

mpn. 19.07.2019

Gdańsk 15.07.2019 r.

Prof. dr hab. n. med. Anna Liberek
Zakład Pielęgniarstwa Ogólnego
Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa
i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Nowickiej pt. „Ocena potencjału terapeutycznego flawonoidów oraz ich łącznego stosowania z rekombinowaną postacią alfa-L-iduronidazy w mysim modelu mukopolisacharydozy typu I”

Mukopolisacharydozy (MPS) są schorzeniami o podłożu genetycznym i stanowią największą grupę lizosomalnych chorób spichrzeniowych. W zależności od braku bądź niedoboru jednego z 11 enzymów lizosomalnych biorących udział w metabolizmie glikozoaminoglikanów (mukopolisacharydów) wyróżnia się 7 typów MPS.

W przypadku MPS III i IV wyróżnia się odpowiednio 4 i 2 podtypy w zależności od rodzaju deficytowego enzymu, natomiast w obrębie MPS I, mimo niedoboru jednego enzymu, w zależności od obrazu klinicznego choroby, scharakteryzowano 3 podtypy. Wszystkie MPS są chorobami jednogenowymi i poza MPS II (dziedziczenie recesywne związane z chromosomem X) są dziedziczone w sposób autosomalny recesywny. W chwili obecnej dobrze scharakteryzowano obraz kliniczny różnych typów MPS, a badania ostatnich lat, między innymi dzięki wprowadzeniu metod biologii molekularnej, udoskonaliły diagnostykę tych schorzeń.

Ze względu na liczne funkcje jakie pełnią w ustroju glikozoaminoglikany, zaburzenia w ich metabolizmie prowadzą do postępującego uszkodzenia większości tkanek, narządów i układów, a w konsekwencji, w zależności o typu MPS, może to skutkować różnie nasiloną niepełnosprawnością somatyczną i intelektualną. Taka sytuacja jest także w wielu przypadkach przyczyną przedwczesnego zgonu chorych z MPS.

Mimo postępu w diagnostyce tych schorzeń, możliwości ich leczenia są nadal znacznie ograniczone. Celem terapii jest przede wszystkim spowolnienie postępu choroby, poprawa jakości życia i profilaktyka dalszego, postępującego uszkodzenia narządów. Obecnie strategia terapii polega przede wszystkim na dostarczeniu aktywnego enzymu do komórek, w których obserwujemy jego deficyt.

Pierwszym typem MPS, w którym zastosowano tę formę terapii (enzymatyczna terapia zastępcza – ang. *enzyme replacement therapy* - ERT) była mukopolisacharydoza typu I spowodowana niedoborem alfa-L-iduronidazy. Dla celów leczniczych aktywny enzym jest produkowany w komórkach jajnika chomika chińskiego, a następnie jest modyfikowany przez wprowadzenie znacznika mannozo-6-fosforanu prowadząc do właściwego ukierunkowania enzymu. Podstawowym defektem ERT jest fakt, iż enzym jako związek wielkocząsteczkowy

nie przenika bariery krew-mózg, nie wywierając oczekiwanego efektu terapeutycznego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego – OUN (w większości typów MPS dochodzi do uszkodzenia OUN). Dotychczas nie opracowano skutecznej i bezpiecznej metody zapewniającej „dotarcie” leku do OUN. Do chwili obecnej ERT jest jednak podstawową metodą terapii tego typu MPS.

Inną z analizowanych opcji terapeutycznych jest obniżenie wydajności procesu syntezy substratu (ang. *substrat reduction therapy* – SRT). Idea tej formy terapii zakłada częściową inhibicję syntezy związku, który jest w nadmiarze gromadzony w ustroju wobec niedoboru enzymu biorącego udział w jego metabolizmie. W tym celu wykorzystuje się związki małowcząsteczkowe. Wśród zalet SRT należy wymienić: możliwość podania doustnego (ERT wyłącznie droga pozajelitowa), brak immunogenności, możliwość pokonania bariery krew-mózg oraz stosunkowo niewysokie koszty terapii. W przypadku MPS I szereg badań koncentruje się na wykorzystaniu w tym celu izoflawonów – genisteiny.

Jednak żadna z tych metod nie hamuje w zadowalającym stopniu postępu choroby ani nie koryguje wystarczająco jej następstw.

