



INSTYTUT
GENETYKI CZŁOWIEKA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Anna Rugowska

Wpływ ekspresji konekysny 43
w ludzkich komórkach
macierzystych pochodzenia
miogennego na poziom zjawisk
arytmogennych oraz na stopień
przebudowy pozawałowego serca
w modelu szczurzym

M O N O G R A F I A

Poznań, 2019

Copyright © Anna Rugowska
Copyright © Instytut Genetyki Człowieka PAN
Poznań 2019

Recenzent naukowy – Prof. dr hab. Maciej Kurpisz
Projekt okładki – Mirka Korbańska
Zdjęcia i ilustracje pochodzą ze zbiorów autora

ISBN: 978-83-950393-4-8

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

SPIS TREŚCI

SPIS RYCIN.....	7
SPIS TABEL	9
WYKAZ SKRÓTÓW	10
I. WPROWADZENIE	13
1. Anatomia i fizjologia mięśnia sercowego	13
1.2. Przewodzenie sygnału i sprzężenie elektromechaniczne	15
1.3. Przepływ krwi przez serce i krążenie wieńcowe	18
2. Zawał mięśnia sercowego – epidemiologia.....	19
2.1 Czynniki ryzyka zawału mięśnia sercowego.....	20
2.2 Obraz kliniczny martwicy oraz powikłania zawału mięśnia sercowego.....	21
3. Epidemiologia arytmii w niewydolności serca.....	23
3.1 Komorowe zaburzenia rytmu	24
4. Badania nad regeneracją pozawałowego mięśnia sercowego	26
5. Charakterystyka koneksyn.....	30
6. Podstawowe informacje dotyczące analizowanych genów w badaniach <i>in vitro</i>	31
6.1 Geny związane z miogenezą i dojrzewaniem mioblastów	31
6.2 Geny strukturalne aparatu kurczliwego.....	33
7. Podstawowe informacje dotyczące analizowanych genów w badaniach <i>ex vivo</i>	34
7.1 Geny związane z zaburzeniami rytmu serca.....	34
7.2 Geny związane z przebudową serca po zawale	35
II. CEL PRACY.....	37
III. MATERIAŁY I METODY.....	38
1. MATERIAŁY.....	38
1.1 Materiał biologiczny.....	38
1.2 Zwierzęta laboratoryjne.....	38
1.3 Plazmidy	39
1.4 Media hodowlane	40
1.5 Pożywki mikrobiologiczne	41
1.6 Odczynniki	41
1.7 Bufory.....	49

1.8 Sprzęt laboratoryjny	51
2. METODY	53
2.1 Hodowla komórkowa <i>in vitro</i>	53
2.1.1 Trypsynizacja zawiesin pierwotnych mioblastów	53
2.1.2 Rozmrażanie mioblastów	53
2.1.3 Zamrażanie mioblastów	54
2.2 Modyfikacja genetyczna ludzkich mioblastów	54
2.2.1 Transformacja i hodowla bakterii	54
2.2.2 Izolacja DNA z hodowli bakteryjnych	55
2.2.3 Hydroliza enzymami restrykcyjnymi	56
2.2.4 Sekwencjonowanie.....	56
2.2.5 Transfekcja mioblastów	56
2.3 Metodologia z zakresu biologii molekularnej	57
2.3.1 Izolacja RNA	57
2.3.2 Oczyszczanie mRNA i reakcja odwrotnej transkrypcji.....	58
2.3.3 Polimerazowa reakcja łańcuchowa PCR	58
2.3.4 Elektroforeza w żelu agarozowym	59
2.3.5 Przygotowanie krzywych standardowych dla analizowanych genów	60
2.3.5.1 Izolacja DNA z żelu.....	60
2.3.5.2 Przygotowanie serii rozcieńczeń	60
2.4 Metodologia testów <i>in vitro</i>	61
2.4.1 Projektowanie starterów	61
2.4.2 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	61
2.4.3 Immunoblotowanie typu Western oraz immunodetekcja	63
2.4.4 Izolacja frakcji białkowej	63
2.4.5 Określenie stężenia białka	64
2.4.5.1 Przygotowanie krzywej standardowej i próbek badanych.....	64
2.4.5.2 Przeprowadzanie reakcji kolorymetrycznej	64
2.4.5.3 Rozdział białek w żelu poliakryloamidowym.....	64
2.4.5.4 Elektrotransfer	65
2.4.5.5 Immunodetekcja białek.....	66
2.4.5.6 Chemiluminescencja	66
2.5 Metodologia stosowana u zwierząt laboratoryjnych <i>in vivo</i>	67

2.5.1 Model doświadczalny	67
2.5.2 Schemat ideowy doświadczeń na zwierzętach	67
2.5.3 Mikrochirurgiczne indukowanie zawału serca – przygotowanie doświadczalnej grupy zwierząt	68
2.5.4 Analiza echokardiograficzna	69
2.5.5 Przeprowadzanie interwencji komórkowych.....	69
2.5.6 Indukcja komorowych zaburzeń rytmu w sercu.....	70
2.5.7 Barwienia immunohistochemiczne.....	70
2.6 Analiza statystyczna	71
IV. WYNIKI.....	73
1. Przygotowanie zawiesin komórkowych do badań.....	73
1.1 Ocena markerów wyizolowanych pierwotnych zawiesin mioblastów ludzkich.....	73
2. Modyfikacja genetyczna mioblastów za pomocą wprowadzonego genu <i>GJA1</i>	74
2.1 Namnażanie plazmidu pCiNeo-CX43 i cięcie enzymami restrykcyjnymi.....	74
2.2 Elektroporacja mioblastów ludzkich oraz ocena wydajności transfekcji	75
3. Charakterystyka modyfikowanych genetycznie mioblastów ludzkich	76
3.1 Ocena proliferacji transfekowanych mioblastów	76
3.2 Ocena ekspresji miogennych czynników transkrypcyjnych oraz transgenu <i>GJA1</i>	77
3.2.1 Ocena jakości izolowanego RNA	77
3.2.2 Weryfikacja odwrotnej transkrypcji.....	78
3.2.3 Przygotowanie krzywych standardowych	79
3.2.4 Badanie metodą PCR w czasie rzeczywistym poziomu ekspresji genów dla miogennych czynników transkrypcyjnych	81
3.2.5 Badanie metodą PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptu <i>GJA1</i>	82
3.3 Ocena ekspresji białka koneksyny 43.....	83
3.3.1 Metoda immunoblotowania typu Western	83
4. Badania <i>in vivo</i> w modelu zwierzęcym	84
4.1 Indukcja zawałów i interwencje komórkowe	84
4.2 Wyniki analiz echokardiograficznych – WMSI	86
4.3 Wyniki barwień immunohistochemicznych	87
4.4 Wyniki indukcji komorowych zaburzeń w rytmie serca	89
5. Badania <i>ex vivo</i> genów funkcjonalnych odpowiedzialnych za procesy arytmogenne i przebudowę mięśnia sercowego	91

5.1 Pozyskiwanie materiału biologicznego	91
5.2 Ocena ekspresji genów pro-arytmogennych oraz odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę serca po zawale	91
5.2.1 Ocena jakości izolowanego RNA	91
5.2.2 Weryfikacja odwrotnej transkrypcji	93
5.2.3 Przygotowanie krzywych standardowych	94
5.2.4 Amplifikacja sekwencji wybranych badanych genów	94
5.2.4.1 Wyznaczenie krzywych standardowych dla badanych genów techniką PCR w czasie rzeczywistym	96
5.2.5 Badanie metodą PCR w czasie rzeczywistym ekspresji genów pro-arytmogennych i odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę serca po zawale	98
5.2.6 Ocena ekspresji białek pro-arytmogennych oraz odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę serca po zawale	99
6. DYSKUSJA	104
6.1 Istota budowy połączeń szczelinowych warunkowanych koneksyną 43	105
6.2 Modyfikacja genetyczna mioblastów	105
6.2.1 Charakterystyka zmodyfikowanych genetycznie ludzkich mioblastów	106
6.2.1.1 Badanie poziomu ekspresji miogennych czynników transkrypcyjnych	106
6.2.1.2 Badanie poziomu koneksyny 43	107
6.3 Sposoby implantowania komórek	110
6.4 Barwienia immunohistochemiczne	111
6.5 Przebudowa funkcjonalna niewydolnego mięśnia sercowego	114
7. WNIOSKI	121
8. STRESZCZENIE	122
9. ABSTRACT	124
10. LITERTURA	126
11. ZAŁĄCZNIKI	137

SPIS RYCIN

Rycina 1. Budowa serca w przekroju; schemat	14
Rycina 2. Układ bodźcoprzewodzący serca	15
Rycina 3. Procesy zachodzące w czasie skurczu mięśnia sercowego	17
Rycina 4. Krążenie wieńcowe w mięśniu sercowym.	19
Rycina 5. Schemat pozawałowej przebudowy serca	22
Rycina 6. Mechanizmy rozwoju arytmii serc	25
Rycina 7. Aplikacje kliniczne komórek macierzystych / progenitorowych oraz metody ich dostarczenia w leczeniu choroby niedokrwiennej serca	28
Rycina 8. Ilustracja wyjaśniająca hipotezę badaniową.	30
Rycina 9. Rozmieszczenie koneksyn wg. ich typów w sercu człowieka.	31
Rycina 10. Ekspresja genów MRF podczas poszczególnych etapów miogenezy.....	32
Rycina 11. Plazmidy wykorzystywane w procesie transfekcji mioblastów ludzkich.....	40
Rycina 12. Schemat przygotowania krzywej standardowej do reakcji PCR w czasie rzeczywiście.....	61
Rycina 13. Schemat przygotowania krzywej standardowej	64
Rycina 14. Schemat przygotowania elektrotransferu (Bio-Rad).....	65
Rycina 15. Schemat ideowy badań <i>in vivo</i>	68
Rycina 16. Ocena fenotypowa populacji mioblastów ludzkich oraz histogram przedstawiający wynik reakcji z ludzkim przeciwciałem anti-CD56.	73
Rycina 17. Ilustracja przedstawiająca obecność desminy w ludzkich mioblastach wykrytej za pomocą immunofluorescencji.....	74
Rycina 18. Ocena poprawności wprowadzonego insertu poprzez reakcję hydrolityczną enzymem EcoR1	75
Rycina 19. Wydajność elektroporacji pierwotnej zawiesiny mioblastów ludzkich.	76
Rycina 20. Dokumentacja zdjęciowa zawiesin pierwotnych zawiesin mioblastów ludzkich w mikroskopie świetlnym (A) oraz fluorescencyjnym (B) po 48 godzinach od przeprowadzonej transfekcji.	76
Rycina 21. Dokumentacja zdjęciowa przedstawiająca ludzkie mioblasty w zawiesinach pierwotnych w medium standardowym (A) oraz miotub po hodowli <i>in vitro</i> w medium różnicującym (B).	77
Rycina 22. Obraz rozdziału elektroforetycznego próbek RNA po czyszczeniu.	78
Rycina 23. Obraz rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym po reakcji PCR sprawdzającej poprawność procesu odwrotnej transkrypcji	79
Rycina 24. Krzywa standardowa i krzywa topnienia dla genów badanych: A) <i>GJA1</i> , B) <i>GAPDH</i> , C) <i>ACTB</i>	80
Rycina 25. Ekspresja czynników miogennych w warunkach <i>in vitro</i> w reakcji qPCR wobec badanych populacji progenitorowych komórek macierzystych	82
Rycina 26. Względna ekspresja genu <i>GJA1</i> w badanych populacjach ludzkich komórek progenitorowych mięśni szkieletowych znormalizowana względem dwóch genów referencyjnych: <i>ACTB</i> i <i>GAPDH</i>	83

Rycina 27. Potwierdzenie ekspresji CX43 na poziomie białka.....	84
Rycina 28. Zdjecie przedstawiające zabieg indukowania zawału mięśnia sercowego u szczura poprzez podwiązanie odgałęzienia lewej tętnicy wieńcowej.....	85
Rycina 29. Wielkość indukowanego zawału mięśnia sercowego w poszczególnych badanych grupach szczurów.....	86
Rycina 30. Barwienie identyfikujące włóknienie serca wg. Massona.....	87
Rycina 31. Panel A: Wyniki barwienia immunohistochemicznego przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko koneksynie 43 oraz przeciwko SMA.....	88
Rycina 32. Wyniki odczynu barwnego skierowanego przeciw markerowi ludzkiego jądra komórkowego.....	88
Rycina 33. Ocena zjawisk arytmogennych dla grupy szczurów poddanych badaniom.....	90
Rycina 34. Obraz rozdziału elektroforetycznego próbek RNA po oczyszczeniu z genomowego DNA.....	92
Rycina 35. Przykładowy reprezentatywny obraz rozdziału elektroforetycznego amplifikowanego genu <i>Hprt</i> (263 pz)	93
Rycina 36. Rodział elektroforetyczny uzyskanych produktów PCR według zaprojektowanych starterów dla wybranych genów.....	94
Rycina 37. Krzywe standardowe oraz krzywe topnienia genów poddanych badaniu: 1) <i>Kcnq1</i> , 2) <i>Cacna1c</i> , 3) <i>Ncx1</i> , 4) <i>Serca2a</i> , 5) <i>Hmbs</i> , 6) <i>Pabp</i> , 7) <i>Ywhaz</i> , 8) <i>Gata4</i> , 9) <i>Tgfb1</i>	95
Rycina 38. Wykresy przedstawiające długoterminowy wpływ interwencji komórkowych na ekspresję wybranych genów w mięśniu sercowym w 42 dniu po indukcji zawału.....	100

SPIS TABEL

Tabela 1. Czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca.....	20
Tabela 2. Klasyfikacja arytmii serca z uwzględnieniem przyczyn	23
Tabela 3. Klasyfikacja zaburzeń rytmu serca uwzględniająca miejsce oraz mechanizm powstawania zmian.....	25
Tabela 4. Odczynniki do hodowli komórkowej mioblastów <i>in vitro</i>	41
Tabela 5. Odczynniki do hodowli bakteryjnej	42
Tabela 6. Odczynniki do transformacji i hodowli bakteryjnej	42
Tabela 7. Odczynniki do izolacji plazmidu	43
Tabela 8. Odczynniki do reakcji restrykcyjnej EcoR1	43
Tabela 9. Odczynniki do izolacji RNA, DNA i białka.....	43
Tabela 10. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR).....	44
Tabela 11. Odczynniki do syntezy cDNA	44
Tabela 12. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR)	45
Tabela 13. Odczynniki do elektroforezy agarozowej.....	45
Tabela 14. Odczynniki do ekstrakcji produktów PCR w żelu.....	46
Tabela 15. Sekwencje starterów użytych do PCR i PCR w czasie rzeczywistym	46
Tabela 16. Odczynniki do pomiaru stężenia białka metodą Lowry	47
Tabela 17. Odczynniki do elektroforezy pionowej białek.....	47
Tabela 18. Odczynniki użyte do transferu białek	47
Tabela 19. Odczynniki do immunodetekcji białek i chemiluminescencji.....	48
Tabela 20. Spis zastosowanych przeciwciał.....	48
Tabela 21. Spis odczynników oraz drobnego sprzętu do zabiegów mikrochirurgicznych	49
Tabela 22. Drobnny sprzęt laboratoryjny i aparatura	51
Tabela 23. Skład mieszaniny do reakcji hydrolitycznej.....	56
Tabela 24. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji	58
Tabela 25. Skład mieszaniny reakcyjnej	59
Tabela 26. Warunki reakcji łańcuchowej polimerazy	59
Tabela 27. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym	62
Tabela 28. Rozcieńczenie przeciwciał do immunoblotowania typu Western.....	66
Tabela 29. Wyniki oceny ilościowej próbek RNA wykonanej na spektrofotometrze firmy NanoDrop®	78
Tabela 30. Wartości krzywych standardowych dla analizowanych ludzkich genów.....	81
Tabela 31. Stężenia ekstraktów białkowych izolowanych z próbek badanych populacji mioblastów.	84
Tabela 32. Wyniki uzyskane w wyniku oceny wielkości indukowanego zawału mięśnia sercowego	86
Tabela 33. Punktowy zapis arytmii serca.....	89
Tabela 34. Wyniki uzyskane po eksperymentalnej indukcji komorowych zaburzeń rytmu serca.....	90
Tabela 35. Indywidualny wykaz szczurów oraz stężenia wyizolowanego RNA z serca.....	92

WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
ACL	<i>Anterior cruciate ligament</i>	Więzadło krzyżowe przednie
ACTB	<i>Beta actin</i>	Beta aktyna
AF	<i>Atrial fibrillation</i>	Migotanie przedsionków
AMI	<i>Acute myocardial infarction</i>	Ostry zawał mięśnia sercowego
ASCs	<i>Adult stem cells</i>	Komórki macierzyste organizmu dojrzałego
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Trifosforan adenozyiny
AVNRT	<i>Atrioventricular node reentry tachycardia</i>	Nawrotowy częstoskurcz przedsionkowo-komorowy węzłowy
AVRT	<i>Atrioventricular reentry tachycardia</i>	Nawrotowy częstoskurcz przedsionkowo-komorowy
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>	Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
Cacna1c	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C</i>	Gen kodujący podjednostkę alfa 1 C kanału wapniowego bramkowanego napięciem
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>	Cykliczny adenozyino-3',5'-monofosforan
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	Komplementarny DNA
CVDs	<i>Cardiovascular diseases</i>	Choroby naczyniowo-sercowe
DAD	<i>Delayed afterdepolarization</i>	Późne depolaryzacje następcze
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	Zmodyfikowane medium Eagle'a wg. Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetylosulfotlenek
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Kwas deoksyrybonukleinowy
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	Ditiotreitol
EAD	<i>Early afterdepolarization</i>	Wczesne depolaryzacje następcze
ECHO	<i>Echocardiography</i>	Echokardiografia
ESCs	<i>Embryonic stem cells</i>	Embryonalne komórki macierzyste
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	Bydłęca surowica płodowa
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
Gata4	<i>Transcription factor GATA-4</i>	Czynnik transkrypcyjny GATA-4
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	Białko zielonej fluorescencji

GJA1 (CX43)	<i>Gap junction protein alpha 1</i>	Białko połączeń szczelinowych alfa 1 (koneksyna 43)
HBBS	<i>Hank's balanced salt solution</i>	Zbalansowany roztwór soli Hanksa
HCM	<i>Hypertrophic cardiomyopathy</i>	Kardiomiopatia przerostowa
HF	<i>Heart failure</i>	Niewydolność serca
HLH	<i>Helix-loop-helix</i>	Helisa-pętla-helisa
IHDs	<i>Ischemic heart diseases</i>	Choroby niedokrwienne serca
IP₃	<i>Inositol trisphosphate</i>	Trisfosforan inozytolu
IPSc	<i>Induced pluripotent stem cells</i>	Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
IPSc-CM	<i>Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes</i>	Kardiomiocyty pochodzące z ludzkich pluripotencjalnych indukowanych komórek macierzystych
Kcnq1	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1</i>	Kanał potasowy zależny od napięcia, czynnik 1 podrodziny Q
LV	<i>Left ventricle</i>	Lewa komora serca
MI	<i>Myocardial infarction</i>	Zawał mięśnia sercowego
MRF	<i>Myogenic regulatory factors</i>	Miogenne czynniki regulatorowe
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	Informacyjny RNA
MYF4	<i>Myogenic factor 4</i>	Czynnik miogenny 4
MYF5	<i>Myogenic factor 5</i>	Czynnik miogenny 5
MYHC1	<i>Myosin Heavy Chain 1</i>	Łańcuch ciężki miozyny 1
MYOD	<i>Myogenic differentiation 1</i>	Miogeny czynnik różnicujący 1
MYOG	<i>Myogenin</i>	Miogenina
Ncx1	<i>Sodium/Calcium Exchanger 1</i>	Wymiennik sodowo-potasowy 1
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reakcja łańcuchowa polimerazy
Pln	<i>Phospholamban</i>	Fosfolamban
PSCs	<i>Pluripotent stem cells</i>	Pluripotencjalne komórki macierzyste

RV	<i>Right ventriculum</i>	Prawa komora serca
SCD	<i>Sudden cardiac death</i>	Nagła śmierć sercowa
Serca2a	<i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>	sarkoplazmatyczna ATP-aza wapniowa siateczki endoplazmatycznej
SR	<i>Sarcoplasmic reticulum</i>	Siateczka sarkoplazmatyczna
Tgfb1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>	Transformujący czynnik wzrostu beta 1
WMSI	<i>Wall Motion Score Index</i>	Wskaźnik kurczliwości ściany komory

I. WPROWADZENIE

„Serce nie ma zmarszczek, ono ma blizny...”

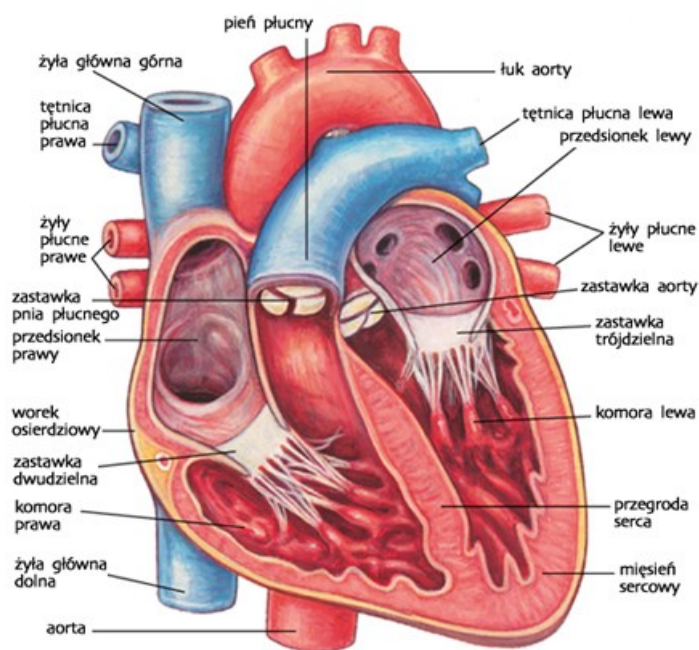
Mięsień sercowy jest najbardziej wydajną pompą w ludzkim organizmie jaką znamy. Przez godzinę przetacza ponad 350 litrów krwi, a w ciągu naszego długiego życia uderza ponad 3,5 miliarda razy. I to bez przerwy i napraw!

1. Anatomia i fizjologia mięśnia sercowego

Mięsień sercowy ze względu na swoją funkcję jest porównywany do pompy ssąco-tłoczącej, która stanowi centralny narząd układu krwiotwórczego. Położony jest w śródpiersiu środkowym, wewnątrz worka osierdziowego zbudowanego z dwóch warstw: wewnętrzną, nazywaną błoną surowiczą, oraz zewnętrzną – błoną włóknistą. Anatomicznie mięsień sercowy dzieli się na dwie połowy: **prawą**, inaczej nazywaną sercem prawym, w którym krąży krew żylna (zawierająca CO₂), oraz **lewą**, w której krąży krew tętnicza (zawierająca O₂). Wnętrze serca dzielone jest na 4 jamy: dwa przedsionki (ang. *Atria*) i dwie komory (ang. *Ventriculum*). Każdy przedsionek łączy się z odpowiednią komorą, natomiast każda komora łączy się z początkiem wielkich tętnic: komora prawa z ujściem pnia płucnego (ang. *Pulmonary trunk*), zaś komora lewa z tętnicą główną - aortą (ang. *Aorta*).¹

Serce podzielone jest przegrodą podłużną, która na poziomie przedsionków nazywana jest przegrodą międzyprzedsionkową, natomiast na poziomie komór-przegrodą międzykomorową. W otworach pomiędzy przedsionkami a komorami znajdują się zastawki przedsionkowo-komorowe. Po prawej stronie znajduje się zastawka trójdzielną, zbudowana z trzech płatków, a po lewej stronie znajduje się zastawka dwudzielną. Do prawego przedsionka uchodzą obie żyły główne: górna i dolna oraz zatoka wieńcowa, odprowadzająca większą część krwi żyłnej ze ścian serca. Natomiast do lewego przedsionka uchodzą cztery żyły płucne. Ściana serca zbudowana jest z trzech warstw: wsierdzia (ang. *Endocardium*), śródsierdzia (ang. *Mycardium*), i nasierdzia (ang. *Epicardium*). Wsierdzie wyściela powierzchnie wewnętrzną

przedsionków i komór, powierzchnię zastawek, strun ścięgniętych i mięśni brodawkowatych. Śródserdzie natomiast stanowi najgrubszą warstwę ściany serca oraz składa się z właściwego mięśnia sercowego, szkieletu serca oraz układu przewodzącego. Budowa serca została przedstawiona na *Rycinie 1*.²



Rycina 1. Budowa serca w przekroju; schemat (zdjęcie z banku grafik M. Żuk/Archiwum Ilustracji WN PWN SA[®] Wydawnictwo Naukowe PWN)

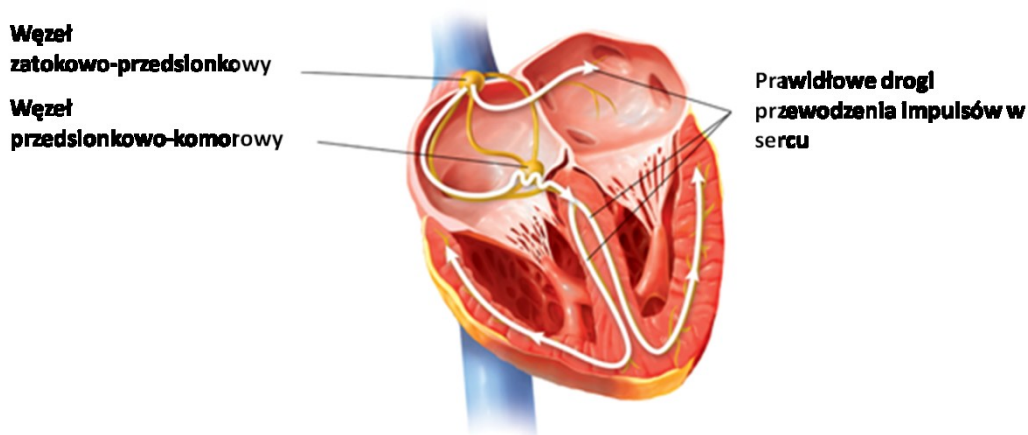
W mięśniu sercowym oprócz kardiomiocytów występują inne duże komórki mięśniowe, które różnią się od miocytów nie tylko pod względem czynnościowym, ale także i morfologicznym, gdyż nie mają one poprzecznego prążkowania, są bogate w glikogen oraz mitochondria. Komórki te tworzą układ przewodzący serca (ang. *Cardiac Conduction System*, CCS), którego zadaniem jest generowanie oraz przewodzenie impulsów elektrycznych wywołujących skurcz serca. Wyjątkową cechą tych zmodyfikowanych komórek mięśniowych jest zdolność do samoistnego, automatycznego pobudzania się na skutek zmian w przepuszczalności ich błony komórkowej dla niektórych kationów, co zapewnia znaczną niezależność i samodzielność pracy serca. Układ przewodzący składa się z trzech elementów:

- węzła zatokowo-przedsionkowego, położonego w pobliżu ujścia żyły głównej do prawego przedsionka,

- węzła przedsionkowo-komorowego, ulokowanego w przegrodzie międzyprzedsionkowej w pobliżu komór,
- pęczka przedsionkowo-komorowego (pęczek Hisa), który tworzą włókna od węzła przedsionkowo-komorowego, biegnące i rozdzielające się początkowo w przegrodzie międzykomorowej, a potem dające odgałęzienia do różnych części komory.³

Pobudzenie najszybciej pojawia się w grupie komórek nazywanych rozrusznikiem serca, ulokowanym w obrębie węzła zatokowo-przedsionkowego. Dlatego też, nazywa się go ośrodkiem nadrzędnym (komórki te narzucają rytm pobudzenia innym częściom układu bódźcotwórczego). Pobudzenie z węzła zatokowo-przedsionkowego dociera bardzo szybko do węzła przedsionkowo-komorowego przechodzącego w pęczek Hisa.

U zdrowego człowieka w spoczynku węzeł zatokowy wytwarza bodźce z częstotliwością 60-70 impulsów/min. Powstałe impulsy w węźle zatokowym poprzez włókna nerwowe są przekazywane do mięśni przedsionków i wywołują ich skurcz. Bodźce trafiają następnie przez węzeł zatokowo-przedsionkowy i pęczek Hisa do włókien Purkiniego, a następnie do komórek serca.⁴ Układ bódźcoprzewodzący serca został przedstawiony na *Rycinie 2*.



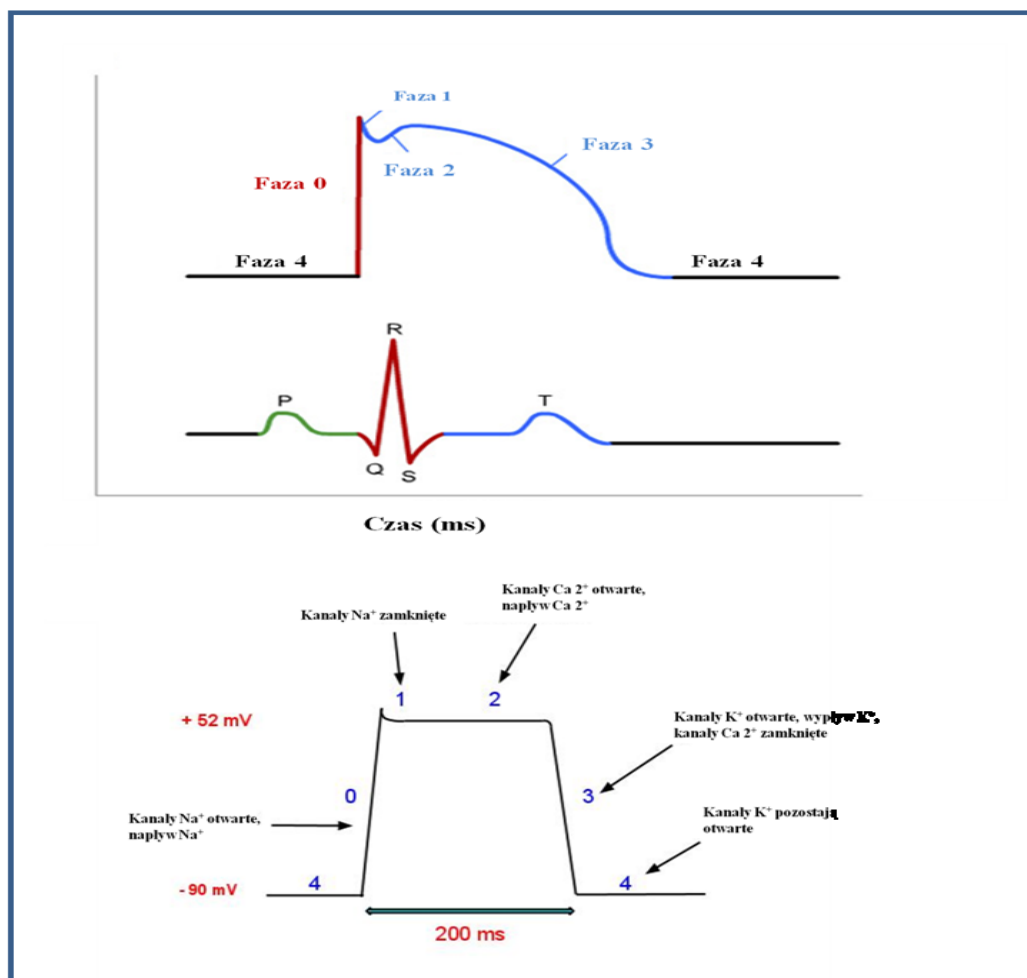
Rycina 2. Układ bódźcoprzewodzący serca.⁵

1.2. Przewodzenie sygnału i sprzężenie elektromechaniczne

W błonie komórkowej niepobudzonych kardiomiocytów otwarta jest tylko jedna grupa kanałów, są to kanały potasowe oznaczane symbolem K₁. W trakcie spoczynku jony potasowe (K⁺) opuszczają komórkę zgodnie z dkomórkowym gradientem błonowym. Ruch

tych jonów trwa do czasu ustalenia się potencjału spoczynkowego, który wynosi -85 mV i jest on utrzymywany do momentu, w którym dotrze do niej impuls z innej pobudzonej komórki układu bodźcoprzewodzącego. W kolejnym etapie otwierają się potencjałozależne kanały sodowe, co powoduje masowy napływ do komórki jonów sodu (Na^+), następstwem tego jest depolaryzacja komórki do wartości około $+30$ mV. Gdy potencjał przekroczy -40 mV, otwierają się potencjałozależne kanały wapniowe typu L, przez które napływają jony Ca^{2+} do komórki. Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia tych jonów generuje skurcz. Ponadto równocześnie z jonami wapniowymi napływają do komórki jony sodowe (Na^+), dzięki czemu depolaryzacja komórki zostaje utrzymana. Następstwem inaktywacji kanałów sodowych i wapniowych oraz otwarcia kanałów potasowych jest repolaryzacja błony komórkowej, w czasie której komórka staje się źródłem impulsu elektrycznego, który przepływa od niej w kierunku komórki jeszcze nie pobudzonej, zgodnie z różnicą potencjałów.⁶

Ogólnie potencjał czynnościowy kardiomiocytów można podzielić na 5 głównych faz (*Rycina 3*). Pierwszym etapem jest **faza 0**, która powoduje otwieranie się zależnych od napięcia kanałów sodowych w błonie komórkowej skutkując wzrostem przepływu jonów sodu do komórki i zmianą potencjału błonowego (z -80 mV do $+30$ mV). W kolejnym etapie (**faza 2**) napływ jonów sodowych do komórki zostaje obniżony poprzez zamykanie się kanałów dla tych jonów, powoduje to nieznaczne obniżenie potencjału czynnościowego. Równocześnie zależne od napięcia kanały dla jonów potasowych zamykają się i otwierają zależne od napięcia kanały wapniowe. Poprzez zwiększające się stężenie jonów wapniowych w komórce następuje depolaryzacja błony komórkowej i hamowanie spadku potencjału błonowego. Kolejna faza zwana *plateau* trwa zaledwie $0,2$ ms. W tym czasie błona komórkowa pozostaje w stanie depolaryzacji (kanały potasowe są zamknięte, a kanały wapniowe typu L – otwarte). W **fazie 3** potencjał czynnościowy ulega obniżeniu, kiedy to zostają otwarte kanały potasowe co pozwala zwiększyć wypływ potasu z komórek. Spadek potencjału czynnościowego powoduje zamknięcie się kanałów wapniowych, zmniejszenie napływu wapnia do komórki, co jest skutkiem repolaryzacji błony komórkowej aż do ustalenia się potencjału czynnościowego. W **fazie 4** potencjał spoczynkowy jest utrzymywany w mięśniu sercowym aż do następnej fali depolaryzacji z komórek rozrusznika serca.⁷



Rycina 3. Procesy zachodzące w czasie skurczu mięśnia sercowego. Pierwszy wykres przedstawia potencjał błonowy oraz odpowiadający mu zapis w postaci krzywej echokardiograficznej. Depolaryzacja przedsionków oznaczona jest załamkiem P, natomiast mięśni komór zespołem QRS, załamek T odpowiada repolaryzacji komór serca. Na wykresie drugim wyszczególnione zostały kanały biorące udział w odpowiedniej fazie potencjału czynnościowego (opracowanie własne).

Skurcz kardiomiocytów jest wyzwalany na drodze sprzężenia elektromechanicznego. W jego przebiegu można wyróżnić następujące etapy:

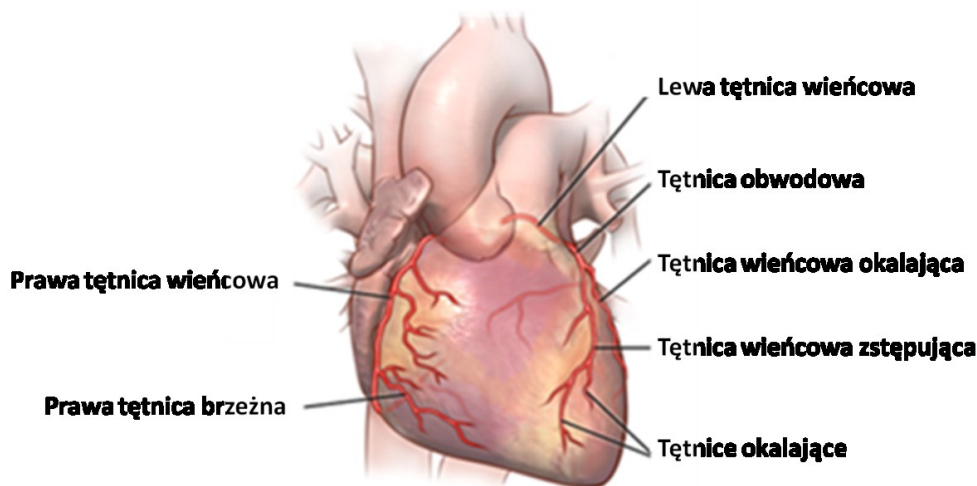
1. Pobudzenie komórek na drodze powstania w nich potencjału czynnościowego (sygnał elektryczny)
2. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (sygnał chemiczny)
3. Generacje skurczu (sygnał mechaniczny)

W niewydolnym mięśniu sercowym dochodzi do zaburzenia każdego z tych trzech etapów, co skutkuje zaburzeniami czynności skurczowej miokardium, a także prowadzi do zaburzeń rytmu serca.^{8,142}

1.3. Przepływ krwi przez serce i krążenie wieńcowe

Układ sercowo-naczyniowy składa się z **krążenia dużego** (układowego), w którym to serce pełni funkcje pompy systemowej, oraz **krążenia małego** (płucnego), w którym pompą jest prawa komora. Przepływ krwi przez serce jest zawsze jednokierunkowy, ściśle określony czasowo oraz podzielony według etapów związanych z rytmem pracy mięśnia. Mały obieg krwi rozpoczyna się w prawej komorze serca. Z niej krew dociera tętnicami płucnymi do płuc, gdzie w pęcherzykach płucnych zachodzi wymiana gazowa. Natlenowana krew przepływa żyłami płucnymi do lewego przedsionka a następnie do lewej komory, gdzie zaczyna się duży obieg krwi. Z tej komory natlenowana krew wypływa aortą, a następnie płynie do poszczególnych narządów poprzez równoległe ułożone w organizmie tętnice narządowe. Poprzez naczynia włosowate dokonuje się wymiana substancji transportowanych przez tlen. Krew wraca żyłami do prawego przedsionka a następnie do prawej komory i cały cykl się powtarza. Opisany proces dla prawej i lewej komory serca zachodzi symultanicznie.⁹

Podstawą prawidłowej funkcji mięśnia sercowego jest nieprzerwana podaż tlenu do kardiomiocytów. Anatomiczna budowa serca uniemożliwia jednak korzystanie z krwi, która przepływa przez przedsionki i komory. Dla tego celu służy sieć naczyń oplatająca cały mięsień sercowy na kształt wieńca głównych tętnic, zwanych tętnicami wieńcowymi. Serce jest zaopatrywane w tlen przez dwie główne tętnice wieńcowe – tętnicę wieńcową prawą i lewą, które odchodzą od aorty, powyżej zastawek półksiężycowatych. Główne tętnice rozdzielają się stopniowo na drobniejsze tętniczki i ostatecznie przechodzą w naczynia włosowate. Z kolei włosniczki łączą się w coraz większe naczynia prowadzące krew w kierunku serca, zwane żyłami. Początkowo drobne żyłki łączą się, tworząc większe, a z kolejnych połączeń powstają ostatecznie żyły główne dochodzące do przedsionków serca.¹⁰ Schemat przedstawiający krążenie wieńcowe w sercu został przedstawiony na *Rycinie 4*.



Rycina 4. Krążenie wieńcowe w mięśniu sercowym (opracowanie własne na podstawie zdjęcia ze strony www.hopkinsmedicine.org).

2. Zawał mięśnia sercowego – epidemiologia

Choroby sercowo-naczyniowe (ang. *Cardiovascular diseases*, CVDs) są zdecydowanie najczęstszym zagrożeniem dla życia w krajach wysokorozwiniętych i stanowią odsetkowo największą przyczynę umieralności.¹¹ Od szeregu lat blisko połowa wszystkich zgonów w naszym kraju spowodowana jest chorobami naczyniowo-sercowymi. Z danych Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego wynika, iż w Polsce z powodu zawału serca umiera codziennie ok. 100 osób, a ogółem, choroby układu sercowo-naczyniowego są w naszym kraju przyczyną prawie 500 zgonów każdego dnia.¹²

Mięsień sercowy działa prawidłowo, gdy jest zdolny tłoczyć na obwód krew bogatą w tlen i substancje odżywcze w ilości niezbędnej do zapewnienia aktualnych potrzeb organizmu. Zaburzenia równowagi pomiędzy zapotrzebowaniem metabolicznym organizmu a dostawą tlenu, powodują różnego rodzaju procesy patologiczne (zaburzenia ogólnoustrojowe), które w dużym stopniu zależą od pracy serca. Nieprawidłowa czynność serca jako pompy doprowadza do wystąpienia zmian patologicznych we wszystkich niemal narządach i układach, dając różne objawy podmiotowe i przedmiotowe.

Zawał mięśnia sercowego (ang. *Myocardial infarction*, MI) to ostra niedokrwienna choroba serca związana zwykle z martwicą pewnego obszaru zaopatrywanego przez daną/dane tętnice wieńcowe.¹³ Spowodowany jest najczęściej poprzez drastyczne zmniejszenie światła naczynia

wieńcowego i ograniczenie przepływu krwi, np. wskutek odkładania się frakcji lipoprotein (ang. *Low-density lipoprotein*, LDL), i innych pochodnych tłuszczowych znajdujących się w wewnętrznej ścianie tętnicy.¹⁴ W wyniku ograniczonego przepływu krwi, serce ulega niedokrwieniu i w ciągu kilku do kilkunastu minut rozpoczyna się jego nieodwracalne uszkodzenie, które ostatecznie prowadzi do powstania wcześniej wspomnianej martwicy segmentu/segmentów mięśnia sercowego. Najczęstszą konsekwencją tego procesu jest powstanie blizny pozawałowej, jako prymitywnego procesu naprawczego, która nie wykazuje funkcji skurczowych. Wpływa to na pogorszenie hemodynamiki i procesów elektrofizjologicznych serca.¹⁵⁻¹⁶ Dlatego też, tak ważna jest regeneracja pozawałowego mięśnia sercowego w celu poprawy jego prawidłowego funkcjonowania, a co za tym idzie, poprawy jakości życia osób po przebytych zawałach.

2.1 Czynniki ryzyka zawału mięśnia sercowego

W wyniku wielu badań udało się zidentyfikować główne czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca, które można podzielić na trzy kategorie czynników: przyczynowe, warunkowe i usposabiające. Podział na te kategorie jest zależny od roli danego czynnika w patogenezie choroby.

Tabela 1. Czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca

Główne czynniki przyczynowe	Główne czynniki warunkowe	Główne czynniki usposabiające
palenie papierosów	podwyższone stężenie trójglicerydów	otyłość
nadciśnienie tętnicze	małe, gęste cząsteczki LDL	brak aktywności fizycznej
podwyższone stężenie cholesterolu całkowitego oraz podwyższone stężenie LDL	nieprawidłowe stężenie lipoproteiny	przedwczesna choroba niedokrwienia serca w wywiadzie rodzinnym
cukrzyca	nieprawidłowe stężenie homocysteiny	czynniki socjoekonomiczne, etniczne i behawioralne
niskie stężenie cholesterolu	nieprawidłowe stężenia	płeć męska oraz

frakcji HDL	czynników krzepnięcia	insulinooporność
-------------	-----------------------	------------------

Poza wymienionymi w powyższej Tabeli 1. grupami czynników, *American Heart Association* wyodrębniło również wiek oraz niespecyficzne zmiany odcinka ST w zapisie EKG spoczynkowym, jako wskaźnik postępu miażdżycy tętnic wieńcowych.¹⁷

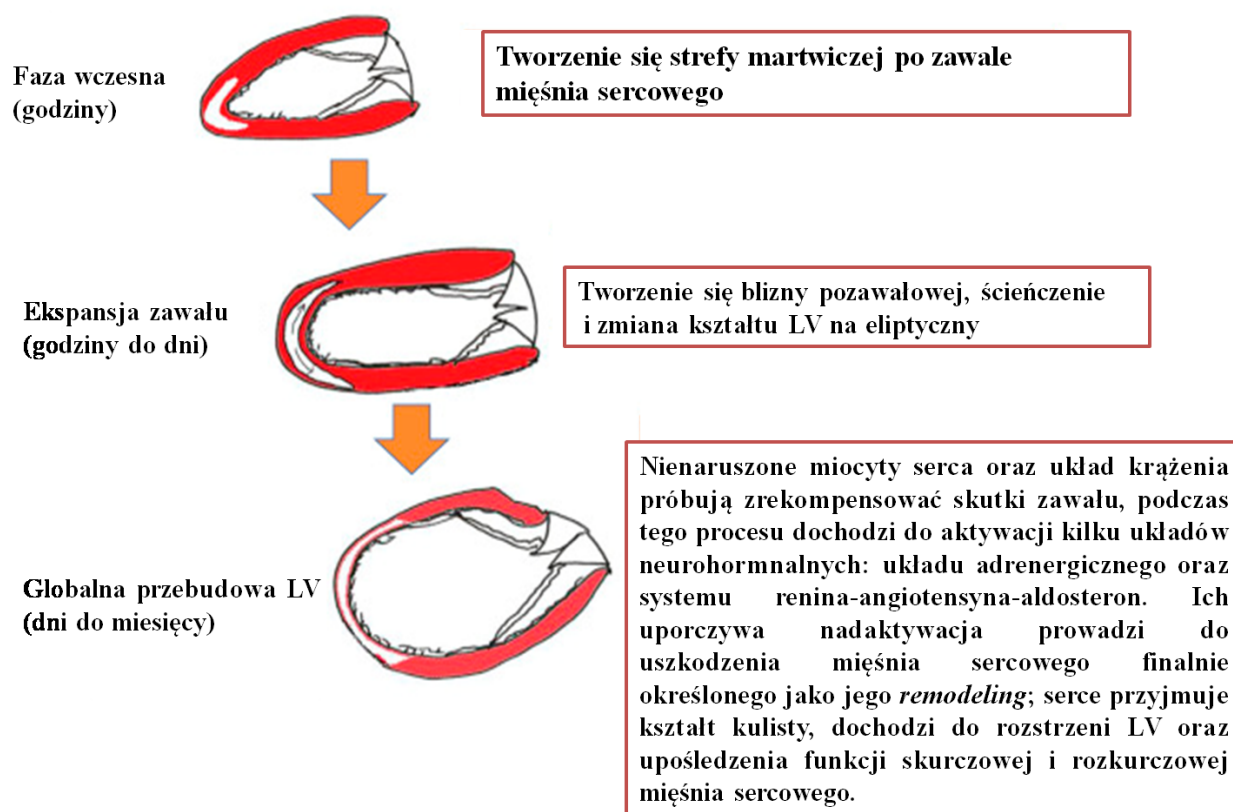
2.2 Obraz kliniczny martwicy oraz powikłania zawału mięśnia sercowego

Niekorzystna przebudowa komórek po zawale mięśnia sercowego (ang. *Remodeling*) jest procesem regionalnych i globalnych zmian zarówno strukturalnych jak i funkcjonalnych w sercu, w wyniku utraty żywotnego miokardium, reakcji zapalnej, zwiększonego stresu ściennego w strefie granicznej i odległej oraz aktywacji neurohormonalnej. Określenie "niekorzystny" odnosi się zarówno do szkodliwych zmian z punktu widzenia hemodynamicznego, jak i do negatywnych prognostycznych implikacji tego procesu.¹⁸⁻²⁰ Przebudowa serca po zawale jest procesem, w którym wielkość, kształt oraz funkcje komórek są regulowane za pomocą czynników mechanicznych, neurohormonalnych i genetycznych. Przebudowa serca może mieć charakter **fizjologiczny** i **adaptacyjny** w normalnym rozwoju; lub **patologiczny** z powodu zawału mięśnia sercowego, kardiomiopatii, nadciśnienia lub choroby zastawek serca.²¹⁻²³

Nagłe zmiany w mięśniu sercowym powodują gwałtowny wzrost obciążenia, które indukują unikalną przebudowę obejmującą najpierw strefę martwego obszaru zawału oraz przylegające zdrowe miocyty. Martwica komórek serca i wynikający z tego wzrost obciążenia wywołują kaskadę procesów wewnątrzkomórkowej sygnalizacji, która inicjuje i następnie moduluje preparatywne zmiany obejmujące poszerzenie i przerost miokardium oraz utworzenie blizny pozawałowej.²⁴⁻²⁶ Przebudowa komórek może być kontynuowana przez tygodnie lub miesiące i zazwyczaj trwa dopóki siły rozciągające mięsień sercowy nie zostaną zrównoważone poprzez np. zwiększenie drożności tętnicy wieńcowej związanej z zawałem i/lub naczyń okalających jak i lokalne czynniki troficzne.

