

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

Warszawa, 28 sierpnia, 2023r.

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
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne
Pani magister Magdaleny Węsierskiej
na temat
„Terapia obniżenia wydajności syntezy substratu z zastosowaniem flawonoidów
w mysim modelu mukopolisacharydozy typu I”,
(„Substrate reduction therapy with flavonoids as a treatment for
mucopolysaccharidosis type I in murine model”).
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 12 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 patogenicznych 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

dyzmorfii, 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), czy - niestety ciągle jeszcze na etapie badań eksperymentalnych - terapia za pomocą redukcji syntezy substratu (SRT) oraz 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 farmakologicznymi czaperonami (pharmacological chaperone therapy, PCT), SRT, terapią genową (GT) lub przeszczepem szpiku kostnego (bone marrow transplantation, BMT).

Wcześniejsze badania pozwoliły ustalić, że związki niskocząsteczkowe, stosowane w PCT i SRT, a wśród nich flawonoidy, przekraczają barierę krew-mózg i penetrują do kości, co sugeruje potencjalne wykorzystanie ich w szerokim zakresie w leczeniu chorób lizosomalnych.

Wybór tematu rozprawy doktorskiej jest bardzo trafny, 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) scharakteryzowanie wybranych mieszanin genisteiny z kemferolem, genisteiny z biochaniną A, kemferolu z biochaniną A pod względem cytotoksyczności, wpływu na aktywność metaboliczną komórek, właściwości antyproliferacyjnych, efektywności zmniejszania wydajności procesu syntezy glikozoaminoglikanów oraz rodzaju interakcji zachodzących między tymi związkami;
- 2) ocena możliwości użycia wybranych mieszanin genisteiny z kemferolem w terapii obniżania wydajności procesu syntezy substratu z wykorzystaniem mysiego modelu mukopolisacharydozy typu I;
- 3) ocena bezpieczeństwa stosowania i skuteczności działania biochaniny A jako czynnika aktywnego w terapii obniżania wydajności procesu syntezy substratu w mysim modelu mukopolisacharydozy typu I.

Doktorantka badała wpływ zastosowania dwuskładnikowych mieszanin genisteiny, kemferolu i biochaniny A 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}; *Idua*^{-/-}), będące homozygotami dla mutacji p.W392X, heterozygoty *Idua*^{-/+} oraz myszy typu dzikiego C57BL/6J; *Idua*^{+/+}. W eksperymentach *in vivo* brały udział zwierzęta przyporządkowane do grup samców typu dzikiego, samców MPS I, samic typu dzikiego i samic MPS I. Każda grupa liczyła w początkowym etapie po 6 osobników.

W pierwszej części eksperymentów zostały zbadane *in vitro* dwuskładnikowe mieszaniny genisteiny, kemferolu i biochaniny A pod względem cytotoksyczności, wpływu na aktywność metaboliczną fibroblastów mysich pozyskanych ze skóry ogona, właściwości antyproliferacyjnych, efektywności obniżania wydajności procesu syntezy GAG oraz rodzaju interakcji zachodzących między składnikami mieszanin.

Doktorantka zauważyła, że genisteina, kemferol i biochanina A w zakresie stężeń 15-120 μM i w różnych proporcjach względem siebie nie wykazywały efektu cytotoksycznego wobec fibroblastów mysich podczas 72-godzinnej ekspozycji.

Wpływ badanych flawonoidów na aktywność metaboliczną fibroblastów określano za pomocą testu z MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy). Wartości współczynników interakcji, CI, między komponentami mieszanin wskazywały, że genisteina i kemferol działają synergistycznie tylko w najniższym stężeniu (30 μM) i w proporcji 4:1. Genisteina i biochanina A oraz biochanina A i kemferol działają synergistycznie w stężeniu najwyższym (tzn. 120 μM) oprócz proporcji 4:1, przy której charakter oddziaływań był addycyjny lub anatagonistyczny. Flawonoidy zastosowane oddzielnie wykazywały następujący wpływ na metabolizm komórek:

- Genisteina istotnie statystycznie obniżała aktywność metaboliczną fibroblastów mysich w każdym z badanych stężeń.
- Biochanina A w najwyższym testowanym stężeniu znacząco hamowała aktywność metaboliczną tych komórek.
- Kemferol, w badanym zakresie stężeń, nie wpływał na analizowany proces.

Za pomocą testu z BrdU (5-bromo-2'-deoksyurydyny) wykazano, że najlepszy efekt antyproliferacyjny otrzymano w przypadku mieszanin biochaniny A z kemferolem przy stężeniu 60 μM i 120 μM i w różnych proporcjach. Osobno, genisteina wykazywała istotne działanie antyproliferacyjne we wszystkich badanych stężeniach. Natomiast kemferol i biochanina A znacząco hamowały proliferację fibroblastów mysich po zastosowaniu stężeń 60 μM i 120 μM .

