



Gdańsk, 5 kwietnia 2019

Prof. dr hab. med. Ryszard Słomski
Przewodniczący Komisji Doktorskiej
Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Rugowskiej pt. „Wpływ ekspresji koneksyny 43 w ludzkich komórkach macierzystych pochodzenia miogenego na poziom zjawisk arytmogennych oraz na stopień przebudowy pozawałowego serca w modelu szczurzym”.

Na wstępie chciałbym zaznaczyć moją najwyższą ocenę w każdym aspekcie przedstawionej mi do recenzji pracy. Zarówno problem którego dotyczy praca jak i wybór metodyki badawczej oraz jakość uzyskanych wyników są na najwyższym poziomie. Interpretacja i przedstawienie kontekstu uzyskanych wyników świadczą o biegłości i kompetencji Doktorantki w badanej tematyce. Praca jest również przygotowana bardzo dobrze pod względem redakcyjnym. Bardzo ciekawy i o adekwatnej zawartości jest wstęp we właściwych proporcjach łączący omówienie podstaw anatomii, fizjologii, aspektów molekularnych i patologii układu krążenia oraz badań nad regeneracją serca i powiązаныmi problemami. W ten sposób wstęp wprowadza czytelnika do głównego badanego problemu czyli analizy możliwości zapobiegania arytmii poprzez ekspresję koneksyn w mioblastach w terapiach komórkowych.

Głównym problemem którego dotyczy rozprawa doktorska jest poszukiwanie optymalnych rozwiązań dla terapii komórkowych w leczeniu pozawałowej niewydolności serca. Jednym z najważniejszych problemów związanych z wszczepianiem komórek, takich jak mioblasty szkieletowe do blizny pozawałowej jest ryzyko powstania ognisk arytmogennych w miejscu wszczepienia tych komórek. Dzieje się to na skutek braku połączenia elektromechanicznego pomiędzy wszczepionymi komórkami, a kardiomiocytami niewydolnego serca. Wynika to z ograniczonej ekspresji białek zaangażowanych w tworzenie połączeń międzykomórkowych we wszczepianych komórkach niezbędnych do właściwej komunikacji międzykomórkowej.

W związku z powyższym, celem pracy było sprawdzenie czy wszczepienie do pozawałowego mięśnia sercowego szczura ludzkich mioblastów z genetyczną modyfikacją powodującą nadekspresję koneksyny 43 będzie zapobiegać powstawaniu pobudzeń dodatkowych.



Główna hipoteza tych badań zakłada, że ta modyfikacja powinna przyczynić się do wytworzenia prawidłowego, synchronicznego skurczu w pozawałowym mięśniu sercowym.

Szczegółowe cele czy etapy prowadzonych badań obejmowały:

1. Przygotowanie grup doświadczalnych szczurów z wyindukowanym zawałem lewej komory mięśnia sercowego.
2. Przygotowanie ludzkich mioblastów z nadekspresją koneksyny 43.
3. Interwencje dosercowe z użyciem ludzkich mioblastów natywnych lub z nadekspresją koneksyny 43 do pozawałowego mięśnia sercowego.
4. Indukcja komorowych zaburzeń rytmu serca w celu sprawdzenia, czy ludzkie mioblasty z nadekspresją koneksyny 43 zmniejszają dodatkowe pobudzenia serca typu wtórnego w modelu serca pozawałowego szczura.
5. Badania ex vivo pozyskanych serc pozawałowych szczurów w celu oceny poziomu ekspresji genów i białek 'pro-arytmogennych' oraz odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę mięśnia sercowego po zawale, po zastosowanej terapii ludzkimi komórkami macierzystymi mięśni szkieletowych.

Niezwykle cennym aspektem prowadzonych badań była zastosowana metodyka obejmująca zarówno procedury biologii komórkowej czy molekularne takie jak:

1. Izolacja i hodowla komórek takich jak mioblasty,
2. Transformacja i hodowla bakterii zawierających konstrukty do transfekcji wraz z powiązаныmi procedurami takimi jak selekcja odpowiednich klonów oraz izolacja i sekwencjonowanie DNA
3. Transfekcja mioblastów opracowanym konstruktem z zastosowaniem elektroporacji w powiązaniu z analizą cytometryczną wydajności.
4. Analiza ekspresji RNA wybranych genów wraz z powiązаныmi procedurami takimi jak izolacja RNA, oczyszczanie mRNA oraz reakcja odwrotnej transkrypcji, analiza produktów PCR z zastosowaniem elektroforezy w żelu agarozowym oraz ostateczna analiza PCR w czasie rzeczywistym.
5. Analiza zawartości specyficznych białek z zastosowaniem Western blot oraz immunodetekcji.



6. Badania *in vivo* u szczurów obejmujące procedurę wywołania zawału przez podwiązanie odgałęzienia lewej tętnicy wieńcowej oraz analizę echokardiograficzną funkcji serca.

7. Procedury implantacji komórek w okolice blizny pozawałowej

8. Analizy wywołanych zaburzeń rytmu serca

9. Badania histologiczne i immunohistochemiczne

Wszystkie powyższe techniki są wymagające i związane z koniecznością uzyskania najwyższych kompetencji. Na podkreślenie zasługuje ich zróżnicowanie obejmując zarówno techniki molekularne, badania *in vivo*, proteomikę oraz histologię. Podkreślić też należy bardzo szczegółową walidację zastosowanych technik oraz wykonanie wszystkich koniecznych kontroli, co podnosi wiarygodność uzyskanych wyników.

