

mp. Prot. Wolf

Prof. IPIN, dr hab. Agnieszka Ługowska
Zakład Genetyki
Instytut Psychiatrii i Neurologii
Al. Sobieskiego 9
02-957 Warszawa

Warszawa, 15 lipca, 2019r.

Instytut Psychiatrii i Neurologii
Zakład Genetyki
02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9
Tel. 22 45 82 610; 22 45 82 856
fax. 22 858 91 69. REGON 000288509

Recenzja

**rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk biologicznych
w dyscyplinie - biologia**

Pani magister Wioletty Nowickiej

na temat

**„Ocena potencjału terapeutycznego flawonoidów oraz ich łącznego stosowania
z rekombinowaną postacią alfa-L-iduronidazy
w mysim modelu mukopolisacharydozy typu I”.**

Promotor: Prof. UG, dr hab. Joanna Jakóbkiewicz-Banecka

Mukopolisacharydozy (MPS) należą do grupy rzadkich, genetycznie uwarunkowanych chorób metabolicznych. Częstość występowania mukopolisacharydoz jako grupy szacuje się na 1: 22 000, ale częstość występowania poszczególnych typów MPS jest dużo niższa i zależy od badanej populacji. Z wyjątkiem MPS II (choroby Huntera) sprzężonej z chromosomem X, MPSy dziedziczą się w sposób autosomalny recesywny.

W ich skład wchodzi 11 jednostek chorobowych, u podłoża których leży deficyt aktywności jednego z enzymów zlokalizowanych w aparacie lizosomalnym. Brak aktywności danego enzymu skutkuje blokadą szlaku degradacji glikozoaminoglikanów (GAG) i następnie spichrzaniem tych związków w komórkach, tkankach i narządach. Akumulacja wielkocząsteczkowych GAG i wtórne gromadzenie innych związków oraz aktywacja różnych mechanizmów patogennych prowadzą w efekcie do objawów klinicznych.

Pod względem klinicznym MPS stanowią bardzo zróżnicowaną grupę chorób o szerokim spectrum objawów nawet w obrębie jednego typu. Nasilenie objawów i dynamika przebiegu choroby może wahać się od postaci ciężkich, wrodzonych do postaci łagodnych, przewlekłych. Objawy kliniczne dotyczą przede wszystkim dyzmoρφii, zaburzeń i deformacji kostnych, powiększenia organów wewnętrznych,

zmętnienia rogówki, utraty słuchu, opóźnienia rozwoju psycho-ruchowego i neurodegradacji.

Próby leczenia MPS za pomocą przeszczepu szpiku kostnego podejmowano już w latach 80. ubiegłego wieku. Wraz z rozwojem biologii molekularnej i biotechnologii opracowano nowe możliwości terapii MPS, jak np. enzymatyczna terapia zastępcza (ERT), terapia za pomocą redukcji syntezy substratu (SRT), czy - niestety ciągle jeszcze na etapie badań eksperymentalnych - terapia genowa lub wyciszanie ekspresji genów. Należy podkreślić, że w przypadku MPS podejmowanie którejkolwiek z terapii ma najlepsze rokowania, gdy objawy kliniczne jeszcze się nie pojawiły. Poważnym problemem stosowanych terapii MPS jest fakt, że związki wielkocząsteczkowe takie, jak np. białka enzymów nie przenikają bez ograniczeń do kości i nie przekraczają bariery krew-mózg.

Ograniczenia te dotyczą również innych chorób lizosomalnych. Zauważono, że najlepsze efekty leczenia przynosi połączenie ERT z innym rodzajem leczenia: terapią czaperonami (chaperone therapy, CT), SRT, terapią genową (GT) lub przeszczepem szpiku kostnego (bone marrow transplantation, BMT). Obecnie stosuje się terapie łączone w niektórych przypadkach u pacjentów z chorobą Gauchera (SRT+ERT) oraz chorobą Pompego (CT+ERT).

