

Przedstawiony Projekt jest wynikiem współpracy zespołów naukowców przy realizacji grantu „Zastosowanie pochodnych poliizoprenoidów jako nośników leków i regulatorów metabolizmu”. Alkohole poliizoprenoidowe (poliprenole i dolichole) są to naturalnie występujące długocząsteczkowe związki, zbudowane z jednostek izoprenowych. Te liniowe polimery pełnią wiele funkcji, takich jak glikozylacja i prenylacja białek, czy związek przepuszczalności błon modelowych. Przedmiotem wyżej wymienionego konsorcjum były kationowe, pół-syntetyczne pochodne alkoholi poliizoprenoidowych (amino-prenole). Uzyskane wyniki potwierdziły, że badane związki posiadają lipofekcyjne właściwości (badania *in vitro* oraz *in vivo*), czyli ułatwiają przenoszenie materiału genetycznego do komórek, stąd pomysł na ich zastosowanie jako składników mieszanin do transfekcji. Dodatkowo potwierdzono także, że badane pochodne nie są toksyczne (badania *in vivo* na szczurach oraz *in vitro* na hodowlach komórkowych).

W proponowanym projekcie chcielibyśmy zbadać dwa równorzędne zagadnienia:

1. Porównanie skuteczności nowo zaprojektowanych mieszanin lipofekcyjnych zawierających kationowe pochodne alkoholi poliizoprenoidowych do komercyjnie dostępnego reagenta do transfekcji w terapii celowanej, w warunkach *in vivo*.

Terapia genowa, która polega na wprowadzaniu obcego materiału genetycznego do komórek pacjenta w celu naprawy lub suplementacji niedoborów powstałych wskutek działania genów odpowiedzialnych za rozwój danej choroby, jest niezwykle obiecującą i szybko rozwijającą się strategią leczenia wielu chorób. **Największym wyzwaniem w stosowaniu terapii genowej jest skonstruowanie efektywnych i przede wszystkim bezpiecznych dla pacjenta nośników materiału genetycznego.** Użycie wektorów wirusowych, uważanych za efektywne w dostarczaniu DNA do komórek gospodarza, obarczone jest ogromnym ryzykiem, ze względu na ich wysoką toksyczność, możliwość wystąpienia stanów zapalnych, czy odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza. Wektory nie-wirusowe są znacznie bezpieczniejsze, jednak te, które zostały do tej pory opracowane charakteryzują się znacznie niższą skutecznością niż wirusowe.

Otrzymanie skutecznych nośników materiału genetycznego wydaje się być niezwykle istotne dla rozwoju wielu dziedzin, takich jak medycyna (opracowanie modeli wielu chorób, nośniki genów w terapii genowej), czy biologia molekularna (badania funkcji genów, regulacji ich ekspresji i/lub aktywności białek).

2. Zbadanie czy lokalnie zwiększony poziom ekspresji genu odpowiedzialnego za syntezę VEGF-A w rdzeniu nerki (obszarze predysponującym do rozwoju nadciężnicy) obniży ciśnienie krwi i zmniejszy spontanicznie nadciężniczość (SHR)?

W proponowanym projekcie chcielibyśmy zastosować innowacyjne mieszaniny lipofekcyjne, oparte na amino-prenolach, do wprowadzenia plazmidowego DNA kodującego czynnik wzrostu śródbłonnka naczyńnianego typu A (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor) oraz białko reporterowe GFP (ang. Green Fluorescence Protein) pozwalające na jego wizualizację u szczurów spontanicznie nadciężniczo (SHR) oraz zbadać jak zwiększony poziom ekspresji VEGF-A wpływa na ciśnienie krwi i tętno oraz hemodynamikę i czynność nerek.

Choroba nadciężnicza stanowi bardzo poważny, ogólnoustrojowy problem ze względu na ogromną częstość występowania oraz towarzyszące jej ryzyko występowania wielu chorób towarzyszących, takich jak przewlekła choroba nerek, choroba niedokrwienna serca, lecz także udar, czy schorzenia mózgowo-naczyniowe. **Znajomość źródeł powstania patogenezy nadciężnicy jest niepełna, co ogranicza możliwości precyzyjnej diagnozy a więc i przyczynowej terapii.**

Wyniki wielu ostatnich badań wskazują na istotną rolę VEGF w przeciwdziałaniu chorobie nadciężniczej. VEGF jest ważnym regulatorem różnych funkcji fizjologicznych, wpływając na procesy angiogenezy, proliferacji i limfangiogenezy. Pierwsze doniesienia dotyczące związku VEGF i nadciężnicy pojawiły się wraz z wprowadzeniem jego inhibitorów do terapii antynowotworowej. Neoangiogeneza jest kluczowym zjawiskiem umożliwiającym wzrost i występowanie przerzutów nowotworów, stąd jej inhibitory (w tym blokery receptora sygnałowej VEGF) zostały niedawno wprowadzone do terapii przeciwnowotworowej. Najczęściej występującym skutkiem ubocznym podczas leczenia inhibitorami VEGF jest nadciężniczość i tętno, ale jego mechanizm nadal jest nie do końca poznany. Wskazuje się, że VEGF reguluje śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS) odpowiedzialną za syntezę tlenku azotu (NO), a jego niedostateczna produkcja prowadzi do systemowego skurczu naczyń i wzrostu ciśnienia krwi. Jako kolejny przyczyną wymienia się zmniejszenie liczby małych tętnic i tętniczek, pojawiające się po leczeniu inhibitorami VEGF-A. U dorosłych z wysokim ciśnieniem krwi (szczególnie z genetycznymi predyspozycjami do nadciężnicy) zaburzone mikrokrążenie (ang. microvascular rarefaction) występuje powszechnie na skutek upośledzonego procesu angiogenezy.

