

Agnieszka Zimna

Wpływ hipoksji sercowej
na ekspresję genów proangiogennych
w pozawałowym sercu myszy
oraz na właściwości biologiczne
mioblastów ludzkich dla potencjalnych
terapii proregeneracyjnych

M O N O G R A F I A

Copyright © Agnieszka Zimna
Copyright © Instytut Genetyki Człowieka PAN
Poznań 2018

Recenzenci naukowi – Prof. dr hab. n. med. Maciej Kurpisz
Prof. dr hab. med. Ewa Straburzyńska-Migaj
Prof. dr hab. n. med. Andrzej Beręsewicz
Projekt okładki – Mirka Korbańska
Zdjęcia i ilustracje pochodzą ze zbiorów autorki

978-83-950393-1-7

Wydawca
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
www.igcz.poznan.pl

Agnieszka Zimna

Wpływ hipoksji sercowej na ekspresję genów proangiogennych w pozawałowym sercu myszy oraz na właściwości biologiczne mioblastów ludzkich dla potencjalnych terapii proregeneracyjnych

SPIS RYCIN.....	8
SPIS TABEL.....	10
SPIS SKRÓTÓW.....	11
I. WSTĘP.....	15
1. Mechanizmy tworzenia naczyń krwionośnych.....	15
2. Hipoksja.....	19
2.1. Homeostaza tlenowa.....	19
2.2. Czynniki indukowane hipoksją (HIF-1).....	19
2.3. Aktywność HIF-1 i najważniejsze geny docelowe.....	23
3. Wpływ czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1) na proces tworzenia naczyń w stanie fizjologicznym.....	26
3.1. Waskulogeneza.....	26
3.2. Angiogeneza fizjologiczna.....	27
4. Komórki macierzyste.....	30
4.1. Komórki macierzyste mięśni szkieletowych.....	31
4.2. Badania nad mioblastami w aspekcie regeneracji serca.....	32
4.3. Terapie pozawałowego mięśnia sercowego z czynnikami proangiogennymi.....	34
4.3.1. PlGF- łożyskowy czynnik wzrostu.....	34
4.3.2. VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego.....	38
4.3.3. FGF - czynnik wzrostu fibroblastów.....	41
4.4. HIF-1 jako narzędzie terapeutyczne w chorobach niedokrwiennych.....	43
II CEL PRACY.....	47
III. MATERIAŁY I METODY.....	48
1. MATERIAŁY.....	48
1.1. Materiał biologiczny.....	48
1.2. Zwierzęta laboratoryjne.....	48
1.3. Plazmidy.....	49
1.4. Odczynniki.....	51
1.5. Bufory.....	55
1.6. Media hodowlane.....	56
1.7. Aparatura.....	57
2. METODY.....	59
2.1. Izolacja oraz podstawowe metody charakterystyki mioblastów ludzkich.....	59
2.1.1 Cytometryczne oznaczenie czystości populacji komórek miogennych.....	60

2.1.2. Immunofluorescencja.....	60
2.1.3. Test funkcjonalny - różnicowanie mioblastów w miotuby.....	60
2.2. Hodowla komórkowa <i>in vitro</i>	61
2.3. Optymalizacja warunków hipoksji	61
2.3.1. Ekstrakcja RNA z komórek.....	63
2.3.2. Pozyskanie frakcji mRNA.....	64
2.3.3. Odwrotna transkrypcja i walidacja otrzymanego cDNA.....	64
2.3.4. Pomiar ekspresji genów - PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)	66
2.3.4.1. Przygotowanie starterów niezbędnych do przeprowadzenia reakcji qPCR.....	66
2.3.4.2. Przygotowanie krzywej standardowej.....	66
2.3.4.3. Przeprowadzanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym	67
2.4. Modyfikacja genetyczna ludzkich mioblastów z zawiesin pierwotnych.....	68
2.4.1. Przygotowanie konstrukcji genowych do transfekcji mioblastów ludzkich	68
2.4.2. Przygotowanie plazmidów do transfekcji- namnażanie na dużą skalę.....	69
2.4.3. Elektroporacja mioblastów.....	71
2.5. Charakterystyka mioblastów ludzkich i porównanie ich właściwości w różnych warunkach tlenowych	72
2.5.1 Analiza na poziomie molekularnym.....	73
2.5.2. Ocena ekspresji i funkcjonalności białka powstałego w wyniku nadekspresji transgenów.....	73
2.5.2.1. Oznaczanie stężenia białek FGF-4 oraz VEGF-A	74
2.5.2.2. Oznaczanie stężenia białka PIGF	75
2.5.2.3. Test funkcjonalny <i>in vitro</i>	75
2.5.3. Charakterystyka biologiczna mioblastów.....	76
2.5.3.1. Występowanie apoptozy w badanych populacjach mioblastów	77
2.5.3.2. Ocena proliferacji komórek <i>in vitro</i>	77
2.5.3.3. Badanie zdolności mioblastów do różnicowania w miotuby.....	78
2.6. Badania na zwierzętach	78
2.6.1. Wywołanie zawału serca u myszy	78
2.6.2. Badanie echokardiograficzne.....	79
2.6.3. Intrakardialna transplantacja mioblastów ludzkich w modelu mysim.....	79
2.6.4 Terminacja zwierząt i pozyskanie organu/tkanki	80
2.6.5. Ustalenie kinetyki molekularnych zmian w ekspresji genów proangiogennych badanych w wybranych interwałach czasowych od indukcji zawału serca u myszy.....	80
2.6.6. Badania przedkliniczne, z użyciem mioblastów modyfikowanych genem <i>PIGF</i> , na modelu mysiego serca pozawałowego.....	82

2.8. Analiza statystyczna	84
VI. WYNIKI	85
1. Izolacja oraz charakterystyka biologiczna mioblastów ludzkich.....	85
2. Optymalizacja warunków hodowli <i>in vitro</i> . Ustalenie warunków hipoksji w hodowli <i>in vitro</i> odpowiadających warunkom tlenowym w sercu po zawale	87
2.1. Ekspresja genu <i>HIF-1α</i> w zależności od stężenia tlenu i długości hodowli - badania <i>in vitro</i>	87
2.2. Ekspresja genu <i>HIF-1α</i> w mioblastach transplantowanych do pozawałowego serca myszy.	91
2.3. Wyznaczanie warunków hipoksji oraz normoksji dla komórek macierzystych pochodzących z mięśni szkieletowych w hodowli <i>in vitro</i>	94
3. Modyfikacja genetyczna mioblastów ludzkich za pomocą genów <i>FGF-4/VEGF</i> oraz <i>PIGF</i>	95
3.1 Przygotowanie konstrukcji genowych.....	95
3.2. Elektroporacja mioblastów oraz określenie wydajności procesu.	96
4. Charakterystyka zmodyfikowanych genetycznie mioblastów ludzkich. Porównanie ich właściwości w różnych warunkach tlenowych.....	98
4.1. Ocena ekspresji wybranych genów	98
4.1.1. Ocena jakości wyizolowanego RNA.....	98
4.1.2. Przygotowanie krzywych standardowych oraz określenie temperatur topnienia produktów.....	99
4.1.2. Ocena ekspresji genu <i>HIF-1α</i> w badanych populacjach komórkowych	100
4.1.3. Ocena ekspresji wprowadzonych transgenów	101
4.1.4 Ocena ekspresji genów miogennych.....	103
4.2. Ocena ekspresji białek proangiogennych	105
4.2.1. Ocena funkcjonalności białka - test formowania kapilar <i>in vitro</i>	107
4.3. Właściwości biologiczne mioblastów	109
4.3.1 Apoptoza.....	109
4.3.2. Proliferacja.....	110
4.3.3. Różnicowanie w miotuby	111
5. Badania w modelu zwierzęcym.....	114
5.1. Ustalenie kinetyki molekularnych zmian w ekspresji genów proangiogennych badanych w wybranych interwałach czasowych od indukcji zawału serca u myszy	114
5.1.2 Analiza ekspresji genów proangiogennych.....	116
5.2. Ocena skuteczności terapii komórkowej z użyciem mioblastów modyfikowanych genem <i>PIGF</i> w modelu mysiego serca pozawałowego.	122
VII. DYSKUSJA.....	129
1. Optymalizacja warunków hipoksji	129

2. Ocena właściwości biologicznych komórek w hipoksji	132
3. Dynamika zmian molekularnych w sercu.....	138
4. Terapia regeneracyjna	141
5. Podsumowanie.....	145
VIII. WNIOSKI	147
IX. STRESZCZENIE.....	149
X. ABSTRACT.....	152
XI. LITERATURA.....	154

SPIS RYCIN

<i>RYCINA 1. Schemat przedstawiający różne rodzaje angiogenezy.....</i>	<i>17</i>
<i>RYCINA 2. Podział migrujących komórek endotelialnych podczas angiogenezy „kiełkującej”</i>	<i>18</i>
<i>RYCINA 3. Budowa i struktura HIF-1/2/3α</i>	<i>21</i>
<i>RYCINA 4. Schemat prezentujący działanie czynnika HIF-1 w zależności od stężenia tlenu.....</i>	<i>23</i>
<i>RYCINA 5. Możliwości terapeutyczne związane ze wzbudzeniem angiogenezy.....</i>	<i>46</i>
<i>RYCINA 6. Plazmidy używane do transfekcji mioblastów ludzkich.....</i>	<i>50</i>
<i>RYCINA 7. Przygotowanie krzywej standardowej do PCR w czasie rzeczywistym.....</i>	<i>67</i>
<i>RYCINA 8. Schemat czasowy hodowli mioblastów ludzkich w różnych warunkach tlenowych uwzględniający modyfikacje</i>	<i>72</i>
<i>RYCINA 9. Schemat czasowy eksperymentu</i>	<i>83</i>
<i>RYCINA 10. Analiza cytometryczna wyizolowanych mioblastów.....</i>	<i>85</i>
<i>RYCINA 11. Barwienie immunofluorescencyjne wyizolowanych mioblastów- desmina.....</i>	<i>86</i>
<i>RYCINA 12. Barwienie immunofluorescencyjne wyizolowanych mioblastów- MHC</i>	<i>86</i>
<i>RYCINA 13. Test na różnicowanie wyizolowanych mioblastów.....</i>	<i>86</i>
<i>RYCINA 14. Analiza elektroforetyczna próbek RNA.....</i>	<i>87</i>
<i>RYCINA 15. Analiza elektroforetyczna produktu PCR.....</i>	<i>88</i>
<i>RYCINA 16. Krzywe topnienia produktów qPCR wraz z temperaturami topnienia i wydajnością....</i>	<i>89</i>
<i>RYCINA 17. Ekspresja genu HIF-1α w mioblastach (mio180) hodowanych 24h oraz 7 dni w zmienionych warunkach tlenowych</i>	<i>90</i>
<i>RYCINA 18. Przykładowa analiza elektroforetyczna uzyskanego materiału genetycznego</i>	<i>92</i>
<i>RYCINA 19. Wykazanie specyficzności użytych starterów.....</i>	<i>92</i>
<i>RYCINA 20. Ekspresja ludzkiego markera HIF-1α w mioblastach podanych do serca mysiego</i>	<i>93</i>
<i>RYCINA 21. Optymalizacja hipoksji.....</i>	<i>94</i>
<i>RYCINA 22. Wyniki hydrolizy DNA plazmidowego</i>	<i>96</i>
<i>RYCINA 23. Analiza cytometryczna populacji mioblastów transfekowanych plazmidem pEGFP</i>	<i>97</i>
<i>RYCINA 24. Analiza elektroforetyczna próbek RNA pochodzących z mioblastów modyfikowanych genetycznie jak i natywnych hodowanych w różnych warunkach tlenowych.....</i>	<i>98</i>
<i>RYCINA 25. Analiza elektroforetyczna produktu PCR.....</i>	<i>99</i>
<i>RYCINA 26. Krzywe topnienia produktów qPCR z temperaturami topnienia i wydajnością.....</i>	<i>100</i>
<i>RYCINA 27. Ocena ekspresji genu HIF-1α w mioblastach ludzkich.....</i>	<i>101</i>
<i>RYCINA 28. Ocena ekspresji wprowadzonych transgenów w mioblastach ludzkich.....</i>	<i>102</i>
<i>RYCINA 29. Krzywe topnienia produktów qPCR odpowiadające ludzkim genom miogennym z temperaturami topnienia i wydajnością</i>	<i>103</i>
<i>RYCINA 30. Ekspresja genów miogennych w komórkach macierzystych mięśni szkieletowych w różnych warunkach stężenia tlenu: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz warunków standardowych (21% O₂).....</i>	<i>104</i>
<i>RYCINA 31. Ekspresja białek w supernatantach zebranych z komórek hodowanych w różnych warunkach tlenowych- hodowanych w różnych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz warunków standardowych (21% O₂).....</i>	<i>106</i>
<i>RYCINA 32. Test proangiogeny. Kontrola eksperymentu.....</i>	<i>107</i>
<i>RYCINA 33. Test proangiogeny. Potwierdzenie funkcjonalności białek FGF-4/VEGF-A.</i>	<i>108</i>
<i>RYCINA 34. Test proangiogeny. Potwierdzenie funkcjonalności białka PlGF</i>	<i>108</i>

<i>RYCINA 35. Analiza cytometryczna prezentująca ilość komórek ulegających apoptozie podczas hodowli w zmienionych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz warunków standardowych (21% O₂).....</i>	<i>109</i>
<i>RYCINA 36. Potencjał proliferacyjny mioblastów zarówno modyfikowanych genetycznie, jak i natywnych hodowanych w różnych warunkach tlenowych. hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz warunków standardowych (21% O₂).....</i>	<i>110</i>
<i>RYCINA 37. Różnicowanie komórek populacji komórek 135.....</i>	<i>112</i>
<i>RYCINA 38. Różnicowanie komórek populacji komórek 191.....</i>	<i>113</i>
<i>RYCINA 39. Zdjęcia serc mysich w różnych punktach czasowych po indukcji zawału serca, oraz serca kontrolne.....</i>	<i>115</i>
<i>RYCINA 40. Analiza histologiczna serc myszy po zawale.....</i>	<i>116</i>
<i>RYCINA 41. Przykładowy rozdział RNA na 1,5% żelu agarozowym.....</i>	<i>117</i>
<i>RYCINA 42. Przykładowy rozdział elektroforetyczny genu β-act, z matrycy cDNA, uzyskanego z serc mysich.....</i>	<i>117</i>
<i>RYCINA 43. Krzywe topnienia produktów qPCR z temperaturami topnienia i wydajnością.....</i>	<i>119</i>
<i>RYCINA 44. Ekspresja genów proangiogennych w sercach myszy.....</i>	<i>120</i>
<i>RYCINA 45. Analiza zależności ekspresji badanych genów w odstępach czasowych jaki upłynął od indukcji zawału serca u myszy.....</i>	<i>121</i>
<i>RYCINA 46. Badanie echokardiograficzne.....</i>	<i>123</i>
<i>RYCINA 47. Optymalizacja barwienia immunofluorescencyjnego mającego na celu uwidocznienie komórek ludzkich w materiale mysim.....</i>	<i>124</i>
<i>RYCINA 48. Barwienie immunofluorescencyjne mające na celu uwidocznienie komórek ludzkich w sercu mysim.....</i>	<i>125</i>
<i>RYCINA 49. Porównanie obrazów histologicznych skrawków pochodzących z serc myszy.....</i>	<i>126</i>
<i>RYCINA 50. Przykładowa analiza elektroforetyczna uzyskanego materiału genetycznego.....</i>	<i>126</i>
<i>RYCINA 51. Profil ekspresji genów proangiogennych w sercach myszy poddanych różnym typom interwencji.....</i>	<i>127</i>

SPIS TABEL

TABELA 1. Odczynniki do hodowli komórek eukariotycznych.....	51
TABELA 2. Odczynniki do transfekcji.....	51
TABELA 3. Odczynniki do przechowywania zebranych próbek biologicznych.....	51
TABELA 4. Odczynniki do barwień immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych.....	51
TABELA 5. Przeciwciała.....	52
TABELA 6. Odczynniki do utrwalania materiału.....	52
TABELA 7. Odczynniki do izolacji RNA, mRNA oraz odwrotnej transkrypcji.....	52
TABELA 8. Odczynniki do reakcji PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym.....	53
TABELA 9. Sekwencje starterów używanych w reakcjach PCR i PCR w czasie rzeczywistym.....	53
TABELA 10. Odczynniki do elektroforezy oraz izolacji DNA z żelu agarozowego.....	54
TABELA 11. Odczynniki używane do cytometrii przepływowej.....	54
TABELA 12. Odczynniki do hodowli bakteryjnej, transformacji oraz ligacji.....	55
TABELA 13. Odczynniki do analizy restrykcyjnej plazmidów.....	55
TABELA 14. Spis używanej aparatury.....	57
TABELA 15. Sps myszy wraz z procedurami, które zostały wykonane w trakcie eksperymentu.....	63
TABELA 16. Mieszanina reakcji odwrotnej transkrypcji.....	65
TABELA 17. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.....	65
TABELA 18. Mieszanina używana do wykonania reakcji reakcji PCR.....	65
TABELA 19. Warunki reakcji PCR.....	65
TABELA 20. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	68
TABELA 21. Spis myszy wraz z procedurami, które zostały wykonane w trakcie eksperymentu.....	82
TABELA 22. Analiza statystyczna dla badanych populacji do Ryc. 23C.....	91

SPIS SKRÓTÓW

SKRÓT	ROZWIĘCIE SKRÓTU	TŁUMACZENIE POLSKIE
2-OG	<i>2-oxoglutarate</i>	2-oksoglutaran
ACL	<i>Anterior cruciate ligament</i>	Więzadło krzyżowe przednie
AMI	<i>Acute myocardial infarction</i>	Ostry zawał mięśnia sercowego
ANG-1	<i>Angiopoietin 1</i>	Angiopoetyna 1
ANG-2	<i>Angiopoietin 2</i>	Angiopoetyna 2
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>	Translokaza jądrowa
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Trifosforan adenozyiny
BAK	<i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i>	Antagonista BCL2/ Zabójca 1
BAX	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>	Regulator apoptozy
BCL-2	<i>BCL2 Apoptosis Regulator</i>	BLC-2 regulator apoptozy
BCL-XL	<i>BCL2 Like 1</i>	Białko BCL2 podobne
BETA ACT	<i>Beta actin</i>	Beta aktyna
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>	Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>	Pętla- helisa-pętla
BID	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>	Agonista domeny BH3
BMDAC	<i>Bone marrow-derived angiogenic cells</i>	Komórki mezenchyalne pochodzące ze szpiku kostnego
BNIP	<i>BCL2 Interacting Protein</i>	Białko wchodzące w interakcje z BCL2
BNP	<i>Natriuretic Peptide B</i>	Peptyd natriuretyczny typu B
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Albumina surowicy bydłej
CBP/p300	<i>CREB-binding protein/E1A binding protein p300</i>	Białko wiążące CREB / białko E1A wiążące p300
NCAM/CD56	<i>Neuronal cell adhesion molecule</i>	Neuronal cell adhesion molecule
CDS	<i>Coding DNA sequence</i>	Sekwencja kodująca
CEE	<i>Chick Embryo Extract</i>	Ekstrakt z zarodków kurczących
CK	<i>Creatine kinase</i>	Kinaza kreatynowa
NR2F2/COUP-TFII	<i>Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2</i>	Podrodzina receptora jądrowego 2 Grupa F Członek 2
Cp	<i>Ceruloplasmin</i>	Ceruloplazmina
Ct	<i>Threshold cycle</i>	Cykl progowy
C-TAD	<i>C-terminal transactivation domain</i>	C- końcowa domena transaktywacyjna
CVD	<i>Cardiovascular diseases</i>	Choroby sercowo-naczyniowe
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>	Chemokiny
CXCL12/ SDF1α	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1/ C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i>	Czynnik pochodzenia zrębowego-1/ Chemokina 12

CXCL8 (IL-8)	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8/ Interleukin 8</i>	Chemokina 8/ Interleukina 8
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>	Dietylopirowęglan
DES	<i>Desmin</i>	Desmina
DFO	<i>Desferoxamine</i>	Chelator jonów żelaza
Dll4	<i>Delta Like Canonical Notch Ligand 4</i>	Ligand 4 kanonicznego szlaku Notch
DMEM	<i>Medium Eagle'a zmodyfikowane przez Dulbecco</i>	Zmodyfikowane Medium Eagle'a wg. Dulbecco
DMOG	<i>Dimethylloxalylglycine</i>	Dimetylooksalioglicyna
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetylosulfotlenek
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Kwas deoksyrybonukleinowy
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	Ditiotreitol
EC	<i>Endothelial cells</i>	Komórki śródbłonkowe
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Kwas wersenowy
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Test immunoenzymatyczny
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>	Endotelialnej syntazy tlenu azotu
EPAS (HIF-1α)	<i>Endothelial PAS protein</i>	Endotelialne białko PAS
EPO	<i>Erythropoietin</i>	Erytropoetyna
ESC	<i>Embryonic stem cells</i>	Komórki embrionalne
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	Bydlęca surowica płodowa
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>	Czynnik wzrostu fibroblastów
FIH-1	<i>Factor inhibiting HIF-1</i>	Czynnik inhibujący HIF-1
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>	Izotiocyanian fluoresceiny
FLT-1 (VEGF-R1)	<i>Fms Related Tyrosine Kinase 1/ Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>	Kinaza tyrozynowa Fms-1/ Receptor 1 czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego
FLT-4 (VEGF-R3)	<i>Fms Related Tyrosine Kinase 3/ Vascular endothelial growth factor receptor 3</i>	Kinaza tyrozynowa Fms-3/ Receptor 3 czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego
FN1	<i>Fibronectin</i>	Fibronektyna
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	Dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	Białko zielonej fluorescencji
GJA1 (CX43)	<i>Gap Junction Protein Alpha 1/ connexin 43</i>	Koneksyna 43
GLUT1 (SLC2A1)	<i>Solute Carrier Family 2 Member 1</i>	Białko transportujące glukozę
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	Roztwór soli Hanksa
HEY	<i>Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1</i>	Czynnik transkrypcyjny rodziny bHLH z motywem YRPW
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>	Czynnik wzrostu hepatocytów

HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor 1</i>	Czynnik indukowany hipoksją 1
HIF-1β/ARNT	<i>Hypoxia inducible factor-1 beta subunit- aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator</i>	Podjednostka beta czynnika indukowanego hipoksją
HIF-1α	<i>Hypoxia inducible factor-1 alpha subunit</i>	Podjednostka alfa czynnika indukowanego hipoksją-1
HIF-2α	<i>Hypoxia inducible factor-2 alpha subunit</i>	Podjednostka alfa czynnika indukowanego hipoksją-2
HIF-3α	<i>Hypoxia inducible factor-3 alpha subunit</i>	Podjednostka alfa czynnika indukowanego hipoksją-3
HO-1	<i>Heme oxygenase</i>	Oksygenaza hemowa-1
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	Fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
HRE	<i>Hypoxia responsible elements</i>	Elementy odpowiedzi na hipoksję
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>	Śródbłonkowe komórki żyły pępowinowej
IPAS (HIF-3α)	<i>Inhibitory PAS</i>	Inhibująca domena PAS
KDR (VEGF-R2)	<i>Kinase Insert Domain Receptor/ Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>	Receptor kinazy tyrozynowej/ Receptor 2 czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>	Dehydrogenazy mleczanowej
LV AREA D	<i>Left ventricle area in diastol</i>	Pole powierzchni przekroju w rozkurczu
LV AREA S	<i>Left ventricle area in systol</i>	Pole powierzchni przekroju w skurczu
LV FAC	<i>Ventricular fractional area of change</i>	Zmiana pola powierzchni przekroju lewej komory
MCT4	<i>Monocarboxylate transporter 4</i>	Transporter kwasów monokarboksylowych
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>	Ciężki łańcuch miozyny
MI	<i>Myocardial infarction</i>	Zawał serca
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>	Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej
MRF	<i>Myogenic regulatory factor</i>	Miogeny czynnik regulatorowy
MRF4	<i>Myogenic enhancer transcription factor 2</i>	Wzmacniacz miogenego czynnika transkrypcyjnego 2
MYF5	<i>Myogenic Factor 5</i>	Czynnik miogeny 5
MYOD	<i>Myogenic Differentiation 1</i>	Miogeny czynnik różnicujący 1
MYOG	<i>Myogenin</i>	Miogenina
ND	<i>Non detectable</i>	Niewykrywalny
NO	<i>Nitric oxide</i>	Tlenek azotu
NOD-SCID	<i>Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency</i>	
NR2F2	<i>Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2</i>	Receptor jądrowy podrodziny 2

NRP	<i>neuropilins</i>	Neuropiliny
NS	<i>Non statistical</i>	Brak istotności statystycznej
N-TAD	<i>N-terminal transactivation domain</i>	C- końcowa domena transaktywacyjna
ODDD	<i>Oxygen dependent degradation domain</i>	Zależna od tlenu domena degradacyjna
ORF	<i>Open reading frame</i>	Otwarta ramka odczytu
PAS	<i>Per-Arnt-Sim</i>	Domena Per-Arnt-Sim
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Buforowany roztwór soli fosforanowych
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PDGF-BB	<i>Platelet-derived growth factor BB</i>	Płytkopochodny czynnik wzrostu BB
PDGF-R	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>	Receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu
PFK1	<i>Phosphofruktokinase-1</i>	Fosfofruktokinaza 1
PHD	<i>Prolyl hydroxylase enzymes</i>	Hydroksylazy prolinowe
PIGF	<i>Placental growth factor</i>	Łożyskowy czynnik wzrostu
REST	<i>Repressor Element 1-Silencing Transcription factor</i>	Element represorowy 1 czynnika transkrypcyjnego wyciszającego ekspresję
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Kwas rybonukleinowy
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Reaktywnych form tlenu
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>	Receptor z rodziny kinaz tyrozynowych
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>	Mysz posiadająca ciężkie złożone niedobory odporności
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Laurylosiarczan sodu
sFLT-1	<i>Soluble Fms Related Tyrosine Kinase 1</i>	Rozpuszczalna wersja kinazy tyrozynowej Fms 1
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>	Czynnik transkrypcyjny wiążący domenę TATA
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>	Szlak kwasów trikarboksylowych
TFR1	<i>Transferrin receptor-1</i>	Receptor transferyny
TPT	<i>Tumor Protein, Translationally-Controlled 1</i>	Translacyjnie kontrolowane białko nowotworowe
TR	<i>Transferrin</i>	Transferyna
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
VHL	<i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>	Białko von Hippel Lindau
WT	<i>Wild type</i>	Typ dziki

I. WSTĘP

1. Mechanizmy tworzenia naczyń krwionośnych

Układ krwionośny jest jednym z pierwszych narządów systemowych kształtujących się w trakcie rozwoju płodowego ssaków [1]. Formowanie naczyń w organizmie zachodzi na drodze waskulogenezy, arteriogenezy i angiogenezy [2]. Podczas embriogenezy, naczynia powstają w procesie zwanym waskulogenezą. Zachodzi ona głównie we wczesnych fazach rozwoju zarodkowego i polega na formowaniu naczyń krwionośnych z komórek macierzystych śródbłonka hemangioblastów, powstających w wyspach krwionośnych woreczka żółtkowego zarodka. Efektem końcowym jest wytworzenie pierwotnego spłotu naczyniowego w trzecim tygodniu rozwoju płodowego [2], [3]. W trakcie rozwoju osobniczego bardzo rzadko dochodzi do tworzenia naczyń krwionośnych na drodze waskulogenezy. Wyjątkiem są pewne stany patologiczne, takie jak: choroby nowotworowe czy niedokrwienne. Arteriogeneza i angiogeneza są procesami zachodzącymi zarówno w życiu płodowym, jak i po urodzeniu. Arteriogenezę zapoczątkowuje czynnik fizyczny, taki jak wzrost napięcia ścian naczynia, podczas gdy angiogeneza zachodzi zazwyczaj w obrębie niedokrwionej tkanki, stymulowana przez hipoksje.

Arteriogeneza, będąca nieco odmiennym procesem formowania naczyń krwionośnych, polega na przekształceniu istniejących już tętniczek kolateralnych w funkcjonalne tętnice. Dzięki temu, stają się one elastycznymi naczyniami i nabywają właściwości wazomotorycznych. Arteriogenezę indukuje wzrost napięcia ścinającego, w wyniku czego dochodzi do aktywacji „uśpionych” komórek śródbłonka, adhezji i migracji monocytów przez ścianę naczynia, które następnie ulegają przekształceniu w makrofagi. Uwalnianie przez okołonaczyniowe makrofagi czynniki wzrostu powodują transformację małych, istniejących już naczyń, w duże przewodzące tętnice, o około 20-krotnie powiększonej średnicy oraz pogrubionej warstwie mięśniowej [4], [5]. Wynikiem arteriogenezy są zatem kolateralne tętnice powstające daleko od niedokrwionego obszaru, a co za tym idzie, proces ten następuje niezależnie od hipoksji oraz stanu niedotlenienia [6].

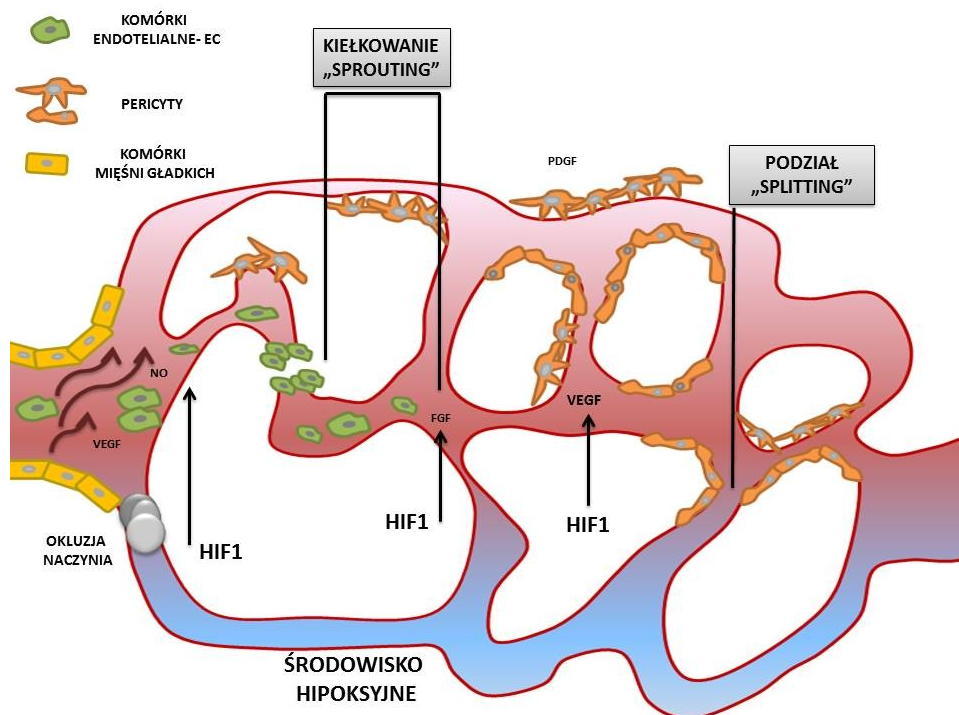
Angiogeneza jest procesem, który prowadzi do utworzenia nowych naczyń włosowatych na bazie już istniejących kapilar poprzez ich wydłużanie lub przebudowę. Najważniejszymi cytokinami, biorącymi udział w procesie angiogenezy, są białka z rodziny czynników wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF ang. *vascular endothelial growth factor*) [2], [7].

Dotychczas wyróżniono 7 izoform: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF oraz VEGF-E (wirusowy homolog VEGF, parapoxvirus Orf) i VEGF-F (obecny w jadzie niektórych węży). Każdy z nich stymuluje odpowiedź komórkową poprzez wiązanie z kinazopodobnym receptorem, którego ekspresję wykazują między innymi komórki śródbłonka. Proces angiogenezy złożony jest z kilku podstawowych faz. Zjawisko to rozpoczyna się od biologicznego sygnału jakim może być hipoksja, niedokrwienie lub uszkodzenie naczynia krwionośnego. Następstwem jednego z wyżej wymienionych stanów jest wzrost ekspresji zarówno czynników, jak i receptorów dla białek o potencjale angiogennym [8], [9]. Dzięki ingerencji tlenu dochodzi do zwiotczenia ścian naczynia, wzbudzenia komórek śródbłonka (EC ang. *endothelial cells*) i zmian morfologicznych w obrębie endotelium, co prowadzi do rozluźnienia interakcji między komórkami - zmniejszenia przylegania. Równocześnie zwiększa się przepuszczalność naczyń krwionośnych, w odpowiedzi na stymulację czynnikiem VEGF-A. Umożliwia to gromadzenie się białek osocza w przestrzeni pozakomórkowej. Mogą one utworzyć prymitywne rusztowanie dla migrujących komórek śródbłonka [10]. Angiopoetyny 1 oraz 2 (ANG-1, ANG-2 ang. *angiopoietins 1 or 2*) wykazują antagonistyczne działanie względem siebie po połączeniu z receptorem TIE-2 (proangiogenne i antyangiogenne). Biorą one udział zarówno w pierwszych etapach angiogenezy, jak i w końcowej stabilizacji naczynia. ANG1 jest znanym, naturalnym inhibitorem przepuszczalności naczyń, chroni przed wyciekiem plazmy, podczas gdy ANG2 angażuje się w destabilizację naczyń poprzez osłabienie przylegania komórek mięśni gładkich i promowanie przepuszczalności. Działanie obydwu angiopoetyn jest ściśle zależne od obecności czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego [3], [11]. Zatem rola ANG2 będzie miała duże znaczenie w początkowych stadiach angiogenezy, ale tylko w obecności VEGF. Natomiast w momencie, gdy czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego nie jest obecny, angiopoetyna druga może stymulować regresję naczyń poprzez indukcję apoptozy komórek śródbłonka. Metaloproteinazy (MMP ang. *matrix metalloproteinases*) wzmacniają angiogenezę poprzez degradację składników błony podstawnej oraz usuwanie macierz pozakomórkowej, ułatwiając w ten sposób migrację komórek śródbłonka [12]. Synergiczne działanie wymienionych białek umożliwia proliferującym komórkom śródbłonka przemieszczanie się do odległych miejsc, a następnie uformowanie naczynia [7], [13]. Integryny $\alpha\beta$ promują migrację i adhezję komórek śródbłonka, podczas gdy kadheryny zwiększają przeżywalność, a także sprzyjają adhezji komórek [14]–[16]. Po uformowaniu naczyń, pericyty i mięśnie gładkie otaczają nowo powstałe naczynia włosowate, stabilizując ściany i zapobiegając przeciekaniu. Inne czynniki, takie jak ANG-1, PDGF-BB

(płytkopochodny czynnik wzrostu BB ang. *platelet-derived growth factor*) i PDGFR (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu ang. *platelet-derived growth factor receptor*) biorą udział w dojrzewaniu naczyń krwionośnych [3], [17]. Dalsze rozszerzenie średnicy naczynia związane jest z arteriogenezą.

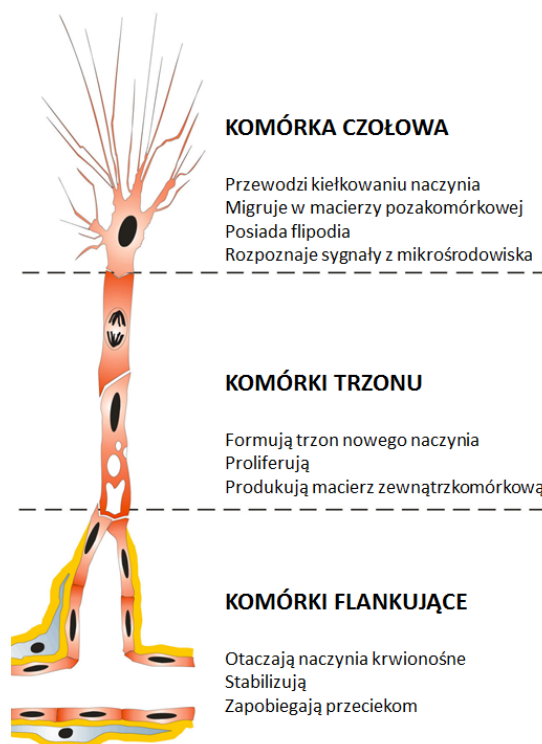
Opisano dwa podstawowe mechanizmy, które odpowiadają za tworzenie naczyń krwionośnych w przedstawionym procesie angiogenezy:

- Kiełkowanie (ang. *sprouting angiogenesis*) - polega na formowaniu się struktur tubularnych z komórek śródbłonkowych (ang. *endothelial sprouts*), których wydłużanie prowadzi do powstawania zamkniętych pętli i sieci kapilarnych. Jest to proces najczęściej występujący w stanach hipoksji i jednocześnie najlepiej opisywany w literaturze
- Podział (ang. *splitting*) - „naczynia macierzyste” w wyniku nacisku dzieli się poprzez powstawanie wewnątrznaczyniowych przegród śródbłonkowych (ang. *intussusception, splitting angiogenesis*) [18].



RYCINA 1. Schemat przedstawiający różne rodzaje angiogenezy: Angiogenezę zachodzącą w odpowiedzi na sygnał hipoksyjny (kiełkującą) oraz angiogenezę odbywającą się poprzez podział naczynia, która jest wymuszona czynnikami fizycznymi. Skrót: HIF-1 - czynnik indukowany hipoksją; VEGF - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego; FGF - czynnik wzrostu fibroblastów; NO - tlenek azotu.[Opracowanie własne].

Formowanie światła nowej kapilary przez komórki endotelialne podczas angiogenezy „kielkującej” jest procesem ściśle kontrolowanym. Kiedy w odpowiedzi na czynniki biologiczne dochodzi do migracji komórek śródbłonka, muszą one zapobiec masowemu i niekontrolowanemu ruchowi. W tym celu otrzymują one specyficzne role. Pierwsza komórka o roli przewodnika, tak zwana komórka czołowa (ang. *tip cell*), dzięki filopodium „rozpoznaje” gradient stężenia czynników proangiogennych wydzielanych przez komórki. W odpowiedzi na czynnik VEGF następuje aktywacja receptora VEGF-R2 (KDR), co z kolei kaskadowo uruchamia ekspresję białka Dll4 w komórce czołowej. Jest to sygnał dla podążających za nią proliferujących komórek trzonowych (ang. *stalk cells*), aby uruchomiły kaskadę sygnałową NOTCH. Powoduje to spadek ekspresji receptora VEGF-R2 wobec wzrostu ekspresji receptora VEGF-R1 (FLT-1). Stanowi to bodziec dla komórek trzonu do aktywnego budowania naczynia oraz poszerzania jego średnicy. Komórki te, w odpowiednim momencie aktywują ekspresję genu *JAGGED1*, który jest antagonistą genu *Dll4*, wyłączając w ten sposób ścieżkę sygnałową NOTCH i dając sygnał komórce czołowej do dalszego rozgałęziania powstającego naczynia. Proces ten zakończy się kiedy naczynie zostanie uformowane w sposób funkcjonalny i dojdzie do przywrócenia homeostazy tlenowej w tkance [13], [19], [20].



RYCINA 2. Podział migrujących komórek endotelialnych podczas angiogenezy „kielkującej”.

[Opracowanie własne].

Podsumowując, angiogeneza jest wieloetapowym procesem, który wymaga zaangażowania bodźców fizycznych oraz sygnałów biologicznych, niezależnie od tego, czy jest to działanie fizjologiczne czy patologiczne. Czynniki proangiogenne są aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenie naczyń krwionośnych, zawał lub spadek przepływu krwi, prowadząc do zmniejszenia dopływu tlenu i zaburzenia homeostazy tlenowej w tkankach, czego następstwem jest hipoksja [7].

2. Hipoksja

2.1. Homeostaza tlenowa

Stały dopływ tlenu na odpowiednim poziomie jest niezbędny do właściwego funkcjonowania tkanek, rozwoju organizmu i utrzymania homeostazy. Dlatego też sieć naczyń w obrębie układu krążenia odgrywa kluczową rolę w dostarczaniu cząstek tlenu (O_2) oraz składników odżywczych w organizmie [21]. Co ważne, pierwszym fizjologicznym układem systemowym, który kształtuje się w trakcie rozwoju embrionalnego ssaków, jest właśnie układ naczyniowo-sercowy. Niezmiernie istotnym procesem biologicznym jest uregulowanie homeostazy O_2 w taki sposób, aby stężenie dostarczanego tlenu odpowiadało potrzebom generowanym przez tkanki. Warto zaznaczyć, iż równowaga gospodarki tlenowej może zostać zaburzona - przez szybkie podziały komórkowe np. podczas rozwoju zarodkowego lub przez wzrost guza; dysfunkcję naczyniową spowodowaną przez okluzję lub pęknięcie naczynia [22]. Należy nadmienić, iż, w zależności od typu tkanki, fizjologiczne stężenie O_2 (zwane normoksją), może znacznie różnić się od stężenia tlenu obecnego w powietrzu. Dla przykładu - w krwi tętniczej stężenie tlenu wynosi 14%; w mięśniu sercowym to 10%; a mięśniu szkieletowym - 5%. Z kolei w szpiku kostnym, grasicy i tkance chrzęstnej stężenie O_2 może być równe bądź niższe niż 1% [23], [24]. Stan, w którym poziom O_2 spada poniżej poziomu fizjologicznego (charakterystycznego dla poszczególnych tkanek), nazywa się hipoksją [1].

2.2. Czynniki indukowane hipoksją (HIF-1)

Dostosowanie do warunków obniżonego stężenia tlenu (hipoksji) w komórkach i tkankach wymaga aktywacji genów, biorących udział w procesach takich jak, między innymi, angiogeneza, proliferacja/przeżywalność komórek oraz metabolizm glukozy czy żelaza. W komórkach eukariotycznych, głównym mediatorem odpowiedzi na hipoksję, a zarazem regulatorem homeostazy O_2 , jest czynnik indukowany hipoksją - HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor-1*) [25]. Jego odkrycie związane było z regulacją genu erytropoetyny w stanach ograniczonego utlenowania we krwi - powiązano wzrost ekspresji tego genu w

odpowiedzi na spadek stężenia tlenu [26], [27]. Dalsze badania potwierdziły jego kluczową rolę w pierwotnej regulacji transkrypcyjnej, jako reakcję na stres wywołany hipoksją.

Czynnik transkrypcyjny HIF-1 złożony jest z dwóch podjednostek - α oraz β (znanej także pod nazwą ARNT- ang. *aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator*). Podjednostki te należą do rodziny białek posiadających w swej strukturze domenę podstawową helisa-pętla-helisa (bHLH ang. *basic helix-loop-helix*) raz domenę PAS - Per-Arnt-Sim (nazwa domeny wywodzi się od trzech głównych białek, w których została wykryta - PER - *period circadian protein*; ARNT - *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein*; SIM - *single-minded protein*) [28], [29]. Obydwie domeny zlokalizowane są w N-końcowej części białka i odpowiedzialne są za heterodimeryzację obydwu podjednostek między sobą [30]. Dodatkowo, w dimerze HIF-1 α /ARNT, domena bHLH ma zasadnicze znaczenie dla wiązania DNA z elementami odpowiedzi na hipoksję (HRE ang. *hypoxia regulatory elements*), znajdującymi się w promotorach lub wzmacniaczach transkrypcji (ang. *enhancer*) genów docelowych. Cechą charakterystyczną elementów HRE jest jedna lub kilka ułożonych tandemowo sekwencji 5'-RCGTG-3' (R-puryna; A lub G) [31]. W pobliżu końca karboksylowego białka HIF-1 zlokalizowane są domeny transaktywacyjne: N-TAD i C-TAD (ang. *transactivation domain*), przy czym białko HIF-1 β posiada tylko jedną domenę TAD [32]. Domeny te pośredniczą w interakcji zdimeryzowanego czynnika transkrypcyjnego HIF-1 z koaktywatorami CBP/p300 (ang. *CREB-binding protein/E1A binding protein p300*) [33]–[35]. Wówczas do kompleksu HIF mogą przyłączyć się inne czynniki transkrypcyjne. W podjednostce HIF-1 α , domena N-TAD sąsiaduje bezpośrednio z zależną od tlenu domeną degradacyjną ODDD (ang. *oxygen dependent degradation domain*), która odgrywa kluczową rolę w regulacji stabilności białka [34]. HIF-1 β jest podjednostką występującą w komórce konstytutywnie, niezależnie od stężenia tlenu, natomiast HIF-1 α w stanach normoksji jest przekazywana w sposób ciągły do degradacji na drodze ubiquitynacji [36], [37].



RYCINA 3. Budowa i struktura HIF-1/2/3α. NLS - sygnał lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signal), bHLH-domena podstawowa helisa-pętla-helisa (ang. basic helix-loop-helix), domena PAS -Per-Arnt-Sim, ODDD - zależna od tlenu domena degradacyjna (ang. oxygen dependent degradation domain), NTAD - N-terminalna domena transaktywacyjna, CTAD - C-terminalna domena transaktywacyjna.[Opracowanie własne].

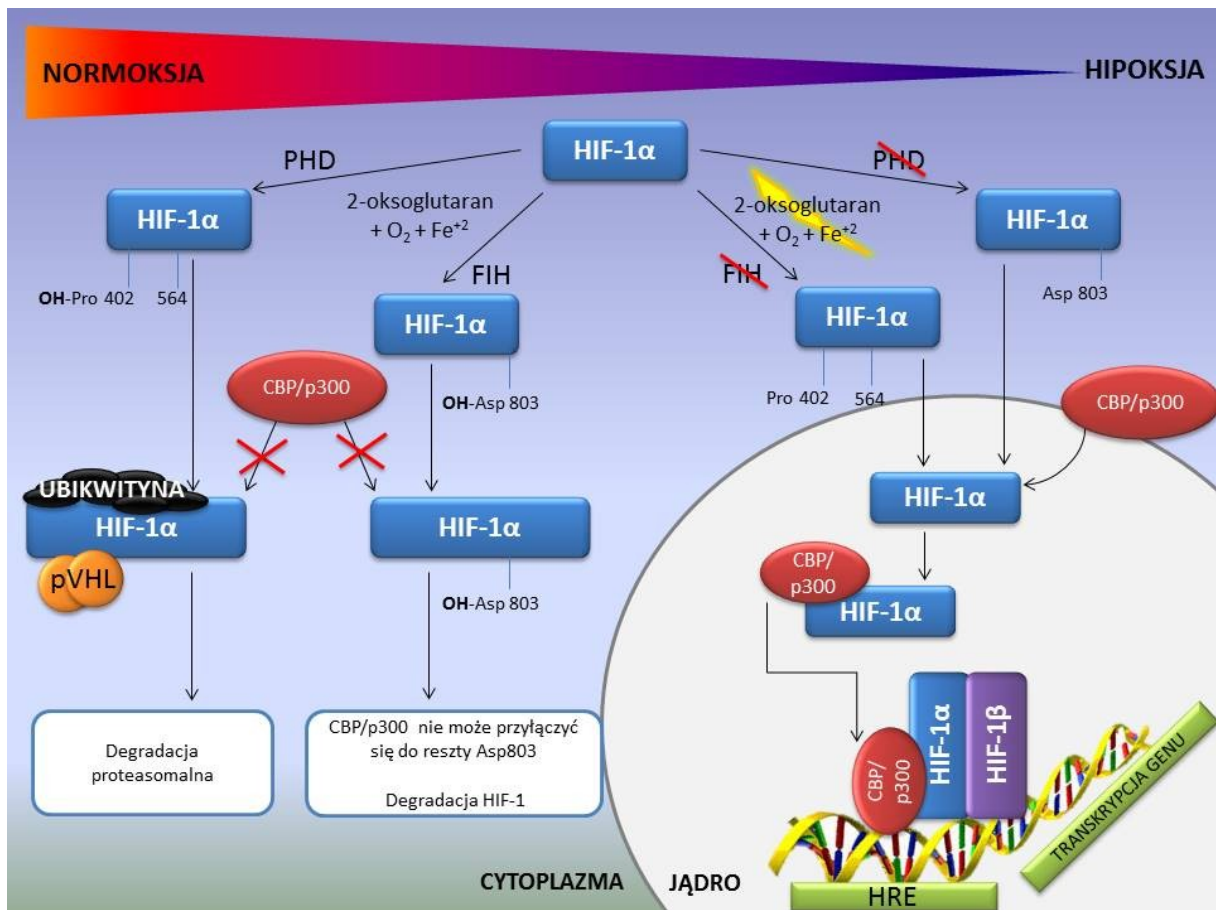
Dotychczas opisano trzy izoformy HIF α . Do tej rodziny należą wcześniej omawiana podjednostka HIF-1 α , a także dwie pozostałe podjednostki - HIF-2 α (nazywanym także endothelialnym białkiem PAS- EPAS ang. *endothelial PAS protein*) oraz HIF-3 α . Zidentyfikowano ekspresję izoformy drugiej w śródbłonku, płucach i tkance chrzęstnej oraz potwierdzono, iż występuje ona w komórkach konstytutywnie. Wykazano również 48% podobieństwa do sekwencji aminokwasowej podjednostki HIF-1 α . Trzecia izoforma HIF-3 α , zwana także inhibitorem PAS (IPAS, ang. *inhibitory PAS*), jest negatywnym regulatorem aktywności czynnika HIF-1, który, dimeryzując z podjednostką HIF-1 β , blokuje zdolność wiązania DNA w elemencie HRE, a co za tym idzie, transkrypcję genu docelowego. Wszystkie izoformy HIF α mają powinowactwo do dimeryzacji z podjednostką ARNT, co umożliwia lub blokuje (jak w przypadku izoformy IPAS) wiązanie do elementów HRE genów [38]–[40].

Podczas dłuższej ekspozycji na warunki hipoksji, czynnik HIF-1 α będzie produkowany tak długo, aż dojdzie do przywrócenia równowagi (homeostazy) tlenowej, czyli kiedy stężenie dostarczonego tlenu osiągnie stan, który odpowiadać będzie generowanemu przez komórkę zapotrzebowaniu [36], [37].

Istnieją dwa mechanizmy pozwalające na degradację podjednostki HIF-1 α w stanach homeostazy tlenowej. W pierwszym z mechanizmów główną rolę odgrywają enzymy zwane hydroksylazami prolinowymi (PHD, ang. *prolyl hydroxylase enzymes*). Aktywność enzymów PHD prowadzi do hydroksylacji reszt prolinowych (Pro402 i Pro564) zlokalizowanych w

obrębie domeny ODDD [41], [42]. Hydroksylacja wspomnianych prolin jest głównym mechanizmem negatywnej regulacji aktywności HIF-1 α i skutkuje przyłączeniem białka VHL (*von Hippel-Lindau*), które jest częścią kompleksu ligazy E3 ubikwitynowej. Jest to sygnał do ubikwitynacji podjednostki HIF-1 α , która następnie przekazywana jest do degradacji proteasomowej [43]–[45]. Drugim mechanizmem negatywnie regulującym działanie HIF-1 α jest hydroksylacja reszty asparaginowej (Asn803), zlokalizowanej w domenie transaktywacyjnej C-TAD. W tym przypadku, kiedy stężenie tlenu odpowiada warunkom normoksji w komórce, asparagina jest hydroksylowana za pomocą czynnika inhibującego HIF-1 (FIH-1 ang. *factor inhibiting HIF-1*). Hydroksylacja powoduje, iż białko koaktywujące CBP/p300 nie może się przyłączyć do podjednostki HIF-1 α , czyniąc tę podjednostkę nieaktywną, a więc przekazywaną do degradacji [46]–[49].

Aktywność obydwu hydroksylaz (PHD oraz FIH-1) jest ściśle zależna od obecności i dostępności tlenu cząsteczkowego O₂, żelaza - Fe⁺² oraz 2-oksoglutaranu- 2-OG. W warunkach hipoksji substraty i kofaktory hydroksylacji przestają być dostępne, co prowadzi do atenuacji hydroksylacji HIF-1 α [50], [51]. Gdy enzymy hydroksylujące nie wykazują aktywności, podjednostka HIF-1 α , zamiast podlegać degradacji, akumuluje się w cytozolu, po czym następuje jej translokacja do jądra, gdzie dochodzi do dimeryzacji z podjednostką HIF-1 β . Dimer HIF-1 α / β łączy się następnie z elementami HRE genów, których regulacja zależy od stężenia tlenu. Zazwyczaj genami docelowymi są geny biorące udział w adaptacji komórek/tkanek do chronicznej lub ostrej hipoksji. Zaliczają się do nich geny biorące udział w adaptacji metabolizmu do warunków beztlenowych, transporcie glukozy, enzymy glikolityczne, geny proangiogenne oraz czynniki hematopoetyczne [52].



RYCINA 4. Schemat prezentujący działanie czynnika HIF-1 w zależności od stężenia tlenu. Dimerizacja podjednostki HIF-1 α z HIF-1 β w warunkach hipoksyjnych powoduje powstanie czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który w jądrze wiąże się z elementami odpowiedzi na hipoksję (HRE) i aktywuje transkrypcję genów zależnych od O₂. Skróty: HIF-1- czynnik indukowany hipoksją- podjednostka α lub β ; PHD- enzymy z grupy hydroksylaz prolinowych; FIH- czynnik inhibujący HIF-1; Pro- prolina (reszty w pozycji 402 oraz 564 podjednostki białka HIF-1 α); Asp- asparagina (reszta w pozycji 803 białka HIF-1 α); CBP/p300- białko kofaktorowe; pVHL- von Hippel-Lindau. [Opracowanie własne].

2.3. Aktywność HIF-1 i najważniejsze geny docelowe

Dotychczas udowodniono, iż HIF-1 reguluje bezpośrednio lub pośrednio ponad 2% genów w komórkach endotelialnych (śródbłonkowych) naczyń krwionośnych [53]. Modulacja odpowiedzi na hipoksję następuje poprzez aktywację transkrypcji genów docelowych za pomocą zdimeryzowanego czynnika HIF-1, złożonego z podjednostek HIF-1 α/β [54], [55].

Jak wspomniano wcześniej, hipoksja reguluje ekspresję genu erytropoetyny (EPO), która jest zaangażowana w proces namnażania i różnicowania erytrocytów. Dowiedziono, iż w warunkach obniżonego stężenia tlenu poziom erytropoetyny w surowicy wzrasta do kilkuset razy [56]. Produkcja erytropoetyny jest stymulowana przez HIF-1 zarówno w nerkach, jak i wątrobie, jednak elementy regulatorowe w obrębie genu *EPO* znajdują się w różnych

miejscach, w zależności od tkanki - w komórkach nerek elementy te znajdują się przy końcu 5' tego genu, natomiast w przypadku komórek wątroby wykryto je po stronie 3' tego samego genu. Dowodzi to, iż wzrost ekspresji EPO w odpowiedzi na hipoksję może się różnić w zależności od tkanki [57]–[59]. Podczas gdy w organizmie dorosłego człowieka nerki są głównym źródłem syntezy EPO, wątroba jest głównym źródłem hormonu w trakcie rozwoju embrionalnego. Jednak wykazano, iż w trakcie rozwoju osobniczego to właśnie wątroba ma główne znaczenie w produkcji EPO podczas ekspozycji na umiarkowaną lub ekstremalną hipoksję [60].

Ciało człowieka złożone jest z około 3-4g żelaza (3g u kobiet), przy czym połowa zawarta jest w hemoglobinie, zaś 1g znajduje się w rezerwuarze tkankowym (zazwyczaj w wątrobie) i jest asymilowany z pożywienia [61]. Stanowiąc integralną część pierścienia porfiryнового hemu, żelazo jest niezbędne w procesie dostarczania tlenu do komórek i tkanek. Biorąc pod uwagę ściśle powiązania między dostarczaniem tlenu, a dostępnością żelaza, nie jest zaskakujące, iż deprivacja żelaza i niedobór tlenu (hipoksja) są powiązane zależnościami na poziomie molekularnym. Wykazano, iż w stanach hipoksji, ekspresja głównych genów homeostazy żelaza, w tym transferyna (TR ang. *transferrin*), receptor transferyny (TFR1, ang. *transferrin receptor-1*), ceruloplazmina (Cp ang. *Ceruloplasmin*) i oksygenaza hemowa-1 (HO-1, ang. *heme oxygenase*) aktywowane są przez czynnik HIF-1. Ma to na celu zwiększenie dostępność żelaza dla erytropoezy, aby podwyższyć liczbę czerwonych krwinek, a przez to zwiększyć wydajność pobierania i transportowania tlenu oraz dostarczania go do hipoksyjnych komórek, co ma w efekcie prowadzić do odzyskania homeostazy tlenowej [61], [62].

Niskie stężenia tlenu mają wpływ na metabolizm. W stanach hipoksji generowane są jedynie 2 cząsteczki ATP na drodze niezależnego od tlenu szlaku glikolitycznego, podczas gdy w obecności tlenu (w stanie normoksji) komórka może uzyskać aż 38 cząsteczek ATP poprzez zależny od tlenu szlak kwasów trikarboksylowych (TCA ang. *tricarboxylic acid cycle*) [63], [64]. Te niedobory energetyczne w stanach hipoksji są kompensowane przez komórkę poprzez pobieranie większej ilości glukozy, a co za tym idzie, dochodzi do wzrostu ekspresji enzymów odpowiadających za jej transport [65]–[67]. Po pierwsze, HIF-1 stymuluje glikolityczną produkcję energii poprzez transaktywację genów zaangażowanych w import glukozy (takich jak *GLUT1*, znany także jako *SLC2A1*) [68]. Aby zabezpieczyć przetransportowany nadmiar glukozy we wnętrzu komórki, heksokinazy, których ekspresja

również modulowana jest przez czynnik indukowany hipoksją, katalizują pierwszą reakcję glikolizy, polegającą na fosforylacji glukozy do glukozy-6-fosforanu. Jest to reakcja fizjologicznie nieodwracalna [69]. W następnych etapach glikolizy czynnik HIF-1 ma wpływ na ekspresję najważniejszych enzymów glikolizy odpowiedzialnych za rozkład glukozy wewnątrzkomórkowej (PFK1 - fosfofruktokinazy 1 ang. *phosphofructokinase-1* oraz aldolazy). Pozostałe enzymy glikolizy są pośrednio lub bezpośrednio regulowane przez czynnik HIF-1. Przebiegająca glikoliza jest procesem biochemicznym, który rozkłada glukozę do pirogronianu i generuje dwie cząsteczki ATP. W warunkach normoksji powstały kwas pirogronowy transportowany jest do mitochondriów, aby ulec przemianom w tak zwanym cyklu Krebsa i zaopatrzyć komórkę w duże ilości energii. Jednak, podczas hipoksji, pirogronian nie jest procesowany w cyklu Krebsa, lecz zamiast tego przekształca się w mleczan za pomocą dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*) [70], [71]. Kwas mlekowy następnie usuwany jest z komórki za pomocą zależnego od HIF-1 transportera kwasów monokarboksylowych (MCT4- ang. *monocarboxylate transporter 4*) [72].

Niezmiernie interesujący jest fakt, iż różne typy komórek tolerują lub też adaptują się do warunków, w których stężenie tlenu odpowiada hipoksji. Doniesienia odnośnie wpływu hipoksji na apoptozę są sprzeczne – jedne z nich sugerują, że HIF-1 może indukować, a inne, iż także hamować apoptozę. Pewne teorie zakładają, że wynika to z faktu, iż podjednostka HIF α występuje w trzech izoformach. Mimo swego strukturalnego podobieństwa, HIF-1 α i HIF-2 α mogą w aspekcie apoptozy pełnić różne role. W różnych typach komórek jedna izoforma może hamować, a druga indukować apoptozę i odwrotnie [73]. W innych doniesieniach opisywane jest wybiórcze działanie czynnika HIF-1 - może on, w zależności od kontekstu, stymulować geny proapoptotyczne, obniżając geny antyapoptotyczne lub odwrotnie. Udokumentowano, iż działanie proapoptotyczne czynnika HIF-1 obejmuje obniżenie ekspresji genu *BCL-2*, indukcję ekspresji genu *BNIP* [74]–[76]. Z drugiej strony warto przytoczyć badania, w których opisano, iż wzrost ekspresji genów *BCL-2*, *MCL-1* oraz indukcja ekspresji genu *BCL-XL* w odpowiedzi na hipoksję ma działanie antyapoptotyczne [77], [78]. Dochodzi wtedy do obniżenia ekspresji genów proapoptotycznych *BID*, *BAX* i *BAK* [78], [79].

3. Wpływ czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1) na proces tworzenia naczyń w stanie fizjologicznym

Zarówno waskulogeneza, jak i angiogeneza mogą zostać zapoczątkowane przez sygnał, jakim jest niskie stężenie tlenu. Prowadzi to do aktywacji kluczowych czynników, które biorą udział w tworzeniu kapilar naczyniowych. W tym podrozdziale zostanie omówiony wpływ czynnika indukowanego hipoksją na proces tworzenia naczyń w stanie fizjologicznym.

