

Zaburzenia angiogenezy w dystrofii mięśniowej Duchenne'a - rola oksygenazy hemowej-1 i statyn

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD), recesywna choroba sprzężona z chromosomem X, dotycząca 1 na 3500 chłopców, jest najczęściej spotykaną i jedną z najcięższych form dystrofii mięśniowej. Opisana po raz pierwszy przez francuskiego neurologa Guillaume'a Benjamina Amada Duchenne'a w roku 1860, do tej pory jest chorobą nieuleczalną. Choroba dotyczy chłopców, u których pierwsze objawy zauważalne dla otoczenia pojawiają się najczęściej w momencie rozpoczęcia samodzielnego chodzenia, ale choroba szybko postępuje z wiekiem i w okresie między 10 a 14 rokiem życia chorzy przestają w ogóle samodzielnie chodzić, by najczęściej w drugiej/trzeciej dekadzie życia doszło do całkowitej niewydolności oddechowo-krążeniowej na skutek atrofii mięśni oddechowych.

DMD spowodowana jest mutacjami w genie kodującym białko dystrofinę, stanowiącym „szkielet” komórki mięśniowej, zapewniającym prawidłowe połączenie między cytoszkieletem aktynowym włókna mięśniowego a białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. W przypadku braku dystrofiny dochodzi do ciągłej aktywacji komórek satelitarnych mięśni szkieletowych (czyli komórek macierzystych, które w normalnych warunkach uaktywniają się np. przy uszkodzeniu lub trenowaniu mięśnia), indukcji procesów zapalnych, włóknienia czy nasilenia stresu oksydacyjnego. Wszystkie te procesy prowadzą do postępującej utraty masy mięśniowej i upośledzenia funkcji mięśni. Wyniki niektórych badań sugerują, że również zaburzenia procesu tworzenia naczyń krwionośnych czyli angiogenezy, mogą wpływać na rozwój DMD. U chorych na DMD komórki śródbłonna, budujące naczynia krwionośne, również są pozbawione dystrofiny i wykazują wadliwe funkcje angiogenne.

W ramach projektu pragniemy zweryfikować hipotezę, iż modulacja angiogenezy przez cytoprotekcyjny enzym, oksygenazę hemową-1 (HO-1) oraz statyny, może mieć terapeutyczne działanie w przebiegu DMD. HO-1 ma dobrze udokumentowane działanie anti-apoptotyczne, anti-zapalne i antyoksydacyjne, a z drugiej strony, pozytywnie reguluje procesy angiogenne i produkcję czynników nasilających tworzenie naczyń krwionośnych. Nasze badania pokazują, że białko to jest również ważne w biologii komórek mięśniowych. Co ciekawe, statyny, leki stosowane powszechnie do obniżenia poziomu cholesterolu, wykazują wielotorowe działanie i jak pokazały nasze badania, mogą stymulować procesy angiogenezy i regulować ekspresję HO-1.

Aby zbadać postawione hipotezy, przeprowadzimy doświadczenia na mysim modelu choroby DMD czyli myszach *mdx*, pozbawionych ekspresji dystrofiny. Zastosujemy również unikatowy model myszy tzw. podwójnych nokautów - myszy pozbawionych równocześnie genu HO-1 oraz dystrofiny. Część doświadczeń będzie wykonana na linii komórkowej mioblastów zmodyfikowanych genetycznie, w których doprowadzimy do nadekspresji lub wyciszenia ekspresji HO-1. W celu sprawdzenia podobnych zależności w modelu ludzkim, proponujemy innowacyjną strategię pozyskania indukowanych komórek pluripotencjalnych (iPSC) z fibroblastów osób zdrowych oraz pochodzących od pacjentów cierpiących na DMD (fibroblasty takie są komercyjnie dostępne) a następnie ich zróżnicowanie do komórek śródbłonna, pericytów oraz komórek mięśni szkieletowych. W ramach badań planujemy zastosowanie kilku modeli angiogennych *in vitro*, m.in. testu tworzenia tubul na specjalnym podłożu Matrigel czy testu sferoidalnego jak również *in vivo*, wykorzystując model niedokrwienia kończyny tylnej myszy czy wszczepienia do myszy komórek śródbłonna/pericytów uzyskanych z komórek iPSC i badanie ich potencjału angiogennego.

Wynikiem realizacji projektu będzie dokładna analiza roli HO-1 oraz statyn w modulacji procesu angiogenezy w chorobie DMD. Wierzimy, że zaplanowane badania pozwolą na uzyskanie odpowiedzi na wiele nurtujących pytań i mogą przyczynić się do szybszego poznania nowych sposobów terapii tej dotychczas nieuleczalnej choroby. Zrozumienie tych skomplikowanych zależności będzie możliwe dzięki wszechstronnej i dotychczas nie stosowanej na taką skalę strategii badawczej z wykorzystaniem zwierząt pozbawionych określonych genów, terapii genowej oraz indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych.