

Molekularny mechanizm działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz flawonoidów w aspekcie ich potencjalnego zastosowania w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych

Paweł W. Mozolewski

Lizosomalne choroby spichrzeniowe (LChS) stanowią grupę rzadkich schorzeń o podłożu metabolicznym, warunkowanych mutacją w jednym z genów kodujących produkt zaangażowany w prawidłowe funkcjonowanie lizosomów. W związku z faktem, iż lizosomy stanowią wewnątrzkomórkowe centrum recyklingu makrocząsteczek pochodzenia zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowego, upośledzenie działania tych organelli powoduje akumulację makromolekuł w ich wnętrzu. Najczęstszą przyczyną zaistnienia takiego patologicznego dla komórki stanu jest defekt genetyczny, pojawiający się w populacji z szacowaną częstością 1:7500, który polega na całkowitym lub częściowym braku aktywności enzymu degradującego określone makrocząsteczki. Począwszy od roku 1963, kiedy zidentyfikowano pierwszą lizosomalną chorobę spichrzeniową, jaką była choroba Pompego, do dnia dzisiejszego opisano oraz scharakteryzowano już około 70 różnych jednostek chorobowych. Podstawą ich klasyfikacji oraz diagnostyki jest charakter chemiczny akumulowanych makromolekuł, na tej podstawie możemy wyróżnić m.in.: mukopolisacharydozy, sfingolipidozy czy też mukolipidozy. Nagromadzające się wewnątrz komórek substraty, które nie mogą zostać w sposób efektywny rozłożone do mniejszych produktów, przyczyniają się do postępującego przebiegu choroby. Patologiczne zmiany prowadzą do zaburzenia w funkcjonowaniu tkanek, narządów i ostatecznie całego organizmu, co zazwyczaj skutkuje znacząco obniżoną długością życia. W związku z faktem, iż objawy związane z wystąpieniem LChS pojawiają się zazwyczaj do drugiego roku życia, stanowią one w większości choroby wieku dziecięcego. Warto jednak podkreślić, że w związku z dużym zróżnicowaniem schorzeń zaliczanych do tej grupy, istnieją również jednostki chorobowe objawiające się dopiero w dojrzałym życiu. Wiek pojawienia się choroby oraz obraz kliniczny wraz z nasileniem objawów związane są z rodzajem występującej mutacji, która może się wiązać z obecnością tzw. aktywności resztkowej danego enzymu, jak również dynamiki akumulacji substratu. Określenie korelacji pomiędzy genotypem i fenotypem często bywa jednak nieprecyzyjne, co jednocześnie sprawia trudności w prawidłowej diagnostyce tych chorób. Aktualnie, zdecydowana większość LChS nie posiada wystarczająco efektywnych form terapii, w szczególności w kontekście łagodzenia objawów ze strony ośrodkowego układu nerwowego (OUN), które towarzyszą około 80% LChS. Spośród

wszystkich chorób z defektem w lizosomalnym katabolizmie makrocząsteczek szczególne miejsce zajmują mukopolisacharydozy (MPS), które stanowią jedną z najliczniejszych grup. Obejmuje ona siedem typów chorobowych (MPS typu I, II, III, IV, VI, VII oraz IX), kategoryzowanych w zależności od występowania jednej z jedenastu mutacji, związanych z upośledzeniem hydrolizy glikozoaminoglikanów (GAG). W populacji polskiej ogólna częstość występowania MPS wynosi 1,8:100000 żywych urodzeń, z czego około 48% stanowi typ III, nazywany inaczej chorobą Sanfilippo. Akumulacja GAG wewnątrz komórek stanowi pierwotny czynnik, który inicjuje szereg patofizjologicznych zmian u osób chorych na MPS. W zależności od występującego typu MPS, spichrzaniu ulegać może siarczan dermatanu, siarczan heparanu, siarczan chondroityny, siarczan keratanu bądź hialuronian. Ponadto, w niektórych przypadkach dochodzi do akumulacji więcej niż jednego rodzaju GAG. Wspólną cechą tych makrocząsteczek jest ich budowa chemiczna, która determinowana jest przez występujące naprzemiennie jednostki dwucukrowe, tworzące długie i nierozgałęzione łańcuchy o silnie anionowych właściwościach. Za wyjątkiem hialuronianu, wszystkie GAG są siarczanowane oraz tworzą z białkami, za pomocą wiązań kowalencyjnych, struktury zwane proteoglikanami.

Aktualnie można wyróżnić kilka rodzajów strategii terapeutycznych stosowanych w leczeniu LChS. Najpowszechniejszą z nich jest terapia polegająca na podaniu pacjentowi aktywnej hydrolazy, której defekt obserwowany jest w danej jednostce chorobowej. W celu dostarczenia enzymu stosuje się między innymi enzymatyczną terapię zastępczą (ETZ), która polega najczęściej na dożylnym podaniu preparatu zawierającego natywną formę białka. Drugim sposobem dostarczenia aktywnego enzymu jest transplantacja szpiku kostnego. Niestety, powyższa strategia nie sprawdza się w przypadku chorób manifestujących się objawami neurologicznymi, gdyż enzym nie może przekroczyć bariery krew-mózg uniemożliwiając tym samym penetrację OUN. Spośród kilku innych strategii terapeutycznych, takich jak terapia genowa lub bezpośrednie podawanie enzymu do płynu mózgowo-rdzeniowego, wyróżnić możemy podejście w oparciu o diametralnie inną koncepcję. W tym przypadku przywrócenie dynamicznej równowagi pomiędzy syntezą i degradacją makrocząsteczek następuje poprzez obniżenie tempa biosyntezy substratu, który nie może być efektywnie katabolizowany. W celu uzyskania takiego efektu stosuje się inhibitor, który najczęściej z uwagi na swoje niewielkie rozmiary jest w stanie przekroczyć barierę krew-mózg. Przy udziale niskiej, sięgającej około 3% aktywności hydrolazy obecnej w komórkach, następuje wówczas przywrócenie równowagi objawiającej się brakiem akumulacji wybranych makrocząsteczek w lizosomach. Zastosowanie takiego podejścia, nazywane jest terapią

obniżenia syntezy substratu (ang. *SRT* - *substrate reduction therapy*), a jej skuteczność zaobserwowano w przypadku genisteiny stosowanej w stosunku do choroby Sanfilippo oraz miglustatu (Zavesca®) w terapii choroby Gauchera.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) stanowią dużą i zróżnicowaną grupę leków, które są spożywane na świecie przez około 30 milionów osób każdego dnia, zazwyczaj w ramach tzw. samoleczenia. Stosowane są w celu łagodzenia bólu o niskim oraz średnim natężeniu, jak również współwystępującego stanu zapalnego i gorączki. Uzyskiwany efekt działania NLPZ jest osiągany poprzez ich właściwości hamujące proces syntezy prostaglandyn (PG), będących hormonami parakrynowymi pośredniczącymi w rozwoju stanu zapalnego oraz regulacji szerokiego spektrum procesów fizjologicznych. Efekt ten jest uzyskiwany w wyniku inhibicji aktywności cyklooksygenazy (ang. *COX* - *cyclooxygenase*, *PTGS* - *prostaglandin-endoperoxide synthase*), która jest kluczowym enzymem procesu biosyntezy prostanoidów, do których poza PG zaliczane są również prostacykliny oraz tromboksany. Obecnie wyróżnia się dwie główne izoformy COX, spośród których jedna stanowi postać o aktywności konstytutywnej (COX-1), druga zaś jest formą indukowalną (COX-2). Stopień powinowactwa NLPZ w stosunku do danej izoformy enzymu pozwolił dokonać klasyfikacji tych leków pod względem ich siły działania na wybraną izoformę COX. Przykładem związku będącego nieselektywnym inhibitorem COX-1 jest indometacyna (kwas 1-(4-chlorobenzoiło)-5-metoksy-2-metylo-1H-indolo-3-octowy), zaś nimesulid (N-(4-nitro-2-fenoksyfenylo)metanosulfonamid) stanowi przykład leku o preferencyjnej aktywności w stosunku do COX-2. Z uwagi jednak na ogromne zróżnicowanie NLPZ jest to jedynie jedno z kryteriów podziału i aktualnie nie obowiązuje jednolita klasyfikacja tej grupy leków.

