

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Zimnej pt.:
„Wpływ hipoksji sercowej na ekspresję genów proangiogennych w
pozawałowym sercu myszy oraz na właściwości biologiczne mioblastów ludzkich
dla potencjalnych terapii proregeneracyjnych”

Uwagi ogólne

Niedokrwienie i reperfuzja mięśnia sercowego skutkują tzw. uszkodzeniem niedokrwienno/reperfuzyjnym i ewentualnie śmiercią kardiomiocytów, czyli zawałem serca. Wielkość martwicy zawałowej (zawału) decyduje o rokowaniu pacjentów zarówno w okresie bezpośrednio około-zawałowym, jak i później, kiedy w wyniku ubytku masy miokardium, pozostałe przy życiu kardiomiocyty są przeciążone, serce ulega przebudowie i u części pacjentów rozwija się niewydolność serca. Dlatego zachowanie prawidłowej liczby komórek sercowych jest kluczem do poprawy rokowania w chorobie niedokrwiennej serca. W tym kontekście testowane są dwie strategie terapeutyczne. Jedna znana, jako **kardioprotekcja**, która ma na celu zapewnić niedokrwionym/reperfundowanym komórkom ochronę i uratować je przed śmiercią. Druga strategia, znana, jako **kardioregeneracja**, była pierwotnie pomyślana, jako sposób na zastąpienie już utraconych kardiomiocytów nowymi, powstałymi przy udziale komórek macierzystych. Rzeczywiście, badania eksperymentalne wykazały, że komórki macierzyste podane do serca w ostrej fazie zawału skutkują redukcją jego wielkości. Wkrótce okazało się jednak, że dzieje się tak, dlatego że w wyniku terapii komórkowej mniej kardiomiocytów umiera a nie, dlatego że powstają nowe. Innymi słowy okazało się, że komórki macierzyste mają działanie raczej kardioprotekcyjne niż kardioregeneracyjne. Prawdopodobny mechanizm ich korzystnego działania jest następujący. Komórki znajdujące się w centrum obszaru niedokrwionego miokardium, jako najbardziej niedokrwione, umierają w ciągu kilkudziesięciu minut i prawdopodobnie są nie do uratowania w inny sposób niż przez reperfuzję. Bój toczy się o mniej niedokrwione komórki leżące na peryferiach zawału. Ich umieranie przeciąga się bowiem w czasie, co daje czas na powstanie w ich sąsiedztwie nowych naczyń włosowatych. Ostatecznie, umieranie komórek na peryferiach zawału, co w anglosaskiej literaturze znane jest, jako *infarct extention*, jest wypadkową dynamiki wymierania kardiomiocytów i dynamiki powstawania nowych kapilar, czyli angiogenezy. Panuje dość powszechne przekonanie, że komórki macierzyste, podane do serca, zmniejszają rozmiar zawału gdyż produkowane przez nie substancje czynne stymulują lokalny proces angiogenezy (efekt parakryny), co poprzez normalizację ich homeostazy tlenowej ratuje je od śmierci.

Kontynuacją tego kierunku myślenia jest pomysł by zwiększać potencjał terapeutyczny komórek macierzystych podawanych w zawałe poprzez ich wstępną transfekcję genami kodującymi produkcję różnych białek, o których wiadomo, że mają działanie stymulujące angiogenezę. Właśnie w ten ważny z teoretycznego i praktycznego punktu widzenia, nurt badań wpisuje się recenzowana praca doktorska. Praktyczną wagę badania podkreśla bardzo niewielka efektywność kliniczna dotychczasowych strategii ograniczania wielkości zawału. Każdy postęp w tej dziedzinie jest, więc nie do przecenienia.

