

Prof. dr hab. med. Ewa Straburzyńska-Migaj

Poznań, 6.06.2018.

I Klinika i Katedra Kardiologii

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,

61-848 Poznań, ul. Długa 1/2, tel. 618549146

e-mail: ewa.straburzynska-migaj@skpp.edu.pl

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"

Choroba niedokrwienna serca i zawał serca to najczęstsze przyczyny niewydolności serca, która we współczesnym świecie stanowi istotny problem medyczny, społeczny i ekonomiczny. Od wielu lat systematycznie rośnie częstość występowania niewydolności serca, między innymi z powodu starzenia się społeczeństw, a także paradoksalnie, w związku z coraz skuteczniejszym leczeniem zawału serca. Zawał serca to martwica kardiomiocytów, do której dochodzi w następstwie pęknięcia blaszki miażdżycowej i zamknięcia naczynia wieńcowego. Współczesne leczenie interwencyjne, którego celem jest jak najszybsze otwarcie zamkniętej tętnicy wieńcowej, doprowadziło do zmniejszenia śmiertelności w świeżym zawale serca, ale w zależności od czasu niedokrwienia, kalibru zamkniętego naczynia, obecności krążenia obocznego dochodzi do różnego stopnia uszkodzenia mięśnia serca, co może prowadzić do jego niewydolności. Ostatnie lata to poszukiwanie nowych możliwości skutecznego leczenia niewydolności serca, a także zapobiegania jej wystąpieniu. Dostępne terapie obejmują farmakoterapię, wszczepianie urządzeń do elektroterapii (kardiowerterów-defibrylatorów, stymulatorów resynchronizujących), urządzeń do mechanicznego wspomagania krążenia oraz przeszczepianie serca. Mimo że przedłużają one życie pacjentom z niewydolnością serca, to nadal rokowanie w tym zespole chorobowym jest niekorzystne – ok. 50% chorych umiera w okresie

5 lat od rozpoznania. Wiele osób wiąże ogromne nadzieje z możliwością regeneracji mięśnia serca, stąd w wielu laboratoriach na całym świecie bada się przydatność różnych komórek do stosowania w tym celu, m.in. komórki macierzyste szpiku, komórki prekursorowe krwi, czy mioblasty. Zainteresowanie badaczy w ostatnich latach przyciąga możliwość genetycznych modyfikacji mioblastów.

W ten nurt badań wpisuje się znakomicie przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Agnieszki Zimnej.

Praca stanowi 164 stronicowe opracowanie o typowym układzie. Zawiera 51 rycin i 22 tabele, które w sposób przejrzysty przedstawiają trudne zagadnienia związane z angiogenezą, schematy eksperymentu i uzyskane wyniki.

Wstęp, w którym Autorka przedstawia mechanizmy angiogenezy, mechanizmy adaptacyjne do hipoksji, w tym działanie czynnika HIF-1, wpływ tego czynnika na proces tworzenia naczyń oraz dotychczasowe wyniki badań nad zastosowaniem komórek macierzystych i mioblastów, w tym modyfikowanych genetycznie z użyciem czynników proangiogennych, w regeneracji serca stanowi znakomite wprowadzenie do opisu przeprowadzonych badań.

Następnie Autorka formułuje cel pracy, którym jest określenie, jaki wpływ mają warunki hipoksji panującej w sercu na ekspresję genów proangiogennych w pozawałowym sercu myszy oraz na właściwości biologiczne genetycznie modyfikowanych mioblastów ludzkich dla potencjalnych terapii proregeneracyjnych. Dla realizacji tego celu określiła 4 zadania badawcze:

1. Ustalenie warunków hipoksji dla komórek mięśni szkieletowych hodowanych w warunkach *in vitro*, tak, aby jak najbardziej przypominały warunki panujące w pozawałowym sercu
2. Uzyskanie populacji mioblastów modyfikowanych genami proangiogennymi *VEGF-A/FGF-4* oraz genem *PIGF*, a następnie porównanie ich właściwości w różnych warunkach stężenia tlenu
3. Ustalenie kinetyki zmian ekspresji genów proangiogennych, badanych w wybranych interwałach czasowych od indukcji zawału serca u myszy
4. Ocenę skuteczności interwencji komórkowej z użyciem mioblastów ludzkich modyfikowanych genem *PIGF* w badaniach przedklinicznych w modelu mysiego serca pozawałowego.

