

Lek weterynarii Ceren Eyiletlen Postula

**BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) LEVELS RELATION TO
METABOLIC DISTURBANCES AND PLATELET REACTIVITY IN TYPE 2
DIABETES MELLITUS**

**ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY STĘŻENIEM NEUROTROFICZNEGO CZYNNIKA
POCHODZENIA MÓZGOWEGO (BDNF) A ZABURZENIAMI METABOLICZNYMI
ORAZ REAKTYWNOŚCIĄ PŁYTEK U PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 2**

Doctor of Philosophy thesis (equivalent to Doctor of Sciences by thesis)

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie medycyny

Promoter: Professor Dagmara Mirowska-Guzel



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu

Medycznego

Warszawa 2019

SUMMARY IN ENGLISH

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a key role in regulating neuronal outgrowth, differentiation, synaptic connections, and neuronal repair. Apart from involvement in nervous system disorders, several reports documented an association between plasma BDNF and systemic or peripheral inflammatory conditions, such as acute coronary syndrome, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis and diabetes. It has been shown that peripheral BDNF is stored in large amounts in platelets, and plasma BDNF concentrations can be attributed to its release into the plasma from platelets through activation or clotting process. However, the regulation of BDNF in peripheral blood remains poorly understood. Limited studies investigated the impact of different antiplatelet drugs on BDNF concentrations in serum and plasma and on the release of BDNF from platelets in healthy volunteers.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterized by hyperglycemia resulting from impaired insulin secretion, increased hepatic glucose production and decreased peripheral glucose utilization. There are many drugs available to treat T2DM and metformin is one of the most commonly used antidiabetic drug, which reduces glycosylated hemoglobin and fasting glucose concentrations as well as plasma triglyceride and low-density lipoprotein (LDL) levels. Some studies showed the alteration of BDNF levels due to metformin treatment *in vitro*, in animal models, and human studies. However, they were performed in neurodegenerative disease and metabolic syndrome, but not in T2DM. Besides, T2DM is a hypercoagulable state and is associated with platelet hyper-reactivity. The etiology of high platelet reactivity (HPR) is complex, and is related to metabolic disturbances, hyperglycemia, coexisting inflammation, and oxidative stress. In particular, inflammatory and coagulation markers have higher concentrations in T2DM patients, and platelet reactivity is increased in comparison to healthy subjects.

This observational, open-label study enrolled T2DM patients. This was a preliminary, exploratory analysis of the results from the AVOCADO (Aspirin Vs/Or Clopidogrel in Aspirin-resistant Diabetics inflammation Outcomes Study) study. Serum BDNF, hematological, biochemical parameters and platelet reactivity were measured. Blood samples were taken in the morning 2–3 h after the last ASA dose.

The correlation between platelet reactivity and BDNF serum levels in T2DM patients on long-term ASA therapy was analyzed. Additionally, the influence of metformin treatment on BDNF serum

levels in patients with T2DM, as well as biochemical parameters, such as adiponectin were investigated. Patients with BDNF level over the median were younger (65.60 ± 8.956 vs 68.59 ± 8.516), smoked cigarettes more frequently (14.6% vs 4.1 %); they were on metformin treatment more frequently (77.3 % vs 54 %); had higher platelet count (245.81 ± 68.85 10^3 /mm³ vs 206.61 ± 44.48 10^3 /mm³); shorter CADP-CT values (104.88 ± 69.73 sec vs 140.93 ± 86.63 sec); higher triglyceride concentrations (140.73 ± 67.5 vs 121.76 ± 60.49) and higher concentrations of serumTxB2 (0.938 ± 1.59 vs 0.364 ± 0.76). In univariate logistic regression analysis, predictive factors for serum BDNF level above the median were: metformin treatment; current smoking; platelet count; triglyceride concentration; total cholesterol concentration and CADP-CT >74 sec. In multivariate backward stepwise analysis CADP-CT >141 sec; adiponectin concentration >4.22 μ g/ml; total cholesterol and LDL were independently associated with serum BDNF levels above the median.

For the first time, we showed the association between BDNF and metformin treatment in T2DM patients. Additionally, we confirmed the previous results that serum BDNF concentration could be at least in part related to platelet reactivity in T2DM on antiplatelet therapy, as it is shown that serum BDNF levels in T2DM patients with high platelet reactivity was higher than in subjects with normal platelet reactivity despite antiplatelet therapy. Besides, the findings of this study suggest that BDNF may contribute to lipid metabolism as adiponectin levels were significantly related with serum BDNF levels. A prospective, randomized trial would provide definitive evidence of the platelet reactivity status of BDNF in this group of patients and would help to elucidate the underlying mechanisms.

SUMMARY IN POLISH

Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) odgrywa kluczową rolę w neurogenezie, funkcjonowaniu połączeń synaptycznych i neuroregeneracji. Poza wpływem na choroby układu nerwowego, kilka doniesień udokumentowało związek między stężeniem BDNF w osoczu a ogólnoustrojowymi lub obwodowymi stanami zapalnymi, takimi jak ostry zespół wieńcowy, miażdżycza tętnic, reumatoidalne zapalenie stawów i cukrzyca. Wykazano, że obwodowy BDNF jest zmagazynowany w dużych ilościach w płytkach krwi, a stężenia BDNF w osoczu można wyjaśnić jego uwalnianiem w przebiegu aktywacji płytek lub procesie krzepnięcia krwi. Jednakże regulacja BDNF we krwi obwodowej pozostaje słabo poznana. W nielicznych badaniach oceniano wpływ różnych leków przeciwplatekowych na stężenia BDNF w surowicy i osoczu oraz uwalnianie BDNF z płytek krwi u zdrowych ochotników.