Obiektem badanym w obecnym doktoracie były ludzkie komórki macierzyste izolowane z mięśni szkieletowych (czyli tzw. komórki satelitarne mięśni szkieletowych). Ten rodzaj komórek był już poprzednio przedmiotem licznych dobrze opublikowanych badań zespołu badawczego prof. Macieja Kurpisa, promotora dzisiejszej doktorantki. Wieloletnie doświadczenie zespołu i doktorantki z tym rodzajem komórek zaowocowało zawansowanym koncepcyjnie i technologicznie doktoratem, ale, jak przypuszczam, stało się także przyczyną głównej jego wady, jaką jest dość „rozwichrzona” konstrukcja i mała komunikatywność

tekstu dysertacji. Doktorantka zdaje się nie dopuszczać myśli, że tzw. kuchnia wykonywanych przez nią badań, zrozumiała bez słów w jej otoczeniu, bez szczegółowego objaśnienia, jest trudno strawna dla postronnego czytelnika, włączając w to moją osobę (o czym poniżej).

Dysertacja jest kombinacją czterech odrębnych badań.

Ad Badanie nr 1; Pokazuje ono:

- (i) że komórki satelitarne, już w standardowych warunkach hodowli *in vitro*, wykazują ekspresję genu odpowiedzialnego za produkcję czynnika HIF-1 α , który to czynnik jest czynnikiem transkrypcyjnym dużej liczby genów, w tym genów odpowiedzialnych za produkcję białek indukujących angiogenezę (białek pro-angiogennych);
- (ii) że wielkość ekspresji genu HIF-1 α zależy od stężenia tlenu w pożywce hodowlanej, że jest największa w środowisku 3% stężenia tlenu (definiowanym przez doktorantkę, jako warunki hipoksyczne) i że zmienia się wraz z czasem ekspozycji komórek na dane stężenie tlenu;
- (iii) dalej, że komórki satelitarne, wstrzyknięte do mięśnia sercowego myszy w drugiej dobie zawału, również wykazują ekspresję genu HIF-1 α , zmieniającą się wraz z upływem czasu od wstrzyknięcia. W tej ostatniej części badania brak jest jednak eksperymentu kontrolnego analizującego zmiany ekspresji genu HIF-1 α (i ewentualnie innych czynników angiogennych) w miokardium kontrolnych serc poddanych zawałowi. Bliższa analiza tekstu doktoratu pokazuje, że omawiany eksperyment kontrolny, *de facto*, jest obecny, ale nie jest traktowany, jako eksperyment kontrolny gdyż jest opisywany w części pracy niezwiązanej z badaniem nr 1 i jest omawiany, jako oddzielne zadanie niezwiązane z badaniem nr 1.

Razem wzięwszy, częściowo niekompletne badanie nr 1 dowodzi, że nawet niezmodyfikowane komórki satelitarne, implantowane dosercowo są potencjalnym źródłem czynników pro-angiogennych. Natomiast nie wiadomo czy czynniki pro-angiogenne są uwalniane także w kontrolnym sercu z zawałem i czy i jak to ewentualne konstytutywne wydzielanie jest modyfikowane przez komórki satelitarne.

Ad Badanie 2; W badaniu tym:

- (i) doktorantka opracowała technikę transfekcji komórek satelitarnych genami trzech różnych czynników powszechnie uznawanych za czynniki pro-angiogenne (VEGF, FGF-4 oraz PLGF), a o których dodatkowo wiadomo, że ich ekspresja jest indukowana przez HIF-1 α ;
- (ii) wykazała, że transfekowane komórki satelitarne, podobnie jak komórki niemodyfikowane, reagują na hipoksję zwiększoną ekspresją genu HIF-1 α ;
- (iii) że ekspresja genów VEGF, FGF-4 i PLGF i produktów białkowych tych genów jest znacznie większa w transfekowanych komórkach niż w komórkach niezmodyfikowanych, i co istotne, że profil zmian ekspresji badanych genów i ich produktów białkowych pod wpływem hipoksji jest podobny w obu typach komórek.
- (iv) Dodatkowo, okazało się, że supernatanty zebrane z badanych populacji komórek satelitarnych stymulują hodowlę komórek śródbłonna do tworzenia kapilar;
- (v) Te i inne liczne testy wykazały ostatecznie, że transfekowane komórki rzeczywiście produkują zwiększone ilości czynników proangiogennych i że, mimo manipulacji związanych z transfekcją, ich inne właściwości biologiczne pozostały niezmienione. Oznacza to, że to dobrze skonstruowane i bardzo kompletne badanie skończyło się opracowaniem nowego obiecującego narzędzia do badań nad mechanizmem i efektywnością kardioprotekcji. W mojej opinii ta część pracy najlepiej się broni i samo to badanie mogłoby stanowić podstawą doktoratu.