3.1. Waskulogeneza

Waskulogeneza jest procesem fizjologicznie zachodzącym jedynie w embriogenezie. Powstawanie kapilar *de novo* prowadzi do utworzenia pierwotnego spłotu naczyniowego. Stężenie O₂ odgrywa kluczową rolę w trakcie rozwoju zarodkowego, organogenezy oraz w procesach tworzenia naczyń krwionośnych [1]. W pierwszych stadiach embriogenezy, zanim powstanie układ krążenia, stężenie tlenu w obrębie dzielących się komórek jest stosunkowo niskie i nie przekracza 3% [80], [81]. Rozwijający się płód do prawidłowego funkcjonowania wymaga zwiększenia nakładów tlenu, a to prowadzi do utworzenia pierwotnego spłotu naczyń krwionośnych z komórek macierzystych śródbłonna - hemangioblastów. Powstają one w wyspach krwionośnych woreczka żółtkowego zarodka. Ze względu na to, że środowisko macicy jest hipoksyjne, oczywistym staje się fakt, że niedotlenienie może być podstawowym czynnikiem stymulującym powstawanie naczyń w rozwoju embrionalnym [2], [82]. Zostało to potwierdzone w badaniach na myszach pozbawionych ekspresji genu *Hif-1β* (*Hif-1β*^{-/-} knock-out), który w komórkach występuje konstytutywnie. Zwierzęta te wykazywały śmiertelność dnia 10,5 embriogenezy (E10,5) ze względu na defekty rozwojowe związane z układem krwionośnym. Potwierdzono również znaczne obniżenie ekspresji genu *Vegf*, uznanego za główny modulator w procesach powstawania naczyń krwionośnych. Produkt ekspresji genu *Hif-1α* powinien być wykrywalny już między E8- E18. Z kolei myszy, u których ten gen został wyłączony (*Hif-1α*^{-/-} knock-out), wykazywały śmiertelność ze względu na defekty układu krwionośnego - tak jak we wcześniej opisanym przypadku, jednak z dodatkowymi patologiami cewy nerwowej [83], [84]. Czynniki indukowane hipoksją oraz stężenie tlenu mają również duże znaczenie w kształtowaniu łożyska. Podczas wczesnych etapów ciąży, powierzchnia łożyska wykazuje bardzo niskie stężenia tlenu – około 2,5% O₂. Rozwój łożyska i jego unaczynienia powoduje, iż stężenie O₂ wzrasta do około 8,6%, stając się tym samym odpowiednim środowiskiem rozwojowym dla płodu [85], [86]. W przypadku rozwoju płodowego myszy, krążenie łożyskowe powinno zacząć funkcjonować pomiędzy E10,5 a E11,5, aby zapewnić odpowiednie utlenowanie i odżywianie formującemu się

zarodkowi. Myszy, u których zaindukowano delecje któregoś z wymienionych genów: *Hif-1 α* , *Hif-1 β* lub *Vhl*, *Phd2*, wykazywały anomalie w budowie łożyska oraz usieciowaniu naczyń [83], [87], [88].

Hipoksja ma także duży wpływ na różnicowanie budujących naczynia komórek śródbłonna (EC, ang. *endothelial cells*). W badaniach *in vitro* wykazano, iż wpływ czynnika HIF-1 α na komórki EC powoduje, że różnicują one bardziej w kierunku o charakterze tętniczym aniżeli żylnym. Ma to związek z regulacją przez czynnik HIF-1 genów, które zaangażowane są w nadawanie EC charakteru tętniczego m.in. *NR2F2*, którego produktem jest czynnik COUP-TFII, receptor dla takich genów jak *HEY2*, *Dll4*, biorących udział w szlakach NOTCH. Wykazano, iż zmniejszone stężenie tlenu prowadzi do aktywacji kaskady sygnalizacji Dll4-NOTCH-HEY2, a następnie represji COUP-TFII w komórkach progenitorowych śródbłonna. Na tej podstawie postuluje się, iż jest to ważny aspekt w procesie rozwoju naczyń włosowatych w kierunku tętniczym [89].

3.2. Angiogeneza fizjologiczna

Dotychczasowe badania udowodniły, iż w trakcie rozwoju osobniczego hipoksja oraz czynnik HIF-1 mogą uczestniczyć w angiogenezie na trzy sposoby:

- w odpowiedzi na hipoksję, HIF-1 działa jako czynnik transkrypcyjny indukujący ekspresję kluczowych genów proangiogennych (*VEGF*, *PlGF*, *PDGFB*, *ANG1* i *ANG2*) oraz ich receptorów (*FLT-1*, *KDR*, *TIE*) [90], [91]
- hipoksja wpływa na regulację wydzielania chemokin proangiogennych (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL7*, *CXCL8*, *CXCL12-SDF-1 α*) i ekspresję receptorów (*CXCR1*, *CXCR2*, *CXCR4*) biorących udział w sygnalizacji angiogenezy [92]
- hipoksja reguluje geny odpowiedzialne za mobilizację i podziały komórek EC [53].

Homeostaza naczyniowa wymaga utrzymania równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi. Sygnał zewnętrzny, taki jak np. hipoksja, przesuwa tę równowagę w stronę czynników proangiogennych, co zapoczątkowuje proces formowania naczyń. Aktywność transkrypcyjna czynnika HIF-1 jest kluczowa do wzbudzenia nadekspresji czynników proangiogennych uczestniczących w tworzeniu nowych kapilar. Przede wszystkim, jest czynnikiem transkrypcyjnym dla najbardziej prominentnych genów proangiogennych, należących do rodziny czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego

(*VEGF-A*, *-B*, *-C* i *-D*), a także ich receptorów (*FLT-1* zwany także *VEGFR1*, *KDR* zwany także *VEGF-R2*). Ponadto, udowodniono, iż elementy odpowiedzi na hipoksję znajdują się w takich genach jak *PIGF* (łożyskowy czynnik wzrostu ang. *placental growth factor*), *FGF* (czynnik wzrostu fibroblastów ang. *fibroblast growth factor*), *PDGF*, *ANG1* i *ANG2* oraz *MMP*. Ekspresja receptorów *FLT-1*, *KDR* oraz *TIE2*, również może być stymulowana w odpowiedzi na hipoksję. Analizy sekwencji wykazały, iż elementy odpowiedzi na hipoksję znajdują się w obrębie wszystkich tych genów [93], [94]. Udowodniono, iż hipoksja oraz HIF-1 pełnią ważną rolę na każdym etapie kaskady tworzenia naczyń. Zastymulowany przez hipoksję czynnik VEGF zapoczątkowuje proces powstawania kapilar. Na tym etapie dochodzi do mobilizacji komórek śródbłonna oraz rekrutacji komórek endotelialnych krążących w naczyniach. Następnie czynnik indukowany hipoksją odgrywa ważną rolę w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, poprzez regulację ekspresji enzymów litycznych z grupy metaloproteinaz. Zwiększona w wyniku hipoksji ekspresja receptorów FLT-1 (VEGF-R1) oraz KDR (VEGF-R2) ma kluczowe znaczenie w transdukcji sygnału między migrującymi komórkami endotelialnymi. Zaindukowane przez HIF-1 integryny $\alpha\beta$ będą w dalszym ciągu stymulować komórki EC do migracji oraz, co najważniejsze, adhezji. Spowoduje to uformowanie struktury przypominającej kapilarę. Stworzona sieć naczyniopodobna musi zostać odpowiednio zabezpieczona, aby zapewnić kolateralny przepływ krwi bez przecieków. Wciąż jeszcze panujące warunki hipoksyjne powodują, iż aktywny czynnik HIF-1 będzie uczestniczyć również w dojrzewaniu naczyń krwionośnych. Na tym etapie jednym z ważniejszych czynników jest PDGF, posiadający elementy HRE w swej sekwencji. Udowodniono jednak, że proces ten koordynuje w dużej mierze podjednostka HIF-2 α . Macierz zewnątrzkomórkowa otaczająca naczynia składa się w znacznym procencie z fibronektyny, przy czym ekspresja genu FN1 (ang. *fibronectin*) jest regulowana właśnie przez dimer czynnika indukowanego hipoksją, składający się z podjednostki HIF-2 α [95].

Chemokiny (małe cytokiny, 8–12 kDa, pojawiające się w stanach zapalnych) odgrywają znaczącą rolę w procesie angiogenezy. Głównym zadaniem chemokin jest koordynowanie rekrutacji i migracji komórek do miejsc zapalnych lub urazów. Udowodniono, że w stymulacji angiogenezy mają one zarówno działanie bezpośrednie, jak i pośrednie [92]. Przede wszystkim wpływają na mobilizację komórek układu immunologicznego, których pojawienie się jest pośrednim, lecz ważnym, sygnałem do rozpoczęcia tworzenia naczyń [96]. Poza tym, wykazano, iż mogą wiązać się bezpośrednio ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek endotelialnych [97]. Obydwie ścieżki sygnalizacyjne prowadzą do

zwiększenia migracji komórek śródbłonna oraz ich powinowactwa do białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Można wyróżnić cytokiny proangiogenne i antyangiogenne, przechylenie równowagi w stronę cytokin proangiogennych powoduje wzbudzenie tworzenia naczyń. Udowodniono, iż hipoksja ma wpływ na te cytokiny, których sygnalizacja odpowiada za tworzenie naczyń krwionośnych [98].

Szczególnie istotnymi chemokinami w stanach hiposyjnych są CXCL12 oraz CXCL8 (mysi analog - CXCL1). HIF-1 α zwiększa ekspresję CXCL12 w niedokrwieniu. Wykazano, iż poziom CXCL12 w miejscach niedokrwienia bezpośrednio koreluje z stopniem hipoksji [99]. Ponadto, zaobserwowano zwiększony poziom CXCL12 po zawale mięśnia sercowego, co udowodniono zarówno w badaniach na ludziach i na gryzoniach. W modelu mysim, zwiększony poziom CXCL12 wykryto już w godzinę po indukcji niedokrwienia mięśnia sercowego lub kończyn dolnych, wskazując na ważną rolę cytokin w rozpoczęciu naprawy tkanek i rewaskularyzacji [100], [101]. Transdukcja sygnału odbywa się za pośrednictwem receptora CXCR4 [102], interakcja CXCL12/CXCR4 skutkuje migracją i rekrutowaniem komórek EPC (ang. *endothelial progenitor cells*) do miejsca niedokrwienia [103]–[105]. Uwolnione pod wpływem hipoksji chemokiny CXCL12 wpływają na zwiększenie aktywności ścieżek sygnałowych, odpowiedzialnych za wzbudzenie ekspresji genu endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS) [106]. Ten z kolei będzie dodatkowo pobudzać migrację i proliferację komórek śródbłonna oraz mobilizować komórki progenitorowe ze szpiku. Dodatkowym wzmocnieniem na tej ścieżce jest VEGF, którego aktywacja również zależna jest od hipoksji i wpływa na mobilizację komórek endotelialnych. W kontekście regeneracji serca u myszy bardzo ważną chemokiną jest CXCL1 (odpowiednik ludzki to CXCL8/IL8- interleukina-8). Wykazano, iż jest to kluczowa cząsteczka w regeneracji śródbłonna po zawale serca, której działanie umożliwia receptor CXCR2 [107]. Udowodniono także interakcję między CXCL8, a najbardziej prominentnym czynnikiem proangiogennym VEGF-A oraz jego receptorem VEGF-R2, co ma bezpośredni wpływ na wzmocnienie sygnałów dla tworzenia naczyń krwionośnych w stanach niedotlenienia [108]. Biorąc pod uwagę tak szerokie spektrum działania chemokin w regeneracji miokardium i transplantacji komórek w rejon niedokrwienia, będą one miały duże znaczenie w stanach hipoksji serca po zawale, działając zarówno kardioprotekcyjnie, jak i osłonowo/proadaptacyjnie dla podawanych komórek [109].

4. Komórki macierzyste

W 2013 roku oszacowano, iż ludzkie ciało składa się z około 37,2 tryliona komórek [110]. Zaobserwowano, że w niektórych tkankach, takich jak krew, skóra lub nabłonek jelitowy wyspecjalizowane finalnie komórki mają krótki cykl życiowy i nie mają zdolności do samoodnawiania. Nasunął się wniosek, iż za utrzymywanie homeostazy tkankowej odpowiedzialne są komórki macierzyste, stanowiące rezerwuar tkankowy danego narządu/układu. Dziś już wiadomo, że komórki macierzyste (ang. *stem cells*) definiowane są jako: niezróżnicowane komórki, dzielące się dwutorowo tj. zdolne do samoodnawiania się jak i generowania zróżnicowanych komórek potomnych, zdolnych do uzupełniania ubytków tkankowych, powodowanych wpływem bodźców naturalnych (uraz, starzenie się) lub zaindukowanych [111].

Ze względu na pochodzenie, komórki macierzyste dzielimy na:

- Embrionalne (ESC ang. *embryonic stem cells*) - komórki o najszerszym spektrum plastyczności; mają potencjał do wytworzenia każdej komórki organizmu ze wszystkich trzech listków zarodkowych oraz pozazarodkowych komórek łożyska. Względy etyczne wykorzystywania tych komórek zostały pokonane w momencie opracowania technik reprogramowania genetycznego, które umożliwiło uzyskanie komórek pluripotencjalnych z komórek somatycznych.
- Somatyczne (ang. *adult stem cells*) - stanowią rezerwuar komórek (prekursorowych) w dorosłym organizmie; występują w swoistych dla danej tkanki niszach. Warunki mikrośrodowiskowe określają kiedy mają ulec aktywacji i zasilić uszkodzoną tkankę, czy pozostawać w stanie latencji.

Biorąc pod uwagę potencjał do różnicowania komórek macierzystych w inne komórki organizmu, można wyróżnić następującą hierarchię:

- Totipotentne – mają potencjał do przeobrażenia się w każdą komórkę organizmu, a także łożyska. Występują tylko we wczesnej fazie rozwoju płodowego. Tylko zygota i pierwsze dzielące się komórki - blastomery – mają właściwości totipotentne.
- Pluripotentne - mogą różnicować się w komórki należące do wszystkich trzech listków zarodkowych, ale nie mają możliwości odtworzenia łożyska – jest to zasadnicza różnica wobec wcześniej wymienionych komórek totipotentnych. Niegdyś komórki te można było uzyskać jedynie z węzła zarodkowego blastocysty, obecnie jednak istnieją

metody reprogramowania komórek somatycznych, które nabywają właściwości pluripotente.

- Multipotentne - komórki macierzyste, które mają zdolność wytworzenia komórek pochodzących z jednego listka zarodkowego.
- Unipotentne - tworzą komórki specyficzne tylko dla danej tkanki. Są rezerwuarem tkankowym, którego zapasy wykorzystywane są podczas uszkodzenia tkanki bądź narządu.

4.1. Komórki macierzyste mięśni szkieletowych

W warunkach fizjologicznych mięśnie szkieletowe ssaków są dość stabilną tkanką postmitotyczną, której komórki nie ulegają podziałom. W związku z wieloma funkcjami, jakie tkanka ta pełni w organizmie (m. in. aktywność lokomotoryczna, zachowanie postawy i oddychanie), mięśnie są podatne na obrażenia związane z bezpośrednimi urazami (np. intensywne ćwiczenia fizyczne). W momencie gdy dochodzi do kontuzji, tkanka mięśniowa ma nadzwyczajne zdolności do uruchamiania szybkiego i efektywnego procesu naprawczego, który ma zapobiegać utracie masy mięśniowej. Odbudowa mięśni szkieletowych jest wysoce zsynchronizowanym procesem, którego kluczowym elementem jest aktywacja unipotencjalnych komórek satelitowych mięśni szkieletowych, uznawanych za swoisty rezerwuar tkankowy. W normalnych warunkach występują one w stanie spoczynku, zajmując miejsce tuż pod błoną podstawną włókna mięśniowego [112].

Zmiany molekularne zachodzące podczas miogenezy mają kluczowe znaczenie w aktywacji i różnicowaniu komórek satelitowych. W zależności od stanu, w jakim znajdują się komórki, zmienia się profil ekspresji genów należących do rodziny miogennych czynników regulatorowych- *MRF* (ang. *myogenic regulatory factor*). Pobudzenie komórek satelitowych następuje, gdy dochodzi do aktywacji genów *MYOD* oraz *MYF5*, zwanych „wczesnymi” genami miogenezy [113]. Aktywnie dzielące się, proliferujące, charakteryzujące się ekspresją tych dwóch czynników transkrypcyjnych komórki zwane są mioblastami. Istotną rolę czynników transkrypcyjnych potwierdzono w badaniach na zwierzętach, w których u myszy z wyłączonymi genami *MyoD* i *Myf5* dochodzi do całkowitej atrofii mięśni szkieletowych [114], [115]. W kolejnych etapach miogenezy mioblasty wycofują się z podziałów komórkowych i zatrzymują swój cykl, w zamian za to wchodzi w ostatnią fazę różnicowania, dla której charakterystyczna jest ekspresja „późnych” genów miogennych - miogeniny (*MYOG*) oraz *MRF4* [113]. Istotną rolę genu miogeniny potwierdzono, gdy przeprowadzono

badania na zarodkach z wyłączoną ekspresją tego genu. Z powodu braku ekspresji *MyoG* wszystkie mutanty obumierały, ponieważ żaden z nich nie wykształcił włókien mięśniowych [116]. W zaawansowanym procesie regeneracji mięśnia, mioblasty zaczynają się wydłużać oraz łączyć ze sobą, co powoduje powstanie wielojądrzastych struktur zwanych miotubami, które, dojrzewając, tworzą właśnie włókna mięśniowe. Dodatkowymi markerami mięśniowych komórek efektorowych są białka MHC - ciężki łańcuch miozyny (ang. *myosin heavy chain*) oraz CK - mięśniowa kinaza keratynowa (ang. *creatine kinase*). Wreszcie, w końcowym etapie różnicowania, wielojądrzaste miotuby połączą się ze sobą, tworząc syncytium, które ostatecznie zróżnicuje do kurczących się włókien mięśniowych [113].

4.2. Badania nad mioblastami w aspekcie regeneracji serca

Choroby sercowo naczyniowe (CVD ang. *cardiovascular diseases*) są wiodącą przyczyną śmierci. Statystyki z 2015 roku wykazały, iż śmiertelność sięgała 17,7 miliona zgonów, czyniąc tym samym choroby układu krążenia główną przyczyną śmiertelności pośród chorób niezakaźnych [117]. Szacuje się, że około 80% zgonów powodowane jest przez zawał mięśnia sercowego (MI ang. *myocardial infarction*) oraz udarem mózgu. To właśnie zawał mięśnia sercowego (MI) jest głównym objawem choroby niedokrwiennej serca, powodującej hipoksję. Następstwem tego stanu jest uszkodzenie mięśnia sercowego, które obejmuje atrofię kardiomiocytów. Proces ten prowadzi do niekorzystnej przebudowy serca, powodując zastąpienie tkanki sercowej o prawidłowej kurczliwości przez niefunkcjonalną bliznę zbudowaną z tkanki łącznej. Mięsień sercowy, w odpowiedzi na niedokrwienie i wytworzenie blizny, reaguje hipertrofią kardiomiocytów. Przerost lewej komory może doprowadzić do zaburzeń rytmu serca (arytmii), migotania komór i masywnego, śmiertelnego ataku serca [118]. Chociaż zaawansowane zabiegi rewaskularyzacji (angioplastyka, cewnikowanie, przeszczepy żyłne) przyczyniły się do istotnego zmniejszenia umieralności z powodu CVD, to znacząca liczba pacjentów nie kwalifikuje się do wykonania wyżej wymienionych procedur chirurgicznych ze względu na zbyt dużą inwazyjność zabiegu, zaawansowany wiek lub współwystępowanie dodatkowych czynników wykluczających, takich jak cukrzyca, nadciśnienie lub inne choroby. W związku z powyższym, zaczęto poszukiwać alternatywnych metod leczenia pozawałowych zmian serca. Biorąc pod uwagę regeneracyjne właściwości komórek macierzystych, stały się one obiektem badań w celu pozyskania nowatorskich terapii.

Mioblasty szkieletowe są komórkami często stosowanymi w medycynie regeneracyjnej serca. Ze względu na swoje podobieństwo do kardiomiocytów, dobrą kurczliwość, łatwość w pozyskaniu, hodowli *in vitro* na stosunkowo dużą skalę i ewentualnej możliwości ich modyfikacji, oraz zwiększoną tolerancję na warunki niedotlenienia są często wykorzystywane do przeszczepów w niedokrwione obszary serca [119], [120]. Do dzisiaj przeprowadzono kilka prób klinicznych na pacjentach po zawale serca z wykorzystaniem transplantacji mioblastów. Przede wszystkim mioblasty są łatwo dostępne, ponieważ tkanka mięśniowa stanowi 30-40% masy ciała człowieka [121]. Udokumentowano również, iż pobranie komórek od pacjentów z niewydolnością serca nie ma wpływu na jakość i przeżywalność mioblastów, które służą do autologicznego przeszczepu [122]. Pierwsze próby kliniczne u pacjentów z przebyłym zawałem serca z użyciem mioblastów wykonywane były poprzez iniekcję komórek w okolice blizny pozawałowej w trakcie zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego. U pacjentów po przeprowadzonej interwencji obserwowano: wzrost frakcji wyrzutowej serca, polepszenie frakcji skurczowej i rozkurczowej serca, ograniczenie niekorzystnej przebudowy lewej komory, hamowanie rozprzestrzeniania blizny pozawałowej [123]–[126]. Kolejne podjęte próby transplantacji okazały się mniej inwazyjne. Zaczęto podawać komórki przezskórnie, eliminując ryzyko wynikające z prowadzenia operacji na otwartym sercu. Skuteczną metodą okazało się podawanie komórek do serca za pomocą cewnika wprowadzonego poprzez tętnicę udową. Próba kliniczna pod akronimem MARVEL wykazała, iż transplantowanie dużych liczebności komórek (400-800 milionów) za pomocą cewnika jest metodą bezpieczną, gwarantującą podanie w wybrane miejsce docelowe i może prowadzić do istotnych korzyści klinicznych [127]. Z kolei w próbie klinicznej SEISMIC nie wykazano globalnej poprawy we frakcji wyrzutowej lewej komory, jednak prowadzone przyczepy przyczyniły się do poprawy jakości życia pacjentów poprzez zwiększenie wydolności w testach wysiłkowych [128]. Wśród pacjentów z zaimplantowanymi mioblastami występowały przypadki arytmii, na krótko po przeprowadzonej procedurze lub w trakcie zabiegu. Przypuszczalnym powodem mógł być brak połączenia elektromechanicznego pomiędzy mioblastami i kardiomiocytami narządu biorcy lub reakcja zapalna. [127], [129]. W ten sposób uwidoczniła została zasadnicza wada mioblastów - natywne komórki mięśnia szkieletowego nigdy nie różnicują się do kardiomiocytów oraz nie wytworzą połączeń elektromechanicznych, za które w miocytach kardialnych odpowiadają koneksyny. Aby wyjść naprzeciw niedogodnościom związanym z brakiem integracji elektrycznej transplantowanych komórek z miokardium, podjęto próby zmodyfikowania mioblastów, wprowadzając gen koneksyny 43 (*GJA1*). Trzynastu pacjentom z grupy „no option” podano autologiczne

mioblasty wykazujące ekspresję CX43. Wyniki wskazały na poprawę wydolności wysiłkowej u tych pacjentów oraz polepszenie żywotności mięśnia sercowego w segmentach, do których podano komórki. Nie zaobserwowano przy tym arytmii komorowej, co może wynikać z ulepszonego genetycznie sprzężenia elektrycznego pomiędzy mioblastami z nadekspresją koneksyny a miokardium [130].

4.3. Terapie pozawałowego mięśnia sercowego z czynnikami proangiogennymi

Aby poprawić efekt terapeutyczny podawanych mioblastów, stosowane są także modyfikacje genetyczne z użyciem czynników proangiogennych. Tego typu terapia ma na celu zwiększenie odporności przeszczepianych mioblastów na warunki hipoksji, zmniejszenie apoptozy komórek oraz poprawienie ukrwienia miokardium przez zaindukowanie dodatkowej angiogenezy.

4.3.1. *PlGF*-łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placental growth factor*)

Łożyskowy czynnik wzrostu (*PlGF* ang. *placental growth factor*) jest członkiem rodziny czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego (*VEGF* ang. *vascular endothelial growth factors*), w obrębie której wyróżnia się takie czynniki jak *VEGF-A* (*VEGF*), *VEGF-B*, *VEGF-C*, oraz *VEGF-D*. *PlGF* jest czynnikiem, który nie wydaje się pełnić kluczowej roli w rozwoju płodowym, jak udowodniły badania na zarodkach mysich pozbawionych ekspresji tego genu, w których zwierzęta urodziły się bez widocznych wad naczyniowych [131]. Jednak niezaprzeczalnie odgrywa on istotną rolę w takich procesach jak regeneracja niedokrwionych tkanek, metastaza nowotworów, stany zapalne oraz w innych stanach patologicznych i fizjologicznych. Liczne modele przedkliniczne wykazały, że podniesienie lub obniżenie poziomów ekspresji *PlGF* może wywołać pozytywny efekt terapeutyczny.

Ekspresja *PlGF* charakterystyczna jest dla wczesnych etapów ciąży - początkowo w komórkach trofoblastu, a w następnie w kosmkach syncytiotrofoblastu [132], [133]. Co więcej, gen *PlGF* reguluje proces dojrzewania komórek NK (ang. *natural killer cells*) w endometrium, które są istotne dla rozwoju trofoblastu, przekształcającego się następnie w łożysko [134]. Mimo doniesień związanych z istotną rolą czynnika łożyskowego w trakcie trwania ciąży, myszy pozbawione ekspresji genu *PlGF* są płodne, a potomstwo rodzi się bez widocznych wad naczyniowych. Prawdopodobnie w trakcie rozwoju płodowego inne czynniki mają większe znaczenie dla procesów zagnieżdżania się zygoty oraz rozwoju

naczyń. Warto jednak zaznaczyć, iż u dorosłych myszy pozbawionych ekspresji *PIGF* zaobserwowano o wiele bardziej ubogą waskulaturę w siatkówce oka oraz miokardium [131].

Gen *PIGF* został zmapowany w ludzkim genomie na chromosomie 14, w obrębie ramienia długiego, regionie 2, prążku 4 (14q24). Cały gen zbudowany jest z 7 egzonów, co odpowiada długości około 800 kpz (kilopar zasad). Dotychczas odkryto cztery izoformy *PIGF*, przy czym u myszy występuje jedynie ekwiwalent izoformy 2. Isoformy *PIGF*-1 oraz 3 wydzielane są poza komórkę, natomiast izoformy *PIGF*-2 oraz 4 pozostają zakotwiczone w błonie komórkowej, co jest związane z faktem, iż w przeciwieństwie do izoformy 1 oraz 2 posiadają one w swej strukturze miejsce wiązania heparyny. Łożyskowy czynnik wzrostu należy do rodziny VEGF. Związki te łączą duże podobieństwo w sekwencji oraz fakt, iż mają wspólny receptor - FLT-1 (VEGF-R1) [135]–[138]. Dodatkowo udowodniono, iż *PIGF* wiąże się również z rozpuszczalną formą receptora FLT-1 (sFLT-1), która nie posiada domeny transbłonowej ani wewnątrzkomórkowej i stanowi pewnego rodzaju pułapkę wychwytyjącą oraz redukującą ilość krążącego białka [139]. Udowodniono, iż izoforma druga *PIGF* ma zdolność wiązania się do neuropiliny 1 oraz 2, (NRP-1, 2) - przy czym staje się celem terapeutycznym w leczeniu rdzeniaków zarodkowych [140].

W związku z tym, iż *PIGF* i VEGF dzielą receptor FLT-1, a ich współwystępowanie jest powszechne, zaproponowano molekularny model działania *PIGF* poprzez wspólny receptor, prowadzący do pobudzenia angiogenezy. Aktywacja FLT-1 przez *PIGF* indukuje interakcję krzyżową FLT-1:KDR, która wzmacnia sygnalizację VEGF/KDR, co sugeruje, że komórki śródbłonna są zdolne do wzmacniania swojej własnej odpowiedzi na VEGF poprzez uwalnianie *PIGF* [141]. Koncepcja ta została nazwana przez niektórych autorów zamianą ligandów (ang. *ligand shifting*). Udowodniono, iż przemieszczenie VEGF do receptora drugiego będzie miało wpływ przede wszystkim na migrację oraz proliferację komórek endotelialnych [142]. Co ciekawe, za pomocą spektrometrii mas udowodniono, iż *PIGF* i VEGF indukują fosforylację różnych reszt tyrozynowych w obrębie receptora FLT-1 [141], podkreślając tym samym fakt, że *PIGF* i VEGF przekazują różne sygnały angiogenne za pośrednictwem tego samego receptora.

Innym mechanizmem opisywanym w literaturze, który może mieć wpływ na angiogenezę, jest obecność zależności pomiędzy czynnikiem łożyskowym a innymi białkami o potencjale proangiogenym. Zaobserwowano, iż *PIGF* stymuluje ekspresję najbardziej prominentnego czynnika VEGF-A. Dodatkowo udowodniono jego stymulujący wpływ na ekspresję takich

czynników jak FGF-2, PDGF oraz metaloproteinaz (MMP) [143][144]. Takie synergiczne działanie ma wpływ na wzmocnienie sygnałów proangiogennych zarówno w tworzeniu naczyń krwionośnych, jak i ich dojrzewaniu i stabilizacji.

PlGF oddziałuje na całą gamę komórek macierzystych biorących udział w różnych procesach, nawet tych nie związanych z angiogenezą, dlatego czynnik ten uznawany jest za plejotropowy. Udowodniono, iż ma on wpływ na przeżycie, migrację, proliferację, metabolizm i aktywację komórek biorących udział w tworzeniu naczyń krwionośnych (komórki śródbłonna, pericyty, komórki mięśni gładkich), jak również na komórki nie związane bezpośrednio z angiogenezą (makrofagi, progenitory pochodzące z szpiku kostnego, komórki nowotworowe, komórki dendrytyczne, fibroblasty, komórki wątroby, komórki nabłonkowe, neurony, komórki Schwanna, astrocyty). Biorąc pod uwagę tak szerokie spektrum aktywności łożyskowego czynnika wzrostu, jest on atrakcyjnym kandydatem w terapiach zarówno antyangiogennych (w leczeniu nowotworów), jak i proangiogennych w leczeniu skutków niedokrwienia serca wywołanego zawałem.

Po ostrym zawale serca (AMI ang. *acute myocardial infarction*) dochodzi do obumierania kardiomiocytów i atrofii miokardium. Serce zwiększa objętość i następuje zmiana geometrii jego kształtu na bardziej sferyczny, związane jest to z procesem hipertrofii kardiomiocytów, a nie ich proliferacją [124]. Niedokrwiony region, który ulega niekorzystnej przebudowie, należy wspomóc poprzez indukcję angiogenezy, aby w jakimś stopniu zahamować i zrekompensować wywołane zmiany patologiczne. PlGF został uznany jako potencjalne narzędzie terapeutyczne po przeprowadzeniu badań z użyciem myszy, u których wyłączono ekspresję czynnika łożyskowego (*PlGF^{-/-} knockout*). U gryzoni zaobserwowano zmniejszoną angiogenezę i masywny stan zapalny w strefie granicznej zawału mięśnia sercowego [131]. W związku z zaobserwowanymi zależnościami między czynnikiem łożyskowym a angiogenezą w sercu, zaczęto powszechnie stosować ten czynnik w terapiach niedokrwienych. W przypadku rewaskularyzacji niedokrwionego serca w modelu mysim, po transferze genu *PlGF* zaobserwowano zwiększenie rozrostu kapilar nawet o 60%. Dodatkowym beneficem działania czynnika PlGF okazał się jego wpływ na pobudzenie komórek mięśniówki gładkiej, przez co powstające naczynia krwionośne były dojrzałe, stabilne i trwałe. Kolejną zaletą okazał się fakt, iż PlGF nie powodował powstania naczyniaków (łagodnych nowotworów wywodzących się z układu krwionośnego), a nowo powstałe unaczynienie miokardium nie wykazywało znamion patologicznego rozrostu [145]. Podobne badania przeprowadzone na

gryzoniach wykazały, iż adenowirusowy transfer genu *PIGF* w obszar niedokrwionego miokardium poprawił wydolność lewej komory serca, a było to prawdopodobnie spowodowane przyrostem kardiomiocytów w odpowiedzi na stymulację tym czynnikiem. Zwiększyła się także ich przeżywalność podczas stanu niedokrwienia i niedotlenienia. Systematyczny transfer genu *PIGF* powodował poprawę kurczliwości serca poprzez polepszenie ukrwienia obszaru blizny. Założono, iż efekt ten osiągnięto poprzez wywołanie angiogenezy w pozostałej części miokardium dzięki nadekspresji genu *PIGF* [146]. Opisywane doświadczenia na myszach wykazały również, iż transfer genu nie powodował działań niepożądanych związanych z zaburzeniami ciśnienia lub powstaniem obrzęku w miejscu podania, co miało miejsce w przypadku terapii z użyciem VEGF. Podobne badania przeprowadzono na szczurach, u których dosercowa iniekcja PIGF u osobników z rozległym zawałem mięśnia sercowego powodowała nasilenie angiogenezy strefy granicznej zawału (ang. *border zone*). Osłabiło to niekorzystną przebudowę lewej komory co pozwoliło ochronić jej funkcjonalność. Wyszuto nawet wniosek, iż terapia ta może być przydatna jako uzupełnienie lub alternatywa dla standardowych technik rewaskularyzacji u pacjentów z niedokrwioną niewydolnością serca [147]. Badania nad wprowadzeniem genu/białka w chorobie niedokrwiennej serca okazały się sukcesem. Postanowiono następnie wspomóc terapię proangiogenną za pomocą L-argininy (podawanej w pożywieniu), która poprawia czynność śródbłonna, będąc źródłem tlenu azotu. Szczurom, u których indukowano zawał serca, podawano do miokardium białko PIGF za pomocą iniekcji, a ich dietę suplementowano L-argininą. Parametry hemodynamiczne poprawiły się znacząco zarówno w grupach szczurów, którym podano jedynie PIGF, jak również tym, których dieta suplementowana była L-argininą. Jednak gryzonie, u których zastosowano terapię skojarzoną wykazywały znacznie gęstsze usieciowane powstałych kapilar, a blizna pozawałowa zbudowana była z większej ilości kolagenu typu I, zaś koncentracja białka uznawanego za marker zawału (BNP) znacznie spadała w porównaniu do szczurów u których zastosowano samo wprowadzenie PIGF [148]. Kolejnym przykładem terapii łączonej było stosowanie mioblastów modyfikowanych genetycznie jako narzędzi terapeutycznego. Szczurom z zaindukowanym zawałem serca podano autologiczne komórki modyfikowane genem *PIGF*. Zaobserwowano, iż gryzonie poddane terapii łączonej wykazywały zwiększoną funkcjonalność lewej komory (polepszona frakcja wyrzutowa krwi, zmniejszone pole powierzchni lewej komory), co miało związek z zahamowaniem niekorzystnej przebudowy serca, a także nasileniem procesu angiogenezy, gdyż wykryto większą ilość naczyń krwionośnych [149].

W kontekście regeneracji serca po zawale, gen *PlGF* jest jednym z lepiej rokujących kandydatów do badania jego użyteczności jako narzędzia terapeutycznego. Potwierdzają to liczne doniesienia, w których wykonano badania przedkliniczne na modelu zwierzęcym, w którym czynnik podawano w formie rekombinowanego białka, w wektorze adenowirusowym, lub jako terapię skojarzoną z dodatkowymi suplementami. Najbardziej obiecujące wydaje się jednak podawanie genetycznie zmodyfikowanych komórek, które potencjalnie wypełnią bliznę pozawałową, zaś czynnik terapeutyczny będzie w stanie wzbudzić angiogenezę.

4.3.2. VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. vascular endothelial growth factor)

Naczynia krwionośne powstają w wyniku indukcji trzech głównych procesów: angiogenezy, arteriogenezy i waskulogenezy. Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych - VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – odgrywa główną rolę we wszystkich tych procesach, przy czym warto zaznaczyć, iż odkryto, że każda ze wspomnianych dróg rewaskularyzacji może zachodzić w niedokrwionym mięśniu sercowym [2], [150]. Choć czynny udział w budowaniu naczyń krwionośnych jest ważnym procesem pośredniczącym przez VEGF, nie jest to jedyna rola tej plejotropowej cytokiny. Szerokie spektrum właściwości VEGF czyni go interesującym obiektem terapeutycznym dla jednostki chorobowej takiej jak niewydolność serca, która ma stosunkowo niewiele szans na pomyślne leczenie.

Rodzina białek VEGF składa się z kilku czynników: VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz PlGF. Każdy członek tej rodziny ma związek z procesem angiogenezy (VEGF-A, VEGF-B, PlGF) lub limfangiogenezy (VEGF-C, VEGF-D). Najbardziej prominentnym czynnikiem z rodziny, a zarazem najczęściej badany jest VEGF-A. Gen dla tego czynnika zlokalizowany jest na chromosomie 6 w obrębie ramienia krótkiego, w regionie 21 (6p21), składa się z 8 egzonów, pomiędzy którymi znajduje się 7 intronów. Alternatywne składanie zachodzące w obrębie genu powoduje powstanie izoform *VEGF₁₂₁*, *VEGF₁₆₅*, *VEGF₁₈₉*, *VEGF₂₀₆*, mających po translacji odpowiednio 121, 165, 189 i 206 aminokwasów [151]. Warto zaznaczyć, iż w zależności od tego jak przebiegnie alternatywne składanie *VEGF* może być generowany jako dwie główne rodziny: proangiogenne izoformy *VEGF_{xxx}*, generowane przez proksymalną selekcję miejsca składania w końcowym egzonie 8a i antyangiogenne izoformy *VEGF_{xxx}b*, generowane przez wykonanie składania sekwencji w dystalnej części egzonu 8b [152].

Szeroki zakres aktywności VEGF nie ogranicza się jedynie do oddziaływania na komórki endotelialne, ale także na komórki pochodzące ze szpiku - promując chemotaksję monocytów, może także hamować rozwój komórek dendrytycznych i zwiększać produkcję limfocytów B [153], [154]. Udowodniono również, że sekrecja VEGF nie jest ściśle przypisana do komórek śródbłonna ale zachodzi także w multipotentnych komórkach macierzystych oraz dojrzałych kardiomiocytach.

Czynnik wzrostu śródbłonna wiąże się z receptorami z rodziny kinaz tyrozynowych (RTK ang. *receptor tyrosine kinase*). Pierwsze dwa - FLT-1 (VEGFR1) oraz KDR (VEGFR2) łączy podobieństwo strukturalne. Biorą one udział w transdukcji sygnału zainicjowanego przez wszystkie izoformy VEGF oraz PlGF. Natomiast receptor FLT-4 (VEGFR3) jest mediatorem odpowiedzi jedynie na czynniki VEGF-C oraz VEGF-D [155]. Udowodniono, iż receptor FLT-1 jest regulowany w sposób zależny od czynnika indukowanego hipoksją. Można wyróżnić jego dwie formy: właściwą oraz rozpuszczalną (sFLT-1 ang. *soluble FLT-1*), ten ostatni działa jako inhibitor aktywności VEGF [156]. Wykazano niezbędny udział właściwego receptora w procesie formowania się naczyń. Badania na myszach udowodniły, że brak ekspresji *Flt-1* (*Flt-1^{-/-}*) prowadzi do obumarcia płodu pomiędzy E8,5 a E9,5, na skutek niewykształcenia się układu krwionośnego – rozwój zarodka pozbawionego ekspresji tego genu jest więc niemożliwy. Tę samą sytuację opisano w przypadku myszy z wyłączonym genem *Kdr* (*Kdr^{-/-}*) [157], [158], co świadczy o równie istotnej roli tego receptora w procesie angiogenezy. Co interesujące, obydwa receptory zdają się mieć nieco inne role w angiogenezie. Jeśli czynnik VEGF-A lub VEGF-B przyłączą się do receptora VEGFR1, dojdzie do negatywnej regulacji angiogenezy, co będzie sygnałem do aktywacji procesów odpowiedzialnych za stabilizację nowopowstałych kapilar. Jeśli natomiast VEGF-A,C lub D połączą się z receptorem VEGFR2, będzie to sygnał proangiogeny lub limfangiogeny [155]. Pozytywna i negatywna regulacja za pomocą obydwu receptorów pokrywa się z teorią „kielkującej” angiogenezy opisanej uprzednio.

Nie ma wątpliwości co do samej istotności czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego w angiogenezie. Wiele doniesień wskazuje na fakt, iż jest on niezbędny podczas rozwoju zarodkowego, przy czym nawet częściowa inaktywacja tego genu (*VEGF-A^{+/-}*) skutkuje letalnością w wyniku nagromadzenia wad rozwojowych związanych z deformacją lub patologią unaczynienia wielu narządów. W pierwszym okresie po urodzeniu aktywność VEGF-A także jest kluczowa. Zarówno wyłączenie ekspresji tego genu za pomocą

rekombinacji, jak i podanie rozpuszczalnej formy receptora VEGFR1, prowadzi do wylapania i wyciszenia cząsteczek VEGF-A, co powoduje spadek masy u potomstwa, niewydolność narządów, a także zwiększoną śmiertelność [159]. W dorosłym organizmie VEGF bierze udział w takich procesach jak rozrost kości, angiogeneza jajników i gojenie ran [151].

W modelach zwierzęcych wykonano kilka prób, które wykazały pozytywne efekty stosowania VEGF-A jako narzędzia terapeutycznego w leczeniu serca po zawale. VEGF-A podawany jako rekombinowane białko zarówno do serca, jak i do obiegu, skutecznie poprawiał wydolność oraz perfuzję, jak również hamował niekorzystną przebudowę serca [160], [161]. Istnieją przesłanki, iż lepszą odpowiedź terapeutyczną osiągnąć można podając czynnik terapeutyczny za pomocą powtarzalnych infuzji bądź poprzez systemy gwarantujące powolne uwalnianie cząsteczki. Zintegrowane połączenie dziedzin biotechnologii oraz nanotechnologii zaowocowało powstaniem nanokapsuł zawierających czynnik VEGF. Przeprowadzone badania udowodniły, iż tempo uwalniania może zagwarantować obecność czynnika nawet do 31 dni po iniekcji w rejon blizny pozawałowej. Nanocząsteczki zawierające VEGF (o średnicy 3-5 μm) doprowadziły do poprawy funkcji serca podczas badań prowadzonych w szczurzych modelach MI. Wyniki sugerowały, że wprowadzenie czynnika za pośrednictwem nanocząsteczek zwiększa siłę działania angiogenego i terapeutycznego VEGF, co może powodować dodatkowe korzyści i ograniczać ryzyko terapii z użyciem VEGF przez stopniowe uwalnianie podawanej dawki. Parametry funkcjonalne serca ulegały poprawie w sposób istotny, niezależnie od stężenia cząsteczki terapeutycznej w porównaniu do zwierząt nieleczonych [162]. Badania z pogranicza nauk nie doczekały się jeszcze swojej kontynuacji w modelu klinicznym. Mimo wszystko, cząsteczka terapeutyczna VEGF-A była przedmiotem kilku prób klinicznych na pacjentach z niewydolnością serca. Początkową próbę wykorzystania potencjału angiogenego VEGF-A wykonano poprzez podanie rekombinowanego białka pacjentom z chorobą niedokrwinną serca (badanie kliniczne VIVA). W przeciwieństwie do znakomych wyników uzyskanych w różnych modelach zwierzęcych, w tym ostrego postępującego niedokrwienia, iniekcja białka do tętnic wieńcowych nie była tak skuteczna jak oczekiwano [163]. Podjęto jeszcze kilka badań klinicznych z mniej zadowalającym wynikiem. W próbie EUROINJECT-ONE, po iniekcji plazmidu zawierającego VEGF-A, nie wykazano istotnej poprawy w perfuzji serca w porównaniu z placebo [164]. Jednak, pomimo niesatysfakcjonujących wyników dotyczących samej rewaskularyzacji, zaobserwowano poprawę kurczliwości ściany serca w obszarach ostrzykniętych VEGF-A.

Wnioskiem płynącym z tych badań była propozycja powrotu do faz przedklinicznych i stosowanie ulepszonej terapii, z użyciem komórek macierzystych i/lub zastosowanie dodatkowego czynnika terapeutycznego w celu wywołania zarówno efektu proangiogenno, jak i odbudowującego względem lewej komory pozawałowego serca. Zmodyfikowane genetycznie komórki mezenchymalne z użyciem wektora adenowirusowego AdVEGF, podane do serca, wykazały efekt terapeutyczny poprzez poprawę parametrów funkcjonalnych serca. Sugerowano, iż w dużej mierze poza VEGF-A bierze w tym udział cytokina SDF-1 α , mająca duże znaczenie w angiogenezie [165]. Zatem połączenie dwóch działających synergicznie cytokin może mieć ważne znaczenie w regeneracji serca. Dodatkowo, zastosowanie jeszcze innego rodzaju komórek, np. pochodzenia miogenne, mogłoby skutkować dobrymi wynikami przedklinicznymi.

4.3.3. FGF - czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*)

Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF ang. *fibroblast growth factor*) bierze udział w wielu procesach biologicznych, zarówno w trakcie rozwoju embrionalnego, jak i w dorosłym organizmie. Jest to bardzo rozbudowana i różnorodna rodzina czynników, być może nieprecyzyjnie nazwana, ponieważ w miarę odkrywania nowych izoform okazało się, iż wiele FGF nie ma swoich receptorów na powierzchni fibroblastów, przez co nie wywołuje biologicznych aktywności w tych komórkach. Może to być związane z faktem, iż geny FGF są zlokalizowane w wielu miejscach w genomie, co sugeruje, że rodzina ta powstała poprzez genowe i chromosomowe duplikacje oraz translokacje zachodzące podczas ewolucji. Dotychczas u człowieka zidentyfikowano 22 izoformy FGF, z czego 15 to czynniki parakryne, 3 hormonopodobne, a 4 z nich są czynnikami wewnątrzkomórkowymi, które nie łączą się z receptorami [166].

Podczas rozwoju zarodkowego czynniki z rodziny FGF są odpowiedzialne za morfogenezę poprzez kontrolę proliferacji, przeżywalności, migracji oraz różnicowania komórek. Brak sygnalizacji ze strony FGF powoduje terminację ciąży w fazie gastrulacji. Może to mieć związek z faktem, iż rodzina czynników ma duży wpływ na wyodrębnianie się mezodermy, a listki zarodkowe kształtują się właśnie w trakcie gastrulacji. Ponadto wykazano istotną rolę czynników FGF w rozwoju układu nerwowego, mięśni, oraz rozwoju kończyn [167].

FGF-1, jak i FGF-2 były intensywnie badane pod kątem ich potencjału w gojeniu się ran. FGF-1 indukuje proliferację komórek w obszarze zranionym i promuje komórki do produkcji cytokin oraz innych czynników wzrostu, które indukują migrację makrofagów i monocytów

w kierunku miejsca urazu w celu usunięcia uszkodzonych lub martwych komórek [168], [169]. FGF jest także mitogenem dla komórek nabłonka oraz śródbłonka, które migrują w kierunku obszaru pourazowego. Zgodnie z pierwotną nazwą, FGF promuje wzrost i różnicowanie fibroblastów oraz indukuje komórki do uwalniania aktywatorów kolagenazy i plazminogenu, a ponadto ma swój udział w promowaniu angiogenezy uszkodzonych tkanek [170], [171]. Czynniki FGF odgrywają także rolę kardioprotekcyjną. Wykazano, że kilku członków rodziny FGF, w tym FGF-1, FGF-2, FGF-5, FGF-16, FGF-21 i FGF-23, odgrywa rolę w funkcjonowaniu serca. Sygnalizacja FGF jest niezbędna dla homeostazy kardiomiocytów poprzez fosforylację koneksyny 43 (Cx43), która jest wymagana do utrzymywania połączeń elektromechanicznych [172]. Wykazano także, iż FGF-1 jest uwalniany z tkanki mięśnia sercowego do płynu osierdziowego podczas ciężkiego niedokrwienia mięśnia sercowego [173].

Białka z rodziny czynników wzrostu fibroblastów zaczęły być rozpatrywane w kontekście regeneracji serca. Początkowo proponowano terapie, które polegały na iniekcji czynnika dosercowo. Tak właśnie podano czynnik FGF-2 wraz z heparyną, co w modelu szczurzym zaowocowało pozytywnym efektem terapeutycznym, czyli zahamowaniem postępującej niewydolności serca [174]. Kolejna próba z użyciem FGF w modelu zwierzęcym polegała na dosercowym wstrzyknięciu adenowirusowej konstrukcji zawierającej sekwencję kodującą dla czynnika FGF-5. Przeprowadzone badania funkcjonalne wykazały poprawę perfuzji, natomiast badania histologiczne ujawniły hipertroficzne kardiomiocyty, u których wykryto markery proliferacji. W tym przypadku badacze sugerowali, iż konstrukcja AdFGF5 może doprowadzić do poprawy kondycji serca poprzez stymulację hipertrofii miocytów mających pewien potencjał do podziałów i proliferacji, a nie jako wynik angiogenezy [175]. W miarę upływu czasu, sposób podawania substancji wspomagających w niewydolności serca ewoluował. Leczenie biodegradowalnymi hydrożelowymi mikrosferami zawierającymi FGF-2 poprawiło funkcję lewej komory i hamowało niekorzystną przebudowę lewej komory przez wzbudzenie angiogenezy u świń po przebytych zawale mięśnia sercowego [176]. Powodzenie przeprowadzonych na modelu zwierzęcym badań zachęciło do zapoczątkowania prób klinicznych na ludziach. Badania pod akronimem AGENT (ang. *Angiogenic GENE Therapy*-genowa terapia proangiogenna) doczekały się aż 4 kolejnych kontynuacji. Pacjentom z objawami dławicy piersiowej (następstwo niewydolności naczyń wieńcowych) podawano adenowirusową konstrukcję zawierającą sekwencje kodującą dla genu *FGF-4*. Pierwsza odsłona badań wykazała zwiększenie wydolności wysiłkowej u pacjentów poddanych terapii.

Co istotne, pojedyncza iniekcja dosercowa nie wykazała natychmiastowych skutków ubocznych. Kontynuacja badań, pod nazwą AGENT 2, wykazała poprawę perfuzji u chorych w grupie terapeutycznej, w porównaniu do pacjentów z grupy placebo. Kolejne badania (AGENT 3 i 4) wykazały z kolei, iż jedynie u kobiet nastąpiło zmniejszenie objawów choroby w stosunku do grupy placebo [177]–[179].

Biorąc pod uwagę potencjał terapeutyczny, plejotropowość działania, a także różnorodność białek z rodziny czynników wzrostu fibroblastów, stają się one potencjalnym kandydatem do testowania pod kątem terapeutycznym. Być może kombinacja izoformy czwartej czynnika wzrostu fibroblastów z jeszcze bardziej potentnym białkiem proangiogennym pozwoli na uzyskanie kompleksowego efektu terapeutycznego.

4.4. HIF-1 jako narzędzie terapeutyczne w chorobach niedokrwienych

Czynnik indukowany hipoksją (HIF-1) jest uznawany za potencjalne narzędzie terapeutyczne, które może być wykorzystane w leczeniu chorób cywilizacyjnych, takich jak choroby niedokrwienne (w tym leczenia niewydolności serca po zawale, bądź leczenie niedokrwienia kończyn) czy nowotwory. Podejście do terapii z wykorzystaniem czynnika indukowanego hipoksją zależne jest od efektu, jaki ma zostać osiągnięty. Można wyróżnić dwie podstawowe strategie: wzmacnianie lub podtrzymanie aktywności HIF-1 w przypadku chorób niedokrwienych lub inhibicja czynnika indukowanego hipoksją w stanach nowotworowych lub endometriozie.

Podstawowym założeniem terapeutycznej angiogenezy jest wzbudzenie neowaskularyzacji rejonu, w którym wystąpiło niedokrwienie. We wcześniejszych podrozdziałach wstępu omówiona została kwestia terapeutycznego zastosowania czynników proangiogennych w stanach niedokrwienia. Ponieważ hipoksja ma wpływ zarówno na najbardziej prominentne czynniki proangiogenne, jak i na cytokiny, pobudzanie lub podtrzymywanie aktywności czynnika HIF-1 może być obiecującym podejściem w regeneracji niedokrwionego rejonu. Dotychczas testowane terapie z użyciem HIF-1 oparte były na dwóch podejściach: aplikacji odpornych na degradację podjednostek - HIF-1 α /HIF-2 α – bądź indukcji ekspresji HIF-1 poprzez modyfikacje/dostarczanie/inhibicje cząsteczek związanych z aktywnością czynnika indukowanego hipoksją.

Wykazano, iż transfer sekwencji kodującej dla *HIF α* prowadził do wzmocnienia angiogenezy zarówno w obrębie pozawałowego mięśnia sercowego, jak i mięśni szkieletowych w

kończynach. Bezpośrednia iniekcja czynników indukowanych hipoksją, zawartych w wektorze adenowirusowym - AdHIF-1 α i AdHIF-2 α – nie wywoływała obrzęku tkankowego, podczas gdy zastosowanie tej samej dawki czynnika VEGF powodowało powstawanie wspomnianego efektu ubocznego. Dodatkowym benefitem był fakt, iż zastosowanie HIF w tym przypadku doprowadziło do uformowania stabilniejszych i dojrzałych naczyń w porównaniu z terapią adenowirusową z użyciem czynnika VEGF, gdzie nowo powstałe naczynia były mniej szczelne [180].

Aby zapobiec zależnej od tlenu degradacji HIF-1 α , podjęto próby modyfikacji tej podjednostki. Zaproponowano alternatywne podejście, polegające na zastosowaniu adenowirusa AdCA5, kodującego konstytutywnie aktywną formę podjednostki HIF-1 α . Efekt ten uzyskano za pomocą wprowadzenia delekcji w regionie odpowiedzialnym za degradację zależną od O₂. W modelu niedokrwienia kończyn, domięśniowa iniekcja wektora AdCA5 spowodowała przywrócenie przepływu krwi dzięki zaindukowaniu zarówno angiogenezy, jak i arteriogenezy [181]. Terapia z użyciem AdCA5 wzbudziła ekspresję kluczowych genów/białek szlaku tworzenia naczyń, które często były celem terapeutycznej angiogenezy w modelach niedokrwienia kończyn dolnych i serca, obejmując: FGF-2, HGF - czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*), PDGF-B, PlGF, SDF-1 i VEGF. Ponadto, iniekcja wektora AdCA5 wzmocniła neowaskularyzację w obrębie oka u myszy. Miało to związek z podwyższeniem ekspresji genów *PlGF* i *VEGF*, w odpowiedzi na regulację czynnikiem indukowanym hipoksją zawartym w wektorze adenowirusowym. Te badania udowadniają, iż synergistyczne działanie odgrywa kluczową rolę w terapiach z użyciem HIF, prowadząc do neowaskularyzacji rejonów objętych niedokrwieniem [182].

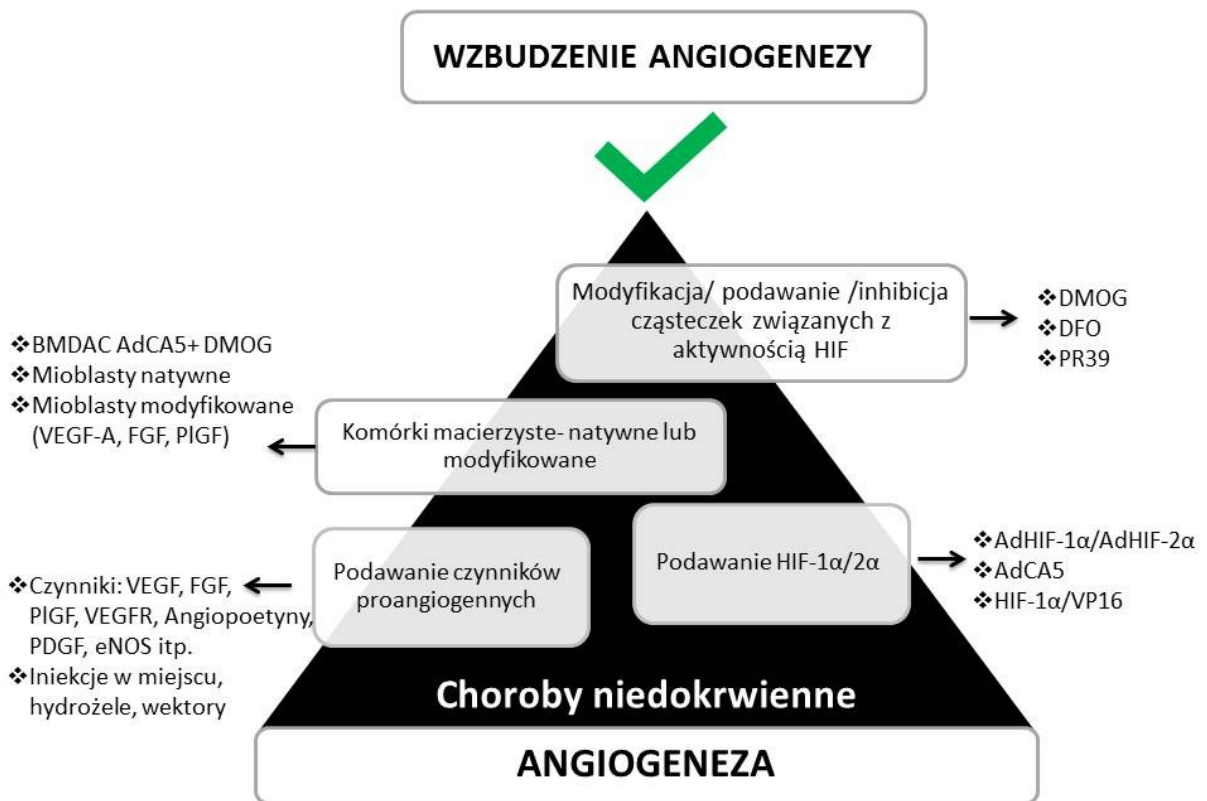
Zastosowano również podejście, które łączyło podanie wektora AdCA5 wraz z inhibitorem hydroksylaz prolinowych. Takim inhibitorem jest np. DMOG - dimetylooksaliloglicyna (ang. *dimethyloxalylglycine*). Badania *ex vivo* na pochodzących ze szpiku komórkach mezenchymalnych BMDAC (ang. *bone marrow-derived angiogenic cells*), które były hodowane w obecności inhibitora DMOG, wykazały, że zwiększa się ich proliferacja przy zmniejszonej śmiertelności. Badania *in vivo* na myszach z niedokrwieniem kończyn dolnych dowiodły, iż lokalna iniekcja wektora AdCA5 wraz z podaniem komórek hodowanych w obecności DMOG zapobiegła nekrozie i obumarciu chorej kończyny. Inne badania z wykorzystaniem inhibitora wykazywały zwiększenie właściwości proangiogennych

przeszczepianych komórek BMDAC, co przypisywano ich zwiększonej proliferacji, różnicowaniu i zasiedlaniu w rejonie niedokrwienia [183].

Stworzenie białka fuzyjnego to kolejny sposób umożliwiający dostarczenie stabilnej podjednostki HIF-1 α . Przygotowano konstrukcję, zawierającą domenę odpowiedzialną za wiązanie się do DNA oraz domenę dimeryzacyjną genu *HIF-1 α* . Te części składowe genu *HIF-1 α* połączono z domeną transaktywacyjną wirusa Herpes Simplex (V16). Tak przygotowany wektor użyto jako narzędzie terapeutyczne w modelu niedokrwienia kończyny tylnej u królika. Po dostarczeniu konstrukcji w rejon objęty hipoksją zaobserwowano, iż nastąpił wzrost przepływu krwi. Zjawisko to było następstwem zwiększenia liczby naczyń krwionośnych, które stworzyły kolateralny przepływ krwi [184].

Drugie podejście w przypadku terapii proangiogennej z użyciem czynnika HIF-1 miało na celu modyfikację aktywności podjednostki HIF-1 α lub dostarczenie cząsteczek mających zdolność jej modulowania. Stabilizacja podjednostki α w warunkach odpowiadających normoksji dla danej tkanki związana jest w dużej mierze z inhibicją hydroksylaz prolinowych. Jak wspomniano wcześniej, aktywność enzymów PHD jest ściśle zależna od obecności w komórce O₂, Fe(II) oraz 2-OG [50], [51]. Użycie związków niskocząsteczkowych, takich jak DFO - chelator jonów żelaza lub analogu 2-OG- N-oksaloglicyny, może blokować aktywność enzymatyczną białek PHD [185], [186]. Kolejnym inhibitorem hydroksylaz jest wcześniej wspomniany DMOG. Dostarczenie do krwioobrotu związku inhibującego (w modelu niedokrwienia kończyny tylnej) powodowało zwiększenie ilości białka HIF-1 α , co następnie skutkowało zwiększoną neowaskularyzacją rejonu objętego niedokrwieniem [185]. Alternatywnym narzędziem biologii molekularnej, gwarantującym stabilizację podjednostki HIF-1 α w warunkach normoksji, jest podanie peptydu, który zamiast inhibować aktywność enzymów katalizujących rozpad podjednostki, będzie stabilizował HIF-1 α . Peptyd PR39, pochodzący z makrofagów, ma zdolność stabilizowania podjednostki α czynnika indukowanego hipoksją poprzez ingerencję w system ubikwityna-proteasom. Podawanie PR39 skutkowało znaczącym wzrostem ilości białka HIF-1 α , niezależnie od niedokrwienia i hipoksji. Znalazło to odzwierciedlenie w terapiach pozawałowego serca myszy, gdzie po podaniu PR39 doszło do neowaskularyzacji serca [187].

Podsumowując, HIF-1 wykazuje właściwości terapeutyczne i może być stosowany jako odrębne narzędzie terapeutyczne. Ponadto, jako czynnik transkrypcyjny, może pośrednio wpływać na ekspresję prominentnych genów proangiogennej.



RYCINA 5. Możliwości terapeutyczne związane ze wzbudzeniem angiogenezy. Objasnienia: HIF-1 α - podjednostka α , czynnika indukowanego hipoksją. DMOG - inhibitor niskocząsteczkowy - dimetylooksaliiloglicyna; DFO - chelator jonów żelaza lub analogu; PR39 - peptyd stabilizujący podjednostkę HIF-1 α ; BMDAC AdCA5+DMOG - terapia kombinowana z użyciem komórek mezenchymalnych pochodzących ze szpiku, genetycznie zmodyfikowanych wektorem AdCA5 (zawierającym podjednostkę HIF-1 α , której ekspresja jest konstytutywna po ingerencji w domenę odpowiedzialną za degradację zależną od O₂) oraz z zastosowaniem inhibitora; mioblasty modyfikowane genami - VEGF-A (czynnik wzrostu śródbłonna- izoforma A), FGF (czynnik wzrostu fibroblastów), PlGF (łożyskowy czynnik wzrostu); podawanie czynników w postaci białek wektorów lub hydrożeli - VEGF, FGF, PlGF, Angiopoetyny, PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu), eNOS (endotelialna syntaza tlenu azotu); AdHIF-1 α /2 α - wektor adenowirusowy zawierający podjednostki czynnika indukowanego hipoksją; AdCA5 - wektorem zawierający HIF-1 α w postaci, która uniemożliwia degradację zależną od tlenu; HIF-1 α /VP16 - białko fuzyjne zawierającą domenę odpowiedzialną za wiązanie się do DNA oraz domenę dimeryzacyjną genu HIF-1 α , połączone z domeną transaktywacyjną wirusa Herpes Simplex (VP16). [Opracowanie własne].

II CEL PRACY

Celem pracy było 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.

Cel pracy realizowano poprzez wykonanie następujących zadań badawczych:

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.

III. MATERIAŁY I METODY

1. MATERIAŁY

1.1. Materiał biologiczny

Mioblasty ludzkie użyte do badań uzyskano na drodze izolacji z tkanki mięśniowej pobranej od pacjentów podczas wykonywania zabiegu rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego (ACL ang. *anterior cruciate ligament*). Tkanekę pozyskano przy współpracy z Ortopedyczno-Rehabilitacyjnym Szpitalem Klinicznym im. Wiktora Degi UM w Poznaniu. Prowadzone badania uzyskały zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Każdy pacjent, od którego uzyskano materiał, świadomie podpisywał zgodę na użycie materiału biologicznego dla celów naukowych. Informacje n/t pacjentów były anonimowo kodowane przed pozyskaniem tkanek, dla ochrony danych osobowych.

Dodatkowo, do badań użyto komercyjnie dostępne komórki HUVEC (endotelialne komórki żyły pępowinowej- komórki zawiesin pierwotnych).

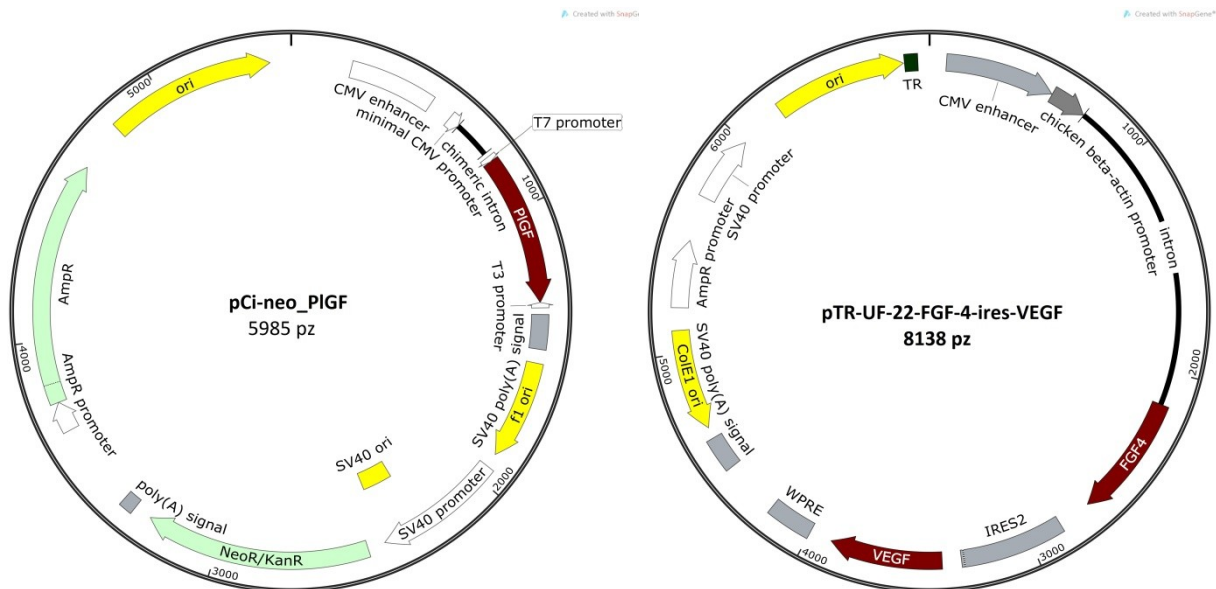
1.2. Zwierzęta laboratoryjne

Zwierzętami laboratoryjnymi użytymi do badań były myszy immunokompromisowane typu SCID oraz NOD-SCID. Gryzonie obydwu płci zakupiono w Jackson Laboratory, a następnie przewieziono je i przechowywano w Zwierzętarni Instytutu Genetyki Człowieka PAN. Doświadczenia prowadzono po osiągnięciu dojrzałości, tj. około 3 miesięcy. Wszystkie procedury na myszach wykonywane były za zgodą Lokalnej Komisji Bioetycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu

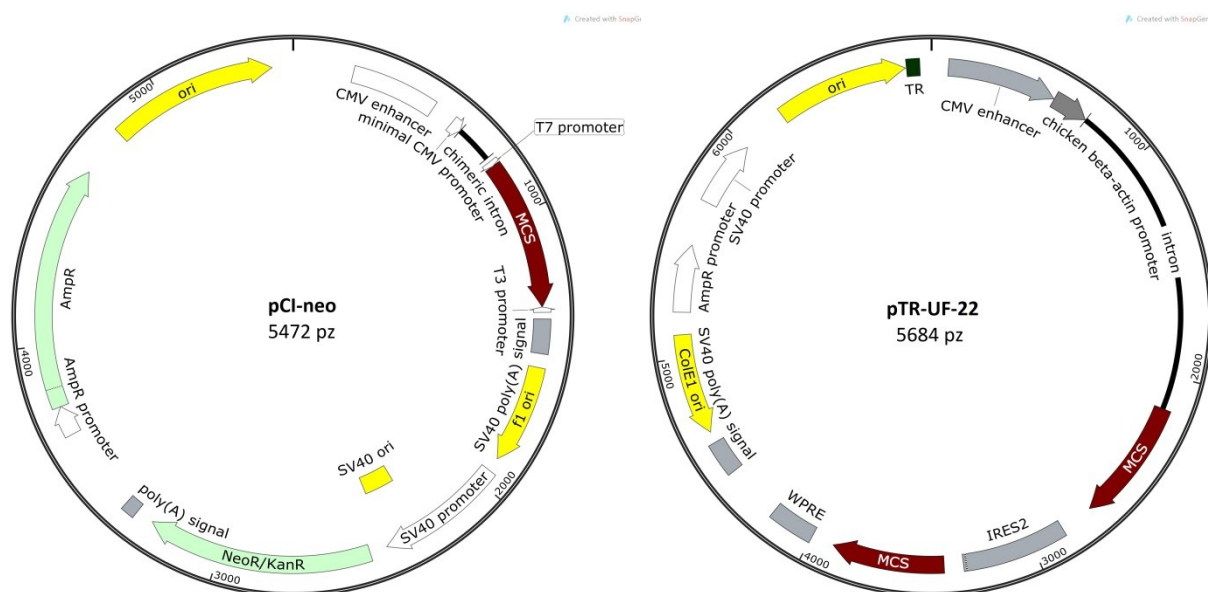
1.3. Plazmidy

Do modyfikacji używano plazmidów episomalnych. Wektor kodujący gen PIGF, powstał poprzez wklonowanie sekwencji kodującej genu PIGF w miejsce MCS (ang. *multicloning site*) do komercyjnie dostępnego wektora ekspresyjnego pCi-neo (dokładny opis w podrozdziałach 2.4.1 oraz 2.4.2). Bicystronowy wektor pTR-UF-22 z wklonwanymi sekwencjami kodującym dla czynnika *FGF-4* oraz *VEGF-A* został pozyskany dzięki uprzejmości prof. J. Dulaka, kierownika Zakładu Biotechnologii Medycznej, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Wektor reporterowy pEGFP-C1, został zakupiony w firmie Clontech (Mountain View, USA).

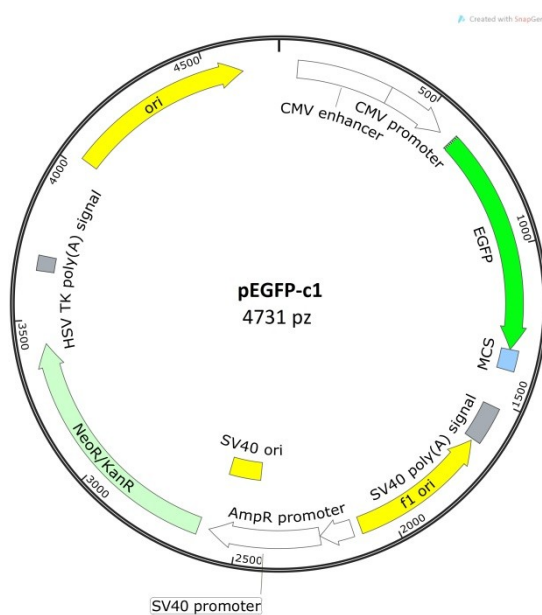
A. Plazmidy ekspresyjne



B. Plazmidy kontrolne



C. Plazmid reporterowy



RYCINA 6. Schematy poglądowe plazmidów używanych do transfekcji mioblastów ludzkich. A - plazmidy ekspresyjne używane do transfekcji przejściowej mioblastów ludzkich: pCi-neo-PIGF, zawierający sekwencję kodującą dla genu łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF ang. placental growth factor), pTR-UF-22-FGF-4-ires-VEGF - zawierający sekwencje kodujące dla genów czynnika wzrostu fibroblastów izoformy 4 oraz czynnika wzrostu śródbłonna połączone sekwencją Ires (umożliwiającej translację dwóch białek niezależnej od czapeczki na końcu 5' mRNA). B - plazmidy kontrolne, nie zawierające sekwencji genu - pCi-neo oraz pTR-UF-22. C - plazmid reporterowy pEGFP-C1, umożliwiający wzbudzenie nadekspresji białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. green fluorescent protein) w komórkach ssaczych, w celu monitorowania wydajności procesu transfekcji.

1.4. Odczynniki

TABELA 1. Odczynniki do hodowli komórek eukariotycznych.

Lp.	Odczynniki	Producent
1.	Antybiotyki przeciwbakteryjne i p/grzybicze - Pen/Strep Amfoterycyna B	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
2	Bydlęca surowica płodowa FBS (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
3	DPBS	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
4	Dimetylosulfotlenek DMSO (ang. <i>Dimethyl Sulfoxide</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
5	Medium do hodowli komórek endotelialnych EGM-2	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
6	Czynnik wzrostu naskórka (hEGF ang. <i>Epidermal Growth Factor</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
7	Ekstrakt z zarodków kurczących CEE (ang. <i>Chick Embryo Extract</i>)	Sera Laboratories International, West Sussex, Wielka Brytania
8	Hydrokortyzon	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
9	Trypsyna 10X (5g/l <i>Trypsin-EDTA</i>)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
10	Ultraglutamina (L-Alanylo-L-Glutamina)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
11	Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów bFGF (ang. <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
12	Zmodyfikowane medium Eagle'a wg. Dulbecco DMEM (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
13	Żelatyna	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

TABELA 2. Odczynniki do transfekcji.

Lp.	Odczynnik	Producent
1	<i>Nutrient Mixture F-10 Ham</i> - medium odżywcze F10	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
2	Plazmidy: pCiNeo, pCiNeo_PIGF eGFP pTR-UF-22 pTR-UF-22 -FGF-4-ires-VEGF	Promega, Madison, USA ZBRiKM Clontech, Mountain View, USA ZBRiKM ZBRiKM
3	Zmodyfikowane medium Eagle'a wg. Dulbecco DMEM (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

TABELA 3. Odczynniki do przechowywania zebranych próbek biologicznych.

Lp.	Odczynnik	Producent
1	Bufor zabezpieczający RNA Later	Invitrogen, Carlsbad, USA
2	Formalina	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
3	TRI® Reagent – odczynnik do izolacji RNA/DNA/białka	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

TABELA 4. Odczynniki do barwień immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	Etanol absolutny	POCH S.A., Gliwice, Polska

2	Alkohol etylowy 96%	POCH S.A., Gliwice, Polska
3	Alkohol etylowy 70%	POCH S.A., Gliwice, Polska
4	EDTA- kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>Ethylenedinitrilo-tetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4	<i>Tween 20</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5	Surowica mysia	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
6	Surowica kozia	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
7	Surowica bydłęca	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
8	Buforowany roztwór soli fosforanowych PBS (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
9	Tryton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10	<i>DAPI anti fade</i> - odczynnik barwiący jądra	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
11	Żelatyna glicerolowa	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
12	Roztwór Hematoksyliny Mayera	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
13	Eozyna Y	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

TABELA 5. Przeciwciała.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	anty-CD56-PC5	Beckman Coulter, Brea, USA
2	anty-HIF1 α	Abcam Cambridge (Wielka Brytania)
3	anty-Mitochondria	Merck, Darmstadt, Niemcy
4	anty-mysie II rzędowe (Alexa Fluor 488)	Abcam Cambridge (Wielka Brytania)
4	anty-DESMINA	Abcam Cambridge (Wielka Brytania)

TABELA 6. Odczynniki do utrwalania materiału.

Lp.	Odczynnik	Producent
1	4% roztwór paraformaldehydu	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
2	Formalina	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

TABELA 7. Odczynniki do izolacji RNA, mRNA oraz odwrotnej transkrypcji.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	5X Bufor dla odwrotnej transkryptazy	Invitrogen, Carlsbad, USA
2	Alkohol etylowy 75%	POCH S.A., Gliwice, Polska
3	Chloroform	Merck, Darmstadt, Niemcy
4	DEPC (Dietylopirowęglan) (ang. <i>Diethylpyrocarbonate</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
4	DTT - Ditiotreitól (ang. <i>Dithiothreitol</i>)	Invitrogen, Carlsbad, USA
5	<i>Dynabeads</i> ® Oligo (dT)25	Invitrogen, Carlsbad, USA
6	EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>Ethylenedinitrilo-tetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
7	Etanol absolutny	POCH S.A., Gliwice, Polska
8	Izopropanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

9	Mieszanina nukleotydów - dNTP Mix 10mM	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
10	Odwrotna transkryptaza <i>SuperScript™ III</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
11	RNasin	Invitrogen, Carlsbad, USA
12	TRI® Reagent – odczynnik do izolacji RNA/DNA/białka	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

TABELA 8. Odczynniki do reakcji PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	Bufor dla reakcji PCR 10X	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
2	iQ™ SYBR® Green Supermix	Biorad, Hercules, USA
3	Mieszanina nukleotydów - dNTP Mix 10mM	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
4	Polimeraza DNA Taq	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
5	Startery	Oligo.pl, Warszawa, Polska

TABELA 9. Sekwencje starterów używanych w reakcjach PCR i PCR w czasie rzeczywistym.

Organizm	Nazwa		Sekwencja	Wielkość (Pz)
<i>H. sapiens</i>	β - <i>AKTYNA</i>	F	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTCC-3'	192
		R	5'-ATCTTGATCTTCATTGTGCTG-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>TBP</i>	F	5'-CGGGCACCCTCCACTGTATC-3'	177
		R	5'-ATTTCGGCGTTTCGGGCA-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>GAPDH</i>	F	5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3'	204
		R	5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGA-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Gapdh</i>	F	5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3'	204
		R	5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGA-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Hprt</i>	F	5'-ACAGGCCAGACTTTGTTGGAT-3'	160
		R	5'-TGCAGATTCAACTTGCGCTC-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Tpt</i>	F	5'-CCGAGCGTGCCCTCTATATG-3'	186
		R	5'-GAGAACAGCTCGTCATGGCT-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>FGF-4</i>	F	5'-TATGGCTCGCCCTTCTTCAC-3'	142
		R	5'-CTCGGTTCCCCTTCTTGGTC-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Hif-1α</i>	F	5'-GCTGAAGACACAGAGGCAAAG-3'	164
		R	5'-GTGCTCATACTTGGAGGGCTT-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>HIF-1 α</i>	F	5'-TTGGCAGCAACGACACAGAA-3'	82
		R	5'-TTGGGTGAGGGGAGCATTACA-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Fflt-1</i>	F	5'-GCTTTCACCGAACTCCACCT-3'	162
		R	5'-AGTCCCGCCTCCTTGCTTT-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>FLT-1</i>	F	5'-CTACCACTCCCTTGAACACGA-3'	190
		R	5'-GGTCCACTCCTTACACGACA-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Kdr</i>	F	5'-TCTGGACTCTCCCTGCCTAC-3'	128
		R	5'-CGGCTCTTTCGCTTACTGTTC-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>KDR</i>	F	5'-TGCCTACCTCACCTGTTTCC-3'	115
		R	5'-CGGCTCTTTCGCTTACTGTTC-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>PIGF-</i>	F	5'-CTCGAGCTGAGAAGATGCCGGTCATGAGGCT-3'	513

	<i>orf</i>	R	5'-TCTAGAAGCCGGGTGCGGGGTCTCTCTCCTC3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>PlGF</i>	F	5'-GGCTCGTCAGAGGTGGAAGT-3'	145
		R	5'-GCAGCAGGGAGACACAGGAT-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Plgf</i>	F	5'-GTGTCCTTCTGAGTCGCTGT-3'	197
		R	5'-CCTTTCTGCCTTTGTCGTCT-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>TBP</i>	F	5'-CGGGCACCCTCCACTGTATC-3'	177
		R	5'-ATTTCGGCGTTTCGGGCA-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>VEGF-A</i>	F	5'-AAGGAGGAGGGCAGAATCAT-3'	143
		R	5'-CACACAGGATGGCTTGAAGA-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Vegf-a</i>	F	5'-TCCTGTGTGCCGCTGATG-3'	121
		R	5'-GCTGGCTTTGGTGAGGTTTG-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Vegf-b</i>	F	5'-GTCGCCTGCTGCTTGTTG-3'	88
		R	5'-ACTTTCTTCTGGTGGCTGGG-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Vegf-c</i>	F	5'-AGATGTGGGGAAGGAGTTTG-3'	193
		R	5'-ACTGATTGTGACTGGTTTGGG-3'	
<i>M. musculus</i>	<i>Vegf-d</i>	F	5'-CTGGGGAAGACAACCAACAC-3'	172
		R	5'-CAGGCACTAACTCGGGCA-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>MIOG</i>	F	5'-GCTGTATGAGACATCCCCCTA-3'	226
		R	5'-CGACTTCCTCTTACACACCTTAC-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>MYF5</i>	F	5'-TGCAGGAGTTGCTGAGAGAGCA-3'	120
		R	5'-CAGGACTGTTACATTCGG-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>MRF4</i>	F	5'-CTTCAGCTACAGACCCAAACA-3'	96
		R	5'-CCTGGAATGATCGGAAACAC-3'	
<i>H. sapiens</i>	<i>MYOD</i>	F	5'-ACGGCATGATGGACTACAG-3'	212
		R	5'-CGACTCAGAAGGCACGTC-3'	

TABELA 10. Odczynniki do elektroforezy oraz izolacji DNA z żelu agarozowego.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	Agaroz typ I	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
2	Agaroz o szerokim zakresie rozdziału (ang. <i>high resolution</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
3	Bromek etydyny 10mg/ml	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
4	Bufor obciążający (<i>Loading Dye 6X</i>)	Fermentas, Burlington, Kanada
6	Zestaw do ekstrakcji z żelu	Qiagen, Hilden, Niemcy
8	Kwas octowy	POCH S.A., Gliwice, Polska
9	Marker wielkości DNA 50bp	Fermentas, Burlington, Kanada
10	Marker wielkości DNA 1kb	Fermentas, Burlington, Kanada
11	Bufor Trizma™ (Tris – C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

TABELA 11. Odczynniki używane do cytometrii przepływowej.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	Aneksyna V-FITC Kit do detekcji apoptozy	Beckman-Coulter, Brea, USA
2	Buforowany roztwór soli fosforanowych PBS (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

3	Buforowany roztwór soli fosforanowych PBS z jonami Ca ²⁺ i Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
4	Bydłęca surowica płodowa FBS (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
5	Jodek propidyny	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

TABELA 12. Odczynniki do hodowli bakteryjnej, transformacji oraz ligacji.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	Agar mikrobiologiczny	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
2	Ampicylina	Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska
3	Baktotrypton	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
4	Ekstrakt drożdżowy	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
5	Glukoza	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
6	Kanamycyna	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
7	MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
8	MgSO ₄	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
9	NaCl	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
10	Plazmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Niemcy
11	Plazmid Mini	Kucharczyk T.E., Warszawa, Polska

TABELA 13. Odczynniki do analizy restrykcyjnej plazmidów.

Lp.	Odczynnik	Pochodzenie
1	Bufor FastDigest Green	Thermo Scientific, Carlsbad, USA
2	Enzym restrykcyjny FastDigest XbaI	Thermo Scientific, Carlsbad, USA
3	Enzym restrykcyjny FastDigest XhoI	Thermo Scientific, Carlsbad, USA
4	Enzym restrykcyjny FastDigest HindIII	Thermo Scientific, Carlsbad, USA
5	Enzym restrykcyjny FastDigest NotI	Thermo Scientific, Carlsbad, USA
6	Enzym restrykcyjny FastDigest EcoRV	Thermo Scientific, Carlsbad, USA

1.5. Bufory

Bufor do elektroforezy agarozowej: TAE 1X (Tris-Acetate-EDTA), pH= 8,0

- 40 mM Tris buforowany kwasem octowym
- 1 mM EDTA, kwas etylenodiaminotetraoctowy

Bufor obciążający wykorzystywany w elektroforezie w żelu agarozowym

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
- 0,03% Błękit bromofenolowy
- 0,03% Cyjanol ksylenu
- 60% Glicerol
- 60 mM EDTA kwas etylenodiaminotetraoctowy

Bufory do barwienia miotub

- Bufor A: 66 mM KH₂PO₄ pH 4,5

→ Bufor B: 66 mM Na₂HPO₄*7H₂O pH 9,0

Bufor wiążący do izolacji mRNA (ang. *Binding Buffer*)

→ 20 mM Tris-HCL, pH = 7,5

→ 1 mM LiCl

→ 0,2 mM EDTA kwas etylenodiaminotetraoctowy

Bufor płuczący do izolacji mRNA (ang. *Washing Buffer B*)

→ 10 mM Tris-HCL, pH = 7,5

→ 0,15 M LiCl

→ 1 mM EDTA kwas etylenodiaminotetraoctowy

Bufor enzymatyczny do izolacji mRNA (ang. *First Strand Buffer*)

→ 250 mM Tris-HCL, pH = 8,3

→ 375 mM KCl

→ 15 M MgCl₂

1.6. Media hodowlane

A. Medium do hodowli mioblastów ludzkich *in vitro*

Zmodyfikowane Medium Eagle'a wg. Dulbecco – DMEM
zawartość glukozy 4,5 g/l

+ Bydłęca surowica płodowa – FBS	20%
+ L-Alanylo-L-Glutamina	1%
+ Pen/Strep Amfoterycyna B	1%
+ Czynniki wzrostu bFGF	5 ng/ml

B. Medium do hodowli *in vitro* komórek śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC)

Medium 200

+ Suplement dużych naczyń endotelialnych	50x
--	-----

C. Medium różnicujące do mioblastów ludzkich

Zmodyfikowane Medium Eagle'a wg. Dulbecco – DMEM
zawartości glukozy 4,5 g/l

+ Surowica końska	2%
+ L-Alanylo-L-Glutamina	1%
+ Pen/Strep Amfoterycyna B	1%

D. Medium do transplantacji mioblastów ludzkich

Zmodyfikowane Medium Eagle'a wg. Dulbecco – DMEM
zawartość glukozy 4,5 g/l bez fenolu red

+ albumina surowicy bydłowej – BSA	2%
------------------------------------	----

E. Medium do mrożenia komórek

→ Medium podstawowe	10%
→ DMSO- dimetylosulfotlenek	10%
→ FBS- bydlęca surowica płodowa	80%

F. Pożywka mikrobiologiczna LB (ang. *Lysogeny Broth*), pH=7,0

→ Bakteriotrypton	1%
→ NaCl	1%
→ Ekstrakt z drożdży	0,5%

G. Pożywka mikrobiologiczna SOC (ang. *Super Optimal Catabolite Repression*)
używana do elektroporacji bakterii

→ Bakteriotrypton	1%
→ NaCl	1%
→ Ekstrakt z drożdży	0,5%
→ Glukoza	20 mM
→ MgCl ₂	10 mM
→ MgSO ₄	10 mM

H. Pożywka mikrobiologiczna stała- agarowa

→ Agar mikrobiologiczny	2%
→ Bakteriotrypton	1%
→ NaCl	1%
→ Ekstrakt z drożdży	0,5%

1.7. Aparatura

TABELA 14. Spis używanej aparatury

L.p.	Nazwa	Producent
1.	Aparat do elektroforezy	Kucharczyk T.E., Warszawa, Polska
2.	Aparat Canon EOS100D z obiektywem 18-55mm III	Canon, Tokio, Japonia
3.	Binokular operacyjny	World Precision Instruments, Sarasota, USA
4.	Cieplarka bakteryjna	Elkon, Łódź, Polska
5.	Spektrofotometr do odczytu płytek 96-dółkowych	BioTek, Winooski, USA
6.	Ezy	Sarsted
7.	Elektroporator Gene Pulser X-cell	Biorad, Hercules, USA

8.	Homogenizator T10 Basic ULTRA-TURRAX®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Niemcy
9.	Inkubator HERAccl	Kendro Langensfeld, Niemcy
10.	Kołyska	Elmi, Warszawa, Polska
11.	Komora laminarna Heraeus HERAsafe	Kendro, Langensfeld, Niemcy
12.	Końcówki do mikropipet bez filtra	Medlab-Products, Raszyn, Polska
13.	Końcówki do mikropipet z filtrem	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Niemcy
14.	Łaźnia wodna	AJL Electronic, Kraków, Polska
15.	Mikropipety	HTL, Warszawa, Polska
16.	Mikropipeta wielokanałowa	HTL, Warszawa, Polska
17.	Mikroskop odwrócony Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy
18.	Mikroskop fluorescencyjny Leica DMI8	Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy
19.	Naczynia hodowlane 25cm ² , 75cm ² z filtrem	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
20.	Narzędzia chirurgiczne do operacji myszy	Aesculap-Chifa, Nowy Tomyśl, Polska
21.	Nici chirurgiczne	B. Braun, Melsungen, Niemcy
22.	Parafilm „M”	Pechiney Plastic Packaging, Chocago, USA
23.	Parownik do izofluranu	Farum, Warszawa, Polska
24.	Pipetor SWIFTPET+	HTL, Warszawa, Polska
25.	Pipety 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
26.	Płytki 96-dołkowe do PCR w czasie rzeczywistym	Greiner BioOne, Frickenhausen, Niemcy
27.	Płytki Petriego	Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA
28.	Probówki 0.2ml, 0.5ml, 1.5ml, 2.0ml	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
29.	Probówki 15ml, 50ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
30.	Stojak magnetyczny Dynal	Invitrogen, Carlsbad, USA
31.	Respirator MiniVent	Hugo Sachs Electr., Harvard App., March, Niemcy
32.	Roller	CAT, Warszawa, Polska
33.	Spektrofotometr ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
34.	Termocykler PTC-200	MJ Research, San Francisco, USA
35.	Termocykler do Real-Time PCR: CFX Connxt™ Real-Time System	Biorad, Hercules, USA
36.	Waga laboratoryjna	Axis, Gdańsk, Polska
37.	Waga laboratoryjna, analityczna	Sartorius, Goettingen, Niemcy
38.	Wirówka 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
39.	Wirówka 5417R	Eppendorf, Hamburg, Niemcy

40.	Wytrząsarka do bakterii	New Brunswick Scientific, Edison, USA
41.	Vortex Genie® - 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
42.	Zasilacz do elektroforezy model 200	Biorad, Hercules, USA

2. METODY

2.1. Izolacja oraz podstawowe metody charakterystyki mioblastów ludzkich

Pozyskane tkanki poddawano obróbce mechanicznej oraz enzymatycznej. Ręcznie usuwano pozostałości tkanki tłuszczowej i łącznej, rozdrabniano, a następnie trawiono enzymatycznie z użyciem kolagenazy typu II przez 45 minut, z jednoczesnym wytrząsaniem, co gwarantowało uwolnienie komórek z tkanki. Uzyskaną po trawieniu, heterogenną zawiesinę resztek tkanki, izolowanych mioblastów i roztworu enzymatycznego, rozcieńczano płynem Hanksa (HBSS ang. *Hank's Balanced Salt Solution*), hamując aktywność enzymu. Tak przygotowaną mieszaninę wirowano 1200 obr/min przez 10 min, supernatant zbierano, a powstały osad zawieszano w medium hodowlanym i przenoszono do flaszki hodowlanej pokrytej 0,1% żelatyną. Następnie, komórki hodowano w standardowych warunkach *in vitro*, co 2 dni przenosząc zawiesinę do kolejnych flaszek hodowlanych. Medium suplementowano czynnikiem FGF (w st. 5 ng/ml), hamującym różnicowanie komórek. Komórki hodowano do uzyskania odpowiedniej liczebności (około 3 pasaży), po czym mrożono je w temperaturze oparów ciekłego azotu, tj. ok. -180° C.

Mioblasty użyte do badań posiadały pełną kartę charakterystyk, tj. wyniki badania cytometrycznego na obecność antygenów powierzchniowych typowych dla komórek miogennych - CD56; wyniki barwienia immunofluorescyjnego w celu potwierdzenia obecności DES - desminy (marker młodych komórek miogennych) oraz MHC - ciężki łańcuch miozyny, ang. *myosin heavy chain* (marker komórek zróżnicowanych), jak również test funkcjonalny wykazujący zdolność komórek macierzystych mięśni szkieletowych do różnicowania w dojrzałe miotuby.

Mioblasty pierwotne używane do badań, przechodziły maksymalnie do 9 pasaży w trakcie trwania wszystkich eksperymentów. W sumie ciągłość hodowli zachowywano przez około miesiąc.

2.1.1 Cytometryczne oznaczenie czystości populacji komórek miogennych

W celu analizy cytometrycznej pozyskiwano około $2,5 \times 10^5$ komórek i zawieszano je w 100 μ l PBS z 2% FBS, a następnie dodawano 10 μ l przeciwciała anty CD56-PC5. Po 20-minutowej inkubacji w ciemności, zawiesinę rozcieńczano, dodając 1 ml PBS z 2% FBS i wirowano przez 5 min 1200 obr/min. Przed poddaniem analizie cytometrycznej, osad komórkowy zawieszano w 500 μ l PBS z 2% FBS.

2.1.2. Immunofluorescencja

Zasada barwienia immunofluorescencyjnego opiera się na zastosowaniu swoistego wobec konkretnego antygeny przeciwciała, skoniugowanego z czynnikiem umożliwiającym detekcję (fluorochrom). Przed wykonaniem barwienia, komórki przenoszono na 10-dołkowe szkiełka do immunocytochemii ($1,5 \times 10^4$ / 50 μ l/ dołek). Następnie inkubowano szkiełka przez 24 h w standardowych warunkach *in vitro*, aby doszło do adhezji mioblastów. Komórki płukano w soli PBS i utrwalano w roztworze 4% paraformaldehydu w PBS (15 minut, 4° C), a następnie trzykrotnie przemywano je w PBS. W celu permeabilizacji błon komórkowych utrwalonych komórek, inkubowano je w roztworze 0,1% Triton X-100 w PBS przez 15 minut. Następnie zablokowano nieswoiste epitopy poprzez inkubację prób z 10% surowicą w PBS, w wilgotnej komorze, przez 60 minut (temperatura pokojowa). Tak przygotowany preparat inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym (w odpowiednim rozcieńczeniu) przez noc, w temperaturze 4° C. Jeden z dołków inkubowany był z PBS (kontrola negatywna - bez przeciwciała I-rzędowego). Następnego dnia, każdy z dołków płukano trzykrotnie w PBS i nakładano przeciwciała drugorzędowe (w odpowiednim rozcieńczeniu) sprzężone z fluorochromem.

W celu charakterystyki populacji ludzkich mioblastów stosowano przeciwciała I rzędowe swoiste dla desminy (rozcieńczenie 1:200) oraz MHC (rozcieńczenie 1:500). W celu detekcji sygnału wykorzystywano przeciwciała II rzędowe skoniugowane z fluorochromem Alexa Fluor 488. Dodatkowo, używano barwnika fluorescencyjnego znakującego jądra – DAPI. Tak przygotowane preparaty obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Leica DMI8.

2.1.3. Test funkcjonalny - różnicowanie mioblastów w miotuby

Mioblasty rozłożono, w standardowym medium, na naczynia hodowlane (w dużym zagęszczeniu; $1,2 \times 10^5$ komórek/ 1 cm^3). Hodowle prowadzono do osiągnięcia 100% konfluencji, a następnie zmieniano medium na różnicujące (z 2% zawartością surowicy

końskiej). Przez kolejny tydzień odnawiano medium co 3 dni, a następnie komórki utrwalano w schłodzonym utrwalaczu, złożonym z metanolu i kwasu octowego (w stos obj. 3:1), przez 15 minut. Po upływie inkubacji, preparaty płukano buforem PBS i zalewano 10% roztworem Giemzy zawieszonym w buforze powstałym ze złożenia roztworów A i B (opisane w podrozdziale 1.5. Bufory). Odczynnik Giemzy, jak i bufor do zawieszania, przygotowywano bezpośrednio przed doświadczeniem. Po 30 min inkubacji, odczynnik odpłukiwano wodą z dodatkiem kwasu octowego (ok. 50 μ l na litr), celem poprawy wydajności usuwania niezwiązanego odczynnika. Następnie przeprowadzano analizę mikroskopową (używając mikroskopu Leica DMi8) i dokumentowano wyniki.

2.2. Hodowla komórkowa *in vitro*

Mioblasty ludzkie oraz komórki HUVEC hodowano w naczyniach o pojemności 75 cm², zawieszane w 10 ml medium. Medium zmieniano z częstotliwością co 2-3 dni. Pasaż komórek przeprowadzano po osiągnięciu około 80% konfluencji. Po usunięciu medium, komórki płukano dwukrotnie 10 ml roztworu soli DPBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺. Komórki traktowano 3 ml roztworu trypsyny (0,5 g/L) + EDTA. Działanie trypsyny blokowano dodaniem odpowiedniej objętości kompletnego medium, w którym kluczową rolę w unieczynnieniu enzymu spełniała surowica. Następnie, komórki rozdzielano na odpowiednią ilość naczyń, gwarantującą optymalną konfluencję początkową (20/30%). W przypadku komórek HUVEC dopuszcza się maksymalną ilość pasaży do czterech, aby w kolejnych etapach zgodnie z ich przeznaczeniem mogły efektywnie formować prymitywne naczynia krwionośne. Procedura hodowli *in vitro* jest identyczna jak w przypadku mioblastów ludzkich (za wyjątkiem składu używanego medium).

Hodowle *in vitro* komórek HUVEC prowadzono w inkubatorze, w standardowych warunkach, w 37° C i atmosferze 5% CO₂. Mioblasty ludzkie, modyfikowane genetycznie, jak i natywne, hodowane były w różnych warunkach tlenowych, zarówno w warunkach standardowych (ok. 21% O₂), jak i normoksji (5% O₂) i hipoksji (3% O₂) - zoptymalizowanych na potrzeby eksperymentu.

2.3. Optymalizacja warunków hipoksji

Optymalizacja miała na celu ustalenie modelu hipoksji maksymalnie zbliżonego do warunków tlenowych występujących w sercu pozawałowym. W tym celu wykorzystano marker hipoksji *HIF-1 α* . Zastosowano kompleksowe podejście łączące ze sobą badania w

warunkach *in vitro* oraz transplatacji mioblastów w hipoksyjny rejon pozawałowego serca myszy. Jego ekspresja została oznaczona w komórkach, które hodowano w warunkach *in vitro* w różnych stężeniach tlenu: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% przez 24 h i 7 dni. W każdym wymienionym punkcie czasowym próbki kolekcjonowano, aby następnie wyizolować z nich RNA, mRNA i otrzymać cDNA. Aby określić, jaki wpływ na komórki miała hodowla *in vitro* w różnych warunkach tlenowych, badano ekspresję genu *HIF-1 α* , który uznawany jest za marker hipoksji. W ten sposób przygotowano zależność ekspresji markera *HIF-1 α* w odniesieniu do różnych stosowanych stężeń tlenu.

Aby poznać jaki wpływ na mioblasty mają warunki tlenowe panujące w sercu po zawale, wykonano badanie *in vivo* z użyciem myszy immunokompromisowanych typu SCID. Do eksperymentu zakwalifikowano 16 myszy (Tabela 19). W trakcie podwiązania lewej tętnicy wieńcowej (procedura opisana w sekcji „Badania na zwierzętach” 2.6.), dokonano transplatacji mioblastów ludzkich w rejon, który został objęty zawałem (3 x10 μ l każdorazowo po 0,5 x10⁶ komórek) - transplatację mioblastów przedstawiono w rozdziale 2.6.3. Następnie, myszy terminowano po 24 h, w 7 dni i 28 dni po zawale/podaniu komórek. Kontrolę stanowiły serca, do których podano mioblasty ludzkie bez uprzedniego wywoływania zawału. Po terminacji zwierząt w odpowiednich punktach czasowych skolekcjonowano serca, w których znajdowały się komórki ludzkie - materiał zabezpieczono w taki sposób, że mógł być przechowywany do momentu izolacji w temperaturze -80⁰ C (z użyciem odczynnika RNALater). Następnie, z serc izolowano RNA, po czym uzyskiwano frakcje mRNA i za pomocą odwrotnej transkrypcji przepisywano na cDNA (metody opisane sekcjach 2.3.1; 2.3.2; 2.3.3). Aby określić, jaki wpływ miały warunki tlenowe panujące w miokardium na mioblasty ludzkie, za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) oznaczano ekspresję genu *HIF-1 α* w komórkach ludzkich znajdujących się w sercu po podaniu intrakardialnym. W tym celu użyto metody qPCR ze starterami swoistymi dla produktu pochodzącego z komórek ludzkich. Jako geny referencyjne użyto ludzkiej β -*AKTYNY* oraz ludzkiego *TBP* (czynnik transkrypcyjny wiążący domenę TATA, ang. *TATA-box binding protein*). Uzyskana w ten sposób ekspresja genu *HIF-1 α* została następnie wykorzystana do optymalizacji hipoksji w warunkach *in vitro*.

TABELA 15. Myszy wraz z procedurami, które zostały wykonane w trakcie trwania eksperymentu.

	Echo serca przed zabiegiem	Echo serca Terminacja 24h po zawale/podaniu komórek	Echo serca Terminacja 24h po podaniu komórek	Echo serca Terminacja w 7 dni po zawale/podaniu komórek	Echo serca Terminacja w 7 dni po podaniu komórek	Echo serca Terminacja w 28 dni po zawale/podaniu komórek	Echo serca Terminacja w 28 dni po podaniu komórek
	Numer myszy	1/233 16/273 17/273 5/239 22/276 23/276 2/234 18/274 19/274 20/275 6/239 21/275 3/234 12/272 4/234 7/270	1/233 16/273 17/273	5/239 22/276 23/276	2/234 18/274 19/274 20/275	6/239 21/275	3/234 12/272

Aby dobrać odpowiednie warunki tlenowe dla hodowli *in vitro*, które jak najbardziej odpowiadały warunkom panującym w sercu, oznaczony poziom ekspresji genu *HIF-1α* uzyskany z hodowli *in vitro* w różnych warunkach tlenowych porównano do ekspresji genu *HIF-1α* z mioblastów ludzkich transplantowanych do mysiego serca pozawałowego. Tak oznaczona zależność ekspresji genu *HIF-1α* do warunków tlenowych pozwoliła na wybranie warunków odpowiadających hipoksji w sercu po zawale oraz wytypowanie (posiłkując się danymi z literatury) warunków normoksji dla mioblastów ludzkich, a także ustalenie odpowiedniego czasu hodowli w zmienionych warunkach tlenowych.

2.3.1. Ekstrakcja RNA z komórek

Komórki hodowane w różnych warunkach tlenowych zostały zabezpieczone w odczynniku TRI Reagent, który umożliwia izolację RNA/DNA oraz białka. W celu zbadania ekspresji genów dokonano izolacji kwasu rybonukleinowego (RNA) za pomocą zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego. Do prób dodawano 200 µl chloroformu, wytrząsano przez 15 sek., a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po upływie 3 minut próbki wirowano w 14 000 obr/min przez 15 min w temperaturze 4° C, w celu uzyskania rozdziału fazowego. Zbierano górną frakcję wodną, zawierającą RNA, które wytrącano dodając do fazy wodnej 500 µl izopropanolu i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie wirowano w 14 000 obr/min przez 10 minut w 4° C. Po usunięciu supernatantu, osad RNA przemywano 1 ml 75% etanolu. Po zwirowaniu próbek w 7 500

obr/min przez 5 minut w 4° C, supernatant ponownie usuwano, a osad poddawano 5 minutowemu suszeniu na lodzie. RNA rozpuszczano w 30 µl wody pozbawionej rybonukleaz. Następnie wykonywano analizę ilościową przy pomocy spektrofotometru *NanoDrop® ND-1000* oraz jakościową za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (1,5%).

2.3.2. Pozyskanie frakcji mRNA

Posiadając wyizolowaną całkowitą pulę RNA, pozyskiwano oczyszczoną frakcję mRNA, dzięki zastosowaniu paciorków magnetycznych (*Dynabeads*) opłaszczonych oligo(dT)₂₅ komplementarnych do fragmentu poli(A) cząsteczek mRNA.

Do izolacji wykorzystano 10 µg całkowitego RNA zawieszonego w 20 µl wody DEPC. Aby pozbyć się struktur II-rzędowych, próbki inkubowano 2 minuty w temperaturze 65° C, następnie przenoszono je na lód i pozostawiano na 10 minut. W tym czasie przygotowywano paciorki magnetyczne. 20 µl paciorków pobierano i umieszczano w probówkach na stojaku magnetycznym. Oddziaływanie magnetyczne powodowało oddzielenie paciorków od buforu, w którym były zawieszone, umożliwiając jego zebranie. Następnie, w celu zaktywowania paciorków do izolacji mRNA, do probówek dodawano dwukrotnie po 20 µl buforu wiążącego. Do tak przygotowanych paciorków dodawano próbki RNA i inkubowano je przez 5 minut w temperaturze pokojowej, poddając ciągłemu mieszaniu. Po tym czasie, probówki ustawiano na stojaku magnetycznym i usuwano supernatant, w którym znajdowało się niezwiązane RNA. Następnie, do próbek dodawano kolejno: bufor płuczący (2 x 100 µl) i bufor enzymatyczny (*First Strand Buffer*) – 1 x 100 µl. Bufory za każdym razem usuwano przy użyciu pola magnetycznego. Ostatecznie do oczyszczonej frakcji mRNA dodawano 10,5 µl wody pozbawionej rybonukleaz.

2.3.3. Odwrotna transkrypcja i walidacja otrzymanego cDNA

W celu przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji próbki poddawano ponownej 10 minutowej inkubacji w temperaturze 70° C, aby pozbyć się struktur II-rzędowych, a następnie przenoszono je na 10 minut na lód. Do przeprowadzenia właściwej reakcji odwrotnej transkrypcji, przygotowywano mieszaninę reakcyjną w objętości 20 µl o składzie zaprezentowanym w poniższej tabeli:

TABELA 16. Mieszanina reakcji odwrotnej transkrypcji

mRNA w H ₂ O DEPC	9,5 μ l
→ Bufor enzymatyczny 5X	4 μ l
→ dNTP (10mM)	1,5 μ l
→ RNAsin	1 μ l
→ DTT (ditiotreitól)	2 μ l
→ Odwrotna transkryptaza	1 μ l

Po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej, próby przenoszono do termocyklera i wykonywano odwrotną transkrypcję, która zachodziła w warunkach przedstawionych w poniższej tabeli:

TABELA 17. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

Przyłączenie transkryptazy do matrycy	20° C, 10 minut
Odwrotna transkrypcja	37° C, 60 minut
Inaktywacja enzymu	70° C, 10 minut

Aby zweryfikować jakość uzyskanego cDNA przeprowadzano kontrolną reakcję PCR z zastosowaniem starterów swoistych dla genu referencyjnego β -AKTYNY. W tym celu, przygotowywano następującą mieszaninę reakcyjną (w objętości 20 μ l) i przeprowadzano reakcję PCR w warunkach przedstawionych tabelach:

TABELA 18. Mieszanina używana do wykonania reakcji PCR.

cDNA	0,5 μ l
+ Bufor do PCR 10X	2 μ l
+ Starter przedni (20 μ M)	0,2 μ l
+ Starter tylny (20 μ M)	0,2 μ l
+ dNTP (10 μ M)	0,4 μ l
+ Polimeraza Taq (5 U/ μ l)	0,2 μ l
+ H ₂ O DEPC	16,5 μ l

TABELA 19. Warunki reakcji PCR

Etap reakcji		Czas i temperatura
Przedenaturacja		95° C, 5 minut
Amplifikacja (30cykli)	Denaturacja	95° C, 45 sekund
	Przyłączanie starterów	60° C, 45 sekund
	Elongacja	72° C, 1 minuta
Końcowa elongacja		72° C, 10 minut

Po wykonaniu reakcji PCR, produkty analizowane były za pomocą elektroforezy przy użyciu 3% żelu agarozowego o wysokiej rozdzielczości.

2.3.4. Pomiar ekspresji genów - PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w celu oceny ekspresji genu *HIF-1 α* . Jako geny referencyjne użyto ludzkiej β -*AKTYNY* oraz *TBP* (czynnik transkrypcyjny wiążący domenę TATA, ang. *TATA-box binding protein*). Oznaczanie ekspresji było możliwe dzięki zmierzeniu w czasie rzeczywistym przyrostu produktu w trakcie polimerazowej reakcji łańcuchowej. Reakcja opiera się o wykorzystanie barwnika *Sybr Green*, który specyficznie wiąże się z dwuniciowym DNA, dając sygnał wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu PCR w próbce. Fluorochrom wzbudzany jest wiązką światła lasera ($\lambda = 497$ nm) do emisji promieniowania ($\lambda = 520$ nm), którego intensywność rejestrują detektory.

2.3.4.1. Przygotowanie starterów niezbędnych do przeprowadzenia reakcji qPCR

Do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) niezbędne było zaprojektowanie odpowiednich starterów. Projektowane były w taki sposób, aby amplifikowały fragment DNA o maksymalnej wielkości do 250 pz. Następnie startery były zweryfikowane w programie *NetPrimer*, w którym wyszukiwano niepożądanych struktury drugorzędowych, takich jak dimery czy spinki do włosów (ang. *hairpin structures*) w obrębie sekwencji starterów.

2.3.4.2. Przygotowanie krzywej standardowej

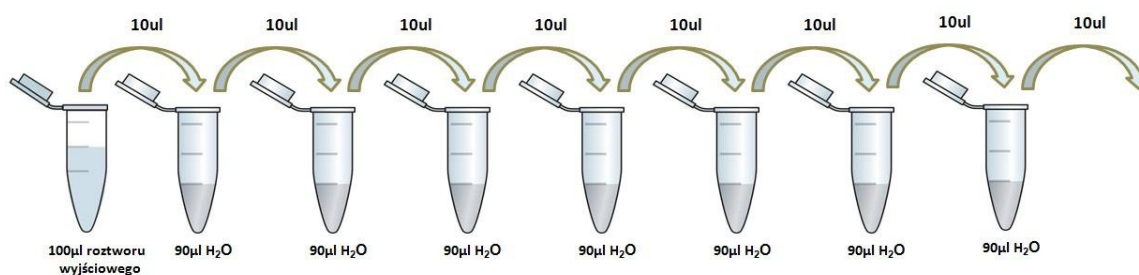
Krzywą standardową wykonywano dla każdego badanego genu. Proces rozpoczynał się od przeprowadzenia reakcji PCR, wykorzystując matryce (cDNA z odpowiedniej tkanki/komórek) o potwierdzonej w bazie *GeneCards* ekspresji danego genu. Produkt wykonanej reakcji rozdzielany był na 3% żelu agarozowym, w celu potwierdzenia odpowiedniej wielkości. Następnie, za pomocą zestawu *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (ThermoFisher Scientific), produkt PCR ekstrahowano z żelu. W skrócie: fragment żelu zawierający produkt PCR wycinano i ważono. Na każde 100 mg żelu dodawano 200 μ l buforu wiążącego (ang. *Binding Buffer*) i inkubowano przez 10 min/56° C. Po inkubacji dodawano 100 μ l alkoholu izopropylowego, pipetowano i nakładano na kolumny z membraną wiążącą DNA. Następnie wirowano 12 000 obr/min przez 1 min w temp. pokojowej (usuwano przesącz), dodawano do kolumny 100 μ l buforu wiążącego (ang. *Binding Buffer*) i ponownie wirowano. Po usunięciu przesączu, kolumnę płukano, używając 700 μ l buforu przemywającego z etanolem (ang.

Wash Buffer). Po ponownym wirowaniu usuwano przesącz. Resztki etanolu usuwano poprzez dodatkowe wirowanie kolumn ze złożem przy 12 000 obr/min przez 1 min. Następnie, kolumny wkładano do 1,5 ml probówek typu Eppendorf i dodawano 30 µl wody kvarcowej, która po wirowaniu 12 000 obr/min przez 2 min wmywała DNA. Pomiaru stężenia produktu dokonywano na spektrofotometrze *NanoDrop® ND-1000*.

W celu przygotowania serii rozcieńczeń, stężenie produktu PCR przeliczano na liczbę kopii/µl według wzoru:

$$\text{Liczba kopii genu w } 1 \mu\text{l} = \frac{(\text{ilość plazmidu w } 1 \mu\text{l [ng]} \times 6.022 \times 10^{23} [\text{liczba/mol}])}{(\text{wielkość plazmidu [bp]} \times 1 \times 10^9 [\text{ng/g}] \times 650 [\text{g/mol bp}])}$$

Serię rozcieńczeń przygotowywano poprzez przyrządzenie 100 µl roztworu zawierającego 1×10^9 kopii/µl, z którego wykonywano serię 10-krotnych rozcieńczeń od 10^8 do 10^2 kopii/µl.



RYCINA 7. Przygotowanie krzywej standardowej do PCR w czasie rzeczywistym (metoda seryjnych rozcieńczeń).

Tak przygotowane rozcieńczenia stały się matrycą dla reakcji qPCR, z której uzyskano krzywą standardową, ilustrującą wydajności reakcji dla danej pary primerów. Wartość ta jest niezbędna do obliczenia ekspresji badanego genu w kolejnych etapach analizy.

2.3.4.3. Przeprowadzanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym

W celu określenia poziomu ekspresji wyselekcjonowanych genów przygotowywano mieszaninę reakcyjną o objętości 25 µl, składającą się z: 2 µl 4-krotnie rozcieńczonej matrycy cDNA; 12,5 µl 2x stężonej mieszaniny reakcyjnej (*Supermix iQ™ SYBR® Green*, Bio-Rad) zawierającej nukleotydy, MgCl₂, polimerazę Taq, stabilizatory reakcji oraz barwnik *Sybr Green*; po 2,5 µl, 4 µM starterów (przedniego i tylnego) swoistych dla badanego genu oraz 5,5 µl wody. Zarówno krzywa standardowa, badane próbki i kontrola były wykonane w duplikatach. Reakcję przeprowadzano na urządzeniu *CFX Connect™ Real-Time System* firmy Bio-Rad, w warunkach przedstawionych poniżej:

TABELA 20. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Etap reakcji		Czas i temperatura
Aktywacja enzymu		1 minuta, 95 ⁰ C
Amplifikacja 45 cykli	Denaturacja	20 sekund, 95 ⁰ C
	Przyłączenie starterów	20 sekund, 60 ⁰ C
	Elongacja	20 sekund, 72 ⁰ C
Synteza terminalna		10 sekund, 65 ⁰ C
Wyznaczenie krzywej topnienia		1 minuta, 65 ⁰ C-95 ⁰ C (co 0,5 ⁰)
Chłodzenie		∞ 4 ⁰ C

Poziom ekspresji genów dla poszczególnych próbek oceniano w oparciu o wartości cyklu progowego Ct (ang. *cycle threshold*). Wartość ekspresji dla danej próbki wyznaczany był za pomocą algorytmu GeNorme. Program określa najbardziej stabilne i wiarygodne pary genów referencyjnych. Na ich podstawie wyliczono współczynnik normalizacji. Poszczególne próby odnoszone były do kontroli (kalibratora), którą była próbka o najwyższej ekspresji i normalizowano w oparciu o współczynnik normalizacji – wyznaczany na podstawie poziomu ekspresji dwóch wybranych genów referencyjnych.

2.4. Modyfikacja genetyczna ludzkich mioblastów z zawiesin pierwotnych

Kolejnym etapem, po ustaleniu warunków hodowli *in vitro* dla mioblastów ludzkich, było otrzymanie populacji komórek genetycznie modyfikowanych czynnikami proangiogennymi. W tym celu niezbędne było uzyskanie i namnożenie konstrukcji plazmidowych, które zawierały czynniki *FGF-4/VEGF* oraz *PIGF*. Transfekcja komórek była przejściowa i przeprowadzona za pomocą elektroporacji.

2.4.1. Przygotowanie konstrukcji genowych do transfekcji mioblastów ludzkich

Do badań użyto dwóch konstrukcji genowych: wektora pTR-UF-22-FGF-4-VEGF oraz pCi-neo-PIGF, zawierających sekwencje dla ludzkich czynników proangiogennych - *FGF-4*, *VEGF-A* oraz *PIGF*.

Bicistronowy wektor pTR-UF-22 z wklonwanymi sekwencjami kodującym dla czynnika *FGF-4* oraz *VEGF-A* zapewniał ekspresję obydwu czynników i został pozyskany dzięki uprzejmości prof. J. Dulaka, kierownika Zakładu Biotechnologii Medycznej, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Otrzymany plazmid został namnożony na dużą skalę oraz

zweryfikowany za pomocą hydrolizy plazmidowego DNA używając enzymu Hind III, który umożliwiał wycięcie wklonowanych sekwencji FGF-4-Ires-VEGF. Następnie otrzymany produkt hydrolizy poddawano sekwencjonowaniu i porównywano z sekwencjami genów z bazy NCBI.

Plazmid pCi-neo, do którego wklonowano sekwencję kodującą dla genu *PIGF*, został zakupiony w firmie Promega (Madison, USA). Matrycą, która posłużyła do uzyskania insertu, było cDNA wyizolowane z komórek HUVEC. Zaprojektowano startery komplementarne do sekwencji CDS (sekwencja kodująca ang. *coding DNA sequence*) z bazy danych NCBI z użyciem narzędzia BLAST. Startery te zostały zweryfikowane dodatkowo w programie *NetPrimer*, w którym wyszukiwano niepożądanych struktur drugorzędowych, takich jak dimery czy spinki do włosów (ang. *hairpin structures*). Dodatkowo, startery zostały skonstruowane w taki sposób, aby oflankować sekwencję w tzw. lepkie końce, kompatybilne dla hydrolizy restryktazami Xho I oraz Xba II. Na matrycy, którą było cDNA z komórek HUVEC, wykonano reakcję PCR, a produkt zweryfikowano na żelu i sekwencjonowano. Po potwierdzeniu zgodności produktu z bazą danych NCBI, został on oczyszczony z pozostałości po reakcji PCR na żelu i wyizolowany za pomocą kitu *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (ThermoFisher Scientific) (metoda opisana w podrozdziale 2.3.4.2.). Następnie, wektor pCi-neo poddawano hydrolizie z użyciem enzymów Xho I oraz Xba I. Pozwoliło to na uzyskanie kompatybilnych końców insertu i wektora, które gwarantowały wklonowanie insertu w odpowiedniej orientacji. Kolejnym etapem było przeprowadzenie ligacji wcześniej przygotowanego wektora pCiNeo z insertem *PIGF*. Reakcje prowadzono za pomocą ligazy T4 w 4° C, inkubując mieszaninę przez całą noc w odpowiednim buforze enzymatycznym. Przygotowany w ten sposób plazmid poddawano elektroporacji z użyciem wcześniej przygotowanych, elektrokompetentnych bakterii *E.coli* DH5 α . Hodowlę bakteryjną prowadzono przez noc, na pożywce agarowej, a następnie klony bakteryjne poddawano weryfikacji (pod kątem posiadania prawidłowego plazmidu) za pomocą hydrolizy enzymami restrykcyjnymi oraz elektroforezy. Zweryfikowany plazmid namnażano na dużą skalę.

2.4.2. Przygotowanie plazmidów do transfekcji- namnażanie na dużą skalę

Do przeprowadzenia transfekcji mioblastów ludzkich niezbędne było uzyskanie dużej ilości wymienionych plazmidów w wysokich stężeniach. Aby osiągnąć planowany efekt dokonywano izolacji plazmidów z bakterii elektrokompetentnych *E.coli* DH5 α hodowanych na dużą skalę. Mikroorganizmy transformowano odpowiednimi plazmidami za pomocą

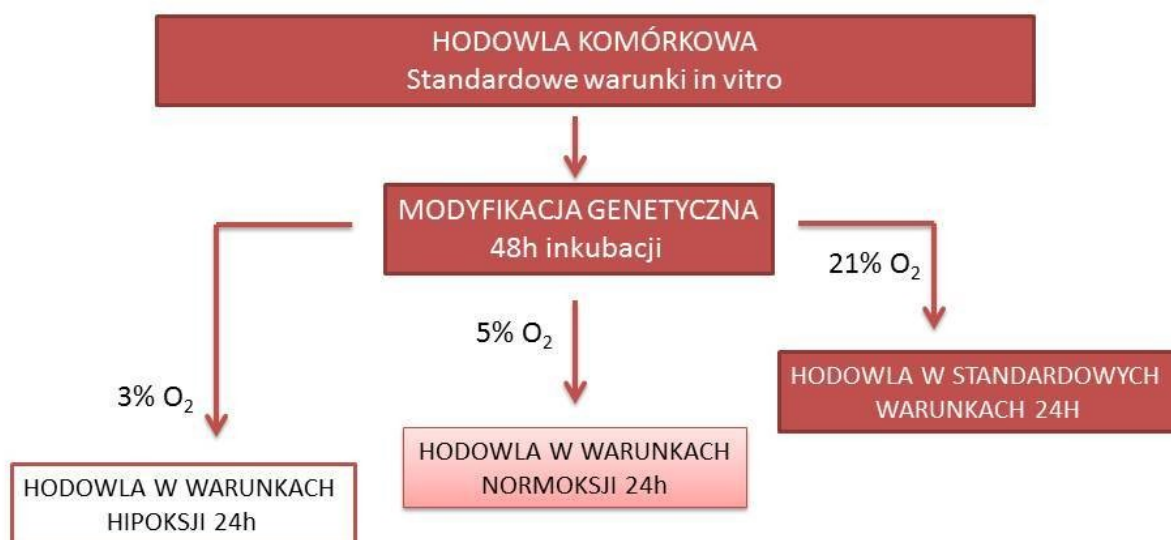
elektroporacji. Przed przystąpieniem do procedury należało przygotować odpowiednią ilość pożywki SOC w temperaturze 36⁰ C. 40 µl bakterii elektrokompetentnych mieszano z wybranym plazmidem, którego stężenie uprzednio przygotowano – 1 ng/µl. Zawiesinę przenoszono do zmrożonej kuwety elektroporacyjnej o wielkości 2 mm. Po impulsie elektrycznym o napięciu 2,5 kV, do kuwet z transformowanymi bakteriami dodawano 1 ml podgrzanej pożywki SOC, a następnie całość mieszaniny przenoszono do probówki typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Próby umieszczano w cieplarni i inkubowano godzinę w 37⁰C, mieszając. Po upływie tego czasu bakterie wysiewano na płytki z agarosem zawierającym antybiotyk odpowiedni dla danego plazmidu (pCiNeo-PIGF, kontrolny pCiNeo, pTR-UF-22-FGF-4-VEGF, kontrolny pTR-UF-22 z ampicyliną, natomiast pEGFP-C1 z kanamycyną; obydwa antybiotyki w stężeniu 100 mg/ml). Po wysianiu, płytki umieszczano na noc w cieplarni. Kolejnego dnia kolonie przenoszono do 10 ml płynnej pożywki bakteryjnej LB z odpowiednim antybiotykiem oraz wytrząsano przez noc, do uzyskania bakterii w logarytmicznej fazie wzrostu.

Następnego dnia wykonywano izolację plazmidów za pomocą zestawu do izolacji plazmidów na małą skalę - *Plasmid Mini Kucharczyk*. Do otrzymania optymalnego stężenia plazmidu używano 4 ml objętości całonocnej hodowli. Procedura opierała się na lizie alkalicznej. Roztwór do lizy składał się ze związków NaOH/SDS, pozwalających na obniżenie pH, przerwanie ciągłości błony bakteryjnej, uwolnienie i denaturację cząsteczek DNA plazmidowego, genomowego oraz białek. Następnie dodawano roztwór zobojętniający, zawierający kolejno: chlorowodorek guanidyny (denaturujący białka), octan potasu (obniżający pH, DNA plazmidowe było renaturowane, natomiast DNA genomowe wciąż pozostawało zdenaturowane) oraz kwas octowy (neutralizujący pH i renaturujący DNA). DNA genomowe i białka ulegały precypitacji, natomiast DNA plazmidowe pozostawało w rozworze. Następnie plazmidy oczyszczano na kolumnkach ze złożami krzemionkowymi. Plazmidowe DNA zostawało związane w kolumnie oraz było przepłukiwane, by usunąć wszelkie zanieczyszczenia. Oczyszczone plazmidowe DNA poddawano elucji wodą. Stężenie uzyskanego DNA mierzono za pomocą urządzenia *NanoDrop® ND-1000*. Następnie wykonywano hydrolizę plazmidowego DNA z użyciem odpowiednich enzymów (dla plazmidu pCiNeo-PIGF były to restryktazy XhoI oraz XbaI, dla plazmidu pTR-UF-22-FGF-4-VEGF HindIII). Reakcja przeprowadzana była przez 3 godziny w temperaturze 37⁰ C. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1,5 µl odpowiedniego buforu, 3 U enzymów oraz 1 µg DNA, całość była uzupełniana wodą do końcowej objętości 15 µl. Po przeprowadzeniu

trawienia dokonywano walidacji otrzymanych plazmidów za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym. Następnym etapem było przeniesienie 6ml pierwotnej hodowli płynnej, służącej jako inokulum, do 150 ml pożywki LB, zawierającej odpowiedni antybiotyk. Mieszaninę pozostawiano na wytrząsanie w 37° C przez noc. Aby uzyskać wysokie stężenie plazmidu wykonywano izolację na dużą skalę, za pomocą zestawu *Qiagen Maxi Prep*. Procedura opierała się na tej samej zasadzie, jak w przypadku wcześniejszej izolacji na mniejszą skalę. Aby sprawdzić wyizolowane na dużą skalę plazmidy, tak samo jak we wcześniejszym przypadku, oznaczano stężenie plazmidowego DNA przy pomocy urządzenia *NanoDrop® ND-1000*, wykonywano hydrolizę oraz analizę elektroforetyczną. Dodatkowo wykonano sekwencjonowanie prób. Zweryfikowane i prawidłowe plazmidy były używane do elektroporacji mioblastów ludzkich.

2.4.3. Elektroporacja mioblastów

Doświadczenia prowadzone były na mioblastach, uzyskanych od dwóch pacjentów. Komórki hodowano, w warunkach standardowych *in vitro* do uzyskania ich odpowiedniej liczebności. Następnie wykonywano transfekcję z użyciem wektorów episomalnych i pozostawiano na kolejne 48 h w warunkach standardowych (taki czas wymagany jest do uaktywnienia transgenów). Po tym czasie medium zmieniano, ze względu na dużą śmiertelność komórek powodowaną metodą transfekcji (ok. 30% komórek) i przenoszono mioblasty do odpowiednich warunków tlenowych: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, a część pozostawiano w warunkach standardowych - 21% O₂. W tych warunkach mioblasty przebywały kolejne 24 h (czas i stężenie tlenu wynikały z wcześniejszej optymalizacji), aby następnie wykonać na nich wszystkie zaplanowane doświadczenia.



RYCINA 8. Schemat czasowy hodowli mioblastów ludzkich w różnych warunkach tlenowych uwzględniający modyfikacje.

Przed przystąpieniem do elektroporacji mioblastów ludzkich dokonano optymalizacji procesu transfekcji. W odpowiednich kuwetach możliwe było elektroporowanie nawet do 1×10^7 komórek, zawieszonych w 500 μ l medium F-10 z plazmidem. Warunki elektroporacji zostały ustalone na jednorazowy impuls o napięciu 160 V, a czas jego trwania wynosił 15 ms. Dobrano również stężenie plazmidów używanych do elektroporacji 1×10^7 komórek, które wynosiły odpowiednio: pCiNeo-PlGF – 54 ng, kontrolnego wektora pCiNeo – 48 ng, pTR-UF-22-FGF-4-VEGF – 42 ng, kontrolnego wektora pTR-UF-22 – 30 ng, reporterowego wektora pEGFP-C1 – 16 ng [89]. Mioblasty ludzkie, elektroporowane w wyżej wymienionych warunkach z użyciem odpowiednich plazmidów (pCiNeo-PlGF, kontrolny pCiNeo, pTR-UF-22-FGF-4-VEGF, kontrolny pTR-UF-22, reporterowy pEGFP-C1), pozostawiano w kuvecie na czas 10 minutowej inkubacji, a następnie nakładano na naczynia hodowlane: flaszki 25 cm², 75 cm² lub płytki 6 dołkowe (powierzchnia dołka 9,6 cm²) - w zależności od tego jaki eksperyment planowano.

Aby określić wydajność zastosowanej metody transfekcji, mioblasty hodowane w różnych stężeniach tlenu (3%, 5%, 21%), modyfikowane plazmidem pEGFP-C1, były odtrawiane oraz wirowane. Następnie, osad z 1 mln komórek był zawieszany w 500 μ l PBS. Wydajność transfekcji była weryfikowana za pomocą cytometru przepływowego.

2.5. Charakterystyka mioblastów ludzkich i porównanie ich właściwości w różnych warunkach tlenowych

Zmodyfikowane genetycznie mioblasty poddawano testom biologicznym oraz molekularnym, aby zbadać, jaki wpływ warunki tlenowe (hipoksja, normoksja i warunki standardowe) wywierają na podstawowe cechy biologiczne komórek miogennych, zarówno zmodyfikowanych genetycznie, jak i natywnych. Następnie dokonywano porównania ich właściwości po hodowli w różnych stężeniach tlenu. Wykonano następujące analizy na poziomie molekularnym: oznaczenie ekspresji markera hipoksji - *HIF-1 α* , ocenę ekspresji genów proangiogennych (*VEGF-A*; *FGF*; *PlGF*) oraz określenie poziomu ekspresji genów miogennych (*MIOG*, *MYOD*, *MRF4*, *MYF5*). Ekspresję transgenów na poziomie białkowym oznaczano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Właściwości biologiczne mioblastów, zarówno zmodyfikowanych genetycznie, jak i natywnych, były weryfikowane poprzez następujące testy: badanie proliferacji (test MTS), badanie żywotności (test cytometryczny na obecność apoptozy) i zdolność do różnicowania w miotuby.

Zweryfikowano również zmodyfikowane genetycznie mioblasty pod kątem przydatności terapeutycznej, w zakresie zdolności do wzbudzenia formowania naczyń krwionośnych - test na formowanie prymitywnych naczyń krwionośnych z użyciem komórek HUVEC.

2.5.1 Analiza na poziomie molekularnym

Komórki hodowane w różnych stężeniach tlenu poddawano badaniom molekularnym. Oznaczano ekspresję markera hipoksji - *HIF-1 α* – aby ocenić odpowiedź komórek na zmienione warunki tlenowe. Dodatkowo, dla komórek miogennych charakterystyczne jest utrzymanie odpowiedniego poziomu ekspresji czynników miogennych, tak, aby nie zmieniały one swoich właściwości biologicznych. Dlatego też oznaczano ekspresję genów szlaku miogennego: *MIOG*, *MYOD*, *MRF4*, *MYF5*. W związku z tym, że *HIF-1 α* uznawany jest za czynnik transkrypcyjny dla wielu genów proangiogennych, oznaczono również ekspresję wprowadzonych transgenów: *VEGF-A*; *FGF*; *PIGF* z komórek po hodowli w różnych stężeniach tlenu. Do weryfikacji ekspresji genów posłużono się metodą PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Po upływie 24 h hodowli w różnych warunkach tlenowych (Ryc. 8), mioblasty ludzkie, zarówno modyfikowane genetycznie, jak i natywne, były odtrawiane, wirowane 1 200 obr/min przez 10 min w temp. 4° C, płukane buforem PBS DEPC (wolnym od RNaz) i ponownie wirowane. Następnie osad komórkowy zawieszano w odczynniku TRI Reagent, który umożliwiał izolację RNA z prób. Odczynnik ten umożliwiał również zamrożenie próbek w temperaturze -80° C oraz przechowywanie ich przez około miesiąc. Po rozmrożeniu, do próbek dodawano 200 μ l chloroformu, a izolacja w kolejnych etapach przebiegała według schematu opisanego wcześniej (w podrozdziale 2.3.1). Z otrzymanego RNA uzyskiwano frakcję mRNA oraz przepisywano na cDNA (opisano w podrozdziałach 2.3.2; 2.3.3.) za pomocą odwrotnej transkrypcji. cDNA następnie weryfikowano na obecność genu referencyjnego β -*AKTYNY* przy pomocy reakcji PCR, której produkti wizualizowano za pomocą elektroforezy na 3% żelu agarozowym. W kolejnych etapach uzyskane cDNA było 4-krotnie rozcieńczane i używane jako matryca w reakcji qPCR z odpowiednimi starterami (Tabela 10, podrozdział 1.4.), w celu oznaczenia ekspresji wybranych genów (wszystkie etapy reakcji qPCR opisano w sekcji 2.3.4.).

2.5.2. Ocena ekspresji i funkcjonalności białka powstałego w wyniku nadekspresji transgenów

Modyfikacje genetyczne wykonane na mioblastach ludzkich powinny wzbudzać nadekspresję genów proangiogennych *FGF-4*, *VEGF-A*, *PIGF*, co ma skutkować wydzieleniem poza

komórkę w pełni funkcjonalnych białek, mających zdolność do zapoczątkowania formowania naczyń krwionośnych. Ekspresja wybranych w niniejszej pracy izoform genów skutkuje powstawaniem czynników sekrecyjnych, zatem badaniu na obecność białka poddawano medium zebrane z nad modyfikowanych komórek, hodowanych w różnych warunkach tlenowych. Supernatanty zebrano z nad komórek zarówno modyfikowanych genetycznie, jak i natywnych, hodowanych w różnych warunkach tlenowych przez 24 h. Następnie wirowano próbki przy 1 200 obr/min przez 10 min w temp. pokojowej, tak, aby pozbyć się komórek, które mogły znajdować się w medium. W celu oznaczenia stężenia białek proangiogennych FGF-4, VEGF-A, PlGF, znajdujących się w mediach zebranych z nad komórek, wykonywano testy immunoenzymatyczne ELISA, zaś aby określić ich potencjał do tworzenia prymitywnych kapilar (test funkcjonalny), te same media używano w teście formowania się naczyń krwionośnych z użyciem komórek HUVEC (*Angiogenesis Starter Kit Thermo Fisher*).

2.5.2.1. Oznaczanie stężenia białek FGF-4 oraz VEGF-A

Celem oznaczenia stężenia białek FGF-4 oraz VEGF-A w mediach hodowlanych, zebranych z nad komórek zarówno modyfikowanych genetycznie, jak i natywnych, hodowanych w różnych warunkach tlenowych, wykonywano test immunoenzymatyczny ELISA. Aby nie zakłócić odczytu, komórki hodowano w medium nie zawierającym egzogenego FGF. Supernatanty z nad komórek modyfikowanych genami *FGF-4* oraz *VEGF-A*, plazmidem kontrolnym pTR-UF-22 oraz natywnych zbierano oraz wirowano. Na płaskodenne płytki 96–dołkowe nakładano przeciwciała I-rzędowe. Pierwsza płytka była opłaszczana przeciwciałem I-rzędowym anty-FGF-4, a druga przeciwciałem I-rzędowym anty-VEGF-A i inkubowano je przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie, płytki płukano trzykrotnie, w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała I-rzędowego za pomocą buforu płuczącego (PBS+ 0,05% *Tween 20*), nakładając go po 100 µl na dołek. Na gotowe płytki, opłaszczone przeciwciałami I rzędowymi anty-FGF-4 i anty-VEGF-A, nakładano po 100 µl roztworów standardowych stężeń białek FGF-4 oraz VEGF-A od 0 do 1000 pg/ml, oraz prób badanych (media z nad komórek modyfikowanych genetycznie właściwym plazmidem, plazmidem kontrolnym oraz komórek natywnych). Po upływie dwugodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej dołki przemywano trzykrotnie buforem płuczącym, w celu pozbycia się niezwiązanego białka, a następnie do każdej studzienki odpowiedniej płytki dodawano po 200 µl poliklonalnego przeciwciała anty-FGF-4 i anty-VEGF-A, związanego z peroksydazą. Płytkę inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej. Po skończonej inkubacji, dołki

trzykrotnie płukano. Następnym krokiem było dodanie roztworu z substratem dla peroksydazy - dihydrochlorku tetrametylenobenzyny - chromogenu, który peroksydaza chrzanowa przekształca w barwny produkt. Po 30 minutowej inkubacji w ciemności reakcję enzymatyczną przerywano za pomocą 100 μ l 1 M H_2SO_4 , a wynik odczytywany był na czytniku spektrofotometrycznym, przy długości fali 450 nm.

2.5.2.2. Oznaczanie stężenia białka PIGF

Celem oznaczenia stężenia białka PIGF w mediach hodowlanych zebranych z komórek zarówno modyfikowanych genetycznie, jak i natywnych, hodowanych w różnych warunkach tlenowych, wykonywano test immunoenzymatyczny ELISA dostępny komercyjnie, w którym studzienki były opłaszczane przeciwciałem I-rzędowym (zestaw *Human PIGF Quantikine ELISA Kit*- R&D Systems). Supernatanty z komórek modyfikowanych genem *PIGF*, plazmidem kontrolnym pCiNeo oraz natywnych zbierano i wirowano. Na płytkę opłaszczoną wcześniej monoklonalnym przeciwciałem anti-PIGF nakładano po 100 μ l roztworów standardowych stężeń białka PIGF od 0 do 500 pg/ml, oraz prób badanych. Po upływie dwugodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej dołki przemywano trzykrotnie buforem płuczającym, w celu pozbycia się niezwiązanego białka, a następnie do każdej studzienki dodawano po 200 μ l poliklonalnego przeciwciała anti-PIGF, związanego z peroksydazą. Płytkę inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej. Po skończonej inkubacji, dołki były trzykrotnie płukane. Następnie dodano roztworu z substratem dla peroksydazy - dihydrochlorku tetrametylenobenzyny - chromogenu, który peroksydaza chrzanowa przekształca w barwny produkt. Po 30 minutowej inkubacji w ciemności reakcję enzymatyczną przerywano dodając 100 μ l, 1 M H_2SO_4 , a wynik odczytywany był na czytniku spektrofotometrycznym, przy długości fali 450 nm.

2.5.2.3. Test funkcjonalny in vitro

Aby ocenić właściwości proangiogenne czynników wydzielanych przez komórki hodowane w różnych stężeniach tlenu, wykonano test proangiogeny z użyciem mediów hodowlanych, w których uprzednio potwierdzono obecność białka (test ELISA). Pierwszym etapem eksperymentu było rozchodowanie komórek HUVEC w specjalnym Medium 200, suplementowanym czynnikami wzrostowymi (*Large Vessel Endothelial Supplement* - LVES). Następnie płytkę 24 dołkową (powierzchnia dołka 1,9 cm^2) opłaszczono Geltrexem - polimerem imitującym macierz zewnątrzkomórkową (*Geltrex® LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane*) - w ilości 100 μ l/dołek, trzymając na lodzie podczas procedury.

Następnie płytkę z Geltrexem inkubowano 1 h w 37⁰ C, aby doprowadzić do jego polimeryzacji. W tym czasie komórki HUVEC odtrawiono za pomocą trypsyny (po poprzednim dwukrotnym przepłukaniu za pomocą buforu DPBS), przeliczono ilość za pomocą automatycznego licznika do komórek (*Bio-Rad TC20™ Automated Cell Counter*) i zwirowano 180 g/7 min/temp. pokojowa. Komórki rozłożono na dołki pokryte Geltrexem w ilości 2,5 x10⁴, a następnie nałożono media hodowlane, zebrane z nad mioblastów zmodyfikowanych genetycznie (pTR-UF-22-FGF-4-VEGF, kontrolny pTR-UF-22, pCi-neo_PIGF, kontrolny pCi-neo) oraz natywnych, hodowanych w hipoksji, normoksji, warunkach standardowych. Zastosowano również kontrolę pozytywną w postaci suplementowanego Medium 200 oraz kontrolę negatywną - czyste, kompletne medium do hodowli mioblastów oraz medium podstawowe DMEM bez suplementów. Przygotowane płytki umieszczono w inkubatorze na 14-18 godzin. Po tym czasie dołki, w których formowały się kapilary, zostały delikatnie przemyte buforem DPBS (tak, aby nie zepsuć sieci powstałych, prymitywnych naczyń). Następnie na dołki nałożono 10 μM kalceine (*Calcein*, ThermoFisher), która umożliwiła fluorescencyjne wyznakowanie powstałych kapilar i wykonanie dokumentacji fotograficznej za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Juli FL GFP. Aby udokumentować proces powstawania prymitywnych naczyń pod wpływem czynników proangiogennych z zebranych mediów w czasie rzeczywistym, użyto mikroskopu Juli FL GFP, którego kompaktowe wymiary umożliwiają wstawienia jednostki optycznej do inkubatora CO₂. W trakcie formowania wykonano dokumentację fotograficzną (zdjęcia co 30 sekund przez 10 h formowania), co skutkowało utworzeniem filmu pokazującego proces powstawania kapilar.

2.5.3. Charakterystyka biologiczna mioblastów

Zasobność tlenu może mieć znaczący wpływ na właściwości biologiczne mioblastów ludzkich. Ponieważ komórki mają być stosowane w terapiach przeciwdziałających niewydolności mięśnia sercowego, szczególnie ważne jest sprawdzenie właściwości mioblastów ludzkich zarówno modyfikowanych genetycznie, jak i natywnych, w warunkach o obniżonej zawartości tlenu. Kluczową rolę stanowi również porównanie właściwości mioblastów w różnych warunkach tlenowych, aby określić ich przydatność w potencjalnych terapiach. Do określenia ewentualnego wpływu warunków tlenowych na apoptozę posłużono się badaniem cytometrycznym z użyciem Anneksyny V. Sprawdzone również proliferację uzyskanych grup mioblastów. Niezmiernie ważne było sprawdzenie, czy mioblasty nie straciły zdolności do różnicowania, a więc czy nie przestały być funkcjonalne po

modyfikacjach i podczas hodowli w różnych warunkach tlenowych. Dlatego też dokonano różnicowania, aby wykazać zdolność mioblastów do organizowania się w miotuby.

2.5.3.1. Występowanie apoptozy w badanych populacjach mioblastów

Wpływ modyfikacji genetycznej oraz warunków tlenowych na poziom komórek apoptotycznych analizowano za pomocą cytometru przepływowego z użyciem Aneksyny V. Jest to białko, które wiąże się z fosfatydyloseryną - fosfolipidem, który jedynie podczas apoptozy znajduje się po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Sprzężenie owego białka z barwnikiem FITC umożliwia wyznaczenie komórek ulegających programowanej śmierci komórki. Przy użyciu lasera o długości fali 488 nm, który wzbudza zieloną fluorescencję, oraz filtra dla światła zielonego, emitowanego przez FITC, możliwa jest ocena liczby komórek apoptotycznych w próbach.

Po 24 godzinach hodowli w różnych warunkach tlenowych (Ryc. 8), mioblasty zarówno modyfikowane (pTR-UF-22-FGF-4-VEGF, kontrolny pTR-UF-22, pCi-neo_PIGF, kontrolny pCi-neo), jak i natywne, były odtrawiane i zbierane razem z mediami hodowlanymi (w których mogły znajdować się komórki ulegające apoptozie). Po zwirowaniu, osad komórkowy był płukany z użyciem zimnego buforu PBS z jonami wapnia i magnezu oraz ponownie wirowany (tym razem w temperaturze 4° C). Następnie próby były przenoszone na lód. W międzyczasie przygotowano mieszaninę zawierającą aneksynę skoniugowaną z FITC oraz bufor wiążący (ang. *Binding Buffer*). Po dodaniu do komórek wcześniej przygotowanego miksu, próby inkubowano w ciemności przez 15 minut. Następnie mioblasty były dodatkowo rozcieńczane w 300 µl schłodzonego buforu wiążącego i poddawane analizie cytometrycznej.

2.5.3.2. Ocena proliferacji komórek in vitro

W celu oceny zdolności mioblastów ludzkich do proliferacji po modyfikacji genami *FGF-4*, *VEGF-A* i *PIGF*, hodowanych w hipoksji, normoksji i warunkach standardowych, wykorzystano test MTS (*CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega). Test ten bazuje na zdolności komórek aktywnych metabolicznie do przekształcania soli tetrazolowej o barwie żółtej, w fioletowe kryształki formazanu. Wyniki odczytywane są na spektrometrze z absorbancją równą $\lambda = 550-600$ nm.

Komórki populacji natywnych, transfekowanych kontrolnymi plazmidami (pTR-UF-22 i pCi-neo) oraz transfekowane genami proangiogennymi (*FGF-4*, *VEGF-A*, *PIGF*), były rozkładane na 96 dołkową płytkę, w ilości $2,5 \times 10^3$ komórek na dołek, w objętości 100 µl medium, w

pięciu powtórzeniach na każdą próbę. Po upływie 24 godzin medium zmieniano, a komórki przekładano do ustalonych wcześniej warunków tlenowych (3% O₂, 5% O₂ i 21% O₂). Po kolejnych 24 h do dołków dodawano odczynnik MTS oraz inkubowano przez 4 godziny w inkubatorze. Następnie dokonano odczytu wyników za pomocą czytnika do ELISY.

2.5.3.3. Badanie zdolności mioblastów do różnicowania w miotuby

Aby zbadać zdolność mioblastów do różnicowania w miotuby, komórki natywne i po transfekcji (pTR-UF-22-FGF-4-VEGF, kontrolny pTR-UF-22, pCi-neo_PIGF, kontrolny pCi-neo) zostały rozłożone na płytkach 6 dołkowych (powierzchnia 9,6 cm²) w ilości 1,2 x 10⁵ komórek/1 cm². Po 24 h od transfekcji na komórki będące w dużym zagęszczeniu nałożono medium różnicujące (z zawartością 2% surowicy końskiej) i przełożono je do wcześniej ustalonych warunków tlenowych (3% O₂, 5% O₂ i 21% O₂) na tydzień. Po tym czasie przeprowadzono procedurę opisaną w sekcji 2.3.3.

2.6. Badania na zwierzętach

Wykonane badania na zwierzętach uzyskały zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Do badań wykorzystano 68 myszy, w tym 53 myszy typu SCID i 15 myszy typu NOD-SCID.

2.6.1. Wywołanie zawału serca u myszy

Zawał mięśnia sercowego u myszy wywoływany był operacyjnie poprzez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej. Zabieg wykonywano w następujący sposób: mysz usypiano wziewnie, przy użyciu 2% Izofluranu. Następnie, zwierzę intubowano przy użyciu rurki wprowadzonej do dróg oddechowych i podłączano do respiratora, który zapewniał odpowiednie dozowanie tlenu i środka usypiającego w trakcie trwania operacji. Zabieg operacyjny obejmował: rozcięcie skóry, odpreparowanie mięśni klatki piersiowej, rozcięcie mięśni międzyżebrowych i podwiązanie tętnicy wieńcowej lewej komory. Po tej procedurze żebra sąsiadujące z rozcięciem prowadzącym do serca, łączono za pomocą rozpuszczalnych nici chirurgicznych. Operacja kończono zszyciem skóry, po czym stopniowo wybudzano zwierzęta poprzez zmniejszenie dopływu środka znieczulającego. Procedurę wykonywano użyciu sterylnych narzędzi i materiałów, w jałowym pomieszczeniu.

2.6.2. Badanie echokardiograficzne

Przed wykonaniem badania zwierzęta usypiano/znieczulano przy użyciu roztworu ketaminy i ksylazyny (1,5 mg Bioketanu i 2 mg Xylopanu/1 ml 0,9% NaCl), podawanego w przeliczeniu na masę ciała zwierzęcia (10 µl roztworu/1 g myszy). Następnie, klatka piersiowa oraz głowica aparatu pokrywane były żelem do USG. Pomiaru dokonywano w osi długiej i krótkiej serca. Oceniane parametry pozwoliły na wyznaczenie powierzchni przekroju lewej komory serca w osi krótkiej w fazie skurczu (LVESAS ang. *left ventricular end-systolic area in the short axis*) i rozkurczu (LVEDAS- ang. *left ventricular end-diastolic area in the short axis*). Na podstawie tych wielkości obliczano – wyrażoną w procentach – zmianę stosunku powierzchni lewej komory w osi krótkiej SAX AC % (ang. *short axis area change area of change*) wyrażony wzorem:

$$\frac{\text{LVEDAS} - \text{LVESAS}}{\text{LVEDAS}} \times 100\%$$

gdzie:

- SAX AC – zmiana pola powierzchni lewej komory w osi krótkiej
- LVEDAS – powierzchnia przekroju lewej komory serca w osi krótkiej w fazie rozkurczu
- LVESAS – powierzchnia przekroju lewej komory serca w osi krótkiej w fazie skurczu.

2.6.3. Intrakardialna transplantacja mioblastów ludzkich w modelu mysim

Komórki używane do transplantacji (zarówno genetycznie modyfikowane, jak i natywne) hodowane były w warunkach *in vitro* do uzyskania odpowiedniej liczby. Następnie, mioblasty były odtrawiane od podłoża za pomocą trypsyny. Skolekcionowane komórki liczone przy użyciu automatycznego licznika do komórek (*Bio-Rad TC20™ Automated Cell Counter*), a następnie zawieszano w odpowiedniej objętości medium DMEM bez czerwieni fenolowej z dodatkiem 1% BSA - albuminy surowicy bydlęcej (ang. *Bovine Serum Albumin*), w celu uzyskania stężenia 1 mln komórek/ 100 µl.

Transplantacja komórek odbywała się po wcześniejszym znieczuleniu myszy za pomocą 2% mieszaniny Izofluranu z tlenem. Procedura otwarcia klatki piersiowej zwierząt przeprowadzona była analogicznie do operacji podwiązania tętnicy wieńcowej. Następnie, podawano 3 x10⁶ µl zawiesiny komórkowej zawierającej około 0,3-0,5 x10⁶ (w zależności od

rodzaju eksperymentu) niezróżnicowanych mioblastów (modyfikowanych genetycznie albo natywnych). W grupie kontrolnej podawano roztwór soli fizjologicznej zamiast komórek. Jako miejsca iniekcji dosercowej wybrano: podstawę, przegrodę i ścianę boczną serca, na granicy blizny zawałowej z prawidłową tkanką miokardium (ang. *border zone*). Procedurę zamknięcia klatki piersiowej i wybudzenia myszy przeprowadzano analogicznie jak w przypadku wywoływania zawału.

2.6.4 Terminacja zwierząt i pozyskanie organu/tkanki

Zwierzęta terminowano poprzez dyslokację rdzenia kręgowego. Po pobraniu całych serc, oddzielano komory od przedsionków za pomocą narzędzi chirurgicznych. Te pierwsze umieszczane były w roztworze RNALater i przechowywane w temperaturze -80° C do następnych analiz.

2.6.5. Ustalenie kinetyki molekularnych zmian w ekspresji genów proangiogennych badanych w wybranych interwałach czasowych od indukcji zawału serca u myszy

W celu ustalenia kinetyki zmian ekspresji markera hipoksji *Hif-1 α* genów proangiogennych *Vegf-a*, *Vegf-b*, *Vegf-c*, *Vegf-d*, *Plgf* oraz receptorów dla tych genów: *Flt-1* oraz *Kdr* w miokardium, wykonano badania *in vivo*, do których zakwalifikowano 37 myszy typu SCID. Myszy miały wykonane badanie echokardiograficzne przed i po zabiegu indukcji zawału serca, aby potwierdzić, iż procedura podwiązania lewej tętnicy wieńcowej zakończyła się pomyślnie. Gryzonię terminowano w następujących punktach czasowych od indukcji zawału: 24 godziny, 7 dni, 28 dni. Dodatkowo, kontrolę doświadczenia stanowiły myszy, u których nie indukowano zawału. Po terminacji pobierano serca, z których odpreparowywano lewą komorę i umieszczano ją w roztworze RNALater (próbki przechowywano w temperaturze -80° C). W celu analizy ekspresji genów, z tkanek izolowano całkowite RNA. Metoda izolacji kwasu rybonukleinowego została opisana w podrozdziale 2.3.1. Różnica w metodologii polegała na dodaniu początkowego kroku obejmującego wstępną obróbkę tkanki. W skrócie: skolekcjonowane tkanki, po rozmrożeniu i pozbyciu się RNALater, rozdrabniano mechanicznie za pomocą skalpela, a następnie przenoszono do 1 ml odczynnika lizującego TRI Reagent. Tak przygotowaną tkankę poddawano homogenizacji (14 000 obr/min, 3 razy po 20 sek., 21° C) przy użyciu homogenizatora *T10 Basic ULTRA-TURRAX*. Następnie procedura odpowiadała wcześniej opisanej metodzie uzyskania RNA, z którego oczyszczano frakcję mRNA. Frakcja ta była przepisywana w wyniku odwrotnej transkrypcji na cDNA, które służyło jako matryca do wykonania reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).

Badaniu poddano ekspresję genów proangiogennych *Vegf-a*, *Vegf-b*, *Vegf-c*, *Vegf-d*, *Plgf* oraz receptorów dla tych genów: *Flt-1* i *Kdr*. Dodatkowo zbadano, w jaki sposób zmienia się ekspresja genu *Hif-1 α* w czasie, jaki upłynął od indukcji zawału serca.

Po terminacji wykonywano dokumentację fotograficzną, przy pomocy aparatu Canon EOS 100D z obiektywem 18-55mm III. Z każdego punktu czasowego jedno serce utrwalano w formalinie, aby następnie przygotować preparaty (kostki parafinowe i skrawki na szkiełkach - myszy oznaczono w Tabeli 21 kolorem bordowym). Badania histologiczne były możliwe dzięki współpracy z Zakładem Patomorfologii Klinicznej, Szpitala Klinicznego im. Heliodora Świącickiego UM w Poznaniu. Zdjęcia w powiększeniu 5x rejestrowano i składano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI8.

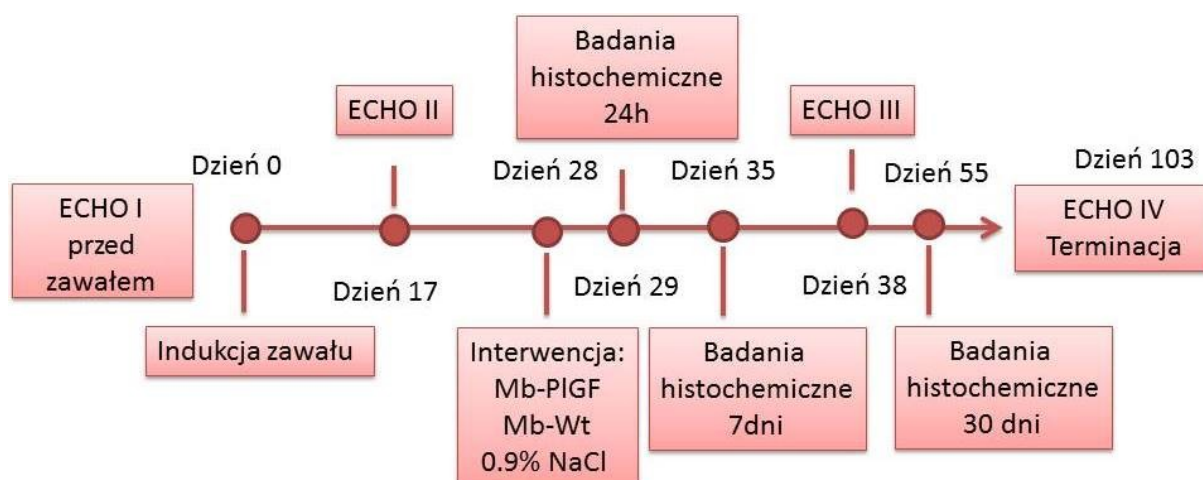
TABELA 21. Indywidualna lista myszy wraz z wykonanymi procedurami które zostały wykonane w trakcie doświadczenia.

	Echo serca	Terminacja	Zawał serca	Echo serca	Terminacja		
					24h	7dni	28dni
	14/202	14/202	18/203	18/203	18/203	1/196	4/197
	15/202	15/202	19/204	19/204	19/204	2/197	6/198
	16/202	16/202	20/204	20/204	20/204	5/198	8/199
	6/396	6/396	30/209	30/209	30/209	26/207	22/205
	9/397	9/397	31/209	31/209	31/209	27/207	23/205
	15/400	15/400	32/209	32/209	32/209	28/208	24/205
	16/400	16/400	11/400	11/400	11/400	3/395	25/206
	18/203		12/400	12/400	12/400	5/396	2/395
	19/204		13/400	13/400	13/400	7/397	8/397
	20/204		14/400	14/400	14/400	4/396	10/399
	30/209		1/196	1/196			1/395
	31/209		2/197	2/197			
	32/209		5/198	5/198			
	11/400		26/207	26/207			
	12/400		27/207	27/207			
	13/400		28/208	28/208			
	14/400		3/395	3/395			
	1/196		4/396	4/396			
	2/197		5/396	5/396			
	5/198		7/397	7/397			
	26/207		4/197	4/197			
	27/207		6/198	6/198			
	28/208		8/199	8/199			
	3/395		22/205	22/205			
	4/396		23/205	23/205			
	5/396		24/205	24/205			
	7/397		25/206	25/206			
	4/197		1/395	1/395			
	6/198		2/395	2/395			
	8/199		8/397	8/397			
	22/205		10/399	10/399			
	23/205						
	24/205						
	25/206						
	1/395						
	2/395						
	8/397						
	10/399						

2.6.6. Badania przedkliniczne, z użyciem mioblastów modyfikowanych genem *PIGF*, na modelu mysiego serca pozawałowego.

Badanie zmian molekularnych w sercu, w różnych odstępach czasu od zawału serca u myszy, a także badania *in vitro* prowadzone na mioblastach ludzkich, modyfikowanych genami proangiogennymi oraz hodowla *in vitro* w różnych warunkach tlenowych, doprowadziły do rozpoczęcia serii badań przedklinicznych na modelu mysiego serca pozawałowego. Kierując się wynikami z wspomnianych badań, wyselekcjonowano mioblasty modyfikowane genem *PIGF* jako potencjalne narzędzie terapeutyczne. Do badań użyto samic myszy

immunokompromisowanych typu NOD-SCID $n=15$. Schemat eksperymentu przedstawiał się w następujący sposób:



RYCINA 9. Schemat czasowy eksperymentu

Założeniem eksperymentu była długoterminowa obserwacja efektu terapeutycznego (do 3 miesięcy od indukcji zawału). Procedurę wykonywania echa serca, transplantacji mioblastów oraz terminacji i kolekcjonowania materiału opisano w sekcji 2.6.1.

Myszy podzielono na 3 grupy w zależności od typu interwencji: myszy, którym podano mioblasty modyfikowane genem *PIGF*- $n=9$, zwierzęta, którym transplutowano komórki natywne $n=3$, oraz kontrole, którym wstrzyknięto jedynie sól fizjologiczną (0,9% NaCl) $n=3$.

Po interwencji z użyciem mioblastów modyfikowanych genem *PIGF*, terminowano 3 myszy – 24 h, 7 dni i miesiąc po interwencji, aby ocenić, jak długo przeszczep komórkowy utrzymywał się w obrębie blizny pozawałowej. Ludzkie komórki barwiono fluorescencyjnie z użyciem przeciwciała *Anti-Mitochondria Antibody, Surface of intact mitochondria, clone 113-1* (MAB1273). Przed wykonaniem właściwego barwienia dokonano optymalizacji i sprawdzenia swoistości przeciwciała z zastosowaniem kontroli negatywnej - tkanki mysiego jądra, oraz kontroli pozytywnej - mioblastów ludzkich.

W ostatnim punkcie terminowano myszy, którym podano mioblasty modyfikowane genem *PIGF*- $n=6$, zwierzęta, którym transplutowano komórki natywne $n=3$, oraz te którym wstrzyknięto jedynie sól fizjologiczną (0,9% NaCl) $n=3$. Po terminacji, serca skolekcjonowano. Następnie izolowano kolejno - RNA i frakcję mRNA, którą przepisano na cDNA. W izolowanych sercach oznaczano ekspresję genów *Vegf-a*, *Vegf-b*, *Vegf-c*, *Vegf-d*,

Plgf oraz receptorów dla tych genów: *Flt-1* i *Kdr*. Ekspresja tych genów była mierzona wobec genów referencyjnych: *Hprt*, *Tpt* (metodologia opisana w podrozdziale 2.3.4).

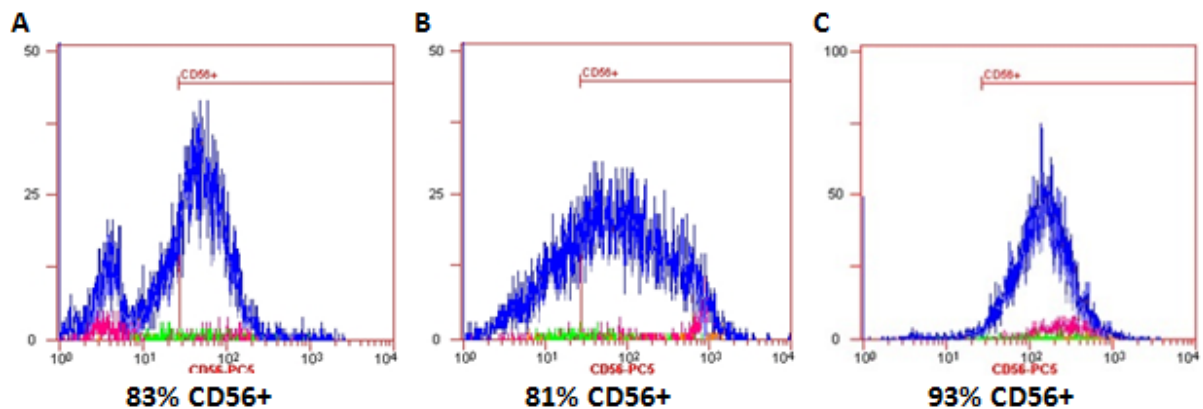
2.8. Analiza statystyczna

Każde doświadczenie wykonane było dwukrotnie, w co najmniej w trzech powtórzeniach. Otrzymane dane wyrażano jako średnią \pm odchylenia standardowe. Do analiz statystycznych używano testów porównujących daną cechę pomiędzy przynajmniej trzema grupami. Finalnie do analizy użyto testu ANOVA z poprawką Tuckey'a dla zmiennych niepowiązanych, Kruskala-Wallis'a z poprawką Dunn'a (wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich grup).

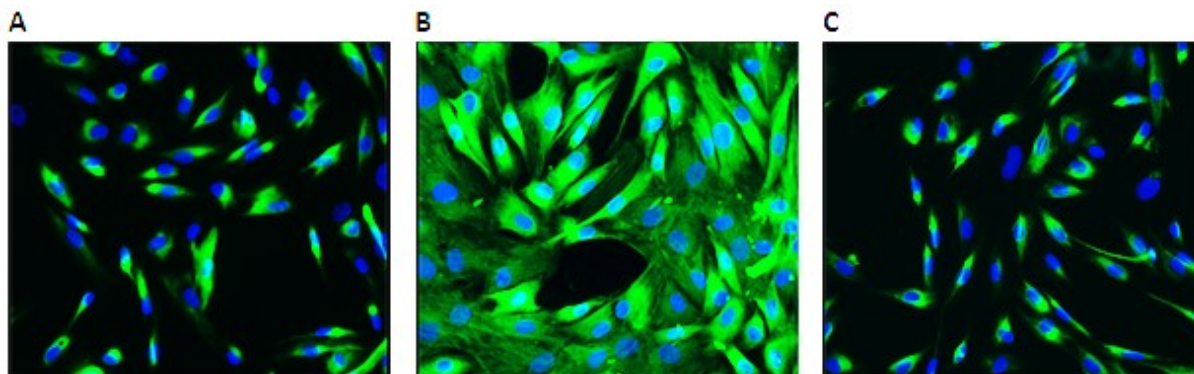
VI. WYNIKI

1. Izolacja oraz charakterystyka biologiczna mioblastów ludzkich

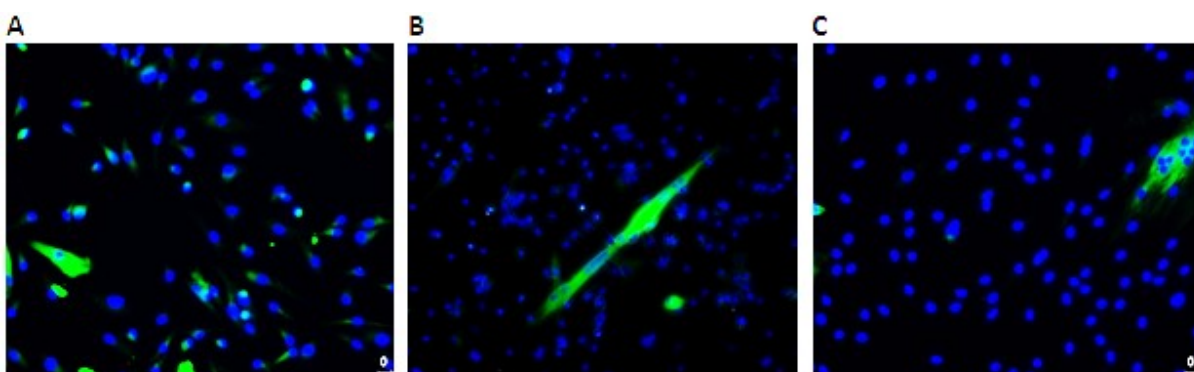
Badania prowadzono z użyciem 3 populacji ludzkich mioblastów, wyizolowanych z pooperacyjnych resztek tkankowych, powstałych w wyniku zabiegu rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego. Populacje oznaczono jako mio135, mio180, mio191; wszyscy pacjenci mieścili się przedziale wiekowym do 35 roku życia. Każda z badanych próbek została scharakteryzowana poprzez cytometryczne oznaczenie „czystości” populacji za pomocą markera CD56, występującego na powierzchni komórek miogennych. Odsetek komórek miogennych w badanych populacjach utrzymywał się w około 80-90% dla każdej badanej zawiesiny pierwotnej (Ryc. 10). Za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego weryfikowano obecność miogennych markerów wewnątrzkomórkowych. Ekspresja desminy – białka charakterystycznego dla komórek niezróżnicowanych – była wykrywana w bardzo wysokim natężeniu po wykonaniu immunofluorescencji - >90% (Ryc. 11). Marker komórek zróżnicowanych MHC utrzymywał się raczej na niskim poziomie, we wszystkich badanych zawiesinach pierwotnych mioblastów - <5% (Ryc. 12). Charakterystykę uzupełnił indeks fuzyjny, który wykazał, iż wszystkie badane populacje komórek pozyskanych z mięśni szkieletowych zachowują funkcjonalność w warunkach *in vitro*, czyli zachowują zdolność do zróżnicowania komórek prekursorowych (mioblastów) w miotuby (Ryc. 13).



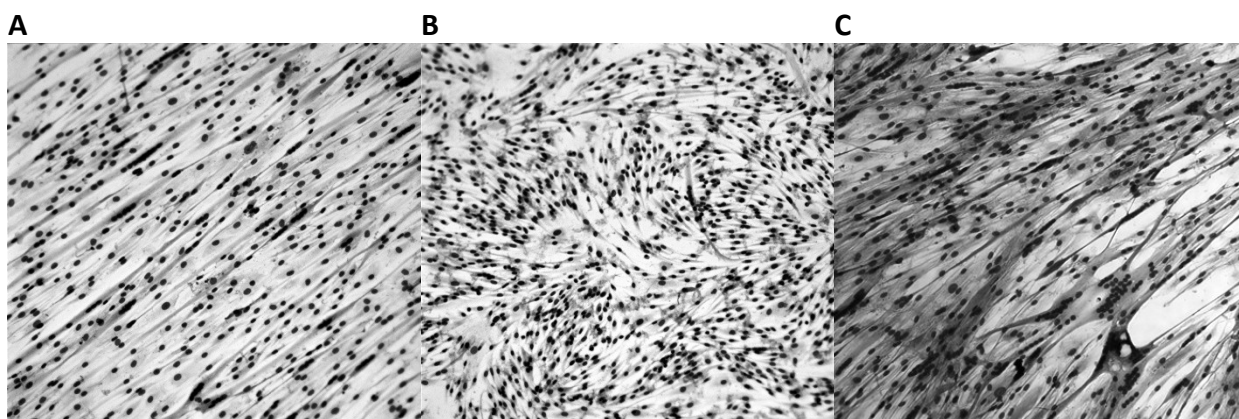
RYCINA 10. Analiza cytometryczna czystości uzyskanych zawiesin pierwotnych, za pomocą markera powierzchniowego CD56, charakterystycznego dla komórek miogennych. A - Ekspresja markera CD56 w populacji mioblastów mio135- 83% komórek pozytywnych; B - Ekspresja markera CD56 w populacji mioblastów mio180- 81% komórek pozytywnych; C - Ekspresja markera CD56 w populacji mioblastów mio191- 93% komórek pozytywnych.



RYCINA 11. Oznaczenie ekspresji białka markerowego, charakterystycznego dla młodych komórek przy pomocy barwienia immunofluorescencyjnego - desmina w populacjach wyizolowanych mioblastów. A - oznaczenie w populacji mio135; B - mio180; C - mio191.



RYCINA 12. Oznaczenie ekspresji białka markerowego, charakterystycznego dla miogennych komórek zróżnicowanych - ciężki łańcuch miozyny (MHC) w populacjach wyizolowanych mioblastów. A - oznaczenie w populacji mio135; B - mio180; C - mio191.

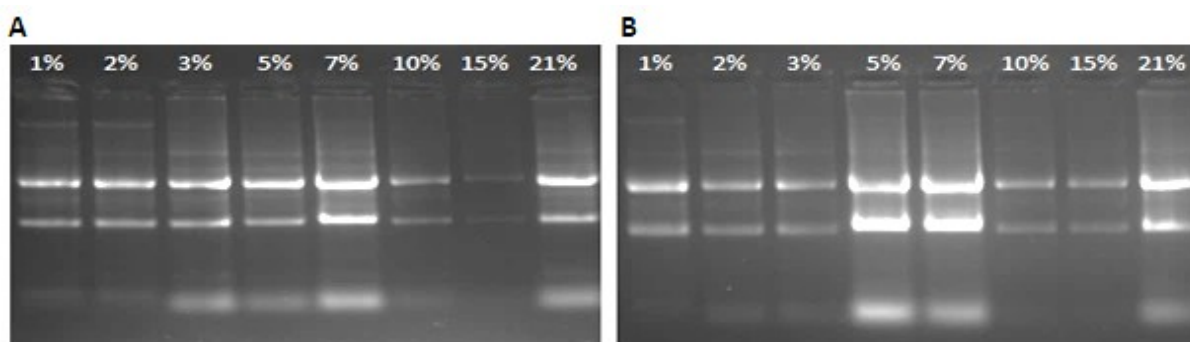


RYCINA 13. Indeks fuzyjny wykonany dla izolowanych populacji komórek macierzystych mięśni szkieletowych. A - różnicowanie populacji mio135; B - mio180; C - mio191.

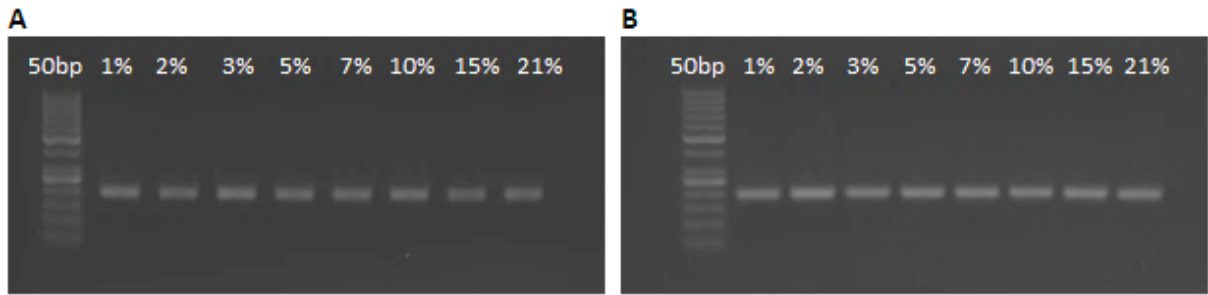
2. Optymalizacja warunków hodowli *in vitro*. Ustalenie warunków hipoksji w hodowli *in vitro* odpowiadających warunkom tlenowym w sercu po zawale

2.1. Ekspresja genu *HIF-1 α* w zależności od stężenia tlenu i długości hodowli - badania *in vitro*

Optymalizacji warunków hodowli dokonano z użyciem komórek zawiesiny pierwotnej mio180. W pierwszym etapie badań oznaczono ekspresję genu *HIF-1 α* w mioblastach ludzkich, hodowanych w różnych stężeniach tlenu. Komórki hodowano w następujących stężeniach tlenu: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% oraz 21% (warunki standardowe). Aby ocenić, jaki wpływ na komórki ma długość ekspozycji na zmienione warunki tlenowe, były one hodowane przez 24 h oraz 7 dni w różnych stężeniach O₂. Z zebranego materiału komórkowego wyizolowano RNA (Ryc. 14), a następnie, w procesie odwrotnej transkrypcji, uzyskano cDNA, którego jakość zweryfikowano za pomocą PCR z użyciem starterów na gen referencyjny β -AKTYNĘ (Ryc. 15).



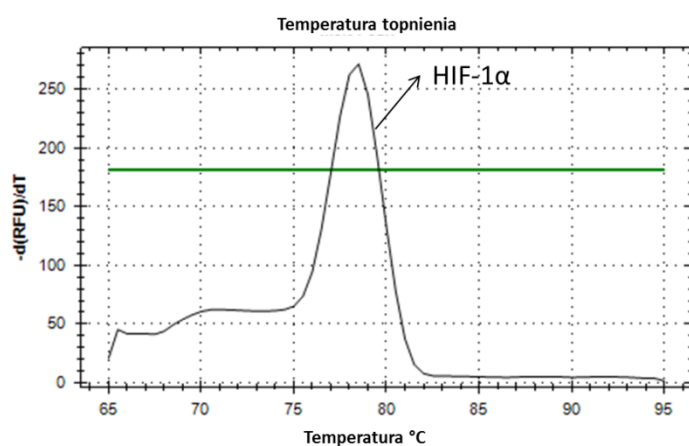
RYCINA 14. Analiza elektroforetyczna próbek. A - RNA pochodzące z mioblastów populacji mio180 hodowanych 24h, w różnych warunkach tlenowych: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% oraz 21% (warunki standardowe); B - RNA uzyskane z populacji mioblastów mio180 hodowanych przez 7 dni w następujących warunkach tlenowych: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% oraz 21% (warunki standardowe).



RYCINA 15. Analiza elektroforetyczna produktu PCR. A - obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR dla genu β -AKTYNY o wielkości 192 pz dla mioblastów hodowanych przez 24h w różnych stężeniach tlenu: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% oraz 21% (warunki standardowe); B - obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR dla genu β -AKTYNY o wielkości 192 pz dla mioblastów zawiesiny mio180 hodowanych przez 7 dni w różnych stężeniach tlenu: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% oraz 21% (warunki standardowe). Do analizy użyto markera o wielkości 50bp.

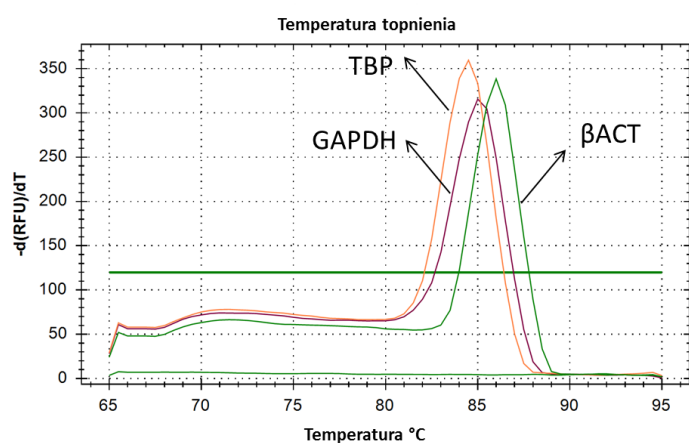
W badanych próbkach oznaczano ekspresję genu *HIF-1 α* za pomocą metody qPCR. W tym celu przygotowano krzywą standardową dla badanego genu. Dostarczyła ona informacji o wydajności reakcji, która była niezbędna, aby dokonać kalkulacji ekspresji badanego genu. Dodatkowo, produkt charakteryzował się odpowiednią temperaturą topnienia, co gwarantowało rozpoznanie jego swoistości. Ta sama zasada postępowania dotyczyła również genów referencyjnych *TBP*, *GAPDH*, *β ACT*. Startery użyte w badaniu były swoiste tylko do matrycy ludzkiej, nie generując produktu na materiale mysim (Ryc. 16).

A



HIF-1α- 78,5° C/ 99%

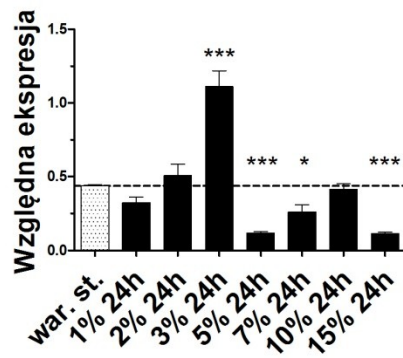
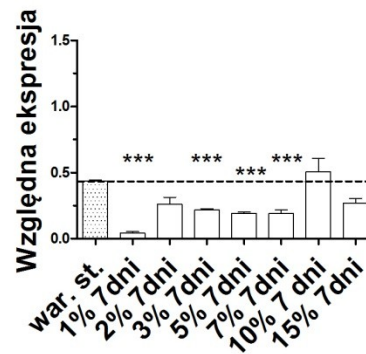
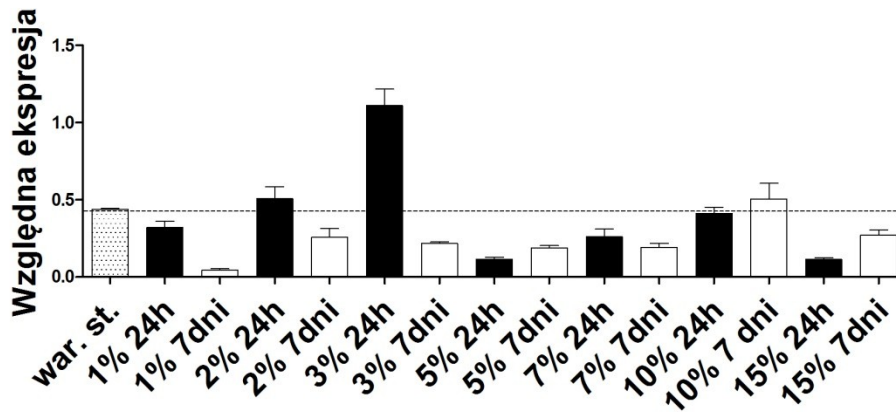
B



βACT- 86,0° C/ 98%
GAPDH- 85,0° C/ 99%
TBP- 84,5° C/ 99%

RYCINA 16. Krzywe topnienia produktów qPCR z temperaturami topnienia (°C) i wydajnością reakcji (%). A - temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla ludzkiego genu *HIF-1α*; B - temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla ludzkich genów *βACT*, *GAPDH*, *TBP*.

Oceny ekspresji genu *HIF-1α* dokonano używając algorytmu GeNorme, wraz z genami referencyjnymi *βACT*, *TBP*.

A Ekspresja genu HIF- α **B** Ekspresja genu HIF-1 α **C** Ekspresja genu HIF-1 α 

RYCINA 17. Ekspresja genu HIF-1 α w mioblastach (mio180) hodowanych *in vitro* przez 24h oraz 7 dni w zmienionych warunkach tlenowych. A - ekspresja markera HIF-1 α w mioblastach hodowanych *in vitro* przez 24h w następujących warunkach: warunki standardowe (21%), 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%; istotności statystyczne zaznaczono względem populacji hodowanej w warunkach standardowych; B - ekspresja markera HIF-1 α w mioblastach hodowanych przez 7dni w następujących warunkach tlenu: warunki standardowe (21%), 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%; istotności statystyczne zaznaczono względem populacji komórek hodowanej w warunkach standardowych; C - porównanie ekspresji markera HIF-1 α w mioblastach hodowanych przez 24h z mioblastami hodowanymi przez 7 dni w następujących warunkach: warunki standardowe (21%), 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%; statystykę podano w Tabeli 22. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

TABELA 22. Analiza statystyczna dla badanych populacji komórek do Ryc. 17C. Badane populacje: mioblasty hodowane 24h oraz 7 dni w następujących warunkach: warunki standardowe (21%), 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oraz *** $p < 0,001$.

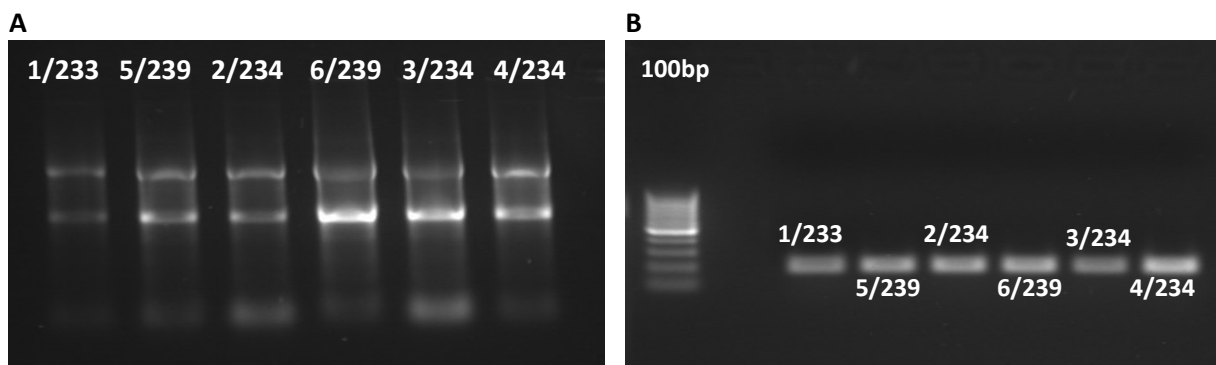
	Warunki st.	1% 24h	1% 7 dni	2% 24h	2% 7 dni	3% 24h	3% 7 dni	5% 24h	5% 7 dni	7% 24h	7% 7 dni	10% 24h	10% 7 dni	15% 24h	15% 7 dni
Warunki st.			***		**	***	***	***	***	**				***	***
1% 24h			***	*		***		**					*	**	
1% 7 dni	***	***		***	**	***	*			**					**
2% 24h		*	***		***	***	***	***	***	***	***			***	***
2% 7 dni	**		**	***		***						*	***		
3% 24h	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***
3% 7 dni	***		*	***		***						**	***		
5% 24h	***	**		***		***						***	***		
5% 7 dni	***			***		***						***	***		
7% 24h	**		**	***		***						***	***		
7% 7 dni				***		***						***	***		
10% 24h					*	***	**	***	***	***	***			***	
10% 7 dni		*			***	***	***	***	***	***	***			***	
15% 24h	***	**		***		***						***	***		*
15% 7 dni	***		**	***		***								*	

Wyniki jednoznacznie wskazały, iż długoterminowa hodowla (7 dni) w zmienionych warunkach tlenowych powodowała „wyciszenie” ekspresji czynnika transkrypcyjnego *HIF-1 α* (Ryc. 17B). Biorąc pod uwagę populacje komórek eksponowanych na obniżoną ilość tlenu w hodowli przez 24 h, widać znaczący wzrost ekspresji genu *HIF-1 α* w populacjach hodowanych w 3% stężeniu tlenu, co potwierdzają istotności statystyczne zawarte w Tabeli 22 (punkt ten jako jedyny był istotnie podwyższony w stosunku do pozostałych badanych populacji komórkowych).

