

Sepsa, zwana także posocznicą, rozwija się w czasie ogólnoustrojowego zakażenia, jest stanem bezpośredniego zagrożenia życia. W czasie sepsy dochodzi do intensywnej odpowiedzi immunologicznej, prowadzącej do upośledzenia funkcjonowania tkanek i dysfunkcji narządów, kończącej się wstrząsem i zgonem. W związku z powyższym, sepsa nie stanowi samodzielnej jednostki chorobowej, ale jest określana jako zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (ang. Systemic Inflammatory Response Syndrome, w skrócie SIRS), wywołany zakażeniem. Posocznica jest wywoływana czynnikami pro-zapalnymi, uwalnianymi ze ściany komórek bakteryjnych. W zależności od patogenu wywołującego zakażenie może być to cząsteczka lipopolisacharydu (LPS) bądź cząsteczka lipidu A, stanowi one odpowiednio główne endotoksyny bakterii Gram-ujemnych lub kwasu lipotechojowego (LTA) z bakterii Gram-dodatnich. Powyższe czynniki prowadzą do uwalniania tzw. modulatorów immunologicznych, czyli substancji, które na poziomie komórkowym odpowiedzialne są za rozwój ogólnoustrojowej reakcji zapalnej. Wykazano, iż wśród lokalnych stanów zapalnych cząstki prowadzących do uwalniania patogenów do krwi i rozwoju posocznicy znajdują się: infekcje płuc, zakażenia jamy brzusznej, zakażenia nerek, oraz jamy ustnej/przewodu pokarmowego. Posocznica to cząstka przyczyna zgonów na szpitalnych oddziałach intensywnej opieki medycznej, hematologii onkologicznej oraz geriatricznej. Szacuje się, iż śmiertelność u pacjentów waha się od 20 do 40 proc. Dane statystyczne wskazują, iż cząstka występowania sepsy rośnie. Przyczyną tego jest starzenie się populacji, zwiększone występowanie chorób przewlekłych i zaburzenia odporności oraz zbyt częste stosowanie antybiotyków, prowadzące do występowania opornych szczepów bakterii i grzybów. Śmiertelność w przypadku wystąpienia wstrząsu septycznego jest wysoka, a leczenie długotrwałe i kosztowne, dlatego też sepsa jest poważnym problemem klinicznym.