Wybór tematu rozprawy doktorskiej jest bardzo właściwy, gdyż wszelkie badania nad nowymi rodzajami terapii lub nowymi, potencjalnymi lekami wykazują nie tylko aspekty poznawcze, lecz również olbrzymie znaczenie praktyczne przede wszystkim dla pacjentów i ich rodzin oraz lekarzy klinicystów.

Doktorantka postawiła sobie następujące cele badawcze:

- 1) Ocena efektywności działania genisteiny w dawce 160 mg/kg m.c./dzień jako czynnika aktywnego w terapii obniżania wydajności syntezy substratu w leczeniu mukopolisacharydozy typu I z wykorzystaniem mysiego modelu choroby.
- 2) Ocena potencjału terapeutycznego kemferolu jako czynnika aktywnego w terapii obniżania wydajności syntezy substratu w leczeniu mukopolisacharydozy typu I z wykorzystaniem mysiego modelu choroby.
- 3) Ocena skuteczności zastosowania laronidazy w dawce 100 U/kg m.c./tydzień oraz genisteiny w dawce 160 mg/kg m.c./dzień jako terapii łączonej w leczeniu mukopolisacharydozy typu I z wykorzystaniem mysiego modelu choroby.
- 4) Ocena wpływu długoterminowego stosowania laronidazy w dawce 100 U/kg m.c./tydzień, genisteiny w dawce 160 mg/kg m.c./dzień, kemferolu w dawkach 5, 50, 80, 160 mg/kg m.c./dzień oraz terapii łączonej w postaci laronidazy w dawce 100 U/kg m.c./tydzień wraz z genisteiną w dawce 160 mg/kg m.c./dzień na parametry behawioralne i kognitywne u myszy MPS I.

- 5) Optymalizacja procedury zakładania i prowadzenia hodowli pierwotnej hepatocytów pozyskanych od myszy MPS I oraz typu dzikiego oraz ich charakterystyka fenotypowa.

Doktorantka badała wpływ zastosowania różnych podejść terapeutycznych na proces spichrzania glikozoaminoglikanów (GAG) w tkankach i ich wydalanie w moczu oraz na zmiany w behawiorze zwierząt eksperymentalnych. Badaniom poddawano myszy będące modelem zwierzęcym MPS I (linia B6.129-Idua^{tm1Clk}/J z defektem w genie Idua o tle genetycznym C57BL6), będące homozygotami dla mutacji p.W392X. W każdej grupie badanej znajdowało się 6 zwierząt. W każdym wariancie eksperymentu uwzględniono grupę kontrolną zwierząt zdrowych.

W pierwszym eksperymencie zwierzęta otrzymywały przez 12 tygodni:

- 1) Laronidazę w dawce 100 U/kg m.c./tydzień (j.t. wariant ERT)
- 2) Genisteinę w dawce 160 mg/kg m.c./dzień (j.t. wariant SRT)
- 3) Laronidazę i genisteinę razem w odpowiednich dawkach (j.t. wariant terapii łączonej ERT+SRT).

W punkcie startu, środka i końca eksperymentu pobierano próbki moczu od badanych zwierząt. Po 12 tygodniach stosowania różnych wariantów terapii od myszy pobierano mózg, wątrobę, śledzionę, nerki i serce. W moczu i pobranych organach oznaczano poziom GAG, a ponadto wątroba i śledziona były ważone.

Doktorantka zauważyła, że samce myszy MPS I spichrzają znamienne więcej GAG w wątrobie i śledzionie niż samice (o ok. 40% więcej). Biorąc pod uwagę efektywność terapii, ocenianą za pomocą ilości GAG w tkankach wątroby, śledziony i nerek, najlepsze rezultaty otrzymano stosując ERT lub terapię łączonej ERT+SRT (widoczne były różnice w zależności od płci). Zarówno w mięśniach, jak i w zastawkach serca największy spadek ilości GAG pod wpływem leczenia odnotowano w wariancie ERT+SRT. Terapia za pomocą wyłącznie genisteiny powodowała spadek ilości GAG w mózgu, ale tylko u samic. Natomiast wyniki dotyczące spadku masy wątroby obserwowano u samic i samców po leczeniu ERT. U samic dodatkowo zmniejszała się masa śledziony. Terapia ERT dawała również najlepsze efekty pod kątem oceny wydalania GAG z moczem; widoczne były różnice w zależności od płci – samice wydalają o ok. 20% więcej GAG niż samce.