Ad Badanie 3; Znacznie mniej kompletne badanie 3 jest próbą weryfikacji generalnej hipotezy, że transfekcja komórek satelitarnych genami czynników pro-angiogennych

zwiększa ich potencjał kardioprotekcyjny w stosunku do komórek niemodyfikowanych. Badanie doktorantki z użyciem komórek transfekowanych genem łożyskowego czynnika wzrostowego (PLGF) takiej przewagi komórek transfekowanych nie wykazało, ale niewystarczająca liczba eksperymentów i dyskusyjny zwierzęcy model eksperymentalny użyty w tym badaniu stawiają pod znakiem zapytania konkluzyjność tego badania (szczegóły poniżej).

Ad Badanie 4; Doktorantka zbadała w nim profil ekspresji licznych czynników pro-angiogennych w czasie w sercach kontrolnych myszy z zawałem. Powód włączenie tego, skąd inąd bogatego w informacje eksperymentu, do doktoratu nie został przez doktorantkę wyjaśniony. Jak o tym piszę powyżej, w ramach ogólnej konstrukcji myślowej całości doktoratu, eksperyment ten najlepiej tłumaczy się, jako część badania nr 1. Natomiast w obecnej postaci, jest on niezrozumiałym wtrętem do dość logicznie skonstruowanej całości. Chyba, że doktorantka zapomniała powiedzieć czytelnikowi o czymś ważnym?

Podsumowując część ogólną uwag uważam, że cel rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Zimnej jest uzasadniony naukowo i dotyczy aktualnego i ważnego problemu, jakimi jest mechanizm i skuteczność kardioprotekcyjna terapii komórkowej w zawałe.

Najmocniejszą stroną badań składających się na dysertację jest ich niezwykle wysoki poziom technologiczny. Opisane w pracy wyniki zostały uzyskane przy użyciu bardzo licznych i zaawansowanych technicznie metod badawczych z kręgu biologii molekularnej a także trudnej techniki wywoływania zawału u myszy i techniki wstrzykiwania komórek do miokardium. Oryginalny pomysł i nowoczesna metodologia badań sprawiły, że uzyskane w pracy wyniki są nowatorskie i stanowią dobry wstęp do dalszych badań nad użytecznością transfekowanych komórek macierzystych w leczeniu zawału serca. Słaba stroną pracy jest jej warstwa językowa i komunikacyjna.

Uwagi szczegółowe

Rozprawa mgr Agnieszki Zimnej ma typowy układ rozdziałów, liczy 164 strony, w tym 51 rycin, 22 tabele, wykazy skrótów, rycin i tabel, oraz spis literatury obejmujący aż 220 pozycji. Polszczyzna rozprawy pozostawia wiele do życzenia zarówno, jeżeli chodzi o gramatykę, składnię, precyzję językową stwierdzeń, jak i ich poprawność faktologiczną. Oto kilka przykładów:

Str. 28 *„Na tym etapie dochodzi do mobilizacji komórek śródbłonna oraz rekrutacji komórek endotelialnych krążących w naczyniach”*.

Str. 31 *„(...) kluczowym elementem jest aktywacja unipotencjalnych komórek satelitarnych mięśni szkieletowych, uznawanych za swoisty rezerwuuar tkankowy”*.

Str. 32 *„Szacuje się, że około 80% zgonów powodowane jest przez zawał mięśnia sercowego. To właśnie zawał mięśnia sercowego jest głównym objawem choroby niedokrwiennej serca, powodującej hipoksję”*

Str. 33 *„Kolejne podjęte próby transplantacji okazały się mniej inwazyjne”*

Str. 36 *„Dodatkowym beneficem działania czynnika PIGF okazał się jego wpływ na pobudzenie komórek mięśniówki gładkiej, przez co powstające naczynia krwionośne były dojrzałe, stabilne i trwałe”*.

