

Molekularne mechanizmy dystrofii mięśniowej Duchenne'a i nowe możliwości terapeutyczne

STRESZCZENIE

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) to choroba genetyczna sprzężona z chromosomem X, dotycząca w przybliżeniu 1 na 5000 urodzonych chłopców. Jest spowodowana mutacjami w genie *DMD* kodującym dystrofinę, która odpowiada za stabilność mechaniczną mięśni podczas skurczu. Jej brak prowadzi do postępującego osłabienia mięśni i przedwczesnej śmierci chorych w wyniku niewydolności sercowo-oddechowej. W ostatnich latach opracowano wiele eksperymentalnych terapii, których celem jest przywrócenie funkcjonalnej dystrofiny lub przeciwdziałanie procesom przyczyniającym się do postępu choroby, takim jak zapalenie czy zwłóknienie. Pomimo tego DMD wciąż pozostaje chorobą nieuleczalną, a glikokortykoidy, wykazujące wiele działań niepożądanych, nadal stanowią „złoty standard” leczenia. Aktualne jest zatem opracowywanie innowacyjnych możliwości terapeutycznych, które przynajmniej złagodzą objawy DMD. Wśród nich na uwagę zasługuje celowanie w określone mikroRNA (miR), np. miR-378a, przywrócenie prawidłowej angiogenezy oraz wykorzystanie cytoprotekcyjnych czynników takich jak oksygenaza hemowa-1 (HO-1) czy siarkowodor (H_2S). W niniejszej pracy omówiono zarówno patologię choroby jak i wspomniane, nowe możliwości terapeutyczne w DMD.

DYSTROFIA MIĘŚNIOWA DUCHENNE'A - ZARYS HISTORYCZNY I OBRAZ KLINICZNY CHOROBY

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD, OMIM#310200) to postępująca choroba genetyczna zaliczana do schorzeń nerwowo-mięśniowych. Dotyka około 1 na 5000 urodzonych chłopców, a jej przyczyną jest brak funkcjonalnej dystrofiny – strukturalnego białka mięśni. Pierwszy obraz kliniczny DMD został przedstawiony przez Edwarda Meryona w 1851 roku, ale swoją nazwę choroba zawdzięcza francuskiemu neurologowi, Guillaume'owi Duchenne'owi, który w latach 60tych XIX wieku nie tylko opisał, ale również jako pierwszy sfotografował chorych cierpiących na DMD. Nie znano wówczas molekularnego wytłumaczenia obserwowanej patologii – dopiero ponad 100 lat później, pod koniec lat 80tych XX wieku zidentyfikowano gen *DMD* kodujący dystrofinę, a brak funkcjonalnego białka potwierdzono w biopsjach mięśni chorych, poznając tym samym molekularne podłoże choroby [1,2].

DMD jest najczęściej spotykaną formą dystrofii mięśniowych. Jest dziedziczona w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X, w związku z tym cierpią na nią głównie chłopcy, otrzymując zmutowany chromosom X od matki. Pierwsze symptomy choroby są zauważalne już w wieku 1–3 lat i manifestują się m.in. opóźnionym siadaniem, wstawaniem i chodzeniem, charakterystycznym tzw. kaczkowatym chodem, trudnościami we wchodzeniu po schodach i bieganiu, przerostem łydek oraz objawem Gowera (chorzy wspomagają się rękoma przy podnoszeniu się z pozycji leżącej). W wieku około 8–14 lat pacjenci tracą zdolność samodzielnego poruszania się, a rozwijające się komplikacje krążeniowo-oddechowe, głównie kardiomiopatia (omówione obszernie w pracy przeglądowej naszej grupy [3]) są najczęstszą przyczyną śmierci między 2 a 4 dekadą życia [4,5] (Ryc. 1).

Przypadki kobiet chorych na DMD są niezwykle rzadkie (mniej niż 1 przypadek na milion urodzeń), a kobiety-nosicielki (u których mutacja w genie *DMD* występuje tylko na jednym chromosomie X) w większości nie wykazują żadnych oznak dystrofii. Szacuje się jednak, że u około 2,5–19% przypadków kobiet-nosicielek występuje osłabienie mięśni szkieletowych, a u 7,3–16,7% rozwija się kardiomiopatia [6].

Mięśniowym objawom DMD towarzyszą również problemy intelektualne związane m.in. z trudnościami w mowie i uczeniu się, a także zaburzenia metaboliczne (otyłość, insulinooporność, nietoleracja glukozy) i wady postawy

dr Paulina Podkalicka,

mgr Małgorzata Mysza,

prof. dr hab. Józef Dulak,

dr hab. Agnieszka Łoboda✉,
prof. UJ

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

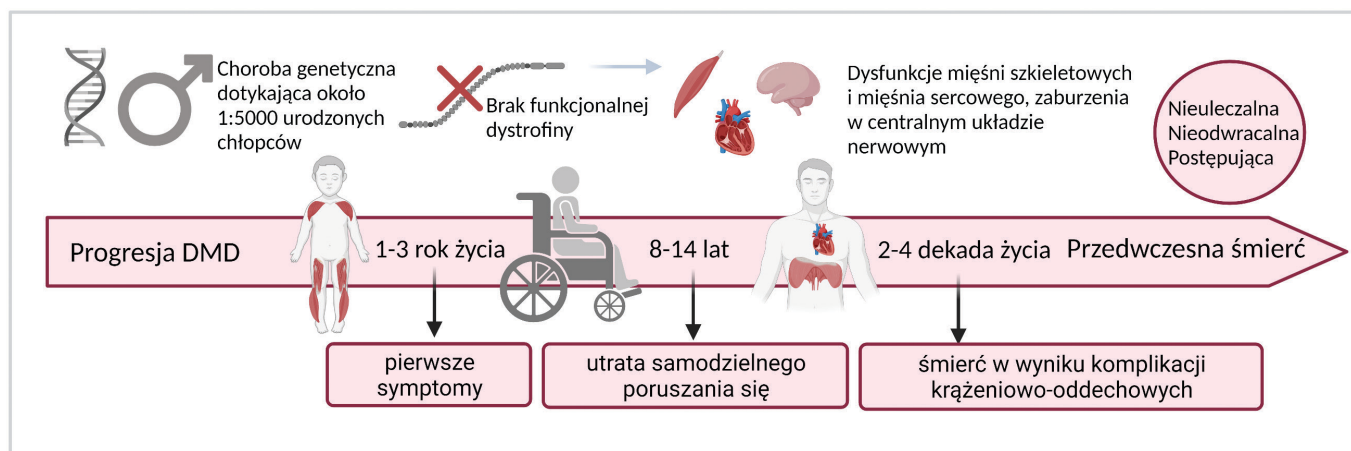
https://doi.org/10.18388/pb.2021_428

✉autor korespondujący: agnieszka.loboda@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: DMD, dystrofia mięśniowa Duchenne'a, miR-378, H_2S , siarkowodor, angiogeneza

Wykaz stosowanych skrótów: DAPC (ang. *dystrophin-associated protein complex*) – kompleks białkowy związany z dystrofiną; DMD (ang. *Duchenne muscular dystrophy*) – dystrofia mięśniowa Duchenne'a; FAP (ang. *fibro-adipogenic progenitors*) – fibro-adipogenne komórki prekursorowe; HLI (ang. *hindlimb ischemia*) – niedokrwienie kończyny tylnej; HO-1 (ang. *heme oxygenase-1*) – oksygenaza hemowa-1; miR (ang. *microRNA*) – mikroRNA; mSC (ang. *muscle satellite cells*) – mięśniowe komórki satelitarne; MyHC (ang. *myosin heavy chain*) – łańcuch ciężki miozyny; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

Podziękowania: Badania prowadzone w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie dotyczące dystrofii mięśniowej Duchenne'a realizowane były/są w ramach projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki i kierowanych przez dr hab. Agnieszkę Łobodę, prof. UJ (#2016/21/B/NZ1/00293; #2019/35/B/NZ3/02817), prof. dr. hab. Józefa Dulaka (#2012/06/A/NZ1/00004; #2018/30/A/NZ3/00412) i mgr Paulinę Podkalicką (#2018/31/N/NZ4/02500). Mgr Paulina Podkalicka korzysta ze wsparcia finansowego Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach programu stypendialnego START 2021. Autorzy składają podziękowania dla mgr Olgi Muchy za pomoc w analizach histologicznych mięśni. Ryciny zostały przygotowane z wykorzystaniem programu *BioRender.com*



Rycina 1. Progresja dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD) – informacje wstępne.

kręgosłupa. W związku z tym pacjenci od najmłodszych lat wymagają kompleksowej opieki medycznej [7].

PODŁOŻE MOLEKULARNE DMD – DMD, DYSTROFINA I KOMPLEKS BIAŁKOWY ZWIĄZANY Z DYSTROFINĄ

Gen *DMD*, zlokalizowany na chromosomie X (prążek Xp21), jest jednym z największych znanych genów – ma długość około 2,4 mln par zasad, a sama sekwencja kodująca zawiera 79 eksonów o łącznej długości 11,4 tysięcy nukleotydów [1] (Ryc. 2). Imponująca wielkość genu *DMD* znajduje również odzwierciedlenie w mnogości mutacji zidentyfikowanych w jego obrębie. Analiza 7000 różnych mutacji występujących u osób cierpiących na DMD wykazała, że zdecydowaną większość stanowią duże mutacje – głównie delecje (68%) i w mniejszym stopniu duplikacje (11%) jednego lub więcej eksonów (głównie w obrębie eksonów 2-20 oraz 45–55). Pozostałe mutacje to tzw. niewielkie mutacje: delecje (5%) i insercje (2%) mniej niż jednoeksonowe, mutacje związane z miejscami alternatywnego składania mRNA (3%), mutacje punktowe, w tym mutacje nonsensowne (10%) i missensowne (zmiany sensu, 0,4%) oraz najrzadsze mutacje intronowe (0,3%) [8].

