

# RAPORT Z REALIZACJI BADAŃ W RAMACH PROJEKTU

**Tytuł projektu:** CoQ10 w chorobie Sanfilippo

## Cel badań

Koenzym Q10 (CoQ10) jest naturalnie występującą w organizmie człowieka cząsteczką umiejscowioną w błonach wszystkich komórek organizmu.

Najlepiej poznaną i główną funkcją tej cząsteczki jest wymiana elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Ubichinol (zredukowana forma CoQ10) jest jednym z ważniejszych antyoksydantów o charakterze lipofilowym, zapobiegającym m.in. generacji wolnych rodników czy modyfikacji białek, lipidów oraz DNA na skutek ich utlenienia. (Skrszydłewska i Siemieniuk, 2005) Inne procesy, w których bierze udział CoQ10 to m.in. regulacja mitochondrialnego rozprężania białek, tworzenie przepuszczalnych porów w błonach mitochondriów, biosynteza nukleozydów pirymidynowych, apoptoza. Ponadto CoQ10 przez udział w transporcie elektronów w błonie lizosomu i obniżanie tym samym poziomu pH wewnątrz niego, odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu enzymów lizosomalnych.

Istnieją dowody wskazujące na związek pomiędzy obniżonym poziomem CoQ10 (i innych przeciwutleniaczy), a chorobami lizosomalnymi, w tym lizosomalnymi chorobami spichrzeniowymi (MPS IIIA i IIIB). Matalong i wsp w swoich badaniach wykazali nie tylko, że w komórkach osób cierpiących na MPS IIIA i IIIB poziom CoQ10 jest wtórnie obniżony, ale udowodnili również, że ich inkubacja w roztworze zawierającym odpowiednie stężenie tej cząsteczki obniża poziom GAG, a w przypadku niektórych linii może wpływać na wzrost resztkowej aktywności dysfunkcyjnego enzymu (Matalonga i inni, 2013).

Ze względu na to, że dotychczasowe dane literaturowe pozostają fragmentaryczne, niejednoznaczne i dotyczą jedynie wybranych podtypów mukopolisacharydozy typu III, celem niniejszej pracy jest określenie wpływu CoQ10 na poziom GAG we wszystkich podtypach choroby Sanfilippo.

## Uzyskane wyniki badań

### *Linie komórkowe*

Do badań wykorzystanych zostało 5 linii komórkowych:

- 1) HDFa (human dermal fibroblasts adult) (Sigma Aldrich)
- 2) fibroblasty pochodzące od pacjenta z MPS IIIA (Coriell Institute for Medical Research)
- 3) fibroblasty pochodzące od pacjenta z MPS IIIB (Coriell Institute for Medical Research)
- 4) fibroblasty pochodzące od pacjenta z MPS IIIC (Coriell Institute for Medical Research)
- 5) fibroblasty pochodzące od pacjenta z MPS IIID (Coriell Institute for Medical Research)

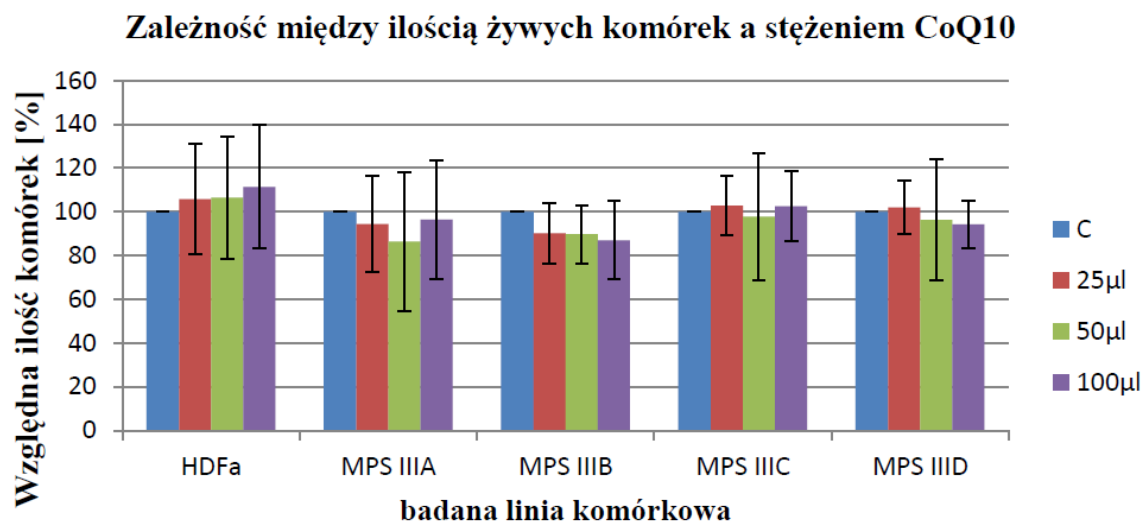
Charakterystyka linii komórkowych pochodzących od pacjentów z chorobą Sanfilippo jest przedstawiona w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Linie fibroblastów pochodzące od pacjentów

