

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

Mukopolisacharydoza typu I (MPS I) to choroba metaboliczna należąca do grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LSD), której przyczyną jest brak lub znaczny niedobór enzymu – α -L-iduronidazy, zaangażowanego w rozkład glikozoaminoglikanów (GAG) – siarczanu heparanu (HS) i dermatanu (DS). Zaburzenie katabolizmu tych związków skutkuje ich sukcesywną akumulacją prowadzącą do dysfunkcji całego organizmu. W obrazie klinicznym występują objawy somatyczne oraz neurologiczne, zaś możliwości ich leczenia są mocno ograniczone. Strategie terapeutyczne w większości polegają na dostarczeniu aktywnego enzymu do komórek, w których obserwujemy deficyt, co może odbywać się w ramach enzymatycznej terapii zastępczej (ERT), polegającej na dożylnym podaniu rekombinowanej α -L-iduronidazy, wykorzystywanej w leczeniu nieneurologicznej postaci MPS I, bądź przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) w ciężkich typach z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Żadna z tych metod leczenia nie jest w stanie skutecznie korygować wszystkich deficytów funkcjonalnych związanych z postępem choroby, ponadto niosą ze sobą znaczne ograniczenia. Wprowadzanie obcego białka do organizmu pacjenta w ramach ERT powoduje aktywację odpowiedzi immunologicznej, w wyniku której może dochodzić do obniżenia aktywności α -L-iduronidazy przez wytwarzane przeciwciała. Natomiast skuteczność HSCT jest zależna od wieku pacjenta, gdyż pozytywnych rezultatów można się spodziewać tylko wtedy, gdy transplantacja zostanie przeprowadzona u dzieci poniżej 2,5 roku życia. Mając powyższe na uwadze zasadnym wydaje się poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych z uwzględnieniem dostarczenia leku do OUN również w przypadkach późnej diagnozy.

Alternatywę stanowi terapia polegająca na obniżeniu wydajności procesu syntezy substratu (SRT), w której wykorzystuje się niskocząsteczkowe substancje w celu ograniczenia biosyntezy GAG. Związkiem, który posiada zdolność do modulowania syntezy GAG jest naturalny izoflawon sojowy – genisteina. W ramach przeprowadzonych przeze mnie badań, w doświadczeniach *in vivo* z wykorzystaniem mysiego modelu MPS I, oceniłam skuteczność długoterminowego stosowania genisteiny w dawce 160 mg/kg mc./dzień. Ponadto oceniłam potencjał łącznego zastosowania genisteiny i rekombinowanej α -L-iduronidazy w stosunku do monoterapii. W założeniu dostarczenie dwóch związków, różniących się mechanizmem działania może przyczynić się do uzyskania lepszego efektu terapeutycznego. Dodatkowo

oceniłam czy kemferol, inny związek z grupy flawonoidów, mógłby znaleźć zastosowanie jako czynnik obniżający wydajność procesu syntezy GAG w leczeniu MPS I.

Wyniki, które uzyskałam wykazały, iż długotrwałe, doustne podawanie genisteiny w wysokiej dawce powoduje znaczne obniżenie spichrzanego materiału w wątrobie oraz śledzionie myszy MPS I względem zwierząt z grupy kontrolnej. Co więcej odnotowałam istotne statystycznie obniżenie akumulacji GAG w tkance mózgowej oraz znaczący wpływ testowanej terapii na poprawę zachowań neurokognitywnych samic myszy MPS I otrzymujących genisteinę. Jednoczesne zastosowanie dwóch terapii, genisteiny oraz rekombinowanej α -L-iduronidazy, prowadziło do uzyskania poprawy we wszystkich mierzonych oznakach postępującego procesu chorobowego: zarówno obniżenie spichrzenia GAG w organach wewnętrznych (wątroba, śledziona), jak również w, opornym na leczenie enzymatyczne, mięśniu serca i jego zastawkach. Ponadto odnotowałam obniżenie poziomu GAG wydalanych w moczu zwierząt, które otrzymywały terapię skojarzoną. Łączne stosowanie SRT i ERT pozwoliło na uzyskanie znacznej poprawy behawioru u samic myszy MPS I.

W swojej pracy wykazałam także, iż podawany doustnie kemferol, skutecznie obniża poziom glikozoaminoglikanów w wątrobie oraz w mięśniu serca myszy MPS I w odniesieniu do zwierząt nieleczonych. Dodatkowo wpływa na zmianę zachowań samic myszy MPS I, które odpowiadają behawiorowi zwierząt typu dzikiego. Niemniej jednak odnotowałam także negatywne skutki wywierane przez kemferol, prowadzące do wprost proporcjonalnego do zastosowanej dawki wzrostu spichrzenia GAG w śledzionie oraz nerce.

Z uwagi na fakt, iż wątroba jest organem niezwykle aktywnym metabolicznie, właśnie w niej dochodzi do znacznej akumulacji glikozoaminoglikanów podczas postępującego procesu chorobowego MPS I. Dlatego też w swojej pracy sięgnęłam po model *in vitro* pierwotnych hepatocytów. Zoptymalizowałam protokół izolacji oraz warunków hodowli licznej populacji żywych mysich hepatocytów. Ponadto scharakteryzowałam fenotypowo otrzymaną populację komórek oraz wykazałam istotnie wyższy poziom akumulacji GAG w mysich hepatocytach MPS I względem hepatocytów pozyskanych od zwierząt typu dzikiego.

Prezentowane w pracy wyniki są oryginalnymi doniesieniami dotyczącymi długotrwałego stosowania flawonoidów, genisteiny i kemferolu, oraz ich wpływu na poziom spichrzanych GAG w mysim modelu MPS I. Zbadałam możliwość wykorzystania tych związków, jako czynników aktywnych, skutecznych w terapii MPS I zarówno w postaci monoterapii, jak i w formie uzupełnienia innych rodzajów terapii. Stanowi to podstawę

do rozszerzenia badań nad potencjałem wykorzystania różnych związków flawonoidowych w leczeniu MPS I.