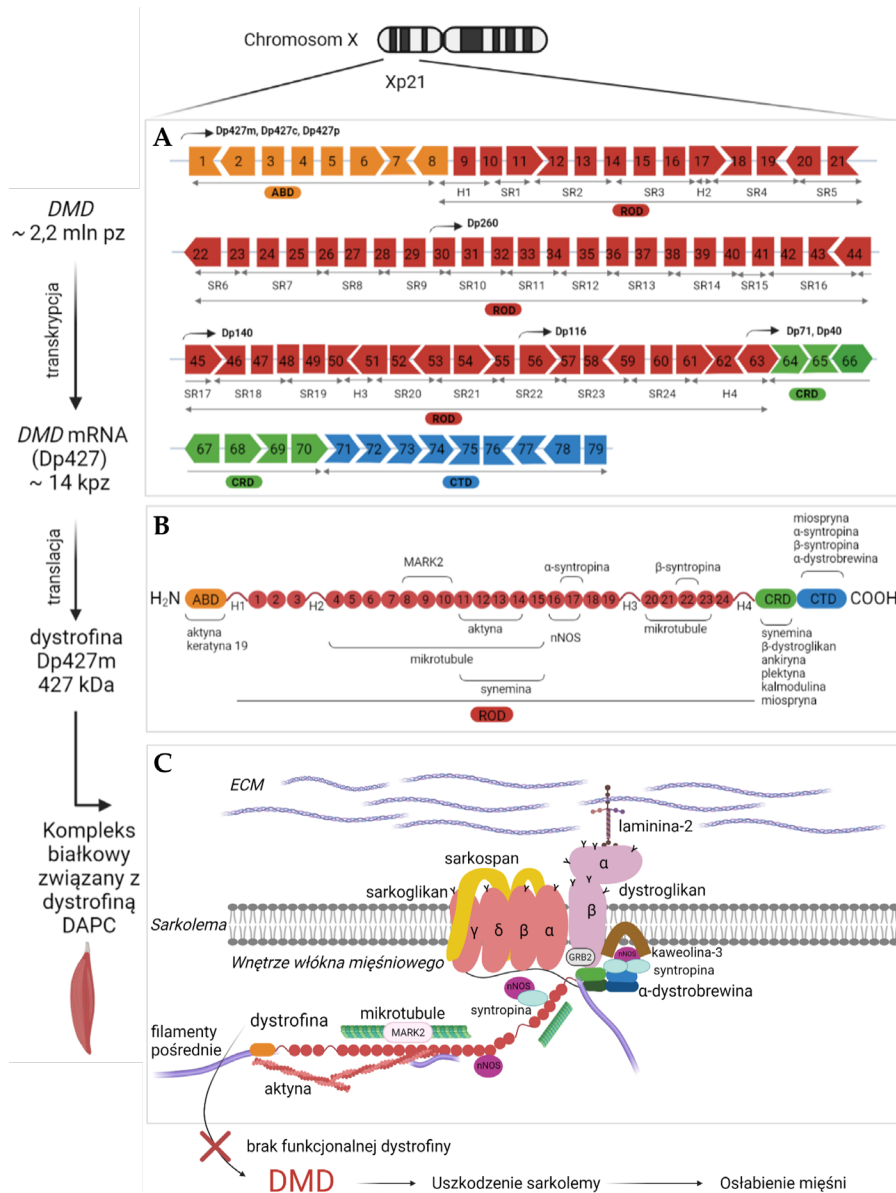
Mutacje w obrębie genu *DMD*, które nie przesuwają otwartej ramki odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) powodują powstanie zmutowanej (krótszej bądź dłuższej), ale częściowo funkcjonalnej dystrofiny. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku dystrofii mięśniowej Beckera (BMD, ang. *Becker's muscular dystrophy*, OMIM#300376), która jest łagodniejszą formą DMD. Mutacje prowadzące do DMD zwykle zaburzają ORF prowadząc do przedwczesnego pojawienia się kodonu stop, terminacji translacji i powstania krótkiej, niefunkcjonalnej formy dystrofiny lub całkowitego jej braku [1].

W genie *DMD* znajduje się siedem promotorów – trzy z nich zlokalizowane przy końcu 5' umożliwiają powstanie izoform dystrofiny pełnej długości o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym 427 kDa – ulegają one ekspresji w neuronach korowych (Dp427c), komórkach Purkiniego (Dp427p) oraz mięśniach (Dp427m). Kolejne cztery promotory znajdujące się w intronach 29, 44, 55, oraz 62 inicjują transkrypcję

krótszych, niemięśniowych izoform dystrofiny, które są pozbawione domeny przy końcu aminowym odpowiedzialnej m.in. za wiązanie aktyny – występują głównie w siatkówce oka (Dp260), ośrodkowym układzie nerwowym i nerkach (Dp140), komórkach Schwanna (Dp116) oraz innych tkankach niemięśniowych (Dp71). Najkrótsza izoforma dystrofiny, Dp40, powstaje z tego samego promotora co Dp71 w wyniku aktywacji alternatywnego miejsca poliadenylacji w intronie 70 i jest obecna głównie w mózgu [1,3] (Ryc. 2A).

Mięśniowa izoforma dystrofiny pełnej długości ma kształt wygiętego pręta i składa się z 4 głównych domen funkcjonalnych: (1) znajdującej się przy końcu aminowym domeny wiążącej aktynę (ABD, ang. *actin binding domain*), (2) domeny centralnej (ROD, ang. *rod domain*), zbudowanej z 24 powtórzeń spektrynowych (SR, ang. *spectrin repeats*) i czterech łączników (H, ang. *hingers*) bogatych w prolinę, (3) domeny bogatej w cysteinę (CRD, ang. *cysteine rich domain*) oraz (4) domeny karboksylowej (CTD, ang. *C-terminal domain*) [1] (Ryc. 2A, B). Blisko 50% mutacji występujących u chorych cierpiących na DMD znajduje się w obrębie miejsc kodujących domenę ABD, w mniejszym stopniu domenę CRD i ROD, a niewiele ponad 10% mutacji jest związanych z miejscami kodującymi domenę CTD [9].

Dystrofina oddziałuje bezpośrednio lub pośrednio z wieloma białkami cytoszkieletu (w tym z aktyną), białkami rusztowania, białkami sygnalizacyjnymi i błoną włókna mięśniowego, sarkolemą (zaznaczonymi na Ryc. 2B, C). Co ważne, jest ona jednym z kluczowych białek wchodzących w skład dużego kompleksu białkowego związanego z dystrofiną (DAPC, ang. *dystrophin-associated protein complex*), nazywanego tradycyjnie glikoproteinowym kompleksem dystrofiny (DGC, ang. *dystrophin glycoprotein complex*). W jego skład (oprócz dystrofiny) wchodzi: α -dystroglikan i laminina-2 (białka zewnątrzkomórkowe), β -dystroglikan i α -, β -, γ -, δ -sarkoglikan wraz ze ściśle do niego przylegającym sarkospanem (białka przez błonowe) oraz $\alpha 1$ -, $\beta 1$ -syntropina, α -dystrobrewina i neuronalna syntaza tlenu azotu (nNOS, NOS1, ang. *neuronal nitric oxide synthase*) (białka wewnątrzkomórkowe) [1, 3] (Ryc. 2C).



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie budowy (A) genu *DMD*, (B) dystrofiny oraz (C) kompleksu białkowego związanego z dystrofiną (DAPC). Na rycinie A różny kształt eksonów wskazuje, czy w przypadku delekcji dojdzie do zachowania (prostokąty) czy utraty (strzałki) otwartej ramki odczytu – ORF. Odmiennymi kolorami zaznaczono eksony kodujące określone domeny białka. MARK2 (ang. *microtubule-affinity regulating kinase 2*) - kinaza regulująca powinowactwo mikrotubuli 2; GRB2 (ang. *growth factor receptor-bound protein 2*) - białko wiążące receptor czynnika wzrostu 2. Szczegółowy opis i wyjaśnienie pozostałych skrótów w tekście.

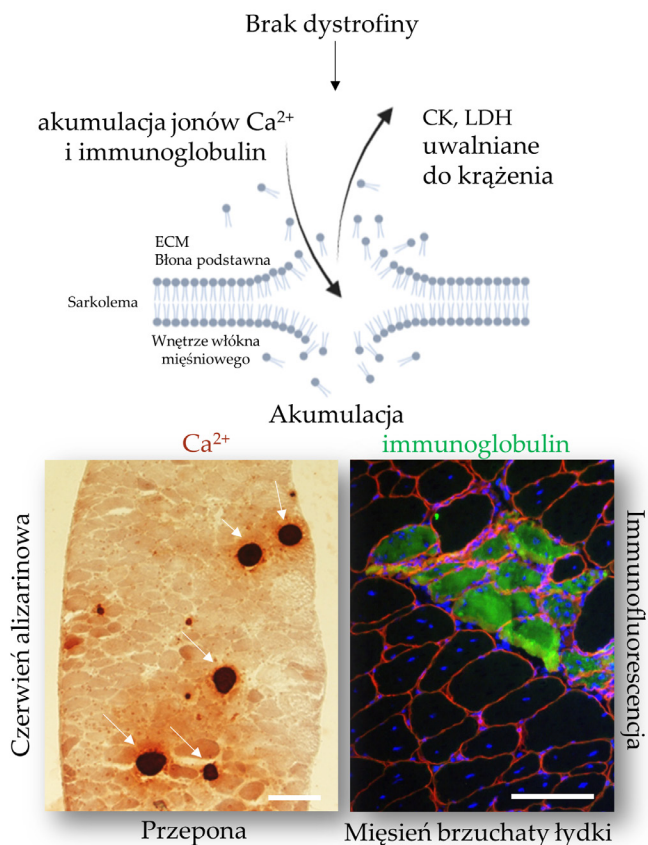
ZARYS KONSEKWENCJI ZWIĄZANYCH Z BRAKIEM DYSTROFINY W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH

Dystrofina pełni istotną rolę w funkcjonowaniu mięśni, choć stanowi zaledwie 0,002% wszystkich białek w nich obecnych. Jej brak pociąga za sobą ogromne konsekwencje - zaburza przede wszystkim stabilność mechaniczną mięśni, jak również powoduje deregulację wielu szlaków sygnałowych. Zmiany towarzyszące DMD nie są zsynchronizowane. Brak mechanicznej stabilizacji podczas skurczu prowadzi do uszkodzenia włókien mięśniowych, a to napędza maszynę molekularną związaną z cyklami zapalenia i regeneracji, które trwają latami. Kiedy jedno włókno mięśniowe ulega degeneracji, inne właśnie się odbudowuje - w związku z tym aktywacji w jednym czasie ulegają różne procesy, odzwierciedlając tym samym kompleksowy charakter choroby zaostrej samonapędzającym się, przewlekłym

zapaleniem i upośledzoną regeneracją. W konsekwencji dochodzi do akumulacji tkanki łącznej w mięśniach wraz z postępującym osłabieniem ich funkcji [1, 10].