2.2. Ekspresja genu *HIF-1 α* w mioblastach transplantowanych do pozawałowego serca myszy.

Populacja mioblastów ludzkich badana w warunkach *in vitro* była następnie używana w badaniach *in vivo*, do transplantacji w modelu mysiego serca pozawałowego. Przy okazji podwiązania lewej tętnicy wieńcowej, transplutowano mioblasty z populacji mio180 w rejon objęty zawałem. Po upływie 24 h, 7 dni i 28 dni od indukcji zawału/transplantacji, myszy terminowano i izolowano serca, w których znajdowały się transplutowane ludzkie

mioblasty. Z pobranego materiału (całych serc mysich z podanymi mioblastami) izolowano RNA (Ryc. 18A), które następnie przepisywano na cDNA (Ryc. 18B)



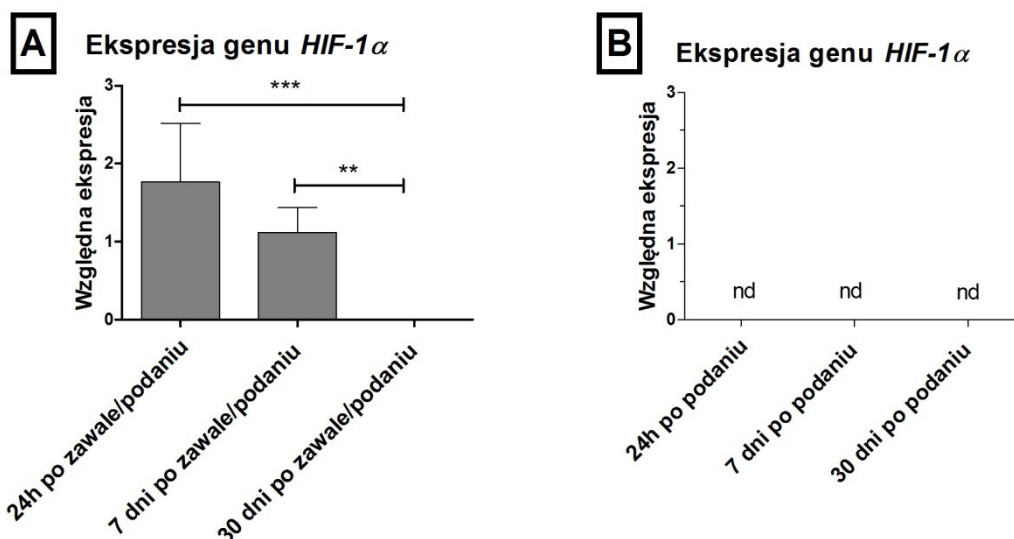
RYCINA 18. Przykładowa analiza elektroforetyczna uzyskanego materiału biologicznego: A - rozdziel elektroforetyczny uzyskanego RNA z izolowanych serc myszy, B - obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR dla genu β -AKTYNY. Myszy: 1/233- 24h po zawale /transplantacji komórek; 5/239- 24h po transplantacji komórek; 2/234- 7 dni po zawale/transplantacji komórek; 6/239- 7 dni po transplantacji komórek; 3/234- 28 dni po zawale/transplantacji komórek; 4/234- 28 dni transplantacji komórek.

Próbki cDNA były używane jako matryca dla reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Do analizy użyto starterów swoistych jedynie dla genomu ludzkiego (pochodzącego z mioblastów ludzkich znajdujących się w sercu mysim), które nie generowały produktu w wyizolowanym materiale pochodzącym z serc myszy (specyfikacja starterów - temperatura topnienia oraz wydajność Ryc. 16). Potwierdzono to za pomocą reakcji PCR z wybranymi starterami z użyciem materiału mysiego, gdzie wynik reakcji, po rozdziale produktu na żelu agarozowym, okazał się negatywny. Tym samym ostatecznie zwalidowano swoistość wybranych starterów (Ryc. 19).



RYCINA 19. Wykazanie swoistości użytych starterów. Analiza wykonana z użyciem starterów swoistych dla matrycy pochodzenia ludzkiego z użyciem próbek cDNA pozyskanych z mysiego serca pozawałowego. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR. Startery użyte do analizy: TBP, β -AKTYNA, HIF-1 α . 1- Marker wielkości 50bp; 2,3,4,- matryca cDNA pochodząca z serca myszy. Testowane startery - kolejno: TBP, β -AKTYNA, HIF-1 α . Wynik negatywny potwierdza swoistość użytych starterów.

Po potwierdzeniu swoistości starterów wykonano PCR w czasie rzeczywistym z użyciem starterów odpowiadających sekwencji ludzkiego czynnika *HIF-1 α* oraz cDNA uzyskanego z mysich serc, w których znajdowały się ludzkie komórki. Jako referencje zastosowano wcześniej wspomniane geny *TBP*, β -*AKTYNE*.



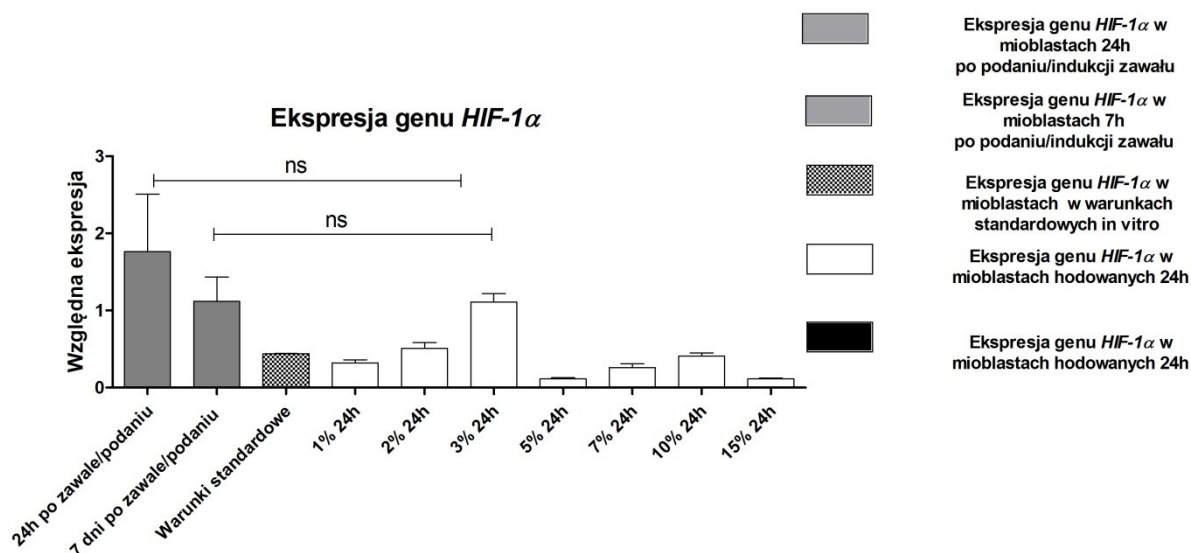
RYCINA 20. Ekspresja ludzkiego genu *HIF-1 α* w mioblastach ludzkich podanych do serca mysiego. A - ekspresja genu *HIF-1 α* w mioblastach podanych do mysiego serca przy okazji indukcji zawału. B - ekspresja genu *HIF-1 α* w mioblastach podanych do mysiego serca bez wywoływania zawału. Badane grupy: serca w 24h po transplantacji komórek/indukcji zawału, n=3; serca w 7 dni po transplantacji komórek/indukcji zawału, n=4; w 30 dni po transplantacji komórek/indukcji zawału, n=2; serca w 24 h po transplantacji komórek, n=3; serca w 7 dni po transplantacji komórek, n=2; w 30 dni po transplantacji komórek, n=2. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. nd - nie zidentyfikowano

Wykazano ekspresję genu *HIF-1 α* w mioblastach ludzkich obecnych w sercach myszy po 24 h od podania komórek/indukcji zawału oraz po 7 dniach od podania komórek/indukcji zawału. Wynik ten potwierdził, iż hipoksja obecna w sercach ma wpływ na ekspresję genów w komórkach podawanych w rejon objęty niedokrwieniem (Ryc. 20A). Po 30 dniach, które upłynęły od podania mioblastów przy okazji indukcji zawału serca, nie zaobserwowano ekspresji genu *HIF-1 α* . Może to mieć związek z faktem, iż po 30 dniach w obrębie blizny pozawałowej było zbyt mało komórek, aby można było oznaczyć ekspresję genów w niewielu mioblastach znajdujących się w obrębie miokardium (Ryc. 20A). Zatem metoda mogła okazać się niewystarczająco czuła. Nie wykryto ekspresji genu *HIF-1 α* w mioblastach podanych do serc, w których nie indukowano zawału (Ryc. 20B). Tym samym udowodniono,

że przy braku hipoksji sercowej wywołanej niedokrwieniem nie dochodzi do ekspresji genu *HIF-1 α* w komórkach macierzystych z mięśni szkieletowych.

2.3. Wyznaczanie warunków hipoksji oraz normoksji dla komórek macierzystych pochodzących z mięśni szkieletowych w hodowli *in vitro*.

Wykorzystując wyniki dotyczące ekspresji genu dla czynnika indukowanego hipoksją w ludzkich mioblastach hodowanych *in vitro* w różnych stężeniach tlenu oraz wyniki uzyskane z badań nad mioblastami ludzkimi podawanymi do serca myszy przy okazji indukcji zawału, ustalono warunki hipoksji dla mioblastów, które najlepiej odzwierciedlały warunki panujące w sercu po zawale.



RYCINA 21. Optymalizacja warunków hipoksji dla hodowli mioblastów *in vitro* najlepiej odzwierciedlających warunki panujące pozawałowym miokardium.

Wysoka ekspresja genu *HIF-1 α* w mioblastach ludzkich podanych dosercowo nie wykazała różnic istotnych statystycznie (ns) z ekspresją tego genu w mioblastach hodowanych *in vitro* przez 24 h w 3% O₂. Dotyczyło to zarówno mioblastów znajdujących się w sercu przez 24 h, jak i 7 dni (Ryc. 21) od indukcji zawału (z równoczesnym podaniem komórek). Jak wynika z Ryc. 17C (podpunkt 2.1), to właśnie hodowla *in vitro* w 3% stężeniu O₂ wzbudziła najwyższą ekspresję genu czynnika indukowanego hipoksją, co również oznacza, iż to stężenie tlenu ma największy wpływ na komórki i ekspresję *HIF-1 α* . Biorąc pod uwagę te wyniki, warunki hodowli mioblastów *in vitro* zostały ustalone na 3% O₂ przez 24 h, ponieważ ten punkt czasowy i to stężenie tlenu odpowiadały hipoksji wywołanej zawałem.

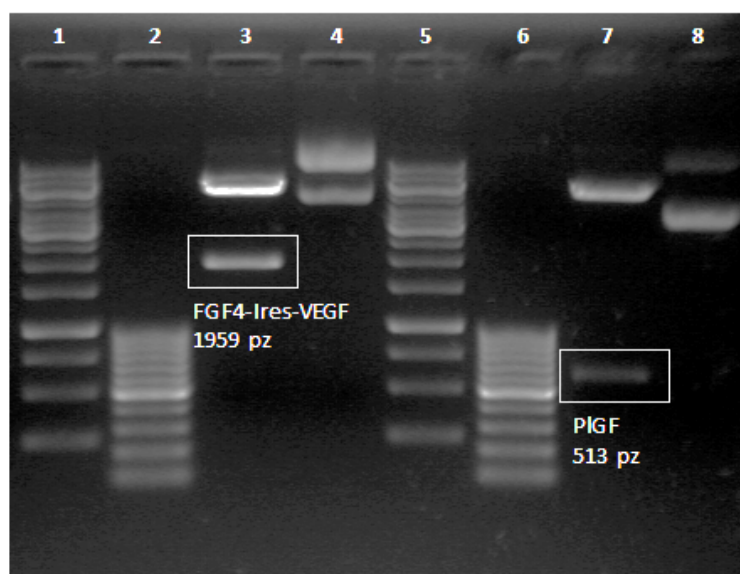
Warunki normoksji, czyli fizjologicznego stężenia tlenu dla mioblastów ludzkich, zostały ustalone za pomocą danych literaturowych. Dodatkowo, z danych uzyskanych po zbadaniu ekspresji genu czynnika indukowanego hipoksją w mioblastach hodowanych przez 24 h w warunkach *in vitro*, w różnych stężeniach tlenu, obserwowano znaczące obniżenie ekspresji markera *HIF-1α* podczas hodowli w stężeniu 5% O₂. Konsolidacja wiedzy literaturowej, wraz z uzyskanymi własnymi wynikami, pozwoliła na ustalenie 5% stężenia tlenu jako warunków normoksji dla mioblastów ludzkich hodowanych w warunkach *in vitro*, ponieważ niejednokrotnie wspomina się, iż to stężenie odpowiada fizjologicznemu dla mięśni szkieletowych.

3. Modyfikacja genetyczna mioblastów ludzkich za pomocą genów *FGF-4/VEGF* oraz *PlGF*

Po zoptymalizowaniu warunków hodowli *in vitro*, możliwe było podzielenie mioblastów na 3 grupy badawcze: hodowanych w warunkach hipoksji - 3% stężenia O₂ przez 24 h, normoksji - 5% stężenia O₂ przez 24 h, oraz w warunkach standardowych (hiperoksji) - 21% stężenia O₂ przez 24 h. Scharakteryzowane populacje mioblastów zostały namnożone do odpowiednich liczebności, a następnie modyfikowane genetycznie. Mioblasty z populacji mio135 były modyfikowane z użyciem konstrukcji wektora *FGF-4/VEGF*, natomiast mioblasty populacji mio191 były modyfikowane za pomocą wektora kodującego gen *PlGF*. Poszczególne populacje komórkowe (zarówno modyfikowane genetycznie, jak i natywne) zostały zbadane i porównane pod kątem wpływu warunków tlenowych na ich właściwości biologiczne, ekspresję genów oraz wprowadzonych transgenów.

3.1 Przygotowanie konstrukcji genowych

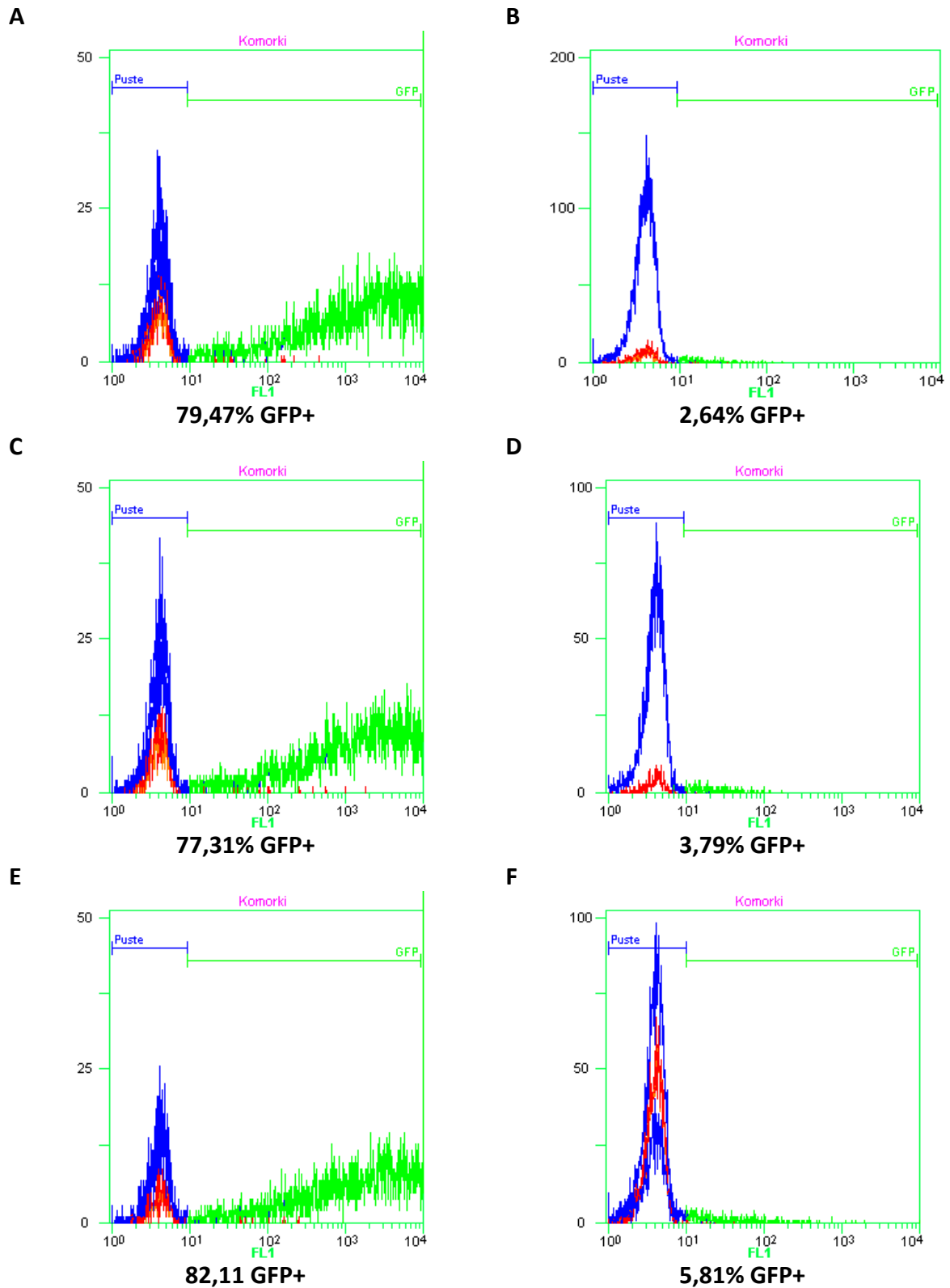
Plazmidy uzyskane w wyniku namnażania na dużą skalę zostały zweryfikowane, tak aby potwierdzić obecność insertu genowego. W tym celu wykonywano hydrolizę DNA obydwu konstrukcji, a całość weryfikowano w rozdziale produktu na 1 % żelu agarozowym (Ryc. 22).



RYCINA 22. Wyniki hydrolizy DNA plazmidowego. Hydroliza enzymem HindIII, w wyniku którego otrzymano wycięte inserty FGF-4, VEGF (wraz z motywem IRES) o wielkości 1959 pz. 1 - marker wielkości 1 kpz, 2 - marker wielkości 100 bp, 3 - plazmid cięty, 4 - plazmid cały. Hydroliza enzymami restrykcyjnymi enzymami Xho I oraz Xba, w wyniku którego otrzymano wycięty insert PlGF o wielkości 513 pz. 5 - marker wielkości 1 kpz, 6 - marker wielkości 100 bp, 7 - plazmid cięty, 8 - plazmid cały.

3.2. Elektroporacja mioblastów oraz określenie wydajności procesu.

Analiza cytometryczna wykazała, iż w transfekowanych populacjach mioblastów hodowanych w warunkach hipoksji - 3% O₂ przez 24 h, normoksji - 5% O₂ przez 24 h, oraz w warunkach standardowych - 21% O₂ przez 24 h, odsetek komórek pozytywnych pod względem białka zielonej fluorescencji wynosił około 80%, a tym samym potwierdziło to wysoką wydajność procesu modyfikacji genetycznej (Ryc. 23). Jako kontroli dla eksperymentu użyto komórek populacji dzikiej (nietransfekowanej).



RYCINA 23. Analiza cytometryczna populacji mioblastów transfekowanych plazmidem pEGFP. A - komórki transfekowane plazmidem pEGFP hodowane w warunkach hipoksji; B - komórki natywne hodowane w warunkach hipoksji; C - komórki transfekowane plazmidem pEGFP hodowane w warunkach normoksji; D - komórki natywne hodowane w warunkach normoksji; E - komórki transfekowane plazmidem pEGFP hodowane w warunkach standardowych; F - komórki natywne hodowane w warunkach standardowych.

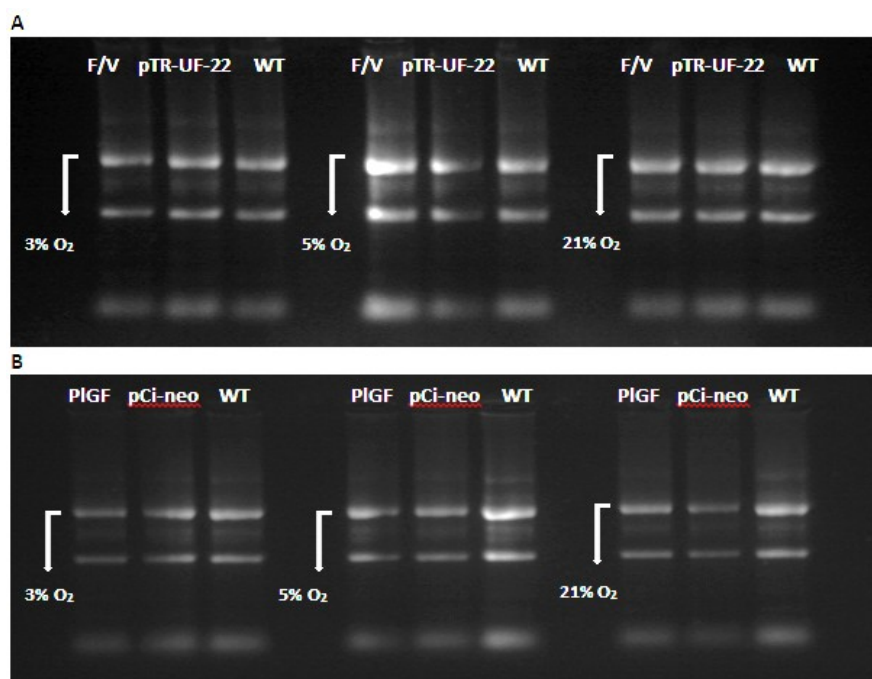
4. Charakterystyka zmodyfikowanych genetycznie mioblastów ludzkich. Porównanie ich właściwości w różnych warunkach tlenowych

W celu określenia wpływu danej modyfikacji genetycznej i warunków tlenowych na komórki macierzyste mięśni szkieletowych, dokonano analiz molekularnych oraz biologicznych. Miały one na celu określenie, czy komórki posiadały potencjał terapeutyczny w niekorzystnych warunkach tlenowych, jakie występują w sercu po zawale.

4.1. Ocena ekspresji wybranych genów

4.1.1. Ocena jakości wyizolowanego RNA

Mioblasty populacji mio135 oraz mio191 były modyfikowane genetycznie. Po 24-godzinnej hodowli w różnych stężeniach tlenu, wszystkie populacje zostały zebrane do badań. Z komórek wyizolowano RNA, a następnie uzyskano cDNA (Ryc. 24,25).



RYCINA 24. Analiza elektroforetyczna próbek RNA pochodzących z mioblastów modyfikowanych genetycznie jak i natywnych hodowanych w różnych warunkach tlenowych: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, w warunkach standardowych - 21% O₂. A - RNA uzyskane z populacji mioblastów mio135. Skróty: F/V - RNA izolowane z mioblastów modyfikowanych genetycznie konstrukcją FGF-4/VEGF; pTR-UF-22 - RNA izolowane z mioblastów elektroporowanych plazmidem kontrolnym pTR-UF-22; WT - RNA izolowane z mioblastów natywnych. B - RNA uzyskane z populacji mioblastów mio191. Skróty: PIGF - RNA izolowane z mioblastów modyfikowanych genetycznie konstrukcją PIGF; pCi-neo - RNA izolowane z mioblastów elektroporowanych plazmidem kontrolnym pCi-neo; WT - RNA izolowane z mioblastów natywnych.

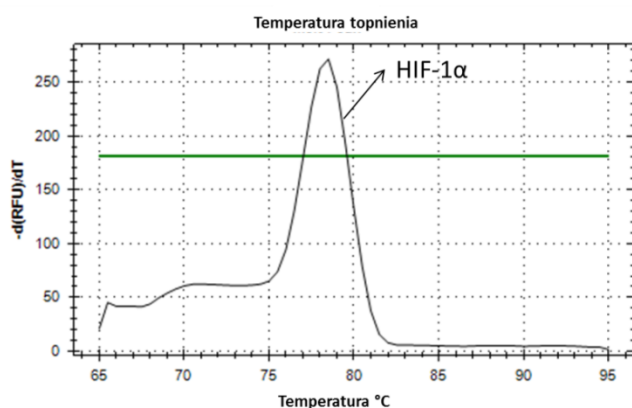


RYCINA 25. Analiza elektroforetyczna produktu PCR. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR dla genu β -AKTYNY o wielkości 192 pz uzyskany z mioblastów modyfikowanych genetycznie jak i natywnych hodowanych w różnych warunkach tlenowych hipoksji (3%), normoksji (5%), warunkach standardowych (21%). A - produkt powstały na matrycy cDNA pochodzącej z mioblastów mio135. Skróty: F/V - cDNA uzyskane z mioblastów modyfikowanych genetycznie konstrukcją FGF-4/VEGF; pTR-UF-22 - cDNA uzyskane z mioblastów elektroporowanych plazmidem kontrolnym pTR-UF-22; WT - cDNA uzyskane z mioblastów natywnych. B - produkt powstały na matrycy cDNA pochodzącej z mioblastów mio191. Skróty: PIGF - cDNA uzyskane z mioblastów modyfikowanych genetycznie konstrukcją PIGF; pCi-neo - cDNA uzyskane z mioblastów elektroporowanych plazmidem kontrolnym pCi-neo; WT - cDNA uzyskane z mioblastów natywnych.

4.1.2. Przygotowanie krzywych standardowych oraz określenie temperatur topnienia produktów.

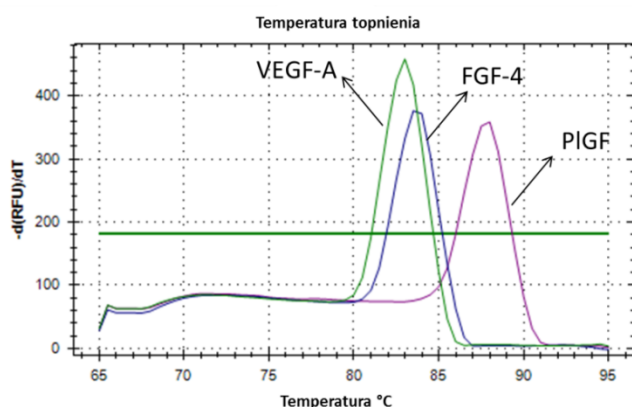
Oznaczenie ekspresji genów *HIF-1 α* , *PIGF*, *FGF-4*, *VEGF-A* we wszystkich populacjach mioblastów było możliwe dzięki przygotowaniu krzywej standardowej dla każdego badanego genu. Dostarczyła ona informacji o wydajności reakcji, która była niezbędna aby dokonać oceny ekspresji genów. Dodatkowo, każdy z produktów charakteryzował się inną temperaturą topnienia, co gwarantowało rozpoznanie jego swoistości.

A



HIF-1α- 78,5° C / 99%

B

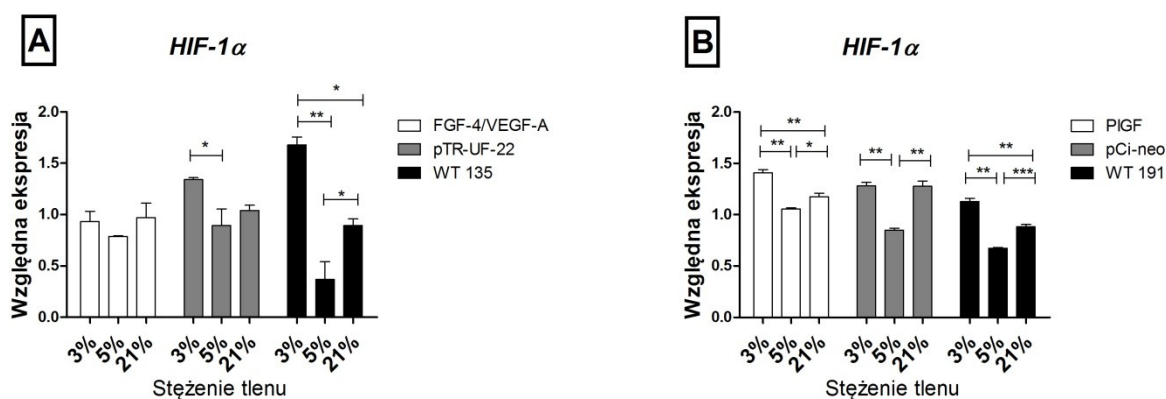


FGF-4- 83,5° C / 94%
VEGF-A- 83,0° C / 99%
PlGF- 88° C / 93%

RYCINA 26. Krzywe topnienia produktów qPCR z temperaturami topnienia (°C) i wydajnością reakcji (%). A -temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla ludzkiego genu *HIF-1α*; B - temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla ludzkich genów *FGF-4*, *VEGF-A*, *PlGF*.

4.1.2. Ocena ekspresji genu *HIF-1α* w badanych populacjach komórkowych

Ekspresja genu *HIF-1α* była badana w populacjach mioblastów modyfikowanych genetycznie *FGF-4/VEGF-A*, *PlGF*, poddanych elektroporacji plazmidami kontrolnymi pTR-UF-22, pCi-neo, oraz w komórkach natywnych, niemodyfikowanych próbkach kontrolnych (WT) hodowanych w różnych stężeniach tlenu: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, warunkach standardowych - 21% O₂.

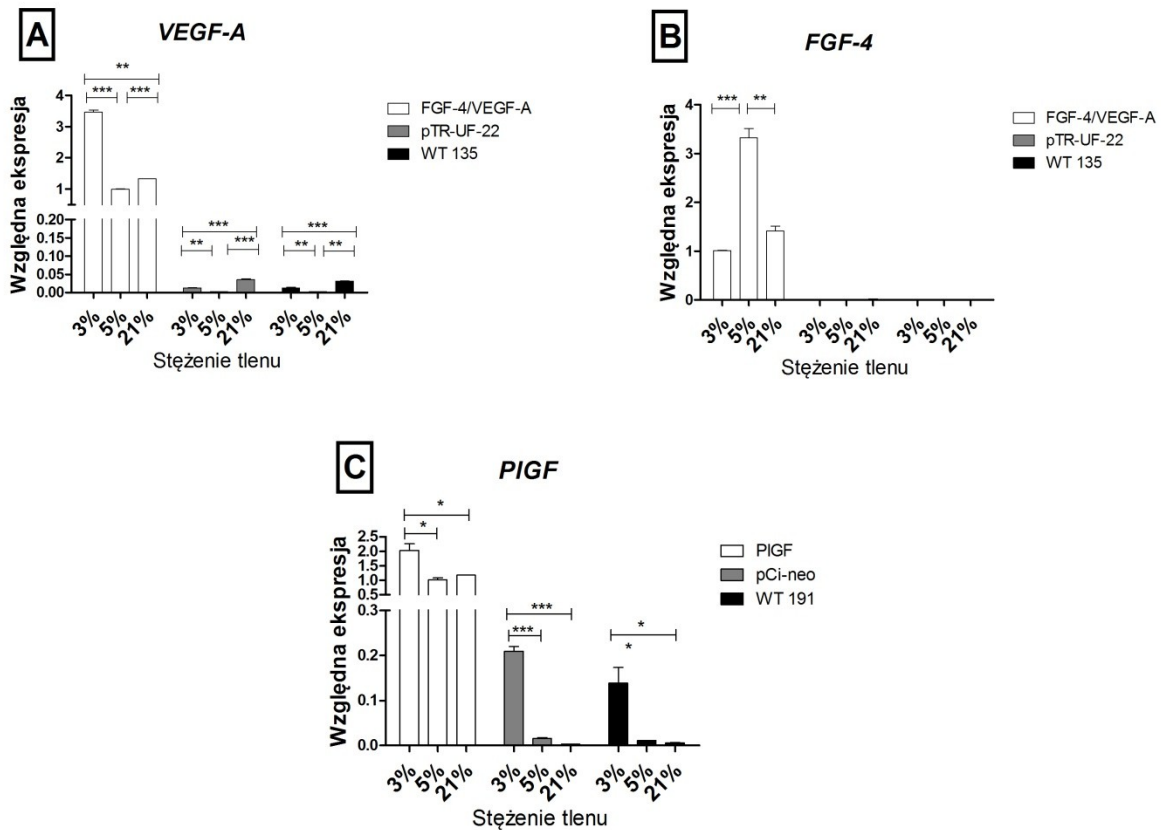


RYCINA 27. Ocena ekspresji genu *HIF-1α* w mioblastach ludzkich. A - Ekspresja genu *HIF-1α* w mioblastach modyfikowanych genami *FGF-4/VEGF*, plazmidem kontrolnym *pTR-UF-22*, oraz mioblastach kontrolnych (WT) hodowanych w następujących stężeniach tlenu: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, warunkach standardowych - 21% O₂; B - Ekspresja genu *HIF-1α* w mioblastach modyfikowanych genem *PIGF*, plazmidem kontrolnym *pCi-neo*, oraz mioblastach kontrolnych (WT) hodowanych w następujących stężeniach tlenu: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, warunkach standardowych - 21% O₂. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$

Wszystkie badane populacje komórek wykazały najniższą ekspresję markera *HIF-1α* podczas hodowli w 5% stężeniu tlenu, czyli w warunkach fizjologicznych dla komórek macierzystych mięśni szkieletowych. Komórki natywne (WT) zarówno w populacji mio135, jak i mio191, wykazały zwiększoną ekspresję markera *HIF-1α* w hipoksji (3% O₂) w stosunku do pozostałych warunków tlenowych, co świadczy o odpowiednim skonstruowaniu modelu eksperymentalnego. W przypadku modyfikacji z użyciem konstrukcji *FGF-4/VEGF*, nie zaobserwowano jednak znaczącego wzrostu ekspresji tego markera w hipoksji (Ryc. 27A). W przypadku modyfikacji genem *PIGF*, zauważono zwiększoną ekspresję genu *HIF-1α* w badanej populacji genetycznie modyfikowanej (Ryc. 27B). W obu populacjach będących kontrolami transfekcji (*pTR-UF-22*, *pCi-neo*) zaobserwowano tendencje spadkowe w ekspresji markera *HIF-1α* w warunkach normoksji.

4.1.3. Ocena ekspresji wprowadzonych transgenów

Po przeprowadzonej reakcji PCR w czasie rzeczywistym, możliwa stała się ocena poziomu ekspresji badanych transgenów w mioblastach hodowanych w różnych stężeniach tlenu: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, warunkach standardowych - 21% O₂



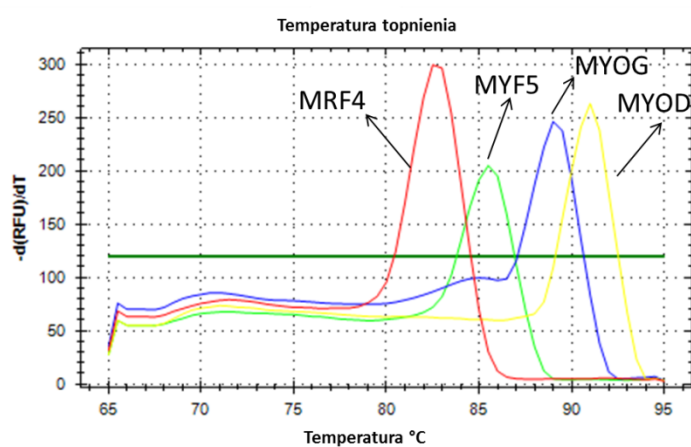
RYCINA 28. Ocena ekspresji wprowadzonych transgenów proangiogennych w mioblastach ludzkich. A - Ekspresja genu *VEGF-A* w mioblastach modyfikowanych genami *FGF-4/VEGF*, plazmidem kontrolnym *pTR-UF-22*, oraz w mioblastach kontrolnych (WT) hodowanych w następujących stężeniach tlenu: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, warunkach standardowych - 21% O₂; B - Ekspresja genu *FGF-4* w mioblastach modyfikowanych genami *FGF-4/VEGF*, plazmidem kontrolnym *pTR-UF-22*, oraz w mioblastach kontrolnych (WT) hodowanych w następujących stężeniach tlenu: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, warunkach standardowych - 21% O₂; C - ekspresja genu *PIGF* w mioblastach modyfikowanych genem *PIGF*, plazmidem kontrolnym *pCi-neo*, oraz mioblastach kontrolnych (WT) hodowanych w następujących stężeniach tlenu: hipoksji - 3% O₂, normoksji - 5% O₂, warunkach standardowych - 21% O₂. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

Zaobserwowano znamienne nadekspresję wprowadzonych transgenów *VEGF-A*, *FGF-4*, *PIGF* w populacjach komórek genetycznie modyfikowanych, w stosunku do komórek transfekowanych plazmidem kontrolnym oraz komórek natywnych (WT). Zaobserwowano wpływ hipoksji (3% O₂) na ekspresję genu *VEGF-A* w populacjach modyfikowanych genetycznie konstrukcją *FGF-4/VEGF* (Ryc. 28A), oraz *PIGF* w populacjach modyfikowanych genem *PIGF* (Ryc. 28C). Jedynie w przypadku genu *FGF-4* to normoksja (5% O₂) wzbudziła znamienne największą ekspresję wprowadzonego transgenu w mioblastach modyfikowanych genetycznie za pomocą *FGF-4/VEGF-A* (Ryc. 28B). Hipoksja miała również wpływ na ekspresję genu *PIGF* w mioblastach kontrolnych, modyfikowanych

plazmidem kontrolnym pCi-neo, jak i natywnych (WT), w porównaniu do mioblastów hodowanych w pozostałych warunkach tlenowych (Ryc. 28C). W komórkach kontrolnych transfekowanych plazmidem pTR-UF-22 oraz niemodyfikowanych populacji mio135 zaobserwowano niewielkie poziomy transkryptów genu *VEGF-A* (Ryc. 28A).

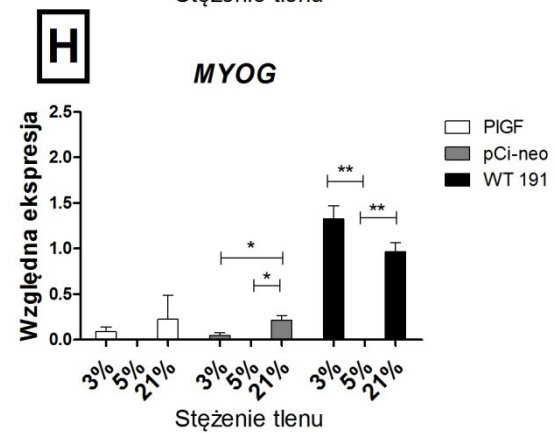
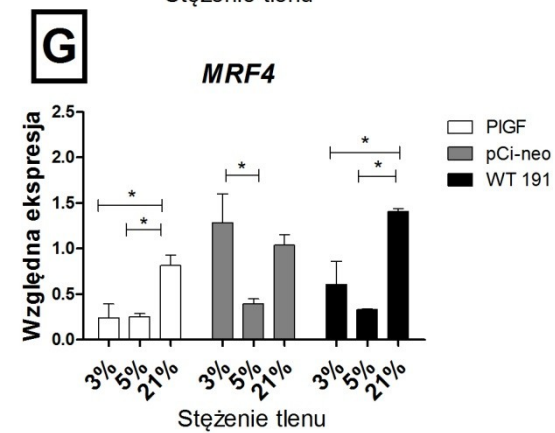
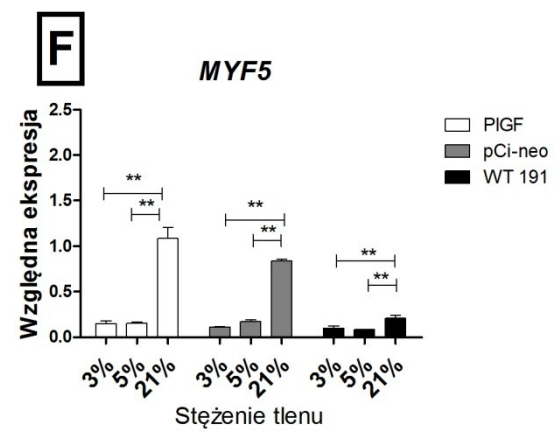
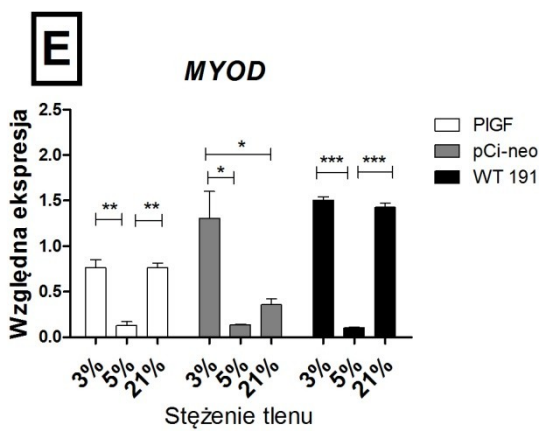
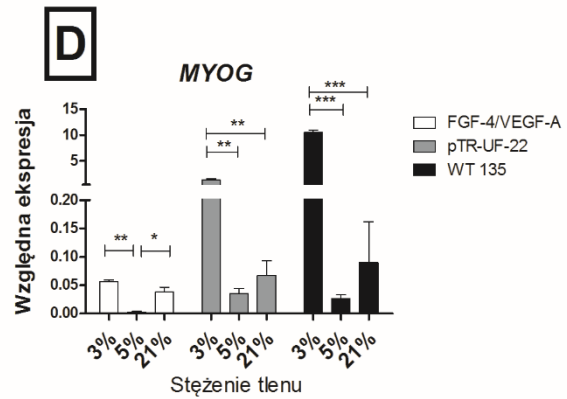
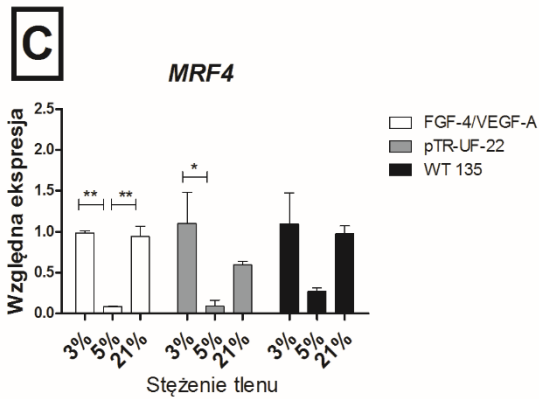
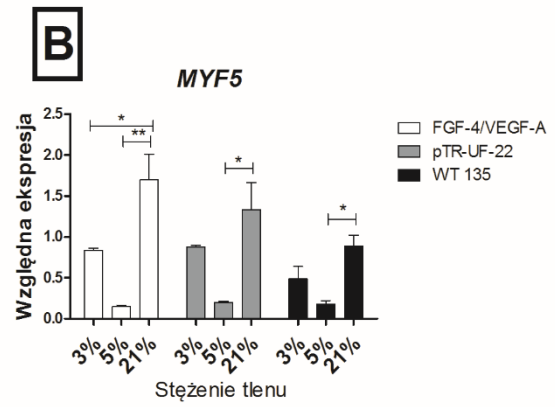
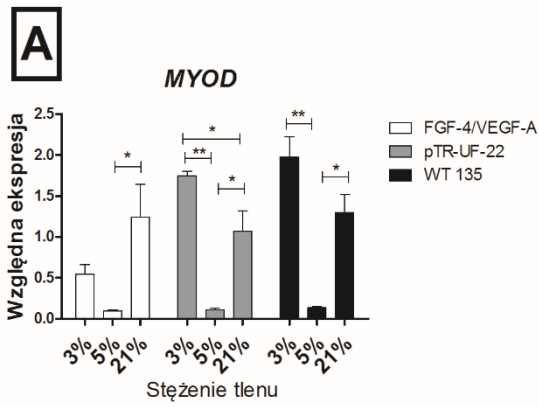
4.1.4 Ocena ekspresji genów miogennych

Wpływ warunków tlenowych - hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz warunków standardowych hodowli (21% O₂), a także przeprowadzonych modyfikacji genetycznych genami proangiogennymi na ekspresję genów związanych z miogenezą, został określony przy pomocy reakcji qPCR. Zbadano „wczesne” geny miogenne: *MYOD*, *MYF5* oraz geny „późne”, odpowiedzialne za wejście komórek na szlak dojrzewania i różnicowania - *MRF4*, *MIOG* (miogenina). Było to możliwe dzięki przygotowaniu krzywych standardowych dla każdego z badanych genów. Dostarczyły one informacji o wydajności reakcji, która była niezbędna aby dokonać oceny ekspresji genów. Dodatkowo, każdy z produktów charakteryzował się inną temperaturą topnienia, co gwarantowało rozpoznanie jego swoistości.



MRF4- 82,50° C/ 96%
MYOG- 89,0° C/ 94%
MYOD- 91,0° C/ 87%
MYF5- 85,5 C/ 99%

RYCINA 29. Krzywe topnienia produktów qPCR odpowiadające ludzkim genom miogennym - *MRF4*, *MYOG*, *MYOD*, *MYF5* z temperaturami topnienia (°C) i wydajnością reakcji (%).

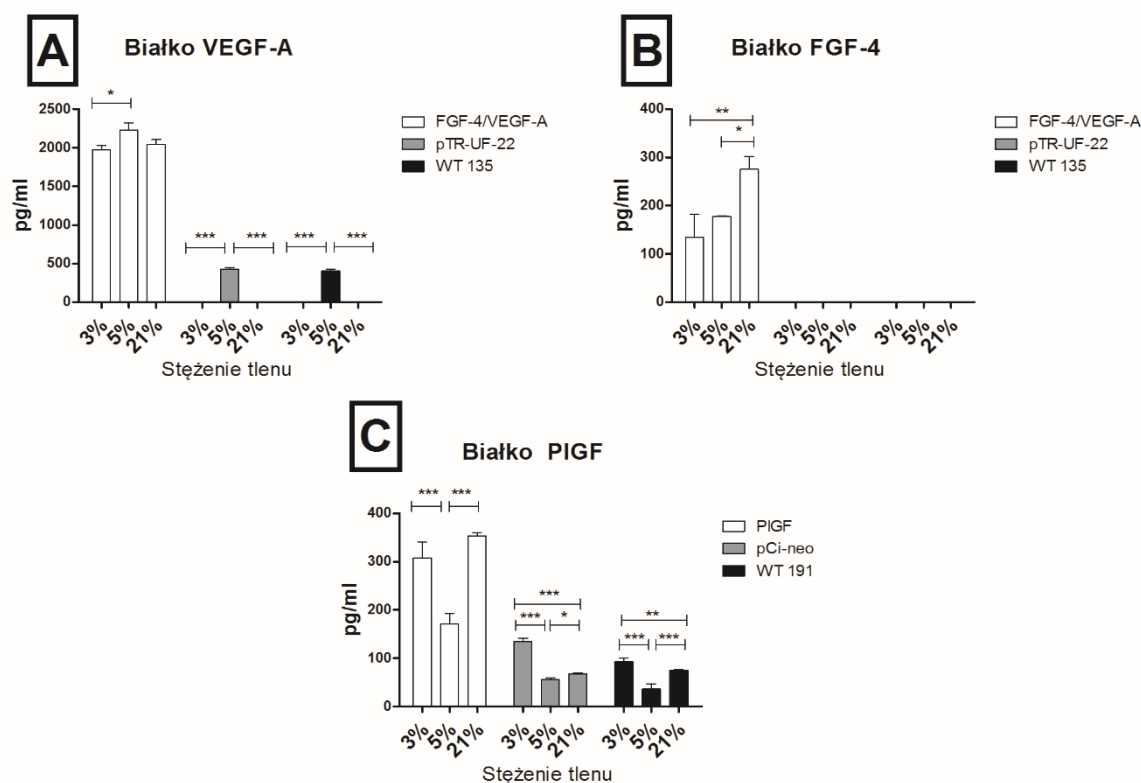


*RYCINA 30. Ekspresja genów miogennych w komórkach macierzystych mięśni szkieletowych w różnych stężeniach tlenu: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂). A- ekspresja genu MYOD w mioblastach populacji mio135 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych; B-Ekspresja genu MYF5 w mioblastach populacji mio135 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych; C- ekspresja genu MRF4 w mioblastach populacji mio135 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych; D- ekspresja genu MYOG- miogenina w mioblastach populacji mio135 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych; D- ekspresja genu MYOD w mioblastach populacji mio191 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych; E- ekspresja genu MYF5 w mioblastach populacji mio191 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych; F- ekspresja genu MRF4 w mioblastach populacji mio191 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych; G- ekspresja genu MYOG- miogenina w mioblastach populacji mio191 zarówno genetycznie modyfikowanych (w tym kontrolnym plazmidem), jak i natywnych. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.*

Populacje komórek hodowane w warunkach normoksji (5% O₂) miały tendencje do obniżania ekspresji wszystkich czterech badanych genów miogennych w porównaniu do pozostałych warunków tlenowych (Ryc. 30). Zaobserwowano też znamienny wpływ warunków tlenowych na regulację ekspresji genu *MYF5* (Ryc. 30B, F), gdzie zarówno komórki genetycznie modyfikowane, jak i natywne, miały tendencje do obniżenia jego ekspresji w warunkach hipoksji i normoksji względem warunków standardowych (hiperoksji). Wyraźnie zaznaczony spadek ekspresji tego genu w mioblastach natywnych hodowanych w stężeniu tlenu równym 3% O₂ świadczy o tym, iż to nie modyfikacja miała wpływ na jego ekspresję, a warunki tlenowe (Ryc. 30B, F). W przypadku mioblastów modyfikowanych genem *PIGF* obserwowano spadek ekspresji genów *MYOD* i *MYOG* w porównaniu do komórek natywnych (WT 191) (Ryc. 30E, H). W przypadku mioblastów modyfikowanych genetycznie za pomocą konstrukcji *FGF-4/VEGF* zauważono drastyczny spadek ekspresji genu *MYOG* w porównaniu do mioblastów nie zmodyfikowanych (WT 135)- Ryc. 30D.

4.2. Ocena ekspresji białek proangiogennych

Przeprowadzono pomiar ilości wydzielonego białka metodą immunoenzymatyczną ELISA. Stężenie białek oznaczano używając supernatantów zebranych z mioblastów zarówno genetycznie modyfikowanych, kontrolnych (elektroporowanych pustym plazmidem) jak natywnych, hodowanych w różnych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂).



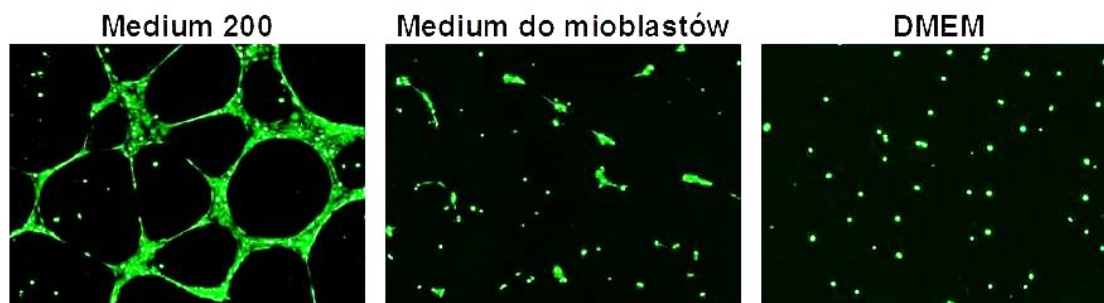
RYCINA 31. Ekspresja białek w supernatantach zebranych z nad komórek hodowanych w różnych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂). A- stężenie białka VEGF-A w mediach zebranych z nad mioblastów modyfikowanych genetycznie konstrukcją FGF-4/VEGF, kontroli transfekcji tj. mioblastów elektroporowanych pustym plazmidem pTR-UF-22, oraz mioblastów natywnych (WT); B- stężenie białka FGF-4 w mediach zebranych z nad mioblastów modyfikowanych genetycznie konstrukcją FGF-4/VEGF, kontroli transfekcji tj. mioblastów elektroporowanych pustym plazmidem pTR-UF-22, oraz mioblastów natywnych (WT); C- stężenie białka PlGF w mediach zebranych z nad mioblastów modyfikowanych genetycznie genem PlGF, kontroli transfekcji tj. mioblastów elektroporowanych pustym plazmidem pCi-neo, oraz mioblastów natywnych (WT). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

Zaobserwowano wysokie stężenia białek proangiogennych VEGF-A, FGF-4 oraz PlGF w supernatantach zebranych z nad komórek zmodyfikowanych tymi genami, w porównaniu do komórek kontrolnych (transfekowanych pustym plazmidem oraz natywnych - WT). Wysokie stężenia białka PlGF wykryto także w supernatantach pochodzących z hodowli mioblastów kontrolnych, przy czym najwyższe stężenie oznaczono w warunkach hipoksji (3% O₂) - Ryc. 31C. W przypadku białka PlGF, hipoksja nie miała negatywnego wpływu na sekrecję białka, ponieważ była ona porównywalna z ilością w uzyskaną w hodowli w warunkach standardowych. Warto zaznaczyć, iż najniższe stężenie białka było wykrywane w warunkach normoksji (5% O₂) (Ryc. 31C). Białko VEGF-A było wykrywane na porównywalnym poziomie we wszystkich badanych grupach komórek modyfikowanych konstrukcją FGF-

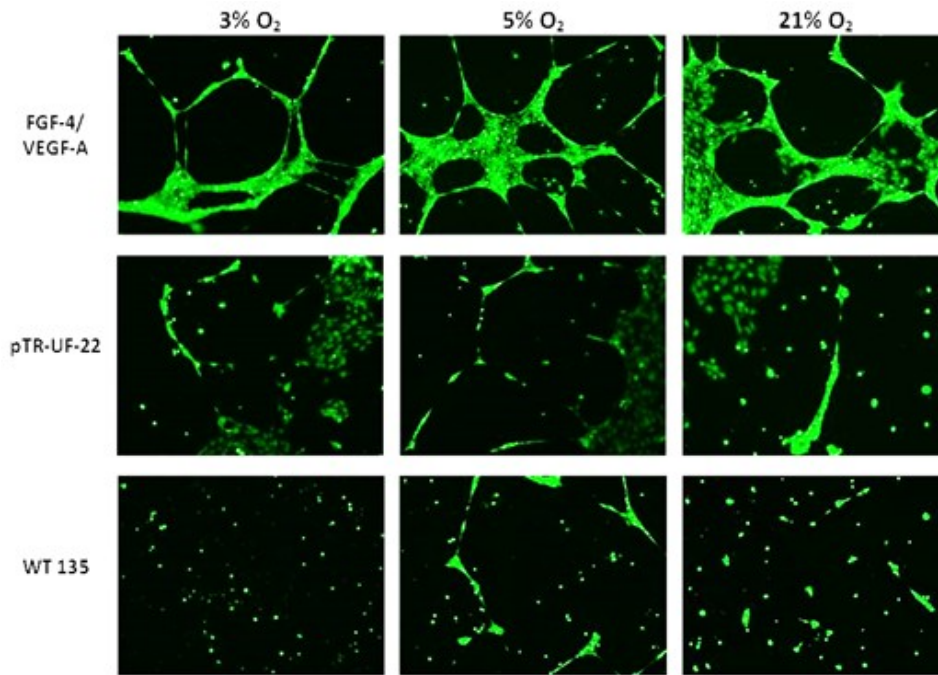
4/*VEGF*. Delikatny wzrost obserwowano w populacjach hodowanych w 5% stężeniu tlenu (normoksja) zarówno w przypadku komórek modyfikowanych, jak i kontrolnych (transfekowanych pustym plazmidem oraz natywnych - WT) - Ryc. 31A. Badanie sekrecji białka FGF-4, ujawniło jego wrażliwość na zmienione warunki tlenowe, co skutkowało obniżeniem sekrecji białka w warunkach hipoksji (3% O₂) oraz normoksji (5% O₂) w stosunku do hiperoksji (Ryc. 31B).

4.2.1. Ocena funkcjonalności białka - test formowania kapilar *in vitro*

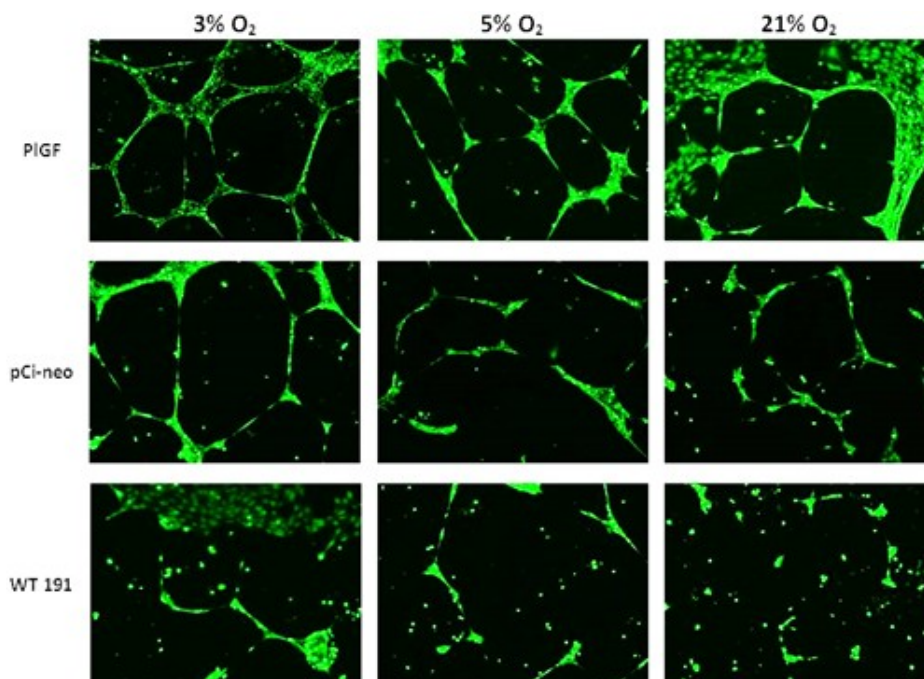
Supernatanty zebrane z wszystkich badanych populacji mioblastów hodowanych w różnych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂), były testowane pod kątem właściwości proangiogennych wydzielanych białek. Potwierdzono funkcjonalność białek ulegających nadekspresji i sekrecji. Białko PlGF okazało się być równie skuteczne w formowaniu sieci prymitywnych kapilar z komórek HUVEC (Ryc. 34), jak mieszanina wydzielanych białek FGF-4 oraz VEGF (Ryc. 33). Kontrolę pozytywną eksperymentu stanowiło medium hodowlane promujące formowanie się kapilar (Medium 200 z suplementem LVES), w którym uformowana sieć naczyń była porównywalna z badanymi grupami mediów zebranych z mioblastów. Kontrole negatywne stanowiły: medium do hodowli mioblastów oraz pożywka podstawowa DMEM, w których nie obserwowano tworzenia się kapilar naczyńiowych (Ryc. 32). Podobną zależność zauważono w przypadku supernatantów uzyskanych z hodowli komórek dzikich zarówno w populacji mio135, jak i mio191. W przypadku supernatantów zebranych z kontroli transfekcji (mioblasty elektroporowane - pTR-UF-22, pCi-neo), można było dopatrzeć się kilku struktur wyglądających jak kapilary, jednak nie tworzących sieci. Stężenie tlenu nie miało widocznego wpływu na funkcjonalność badanych białek.



RYCINA 32. Test proangiogenny. Kontrola z użyciem medium promującego wzrost kapilar naczyńiowych - Medium 200 (kontrola pozytywna), czystym medium do hodowli mioblastów oraz pożywką podstawową DMEM (kontrole negatywne).



RYCINA 33. Test proangiogeny. Potwierdzenie funkcjonalności wydzielonych do medium białek FGF-4/VEGF-A. Badane populacje: FGF-4/VEGF-A - supernatant zebrany znad komórek modyfikowanych genetycznie konstrukcją FGF-4/VEGF; pTR-UF-22 - supernatant uzyskany znad komórek elektroporowanych plazmidem kontrolnym pTR-UF-22; WT135 - supernatant zebrany znad komórek kontrolnych populacji mio135



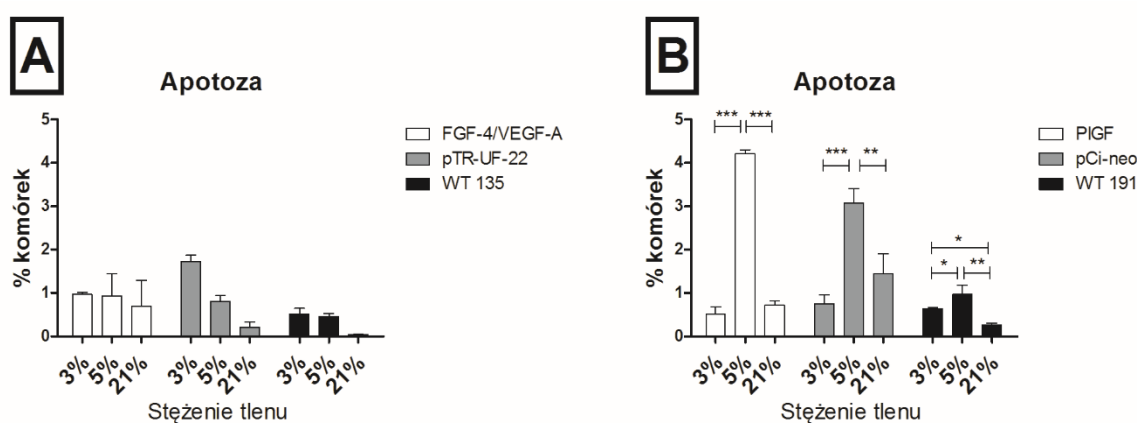
RYCINA 34. Test proangiogeny. Potwierdzenie funkcjonalności białka PlGF wydzielonego do medium. Badane populacje: PlGF - supernatant zebrany znad komórek modyfikowanych genetycznie wektorem PlGF; pCi-neo - supernatant uzyskany znad komórek elektroporowanych plazmidem kontrolnym pCi-neo; WT191 - supernatant zebrany znad komórek kontrolnych populacji mio191.