Wśród flawonoidów, związków organicznych stanowiących wtórne metabolity roślin, genisteina (5,7-dihydroksy-3-(4-hydroksyfenylo)-4H-1-benzopiran-4-on) jest przykładem substancji o niezwykle obiecujących zastosowaniach w kontekście terapii MPS. Prowadzone od wielu lat badania pozwoliły wykazać, iż z uwagi na jej plejotropowy mechanizm działania substancja ta może być z powodzeniem stosowana w celu modulacji kluczowych procesów komórkowych takich jak cykl komórkowy, metabolizm makrocząsteczek oraz biogeneza i aktywność lizosomów. W związku z występowaniem u chorych na MPS licznych defektów dotyczących wymienione powyżej procesy, genisteina stanowi obiecujące dopełnienie aktualnych strategii terapeutycznych, w tym jako element tzw. terapii łączonej.

Celem realizowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej było określenie mechanizmu działania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz ich mieszanin z izoflawonem genisteiną w kontekście modulacji procesów komórkowych, dla potencjalnego

ich zastosowania w terapii mukopolisacharydoz. Badania zostały wykonane na modelu *in vitro* poprzez zastosowanie w doświadczeniach ludzkich fibroblastów skórnych (ang. *HDFa* - *Human Dermal Fibroblast, adult*). W przeprowadzanych pracach eksperymentalnych stosowane były również fibroblasty skórne pochodzące od osób chorych na MPS typu I, II, IIIA, MPS IIIB oraz MPS VI. Wyselekcjonowane leki stanowiły indometacyna oraz nimesulid, z uwagi na liczne doniesienia literaturowe raportujące ich wpływ na procesy związane z metabolizmem GAG. Ponadto, na początkowym etapie badań przeprowadzono doświadczenia z zastosowaniem acetaminofenu (N-(4-hydroksyfenylo)acetamid), będącego selektywnym inhibitorem specyficznego wariantu splicingowego izoformy COX-1, nazywanego niekiedy w literaturze COX-3. Spośród flawonoidów w badaniach zastosowano genisteinę, w związku z jej dużym potencjałem hamującym biosyntezę GAG oraz wcześniejszymi doniesieniami na temat jej wpływu na modulację procesów komórkowych w badaniach na modelu ludzkich fibroblastów skórnych.

Pierwszym etapem przeprowadzonych prac badawczych było dobranie odpowiednich stężeń NLPZ oraz acetaminofenu i określenie ich wpływu na proliferację komórek. Na podstawie doniesień literaturowych oraz informacji dotyczących przybliżonych wartości dawek osiągalnych w badaniach klinicznych wyznaczono stężenia, które zostały uzyskane poprzez rozpuszczenie każdego ze związków w 100% dimetylosulfotlenku (DMSO). Stężenie genisteiny wynoszące 100 μM dobrano zgodnie z przeprowadzonymi doświadczeniami [1,2]. W przypadku wszystkich badanych związków stężenie końcowe DMSO wynosiło 0,05%, zaś w przypadku mieszanin 0,1%. Efekt cytotoksyczny analizowanych substancji oraz ich mieszanin oszacowano w oparciu o odczynnik MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy), który określa żywotność komórek na podstawie aktywności metabolicznej mitochondriów. W tym celu komórki były traktowane wyselekcjonowanymi stężeniami leków, genisteiny lub odpowiednich mieszanin przez 24, 48 godzin oraz 7 dni. W rezultacie przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że w większości zastosowanych warunków, leki nie wykazują istotnych właściwości cytotoksycznych po traktowaniu fibroblastów przez 24 oraz 48 godzin [3]. Wartości LC_{25} , LC_{50} oraz LC_{75} (ang. *LC* – *lethal concentration*), określające stężenie letalne dla odpowiednio 25, 50 oraz 75% komórek, wyznaczono po 7 dniach traktowania NLPZ, wykazując silniejsze działanie cytotoksyczne indometacyny w stosunku do nimesulidu [4]. Najsilniejszy efekt hamujący wzrost komórek, potwierdzony prowadzonymi obserwacjami mikroskopowymi, uzyskały mieszaniny NLPZ z genisteiną [3].

Realizację celu polegającego na określeniu wpływu badanych związków na poziom syntezy GAG przeprowadzono w oparciu o metodę pomiaru tempa inkorporacji radioaktywnego izotopu siarki (^{35}S) lub wodoru (^3H). Oba z wymienionych pierwiastków stanowią istotny element budowy GAG. W przypadku siarki są to modyfikujące strukturę oraz właściwości biochemiczne reszty SO_4^{2-} , zaś w przypadku wodoru monomery cukrowe budujące łańcuch cukrowy. W związku z wynikami uzyskanymi w doświadczeniach określających cytotoksyczność oraz konfrontacji z danymi literaturowymi, stosowane stężenia uległy zawężeniu do trzech wartości dla każdego z leków. Do celów doświadczalnych wybrano linię HDFa oraz trzy linie komórek pochodzących od chorych (MPS typu IIIA, IIIB oraz VI). Analiza tempa syntezy GAG została określona po 72 godzinach oraz w przypadku linii HDFa również po 7 dniach traktowania. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż indometacyna oraz nimesulid istotnie modulują tempo biosyntezy GAG poprzez hamowanie tego procesu zarówno w komórkach modelowych oraz pochodzących od pacjentów. Stężenia NLPZ, przy których zaobserwowano korzystny efekt wynosiły, odpowiednio: 2 i 10 μM dla indometacyny oraz 5 i 25 μM dla nimesulidu [3]. W przypadku acetaminofenu nie zaobserwowano inhibicji, w związku z czym został on wyeliminowany z dalszych badań. Wyniki uzyskane z zastosowaniem genisteiny pozwoliły wykazać, że stanowi ona efektywny inhibitor syntezy GAG, który posiada wysoki potencjał aplikacyjny jako terapia obniżenia syntezy substratu [2]. Pozytywny mechanizm działania tej substancji związany jest ze zmianą aktywności m.in. genów metabolizmu GAG oraz inhibicją szlaków sygnałowych w komórce. Obiecujące rezultaty badań nad wyżej wymienionym izoflawonem poskutkowały rozszerzeniem doświadczeń o jego mieszaniny z NLPZ. W tym celu fibroblasty HDFa oraz MPS IIIA były traktowane przez 72 godziny odpowiednimi mieszaninami. Wykazano, że połączenie ze sobą 100 μM genisteiny oraz 25 μM nimesulidu powoduje najefektywniejsze zahamowanie procesu syntezy GAG (efekt addytywny). W przypadku komórek modelowych efekt inhibicyjny oszacowano na poziomie ok. 48%, zaś dla komórek od pacjentów wynosił ok. 40% [3]. Ponadto, istotną informacją było wskazanie, iż wyżej wymieniony efekt jest korzystniejszy w porównaniu do rezultatu uzyskanego dla samej genisteiny [2].

Kolejnym celem mojej pracy było zbadanie mechanizmów działania badanych NLPZ oraz ich mieszanin z genisteiną, za pośrednictwem których następuje zmiana w fenotypie komórek. W związku z danymi literaturowymi na temat ogólnego mechanizmu działania NLPZ oraz ich wpływem na poziom aktywacji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *EGFR* - *epidermal growth factor receptor*) szlak ten stanowił pierwszy cel moich badań. Ponadto, aktywność powyższego receptora stanowi istotny czynnik regulujący syntezę GAG, a jego

inhibicja w przypadku flawonoidów prowadziła do redukcji złogów substratu w lizosomach. Prace doświadczalne zostały przeprowadzone przy zastosowaniu analizatora komórek MUSE®, który działa w oparciu o fluorescencyjną detekcję sygnału. Do badań wybrano modelowe fibroblasty HDFa z uwagi na ich stabilny fenotyp. W celu analiz komórki zostały poddane traktowaniu czynnikiem EGF (ang. *epidermal growth factor*) o stężeniu 100 ng/ml, który stymulował je do fosforylacyjnej aktywacji EGFR, wraz z indometacyną (10 μ M) lub nimesulidem (25 μ M). Kontrolę stanowiły komórki traktowane 0,05% DMSO bądź powyższym rozpuszczalnikiem z dodatkiem 100 ng/ml EGF. Po 24 godzinach dokonano analizy przy użyciu znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał specyficznych w stosunku do fosforylowanego oraz nefosforylowanego EGFR. Uzyskane dane pozwoliły stwierdzić, że zarówno indometacyna, jak i nimesulid, oraz ich mieszaniny z genisteiną, hamują aktywację receptora EGF [3]. Najwyższy stopień inhibicji zaobserwowano w przypadku zastosowania nimesulidu, który był bardziej efektywny nawet w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla mieszaniny z genisteiną, stanowiącą dobrze opisany inhibitor EGFR. W przypadku komórek traktowanych indometacyną również zaobserwowano silniejszy efekt hamujący fosforylację EGFR w porównaniu do komórek rosnących z dodatkiem jedynie genisteiny. Kolejnym etapem doświadczeń było dalsze, bardziej szczegółowe opisanie mechanizmów regulowanych działaniem leków oraz ich mieszanin z genisteiną. W tym celu przeprowadzono analogiczną procedurę z wykorzystaniem analizatora komórek MUSE®, w której celem badań był szlak 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (ang. *PI3K - phosphatidylinositol-3-kinase*). Ścieżka sygnałowa z udziałem PI3K, która odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu komórki znajduje się pod kontrolą EGFR, będącego jednym z modulatorów jej aktywności. Określenie poziomu aktywacji szlaku PI3K w przypadku inhibicji EGFR stanowiło zatem odpowiedź na pytanie, czy kaskada sygnałowa po podaniu NLPZ przebiega również z udziałem tego czynnika komórkowego. Aby osiągnąć zamierzony cel analizie poddano komórki HDFa, traktowane w sposób analogiczny do procedury z udziałem EGFR. W tym przypadku zastosowano dodatkową kontrolę w postaci komórek Jurkat T, posiadających stale aktywny szlak PI3K oraz wortmaninę będącą jego inhibitorem. Przeprowadzona analiza pozwoliła na oszacowanie procentowego udziału komórek z aktywnym oraz zahamowanym szlakiem. Stwierdzono, iż testowane NLPZ posiadają zdolność hamowania ścieżki sygnałowej z udziałem PI3K [3]. Wykazano, że zastosowanie 25 μ M nimesulidu powoduje najefektywniejszą inhibicję, co odzwierciedlało efekt uzyskany podczas badania aktywności EGFR. Tym razem mieszanina indometacyny z genisteiną posiadała jednak wyższy potencjał hamujący aktywność PI3K w stosunku do zastosowania leku bez dodatku izoflawonu.

Ocena wpływu indometacyny oraz nimesulidu na poziom transkryptomu fibroblastów HDFa została przeprowadzona w oparciu o technologię mikromacierzy oligonukleotydowych. Do badań wykorzystano macierze HumanHT-12 BeadChip v4.0 firmy Illumina, identyfikujące ponad 25000 znanych genów. W celu analiz komórki poddano traktowaniu badanymi związkami przez 24 lub 48 godzin w stężeniach odpowiednio dla indometacyny: 2 oraz 10 μM , zaś dla nimesulidu: 5 oraz 25 μM . Uzyskane wyniki opracowano poprzez obliczenie stosunku sygnału sondy dla próby traktowanej lekiem względem kontroli traktowanej 0,05% DMSO. Przyjętym kryterium stanowiącym o istotności występujących zmian była wartość stosunku sygnałów wynosząca $\leq 0,7$ lub $\geq 1,3$. Wstępna analiza wykazała, że stosowane warunki hodowli powodują niewielkie zmiany w aktywności genomu z uwagi na użycie relatywnie niskich stężeń, mogących mieć zastosowanie w badaniach klinicznych [3,4]. W dalszym etapie moich badań wykonano analizy ontologiczne identyfikujące szlaki oraz procesy komórkowe modulowane na poziomie transkryptycznym. W tym celu zastosowano programy GSEA (ang. *Gene Set Enrichment Analysis*) oraz GOrilla (ang. *Gene Ontology enRiChment anaLysis and visuaLizAtion tool*). Ze względu na brak istotnych statystycznie zmian, analizie nie poddawano wyników uzyskanych dla niższych stężeń leków oraz po traktowaniu komórek przez 48 godzin. W przypadku wyższych stężeń zarówno indometacyny, jak również nimesulidu wykazano, że po 24 godzinach modulowana jest aktywność przede wszystkim genów zaangażowanych w metabolizm komórki [3]. Zastosowane kryterium wyznaczające obecność zmian w transkryptomie pozwoliło również zidentyfikować geny kodujące białka, które uczestniczą w przekazywaniu sygnału za pośrednictwem m.in. szlaku Wnt (ang. *Wingless-related integration site*), TCR (ang. *T cell receptor*) oraz PI3K. Zdecydowanie większa liczba genów o podwyższonej aktywności, uczestniczących w metabolizmie oraz sygnalizacji komórki, została scharakteryzowana w przypadku nimesulidu [3]. Z uwagi na brak dostatecznie dobrej jakości sygnału pochodzącego od sond mikromacierzowych, dla części interesujących mnie genów niemożliwe jednak było oszacowanie poziomu ich aktywności. W tym przypadku zastosowano wyniki mikromacierzowe dla 100 μM genisteiny, które uzyskano w ramach innych badań przeprowadzonych przez naszego współpracownika na modelu komórek HDFa [2].

Badania transkryptyczne badające wpływ NLPZ na procesy komórkowe prowadzone są w przeważającej większości na liniach komórek nowotworowych. Jedyne niewielka liczba badań dotyczy komórek zdrowych, ponadto stosowane w doświadczeniach *in vitro* stężenia leków najczęściej znacząco przewyższają wartości możliwe do uzyskania w dawkach podawanych *in vivo*. W związku z powyższym faktem, jednym z celów mojej pracy było

określenie wpływu badanych leków na transkryptom zdrowych fibroblastów skórnych, traktowanych osiągalnymi klinicznie stężeniami. Zagadnienie to stanowiło istotny element oceny bezpieczeństwa stosowanych substancji w kontekście ich aplikacyjnego wykorzystania w terapii. Przeprowadzone analizy pozwoliły zidentyfikować 3803 genów o istotnie modulowanej ekspresji, z czego większość posiadała podwyższony profil aktywności [4]. Istotną informacją było wykazanie, że pomimo relatywnie dużej liczby genów, poziom zmian w ich aktywności jest niewielki, z jedynie kilkoma przykładami ekspresji zmienionej ponad dwukrotnie. Największa liczba genów o modulowanej aktywności została zidentyfikowana w przypadku traktowania fibroblastów nimesulidem w stężeniu 25 μ M przez 24 godziny. Spośród genów o najsilniej zmienionej aktywności ponad 20%, dla wszystkich stężeń oraz punktów czasowych, stanowiły geny o niepoznanej jeszcze funkcji w komórce. Świadczy to m.in. o potrzebie dalszych badań w celu lepszego poznania mechanizmów działania NLPZ, których spożycie w populacji ludzkiej utrzymuje się na stale wysokim poziomie. Istotnie modulowana aktywność dotyczyła pojedynczych genów kodujących produkty zaangażowane w cykl komórkowy oraz metabolizm DNA, takie jak *SPHAR*, *RECQL4* oraz *NEK7* [4]. W dalszych pracach postanowiono więc sprawdzić wpływ badanych leków na przebieg faz cyklu komórkowego. Do doświadczeń poza komórkami HDFa zostały również wytypowane fibroblasty pochodzące od chorych na MPS I oraz MPS II. Analizy wykonano w oparciu o pomiar sygnału fluorescencji pochodzącej od jodku propidyny, rejestrowanego przez analizator komórek MUSE® po 24 godzinach traktowania niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Uzyskane wyniki wykazały brak znaczących różnic w liczbie komórek HDFa poddanych traktowaniu, które znajdowały się w danej fazie cyklu komórkowego, w stosunku do kontroli [4]. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku komórek pochodzących od pacjentów, poza niewielką różnicą występującą w komórkach linii MPS I. Pomimo istotności statystycznej, wielkość obserwowanej różnicy w liczbie komórek wydaje się nie mieć większego znaczenia z biologicznego punktu widzenia. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że zastosowane stężenia leków nie wywierają wpływu na przebieg cyklu komórkowego w zdrowych ludzkich fibroblastach skórnych oraz w fibroblastach pochodzących od chorych na dane typy MPS. Stanowi to niezwykle istotną informację z uwagi na potencjalny profil bezpieczeństwa tych substancji, w szczególności w odniesieniu do pacjentów.

Zastosowanie metody ilościowego PCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (ang. *real-time quantitative RT-PCR*, *real-time qRT-PCR*) posłużyło do walidacji wcześniej uzyskanych wyników mikromacierzowych, w celu precyzyjnego określenia poziomu

analizowanych transkryptów. W pierwszej kolejności badano geny metabolizmu GAG oraz geny związane z funkcjami lizosomu [3]. Analiza przy zastosowaniu real-time qRT-PCR została przeprowadzona dodatkowo dla komórek traktowanych 100 μ M genisteiną oraz mieszaniną 25 μ M nimesulidu i 100 μ M genisteiny. Celem zastosowania powyższych warunków była próba porównania działania nimesulidu oraz genisteiny z uwagi na zbliżone efekty wywierane na metabolizm GAG oraz aktywność EGFR [1,2,3]. Poziom zmian w ekspresji (ang. *FC - fold change*) został określony przy zastosowaniu trzech genów referencyjnych: *ACTB*, *SDHA* oraz *YWHAZ*. Stały poziom ich aktywności w stosowanych warunkach dowiedziono eksperymentalnie, poprzez wykonanie odrębnych doświadczeń przy użyciu metody real-time qRT-PCR. Wśród 14 analizowanych genów o istotnej funkcji z punktu widzenia lizosomalnych chorób spichrzeniowych, niemal połowa (*ACP5*, *AGA*, *ASAH1*, *CTSK*, *HEXA* i *MANBA*) wykazała zwiększony poziom modulacji w przypadku zastosowania mieszaniny genisteiny oraz nimesulidu w odniesieniu do samej genisteiny [3]. Kryterium decydującym o istotności zmian były wartości $FC \geq 1,3$ lub $FC \leq 0,7$. Zaobserwowane rezultaty wskazują na pozytywny wpływ nimesulidu na aktywność genów o istotnej funkcji w patogenezie LChS. Potwierdza to również korzystniejsze działanie stosowanej mieszaniny w stosunku do podawania związków pojedynczo oraz ich addytywny efekt na wybrane szlaki komórkowe. Wyniki uzyskane dla genów kodujących EGFR, mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin, mechanistic target of rapamycin kinase*) oraz TFEB (ang. *transcription factor EB*) zarówno w przypadku indometacyny, jak również nimesulidu nie wykazały istotnych zmian w poziomie ekspresji, wskazując na odmienny mechanizm działania w porównaniu do genisteiny, będącej modulatorem aktywności powyższych genów. Zastosowanie mieszaniny badanych NLPZ z izoflawonem prowadziło do istotnego wzrostu aktywności genów *mTOR* oraz *TFEB*, nie powodując jednak zmian w ekspresji genu kodującego *EGFR*. Świadczyć to może o złożonych zależnościach w modulacji aktywności genomu w przypadku zastosowania związków posiadających szerokie spektrum działania na metabolizm komórki.

W związku z realizacją mojej rozprawy doktorskiej, mającej na celu scharakteryzowanie mechanizmu działania badanych NLPZ oraz genisteiny w kontekście ich zastosowania w terapii LChS, przedstawiono ich właściwości w odniesieniu do modelu ludzkich fibroblastów skórnych. Uzyskane wyniki stanowią dopełnienie wcześniejszych badań dotyczących pozytywnego działania flawonoidów na tym samym modelu badawczym. Po raz pierwszy wskazano na NLPZ jako związki o potencjale aplikacyjnym w leczeniu LChS, a w szczególności mukopolisacharydoz. Zaproponowany mechanizm działania, polegający na obniżeniu syntezy GAG związanej z inhibicją szlaków EGFR oraz PI3K stanowi nowy wkład

wiedzy dotyczącej aktywności badanych leków. Wskazanie addytywnego działania NLPZ oraz genisteiny stanowi nową perspektywę dla badań nad mechanizmem działania flawonoidów posiadających skuteczność w terapii LChS. Przeprowadzone badania stanowią również jedno z nielicznych doniesień dotyczących bezpieczeństwa stosowania NLPZ przy zastosowaniu komórek nienowotworowych, w kontekście badań transkryptomicznych. Powyższa praca stanowi poszerzenie stanu wiedzy na temat mechanizmu działania NLPZ oraz ich potencjału w modulacji metabolizmu komórek, również w połączeniu z innymi substancjami.