W kolejnym eksperymencie zwierzętom podawano kemferol, który jest związkiem flawonoidowym należącym do grupy flawonoli. Kemferol podawano przez 18 tygodni w dawkach: 5, 50, 80 i 160 mg/kg m.c./dzień. Od tej grupy zwierząt również pobierano próbki moczu na początku i końcu eksperymentu oraz organy wewnętrzne na końcu badania.

Stwierdzono, że kemferol w dawce 160 mg/kg m.c./dzień wykazuje działanie toksyczne na zwierzęta i ten wariant eksperymentu został przerwany. Terapia kemferolem wpływała na obniżenie ilości GAG w wątrobie i sercu, zwłaszcza u samic po zastosowaniu wyższych dawek. Natomiast w nerkach i śledzionie kemferol sprzyjał spichrzaniu GAG, szczególnie u samców (wyniki były zależne od dawki). Spadek ilości GAG w mózgu obserwowano tylko u samic przy zastosowaniu dawki 50 mg/kg m.c./dzień. Nie stwierdzono wpływu kemferolu na masę wątroby i śledziony. Obniżenie wydalania GAG w moczu obserwowano tylko u samic otrzymujących dawki 5 i 50 mg/kg m.c./dzień.

Oprócz badań biochemicznych prowadzono również analizę zmian behawioru myszy pod wpływem zastosowanych terapii. W tym celu posłużono się testem otwartego pola, testem rozpoznawania nowego przedmiotu (NOR) oraz testem rozpoznawania zmiany miejsca położenia przedmiotu (NLR). Analizując wyniki testu otwartego pola, najlepsze efekty leczenia otrzymano u myszy, którym podawano wyłącznie genisteinę (SRT). Wyniki testów u tych zwierząt były porównywalne z wynikami osiąganymi przez zwierzęta zdrowe. Natomiast leczenie laronidazą (ERT) nie przyniosło żadnych korzystnych rezultatów. Z kolei analiza wyników testów NOR i NLR wykazała brak różnic w zachowaniu myszy chorych i zdrowych pod wpływem zastosowanych wariantów leczenia laronidazą i/lub genisteiną.

Co ciekawe, leczenie kemferolem przyniosło bardzo dobre wyniki testu otwartego pola po zastosowaniu najniższej dawki, czyli 5 mg/kg m.c./dzień. Badano tylko samice. Polepszeniu uległy wszystkie oceniane parametry: czas w ruchu, długość przebytej drogi, częstość wejść i czas przebywania w centrum areny. Rezultaty u leczonych samic MPS I były porównywalne z wynikami u zdrowych samic. Podawanie kemferolu nie przyniosło żadnych korzyści pod kątem oceny testów NOR i NLR.

Oddzielny etap pracy stanowiła optymalizacja protokołu izolacji oraz opracowanie warunków hodowli hepatocytów mysich, co pozwoli na ich wykorzystanie jako komórkowego modelu MPS I *in vitro* potencjalnie lepszego od modeli opierających się na liniach fibroblastów skóry. Sposób oraz warunki hodowli zaproponowane przez doktorantkę pozwoliły na uzyskanie linii hepatocytów od myszy MPS I, które nie wykazywały istotnych różnic morfologicznych w porównaniu z komórkami od myszy zdrowych. Pod względem biochemicznym stwierdzono wyższy poziom GAG w hepatocytach od myszy chorych, a najbardziej widoczne różnice były obserwowane w 72 godz. od momentu założenia hodowli.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników można wyciągnąć ostatecznie następujące ogólne wnioski:

- najlepsze efekty leczenia obserwowane w narządach wewnętrznych myszy MPS I otrzymano po zastosowaniu terapii łączonej (laronidaza+genisteina)
- najbardziej wyraźne pozytywne zmiany w behawiorze chorych myszy stwierdzono po podaniu wyłącznie genisteiny (SRT), chociaż żaden z wariantów leczenia nie wpływał na zmiany kognitywne
- ze względu na toksyczne działanie w wysokiej dawce oraz stymulację spichrzania GAG w nerkach i śledzionie nie można zakwalifikować kemferolu jako czynnika terapeutycznego dla MPS I.

Recenzowana praca liczy 172 strony, składa się z 8 rozdziałów, zawiera 42 ryciny, 9 tabel. Lista piśmiennictwa obejmuje 296 pozycji. Cała praca, w tym prezentacja wyników i dyskusja są przedstawione poprawnie. Brakuje jednak wyodrębnionej części pracy z wyciągniętymi wnioskami.

Z obowiązku recenzenta podaję również uwagi, które nasunęły mi się podczas czytania tej pracy:

1. Poprawne polskie nazwy dwucukrów to N-acetylogalaktozoamina, N-acetyloglukozoamina itd., a nie N-acetyloglukozamina itd.
2. W podpisie do Ryc.1.1. pojawił się błąd literowy: jest łańcuchem glikozoaminoklikanowym; powinno być ... glikozoaminoglikanowym.
Ponadto, na Ryc.1.1. zamianie uległy nazwy łańcuchów GAG (w górnej części rysunku powinien być siarczan heparanu, a w dolnej – siarczan chondroityny). Dodatkowo, graficzne przedstawienie N-acetyloglukozoaminy (granatowe sześciokąty) nie zostało umieszczone i podpisane w legendzie do rysunku.
3. W legendzie do Ryc.1.2. brak graficznego przedstawienia receptora M6P.
4. Uwagi do Ryc. 1.3.:
Enzym deficytowy w MPS II to sulfataza siarczanu iduronianu, a nie sulfataza iduronianu. Podobnie, enzym deficytowy w MPS IIIA to sulfataza siarczanu heparanu, a nie sulfataza heparanu. Enzym deficytowy w MPS IIIB to **alfa-N-acetyloglukozoaminidaza**, a w MPS IIID – sulfataza **6-siarczanu N-acetyloglukozoaminy**.
5. Powyższe uwagi dotyczą również Tabeli 1.2., a ponadto MPS IV to choroba Morquio (nie Morquiro). Przyczyną MPS IVA jest brak aktywności sulfatazy 6-siarczanu N-acetylogalaktozoaminy (nie ...glukoaminy), a przyczyną MPS VI – brak sulfatazy **4-siarczanu N-acetylogalaktozoaminy** zwanej również arylosulfatazą B.
6. Testy enzymatyczne wykonuje się w suchych kroplach krwi, nie – w suchych płamkach krwi (str. 28).
7. W genetyce mówi się raczej o **częstości** występowania danej choroby. Nie stosuje się określenia „częstotliwość występowania choroby X” (str.29).