USZKODZENIE SARKOLEMY I DEGENERACJA WŁÓKIEŃ MIĘŚNIOWYCH

W pierwszej kolejności dochodzi do utraty integralności sarkolemy. Na skutek wzrostu jej przepuszczalności z mięśni uwalniane są do krążenia m.in. dehydrogenaza mleczanowa (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*) oraz kinaza kreatynowa (CK, ang. *creatine kinase*), będące najbardziej znanymi biomarkerami wykorzystywanymi w diagnostyce DMD. Z drugiej strony, do wnętrza włókien mięśniowych dostają się jony wapnia (Ca^{2+}), zaburzając tym samym gospodarkę wapniową, kluczową dla poprawnego funkcjonowania mięśni (Ryc. 3). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie uszkodzenia sarkolemy w wyniku braku dystrofiny. Akumulacja: jonów Ca^{2+} (na podstawie barwienia czerwienią alizarinową) oraz immunoglobulin IgG/IgM (na podstawie barwienia immunofluorescencyjnego) w uszkodzonych włóknach mięśniowych myszy dystroficznych. Skala: 100 μm .

wapnia jest obserwowany zarówno u osób cierpiących na DMD jak i w modelach zwierzęcych choroby [11]. Sugeruje się jednak, że uszkodzenie błony komórkowej włókien mięśniowych *per se* nie jest główną przyczyną napływu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek – opisano szereg różnych mechanizmów wyjaśniających to zjawisko, związanych m.in. ze wzmożoną aktywnością kanałów wapniowych, wyciekaniem Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej i obniżoną aktywnością Ca^{2+} -ATPazy zlokalizowanej w błonie siateczki śródplazmatycznej (SERCA, ang. *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*). W konsekwencji, przeładowanie komórek jonami Ca^{2+} prowadzi do aktywacji zależnych od wapnia proteaz – kalpainy i fosfolipazy A2, odpowiedzialnych za proteolityczną degradację białek i sarkolemy [12]. Ponadto, dochodzi do dysfunkcji mitochondriów i zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), aż w końcu indukcji szlaków związanych z apoptozą i nekrozą włókien mięśniowych [1]. Co ciekawe, Morgan i wsp. wykazali, że nekroptoza (rodzaj zaprogramowanej śmierci komórkowej morfologicznie przypominający nekrozę) jest również jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za degenerację dystroficznych włókien mięśniowych [13].

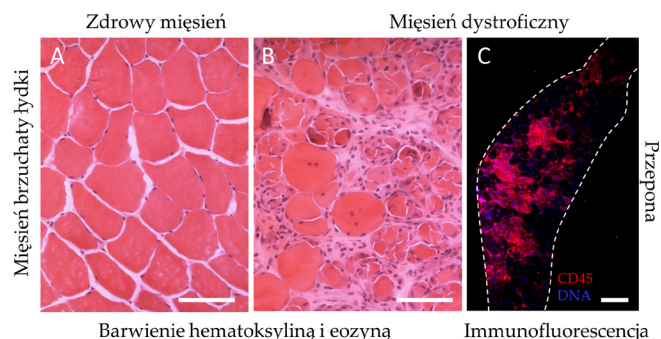
Typowymi markerami uszkodzonych włókien mięśniowych są też albumina i immunoglobuliny (głównie IgG i IgM), które normalnie nie są przepuszczane przez niena-

ruszoną błonę komórkową. Wykorzystanie barwników związanych z albuminą (np. Evans Blue) lub przeciwciał anti-IgG/IgM sprzęgniętych z fluorochromami umożliwia wizualizację uszkodzonych włókien i jest często stosowaną metodą w badaniach dotyczących DMD [14] (Ryc. 3).

PRZEWLEKŁY STAN ZAPALNY

Uszkodzenie włókien mięśniowych natychmiastowo indukuje reakcję zapalną (Ryc. 4). Choć infiltracja mięśni przez komórki układu odpornościowego jest niezbędna w celu fagocytozy zniszczonych włókien mięśniowych oraz inicjacji ich odbudowy, to w przypadku DMD przewlekłe zapalenie *de facto* przyczynia się do osłabienia zdolności regeneracyjnych mięśni szkieletowych i wpływa na postępujący charakter choroby [15]. W odpowiedzi na nasilone zapalenie aktywacji ulegają białka cytoprotekcyjne i antyzapalne, takie jak oksygenaza hemowa 1 (HO-1, ang. *heme oxygenase 1*), której głównym zadaniem jest rozkład prooksydacyjnego hemu (zawartego również w mioglobinie uwalnianej z uszkodzonych włókien mięśniowych) do biliwerdyny, tlenku węgla i jonów Fe^{2+} , wykazujących działanie ochronne w wielu procesach biologicznych (omówionych obszernie w pracy przeglądowej naszej grupy [16]). Obniżenie poziomu HO-1 nasila reakcję zapalną w mięśniach szkieletowych myszy dystroficznych, co wykazaliśmy poprzez farmakologiczne zahamowanie aktywności tego cytoprotekcyjnego enzymu [17].

Podczas wczesnej odpowiedzi zapalnej uwalniane są tzw. alarminy, które aktywują mechanizmy odpowiedzi zapalnej nieswoistej dzięki interakcji z receptorami rozpoznającymi wzorce, w tym receptorami Toll-podobnymi (TLR, ang. *Toll-like receptor*). Sugeruje się, że w przypadku DMD najsilniejszymi alarminami są cząsteczki RNA, ze względu na znacznie podwyższony poziom TLR7 (specyficznego w stosunku do jednoniciowych cząsteczek RNA) już na bardzo wczesnym etapie choroby [18]. Aktywacja TLR7 jest związana ze zwiększeniem poziomu kompleksów głównego układu zgodności tkankowej (MHC, ang. *major histocompatibility complex*) klasy I i II oraz białek układu dopełniacza, jak i nasileniem prozapalnego szlaku sygnałowego związanego z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κB , (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Tym samym dochodzi do produkcji m.in. cytokin prozapalnych i



Rycina 4. Naciek zapalny w mięśniach dystroficznych. Przekrój poprzeczny (A) zdrowego oraz (B) dystroficznego mięśnia brzuchatego łydki z widocznym naciekiem komórek zapalnych na podstawie barwienia hematoksylina i eozyną oraz (C) dystroficznej przepony na podstawie barwienia immunofluorescencyjnego na obecność markera leukocytów – CD45. Barwienia wykonano na preparatach mięśni myszy dystroficznych. Skala: 100 μm .

chemokin rekrutujących komórki odpowiedzi nieswoistej, w następstwie czego włókna nekrotyczne są infiltrowane i fagocytowane w pierwszej kolejności przez neutrofile, a w końcu makrofagi. Paradoksalnie, choć makrofagi eliminują zniszczone włókna, to z drugiej strony są głównymi komórkami odpowiedzialnymi za nasilenie uszkodzenia mięśni. Na etapie wczesnej odpowiedzi zapalnej dominują prozapalne makrofagi typu M1 specjalizujące się w produkcji wolnych rodników i fagocytozie. W odpowiedzi na czynnik martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) i aktywację NF- κ B makrofagi uruchamiają ekspresję i syntezę indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS, NOS2, ang. *inducible nitric oxide synthase*). iNOS metabolizując argininę generuje wolny rodnik NO i cytrulinę. O ile NO w stężeniach fizjologicznych pełni istotną funkcję m.in. w procesie rozszerzania naczyń krwionośnych, to drastyczny, cytotoksyczny wzrost jego stężenia prowadzi do rozpadu włókien mięśniowych i fagocytozy resztek komórkowych. Ze względu na niespecyficznosc tego procesu, zniszczeniu ulegają również nieuszkodzone włókna mięśniowe, zaostrzając tym samym przebieg DMD.

Destrukcyjne działanie prozapalnych makrofagów M1 jest blokowane przez przeciwzapalne i pro-regeneracyjne makrofagi typu M2. Produkują one głównie interleukinę 4 (IL-4, ang. *interleukin 4*), IL-10 oraz transformujący czynnik wzrostu β (TGF β , ang. *transforming growth factor β*). IL-10 osłabia fenotyp makrofagów M1 hamując szlak sygnałowy NF- κ B i obniżając poziom iNOS. Korzystane działanie IL-10 zostało potwierdzone szeregiem badań, w tym wykazaniem, że jej brak w mięśniach myszy dystroficznych prowadzi do znacznego zmniejszenia liczby makrofagów typu M2 i funkcjonalnego osłabienia mięśni. Co istotne, makrofagi M2 wpływają na redukcję nie tylko ekspresji, ale również aktywności iNOS. Jest to związane z produkcją arginazy, która hydrolizuje L-argininę do L-ornityny. W związku z tym dochodzi do rywalizacji makrofagów typu M1 i M2 o substrat – L-argininę, co w konsekwencji osłabia produkcję NO przez makrofagi M1 i redukuje cytotoksyczność prowadzącą do uszkodzenia sarkolemy. Z drugiej jednak strony, korzystnemu wpływowi makrofagów M2 na przebieg dystrofii towarzyszy nasilenie zwłóknienia poprzez indukcję TGF β i zwiększoną syntezę kolagenu przez fibroblasty.

Istotnymi komórkami wczesnej odpowiedzi zapalnej są również komórki tuczne oraz eozynofile, których liczba jest znacząco podwyższona w mięśniach dystroficznych w porównaniu do zdrowej tkanki. Komórki tuczne uwalniają histaminę i prozapalny TNF zaostrzają nekrozę włókien mięśniowych. Eozynofile z jednej strony wykazują działanie cytotoksyczne związane np. z degranulacją białek takich jak główne białko zasadowe (MBP, ang. *major basic protein*), z drugiej produkują m.in. IL-10, co może wpływać korzystnie na DMD.

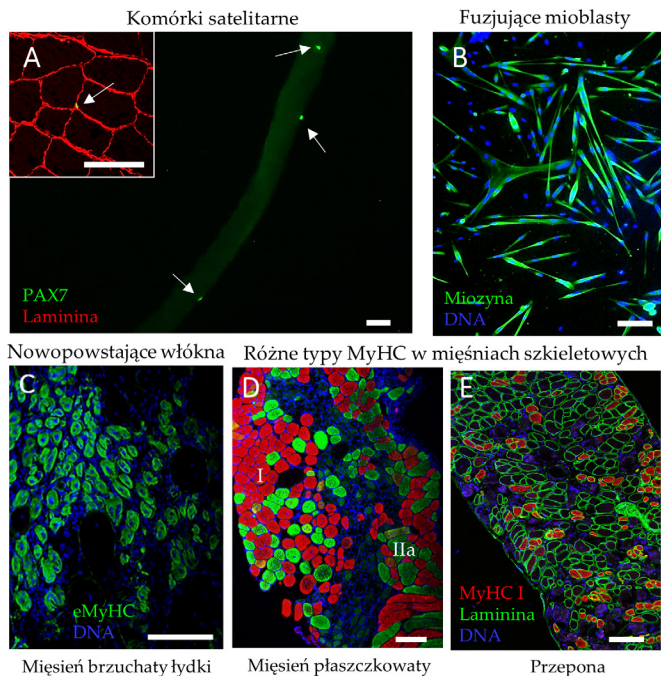
Poza komórkami odpowiedzi nieswoistej, limfocyty T (cytotoksyczne, pomocnicze i regulatorowe) również odgrywają istotną rolę w zapaleniu towarzyszącym DMD. Limfocyty T cytotoksyczne i pomocnicze indukują apoptozę i/lub nekrozę włókien mięśniowych, a ich usunięcie redukuje uszkodzenie mięśni myszy dystroficznych. Nato-

miast limfocyty T regulatorowe wykazują korzystny wpływ na przebieg choroby poprzez m.in. produkcję IL-10 – ich brak jest związany ze zwiększonym uszkodzeniem mięśni i aktywacją prozapalnych makrofagów typu M1. Obecność limfocytów B została potwierdzona w mięśniach chorych cierpiących na DMD, niemniej jednak ich rola w prezentacji antygeny i produkcji przeciwciał w warunkach dystroficznych nie jest dokładnie poznana [15,19].