Zawał mięśnia sercowego powoduje wczesną migrację makrofagów, monocytów i neutrofilów do strefy zawału; to zaś inicjuje wewnątrzkomórkową sygnalizację i aktywację neurohormonalną, która uruchamia reakcję zapalną. Zmiany w hemodynamice krążenia determinowane są przede wszystkim przez liczbę miocytów, które uległy apoptozie, stymulację synaptycznego układu nerwowego i układu renina-angiotensyna-aldosteron oraz

uwalnianie peptydów natriuretycznych.^{27,28} Przebudowę serca można podzielić na **fazę wczesną**, która ma miejsce w ciągu 72 godzin od zawału mięśnia sercowego oraz **fazę późną** (ponad 72 godziny). Wczesna faza polega na ekspansji strefy zawału, co może skutkować wczesnym pęknięciem komory lub powstaniem tętniaka. Późna faza niekorzystnej przebudowy lewej komory serca dotyczy zmian w całej lewej komorze serca i wiąże się z zależnym od czasu poszerzeniem, zniekształceniem kształtu komór i ich przerostem. Brak normalizacji występujących zjawisk skutkuje postępującą rozstrzenią, tworzeniem blizny łącznotkankowej w strefie pozawałowej oraz pogorszenie kurczliwości mięśnia sercowego.²⁷ Graficznie schemat przebudowy pozawałowej serca został przedstawiony na *Rycinie 5*. Głównym celem leczenia serca po zawale jest odwrócenie lub ograniczenie niekorzystnej jego przebudowy.



Rycina 5. Schemat pozawałowej przebudowy serca. Przekrój przez lewą komorę serca w osi długiej, zawał zaznaczony kolorem białym (opracowanie własne na podstawie ²⁹).

3. Epidemiologia arytmii w niewydolności serca

Zaburzenia rytmu wiążą się ze znacznym ryzykiem zgonu u pacjentów z niewydolnością serca (ang. *Heart failure*, HF), co stanowi poważne obciążenie dla stanu zdrowotności ludzi na całym świecie. Przewlekła niewydolność serca jest niezmiernie poważnym problemem klinicznym, ekonomicznym jak i społecznym, gdyż zapadalność na tego typu chorobę dotyczy 1-2 % dorosłej populacji krajów wysoko rozwiniętych i wzrasta wraz z wiekiem. U osób powyżej 70 roku życia przekracza nawet 10 % !. Niepokojącym faktem jest wzrost częstości występowania HF, co jest kojarzone ze starzeniem się społeczeństwa i wzrostem liczby osób, u których obserwuje się występowanie czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.³⁰

Zaburzenia normalnego rytmu pracy serca inaczej nazywane arytmia, pochodzą z zaburzeń w rytmie lub częstotliwości powstawania bodźców, lub też z zaburzeń ich przewodzenia, czyli tzw. bloków. Arytmie mogą być również powodowane przez nadpobudliwość mięśnia sercowego i jego reagowania na bodźce z tzw. pozazatokowych ośrodków bodźcotwórczych. Dochodzi wtedy najczęściej do zmian częstości lub nieregularności ewolucji skurczowo-rozkurczowych. W Tabeli 2 zestawiono najważniejsze przyczyny arytmii oraz jej podział.³¹

Do najczęstszych zaburzeń elektrofizjologicznych, które towarzyszą niewydolności serca zalicza się: częstoskurcze komorowe (ang. *Ventricular tachycardias*, VTs), migotanie przedsionków (ang. *Atrial fibrillation*, AF) oraz rozmaite zaburzenia czynności węzła zatokowego.³² Powodem tych zaburzeń są zmiany w ekspresji i/lub czynności białek kanałów jonowych i białek biorących udział w obiegu komórkowym jonów Ca^{2+} , co jest w literaturze określane mianem – przebudowa elektryczna serca.⁷ Zagadnienie to zostało omówione w Dyskusji.

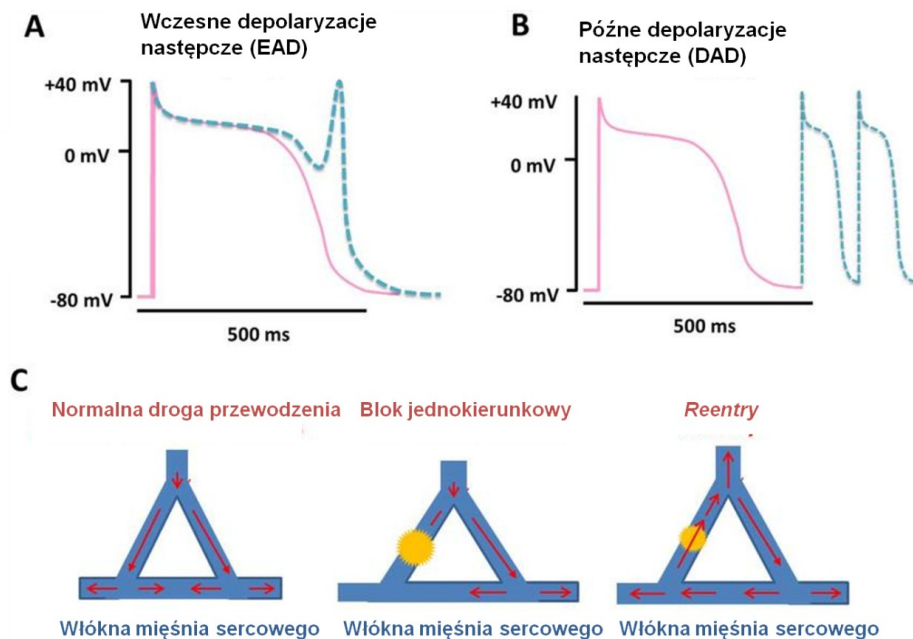
Tabela 2. Klasyfikacja arytmii serca z uwzględnieniem przyczyn

Zaburzenia rytmu serca - klasyfikacja		
Sercowe	Hemodynamiczne	Pozasercowe, ogólnoustrojowe
<ul style="list-style-type: none">choroba niedokrwienna,zawał mięśnia sercowegozapalenie mięśnia sercowego	<ul style="list-style-type: none">wady serca,nadciśnienie tętniczenadciśnienie płucne	<ul style="list-style-type: none">stres psychiczny, silne przeżycia emocjonalnezaburzenia gospodarki kwasowo-zasadowejnadczynność tarczycynadużywanie alkoholu,

<ul style="list-style-type: none"> • kardiomiopatie przerostowe i rozstrzeniowe • choroby układowe obejmujące miokardium 		<p>kawy, tytoniu, in. używek</p> <ul style="list-style-type: none"> • leki: glikozydy naparstnicy, antyarytmiczne, moczopędne, sympatykomimetyczne, • choroby zakaźne
--	--	---

3.1 Komorowe zaburzenia rytmu

Do arytmii w mechanizmie fal nawrotowych dochodzi, gdy w mięśniu sercowym współlistniają zarówno odpowiedni **substrat elektrofizjologiczny**, np. nierówne okresy refrakcji sąsiadujących ze sobą komórek i wolne przewodzenie pobudzenia; jak również **czynnik wyzwalający arytmie** (pobudzenie dodatkowe, które jest następstwem depolaryzacji następczych lub automatyzmu patologicznego).³³ Mechanizm pobudzenia nawrotowego polega na wędrowaniu fali depolaryzacji po pętli, której część objęta jest lokalnym, jednokierunkowym blokiem przewodzenia pobudzenia. W takiej sytuacji obszar mięśnia sercowego, który jest objęty blokiem może być pobudzony wstecznie. Jeśli fala nawrotowa dotrze do strefy objętej blokiem dostatecznie późno, tuż po ustąpieniu refrakcji włókien mięśniowych pobudzonych od góry, to pojawiają się korzystne warunki do jej ponownego pobudzenia, czego konsekwencją będzie zamknięcie pętli, zawiązanie się i utrwalenie arytmii. Istnieją dwie odmiany tzw. *reentry*: makroreentry i mikroreentry. Jeżeli pętla *reentry* obejmuje duże strefy układu przewodzącego, np. prawy i lewy przedsionek, to jest to makroreentry. Jeśli pętla *reentry* obejmuje układ przewodzący w niewielkiej strefie, to jest to mikroreentry.³⁴ Do zaburzeń rytmu powstających w mechanizmie *reentry* zalicza się: migotanie przedsionków, nawrotowy częstoskurcz węzłowy (ang. *Atrioventricular nodal reentry tachycardia*, AVNRT) i nawrotowy częstoskurcz przedsionkowo-komorowy (ang. *Atrioventricular reentrant tachycardia*, AVRT).³⁵ Najczęstszymi przyczynami występowania zjawiska *reentry* są niedokrwienie mięśnia sercowego, hiperglikemia czy niektóre leki antyarytmiczne.



Rycina 6. Mechanizmy rozwoju arytmii serca. A) potencjał czynnościowy wywołany wczesną depolaryzacją (ang. *Early afterdepolarization*, EAD), B) późne depolaryzacje następce (ang. *Delayed afterdepolarization*, DAD) C) Przykład rozwoju arytmii. Lewy panel pokazuje schemat normalnego przewodzenia we włóknie mięśnia sercowego. Środkowy panel pokazuje, zaburzenia w przewodzeniu na skutek jednokierunkowego bloku. Panel po prawej stronie ilustruje sytuację, w której prędkość przewodzenia jest wolniejsza niż okres refrakcji tkanki, co może być dodatkowym substratem dla występowania zjawiska *reentry*.³⁶

Komorowe pobudzenia dodatkowe powstają w wyniku DAD, oraz EAD, które występują odpowiednio po zakończeniu potencjału czynnościowego, oraz mogą się również pojawić w fazie *plateau* lub repolaryzacji potencjału czynnościowego.^{36,37} Jednak dodatkowym źródłem pobudzeń typu wtórnego może być patologia samych kardiomiocytów lub komórek Purkiniego.

Tabela 3. Klasyfikacja zaburzeń rytmu serca uwzględniająca miejsce oraz mechanizm powstawania zmian³¹

Arytmia	Mechanizm	Lokalizacja	Częstość
Nadkomorowa:			
Pojedyncza ekstrasystolia nadkomorowa (przedsionkowa i węzłowa)	<i>reentry</i> , zaburzenia automatyzmu, automatyzm wywołany	przedsionki, węzeł AV	---
Tachykardia zatokowa	<i>reentry</i>	węzeł zatokowy	>100/min
Trzepotanie przedsionków	<i>reentry</i>	prawy przedsionek	240-320/min

Migotanie przedsionków	<i>reentry</i>	przedsionki	320-450/min
Częstoskurcz przedsionkowy -jednoogniskowy -wielogniskowy	<i>reentry</i> , zaburzenia automatyzmu, automatyzm wyzwalany	przedsionki	150-240/min
Napadowy nawrotowy częstoskurcz węzłowy	<i>reentry</i>	węzeł AV	120-250/min
Częstoskurcze w zespołach preekscytacji (ortodromowy i antydromowy)	<i>reentry</i>	pętla <i>reentry</i> , obejmuje drogę dodatkową, przedsionki, węzeł AV, pęczek Hisa, komory	140-250/min
Komorowa:			
Pojedyncza ekstrasystolia komorowa	zaburzenia automatyzmu, automatyzm wyzwalany, <i>reentry</i>	komory	---
Przyspieszony rytm zatokowy	zaburzenia automatyzmu	komórki Purkinjego	60-120/min
Jednokształtny częstoskurcz komorowy	<i>reentry</i>	komory	120-300/min
Częstoskurcz z drogi odpływu prawej komory (ROV)	automatyzm wyzwalany lub <i>reentry</i>	droga odpływu prawej komory	120-220/min
<i>Torsade de pointes</i>	<i>reentry</i> , automatyzm wyzwalany	komory	>170/min

Skrót: AV - węzeł przedsionkowo-komorowy (ang. *Atrioventricular node*).

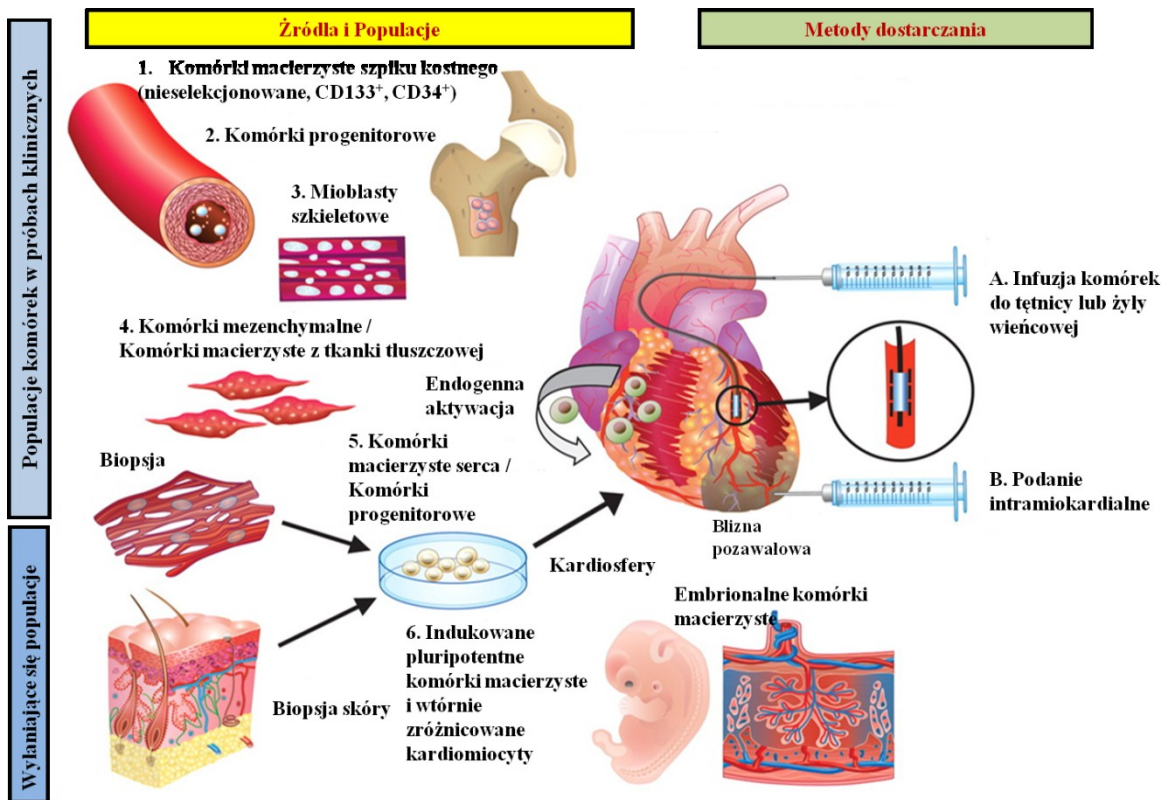
4. Badania nad regeneracją pozawałowego mięśnia sercowego

Zawał mięśnia sercowego jest głównym powodem zgonu w społeczeństwach wysoko rozwiniętych, a odsetek osób cierpiących na zawał rośnie każdego roku, co jest związane z wiekiem ludności i niewłaściwym stylem życia (złe nawyki żywieniowe, stres itp.).⁴¹⁻⁴³ Poprzez zmniejszony przepływ krwi w tętnicach wieńcowych dochodzi do utraty liczby kardiomiocytów powodując kaskadę zdarzeń, w tym odczyn zapalny, tworzenie niekurczliwych blizn włóknistych (co prowadzi do zmniejszenia funkcji skurczowej lewej komory serca oraz do jego niekorzystnej przebudowy), zmiany w obciążeniu mięśnia sercowego, a jeśli uszkodzony obszar jest wystarczająco duży, może to powodować zastoinową niewydolność serca.³⁸⁻⁴⁰ Pozostałe kardiomiocyty mogą usiłować

zrekompensować utratę funkcji serca poprzez naprawę tkanki mięśniowej, jednak przywrócenie pełnej sprawności mięśnia sercowego jest niemożliwe ze względu na niską zdolność do samoregeneracji dojrzałego serca człowieka. Aktualne podejścia kliniczne, w tym interwencje farmakologiczne, mechaniczne i fizyczne, czy rehabilitacyjne poprawiają jakość życia pacjentów po zawale, jednak są one niewystarczające, aby zrekompensować nieodwracalną utratę części mięśnia sercowego i mają raczej charakter paliatywny, jedynie opóźniając postęp niewydolności serca. Wspomniane fakty mobilizują badaczy na całym świecie do opracowania nowej, skutecznej metody leczenia skutków zawału mięśnia sercowego z wykorzystaniem technik medycyny regeneracyjnej, która wykorzystuje m.in. komórki macierzyste jako potencjalne źródło odnowy pozawałowego serca.

W okresie ostatnich 20 lat terapia oparta na komórkach macierzystych została uznana za innowacyjną technikę naprawy/regeneracji serca po epizodzie niedokrwiennym. Choć badania przedkliniczne na zwierzętach z wykorzystaniem różnych typów komórek macierzystych wykazały obiecujący postęp, obecnie panuje ogromny sceptycyzm wśród specjalistów, gdyż dużo prób z komórkami macierzystymi, (jako źródło regeneracji mięśnia sercowego), nie przyniosło korzystnych i/lub długotrwałych efektów.⁴¹

W ciągu ostatniej dekady w badaniach przedklinicznych i klinicznych różne typy komórek macierzystych były wykorzystywane do naprawy uszkodzonego mięśnia sercowego. Ogólnie komórki te można podzielić na dwie kategorie: pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *Pluripotent stem cells*, PSCs), do których zaliczają się: embrionalne komórki macierzyste (ang. *Embryonic stem cells*, ESCs), jak również indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *Induced pluripotent stem cells*, iPSc). Inną kategorię stanowią komórki macierzyste pochodzące z organizmu dojrzałego (ang. *Adult stem cells*, ASCs), które przekształcają się w określony rodzaj wyspecjalizowanych komórek.⁴¹⁻⁴³ Graficznie podział ten został przedstawiony na *Rycinie 7*.



Rycina 7. Aplikacje kliniczne komórek macierzystych / progenitorowych oraz metody ich dostarczania w leczeniu choroby niedokrwiennej serca (opracowanie własne na podstawie ⁴⁴.)

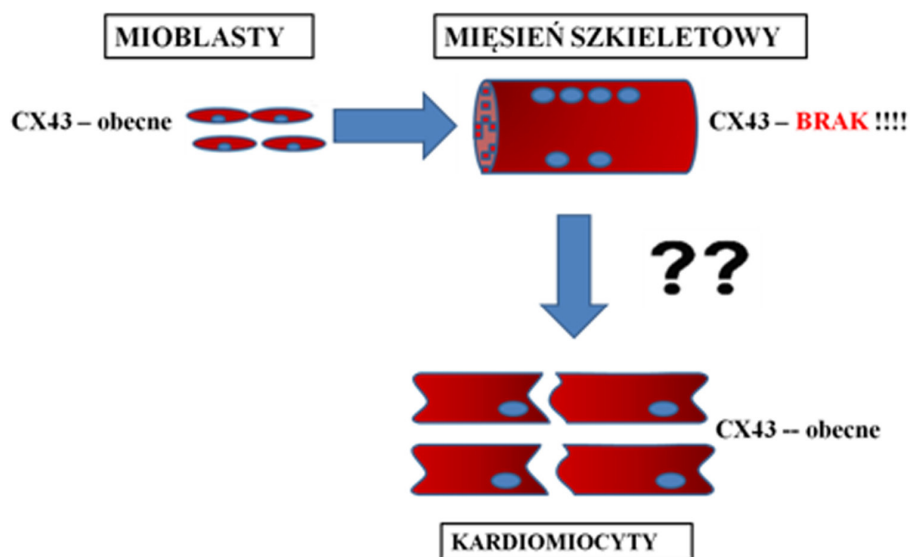
Mioblasty szkieletowe uważa się za dobre źródło do kardiomioplastyki komórkowej gdyż charakteryzują się fenotypowym podobieństwem do mięśnia poprzecznie prążkowanego. Co więcej, posiadają one wiele zalet: m.in. można je w łatwy sposób pozyskać od osób dorosłych, łatwo proliferują w hodowli *in vitro*, jak również przy ich zastosowaniu nie towarzyszą problemy natury etycznej. Jednak najważniejszą cechą tych komórek jest fakt, iż są one bardziej odporne na niedotlenienie w porównaniu z innymi typami komórek macierzystych.⁴⁵⁻⁵³ Spośród wszystkich wykorzystywanych komórek macierzystych w terapii pro-regeneracyjnej pozawałowego mięśnia sercowego, to właśnie komórki progenitorowe pochodzące z mięśni szkieletowych badano na dużą skalę, zarówno eksperymentalnie, przedklinicznie jak i klinicznie.⁵⁴⁻⁵⁷ Komórki macierzyste rezerwuaru mięśni szkieletowych były pierwszym typem komórek, które zostały wykorzystane w próbie klinicznej nad regeneracją pozawałowego mięśnia sercowego w 1937 roku przez Lavine i Upcott. Dzięki zastosowanej terapii pacjent, który nie mógł przejść nawet pięciu metrów bez odpoczynku, po operacji był w stanie pokonać 140 metrów bez większego wysiłku!⁵⁸ W innej pracy Menasché i wsp. w 2001 r. przeszczepili do blizny pozawałowej autologiczne mioblasty szkieletowe przy okazji operacji pomostowania aortalno-wieńcowego. Po 5 miesiącach

zaobserwowali oni potencjał kurczliwy oraz miejscową żywotność komórek wszczepionych, co było potwierdzone zarówno echokardiograficznie jak i przy użyciu tomografii emisyjnej.⁵⁹

W terapii regeneracyjnej pozawałowego mięśnia sercowego przeprowadzono również próby z wykorzystaniem embrionalnych pluripotentnych komórek macierzystych. Komórki te ze względu na swój plastyczny charakter cechują się największym potencjałem regeneracyjnym, gdyż zdolne są do różnicowania w dowolny rodzaj komórek czy tkanek organizmu.⁶⁰⁻⁶² Jednak, ze względu na problemy natury etycznej i inne ograniczenia, tj. ryzyko formowania potworniaków czy immunogenność ze strony komórek pochodzenia allogenicznego; nie mają obecnie szerokiego zastosowania klinicznego. Niedawno przeprowadzono kilka prób klinicznych z użyciem ESC/iPSC-CM wtórnie zróżnicowanych do kardiomiocytów otrzymując pozytywne wyniki.⁶³⁻⁶⁵

Wydawać by się mogło, że mioblasty stanowią najbezpieczniejsze źródło regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego. Jednak istnieją pewne ograniczenia spowodowane brakiem ekspresji białka koneksyny 43 w miotubach pochodzenia szkieletowego, co zostało przedstawione na *Rycinie 8*.

Komórki macierzyste mięśni szkieletowych charakteryzują się obecnością białka CX43. Jednak w momencie ich implantacji w okolicę blizny pozawałowej przekształcają się w dojrzałe komórki mięśni szkieletowych (miotuby), w których brak jest ekspresji tego białka. Powoduje to niebezpieczne implikacje po wszczepieniu natywnych mioblastów do miokardium na skutek braku możliwości wytworzenia się funkcjonalnych połączeń z kardiomiocytami organu biorczego. A to może skutkować wystąpieniem groźnych dla życia arytmii. Oczekuje się zatem, że przeprowadzona modyfikacja genetyczna mioblastów, która ma na celu uzyskanie nadekspresji CX43 w ludzkich komórkach macierzystych mięśni szkieletowych może doprowadzić do wytworzenia funkcjonalnego syncytium z kardiomiocytami narządu biorczego tym samym zmniejszając lub eliminując niebezpieczeństwo dodatkowych pobudzeń serca typu wtórnego w sercu pozawałowym.



Rycina 8. Ilustracja wyjaśniająca hipotezę badaniową. Opis w tekście powyżej.

