

Nowe spojrzenie na cytoprotekcyjne funkcje siarkowodoru – czy H₂S może zapobiegać progresji dystrofii mięśniowej Duchenne'a?

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest najczęściej spotykaną i jedną z najcięższych form dystrofii mięśniowej i dotyka 1 na 5000 – 6000 chłopców. Pierwsze objawy DMD zauważalne u małych chłopców to zaburzenia chodzenia, które postępują wraz z wiekiem a w drugiej/trzeciej dekadzie życia dochodzi również do niewydolności oddechowo-krażeniowej na skutek atrofii mięśni oddechowych. Rozwijająca się kardiomiopatia i powikłania sercowo-naczyniowe są jedną z głównych przyczyn zgonu chorych na DMD.

Ta nieuleczalna dotąd choroba jest spowodowana mutacjami w genie kodującym białko dystrofinę, zapewniającym prawidłowe połączenie między cytoszkieletem aktynowym włókna mięśniowego a białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. W pozbawionych dystrofiny mięśniach dochodzi do ciągłej aktywacji komórek satelitarnych, nasilonego włóknienia i stresu oksydacyjnego oraz indukcji procesów zapalnych, co prowadzi do upośledzenia funkcji mięśni. Ostatnio wykazano, że pozbawione dystrofiny są nie tylko komórki mięśniowe, ale również komórki śródbłonna, budujące naczynia krwionośne. Wyniki naszych badań sugerują, że na rozwój DMD mogą wpływać zaburzenia angiogenezy czyli procesu tworzenia naczyń krwionośnych.

Główną dostępną formą leczenia pacjentów chorych na DMD jest zastosowanie glukokortykoidów, które działają przede wszystkim jako środki anty-zapalne, wywołując równocześnie wiele skutków ubocznych. Ponieważ wciąż choroba jest nieuleczalna, niezbędne jest poszukiwanie nowych czynników wpływających na jej progresję. W badaniach wstępnych stwierdziliśmy obniżoną ekspresję genów kodujących enzymy generujące siarkowodór (H₂S) w tkankach dystroficznych myszy oraz w ludzkich próbkach. **W związku z tym w ramach projektu pragniemy zweryfikować hipotezę, iż siarkowodór (H₂S), gaz o działaniu anty-zapalnym, anty-oksydacyjnym, anty-włóknieniowym, pro-angiogennym i kardioprotekcyjnym może mieć terapeutyczne działanie w przebiegu DMD.**

Aby zbadać postawione założenie, przeprowadzimy doświadczenia w mysim modelu choroby czyli myszach *mdx*, pozbawionych ekspresji dystrofiny. Dodatkowo, zastosujemy również myszy *mdx/utr^{-/-}* pozbawione ekspresji dystrofiny oraz utrofiny, która może przejmować funkcje dystrofiny. Myszy te wykazują ostrzejszy przebieg choroby niż myszy *mdx* i są stosowane głównie do badania powikłań sercowo-naczyniowych. W celu sprawdzenia podobnych zależności w modelu ludzkim, proponujemy nowoczesną strategię wykorzystania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) uzyskanych z krwi osób zdrowych oraz pochodzących od pacjentów cierpiących na DMD a także stworzenia odpowiednich linii izogenicznych z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 a następnie ich zróżnicowania do komórek śródbłonna oraz kardiomiocytów. W modelach *in vitro* i *in vivo* testowany będzie wpływ związków uwalniających H₂S a także terapia genowa, tj. nadekspresja enzymów generujących siarkowodór. Wykorzystując technologię RNA-seq, testy funkcjonalne oceniające wydolność wysiłkową myszy, kurczliwość mięśni, czynność serca, metody biochemiczne i testy do oceny właściwości kardiomiocytów (np. dynamikę wapnia, aktywność mitochondriów) i komórek śródbłonna (np. potencjał angiogeny z wykorzystaniem testu Matrigel oraz kultur sferoidalnych w żelu kolagenowym) dokładnie zbadamy rolę H₂S w progresji DMD.

Wynikiem realizacji projektu będzie dokładne sprawdzenie hipotezy o pozytywnej roli H₂S w modulacji procesów istotnych w rozwoju DMD, w tym zapalenia, włóknienia, autofagii, angiogenezy i kardiomiopatii. Wierzimy, że zaplanowane badania z wykorzystaniem mysich modeli choroby, terapii genowej oraz indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych pozwolą na lepsze zrozumienie mechanizmów choroby.