Nazwa linii	Płeć	Wiek w momencie pobrania komórek	Zmutowany gen i jego locus	Wykryte mutacje
MPS 3A	żeńską	3 lata	SGSH, 17q25.3	złożona heterozygota p.Glu447Lys/p.Arg24His
MPS 3B	męska	7 lat	NAGLU, 17q21	homozygota p.Arg626Ter/p.Arg626Ter
MPS 3C	męska	8 lat	HGSNAT, 8p11.1	bd
MPS 3D	męska	7 lat	GNS, 12q14	homozygota p.Arg355Ter/p.Arg355Ter

### Test żywotności komórek- SRB

Test żywotności komórek miał na celu sprawdzenie czy wybrane stężenia roztworu CoQ10 wpływają negatywnie na wzrost komórek. Wykres zamieszczony na Ryc. 1 pokazuje zależność między ilością żywych komórek, a użytym stężeniem roztworu.

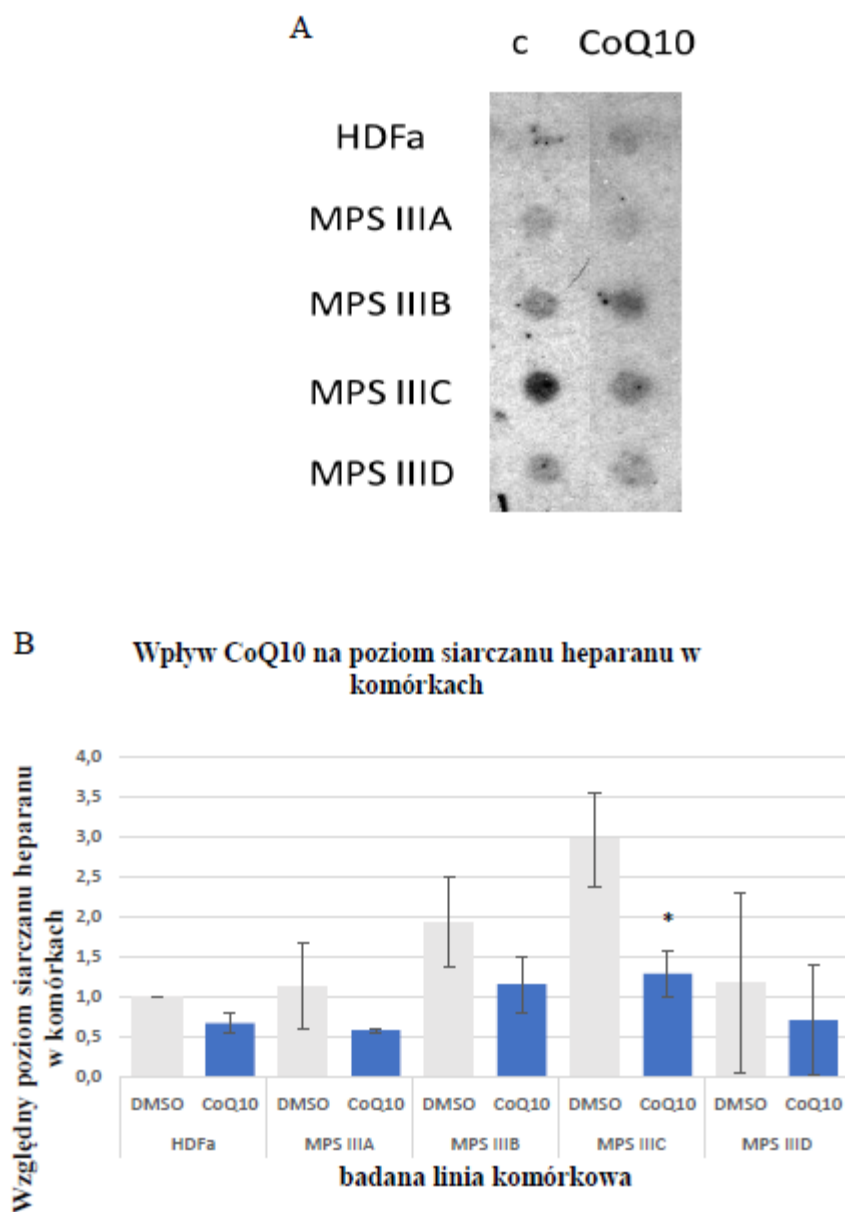


**Ryc. 1.** Liczba żywych komórek po traktowaniu DMSO (c) oraz koenzymem Q10 do końcowego stężenia 25 μM, 50 μM i 100 μM przez 24 godziny. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako średnią z odchyleniem standardowym. Gwiazdką oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla hodowli w obecności koenzymu Q10 i w obecności DMSO ( $p < 0,05$  w teście ANOVA).

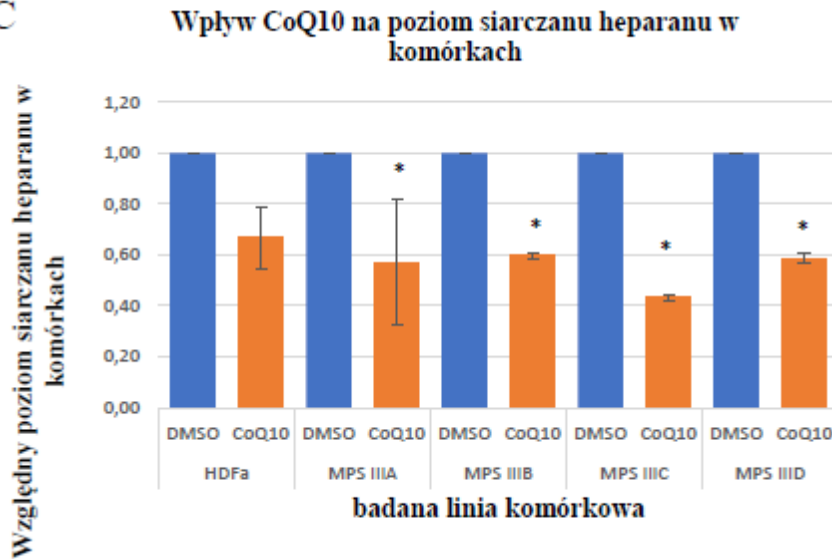
Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że użyte w doświadczeniu stężenia koenzymu Q10 nie wpływają negatywnie na wzrost hodowli komórkowych zarówno HDFa, jaki i wszystkich podtypów MPS III i mogą być wykorzystane do dalszych badań. W celu osiągnięcia możliwie najlepszych efektów terapeutycznych, w kolejnych testach wykorzystano stężenie 100  $\mu$ M CoQ10.

### ***Badanie poziomu glikozaminoglikanów w komórkach***

Badanie poziomu glikozaminoglikanów w komórkach miało na celu sprawdzenie czy CoQ10 może powodować spadek ilości siarczanu heparanu odkładającego się w komórkach. Przykładowe zdjęcie kliszy oraz wykresy zamieszczone na Ryc. 2 ilustrują rezultat wykonanego badania.



