

STRESZCZENIE

Choroba niedokrwienność serca stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny i jest celem medycyny regeneracyjnej. Liczebność progenitorowych komórek sercowych w organizmie dorosłego człowieka jest niewystarczająca do regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego, zaś komórki macierzyste z takich źródeł jak szpik kostny cechuje zbyt mała plastyczność. Przełomem w badaniach może okazać się technologia indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych, która umożliwia różnicowanie autologicznych komórek w różnych kierunkach, w tym do kardiomiocytów. Otrzymane tą drogą mięśniowe komórki serca posiadają jednak fenotyp płodowy, co skłania do dalszych prac nad poprawą ich strukturalnych i funkcjonalnych właściwości.

Jednym z czynników wspomagających dojrzewanie komórek mięśniowych jest długość prowadzenia hodowli *in vitro*. W niniejszej pracy wykazano na podstawie dwóch punktów czasowych wczesnego etapu różnicowania – 20 i 40 dni hodowli *in vitro* – proces nabywania przez kardiomiocyty cech komórek dorosłych. Badania podzielone zostały na dwa główne etapy.

W pierwszym dokonano reprogramowania genetycznego mioblastów mięśni szkieletowych i uzyskano z użyciem konstrukcji genetycznej oraz wektora opartego na wirusie Sendai indukowaną pluripotentną linię komórkową 194, która przeszła pozytywną weryfikację pluripotencji:

- a) wykryto w niej podwyższoną ekspresję markerów jądrowych *OCT4*, *SOX2*, *c-MYC* w porównaniu z wyjściowymi komórkami mięśniowymi;
- b) potwierdzono obecność markerowych białek pluripotentnych, zarówno powierzchniowych TRA 1-60, TRA 1-81 i SSEA4, jak i jądrowych *OCT4* i *SOX2*;
- c) uzyskano prawidłowy kariotyp;
- d) wykonano test spontanicznego różnicowania *in vitro* generując kule zarodkowe i identyfikując w nich pochodne trzech listków zarodkowych: białka AFP, SMA, TUJ1;
- e) uzyskano potwierdzenie potencjału pluripotencji *in vivo* w wyniku podania komórek iPS linii 194 do myszy i analizy histologicznej utworzonego potworniaka.

W drugim etapie zweryfikowana linia komórkowa iPS 194 została poddana pomyślnemu różnicowaniu w komórki mięśniowe serca za pomocą protokołu z suplementacją białka BMP4 oraz związkami modulującymi szlak WNT – CHIR99021 i IWR-1 oraz za pomocą zestawu mediów różnicujących, *PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit*. Większa wydajność i powtarzalność wyników zdecydowały o wykorzystaniu drugiej metody różnicowania.

Różnicujące się kardialne komórki mięśniowe w 40. dniu hodowli *in vitro* wykazują większy stopień podobieństwa do dojrzałych komórek serca niż w dniu 20., przez co ten punkt czasowy może być lepszym wyborem do wykorzystania w badaniach. Wykazano:

- a) utrzymywanie się kardiospecyficznym markerów białkowych: NKX2.5, TNNT2, koneksyny 43 i α -MHC;
- b) bardziej zaznaczoną hipertrofię w dniu 40, o czym świadczył istotny statystycznie wzrost obwodu i powierzchni komórkowej oraz wyższy udział komórek dwujądrazastych;
- c) większe 40-dniowe kardiomiocyty posiadają w obrębie komórek równomiernie rozmieszczoną regularną sieć mitochondrialną w której aktywne organelle o wytworzonym potencjale błonowym ulegają wydłużeniu i wydajniej mogą zaspokajać zapotrzebowanie energetyczne. W 20-dniowym punkcie czasowym mniej liczne mitochondria rozmieszczone były bliżej jąder i rzadziej obserwowano ich prawidłowe funkcjonowanie;
- d) kardiomiocyty w 40 dniu różnicowania miały bardziej uporządkowany i lepiej wykształcony aparat kurczliwy, co wykazano w oparciu o barwienie sarkomerów α -aktynią (linie Z);
- e) w dłużej hodowli *in vitro* 40-dniowych kardiomiocytach doszło do istotnej statystycznie zmiany w ekspresji genów: wzrostu poziomu *CX43* i β -*MHC* przy zmniejszeniu α -*MHC* (wskazująca na dojrzewanie zamiana izoformy szybkiej α na wolną β ciężkich łańcuchów miozyny). Natomiast ekspresja genów *TNNI3*, *KCNJ2* i *SERCA 2A* pozostała na porównywalnym poziomie od punktu czasowego 20 dni;
- f) uzyskane wyniki sugerują również, że 40-dniowe kardiomiocyty uzyskane w hodowli *in vitro* charakteryzował bardziej wydajny proces obrotu wewnątrzkomórkowym wapniem w czasie skurczu. Użycie sondy wapniowej FURA-2 pozwoliło zebrać dowody na większą pulę magazynowanego w SR wapnia oraz na szybszy proces uwalniania i wychwytu tego pierwiastka w 40 dniu różnicowania. Niemniej nadal mechanizm ten odbiega od pełnej sprawności dojrzałych komórek serca;
- g) dłuższy czas hodowli *in vitro* kardiomiocytów pozwolił na dostrzeżenie w 40 dniu większej częstotliwości skurczów w odpowiedzi na związek pobudzający receptory beta-adrenergiczne.

Uzyskane w dysertacji wyniki potwierdzają badania innych grup wskazujące na płodowy fenotyp kardiomiocytów uzyskiwanych *in vitro* z komórek iPS. Objawy początku ich dojrzewania są jednak już widoczne w trakcie nieznacznego wydłużenia hodowli *in vitro* do 40 dni. Zestaw proponowanych testów może być podstawą do dalszych badań porównawczych z innymi liniami komórkowymi iPS i/lub wykorzystaniem innych czynników pobudzających dojrzewanie komórek. Otrzymane mięśniowe komórki serca po 40 dniach hodowli mogą być wykorzystywane jako układ modelowy chorób serca, do przesiewu nowych leków, w badaniach podstawowych, analizach kardiotoksyczności oraz w ewentualnej terapii w przyszłych próbach klinicznych.