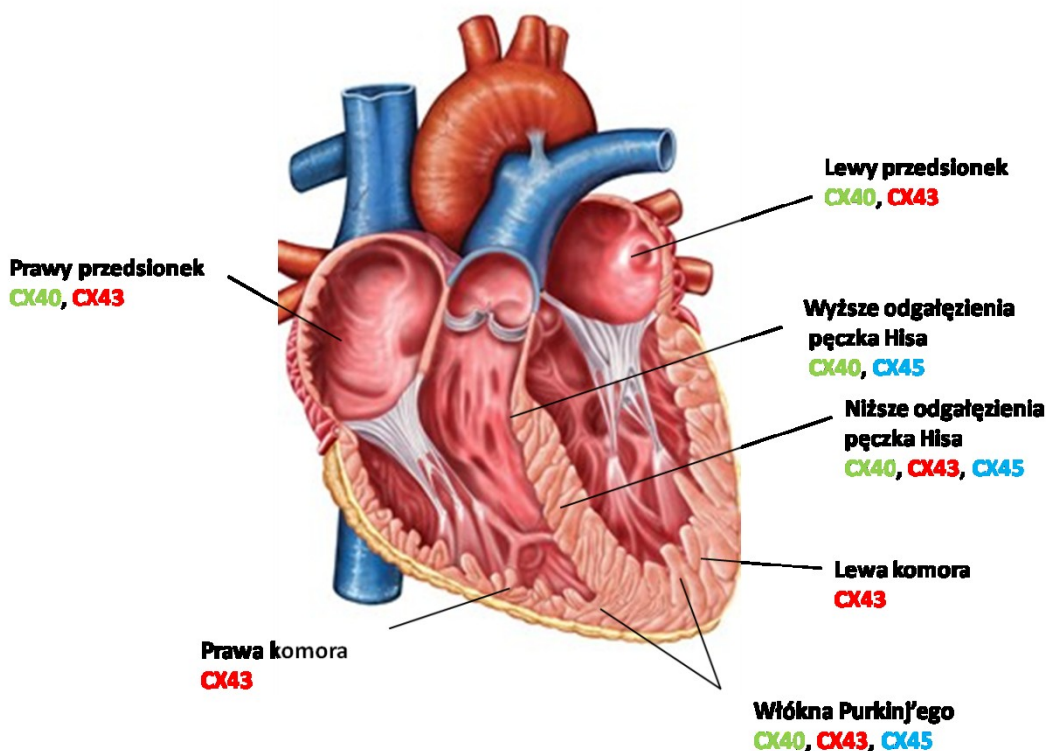
5. Charakterystyka koneksyn

Koneksyna 43 to białko transbłonowe o masie 43,0 kDa złożone z 382 aminokwasów, które kodowane jest przez gen *GJA1* zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 6 w pozycji q22.31, posiada on 2 egzony. Białko przechodzi czterokrotnie przez dwuwarstwą fosfolipidową, a końce C i N znajdują się od strony cytoplazmy.⁶⁶ Ogon C-końcowy składa się z 50 aminokwasów i obejmuje miejsca modyfikacji potranslacyjnych, a także miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych, elementów szkieletu cytoplazmatycznego i innych białek.^{66,67} Domeny transbłonowe tworzą kanał złącza szczelinowego, podczas gdy pętle pozakomórkowe ułatwiają prawidłowe dokowanie kanału. Ponadto, dwie zewnątrzkomórkowe pętle tworzą wiązania dwusiarczkowe, które oddziałują z dwoma heksamerami, tworząc pełny kanał połączenia szczelinowego.⁶⁶ Białko koneksyna 43 odgrywa kluczową rolę w embriogenezie oraz w synchronicznym skurczu mięśnia sercowego poprzez tworzenie połączeń typu szczelinowego (ang. *Gap junctions*, GJs).^{68,69}

Kanały szczelinowe stanowią wewnątrzkomórkowe struktury zapewniające połączenia oraz komunikację międzykomórkową w układzie sercowo-naczyniowym dla utrzymania normalnego rytmu serca, regulacji napięcia naczyniowego i funkcji śródbłonna, jak również wymiany metabolicznej pomiędzy komórkami. Pozwala to na przechodzenie jonów i małych cząsteczek, tj. ATP, glutationu, cAMP, IP₃, glukozy i innych.⁷⁰ W sercu połączenia typu szczelinowego pośredniczą w sprzężeniu elektromechanicznym pomiędzy kardiomiocytami,

tworząc ścieżki dla prawidłowego rozprzestrzeniania się fali wzbudzenia elektrycznego odpowiedzialnego za synchroniczny skurcz.⁷¹

W mięśniu sercowym organizmu dorosłego istnieją trzy główne izoformy koneksyny: CX40, CX45 oraz CX43. Koneksyna 40 występuje głównie we włóknach mięśniowych przedsionków, pęczku Hisa i komorowych systemach przewodzenia, podobnie jak koneksyna 45. Natomiast ekspresja CX43 zlokalizowana jest głównie w węzle zatokowo-predsionkowym i węzle przedsionkowo-komorowym oraz w mięśniach obu komór.⁷²



Rycina 9. Rozmieszczenie koneksyn wg. ich typów w sercu człowieka. Zwrócono szczególną uwagę na dominującą zawartość CX43 w strukturach kurczliwych (opracowanie własne na podstawie ⁷³.)

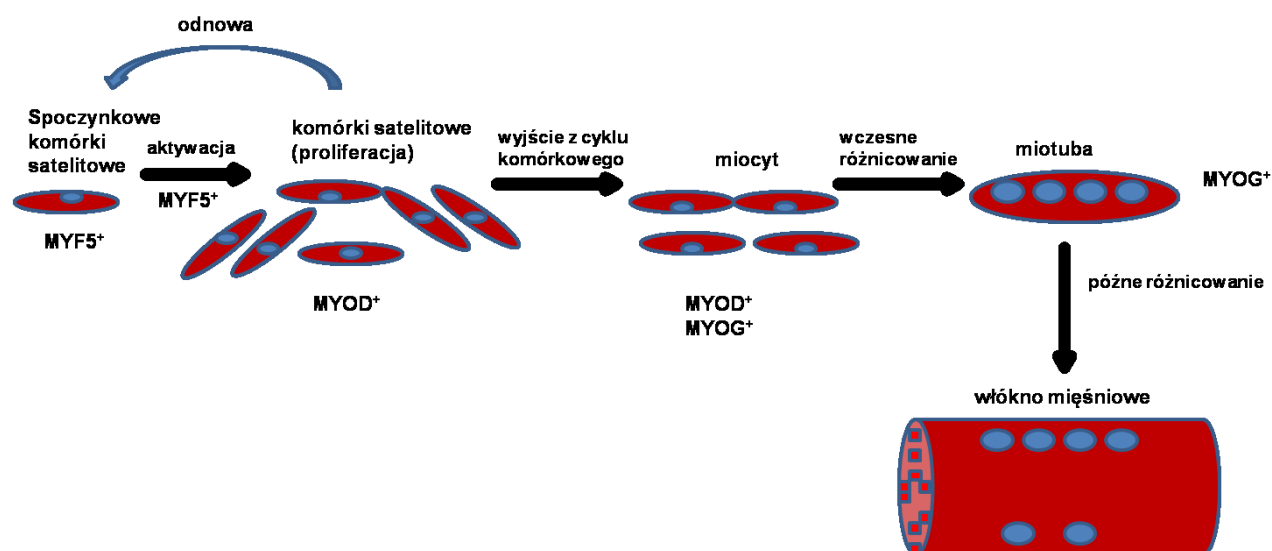
6. Podstawowe informacje dotyczące analizowanych genów w badaniach *in vitro*

6.1 Geny związane z miogenezą i dojrzewaniem mioblastów

Włókna mięśniowe powstają w złożonym procesie, w trakcie którego stopniowej ekspresji ulegają czynniki regulujące miogenezę (ang. *Myogenic regulatory factor*, MRF). W skład tej rodziny wchodzi czynniki: czynnik miogenny 5 (ang. *Myogenic factor 5*, MYF5), miogenny czynnik różnicujący 1 (ang. *Myogenic differentiation*, MYOD) oraz miogenina (ang.

Myogenin, *MYOG*), których cechą charakterystyczną jest występowanie w ich sekwencjach domeny helisa-pętla-helisa (ang. *Helix-loop-helix*, HLH).

Pierwszym etapem związanym z powstawaniem włókien mięśniowych jest aktywacja komórek satelitowych a następnie mioblastów, które zaczynają intensywnie proliferować. Aktywacja ta jest ściśle związana ze wzrostem ekspresji *MYF5* i/lub *MYOD*. Zwiększenie ekspresji miogeniny skutkuje rozpoczęciem końcowej fazy różnicowania komórek progenitorowych mięśni szkieletowych. W końcowym etapie następuje aktywacja białka p21, które zatrzymuje cykl komórkowy i w efekcie prowadzi do zahamowania proliferacji komórek. Zatrzymana proliferacja ma swoje odzwierciedlenie w różnicowaniu miocytów i wytworzeniu włókien mięśniowych.⁷⁴ Graficznie proces ten jest zilustrowany na *Rycinie 10*.



Rycina 10. Ekspresja genów MRF podczas poszczególnych etapów miogenezy (opracowanie własne).

Skróty: **MYF5** – czynnik miogeny 5 (ang. *Myogenic factor 5*), **MYOD** - miogeny czynnik różnicujący 1 (ang. *Myogenic differentiation*), **MYOG** – miogenina (ang. *Myogenin*).

Czynnik miogeny 5 (ang. *Myogenic factor 5*, *MYF5*)

W genomie człowieka gen *MYF5* znajduje się na długim ramieniu chromosomu 12 w pozycji q21. *MYF5* jest genem, który jako pierwszy ulega ekspresji w aktywowanych komórkach satelitowych mięśni szkieletowych, co więcej, możliwe, że także spoczynkowe komórki satelitowe również mogą wykazywać ekspresję *MYF5*.⁷⁵ U myszy z *knock-outem* tego genu zaobserwowano, że aktywacja komórek satelitowych i w efekcie rozwój mięśni w zarodkach ulega znacznemu opóźnieniu – prawdopodobnie aż do momentu pojawienia się ekspresji genu

MYOD.⁷⁶ Sugerowało to rolę MYF5 jako prekursora całej kaskady miogenezy, biorącej udział w aktywacji kolejnych czynników regulatorowych.

Miogeny czynnik różnicujący 1 (ang. *Myogenic differentiation, MYOD*)

Kolejnym czynnikiem regulującym miogenezę jest MYOD, który został zidentyfikowany w 1987 roku. Gen *MYOD* znajduje się na chromosomie 11 w pozycji p15.1. Białko tego genu występuje głównie w mioblastach i tkance mięśniowej szkieletowej, brak go natomiast w tkance mięśnia sercowego, mięśniach gładkich i innych tkankach pozamięśniowych.⁷⁷ Transfekcja mioblastów tym czynnikiem powoduje ich zróżnicowanie w komórki mięśniowe.

Miogenina (ang. *Myogenin, MYOG*)

Kolejnym genem, należącym do wyżej wspomnianej rodziny MRF jest miogenina (*MYOG*). Gen kodujący ten czynnik lokalizuje się na chromosomie 1 w pozycji 1q31-41, zawiera on 3 egzony. Miogenina jest markerem procesu różnicowania i bierze udział w drugiej fazie fuzji mioblastów poprzez aktywację transkrypcji większości białek strukturalnych w mięśniu szkieletowym. Wykazano, że myszy z *knock-outem* genu *MYOG* w obu allelach charakteryzują się rozległym niedoborem tkanki mięśniowej i umierają zaraz po urodzeniu, co sugeruje jej ważną rolę w procesie różnicowania mięśni szkieletowych.⁷⁸

6.2 Geny strukturalne aparatu kurczliwego

Łańcuch ciężki miozyny 1 (ang. *Myosin heavy chain 1, MYH1*)

Miozyna jest heksametrycznym białkiem złożonym z pary ciężkich łańcuchów miozyny i dwóch par łańcuchów lekkich. Gen *MYH1* koduje podjednostki łańcucha ciężkiego miozyny mięśni poprzecznie prążkowanych będących podstawowym białkiem strukturalnym aparatu kurczliwego mięśni, który przekształca energię chemiczną w energię mechaniczną poprzez hydrolizę ATP. U ssaków opisano co najmniej 10 izoform łańcucha ciężkiego miozyny, które wykazują różną ekspresję w zależności od lokalizacji i etapu rozwoju.⁷⁹ Gen łańcucha ciężkiego miozyny jest zlokalizowany na chromosomie 17 w pozycji 38p12.

7. Podstawowe informacje dotyczące analizowanych genów w badaniach *ex vivo*

7.1 Geny związane z zaburzeniami rytmu serca

Kanał potasowy zależny od napięcia, czynnik 1 podrodziny Q (ang. *Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q member 1, Kcnq1*)

Gen *Kcnq1* umiejscowiony jest na krótkim ramieniu chromosomu 11 pomiędzy pasmem p15.5-p15.4. Koduje bramkowane napięciem białko kanału potasowego, które jest niezbędne do repolaryzacji potencjału czynnościowego serca poprzez transport dodatnio naładowanych jonów potasowych (K^+) na zewnątrz komórki. Odgrywa ono również kluczową rolę w zdolności komórki do generowania i przesyłania sygnałów elektrycznych.^{80,81}

Mutacje w genie *Kcnq1* wiążą się z dziedzicznym wydłużonym zespołem QT 1 (znanym również jako zespół Romano-Warda), zespołem Jervella i Lange-Nielsena oraz rodzinnym migotaniem przedsionków. Zmiany w ekspresji białek tych kanałów są czynnikami przyczyniającymi się do nieprawidłowej repolaryzacji związanej z niewydolnością serca.^{80,81}

Bramkowany napięciem kanał wapniowy (ang. *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C, Cacna1c*)

Gen *Cacna1c* kodujący podjednostkę alfa-1 kanału wapniowego umiejscowiony jest na chromosomie 12, w ramieniu krótkim, w paśmie 13.33. Białko kanału wapniowego kodowane przez ten gen znane jest również jako CaV1.2. Najobficiej występuje ono w sercu i mózgu, gdzie kontroluje przepływ wapnia do komórek. Zmieniając właściwości elektryczne komórek, kanały wapniowe sygnalizują skurcz mięśni sercowego i pomagają utrzymać prawidłowy rytm serca. Mutacje w egzonie 8 genu *Cacna1c* powodują Zespół Timothy'ego oraz Zespół Brugada.^{80,81}

Wymiennik sodowo-wapniowy 1 (ang. *Sodium/Calcium Exchanger 1, Ncx1*)

Gen *Ncx1* zlokalizowany jest w genomie w pozycji 2p22.1 i składa się z 20 egzonów. Produktem tego genu jest wymiennik sodowo – wapniowy, napędzany gradientem jonowym zależnym od aktywności pompy sodowo-potasowej, zależnej od ATP (Na^+K^+ -ATPazy). Jego rola polega na transporcie jonów wapnia Ca^{2+} na zewnątrz komórki, podczas rozkurczu

kardiomiocytów, do którego zużywa się energię zmagazynowaną w wyniku przeniesienia trzech jonów sodowych do przetransportowania jednego jonu wapnia na zewnątrz komórki. Ncx1 jest wymiennikiem o bardzo niskim przewodnictwie i dużej sprawności transportowej w odniesieniu do jonów wapnia. Największe znaczenie ma ten kanał na początku sygnału wapniowego, kiedy stężenie Ca^{2+} jest najwyższe. Aktywność Ncx1 regulowana jest przez kilka przekaźników cytoplazmatycznych, tj. jony Ca^{2+} i Na^{+} , protony, tlenek węgla (II), fosfatydyloinozitol, fosfoargininę, fosfokreatynę oraz ATP.⁸²

7.2 Geny związane z przebudową serca po zawale

Sarkoplazmatyczna ATP-aza wapniowa siateczki śródplazmatycznej (ang. *Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, Serca2a*)

Wewnątrzkomórkowa pompa sodowo-potasowa znajduje się m.in. w błonach siateczki sarkoplazmatycznej miocytów. Enzym ten katalizuje hydrolizę ATP sprzężoną z translokacją wapnia z cytozolu do światła siateczki sarkoplazmatycznej i bierze udział w regulacji cyklu skurczu/relaksacji mięśnia sercowego. Regulacja szybkości pracy Serca2a jest kontrolowana przez inne białko regulatorowe – fosfolamban (ang. *Phospholamban, Pln*) w następującej zależności: gdy Pln jest związany z Serca2a, szybkość transportu jonów Ca^{2+} jest zmniejszona, natomiast przy dysocjacji Pln, szybkość ta wzrasta. Pompa ta może być również regulowana przez miRNA, np. przez miR-25, który hamuje jej aktywność np. w trakcie niewydolności mięśnia sercowego.⁸³

Czynnik transkrypcyjny GATA-4 (ang. *Transcription Factor GATA-4, Gata4*)

Gen *Gata4* należy do rodziny sześciu czynników transkrypcyjnych GATA, które w swojej budowie mają domenę wiążącą DNA z dwoma palcami cynkowymi. Największa ekspresja czynników Gata-4,-5,-6 jest obserwowana w sercu, ale także biorą one udział w regulacji genów wątroby, gonad, płuc oraz nabłonka jelit. Gata4 jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym niezbędnym dla prawidłowego rozwoju serca ssaków i ma zasadnicze znaczenie dla przeżycia zarodka. Działa on również w połączeniu z innymi czynnikami transkrypcyjnymi serca, tj. Nkx2-5 i Tbx5. Gen ten znajduje się na chromosomie 8 w paśmie p23.1.

Mutacje genu *Gata4* mogą prowadzić do różnych problemów kardiologicznych, w tym wrodzonej wady serca, nieprawidłowości w budowie przegrody międzyprzedsionkowej oraz międzykomorowej, jak również do niedorozwoju mięśnia sercowego.⁸⁴

Transformujący czynnik wzrostu beta 1 (ang. *Transforming growth factor Beta 1, Tgfβ1*)

Kolejnym ważnym genem wydaje się być kodujący transformujący czynnik wzrostu beta 1 (*Tgfβ1*), który jest zlokalizowany na chromosomie 19 w paśmie 13.2. Po raz pierwszy zidentyfikowano go w ludzkich płytkach krwi, przypisując mu rolę w gojeniu się ran.⁸⁵ Później scharakteryzowano go jako duży prekursor białkowy (zawierający 390 aminokwasów), który poddano proteolitycznej obróbce w celu wytworzenia dojrzałego peptydu o 112 aminokwasach. Tgfβ1 pełni wiele funkcji w komórce, w tym kontrolę wzrostu komórek, ich proliferację oraz różnicowanie, ma również udział we włóknieniu narządowym.⁸⁶

II. CEL PRACY

Obecnie głównym problemem związanym z wykorzystaniem mioblastów szkieletowych do celów regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego jest ich pro-arytmogenny charakter. Dzieje się to na skutek braku połączenia elektromechanicznego z kardiomiocytami narządu biorczego. **Dlatego też, głównym celem pracy było sprawdzenie, czy zmodyfikowane genetycznie ludzkie mioblasty – z nadekspresją białka koneksyny 43 zmniejszą ilość pobudzeń dodatkowych, po ich wszczepieniu do pozawałowego mięśnia sercowego szczurów rasy Wistar.** W pierwotnym założeniu, zastosowana modyfikacja genetyczna ludzkich mioblastów powinna przyczynić się do wytworzenia prawidłowego, synchronicznego skurczu w pozawałowym mięśniu sercowym.

Cele szczegółowe:

1. Przygotowanie grup doświadczalnych szczurów z wyindukowanym zawałem lewej komory mięśnia sercowego.
2. Przygotowanie ludzkich mioblastów z nadekspresją koneksyny 43.
3. Interwencje dosercowe z użyciem ludzkich mioblastów natywnych lub z nadekspresją koneksyny 43 do pozawałowego mięśnia sercowego.
4. Indukcja komorowych zaburzeń rytmu serca w celu sprawdzenia, czy ludzkie mioblasty z nadekspresją koneksyny 43 zmniejszają dodatkowe pobudzenia serca typu wtórnego w modelu serca pozawałowego szczura.
5. Badania *ex vivo* pozyskanych serc pozawałowych szczurów w celu oceny poziomu ekspresji genów i białek ‘pro-arytmogennych’ oraz odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę mięśnia sercowego po zawale, po zastosowanej terapii ludzkimi komórkami macierzystymi mięśni szkieletowych.

III. MATERIAŁY I METODY

1. MATERIAŁY

1.1 Materiał biologiczny

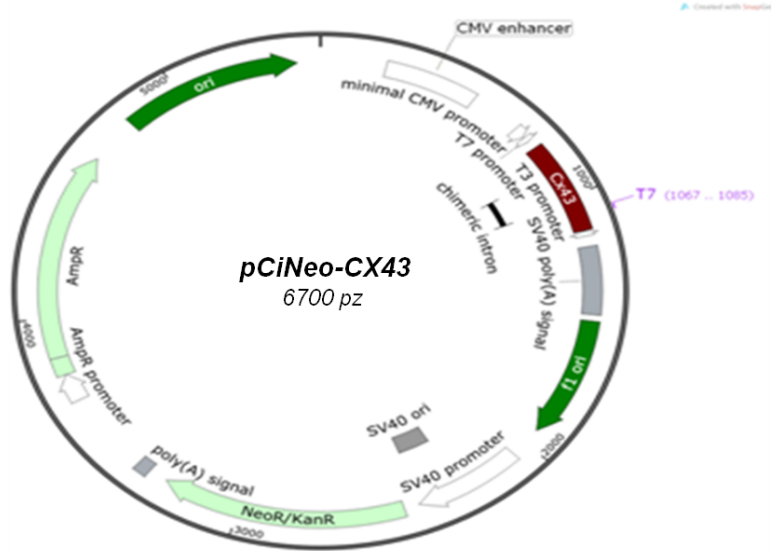
W doświadczeniach wykorzystano ludzkie komórki prekursorowe mięśni szkieletowych, tzw. mioblasty, które pochodziły z tkanki mięśniowej pozyskanej przy okazji zabiegu rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego (ang. *Anterior cruciate ligament*, ACL) od pacjentów Oddziału Ortopedii Klinicznego Szpitala Uniwersyteckiego Medycznego w Poznaniu. Pobranie tkanki dla celów badań naukowych odbyło się za zgodą pacjentów, którzy podpisali świadomą zgodę na użycie ich materiału tkankowego dla celów naukowych. Prowadzone badania uzyskały zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Uchwała nr 1103/12).

1.2 Zwierzęta laboratoryjne

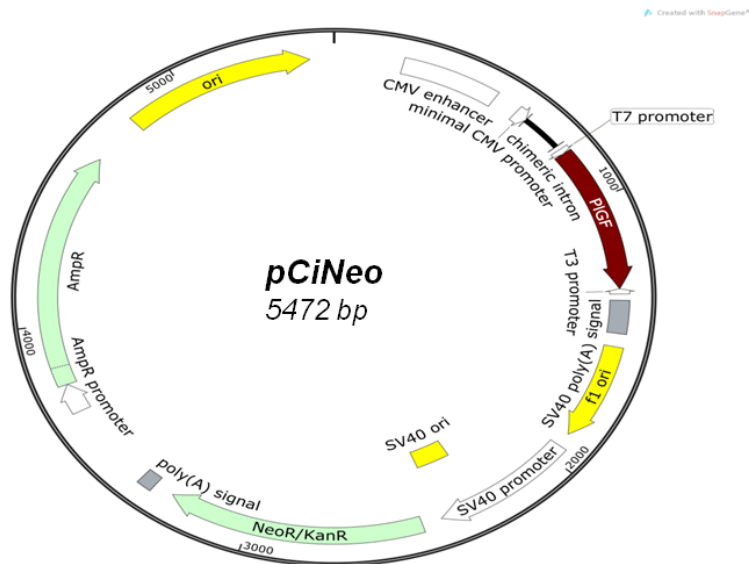
Zwierzętami laboratoryjnymi użytymi do badań były samice szczurów rasy Wistar o wadze 200-250 g zakupione w Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zwierzęta były przechowywane w Zwierzętarni Instytutu Genetyki Człowieka PAN. Wszystkie procedury wykonywane na szczurach odbyły się za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Uchwała nr 1/2013).

1.3 Plazmidy

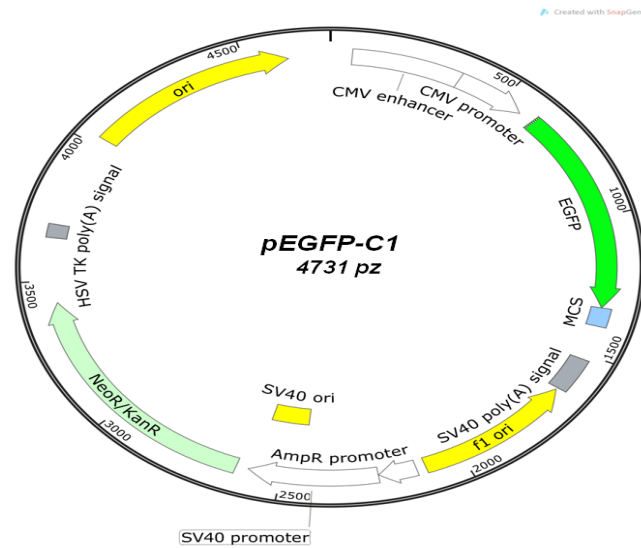
A) Plazmid ekspresyjny



B) Plazmid kontrolny



C) Plazmid reporterowy



Rysunek 11. Plazmidy wykorzystywane w procesie transfekcji mioblastów ludzkich. A – plazmid ekspresyjny używany do transfekcji przejściowej mioblastów ludzkich: pCiNeo-CX43 – zawierający sekwencję kodującą dla genu koneksyny 43. B- plazmid kontrolny nie zawierający sekwencji genu – pCiNeo. C- plazmid reporterowy pEGFP-C1, umożliwiający wzbudzenie nadeskresji białka zielonej fluorescencji (ang. *Green fluorescent protein, GFP*) w komórkach eukariotycznych, w celu określenia wydajności procesu transfekcji.