C



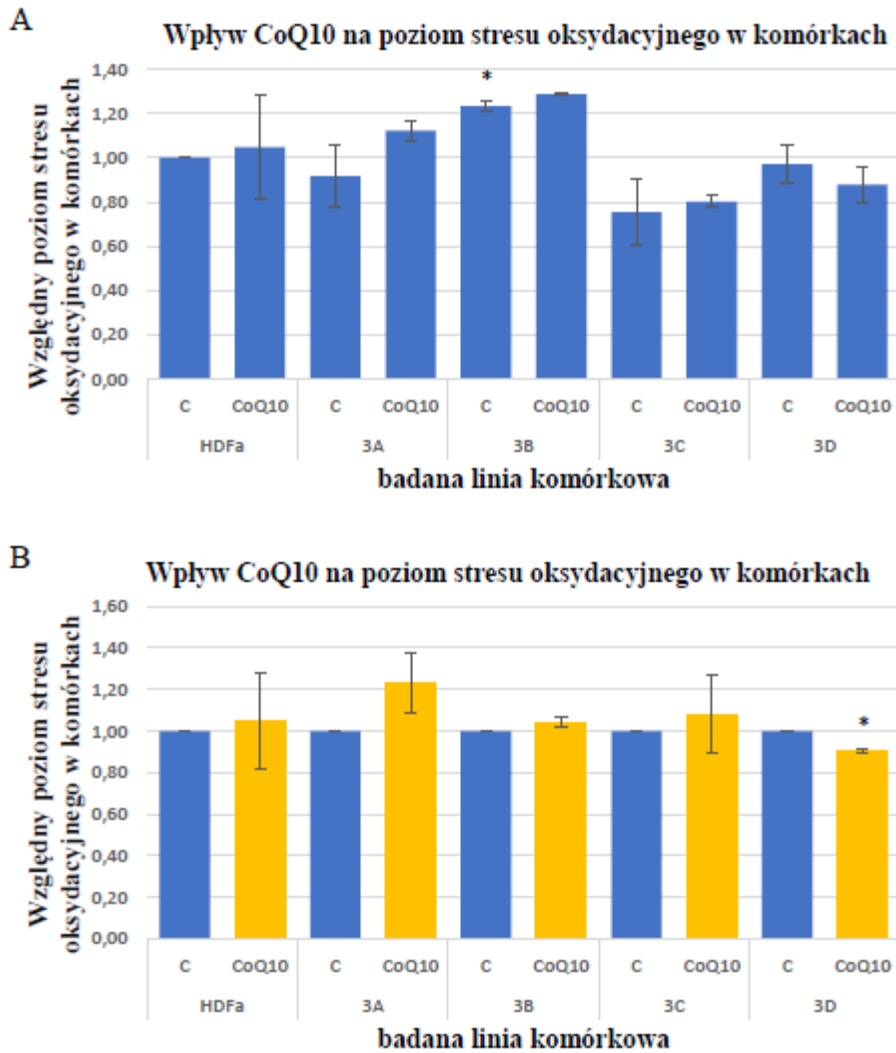
**Ryc. 2.** Względny poziom siarczanu heparanu w komórkach HDFa, MPS IIIA, IIIB, IIIC i IIID po traktowaniu DMSO albo koenzymem Q10 do końcowego stężenia 100  $\mu$ M przez 24 godziny. 6A Przykładowe zdjęcie kliszy. 6B i 6C Względny poziom siarczanu heparanu w porównaniu do komórek zdrowych (B) oraz w porównaniu do kontroli negatywnej (C). Doświadczenie przeprowadzono w dwóch niezależnych powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako średnią z odchyleniem standardowym. Gwiazdką oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla hodowli w obecności koenzymu Q10 i w obecności DMSO ( $p < 0,05$  w teście ANOVA).

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że poziom spichrzania w komórkach osób chorych pozostaje wyższy w porównaniu z HDFa, jednak CoQ10 o stężeniu 100  $\mu$ M istotnie obniża poziom siarczanu heparanu. Najlepszy efekt obserwuje się w przypadku MPS IIIC. Nieco słabszy, ale również pozytywny efekt uzyskany został dla podtypów IIIA, IIIB oraz IIID.

