

STRESZCZENIE

W ramach innowacyjnego podejścia do terapii regeneracyjnej z użyciem mięśniowych komórek macierzystych w leczeniu skutków ostrego niedokrwienia serca, utworzono model hipoksji do badań *in vitro*, który odzwierciedlał warunki tlenowe panujące *in situ* w sercu pozawałowym. W pierwszej fazie oceniono wpływ różnych stężeń tlenu: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% na mioblasty ludzkie hodowane w warunkach *in vitro*. Kolejnym etapem były badania *in vivo* na modelu mysim, w którym określono wpływ hipoksji obecnej w sercu po indukcji zawału na transplantowane ludzkie mioblasty. Za pomocą metody qPCR określono we wszystkich badanych populacjach mioblastów ekspresję markera hipoksji - *HIF-1α*. Konsolidacja wyników badań *in vitro* oraz *in vivo* pozwoliła na ustalenie warunków hipoksji, które odpowiadały warunkom tlenowym obecnym w sercu po zawale na 3% O₂, jako ekwiwalent dla hodowli *in vitro* komórek macierzystych mięśni szkieletowych, czego wcześniej nie dokonano.

Następnie uzyskano populację mioblastów modyfikowanych genami proangiogennymi *FGF-4/VEGF* oraz *PIGF*. Zostały one zbadane w różnych warunkach tlenowych pod kątem ich właściwości biologicznych (prolifracja, apoptoza, zdolność do tworzenia miotub) i potencjału terapeutycznego (zdolność do wywołania angiogenezy w wyniku sekrecji białek powstałych z wprowadzonych transgenów). Wyniki jednoznacznie wskazały, iż wykreowane warunki hipoksji nie miały negatywnego wpływu na hodowane mioblasty, zarówno modyfikowane jak i natywne. Rozpatrując poszczególne właściwości biologiczne mioblastów w kontekście hodowli w stężeniu 3% O₂ warto zauważyć, że proliferacja komórek nie zmniejszała się w odpowiedzi na obniżone stężenie tlenu, apoptoza wśród komórek utrzymana była na niskim poziomie, w mioblastach natywnych poniżej 1%, zdolność do różnicowania w miotuby nie została zaburzona. Po modyfikacji w populacji komórek z nadekspresją genu *PIGF* nieznacznie obniżał się potencjał proliferacyjny, odsetek komórek apoptotycznych utrzymywał się podobnym poziomie jak w przypadku komórek natywnych, potencjał do różnicowania nie zmieniał się. Mioblasty charakteryzujące się ekspresją konstrukcji *FGF-4/VEGF* nie wykazywały zmian w proliferacji w stosunku do komórek natywnych, poziom apoptozy podniósł się powyżej 1%, jednak nie zauważono zmian w zdolności do różnicowania. Supernatanty zebrane z nad modyfikowanych komórek wzbudziły angiogenezę, równie wydajnie w każdym z testowanych stężeń tlenu.

Badania o charakterze przedklinicznym na modelu mysiego serca pozawałowego pozwoliły na poznanie dynamiki zmian w ekspresji genów proangiogennych (*Vegf-a, b, c, d* czy *Plgf* i genów dla ich receptorów *Flt-1* i *Kdr*) po 24 h, 7 dniach oraz 28 dniach od zaindukowanego zawału. Geny *Hif-1α*, *Vegf-a*, *Plgf* i *Flt-1* wykazywały podobny wzór ekspresji na przestrzeni czasu, przy czym największą ekspresję w odpowiedzi na stymulację czynnikiem transkrypcyjnym *Hif-1α* w ostrym stanie niedokrwiennym (24 h od indukcji zawału) wykazał gen dla czynnika proangiogennego *Plgf*. Jak wykazano spadek każdego z genów (*Hif-1α*, *Vegf-a*, *Vegf-b*, *Vegf-c* oraz genów dla dwóch receptorów- *Flt-1* oraz *Kdr*) przypadał na 7 dzień. Następnie ekspresja wymienionych genów wzrastała w 28 dniu po indukcji zawału, aby prawdopodobnie wspólnie skompensować niewydolność serca za pomocą wywołania neoangiogenezy.

Badania na mioblastach modyfikowanych genetycznie oraz ustalenie kinetyki molekularnych zmian w sercu pomogły w dokonaniu wyboru odpowiedniego podejścia regeneracyjnego, poprzez włączenie terapii komórkowej z użyciem genetycznie modyfikowanych komórek za pomocą czynnika PIGF.

Mioblasty modyfikowane genetycznie przez wprowadzenie genu *PIGF* w wektorze plazmidowym podano w obszar blizny pozawałowej, w modelu mysim. Długoterminowa obserwacja, trwająca 2 miesiące od podania komórek, wykazała poprawę parametrów hemodynamicznych lewej komory (około 40% w stosunku do kontroli typu „*sham*”) oraz wzmocnienie ściennej ściany po zawale. Badania molekularne próbek tkankowych izolowanych z serc pozwoliły na określenie profilu molekularnego genów proangiogennych. Zaobserwowano wzrost ekspresji genów proangiogennych (*Vegf-a, b, c, d, Flt-1, Kdr*) w sercach, które poddano terapii z użyciem genetycznie zmodyfikowanych mioblastów w porównaniu do serc którym podano roztwór soli fizjologicznej (kontrola typu „*sham*”).

Poszukiwanie nowych form terapii pozawałowego miokardium jest kluczowym aspektem medycyny regeneracyjnej. Schorzenia takie jak zawał serca często leczone są za pomocą interwencji chirurgicznych oraz środków farmakologicznych. Tego typu terapie nie są odpowiednie dla wszystkich pacjentów, dlatego też podejście medyczne musi zostać często zastąpione podejściem biologicznym, a podłoże choroby zbadane molekularnie. Dopiero szerokie spektrum badań molekularnych może doprowadzić do znalezienia odpowiedniej terapii dla danego przypadku. Badania prowadzone w ramach niniejszej dysertacji mogą przyczynić się do rozszerzenia wiedzy dotyczącej terapii pozawałowego serca zarówno na

poziomie molekularnym jak i biologicznym, tak aby dostosować podejście terapeutyczne z użyciem właściwych czynników oraz w odpowiednim punkcie czasowym.