1.4 Media hodowlane

Medium do hodowli mioblastów ludzkich *in vitro*

- Zmodyfikowane Medium Eagle'a wg Dulbecco
- 20 % Bydłęca surowica płodowa, FBS
- 1 % L-Alanylo-L-Glutamina (Ultraglutamina)
- 1 % Pen/Strep-Amfoterycyna B (Antybiotyki)
- 1 % ekstrakt z embrionów kurczących (CEE)

Medium krioprotekcyjne do mrożenia mioblastów ludzkich

- 10 % zmodyfikowane medium Eagle'a wg. Dulbecco
- 10 % dimetylosulfotlenek, DMSO
- 80 % bydłęca surowica płodowa, FBS

1.5 Pożywki mikrobiologiczne

Pożywka mikrobiologiczna LB (ang. *Lysogeny broth*), pH=7.0

- 1 % Trypton
- 1 % NaCl
- 0.5 % Ekstrakt drożdżowy

Pożywka mikrobiologiczna agarozowa stała

- 2 % Agar mikrobiologiczny
- 1 % NaCl
- 1 % Trypton
- 0.5 % Ekstrakt drożdżowy
- 100 µg/µl Ampicylina

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

- 1 % Baktotrypton
- 1 % NaCl
- 0.5 % Ekstrakt z drożdży
- 20 mM Glukoza
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄

1.6 Odczynniki

Tabela 4. Odczynniki do hodowli komórkowej mioblastów *in vitro*

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Antybiotyki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze - Pen/Strep-Amfoterycyna B	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
Bydlęca surowica płodowa FBS (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
Buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco, DPBS (ang. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
Dimetylosulfotlenek, DMSO (ang. <i>Dimethyl Sulfoxide</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Zmodyfikowane Medium Eagle'a wg. Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

<i>Medium</i>)	
Ekstrakt z zarodków kurczących, CEE (ang. <i>Chick Embryo Extract</i>)	Sera Laboratories International, West Sussex, Wielka Brytania
Kolagenaza typu II	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsyna 10x (5 g/L Trypsin-EDTA)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
Ultraglutamina (L-Alanylo-L-Glutamina)	Lonza Group, Bazylea, Szwajcaria
Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, bFGF (ang. <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Żelatyna	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Tabela 5. Odczynniki do hodowli bakteryjnej

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Agar mikrobiologiczny	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ampicylina	Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska
Baktotrypton	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ekstrakt drożdżowy	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glukoza	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Chlorek magnezu, MgCl₂ (ang. <i>Magnesium chloride</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Siarczan VI magnezu, MgSO₄ (ang. <i>Magnesium sulphate</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Chlorek sodu, NaCl (ang. <i>Sodium chloride</i>)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Tabela 6. Odczynniki do transformacji i hodowli bakteryjnej

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Agar mikrobiologiczny	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampicylina	Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska
Ekstrakt drożdżowy	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chlorek sodu, NaCl (ang. <i>Sodium chloride</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bakterie elektrokompetentne	Agilent Technologies, La Jolla, USA
Trypton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabela 7. Odczynniki do izolacji plazmidu

Nazwa odczynnika		Pochodzenie
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA w skali mini EZ-10 (ang. <i>EZ-10 Spin Column Plasmid</i>)	Bufor do zawieszenia bakterii (ang. <i>Solution I</i>)	Bio Basic Inc., Ontario, Kanada
	Bufor do lizy bakterii (ang. <i>Solution II</i>)	
	Bufor neutralizujący (ang. <i>Solution III</i>)	
	Bufor płuczący (ang. <i>Wash Solution</i>)	
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA w dużej skali (ang. <i>Plasmid Maxi Kit</i>)		Qiagen, Hilden, Niemcy
Etanol 96%		Poch S.A., Gliwice, Polska

Tabela 8. Odczynniki do reakcji restrykcyjnej EcoR1

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
bufor Fast Digest; bufor do reakcji	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
enzym restrykcyjny EcoR1 Fast Digest	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabela 9. Odczynniki do izolacji RNA, DNA i białka

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Alkohol izopropylowy (ang. <i>Izopropyl alcohol</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β-merkaptoetanol (ang. <i>Beta mercaptoethanol</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform (ang. <i>Chlorophorm</i>)	Merck, Darmstadr, Niemcy
Cytrynian sodu (ang. <i>Sodium citrate</i>)	Poch S.A., Gliwice, Polska

Chlorowodorek guanidyny (ang. <i>Guanidine hydrochloride</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Etanol 75 %	Poch S.A., Gliwice, Polska
Etanol 100 %	Poch S.A., Gliwice, Polska
Mocznik (ang. <i>Urea</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Koktajl z inhibitorami proteaz (ang. <i>Protease inhibitor cocktail tablets</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sól sodowa siarczanu alkoholu laurylowego, SDS (ang. <i>Sodium lauryl sulfate</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-hydrochlorek (ang. <i>Tris-hydrochloride</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trizma zasada (ang. <i>Trizma base</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRI Reagent , odczynnik do izolacji DNA/RNA oraz białek	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wodorotlenek sodu 8 mM (ang. <i>Sodium hydroxide</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabela 10. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)

Nazwa zestawu	Pochodzenie
Bufor do reakcji PCR 10x	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Nukleotydy - dNTP Mix 10 mM	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Polimeraza DNA Taq	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Startery (Tabela 15)	genomed.pl, Warszawa, Polska
0.1 M DTT - ditiotreitól	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad

Tabela 11. Odczynniki do syntezy cDNA

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Bufor do odwrotnej transkrypcji stężony (5x)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Ditiotreitól DTT	Invitrogen, Life Technologies,

(ang. <i>Dithiothreitol</i>)	Carlsbad, USA
Zestaw nukleotydów - dNTP Mix 10mM	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Odwrotna transkryptaza SuperScript™ IV	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Bufor do odwrotnej transkrypcji SuperScript™IV 10x stężony	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Zestaw Turbo wolny od DNA (ang. <i>TURBO DNA-free™ Kit</i>)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Inhibitor rybonukleaz RNasin	Promega, Madison, USA
Startery oligo d(T15)	Oligo.pl, Warszawa, Polska
Mieszanina iQ™ SYBR® Green zawierający barwnik interkalujący SYBR Green I (ang. <i>iQ™ SYBR® Green Supermix</i>)	Bio-Rad, Hercules, USA

Tabela 12. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR)

Odczynnik	Pochodzenie
Mieszanina do PCR w czasie rzeczywistym (iQ™ SYBR® Green Supermix)	Bio-Rad, Hercules, USA
Startery	genomem.pl, Warszawa, Polska

Tabela 13. Odczynniki do elektroforezy agarozowej

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Agaroza typu I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agaroza do rozdzielenia małych fragmentów, 3:1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromek etydyny 10 mg/ ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bufor obciążający (ang. <i>Loading Dye</i>)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA (ang. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kwas octowy	Poch S.A., Gliwice, Polska
Marker wielkości DNA 50 pz	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Marker wielkości DNA 1 kpz	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Trizma™ - bufor zasadowy	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabela 14. Odczynniki do ekstrakcji produktów PCR w żelu

Nazwa odczynnika		Pochodzenie
Alkohol izopropylowy		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Etanol 96 %		Poch S.A., Gliwice, Polska
GeneJet™ Gene Extraction Kit	Bufor wiążący (ang. <i>Binding Buffer</i>)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
	Bufor płuczący (ang. <i>Wash Buffer</i>)	

Tabela 15. Sekwencje starterów użytych do PCR i PCR w czasie rzeczywistym

Organizm	Symbol genu	Starter	Sekwencja	Wielkość (pz)
H. sapiens	<i>ACTB</i>	'Forward'	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTCC-3'	192
		'Reverse'	5'-ATCTTGATCTTCATTGTGCTG-3'	
H. sapiens	<i>GAPDH</i>	'Forward'	5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3'	112
		'Reverse'	5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGA-3'	
H. sapiens	<i>MYOD</i>	'Forward'	5'-ACGGCATGATGGACTACAG-3'	212
		'Reverse'	5'-CGACTCAGAAGGCACGTC-3'	
H. sapiens	<i>MYOG</i>	'Forward'	5'-GCTGTATGAGACATCCCCCTA-3'	226
		'Reverse'	5'-CGACTTCCTCTTACACACCTTAC-3'	
H. sapiens	<i>MYHC1</i>	'Forward'	5'-CCCTTGAGAAGACGAAGCAG-3'	192
		'Reverse'	5'-GTGAGCGGGATTCCTTTTGA-3'	
H. sapiens	<i>MYF5</i>	'Forward'	5'-TGCAGGAGTTGCTGAGAGAGCA-3'	120
		'Reverse'	5'-CAGGACTGTTACATTCCGG-3'	
H. sapiens	<i>CX43</i>	'Forward'	5'-AGAGGAAGAAGCAAGGTTG-3'	179
		'Reverse'	5'-AGGCCACCTCAAAGATAGAC-3'	
R. norvegicus	<i>Gata4</i>	'Forward'	5'-TCAAACCAGAAAACGGAAGCCCA-3'	187
		'Reverse'	5'-GTGCCCATAGTGAGATGACAGCC-3'	
R. norvegicus	<i>Ncx1</i>	'Forward'	5'-TCTGAAAGATTCCGTGACTGC-3'	148
		'Reverse'	5'-GAAGACATTACAGCGTTGC-3'	
R. norvegicus	<i>Cacna1c</i>	'Forward'	5'-AGACACTGCAGGTGAAGAGG-3'	191
		'Reverse'	5'-TGGTGAAGATCGTGTCATTG-3'	
R. norvegicus	<i>Tgfb1</i>	'Forward'	5'-GGGTGGAAGCCATTAGGGGA-3'	300
		'Reverse'	5'-CTGAGGACACATTGAAACGGAAAAC-3'	
R. norvegicus	<i>Kcnq1</i>	'Forward'	5'-TCGTGTACCACTTCACCGTCTTC-3'	284
		'Reverse'	5'-GGAACCCACACAGAGGACAACC-3'	
R. norvegicus	<i>Serca2a</i>	'Forward'	5'-CAGTGGCTGATGGTGCTGAAAATC-3'	183
		'Reverse'	5'-AGAGGGCTGGAAGATGTGTTGCT-3'	

R. norvegicus	<i>Ywhaz</i>	'Forward'	5'-GATGAAGCCATTGCTGAACTTC-3'	117
		'Reverse'	5'-GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC-3'	
R. norvegicus	<i>Hmbs</i>	'Forward'	5'-TTGCCAGAGAAAAGTGCCGT-3'	247
		'Reverse'	5'-CTCCCTGACCCACAGCATC-3'	
R. norvegicus	<i>Pabp</i>	'Forward'	5'-TATGGTGCGACAGCAGAAGA-3'	110
		'Reverse'	5'-TATGCAAACCCTTTGGGATG-3'	

Tabela 16. Odczynniki do pomiaru stężenia białka metodą Lowry

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Siarczan miedzi, CuSO₄ (ang. <i>Copper (II) sulfate</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Węglan sodu, Na₂CO₃ (ang. <i>Sodium carbonate</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sól fizjologiczna 0.9%, NaCl (ang. <i>0.9 % physiologicum saline</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wodorotlenek sodu, NaOH (ang. <i>Sodium hydrochloride</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Odczynnik Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Winian sodowo-potasowy	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabela 17. Odczynniki do elektroforezy pionowej białek

Nazwa odczynnika	Pochodzenie	
Bufor obciążający	DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	4x bufor Laemmil	
Marker wielkości do białek (ang. <i>Precision Plus Protein WesternC Standards</i>)	Bio-Rad, Hercules, USA	
żel poliakryloamidowy gradientowy (4-15 %; 4-20 %)	Bio-Rad, Hercules, USA	

Tabela 18. Odczynniki użyte do transferu białek

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Bufor do transferu (5x) Trans Blot® Turbo™	Bio-Rad, Hercules, USA

Tabela 19. Odczynniki do immunodetekcji białek i chemiluminescencji

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Chlorek sodu, NaCl (ang. <i>Sodium chloride</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Odczynnik do detekcji chemiluminescencji Clarity™ ECL	Bio-Rad, Hercules, USA
Odtłuszczone mleko w proszku (ang. <i>Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk</i>) – bloker nieswoistego wiązania	Bio-Rad, Hercules, USA
Tween20 - detergent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trizma - bufor Trisowy	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabela 20. Spis zastosowanych przeciwciał

Typ przeciwciała	Symbol	Nr katalogowy	Pochodzenie
I rzędowe	anty-aktynie mięśni gładkich (SMA)	IR611	DAKO, Glostrup, Dania
I rzędowe	anty-Cacna1c	ab84814	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
I rzędowe	anty-CX43	ab63851	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
I rzędowe	anty-desmina	ab15200	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
I rzędowe	anty-GAPDH	ab9485	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
I rzędowe	anty-Gata4	PA5-29663	Invitrogen, Technologies, Carlsbad, USA
I rzędowe	anty-Kcnq1	P5372	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
I rzędowe	anty-ludzkiemu jądru komórkowemu (HuNuclei)	MAB1281	Merc Millipore, Billerica, MA, USA
I rzędowe	anty-Ncx1	ab177952	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
I rzędowe	anty-Serca2a	ab3625	Abcam, Cambridge, UK

II rządowe	anty-królicze	ab97051	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
II rządowe	anty-mysie	A9917	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabela 21. Spis odczynników oraz drobnego sprzętu do zabiegów mikrochirurgicznych

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Izofluran "AErrane"	BAXTER International, Deerfield, USA
Ketamina	Centrowet-Cezal, Wrocław
Sól fizjologiczna	POLPHARMA, Starogard Gd., Polska
Nić Prolen 6-0	ETHICON SUTURES, New Jersey, USA
Nić Prolen 4-0	ETHICON SUTURES, New Jersey, USA
Nić Mersilk 6-0	ETHICON SUTURES, New Jersey, USA
Strzykawka (0,5 ml, G30)	BECTON DICKINSON, Franklin Lakes, USA

1.7 Bufory

Bufor soli fosforanowych PBS, pH=7.4 (ang. *Phosphate Buffered Saline*)

- 1,47 M NaCl
- 80 mM Na₂HPO₄
- 29 mM NaH₂PO₄ + H₂O

Bufor LB do hodowli bakteryjnej (ang. *Lysogeny Broth*)

- 5 g/L ekstraktu drożdżowego
- 10 g/L NaCl
- 10 g/L Trypton

Bufor o pH=7–8 jest poddawany autoklawowaniu i przechowywany w 4°C.

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

Bufor TAE 1x, pH 8=0 (ang. *Tris-Acetate-EDTA*)

- 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

Mieszanka zasadowa do określenia stężenia białka metodą Lowry

- 750 µl 2 % winian sodowo-potasowy
- 32 ml 2 % Na₂CO₃ w 0,1 M NaOH
- 750 µl 1 % CuSO₄

Bufor obciążający

- Ditiotretitol - 50 mM
- Bufor Laemmli 4x

Bufor do elektroforezy: Tris-Glicyna (5x)

- Tris - 25 mM
- Glicyna - 250 mM
- Laurylosiarczan sodu - 17 mM

Bufor do elektrotransferu

- Tris (zasada) - 25 mM
- Glicyna - 192 mM
- Metanol – 4.93 M

Bufor blokujący

- Sól fosforanowa buforowana Trisem (10x) - 2 ml
- Tween 20 - 20 µl
- Mleko w proszku - 5%

- Bydłęca surowica płodowa - 2 ml

Bufor TBS (10x), pH=7.4 (ang. *Tris-Buffered Saline*),

- NaCl - 1,37 M
- KCl - 27 mM
- Tris (zasada) - 248 mM

Bufor TBST (ang. *Tween + Tris-Buffered Saline*)

- Tween 20 - 0,8 mM
- 1x TBS

Bufor PBS (10x) pH=7.4 (ang. *Phosphate Buffered Saline*)

- 1.47 M NaCl
- 80 mM Na₂HPO₄
- 29 mM NaH₂PO₄ + H₂O

1.8 Sprzęt laboratoryjny

Tabela 22. Drobny sprzęt laboratoryjny i aparatura

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Aparat do elektroforezy poziomej	Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Warszawa, Polska
Folia zabezpieczająca płytki do PCR w czasie rzeczywistym	Bio-rad, Hercules, USA
Końcówki do mikropipet bez filtra	Medlab-Products, Raszyn, Polska
Końcówki do mikropipet z filtrem	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Niemcy
Mikroskop świetlny Olympus BX40	Olympus, Tokyo, Japonia
Pipety automatyczne	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Płytki typu Petriego	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Płytki 96-dolkowe do PCR w czasie rzeczywistym	Bio-rad, Hercules, USA
Probówki 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5ml; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Probówki 15 ml; 50 ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Termocykler PTC-200	MJ Research, San Francisco, USA
Termocykler do PCR w czasie rzeczywistym: CFX Connex TM Real-Time System	Bio-rad, Hercules, USA
Waga laboratoryjna precyzyjna	Axis, Gdańsk, Polska

Waga laboratoryjna analityczna	Sartorius, Goettingen, Niemcy
Wirówka 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Wytrząsarka Genie[®]	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zasilacz model 200	Bio-rad, Hercules, USA
Cieplarka bakteryjna	Elkon, Łódź, Polska
Cytometr przepływowy, Cell Lab Quanta[™] SC	Beckman-Coulter, Brea, USA
Elektroporator, Gene Pulser X-cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Filtry 0.2 µm	Whatman, Dassel, Niemcy
Filtry 0.45 µm	Whatman, Dassel, Niemcy
Inkubator Heraeus HERAcell[®]	Kendro, Langenselbold, Niemcy
Kołyska	Elmi, Warszawa, Polska
Komora laminarna Heraeus HERAsafe[®]	Kendro, Langenselbold, Niemcy
Kuwety 0.2cm do elektroporacji	Bio-Rad, Hercules, USA
Łaźnia wodna	AJL Electronic, Kraków, Polska
Mikropipety	HTL, Warszawa, Polska
Mikropipeta wielokanałowa	HTL, Warszawa, Polska
Mikroskop odwrócony	ZEISS, Jena, Niemcy
Naczynia hodowlane 25 cm², 75 cm² z filtrem	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Narzędzia mikrochirurgiczne	Aesculap-Chifa, Nowy Tomysl, Polska
Parafilm „M”	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Parownik do izofluranu	EZ-Anesthezia, Animalab, Niemcy
Pipetor SWIFTPET+	HTL, Warszawa, Polska
Pipety 5 ml, 10 ml, 25 ml, 5 0ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Respirator MiniVent	Hugo Sachs Electr., Harvard App., March, Niemcy
Spektrofotometr NanoDrop[®] ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Stojak magnetyczny Dynal	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mieszadło laboratoryjne	CAT RM5 V-30, Warszawa, Polska
Wirówka 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Wirówka, Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Wytrząsarka do bakterii	New Brunswick Scientific, Edison, USA

2. METODY

2.1 Hodowla komórkowa *in vitro*

Ludzkie zawiesiny pierwotnych mioblastów hodowane były w środowisku o temperaturze 37°C, przy 5 % zawartości CO₂ oraz ok. 95 % wilgotności. Wszelkie czynności wykonywane podczas ich hodowli odbywały się sterylnie pod komorą laminarną II klasy bezpieczeństwa z przepływem pionowym (filtr HEPA 0,2 µm). Komórki hodowano we flaszkach 75 cm² przy objętości 10 ml medium, do którego dodawano profilaktycznie antybiotyki: penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (10 mg/ml) i amfoterycynę B (25 µg/ml) oraz dodatkową ilość glutaminy. Mioblasty ludzkie wymagały hodowli o podwyższonej zawartości glukozy (ang. *DMEM high glucose*) z dodatkiem 10 % bydlęcej surowicy płodowej oraz z zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów. Niezależnie od tempa wzrostu komórek, medium zmieniano co dwa dni.

2.1.1 Trypsynizacja zawiesin pierwotnych mioblastów

Po osiągnięciu przez mioblasty około 80 % konfluencji, komórki pasażowano. W tym celu płukano je w 10 ml roztworu DPBS i traktowano 3 ml (0.5 g/L) roztworem trypsyny. Monitorowanie procesu polegało na sprawdzaniu żywotności komórek z użyciem odwróconego mikroskopu świetlnego. W celu zahamowania działania trypsyny dodawano odpowiednią objętość kompletnego medium, w którym surowica odgrywa kluczową rolę w unieczynnieniu aktywności enzymu. Następnie komórki rozdzielano na odpowiednią liczbę naczyń hodowlanych, gwarantujących mioblastom optymalną konfluencję początkową wynoszącą 20-30 %.

2.1.2 Rozmrażanie mioblastów

Aby rozmrozić ludzkie mioblasty, pobrane próbki z banku ciekłego azotu i umieszczano je w łaźni wodnej o temperaturze 37°C w celu powolnego rozmrażania, po czym przelewano całkowitą objętość do probówek 50 ml wypełnionych odpowiednią objętością medium o temperaturze pokojowej (21°C) i wirowano przy standardowych parametrach (1200 obr/min, 21°C), pozbywając się w ten sposób toksycznego składnika zawartego w medium -

DMSO. Następnie komórki zawieszano w świeżej pożywce i wysiewano na naczynie hodowlane.

2.1.3 Zamrażanie mioblastów

W celu przechowywania próbek w głębokim zamrożeniu zawieszano je w wychłodzonym medium krioprotekcyjnym. Zawiesinę mioblastów umieszczano w probówkach typowych do mrożenia (NUNC) i przechowywano w -80°C przez 24 h, po czym przenoszono je do banku ciekłego azotu.

2.2 Modyfikacja genetyczna ludzkich mioblastów

Hodowla ludzkich mioblastów trwała do osiągnięcia odpowiedniej liczebności komórek niezbędnej do przeprowadzenia zaplanowanych badań *in vitro* oraz *in vivo* - na szczurach rasy Wistar.

2.2.1 Transformacja i hodowla bakterii

Do przeprowadzenia transfekcji mioblastów ludzkich, niezbędne było uzyskanie wysokich stężeń plazmidów przeznaczonych do elektroporacji: pCiNeo-CX43, pCiNeo, oraz pEGFP-C1. W tym celu dokonano transformacji bakterii elektrokompetentnych (szcep JM-109) metodą elektroporacji, która pozwalała na znaczny wzrost przewodnictwa błony komórkowej poprzez utworzenie w niej hydrofilowych przestrzeni, podczas oddziaływania na błonę komórkową polem elektromagnetycznym. Pierwszym etapem było przygotowanie odpowiedniej ilości pożywki SOC podgrzanej do temp. 36°C . Bakterie elektrokompetentne w probówkach o objętości 50 μl mieszano z wybranym plazmidem o stężeniu 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Tak przygotowaną zawiesinę przenoszono do kuwety elektroporacyjnej o wielkości 2 mm i działano na bakterie impulsem elektrycznym (200 Ω ; 2,5 μF ; 2,5 kV). Następnie do kuwet dodawano 1 ml podgrzanej pożywki SOC i mieszaninę umieszczano w probówce typu Eppendorf na 1 godzinę w 37°C . Kolejnym etapem było wysianie 100 μl mieszaniny bakteryjnej na wcześniej przygotowane płytki Petriego z pożywką agarową, zawierającą antybiotyki, odpowiedni dla danego plazmidu, pCiNeo-CX43 z ampicyliną, natomiast pEGFP-

C1 z kanamycyną; obydwie antybiotyki były w stężeniu 100 mg/ml. Bakterie były inkubowane przez noc w cieplarni w temp. 37°C.

Po całonocnej hodowli bakterii na podłożu stałym wybierano jedną kolonię, którą przenoszono do 10 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny bądź kanamycyny i ponownie hodowano przez całą noc w 37°C, ale tym razem wytrząsając. Kolejnego dnia część hodowli służyła jako inokulum do hodowli bakterii na większą skalę, natomiast z pozostałej części izolowano DNA plazmidowe za pomocą zestawu do izolacji plazmidów na małą skalę- Plasmid Mini Kucharczyk zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Następnie przeprowadzono kontrolne cięcia restrykcyjne enzymem EcoRI, które zostało opisane w podrozdziale 2.2.3.

2.2.2 Izolacja DNA z hodowli bakteryjnych

Po sprawdzeniu poprawności namnożonego plazmidu za pomocą trawienia restrykcyjnego przeprowadzono hodowlę bakteryjną na dużą skalę. Tego typu izolacja następowała po hodowli bakterii w objętościach ok. 200-500 ml przy pomocy zestawu HiSpeed® Plasmid Purification Kit i według procedury podanej przez producenta. W skrócie: po zakończeniu hodowli, komórki wirowano (6000 obr/min, 4°C, 15 minut), zawieszano w 10 ml buforu P1, a następnie dodawano 10 ml buforu P2, mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej. Po 5 minutach dodawano 10 ml buforu P3 a próbkę umieszczano na filtrze i inkubowano przez 10 minut. Następnie lizat komórkowy przelewano na kolejną kolumnę, do której, podczas grawitacyjnego przepływu lizatu, wiązało się DNA. Kolejnym etapem było przemywanie 60 ml buforu QC i elucja 15 ml buforu QF. Precypitacja DNA następowała poprzez dodanie 0,7 objętości izopropanolu i 5 minutową inkubację, po czym wytrącone DNA pozostało związane z filtrem i dwukrotnie przemywano je 70 % etanolem. Elucja plazmidowego DNA następowała poprzez wymuszony ciśnieniem przepływ 1 ml wody. Uzyskane DNA poddawane było analizie spektrofotometrycznej na aparacie NanoDrop® ND-1000. Następnie wykonywano reakcję cięcia restrykcyjnego z użyciem odpowiednich enzymów na obecność insertów bądź ich braku.