Przesłanki do stworzenia projektu są także wyniki badań własnych przeprowadzonych w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych, w których stwierdzono obniżony przepływ krwi oraz zmniejszoną immunoreaktywność VEGF-A w rdzeniu nerki u szczurów spontanicznie nadciężniczo, w porównaniu do szczurów normotensyjnych. Znaczna liczba opisanych mechanizmów protekcyjnych, szczególnie lokalizowanych w rdzeniu nerki, wiadczą o istotnym udziale tego obszaru w kontroli ciśnienia tętniczego. Wydaje się więc, że zmniejszona immunoreaktywność VEGF-A w rdzeniu nerki może być czynnikiem predysponującym do rozwoju nadciężnicy.

Próba wyjaśnienia, w badaniach podstawowych, czy wzmocnienie ekspresji VEGF-A w rdzeniu nerki zwiększy jego ukrwienie i obniży ciśnienie krwi wydaje się być niezwykle obiecujące dla rozwoju wiedzy o tym złożonym procesie chorobowym.

Planowane badania

W niniejszym projekcie planujemy skonstruowanie odpowiedniego plazmidu kodującego białko VEGF-A oraz białko reporterowe GFP, a następnie podanie go szczurom spontanicznie nadciężniczo SHR, u których obok nośnika dostępnego komercyjnie, innowacyjnych mieszanin do transfekcji opartych na amino-prenolach.

W pierwszym etapie oceniana będzie efektywność transfekcji na podstawie intensywności fluorescencji wprowadzonego białka GFP. W tym celu badane mieszaniny zawierające plazmidowe DNA kodujące jedynie GFP, zostaną podane szczurom w układzie dotętniczym w okolicę nerek. Szczury zostaną wybudzone i po upływie 48 h odpowiednie narządy zostaną pobrane przy użyciu (nerki, serce, wątroba). Po zhomogenizowaniu części tkanek efektywność transfekcji będzie oceniana metodą cytometrii przepływową i porównywana do skuteczności komercyjnie dostępnych preparatów.

W kolejnym etapie planujemy podanie wybranych lipofektantów z plazmidowym DNA kodującym białko VEGF-A oraz białko reporterowe GFP wprost do rdzenia nerek szczurów SHR. Szczury zostaną upijone (narkoza krótkoterminowa), a następnie za pomocą specjalnych mikrokaniuli umieszczonych w rdzeniach obu nerek zostaną podane odpowiednie lipofektanty wraz z DNA. Taka celowana terapia wydaje się być bardzo korzystna, ponieważ chcielibyśmy wzmocnić ekspresję VEGF-A wyłącznie w rdzeniu nerki – obszarze, który wydaje się kluczowy dla regulacji ciśnienia krwi. Szczury zostaną wybudzone i obserwowane przez 7, 14 oraz w kolejnej grupie przez 21 dni. Planowane są cotygodniowe obserwacje w klatkach metabolicznych, połączone ze zbiorami moczu; raz w tygodniu będzie pobierana próbka krwi. Ciśnienie krwi we wszystkich grupach szczurów będzie monitorowane metodą telemetryczną. Po doświadczeniach chronicznych planujemy u tych zwierząt przeprowadzić krótkie obserwacje hemodynamiki i czynności nerek w upijonym. Pozostała część szczurów będzie upijona i odpowiednie tkanki będą pobrane w celu oceny efektywności transfekcji na podstawie intensywności fluorescencji białka GFP oraz do badań histologicznych, morfometrycznych, biochemicznych.

W zebranych materiale (tkanki, mocz, krew) zamierzamy oznaczyć różnego typu substancje zaangażowane w kontrolę ciśnienia krwi (stężenie jonów, tlenku azotu), markery uszkodzenia nerek (mikroalbuminuria, kreatynina), jak i sam poziom VEGF-A (ilościowo i jakościowo). Ze względu na angiogenną aktywność VEGF-A planujemy oszacować zmiany w unaczynieniu poszczególnych narządów (przy użyciu mikroskopu konfokalnego i znakowania specyficznego dla angiogenezy).

W ostatnim etapie podejmiemy próby długotrwałego wzmocnienia ekspresji VEGF-A przy użyciu wyselekcjonowanej mieszaniny do transfekcji podanej za pomocą mini-pomp osmotycznych, wprost do rdzenia nerki szczurom SHR. Takie infuzje umożliwiają zestawy firmy Alzet® (ALZET Brain Infusion Kits) do ciągłych infuzji roztworów.

Zaproponowane w niniejszym Projekcie interdyscyplinarne badania nad innowacyjnymi nośnikami materiału genetycznego w celu lokalnego zwiększenia ekspresji VEGF-A w rdzeniu nerki i sprawdzenia jego wpływu na ciśnienie krwi i tętna szczurów SHR, w razie powodzenia, nie tylko mogą pomóc w całkowitym zrozumieniu podstawowych mechanizmów zróbnionej patogenezy nadciśnienia, ale również otrzymanie skutecznego narzędzia w postaci efektywnych mieszanin do transfekcji, co pozwoli na rozwój wielu dziedzin takich jak biologia molekularna czy medycyna.