Materiał biologiczny stanowiły mioblasty ludzkie uzyskane od pacjentów poddawanych rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego. Eksperymenty przeprowadzono w modelu mysim. Plan obszernych badań i metody badawcze są dobrze opisane i zilustrowane. Wyniki analizowano przy użyciu testów porównujących dane pomiędzy przynajmniej 3 grupami. W eksperymencie *in vitro* badano model hipoksji, który odzwierciedlał warunki tlenowe panujące w sercu objętym zawałem, a następnie *in vivo* w modelu mysim określano wpływ hipoksji pozawałowej na transplantowane ludzkie mioblasty.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pracy świadczą o realizacji celów badania. Najważniejszym wynikiem jest ustalenie przez Autorkę warunków hipoksji, które odpowiadają warunkom tlenowym w sercu po zawale na 3% zawartości tlenu, jako odpowiednie warunki dla hodowli *in vitro* komórek macierzystych mioblastów. Jest to nowatorska obserwacja. Inne niezmiernie ciekawe eksperymenty wykazały, że wykreowane warunki hipoksji nie miały negatywnego wpływu na modyfikowane i natywne hodowane mioblasty. Badania na modelu mysiego serca pozawałowego pozwoliły na poznanie dynamiki zmian w ekspresji genów proangiogennych po 24 godzinach, 7 i 28 dniach od zawału. Te badania oraz badania genetycznie modyfikowanych mioblastów pozwoliły na dokonanie wyboru terapii regeneracyjnej przeprowadzonej w ramach badań przedklinicznych z zastosowaniem mioblastów modyfikowanych genetycznie przez wprowadzenie genu PlGF w wektorze plazmidowym. Stwierdzono, że podanie ich w obszar blizny pozawałowej serca myszy związane było z poprawą parametrów hemodynamicznych lewej komory serca (o ok. 40%) w porównaniu z grupą kontrolną.

Dyskusja prowadzona jest w sposób wyczerpujący. Doktorantka przedstawia w niej wyniki własne w kontekście badań innych autorów. Obserwacje poczynione przez Doktorantkę i sformułowane na ich podstawie wnioski stanowią przyczynek do dalszych badań nad możliwością zastosowania modyfikowanych genetycznie mioblastów w regeneracji mięśnia serca. Elementem nowatorskim przeprowadzonych badań jest ustalenie przez Autorkę, że w sercu pozawałowym zawartość tlenu wynosi 3% i to mogą być odpowiednie warunki do prowadzenia hodowli mioblastów *in vitro*. Dyskusja świadczy o dobrej umiejętności analizowania dostępnych danych i prowadzenia rozważań naukowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka przedstawiła 6 wniosków. Stwierdziła, że:

1. Analiza ekspresji markera *HIF-1α* w mioblastach hodowanych *in vitro* w różnych stężeniach tlenu oraz w komórkach po podaniu w rejon niedokrwienno serca pozawałowego umożliwiła ustalenie warunków hipoksji, odzwierciedlających stężenie tlenu panujące w pozawałowym miokardium. Konsolidacja badań *in vitro* oraz *in vivo* wykazała, iż ekspresja markera *HIF-1α* w punkcie oznaczającym 3% stężenia O_2 jako jedyna nie wykazała istotności statystycznej z ekspresją tego markera obecną w mioblastach ludzkich transplantowanych w rejon niedokrwienia. Przeprowadzona analiza pozwoliła wnioskować, iż 3% stężenia tlenu odpowiada warunkom w miokardium po zaindukowaniu zawału.
2. Warunki tlenowe *in vitro* odpowiadające hipoksji sercowej *in situ* nie wpłynęły negatywnie na obserwowany profil ekspresji genów (transgenów oraz genów miogennych) oraz na właściwości biologiczne mioblastów ludzkich modyfikowanych genetycznie przy pomocy konstrukcji *FGF-4/VEGF* oraz *PlGF*. Komórki traciły swe wartości regeneracyjne (tendencje spadkowe w ekspresji genów miogennych, statystycznie istotne obniżenie proliferacji w większości populacji, obniżony potencjał do różnicowania) w warunkach fizjologicznych - 5% O_2 , uznawanych za warunki normoksji; natomiast warunki standardowe *in vitro* (hiperoksja) kreowały dla komórek środowisko, które nie zmieniało właściwości biologicznych mioblastów.
3. Zastosowane modyfikacje genetyczne (wektory plazmidowe zawierające geny *FGF-4/VEGF* oraz *PlGF*) nie miały wpływu na właściwości biologiczne mioblastów, za to powodowały, iż nabierały one lepszych właściwości proregeneracyjnych poprzez wydzielanie dużych ilości funkcjonalnych białek o charakterze proangiogennym.
4. Analiza molekularna serc mysich w różnych odstępach czasu po zawale umożliwiła ustalenie dynamiki zmian ekspresji genów proangiogennych. W 24 h po zawale, w odpowiedzi na stymulację czynnikiem indukowanym hipoksją (w ostrej fazie niedokrwienia), istotnie wzrasta ekspresja genów proangiogennych *Plgf* oraz genu dla receptora *Flt-1*. Tendencje wzrostowe w odpowiedzi na statystycznie znamienny wzrost czynnika *Hif-1α* wykazuje gen *Vegf-a*. *Plgf* był aktywnie transkrybowany jedynie 24 h po zawale, a następnie jego ekspresja wraca do poziomu bazalnego (przed indukacją zawału). Miesiąc po zawale, kiedy to blizna pozawałowa jest już ukształtowana wystę-