UPOŚLEDZONA REGENERACJA

Mięśnie szkieletowe wykazują zdolność do regeneracji w odpowiedzi na różnego rodzaju uszkodzenia, a w inicjacji i promowaniu tego procesu istotne znaczenie odgrywa zapalenie [20]. Szczególnie ważne są makrofagi, które zmieniając fenotyp prozapalny na antyzapalny wpływają na różnicowanie komórek macierzystych mięśni, czyli komórek satelitarnych (mSC, ang. *muscle satellite cells*), pełniących fundamentalną rolę w procesie odnowy mięśni szkieletowych [21]. W warunkach homeostazy w dojrzałym organizmie mSC są nieliczną populacją komórek i pozostają w stanie uśpienia. W odpowiedzi na uszkodzenie ulegają aktywacji – intensywnie proliferują, różnicują do mioblastów, po czym ulegają fuzji i tworzą miotuby, które dają początek dojrzałym włóknom mięśniowym. Charakterystycznymi regulatorami potencjału miogenego mSC są czynniki transkrypcyjne z rodziny PAX, w tym PAX7 (ang. *pairbox 7*) oraz miogenne czynniki regulatorowe (MRF, ang. *myogenic regulatory factors*), wśród których możemy wyróżnić miogeny czynnik regulatorowy 4 (MRF4, ang. *myogenic regulatory factor 4*), miogeny czynnik 5 (MYF5, ang. *myogenic factor 5*) oraz czynnik determinacji miogennej (MYOD, ang. *myogenic determination factor*) [22].

PAX7 jest niezbędny w regeneracji mięśni szkieletowych w dojrzałym organizmie [23]. Myszy pozbawione tego czynnika wykazują deficyt lub całkowity brak mSC oraz upośledzoną odbudowę mięśni szkieletowych po uszkodzeniu [24]. Jest on obecny zarówno w spoczynkowych jak i aktywowanych mSC. Podczas aktywacji mSC bierze udział w regulacji ekspresji konkretnych MRF, po czym jego poziom spada na etapie różnicowania mioblastów [25]. Nowe włókna mięśniowe początkowo wykazują obecność wczesnorozwojowych izoform łańcuchów ciężkich miozyny, w tym izoformy embrionalnej (eMyHC, ang. *embryonic myosin heavy chain*) oraz charakteryzują się centralnie położonym jądrem [26]. Następnie dojrzewają (zwiększają swoją wielkość, a jądra migrują na obrzeża komórki) i wykazują mięśniowo-specyficzną dystrybucję różnych izoform MyHC determinujących dany typ włókien mięśniowych (tzw. szybko kurczliwe typu IIa, IIb, IIx i wolno kurczliwe typu I) (Ryc. 5) o określonym potencjale metabolicznym. Ostatni etap regeneracji to przebudowa tkanki łącznej, w tym produkcja białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix proteins*) stanowiących rusztowanie dla nowopowstałych włókien, tworzenie nowych naczyń krwionośnych w procesie angiogenezy oraz unerwienie tkanki [27]. W wyniku efektywnej rekonstrukcji dochodzi więc do strukturalnej i funkcjonalnej odnowy uszkodzonego mięśnia. Jednakże w przypadku DMD, proces ten jest upośledzony.

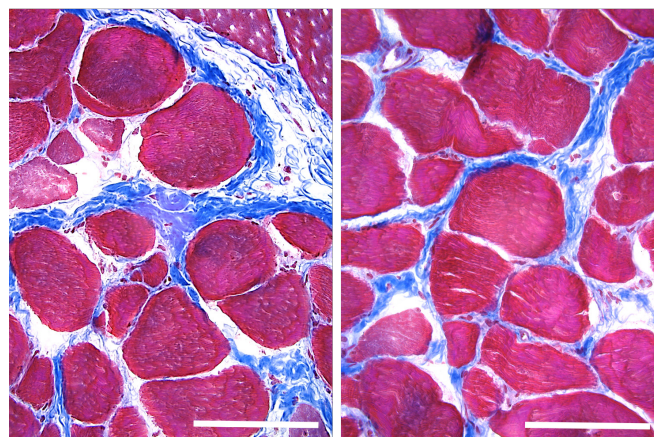


Rycina 5. Wybrane etapy procesu regeneracji mięśni szkieletowych. Przedstawiono: (A) PAX7 pozytywne komórki satelitarne (mSC) zarówno na przekroju poprzecznym mięśnia brzuchatego łydki (lewy górny róg) jak i w pojedynczym włóknie mięśniowym wyizolowanym z mięśnia prostownika palców; (B) Fuzjujące do miotub mioblasty zróżnicowane z mSC wyizolowanych z mięśni kończyn dolnych wybarwione na obecność miozyny przy użyciu przeciwciała rozpoznającego izoformy szybko kurczliwe MyHC; (C) nowopowstające włókna eMyHC pozytywne łydki; (D-E) Dojrzałe włókna mięśniowe wybarwione na obecność różnych izoform MyHC: (D) MyHC I (czerwone), MyHC IIa (zielone); (E) MyHC I (czerwone). Skala: 100 µm. Zdjęcia przedstawiają mysie tkanki lub komórki.

Dotychczas zaproponowano wiele hipotez tłumaczących defekt regeneracyjny w DMD. Jedną z nich zakłada, że w wyniku powtarzających się cykli uszkodzenia i regeneracji oraz ciągłych podziałów mSC w końcu dochodzi do wyczerpania ich zdolności regeneracyjnych, poprzez m.in. osłabienie proliferacji czy indukcję starzenia komórkowego (senescencji) na skutek skracania telomerów. Jednocześnie wiele grup badawczych raportowało wręcz podwyższoną liczbę mSC zarówno w biopsjach mięśni chorych cierpiących na DMD (w wieku 2–7 lat) w porównaniu do odpowiednich kontroli, jak i w izolowanych pojedynczych włókniach mięśniowych z myszy dystroficznych (młodych i starych) w porównaniu do osobników zdrowych. Nasze analizy przeprowadzone na skrawkach mięśni szkieletowych z myszy dystroficznych również potwierdzają te obserwacje, co sugeruje, że defekt w potencjale regeneracyjnym mSC towarzyszący DMD najprawdopodobniej nie jest związany bezpośrednio z redukcją liczby tych komórek [28–30].

mSC jako komórki macierzyste wykazują zarówno potencjał miogenny, jak i posiadają zdolność do samoodnowy, utrzymując tym samym rezerwuar mSC w mięśniach. Samoodnowa jest osiągnięta dzięki podziałom asymetrycznym (powstaje komórka prekursorowa i odnawia się jedna komórka macierzysta) lub symetrycznym (odnawiają się dwie komórki macierzyste). Wykazano, że prawidłowe mSC syntetyzują dystrofinę oddziałującą z kinazą MARK2, która determinuje podział asymetryczny komórek poprzez regulację ich biegunowości [31]. mSC myszy dystroficznych

Dystroficzny mięsień brzuchaty łydki



Barwienie trójbarwne według Massona

Rycina 6. Śródmięśniowa akumulacja kolagenu w dystroficznym mięśniu brzuchatym łydki. Przekrój poprzeczny mięśni myszy dystroficznych. Skala: 100 µm.

wykazują obniżony poziom MARK2, a zatem redukcję asymetrycznych podziałów i postępujący zanik komórek prekursorowych mięśni, co stanowi bardzo prawdopodobny mechanizm odpowiadający za upośledzoną regenerację w DMD [31].

NADMIERNE ZWŁÓKNIENIE

W wyniku upośledzonej regeneracji w warunkach dystroficznych tkanka mięśniowa zostaje zastąpiona tkanką łączną, w tym włóknistą, na skutek nadmiernego odkładania się białek macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in. kolagenów (Ryc. 6) i fibronektyny. Jednym z najistotniejszych i najlepiej poznanych czynników wpływających na zwłóknienie w DMD jest TGFβ. Ulega on silnej ekspresji w mięśniach myszy dystroficznych i u chorych cierpiących na DMD stymulując produkcję białek ECM, w tym fibronektyny i kolagenu [32].

Proces zwłóknienia kontrolują fibro-adipogenne komórki prekursorowe (FAP, ang. *fibro-adipogenic progenitors*), odkryte zaledwie dekadę temu, stanowiące populację komórek pochodzenia mezenchymalnego rezydującą w mięśniach. Definiowane są jako komórki nieposiadające markerów typowych dla komórek hematopoetycznych (CD45), komórek satelitarnych (np. α7-integryna) i komórek śródbłonka (CD31), ale za to wykazujące obecność markerów komórek prekursorowych (CD34 lub Sca-1) oraz charakterystycznego dla fibroblastów receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa (PDGFRα, ang. *platelet-derived growth factor α*). Swoją nazwę zawdzięczają zdolności do różnicowania zarówno w fibroblasty jak i adipocyty *in vitro* i *in vivo* [33, 34]. W warunkach homeostazy pozostają nieaktywne, podobnie jak mSC, natomiast w odpowiedzi na uszkodzenie mięśni ulegają aktywacji, zależnej głównie od IL-4 i IL-14 wydzielanych przez eozynofile [35]. W następstwie proliferują i różnicują do miofibroblastów produkujących białka ECM oraz czynniki promujące różnicowanie miogenne umożliwiając efektywną odnowę mięśni w warunkach fizjologicznych, po czym zostają usunięte z niszy regeneracyjnej na drodze

apoptozy [36,37]. W przypadku DMD okazuje się jednak, że FAP są głównymi komórkami odpowiedzialnymi za nadmierne zwłóknienie i nagromadzenie tłuszczu: dochodzi do ich akumulacji związanej z anty-apoptotycznym działaniem produkowanego przez makrofagi TGFβ [38]. Nasze analizy również wskazują na znaczący wzrost liczby tych komórek w mięśniach szkieletowych myszy dystroficznych [29,30]. Ponadto, Juban i wsp. dowiedli, że FAP są głównym źródłem enzymów aktywujących TGFβ w DMD, promując tym samym produkcję kolagenu przez fibroblasty [39].