**W związku z powyższym, istnieje realna potrzeba poszukiwania nowych substancji, cechujących się szerokim spektrum działania hamującego tego biologicznie czynników pro-zapalnych uwalnianych z patogenów i możliwość ich zastosowania ich podczas terapii sepsy.** Dostępne dane literaturowe wskazują na duży potencjał zastosowania gelsoliny osoczowej (pGSN). pGSN występuje w naszym organizmie w różnych płynach ustrojowych, a jej stężenie we krwi w warunkach fizjologicznych waha się w przedziale od 200 - 300 µg/ml. Gelsolina występuje także we wnętrzu komórek i należy do rodziny białek wiążących aktynę, mających zdolność wiązania i skracania filamentów aktynowych (aktyna to dominujące białko cytoplazmy). GSN buduje 730 aminokwasów, które są zorganizowane w sześć identycznych segmentów G1-G6, przy czym każda z nich spełnia odmienne funkcje. Forma cytoplazmatyczna gelsoliny poprzez oddziaływanie z filamentami aktynowymi, reguluje organizację struktury cytoszkieletu, warunkując zmiany jego kształtu, chemotaksję i wydzielanie. Gelsolina ma zdolność do reagowania z mediatorami lipidowymi. Udowodniono jej preferencyjne działanie z LTA, LPS, SIP i PAF, co prawdopodobnie związane jest z podobieństwem strukturalnym tych cząstek do czynników regulujących jej aktywność wewnątrzkomórkową tj.: fosfatydyloinozitolu (PIP, PIP2) oraz kwasu lizofosfatydowego (LPA). Badania wykazały, iż w przebiegu różnych chorób charakteryzujących się bezpośrednim zagrożeniem życia lub przewlekłym procesem zapalnym dochodzi do obniżenia stężenia gelsoliny we krwi, co w konsekwencji prowadzi do dysfunkcji tzw. buforu aktynowego. Najlepiej udokumentowanym przykładem zmniejszenia osoczowego stężenia gelsoliny jest zespół ostrej niewydolności oddechowej, w przebiegu której, jej stężenie spada poniżej 30% w porównaniu z wartościami stwierdzanymi u osób zdrowych. Zmniejszenie ilości gelsoliny we krwi zaobserwowano również w przebiegu sepsy, zawału serca i poważnych urazów oraz ciężkich pasożytów krwi (np. malarii). Dlatego cząstka podkreślaną jest rola tego białka jako markera prognostycznego w stanach charakteryzujących się bezpośrednim zagrożeniem życia. Ostatnie badania na modelu zwierzęcym wykazały, iż zastosowanie egzogennej gelsoliny podczas szoku septycznego zmniejsza śmiertelność zwierząt. Nieznany jest jednak mechanizm tego działania. Brak jest również danych dotyczących dystrybucji GSN w różnych kompartmentach ustrojowych w stanie zdrowia i przebiegu szoku septycznego, co pozwoliłoby poznać bliżej mechanizm działania tego białka. Zależności odniósłoby natomiast poziom gelsoliny we krwi podczas stanów krytycznych wskazuje na potencjalną użyteczność tego białka jako markera prognostycznego, jak również możliwość terapeutycznego uzupełnienia gelsoliny celem zminimalizowania objawów i konsekwencji towarzyszących powyższym stanom klinicznym.

**Celem projektu jest poznanie mechanizmu działania pGSN i pochodnych jej peptydów w aspekcie kontroli i hamowania rozwoju stanu zapalnego (właściwość immunomodulująca i przeciwzapalna), aktywności bakteriobójczej w przebiegu sepsy, w której dochodzi do obniżenia stężenia GSN we krwi obwodowej.** Planowane badania umożliwią identyfikację ligandów gelsoliny, innych niż dotychczas poznane, w próbkach krwi pobranej od pacjentów zdrowych i pacjentów z rozpoznaną sepsą. Ponadto, zbadane zostanie działanie immunomodulujące gelsoliny i jej pochodnych w hodowli komórek rdzłonka, zawiesinie izolowanych komórek neutrofilii krwi obwodowej, poprzez ocenę aktywności szlaków sygnałowych (NF- $\kappa$ B) oraz ocenę wydzielania mediatorów stanu zapalnego w obecności produktów bakterii (LPS, LTA, inaktywowana termicznie zawiesina *E. coli* lub *S. aureus*), jak i wyizolowanego z krwi pacjentów z sepsą precipitatu pGSN. Ocenione zostanie działanie bakteriobójcze komórek śródprzewodowych (zdolnych do fagocytozy, czyli pochłaniania mikroorganizmów) wynikające z aktywacji enzymu, tzw. syntazy tlenku azotu typu 3 (NOS3) oraz działanie przeciwzapalne (np. produkcja mediatorów reakcji zapalnej). Zakłada się, że właściwość immunomodulująca gelsoliny znacznie ograniczy stan zapalny, leżący u podstawy wstrząsu septycznego. Zaproponowane powyżej badania pozwolą także na poznanie mechanizmu działania gelsoliny oraz identyfikację i analizę biochemiczną ligandów wiązanych przez to białko. Przeprowadzenie doświadczeń na organizmie żywym (szczury i myszy), pozwoli na potwierdzenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej in vivo egzogennej gelsoliny w leczeniu szoku septycznego wywołanego przez wybrane bakterie, a także w obecności bakteryjnego LPS. Ocena biodystrybucji narządowej pozwoli na poznanie parametrów farmakologicznych GSN, co jest niezbędne przy rozpatrywaniu jej jako czynnika terapeutycznego. Dodatkowo, w związku z obserwowanym w ostatnim czasie rozwojem metod terapeutycznych (DDS – ang. Drug Delivery System) i diagnostycznych (techniki separacyjne i obrazowanie), proponujemy również zastosowanie nanotechnologii, w niniejszym projekcie ocenione zostanie także potencjał wykorzystania nanocząstek magnetycznych, jako transporterów gelsoliny i jej pochodnych.

