



*Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska  
Zakład Biofarmacji i Radiofarmacji  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Mickiewicza 2C  
15-222 Białystok  
tel. 085 748 56 07  
e-mail: [ewa.chabielska@umb.edu.pl](mailto:ewa.chabielska@umb.edu.pl)*

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
**pt., „ Autologiczne komórki pochodzenia miogenego od pacjentów dystroficznych**  
**poddane modyfikacji genetycznej jako nowa strategia poprawy struktury i funkcji mięśni**  
**szkieletowych w chorobie Duchenne`a”**

**wykonanej przez mgr Martę Budzińską**

**w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka**  
**Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu**

**Promotor rozprawy Prof. dr hab. n.med. Maciej Kurpisz**

**Ocena merytoryczna rozprawy**

Dystrofia mięśniowa Duchenne`a (DMD) jest recesywną chorobą nerwowo-mięśniową, sprzężoną z chromosomem X. Jej powodem są zróżnicowane mutacje w genie kodującym dystrofinę i mimo znacznego postępu wiedzy oraz poznania molekularnego podłoża choroby, terapia nadal jest ograniczona do objawowego leczenia glikokortykosteroidami.

Różnorodność możliwych mutacji w genie DMD, który jest największym znanym ludzkim genem, zwraca uwagę badaczy w kierunku substytucji dystrofiny białkiem mogącym przejąć jego funkcję tj. na mikrodistrofinę, jako sztuczną konstrukcji, która posiadając domeny funkcjonalne dystrofiny mogłaby zastąpić ją w dystroficznych komórkach mięśniowych. Ponadto, naukowcy widzą konieczność kompleksowej poprawy stanu pacjentów w terapiach łączonych, wykorzystujących jednocześnie strategie celujące w przyczynę genetyczną oraz osłabiające drugorzędowe skutki DMD.

Jednym z budzących nadzieję podejść eksperymentalnych, jest realizowany w zespole Pana Profesora Macieja Kurpisza projekt dotyczący nowej strategii terapii choroby Duchenne'a, w której wykorzystane są autologiczne komórki pochodzenia miogenego pacjentów dystroficznych poddane korekcie genetycznej. Taka terapia komórkowa niesie istotne korzyści ze względu na brak konieczności włączania terapii immunosupresyjnej. Ponadto, w świetle aktualnych danych, połączenie terapii komórkami macierzystymi z zastosowaniem konstrukcji lentiwirusowej dla sekwencji mikrodistrofiny ( $\mu$ DYS) może mieć wpływ na drugorzędowe objawy DMD, a zatem finalnie łagodniejszy przebieg choroby.

Celem badań, które są tematem rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Budzińskiej było utworzenie linii indukowanych komórek mezenchymalnych modyfikowanych mikrodytrofiną, zdolnych do poprawy funkcji mięśni szkieletowych myszy z chorobą Duchenne'a

W eksperymentach Doktorantka wykorzystwała warsztat badawczy obejmujący uznane, nowoczesne i wysokospecjalistyczne techniki z zakresu biologii molekularnej, technik analityki biologicznej, genetyki i biochemii. W badaniach *in vivo*, użyła dorosłe samce myszy z dystrofią mięśniową Duchenne'a (*mdx*). W pierwszym etapie eksperymentów, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste zostały przeprogramowane z komórek mięśniowych chorych na dystrofię mięśniową Duchenne'a (czterech chłopców z łagodnym i ciężkim fenotypem choroby), które następnie zróżnicowano w prekursorowe komórki mezoangioblastopodobne (HIDEMs). W kolejnym etapie zastosowano lentiwirusową konstrukcję posiadającą sekwencję dla  $\mu$ DYS do transdukcji komórek HIDEMs. Interesującym etapem badań Doktorantki była analiza biochemiczna parametrów stresu oksydacyjnego oraz ekspresji genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS w homogenatach komórek HIDEMs przed i po transdukcji  $\mu$ DYS. W ostatnim etapie eksperymentu transdukowane komórki podano miejscowo myszom (mięśnie piszczelowe przednie) i oceniono wpływ zastosowanej terapii na długość pokonanego na bieżni dystansu oraz liczbę przyjętych przez zwierzę szoków elektrycznych stymulujących zwierzę do biegu.