2.2.3 Hydroliza enzymami restrykcyjnymi

Walidacja otrzymanych plazmidów następowała poprzez hydrolizę odpowiednimi enzymami restrykcyjnym. Reakcja trawła 3 h w temp. 37°C po czym miała miejsce inaktywacja enzymu przez 20 minut w 65°C. Skład mieszaniny o objętości końcowej 25,5 µl był następujący:

Tabela 23. Skład mieszaniny do reakcji hydrolitycznej

DNA (0,5-1µg)	5 µl
Enzym restrykcyjny (10U/µl)	1,5 µl
Bufor 10x	2,5 µl
H ₂ O DEPC	16,5 µl

Skróty: DNA- kwas deoksyrybononukleotydowy (ang. *Deoxyribonucleotide acid*), H₂O DEPC - woda oczyszczona poliwęglanem dietylu (ang. *Diethyl pyrocarbonate*).

2.2.4 Sekwencjonowanie

Kolejnym etapem było sprawdzenie czy uzyskana sekwencja była identyczna z sekwencją referencyjną znajdującą się w bazie NCBI (NM_000165). Sekwencjonowanie otwartej ramki odczytu dla genu koneksyny 43 wykonała firma Oligo.pl.

2.2.5 Transfekcja mioblastów

Po otrzymaniu odpowiedniej liczby ludzkich mioblastów niezbędnych do przeprowadzenia badań wykonywano transfekcję przejściową w celu uzyskania populacji komórek genetycznie zmodyfikowanych sekwencją kodującą dla ludzkiej koneksyny 43. Do tego celu wybrano metodę elektroporacji. Ocenę wydajności transfekcji dokonywano 48 godzin po przeprowadzonej transfekcji przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego, jak również za pomocą cytometrii przepływowej (patrz podrozdział 2.2.5.1) oceniając fluorescencję białka zielonej fluorescencji (ang. *Green fluorescent protein*, GFP) oraz żywotność komórek.

2.2.5.1 Wydajność transfekcji poprzez analizę cytometryczną

Równocześnie z transfekcją ludzkich mioblastów za pomocą plazmidu pCiNeo-CX43 przeprowadzono również transfekcję z użyciem plazmidu zawierającego gen kodujące białko zielonej fluorescencji oraz z plazmidem kontrolnym pCiNeo, którego użyto w celu sprawdzenia wpływu samego procesu elektroporacji na ekspresję badanych genów.

Transfekcję przeprowadzono na tych samych populacjach ludzkich mioblastów z użyciem identycznych warunków doświadczalnych. Dwie doby po wykonanej transfekcji komórki odpłukiwano z medium hodowlanego, zawieszano w stężeniu 1 mln/ml i poddawano analizie za pomocą cytometrii przepływowej. Wyizolowaną pod względem wielkości (ang. *Forward Scatter*, FS) i złożoności (ang. *Side Scatter*, SS) populację komórek analizowano wobec ekspresji zielonego białka fluorescencji, dzięki czemu możliwe było rozdzielenie populacji komórek nietransfekowanych, od tych zawierających zastosowany plazmid.

2.3 Metodologia z zakresu biologii molekularnej

2.3.1 Izolacja RNA

W celu zbadania ekspresji analizowanych w pracy genów dokonywano izolacji RNA zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi za pomocą komercyjnie dostępnego odczynnika TRI Reagent[®]. Po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji komórek lub we właściwym punkcie czasowym (w badaniach *in vivo*) pozyskany materiał badawczy: ludzkie mioblasty/ lewe komory mięśnia sercowego szczura, zawieszano w 1 ml odczynnika lizującego TRI Reagent[®] z dodatkiem 40 µl miksu z inhibitorami proteaz i inkubowano przez 5 minut na lodzie celem lizy komórek. W przypadku izolacji RNA z materiału biologicznego – tkanki mięśnia sercowego, poddawano homogenizacji (program 4 - 14 000 obr/min, 3 razy po 20 sek., 21°C) przy użyciu homogenizatora T10 Basic ULTRA-TURRAX[®] (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Niemcy). Do zhomogenizowanych prób uzyskanych z tkanek lewej komory serca szczura/ mieszaniny ludzkich mioblastów, dodawano 200 µl chloroformu, mieszano, a trzyminutową inkubację poprzedzało wirowanie przez 15 minut w 4°C przy 12 000 obr/min. Ekstrakcja chloroformem powodowała rozdzielenie na trzy fazy – górną zawierającą RNA, dolną organiczną fazę białkową, oraz interfazę z DNA. Uzyskaną fazę wodną (ok. 600 µl) przenoszono do nowych 1,5 ml probówek typu Eppendorf i dodawano 500 µl izopropanolu, a 10 minutowa inkubacja powodowała wytrącenie RNA. Pozostałe dwie fazy przechowywano w temperaturze 4°C w celu izolacji (DNA) i białka (opisano w dalszej części pracy).

Używając wcześniejszych ustawień wirówki próbki wirowano przez 10 minut. Po usunięciu supernatantu następował etap przemywania, w którym otrzymane osady zawieszano dodając do każdej probówki po 1 ml 75 % etanolu z DEPC i wirowano (6000 obr/min, 4°C, 5 min).

Następnie usuwano supernatant, a osad suszono przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym rozpuszczano w 30 μl wody pozbawionej rybonukleaz dzięki DEPC i umieszczano w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Każda izolowana próbka oceniana była pod względem jakości materiału biologicznego – w elektroforezie 1.5%, w żelu agarozowym (patrz podrozdział 2.3.4) oraz ilościowo przy pomocy spektrofotometru NanoDrop[®] ND-1000.

2.3.2 Oczyszczanie mRNA i reakcja odwrotnej transkrypcji

Z wyizolowanej całkowitej puli RNA, pozyskiwano oczyszczoną frakcję mRNA. Do izolacji wykorzystywano paciorki magnetyczne (Dynabeads) opłaszczone oligo(dT)₂₅, komplementarne do ogona poli(A) cząsteczek mRNA. Wszystkie etapy izolacji mRNA zostały przeprowadzone zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Wyodrębnione mRNA służyło jako matryca do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji, w której wykorzystano 5 μg roztworu RNA zawieszony w 20 μl wody wolnej od rybonukleaz. Końcowym etapem była właściwa synteza DNA na matrycy RNA (tzw. odwrotna transkrypcja). Mieszanina reakcyjna w swym składzie zawierała: 4 μl buforu (5x), 1,5 μl dNTP (10 mM), 1 μl RNAsin, 2 μl DTT oraz 200 U odwrotnej transkryptazy. Po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej, próby przenoszono do termocyklera i wykonywano reakcję odwrotnej transkrypcji, która zachodziła w warunkach przedstawionych w *Tabeli 24*.

Tabela 24. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji

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

2.3.3 Polimerazowa reakcja łańcuchowa PCR

Jakość uzyskanego cDNA weryfikowano przeprowadzając kontrolną reakcję PCR z zastosowaniem specyficznych starterów dla genu referencyjnego *ACTB*. Przygotowano mieszaninę reakcyjną o objętości 20 μl o składzie przedstawionym w *Tabeli 25*.

Tabela 25. Skład mieszaniny reakcyjnej

Bufor do PCR (10x)	2 μ l
Starter 'Forward' (20 μ M)	0,2 μ l
Starter 'Reverse' (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
cDNA	0,5 μ l

Skróty: **dNTP** - trifosforany deoksynukleotydów (ang. *Deoxynucleotide Triphosphates*); **H₂O DEPC** – woda oczyszczona poliwęglanem dietylu (ang. *Diethyl pyrocarbonate*), **PCR** - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*) **polimeraza Taq** - termostabilna polimeraza z bakterii (ang. *Taq DNA polimerase*) *Thermus aquaticus*.

I przeprowadzano PCR w standardowych warunkach przedstawionych w Tabeli 26.

Tabela 26. Warunki reakcji łańcuchowej polimerazy

Predenaturacja		95°C, 5 min
Amplifikacja (30 cykli)	Denaturacja	95°C, 45 sekund
	Przyłączanie starterów	60°C, 45 sekund
	Synteza nici DNA (elongacja)	72°C, 1 minuta
Końcowa elongacja		72°C, 10 minuta
Chłodzenie		4°C

Produkty reakcji PCR były analizowane za pomocą elektroforezy w 3 % żelu o wysokiej rozdzielczości.

2.3.4 Elektroforeza w żelu agarozowym

Poprawność przeprowadzonej reakcji PCR sprawdzano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. W zależności od pożądanej gęstości żelu rozpuszczano odpowiednią ilość agarozy w 100 ml buforu TAE(1x) poprzez ogrzewanie a następnie chłodzenie do temperatury 40-50°C. Do schłodzonego roztworu dodawano bromku etydy do stężenia 0,25 μ g/ml. Procentowość wykorzystywanego żelu zależała od wielkości produktów na nim

rozdzielanych i wahała się w granicy 1,5-3 %. Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 70-110 V.

2.3.5 Przygotowanie krzywych standardowych dla analizowanych genów

2.3.5.1 Izolacja DNA z żelu

Izolację produktów reakcji PCR wykonywano zgodnie z protokołem zestawu *GeneJet™ Gene Extraction Kit*, który przedstawiał się następująco. Wycięte fragmenty DNA eluowano poprzez rozpuszczenie ich w 3 objętościach (100 µl~100 mg) buforu QG (50°C, 10 minut). Próbkę mieszaną były co parę minut, aby rozpuścić całkowicie żel. Kolejnym etapem było dodanie do próbek 100 µl alkoholu izopropylowego, pipetowanie i przekładanie na kolumny zawierające błony wiążące DNA. Wszystkie próbki wirowano w 12 000 obr/min przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, a powstały supernatant usuwano. Następnie do kolumny dodawano 100 µl buforu wiążącego (ang. *Binding Buffer*) i wirowano przy wcześniejszych ustawieniach wirówki, nadsącz usuwano a do kolumny dodawano 700 µl buforu przemywającego z dodatkiem etanolu (ang. *Wash Buffer*). Po ponownym wirowaniu, nadsącz usuwano a resztek etanolu pozbywano się w wyniku dodatkowego wirowania kolumnienek przy 12 000 obr/min przez 1 minutę. Przygotowane w ten sposób kolumny wkładano do 1,5 ml próbówek typu Eppendorf i dokonywano elucji poprzez dodanie 30 µl wody kvarcowej oraz inkubację przez 1 minutę w temperaturze pokojowej. Ostatnim etapem było wirowanie przy 12 000 obr/min oraz pomiar stężenia otrzymanego wodnego roztworu DNA na spektrofotometrze NanoDrop® ND-1000.

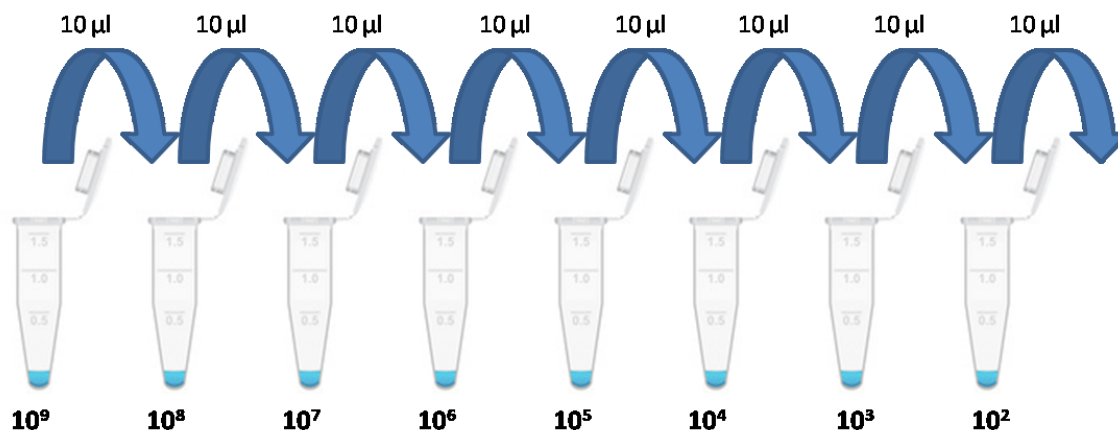
2.3.5.2 Przygotowanie serii rozcieńczeń

W celu przygotowania serii rozcieńczeń, znane stężenie produktu PCR przeliczano na liczbę kopii przypadającą na 1 µl według poniższego wzrou:

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

Krzywą standardową do reakcji PCR w czasie rzeczywistym wyznaczono wg. poniższego schematu. Pierwszym etapem było przygotowanie 100 µl roztworu zawierającego 1×10^9 kopii

w 1 μl roztworu, następnie pobierano z niego 10 μl roztworu i dodawano 90 μl wody kwarcowej, w ten sposób uzyskiwano próbkę stężeniu 1×10^8 w 1 μl . Przygotowano 10-krotną serię takich rozcieńczeń.



Rycina 12. Schemat przygotowania krzywej standardowej do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

2.4 Metodologia testów *in vitro*

2.4.1 Projektowanie starterów

Wszystkie niezbędne do analiz startery zaprojektowano przy pomocy bazy danych BLAST oraz Primer-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Podczas projektowania starterów zwracano szczególną uwagę na specyficzność danego genu. Startery projektowano tak, aby znajdowały się na połączeniu dwóch egzonów; długość produktu powinna mieścić się w zakresie 80-200 pz; ewentualność tworzenia dimerów krzyżowych i struktury typu spinki do włosów ograniczono do minimum. Właściwości fizyczne, tj. temperatura topnienia i możliwość tworzenia się struktur mimetycznych zostały sprawdzone programem NetPrimer. Wszystkie startery zostały zsyntetyzowane przez firmę genomed.pl w Warszawie. Sekwencja starterów znajduje się w Tabeli 15.

2.4.2 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

W pracy wykorzystano protokół z użyciem zielonego barwnika fluorescencyjnego SYBR GREEN, który wykazuje silne powinowactwo do dwuniciowych cząsteczek DNA, dzięki

czemu można ocenić jego liczbę kopii w próbach poddawanych łańcuchowej reakcji polimerazowej, w czasie rzeczywistym (ang. *Real-time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Mechanizm obliczeń polegał na ustaleniu cyklu progowego (ang. *Theshold Cycle*, CT), czyli momentu, w którym reakcje wkraczają w fazę logarytmiczną spowodowaną przyrostem liczby cząsteczek DNA (produktu). Do wspomnianej reakcji wykorzystano odczynnik iQ™ SYBR® Green Supermix, który w swoim składzie zawierał nukleotydy, MgCl₂, polimerazę „hotstart” iTaq, stabilizatory reakcji, fluoresceinę i barwnik SYBR GREEN. Wszystkie analizowane próbki mierzone były w dwukrotnych powtórzeniach, a wydajność danej reakcji oceniano na podstawie krzywej standardowej wykonanej z serii rozcieńczeń plazmidu zawierającego amplifikowaną sekwencję. Przygotowano mieszaninę reakcyjną o objętości 25 µl składającą się z:

- 2 µl 4x rozcieńczonej matrycy cDNA
- 12,5 µl 2x stężonej mieszaniny reakcyjnej (Supermix iQ™ SYBR® Green)
- po 2,5 µl 4 µM starterów (‘forward’, ‘reverse’) specyficznych dla badanego genu
- 5,5 µl wody

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym dla każdego genu wykonywano na 96-dółkowej płytce, na której znajdowały się: krzywa standardowa dla badanego genu, matryca cDNA badanych próbek oraz kontrola negatywna pozbawiona matrycy cDNA. Do amplifikacji wykorzystano urządzenie Connect™ Real-Time System firmy Bio-Rad w warunkach przedstawionych poniżej.

Tabela 27. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Etap reakcji		Czas i temperatura
Aktywacja enzymu		1 minuta w 95°C
Amplifikacja (45 cykli)	Denaturacja	95°C, 20 sekund
	Przyłączanie starterów	60°C, 20 sekund
	Elongacja	72°C, 20 sekund
Synteza terminalna		65°C, 1 minuta
Topnienie produktu		65-95°C, wzrost o 0,5°C co 30 sekund
Chłodzenie		4°C

2.4.3 Immunoblotowanie typu Western oraz immunodetekcja

Immunoblotowanie typu Western (ang. *Western Blot*) to technika stosowana do wykrywania badanego białka. W przedstawionych badaniach, immunoblotowanie posłużyło do weryfikacji poziomu ekspresji białek, oraz odpowiedzi na pytanie, czy poziomy ekspresji badanego mRNA znajdują potwierdzenie na poziomie produktu białkowego.

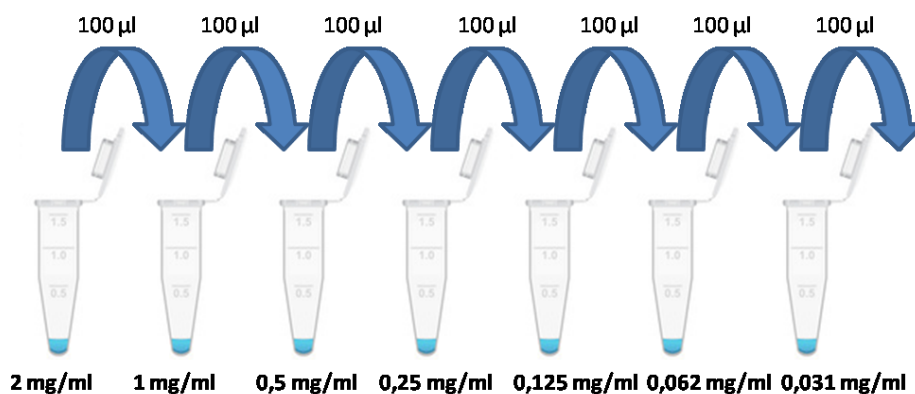
2.4.4 Izolacja frakcji białkowej

Frakcję białkową izolowano wg. protokołu TRI[®] Reagent, opisaną częściowo przy izolacji RNA (podrozdział 2.3.1). Po ekstrakcji z chloroformem, fazę wodną wykorzystywano do izolacji RNA, natomiast do dwóch pozostałych faz – interfazy zawierającej DNA oraz fazy organicznej zawierającej białka dodawano 300 µl 100 % etanolu. Próbkę delikatnie mieszano i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze 21°C po czym następowało wirowanie przy 2 000 obr/min przez 5 min. w temperaturze 4°C. W celu precypitacji frakcji białkowej supernatant przenoszono do nowej 2 ml probówki typu Eppendorf i dodawano 1,5 ml alkoholu izopropylowego, i tak przygotowaną mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej oraz wirowano przy 12000 obr/min przez 10 min. w 4°C. Po usunięciu supernatantu następowało trzykrotne przemywanie osadu, dodając za każdym razem 2 ml 0,3 M chlorowodoru guanidyny w 96 % etanolu. Podczas każdego przemywania, próbki inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przy 7500 obr/min przez 5 min. w temp. 4°C. Po zakończonym procesie przemywania dodawano 2 ml 100 % etanolu, i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej a następnie wirowano przy 7500 obr/min przez 5 minut w temp. 4°C. Dokładnie usuwano supernatant, a probówki z otwartym wieczkiem przekładano na 10 minut na lód, w celu osuszenia osadu. Osad białkowy rozpuszczano w 200 µl roztworu zawierającego 1 % SDS i 8 M mocznik w Tris-HCl o pH=8.0 - w stosunku 1:1, z dodatkiem 8 µl miksu z inhibitorami proteaz. Próbkę wirowano przy 10 000 obr/min przez 10 min. w temp. 4°C, a supernatant zawierający rozpuszczoną frakcję białkową przekładano do 1,5 ml probówki typu Eppendorf i homogenizowano (homogenizator T10 Basic ULTRA-TURRAX[®], IKA) przy 8000 obr/min trzykrotnie po 20 sek., a następnie wirowano przy 10000 obr/min przez 10 min. w 4°C. Uzyskany supernatant przekładano do 1,5 ml probówki typu Eppendorf. Próbkę przechowywano w temperaturze -80°C.

2.4.5 Określenie stężenia białka

2.4.5.1 Przygotowanie krzywej standardowej i próbek badanych

Krzywą standardową przygotowano na podstawie serii rozcieńczeń albuminy bydlęcej (ang. *Bovine serum albumin*, BSA) o następujących stężeniach: 2 mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,062,5 mg/ml; 0,031 mg/ml w 0.9 % roztworze soli fizjologicznej według schematu przedstawionego na *Rycinie 13*. Próbkę badaną rozcieńczano 10-krotnie w 0.9 % NaCl, w końcowej objętości 100 μ l. Próbkę referencyjną stanowiło 100 μ l 0.9 % roztworu soli fizjologicznej. Schemat wykonania krzywej standardowej przedstawiono poniżej.



Rycina 13. Schemat przygotowania krzywej standardowej.

2.4.5.2 Przeprowadzanie reakcji kolorymetrycznej

Do krzywej standardowej, próbki referencyjnej i badanych dodawano po 500 μ l mieszaniny o charakterze zasadowym i inkubowano przez 10 minut. Kolejnym krokiem było dodanie po 50 μ l 4-krotnie rozcieńczonego w wodzie odczynnika Folina oraz inkubacja przez 30 minut w ciemności. Ostatecznie pomiar stężenia badanych próbek odniesionych do przygotowanej krzywej standardowej oznaczano przy pomocy spektrofotometru firmy NanoDrop[®] ND-1000. Wszystkie próby i krzywą referencyjną mierzono w podwójnych powtórzeniach.

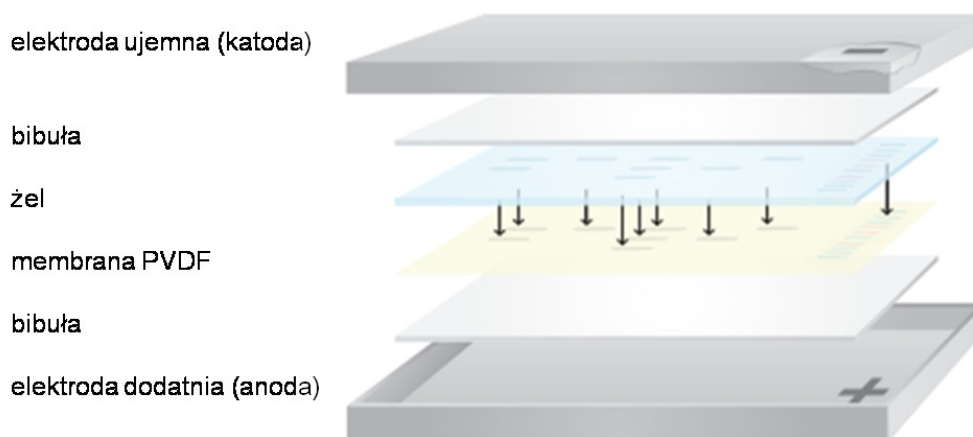
2.4.5.3 Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym

Do elektroforezy wykorzystano gotowe gradientowe (4-15 % lub 4-20 %) żele poliakrylamidowe. W pierwszym etapie przygotowywano 100 μ g białka, do którego

dodawano buforu obciążającego w stosunku 5:1. Tak przygotowaną mieszaninę poddawano denaturacji w 95°C przez 5 min w celu zniszczenia struktur II-rzędowych białek, po czym próbki przenoszono na lód. Rozdział białek prowadzony był równocześnie z markerem wielkości *Precision Plus Protein WesternC Standards* w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Do elektroforezy wykorzystano bufor Tris-glicyna(1x), w żelu zagęszczającym przy natężeniu pola elektrycznego 30 mA, a po przejściu próbek do żelu rozdzielającego natężenie prądu zwiększano do 40 mA.

2.4.5.4 Elektrotransfer

Elektrotransfer białek przeprowadzono przy użyciu Trans-Blot[®] Turbo Blotting System. Pierwszą czynnością było zaktywowanie błony PVDF w 100 % metanolu przez 1 minutę i dwukrotnie przez 10 sekund w wodzie kwarcowej, natomiast żel z rozdzielonymi białkami inkubowano w buforze do elektrotransferu (Trans-Blot[®]Turbo). Do elektrotransferu wykorzystywano konstrukcję skład której jest zamieszczony na *Rycinie 14* Ujemnie naładowane białka migrując pod wpływem przyłożonego prądu w kierunku elektrody dodatniej przenoszone były z żelu na membranę. Transfer prowadzony był przy natężeniu powyżej 1 mA przez 30 minut.



Rycina 14. Schemat przygotowania elektrotransferu (Bio-Rad).

Skrót: PVDF- difluorek poliwinylidenu (ang. *Polyvinylidene difluoride*).

2.4.5.5 Immunodetekcja białek

Jakość elektrotransferu sprawdzano na urządzeniu Chemi Doc XRS+, po czym przeprowadzano immunodetekcję białek. W pierwszej kolejności błonę PVDF inkubowano w buforze blokującym przez 1 godzinę co zapobiegało niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciał do jej powierzchni. Kolejnym etapem była inkubacja membrany z I-rzędowym przeciwciałem rozcieńczonym w buforze blokującym w 4°C przez noc. Po całonocnej inkubacji błony płukano trzykrotnie w buforze TBST po 20 minut, w celu odpłukania niezwiązanych przeciwciał. Następnie błonę PVDF inkubowano z II-rzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą również rozcieńczoną w buforze blokującym przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji błonę płukano 20 min, w buforze TBST i kolejne 20 min. w TBS(1x). Spis wraz ze składem użytych buforów znajduje się w podrozdziale 1.6 a spis stosowanych przeciwciał znajduje się w Tabeli 28.

