

Miażdżycę jest przewlekłą chorobą zapalną, zapoczątkowaną przez odkładanie się w ścianie naczyń lipoprotein zawierających apolipoprotein B, które ulegają patologicznym modyfikacjom oraz degradacji, jako DAMPs (ang. damage-associated molecular patterns) inicjują i nasilają reakcję zapalną w ścianie naczyń. Uczestniczą w niej trzy główne typy komórek: komórki różniokształtne, komórki mięśni gładkie i monocyty. Wywodzą się z monocytów makrofagi inicjują procesy uszkodzenia i śmierci komórek, produkując cząsteczki mediatorów uwłamywających za kluczowe motory napędowe aterogenezy oraz progresji zmian w kierunku niestabilnych blaszek miażdżycowych.

Postępującym od lat dziesięcioleciom badaniom nad miażdżycą zawoocował wdrożeniem do terapii wielu leków np. leków obniżających poziom cholesterolu we krwi (statyn), które wyraźnie poprawiły obraz kliniczny pacjentów, przedłużyły czas życia i polepszyły jego jakość. W tym problemem klinicznym pozostaje jednak wciąż znaczna grupa chorych, która nie w pełni odpowiada na leczenie standardowe. Dla takich chorych potrzebne są nowe scenariusze farmakoterapii, oparte na innych mechanizmach działania.

Dla takich chorych potrzebne są nowe scenariusze farmakoterapii, oparte na innych mechanizmach działania, prowadzące do zmniejszenia progresji aterogenezy lub jej modyfikacji w kierunku tworzenia się stabilnych zmian miażdżycowych. Założeniem takiego podejścia mogłaby być strategia farmakologicznego modulowania funkcji makrofagów poprzez hamowanie w nich aktywności dipeptydyloproteaz (DPP).

Najlepiej znanym przedstawicielem rodziny tych białek jest DPPiV, której inhibitory weszły do klinicznego zastosowania w leczeniu cukrzycy typu drugiego. Pozostałe białka rodziny obejmują izoformy DPP8 i DPP9 oraz białko FAP (ang. fibroblast activation protein), których funkcje i biologiczne znaczenie w komórce pozostają w większości nieznane. Istotnie, DPP8/9 podlegają silnej ekspresji w obszarach blaszek miażdżycowych bogatych w makrofagi, odpowiadając za większość aktywności rodziny DPP. Zahamowanie DPP8/9 zmniejsza aktywność pro-zapalnego fenotypu makrofagów (M1), przy braku wpływu na komórki o fenotypie M2. Zwiększa również podatność makrofagów na bodźce wywołujące ich kontrolowaną, „niezapalną” śmierć - apoptozę. Zarówno hamowanie aktywności makrofagów M1, jak i zwiększenie ich bezpiecznego usuwania ze zmian miażdżycowych mogą przekładać się na przeciwdziałanie aterogenezie i/lub zwiększenie stabilności blaszek miażdżycowych. Celem prezentowanego projektu jest przede wszystkim najpełniejsze zbadanie roli peptydaz DPP8/9 w regulowaniu funkcji makrofagów *in vitro*, oraz zbadanie potencjału przeciwmiażdżycowego farmakologicznego hamowania DPP8/9 *in vivo* w eksperymentalnym modelu miażdżycy (u myszy apoE-knockout).

W niniejszym projekcie proponujemy zastosowanie najnowszych technik badawczych do nowatorskiego i jak najszerszego zbadania roli dipeptydyloproteaz 8/9 w makrofagach. Wykorzystamy metody proteomiki ilościowej (iTRAQ) do zbadania wpływu inhibitora DPP8/9 (związek 1G244) na jakościowe i ilościowe zmiany w zakresie proteomu makrofagów, jak i wszystkich białek wydzielanych przez makrofagi do medium hodowlanego (sekretom). Współczesne metody proteomiki, oparte na chromatografii cieczowej i spektrometrii mas pozwalają na identyfikację i analizę ilościową setek, a nawet tysięcy białek jednocześnie. Potencjał tych nowoczesnych metod analizy skomplikowanych mieszanin białek dalece wykracza poza możliwości wykorzystywanych często analiz celowanych (Western blot, ELISA), ograniczonych zwykle do kilkunastu znanych markerów (np. cytokiny). Identyfikacja zmian w ekspresji tysięcy białek w komórce pozwala na znaczne poszerzenie obszaru analizy i płynących z niego wniosków. Dodatkowo wykorzystamy metodę TAILS do proteomicznej oceny aktywności DPP8 i 9 poprzez zbadanie ich naturalnych substratów. Badania poszerzą dotychczasową charakterystykę morfologii blaszek miażdżycowych oraz fenotypu i aktywności makrofagów metodami immunohistochemii, cytometrii przepływową, immunoblotingu i RT-PCR.