

Ocena

rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna mgr biologii Jarosława Lewandowskiego z Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk pt. Wpływ czasu hodowli *In vitro* na stopień dojrzałości kardiomiocytów pozyskanych drogą różnicowania z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych pochodzenia miogenego.

Zaburzenia ukrwienia mięśnia sercowego, w krańcowych przypadkach prowadzące do zawału tzn. do martwicy włókien mięśniowych, należą do głównych przyczyn niewydolności i śmiertelności populacji niemal na całym świecie. Przeżycie zawału serca, pozornie korzystne dla pacjenta, istotnie jednak osłabia jego aktywność życiową wskutek powstania tzw. *locus minoris resistenciae*, tzn. obszaru w mięśniu sercowym, w którym włókna mięśniowe zostały zastąpione włóknami tkanki łącznej, czyli blizną. Obszar ten nie ma zdolności do skurczów i nie współdziała z pracą serca. Ponadto grozi pęknięciem, a w skrajnych przypadkach prowadzi do tzw. tamponady serca, polegającej na zatrzymaniu jego akcji wskutek wypełnienia worka osierdziowego krwią. Stąd, w wielu ośrodkach naukowych powstała koncepcja badawcza zmierzająca do odbudowy zniszczonej struktury mięśnia sercowego. Komórki mięśniowe niestety nie mają zdolności do autoregeneracji. Próbuje się więc uzyskać takie komórki *In vitro* poprzez odpowiednie modyfikacje komórek macierzystych i progenitorowych. Tak zwana kardiomiogeneza jest jednak procesem bardzo złożonym, wymagającym współdziałania szeregu czynników wzrostu, czynników transkrypcyjnych, właściwych szlaków sygnałowania komórkowego etc. nie mówiąc już o źródle komórek. Magister Jarosław Lewandowski (mgr JL) podjął to trudne wyzwanie, nie mając praktycznie właściwych, powszechnie uznawanych wzorców postępowania w piśmiennictwie. Wprowadzenie do pracy, - liczące 50 stron, jest szczegółowym omówieniem sposobów i metod pozyskiwania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (IPS) *In vitro* i kilkanaście sposobów ich uzyskiwania z określeniem zarówno zalet jak i wad każdej procedury. Omawiając metody różnicowania IPS w kardiomiocyty, szczególnie dużo miejsca poświęcił technologii kul zarodkowych, polegającej na tworzeniu agregatów komórkowych a następnie sferoidów złożonych z ekto- i endodermy, podobnych do wczesnych zarodków, zdolnych do indukcji pochodnych 3 listków zarodkowych. Technologia ta ma jednak wiele

modyfikacji i prowadzona jest w medium hodowlanym wzbogaconym w różnorodne czynniki wzrostu, wybrane związki chemiczne promujące kierunek kardiogeny i inne. Ważnymi elementami tych procedur jest kontrola efektywności różnicowania i metody oczyszczania kardiomiocytów z uzyskanej hodowli. Autor omówił krótko dostępne możliwości techniczne w tym zakresie, natomiast przedstawił szczegółowo mechanizmy kurczliwości serca, w tym poszczególne białka aparatu kurczliwego oraz ich funkcje w przebiegu skurczu. Podkreślił rolę jonów wapnia w tym procesie i znaczenie różnych kanałów wapniowych. W końcowej części Wprowadzenia znajdują się informacje dotyczące dojrzewania kardiomiocytów *In vivo* w warunkach fizjologicznych i uzyskiwania przez nie dojrzałego fenotypu. Interesujące jest, że w ludzkim organizmie komórki serca uzyskują dojrzały fenotyp dopiero po 6 – 10 latach!

Cel pracy – został sformułowany jako „określenie wpływu czasu trwania hodowli *In vitro* kardiomiocytów na stopień ich dojrzałości”. Można tu mieć zastrzeżenia co do poprawności tego określenia, gdyż parametr czasu był badany tylko w 2 przedziałach czasowych a ponadto zakres badań obejmował znacznie szerszy wachlarz zagadnień niż wpływ czasu hodowli *In vitro*.

W Materiałach – Kandydat opisał bardzo szczegółowo wszystkie użyte odczynniki, bufony i drobny sprzęt laboratoryjny z podaniem producenta, numeru katalog. itp. Natomiast w odniesieniu do pobranego ludzkiego materiału operacyjnego (mięśnie szkieletowe) brak jest bliższych danych odnośnie zgody poszczególnych pacjentów oraz dokumentu lokalnej (jakiej?) Komisji Bioetycznej zezwalającej na pobranie materiału. Ponadto nie wiadomo, od ilu pacjentów uzyskano materiał tkankowy.

W Metodach – hodowane *in vitro* mioblasty z ludzkich mięśni szkieletowych zostały poddane reprogramowaniu z pomocą wektora lentiwirusowego dla uzyskania linii pluripotentnych komórek macierzystych. Metodyka opisana jest szczegółowo, kontrolowana technikami biologii molekularnej a wprowadzone transgeny zostały wycięte z komórek. W dalszych badaniach podjęto próby różnicowania uzyskanych komórek linii IPS 119 w kierunku kardiomiocytów. Stosowano tu kilka metod, ale najlepsze wyniki uzyskano stosując hodowlę tzw. kul zarodkowych mioblastów reprogramowanych za pomocą wektora wirusowego Sendai. Powstające zmiany w reprogramowanych komórkach były gruntownie monitorowane przez szeroki panel metod jak techniki morfologiczne, immunofluorescencyjne,

cytometrię przepływową, metody molekularne w tym pomiar ekspresji genów biogennych i markerowych. Parametrem kontroli czynnościowej była ocena przepływu wewnątrzkomórkowego wapnia. Reasumując, niemal całość danych dotycząca Materiałów i Metod została przedstawiona dokładnie, szczegółowo i właściwie udokumentowana.