Str. 113 *„Komórki populacji mia135 wykazywały polepszone zdolności do różnicowania w miotuby w warunkach tlenowych odpowiadających hipoksji”*

Str. 123 *„Przed zawałem wydolności lewej komory sięgała prawie 80%”*

Konstrukcja rycin nie budzi większych zastrzeżeń, z wyjątkiem tego, że ryciny są na ogół bardzo małe i szczegóły na nich pokazane są trudne do precyzyjnej analizy. Dodatkowo, dobrym obyczajem autorów prac naukowych jest zamieszczanie w podpisie do rycin: (i) informacji o rodzaju eksperymentu, z którego pochodzą prezentowane wyniki, tak by nie było

konieczności ustawicznego powracania do tekstu rozdziału Metodyka, oraz (ii) liczby eksperymentów składających się na demonstrowane wyniki.

Poniżej przedstawiam uwagi szczegółowe dotyczące poszczególnych elementów rozprawy.

Ad Tytuł; Fraza tytułu „*Wpływ hipoksji sercowej na ekspresję genów (...)*” jest moim zdaniem myląca. Doktorantka badała wpływ precyzyjnie wyskalowanych warunków tlenowych jedynie w warunkach hodowli komórkowej, natomiast nie robiła bezpośredniego pomiaru stężenia tlenu w miokardium. O obecności hipoksji tkankowej Doktorantka jedynie spekuluje, zresztą na podstawie dość wątpliwych przesłanek (vide poniżej).

Ad Wstęp – Wstęp liczy 31 stron i jest niepotrzebnie tak długi. Dodatkowo te same informacje (zwłaszcza dotyczące mechanizmu angiogenezy) są powtarzane trzykrotnie - dwa razy we wstępie i ponownie w Dyskusji. Trzy czwarte wstępu zajmują bardzo szczegółowe i niezwiązane z tematem pracy informacje o mechanizmie angiogenezy i można by je śmiało opuścić. Ostatecznie czytelnik dowiaduje się o kontekście patofizjologicznym pracy i właściwym pomysłem na późniejsze eksperymenty dopiero w okolicach 30 strony wstępu, kiedy jest już dość zniecierpliwiony, zdeorientowany i zirytowany. Z tekstu wstępu widać, że żywiołem doktorantki jest biologia molekularna i związane z nią techniki badawcze, a niezbędne dla zrozumienia istoty pomysłu pracy patofizjologia zawału i kardioprotekcji są potraktowane jedynie marginalnie.

Ad Metodyka;

Metodyka jest mocną stroną doktoratu. Rozdział Metodyka zawiera szczegółowe opisy wyjątkowo licznych metod badawczych używanych w dysertacji. Dodatkowo w rozdziale Wyniki zaprezentowane zostały liczne eksperymenty nastawione na weryfikację jakości wykonanych pomiarów, co dowodzi biegłości metodologicznej doktorantki. Autor obecnej recenzji nie jest ekspertem w dziedzinie technik biologii molekularnej i nie podejmuje się szczegółowo oceniać sposobu posługiwania się nimi przez doktorantkę. Do niektórych wątpliwości dotyczących metodyki bądź sposobu prezentacji wyników wracam przy ocenie rozdziału Wyniki.

Ad Wyniki;

Na przykładzie danych z Ryc, 17, proszę doktorantkę o wyjaśnienie:

- (i) co oznacza, obecny na Ryc. 17 i wielu innych rycinach, termin „Względna ekspresja”? Rozumiem, że dane pokazane na Ryc. 17 były przedmiotem normalizacji. Proszę wyjaśnić jak to było robione?
- (ii) Co oznacza pozioma przerywana linia na rycinie?
- (iii) Względem, czego były liczone znamienności statystyczne pokazane na Ryc. 17A i B. Proszę wyjaśnić, jakie były kolejne kroki składające się na analizę statystyczną pokazaną na rycinie.