### ***Badanie poziomu stresu oksydacyjnego***

Ze względu na fakt, że dostępne źródła literaturowe wskazują stres oksydacyjny jako jedną z przyczyn powstawania patologicznych zmian w przebiegu choroby Sanfilippo, (Heon-Roberts, Nguyen i Pshezhetsky, 2020) sprawdzano czy CoQ10 spowoduje spadek jego poziomu.

Wyniki uzyskane w badaniu poziomu stresu oksydacyjnego pokazują, że poziom ROS jest istotnie wyższy tylko w przypadku MPS IIIB (Ryc. 3A) w stosunku do komórek HDFa. Natomiast koenzym Q10 skutecznie obniża poziom stresu oksydacyjnego w komórkach pobranych od pacjenta z MPS IIID (Ryc. 3B). W przypadku pozostałych linii nie obserwuje się takiego efektu.



**Ryc. 3.** Względny poziom stresu oksydacyjnego w komórkach HDFa, MPS IIIA, IIIB, IIIC i IIID po traktowaniu DMSO albo koenzymem Q10 do końcowego stężenia 100  $\mu$ M przez 24 godziny. Wykresy ilustrują odpowiednio poziom stresu oksydacyjnego w porównaniu do komórek zdrowych (A) oraz w porównaniu do kontroli negatywnej (B). Doświadczenie przeprowadzono w dwóch niezależnych powtórzeniach, a wyniki przedstawiono jako średnią z odchyleniem standardowym. Gwiazdką oznaczono statystycznie istotne różnice ( $p < 0,05$  w teście ANOVA).

## Dyskusja wyników

Podstawową przyczyną patologicznych zmian i zaburzeń obserwowanych w przebiegu mukopolisacharydozy typu III jest niedostateczna aktywność jednej z lizosomanych hydrolaz odpowiadających za degradację siarczanu heparanu. Akumulacja tej makrocząsteczki w lizosomach powoduje upośledzenie ich funkcji zaburzając pracę komórki, a w dalszych etapach, tkanki, narządu i całego organizmu (Casale i Crane, 2019). Głównym celem potencjalnych terapii w przypadku tego typu MPS powinien być OUN, ponieważ to jego uszkodzenia składają się przede wszystkim na obraz charakterystycznych objawów choroby

Sanfilippo (Heon-Roberts, Nguyen i Pshezhetsky, 2020) (Gaffke, Pierzynowska, Piotrowska i Węgrzyn, 2017). Opracowanie skutecznej metody leczenia jest więc o tyle problematyczne, że zastosowane związki muszą być zdolne do przekroczenia bariery krew-mózg.

Cząsteczką o potencjalnie terapeutycznym działaniu i jednocześnie zdolną do przenikania do OUN jest CoQ10. W dostępnej literaturze podobne doświadczenia prowadzone były z użyciem komórek pobranych od pacjentów cierpiących na MPS IIIA oraz MPS IIIB (Matalonga i inni, 2013). Rezultaty przedstawionych badań pokrywają się z wynikami przedstawionymi w literaturze. CoQ10 zastosowany w stężeniach 25, 50 oraz 100  $\mu\text{M}$  nie wpływa negatywnie na wzrost komórek, niezależnie od podtypu choroby. Inkubacja komórek w środowisku uzupełnionym o 100  $\mu\text{M}$  roztwór koenzymu Q10 pozytywnie wpływa na ilość odkładanych w lizosomach GAG. Tendencja spadkowa obserwowana jest we wszystkich podtypach MPS III, jednak najlepszy efekt uzyskano w przypadku komórek pobranych od pacjenta z MPS IIIC. Wyniki uzyskane dla MPS IIIA i MPS IIIB pokrywają się z danymi literaturowymi (Matalonga i inni, 2013). Badanie poziomu stresu oksydacyjnego pokazuje, że jego poziom jest znacząco wyższy tylko w przypadku MPS IIIB, jednak użycie roztworu CoQ10 o stężeniu 100  $\mu\text{M}$  skutecznie obniża poziom ROS tylko w MPS IIID. Wyniki te sugerują, że spadek poziomu HS nie ma związku z obniżeniem poziomu stresu oksydacyjnego przez koenzym Q10. Być może CoQ10 powoduje spadek poziomu siarczanu heparanu przez poprawienie aktywności enzymatycznej dysfunkcyjnych hydrolaz. Matalonga i wsp. (2013) w prowadzonych badaniach udowodnili, że inkubacja w roztworze CoQ10 może poprawić resztkową aktywność enzymów lizosomalnych odpowiedzialnych za degradację HS dlatego też należy wziąć pod uwagę taki mechanizm.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że niektóre zmiany biochemiczne w fibroblastach spowodowane przez chorobę Sanfilippo mogą być częściowo przywrócone przez CoQ10, ale konieczne są dalsze, szerszej zakrojone badania nad wykorzystaniem tej cząsteczki. Należy rozważyć użycie innych stężeń CoQ10 oraz równoczesne zastosowanie koktajli antyoksydacyjnych w celu uzyskania lepszych efektów terapeutycznych. Dodatkowych badań wymaga również wpływ CoQ10 na resztkową aktywność dysfunkcyjnych enzymów.