4.3. Właściwości biologiczne mioblastów

Aby ocenić właściwości mioblastów modyfikowanych genetycznie wobec kontrolnych oraz natywnych, wykonano szereg testów biologicznych mających wykazać stopień ich adaptacji do warunków z obniżonymi stężeniami tlenu. W tym celu poddano badaniom podatność komórek na apoptozę, oceniono potencjał proliferacyjny mioblastów ludzkich oraz ich zdolność do różnicowania się w miotuby (test funkcjonalny).

4.3.1 Apoptoza

Aby ocenić odporność komórek na stres tlenowy, wykonano test umożliwiający oznaczenie odsetka komórek wszystkich badanych populacji, wchodzących na szlak apoptozy.



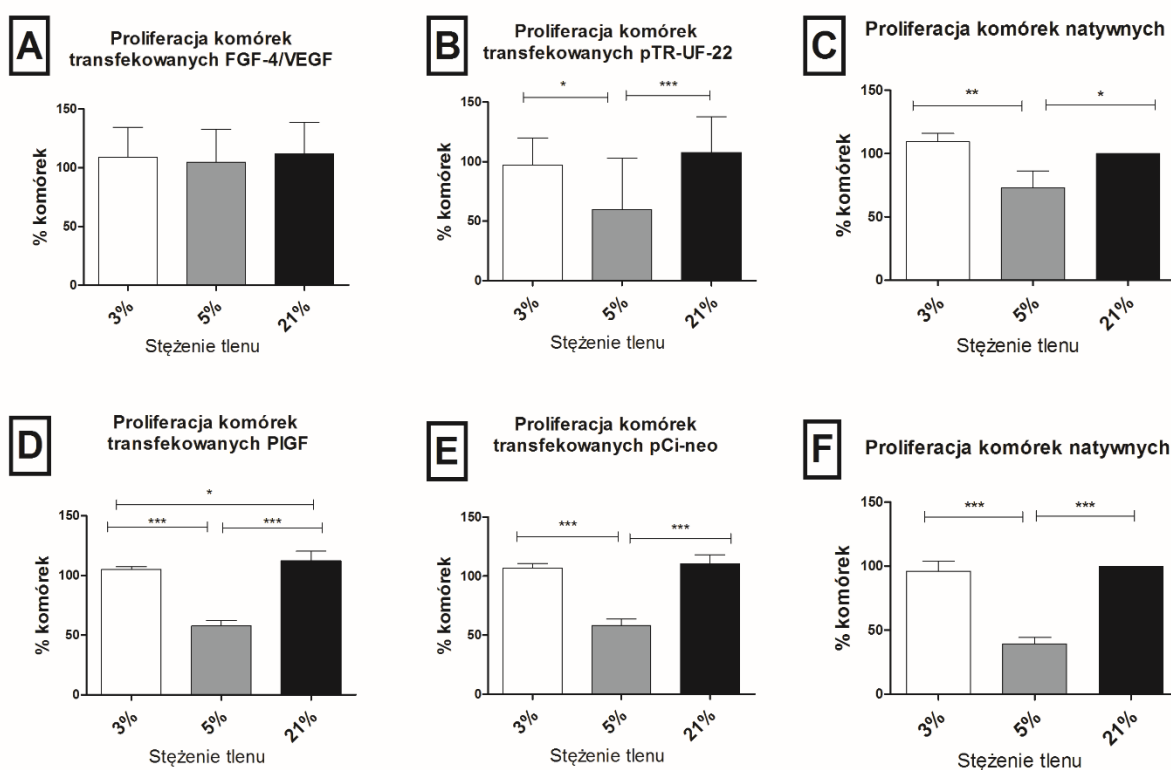
*RYCINA 35. Analiza cytometryczna przedstawiająca odsetek komórek ulegających apoptozie po hodowli w zmienionych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂). A - odsetek komórek apoptotycznych z populacji mio135 genetycznie modyfikowanych konstrukcją FGF-4/VEGF, kontrolnych (transfekowanych pustym plazmidem) jak i natywnych; B - odsetek komórek apoptotycznych z populacji 191 zarówno genetycznie modyfikowanych wektorem PIGF, kontrolnych (transfekowanych pustym plazmidem) jak i natywnych. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.*

Obydwie populacje komórek zarówno mio135, jak i mio191 zmodyfikowane genetycznie genami proangiogennymi oraz mioblasty natywne, wykazywały apoptozę oscylującą około 1-2% komórek. Wyjątkiem była populacja mioblastów mio191 hodowana w normoksji - 5% O₂ (Ryc. 35B), przy czym największą odporność na apoptozę w tych warunkach wykazywały komórki natywne (WT). Modyfikacje zwiększały stopniowo liczbę komórek apoptotycznych (transfekowane plazmidem kontrolnym pCi-neo około 3%, zaś transfekowane genem PIGF - około 4,5% komórek apoptotycznych). W przypadku komórek z populacji mio135, poziom apoptozy utrzymywany był w podobnych granicach - 0,5-2% komórek. Najmniej komórek

apoptotycznych wykryto w populacji natywnej mioblastów 135 hodowanych w warunkach standardowych (Ryc. 35A). Analizując jedynie warunki hipoksji okazało się, iż komórki modyfikowane genem *PIGF* wykazały mniejszą apoptozę (około 0,5%) w porównaniu do komórek modyfikowanych genetycznie konstrukcją *FGF-4/VEGF* (około 1% komórek).

4.3.2. Proliferacja

Przy pomocy testu MTS określano potencjał proliferacyjny komórek genetycznie modyfikowanych w stosunku do populacji wyjściowej - niemodyfikowanej (WT). Mioblasty były hodowane z różnych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂).



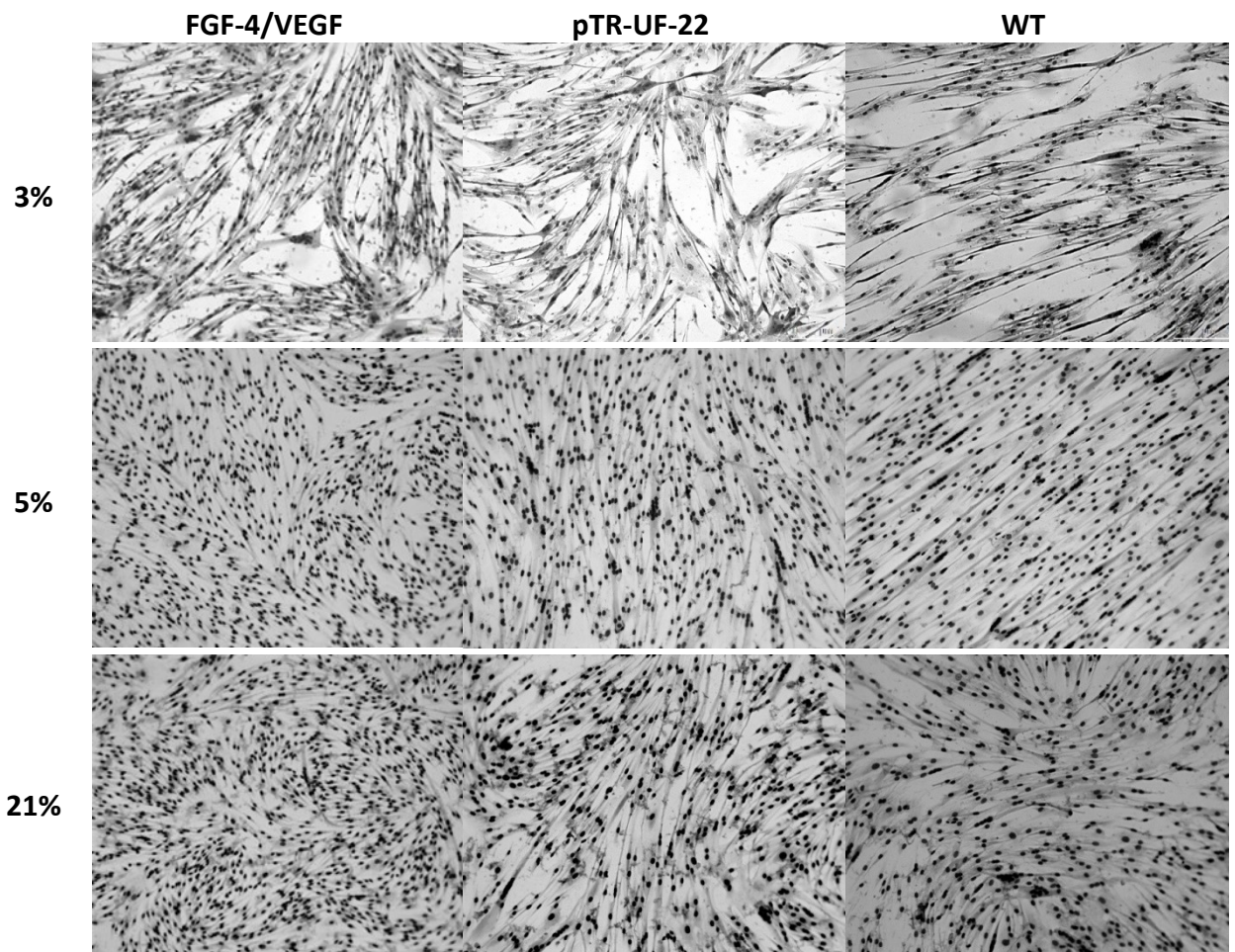
RYCINA 36. Potencjał proliferacyjny mioblastów zarówno modyfikowanych genetycznie, kontrolnych (transfekowanych pustym plazmidem) jak i natywnych hodowanych w różnych warunkach tlenowych: hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz warunków standardowych (21% O₂). A - proliferacja mioblastów z populacji mio135 zmodyfikowanych genetycznie używając konstrukcji FGF-4/VEGF; B - proliferacja kontrolnych mioblastów populacji mio135, transfekowanych pustym wektorem pTR-UF-22; C - proliferacja mioblastów natywnych populacji mio135; D - proliferacja mioblastów populacji mio191 zmodyfikowanych genetycznie za pomocą genu PIGF; E - proliferacja mioblastów populacji mio191 transfekowanych pustym plazmidem pCi-neo; F - proliferacja mioblastów natywnych populacji mio191. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: **p*<0,05, ***p*<0,01 i ****p*<0,001.

Zarówno populacja mio135, jak i mio191, wykazywały zmniejszoną proliferację w warunkach normoksji - 5%O₂ (Ryc. 36B-F). Odstępstwem od reguły były komórki

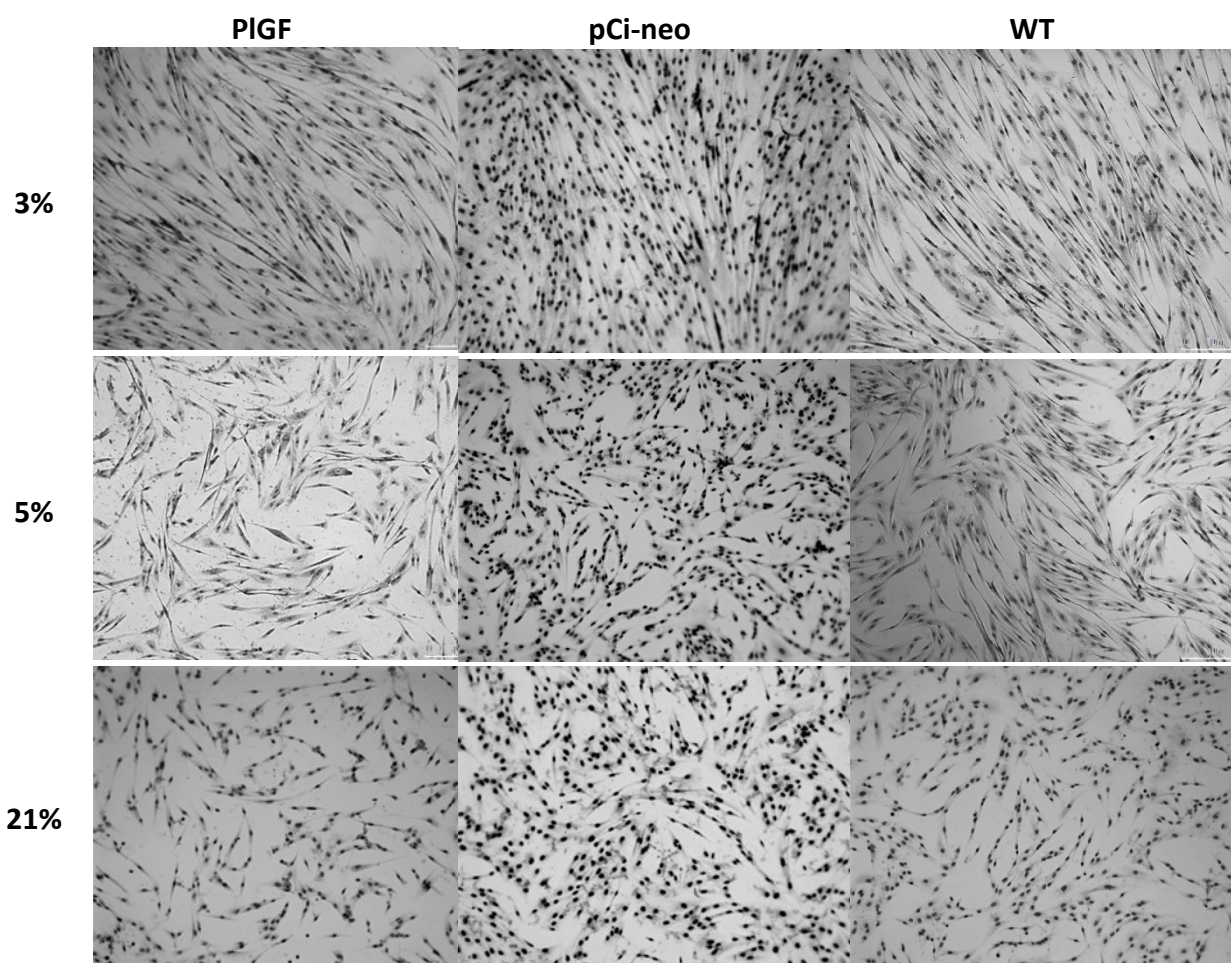
modyfikowane genetycznie konstrukcją genową *FGF-4/VEGF*, w których obserwowano proliferację na podobnym poziomie we wszystkich warunkach tlenowych (Ryc. 36A). Mioblasty transfekowane pustymi plazmidami kontrolnymi nie wykazywały zmian w proliferacji pomiędzy populacjami hodowanymi w warunkach hipoksji (3% O₂), a tymi hodowanymi w warunkach standardowych (Ryc. 36B, E). Te same tendencje wykazywały komórki zarówno z populacji mio135, jak i mio191 - Ryc. 36C, F. Komórki modyfikowane genetycznie za pomocą genu *PIGF* wykazały mniej zintensyfikowaną proliferację w warunkach hipoksji (3% O₂) w porównaniu do warunków standardowych (21% O₂) - Ryc. 36D.

4.3.3. Różnicowanie w miotuby

Aby ocenić zdolność mioblastów do łączenia się w bardziej złożone struktury, wykonano test mający na celu wymuszenie formacji miotub. Komórki modyfikowane genetycznie oraz kontrolne (transfekowane pustym plazmidem) i natywne, obydwu populacji (mioblasty mio135 i mio191) poddano różnicowaniu za pomocą specjalnego medium hodowlanego.



RYCINA 37. Różnicowanie w miotuby komórek populacji komórek mioI35 modyfikowanych genetycznie konstrukcją genetyczną FGF-4/VEGF, plazmidem kontrolnym pTR-UF-22, oraz natywnych, hodowane w zmienionych warunkach tlenowych - hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂) przez 7 dni w medium różnicującym zawierającym surowicę końską.



RYCINA 38. Różnicowanie w miotuby komórek populacji mio191 modyfikowanych genetycznie genem PIGF, plazmidem kontrolnym pCi-neo, oraz natywnych, hodowanych w zmienionych warunkach tlenowych - hipoksji (3% O₂), normoksji (5% O₂) oraz w warunkach standardowych (21% O₂) przez 7 dni w medium różnicującym zawierającym surowicę końską.

Komórki populacji mio135 wykazywały polepszone zdolności do różnicowania w miotuby w warunkach tlenowych odpowiadających hipoksji (Ryc. 37). W przypadku komórek populacji mio191, zaobserwowano tendencje do budowy bardziej zwartych miotub podczas hodowli w 3% stężeniu tlenu. Szczególnie interesująco kształtuje się porównanie mioblastów transfekowanych genem *PIGF* z mioblastami natywnymi tej populacji, gdyż hodowane w warunkach standardowych komórki wykazywały słaby potencjał do tworzenia miotub, natomiast, wraz ze spadkiem dostępności tlenu, ten potencjał wzrastał (Ryc. 38).

5. Badania w modelu zwierzęcym.

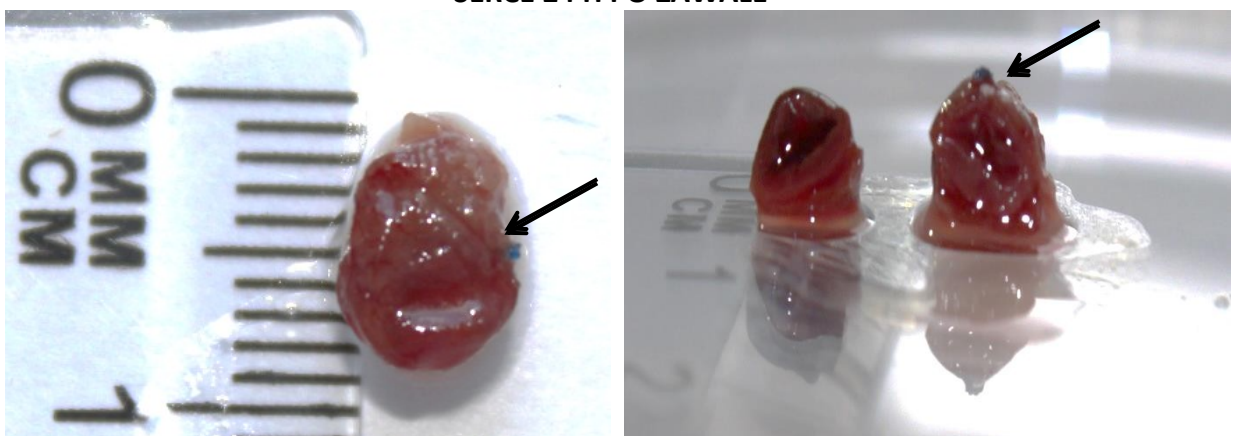
5.1. Ustalenie kinetyki molekularnych zmian w ekspresji genów proangiogennych badanych w wybranych interwałach czasowych od indukcji zawału serca u myszy

Aby udokumentować zmiany w sercu, związane z jego niekorzystną przebudową i ścieńczeniem lewej komory, wykonano dokumentację fotograficzną pobranych serc.

SERCE KONTROLNE - bez zawału



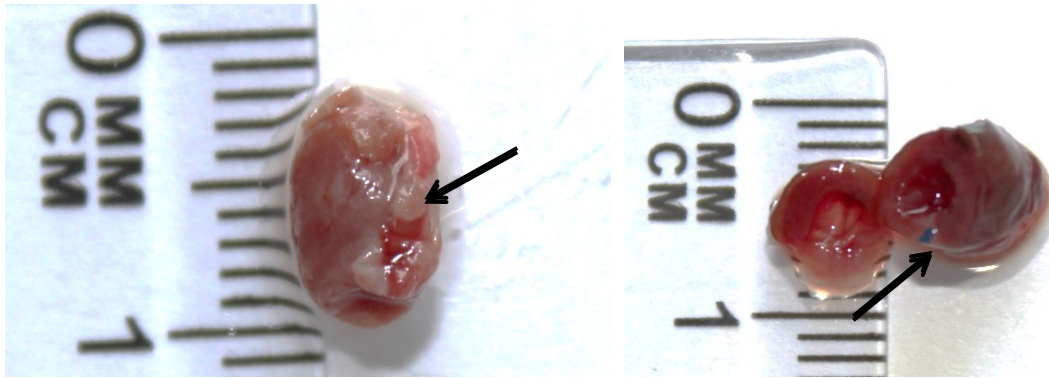
SERCE 24 H PO ZAWALE



SERCE 7 DNI PO ZAWALE



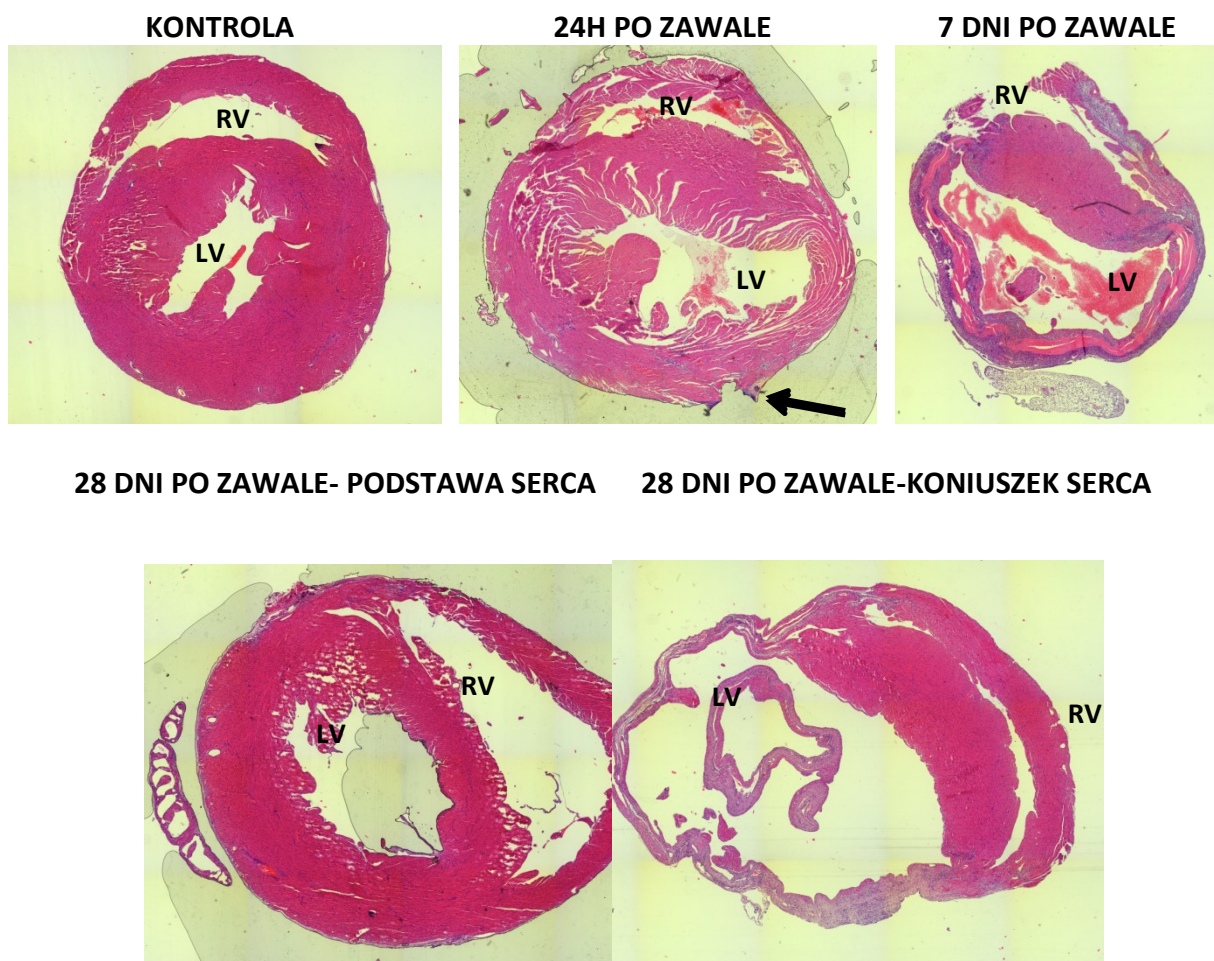
SERCE 28 DNI PO ZAWALE



RYCINA 39. Zdjęcia serc mysich w różnych punktach czasowych po indukcji zawału oraz serca kontrolnego, w którym nie została przeprowadzona procedura podwiązania lewej tętnicy wieńcowej. Strzałkami oznaczono miejsca podwiązania lewej tętnicy wieńcowej.

Zdjęcia ukazują niekorzystną przebudowę serca (ang. *cardiac remodeling*), zachodzącą wraz z upływem czasu po zawale. Serca kontrolne (bez zawału) są anatomicznie prawidłowe, mają wyraźniej zaznaczoną lewą i prawą komorę. Po 24 h od indukcji zawału, można zauważyć wgłębienie w miejscu gdzie zostało wykonane podwiązanie. W 7 dni po zawale serca, ściana lewej komory jest wyraźnie cieńsza, natomiast serce zaczyna pokrywać tkanka łączna, co jest charakterystyczne dla procesu bliznowacenia w miejscu pozawałowym. W 28 dni po zawale serce uległo całkowitej przebudowie, koniuszek serca, ze względu na ścieńczenie ścian, uległ degeneracji. Dodatkowo zauważalne jest zwłóknienie serca w miejscu podwiązania i bezpośrednio go otaczającym.

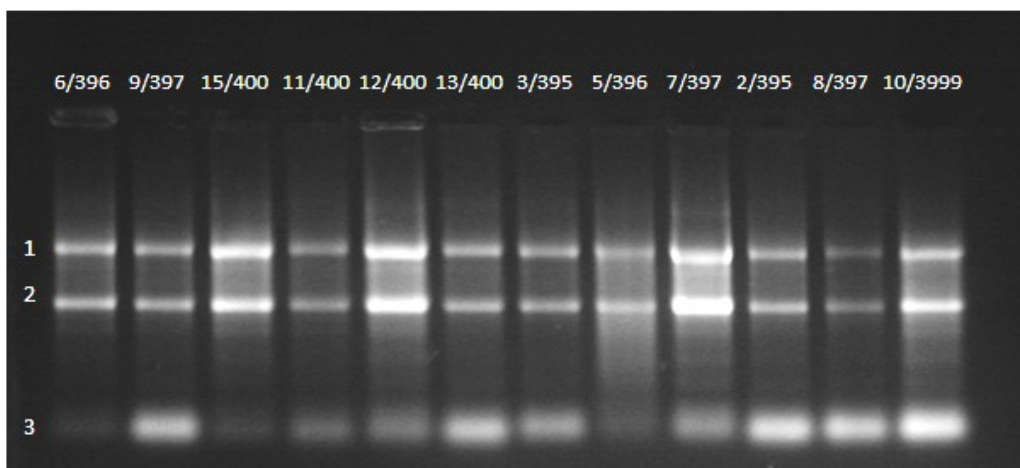
Wykonano również analizę histologiczną serc - Ryc. 40, która wyraźnie wskazała na przebudowę lewej komory, ścieńczenie ściany pozawałowej oraz stan zapalny (7 dzień, 28 dzień po podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej). Zdjęcie histologiczne serca w 24 godziny po zawale ukazało również ślad po miejscu podwiązania.



RYCINA 40. Analiza histologiczna serc myszy po zawale. Serca wybarwione za pomocą hematoksyliny oraz eozyny, widoczne ogniska stanu zapalnego- kolor fioletowy. LV - lewa komora (ang. left ventricle); RV - prawa komora (ang. right ventricle). Strzałką oznaczono miejsce podwiązania.

5.1.2 Analiza ekspresji genów proangiogennych

Po wykonaniu dokumentacji fotograficznej serc, izolowano materiał biologiczny. Wyizolowane RNA weryfikowano za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (Ryc. 41). Analiza elektroforetyczna wykazała, iż RNA jest dobrej jakości, o czym świadczyła obecność dwóch prążków odpowiadających podjednostkom 28S i 18S RNA. Taki obraz potwierdził brak degradacji uzyskiwanego RNA. Prążki występujące u dołu rozdziału świadczą o obecności frakcji niskocząsteczkowych RNA - tRNA i 5S RNA, które w żaden sposób nie zaburzają dalszych doświadczeń.



RYCINA 41. Przykładowy rozdział RNA w 1,5% żelu agarozowym. Grupy myszy: kontrola bez zawału - 6/396, 9/397, 15/400; 24h po zawale - 11/400, 12/400, 13/400; 7 dni po zawale - 3/395, 5/396, 7/397; 28 dni po zawale - 2/395, 8/397, 10/3999. Rozdział ukazuje 2 podjednostki rybosomalne RNA: 1 - 28S, 2 - 18S, oraz niskocząsteczkowe RNA: tRNA i 5S RNA - 3.

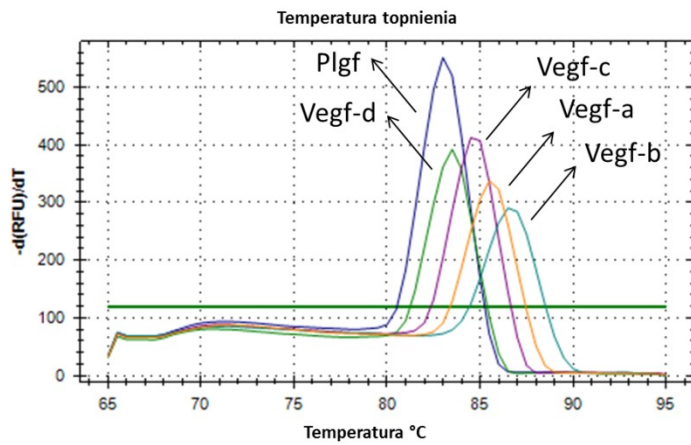
Po wyizolowaniu frakcji mRNA wykonywano odwrotną transkrypcję, w celu uzyskania cDNA. Następnie, próbki cDNA oceniono za pomocą reakcji PCR z użyciem starterów na β -act. Weryfikacji dopełniała elektroforeza w 3% żelu agarozowym, która ukazała produkt na wysokości 192 pz odpowiadający fragmentowi genu *aktyny* (Ryc. 42).



RYCINA 42. Przykładowy rozdział elektroforetyczny genu β -act, z matrycy cDNA, uzyskanego z serc mysich. Grupy myszy: kontrola bez zawału - 6/396, 9/397, 15/400; 24h po zawale - 11/400, 12/400, 13/400; 7 dni po zawale - 3/395, 5/396, 7/397; 28 dni po zawale - 2/395, 8/397, 10/3999.

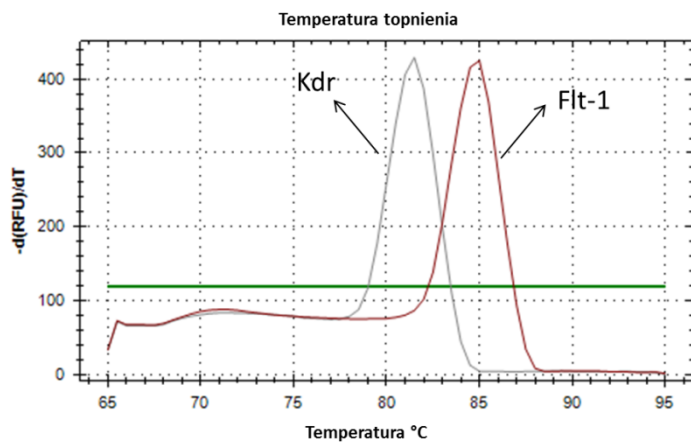
Aby zbadać ekspresję genów *Hif-1 α* , *Vegf-a*, *Vegf-b*, *Vegf-c*, *Vegf-d*, *Plgf* oraz receptorów dla tych genów: *Flt-1* oraz *Kdr* w sercach z poszczególnych punktów czasowych, niezbędne było przygotowanie krzywej standardowej dla każdego badanego genu. Dostarczyła ona informacji o wydajności reakcji ($E = \%$), która była niezbędna aby dokonać kalkulacji ekspresji genów. Dodatkowo, każdy z produktów charakteryzował się inną temperaturą topnienia ($T_m = ^\circ C$), co gwarantowało rozpoznanie swoistości. Ta sama zasada postępowania dotyczyła również genów referencyjnych *Tpt*, *Hprt*, *Gapdh*.

A



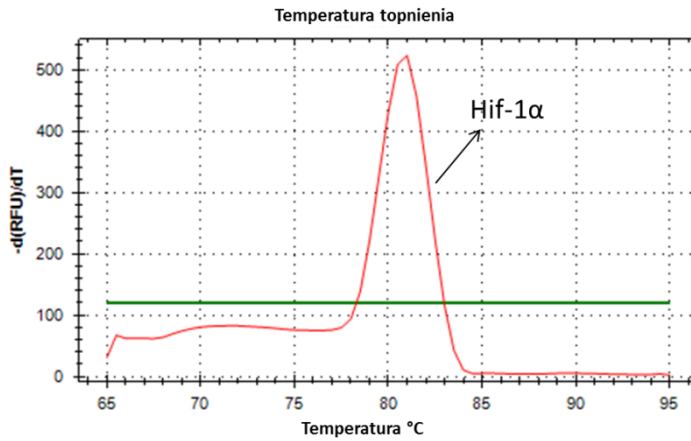
Vegf-a- 85,5° C/ 102%
Vegf-b- 86,5° C/ 94%
Vegf-c- 84,5° C/ 99%
Vegf-d- 83,5° C/ 98%
Plgf- 83,0° C/ 99,8%

B

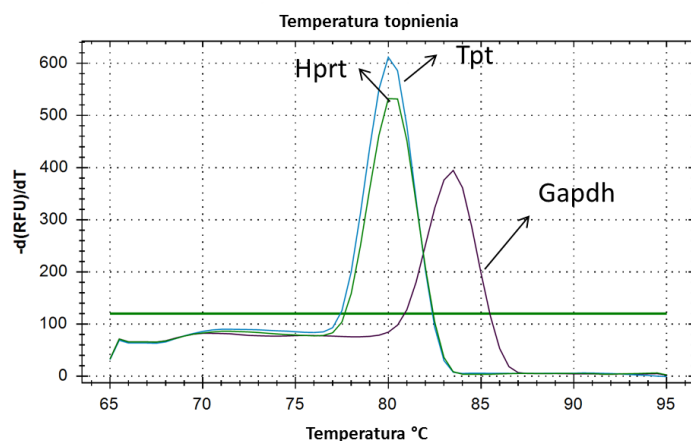


Flt-1- 85,0° C/ 98%
Kdr- 81,5° C/ 94%

C



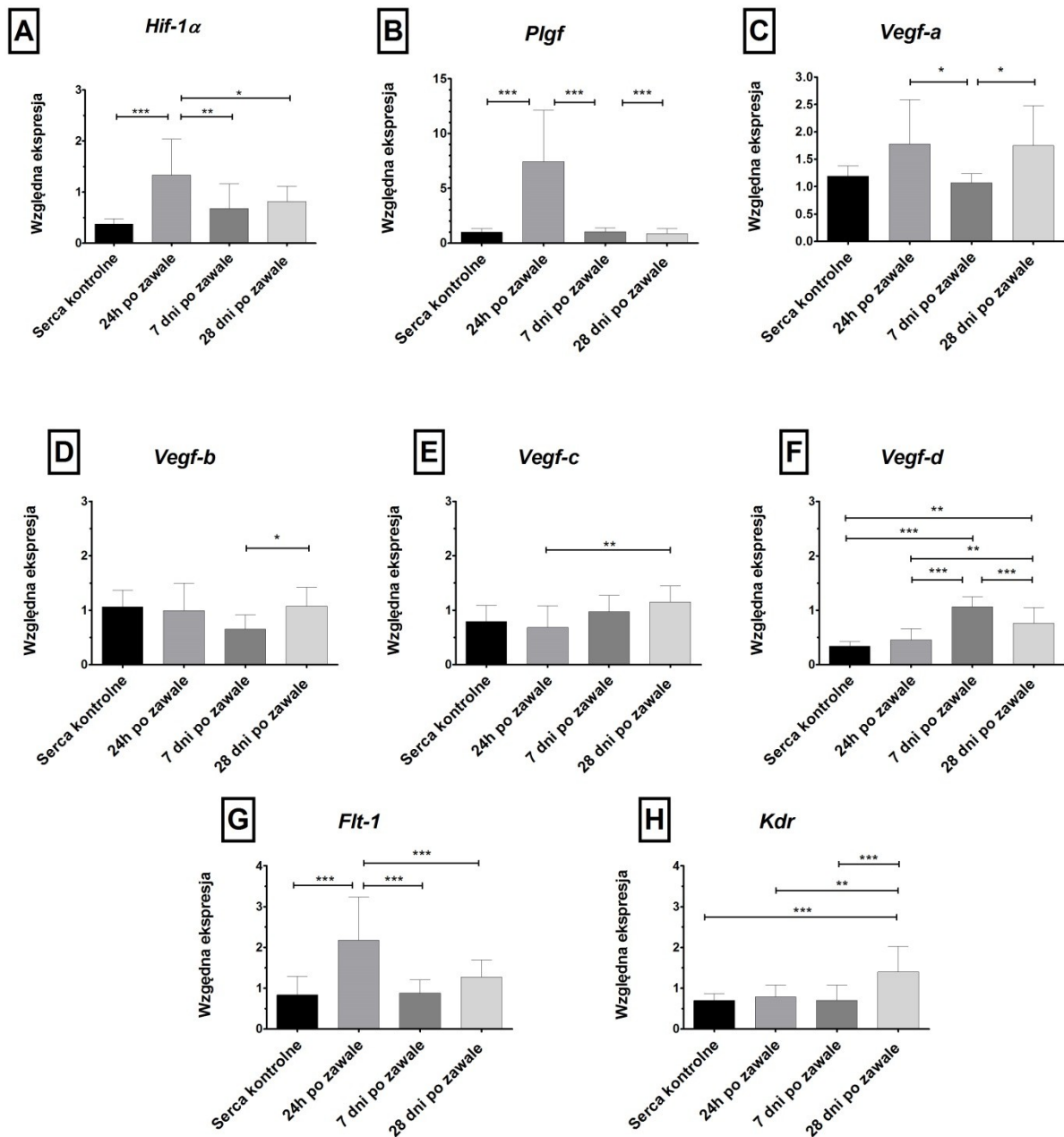
Hif-1α- 81,0° C/ 91%

D

Hprt- 80,0° C/ 98%
Tpt- 80,0° C/ 97%
Gapdh- 83,5° C/ 94%

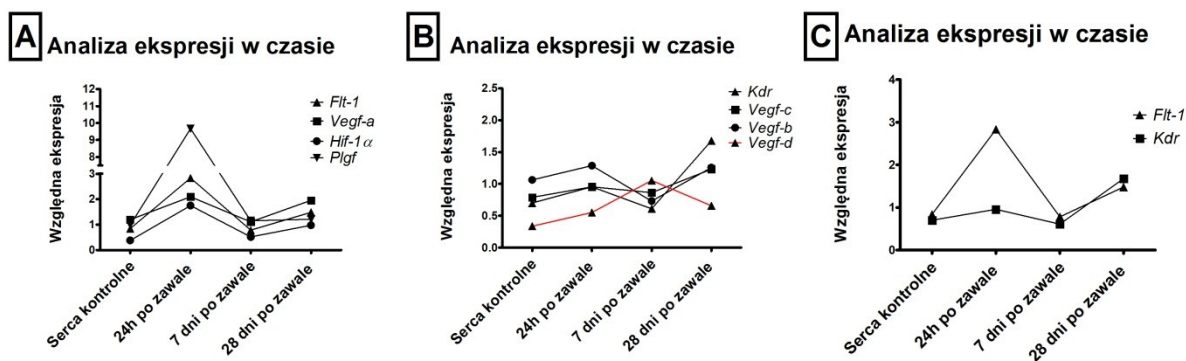
*RYCINA 43. Krzywe topnienia produktów reakcji qPCR z temperaturami topnienia (°C) i wydajnością reakcji (%). A - temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla określenia ekspresji mysich genów- *Vegf-a, Vegf-b, Vegf-c, Vegf-d, Plgf*; B - temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla określenia ekspresji mysich genów *Flt-1* oraz *Kdr*; C - temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla określenia ekspresji mysiego genu *Hif-1 α* .; D - temperatura topnienia oraz wydajność reakcji dla określenia ekspresji mysich genów *Hprt, Tpt, Gapdh*.*

Ustalenie kinetyki reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla określenia ekspresji każdego z genów (krzywa standardowa z rozcieńczeń dziesiętnych produktu PCR), skutkowało otrzymaniem wydajności reakcji, która posłużyła do obliczenia zmian w aktywności transkrypcyjnej genów dla ligandów *Vegf-a, Vegf-b, Vegf-c, Vegf-d, Plgf* oraz ich receptorów: *Flt-1* oraz *Kdr* w tkance serca myszy, w różnych odstępach czasu jaki upłynął od indukcji zawału.



RYCINA 44. Ekspresja genów proangiogennych w sercach myszy w następujących grupach: kontrolna (bez zawalu), $n=6$; 24h po indukcji zawalu, $n=10$; 7dni po indukcji zawalu $n=10$; 28dni po indukcji zawalu $n=11$. Badane geny: A - *Hif-1 α* , B - *Plgf*, C - *Vegf-a*, D - *Vegf-b*, E - *Vegf-c*, F - *Vegf-d*, G - *Flt-1*, H - *Kdr*. Normalizację wykonano w oparciu o geny referencyjne *Tpt* oraz *Hprt*. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ i *** $p<0,001$

Dodatkowo, z uzyskanych danych wykonano wykresy ilustrujące zależności ekspresji pomiędzy badanymi genami w czasie, co umożliwiło bardziej kompleksową analizę przeprowadzonego badania.



RYCINA 45. Analiza zależności ekspresji badanych genów w oznaczonych odstępach czasowych. Badane grupy: kontrolna (bez zawalu), $n=6$; 24h po indukcji zawalu, $n=10$; 7dni po indukcji zawalu $n=10$; 28dni po indukcji zawalu $n=11$. A - analiza zależności ekspresji genów *Hif-1 α* , *Vegf-a*, *Plgf* oraz ich receptorów *Flt-1*; B - analiza zależności ekspresji genów dla ligandów *Vegf-b*, *Vegf-c*, *Vegf-d* oraz ich receptorów *Kdr*; C - analiza zależności pomiędzy ekspresją genów dla receptorów *Flt-1* oraz *Kdr*.

Ekspresja genu *Hif-1 α* drastycznie wzrastała 24 h po zawale, prawdopodobnie w odpowiedzi na ostry stan niedokrwienny, a co za tym idzie – niedotlenienie. Następnie ekspresja spadała, aby w stanie permanentnego niedokrwienia znowu wzrosnąć (wtedy blizna pozawałowa jest w pełni ukształtowana i dochodzi do niekorzystnej przebudowy serca) (Ryc. 44A). Podobny wzór ekspresji przedstawiał gen *Vegf-a*, dla którego *Hif-1 α* jest czynnikiem transkrypcyjnym (Ryc. 44C). Wedle tego schematu występował wzór ekspresji genu dla receptor *Flt-1* (Ryc. 44G). Zaobserwowano również znaczący wzrost ekspresji genu *Plgf* w odpowiedzi na ostry stan niedokrwienia (Ryc. 44B). Wszystkie wspomniane geny wykazywały podobny wzór ekspresji na przestrzeni czasu, przy czym największą ekspresję w odpowiedzi na stymulację czynnikiem transkrypcyjnym *Hif-1 α* w ostrym stanie niedokrwiennym (24 h od indukcji zawalu) wykazał gen dla czynnika proangiogenego *Plgf* (Ryc. 45A).

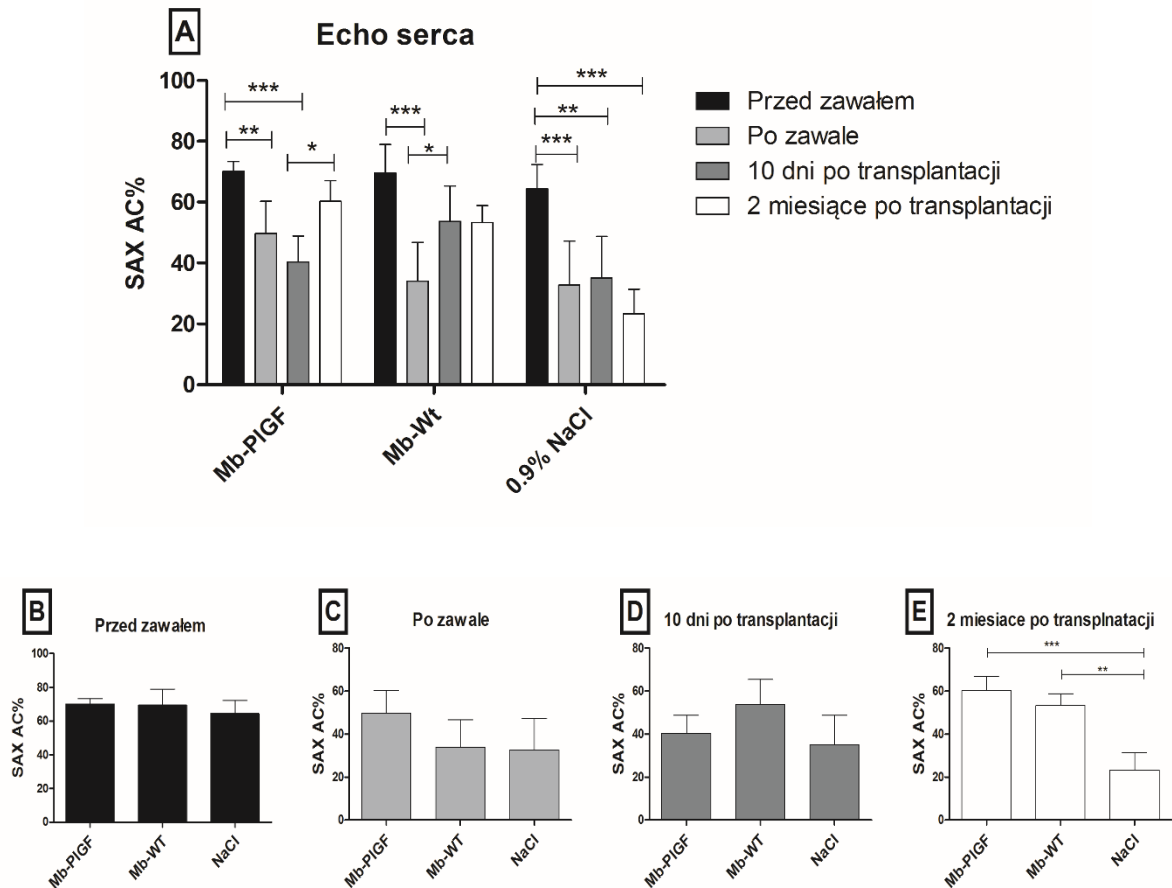
Geny proangiogenne *Vegf-b* (Ryc. 44D) oraz *Vegf-c* (Ryc. 44E) nie wykazały stymulacji w odpowiedzi na czynnik transkrypcyjny *Hif-1 α* na przestrzeni wybranych (badanych) punktów czasowych. Zaobserwowano natomiast wzrost ich ekspresji w fazie permanentnego niedokrwienia (28 dni po zawale). Ekspresja genu kodującego receptor *Kdr* również znacząco wzrastała w ostatnim punkcie czasowym (Ryc. 44H). Zależności w ekspresji pomiędzy tymi genami ilustruje Ryc. 45C. Całkowicie odmienny wzór ekspresji wykazuje gen *Vegf-d*, odpowiedzialny za limfangiogenezę (Ryc. 44B, 45B).

Porównanie ekspresji obydwu receptorów wykazało, iż to gen kodujący receptor *Flt-1* jest odpowiedzialny za modulację odpowiedzi we wczesnej fazie niedokrwienia (24 h po zawale),

natomiast gen dla receptora *Kdr* aktywuje się w późnej fazie niedokrwienia (28 dni po zawale), kiedy to jego ekspresja wzrastała aby wyrównać swój poziom ekspresji z genem dla receptora *Flt-1* i modulować późną odpowiedź komórek na niedokrwienie (Ryc. 45C).

5.2. Ocena skuteczności terapii komórkowej z użyciem mioblastów modyfikowanych genem *PIGF* w modelu mysiego serca pozawałowego.

Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* z komórkami modyfikowanymi genem *PIGF*, miały swoją kontynuację w postaci badań przedklinicznych *in vivo*, w modelu mysiego serca pozawałowego. Aby potwierdzić ewentualną skuteczność zaproponowanej terapii komórkowej, dokonano transplantacji mioblastów ludzkiej populacji mio191 zmodyfikowanych genem łożyskowego czynnika wzrostu (*PIGF*). Skuteczności zaproponowanej terapii badano za pomocą echokardiograficznej oceny parametrów hemodynamicznych serca.

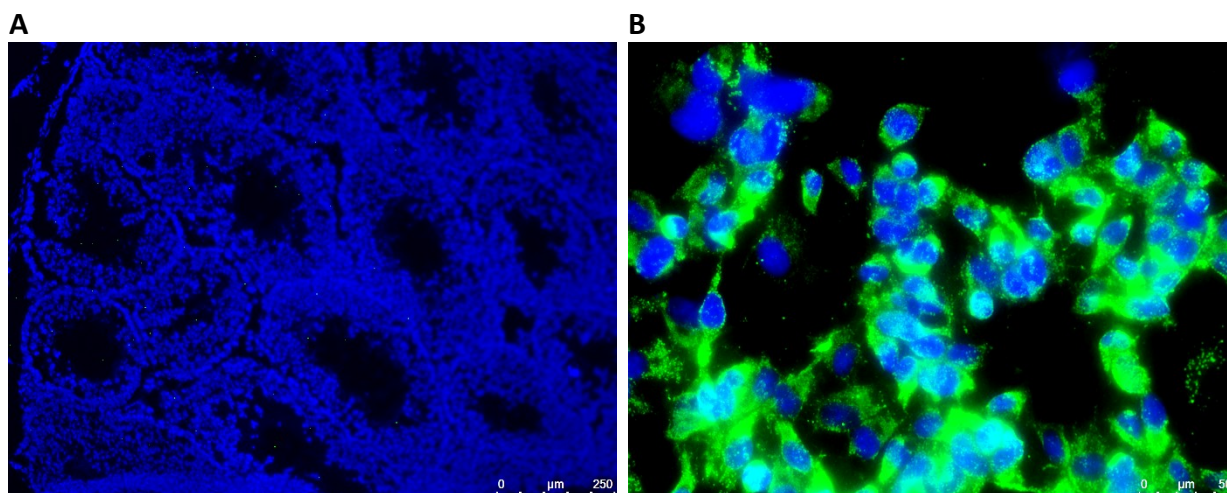


RYCINA 46. Badanie echokardiograficzne. Grupy doświadczalne: Mb-PIGF - myszy, u których transplantowano mioblasty modyfikowane genem PIGF $n=6$; Mb-WT - myszy którym transplantowano komórki natywne, $n=3$; NaCl - myszy u których przeprowadzono interwencję z użyciem soli fizjologicznej, $n=3$. A - porównanie funkcjonalności lewej komory pomiędzy punktami czasowymi eksperymentu w obrębie danej grupy myszy; B - porównanie hemodynamicznych właściwości lewej komory pomiędzy grupami myszy przed indukcją zawału; C - porównanie hemodynamicznych właściwości lewej komory pomiędzy grupami myszy po indukcji zawału; D - porównanie hemodynamicznych właściwości lewej komory pomiędzy grupami myszy w 10 dni po interwencji; E - porównanie właściwości lewej komory pomiędzy grupami myszy 2 miesiące po interwencji. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: $*p<0,05$, $**p<0,01$ and $***p<0,001$.

Myszy, którym podano komórki zarówno modyfikowane genem PIGF, jak i natywne, wykazały znamienne poprawę parametrów hemodynamicznych lewej komory w dwa miesiące po terapii. Wskazuje to na długofalowy efekt terapeutyczny zastosowanych interwencji komórkowych (Ryc. 46A). Zauważalny był znaczący spadek hemodynamiki lewej komory w czasie upływającym od indukcji zawału serca u myszy, które otrzymały jedynie iniekcje roztworu soli fizjologicznej (Ryc. 46A). Przed zawałem wydolność lewej komory sięgała prawie 80% (Ryc. 46B), natomiast po podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej znacząco malała do około 30-45%, przy czym nie obserwowano istotnych różnic w następstwie zawału

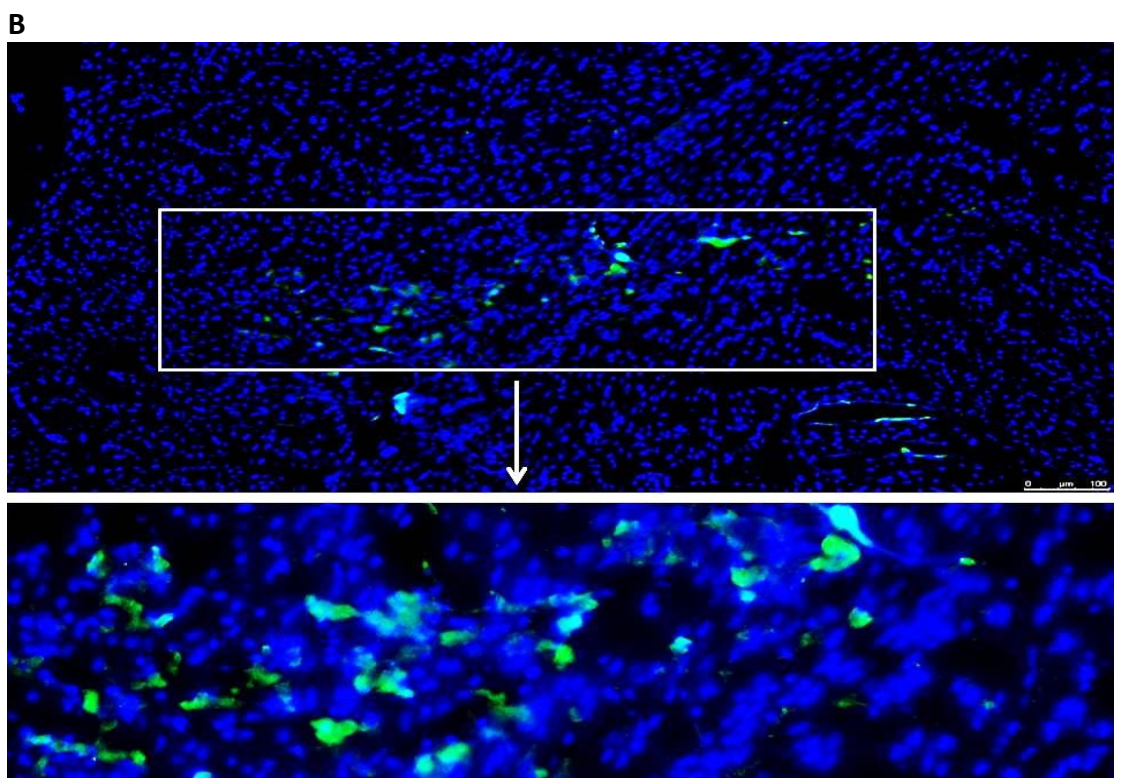
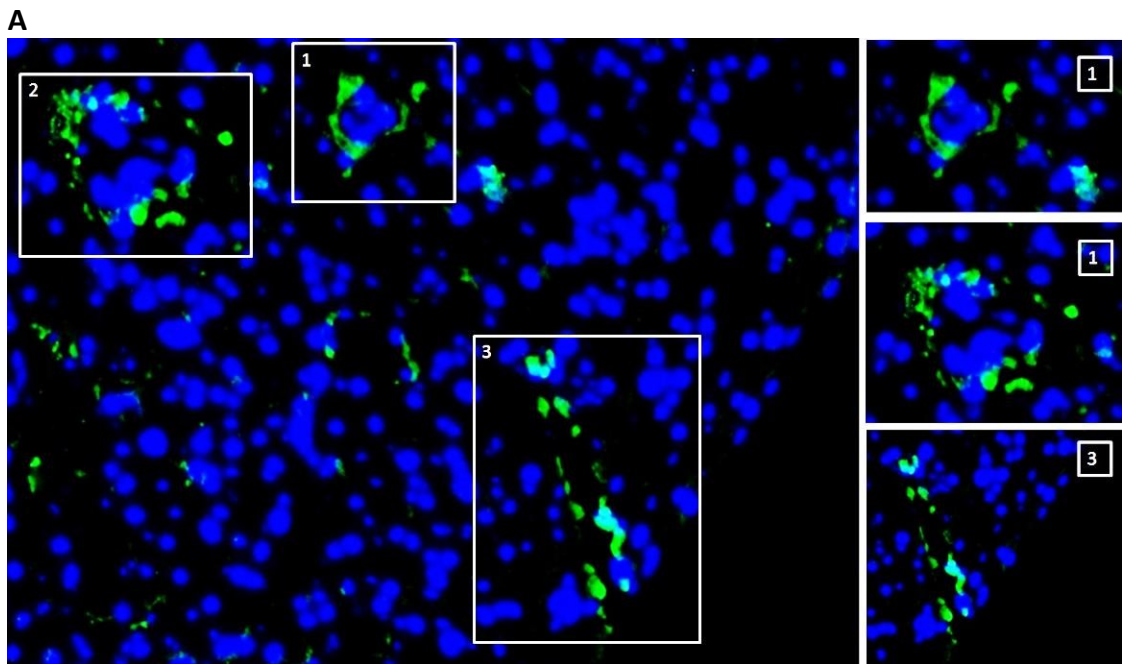
pomiędzy grupami myszy zakwalifikowanymi do różnych wariantów terapeutycznych (Ryc. 46C). Po upływie 10 dni od interwencji nie było widać zauważalnej poprawy, a wydolność lewej komory utrzymywała się na podobnym poziomie jak po indukcji zawału (Ryc. 46D). Dwa miesiące po interwencji komórkowej wykazano znamienne poprawę wydolności lewej komory (wynosiła ona aż 40%) w grupach myszy, które otrzymały mioblasty zarówno modyfikowane genem *PIGF*, jak i natywne, w porównaniu do myszy, u których podano sól fizjologiczną (gdzie funkcjonalność komory spadła do 20%) (Ryc. 46E).

Podczas trwania eksperymentu pobrano całe serca (n=3), w których dokonywano interwencji z użyciem mioblastów modyfikowanych genem *PIGF*, aby ocenić przeżywalność zastosowanego przeszczepu komórkowego. Serca pobrano w następujących punktach czasowych: 24 h, 7 dni i 30 dni od podania komórek. Aby uwidocznnić transplantowane mioblasty, zastosowano przeciwciało swoiste do ludzkich mitochondriów, które nie dawało krzyżowej reakcji z próbkami mysimi. Swoistość sygnału fluorescencyjnego wykazano z użyciem tkanki mysiego jądra oraz mioblastów ludzkich (Ryc. 47).



RYCINA 47. Immunofluorescencja z użyciem przeciwciała I-rzędowego Anti-Mitochondria Antibody (MAB1273) oraz II-rzędowego Alexa Fluor® 488. Jądra komórkowe wybarwiono na kolor niebieski za pomocą odczynnika DAPI. A - negatywny sygnał w tkance mysiego jądra; B - pozytywny sygnał w mioblastach ludzkich.

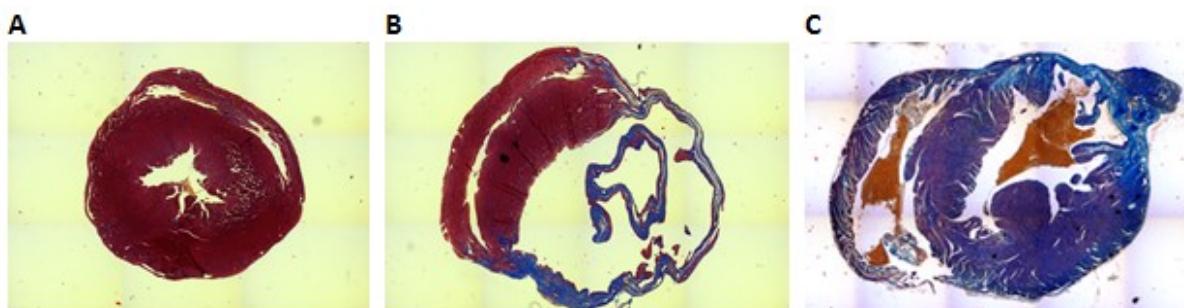
Mioblasty zlokalizowano w sercach mysich w 24 h i 7 dni po transplantacji (Ryc. 48B), natomiast w sercach po 30 dniach od transplantacji nie udało się zlokalizować mioblastów w sercu. Udało się udowodnić poprawność wykonania procedury, ponieważ uwidoczniono „ślad” po wkłuciu igły, używanej w trakcie podawania komórek. Jest on otoczony mioblastami (Ryc. 48A- panel 3) o czym świadczy zielony sygnał fluorescencji.