puje trend synchronizacji wszystkich czynników (*Hif-1a*, *Vegf-a*, *b*, *c*, *d*) oraz receptorów (*Flt-1* i *Kdr*) poza czynnikiem *Plgf*. Geny odpowiedzialne za limfangiogenezę (*Vegf-a*, *c*, *d* oraz receptor *Kdr*) również zwiększają swoją ekspresję między 7 a 28 dniem po zawale.

5. Terapia regeneracyjna z użyciem ludzkich mioblastów modyfikowanych genem *PLGF* poprawiła parametry hemodynamiczne serca o około 40% w porównaniu do grup myszy, u których zastosowano interwencję typu „*sham*”. Zwiększyła się widocznie grubość ściany lewej komory, w porównaniu do serca nie poddanego zabiegom terapeutycznym.
6. Mioblasty ludzkie modyfikowane genetycznie za pomocą konstrukcji *PLGF* wpływały znamienne na zmianę profilu ekspresji genów proangiogennych w sercu. Dochodziło do podwyższenia ekspresji kluczowych genów proangiogennych *Vegf-a*, *b*, *c*, *d*, oraz genów kodujących receptory *Flt-1*, *Kdr* w stosunku do grupy kontrolnej, w której zastosowano interwencję typu „*sham*” podając roztwór soli fizjologicznej.

Przedstawione wyniki i wnioski mają istotny aspekt poznawczy, poszerzają wiedzę o możliwościach terapii regeneracyjnej w sercu po zawale. Udowadniają w eksperymencie przedklinicznym, że mioblasty modyfikowane genami proangiogennymi podawane do strefy zawału serca mogą wpływać korzystnie na proces przebudowy i czynność mięśnia serca. Stanowią przyczynek do projektowania kolejnych badań, w tym w zawale serca u ludzi.

Doktorantka wykorzystała w pracy imponującą liczbę – 220 - pozycji piśmiennictwa, niestety znalazłam tylko 4 pozycje autorów polskich (pochodzące zresztą z ośrodka, w którym Doktorantka wykonała badania). Piśmiennictwo jest dobrze dobrane i wykorzystane. Praca jest napisana poprawnym językiem zgodnie z zasadami publikacji naukowych.

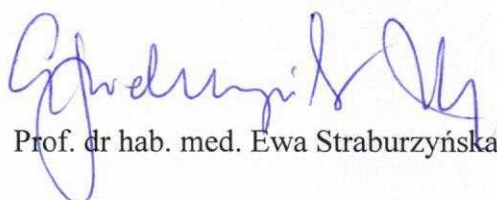
Z obowiązku recenzenta przedstawiam kilka uwag dotyczących pracy:

1. Nie podano liczby pacjentów od których uzyskano materiał do badań, ani liczby zwierząt eksperymentalnych w rozdziale „Materiały”, są one ukryte w rozdziale „Metody”. Jest tu mowa o 68 myszach (str. 78) i 2 pacjentach (str. 71)? A na str. 85 napisano, że „wszyscy pacjenci mieścili się w przedziale wiekowym do 35 roku życia” (to ilu było tych pacjentów? Od jakiego wieku zaczynał się przedział wiekowy?)

2. We wstępie Autorka pisze na temat chorób sercowo-naczyniowych w kontekście regeneracji serca. Tytułem wyjaśnienia prostuję podane przez Doktorantkę wyjaśnienia dotyczące poszukiwania alternatywnych metod leczenia zmian pozawałowych – nie stanowią przeciwwskazania do leczenia zabiegowego (interwencji wewnątrznaczyniowych) ani zaawansowany wiek, ani choroby towarzyszące. Problemem jest występowanie niewydolności serca po zawale serca i jej zapobieganie.

Przedstawione uwagi nie pomniejszają wartości rozprawy, która prezentuje elementy nowatorskie i niewątpliwie jest przyczynkiem w rozwoju badań nad regeneracją serca po zawale. Uważam, że przedstawiona praca 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" spełnia warunki stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych.

Wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Agnieszki Zimnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. med. Ewa Straburzyńska-Migaj