LECZENIE DMD I NOWE OPCJE TERAPEUTYCZNE

GLIKOKORTYKOIDY JAKO ZŁOTY STANDARD W LECZENIU DMD - KORZYŚCI I OGRANICZENIA

Od ponad 30 lat standardowo stosowanymi związkami w leczeniu DMD są kortykosteroidy (glikokortykoidy) - prednizon, prednizolon i deflazakort. Sugeruje się, że znacząco osłabiają progresję choroby, przedłużając samodzielne poruszanie się średnio o 2-3 lata i poprawiają funkcjonalność nie tylko mięśni szkieletowych, ale również płuc i serca oraz dodatkowo zmniejszają ryzyko rozwoju skoliozy. Mechanizm ich działania opiera się głównie na osłabianiu odpowiedzi zapalnej poprzez hamowanie ścieżki zależnej od NF-κB [40].

Pomimo korzyści płynących ze stosowania glikokortykoidów, ich długotrwałe, codzienne przyjmowanie wiąże się z szeregiem działań niepożądanych manifestujących się nadmiernym przyrostem masy ciała, zahamowaniem wzrostu, niewydolnością nadnerczy, osłabieniem kości, rozwojem zaćmy i zmianami behawioralnymi, wpływając na pogorszenie jakości życia chorych [40]. Sugeruje się, że rzadsze stosowanie glikokortykoidów, np. raz w tygodniu, znacząco redukuje pojawienie się niekorzystnych objawów przy zachowanym efekcie terapeutycznym [41]. Ponadto testuje się analogi steroidowe, takie jak vamorlon (inaczej VBP15), który podobnie jak standardowe glikokortykoidy spowalnia degenerację mięśni, ale wykazuje mniejsze ryzyko wystąpienia poważnych skutków ubocznych [42].

Obecnie badacze na całym świecie zajmują się opracowywaniem nowych, potencjalnych terapii w walce z DMD. Koncentrują się one zarówno na przywróceniu funkcjonalnej dystrofiny jak i na strategiach łagodzących symptomy choroby, jako alternatywa dla stosowanych obecnie glikokortykoidów [11]. Sugeruje się również, że tzw. terapie łączone, wykorzystujące jednocześnie strategie celujące w przyczynę choroby i osłabiające drugorzędowe skutki braku dystrofiny mogą być addytywnie korzystne terapeutycznie [43].

STRATEGIE MAJĄCE NA CELU PRZYWRÓCENIE EKSPRESJI I SYNTEZY FUNKCJONALNEJ DYSTROFINY

Przywrócenie funkcjonalnej dystrofiny jest z całą pewnością najbardziej uzasadnioną opcją terapeutyczną celującą bezpośrednio w przyczynę choroby, jednocześnie jednak stanowi olbrzymie wyzwanie dla współczesnej biologii molekularnej i terapii genowej. Metody, które są obecnie wykorzystywane to głównie:

- pominięcie eksonu z wykorzystaniem krótkich sekwencji antysensownych oligonukleotydów (AO, ang. *antisense oligonucleotides*) w celu przywrócenia ORF dystrofiny
- translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów stop (ang. *readthrough therapy*) związanych z występowaniem mutacji nonsensowych,
- system edycji genów CRISPR/Cas9 (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) w celu naprawy mutacji w genie *DMD* oraz
- dostarczanie tzw. mini/mikrodystrofiny (skróconych form dystrofiny zawierającej jedynie niezbędne dla pełnionej funkcji domeny) poprzez wektory wirusowe związane z adenowirusami (AAV, ang. *adeno-associated viruses*). Te, jak również inne strategie zostały obszernie omówione w pracy przeglądowej naszej grupy [11].

Wiele potencjalnych leków powstałych na bazie powyższych metod jest obecnie testowanych w fazach klinicznych (np. SRP-9001 w przypadku mikrodystrofiny, DS-5141b - AO mający na celu pominięcie egzonu 45 w genie *DMD*, NPC-14 umożliwiający translacyjny odczyt przedwczesnego kodonu stop), a kilka zostało warunkowo dopuszczonych do stosowania u ograniczonej liczby chorych wykazujących konkretną mutację w genie *DMD* (Eteplirsen oraz Golodirsen i Viltolarsen - AO umożliwiające pominięcie odpowiednio eksonu 51 oraz 53 genu *DMD* oraz Ataluren dostępny dla osób z nonsensowną mutacją w genie *DMD*), choć ich korzystne działanie wciąż wymaga weryfikacji. Należy podkreślić, że wszystkie strategie mające na celu przywrócenie ekspresji oraz syntezy funkcjonalnej dystrofiny stanowią wyzwanie zarówno od strony technicznej (optymalna droga podania tak, by zapewnić produkcję dystrofiny nie tylko w mięśniach szkieletowych, ale również w sercu) jak i biologicznej związanej z jednej strony z odpowiedzią immunologiczną względem dystrofiny i/lub wektorów AAV, a z drugiej z minimalnym poziomem dystrofiny, niezbędnym do wykazania efektu terapeutycznego [11].

Choć strategie te są niezwykle obiecujące wydaje się, że ich szerokie zastosowanie kliniczne może być kwestią odległej przyszłości. Dlatego też poszukiwanie czynników osłabiających przebieg choroby jak i badanie zaburzeń towarzyszących DMD jest wciąż uzasadnione.

PODWYŻSZENIE POZIOMU UTROFINY

Ze względu na wskazane powyżej ograniczenia terapii przywrócenia funkcjonalnej dystrofiny, poszukuje się alternatywnych metod leczenia DMD. Jedną z nich jest nasilenie ekspresji/syntezy utrofiny, białka wykazującego wysoką homologię strukturalną i funkcjonalną do dystrofiny, z zachowanymi domenami odpowiedzialnymi za połączenie cytoszkieletu z ECM, choć pozbawionego m.in. miejsc wiązania nNOS [44]. Utrofina jest syntetyzowana w mięśniach szkieletowych przede wszystkim w okresie płodowym, a w zdrowym, dorosłym organizmie jej obecność jest ograniczona głównie do połączeń nerwowo-mięśniowych i mięśniowo-ścięgniowych, a jej funkcje przejmuje dystrofina.

Protেকcyjne działanie utrofiny wykazano w różnych zwierzęcych modelach DMD. Podwyższenie jej poziomu u myszy *mdx* (np. poprzez krzyżowanie myszy transgenicznych posiadających pełnej długości utrofinę w mięśniach szkieletowych z myszami *mdx* pozbawionymi dystrofiny) pozytywnie wpłynęło na funkcjonowanie mięśni, ich właściwości mechaniczne oraz regenerację włókien [45]. Inną strategią jest również nadekspresja genu *GALGT2* (w wektorach AAV) kodującego O-mannozytransferazę, która prowadzi do glikozylacji α -dystroglikanu i wzrostu poziomu utrofiny, a w konsekwencji do poprawy funkcji serca i mięśni szkieletowych u myszy dystroficznych [46,47].

Ważną zaletą strategii podwyższenia poziomu utrofiny może być minimalne ryzyko indukcji odpowiedzi immunologicznej, którą odnotowano w przypadku dostarczenia dystrofiny i minidystrofiny z wykorzystaniem wektorów AAV. Z drugiej strony, podobnie jak w przypadku dystrofiny, problem może stanowić duży rozmiar genu kodującego utrofinę, co próbuje się rozwiązać poprzez rozwój zminimalizowanych syntetycznych genów utrofiny. Song i wsp. [48] wykonali serię eksperymentów mających na celu porównanie skuteczności zminiaturyzowanej utrofiny (μ Utro) dostarczanej przez wektory AAV z podobnie skonstruowaną mikrodystrofiną. Podejście takie wykazało lepsze działanie w przypadku μ Utro – obserwowano nie tylko hamowanie uszkodzenia mięśni u nowonarodzonych myszy *mdx*, ale również brak wystąpienia odpowiedzi immunologicznej u dystroficznych psów.

Oprócz terapii genowej, pozytywne działanie w modelach zwierzęcych oraz u pacjentów z DMD przyniosło zastosowanie środków farmakologicznych prowadzących do zwiększenia poziomu utrofiny. Choć faza 2 próby klinicznej przeprowadzona z wykorzystaniem związku o nazwie ezutromid (SMT C1100, NCT02858362, clinicaltrials.gov) została zakończona z powodu braku skuteczności, to firma Summit Therapeutics opracowała również inne cząsteczki (należące do tej samej serii co ezutromid) i wykazała ich działanie ochronne u myszy *mdx* [49]. Szereg innych środków farmakologicznych znajduje się obecnie w fazie intensywnych badań o różnym stopniu zaawansowania [50].

Modulacja poziomu utrofiny może być obiecującą strategią terapeutyczną dla wszystkich pacjentów z DMD, niezależnie od rodzaju mutacji dystrofiny. Należy jednak pamiętać, że białko to nie jest w stanie przejąć wszystkich funkcji pełnionych przez dystrofinę, ponieważ m.in. nie posiada miejsca wiązania nNOS. Różnice te mogą mieć istotne konsekwencje kliniczne, dlatego obiecującym rozwiązaniem wydają się być terapie łączone mające na celu jednoczesne zwiększenie poziomu utrofiny i dystrofiny [51].

NOWE PODEJŚCIA TERAPEUTYCZNE

ZABURZENIA ANGIOGENEZY I TERAPIE PRO-ANGIOGENNE W DMD

Jeszcze przed odkryciem dystrofiny sądzono, że bezpośrednią przyczyną DMD związaną z obserwowanym uszkodzeniem włókien mięśniowych u chorych jest niewystarczający dopływ substancji odżywczych w wyniku zaburzeń w

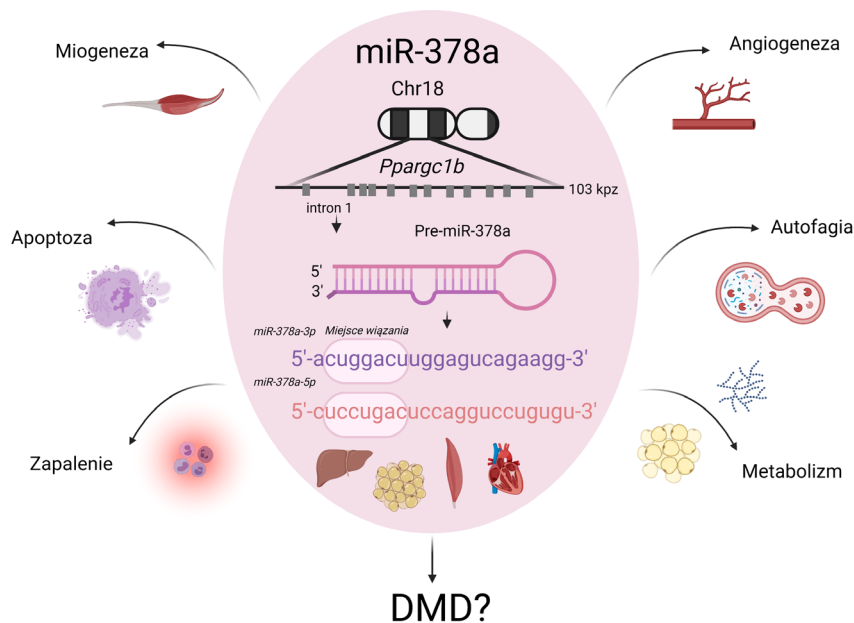
procesie tworzenia naczyń krwionośnych, tj. angiogenezy. Choć ostatecznie tzw. „teoria naczyniowa” została obalona wraz z odkryciem dystrofiny, zagadnienia te nie tracą na ważności (opisano szczegółowo w pracy przeglądowej naszej grupy [52]).