RYCINA 48. Barwienie immunofluorescencyjne tkanek serca z użyciem przeciwciała I-rzędowego skierowanego przeciwko ludzkim mitochondriom (Anti-Mitochondria Antibody (MAB1273)) związanego z przeciwciałem II-rzędowym Alexa Fluor® 488- dając zielony sygnał. Jądra komórkowe wybarwiano za pomocą DAPI. A - serce w 24h po podaniu komórek, panele 1,2 oraz 3- ilustrują powiększenia rejonów w których zidentyfikowano komórki, B - serce 7 dni po podaniu komórek.

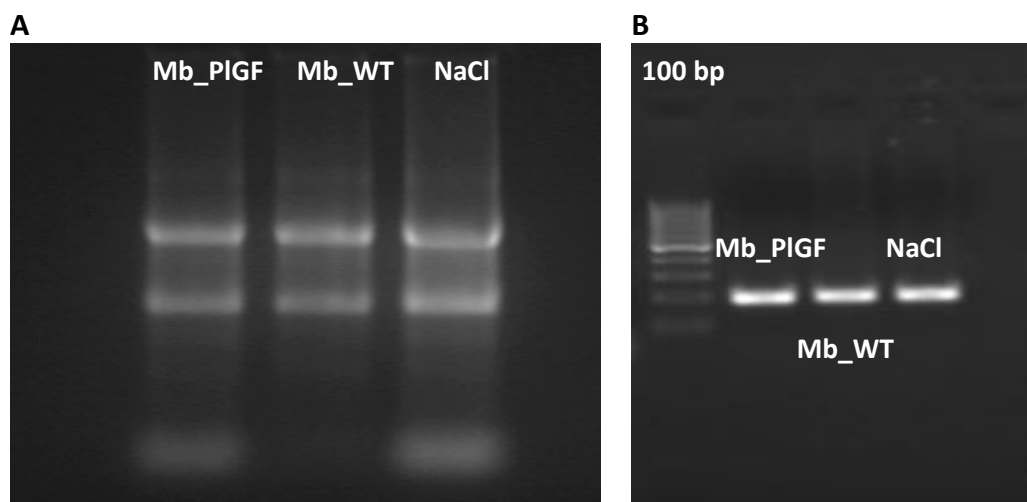
Dodatkowo, za pomocą skrawków histologicznych wybarwionych metodą Masson-Trichrom, wykazano efekt terapeutyczny zastosowanej strategii. Porównując między sobą skrawki

pochodzące z serca po terapii mioblastami modyfikowanymi genetycznie konstrukcją *PIGF* z sercem po 28 dni po zawale bez interwencji komórkowej, wyraźnie zaobserwowano efekt terapeutyczny. Ściana lewej komory była grubsza, a obszar w kolorze niebieskim, wskazujący bliznę pozawałową, mniejszy.



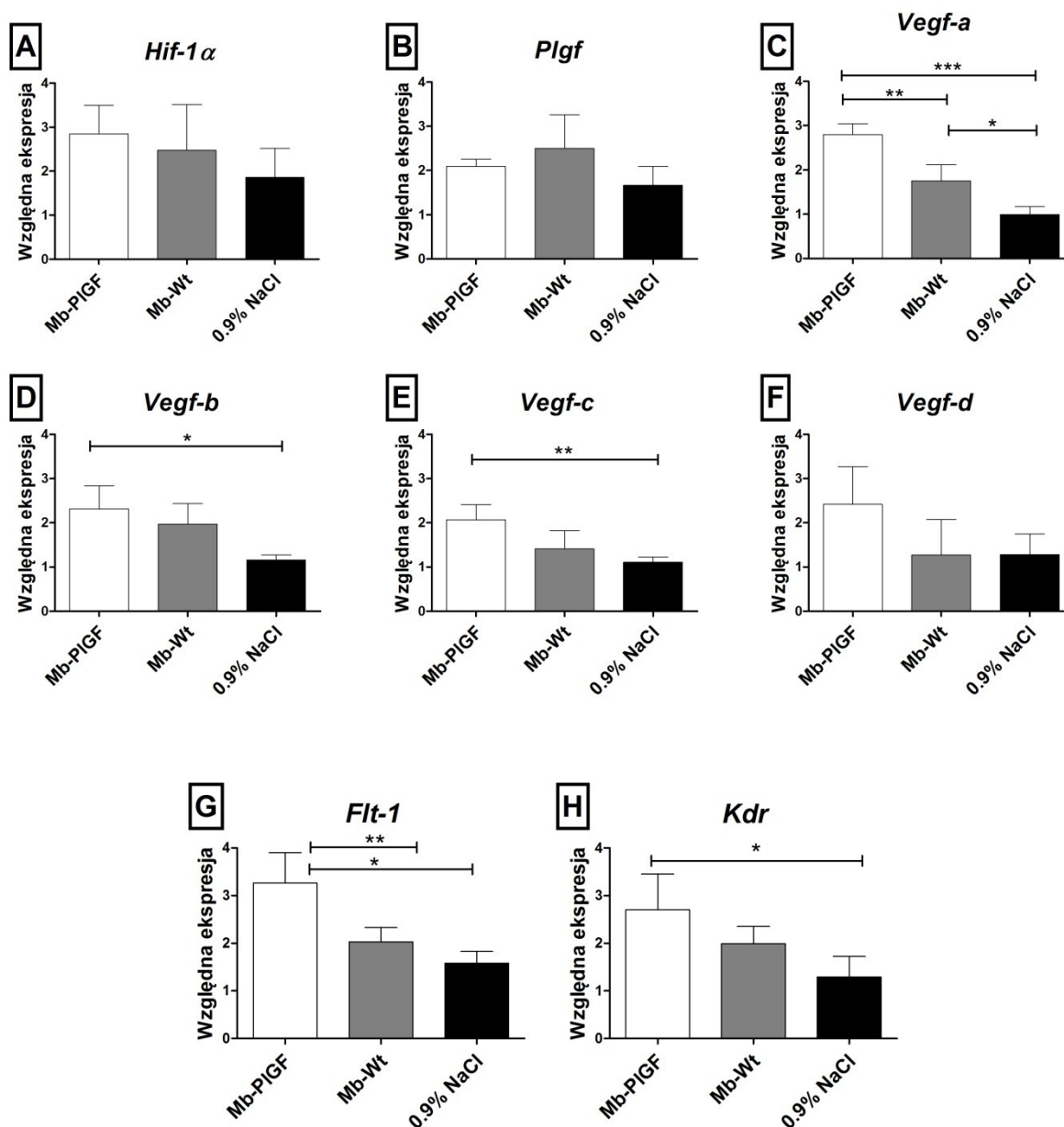
RYCINA 49. Porównanie obrazów histologicznych skrawków pochodzących z serc myszy. A - serce kontrolne; B - serce myszy w 28 dni po zawale; C - serce myszy w 2 miesiące po transplantacji mioblastów ludzkich modyfikowanych genem *PIGF*.

Aby dokonać oceny zmian molekularnych, jakie zaszły w sercach myszy po 2 miesiącach od zastosowanej interwencji, oraz zweryfikować, czy typ interwencji wpływa na profil ekspresji podstawowych genów proangiogennych, wykonano analizę PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Z serc myszy izolowano RNA, a następnie uzyskano cDNA (Ryc. 50A oraz Ryc. 50B).



RYCINA 50. Przykładowa analiza elektroforetyczna uzyskanego materiału genetycznego: A - rozdziel elektroforetyczny uzyskanego RNA izolowana z serc myszy poddanych różnego rodzaju interwencjiom B - obraz rozdzielu elektroforetycznego produktów reakcji PCR dla genu β -aktyny Skróty: Mb_*PIGF* - myszy gdzie transplantowano mioblasty modyfikowane genem *PIGF*; Mb_*WT* - myszy, którym transplantowano komórki natywne; NaCl - myszy, u których przeprowadzono interwencję z użyciem roztworu soli fizjologicznej

Kolejnym etapem była analiza ekspresji genów proangiogennych: *Vegf-a*, *Vegf-b*, *Vegf-c*, *Vegf-d*, *Plgf* oraz receptorów dla tych genów: *Flt-1* i *Kdr* w sercach myszy poddanych terapii z użyciem mioblastów modyfikowanych genetycznie, jak i tych, którym podano jedynie sól fizjologiczną.



RYCINA 51. Profil ekspresji genów proangiogennych w sercach myszy poddanych różnego typu interwencjom po 3 miesiącach od indukcji zawału: Mb-PIGF - serca izolowane z myszy, w których dokonano transplantacji mioblastów zmodyfikowanych genetycznie konstrukcją PIGF- n=6, Mb-WT - serca izolowane z myszy, w których dokonano transplantacji mioblastów natywnych n=3, 0,9% NaCl - serca izolowane z myszy, w których dokonano iniekcji roztworem soli fizjologicznej. Badane geny: A - *Hif-1α*, B - *Plgf*, C - *Vegf-a*, D - *Vegf-b*, E - *Vegf-c*, F - *Vegf-d*, G - *Flt-1*, H - *Kdr*. Normalizację wykonano w oparciu o geny referencyjne *Tpt* oraz *Hprt*. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$.

Podjęcie terapii serca pozawałowego zarówno z użyciem mioblastów natywnych, jak i modyfikowanych genetycznie za pomocą konstrukcji zawierającej gen PlGF wykazało generalne tendencje wzrostowe w ekspresji genów proangiogennych dla ligandów i ich receptorów, w porównaniu do grup myszy, u których zastosowano iniekcje roztworem soli fizjologicznej. W przypadku terapii z użyciem mioblastów modyfikowanych genetycznie, tendencja ta przerodziła się w wzrost ekspresji znamiennej statystycznie w przypadku genów kodujących ligandy *Vegf-a, b, c* oraz ich receptory *Flt-1* oraz *Kdr*. Nie zidentyfikowano różnic w ilości transkryptów genu kodującego czynnik indukowany hipoksją w sercu pomiędzy badanymi grupami myszy. Dodatkowo, ekspresja genu *Plgf* w mysim sercu również nie wykazywała zmian w ekspresji pomiędzy badanymi grupami myszy z różnymi typami interwencji.

VII. DYSKUSJA

W przedstawionej dysertacji dokonano określenia warunków hipoksji dla hodowli ludzkich mioblastów pierwotnych *in vitro*, tak, aby odzwierciedlały one stężenie tlenu w sercu pozawałowym. Następnie przeprowadzono doświadczenia mające na celu ustalenie jaki wpływ ma hipoksja obecna w pozawałowym sercu na właściwości biologiczne ludzkich komórek pochodzenia miogenne (zarówno modyfikowanych genetycznie jak i natywnych), a także czy różne stężenia tlenu mają wpływ na ich potencjał terapeutyczny. Doświadczenia *in vitro* doprowadziły do opracowania potencjalnego „narzędzia terapeutycznego” jakim mogły być mioblasty ludzkie modyfikowane genem *PIGF*. Następnie przeprowadzono badania przedkliniczne z wykorzystaniem mysiego modelu serca pozawałowego. Dodatkowo wykonano kompleksową analizę molekularną wpływu warunków hipoksji na ekspresję kluczowych genów szlaku proangiogenne w miokardium po zawale.

1. Optymalizacja warunków hipoksji

Hipoksja następuje gdy w narządach, tkankach lub komórkach dochodzi do zmniejszenia stężenia tlenu, w stosunku do ustalonego poziomu optimum. Zmniejszenie podaży tlenu ma związek z występowaniem ubogiej sieci naczyń krwionośnych, uszkodzeniem któregoś z nich, bądź gwałtownym niedokrwieniem (przykładem może być zawał serca). Może to mieć także związek ze zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen, spowodowanym nagłym, wyższym wskaźnikiem proliferacji komórek (jak w przypadku nowotworzenia). Komórki wykształciły mechanizmy, które gwarantują przystosowanie się do stanu hipoksji poprzez zmiany profilu ekspresji genów, związanych zarówno z metabolizmem, jak i z angiogenezą.

Choroby niedokrwienne serca są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Poszukiwanie nowych terapii z użyciem komórek macierzystych zazwyczaj oparte jest na doświadczeniach wykonywanych w warunkach standardowych *in vitro*. Badania te mają zwykle na celu zweryfikowanie, czy komórki będą wykazywały pożądane właściwości biologiczne, które mogą wspomóc regenerację danego organu. Jednak standardowe warunki hodowli wiążą się z utrzymywaniem komórek w hodowli nasyconej tlenem w stężeniu około 21% (warunki hiperoksji). W ramach niniejszej rozprawy przeprowadzono doświadczenia, które umożliwiły określenie, czy właściwości biologiczne mioblastów ludzkich (stosowanych

w terapiach regeneracyjnych) nie zmieniają się w drastyczny sposób, kiedy zostają one poddane transplantacji w rejon blizny pozawałowej.

Za marker stanu hipoksji uznano gen *HIF-1 α* , którego nadmierna ekspresja występuje w komórkach podczas obniżonego stężenia tlenu. Dlatego też ekspresja genu *HIF-1 α* wydaje się być wiarygodnym miernikiem przeprowadzenia optymalizacji dla warunków hipoksji, odpowiadającej warunkom panującym w sercu po zawale. Przy zablokowaniu jednej z tętnic wieńcowych, krew nie dopływa do regionu jej zapotrzebowania w obrębie miokardium, a przy braku odpowiedniej podaży tlenu, kardiomiocyty wchodzą w stan hipoksji. Jest to środowisko mało przyjazne dla komórek podawanych w ramach podjętej terapii. Brak danych literaturowych odnośnie stężenia tlenu w sercu po zawale wymusił utworzenie eksperymentalnego modelu, który mógłby pomóc w jego zdefiniowaniu. Pierwszy etap optymalizacji przygotowywany był w warunkach *in vitro*. Co zaskakujące, w warunkach przedłużonej w czasie hipoksji dochodziło raczej do obniżenia ekspresji czynnika *HIF-1 α* (Ryc. 17B, C). Okazuje się, iż nie było to odosobnione zjawisko. Poza ludzkimi mioblastami, wyciszenie ekspresji tego markera (podczas długotrwałej hodowli *in vitro*) występowało w innych liniach komórkowych oraz komórkach pierwotnych (nowotworowych, epithelialnych, fibroblastach oraz embrionalnych komórkach nerki) [188]. Negatywna regulacja ekspresji *HIF-1 α* związana jest z hydroksylazami prolinowymi (PHD). Jednak w stanach o obniżonej zawartości tlenu, aktywność enzymatyczna PHD jest blokowana, głównie przez brak kofaktorów reakcji: O_2 , 2-OG oraz Fe^{2+} . Zaobserwowano, iż białko *HIF-1 α* ulega degradacji z powodu hydroksylacji, ubikwitynacji i przemieszczania go do degradacji przez proteasom, co sugeruje, że przy długotrwałej hipoksji enzymy PHD są aktywne, pomimo warunków niedotlenienia. Założono zatem, iż przewlekła ekspozycja na warunki ubogie w tlen powoduje nadaktywację i gromadzenie enzymów hydroksylujących, które w efekcie będą degradowały *HIF-1 α* [188]. Ostatnie badania ujawniły istnienie czynnika transkrypcyjnego - REST (ang. *Repressor Element 1-Silencing Transcription factor*), który w przedłużającym się niedotlenieniu wiąże się z promotorem *HIF-1 α* i blokuje jego aktywność na poziomie transkrypcyjnym. Stąd też obniżeniu ulega ilość mRNA dla badanego markera [189]. Może to tłumaczyć zjawisko obniżania ekspresji markera *HIF-1 α* w mioblastach ludzkich, które poddane były 7 dniowej hipoksji (Ryc. 17C).

W związku z tym, iż mioblasty mają potencjalnie służyć do regeneracji oraz odbudowy serca po zawale, należało postawić pytanie, jaki wpływ na transplantowane komórki będzie miała hipoksja obecna w sercu po zawale. Podwiązując lewą tętnicę wieńcową, podawano komórki

bezpośrednio w rejon objęty zawałem. Następnie po 24 h, 7 dniach i 30 dniach badano ekspresję markera *HIF-1 α* (Ryc. 20A). Niestety, w 30 dni po podaniu komórek nie udało się oznaczyć ekspresji markera hipoksji. Być może liczba komórek podana do serca po 30 dniach zmalała do liczby, która nie była wykrywalna dla metody PCR w czasie rzeczywistym. Warto zaznaczyć, iż największą wadą terapii obejmujących transplantację komórek macierzystych/progenitorowych, jest okresowe utrzymywanie się przeszczepu w miejscu podania. Zaobserwowano, iż po upływie 2 h od iniekcji do naczyń wieńcowych komórek izolowanych ze szpiku kostnego, wykrywano jedynie około 5% transplantowanych komórek w obrębie miokardium. Natomiast tylko 1% z populacji wyjściowej komórek zdołał się utrzymać w miejscu podania po upływie 18 h od implantacji [190]. Z kolei za bardziej wydajną metodę (stosowaną m. in. w doświadczeniach wykonanych w ramach niniejszej rozprawy) uważana jest iniekcja intrakardialna komórek. Jest to zarazem dość precyzyjna metoda podawania komórek w miejsce docelowe. Wykazano, iż po 6 tygodniach od podania komórek w docelowy obszar miokardium jedynie 0,3-3,5% z populacji wyjściowej utrzymywała się w miejscu podania [191]. Biorąc pod uwagę przedstawione dane, można było się spodziewać, iż po 30 dniach od wszczepienia mioblastów w obszar objęty zawałem serca, mogła pozostać zbyt mała liczba komórek aby dokonać wiarygodnej analizy qPCR. Należy także zaznaczyć, iż komórki podano w obszar zawału „świeżego”, tj. miejsca, w którym toczący się stan zapalny. Mógł on dodatkowo wywrzeć negatywny wpływ na zdolność przeszczepu do utrzymania się w miejscu docelowym. Dlatego też terapie obejmujące transplantację komórek macierzystych prowadzone są zwykle dopiero po ukształtowaniu się blizny pozawałowej, kiedy stan zapalny stopniowo ustępuje - na modelu mysim jest to okres około miesiąca po zawale [192], [193]. Udało się jednak oznaczyć ekspresję genu *HIF-1 α* we wszczepianych populacjach ludzkich mioblastów, które znajdowały się w pozawałowym sercu przez dobę oraz przez 7 dni (od czasu indukcji zawału/transplantacji komórek). Wykazanie ekspresji markera hipoksji świadczy o tym, iż środowisko niedotlenienia w obrębie mięśnia sercowego miało wydatny wpływ na transplantowane komórki. Najwyższą ekspresję *HIF-1 α* uzyskano dla populacji mioblastów poddanych 24 h hipoksji w sercu, natomiast po 7 dniach ekspresja spadała (Ryc. 20A). Spadek ekspresji czynnika *HIF-1 α* może być efektem zmniejszania się populacji implantowanych komórek, które utrzymały się w sercu od czasu podania z równoczesną indukcją zawału. Niemniej jednak, wykrycie tak wysokiego poziomu transkryptów genu *HIF-1 α* w transplantowanych mioblastach świadczy o utrzymującej się wysokiej hipoksji nawet w 7 dni po zawale.

Wyniki uzyskane z badań *in vitro* oraz *in vivo* umożliwiły porównanie wartości ekspresji markera *HIF-1 α* oraz zdefiniowanie takiego stężenia tlenu, które równałoby się warunkom hipoksji w sercu po zawale. Poziom transkryptów wykryty w ludzkich mioblastach podanych do serca pozawałowego okazał się tak wysoki, że odpowiadał hipoksji wywołanej przez 3% stężenie O₂ w hodowli *in vitro*. Dlatego wybrano właśnie to stężenie tlenu dla animowania warunków powstających w sercu po zawale (Ryc. 21). Co więcej, z badań wynika, że nie 1 lub 2% O₂, a 3% stężenie tlenu wywiera większą presję hipoksyjną na ludzkie mioblasty, pomimo iż w większości badań używano od 0,5- do 2% O₂ stężenia tlenu aby zaindukować hipoksję w komórkach macierzystych mięśni szkieletowych [194]–[196].

2. Ocena właściwości biologicznych komórek w hipoksji

Ekspresja *HIF-1 α* jest oznaczana głównie w komórkach nowotworowych, ponieważ nie tylko jest on markerem stanu niedotlenienia, lecz w przypadku guzów jest uznawany za marker prognostyczny, który pomaga w ustaleniu stopnia agresywności nowotworu i dobrania odpowiedniej strategii terapeutycznej [197]. W komórkach somatycznych zwykle nie oznacza się poziomu markera hipoksji. Z danych literaturowych wynika, iż stanem normoksji dla mioblastów jest około 5% stężenia tlenu, natomiast hipoksja dla komórek mięśni szkieletowych wywoływana jest stężeniami tlenu wahającymi się pomiędzy 0,5-2% stężenia tlenu. Drastyczne obniżenie stężenia O₂, nazywane jest stanem patologicznej hipoksji (0,5%) lub ekstremalnie patologicznej hipoksji (0,01%) [198]. W niniejszej pracy mioblasty zostały poddane hipoksji, która miała odzwierciedlać warunki tlenowe panujące w sercu pozawałowym. Zostały one ustalone na ekwiwalent 3% stężenia tlenu w warunkach *in vitro*. Model ten okazał się wystarczający dla stworzenia adekwatnych warunków hipoksji, ponieważ mioblasty populacji natywnych obydwu pacjentów wykazały w tych warunkach najwyższą ekspresję markera *HIF-1 α* (Ryc. 27). Zatem warunki odpowiadające hipoksji sercowej, która tworzy się po zawale, były w stanie zaindukować ekspresję markera *HIF-1 α* w mioblastach ludzkich, mimo że z doniesień literaturowych wynikało, iż hipoksja dla komórek miogennych przyjmowana była na 0.5-2% stężenia tlenu w hodowli *in vitro*. Potwierdziła się hipoteza mówiąca o tym, iż normoksja dla komórek macierzystych mięśni szkieletowych wynosi 5% O₂ [199]. Każda badana populacja komórek, niezależnie od tego, czy była modyfikowana genetycznie, czy natywna, wykazywała tendencje, niekiedy znamienne statystycznie, do obniżania ekspresji tego markera.

Metoda transfekcji mioblastów ludzkich przyjęta w niniejszej pracy okazała się być bardzo wydajna. Zastosowanie wektora bicistronowego zagwarantowało porównywalny poziom ekspresji obydwu genów proangiogennych (VEGF-A oraz FGF-4- Ryc. 28A, B). Należy zaznaczyć, iż żaden z zastosowanych wektorów nie posiadał w swej budowie elementów odpowiedzi na hipoksję dodatkowo wbudowanych. Zatem jeśli pojawiała się większa ilość transkryptów w którejś z badanych próbek znajdujących się w warunkach hipoksji, musiało to mieć związek z endogennym wzbudzeniem. Dodatkowo warto podkreślić, iż ekspresja genu *PIGF* wzrastała w hipoksji po 24 h, zarówno w komórkach modyfikowanych genetycznie (plazmidem zawierającym sekwencję kodującą dla genu *PIGF* oraz kontrolnym), jak i natywnych (Ryc. 28C). Porównując ten wynik z ekspresją uzyskaną z serc pozawałowych myszy, w których badano dynamikę zmian ekspresji genów proangiogennych (Ryc. 44B), widać było pewną prawidłowość w sposobie regulacji ekspresji *PIGF* na obniżone stężenie tlenu trwające 24 h.

Jednak aby uznać proponowane terapie komórkowe za funkcjonalne, należy zaznaczyć, iż ilość transkryptów wprowadzonych (transfekowanych) genów powinna finalnie przełożyć się na ilość funkcjonalnego produktu białkowego, który zostanie wydzielony z komórek w wyniku translacji.

Wiadomym jest, iż nagle narażenie na stan hipoksji będzie pierwotnie dla komórki bodźcem stresującym i patologicznym (wywołanym przez okluzję lub przerwanie ciągłości naczynia bądź też zawał). Wykazano, że w związku z niekorzystnymi warunkami tlenowymi może dojść do globalnej blokady translacji białek. Hipoksja przełącza klasyczny mechanizm inicjacji translacji zależnej od czapeczki 5' na mechanizm alternatywny, ograniczający zużycie tlenu i energii. Zablockowanie translacji zależnej od czapeczki 5' może ułatwiać inicjację translacji kontrolowanej przez elementy IRES lub uORF. Szacuje się, że 10-15% komórkowych cząsteczek mRNA dysponuje elementami umożliwiającymi translację niezależną od czapeczki 5' [200]. Translacja genów *PIGF* (Ryc. 31C) oraz *VEGF-A* (Ryc. 31A) była utrzymana na podobnym, poziomie jak w przypadku komórek hodowanych w warunkach standardowych *in vitro*. Zatem w tym wypadku, hipoksja nie miała negatywnego wpływu na dynamikę powstawanie białka, co z kolei miało miejsce w przypadku białka FGF-4, gdzie wraz z ograniczeniem dostępności tlenu ilość wykrywanego czynnika FGF-4 w medium wyraźnie spadała (Ryc. 31B). Jednak funkcjonalność wydzielanych białek została zachowana, co udowodnił test na formowanie się prymitywnych kapilar (Ryc. 33,34).

Hipoksja nie powinna mieć wpływu na funkcjonalność białek proangiogennych. bo jak wspomniano wcześniej, może być jednym z głównych czynników fizjologicznych mających wpływ na prawidłowy rozwój układu sercowo naczyniowego ssaków [82].

Aktywacja oraz różnicowanie mioblastów zależne jest od ekspresji genów miogennych w tych komórkach. W pierwszych etapach miogenezy uczestniczą głównie dwa geny: *MYOD* oraz *MYF5*, w kolejnych etapach przejście w stan dojrzałych miocytów kierowane jest przez czynniki transkrypcyjne MRF4 oraz MYOG. Wszelkie zmiany, do jakich dochodzi w ekspresji genów miogennych pomiędzy stężeniem tlenu odpowiadającym hipoksji, a warunkom standardowym, nie miały wpływu na dalszy tor różnicowania komórek. Warto zaznaczyć, iż wyjściowy poziom ekspresji genów miogennych różnił się w zależności od tego czy badano populacje mio135 czy mio191 (Ryc. 30), pomimo iż komórki utrzymane były dokładnie w tym samym pasażu, w każdym z przeprowadzonych doświadczeń. Najwięcej sporów w literaturze toczy się o poziom ekspresji genów *MYF5* oraz *MYOD*. Grupy badawcze na zmianę udowadniają spadek w ekspresji tych genów [201] lub wykazują brak wpływu warunków hipoksji na mioblasty [198]. Warto zaznaczyć, iż stosowane są różne stężenia tlenu w badaniach - już od poziomu 0,5% O₂. Hipoksja indukowana w niniejszej pracy miała na celu odzwierciedlać warunki panujące w sercu pozawałowym, zatem proponowane 3% stężenie O₂ zdecydowanie inaczej wpływało na transkrypcję genów niż stężenie 0,5% lub 1% O₂, które z powodzeniem można uważać za spełniające warunki hipoksji, jednak odbiegające od tych panujących w sercu pozawałowym. Co było interesujące, mimo różnic w ekspresji badanych genów, pomiędzy analizowanymi populacjami komórkowymi (mio135 i mio191), zauważono jedną prawidłowość - wszystkie badane geny miogenne wykazywały spadek ekspresji w 5% stężeniu tlenu. W literaturze, to stężenie tlenu określane jest mianem normoksji, czyli stężenia uważanego za fizjologiczne dla mięśni szkieletowych [202]. Być może odzwierciedlając takie warunki w hodowli komórkowej *in vitro* doszło do „uśpienia” komórek satelitowych, które bez dodatkowego bodźca nie były aktywowane do proliferacji. Doświadczenia prowadzone na mioblastach ludzkich hodowanych w 5% stężeniu O₂ potwierdziły, że mioblasty te gorzej proliferowały (Ryc. 36). Może to mieć odzwierciedlenie w wynikach uzyskanych z badania ekspresji genów miogennych (Ryc. 30). Aby wytłumaczyć fakt, że mioblasty w kolejnym eksperymencie różnicowały się w miotuby podczas hodowli w fizjologicznym stężeniu tlenu należy zwrócić uwagę, iż do różnicowania użyto specjalnego medium, którego zadaniem było wymóc na mioblastach ich aktywację, a następnie utworzenie miotub (Ryc. 37, 38).

Tlen jest niezmiernie istotną cząsteczką w aspekcie biologii komórki. Zarządzanie homeostazą O_2 jest jednym z kluczowych procesów gwarantujących utrzymanie prawidłowej funkcjonalności komórek. Zarówno hipoksja, jak i hiperoksja (zbyt wysokie stężenie tlenu) przedstawiają pewnego rodzaju stan patologiczny (odbiegający od normy), w którym komórka zmuszona jest do aktywowania szlaków sygnałowych celem przywrócenia równowagi. Zaburzenia homeostazy tlenowej mogą w konsekwencji prowadzić do zmian w procesach biologicznych, takich jak: tworzenie naczyń krwionośnych, proliferacja, różnicowanie czy starzenie.

Wpływ hipoksji na apoptozę jest dość kontrowersyjnym aspektem. Niektóre doniesienia wskazują, iż zmiany molekularne wywołane przez stan obniżonej zawartości tlenu mają wpływ na przesunięcie równowagi ekspresji czynników pro i antyapoptotycznych w stronę ochrony, czyli promowania ekspresji genów antyapoptotycznych. Okazuje się, iż hipoksja może indukować apoptozę, powodując nadmierną przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej, co prowadzi do uwolnienia cytochromu C w następujący sposób. Brak tlenu hamuje transport protonów i przez to powoduje spadek potencjału błony. Zmniejszenie ilości ATP wywołane spadkiem funkcjonalności mitochondriów powoduje aktywację *Bax* lub *Bak* (genów proapoptotycznych), co prowadzi do uwolnienia cytochromu C [203]. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki nie wykazały jednak negatywnego wpływu hipoksji, co przełożyło się na utrzymywanie dość niskiego odsetka komórek eliminowanych na drodze apoptozy. Zaobserwowano wpływ modyfikacji genetycznej na zwiększenie apoptozy. Niezaprzeczalnie, może to mieć związek z procesem samej elektroporacji, ponieważ metoda ta powoduje powstawanie porów w błonie komórkowej. Komórka poddana takiemu wymuszonemu zjawisku fizycznemu może nie być zdolna do odtworzenia ciągłości błony, co w efekcie prowadzi do permabilizacji. Szok wywołany przez impuls elektryczny z łatwością może zapoczątkować kaskadę apoptotyczną [204]. Jednak komórki genetycznie modyfikowane wybranymi genami proangiogennymi wciąż wykazywały niski odsetek apoptozy. Zaobserwowano, iż gen *VEGF* w pewnych sytuacjach ma właściwości cytoprotekcyjne. VEGF zapobiegał apoptozie komórek HUVEC, które zostały potraktowane wysokim stężeniem glukozy (szok hipertoniczny). Wykazano, iż VEGF może wpływać na zmniejszenie ilości wytwarzanych reaktywnych form tlenu (ROS), niwelowanie przeciążenia wapniowego, a także zmieniać stosunki genów pro oraz antyapoptotycznych, w taki sposób, iż dochodzi do przechylenia równowagi w stronę właściwości antyapoptotycznych [205]. W aspekcie wzbudzania apoptozy omawiany jest także wpływ genu *PIGF* na to zjawisko, ale dotyczy to

warunków hiperoksji sięgającej 99% nasycenia tlenem. Okazuje się, iż właśnie w tych warunkach staje się on induktorem apoptozy. Fakt ten sprawia, iż PlGF staje się potencjalnym celem terapeutycznym w chorobach płuc [206]. W przeprowadzonych badaniach, zarówno w przypadku komórek modyfikowanych genami *FGF-4/VEGF*, jak i *PlGF*, nie zauważono drastycznego wzrostu apoptozy w warunkach hipoksji (Ryc. 35). Szczególnie istotny jest fakt, iż obydwie badane populacje wykazywały kolejno 1% komórek apoptotycznych przy modyfikacji genetycznej za pomocą konstrukcji *VEGF/FGF-4* oraz 0,5% w przypadku komórek transfekowanych *PlGF*. W tym wypadku można stwierdzić, iż w warunkach, jakie istnieją w sercu pozawałowym, lepszy potencjał wykazują mioblasty modyfikowane genem *PlGF*. Zaobserwowano drastyczny wzrost apoptozy w przypadku komórek hodowanych w 5% stężeniu tlenu, co sugeruje, że takie warunki hodowli *in vitro* nie wpływają korzystnie na mioblasty (Ryc. 35B). Sytuacja ta nie powtórzyła się dla komórek populacji mio135, co może sugerować osobniczą zależność tego zjawiska.

Jedną z kluczowych funkcji biologicznych komórki jest regulacja proliferacji. W przypadku większości typów komórek hipoksja może powodować zmniejszenie proliferacji, ponieważ sukcesywne zwiększanie się liczebności komórek w niekorzystnych warunkach może generować dodatkowe zapotrzebowanie na tlen. Jednak niektóre populacje komórki/tkanki zachowują proliferację także w warunkach niedotlenienia. Jest to powszechna cecha patologiczna nowotworów, ale może również służyć funkcji fizjologicznej, jak np. utrzymaniu się populacji komórek macierzystych, które znajdują się w niszy, gdzie może być obecne środowisko hipoksyjne [207]. Jednak w populacjach badanych mioblastów nie dochodziło do znaczącego zmniejszenia proliferacji w warunkach hipoksji (3% O₂ – Ryc. 36), natomiast w normoksji większość z badanych populacji ludzkich mioblastów (zarówno tych modyfikowanych genetycznie za pomocą wektora zawierającego *VEGF/FGF-4* oraz *PlGF*) wykazywała raczej obniżenie proliferacji. Należy podkreślić, iż mioblasty, a przede wszystkim tkanka mięśniowa, jest tkanką specyficzną, często narażoną na wysiłek o charakterze anaerobowym. Zatem obniżenie zawartości tlenu nie powinno wywołać negatywnych skutków w aspekcie proliferacji komórek. To właśnie środowisko normoksyjne powinno być sygnałem do utrzymywania komórek w stanie „uśpienia”, ponieważ wtedy nie występują żadne bodźce powodujące uaktywnienie tkanki do regeneracji. Warto tutaj przytoczyć badania nad wpływem niedotlenienia na proliferację mioblastów *in vitro*, które wykazywały zwiększony potencjał proliferacyjny komórek podczas zmiany stężenia tlenu z warunków standardowych na hipoksyjne [208]. Podążając za wnioskiem płynącym z

cytowanej wcześniej pracy odnośnie zwiększenia proliferacji komórek w warunkach hipoksji *in vitro*, można uznać to za obiecującą cechę w aspekcie regeneracji serca pozawałowego. Mioblasty modyfikowane genetycznie, podane w obszar blizny pozawałowej, którą charakteryzują warunki hipoksji, będą miały zatem potencjał do proliferacji oraz uwalniania czynnika terapeutycznego. Bardzo ważnym jest fakt, iż modyfikacje genetyczne przeprowadzone na mioblastach również nie wpłynęły negatywnie na ich proliferację (Ryc. 36). Można zatem wnioskować, że mioblasty nie wykazują zaburzeń w proliferacji w warunkach hipoksji, a dodatkowo zastosowana modyfikacja genetyczna nie wpłynęła negatywnie na vitalność tych komórek w obniżonych stężeniach tlenu.

Hipoteza związana z tym, że hipoksja może mieć wpływ na różnicowanie komórek, ma swoje podparcie biorąc pod uwagę fakt, iż jest ona kluczowym elementem biorącym udział w rozwoju embrionalnym i kształtowaniu się układów systemowych w organizmie człowieka (główny udział w rozwoju układu sercowo-naczyniowego). Co więcej, niskie stężenie O₂ zapewnia dobrą samoodnowę komórek. Hipoksja ma fundamentalne znaczenie dla utrzymywania nisz komórek hematopoetycznych i nerwowych. Różnicowanie się mezenchymalnych komórek macierzystych do chondrocytów, adipocytów i osteoblastów zależy od stężenia O₂, którym można łatwo manipulować w warunkach *in vitro* w celu wygenerowania pożądanych typów komórek [209]. Mioblasty w stanie hipoksji, jak wcześniej wnioskowano, mogą być pobudzane do aktywniejszej proliferacji, jeśli znajdować się będą wystarczająco długo w środowisku hipoksyjnym. Ale jako komórki macierzyste, oprócz namnażania i odnawiania swojej puli, muszą mieć także zdolność do różnicowania i uzupełnienia puli komórek (tkanek) ulegających urazowi. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy wykazały, iż warunki tlenowe nie zaburzają zdolności komórek do różnicowania, wręcz proces ten jest nawet bardziej wydajny w niekorzystnych warunkach (Ryc. 37, 38). Co ważne w przypadku terapii regeneracyjnej serca, mioblasty, które zostały modyfikowane genami proangiogennymi, różnicowały się bez zaburzeń. Można zaobserwować, iż hodowla w 3% O₂ miała szczególnie pozytywny wpływ na różnicowanie się komórek zmodyfikowanych genem *PIGF* (Ryc. 38), w której to populacji wyraźnie obserwuje się więcej sfuzjowanych komórek w porównaniu do tych hodowanych w warunkach standardowych. Są to przesłanki skłaniające do wysnucia wniosku, iż mioblasty osadzone w nieprzyjaznym środowisku jakim jest serce po zawale, po przeprowadzonym cyklu proliferacji, mogą zróżnicować się w miotuby pomimo występującej hipoksji.

Analizując ogółem funkcje biologiczne komórek mięśniowych należy stwierdzić, iż hodowla *in vitro* w obniżonym stężeniu tlenu, które odpowiada hipoksji serca pozawałowego, nie powodowała negatywnego wpływu na właściwości mioblastów ludzkich. Komórki nie wykazywały podwyższonej śmiertelności apoptotycznej (Ryc. 35), zachowując proliferację na poziomie porównywalnym z warunkami standardowymi *in vitro* (Ryc. 36), a ponadto posiadały zdolność do różnicowania się w miotuby, a co za tym idzie uzupełnienia ubytków tkankowych w miokardium (Ryc. 37, 38). Modyfikacje genetyczne przeprowadzone na zawieszinach pierwotnych mioblastów otrzymanych od różnych pacjentów wykazały, iż wprowadzone geny *VEGF/FGF-4* jak i *PGF* nie wpływały negatywnie na biologiczne cechy proregeneracyjne.

3. Dynamika zmian molekularnych w sercu

Mięsień sercowy dorosłych ssaków nie jest zdolny do regeneracji po utracie kardiomiocytów, co stanowi podstawę trwałych i ciężkich skutków kardiomiopatii wywodzącej się z patologicznej i niekorzystnej przebudowy serca. Dla kontrastu, niektóre ryby i płazy zachowują silną zdolność do regeneracji serca przez całe życie. Ostatnie doniesienia wskazują jednak, iż serce ssaków nie jest organem postmitotycznym. Zdolność do odnowy wykazuje np. mięsień sercowy nowonarodzonej myszy, który jest w stanie się zregenerować po częściowej resekcji, niestety predyspozycje te zostają utracone już około 7 dnia życia pozapłodowego. Mimo wszystko, dojrzałe serce zachowuje subtelny potencjał do samoodnowy [210]. Znikoma zdolność do samoodnowy mięśnia sercowego jest niewystarczająca, dlatego też po rozległym zawale serca dochodzi do poważnej utraty kardiomiocytów, a ich miejsce zajmują fibroblasty wytwarzające bliznę pozawałową. Dochodzi do zmian morfologicznych serca, które skutkują jego niekorzystną przebudową. W ostatnich latach, dzięki eksperymentom opartym na mikromacierzach ekspresyjnych, udało się zidentyfikować zmiany w ekspresji genów i – przynajmniej częściowo – powiązać je z obserwowanymi zmianami w strukturze i funkcjonowaniu serca po zawale. Zmiana ekspresji genów może występować na różnych etapach przebudowy miokardium po zawale i trwać określoną ilość czasu [211]. Dotychczasowe informacje dotyczące obecności peptydu NT-proBNP wykazują, że wzrost jego stężenia we krwi u ludzi można zaobserwować już kilka godzin po wystąpieniu niedotlenienia mięśnia sercowego [212]. Rosnącą ekspresję genu *CTGF* (ang. *Connective Tissue Growth Factor*) skorelowano z powiększającym się zwłóknieniem ściany lewej komory po zawale. Źródłem *CTGF* są przede wszystkim

fibroblasty serca, choć podwyższoną ekspresję tego genu zaobserwowano także w warstwie kardiomiocytów znajdującej się przy świetle komory [213]. W niniejszej pracy skupiono się na dynamice zmian ekspresji genów proangiogennych w różnych odstępach czasu, jaki upłynął od zawału serca, a także na skorelowaniu zależności pomiędzy tymi genami, a czynnikiem indukowanym hipoksją. Zaobserwowano, że *Hif-1a* osiągnął najwyższą ekspresję w 24 godziny po indukcji zawału w sercach mysich (Ryc.44A). Sugeruje to, iż w tym czasie dochodzi do ostrej hipoksji w sercu. W tym samym czasie ekspresja genów *Vegf-a*, *Plgf* i *Flt-1* również ulegała podwyższeniu (Ryc. 44B, C, G oraz Ryc. 45A). Ta tendencja nie jest trudna do wyjaśnienia. HIF-1 reguluje bezpośrednio lub pośrednio ponad 2% genów w śródbłonku naczyniowym [53]. Czynniki indukowane hipoksją wiążą się z elementami HRE umiejscowionymi w różnych genach. Zarówno *Vegf-a*, *Plgf* jak i receptor *Flt-1* są uznawane za geny docelowe dla czynnika transkrypcyjnego HIF-1, zatem ich ekspresja jest bezpośrednio modulowana w stanie hipoksji. Dlatego też udało się pozytywnie skorelować ekspresję wymienionych genów z ekspresją czynnika indukowanego hipoksją we wszystkich punktach czasowych eksperymentu (Ryc. 45A). Bardzo interesująca wydaje się ekspresja mysiego genu *Plgf* w sercu, w którym w 24 h po zawale osiągnęła ona bardzo wysoki poziom (najwyższy ze wszystkich genów proangiogennych - Ryc. 44B). Na podstawie badań z użyciem kardiomiocytów pochodzących od nowonarodzonego szczura udowodniono, iż utrzymujące się dłużej niż 6 godzin warunki niedotlenienia, obejmujące mniej niż 2% O₂, powodują znaczny wzrost ekspresji genu *Plgf*, który osiąga najwyższy punkt po 24 godzinach. Podwyższona aktywność genu *PIGF* została również wykazana w ludzkich sercach z objawami zaawansowanego włóknienia, które jest długoterminową konsekwencją przebytego zawału serca. W bioptatach pobranych z mięśnia sercowego wykazano, iż serca, które nie charakteryzują się zwłóknieniem, wykazują niewielką ekspresję zarówno genu *PIGF* oraz receptora *Flt-1*. Jednak w miokardium, w którym dochodzi do fibrozy, ekspresja *PIGF* wzrasta prawie dwukrotnie. Białko zostało zlokalizowane zarówno w kardiomiocytach, jak i macierzy zewnątrzkomórkowej oraz w niektórych naczyniach włosowatych w obrębie tkanki łącznej [214]. *Vegf-a* wykazywał bardzo wysoką ekspresję w 24 h po wywołaniu zawału. Prawdopodobnie miało to związek z ostrym stanem niedotlenienia. Następnie jego ekspresja spadała, aby prawie miesiąc po zawale wzrosnąć w momencie, kiedy warunki panujące w sercu stabilizują się, a blizna pozawałowa przyjmuje ostateczny kształt, zaś sam mięsień wykazuje znamiona niekorzystnej przebudowy. Być może jest to moment, w którym czynniki proangiogenne w sercu synchronizują swoje działanie. Jak wykazano za pomocą schematów przedstawiających analizę ekspresji badanych genów w czasie - spadek każdego z genów

(*Hif-1a*, *Vegf-a*, *Vegf-b*, *Vegf-c* oraz genów dla dwóch receptorów- *Flt-1* oraz *Kdr*) przypadają na 7 dzień, kiedy analiza histologiczna wykazywała masywny stan zapalny (być może te zjawiska są ze sobą powiązane). Następnie ekspresja wymienionych genów wzrastała, aby prawdopodobnie wspólnie skompensować niewydolność serca za pomocą wywołania neoangiogenezy.

Jest interesujące, że jedynym genem, który nie podążał za schematem wyznaczonym przez pozostałe geny był *Vegf-d*, biorący udział głównie w powstawaniu naczyń limfatycznych (Ryc. 44F). Wykazano, iż hipoksja ma także wpływ na regulację limfangiogenezy, a nie tylko samej angiogenezy na czym skupia się większość doniesień. Limfangiogeneza indukowana jest przez czynniki należące do rodziny VEGF, które promują angiogenezę (VEGF-A) lub angiogenezę i limfangiogenezę (VEGF-C i VEGF-D oraz FGF-2). Podczas stanu o obniżonej zawartości tlenu dochodzi do pobudzenia ekspresji tych czynników wraz z ich receptorami *VEGF-R2* (*Kdr*) oraz *VEGF-R3* [215]. Ekspresja genu *Vegf-C* utrzymywała stały poziom na przestrzeni badanych punktów czasowych, aż do momentu 28 dnia po zawale, w którym wykazywała delikatny wzrost, tak samo jak genu dla receptora *Kdr*, sugerując ich synchronizację w czasie (Ryc. 44E, H). Co ciekawe, szczyt ekspresji genu *Vegf-d* przypadają na 7 dzień po indukcji zawału, kiedy to wykrywano najbardziej zintensyfikowany stan zapalny w obrębie mięśnia sercowego.

Dokumentacja fotograficzna wykonana za pomocą aparatu cyfrowego ilustruje przebieg zmian geometrii i morfologii serca na przestrzeni czasu. Dodatkowo badania histologiczne wykazały natężenie patologii zjawiska po 28 dniach od zawału (Ryc. 39). W niecały miesiąc od podwiązania lewej tętnicy wieńcowej ściana lewej komory serca u myszy jest tak cienka, że każde uderzenie serca mogło doprowadzić do jej perforacji. Uwidocznienie dynamiki zjawiska znanego pod nazwą niekorzystna przebudowa serca wskazuje, jak ważnym z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej jest zastosowanie terapii restrukturyzacyjnej, która może odbudować ścianę lewej komory. Obniżona podaż krwi, tlenu i substancji odżywczych w obrębie serca pozawałowego może również mieć wpływ na tempo regeneracji. Należy zatem rozważyć zastosowanie dodatkowego elementu terapeutycznego w postaci np. białek proangiogennych, które będą w stanie wzbudzić powstanie alternatywnego przepływu krwi w miejscu objętym niedokrwieniem. W ramach badań przeprowadzonych w niniejszej pracy udało się wykazać, iż mioblasty są odpowiednimi kandydatami do zastosowania ich jako terapeutyczny przeszczep komórkowy w miejsce, w którym panują niekorzystne warunki

tlenowe. Co istotne, w toku prowadzonych doświadczeń nie zaobserwowano aby hipoksja miała negatywny wpływ na właściwości biologiczne mioblastów ludzkich. Nie udokumentowano istotnych zmian w proliferacji komórek hodowanych w warunkach 3% stężenia O₂ w stosunku do komórek utrzymywanych w warunkach standardowych. Pogorszeniu nie ulegała także zdolność do różnicowania się w miotuby w populacjach mioblastów niemodyfikowanych. Badanie na obecność apoptozy w populacjach komórek mio 191 ujawniło wzrost odsetka komórek wchodzących w szlak programowanej śmierci w obrębie mioblastów natywnych hodowanych w 3% stężenia O₂ w stosunku do warunków standardowych. Jednak po modyfikacji genem *PIGF* różnica zniknęła. Biorąc pod uwagę możliwość wspomagania właściwości regeneracyjnych komórek macierzystych, zastosowano modyfikacje genetyczne komórek macierzystych mięśni szkieletowych w perspektywie wspomagania odbudowy waskulatury pozawałowego serca. Przetestowano dwa rodzaje modyfikacji genetycznych - transfekcję z użyciem wektora *FGF4/VEGF* oraz *PIGF*. Obydwie modyfikacje w warunkach *in vitro* wykazywały potencjalne właściwości terapeutyczne. Jednak do dalszych badań na modelu zwierzęcym wybrano mioblasty modyfikowane genem *PIGF*.

4. Terapia regeneracyjna

Idealna terapia obejmująca leczenie skutków zawału serca powinna składać się z co najmniej dwóch czynników: strukturalnego - czyli komórek, które będą w stanie wypełnić bliznę pozawałową i zadziałać jako element wzmacniający ścieńczoną ścianę lewej komory, oraz proregeneracyjnego - który wspomagałby w jakiś sposób odtworzenie warunków, które przypominałyby fizjologiczne np. niwelując arytmie czy stan zapalny bądź wspomagając przepływ krwi w miejscu niedokrwienia. Dotychczas zaproponowano cały wachlarz komórek macierzystych, metod ich modyfikacji, czynników terapeutycznych, a także sposobów dostarczania transplantów w miejsce docelowe [216], [217].

W ramach niniejszej dysertacji wykonano modyfikację genetyczną komórek macierzystych mięśni szkieletowych za pomocą dwóch różnych wektorów zawierających - *FGF-4/VEGF* oraz *PIGF*. Wybór typu modyfikacji genetycznej do dalszych testów w modelu *in vivo* był niezmiernie trudny. Obydwa testowane warianty wykazywały potencjał terapeutyczny (proangiogeny), a hipoksja nie wywierała znaczącego negatywnego wpływu na właściwości biologiczne komórek. Po dłuższej analizie danych zarówno literaturowych, jak i

wynikających z przeprowadzonych eksperymentów, wyselekcjonowano mioblasty modyfikowane genem *PIGF*, głównie dlatego, że na przestrzeni lat pojawiło się mnóstwo badań odnośnie genu *VEGF-A* i jego potencjału terapeutycznego w leczeniu pozawałowej niewydolności serca. Próby kliniczne z użyciem czynnika FGF nie dawały jednak satysfakcjonujących wyników. Warto jednak zauważyć, że kombinacja czynników FGF-4 oraz VEGF-A razem nigdy nie była testowana. Zatem ostateczną decyzję podjęto kierując się wynikami przeprowadzonych doświadczeń. Co prawda, w badaniach *in vitro* nad właściwościami genetycznie modyfikowanych komórek w hipoksji, tylko pod względem apoptozy zauważono zmniejszoną podatność mioblastów transfekowanych genem *PIGF*. Jednak badanie dynamiki zmian molekularnych w sercu wykazało drastyczny wzrost genu *Plgf* jedynie po 24 od indukcji zawału (Ryc. 44B). Następnie jego ekspresja pozostawała wyciszona. Ilość transkryptów *Vegf-a* wzrosła 28 dnia po zawale (Ryc. 44C). Zatem podanie w tym punkcie czasowym czynnika PIGF uzupełniłoby pulę naturalnie występujących czynników proangiogennych, których ekspresja w synchronizowany sposób rosłaby w ostatnim punkcie czasowym eksperymentu. Ilość białka PIGF wykrywanego w medium była co prawda mniejsza niż w przypadku VEGF-A (Ryc. 31), jednak białko to było równie funkcjonalne jak w przypadku połączenia obu czynników VEGF-A oraz FGF-4 (Ryc. 33, 34). Co więcej, stężenie około 300-350 pg/ml białka PIGF było równie funkcjonalne co o wiele wyższe stężenia białek VEGF-A i FGF-4. W związku z tym, iż w literaturze znajdują się przesłanki wskazujące, że zbyt duża dawka VEGF-A może powodować powstawanie obrzęków [146], postanowiono zrezygnować z podawania mioblastów modyfikowanych genetycznie plazmidem FGF-4/VEGF na rzecz komórek macierzystych mięśni szkieletowych modyfikowanych genem *PIGF*.

Jak wspomniano wcześniej, idealna terapia skierowana na leczenie skutków zawału serca powinna spełniać dwa podstawowe kryteria - odbudować strukturalnie i zregenerować. Komórki macierzyste mięśni szkieletowych były podawane w rejon strefy granicznej zawału (ang. *border zone*). Następnie za pomocą echa serca oceniano, czy poprawie ulegały parametry hemodynamiczne lewej komory. Obserwowano poprawę wydolności serca u myszy, którym transplantomano komórki zarówno „natywne”, jak i modyfikowane genetycznie genem *PIGF*. Po 2 miesiącach od interwencji komórkowych, zmiana stosunku powierzchni lewej komory w osi krótkiej (SAX AC) ulegała poprawie o około 40% w stosunku do serc, którym podawano intrakardialnie roztwór soli fizjologicznej (Ryc. 46). Podobne badania były uprzednio przeprowadzane na szczurach, którym również podawano

mioblasty transfekowane genem *PIGF*. W tym wypadku badanymi parametrami hemodynamicznymi lewej komory były: frakcja skracania (FS ang. *fractional shortening*) oraz frakcja wyrzutowa (EF ang. *ejection fraction*). Obydwa parametry uległy poprawie po 86 dniach od zainicjowania terapii. Warto zauważyć, iż parametry te były mierzone w osi długiej serca. Zatem łącząc wnioski płynące z cytowanego badania przedklinicznego oraz z próby przedklinicznej przedstawionej w dysertacji, można stwierdzić, iż mioblasty (modyfikowane genetycznie bądź natywne) podane w niedokrwienno-rejon serca pozawałowego, mogą poprawić parametry hemodynamiczne mierzone w różnych projekcjach (osi długiej oraz krótkiej serca) [149]. Podanie komórek może prowadzić do uzupełnienia ubytków w miejscach objętych zawałem i wzmocnienia lewej komory serca. Uzyskane wyniki badań można skonfrontować z wynikami opublikowanymi przez inne grupy badawcze, które postanowiły zbadać proregeneracyjne właściwości cząsteczek PIGF po ich iniekcji do serca. Badania na szczurach, którym 20 min po indukcji zawału podano intrakardialnie wektor wywołujący nadekspresję genu *PIGF*, udowodniły działanie plejotropowe względem serca. Terapia genowa *PIGF* poprawiała wydolność serca po zawale, przez zmniejszenie obszaru objętego zawałem (w porównaniu do kontrolnych serc którym podano „pusty wektor”) i wzbudzenie naprawczej angiogenezy, poprzez regulację parakrynych czynników antyapoptotycznych i angiogennych [218]. Również w modelu mysiego serca pozawałowego podawano nanocząsteczki uwalniające PIGF nawet do 120 godzin po iniekcji [219]. Po upływie 8 tygodni od wdrożenia terapii, zaobserwowano wzrost frakcji wyrzutowej lewej komory, zmniejszenie obszaru blizny pozawałowej, zwiększenie gęstości siatki naczyń, a także spadek poziomu cytokin prozapalnych - $TNF\alpha$ oraz interleukiny-6 [219]. Zatem biorąc pod uwagę właściwości plejotropowe czynnika PIGF, można przypisać mu funkcje regeneracyjne tak pożądane w przypadku terapii z użyciem komórek macierzystych. Co więcej, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badanie histochemiczne, w którym porównano morfologię serc po podaniu komórek modyfikowanych genetycznie za pomocą wektora z PIGF do serca w 28 dni po zawale bez terapii, wykazało wzmocnienie lewej komory (Ryc. 49). Podobną prawidłowość zaobserwowano w innych badaniach, w których intrakardialnie podawano jedynie rekombinowane białko PIGF, a porównania dokonano z sercami w których stosowano jedynie roztwór soli fizjologicznej [220]. Zatem nie tylko mioblasty posiadają właściwości odbudowujące ścianę lewej komory, ale również samo białko PIGF.

Poziom ekspresji genów proangiogennych badanych w sercach po interwencjach zarówno komórkowych (genetycznie modyfikowanych oraz „natywnych”), jak i roztworem soli fizjologicznej (Ryc. 51), ujawnił kilka prawidłowości, które można odnieść do badań nad dynamiką ekspresji genów w różnych odstępach czasu po zawale (Ryc. 44). Wykryto podwyższoną ekspresję genu *Hif-1α* po upływie 3 miesięcy od indukcji zawału (Ryc. 51A) niż 24 h po zawale (Ryc. 44A), kiedy to wykazał on swoją najwyższą ekspresję. W sercach poddanych terapii utrzymywał się on na podobnym poziomie we wszystkich grupach.

Gen *Vegf-a* oraz geny dla receptorów *Flt-1* oraz *Kdr* wykazywały wzrost ekspresji 65 dni od podania komórek modyfikowanych genem *PlGF* (Ryc. 51C, G, H). Podobne zależności wykryto (na poziomie transkrypcyjnym) u szczurów, w których analiza PCR w czasie rzeczywistym została przeprowadzona aż 86 dni po transplantacji [149]. Tak, jak przypuszczano podczas doboru modyfikacji genetycznej, która zostanie przetestowana w warunkach *in vivo*, zastosowanie terapii pomogło utrzymać ekspresję genu *Vegf-a* (2 miesiące po terapii, a 3 miesiące od indukcji zawału serca) nawet na wyższym poziomie niż zaobserwowano 24 h i 7 dni po zawale bez interwencji. Co więcej, w sercach, w których podano roztwór soli fizjologicznej, obserwowano drastyczny spadek ilości transkryptów w stosunku do grup poddanych interwencji (Ryc. 44C oraz Ryc. 51C). W sercach, które ulegały dalszej patologicznej, niekorzystnej przebudowie po podaniu 0,9% NaCl (3 miesiące od podwiązania lewej tętnicy wieńcowej- Ryc. 51C, G, H), poziom ekspresji genów *Vegf-a*, *Flt-1* i *Kdr* utrzymywał się na podobnym poziomie co w 28 dniu po zawale (Ryc. 44C, G, H).

Z kolei endogenna ekspresja *Plgf* w mysim sercu po terapii z użyciem ludzkich mioblastów (zarówno modyfikowanych jak i natywnych) nie wykazywała tak spektakularnego wzrostu jak po 24 h od indukcji zawału (Ryc. 44B). Jak się okazało poziom tego genu utrzymywał się na podobnym poziomie w każdej z badanych grup myszy (Mb-PlGF, Mb-WT oraz 0,9%NaCl- Ryc. 51B) i było to porównywalne z wyjściowym poziomem ekspresji tego genu w sercu kontrolnym (bez zawału) oraz sercach 7 dni i 28 dni po zawale (Ryc. 44B). W badaniach na szczurach, którym zostały transplantowane ludzkie mioblasty, również nie zaobserwowano zmian w ekspresji genu *Plgf* pomiędzy grupami szczurów kontrolnych (bez zawału, z podanym płynem Ringera i po terapii mioblastami zmodyfikowanymi genem *PlGF*) [149].

Analizując wyniki przeprowadzonych badań *in vivo*, udało się wykazać poprawę parametrów hemodynamicznych serca. Prawdopodobnie nastąpiło to w wyniku odbudowy ściany lewej

komory. Miały na to wpływ transplantowane mioblasty, czyli komórki macierzyste mięśni szkieletowych, których właściwości pozwalają na skuteczne uzupełnienie ubytków w okolicach blizny pozawałowej oraz sam gen *PlGF*, którego plejotropowe właściwości mogły doprowadzić do mobilizacji komórek CPC (progenitory kardialne ang. *cardiac progenitor cells*) w obrębie serca i tym samym promować odbudowę. Ponadto, biorąc pod uwagę właściwości proangiogenne cząsteczki PlGF można wnioskować, iż może dojść do poprawy ukrwienia w obrębie rejonu pozawałowego, przez co może zostać spełniona rola regeneracyjnej zaproponowanej terapii. Obok poprawy funkcjonalności mięśnia sercowego, zaproponowana terapia z użyciem genetycznie zmodyfikowanych miała również wpływ na ekspresję genów na poziomie molekularnym w miokardium. Doszło do wzbudzenia ekspresji najbardziej prominentnych genów proangiogennych oraz genów dla ich receptorów w porównaniu do serc, w których zastosowano iniekcję roztworu soli fizjologicznej.