**Ponieważ zasadniczym elementem DDS jest użycie odpowiedniego nośnika, który nie powinien być toksyczny, powinien dobrze wiązać lek, ale też umożliwić uwolnienie go w docelowym miejscu w ściśle określonym miejscu w zakresie terapeutycznym, można założyć, że wykorzystanie nanocząstek jako nośnika GSN znacznie zwiększy efektywność jej**

**Łączenia z cząsteczkami LPS/LTA, poprzez modyfikacje rozpuszczalności, czasu retencji w ustroju i przechodzenie przez bariery biologiczne. Ulepszona w ten sposób biodostępność może zwiększyć efektywność terapii GSN i jej pochodnymi/ lub być wykorzystana do tworzenia nanosystemów do puryfikacji płynów ustrojowych z LPS/LTA.**

Badania proponowane w niniejszym projekcie zaplanowane są na okres 3 lat. W tymże okresie zastosowany zostanie szereg metod biochemicznych i fizykochemicznych, które umożliwi realizację założonych celów. W pierwszej kolejności przeprowadzone zostaną badania mające na celu poszukiwanie nowych ligandów łączących gelsoliny. Powyższe zostanie osiągnięte poprzez wyizolowanie i oczyszczanie GSN z próbek krwi od osób zdrowych i z rozpoznaniem wstrząsem septycznym oraz ze zwierzęcej surowicy z wykorzystaniem technik chromatograficznych. Identyfikacja ligandów GSN zostanie przeprowadzona za pomocą zaawansowanych technik obejmujących analizy z użyciem spektrometrii mas (MS), magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektroskopii UV i w podczerwieni (FT-IR). Właściwości immunomodulujące gelsoliny oraz jej fragmentów w formie wolnej i zimmobilizowanej na magnetycznym nośniku zostaną zbadane wykorzystując techniki biologii molekularnej (mikromacierze, ELISA, elektroforeza). Efekt bakteriobójczy gelsoliny będzie oceniony z wykorzystaniem testu przeżywalności komórek patogenów w obecności wzrastającego stężenia tego białka (zliczanie ilości uformowanych kolonii bakterii). Dodatkowo zbadany zostanie wpływ GSN na proces fagocytozy w hodowli ludzkiej linii monocytów U937 za pomocą technik mikroskopowych. Celem oceny parametrów farmakologicznych gelsoliny, białko zostanie upochodnione cząsteczką barwnika (DYE-800CW) emitującego fluorescencję. Biodystrybucja GSN-DYE-800CW zostanie oceniona przy użyciu obrazowania w bliskiej podczerwieni rejestrującego zmiany intensywności wieczenia w czasie.

**Planowane badania umożliwią identyfikację ligandów gelsoliny, innych niż dotychczas poznane, w próbkach krwi pobranej od pacjentów zdrowych i pacjentów z rozpoznaniem sepsu. Ponadto, projekt pozwoli na identyfikację mechanizmu działania pGSN obejmującego aktywność immunomodulującą, przeciwzapalną i bakteriobójczą. Zakłada się, że właściwości immunomodulujące gelsoliny znacznie ograniczą odpowiedź zapalną, leżą u podstawy wstrząsu septycznego. Zapropozowane powyżej badania pozwolą także na poznanie mechanizmu działania i parametrów farmakologicznych gelsoliny oraz identyfikację i analizę biochemiczną ligandów wiązanych przez to białko, przyczyniając się tym samym do zapoczątkowania rozwoju nowych, celowanych metod terapeutycznych w stanach zagrożenia życia.**