

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Anny Rugowskiej

„Wpływ ekspresji koneksyny 43 w ludzkich komórkach macierzystych pochodzenia miogenego na poziom zjawisk arytmogennych oraz na stopień przebudowy pozawałowego serca w modelu szczurzym”

Katedra i Klinika
Kardiochirurgii

40-635 Katowice,
ul. Ziołowa 45/47
www.sum.edu.pl

KIEROWNIK
Prof. dr hab. n. med. Marek DEJA
tel.: (+48 32) 359 88 77
fax: (+48 32) 359 89 07

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 359 88 77
tel.: (+48 32) 359 89 07
fax: (+48 32) 359 89 07
kkch@sum.edu.pl

W miarę postępu w leczeniu ostrego zawału serca mierzonego istotną poprawą przeżycia wczesnego i odległego niewydolność serca staje się epidemią dotykająca coraz większej liczby pacjentów. Chociaż terapia niewydolności serca zarówno farmakologiczna jak i oparta o urządzenia wszczepialne w tym elektroterapię poprawia przeżycie pacjentów z niewydolnością serca, dążenie do trwałego zahamowania przebudowy mięśnia sercowego czy wręcz jej odwrócenia pozostaje niespełnionym dążeniem. Wyniki większości przeprowadzonych do dzisiaj prac związanych z użyciem komórek macierzystych różnego pochodzenia były dość zniechęcające, a niedawne stanowisko Grupy Roboczej Biologii Komórkowej Serca Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego wskazało, że „obietnica terapii komórkowej nie została jak dotąd spełniona”. Ujawnienie, że wyniki jednego z pionierów terapii komórkowej Piero Anversy, były w dużej mierze nieprawdziwe nasiliło poczucie pewnego zniechęcenia.

Wobec powyższego tym ważniejsze wydają się prace u podstaw, które powoli odkrywają reguły rządzące terapią komórkową, i pozwalają mieć nadzieję, że dokładne poznanie mechanizmów i efektów stosowania komórek macierzystych, w tym komórek poddanych różnym modyfikacjom, pozwoli na opracowanie terapii skutkujących mierzalnym i trwałym efektem klinicznym. Zespół profesora Macieja Kurpisza należy do pionierów stosowania komórek macierzystych pochodzenia mięśniowego w terapii regeneracyjnej mięśnia sercowego. Powstała pod kierunkiem profesora Kurpisza praca doktorska mgr Anny Rugowskiej wpisuje się w mojej opinii w ciąg prac tego zespołu zmierzających do takiej modyfikacji mioblastów ludzkich by doprowadzić do ich efektywnej i co istotne bezpiecznej integracji z uszkodzonym mięśniem sercowym.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Rugowskiej, zatytułowana „Wpływ ekspresji koneksyny 43 w ludzkich komórkach macierzystych pochodzenia miogenego na poziom zjawisk arytmogennych oraz na stopień przebudowy pozawałowego serca w modelu szczurzym” ma formę maszynopisu zawierającego na 138 stronach oprócz Spisu treści, Spisu rycin, Spisu tabel oraz streszczeń w języku polskim i angielskim, treść rozprawy (110 stron) opatrzoną wykazem 143 cytowanych pozycji literaturowych. Praca finansowana była z grantu Preludium Narodowego Centrum Nauki oraz z dwóch Projektów badawczych Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Praca uzyskała pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu.

