

Streszczenie pracy doktorskiej pt. "Wpływ polimorfizmu genu apolipoproteiny E na procesy regeneracyjne"

mgr Szymon Czauderna

Promotor: dr hab. Agnieszka Łoboda

Postęp w poznawaniu molekularnego podłoża procesów regeneracyjnych, m.in. gojenia ran, niesie nadzieję na opracowanie nowych i skuteczniejszych metod terapeutycznych. Jednym z białek wpływających na tempo gojenia ran u myszy jest apolipoproteina E (APOE). U ludzi APOE występuje w trzech izoformach – APOE2, APOE3 i APOE4, z których najczęściej występującą i neutralną dla zdrowia jest APOE3. Istnieją podobieństwa pomiędzy skutkami występowania allelu *APOE4* u ludzi i nokautem genu *ApoE* u myszy – w obu przypadkach obserwuje się m.in. zwiększony poziom stanu zapalnego. Co więcej, nokaut *ApoE* u myszy upośledza regenerację uszkodzonych aksonów i tempo przywracania krążenia krwi po niedotlenieniu. Do tej pory nie został jednak zbadany wpływ polimorfizmu ludzkiego genu *APOE* na gojenie ran i szybkość przywracania krążenia krwi w kończynach, pomimo przesłanek epidemiologicznych o roli APOE4 w rozwoju choroby tętnic obwodowych, skutkującej niedotlenieniem kończyn dolnych u ludzi.

W ramach niniejszej pracy zbadano wpływ polimorfizmu genu *APOE in vitro* na produkcję czynników uczestniczących w gojeniu ran i ich regulacji przez mikroRNA (miRNA) w mysich makrofagach oraz proces gojenia ran *in vivo* w modelu wyciętych ran pełnej grubości oraz angiogenezy i arteriogenezy *in vivo* w modelu niedokrwienia kończyn tylnych.

Do eksperymentów *in vitro* wykorzystano mysia monocytarno-makrofagową linię RAW264.7 z nadekspresją ludzkich genów *APOE3* lub *APOE4* (odpowiednio komórki APOE3+ i APOE4+). Do doświadczeń *in vivo* wykorzystano myszy transgeniczne typu knock-in, w których mysi gen *ApoE* zastąpiony został ludzkim *APOE3* lub *APOE4* (odpowiednio myszy *APOE^{3/3}* i *APOE^{4/4}*).

Makrofagi koordynują proces gojenia ran poprzez wydzielanie czynników prozapalnych, przeciwzapalnych, czynników wzrostu i proteaz w zależności od etapu gojenia. W modelu *in vitro* makrofagi z ekspresją APOE4 (komórki APOE4+) wykazywały istotnie podwyższony poziom mRNA interleukiny 1 beta (*Il1b*), metaloproteinazy 9 (*Mmp9*), czynnika wzrostu śródbłonna naczyń A (*Vegfa*) i receptora *Cxcr4* w porównaniu do komórek z ekspresją APOE3 (komórki APOE3+). Obniżony poziom transkryptów zaobserwowano dla chemokin *Ccl2* i *Ccl3* i płytkopochodnego czynnika wzrostu B (*Pdgfb*) w komórkach APOE4+ w stosunku do APOE3+. Komórki APOE4+ wydzielały również większe ilości VEGFA i MMP9

oraz IL6, IL10 i NO po stymulacji LPS niż komórki APOE3+. Zaobserwowano również zwiększony poziom CXCR4 na błonie komórek APOE4+ w porównaniu do APOE3+.

W regulacji ekspresji wyżej wymienionych czynników biorą udział między innymi mikroRNA (miRNA). Aby dokładniej zbadać wpływ izoform APOE na ich ekspresję, wykonano profilowanie 709 miRNA. Profilowanie ujawniło 14 i 110 miRNA, których poziom było odpowiednio podwyższony i obniżony w komórkach APOE4+ w stosunku do komórek APOE3+. Weryfikacja poziomu wybranych miRNA wykazała statystycznie istotne obniżenie ekspresji miR-24, miR-222 i miR-365 oraz zwiększenie poziomu miR-125a, miR-146a, miR-155, miR-181b i miR-342 w komórkach APOE4+ w stosunku do APOE3+. Analiza bioinformatyczna profilu miRNA ujawniła potencjalne zmiany w obrębie ścieżek sygnałowych kontrolujących stan zapalny i migrację komórek. Różnice w szybkości migracji zostały potwierdzone w teście zarastania rany – komórki APOE4+ migrowały szybciej niż komórki APOE3+.

Badanie gojenia ran *in vivo* wykazało brak różnic w szybkości ich zamykania pomiędzy badanymi genotypami (kontrola typu dzikiego, zwierzęta $APOE^{3/3}$ i $APOE^{4/4}$). Analiza histologiczna ran w 7. dniu po zranieniu ujawniła tendencję do nasilonej syntezy kolagenu w ranach zwierząt $APOE^{4/4}$ i brak znaczących różnic w formowaniu się nowych naczyń krwionośnych pomiędzy grupami. Co więcej, nie zaobserwowano różnic w poziomie białka VEGFA w obrębie rany.

Pomiar szybkości przywracania przepływu krwi w modelu choroby tętnic obwodowych ujawnił zbliżone tempo przywracania przepływu dla wszystkich badanych genotypów.

Z uzyskanych danych wynika, że genotyp $APOE$ nie wpływa na tempo gojenia ran i przywracania krążenia krwi po niedotlenieniu pomimo obserwowanych różnic w modelu *in vitro*.

Aleqshy's
Fruishes to be de