Tabela 28. Rozcieńczenie przeciwciał do immunoblotowania typu Western

Rozcieńczenie I rządowego przeciwciała		Rozcieńczenie II rządowego przeciwciała	
anty-GAPDH	1:2500	anty-królicze	1:40000
anty-ncx1	1:200		
anty-gata4	1:500		
anty-CX43	1:500		
anty-kcnq1	1:200	anty-mysie	1:500
anty-cacna1c	1:1000		
anty-serca2a	1:5000		

2.4.5.6 Chemiluminescencja

Detekcję badanego białka osiągnęto inkubując membranę z chemiluminescencyjnym substratem dla peroksydazy Clarity™ Western ECL. Do wizualizacji i określenia ilości badanego białka zastosowano urządzenie Chemi Doc XRS+ wraz z oprogramowaniem Image Lab 2.0. Analizę ilościową poszczególnych prążków wykonywano względem intensywności kontroli i normalizowano względem białka referencyjnego- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

2.5 Metodologia stosowana u zwierząt laboratoryjnych *in vivo*

2.5.1 Model doświadczalny

Do doświadczeń zostały wykorzystane samice szczurów rasy Wistar, które były zakupione w Centrum Medycyny Doświadczalnej przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Masa zwierząt wynosiła 200-250 g. Zwierzęta były utrzymywane w klimatyzowanej zwierzętarni o podniesionym standardzie higienicznym. Temperatura wynosiła $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, pomieszczenie o wilgotności ok. 55 % w cyklicznym oświetleniu 12/12 godzin oraz 15-krotnej wymianie powietrza na godzinę. Szczury miały dostęp do wody pitnej *ad libitum* (wymiana 3 razy w tygodniu) i paszy bytowej *ad libitum*. Klatki wyposażone były dodatkowo w odpowiednio dobrane urozmaicenia (np. rurki papierowe). Wszystkie wykonywane procedury na zwierzętach zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Uchwała nr 1/2013).

Ze względu na przeszczep ksenogeniczny transplantowanych komórek, od dnia interwencji komórkowych (dzień 14, patrz *Schemat ideowy badań in vivo*), szczurom zapewniono odpowiedni reżim immunosupresyjny za pomocą codziennego ostrzykiwania roztworem cyklosporyny (*Sandimmun*), w końcowym stężeniu 10 mg/kg masy ciała.

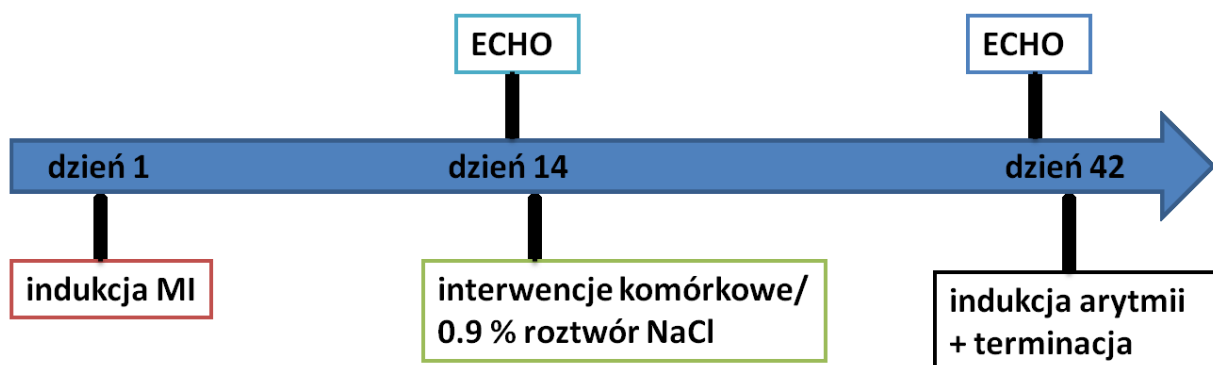
2.5.2 Schemat ideowy doświadczeń na zwierzętach

W pierwszym dniu następowała indukcja zawału lewej komory mięśnia sercowego poprzez podwiązanie odgałęzienia lewej tętnicy wieńcowej. Po zabiegu zwierzęta wyosobniono w trzy grupy:

1. **MI+MbCX43** – szczury, którym wszczepiano zmodyfikowane genetycznie mioblasty, n=12
2. **MI+MbWT** - szczury, który wszczepiano mioblasty natywne, n=12
3. **MI+0.9%NaCl** – grupa szczurów, która otrzymywała 0.9 % roztwór soli fizjologicznej, n=12

Grupa szczurów, której podano odpowiedni ekwiwalent roztworu soli fizjologicznej, stanowiła w przeprowadzonych badaniach grupę kontrolną, gdyż sól fizjologiczna nie jest substancją pro-arytmogenną.

Schemat badań ilustruje poniższa Rycina 15.



Rycina 15. Schemat ideowy badań *in vivo*.

Skróty: **MI** - zawał serca (ang. *Myocardial Infarction*), **ECHO** - echokardiografia (ang. *Echocardiography*).

2.5.3 Mikrochirurgiczne indukowanie zawału serca – przygotowanie doświadczalnej grupy zwierząt

Zawał mięśnia sercowego był indukowany u 50-ciu młodych (3-miesięcznych) samic szczurów rasy Wistar. Zwierzęta poddawano anestezji wziewnej stosując roztwór izofluranu (ciśnienie O₂ – 55 psi, przepływ 1 L/min, ustawienie waporizatora 2 %), następnie były one intubowane i ustabilizowane z wykorzystaniem respiratora Cwe POWER SAR-830/P Ventilator. Kolejnym krokiem przygotowania do operacji była dezynfekcja okolic klatki piersiowej po czym następowało przerwanie ciągłości skóry, odseparowanie mięśni piersiowych oraz żeber. Następnie preparowano tkankę osierdzia i podwiązywano odgałęzienie lewej tętnicy wieńcowej na wysokości ok. 5 mm poniżej dolnej granicy uszka lewego przedsionka. Zawał mięśnia sercowego obserwowano tuż po podwiązaniu tętnicy wieńcowej, poprzez zmianę zabarwienia obszaru niedokrwienia oraz akinezę (zanik czynności skurczowej serca w niedokrwionym obszarze serca). Po wykonanej indukcji zamykano klatkę piersiową poprzez podwiązanie przestrzeni pomiędzy żebrami oraz zakładano szwy skórne. Do operacji wykorzystano narzędzia mikrochirurgiczne tj. skalpel, imadło, nożyczki, rektraktor, pęsetę oraz nici. Dzień indukcji zawału był oznaczony jako dzień 1 (Rycina 15).

2.5.4 Analiza echokardiograficzna

Echokardiografia jest podstawowym badaniem obrazowym umożliwiającym ocenę funkcji hemodynamicznej serca. Celem tego badania była ocena obszaru serca objętego zawałem. Analizę przeprowadzano na ultrasonografie Vivid 7 z wykorzystaniem sondy o częstotliwości 14 MHz. Do tej procedury szczury były usypiane za pomocą podawanej dootrzewnowo mieszaniny ketaminy (75 mg/kg m.c) oraz ksylazyny (3,5 mg/kg m.c.). Po wygoleniu klatki piersiowej umieszczano je w pozycji leżącej na wznak. Badanie echokardiograficzne wykonywane było w projekcji przymostkowej zarówno w osi długiej jak i krótkiej. W czasie badania obserwowano dyskinezę koniuszka, akinezę przegrody oraz hipokinezję segmentów przednich za pomocą badań 2D oraz M-mode.

Wielkość zawału mięśnia sercowego określano posługując się całkowitym wskaźnikiem kurczliwości ściany komory (ang. *Wall Motion Score Index*, WMSI), który jest ilościową analizą funkcji skurczowej serca. W metodzie tej serce wg. schematu dzielone jest na 23 segmenty, a następnie indywidualnie oceniane na podstawie wykonywanego ruchu i skurczowego pogrubienia. U zdrowych zwierząt wynosi ono 23, natomiast WMI=15 odpowiada zawałowi serca ~40%.¹⁴¹ Każdy z 12 segmentów w projekcji poprzecznej i każdy z 11 segmentów w projekcji podłużnej lewej komory serca oceniany był jako 1 przy prawidłowej kurczliwości lub 0 przy nieprawidłowej kurczliwości (hipokineza, dyskineza, akineza).

2.5.5 Przeprowadzanie interwencji komórkowych

W 14 dniu od wywołania zawału mięśnia sercowego u szczura uzyskuje się stan pozawałowy, który charakteryzuje się wykształceniem łącznotkankowej blizny pozawałowej na skutek proliferacji fibroblastów i akumulacji kolagenu w obrębie miejsca niedotlenionego. Wykształcona blizna pozawałowa przyczynia się do znacznego obniżenia czynności skurczowej serca. Tak przygotowany model był podstawą opracowania skutecznej terapii komórkowej dla regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego.

Procedura implantacji komórek wyglądała podobnie jak w przypadku indukcji zawału (podrozdział 2.5.3), jednak zamiast podwiązania tętnicy wieńcowej, dokonywano intrakardialnej iniekcji 1) mioblastów natywnych (MbWT), 2) mioblastów z nadekspresją

koneksyny 43 (MbCX43) w objętości próbek: 3x50 µl, w stężeniu 1 mln komórek/100 µl; bądź 3) odpowiedniej objętości roztworu soli fizjologicznej, w obszar graniczny zawału (ang. *Border zone*) od strony podstawy, ściany bocznej i przegrody za pomocą strzykawki Micro-Fine Plus 29G 0,33x12,7 mm. Przeżywalność wśród zwierząt wynosiła 70 %.

2.5.6 Indukcja komorowych zaburzeń rytmu w sercu

Dla oceny skuteczności zastosowanej terapii komórkowej, wykonywano indukcyjne wywoływanie pobudzeń dodatkowych serca. W tym celu zwierzęta usypiano i znieczulano za pomocą ketaminy (0,16 mg/kg m.c.) oraz ksylazyny (0,25 mg/ml) a następnie podłączano do respiratora. Po uwidocznieniu mięśnia sercowego do bocznej ściany lewej komory przykładano elektrodę dwubiegunową podłączoną do stymulatora, a następnie stymulowano mięsień sercowy następującymi częstotliwościami:

- I bodźcem pojedynczym o częstotliwości 1 Hz, 2 minuty
- II bodźcem podwójnym o częstotliwości 1 Hz, 2 minuty
- III bodźcem pojedynczym z częstotliwością 8 Hz 4 x 10 sekund
- IV bodźcem o częstotliwości 15 Hz, 4 x 10 sekund

W trakcie badania rejestrowano przypadki częstoskurczu komorowego, migotania komór, łączny czas trwania komorowych zaburzeń rytmu oraz przypadki utrwalonego częstoskurczu prowadzące do śmierci zwierzęcia.

2.5.7 Barwienia immunohistochemiczne

Barwienia histologiczne wykonywano na trzech skolekcjonowanych sercach, po jednym z każdej grupy zwierząt. W procedurze tej materiał tkankowy stanowiły lewe ściany komór, które utrwalano w 10 % roztworze formaliny przez 48 godzin. Po ukończeniu tego etapu, tkanki były zalewane parafiną aby otrzymać bloczki parafinowe. Następnie przy użyciu mikrotomu bloczki były cięte w cienkie o 5 µm grubości skrawki po czym wykonywano standardowe barwienie hematoksyliną i eozyną. Oprócz barwień standardowych, wykonywano również barwienie trichromem wg. Massona w celu uwidocznienia tkanki łącznej, kolagenu i włókien mięśniowych. Otrzymane skrawki wykorzystano do

immunohistochemii w celu barwienia aktywności mięśni gładkiej. Skrawki poddano deparafinacji, ponownie uwadniano i ogrzewano w 97°C przez 20 minut w roztworze do odzyskiwania EnVision Flex-Target o wysokim pH. Immunobarwienie dla SMA prowadzono za pomocą AutostainerLink48 w następujących warunkach: odczynnik blokujący peroksydazę EnVision FLEX (5 min), inkubacja z przeciwciałem anti-SMA przez 20 min w temperaturze pokojowej i drugorzędowe przeciwciało EnVision FLEX / HRP (20 min), natomiast roztwór roboczy substratu dodawano na 10 minut.

Wykonywano również barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej koneksynie 43 oraz przeciwko ludzkim jądrówkom. W tym celu skrawki poddawano deparafinacji, ponownie uwadniano i ogrzewano w 97°C przez 20 minut w roztworze do odzyskiwania EnVision Flex-Target (niskie pH), a następnie skrawki pokrywano odczynnikiem blokującym peroksydazę EnVision FLEX (5 minut). Pierwotne przeciwciało swoiste dla koneksyny 43 i HuNuclei w optymalnym rozcieńczeniu dodawano i inkubowano w 4°C przez noc lub przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki pokrywano EnVision FLEX / HRP przez 20 min. Wykrywanie sygnału przeprowadzono przy użyciu roztworu roboczego substratu. Spis użytych przeciwciał i stosowanych rozcieńczeń opisano w Tabeli 20.

2.6 Analiza statystyczna

Doświadczenia w badaniach *in vitro* związane z oceną ekspresji genów wykonywane były w dwóch powtórzeniach. Poziom ekspresji genów wyznaczany był za pomocą metody ΔCt i algorytmu *GeNorm*, który określa najbardziej stabilne i wiarygodne pary genów referencyjnych, wyznaczając wartość M , ulegającą ekspresji w badanych próbkach. Na tej podstawie wyliczany był współczynnik normalizacji. Poziom ekspresji genów dla poszczególnych próbek oceniano w oparciu o wartości cyklu progowego Ct . Odnoszone były one do kontroli (kalibratora), którą była próbka o najwyższej ekspresji, i normalizowane w oparciu o współczynnik normalizacji – wyznaczany na podstawie poziomu ekspresji conajmniej dwóch genów referencyjnych *ACTB* i *GAPDH* (Real-Time PCR dla ludzkich genów), oraz na podstawie ekspresji trzech genów referencyjnych *Ywhaz*, *Hms*, *Pabp* (Real-Time PCR dla genów szczurzych). Analizę ilościową białek wykonywano względem

intensywności prążka kontroli i normalizowano go względem ilości białka referencyjnego-dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

Przedstawione wyniki są pomiarami uśrednionymi (z odchyleniami standardowymi). Analizę statystyczną wyników przeprowadzano wykorzystując test t-Studenta, bądź analizę wariancji testem Kruskala-Wallisa.

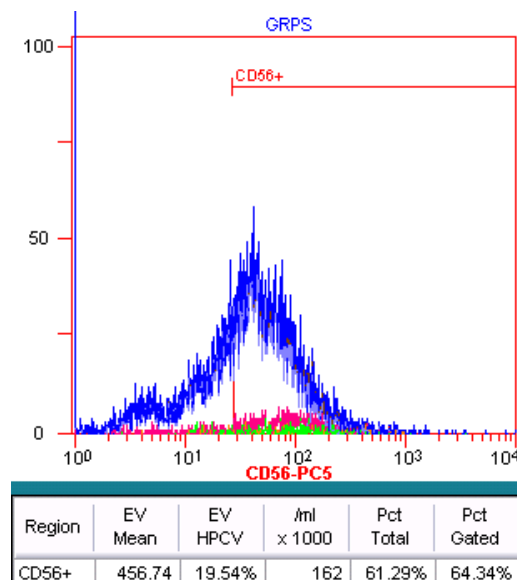
IV. WYNIKI

1. Przygotowanie zawiesin komórkowych do badań

1.1 Ocena markerów wyizolowanych pierwotnych zawiesin mioblastów ludzkich

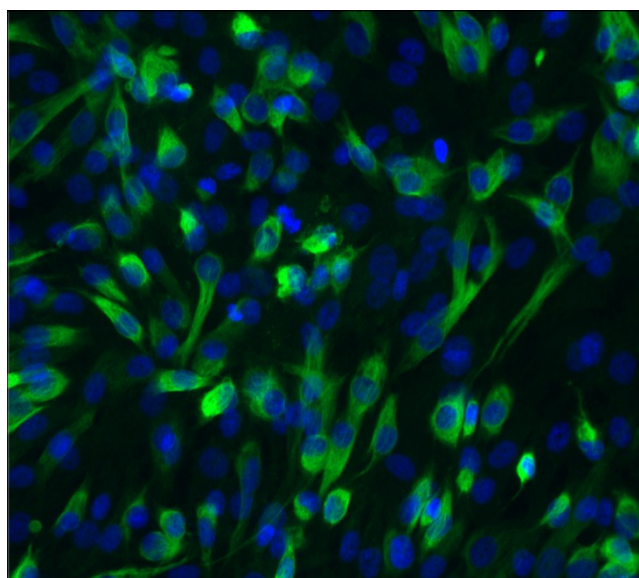
Dokonywano izolacji mioblastów wczesno- oraz późnoadherentnych, które przylegały do powierzchni naczynia hodowlanego odpowiednio w 3-7 oraz 8-14 dobie hodowli *in vitro*. Wyizolowane z tkanki mięśni szkieletowych komórki stanowiły heterogenną populację składającą się z m.in. macierzystych komórek mięśniowych (ang. *Muscle Derived Stem Cells*, MDSC), komórek satelitowych (ang. *Satellite Cells*) oraz tzw. populacji ubocznej (ang. *Side Population*, SP).

Analiza cytometryczna umożliwiła ocenę komórek ze względu na ich wielkość, względną ziarnistość i stopień jej złożoności. Innymi analizowanymi cechami komórek były: struktura jądra komórkowego oraz obecność markera powierzchniowego-CD56+. Barwienie przy pomocy przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie wykazało obecność markera CD56+ na powierzchni około 64 % badanych komórek (*Rycina 16*). Należy brać pod uwagę, że nie wszystkie komórki wyizolowane z populacji tkanki mięśnia szkieletowego charakteryzują się obecnością typowego dla mioblastów markera CD56+. Dla pozostałych komórek tej populacji charakterystyczne są inne markery powierzchniowe, np. dla komórek mioendotelialnych charakterystyczny jest marker CD144+, natomiast dla komórek populacji ubocznej CD45+.



Rycina 16. Ocena fenotypowa populacji mioblastów ludzkich oraz histogram przedstawiający wynik reakcji z ludzkim przeciwciałem anti-CD56.

Wykonana została również analiza immunocytochemiczna na obecność strukturalnego białka mikrofilamentowego – desminy, co miało na celu potwierdzenie miogenego charakteru wyizolowanych populacji komórek. Po przeprowadzonym barwieniu z użyciem specyficznego przeciwciała przeciwko ludzkiej desminie, preparaty oceniano mikroskopowo, wykonano dokumentację fotograficzną (*Rycina 17*) oraz wyliczono średnią zawartość procentową komórek wykazujących obecność desminy. Ekspresja desminy kształtuje się na poziomie ok. 95 %. Na podstawie uzyskanych wyników można zaobserwować, że badane populacje mioblastów charakteryzowały się wysokim poziomem ekspresji desminy, co potwierdza ich miogeny charakter.



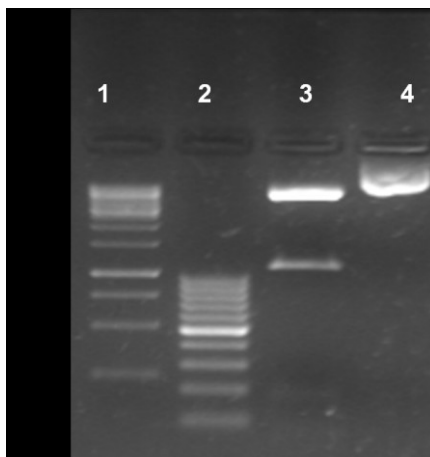
Rycina 17. Ilustracja przedstawiająca obecność desminy w ludzkich mioblastach wykrytej za pomocą immunofluorescencji. Zdjęcia zarejestrowane na mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss Imager D1. Skala 50 μm .

2. Modyfikacja genetyczna mioblastów za pomocą wprowadzonego genu *GJA1*

2.1 Namnażanie plazmidu pCiNeo-CX43 i cięcie enzymami restrykcyjnymi

Po namnożeniu plazmidu w hodowli bakteryjnej *in vitro* na dużą skalę, wyizolowane plazmidy użyte do transfekcji mioblastów weryfikowane były przy użyciu analizy restrykcyjnej. Po reakcji hydrolitycznej plazmidu pCiNeo-CX43 enzymem EcoR1 otrzymane fragmenty powinny wykazywać długość: 5523 pz (plazmid pCiNeo) oraz 400 pz (ORF genu

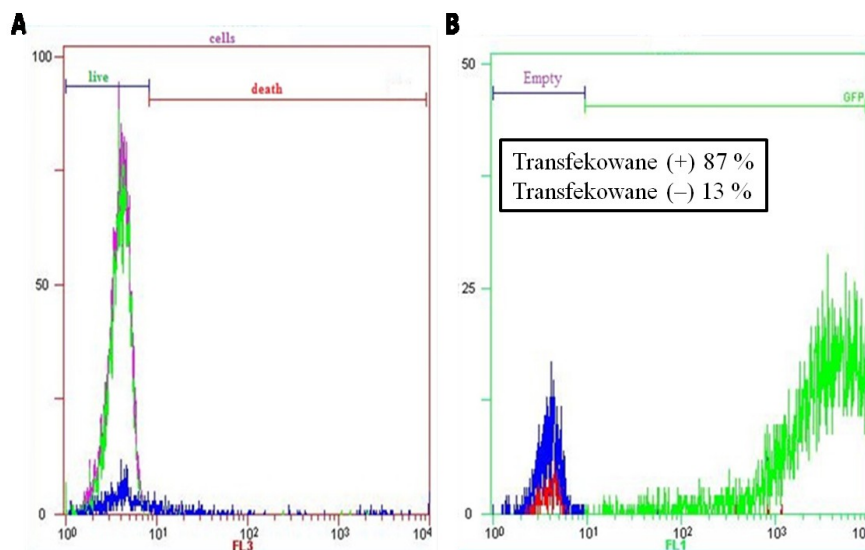
CX43). Przeprowadzone cięcie restrykcyjne namnożonego plazmidu enzymem EcoR1 potwierdziły obecność pożądanego insertu o wielkości 400 pz (*Rycina 18*).



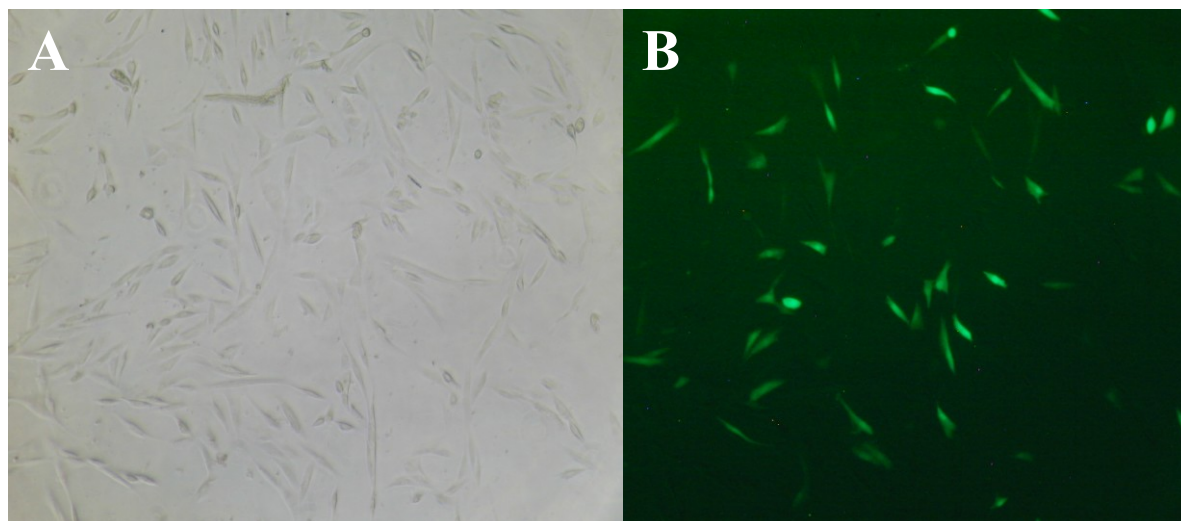
Rycina 18. Ocena poprawności wprowadzonego insertu poprzez reakcję hydrolityczną enzymem EcoR1. Opis: 1- markery wielkości 1 kz, 2- markery wielkości 50 pz, 3- cięty plazmid pCiNeo-CX43, 4-kontrolny plazmid pCiNeo-CX43.

2.2 Elektroporacja mioblastów ludzkich oraz ocena wydajności transfekcji

Transfekcję mioblastów wykonano z użyciem elektroporacji, którą wybrano jako optymalną metodę dla modyfikacji genetycznej mioblastów. Celem potwierdzenia udanej transfekcji plazmidem pCiNeo-CX43 równocześnie wykonano elektroporację plazmidem zawierającym białko zielonej fluorescencji. Transfekcja kontrolna wykonywana była przy zachowaniu identycznych warunków doświadczalnych i z wykorzystaniem komórek z tego samego pasażu hodowlanego. Wydajność oceniono pod mikroskopem fluorescencyjnym, jak również przy użyciu cytometrii przepływowej. Około 87 % populacji ludzkich mioblastów zostało zmodyfikowanych plazmidem pCiNeo-CX43, (*Rycina 19,20*).