Ad Rycina 20;

- (i) Jak były normalizowane dane z Ryc. 20A i B? W tekście jest mowa o dwóch genach referencyjnych, ale nie wiadomo czy mysich czy ludzkich? Czy robiono normalizację względem obu a pokazano wynik tylko jednej normalizacji?
- (ii) czy normalizacja brała pod uwagę ewentualne zmiany liczby zagnieżdżonych w miokardium komórek satelitarnych (konieczna byłaby wtedy normalizacja w stosunku do ludzkich genów referencyjnych). Konsekwentnie, czy wynik w 20B oznacza, że komórki satelitarne nie zagnieżdżyły się w normalnym zdrowym miokardium, czy też poszło coś nie tak z pomiarem ekspresji?

- (iii) W kontekście Ryc. 20A pokazującej ekspresję genu HIF-1 α w komórkach satelitarnych wstrzykniętych do serca z zawałem, doktorantka stwierdza „Wynik ten potwierdził, iż hipoksja obecna w sercach ma wpływ na ekspresję genów w komórkach podawanych w rejon objęty niedokrwieniem”. Natomiast w kontekście Ryc. 20B doktorantka stwierdza „Nie wykryto ekspresji genu HIF-1 α w mioblastach podanych do serc, w których nie indukowano zawału. Tym samym udowodniono, że przy braku hipoksji sercowej wywołanej niedokrwieniem nie dochodzi do ekspresji genu HIF-1 α w komórkach macierzystych”. W mojej opinii obie te konkluzje są nieuprawnione. Jak wyraźnie pokazują to dane z Ryc. 44, nawet w sercach kontrolnych (a więc prawidłowo utlenowanych) ma miejsce pewna podstawowa ekspresja zarówno genów HIF-1 α jak i genów wielu innych czynników zaangażowanych w angiogenezę. Oznacza to, że ekspresja genów pro-angiogennych ma charakter, przynajmniej częściowo, konstytutywny (vide także Ryc. 17), i że samo stwierdzenie w tkance sercowej (lub hodowli komórkowej) ekspresji któregoś z tych czynników nie może być traktowane, jako marker hipoksji tkankowej.
- (iv) Kontynuując powyższe rozumowanie, trudno mi się zgodzić z wnioskowaniem Doktorantki dotyczącym wyników z Ryc. 21. Po pierwsze, oznaczenia słupków z danymi na tej rycinie są nieczytelne i prawdopodobnie pomyłone. Po drugie Doktorantka argumentuje, że w zawałowym miokardium stężenie tlenu wynosi 3%, bo ekspresja genu HIF-1 α w zawałowym miokardium jest z grubsza podobna do ekspresji genu HIF-1 α , jaką mają komórki satelitarne w hodowli w środowisku 3% tlenu. Kalibracja utlenowania miokardium na podstawie danych z hodowli komórkowej byłaby uprawniona tylko wtedy gdyby dało się porównać jakieś dwa punkty na „hodowlanej krzywej kalibracyjnej” z ekspresją genu HIF-1 α w sercu mierzoną w dwóch różnych warunkach jego utlenowania. W innej sytuacji mamy do czynienia z nierozwiązywalnym równaniem z dwoma niewiadomymi. Sumując nie twierdzę, że miokardium w ostrej fazie zawału nie jest hipoksyczne, uważam jedynie, że fakt stwierdzenia w miokardium ekspresji genów pro-angiogennych nie wystarcza by rozpoznać hipoksję. Ekspresja omawianych genów jest częściowo konstytutywna (vide Ryc. 17 i 44), co bardzo komplikuje wnioskowanie Doktorantki.

O eksperymentach z transfekowanymi komórkami pisałem już powyżej. Są one najwyższej próby i one same wystarczyłyby za cały doskonały doktorat.