Cukrzyca typu 2 (ang. type 2 diabetes mellitus, T2DM) charakteryzuje się hiperglikemią wynikającą z upośledzonego wydzielania insuliny, zwiększoną produkcją glukozy w wątrobie i zmniejszeniem jej obwodowej utylizacji. Istnieje wiele leków dostępnych w leczeniu T2DM, przy czym metformina jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwcukrzycowych, której stosowanie zmniejsza stężenie glikowanej hemoglobiny oraz glukozy na czczo, jak również stężenie triglicerydów i lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Istnieją badania, które wykazały zmianę stężenia BDNF spowodowanych leczeniem metforminą w modelach *in vitro*, zwierzęcych i ludzkich. Jednakże koncentrowały się one na chorobach neurodegeneracyjnych oraz zespole metabolicznym, pomijając bezpośredni wpływ T2DM. Ponadto T2DM jest stanem, w którym występuje skłonność do nadkrzepliwości i wiąże się z nadmierną reaktywnością płytek krwi. Etiologia wysokiej reaktywności płytek krwi (ang. high platelet reactivity, HPR) jest złożona i związana jest z zaburzeniami metabolicznymi, hiperglikemią, współistniejącym stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym. Wśród pacjentów z T2DM markery związane z zapaleniem oraz aktywacją kaskady krzepnięcia osiągają wyższe stężenia, a reaktywność płytek jest u nich większa w porównaniu z osobami zdrowymi.

W obserwacyjnym, otwartym badaniu AVOCADO (Aspirin Vs/Or Clopidogrel in Aspirin-resistant Diabetics inflammation Outcomes Study) włączono pacjentów z T2DM. W surowicy krwi zostały zmierzone parametry hematologiczne, biochemiczne, stężenie BDNF oraz reaktywność płytek krwi. Próbkę krwi pobierano w godzinach porannych, 2-3 godziny po ostatniej dawce ASA.

Analizie poddano związek pomiędzy reaktywnością płytek a stężeniem BDNF w surowicy u pacjentów z T2DM w długotrwałej terapii ASA. Ponadto zbadano wpływ leczenia metforminą na stężenie BDNF w surowicy u pacjentów z T2DM, a także na parametry biochemiczne, takie jak adiponektyna. Pacjenci ze stężeniem BDNF powyżej mediany byli młodsi ($65,60 \pm 8,956$ vs $68,59 \pm 8,516$), częściej palili papierosy (14,6% vs 4,1%); częściej stosowali leczenie metforminą (77,3% vs 54%); mieli większą liczbę płytek krwi ($245,81 \pm 68,85$ 103 / mm³ vs $206,61 \pm 44,48$ 103 / mm³); krótsze wartości CADP-CT ($104,88 \pm 69,73$ sek vs $140,93 \pm 86,63$ sek); wyższe stężenia triglicerydów ($140,73 \pm 67,5$ vs $121,76 \pm 60,49$) i wyższe stężenia TxB2 w surowicy krwi ($0,938 \pm 1,59$ vs $0,364 \pm 0,76$). W jednoczynnikowej analizie regresji logistycznej czynnikami predykcyjnymi podwyższonego stężenia BDNF w surowicy powyżej mediany były: leczenie metforminą; aktualne palenie papierosów; liczba płytek krwi; stężenie triglicerydów; stężenie cholesterolu całkowitego i CADP-CT > 74 s. W wielowymiarowej wstecznej analizie krokowej CADP-CT > 141 s; stężenie adiponektyny > 4,22 µg / ml; cholesterol całkowity i LDL były niezależnie związane ze stężeniami BDNF w surowicy powyżej mediany.

Po raz pierwszy pokazaliśmy związek między stężeniem BDNF i leczeniem metforminą u pacjentów z T2DM. Dodatkowo potwierdziliśmy wcześniejsze doniesienia, że stężenie BDNF w surowicy może być przynajmniej częściowo związane z reaktywnością płytek w T2DM podczas terapii przeciwplatekowej, ponieważ wykazano, że stężenie BDNF w surowicy u pacjentów z T2DM z wysoką reaktywnością płytek były wyższe niż u pacjentów z prawidłową reaktywnością płytek krwi pomimo leczenia przeciwplatekowego. Ponadto wyniki tego badania sugerują, że BDNF może partycypować w metabolizmie tkanki tłuszczowej, ponieważ poziomy adiponektyny były istotnie związane ze stężeniem BDNF w surowicy. Prospektywne, randomizowane badanie dostarczyłoby ostatecznych dowodów na związek pomiędzy reaktywnością płytek krwi oraz stężeniem BDNF w tej grupie pacjentów i pomogłoby wyjaśnić mechanizmy leżące u podstaw tych zależności.

Ceren Ejilekten
Postula
Cezgin

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmakologii
Doświadczalnej i Klinicznej
Centrum Badań Przedklinicznych CePT
Durak
Prof. dr hab. med. Dağmara Mirowska-Guzel