Występowanie zgrupowanych włókien nekrotycznych można tłumaczyć obniżonym poziomem nNOS (na skutek jego delokalizacji z DAPC), a w konsekwencji zmniejszoną produkcją NO, co wpływa na osłabienie protekcyjnego efektu rozszerzania się naczyń krwionośnych podczas skurczu, co prowadzi do niedokrwienia mięśni [53]. Obecnie sugeruje się korzystny wpływ terapii pro-angiogennych na DMD, a ostatnie badania przeprowadzone przez Bosco i wsp. [54] oraz Verma i wsp. [55] wskazują na osłabienie symptomów chorobowych w wyniku zahamowania negatywnego regulatora angiogenezy, receptora 1 czynnika wzrostu śródbłonnka naczyniowego (VEGFR1, ang. *vascular endothelial growth factor receptor 1*).

Tematyka zaburzeń unaczynienia w DMD wydaje się być niezwykle istotna i jest wciąż poruszana przez naukowców. W naszych badaniach wykazaliśmy, że zaburzenia angiogenezy mogą, przynajmniej częściowo, zależeć od wieku, co zaobserwowaliśmy w mysim modelu DMD – myszach *mdx* ze spontaniczną mutacją w eksonie 23 genu *Dmd*. Przeprowadzone analizy podkreśliły deregulację ekspresji czynników związanych z angiogenezą w mięśniach szkieletowych myszy *mdx* w różnym wieku (6-tygodniowe i 12-tygodniowe) wraz ze spadkiem poziomu VEGF, który był widoczny również w komórkach mięśni szkieletowych zróżnicowanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSC, ang. *human induced pluripotent stem cells*) pacjentów cierpiących na DMD w porównaniu do zdrowych osobników [56]. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że osłabiona odbudowa przepływu krwi w odpowiedzi na niedokrwienie kończyny tylnej (HLI, ang. *hindlimb ischemia*) w wyniku podwiązania kończyny dolnej, dotyczyła jedynie starszych myszy *mdx*. Towarzyszyła temu zaburzona odpowiedź zapalna oraz regeneracyjna. Otrzymane wyniki sugerują, że upośledzenie angiogenezy manifestuje się głównie u starszych myszy dystroficznych, stanowiących dobry model do badań mających na celu przywrócenie prawidłowej angiogenezy w celu osłabienia symptomów DMD [56].

MIKRORNA A DMD – POTENCJALNA ROLA MIR-378a

Mając na uwadze szerokie spektrum patofizjologii DMD, uzasadnionymi modulatorami jej progresji są mikroRNA (miRNA, miR) – małe, około 22 nukleotydowe cząsteczki RNA niekodujące białka wpływające negatywnie na ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym [57]. Szacuje się, że aż około 60% ludzkich genów jest regulowanych przez te małe cząsteczki [58], a liczba zidentyfikowanych miRNA osiąga wartość niespełna 2000 w przypadku ludzi i trochę ponad 1200 u myszy [59]. MiRNA biorą udział w modulacji kluczowych procesów biologicznych zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych takich jak DMD [57].



Rycina 7. Rola miR-378a w różnych procesach biologicznych, potencjalnie zaangażowanych w rozwój DMD. Na rycinie przedstawiona została mysia sekwencja miR-378a.

DEREGULACJA MIRNA W DMD

Wśród miRNA odgrywających istotną rolę w rozwoju mięśni, ich różnicowaniu i regeneracji można wyróżnić m.in. miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486 oraz miR-499, które należą do grupy mięśniowych miRNA, tzw. mio-miRów, ze względu na ich wysoki poziom w mięśniach szkieletowych i sercowym. Mio-miRy odgrywają istotną rolę niemalże na każdym etapie rozwoju mięśni [60]. Wyniki naszej grupy również podkreślają istotną rolę miRNA w różnicowaniu mysich komórek mioblastów linii C2C12 oraz mSC w modelu ostrego uszkodzenia kardiotoxyną [61,62].

W warunkach dystroficznych obserwuje się deregulację poziomu różnych miRNA, zarówno w mięśniach myszy *mdx* jak i u chorych cierpiących na DMD w porównaniu odpowiednio do myszy typu dzikiego i zdrowych osób [63]. miRNA o zmienionym profilu ekspresji zostały podzielone na związane z (1) degeneracją (miR-1, miR-39c i miR-135a), które wykazywały spadek ekspresji (związany m.in. ze zwłóknieniem), (2) regeneracją (miR-31, miR-34c, miR-206, miR-335, miR-449 i miR-494), które wykazywały podwyższony poziom, oraz (3) zapaleniem (miR-222 i miR-223), które ulegały ekspresji w miejscach uszkodzenia korelując z nasilonym naciekiem komórek układu odpornościowego [63]. Wyniki naszych analiz wskazują co prawda, że utrata anty-zapalnego miR-146 nie odgrywa znaczącej roli w DMD [29], ale brak miR-378 wpływa istotnie na objawy choroby [64] (szczegółowo opisano poniżej).

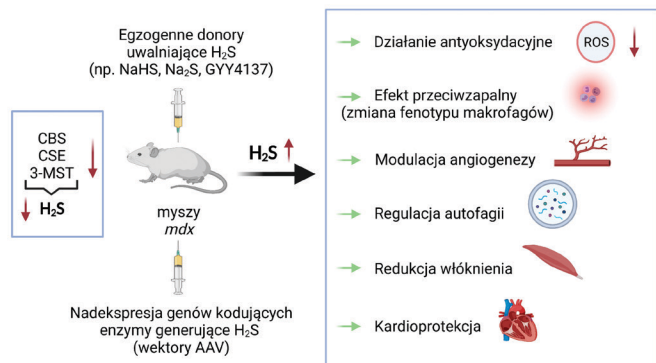
Co ciekawe, obecnie tematyka DMD i miRNA koncentruje się również na deregulacji poziomu miRNA w płynach ustrojowych. Sugeruje się, że mogą być one uwalniane do krążenia pasywnie w wyniku uszkodzenia tkanek, zapalenia, czy śmierci komórkowej lub aktywnie w postaci mikro-pęcherzyków zawierających fragmenty komórkowe oraz za

pośrednictwem białek wiążących RNA [65]. Krążące miRNA mogą być wykorzystywane jako biomarkery w różnych stanach patofizjologicznych, w tym DMD [66,67].

MIR-378a

Wśród miRNA proponowanych jako biomarkery DMD jest miR-378a, zlokalizowany w pierwszym intronie genu *Ppargc1b* kodującego koaktywator 1 β receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksyosomów (PGC1 β , ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta*). Sugeruje się, że miR-378a jest eksymowany wspólnie z *Ppargc1b* i może regulować podobne procesy do tych, w których bierze udział PGC1 β . PGC1 β jest kluczowym czynnikiem wpływającym na metabolizm komórkowy, w tym na biogenezę mitochondrialną czy metabolizm glukozy i tłuszczów [68]. Jednakże, ostatnie doniesienia wskazują, że miR-378a posiada również swoją własną maszynę transkrypcyjną, która jest niezależna od *Ppargc1b*, a zatem funkcje pełnione przez miR-378a nie muszą być tożsame z tymi wykazywanymi przez PGC1 β [69].

miR-378a bierze udział w regulacji szeregu procesów związanych z metabolizmem, angiogenezą, miogenezą, zapaleniem, apoptozą czy autofagią [68,70] (Ryc. 7). Ulega ekspresji głównie w miejscach aktywnych metabolicznie, takich jak wątroba czy brązowa tkanka tłuszczowa, a wysoki poziom miR-378a został zaobserwowany również przez nas w mięśniach szkieletowych i sercowym [71-73]. Ekspresja miR-378a wzrasta podczas rozwoju mięśni oraz, jak ostatnio dowiedliśmy, różnicowania kardiomiocytów otrzymanych z komórek hiPSC [74]. Ponadto, odnotowaliśmy spadek poziomu miR-378a w mięśniach i wzrost w osoczu, w odpowiedzi na wywołane eksperymentalnie niedokrwienie kończyny tylnej u myszy. Równocześnie, wykazaliśmy, że ekspresja miR-378a jest znacząco podwyższona w osoczu osób cierpiących na chromanie przestankowe (ang. *intermittent*



Rycina 8. Potencjalna rola H₂S w przeciwdziałaniu DMD. Zwiększenie poziomu H₂S pod wpływem chemicznych donorów albo genetycznej nadekspresji genów kodujących enzymy ze szlaku biosyntezy H₂S, może regulować wiele procesów odgrywających kluczową rolę w progresji choroby.

claudication), schorzenie objawiające się uciążliwym bólem nóg na skutek zwężenia tętnic i niewystarczającego dopływu tlenu do mięśni [71]. Tym samym założyliśmy, że miR-378a może być markerem uszkodzenia mięśni i potencjalnie wpływać na ich funkcjonowanie w stanach patologicznych takich jak DMD. Istotnie, wzrost poziomu miR-378 w surowicy wykazano zarówno w mysim modelu choroby jak i u chorych z dystrofią [75,76], przy jednocześnie obniżonym poziomie w mięśniach [77,78]. Nasze analizy potwierdziły wzrost poziomu miR-378a w surowicy myszy dystroficznych. Ponadto, jako pierwsi zaobserwowaliśmy, że myszy *mdx* pozbawione miR-378a wykazywały znacząco mniej nasilone objawy DMD związane z zapaleniem, zwłóknieniem czy aktywacją mSC. Co ważne, zauważyliśmy poprawę funkcjonalności mięśni w wyniku braku miR-378, sugerując tym samym miR-378a jako nowy, potencjalny cel terapeutyczny w DMD [64].

ROLA H₂S W DMD

Siarkowodor (H₂S) stanowi wraz z tlenkiem azotu (NO) oraz tlenkiem węgla (CO) grupę gazowych transmiterów, wykazujących działanie plejotropowe i mogących pełnić istotną funkcję w patogenezie chorób, w tym DMD. W organizmie ssaków H₂S może być wytwarzany na drodze nieenzymatycznej (np. poprzez redukcję siarczanów przez bakterie kolonizujące jelito) i enzymatycznej. Za endogenną produkcję H₂S odpowiedzialne są trzy enzymy: β-syntaza cystationiny (CBS), γ-liaza cystationiny (CSE) oraz transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu (3-MST). Enzymy te wykazują tkankowo specyficzną dystrybucję, ulegając ekspresji m.in. w śródbłonku, mięśniach szkieletowych oraz układzie sercowo-naczyniowym [79].