W trakcie prowadzonych przez siebie badań doktorantka posłużyła się mioblastami ludzkimi pozyskanymi z tkanki mięśniowej pacjentów poddawanych rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego. Mioblasty izolowała z hodowli tkankowej, w której oprócz mioblastów z typowym markerem powierzchniowym CD56+, znajdowały się również komórki mioendotelialne CD144+ i populacja uboczna CD45+. Doktorantka transfekowała mioblasty z użyciem elektroporacji, plazmidem pCiNeo-CX43 zawierającym sekwencję kodującą dla genu koneksyny 43 lub wektorem pustym pCiNeo nie zawierającym sekwencji genu. Ponadto doktorantka wykonywała transfekcję kontrolną plazmidem pEGFP-C1 umożliwiającym wzbudzenie nadekspresji białka zielonej fluorescencji co pozwoliło na ocenę wydajności transfekcji na poziomie około 87%. Dalsza hodowla w medium różnicującym potwierdziła, że transfekowane plazmidem ekspresyjnym mioblasty zachowały zdolność przekształcania się w miotuby. Metodą PCR w czasie rzeczywistym doktorantka stwierdziła istotnie niższą ekspresję genów miogeniny (MYOG), miogenego czynnika różnicującego (MYOD) i ciężkiego łańcucha miozyny (MCHC1) przy zachowanej ekspresji MYF5 – czynnika miogenicznego 5 w transfekowanych mioblastach względem mioblastów dzikich, co interpretuje jako zjawisko korzystne mogące zwiększać potencjał proliferacyjny transfekowanych mioblastów. Ponadto metodą PCR stwierdziła ogromną nadekspresję genu GJA1, której towarzyszył 4-krotny wzrost ekspresji białka koneksyny 43 w mioblastach transfekowanych.

Tak przygotowane mioblasty zostały następnie użyte w doświadczeniach polegających na ich implantacji w okolicę blizny pozawałowej serca szczura. Doktorantka zastosowała model zawału wywołanego podwiązaniem jednej z gałęzi lewej tętnicy wieńcowej serca szczura. Po 14 dniach, gdy zawał miał formę blizny łącznotkankowej, a kurczliwość lewej komory oceniana echokardiograficznie spadła do indeksu kurczliwości odcinkowej średnio 18,5-20,5 z możliwych 23 pkt, doktorantka podawała w okolicę obrzeża zawału 3x50ml mioblastów natywnych lub transfekowanych w stężeniu 1mln komórek/100ml, lub odpowiednią ilość soli fizjologicznej. Po kolejnych 4 tygodniach serca szczurów poddawane były próbie indukcji komorowych zaburzeń rytmu za pomocą protokołu stymulacji bezpośredniej elektrodami nasierdziowymi. Doktorantka wykazała, że liczba wyindukowanych komorowych zaburzeń rytmu była w sercach poddanych implantacji mioblastów transfekowanych genem koneksyny 43 istotnie niższa niż w sercach poddanych implantacji mioblastów natywnych. Niestety autorka nie oceniała kurczliwości mięśnia sercowego w poszczególnych grupach. Natomiast wykazała immunohistochemicznie, że w miesiąc po implantacji mioblastami transfekowanymi w sercu szczura nadal obecne były mioblasty obładowane koneksyną 43. Ponadto wykazała, że zawierające aktywną miogienę mioblasty

występują po miesiącu zarówno w sercach poddanych implantacji mioblastów natywnych jak i transfekowanych koneksyną 43, z tym, że mioblasty transfekowane tworzyły strukturę równoległą do kierunku komórek serca biorcy. Ponadto doktorantka zidentyfikowała immunohistochemicznie ludzkie jądra komórkowe w preparatach mikroskopowych, co jest kolejnym dowodem utrzymywania się ludzkich mioblastów w sercu szczura w miesiąc po ich implantacji. W końcu doktorantka poddała ocenie ekspresję niektórych genów i białek w 42 dni po zawale i 28 dni po implantacji mioblastów ludzkich w całej (?) lewej komorze szczura. Wyniki tej części pracy wydają się dość niespójne. O ile PCR w czasie rzeczywistym wskazał na wzrost ekspresji genu kodującego kanał wapniowy typu L i spadek ekspresji genu sarkoplazmatycznej ATP-azy wapniowej (Serca) to w ocenie Western Blot obserwowano spadek ekspresji tych białek w sercach po implantacji mioblastów z nadekspresją koneksyny 43. Z kolei w sercach po implantacji mioblastów natywnych obserwowano spadek ekspresji genu wymiennika sodowo-wapniowego ze wzrostem ekspresji białka w metodzie WB. Doktorantka opierając się na tym, że stosunek ekspresji białka NCx1/Serca2a był niższy w sercach poddanych implantacji transfekowanych mioblastów niż w sercach poddanych implantacji mioblastów dzikich wnosi, że transfekcja mioblastów wpłynęła korzystnie na „przebudowę funkcjonalną mięśnia sercowego szczura”. Doktorantka oceniała również poziom ekspresji w sercu genów i białek czynnika transkrypcyjnego Gata 4 i transformującego czynnika wzrostu Tgfb1. W wypadku Gata 1 nie stwierdziła różnic pomiędzy grupami, a w wypadku Tgfb1 stwierdziła wzrost ekspresji genu w sercach po implantacji transfekowanych mioblastów, ale niestety nie udało jej się uzyskać pozytywnego wyniku Western Blot.

