

## STRESZCZENIE

### STRESZCZENIE

Krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych (CLI) stanowi powszechny problem zdrowotny charakteryzujący się wysokim współczynnikiem zachorowalności i śmiertelności. Zgodnie z danymi w piśmiennictwie średnia zapadalność sięga 220 nowych przypadków na milion mieszkańców rocznie. Współczynnik śmiertelności pacjentów z CLI wynosi 25% w ciągu rocznej obserwacji. U podłoża choroby leży zaburzenie przepływu krwi tętniczej w kończynach, wywołane zmianami miażdżycowymi, a bezpośrednią konsekwencją zwężenia światła naczyń jest niedokrwienie prowadzące do znacznego obniżenia poziomu tlenu w tkankach. Niedotlenienie jest jednym z istotnych bodźców aktywujących powstawanie nowych naczyń krwionośnych w procesie angiogenezy. Pomimo warunków hipoksji panujących w niedokrwionych naczyniach proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych chorych na CLI jest zaburzony. Niedostateczna angiogeneza w odpowiedzi na niedotlenienie jest efektem złożonych mechanizmów obejmujących współdziałanie licznych komórek, czynników wzrostu oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Zahamowanie tworzenia nowych naczyń krwionośnych jest przyczyną postępującej martwicy tkanek i najczęściej prowadzi do amputacji kończyny, a nawet zgonu pacjenta. Problem zaburzonej angiogenezy w chorobie niedokrwiennej kończyn dolnych nie jest w pełni wyjaśniony. Doniesienia literaturowe obejmujące zagadnienia molekularnych aspektów angiogenezy w chorobie CLI są często niespójne, a nawet sprzeczne i świadczą o skomplikowanym charakterze tego procesu. Zastosowanie optymalnego leczenia wymaga dokładnego poznania patomechanizmu choroby, dlatego badania nad czynnikami regulującymi proces angiogenezy stwarzają nowe możliwości terapeutyczne. Wykorzystanie proangiogennych czynników wzrostowych w terapii krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych budzi ogromne nadzieje, ale również niesie ze sobą wiele obaw. Z tego względu uzasadnionym jest podjęcie badań mających na celu zrozumienie molekularnych podstaw rozwoju tej choroby.

Celem pracy była identyfikacja czynników i mechanizmów ich regulacji, które mogą mieć istotne znaczenie w patomechanizmie CLI. Zadaniem niniejszej pracy było określenie poziomu ekspresji genów u chorych na CLI i próba wyodrębnienia tych o potencjalnym znaczeniu dla rozwoju choroby. W dalszych etapach badań zmierzano do ustalenia epigenetycznego mechanizmu regulacji kluczowego czynnika proangiogenego, jakim jest czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (*VEGF-A*).

Model badawczy stanowiły fragmenty tętnic podkolanowych pobrane od pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn podczas amputacji kończyny oraz od zdrowych dawców w czasie pobrań wielonarządowych. Badania *in vitro* przeprowadzono na modelu komórek progenitorowych śródbłonka HEPC-CB.2 oraz komórkach śródbłonka mikronaczyń skóry HSkMEC.

## STRESZCZENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że w tętnicach podkolanowych pacjentów z CLI występuje zwiększona ekspresja czynników prozapalnych takich jak *IFNB1*, *IL12A*, *IFNG* oraz *MMP9* i *TLR1*, *3*, *5*, przy jednoczesnym braku aktywacji kluczowych cytokin proangiogennych m.in. *VEGF-A*, *HGF*, *FGF-2* i *HIF1A* i ich receptorów. W kolejnych etapach pracy podjęto próbę zbadania czy za hamowanie ekspresji *VEGF-A* mogą odpowiadać czynniki epigenetyczne. W tym celu przeprowadzono analizy poziomu ekspresji wybranych mikroRNA oraz zbadano profil metylacji promotora *VEGF-A*. U pacjentów z CLI odnotowano podwyższony poziom mikroRNA 93, 126 oraz 29c, dla których docelowym transkryptem jest *VEGF-A*. Uzyskane rezultaty wskazują, że *VEGF-A* może być także regulowany także na drodze metylacji genomowego DNA. W materiale pobranym od chorych na CLI zaobserwowano podwyższony stopień metylacji promotora *VEGF-A*, ze szczególnym uwzględnieniem fragmentów -1217/-1207 i -1047/-1018, w których odnotowano najwięcej hipermetylowanych miejsc CpG.

W prezentowanej pracy doktorskiej zmierzano również do ustalenia epigenetycznego mechanizmu regulacji genu *VEGF-A* na modelu hodowli komórkowych *in vitro*. Stwierdzono, że komórki progenitorowe śródbłonna HEPC-CB.2 charakteryzują się niższym stopniem globalnej metylacji DNA niż dojrzałe komórki śródbłonna mikronaczyń skóry HSkMEC, a poziom totalnej metylacji DNA znacząco wzrasta podczas niedotlenienia w obydwu liniach komórkowych. Badania nad regulacją epigenetyczną prowadzono przy użyciu inhibitora metylotransferaz DNA - 5aza-2'-deoksycytydyny, donora grup metylowych - S-adenozylometioniny oraz inhibitora deacetylaz histonów - trichostatyny A. Otrzymane wyniki wskazują, że produkcja *VEGF-A* jest zależna od stężenia tlenu oraz poziomu metylacji DNA w komórkach HEPC CB.2 oraz HSkMEC. Ilość mRNA i stężenie wydzielanego przez komórki białka *VEGF-A* wzrasta w wyniku obniżenia poziomu metylacji DNA w warunkach hipoksji. Zahamowanie deacetylacji histonów nie wpływa na poziom ekspresji genu *VEGF-A* w komórkach progenitorowych HEPC-CB.2, natomiast w dojrzałych komórkach śródbłonna HSkMEC powoduje zwiększenie produkcji *VEGF-A* w warunkach hipoksji. Demetylacja DNA w komórkach HEPC-CB.2 prowadzi do obniżenia ekspresji miR93, miR15a, miR16.1 oraz miR17, które są kluczowe dla regulacji ekspresji *VEGF-A*. Analiza profilu metylacji fragmentu promotora *VEGF-A* wykazała, że stopień metylacji promotora nie koreluje z ilością produkowanego *VEGF-A* przez komórki HskMEC i HEPC CB.2. Ponadto zaobserwowano, że obniżenie metylacji genomowego DNA działa stymulująco na właściwości angiogenne komórek HEPC-CB.2 *in vitro*, m.in. poprzez indukcję transkrypcji cytokin proangiogennych takich jak *VEGF-A*, *HGF*, *ANGPT1*. Podsumowując, uzyskane rezultaty świadczą, że do najefektywniejszej aktywacji transkrypcji *VEGF-A* dochodzi w warunkach hipoksji oraz w wyniku zahamowania procesu metylacji DNA. Otrzymane wyniki mają charakter poznawczy i wskazują na nowe kierunki badań, które mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patomechanizmu krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych. Charakterystyka

## STRESZCZENIE

molekularnych i epigenetycznych mechanizmów regulacji *VEGF-A* może umożliwić stworzenie ukierunkowanej, skutecznej terapii CLI.

## STRESZCZENIE