8. We Wstępie zwraca uwagę brak jednolitego zapisu nazw genów oraz mutacji (np. str. 30).
9. W tekście Rozprawy pojawia się wyraz „egzon” zamiast „ekson” (nazwa pochodzi od ang. expression on) np. str. 30.
10. Na str.30 doktorantka pisze o czynniku korygującym Hurlera. Należy pamiętać, że MPS I opisała Gertrud Hurler (niemiecka lekarka pediatra), a więc czynnik koryguje chorobę Hurler.
11. Na str. 33 autorka pisze, że aktywność alfa-iduronidazy określa się przy użyciu znakowanych fluorescencyjnie substratów **lub** pochodnych 4-metyloumbelliferonu, ale to właśnie 4-MU jest związkiem fluorogennym. Ponadto stosuje się substraty chromogenne np. będące pochodnymi fenolu.
12. W Tabeli 1.3 proponuję zamienić słowo „subkategoria” w odniesieniu do choroby na słowo „podtyp”; „częstotliwość” na „częstość” oraz ujednoczyć nazewnictwo enzymu hialuronidazy (wcześniej we Wstępie podano inną nazwę tego enzymu). Brakuje również odnośnika literaturowego, na podstawie którego tabela została opracowana.
13. W Tabeli 1.4 druga od góry grupa związków to flawonole (nie flawanole).
14. Na str. 59 domyślam się, że chodzi o izoflawon glicyteinę, a nie o glicynę.
15. Na str. 74 jest nieprawidłowe odniesienie do rozdziału 3.6.
16. Ryc. 4.3. – rozbieżność w opisie fotografii oraz w rozwinięciu tekstu po tytule ryciny (MPS i MUT).
17. Proponuję w części „Metody” w punkcie 4.8. „Analiza behawioru zwierząt” dodać informację, po jakim czasie leczenia badano zmiany zachowania. Ta informacja pojawia się w Wynikach.
18. W tytule części 5.2.2. brakuje wyrazu „pola”.
19. Na Ryc. 5.17. brak wskazania płci zwierząt.
20. Na Ryc. 5.25. zamiana podpisów „MPS” i „WT”.
21. Na str. 142 podano nieprawidłową nazwę chemiczną miglustatu. Powinno być - N-butylo-deoksynojrymycina.
22. Poprawy lub uzupełnienia wymagają odnośniki literaturowe nr [102], [175], [224], [245] i [296].

Ponadto w recenzowanej pracy zauważyłam błędy literowe i interpunkcyjne, których listę mogę udostępnić doktorantce lub promotorowi.

Muszę jednak podkreślić, że są to uwagi, które nie mogą wpłynąć na obniżenie merytorycznej wartości recenzowanej pracy.

W podsumowaniu, pragnę stwierdzić, że rozprawa mgr Wioletty Nowickiej stanowi cenny wkład do badań nad opracowaniem nowych terapii dla chorób rzadkich, jakimi są mukopolisacharydozy. Osiągnięcie celów, które postawiła sobie

doktorantka wymagało doskonałego przygotowania w zakresie technik biochemicznych, molekularnych i opanowania pracy ze zwierzętami. Otrzymane wyniki wnoszą istotne wartości poznawcze i posiadają duże znaczenie praktyczne. Stanowią podłoże do dalszych badań nad zastosowaniem terapii ERT i SRT w leczeniu mukopolisacharydoz. Należy podkreślić, że dotychczas nie podejmowano prób leczenia MPS I za pomocą terapii SRT lub połączonych terapii SRT i ERT. Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Nowicką mają zatem duże szanse stać się przyczynkiem do podjęcia takich prób leczenia u ludzi.

Niebagatelne znaczenie ma również opracowanie i optymalizacja hodowli pierwotnej hepatocytów, co pozwoli na wykorzystanie tych komórek jako modelu choroby w dalszych eksperymentach. Recenzowana praca stanowi samodzielny i oryginalny dorobek autorki.

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr Wioletty Nowickiej oceniam pozytywnie i uważam, że spełnia ona warunki określone w Art. 13 Ustawy z dn. 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i uzasadnia nadanie Kandydatce stopnia doktora nauk biologicznych (Obszar wiedzy: Nauki przyrodnicze; Dziedzina: Nauki Biologiczne; Dyscyplina: Biologia). Zwracam się zatem z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Wioletty Nowickiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się również z prośbą o wyróżnienie pracy doktorskiej przedstawionej przez mgr Nowicką.

05095 dr hab. n. med. Agnieszka Ługowska
Prof. nadzw. w IPiN
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
analityk kliniczny,
specjalista laboratoryjnej
genetyki medycznej