W tak zaprojektowanych badaniach Doktorantka wykazała, iż komórki iPS, które zostały zreprogramowane z dystroficznych komórek mięśniowych pochodzących od pacjentów z DMD wykazywały cechy pluripotencji, były stabilne i nie posiadały cech spontanicznego różnicowania. Następnie Doktorantka skutecznie dokonała procesu różnicowania komórek iPS do komórek HIDEMs. Zauważyła, iż zróżnicowany u pacjentów poziom ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek HIDEMs był zależny od fenotypu schorzenia. Poziom ekspresji markerów mezenchymalnych w komórkach HIDEMs pacjenta z łagodnym fenotypem był najbardziej zbliżony do populacji kontrolnej HIDEMs. W kolejnym etapie eksperymentu, potwierdziła możliwość transdukcji komórek HIDEMs konstrukcją lentiwirusową zawierającą sekwencję  $\mu$ DYS w komórkach z różnymi mutacjami w obrębie genu DMD. Największą nadekspresję mikrodytrofiny uzyskała w komórkach pacjenta z łagodnym fenotypem choroby, przy całkowitym braku nadekspresji mikrodytrofiny u pacjenta tetraplegicznego. W toku dalszych badań dowiodła, że transdukcja komórek HIDEMs konstrukcją lentiwirusową zawierającą sekwencję  $\mu$ DYS może znamienne zmieniać ekspresję genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS, pełniącej istotną rolę w zachowaniu prawidłowej funkcji mięśni. Zauważyła wzrost ekspresji genów surowiczego czynnika odpowiedzi (SRF), czynnika jądrowego wzmacniającego ekspresję łańcuchów lekkich kappa aktywowanych komórek B (NFKB1) i czynnika martwicy nowotworu alfa (TNFA) wyłącznie w komórkach pacjenta z łagodnym fenotypem choroby. Obecność podwyższonej ekspresji genów należących do ścieżki sygnałowej STARS i ich pozytywny wpływ na funkcjonowanie i regenerację mięśni zdaniem Doktorantki, może być celem dalszych szczegółowych badań. Kolejne wyniki sugerują, że transdukcja komórek konstrukcją lentiwirusową zawierającą sekwencję  $\mu$ DYS zmniejsza stres oksydacyjny w komórkach HIDEMs. Świadczył o tym spadek aktywności katalazy (CAT) oraz całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) i wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w komórkach pacjentów o łagodnym fenotypie choroby. Zdaniem Doktorantki wyniki te dowodzą celowości badań dotyczących znaczenia reaktywnych form tlenu w przebiegu

DMD, jako ważnych elementów wpływających na patogenezę choroby i mogących być celem w złożonym podejściu terapeutycznym. Chętnie poznałabym szczegółowe propozycje kierunków dalszych badań i opinię Doktorantki o zasadności dołączenia do przyczynowej strategii terapeutycznej DMD np. farmakologicznej modulacji stresu oksydacyjnego. W końcowym etapie badań Doktorantka nie zaobserwowała różnic w pokonanym dystansie na bieżni przez myszy *mdx*, którym przeszczepiono transdukowane  $\mu$ DYS komórki HIDEMs w porównaniu z grupą myszy kontrolnych, przy jednocześnie niższej liczbie szoków elektrycznych. Wydaje się, że może świadczyć o pozytywnym działaniu transdukowanych komórek HIDEMs w mięśniach chorych zwierząt, jednak należy zgodzić się z Doktorantką, że z uwagi na metodologiczne ograniczenia tego badania nie należy formułować jeszcze ostatecznych wniosków dotyczących poprawy funkcji dystroficznych mięśni.