## **Literatura**

Casale, J. i Crane, J. S. (2019). NCBI. Pobrano Maj 2020 z lokalizacji <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544295/>

Fecarotta, S., Gasperini, S. i Parenti, G. (2018). New treatments for the mucopolysaccharidoses: from pathophysiology to therapy. *Italian Journal of Pediatrics*, 44,136-141.

Gaffke, L., Pierzynowska, K., Piotrowska, E. i Węgrzyn, G. (2017). How close are we to therapies for Sanfilippodisease? *Metab Brain Disease*, 33,1-10.

Guarany, N. R., Vanz, A., Bender, D. D., Wilke, M. M., Borges, M. D., Giugliani, R. I Doederlein Schwartz, I. V. (2015). Mucopolysaccharidosis: Caregiver Quality of Life. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*,1-7.

Heon-Roberts, R., Nguyen, A. i Pshezhetsky, A. (2020). Molecular Bases of Neurodegeneration and Cognitive Decline, the Major Burden of Sanfilippo Disease. *Jurnal of Clinical Medicine*, 9,2-14.

Jakobkiewicz-Banecka, J., Kloska, A., Piotrowska, E., Malinowska, M., Gabig- Ciminska, M., Banecka-Majkutewicz, Z., Banecki, B., Węgrzyn, A. Węgrzyn, G. (2016). Glycosaminoglycans and mucopolysaccharidosis type III. *Frontiers in Bioscience* 21(7),1393-1409.

Kloska, A., Tylki-Szymańska, A. i Węgrzyn, G. (2011). Mukopolisacharydozy — biochemiczne mechanizmy chorób oraz możliwości terapeutyczne. *Postępy Biochemii* 57(2),133-147.

Matalonga, L., Arias , A., Coll, M., Garcia-Villoria, J., Gort, L. i Ribes, A. (2013). Treatment effect of coenzyme Q10 and an antioxidant cocktail in fibroblasts of patients with Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis* (37),439-446.

Pearse, Y. i Iacovino, M. (2020). A Cure for Sanfilippo Syndrome? A Summary of Current Therapeutic. *KEI Jurnal*, 8(2),2-16.

Pu, J., Guardia, C. M., Keren-Kaplan, T. i Bonifacino, J. (2016). Mechanisms and functions of lysosome positioning. *Journal of Cell Science*, 129, 4329-4339.

Skrszylewska, E. i Siemieniuk, E. (2005). Koenzym Q10 – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka. *Postepy Hig Med Dosw*, 59, 150-159.

Vicha, V. i Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1115.

### **Wniosek końcowy i prośba o przedłużenie realizacji projektu do 31 grudnia 2022 r.**

W ramach przeprowadzonych prac uzyskano interesujące wyniki. Niemniej, potrzebne są dodatkowe analizy w celu potwierdzenia zaobserwowanych efektów CoQ w chorobie Sanfilippo oraz bardziej szczegółowego mechanizmu działania tego związku.

Na podstawie powyższego, zwracam się z prośbą o przygotowanie aneksu do umowy, umożliwiającego przedłużenie realizacji tego projektu do 31 grudnia 2022 r.



*prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn*

Gdańsk, 9 stycznia 2022 r.