Poziom H₂S w organizmie można podwyższyć w wyniku podawania egzogennych związków. Najczęściej stosowanymi donorami są sole siarczkowe: NaHS i Na₂S a także pochodne fosforoditionianowe, takie jak GYY4137 i FW1256. Inna strategia może opierać się na terapii genowej i nadekspresji genów kodujących enzymy wytwarzające H₂S, np. z wykorzystaniem wektorów AAV [80] (Ryc. 8).

H₂S wykazuje działanie plejotropowe. Antyoksydacyjny efekt związany jest zarówno z hamowaniem produkcji ROS,

jak ich neutralizacją poprzez bezpośrednie zmiatanie. Cząsteczka ta ma właściwości przeciwzapalne, antyapoptotyczne, reguluje proces angiogenezy oraz działa neuroprotekcynie. Podobnie jak NO, H₂S może zwiększać aktywność rozpuszczalnej cykazy guanylowej (sGC, ang. *soluble guanylyl cyclase*), tym samym podwyższając poziom cyklicznego 3',5'-guanozynomonofosforanu (cGMP). Efekt ten, przynajmniej częściowo, może być spowodowany bezpośrednim hamowaniem aktywności fosfodiesterazy cGMP (PDE-5, ang. *phosphodiesterase-5*), tym samym wydłużając biologiczny okres półtrwania cGMP [81]. Co ważne, wykazano, że podawanie inhibitorów PDE5, takich jak sildenafil łagodzi proces włóknienia tkanki mięśniowej w przebiegu DMD [82]. Inne protekcyjne działanie H₂S może być związane z regulacją poziomu czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (ang. *nuclear-factor-E2-related-factor-2*) [83] i nasileniem ekspresji endogennych przeciwutleniaczy, w tym HO-1, która, jak wspomniano wcześniej, pełni rolę ochronną w przebiegu progresji DMD [17]. Co istotne również w kontekście DMD, H₂S może wpływać na proces angiogenezy. Wykazano, że zarówno podawanie donorów H₂S jak i nadekspresja generujących go enzymów, podwyższa ekspresję kluczowego czynnika angiogenego, VEGF [84]. Ponadto aktywacja szlaku VEGF/Akt/eNOS/NO/cGMP poprzez H₂S wpływa ochronnie na funkcje mitochondriów oraz przeciwdziała kardiomiopatii poprzez tłumienie stresu oksydacyjnego [85], a w hodowanych kardiomiocytach wodorosiarczek sodu (NaHS, donor H₂S) hamuje apoptozę wywołaną niedotlenieniem/reoksygenacją w sposób zależny od stężenia [86].

Biorąc pod uwagę spektrum możliwych działań H₂S można sugerować jego protekcyjne działanie w DMD. Najnowsze doniesienia potwierdzają te spekulacje i wskazują, że myszy dystroficzne charakteryzują się obniżonym poziomem kluczowych dla endogennej produkcji H₂S enzymów (CBS, CSE, 3-MST), wraz z obniżeniem poziomu metabolitów, regulujących aktywność wieloetapowego szlaku transulfuracji, prowadzącego do wytwarzania H₂S z L-cysteiny, a także prowadzącego do innych kluczowych metabolitów, takich jak glutation i L-tauryna. W mięśniach myszy dystroficznych wykazano istotnie obniżony poziom metioniny, L-glicyny, L-glutaminianu, glutationu oraz L-tauryny. Co więcej zmiany te odnotowano już we wczesnym stadium choroby u myszy, z późniejszym rozregulowaniem wraz z rozwojem choroby i obniżeniem poziomu H₂S w mięśniach dystroficznych. Podawanie donorów H₂S myszom *mdx* wpływało na redukcję nekrozy oraz włóknienia tkanki mięśniowej. Co ważne, H₂S obniżał stan zapalny poprzez hamowanie produkcji cytokin prozapalnych (IL-1β, IL-6, TNF-α) oraz TGF-β. Innym mechanizmem była regulacja ekspresji kluczowych genów kontrolujących zaburzony w przebiegu DMD proces autofagii. Odnotowany terapeutyczny efekt miał odzwierciedlenie w przywróceniu aktywności lokomotorycznej u myszy *mdx* [87]. W innych badaniach wykazano, że przeciwzapalne działanie H₂S jest związane z obniżeniem liczby prozapalnych makrofagów wraz ze spadkiem markerów: TNF-α, iNOS oraz wzrostem przeciwzapalnego markera CD206. Zaproponowanym mechanizmem, w wyniku którego H₂S promuje fenotyp przeciwzapalny makrofagów jest aktywacja kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, ang. *AMP-activated protein kinase*) – czynnika

odgrywającego kluczową rolę w zmianach fenotypowych makrofagów w czasie regeneracji mięśni szkieletowych [88]. Zahamowanie odpowiedzi zapalnej w następstwie podawania H₂S może również redukować włóknienie mięśni, co wykazano zarówno u myszy *mdx* [88] jak i w modelu urazu mięśnia wywołanego stłuczeniem [89].

Badania te ukazują H₂S jako nową cząsteczkę mogącą nasilać procesy regeneracyjne w mięśniach oraz działać przeciwzapalnie, stanowiąc tym samym alternatywę dla dotychczas stosowanych glikokortykoidów i otwierając nowe możliwości terapeutyczne (Ryc. 8). Również badania przeprowadzone w naszym zespole sugerują protekcyjny wpływ NaHS w mysim modelu choroby, jednak poznanie specyficznych mechanizmów i skutków klinicznych podawania H₂S w przebiegu DMD wymaga dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Pomimo wieloletnich badań nad molekularnymi mechanizmami DMD, całkowite wyleczenie chorych stanowi prawdziwe wyzwanie dla współczesnej nauki – jak dotąd dostępnych jest zaledwie kilka leków, które mają za zadanie przywrócić ekspresję dystrofiny, niemniej jednak ich efektywność terapeutyczna jest wciąż niewystarczająca, by w pełni zapobiec progresji dystrofii. Wysiłki naukowców i lekarzy koncentrują się obecnie na poznaniu nowych sposobów terapii łagodzących przebieg choroby.

PIŚMIENNICTWO

1. Duan D, Goemans N, Takeda S, et al (2021) Duchenne muscular dystrophy. *Nature Rev Dis Primers* 7: 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3>
2. Tyler KL (2003) Origins and early descriptions of “Duchenne muscular dystrophy.” *Muscle Nerve* 28: 402–422. <https://doi.org/10.1002/mus.10435>
3. Florzczak-Soluch U, Polak K, Dulak J (2021) The multifaceted view of heart problem in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci* 78: 5447–5468. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03862-2>
4. Landfeldt E, Thompson R, Sejersen T, et al (2020) Life expectancy at birth in Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 35: 643–653. <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00613-8>
5. Ryder S, Leadley RM, Armstrong N, et al (2017) The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J Rare Dis* 12: 79. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0631-3>
6. Ishizaki M, Kobayashi M, Adachi K, et al (2018) Female dystrophinopathy: Review of current literature. *Neuromuscul Disord* 28: 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.04.005>
7. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al (2018) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol* 17: 251–267. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30024-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30024-3)
8. Bladen CL, Salgado D, Monges S, et al (2015) The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 36: 395–402. <https://doi.org/10.1002/humu.22758>
9. Bagchi A (2015) Domain Wise Distribution of Mutations in Dystrophin Protein and Duchenne Muscular Dystrophy. *Gene Technol* 4: 3. <https://doi.org/10.4172/2329-6682.1000128>
10. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919–928. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90579-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90579-4)

11. Łoboda A, Dulak J (2020) Muscle and cardiac therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: past, present, and future. *Pharmacol Rep* 72: 1227–1263. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00134-x>
12. Mareedu S, Million ED, Duan D, Babu GJ (2021) Abnormal Calcium Handling in Duchenne Muscular Dystrophy: Mechanisms and Potential Therapies. *Front Physiol* 12: 647010. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.647010>
13. Morgan JE, Prola A, Mariot V, et al (2018) Necroptosis mediates myofibre death in dystrophin-deficient mice. *Nat Commun* 9: 3655. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06057-9>
14. Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP (1997) Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 139: 375–385. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.2.375>
15. Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, et al (2015) Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 7: 299rv4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7322>
16. Łoboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al (2016) Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 73: 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>
17. Pietraszek-Gremplewicz K, Kozakowska M, Bronisz-Budzyńska I, et al (2018) Heme Oxygenase-1 Influences Satellite Cells and Progression of Duchenne Muscular Dystrophy in Mice. *Antioxid Redox Signal* 29: 128–148. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7435>
18. Chen Y-W, Nagaraju K, Bakay M, et al (2005) Early onset of inflammation and later involvement of TGFβ in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 65: 826–834. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000173836.09176.c4>
19. Tidball JG, Welc SS, Wehling-Henricks M (2018) Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Compr Physiol* 8: 1313–1356. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170052>
20. Yang W, Hu P (2018) Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J Orthop Translat* 13: 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.01.002>
21. Chazaud B (2020) Inflammation and Skeletal Muscle Regeneration: Leave It to the Macrophages! *Trends Immunol* 41: 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.04.006>
22. Relaix F, Bencze M, Borok MJ, et al (2021) Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nat Commun* 12: 692. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20760-6>
23. Buckingham M, Relaix F (2015) PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 44: 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.017>
24. Oustanina S, Hause G, Braun T (2004) Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J* 23: 3430–3439. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600346>
25. Mierzejewski B, Archacka K, Grabowska I, et al (2020) Human and mouse skeletal muscle stem and progenitor cells in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* 104: 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.01.004>
26. Schiaffino S, Rossi AC, Smerdu V, et al (2015) Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skelet Muscle* 5: 22. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0046-6>
27. Schiaffino S, Reggiani C (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91: 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
28. Chang NC, Chevalier FP, Rudnicki MA (2016) Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends Mol Med* 22: 479–496. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.002>
29. Bronisz-Budzyńska I, Chwalenia K, Mucha O, et al (2019) miR-146a deficiency does not aggravate muscular dystrophy in *mdx* mice. *Skelet Muscle* 9: 22. <https://doi.org/10.1186/s13395-019-0207-0>
30. Bronisz-Budzyńska I, Kozakowska M, Podkalicka P, et al (2020) The role of Nrf2 in acute and chronic muscle injury. *Skelet Muscle* 10: 35. <https://doi.org/10.1186/s13395-020-00255-0>