Moje kolejne wątpliwości dotyczą interpretacji i ideologii eksperymentów opisanych w rozdziale 5 Wyników zatytułowanym „Badania w modelu zwierzęcym”. Pierwsza część eksperymentów tam opisanych wykonana została na myszach z zawałem, u których mierzono w miokardium poziom ekspresji dużego panelu genów pro-angiogennych w 24 godziny, 7 dni lub 28 dni po podwiązaniu tętnicy wieńcowej, celem indukcji zawału. Generalnie, ekspresja ta była największa po 24 godzinach od indukcji zawału a później malała do poziomu, jaki występuje w normalnych sercach bez zawału. Niemniej jednak, konkluzja Doktorantki na podstawie tych wyników jest taka, że serce z podwiązaną tętnicą wieńcową jest już permanentnie niedotlenione (hipoksyczne), z tym że poziom hipoksji jest największy w 2 dobie zawału. Konsekwencją tej interpretacji, w moim przekonaniu nieuprawnionej, jest konstrukcja kolejnego eksperymentu, w którym w 28 dniu od indukcji zawału wstrzykiwano w okolicę blizny pozawałowej komórki satelitarne niezmodyfikowane lub transfekowane genem PLGF i kontynuowano obserwację przez kolejne 3 miesiące. Ciche założenie takiej konstrukcji eksperymentu jest takie, że przebudowa i rozwój niewydolności serca w zbliżowaciałym pozawałowym sercu jest wynikiem permanentnego niedotlenienia tych kardiomiocytów, które przeżyły zawał. Ergo, terapia z użyciem czynników pro-angiogennych

w tak odległym od zawału okresie jest uzasadniona patofizjologicznie. Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, jakie fakty uzasadniają jej poglądy na temat patomechanizmu przebudowy i niewydolności pozawałowego serca. Abstrachując od tych rozważań teoretycznych, uważam, że moc statystyczna eksperymentów z komórkami transfekowanymi genem PLGF jest niewystarczająca by na ich podstawie wnioskować o potencjale terapeutycznych tych komórek. Liczebności trzech porównywanych grup myszy wynosiły 6:3:3. Jest jeszcze zbyt wcześnie by te eksperymenty pokazywać w doktoracie.

Tematy do rozmowy z Doktorantką

1. Dlaczego w terapii komórkowej stosowane są koniecznie komórki macierzyste a nie jakieś inne łatwiej dostępne komórki, np. fibroblasty?
2. Na czym polega ewentualna przewaga terapeutyczna transfekowanych komórek macierzystych nad podawaniem gotowych produktów białkowych transferowanych genów?
3. Skąd się wzięła hipoteza obecnego doktoratu, że także w czasie odległym od ostrej fazy zawału, kiedy doszło już do organizacji blizny pozawałowej, angiogeneza jest ważną determinanta procesu przebudowy miokardium?

Uwagi końcowe

Podsumowując, stwierdzam, że jak zwykle w przypadku tego typu prac, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Zimnej ma elementy znakomite, ale również, że ma elementy słabsze. Do słabszych stron pracy zaliczam:

- (i) Brak precyzyjnego wprowadzenia do wykonanych badań;
- (ii) Nie zawsze zgodną z faktami interpretację niektórych uzyskanych wyników;
- (iii) Niepotrzebne włączenie do doktoratu częściowo niekompletnych i tym samym nie konkluzyjnych eksperymentów.

Do pozytywów pracy zaliczam:

- (i) Podjęcie ważnego i aktualnego tematu badawczego;
- (ii) Użycie w pracy licznych i nowoczesnych metod badawczych;
- (iii) Prawidłową konstrukcję, organizację, wykonanie i oryginalne wyniki szczególnie wysoko przeze mnie ocenianego badanie dotyczące efektów biologicznych transfekcji komórek satelitarnych genami czynników pro-angiogennych;
- (iv) Fakt, że wyniki pracy otwierają nową perspektywę zastosowań klinicznych terapii komórkowej w zawałe i być może w pozawałowej niewydolności serca.

Nie mam wątpliwości, że pozytywy rozprawy zdecydowanie przeważają nad jej niedociągnięciami i wyrażam przekonanie, że spełnia ona wymagania Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym

W związku z powyższym, zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Agnieszki Zimnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Beręsewicz

Warszawa, 4 czerwca 2018 r.