5. Podsumowanie

W przedstawionym innowacyjnym podejściu badawczym utworzono model hipoksji dla mioblastów ludzkich hodowanych w warunkach *in vitro*, który optymalnie odzwierciedlał warunki tlenowe w sercu pozawałowym. Dodatkowo, biorąc pod uwagę aspekty kliniczne proponowanych terapii komórkowych, postanowiono zmodyfikować genetycznie komórki macierzyste mięśni szkieletowych za pomocą genów proangiogennych *FGF-4/VEGF* oraz *PlGF*, tak, aby spełniały one funkcje strukturalno-regeneracyjne w pozawałowym miokardium. Mioblasty badano zarówno w warunkach ustalonej wcześniej hipoksji (3% O₂) oraz w warunkach fizjologicznych (5% O₂) i standardowych dla hodowli *in vitro* (21% O₂). Wykazano, iż zaproponowane „narzędzie terapeutyczne” (w postaci genetycznie modyfikowanych mioblastów) może z powodzeniem być stosowane w terapiach regeneracyjnych skierowanych na leczenie niedokrwienia mięśnia sercowego. Badania w modelu zwierzęcym pozwoliły na ustalenie, w jaki sposób zmienia się profil ekspresji genów proangiogennych (*Vegf-a, b, c, d, Flt-1, Kdr*) w odpowiedzi na hipoksję, w różnych odstępach czasu od zaindukowania zawału. Próba przedkliniczna, z zastosowaniem mioblastów modyfikowanych genetycznie genem *PlGF*, zakończyła się pełnym sukcesem, który miał swoje odzwierciedlenie w poprawie parametrów hemodynamicznych serca, wzmocnieniu ściany lewej komory, oraz pozytywnych zmianach w profilu ekspresji genów proangiogennych w sercach poddanych terapii. Tym samym udowodniono, iż zaproponowana terapia z użyciem ludzkich mioblastów modyfikowanych genetycznie genami

proangiogennymi, może spełniać oczekiwania w zakresie odbudowy struktury i funkcji mięśnia sercowego.

VIII. WNIOSKI

- Analiza ekspresji markera *HIF-1 α* w mioblastach hodowanych *in vitro* w różnych stężeniach tlenu oraz w komórkach po podaniu w rejon niedokrwienny 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-1 α* 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.
- 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 , uznawane za warunki normoksji; natomiast warunki standardowe *in vitro* (hiperoksja) kreowały dla komórek środowisko, które nie zmieniało właściwości biologicznych mioblastów.
- 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 proangiogennymi.
- 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 znamienne wzrost czynnika *Hif-1 α* wykazuje gen *Vegf-a*. *Plgf* był aktywnie transkrybowany jedynie 24 h po

zawale, a następnie jego ekspresja wraca do poziomu bazalnego (przed indukcją zawału). Miesiąc po zawale, kiedy to blizna pozawałowa jest już ukształtowana występuje trend synchronizacji wszystkich czynników (*Hif-1 α* , *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.

- 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.
- 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.

IX. 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-1 α* . 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 zaidukowanego zawału. Geny *Hif-1 α* , *Vegf-a*, *Plgf* i *Flt-1* wykazywały podobny wzór ekspresji na przestrzeni czasu, przy czym największą ekspresję w odpowiedzi na stymulację czynnikiem transkrypcyjnym *Hif-1 α* w ostrym stanie niedokrwinnym (24 h od indukcji zawału) wykazał gen dla czynnika proangiogenego *Plgf*. Jak wykazano spadek każdego z genów (*Hif-1 α* , *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 PlGF.

Mioblasty modyfikowane genetycznie przez wprowadzenie genu *PlGF* 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 ścięnczonej 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.

X. ABSTRACT

The innovative part of the study required establishment of the most accurate *in vitro* O₂ level corresponding to the hypoxia level prevailing in myocardium after MI. So far, no study has previously reported such an experiment. Thus, human wild type myoblasts were cultured *in vitro* in different concentrations of oxygen (1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, and 15%) and expression of *HIF-1α* was verified at time intervals of 24 h and 7 days of *in vitro* culture. Thus, we determined the *HIF-1α* expression curve depending on the O₂ level in cultured *in vitro* wild type myoblasts. Myoblast cells exhibited the highest expression of *HIF-1α* when cultured *in vitro* for 24 h in 3% oxygen. To compare *in vitro* hypoxia to conditions prevailing in post-infarcted hearts, *HIF-1α* expression was examined in human myoblasts transplanted into murine hearts immediately after myocardial infarction. Highly elevated expression of *HIF-1α* in human was detected in samples of myoblasts at 24 h after cell transplantation and at 7 days after transplantation *in situ*. After comparison of the *in vitro* and *in vivo* experiments, it turned out that only cells cultured for 24 h in 3% oxygen exhibited similar *HIF-1α* levels with no statistically significant differences, similarly to *HIF-1α* expression in myoblasts transplanted into murine post-infarcted hearts. Therefore, 3% oxygen for *in vitro* hypoxic myoblast cell culture was considered equivalent to post-infarcted heart environment.

After establishment of *in vitro* O₂ level corresponding to the hypoxia level prevailing in myocardium after MI, human myoblasts cells were genetically modified using vectors containing following proangiogenic genes: *FGF-4/VEGF* and *PlGF*. Subsequently, the influence of oxygen concentrations on the biological functions (proliferation, differentiation, apoptosis) was evaluated. Additionally, to define how O₂ conditions may impact selected gene expression (of transgenes) and protein secretion, the expression of introduced transgenes was evaluated and the functional test for *in vitro* primitive vessel-like structures was performed.

Studies using SCID mice contributed to establishment of gene expression profile of proangiogenic genes in different time points after induction of heart infarction. The interest was focused on proangiogenic genes (*Vegf isoforms a, b, c, d; Plgf*) and genes coding for respective receptors (*Flt-1; Kdr*). To evaluate the influence of hypoxia in the hearts of mice, the expression of *Hif-1α* was also examined. Mice were sacrificed at 24 h, 7 days and 28 days after coronary artery ligation and the expression of listed above genes was evaluated. Understanding the dynamics of proangiogenic genes expression in mouse post-infarction

model allowed for selection of an appropriate regenerative approach by applying cell therapy with genetically modified cells using the *PIGF* gene in further preclinical studies.

The final phase of the study involved the transplantation of genetically modified myoblasts using *PIGF* into post-infarcted mouse hearts. The therapy was successful not only at the functional level but also at the molecular level, in which the introduced factors could enhance the expression of pro-angiogenic genes. It is worth noting, that the cellular therapy provided a prolonged benefit since the results at endpoint were assessed three months after MI induction, which is significant period of time in the life of a mouse. Echocardiography of the left ventricle showed improvement in the haemodynamic properties of the heart after therapy with both genetically modified myoblasts and WT myoblasts in contrast to treatment with 0.9% NaCl solution. Additionally after cell therapy, the most prominent pro-angiogenic genes (*Vegf-a*, *Vegf-b*, and *Vegf-c*) and their receptors (*Flt-1* and *Kdr*) were upregulated in the myocardium three months after MI induction.

XI. LITERATURA

- [1] G. L. Semenza, „Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease.”, *Annu. Rev. Physiol.*, t. 76, ss. 39–56, 2014.
- [2] P. Carmeliet, „Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis”, *Nature Medicine*, t. 6, nr 4. ss. 389–395, 2000.
- [3] G. Thurston, J. S. Rudge, E. Ioffe, H. Zhou, L. Ross, S. D. Croll, N. Glazer, J. Holash, D. M. McDonald, i G. D. Yancopoulos, „Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage”, *Nat. Med.*, t. 6, nr 4, ss. 460–463, 2000.
- [4] N. Van Royen, J. J. Piek, W. Schaper, C. Bode, i I. Buschmann, „Arteriogenesis: Mechanisms and modulation of collateral artery development”, *J. Nucl. Cardiol.*, t. 8, nr 6, ss. 687–693, 2001.
- [5] J. Koerselman, Y. Van der Graaf, P. P. T. De Jaegere, i D. E. Grobbee, „Coronary collaterals: An important and underexposed aspect of coronary artery disease”, *Circulation*, t. 107, nr 19. ss. 2507–2511, 2003.
- [6] M. Heil, I. Eitenmüller, T. Schmitz-Rixen, i W. Schaper, „Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences”, *J. Cell. Mol. Med.*, t. 10, nr 1, ss. 45–55, 2006.
- [7] E. M. Conway, D. Collen, i P. Carmeliet, „Molecular mechanisms of blood vessel growth”, *Cardiovascular Research*, t. 49, nr 3. ss. 507–521, 2001.
- [8] P. Carmeliet, „Angiogenesis in health and disease”, *Nature Medicine*, t. 9, nr 6. ss. 653–660, 2003.
- [9] G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, i J. Holash, „Vascular-specific growth factors and blood vessel formation”, *Nature*, t. 407, nr 6801, ss. 242–8, 2000.
- [10] B. P. Eliceiri, R. Paul, P. L. Schwartzberg, J. D. Hood, J. Leng, i D. A. Cheresh, „Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability”, *Mol. Cell*, t. 4, nr 6, ss. 915–924, 1999.
- [11] P. C. Maisonpierre, C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato, i G. D. Yancopoulos, „Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis”, *Science (80-.)*, t. 277, nr 5322, ss. 55–60, 1997.
- [12] a R. Nelson, B. Fingleton, M. L. Rothenberg, i L. M. Matrisian, „Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications.”, *J. Clin. Oncol.*, t. 18, nr 5, ss. 1135–1149, 2000.
- [13] P. Carmeliet i R. K. Jain, „Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.”, *Nature*, t. 473, nr 7347, ss. 298–307, 2011.
- [14] B. P. Eliceiri i D. A. Cheresh, „The role of α v integrins during angiogenesis: Insights into potential mechanisms of action and clinical development”, *Journal of Clinical Investigation*, t. 103, nr 9. ss. 1227–1230, 1999.
- [15] M. Corada, M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M. G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D. M. McDonald, P. A. Ward, i E. Dejana, „Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 96, nr 17, ss. 9815–9820, 1999.
- [16] K. a Knudsen, C. Frankowski, K. R. Johnson, i M. J. Wheelock, „A role for cadherins in cellular signaling and differentiation.”, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, t. 30–31, ss. 168–76, 1998.
- [17] P. Lindahl, M. Hellstrom, M. Kalen, i C. Betsholtz, „Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice”, *Curr. Opin.Lipidol.*, t. 9, nr 5, ss. 407–411, 1998.
- [18] R. Gianni-Barrera, M. Trani, S. Reginato, i A. Banfi, „To sprout or to split? VEGF, Notch and vascular morphogenesis”, *Biochem. Soc. Trans.*, t. 39, nr 6, ss. 1644–1648, 2011.
- [19] T. Kangsamaksin, A. Murtomaki, N. M. Kofler, H. Cuervo, R. A. Chaudhri, I. W. Tattersall, P. E. Rosenstiel, C. J. Shawber, i J. Kitajewski, „NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth”, *Cancer Discov.*, t. 5, nr 2, ss. 182–197, 2015.
- [20] R. Blanco i H. Gerhardt, „VEGF and Notch in tip and stalk cell selection”, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, t. 3, nr 1, 2013.
- [21] G. L. Semenza, „Life with oxygen”, *Science*, t. 318, nr 5847. ss. 62–64, 2007.
- [22] J. A. Bertout, S. A. Patel, i M. C. Simon, „The impact of O₂ availability on human cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, t. 8, nr 12, ss. 967–975, 2008.
- [23] B. L. Krock, N. Skuli, i M. C. Simon, „Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil”, *Genes Cancer*, t. 2, nr 12, ss. 1117–1133, 2011.
- [24] Z. Yun, Q. Lin, i A. J. Giaccia, „Adaptive Myogenesis under Hypoxia”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 25, nr 8, ss. 3040–3055, 2005.
- [25] J. I. Bárdos i M. Ashcroft, „Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network.”, *Biochim. Biophys. Acta*, t. 1755, nr 2, ss. 107–120, 2005.

- [26] G. L. Semenza i G. L. Wang, „A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 12, nr 12, ss. 5447–5454, 1992.
- [27] G. L. Wang i G. L. Semenza, „Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia.”, *J. Biol. Chem.*, t. 268, nr 29, ss. 21513–21518, 1993.
- [28] R. J. Kewley, M. L. Whitelaw, i A. Chapman-Smith, „The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators”, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, t. 36, nr 2, ss. 189–204, 2004.
- [29] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. a Rue, i G. L. Semenza, „Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 92, nr 12, ss. 5510–5514, 1995.
- [30] S. T. Crews, „Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH- PAS proteins”, *Genes and Development*, t. 12, nr 5, ss. 607–620, 1998.
- [31] R. H. Wenger, D. P. Stiehl, i G. Camenisch, „Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE”, *Sci. Signal.*, t. 2005, nr 306, s. re12-re12, 2005.
- [32] K. Lisy i D. J. Peet, „Turn me on: Regulating HIF transcriptional activity”, *Cell Death and Differentiation*, t. 15, nr 4, ss. 642–649, 2008.
- [33] C. W. Pugh, J. F. O’Rourke, M. Nagao, J. M. Gleadle, i P. J. Ratcliffe, „Activation of hypoxia-inducible factor-1; Definition of regulatory domains within the α subunit”, *J. Biol. Chem.*, t. 272, nr 17, ss. 11205–11214, 1997.
- [34] B. H. Jiang, J. Z. Zheng, S. W. Leung, R. Roe, i G. L. Semenza, „Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension.”, *J. Biol. Chem.*, t. 272, nr 31, ss. 19253–19260, 1997.
- [35] J. L. Ruas, L. Poellinger, i T. Pereira, „Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein.”, *J. Biol. Chem.*, t. 277, nr 41, ss. 38723–38730, 2002.
- [36] B. H. Jiang, G. L. Semenza, C. Bauer, i H. H. Marti, „Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension.”, *Am. J. Physiol.*, t. 271, nr 45, ss. C1172–C1180, 1996.
- [37] S. Salceda i J. Caro, „Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions”, *J. Biol. Chem.*, t. 272, nr 36, ss. 22642–22647, 1997.
- [38] M. Ema, S. Taya, N. Yokotani, K. Sogawa, Y. Matsuda, i Y. Fujii-Kuriyama, „A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 94, nr 9, ss. 4273–4278, 1997.
- [39] Y. Z. Gu, S. M. Moran, J. B. Hogenesch, L. Wartman, i C. a Bradfield, „Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α .”, *Gene Expr.*, t. 7, nr 3, ss. 205–213, 1998.
- [40] Y. Makino, R. Cao, K. Svensson, G. Bertilsson, M. Asman, H. Tanaka, Y. Cao, A. Berkenstam, i L. Poellinger, „Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression”, *Nature*, t. 414, nr 6863, ss. 550–554, 2001.
- [41] W. G. Kaelin, „PROLINE HYDROXYLATION AND GENE EXPRESSION”, *Annu. Rev. Biochem.*, t. 74, nr 1, ss. 115–128, 2005.
- [42] V. Srinivas, L. P. Zhang, X. H. Zhu, i J. Caro, „Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor α (HIF- α) proteins”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 260, nr 2, ss. 557–561, 1999.
- [43] N. Masson, „HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels”, *J. Cell Sci.*, t. 116, nr 15, ss. 3041–3049, 2003.
- [44] N. Masson, C. Willam, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, i P. J. Ratcliffe, „Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-?? chains activated by prolyl hydroxylation”, *EMBO J.*, t. 20, nr 18, ss. 5197–5206, 2001.
- [45] L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. M. Gleadle, L. E. Horsfall, N. J. Oldham, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, i C. J. Schofield, „The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1)”, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, t. 12, nr 12, ss. 1547–1550, 2002.
- [46] K. S. Hewitson, L. A. McNeill, M. V. Riordan, Y. M. Tian, A. N. Bullock, R. W. Welford, J. M. Elkins, N. J. Oldham, S. Bhattacharya, J. M. Gleadle, P. J. Ratcliffe, C. W. Pugh, i C. J. Schofield, „Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family”, *J. Biol. Chem.*, t. 277, nr 29, ss. 26351–26355, 2002.
- [47] D. Lando, D. J. Peet, D. A. Whelan, J. J. Gorman, i M. L. Whitelaw, „Asparagine hydroxylation of the

- HIF transactivation domain: A hypoxic switch”, *Science* (80-), t. 295, nr 5556, ss. 858–861, 2002.
- [48] D. Lando, D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw, i R. K. Bruick, „FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor”, *Genes Dev.*, t. 16, nr 12, ss. 1466–1471, 2002.
- [49] P. C. Mahon, K. Hirota, i G. L. Semenza, „FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity”, *Genes Dev.*, t. 15, nr 20, ss. 2675–2686, 2001.
- [50] W. G. Kaelin i P. J. Ratcliffe, „Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway”, *Molecular Cell*, t. 30, nr 4. ss. 393–402, 2008.
- [51] C. J. Schofield i Z. Zhang, „Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes”, *Current Opinion in Structural Biology*, t. 9, nr 6. ss. 722–731, 1999.
- [52] Q. Ke i M. Costa, „Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)”, *Mol. Pharmacol.*, t. 70, nr 5, ss. 1469–1480, sie. 2006.
- [53] D. J. Manalo, A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B. D. Kelly, S. Q. Ye, J. G. N. Garcia, G. L. Semenza, i H. Hif-, „Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1”, *Regulation*, t. 105, nr 2, ss. 659–669, 2005.
- [54] P. J. Kallio, I. Pongratz, K. Gradin, J. McGuire, i L. Poellinger, „Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 94, nr 11, ss. 5667–72, maj 1997.
- [55] P. J. Kallio, K. Okamoto, S. O’Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka, i L. Poellinger, „Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α .”, *EMBO J.*, t. 17, nr 22, ss. 6573–86, lis. 1998.
- [56] B. L. Ebert i H. F. Bunn, „Regulation of the erythropoietin gene.”, *Blood*, t. 94, nr 6, ss. 1864–77, wrz. 1999.
- [57] G. L. Semenza, R. C. Dureza, M. D. Traystman, J. D. Gearhart, i S. E. Antonarakis, „Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 10, nr 3, ss. 930–8, mar. 1990.
- [58] G. L. Semenza, S. T. Koury, M. K. Nejfelt, J. D. Gearhart, i S. E. Antonarakis, „Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 88, nr 19, ss. 8725–9, paź. 1991.
- [59] G. L. Semenza, M. D. Traystman, J. D. Gearhart, i S. E. Antonarakis, „Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 86, nr 7, ss. 2301–5, kwi. 1989.
- [60] V. H. Haase, „Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism”, *AJP Ren. Physiol.*, t. 299, nr 1, ss. F1–F13, 2010.
- [61] C. Peyssonnaud, V. Nizet, i R. S. Johnson, „Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism”, *Cell Cycle*, t. 7, nr 1, ss. 28–32, 2008.
- [62] N. L. Chepelev i W. G. Willmore, „Regulation of iron pathways in response to hypoxia”, *Free Radical Biology and Medicine*, t. 50, nr 6. ss. 645–666, 2011.
- [63] T. N. Seagroves, H. E. Ryan, H. Lu, B. G. Wouters, M. Knapp, P. Thibault, K. Laderoute, i R. S. Johnson, „Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 21, nr 10, ss. 3436–44, maj 2001.
- [64] C. V Dang i G. L. Semenza, „Oncogenic alterations of metabolism.”, *Trends Biochem. Sci.*, t. 24, nr 2, ss. 68–72, luty 1999.
- [65] G. L. Semenza, P. H. Roth, H. M. Fang, i G. L. Wang, „Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.”, *J. Biol. Chem.*, t. 269, nr 38, ss. 23757–63, wrz. 1994.
- [66] R. H. WENGER, „Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression”, *FASEB J.*, t. 16, nr 10, ss. 1151–1162, sie. 2002.
- [67] G. L. Semenza, „Regulation of Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1”, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, t. 76, nr 0, ss. 347–353, sty. 2011.
- [68] M. C. Brahimi-Horn, J. Chiche, i J. Pouyssegur, „Hypoxia signalling controls metabolic demand.”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, t. 19, nr 2, ss. 223–9, kwi. 2007.
- [69] S. P. Mathupala, A. Rempel, i P. L. Pedersen, „Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions.”, *J. Biol. Chem.*, t. 276, nr 46, ss. 43407–12, lis. 2001.
- [70] N. C. Denko, „Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour”, *Nat. Rev. Cancer*, t. 8, nr 9, ss. 705–713, 2008.
- [71] G. L. Semenza, „Hypoxia- inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype”, *EMBO J.*, t. 36, nr 3, ss. 252–259, 2017.

- [72] M. S. Ullah, A. J. Davies, i A. P. Halestrap, „The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism.”, *J. Biol. Chem.*, t. 281, nr 14, ss. 9030–7, kwi. 2006.
- [73] A. Sendoel i M. O. Hengartner, „Apoptotic Cell Death Under Hypoxia”, *Physiology*, t. 29, nr 3, ss. 168–176, 2014.
- [74] H. M. Sowter, P. J. Ratcliffe, P. Watson, A. H. Greenberg, i A. L. Harris, „HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors.”, *Cancer Res.*, t. 61, nr 18, ss. 6669–73, wrz. 2001.
- [75] J.-Y. Kim, H.-J. Ahn, J.-H. Ryu, K. Suk, i J.-H. Park, „BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 α .”, *J. Exp. Med.*, t. 199, nr 1, ss. 113–24, sty. 2004.
- [76] P. Carmeliet, Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C. J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R. K. Jain, D. Collen, E. Keshet, i E. Keshet, „Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.”, *Nature*, t. 394, nr 6692, ss. 485–90, 1998.
- [77] M. Sharma, N. Machuy, L. Böhme, K. Karunakaran, A. P. Mäurer, T. F. Meyer, i T. Rudel, „HIF-1 α is involved in mediating apoptosis resistance to Chlamydia trachomatis-infected cells”, *Cell. Microbiol.*, t. 13, nr 10, ss. 1573–1585, 2011.
- [78] E. Sasabe, Y. Tatemoto, D. Li, T. Yamamoto, i T. Osaki, „Mechanism of HIF-1 α -dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells”, *Cancer Sci.*, t. 96, nr 7, ss. 394–402, 2005.
- [79] J. T. Erler, C. J. Cawthorne, K. J. Williams, M. Koritzinsky, B. G. Wouters, C. Wilson, C. Miller, C. Demonacos, I. J. Stratford, i C. Dive, „Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 24, nr 7, ss. 2875–89, kwi. 2004.
- [80] J. A. Mitchell i J. M. Yochim, „Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the rat: its relation to uterine respiration and vascular activity.”, *Endocrinology*, t. 83, nr 4, ss. 701–5, paź. 1968.
- [81] F. Rodesch, P. Simon, C. Donner, i E. Jauniaux, „Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy.”, *Obstet. Gynecol.*, t. 80, nr 2, ss. 283–285, 1992.
- [82] W. Risau i I. Flamme, „Vasculogenesis.”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, t. 11, ss. 73–91, 1995.
- [83] K. Takeda, V. C. Ho, H. Takeda, L.-J. Duan, A. Nagy, i G.-H. Fong, „Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 26, nr 22, ss. 8336–46, 2006.
- [84] E. Maltepe, J. V. Schmidt, D. Baunoch, C. A. Bradfield, i M. C. Simon, „Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT”, *Nature*, t. 386, nr 6623, ss. 403–407, 1997.
- [85] O. Genbacev, Y. Zhou, J. W. Ludlow, S. J. Fisher, S. J. Fisher, C. H. Damsky, R. Schwarting, C. H. Damsky, M. L. Fitzgerald, S. J. Fisher, C. L. Librach, M. T. McMaster, R. J. Kurman, F. Rodesch, P. Simon, C. Donner, E. Jauniaux, O. Genbacev, R. Joslin, C. H. Damsky, B. M. Polliotti, S. J. Fisher, R. W. King, P. K. Jackson, M. W. Kirschner, U. K. Laemmler, H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, A. L. Gartel, M. S. Serfas, A. L. Tyner, C. H. Damsky, A. T. Hertig, T. G. Graeber, J. D. Boyd, W. J. Hamilton, Y. Zhou, J. Stone, Y. Zhou, C. H. Damsky, K. Chiu, J. M. Roberts, S. J. Fisher, S. J. Fisher, O. Genbacev, S. Schubach, i R. K. Miller, „Regulation of human placental development by oxygen tension.”, *Science*, t. 277, nr 5332, ss. 1669–72, 1997.
- [86] M. C. Simon i B. Keith, „The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, t. 9, nr 4, ss. 285–296, 2008.
- [87] D. M. Adelman, M. Gertsenstein, A. Nagy, M. C. Simon, i E. Maltepe, „Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses”, *Genes Dev.*, t. 14, nr 24, ss. 3191–3203, 2000.
- [88] K. D. Cowden Dahl, B. H. Fryer, F. A. Mack, V. Compernelle, E. Maltepe, D. M. Adelman, P. Carmeliet, i M. C. Simon, „Hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulate trophoblast differentiation”, *Mol Cell Biol*, t. 25, nr 23, ss. 10479–10491, 2005.
- [89] H. Diez, A. Fischer, A. Winkler, C. J. Hu, A. K. Hatzopoulos, G. Breier, i M. Gessler, „Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate”, *Exp. Cell Res.*, t. 313, nr 1, ss. 1–9, 2007.
- [90] a E. Greijer, P. van der Groep, D. Kemming, a Shvarts, G. L. Semenza, G. a Meijer, M. a van de Wiel, J. a M. Belien, P. J. van Diest, i E. van der Wall, „Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1).”, *J. Pathol.*, t. 206, nr 3, ss. 291–304, 2005.
- [91] G. L. Semenza, „Angiogenesis Ischemic and Neoplastic Disorders”, *Annu. Rev. Med.*, t. 54, nr 1, ss. 17–28, 2003.
- [92] A. Dimberg, „Chemokines in Angiogenesis”, 2010, ss. 59–80.

- [93] C. W. Pugh i P. J. Ratcliffe, „Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system.”, *Nat. Med.*, t. 9, nr 6, ss. 677–684, 2003.
- [94] D. R. Mole, C. Blancher, R. R. Copley, P. J. Pollard, J. M. Gleadle, J. Ragousis, i P. J. Ratcliffe, „Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts”, *J. Biol. Chem.*, t. 284, nr 25, ss. 16767–16775, 2009.
- [95] S. Keely, L. E. Glover, C. F. MacManus, E. L. Campbell, M. M. Scully, G. T. Furuta, i S. P. Colgan, „Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing.”, *FASEB J.*, t. 23, nr 5, ss. 1338–1346, 2009.
- [96] E. C. Keeley, B. Mehrad, i R. M. Strieter, „Chemokines as mediators of neovascularization”, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, t. 28, nr 11, ss. 1928–1936, 2008.
- [97] I. Petit, D. Jin, i S. Rafii, „The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis”, *Trends Immunol.*, t. 28, nr 7, ss. 299–307, 2007.
- [98] A. Ridiandries, J. T. M. Tan, i C. A. Bursill, „The role of CC-chemokines in the regulation of angiogenesis”, *International Journal of Molecular Sciences*, t. 17, nr 11, 2016.
- [99] D. J. Ceradini, A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine, i G. C. Gurtner, „Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1.”, *Nat. Med.*, t. 10, nr 8, ss. 858–864, 2004.
- [100] S. P. Lee, S. W. Youn, H. J. Cho, L. Li, T. Y. Kim, H. S. Yook, J. W. Chung, J. Hur, C. H. Yoon, K. W. Park, B. H. Oh, Y. B. Park, i H. S. Kim, „Integrin-linked kinase, a hypoxia-responsive molecule, controls postnatal vasculogenesis by recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue”, *Circulation*, t. 114, nr 2, ss. 150–159, 2006.
- [101] E. De Falco, D. Porcelli, A. R. Torella, S. Straino, M. G. Iachininoto, A. Orlandi, S. Truffa, P. Biglioli, M. Napolitano, M. C. Capogrossi, i M. Pesce, „SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells.”, *Blood*, t. 104, nr 12, ss. 3472–82, grudz. 2004.
- [102] S. Liekens, D. Schols, i S. Hatse, „CXCL12-CXCR4 axis in Angiogenesis, Metastasis and Stem Cell Mobilization”, *Curr. Pharm. Des.*, t. 16, ss. 3903–3920, 2010.
- [103] A. Schober, E. Karshovska, A. Zerneck, i C. Weber, „SDF-1 α -mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine?”, *Trends Cardiovasc. Med.*, t. 16, nr 4, ss. 103–108, 2006.
- [104] Y. Wang, H. K. Haider, N. Ahmad, D. Zhang, i M. Ashraf, „Evidence for ischemia induced host-derived bone marrow cell mobilization into cardiac allografts”, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, t. 41, nr 3, ss. 478–487, 2006.
- [105] J. Ma, J. Ge, S. Zhang, A. Sun, J. Shen, L. Chen, K. Wang, i Y. Zou, „Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction”, *Basic Res Cardiol*, t. 100, nr 3, ss. 217–223, 2005.
- [106] H. Zheng, G. Fu, T. Dai, i H. Huang, „Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway.”, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, t. 50, nr 3, ss. 274–80, 2007.
- [107] E. A. Liehn, A. Schober, i C. Weber, „Blockade of keratinocyte-derived chemokine inhibits endothelial recovery and enhances plaque formation after arterial injury in apoE-deficient mice”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, t. 24, nr 10, ss. 1891–1896, 2004.
- [108] D. Martin, R. Galisteo, i J. S. Gutkind, „CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NF κ B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex.”, *J. Biol. Chem.*, t. 284, nr 10, ss. 6038–42, mar. 2009.
- [109] E. A. Liehn, E. Radu, i A. Schuh, „Chemokine Contribution in Stem Cell Engraftment into the Infarcted Myocardium”, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, t. 8, ss. 278–283, 2013.
- [110] E. Bianconi, A. Piovesan, F. Facchin, A. Beraudi, R. Casadei, F. Frabetti, L. Vitale, M. C. Pelleri, S. Tassani, F. Piva, S. Perez-Amodio, P. Strippoli, i S. Canaider, „An estimation of the number of cells in the human body”, *Ann. Hum. Biol.*, t. 40, nr 6, ss. 463–471, 2013.
- [111] F. M. Watt i R. R. Driskell, „The therapeutic potential of stem cells.”, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, t. 365, nr 1537, ss. 155–63, 2010.
- [112] H. Yin, F. Price, i M. a Rudnicki, „Satellite cells and the muscle stem cell niche.”, *Physiol. Rev.*, t. 93, nr 1, ss. 23–67, 2013.
- [113] X. Fu, H. Wang, i P. Hu, „Stem cell activation in skeletal muscle regeneration”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, t. 72, nr 9, ss. 1663–1677, 2015.
- [114] M. L. Conerly, Z. Yao, J. W. Zhong, M. Groudine, i S. J. Tapscott, „Distinct Activities of Myf5 and MyoD Indicate Separate Roles in Skeletal Muscle Lineage Specification and Differentiation”, *Dev. Cell*,

- t. 36, nr 4, ss. 375–385, 2016.
- [115] T. Francetic i Q. Li, „Skeletal myogenesis and Myf5 activation”, *Transcription*, t. 2, nr 3, ss. 109–114, 2011.
- [116] E. Meadows, J. H. Cho, J. M. Flynn, i W. H. Klein, „Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells”, *Dev. Biol.*, t. 322, nr 2, ss. 406–414, 2008.
- [117] WHO, „WHO _ Cardiovascular diseases (CVDs)”, *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2015.
- [118] B. I. Jugdutt, „Ischemia/Infarction.”, *Heart Fail. Clin.*, t. 8, nr 1, ss. 43–51, sty. 2012.
- [119] J. J. Gavira, G. Abizanda, M. Perez-Ilzarbe, D. Martinez-Caro, E. Nasarre, A. Perez-Ruiz, i F. Prosper, „Skeletal myoblasts for cardiac repair in animal models”, *Eur. Hear. J. Suppl.*, t. 10, nr Suppl K, ss. K11–K15, grudz. 2008.
- [120] P. Menasché, „Skeletal Myoblasts for Cardiac Repair: Act II?”, *Journal of the American College of Cardiology*, t. 52, nr 23, ss. 1881–1883, 2008.
- [121] E. N. Marieb i K. Hoehn, *Human Anatomy & Physiology*, t. 7. 2010.
- [122] T. Sente, A. M. Van Berendoncks, A. I. Jonckheere, R. J. Rodenburg, P. Lauwers, V. Van Hoof, A. Wouters, F. Lardon, V. Y. Hoymans, i C. J. Vrints, „Primary skeletal muscle myoblasts from chronic heart failure patients exhibit loss of anti-inflammatory and proliferative activity”, *BMC Cardiovasc. Disord.*, t. 16, nr 1, 2016.
- [123] P. Menasché, O. Alfieri, S. Janssens, W. McKenna, H. Reichenspurner, L. Trinquart, J. T. Vilquin, J. P. Marolleau, B. Seymour, J. Larghero, S. Lake, G. Chatellier, S. Solomon, M. Desnos, i A. A. Hagege, „The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation”, *Circulation*, t. 117, nr 9, ss. 1189–1200, 2008.
- [124] T. Siminiak, R. Kalawski, D. Fiszer, O. Jerzykowska, J. Rzeźniczak, N. Rozwadowska, i M. Kurpisz, „Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: Phase I clinical study with 12 months of follow-up”, *Am. Heart J.*, t. 148, nr 3, ss. 531–537, 2004.
- [125] P. Menasché, A. A. Hagege, M. Scorsin, B. Pouzet, M. Desnos, D. Duboc, K. Schwartz, J. T. Vilquin, i J. P. Marolleau, „Myoblast transplantation for heart failure”, *Lancet*, t. 357, nr 9252, ss. 279–280, 2001.
- [126] A. A. Hagege, J. P. Marolleau, J. T. Vilquin, A. Alhérière, S. Peyrard, D. Duboc, E. Abergel, E. Messas, E. Mousseaux, K. Schwartz, M. Desnos, i P. Menasché, „Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: Long-term follow-up of the first phase I cohort of patients”, *Circulation*, t. 114, nr SUPPL. 1, 2006.
- [127] T. J. Povsic, C. M. O’Connor, T. Henry, A. Taussig, D. J. Kereiakes, F. D. Fortuin, A. Niederman, R. Schatz, R. Spencer, D. Owens, M. Banks, D. Joseph, R. Roberts, J. H. Alexander, i W. Sherman, „A double-blind, randomized, controlled, multicenter study to assess the safety and cardiovascular effects of skeletal myoblast implantation by catheter delivery in patients with chronic heart failure after myocardial infarction.”, *Am. Heart J.*, t. 162, nr 4, s. 654–662.e1, paź. 2011.
- [128] H. J. Duckers, J. Houtgraaf, C. Hehrlein, J. Schofer, J. Waltenberger, A. Gershlick, J. Bartunek, C. Nienaber, S. Macaya, N. Peters, P. Smits, T. Siminiak, W. van Mieghem, V. Legrand, i P. W. Serruys, „Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial.”, *EuroIntervention*, t. 6, nr 7, ss. 805–812, 2011.
- [129] P. Menasché, A. A. Hagege, J. T. Vilquin, M. Desnos, E. Abergel, B. Pouzet, A. Bel, S. Sarateanu, M. Scorsin, K. Schwartz, P. Bruneval, M. Benbunan, J. P. Marolleau, i D. Duboc, „Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction”, *J. Am. Coll. Cardiol.*, t. 41, nr 7, ss. 1078–1083, 2003.
- [130] A. Gwizdala, N. Rozwadowska, T. J. Kolanowski, A. Malcher, A. Cieplucha, B. Perek, W. Seniuk, E. Straburzynska-Migaj, Z. Oko-Sarnowska, W. Cholewinski, M. Michalak, S. Grajek, i M. Kurpisz, „Safety, feasibility and effectiveness of first in-human administration of muscle-derived stem/progenitor cells modified with connexin-43 gene for treatment of advanced chronic heart failure.”, *Eur. J. Heart Fail.*, t. 19, nr 1, ss. 148–157, sty. 2017.
- [131] P. Carmeliet, L. Moons, A. Lutun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. Dipalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. Vandendriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K. H. Plate, J. M. Foidart, W. Schaper, D. S. Charnock-Jones, D. J. Hicklin, J. M. Herbert, D. Collen, i M. G. Persico, „Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions”, *Nat. Med.*, t. 7, nr 5, ss. 575–583, 2001.
- [132] C. Munaut, S. Lorquet, C. Pequeux, S. Blacher, S. Berndt, F. Frankenne, i J.-M. Foidart, „Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast”, *Hum. Reprod.*, t. 23, nr 6, ss. 1407–1415, kwi. 2008.
- [133] C. Depoix, M. K. Tee, i R. N. Taylor, „Molecular regulation of human placental growth factor (PlGF) gene expression in placental villi and trophoblast cells is mediated via the protein kinase A pathway.”,

- Reprod. Sci.*, t. 18, nr 3, ss. 219–28, 2011.
- [134] C. Tayade, D. Hilchie, H. He, Y. Fang, L. Moons, P. Carmeliet, R. A. Foster, i B. A. Croy, „Genetic Deletion of Placenta Growth Factor in Mice Alters Uterine NK Cells”, *J. Immunol.*, t. 178, nr 7, ss. 4267–4275, 2007.
- [135] D. Maglione, V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, i M. G. Persico, „Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 88, nr 20, ss. 9267–71, 1991.
- [136] S. Hauser i H. A. Weich, „A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta”, *Growth Factors*, t. 9, nr 4, ss. 259–268, 1993.
- [137] Y. Cao, W. R. Ji, P. Qi, i A. Rosin, „Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing.”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 235, nr 3, ss. 493–8, 1997.
- [138] W. Yang, H. Ahn, M. Hinrichs, R. J. Torry, i D. S. Torry, „Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells”, *J. Reprod. Immunol.*, t. 60, nr 1, ss. 53–60, 2003.
- [139] R. L. Kendall i K. A. Thomas, „Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 90, nr 22, ss. 10705–10709, 1993.
- [140] M. Snuderl, A. Batista, N. D. Kirkpatrick, C. R. De Almodovar, L. Riedemann, E. C. Walsh, R. Anolik, Y. Huang, J. D. Martin, W. Kamoun, E. Knevels, T. Schmidt, C. T. Farrar, B. J. Vakoc, N. Mohan, E. Chung, S. Roberge, T. Peterson, C. Bais, B. H. Zhelyazkova, S. Yip, M. Hasselblatt, C. Rossig, E. Niemeyer, N. Ferrara, M. Klagsbrun, D. G. Duda, D. Fukumura, L. Xu, P. Carmeliet, i R. K. Jain, „Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma”, *Cell*, t. 152, nr 5, ss. 1065–1076, 2013.
- [141] M. Autiero, J. Waltenberger, D. Communi, A. Kranz, L. Moons, D. Lambrechts, J. Kroll, S. Plaisance, M. De Mol, F. Bono, S. Kliche, G. Fellbrich, K. Ballmer-Hofer, D. Maglione, U. Mayr-Beyrle, M. Dewerchin, S. Dombrowski, D. Stanimirovic, P. Van Hummelen, C. Dehio, D. J. Hicklin, G. Persico, J. M. Herbert, D. Communi, M. Shibuya, D. Collen, E. M. Conway, i P. Carmeliet, „Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1”, *Nat. Med.*, t. 9, nr 7, ss. 936–943, 2003.
- [142] F. Mac Gabhann, A. S. Popel, F. Mac Gabhann, A. S. Popel, F. Mac Gabhann, i A. S. Popel, „Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells”, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, t. 286, nr 1, ss. H153–H164, 2004.
- [143] H. Roy, S. Bhardwaj, M. Babu, S. Jauhainen, K. H. Herzig, A. R. Bellu, H. J. Haisma, P. Carmeliet, K. Alitalo, i S. Yla-Herttuala, „Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A”, *Hum. Gene Ther.*, t. 16, nr 12, ss. 1422–1428, 2005.
- [144] M. Marcellini, N. De Luca, T. Riccioni, A. Ciucci, A. Orecchia, P. M. Lacal, F. Ruffini, M. Pesce, F. Cianfarani, G. Zambruno, A. Orlandi, i C. M. Failla, „Increased Melanoma Growth and Metastasis Spreading in Mice Overexpressing Placenta Growth Factor”, *Am. J. Pathol.*, t. 169, nr 2, ss. 643–654, 2006.
- [145] A. Lutun, M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J. A. Nagy, A. Hooper, J. Priller, B. De Klerck, V. Compennolle, E. Daci, P. Bohlen, M. Dewerchin, J. M. Herbert, R. Fava, P. Matthys, G. Carmeliet, D. Collen, H. F. Dvorak, D. J. Hicklin, i P. Carmeliet, „Revascularization of ischemic tissues by PLGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1”, *Nat. Med.*, t. 8, nr 8, ss. 831–840, 2002.
- [146] C. Roncal, I. Buyschaert, E. Chorianopoulos, M. Georgiadou, O. Meilhac, M. Demol, J. B. Michel, S. Vinckier, L. Moons, i P. Carmeliet, „Beneficial effects of prolonged systemic administration of PlGF on late outcome of post-ischaemic myocardial performance”, *J. Pathol.*, t. 216, nr 2, ss. 236–244, 2008.
- [147] S. Kolakowski Jr, M. F. Berry, P. Atluri, T. Grand, O. Fisher, M. A. Moise, J. Cohen, V. Hsu, i Y. J. Woo, „Placental growth factor provides a novel local angiogenic therapy for ischemic cardiomyopathy”, *J. Card. Surg.*, t. 21, nr 6, ss. 559–564, 2006.
- [148] L. Luo i Y. Yin, „Cardioprotective activity of placental growth factor combined with oral supplementation of l-arginine in a rat model of acute myocardial infarction”, ss. 3483–3492, 2016.
- [149] M. Gmeiner, D. Zimpfer, J. Holfeld, G. Seebacher, D. Abraham, M. Grimm, i S. Aharinejad, „Improvement of cardiac function in the failing rat heart after transfer of skeletal myoblasts engineered to overexpress placental growth factor”, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, t. 141, nr 5, ss. 1238–1245, 2011.
- [150] R. J. Tomanek, D. D. Lund, i X. Yue, „Hypoxic induction of myocardial vascularization during development”, *Adv. Exp. Med. Biol.*, t. 543, ss. 139–149, 2003.
- [151] N. Ferrara, H. P. Gerber, i J. LeCouter, „The biology of VEGF and its receptors”, *Nature Medicine*, t. 9,

- nr 6. ss. 669–676, 2003.
- [152] D. G. Nowak, E. M. Amin, E. S. Rennel, C. Hoareau-Aveilla, M. Gammons, G. Damodoran, M. Hagiwara, S. J. Harper, J. Woolard, M. R. Lodomery, i D. O. Bates, „Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: A novel therapeutic strategy for angiogenesis”, *J. Biol. Chem.*, t. 285, nr 8, ss. 5532–5540, 2010.
- [153] M. Clauss, „Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration”, *J. Exp. Med.*, t. 172, nr 6, ss. 1535–1545, 1990.
- [154] D. I. Gabrilovich, H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, i D. P. Carbone, „Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.”, *Nat. Med.*, t. 2, nr 10, ss. 1096–103, 1996.
- [155] Z. Taimeh, J. Loughran, E. J. Birks, i R. Bolli, „Vascular endothelial growth factor in heart failure”, *Nature Reviews Cardiology*, t. 10, nr 9. ss. 519–530, 2013.
- [156] M. Shibuya, „Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies”, *Genes and Cancer*, t. 2, nr 12, ss. 1097–1105, 2011.
- [157] G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein, i M. L. Breitman, „Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium”, *Nature*, t. 376, nr 6535. ss. 66–70, 1995.
- [158] F. Shalaby, R. Janet, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman, i A. C. Schuh, „Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice”, *Nature*, t. 376, nr 6535. ss. 62–66, 1995.
- [159] H. P. Gerber, K. J. Hillan, A. M. Ryan, J. Kowalski, G. A. Keller, L. Rangell, B. D. Wright, F. Radtke, M. Aguet, i N. Ferrara, „VEGF is required for growth and survival in neonatal mice.”, *Development*, t. 126, nr 6, ss. 1149–59, 1999.
- [160] J. J. Lopez, R. J. Laham, A. Stamler, J. D. Pearlman, S. Bunting, A. Kaplan, J. P. Carrozza, F. W. Sellke, i M. Simons, „VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs”, *Cardiovasc. Res.*, t. 40, nr 2, ss. 272–281, 1998.
- [161] P. W. Radke, A. Heintz-Green, O. M. Frass, U. Griesenbach, S. Ferrari, D. M. Geddes, i E. W. F. W. Alton, „Effects of intramyocardial pVEGF165 delivery on regional myocardial blood flow: evidence for a spatial ‘delivery-efficacy’ mismatch.”, *Gene Ther.*, t. 11, nr 16, ss. 1249–1255, 2004.
- [162] Y. Oduk, W. Zhu, R. Kannappan, M. Zhao, A. V Borovjagin, S. Oparil, i J. Zhang, „VEGF Nanoparticles Repair Heart after Myocardial Infarction”, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, s. ajpheart.00471., 2017.
- [163] T. D. Henry, B. H. Annex, G. R. McKendall, M. A. Azrin, J. J. Lopez, F. J. Giordano, P. K. Shah, J. T. Willerson, R. L. Benza, D. S. Berman, C. M. Gibson, A. Bajamonde, A. C. Rundle, J. Fine, i E. R. McCluskey, „The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis”, *Circulation*, t. 107, nr 10, ss. 1359–1365, 2003.
- [164] J. Kastrup, E. Jørgensen, A. Rück, K. Tägil, D. Glogar, W. Ruzyllo, H. E. Bøtker, D. Dudek, V. Drvota, B. Hesse, L. Thuesen, P. Blomberg, M. Gyöngyösi, i C. Sylvén, „Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial.”, *J. Am. Coll. Cardiol.*, t. 45, nr 7, ss. 982–8, 2005.
- [165] J.-M. Tang, J.-N. Wang, L. Zhang, F. Zheng, J.-Y. Yang, X. Kong, L.-Y. Guo, L. Chen, Y.-Z. Huang, Y. Wan, i S.-Y. Chen, „VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart.”, *Cardiovasc. Res.*, t. 91, nr 3, ss. 402–11, 2011.
- [166] D. M. Ornitz i N. Itoh, „Fibroblast growth factors.”, *Genome Biol.*, t. 2, nr 3, s. REVIEWS3005, 2001.
- [167] B. Thisse i C. Thisse, „Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development”, *Dev. Biol.*, t. 287, nr 2, ss. 390–402, 2005.
- [168] H. Zhang i A. C. Issekutz, „Down-modulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor: reversal by the anti-angiogenic agent SU6668.”, *Am. J. Pathol.*, t. 160, nr 6, ss. 2219–30, 2002.
- [169] B. Matuszewska, M. Keogan, D. M. Fisher, K. A. Soper, C. M. Hoe, A. C. Huber, i J. V Bondi, „Acidic fibroblast growth factor: evaluation of topical formulations in a diabetic mouse wound healing model”, *Pharm Res*, t. 11, nr 1, ss. 65–71, 1994.
- [170] T. N. Mellin, D. E. Cashen, J. J. Ronan, B. S. Murphy, J. DiSalvo, i K. a Thomas, „Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 104, nr 5. ss. 850–855, 1995.
- [171] L. Xie, M. Zhang, B. Dong, M. Guan, M. Lu, Z. Huang, H. Gao, i X. Li, „Improved refractory wound healing with administration of acidic fibroblast growth factor in diabetic rats”, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, t. 93, nr 3, ss. 396–403, 2011.

- [172] X. Li, C. Wang, J. Xiao, W. L. McKeehan, i F. Wang, „Fibroblast growth factors, Old kids on the new block”, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, t. 53. ss. 155–167, 2016.
- [173] T. Sakurai, M. Tsuchida, P. D. Lampe, i M. Murakami, „Cardiomyocyte FGF signaling is required for Cx43 phosphorylation and cardiac gap junction maintenance”, *Exp. Cell Res.*, t. 319, nr 14, ss. 2152–2165, 2013.
- [174] M. Fujita, M. Ishihara, M. Shimizu, K. Obara, S. Nakamura, Y. Kanatani, Y. Morimoto, B. Takase, T. Matsui, M. Kikuchi, i T. Maehara, „Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel in a rat hindlimb ischemia model”, *Wound Repair Regen.*, t. 15, nr 1, ss. 58–65, 2007.
- [175] G. Suzuki, T. C. Lee, J. A. Fallavollita, i J. M. Canty, „Adenoviral gene transfer of FGF-5 to hibernating myocardium improves function and stimulates myocytes to hypertrophy and reenter the cell cycle”, *Circ. Res.*, t. 96, nr 7, ss. 767–775, 2005.
- [176] Y. Sakakibara, K. Tambara, G. Sakaguchi, F. Lu, M. Yamamoto, K. Nishimura, Y. Tabata, i M. Komeda, „Toward surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast growth factor”, w *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2003, t. 24, nr 1, ss. 105–112.
- [177] C. L. Grines, M. W. Watkins, G. Helmer, W. Penny, J. Brinker, J. D. Marmur, A. West, J. J. Rade, P. Marrott, H. K. Hammond, i R. L. Engler, „Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris”, *Circulation*, t. 105, nr 11, ss. 1291–1297, 2002.
- [178] C. L. Grines, M. W. Watkins, J. J. Mahmarian, A. E. Iskandrian, J. J. Rade, P. Marrott, C. Pratt, i N. Kleiman, „A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ad5FGF-4 Gene Therapy and its Effect on Myocardial Perfusion in Patients with Stable Angina”, *J. Am. Coll. Cardiol.*, t. 42, nr 8, ss. 1339–1347, 2003.
- [179] T. D. Henry, C. L. Grines, M. W. Watkins, N. Dib, G. Barbeau, R. Moreadith, T. Andrasfay, i R. L. Engler, „Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials.”, *J. Am. Coll. Cardiol.*, t. 50, nr 11, ss. 1038–46, wrz. 2007.
- [180] H. Niemi, K. Honkonen, P. Korpisalo, J. Huusko, E. Kansanen, M. Merentie, T. T. Rissanen, H. André, T. Pereira, L. Poellinger, K. Alitalo, i S. Ylä-Herttuala, „HIF-1 α and HIF-2 α induce angiogenesis and improve muscle energy recovery”, *Eur. J. Clin. Invest.*, t. 44, nr 10, ss. 989–999, 2014.
- [181] T. H. Patel, H. Kimura, C. R. Weiss, G. L. Semenza, i L. V. Hofmann, „Constitutively active HIF-1 α improves perfusion and arterial remodeling in an endovascular model of limb ischemia”, *Cardiovasc. Res.*, t. 68, nr 1, ss. 144–154, 2005.
- [182] B. D. Kelly, S. F. Hackett, K. Hirota, Y. Oshima, Z. Cai, S. Berg-Dixon, A. Rowan, Z. Yan, P. A. Campochiaro, i G. L. Semenza, „Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1”, *Circ Res*, t. 93, nr 11, ss. 1074–1081, 2003.
- [183] S. Rey, K. Lee, C. J. Wang, K. Gupta, S. Chen, A. McMillan, N. Bhise, A. Levchenko, i G. L. Semenza, „Synergistic effect of HIF-1 α gene therapy and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cells in a mouse model of limb ischemia.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 106, nr 48, ss. 20399–404, 2009.
- [184] K. G. Shyu, M. T. Wang, B. W. Wang, C. C. Chang, J. G. Leu, P. Kuan, i H. Chang, „Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 α /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat”, *Cardiovasc. Res.*, t. 54, nr 3, ss. 576–583, 2002.
- [185] M. Milkiewicz, C. W. Pugh, i S. Egginton, „Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice.”, *J. Physiol.*, t. 560, nr Pt 1, ss. 21–26, 2004.
- [186] G. L. Wang i G. L. Semenza, „Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction.”, *Blood*, t. 82, nr 12, ss. 3610–3615, 1993.
- [187] J. Li, M. Post, R. Volk, Y. Gao, M. Li, C. Metais, K. Sato, J. Tsai, W. Aird, R. D. Rosenberg, T. G. Hampton, F. Sellke, P. Carmeliet, i M. Simons, „PR39, a peptide regulator of angiogenesis.”, *Nat. Med.*, t. 6, nr 1, ss. 49–55, 2000.
- [188] A. Ginouves, K. Ilc, N. Macias, J. Pouyssegur, i E. Berra, „PHDs overactivation during chronic hypoxia «desensitizes» HIF and protects cells from necrosis”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 105, nr 12, ss. 4745–4750, 2008.
- [189] M. A. S. Cavadas, M. Mesnieres, B. Crifo, M. C. Manresa, A. C. Selfridge, C. C. Scholz, E. P. Cummins, A. Cheong, i C. T. Taylor, „REST mediates resolution of HIF-dependent gene expression in prolonged hypoxia.”, *Sci. Rep.*, t. 5, nr 1, s. 17851, grudz. 2015.
- [190] H. Zhang, H. Chen, W. Wang, Y. Wei, i S. Hu, „Cell survival and redistribution after transplantation into damaged myocardium”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, t. 14, nr 5. ss. 1078–1082, 2010.
- [191] H. Zhang, H. Chen, W. Wang, Y. Wei, i S. Hu, „Cell survival and redistribution after transplantation into damaged myocardium.”, *J. Cell. Mol. Med.*, t. 14, nr 5, ss. 1078–82, maj 2010.

- [192] T. J. Kolanowski, N. Rozwadowska, A. Malcher, E. Szymczyk, J. D. Kasprzak, T. Mietkiewski, i M. Kurpisz, „In vitro and in vivo characteristics of connexin 43-modified human skeletal myoblasts as candidates for prospective stem cell therapy for the failing heart”, *Int. J. Cardiol.*, t. 173, nr 1, ss. 55–64, kwi. 2014.
- [193] B. Wiernicki, N. Rozwadowska, A. Malcher, T. Kolanowski, A. Zimna, A. Rugowska, i M. Kurpisz, „Human myoblast transplantation in mice infarcted heart alters the expression profile of cardiac genes associated with left ventricle remodeling”, *Int. J. Cardiol.*, t. 202, ss. 710–721, sty. 2016.
- [194] A. J. Majmundar, N. Skuli, R. C. Mesquita, M. N. Kim, A. G. Yodh, M. Nguyen-McCarty, i M. C. Simon, „O(2) regulates skeletal muscle progenitor differentiation through phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 32, nr 1, ss. 36–49, sty. 2012.
- [195] W. Liu, Y. Wen, P. Bi, X. Lai, X. S. Liu, X. Liu, i S. Kuang, „Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation.”, *Development*, t. 139, nr 16, ss. 2857–65, sie. 2012.
- [196] J. Sellathurai, J. Nielsen, E. K. Hejbøl, L. H. Jørgensen, J. Dhawan, M. F. B. Nielsen, i H. D. Schröder, „Low Oxygen Tension Enhances Expression of Myogenic Genes When Human Myoblasts Are Activated from G0 Arrest.”, *PLoS One*, t. 11, nr 7, s. e0158860, lip. 2016.
- [197] G. N. Masoud i W. Li, „HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy.”, *Acta Pharm. Sin. B*, t. 5, nr 5, ss. 378–89, wrz. 2015.
- [198] Z. Yun, Q. Lin, i A. J. Giaccia, „Adaptive myogenesis under hypoxia.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 25, nr 8, ss. 3040–55, kwi. 2005.
- [199] X. Yang, S. Yang, C. Wang, i S. Kuang, „The hypoxia-inducible factors HIF1 α and HIF2 α are dispensable for embryonic muscle development but essential for postnatal muscle regeneration.”, *J. Biol. Chem.*, t. 292, nr 14, ss. 5981–5991, kwi. 2017.
- [200] J. Somers, T. Pöyry, i A. E. Willis, „A perspective on mammalian upstream open reading frame function.”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, t. 45, nr 8, ss. 1690–700, sie. 2013.
- [201] A. Di Carlo, R. De Mori, F. Martelli, G. Pompilio, M. C. Capogrossi, i A. Germani, „Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation.”, *J. Biol. Chem.*, t. 279, nr 16, ss. 16332–8, kwi. 2004.
- [202] S. J. Lees, T. E. Childs, i F. W. Booth, „p21(Cip1) expression is increased in ambient oxygen, compared to estimated physiological (5%) levels in rat muscle precursor cell culture.”, *Cell Prolif.*, t. 41, nr 2, ss. 193–207, kwi. 2008.
- [203] A. E. Greijer i E. van der Wall, „The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis.”, *J. Clin. Pathol.*, t. 57, nr 10, ss. 1009–14, paź. 2004.
- [204] N. Traitcheva i H. Berg, „Electroporation and alternating current cause membrane permeation of photodynamic cytotoxins yielding necrosis and apoptosis of cancer cells.”, *Bioelectrochemistry*, t. 79, nr 2, ss. 257–60, paź. 2010.
- [205] Z. Yang, X. Mo, Q. Gong, Q. Pan, X. Yang, W. Cai, C. Li, J.-X. Ma, Y. He, i G. Gao, „Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose.”, *Apoptosis*, t. 13, nr 11, ss. 1331–43, lis. 2008.
- [206] L. Zhang, S. Zhao, L. Yuan, H. Wu, H. Jiang, i G. Luo, „Placenta growth factor contributes to cell apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition in the hyperoxia-induced acute lung injury.”, *Life Sci.*, t. 156, ss. 30–37, lip. 2016.
- [207] M. E. Hubbi i G. L. Semenza, „Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors.”, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, t. 309, nr 12, ss. C775–82, grudz. 2015.
- [208] M. Koning, P. M. N. Werker, M. J. A. van Luyn, i M. C. Harmsen, „Hypoxia Promotes Proliferation of Human Myogenic Satellite Cells: A Potential Benefactor in Tissue Engineering of Skeletal Muscle”, *Tissue Eng. Part A*, t. 17, nr 13–14, ss. 1747–1758, 2011.
- [209] K. E. Hawkins, T. V. Sharp, i T. R. McKay, „The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation.”, *Regen. Med.*, t. 8, nr 6, ss. 771–82, lis. 2013.
- [210] A. Uygun i R. T. Lee, „Mechanisms of Cardiac Regeneration”, *Developmental Cell*, t. 36, nr 4, ss. 362–374, 2016.
- [211] L. Nanni, C. Romualdi, A. Maseri, i G. Lanfranchi, „Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases.”, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, t. 41, nr 6, ss. 934–48, grudz. 2006.
- [212] R. W. Troughton, L. K. Lewis, T. G. Yandle, C. J. Pemberton, i M. G. Nicholls, „B-type natriuretic peptides: looking to the future.”, *Ann. Med.*, t. 43, nr 3, ss. 188–97, maj 2011.
- [213] S. M. Chuva De Sousa Lopes, A. Feijen, J. Korving, O. Korchynskiy, J. Larsson, S. Karlsson, P. Ten Dijke, K. M. Lyons, R. Goldschmeding, P. Doevendans, i C. L. Mummery, „Connective tissue growth factor expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction”, *Dev. Dyn.*, t. 231, nr 3, ss. 542–550, lis. 2004.
- [214] R. J. Torrey, R. J. Tomanek, W. Zheng, S. J. Miller, C. A. Labarrere, i D. S. Torrey, „Hypoxia Increases

- Placenta Growth Factor Expression in Human Myocardium and Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes”, *J. Hear. Lung Transplant.*, t. 28, nr 2, ss. 183–190, luty 2009.
- [215] F. Morfoisse, E. Renaud, F. Hantelys, A.-C. Prats, i B. Garmy-Susini, „Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis.”, *Mol. Cell. Oncol.*, t. 1, nr 1, s. e29907, sty. 2014.
- [216] R. Sun, X. Li, M. Liu, Y. Zeng, S. Chen, i P. Zhang, „Advances in stem cell therapy for cardiovascular disease (Review).”, *Int. J. Mol. Med.*, t. 38, nr 1, ss. 23–9, lip. 2016.
- [217] E. Cambria, F. S. Pasqualini, P. Wolint, J. Günter, J. Steiger, A. Bopp, S. P. Hoerstrup, i M. Y. Emmert, „Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types”, *npj Regen. Med.*, t. 2, nr 1, s. 17, grudz. 2017.
- [218] H. Iwasaki, A. Kawamoto, M. Tjwa, M. Horii, S. Hayashi, A. Oyamada, T. Matsumoto, S. Suehiro, P. Carmeliet, i T. Asahara, „PLGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors”, *PLoS One*, t. 6, nr 9, 2011.
- [219] Z. M. Binsalamah, A. Paul, A. A. Khan, S. Prakash, i D. Shum-Tim, „Intramyocardial sustained delivery of placental growth factor using nanoparticles as a vehicle for delivery in the rat infarct model.”, *Int. J. Nanomedicine*, t. 6, ss. 2667–78, paź. 2011.
- [220] Y. Takeda, S. Uemura, H. Iwama, K. Imagawa, T. Nishida, K. Onoue, Y. Takemoto, T. Soeda, S. Okayama, S. Somekawa, K. Ishigami, M. Takaoka, H. Kawata, A. Kubo, M. Horii, T. Nakajima, i Y. Saito, „Treatment with recombinant placental growth factor (PlGF) enhances both angiogenesis and arteriogenesis and improves survival after myocardial infarction.”, *Circ. J.*, t. 73, nr 9, ss. 1674–1682, 2009.

Finansowanie badań:

PRELUDIUM 2012/07/N/NZ3/01687 Narodowe Centrum Nauki
„Ocena wpływu warunków hipoksji na komórki macierzyste mięśni szkieletowych modyfikowane genetycznie czynnikami proangiogennymi VEGF/FGF i PlGF”.

PBS3/A7/27/2015 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju
„Molekularne obrazowanie (z zastosowaniem nanotechnologii) dla monitorowania implantowanych komórek macierzystych i ich funkcji regeneracyjnych”.

STRATEGMED1/233624/5/NCBR/2014 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju
„Niskocząsteczkowe modulatory epigenetyczne jako aktywatory pluripotencji komórek dla potrzeb medycyny regeneracyjnej”.