Doktorantka posłużyła się pomiarem ilości inkorporowanej do łańcuchów GAG [³H]-glukoaminy w celu oceny wpływu mieszanin flawonoidów na kinetykę

syntezy GAG. Stwierdziła, że najwyższe działanie hamujące wykazywały flawonoidy w stężeniach 60 i 120 μM niezależnie od proporcji. Najskuteczniejsze były mieszaniny genisteiny z kemferolem i genisteiny z biochaniną A w różnych proporcjach. Mieszanina biochaniny A z kemferolem działała inhibująco przy stężeniu 120 μM w niektórych proporcjach. Stopień zaobserwowanej inhibicji był na tyle wysoki, że prowadził do co najmniej 80% spadku wydajności procesu biosyntezy GAG.

W drugiej części eksperymentów oceniano możliwość zastosowania badanych flawonoidów w terapii SRT *in vivo* z wykorzystaniem mysiego modelu MPS I. Zwierzętom podawano genisteinę z kemferolem w dawce całkowitej 80 mg/kg masy ciała/dzień, w proporcjach 4:1, 3:2, 2:3. Zauważono, że zastosowanie mieszaniny genisteiny z kemferolem w dawce całkowitej 80 mg/kg masy ciała/dzień w proporcji 2:3 od 8. tygodnia terapii prowadziło do zwiększenia aktywności samców MPS I przebywających w klatkach domowych. Poziom aktywności tych myszy był porównywalny do poziomu aktywności samców typu dzikiego.

Zastosowanie mieszanin genisteiny z kemferolem:

- obniżało ilość GAG w wątrobie i śledzionie chorych myszy (samców i samic)
- obniżało ilość GAG w komorach serca u samców MPS I w proporcji 4:1
- prowadziło do wzrostu GAG w mózgu samic MPS I w proporcji 3:2
- obniżało ilość GAG w zastawkach, przedsionkach i komorach serca w proporcji 2:3
- normalizowało wydalanie GAG z moczem po 8 tyg. terapii w proporcji 3:2 bez utrzymania efektu w kolejnych tygodniach leczenia u obu płci; u samców po 16 tyg. leczenia następowało obniżenie wydalania GAG z moczem po zastosowaniu proporcji 4:1
- nie wykazywało większego wpływu na ilość GAG w nerkach.

Oprócz badań biochemicznych prowadzono również analizę zmian behawioru myszy pod wpływem zastosowanych terapii. W tym celu posłużono się testem otwartego pola. Wyniki wskazywały, że samce MPS I leczone mieszaniną w proporcji 2:3 istotnie rzadziej eksplorowały centrum areny w porównaniu do samców nieleczonych. Terapia genisteiną i kemferolem, niezależnie od proporcji mieszanin, nie zaburzyła normalizacji aktywności eksploracyjnej chorych samców w drugiej fazie testu otwartego pola. U chorych samic najlepsze efekty przyniosło leczenie mieszaninami genisteiny i kemferolu w proporcjach 4:1 i 2:3.

Zastosowanie biochaniny A w dawce 5 mg/kg masy ciała/dzień oraz 15 mg/kg masy ciała/dzień wpływało korzystnie na wzrost aktywności samców MPS I przebywających w klatkach domowych, które częściej wykonywały czynności pielęgnacyjne, wspinały się po kratkach klatki i wykazywały zwiększoną zdolność do utrzymania się na nich.

Po 16 tygodniach terapii biochaniną A odnotowano:

- spadek poziomu GAG w śledzionie, wątrobie i części serca obejmującej komory u samców MPS I
- brak wpływu na poziom GAG w mózgu, nerkach i części serca obejmującej przedsionki i zastawki u samców MPS I
- brak wpływu na poziom GAG spichrzanych w żadnej z badanych tkanek samic MPS I po podaniu biochaniny A w dawce 5 mg/kg masy ciała/dzień
- znaczący spadek poziomu GAG w wątrobie i części serca obejmującej przedsionki i zastawki u chorych samic po długoterminowej terapii dawką 15 mg/kg masy ciała/dzień
- brak wpływu na poziom GAG w mózgu, śledzionie, nerkach oraz części serca obejmującej komory u samic MPS I
- brak normalizacji poziomu GAG wydalanych wraz z moczem myszy MPS I obojga płci.

Terapia biochaniną A spowodowała spadek aktywności lokomotorycznej chorych samców w fazie habituacji podczas testu otwartego pola. Podobnie zachowywały się chore samice po terapii, które ponadto pokonywały istotnie krótszy dystans i były mniej ruchliwe i istotnie rzadziej wchodziły do centrum areny niż osobniki MPS I z grupy kontrolnej.

