

Celowanie w mikroRNA-378 w mysim modelu dystrofii mięśniowej Duchenne'a – broń w walce symptomami choroby?

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) to choroba genetyczna objawiająca się postępującym i jednocześnie nieodwracalnym zanikiem mięśni, dotykająca w przybliżeniu 1 na 5000 urodzonych chłopców. Po raz pierwszy została opisana w 1861 roku przez francuskiego neurologa Guillaume'a Benjamina Amada Duchenne'a, natomiast jej bezpośrednią przyczynę zidentyfikowano dopiero ponad 100 lat później. Do dziś jednak DMD pozostaje chorobą nieuleczalną. Pierwsze zauważalne symptomy pojawiają się już w wieku 2-3 lat i obejmują problemy z chodzeniem i bieganiem, natomiast w wieku 12-15 lat chorzy nie są już w stanie chodzić samodzielnie. Choroba postępuje bardzo szybko prowadząc w końcu do niewydolności sercowo-oddechowej, będącej główną przyczyną śmierci chorych w drugiej lub trzeciej dekadzie życia.

DMD jest jedną z najcięższych form dystrofii mięśniowej, a jej etiologia związana jest z występowaniem mutacji w genie kodującym dystrofinę, która stanowi białko strukturalne wszystkich komórek mięśniowych stabilizując tym samym mięśnie podczas skurczu. Jej brak powoduje, że komórki mięśniowe stają się niezwykle wrażliwe na uszkodzenia mechaniczne, dochodzi do ich nekrozy, a to z kolei indukuje procesy zapalne. Jednocześnie aktywowane zostają komórki macierzyste mięśni, tzw. komórki satelitarne, których zadaniem jest zregenerowanie uszkodzonego mięśnia. Niestety jednak, ciągłe cykle uszkodzenia i regeneracji trwające latami osłabiają zdolności regeneracyjne przy jednocześnie utrzymującym się stanie zapalnym. Wszystko to w konsekwencji prowadzi do zaniku mięśni.

Jedyną dostępną formą leczenia pacjentów chorych na DMD jest zastosowanie glukokortykoidów, które działają głównie jako środki anty-zapalne. Dzięki tym lekom następuje poprawa stanu zdrowia pacjentów związana m.in. z przedłużeniem okresu samodzielnego poruszania się, jednak ich codzienne zażywanie wiąże się z wieloma skutkami ubocznymi. W związku z tym niezbędne jest poszukiwanie nowych czynników wpływających na progresję tej choroby. Ostatnie badania sugerują, że oprócz symptomów choroby ściśle związanych z komórkami mięśniowymi, również zaburzenia w ogólnoustrojowym metabolizmie glukozy i tłuszczów mogą przyczyniać się do pogorszenia kondycji chorych. Jednym z czynników wpływających zarówno na komórki mięśniowe jak i modulujących ogólnoustrojowy metabolizm jest mikroRNA-378 (miR-378). Co ciekawe wykazano podwyższony poziom miR-378 u pacjentów chorych na DMD, a nasze badania wstępne sugerują, że pozbawienie miR-378 w mysim modelu DMD, tzw. myszach *mdx* wpływa na zwiększoną zdolność do biegania tych myszy w teście na bieżni. Niemniej jednak wciąż nie jest wiadomo, czy ma to związek jedynie z wpływem miR-378 na funkcjonalność mięśni, zmiany w metabolizmie, czy może na obydwie te procesy.

W związku z powyższym, w ramach projektu pragniemy rozszerzyć nasze wcześniejsze badania dotyczące roli miR-378 w progresji DMD w mysim modelu tej choroby. Naszym celem będzie weryfikacja hipotezy, która zakłada, że za złagodzenie fenotypu dystroficznego u myszy dodatkowo pozbawionych miR-378 odpowiadają zarówno zmiany prowadzące do poprawy funkcjonalności mięśni oraz modulacja procesów związanych z metabolizmem glukozy oraz tłuszczu. Ponadto zakładamy, że zastosowanie fisetyny, związku zaliczanego do grupy roślinnych polifenoli, będzie miało korzystny wpływ na osłabienie fenotypu dystroficznego. Fisetyna hamuje miR-378, ale również posiada szereg właściwości anty-zapalnych i cytoprotekcyjnych, co pozwala sugerować, że jej zastosowanie znacząco wpłynie na złagodzenie przebiegu tej choroby u myszy dystroficznych, ale potencjalnie również u pacjentów chorych na DMD.

Aby zbadać postawione hipotezy, przeprowadzimy doświadczenia na mysim modelu choroby DMD czyli myszach *mdx* oraz unikatowym modelu myszy tzw. podwójnych nokautów, czyli myszach *mdx* dodatkowo pozbawionych miR-378. Przeprowadzimy analizę funkcjonalności mięśni poprzez wykonanie testów siły uchwytu, skurczu mięśni oraz ich mechanicznej stabilności. Wykonamy również szereg analiz związanych ze sprawdzeniem zmian w metabolizmie glukozy oraz tłuszczów, analizując je zarówno w mięśniach jak i w wątrobie. W celu sprawdzenia wpływu fisetyny na fenotyp dystroficzny zastosujemy opisane wyżej strategie oraz szczegółowo przyjrzymy się zmianom związanym z degeneracją i regeneracją mięśni. Dodatkowo wykonamy globalną analizę ekspresji genów z mięśni i wątroby, aby przyjrzeć się potencjalnemu mechanizmowi działania fisetyny.

Wynikiem realizacji projektu będzie dokładna analiza roli miR-378 w funkcjonalności mięśni oraz modulowaniu metabolizmu glukozy i lipidów w mysim modelu DMD. Wierzmy, że zaplanowane badania pozwolą na uzyskanie odpowiedzi na wiele nurtujących pytań, a zastosowanie fisetyny m.in. jako czynnika modulującego poziom miR-378 może przyczynić się do opracowania nowych, terapeutycznych strategii leczenia DMD.