Podsumowując, wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy. Na podkreślenie zasługują merytoryczne plany doświadczalne, nowatorskie wyniki badań oraz potencjał translacyjny badań. Część wyników ma jeszcze charakter wstępny, jednak ich analiza pozostawiła mnie z silnym przekonaniem o celowości kontynuowania badań. Jak dowodzą dotychczasowe rezultaty wartość proponowanej strategii może być ściśle związana z rodzajem mutacji i fenotypem choroby. Wyniki badań Doktorantki stanowią cenny wkład do światowej wiedzy dotyczącej poszukiwania złożonej, wielokierunkowej terapii dystrofii mięśniowej Duchenne'a dowodząc, że proponowane w pracy połączenie terapii komórkowej i genowej wraz z modyfikacją komórkowych szlaków biochemicznych w dystroficznych komórkach jest właściwym kierunkiem badań.

#### **Ocena formalna rozprawy**

Badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej były finansowane w ramach grantu: OPUS 2017/25/B/NZ5/01131 Narodowego Centrum Nauki.

Rozprawa została napisana w postaci 67 stronicowej monografii o typowej strukturze. Tytuł rozprawy precyzyjnie odzwierciedla zagadnienia będące przedmiotem badań Doktorantki. Rozprawę podzielono na rozdziały, rozpoczynając od 11-stronicowego WSTĘPU zawierającego wszystkie istotne dane w oparciu o które Doktorantka zaproponowała nowatorską strategię kompleksowego podejścia do leczenia dystrofii mięśniowej Duchenne'a. W rozdziale „ZAŁOŻENIA I CEL PRACY” Doktorantka przedstawia precyzyjnie sformułowane, spójne z hipotezami plany badawcze, finalnie przedstawione w formie celu głównego i czterech celów szczegółowych. Kolejny, najdłuższy rozdział rozprawy pt. „MATERIAŁY I METODY” liczący 28 stron, zawiera szczegółowy opis materiałów i metodologii, ilustrowany tabelami i rycinami. Techniki badawcze zostały obszernie opisane i dowodzą, że Doktorantka sprawnie opanowała różnorodny warsztat doświadczalny. Rozdział rozprawy - „WYNIKI” liczy 16 stron. Wyniki badań opisane są bardzo szczegółowo oraz graficznie przedstawione na 12, w większości złożonych, panelowych rycinach oraz w 2 tabelach. Niektóre z rycin są bardzo słabo czytelne z racji na mnogość danych i/lub skalę rycin. Analiza statystyczna jest adekwatna do rodzaju analizowanych danych. Rozdział „DYSKUSJA” liczy 8 stron i jest zwarty, bez zbędnych powtórzeń wcześniej omówionych w rozprawie zagadnień. Doktorantka w sposób dojrzały omawia wyniki kolejnych etapów eksperymentów zarówno w kontekście autorskich hipotez badawczych jak i dotychczasowych, skromnych danych literaturowych. W tej części rozprawy znajduje się także analiza ograniczeń metodologicznych (niedoskonały pod wieloma względami model zwierzęcy DMD i niska liczebność grup badanych myszy), które są powodem, co warto podkreślić, ostrożnej interpretacji wyników. W podsumowaniu tego rozdziału Autorka

odnosi się także do aplikacyjnego znaczenia swoich badań, w szczególności w grupach pacjentów z łagodnym fenotypem DMD. Dyskusja nad wynikami jest więc dowodem bardzo dobrego przygotowania Doktorantki do badań nad tezami rozprawy doktorskiej oraz umiejętności krytycznej oceny tekstu naukowego i formułowania wniosków. W kolejnym rozdziale pt. „WNIOSKI” Doktorantka umieściła sześć, trafnie postawionych i nie wybiegających poza cele badań, wniosków końcowych. W rozdziale „PIŚMIENNICTWO” znajduje się 46 aktualnych (najstarsze pozycje z 1995 roku) pozycji bibliograficznych. Zwraca uwagę brak staranności w redakcji spisu piśmiennictwa.

### **Konkluzja**

Wysoko oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Marty Budzińskiej pt. *„Autologiczne komórki pochodzenia miogenne od pacjentów dystroficznych poddane modyfikacji genetycznej jako nowa strategia poprawy struktury i funkcji mięśni szkieletowych w chorobie Duchenne’a”*. Stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). Wobec powyższego, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Marty Budzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Ewa Chabielska

Białystok, 17 .10.2024