Podsumowując przedstawiona praca doktorska jest świadectwem ogromnego wysiłku włożonego przez mgr Rugowską w jej przeprowadzenie jak i biegłości doktorantki w posługiwaniu się metodami biologii molekularnej. Praca potwierdza, że ludzkie mioblasty można transfekować genem GJA1, co skutkuje większą produkcją koneksyny 43. Z kolei wszczepienie tak przygotowanych mioblastów w okolice obrzeża zawału wiąże się z mniejszą skłonnością do arytmii komorowych niż implantacja mioblastów nietransfekowanych. W trakcie lektury dysertacji nasunęło mi się jednak szereg pytań natury merytorycznej jak i uwag zarówno merytorycznych jak i redakcyjnych.

Rozpocznę od pytania natury ogólnej, na które nie znalazłem odpowiedzi ani we wstępie, ani w dyskusji. Zespół profesora Macieja Kurpisa opublikował wcześniej badania, w których badał efekty wszczepiania ludzkich mioblastów do ludzkiego serca, w tym mioblastów modyfikowanych genetycznie z nadekspresją koneksyny 43, oraz badania charakteryzujące mioblasty ludzkie z nadekspresją koneksyny 43 wszczepiane do serc mysich. Zespół ten zresztą od dawna zajmuje się możliwościami użycia komórek macierzystych pochodzenia mięśniowego do regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego. W dysertacji brakuje mi jasnego odniesienia do wcześniejszych prac zespołu i wskazania celu podjętych badań na tle badań już wcześniej przeprowadzonych. Czym podyktowany był wybór takiego a nie innego modelu. Dlaczego badano ludzkie mioblasty implantowane do serca szczura, a nie szczurze mioblasty implantowane po namnożeniu do jego własnego serca. Dlaczego badanym modelem zawału był zawał u szczura, a nie jak w poprzednich pracach zespołu u myszy. Czy różnice międzygatunkowe mają tu jakieś znaczenie?

Najważniejszym merytorycznym słabym punktem pracy (co zresztą autorka sam przyznaje) jest brak oceny kurczliwości lewej komory serca szczura w miesiąc po implantacji mioblastów. Czytelnik

dowiaduje się, że indeks arytmii w sercach z implantacją transfekowanych mioblastów jest niższy niż po wszczepieniu mioblastów dzikich. Jednak jest on trzykrotnie wyższy niż w sercach bez implantacji. Uzyskany efekt antyarytmiczny ma sens, o ile wszczepienie mioblastów poprawia czynność serca. Nie jest przecież oczywiste, że obecność żywych mioblastów w okolicy blizny przyczynia się do poprawy czynności lewej komory, a tym bardziej, że wszczepienie mioblastów transfekowanych da taki sam (lub lepszy) efekt hemodynamiczny jak wszczepienie mioblastów niemodyfikowanych. Doktorantka powinna przynajmniej przywołać wyniki prac wskazujących na to, że taka poprawa (w używanym przez nią modelu) rzeczywiście ma miejsce.

Kolejna uwaga dotyczy badania ekspresji genów czynników miogennych w mioblastach. Myślę, że dysertację wzbogaciłaby jasno zdefiniowana hipoteza robocza, zgodnie, z którą autorka badała geny czynników miogennych. Czy doktorantka usiłowała pokazać, że charakterystyka transfekowanych mioblastów jest zbliżona do natywnych, czy też od razu zakładała, że transfekcja może zmieniać poziom zróżnicowania mioblastów? Czy fakt, że sama elektroporacja wydaje się cofać mioblasty na ich szlaku różnicowania był wcześniej znany? Doktorantka stwierdza, że obserwowane potencjalne zwiększenie zdolności proliferacyjnych transfekowanych mioblastów jest zjawiskiem korzystnym gdyż może zwiększać szansę regeneracji mięśnia sercowego. Jak pisze modyfikacja genetyczna „wywierała pozytywny wpływ na biologię i funkcję komórek macierzystych pochodzenia miogenne”. Czy doktorantka zdaje sobie sprawę, że taki pozytywny wpływ jak i samo zwiększenie potencjału proliferacyjnego są w tym wypadku domniemane? Zmiany na poziomie ekspresji genów czynników miogennych nie muszą się w rzeczywistości przekładać na funkcję mioblastów. Ewentualną zmianę czynności i opóźnienie różnicowania należałoby dopiero zbadać i potwierdzić. Wyniki doktorantki choć sugestywne, nie pozwalają na formułowanie tak kategoriycznych stwierdzeń. Ponadto, czy taki zwiększony potencjał proliferacyjny może też mieć negatywne konsekwencje? Chętnie poznałbym opinię doktorantki na ten temat.