W związku z tym niezwykle cenne jest poszukiwanie i analizowanie skuteczności oraz bezpieczeństwa wszelkich metod terapeutycznych mogących mieć wpływ na zahamowanie postępu/ustąpienie objawów choroby jaką jest m. in. mukopolisacharydoza typu I.

Z powyższych względów uważam, że podjęcie przez mgr Wioletę Nowicką badań mających na celu ocenę potencjału terapeutycznego flawonoidów oraz ich łącznego stosowania z rekombinowaną postacią alfa-L-iduronidazy w mysim modelu mukopolisacharydozy typu I jest jak najbardziej uzasadnione i stanowi cenną i dojrzałą analizę tego zagadnienia.

Przedstawiona mi do oceny praca cechuje się układem typowym dla rozpraw doktorskich. Obejmuje 172 strony maszynopisu, 296 pozycji piśmiennictwa oraz informacje nt. źródeł finansowania badań.

Rozprawa zawiera również obszerne streszczenie w języku polskim i angielskim. Wartościowym elementem jest objaśnienie zastosowanych w pracy skrótów, co ułatwia czytającemu na bieżąco identyfikowanie stosowanej w rozprawie terminologii.

Obszerny, bo liczący 47 stron, **Wstęp**, w którym Autorka szczegółowo omówiła budowę, metabolizm oraz funkcje w ustroju glikoaminoglikanów. Bardzo wartościową częścią Wstępu jest wszechstronne przedstawienie zagadnień dotyczących mukopolisacharydoz z uwzględnieniem współczesnych metod diagnostycznych oraz dostępnych i potencjalnych metod terapeutycznych, także badań z wykorzystaniem modeli komórkowych mukopolisacharydozy typu I oraz mysiego modelu choroby.

We Wstępie Autorka na 12 prezentowanych: tabel, rycin i schematów jedynie w 2 przypadkach wskazała ich źródło. Czy pozostałe są autorstwa Doktorantki?

Zagadnienia omawiane we Wstępie ściśle wiążą się z tematem pracy i dobrze wprowadzają czytelnika w zakres prowadzonych badań oraz uzasadniają celowość podjętych do analizy zagadnień.

W tym miejscu chciałabym podkreślić, iż sam rozdział „Wstęp” może stanowić samodzielną, wyczerpującą monografię na temat zagadnień związanych z mukopolisacharydozami. Tekst tego rozdziału jest napisany przejrzyście i w mojej ocenie na wysokim poziomie merytorycznym w oparciu o aktualne piśmiennictwo naukowe.

Przedstawione we Wstępie dane logicznie prowadzą do przedstawienia celów pracy.

Cele pracy sformułowane są precyzyjnie i jasno.

- Głównym założeniem było porównanie różnych form terapii MPS I z wykorzystaniem mysiego modelu choroby, uwzględniając przede wszystkim stopień akumulacji GAG w różnych narządach oraz możliwość penetracji do ośrodkowego układu nerwowego.
- Analizie poddano również ocenę potencjału terapeutycznego kemferolu jako czynnika aktywnego w terapii obniżania wydajności syntezy substratu w leczeniu mukopolisacharydozy typu I z wykorzystaniem mysiego modelu choroby.
- Ponadto dodatkowym celem pracy była optymalizacja procedury zakładania i prowadzenia hodowli pierwotnej hepatocytów pozyskanych od myszy MPS I oraz typu dzikiego oraz ich charakterystyka fenotypowa.

W pracy zawarto informację nt. zatwierdzenia procedur doświadczalnych przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. W celu realizacji założonych celów pracy Autorka poddała analizie wyniki badań doświadczalnych przeprowadzonych na mysim modelu MPS I.

W rozdziale **Materiały** Doktorantka omówiła metody hodowli zwierząt wykorzystanych do przeprowadzenia doświadczeń. Przedstawiła odczynniki, narzędzia, sprzęt jednorazowy oraz aparaturę i sprzęt laboratoryjny wykorzystany w doświadczeniach.