31. Dumont NA, Wang YX, von Maltzahn J, et al (2015) Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* 21: 1455–1463. <https://doi.org/10.1038/nm.3990>
32. Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, et al (2014) Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res Int* 2014: 965631. <https://doi.org/10.1155/2014/965631>
33. Joe AWB, Yi L, Natarajan A, et al (2010) Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 12: 153–163. <https://doi.org/10.1038/ncb2015>
34. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, et al (2010) Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12: 143–152. <https://doi.org/10.1038/ncb2014>
35. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, et al (2013) Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 153: 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.053>
36. Biferali B, Proietti D, Mozzetta C, Madaro L (2019) Fibro-Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. *Front Physiol* 10: 1074. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01074>
37. Giuliani G, Rosina M, Reggio A (2021) Signaling pathways regulating the fate of fibro/adipogenic progenitors (FAPs) in skeletal muscle regeneration and disease. *FEBS J*. <https://doi.org/10.1111/febs.16080>
38. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, et al (2015) Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* 21: 786–794. <https://doi.org/10.1038/nm.3869>
39. Juban G, Saclier M, Yacoub-Youssef H, et al (2018) AMPK Activation Regulates LTB₄-Dependent TGF- β 1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Reports* 25: 2163–2176.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.077>
40. Kourakis S, Timpani CA, Campelj DG, et al (2021) Standard of care versus new-wave corticosteroids in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Can we do better? *Orphanet Journal of Rare Diseases* 16: 117. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01758-9>
41. Quattrocelli M, Barefield DY, Warner JL, et al (2017) Intermittent glucocorticoid steroid dosing enhances muscle repair without eliciting muscle atrophy. *J Clin Invest* 127: 2418–2432. <https://doi.org/10.1172/JCI91445>
42. Heier CR, Damsker JM, Yu Q, et al (2013) VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol Med* 5: 1569–1585. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302621>
43. Cordova G, Negroni E, Cabello-Verrugio C, et al (2018) Combined Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy to Optimize Treatment Efficacy. *Front Genet* 9: 114. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00114>
44. Love DR, Hill DF, Dickson G, et al (1989) An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339: 55–58. <https://doi.org/10.1038/339055a0>
45. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, et al (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4: 1441–1444. <https://doi.org/10.1038/4033>
46. Xu R, Jia Y, Zygmunt DA, Martin PT (2019) rAAVrh74.MCK.GALGT2 Protects against Loss of Hemodynamic Function in the Aging mdx Mouse Heart. *Mol Ther* 27: 636–649. <https://doi.org/10.1016/j.yjmt.2019.01.005>
47. Martin PT, Xu R, Rodino-Klapac LR, et al (2009) Overexpression of Galgt2 in skeletal muscle prevents injury resulting from eccentric contractions in both mdx and wild-type mice. *Am J Physiol, Cell Physiol* 296: C476–488. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00456.2008>
48. Song Y, Morales L, Malik AS, et al (2019) Non-immunogenic utrophin gene therapy for the treatment of muscular dystrophy animal models. *Nat Med* 25: 1505–1511. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0594-0>
49. Guiraud S, Squire SE, Edwards B, et al (2015) Second-generation compound for the modulation of utrophin in the therapy of DMD. *Hum Mol Genet* 24: 4212–4224. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv154>
50. Guiraud S, Davies KE (2017) Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Pharmacol* 34: 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.04.002>
51. Guiraud S, Edwards B, Babbs A, et al (2019) The potential of utrophin and dystrophin combination therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 28: 2189–2200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz049>
52. Podkalicka P, Mucha O, Dulak J, Loboda A (2019) Targeting angiogenesis in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci* 76: 1507–1528. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03006-7>
53. Rando TA (2001) Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech* 55: 223–235. <https://doi.org/10.1002/jemt.1172>
54. Bosco J, Zhou Z, Gabriëls S, et al (2021) VEGFR-1/Flt-1 inhibition increases angiogenesis and improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 21: 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.013>
55. Verma M, Shimizu-Motohashi Y, Asakura Y, et al (2019) Inhibition of FLT1 ameliorates muscular dystrophy phenotype by increased vasculature in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS Genet* 15: e1008468. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008468>
56. Podkalicka P, Mucha O, Kaziród K, et al (2021) Age-Dependent Dysregulation of Muscle Vasculature and Blood Flow Recovery after Hindlimb Ischemia in the mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Biomedicines* 9: 481. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050481>
57. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
58. Friedman RM, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
59. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47: D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
60. Horak M, Novak J, Biernertova-Vasku J (2016) Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol* 410: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.12.013>
61. Kozakowska M, Ciesla M, Stefanska A, et al (2012) Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs. *Antioxid Redox Signal* 16: 113–127. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3964>
62. Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Ciesla M, et al (2018) Lack of Heme Oxygenase-1 Induces Inflammatory Reaction and Proliferation of Muscle Satellite Cells after Cardiotoxin-Induced Skeletal Muscle Injury. *Am J Pathol* 188: 491–506. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.10.017>
63. Greco S, De Simone M, Colussi C, et al (2009) Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J* 23: 3335–3346. <https://doi.org/10.1096/fj.08-128579>
64. Podkalicka P, Mucha O, Bronisz-Budzyńska I, et al (2020) Lack of miR-378 attenuates muscular dystrophy in mdx mice. *JCI Insight* 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.135576>
65. Zhao C, Sun X, Li L (2019) Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA* 1: 38. <https://doi.org/10.1186/s41544-019-0039-4>
66. Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, et al (2011) miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 3: 258–265. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100133>
67. Trifunov S, Natera-de Benito D, Exposito Escudero JM, et al (2020) Longitudinal Study of Three microRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy and Becker Muscular Dystrophy. *Front Neurol* 11: 304. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00304>
68. Krist B, Florczyk U, Pietraszek-Gremplewicz K, et al (2015) The Role of miR-378a in Metabolism, Angiogenesis, and Muscle Biology. *Int J Endocrinol* 2015: 281756. <https://doi.org/10.1155/2015/281756>
69. Zhang T, Duan J, Zhang L, et al (2019) LXR α Promotes Hepatosteatosis in Part Through Activation of MicroRNA-378 Transcription and Inhi-

- bition of Ppargc1 β Expression. *Hepatology* 69: 1488–1503. <https://doi.org/10.1002/hep.30301>
70. Machado IF, Teodoro JS, Palmeira CM, Rolo AP (2020) miR-378a: a new emerging microRNA in metabolism. *Cell Mol Life Sci* 77: 1947–1958. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03375-z>
 71. Krist B, Podkalicka P, Mucha O, et al (2019) miR-378a influences vascularization in skeletal muscles. *Cardiovasc Res*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz236>
 72. Knezevic I, Patel A, Sundaresan NR, et al (2012) A novel cardiomyocyte-enriched microRNA, miR-378, targets insulin-like growth factor 1 receptor: implications in postnatal cardiac remodeling and cell survival. *J Biol Chem* 287: 12913–12926. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331751>
 73. Mallat Y, Tritsch E, Ladouce R, et al (2014) Proteome modulation in H9c2 cardiac cells by microRNAs miR-378 and miR-378. *Mol Cell Proteomics* 13: 18–29. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.030569>
 74. Martyniak A, Andrysiak K, Motais B, et al (2021) Generation of microRNA-378a-deficient hiPSC as a novel tool to study its role in human cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* S0022-2828(21)00148–6. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.07.007>
 75. Vignier N, Amor F, Fogel P, et al (2013) Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. *PLoS ONE* 8: e55281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055281>
 76. Roberts TC, Godfrey C, McClorey G, et al (2013) Extracellular microRNAs are dynamic non-vesicular biomarkers of muscle turnover. *Nucleic Acids Res* 41: 9500–9513. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt724>
 77. Li Y, Jiang J, Liu W, et al (2018) microRNA-378 promotes autophagy and inhibits apoptosis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E10849–E10858. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803377115>
 78. Roberts TC, Blomberg KEM, McClorey G, et al (2012) Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 1: e39. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.26>
 79. Tadeusiewicz J, Olas B (2014) Siarkowodór - gaz nie tylko o właściwościach toksycznych. *Kosmos* 63: 125–135
 80. Cao X, Ding L, Xie Z-Z, et al (2019) A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? *Antioxid Redox Signal* 31: 1–38. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7058>
 81. Szabo C (2017) Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol, Cell Physiol* 312: C3–C15. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2016>
 82. Percival JM, Whitehead NP, Adams ME, et al (2012) Sildenafil reduces respiratory muscle weakness and fibrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol* 228: 77–87. <https://doi.org/10.1002/path.4054>
 83. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, et al (2009) Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res* 105: 365–374. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199919>
 84. Kanagy NL, Szabo C, Papapetropoulos A (2017) Vascular biology of hydrogen sulfide. *Am J Physiol Cell Physiol* 312: C537–C549. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2016>
 85. Kondo K, Bhushan S, King AL, et al (2013) H-S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 127: 1116–1127. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000855>
 86. Yao L-L, Huang X-W, Wang Y-G, et al (2010) Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 β -dependent opening of mPTP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1310–1319. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00339.2009>
 87. Panza E, Vellecco V, Iannotti FA, et al (2021) Duchenne's muscular dystrophy involves a defective transsulfuration pathway activity. *Redox Biol* 45: 102040. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102040>
 88. Saclier M, Ben Larbi S, My Ly H, et al (2021) Interplay between myofibers and pro-inflammatory macrophages controls muscle damage in mdx mice. *J Cell Sci* 134: jcs258429. <https://doi.org/10.1242/jcs.258429>
 89. Zhao L, Liu X, Zhang J, et al (2020) Hydrogen Sulfide Alleviates Skeletal Muscle Fibrosis via Attenuating Inflammation and Oxidative Stress. *Front Physiol* 11: 533690. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.533690>

Molecular mechanisms of Duchenne muscular dystrophy and new therapeutic strategies

Paulina Podkalicka, Małgorzata Myszka, Józef Dulak, Agnieszka Łoboda✉

Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

✉Corresponding author: agnieszka.loboda@uj.edu.pl

Keywords: DMD, Duchenne muscular dystrophy, miR-378, H₂S, hydrogen sulfide, angiogenesis

SUMMARY

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked genetic disease affecting approximately 1 in 5,000 born boys. It is caused by mutations in the *DMD* gene encoding dystrophin, which protects muscle fibers upon contraction. Its absence leads to muscle weakening and premature death mostly due to cardio-respiratory failure. Many experimental therapies have been developed to restore functional dystrophin or counteract processes contributing to disease progression. Nonetheless, DMD remains an incurable disease, and glucocorticoids, exerting many side effects, still serve as the "gold standard" of treatment. Hence, there is a need to develop innovative therapeutic options that will at least alleviate the symptoms of DMD. Among them, targeting specific microRNAs (miRs), e.g. miR-378a, restoring normal angiogenesis and the use of cytoprotective factors such as heme oxygenase-1 (HO-1) or hydrogen sulfide (H₂S) might be of special interest. In this review, we describe both the pathology of the disease and the aforementioned new therapeutic options in DMD.