W końcu doktorantka bada ekspresję wybranych genów i białek w lewych komorach serca w 28 dni po implantacji mioblastów lub eksperymencie pozorowanym (sham). W rozdziale 5.2. podkreśla, że „równoczesna ekstrakcja RNA i białka z tej samej próbki ma kluczowe znaczenie dla określenia dokładnych korelacji pomiędzy ekspresją genową i białkową”. Następnie jednak, ponieważ wyniki PCR i WB okazały się niespójne, pisze: „należy pamiętać, że w komórkach ssaków korelacja pomiędzy ekspresją mRNA i białka jest słabsza” oraz, że „szybkość degradacji mRNA wynosi 2-7h (...) w porównaniu z 48h wymaganymi do degradacji białka”. Zdaniem recenzenta doktorantka powinna również zwrócić uwagę na fakt, że badając „całe serca” bada próbki pochodzące równocześnie z wielu typów komórek, oraz różnych obszarów lewej komory, poczynawszy od blizny pozawałowej, poprzez obszar okołozawałowy zawierający wszczepione mioblasty (trudno powiedzieć w jakiej ilości) i mięsień sercowy w obszarze potencjalnie niedokrwionym oraz odległe miokardium lewej komory. Ekspresja badanych czynników w różnych częściach lewej komory i w różnych komórkach może być różna i może się zdarzyć tak, że badane mRNA pochodzi z komórek jednego typu, podczas gdy badane białko znalazło się próbce na skutek jego produkcji w zupełnie innych komórkach. Zgadzam się z doktorantką, że spadek poziomu Serca2 (na poziomie białka), może świadczyć o mniejszym zaawansowaniu przebudowy mięśnia sercowego. Niemniej wnioskowanie na tej podstawie, że to mioblasty poprawiając czynność lewej komory, zmniejszały stres ściany, produkcję NTproBNP i przez to prowadziły do wzrostu produkcji Serca2 wydaje mi się znowu zbyt daleko idące. Przecież

wystarczyło pobrać poziomy NTproBNP u badanych szczurów, żeby taką hipotezę sprawdzić. Ponadto zastanawiałem się, czy badanie osobno odległego miokardium, a osobno części lewej komory objętej zawałem nie pozwoliłoby na łatwiejsze wnioskowanie co do zmian zachodzących w nieobjętej zawałem części lewej komory.

Chciałbym również zgłosić kilka drobnych uwag natury poniekąd redakcyjnej (choć nie tylko).

