

## ***Streszczenie***

Gojenie ran to ściśle regulowany proces, w którym występują cztery fazy. Prawidłowe gojenie rozpoczyna się od tworzenia skrzepów, po którym następuje naciekanie komórek zapalnych, proliferacja komórek nabłonka i wreszcie zachodzi przebudowa macierzy. W wyniku zaburzenia gojenia się ran mogą wystąpić przewlekłe stany zapalne i owrzodzenia. Jednym z najczęściej uszkodzanych narządów jest skóra. Zbudowana jest z komórek takich jak keratynocyty, fibroblasty, makrofagi i komórki śródbłonka. W warstwach naskórka około 95% masy komórek stanowią keratynocyty. Jako komórki pierwszej linii stykają się z bakteriami chorobotwórczymi, wirusami, promieniowaniem UV i alergenami co prowadzi do wytwarzania cytokin prozapalnych i progresji stanu zapalnego skóry. Podczas gojenia zaangażowane są również receptory czynników wzrostu, metaloproteinazy (MMP), mediatory stanu zapalnego oraz enzymy ściśle współpracujące z komórkami w celu przywrócenia funkcjonalności uszkodzonej tkanki. Niedawno odkryto, że PEPD jest ligandem EGFR. Ponieważ aktywacja EGFR sprzyja proliferacji, wzrostowi, różnicowaniu i migracji komórek, powstało pytanie, czy prolidaza może być czynnikiem stymulującym gojenie się ran *in vitro*.

Niniejsze badania miały na celu zbadanie zdolności proliferacyjnej prolidazy w modelach doświadczalnego gojenia się ran w warunkach zapalenia indukowanego przez interleukinę (IL)-1 $\beta$  i mechanicznego uszkodzenia keratynocytów linii HaCaT.

Ludzkie keratynocyty linii HaCaT poddano działaniu prolidazy (świńska lub ludzka rekombinowana) i oceniano przeżywalność, proliferację i migrację komórek. Do oceny ekspresji białek zastosowano Western-immunoblot i technikę immunocytochemiczną z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Biosyntezę kolagenu oznaczano metodą radiometryczną, a aktywność prolidazy metodą kolorymetryczną. Do pomiaru stężenia proliny zastosowano celowaną analizę metabolomiczną z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Aktywność MMP oceniano za pomocą zymografii żelatynowej, podczas gdy analizę cyklu komórkowego analizowano za pomocą cytometrii obrazowej.

Przeprowadzone badania ujawniły, że PEPD w warunkach uszkodzenia mechanicznego indukował proliferację i migrację keratynocytów poprzez aktywację sygnalizacji EGFR, w której kluczową rolę odgrywał szlak Akt/PI3K/mTOR. Markery białkowe przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego uległy zwiększeniu, co potwierdziło obserwację zwiększonej migracji komórek. Ekspresja receptorów  $\beta$ 1-integryny i IGF-1 oraz zależnych od nich kinaz uległa zwiększeniu, czemu towarzyszyło wyższe stężenie proliny i biosynteza kolagenu.

W stanach zapalnych PEPD wymagała obecności IL-1 $\beta$  w celu zwiększenia proliferacji keratynocytów poprzez aktywację EGFR i zależnych od EGFR białek sygnałowych (Akt, ERK1/2 i STAT3). Migrujące komórki wykazywały ekspresję markerów białkowych EMT, takich jak obniżona ekspresja E-kadheryny i zwiększona ekspresja N-kadheryny. Przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej zachodząca w fazie zapalnej została odzwierciedlona poprzez aktywację MMP-9 związaną z aktywacją NF- $\kappa$ B poprzez degradację I $\kappa$ B $\alpha$  z udziałem IKK. Zmutowane PEPD (rhPEPD-G448R, rhPEPD-231delY i rhPEPD-E412K) były również zdolne do pobudzenia proliferacji keratynocytów poprzez szlak EGFR.

Prolidaza zewnątrzkomórkowa działająca poprzez EGFR indukuje wzrost, migrację i biosyntezę kolagenu oraz przebudowę ECM w keratynocytach HaCaT w warunkach eksperymentalnego gojenia ran. Szlaki Akt/PI3K/mTOR, ERK1/2 i STAT3 biorą udział w proliferacji i migracji keratynocytów. Aktywność prolidazy nie jest wymagana do aktywacji EGFR. Enzymatycznie aktywna i nieaktywna prolidaza może modulować sygnalizację EGFR z różną intensywnością. Niniejsze badania sugerują, że nie tylko aktywność PEPD, ale także zewnątrzkomórkowa funkcja PEPD może być zaangażowana w mechanizm leżący u podstaw niedoboru prolidazy. Endogenna prolidaza może służyć jako czynnik stymulujący procesy naprawcze uszkodzonych komórek, którym towarzyszy stan zapalny. Proces ten może stanowić potencjalny punkt uchwytu w terapii ran skóry.