Wyniki – dominują tu ryciny z mikroskopu świetlnego i fluorescencyjnego wykazujące cechy komórek IPS w tym białka markerowe a także prawidłowy kariotyp. W generowanych potworniakach u myszy widoczna jest obecność 3 listków zarodkowych w powstałych narządach i tkankach. Podobnie dokumentowane jest różnicowanie linii komórkowej IPS 194 w kierunku kardialnych komórek mięśniowych. Już po 20 dniach hodowli wykazywano w różnicujących się komórkach obecność białek markerowych jak NKX2.5, troponiny i miozyny. W czasie dalszego trwania hodowli (do 40 dnia) obserwowano wiele zmian świadczących o dojrzewaniu fenotypu kardiomiocytów, jak poprawa organizacji sarkomerów z powstawaniem poprzecznego prążkowania, zmiana kształtu komórek z okrągłego na wydłużony, zanik proliferacji, reorganizacja sieci mitochondriów. Towarzyszyły temu zmiany ma poziomie DNA w reakcji PCR w czasie rzeczywistym, wyrażone w temperaturze topnienia produktów PCR. Porównanie ekspresji genów kodujących białka o kluczowym znaczeniu dla funkcji serca (troponina T, miozyna, koneksyna i inne) w różnicujących się kardiomiocytach w 20 i 40 dniu hodowli a także w dojrzałych komórkach serca wykazało stopniowy przyrost ich ekspresji, jednak uzyskany poziom był zwykle dużo niższy w porównaniu z dojrzałymi komórkami serca. Wzrastała również zdolność do skurczu różnicujących się komórek kardialnych, zauważalna już w 8 -10 dniu hodowli. Znamienny było znaczący wzrost częstości skurczów pod wpływem agonisty receptorów β -adrenergicznych, izoprenaliny, co świadczyło o obecności tych receptorów na badanych komórkach.

W Dyskusji – Autor sekwencyjnie omawia i interpretuje wyniki swych badań, zarówno dotyczące wytworzenia linii komórek pluripotentnych jak i ich różnicowania *In vitro* w kierunku kardiomiocytów. Podkreśla rolę białka NKX2.5 jako czynnika transkrypcyjnego, odpowiedzialnego, z danych piśmiennictwa, za prawidłową strukturę anatomiczną serca. Zwraca uwagę, że mutacje genu *TNNT2* kodującego troponinę T są przyczyną wielu kardiomiopatii. Podkreśla znaczenie stosunku obu lizoforn α i β miozyny jako znacznika dojrzewania kardiomiocytów, co było widoczne w badaniach tej pracy. Dużo miejsca poświęca też koneksynie 43, białku wstawek serca, wpływającym na wyższą prędkość

przewodzenia bodźców. Poziom ekspresji jej genu (CX43) wzrastał stopniowo i w 40 dniu hodowli był porównywalny z wartością dojrzałych komórek serca.

W końcowej części Dyskusji Autor zastanawia się nad wpływem stopnia rozwoju różnicujących się kardiomiocytów a możliwościami regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego poprzez zastosowanie terapii komórkowej u pacjentów. Z własnych obserwacji Autora i z danych piśmiennictwa wynika jednak, że metodyka ta jest jeszcze daleka od praktycznego wprowadzenia do kliniki człowieka, wymaga bowiem badań na większych zwierzętach i optymalizacji procedur badawczych.

Rozprawę kończy 7 wniosków będących dobrym odbiciem uzyskanych wyników, przedstawianych niekiedy jednak zbyt szczegółowo. Praca liczy 202 strony. Język rozprawy jest poprawny i zrozumiały. Tekst jest bogato ilustrowany, zawiera 61 rycin dobrej jakości, jakkolwiek opisy w rycinach są trudno czytelne. Pomocne dla czytelnika są tabele w liczbie 24. Piśmiennictwo jest obszerne (n = 237) i dobrze dobrane do meritum rozprawy. Spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim są bez zarzutu.


Praca jest wszechstronnym, bogatym studium dotyczącym warunków uzyskiwania *In vitro* ludzkich komórek mięśnia sercowego dla celów terapii komórkowej. Autor przedstawił obiektywnie nie tylko zalety ale i wady poszczególnych procedur a także potencjalne zagrożenia.

Rozprawa stanowi oryginalny dorobek Autora i w pełni kwalifikuje się jako podstawa do ubiegania się o uzyskanie stopnia naukowego doktora.

Zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o podjęcie kolejnych etapów postępowania dla nadania magistrowi Jarosławowi Lewandowskiemu stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna.

Jednocześnie postuluję wyróżnienie pracy.

Poznań, 14 sierpnia 2017 r.


Prof. zw. dr hab.med. Jan Żeromski