1. Doktorantka znaczącą część metodyki zamieściła w rozdziale wyniki. W wynikach znalazł się opis sposobu oceniania efektywności transfekcji mioblastów, metoda oceny jakości izolowanego RNA, weryfikacji odwrotnej transkrypcji, przygotowywania krzywych standardowych, po części opis postępowania ze zwierzętami i ich tkankami w trakcie doświadczeń na zwierzętach, opis skali służącej do badania arytmii, czy metodyka badania *ex vivo* genów w sercach szczura. Taki sposób pisanie wyników, w którym duże fragmenty metodyki przeplatają się rzeczywistymi wynikami bardzo utrudnia czytanie dysertacji. Ponadto krzywe standardowe, krzywe topnienia genów czy obrazy rozdziału elektroforetycznego RNA potwierdzające poprawność metodyczną pracy są bardzo ważne, ale nie jestem przekonany, czy ich umieszczenie w rozdziale wyniki, nie zaciemnia obrazu rzeczywistych wyników eksperymentów.
2. Nie jest jasne skąd pochodzi wspomniana skala służąca ocenie arytmii. Czy jest to skala autorska czy też została zaczerpnięta od innych autorów – brak odnośnika literaturowego. Czy była ona walidowana u szczurów i czy stosowana jest zawsze z takim protokołem stymulacji/indukcji arytmii jak w ocenianej pracy?
3. W odczuciu recenzenta proces wiodący od pobrania ludzkiej mięśniówki do modyfikowania mioblastów jest opisany nazbyt pobieżnie. Jak rozumiem doktorantka posługiwała się mioblastami pochodzącymi z rozmrożenia. Czy doktorantka sama zakładała hodowle komórkowe? Na którym etapie dochodziło do wzbogacenia hodowli tak by zawierała głównie mioblasty? Jak długi był okres czasu i liczba pasażów pomiędzy pobraniem fragmentu mięśnia szkieletowego, zamrożeniem, a następnie elektroporacją mioblastów. Proces ten, być może oczywisty dla biologa molekularnego, jest niejasny dla recenzenta, a wydaje się, że w pracy doktorskiej powinien być opisany wystarczająco szczegółowo.
4. Doktorantka w wielu miejscach nie podaje w sposób wystarczająco jasny liczebności badanych próbek. Na przykład nie jest jasne na jakiej ilości prób badano ekspresję genów czynników miogennych w mioblastach. Obecność barów błędu na rysunkach wskazuje, że próbek było więcej niż jedna. Podobnie nie jest jasna liczba badanych zwierząt ani liczba próbek poddanych ocenie ekspresji genów i białek lewej komory serca. W metodyce doktorantka pisze o 12 szczurach w każdej grupie. Tymczasem w wynikach okazuje się, że analizie poddano 10 zwierząt w grupie terapeutycznej, 6 w grupie z mioblastami natywnymi i 15 (!) w grupie Sham. Zgodnie z opisem zwierzęta utracono najpierw przy okazji indukcji zawału (13 zwierząt) i następnie 6 w trakcie zabiegu implantacji komórek/0.9% soli. Jeżeli do zgonu dochodziło w trakcie zabiegu to można było zwiększyć na tym etapie grupę z mioblastami kosztem grupy sham. Jeżeli natomiast do zgonu dochodziło po operacji wszczepienia komórek, to nie można tego pomijać jako ewentualnego wpływu implantacji mioblastów na przeżycie zwierząt. W końcu tabela 35 sugeruje, że badaniu PCR i WB poddano jedynie 8, 5 i 7 serc z poszczególnych grup. Najlepszym sposobem rozwiania wspomnianych wątpliwości jest podawanie liczny N przy każdej grupie w opisie każdego rysunku/tabeli.

5. Recenzent ma też pewną wątpliwość dotyczącą tego czy posługiwanie się średnią z odchyleniem standardowym w wypadku tak mało licznych grup o rozkładzie najpewniej skrzywionym jest statystycznie poprawne. Wydaje się, że mediany z zakresami bądź kwartylami byłyby bardziej na miejscu.
6. W końcu znalazłem w pracy szereg błędów redakcyjnych, które nie wpływają na wartość merytoryczną prac i których nie będę wyliczał. Wspomnę jedynie, że tabela zawierająca jak rozumiem główny wynik badania tj. indeks arytmii w 42 dniu eksperymentu, zawiera tytuły kolumn ECHO (WMSI) sugerujące jakoby wynikiem był wskaźnik kurczliwości mięśnia sercowego.

Na zakończenie pragnę jeszcze raz podkreślić ogrom wysiłku włożony przez doktorantkę w przeprowadzenie badań, jak i widoczną w pracy biegłość mgr Rugowskiej w posługiwaniu się metodami biologii molekularnej. Praca świadczy również o niewątpliwej znajomości tematu i wiedzy teoretycznej mgr Anny Rugowskiej oraz potwierdza jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Oceniana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Tym samym przedstawiona mi rozprawa wyczerpuje warunki art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i pozwala mi wnioskować do Rady Naukowej Instytut Genetyki Człowieka PAN o nadanie mgr Annie Rugowskiej stopnia naukowego doktora.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Kardiologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Marek A. Deja