W rozdziale **Metody** omówiono szczegółowo metody hodowli zwierząt doświadczalnych, sposób ich genotypowania oraz przeprowadzania analizy biochemicznej tkanek i moczu, a także analizę behawioru zwierząt. Przedstawiono również protokół uzyskiwania stabilnej hodowli pierwotnej hepatocytów mysich MPS I.

Doktorantka opisała także procedurę przeprowadzenia doświadczeń *in vivo*.

W rozdziale tym, podobnie jak całej pracy brakuje podania jednoznacznej i wyraźnej charakterystyki badanych grup zwierząt doświadczalnych. Jedynie dokładna analiza wyników badań pozwala przypuszczać, że w przeprowadzonych doświadczeniach analizie poddano 4 grupy zwierząt - myszy MPS I (1. myszy MPS I – poddane terapii, 2. myszy MPS I – nieleczone) oraz myszy zdrowe (3. myszy zdrowe poddane terapii, 4. myszy zdrowe nieleczone). Brak jasnego zdefiniowania grup w pewnym stopniu utrudnia analizę wyników badań.

Podkreślenia wymaga fakt ogromnego osobistego zaangażowania Doktorantki na wszystkich etapach badań, począwszy od hodowli zwierząt doświadczalnych do wykonywania wszystkich oznaczeń.

W rozdziale Metody podobnie jak we Wstępie Doktoranta nie podaje źródeł przedstawianych schematów, rycin i zdjęć. Czy są autorstwa Doktorantki?, jeżeli tak to należy podać tę informację.

W rozdziale **Wyniki** Autorka swoje obserwacje przedstawiła w sposób opisowy oraz

za pomocą rycin. Wykazała, że długotrwałe, doustne podawanie genisteiny w wysokiej dawce (160 mg/kg/dobę) powoduje znaczne obniżenie spichrzania GAG w wątrobie oraz śledzionie u leczonych myszy MPS I w porównaniu do grupy kontrolnej MPS I nieleczonej. Ponadto stwierdzono istotne statystycznie obniżenie gromadzenia GAG w tkance mózgowej oraz istotny wpływ monitorowanej terapii na poprawę zachowań neurokognitywnych samic myszy MPS I otrzymujących genisteinę. Natomiast zastosowanie terapii łączonej - genisteiny i rekombinowanej α -L-iduronidazy, skutkowało zarówno zmniejszeniem spichrzania GAG w wątrobie (gdzie stwierdza się szczególnie nasilone gromadzenie GAG) i śledzionie, jak również w opornym na leczenie enzymatyczne, mięśniu sercowym. Dodatkowo stwierdzono obniżenie poziomu GAG w moczu zwierząt, które otrzymywały terapię skojarzoną. W tej grupie zwierząt doświadczalnych obserwowano znaczną poprawę zachowania samic myszy MPS I.

Celem pracy była także analiza potencjału terapeutycznego kemferolu jako czynnika obniżającego wydajność syntezy substratu w leczeniu mukopolisacharydozy typu I z wykorzystaniem mysiego modelu choroby.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że podawany doustnie kemferol, obniża poziom GAG w wątrobie oraz w mięśniu serca myszy MPS I w porównaniu do grupy kontrolnej MPS I nieleczonej. Ponadto wpływa korzystnie na zmianę zachowania samic myszy MPS I. Niestety zaobserwowano także negatywne objawy wywołane przez kemferol, skutkujące nasilonym gromadzeniem GAG w śledzionie, a szczególnie w nerce w zależności od zastosowanej dawki kemferolu.

Dyskusja stanowi dużą wartość pracy. Napisana jest w sposób zrozumiały i świadczy o dogłębnej znajomości zagadnień będących przedmiotem rozprawy. Autorka szczegółowo i jednocześnie krytycznie analizuje wyniki własnych badań, porównując je z danymi uzyskanymi przez innych badaczy.

Doktorantka wykazując bardzo dobre przygotowanie merytoryczne, w oparciu o dostępne piśmiennictwo naukowe nie tylko stwierdza fakty, ale próbuje wyjaśniać przyczyny i patomechanizm obserwowanych zjawisk.