Podstawowe wnioski z badań w ramach pracy doktorskiej obejmują:

1. Potwierdzenie zwiększonej ekspresji koneksyny 43 w transfekowanych mioblastach zarówno na poziomie mRNA jak i białka

2. Wykazanie protekcyjnego działania ekspresji koneksyny 43 w mioblastach zastosowanych do terapii komórkowych w pozawałowej niewydolności serca w kontekście zaburzeń rytmu serca.

3. Analiza molekularnych mechanizmów antyarytmicznego działania ekspresji koneksyny 43 w tym stwierdzenie korzystnych zmian potencjału czynnościowego oraz zmniejszonej ekspresji białek arytmogennych.

4. Stwierdzenie wzrostu ekspresji Serca2a po transplantacji mioblastami z ekspresją koneksyny 43, co stanowi dowód skuteczniejszego zapobiegania niekorzystnej przebudowie mięśnia sercowego.

5. Wykazanie, obecności, po okresie miesiąca od podania, genetycznie modyfikowanych ludzkich komórek macierzystych/progenitorowych pochodzenia miogenego w mięśniu sercowym szczura wykazując ich uporządkowanie położenie względem miocytów sercowych.

Wnioski te są w pełni uzasadnione przeprowadzonymi badaniami i stanowią znaczący wkład zarówno w aspekty podstawowe badanego problemu jak i praktyczny rozwój terapii komórkowych w leczeniu niewydolności serca.

Mam jedynie kilka drobnych uwag o charakterze redakcyjnym w odniesieniu do przedstawionej pracy:



1. Już w jednym z pierwszych zdań wstępu porównano serce do pompy ssąco-toczącej, co nie jest właściwe bo serce pompą ssącą nie jest i zawsze musi mieć na wejściu dodatnie ciśnienie.
2. Na str. 21 patogeneza miażdżycy jest omówiona w sposób nazbyt uproszczony. To nie tylko odkładanie się LDL w ścianie naczynia.
3. Na stronie 23, 2 linia od końca trzeba by napisać: nekrozie lub apoptozie.
4. Na stronie 20, 12 linia od dołu: czy nie lepiej napisać jednocześnie zamiast symultanicznie.
5. Jest kilka błędów literowych p. str. 42 ostatnia linia „płodowea”.
6. Mam drobne zastrzeżenia do sformułowania celu pracy: Zamiast „Przygotowania grup doświadczalnych szczurów” lepiej napisać Opracowanie modelu i uzyskanie szczurów z eksperymentalnym zawałem lewej komory mięśnia sercowego.
7. Pomimo obecnej tendencji do zamiennego używania tych terminów, w moim przekonaniu w opracowaniach naukowych lepiej używać terminu piśmiennictwo, a nie literatura.
8. Pomimo nowej tradycji zamieszczania w pracy doktorskiej dokumentów formalnych takich jak zgody komisji czy ministerstwa (tak jak w ocenianej pracy) czy np. zgód współautorów w przypadku publikacji nie uważam tego kierunku za właściwy. Jest to bardzo ważne, jednak powinno pozostać w dokumentacji dotyczącej przewodu dostępnej w prowadzącej jednostce.

Mam też kilka pytań głównie do oceny czynnościowej terapii komórkowej:

1. Dlaczego do badania echokardiograficznego znieczulano ketaminą z ksylazyną, a do zawału izofluranem? Jeżeli jest możliwość znieczulania izofluranem to lepiej jest to stosować również do echo, bo nie powoduje bradykardii.
2. Na ile powtarzalne były zmiany echokardiograficzne po podwiązaniu odgałęzienia lewej tętnicy wieńcowej? Czy selekcjonowano zwierzęta o odpowiednich parametrach echokardiograficznych? Jak wyglądały parametry echokardiograficzne u zwierząt u których nie wywołano zawału.
3. W planie eksperymentów *in vivo* podano wykonanie badania echo po 2 tygodniach od zawału przed podaniem komórek i na koniec po 42 dniach. W wynikach jest jednak tylko jedna tabela i nie jest do końca jasne z którego punktu. Jeżeli są dostępne wyniki przed i po terapii komórkowej to porównanie analizy zmian u poszczególnych zwierząt pozwoliło by na bardziej precyzyjną ocenę efektów czynnościowych.



4. Bardzo byłbym ciekaw opinii Autorki pracy dotyczącej obecnych perspektyw zastosowania terapii komórkowych w leczeniu pozawałowej niewydolności serca u ludzi.

Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości naukowej oraz praktycznej. Praca stanowi bardzo znaczący wkład w badania nad zrozumieniem mechanizmów i praktycznym zastosowaniem terapii komórkowych w leczeniu niewydolności serca. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria formalne stawiane rozprawie doktorskiej.

Wnoszę do Komisji Doktorskiej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Anny Rugowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość przeprowadzonych badań, ich spójność, zastosowanie trudnych i zróżnicowanych procedur eksperymentalnych oraz wykonanie bardzo potrzebnych, a często pomijanych procedur szczegółowej walidacji na każdym etapie składam dodatkowy wniosek o wyróżnienie.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński