

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Nasz projekt ma na celu zbadanie wpływu eksendyny-4, leku stosowanego w leczeniu cukrzycy, na funkcje fibroblastów (komórek tkanki łącznej biorących udział w procesie gojenia ran) wyosobnionych ze skóry zwierząt z cukrzycą. Cukrzyca typu 2 jest chorobą cywilizacyjną, która dotyczy szybko wzrastającej liczby osób zarówno w Polsce jak i na świecie. Jednym z najgroźniejszych zaburzeń jest tzw. stopa cukrzycowa, która jest skutkiem nieprawidłowego gojenia się zranienia skóry stopy, co czasem skutkując amputacją. Kluczową rolę w tworzeniu blizny odgrywają komórki tkanki łącznej – fibroblasty. Wytwarzają one składniki tzw. macierzy zewnątrzkomórkowej, np. kolagen i glikozaminoglikany. Po zranieniu fibroblasty przemieszczają się (migrują) do wnętrza rany, namnażają się (proliferyją) i zaczynają wytwarzać kolagen i glikozaminoglikany. Przebieg gojenia jest kontrolowany m.in. przez enzymy - metaloproteinazy i ich tkankowe inhibitory (związki hamujące aktywność) oraz białko C-reaktywne (CRP). Metaloproteinazy rozkładają białka macierzy, które zastępowane są przez inne białka wytwarzane przez fibroblasty. CRP hamuje gojenie ran. Ważną rolę regulacyjną w gojeniu ran odgrywają czynniki wzrostu, np. czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), który pobudza aktywność komórek w trakcie gojenia. Innymi czynnikami kontrolującymi gojenie są cząsteczki mikroRNA. Cukrzyca upośledza wszystkie funkcje fibroblastów i w sposób niekorzystny dla procesu gojenia zmienia aktywność metaloproteinaz, ich inhibitorów, białka CRP i wytwarzanie VEGF oraz mikroRNA. Zaburzenia te są najważniejszą przyczyną upośledzonego gojenia ran, ale dotychczas nie odkryto w pełni zadowalającej metody poprawienia czynności fibroblastów. Czynnikiem usprawniającym funkcje fibroblastów może być hormon jelitowy, tzw. peptyd glukagonopodobny-1 (GLP-1), którego obecność wykryto w skórze. Związki podobne do tego hormonu, takie jak eksendyna-4, używane są w leczeniu cukrzycy. Wiadomo jednak również o korzystnym wpływie GLP-1 i eksendyny-4 na przyspieszenie gojenia owrzodzeń skóry u osób z cukrzycą, co może zachodzić przez wpływ na czynność fibroblastów. Dotychczas nie badano jednak wpływu eksendyny-4 na czynność fibroblastów skóry w warunkach cukrzycy. Dlatego celem planowanych badań jest sprawdzenie w jaki sposób eksendyna-4 wstrzykiwana szczurom z wrodzoną cukrzycą typu 2 zmienia istotne dla procesu gojenia ran funkcje fibroblastów uzyskanych ze skóry tych zwierząt i hodowanych następnie poza organizmem (metoda ex vivo). Szczurom wszczepione zostaną siatki polipropylenowe podobne do tych, które stosuje się w chirurgicznym leczeniu przepukliny u ludzi. Następnie będą one otrzymywały codziennie iniekcje eksendyny-4 lub 0.9 % roztworu NaCl (szczury kontrolne) przez 4 tygodnie. W tym czasie mierzona będzie ilość pokarmu zjedanego przez każde zwierzę w ciągu doby, masa ciała i stężenie glukozy we krwi. Po 4 tygodniach szczury zostaną uśpione, a siatki przerośnięte tkanką łączną zawierającą fibroblasty zostaną wyosobnione. Wyizolowane fibroblasty będą namnażane w celu wykorzystania w dalszych badaniach. W dodatkowej serii badań zajmiemy się mechanizmami działania eksendyny-4 na ludzkie fibroblasty pobrane od ludzi z cukrzycą, tzn. zidentyfikujemy receptor, przez jaki działa na te komórki eksendyna-4, sprawdzimy, jakie związki wytwarzane wewnątrz komórek fibroblastów pośredniczą w działaniu tego hormonu na poszczególne funkcje fibroblastów oraz zbadamy wpływ eksendyny-4 na ekspresję mikroRNA regulujących gojenie. Wiedza o tych mechanizmach pozwoli stwierdzić, czy eksendyna-4 mogłaby w przyszłości znaleźć zastosowanie nie tylko jako lek przeciwdziałający hiperglikemii ale też wspomagający utrudnione leczenie ran u ludzi chorych na cukrzycę. W obu seriach badań porównamy zdolność fibroblastów do syntezy kolagenu i glikozaminoglikanów. Używając specjalnej komory podzielonej porowatą membranę (błoną) na część górną i dolną zbadamy, czy eksendyna-4 zmienia zdolność migracji fibroblastów przez tę membranę. Dzięki hodowli fibroblastów z przeciwciałami wiążącymi się z naturalnymi substancjami kontrolującymi procesy „samobójczej” śmierci komórek (apoptozy) i naprawy DNA, wytwarzanymi przez komórki, w oparciu o analizę próbek w cytometrze przepływowym, określimy czy eksendyna-4 wpływa na apoptozę i procesy naprawcze struktury DNA fibroblastów. Metodami biologii molekularnej (tzw. reakcja odwrotnej polimerazy w czasie rzeczywistym) zbadamy, czy eksendyna zmienia ekspresję (aktywność) genów metaloproteinaz, ich tkankowego inhibitora lub czynnika VEGF w hodowlach fibroblastów. Określimy również poziom metaloproteinazy, jej inhibitora i białka CRP we krwi szczurom, aby zbadać, czy eksendyna-4 przywraca korzystne stężenie tych substancji zaburzone przez cukrzycę. W drugiej serii doświadczeń in vitro (wykonanej na komórkach hodowanych poza organizmem), wykorzystując fibroblasty uzyskane od ludzi z cukrzycą zajmiemy się wyjaśnieniem wewnątrzkomórkowych mechanizmów bezpośredniego działania eksendyny-4 na fibroblasty. Pod tym kątem zbadany zostanie wpływ eksendyny na wszystkie funkcje fibroblastów, tj. wytwarzanie kolagenu i glikozaminoglikanów, żywotność, migrację i proliferację oraz ekspresję wybranych cząsteczek mikroRNA kontrolujących fibroblasty. Dzięki temu sprawdzimy, czy czynniki te pośredniczą we wpływie eksendyny-4 na ww. funkcje fibroblastów i uzyskamy dodatkowe informacje na temat sposobu działania tego leku na komórki. Wyniki naszych doświadczeń wskażą, czy eksendyna-4 poprawia czynność fibroblastów w warunkach cukrzycy i czy mogłaby znaleźć zastosowanie w polepszeniu upośledzonego gojenia ran u osób chorych na cukrzycę.