Analiza wyników badań własnych Doktorantki oraz przegląd aktualnego piśmiennictwa przedmiotu stanowią bardzo wartościowe źródło wiedzy na temat możliwości terapeutycznych nie tylko mukopolisacharydozy typu I, ale także innych schorzeń lizosomalnych. Przedstawione w Dyskusji zagadnienia są fachowym przeglądem piśmiennictwa na temat aktualnych możliwości terapeutycznych MPS I jak i prowadzonych w tej dziedzinie badań. Autorka prezentuje zalety, ale i wady rozważanych prób terapii – choćby krytycznie ocenia potencjał terapeutyczny badanego w swoich doświadczeniach kemferolu jako czynnika obniżającego wydajność syntezy substratu w leczeniu mukopolisacharydozy typu I, podkreślając toksyczne działanie tego związku na organizm zwierząt doświadczalnych przy stosowanie większych dawek – takich, które potencjalnie mogłyby być skuteczne w leczeniu MPS.

Autorka podjęła próbę uwieńczoną powodzeniem pozyskania hodowli hepatocytów, gdyż

właśnie wątroba jako niezwykle aktywna metabolicznie jest narządem, w którym dochodzi do najbardziej nasilonego spichrzania GAG. Dotychczas podstawowym modelem komórkowym wykorzystywanym w badaniach *in vitro* były pochodzące od pacjentów fibroblasty, które ze względu na mało wymagające warunki hodowli stanowią optymalny model badawczy.

Starannie przeprowadzone badania oraz otrzymane wyniki, poddane zarówno analizie statystycznej, jak i krytycznej dyskusji, pozwoliły na sformułowanie **Wniosków** będących odpowiedzią na postawione cele badawcze.

Piśmiennictwo zawierające 296 pozycji zostało właściwie dobrane, zdecydowanie dominują prace z ostatnich lat, publikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Należy podkreślić, że Autorka w realizowaniu rozprawy korzystała również z dorobku ośrodka macierzystego, posiadającego ogromne i niepodważalne doświadczenie i dorobek w skali międzynarodowej w aspekcie pionierskich badań nad wdrażaniem nowych terapii w MPS. Doktorantka nie uniknęła jednak kilku błędów – pozycja 102 „No Title” oraz niewłaściwie zacytowana pozycja 245 - „wyniki są zgodne z przedstawionymi przez Malinowską i wsp.....” a autorem pozycji 245 jest A. Langford-Smith.

Poza drobnymi błędami edytorskim (np. zamiast hepatocyty wielokrotnie wymieniane są hapatocyty) praca jest napisana bardzo starannie i przejrzysto, a prezentowanie ryciny i schematy są czytelne.

W **podsumowaniu**, należy stwierdzić, że otrzymane wyniki badań posiadają niewątpliwie wysoką wartość naukową. Świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do projektowania i realizowania projektów badawczych.

Podkreślenia wymaga także ogromne osobiste zaangażowanie Doktorantki na wszystkich etapach badań, począwszy od hodowli zwierząt doświadczalnych do wykonywania wszystkich oznaczeń.

Zagadnienia będące przedmiotem rozprawy – poszukiwanie nowych, optymalnych metod terapii spichrzeniowych chorób lizosomalnych na przykładzie MPS I – chorób, których do dziś nie potrafimy skutecznie leczyć, są niezmiernie istotne dla lekarzy klinicystów zajmujących się tą dziedziną medycyny. Dzięki pracom doświadczalnym m.in. takim jakie prezentuje Doktorantka w swojej rozprawie, istnieją szanse podejmowania prób wdrażania nowoczesnych i bezpiecznych terapii. W związku z tym należy podkreślić dużą wartość nie tylko naukową, ale także i praktyczną przeprowadzonych badań.

Poczynione drobne uwagi, nie wpływają na kompleksową, jednoznacznie pozytywną ocenę pracy zarówno pod względem merytorycznym, jak i redakcyjnym.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Wioletty Nowickiej pt. „Ocena potencjału terapeutycznego flawonoidów oraz ich łącznego stosowania z rekombinowaną postacią alfa-L-iduronidazy w mysim modelu mukopolisacharydozy typu I” spełnia wszelkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę więc do Rady

Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Wioletty Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i ze względu na wysoką wartość naukową, ale i praktyczną wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. n. med. Anna Liberek

Prof. dr hab. n. med. Anna Liberek
specjalista pediatrii
i gastroenterologii dziecięcej
PWZ 1049605