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

- genisteina, kemferol i biochanina A nie wykazują właściwości cytotoksycznych wobec badanych komórek,
- wpływ badanych flawonoidów na aktywność metaboliczną fibroblastów, kinetykę syntezy GAG oraz aktywność antyproliferacyjną był zróżnicowany i zależał od stężenia końcowego, proporcji oraz tego, czy związki były badane w mieszaninach, czy osobno,
- w niektórych przypadkach (mieszaniny genisteiny z kemferolem) synergizm między flawonoidami w mieszaninie wpływał na stopień zaobserwowanej inhibicji syntezy GAG w tak wysokim stopniu, że prowadził do co najmniej 80% spadku wydajności procesu biosyntezy GAG, co pozwala na obniżenie stosowanych stężeń pojedynczych składników
- zastosowanie mieszanin genisteiny i kemferolu zwiększa szanse na uzyskanie efektu terapeutycznego w tkankach, w których terapię pojedynczymi związkami były nieskuteczne
- niektóre mieszaniny genisteiny z kemferolem mogą wywołać niekorzystne efekty, np. wzrost poziomu glikozoaminoglikanów w mózgu
- różnice między płciami wpływające na metabolizm flawonoidów mogą wymagać zastosowania różnego składu, dawki lub schematu dawkowania mieszanin podczas potencjalnej terapii u kobiet i mężczyzn

- biochanina A wykazywała zróżnicowane działanie u samic i samców chorych myszy w odniesieniu do GAG spichrzanych w badanych tkankach. Zarówno u samców, jak i samic MPS I biochanina A wpływała na obniżenie aktywności lokomotorycznej w teście otwartego pola w fazie habituacji.

Recenzowana praca liczy 167 stron, składa się z 8 rozdziałów, zawiera 32 ryciny, 16 tabel. Lista piśmiennictwa obejmuje 166 pozycji. Cała praca, w tym prezentacja wyników i dyskusja są przedstawione poprawnie i starannie.

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

1) uwagi do Tabeli 1:

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-acetyloglukozaminidaza, a w MPS IIID – sulfataza **6-siarczanu** N-acetyloglukozaminy. Ponadto, przyczyną MPS IVA jest brak aktywności sulfatazy 6-siarczanu N-acetylogalaktozamininy (nie brak aktywności galaktozo-6-sulfatazy).

- 2) W tekście rozprawy pojawia się wyraz „egzon” zamiast „ekson” (nazwa pochodzi od ang. expression on) np. str. 21.
- 3) Należy ujednoczyć zapis nazw gangliozydów, ponieważ obecnie na str. 21 jest GM2 i GM3, a dalej na str. 24 jest GM₂ i GM₃.
- 4) W rozwinięciu nazwy MTT jest błąd literowy.
- 5) Poprawne polskie nazwy dwucukrów to N-acetylogalaktozamina, N-acetyloglukozamina itd., a nie N-acetyloglukozamina itd. (np. na str. 28).
- 6) Na str. 67. Doktorantka opisuje proces trawienia homogenatów mózgu, serca i nerek od zwierząt eksperymentalnych. Domyślam się, że używała nadsączu (supernatantu) otrzymanego po wirowaniu homogenatu wspomnianych organów, a nie homogenatu, jak to jest w tekście.
- 7) W „Metodach” w części „3.2. Genotypowanie” brak jest informacji, jaka mutacja była poszukiwana za pomocą ASO-PCR.
- 8) Brak jest komplementarności między założonymi celami, a wyciągniętymi wnioskami. Doktorantka nie umieszcza wniosków odnośnie trzeciego celu, związanego z biochaniną A.

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

W podsumowaniu, pragnę stwierdzić, że rozprawa mgr Magdaleny Węsierskiej 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 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 Węsierską mają zatem duże szanse stać się przyczynkiem do podjęcia takich prób leczenia u ludzi.

Recenzowana praca stanowi samodzielny i oryginalny dorobek autorki.

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr Magdaleny Węsierskiej oceniam pozytywnie i uważam, że spełnia ona wymogi określone w Art. 13 Ustawy z dn. 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z Art.179. Ustawy z dn. 3 lipca 2018r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1669 z późn. zm.) i uzasadnia nadanie Kandydatce stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych. Zwracam się zatem z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Węsierskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się również z prośbą o wyróżnienie pracy doktorskiej przedstawionej przez mgr Węsierską ze względu na:

- innowacyjne podejście do zastosowania flawonoidów w terapii obniżania wydajności syntezy substratu w odniesieniu do mukopolisacharydozy typu I,
- stwierdzenie, że dwuskładnikowe mieszaniny flawonoidów nie zawsze wykazują lepszy efekt biologiczny, niż pojedynczy związek,
- obserwację, że synergia między niektórymi flawonoidami wzmacnia efekt terapeutyczny i umożliwia obniżenie dawek poszczególnych czynników aktywnych oraz minimalizację skutków ubocznych,
- obserwację, że w przypadku niektórych flawonoidów zastosowanie mieszanin w odpowiednich proporcjach dawało efekt pozytywny w tkankach niewrażliwych na terapie pojedynczymi związkami oraz że flawonoidy wykazują zróżnicowane działanie w zależności od płci.

Agnieszka Ługowska

06095 dr hab. n. med. Agnieszka Ługowska
Prof. nadzw. w IPiN
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
analityk kliniczny,
specjalista laboratoryjnej
genetyki medycznej