Rycina 19. Wydajność elektroporacji pierwotnej zawiesiny mioblastów ludzkich - odsetkowy rozkład populacji komórek nietransfekowanych i transfekowanych, żywych oraz martwych (reakcja z jodkiem propidyny).

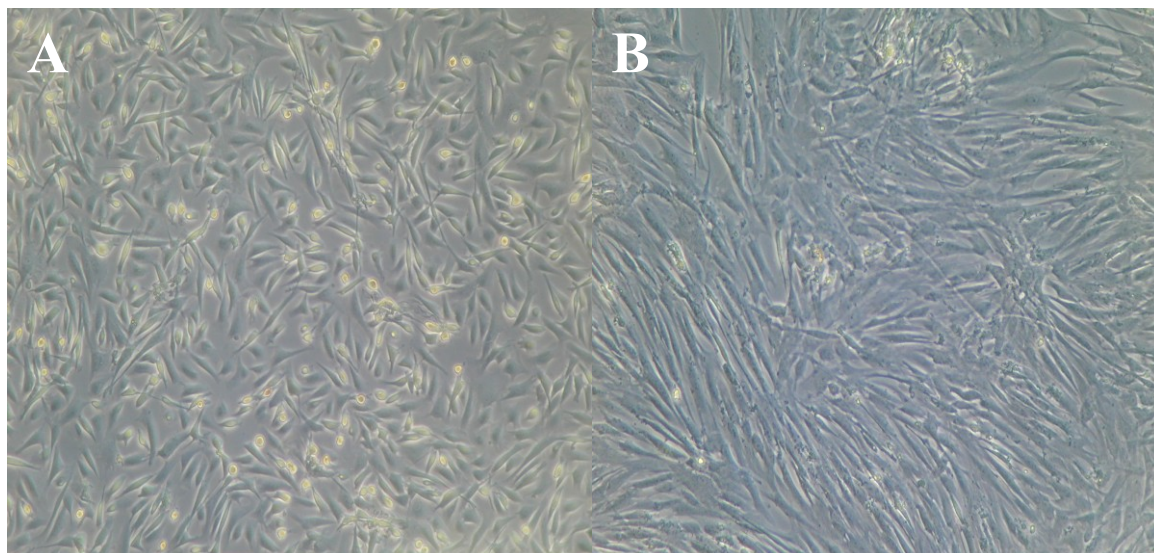


Rycina 20. Dokumentacja zdjęciowa zawiesin pierwotnych zawiesin mioblastów ludzkich w mikroskopie świetlnym (A) oraz fluorescencyjnym (B) po 48 godzinach od przeprowadzonej transfekcji.

3. Charakterystyka modyfikowanych genetycznie mioblastów ludzkich

3.1 Ocena proliferacji transfekowanych mioblastów

Po hodowli *in vitro* badanych mioblastów transfekowanych plazmidem pCiNeo-CX43 oraz mioblastów kontrolnych hodowanych w medium różnicującym, porównywano te populacje między sobą. Wykazano, że zmodyfikowane genetycznie mioblasty ludzkie zachowały zdolność do efektywnego różnicowania się w miotuby (Rycina 21).



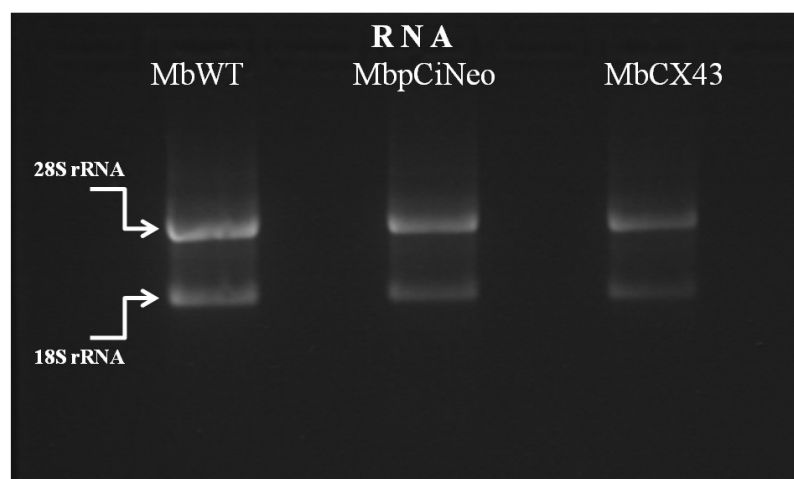
Rycina 21. Dokumentacja zdjęciowa przedstawiająca ludzkie zmodyfikowane mioblasty w zawiesinach pierwotnych w medium standardowym (A) oraz miotub po hodowli *in vitro* w medium różnicującym (B).

3.2 Ocena ekspresji miogennych czynników transkrypcyjnych oraz transgenu *GJA1*

3.2.1 Ocena jakości izolowanego RNA

RNA izolowano ze wszystkich badanych populacji mioblastów, tj.: mioblastów natywnych (MbWT), mioblastów transfekowanych pustym wektorem (MbpCiNeo) oraz transfekowanych plazmidem ekspresyjnym pCiNeo-CX43, (MbCX43). Ocenę jakościową wyizolowanego RNA przeprowadzano w 1,5 % żelu agarozowym, a określenie ilości dokonywano na spektrofotometrze firmy NanoDrop. Zwracano uwagę na współczynnik 260/280, mówiący o czystości izolowanego RNA (Rycina 22). Współczynnik powyżej 1,8 świadczył o braku zanieczyszczeń próbki DNA czy białkami. Takie próbki można było poddać oczyszczaniu z pozostałych frakcji RNA, a następnie reakcji odwrotnej transkrypcji.

Jakość RNA oceniano za pomocą elektroforezy w 3 % żelu agarozowym. O wysokiej jakości próbki RNA świadczyła obecność dwóch fragmentów odpowiadających podjednostkom rybosomowym 18S i 28S rRNA, co jest widoczne na Rycinie 22.



Rycina 22. Obraz rozdziału elektroforetycznego próbek RNA po czyszczeniu.

Skróty: **MbWT** – mioblasty natywne, **MbpCiNeo** – mioblasty transfekowane pustym wektorem, **MbCX43** – mioblasty transfekowane plazmidem **pCiNeo-CX43**.

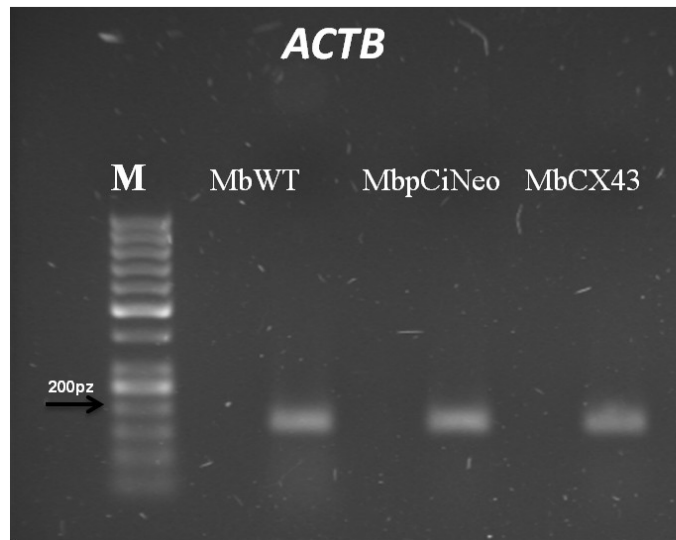
Tabela 29. Wyniki oceny ilościowej próbek RNA wykonanej na spektrofotometrze firmy NanoDrop®

Próba	Stężenie [ng/μl]	260/280
MbWT	1934,6	2,05
MbpCiNeo	1124,4	2,04
MbCX43	561,0	2,04

Skróty: **MbWT** – mioblasty natywne, **MbpCiNeo** – mioblasty transfekowane pustym wektorem, **MbCX43** – mioblasty transfekowane plazmidem **pCiNeo-CX43**.

3.2.2 Weryfikacja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano na oczyszczonym, matrycowym RNA z użyciem mikrosfer Oligo (dT)₂₅. Wykonano weryfikację odwrotnej transkrypcji techniką PCR ze starterami specyficznymi dla ludzkiej *ACTB*. Produkty tej reakcji poddawano następnie rozdzielowi elektroforetycznemu w 3 % żelu agarozowym. Otrzymane fragmenty o oczekiwanej wielkości 194 pz świadczyły o poprawności przeprowadzonej reakcji odwrotnej transkrypcji (Rycina 23). Tak przygotowane i sprawdzone cDNA służyło następnie jako matryca do badania ilościowego ekspresji genów przy użyciu techniki PCR w czasie rzeczywistym.



Rycina 23. Obraz rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym po reakcji PCR sprawdzającej poprawność procesu odwrotnej transkrypcji. M- markery wielkości 50 pz.

Skróty: MbWT – mioblasty natywne, MbpCiNeo – mioblasty transfekowane pustym wektorem, MbCX43 – mioblasty transfekowane plazmidem pCiNeo-CX43.

3.2.3 Przygotowanie krzywych standardowych

Wykonano krzywe standardowe dla genów poddanych analizie oraz genów referencyjnych w oparciu o szereg rozcieńczeń liczby kopii DNA, od 10^2 do 10^8 cząsteczek w jednym mikrolitrze roztworu.

3.2.3.1 Amplifikowanie sekwencji badanego genu

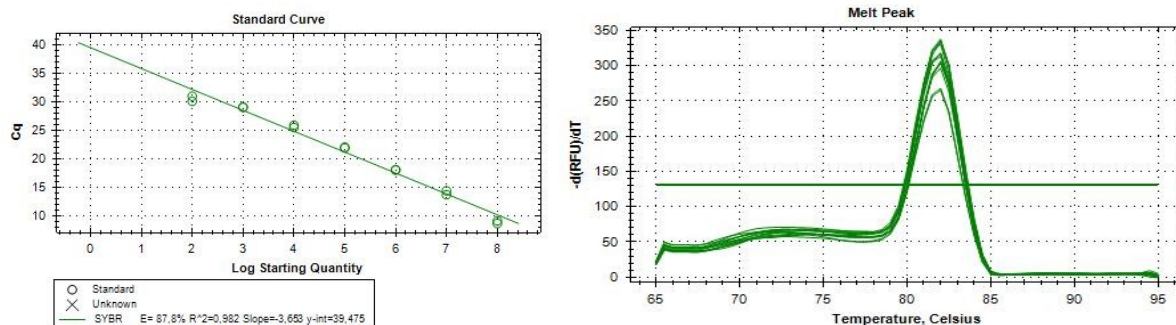
Przygotowaną matrycę cDNA używano do reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych starterów dla analizowanych genów. Weryfikowano otrzymane produkty PCR pod względem oczekiwanej wielkości przeprowadzając rozdzielanie elektroforetyczne w 3 % żelu agarozowym.

3.2.3.2 Wyznaczenie krzywych standardowych dla badanych genów za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym

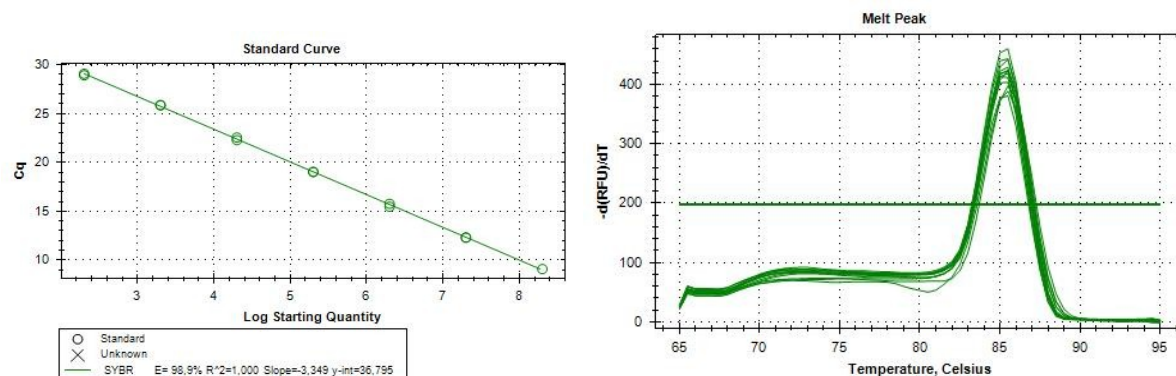
Wyznaczono krzywe standardowe niezbędne do przeprowadzenia analizy PCR w czasie rzeczywistym. Zwrócono uwagę na fakt, aby spełniała ona określone warunki, tj. współczynnik korelacji (R^2) był bliski 1, nachylenie krzywej (ang. *Slope*) w przedziale pomiędzy -3,3 a -3,8, a wydajność reakcji (E) w granicach 80-100 % (Rycina 21).

Cały opis przygotowania krzywych standardowych podano w podrozdziale 2.3.5 oraz schematycznie przedstawiono na Rycinie 12.

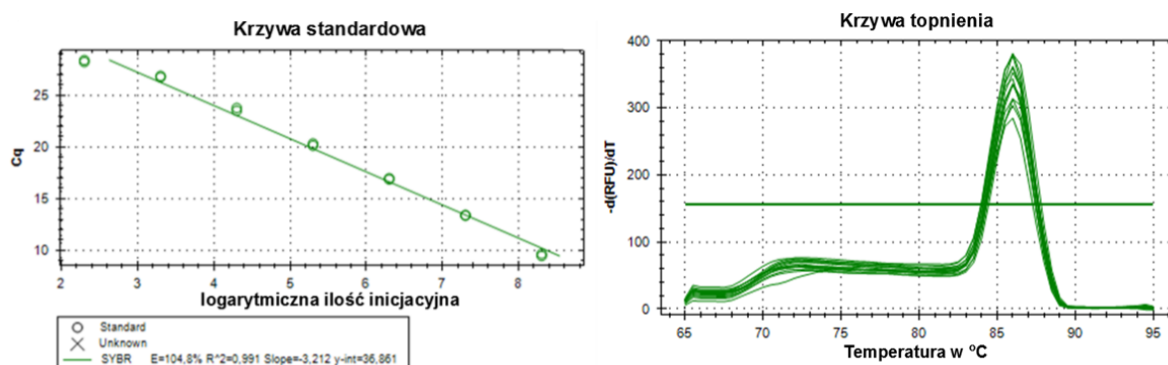
A) *GJAI*



B) *GAPDH*



C) *ACTB*



Rycina 24. Krzywa standardowa i krzywa topnienia dla genów badanych: A) *GJAI*, B) *GAPDH*, C) *ACTB*

Skróty: gen kodujący: *GJAI*- białko połączeń szczelinowych alfa 1 (ang. *Gap junction protein alpha*), *GAPDH*- dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), *ACTB*- beta aktynę (ang. *Beta actin*).

Tabela 30. Wartości krzywych standardowych dla analizowanych ludzkich genów

nazwa genu	wydajność (E)	R ²	nachylenie krzywej
MYOD	87 %	0,999	-3,677
MYOG	94 %	1	-3,474
MYHC1	93 %	0,999	-3,667
MYF5	99,2 %	1	-3,340

Skróty: **MYOD**- miogenny czynnik różnicujący (ang. *Myogenic differentiation*), **MYOG**- miogenina (ang. *myogenin*), **MYHC1**- ciężki łańcuch miozyny, gen 1 (ang. *Myosin heavy chain 1*), **MYF5**- czynnik miogeniczny 5 (ang. *Myogenic Factor 5*).

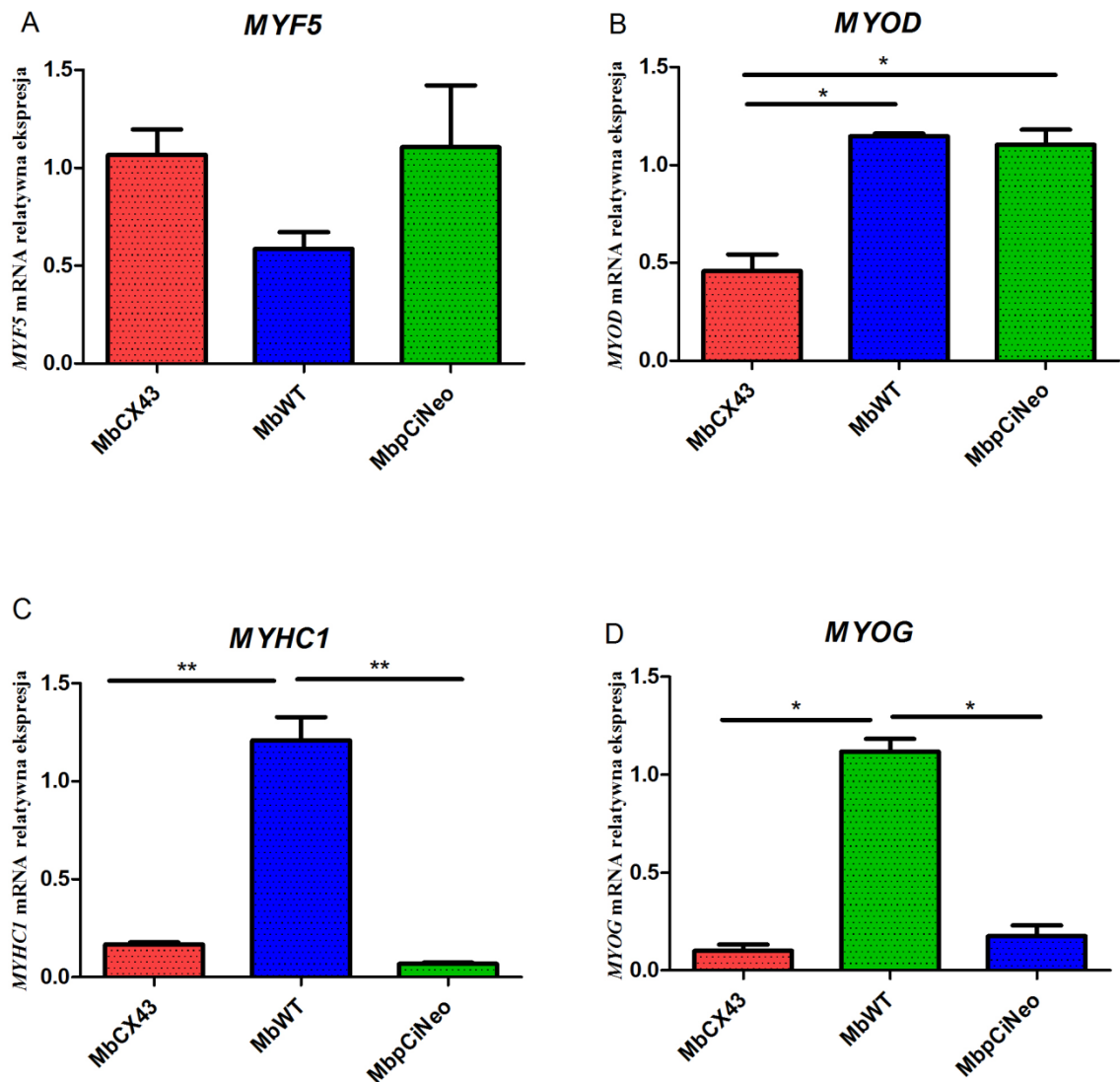
3.2.4 Badanie metodą PCR w czasie rzeczywistym poziomu ekspresji genów dla miogennych czynników transkrypcyjnych

Zbadano ekspresję wybranych ludzkich genów miogennych: w mioblastach poddanych transfekcji plazmidem pCiNeo-CX43.

- *MYOD*
- *MYOG*
- *MYHC1*
- *MYF5*

Geny te są niezbędne dla procesu miogenezy od komórek satelitowych do ich finalnego zróżnicowania we włókna mięśniowe. Kodują one białka należące do rodziny czynników transkrypcyjnych MRF. Pod ich wpływem powstają białka, które są istotne rozwojowo dla komórki mięśniowej. Punktem odniesienia dla oceny ekspresji markerów miogennych w transfekowanych mioblastach ludzkich była populacja komórek kontrolnych (MbWT oraz mioblasty transfekowane pustym wektorem pCiNeo - MbpCiNeo). Wyniki zostały znormalizowane względem ekspresji dwóch genów referencyjnych: *GAPDH* oraz *ACTB*.

W populacji mioblastów ludzkich genetycznie zmodyfikowanych zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie ekspresji trzech genów miogennych: *MYHC1*, *MYOG*, *MYOD*. Podobny trend zaobserwowano w przypadku genów *MYHC1* i *MYOG* układający się zgodnie z procesem transfekcji pustym plazmidem. Nieco podwyższony poziom ekspresji *MYF5* był statystycznie nieistotny, ale wyraźnie wyższy w komórkach transfekowanych w porównaniu do mioblastów natywnych (*Rycina 25*).



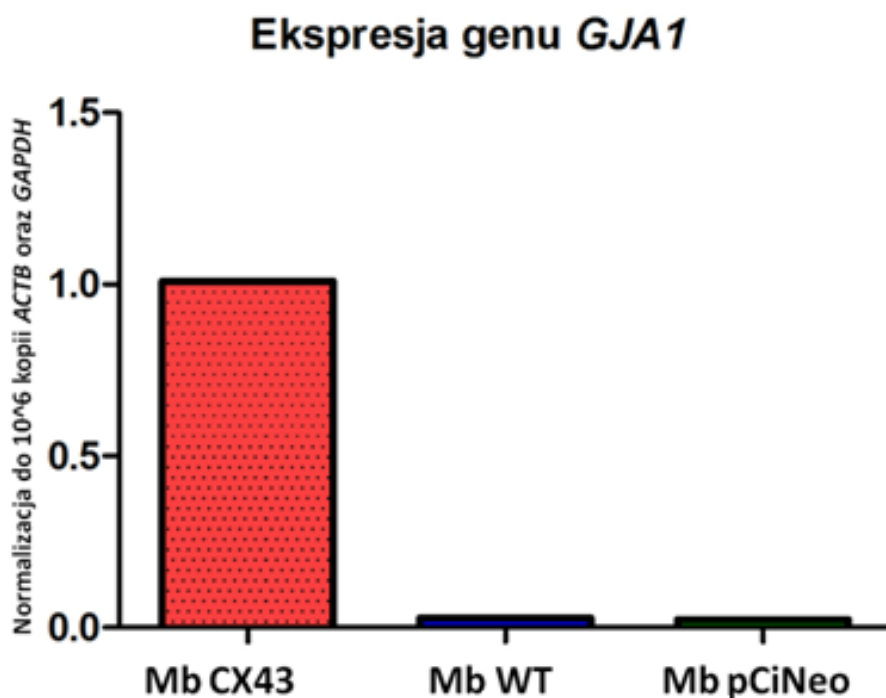
Rycina 25. Ekspresja czynników miogennych w warunkach *in vitro* w reakcji qPCR wobec badanych populacji progenitorowych komórek macierzystych. Względna ekspresja genów została znormalizowana względem genów referencyjnych: (*GAPDH*, *ACTB*). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Skróty: **MYF5**- czynnik miogeniczny 5 (ang. *Myogenic Factor 5*), **MYOD**- miogenny czynnik różnicujący (ang. *Myogenic differentiation*), **MYHC1**- ciężki łańcuch miozyny, gen 1 (ang. *Myosin heavy chain 1*), **MYOG**- miogenina (ang. *myogenin*). **MbCX43**- mioblasty transfekowane wektorem z wprowadzoną sekwencją dla ludzkiej koneksyny 43, **MbWT**- mioblasty natywne, **MbpCiNeo**- mioblasty transfekowane pustym wektorem.

3.2.5 Badanie metodą PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptu *GJA1*

Po wykonanej transfekcji genetycznej ludzkich mioblastów plazmidem pCiNeo-CX43, zbadano poziom ekspresji genu koneksyny 43 za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskana ekspresja koneksyny 43 była około 40-krotnie wyższa w populacji

mioblastów transfekowanych pCiNeo-CX43 (Rycina 26). Punktem odniesienia dla oceny ekspresji genu koneksyny 43 w mioblastach modyfikowanych genetycznie była populacja komórek natywnych (MbWT) oraz mioblasty transfekowane pustym wektorem pCiNeo, (MbpCiNeo). Wyniki zostały znormalizowane względem ekspresji dwóch genów referencyjnych: *GAPDH* oraz *ACTB*.



Rycina 26. Względna ekspresja genu *GJA1* w badanych populacjach ludzkich komórek progenitorowych mięśni szkieletowych znormalizowana względem dwóch genów referencyjnych: *ACTB* i *GAPDH*.

Skróty: **MbCX43**- mioblasty transfekowane wektorem z wprowadzoną sekwencją dla ludzkiej koneksyny 43, **MbWT**- mioblasty natywne, **MbpCiNeo**- mioblasty transfekowane pustym wektorem.

3.3 Ocena ekspresji białka koneksyny 43

3.3.1 Metoda immunoblotowania typu Western

Pewną weryfikacją wyników uzyskanych z reakcji PCR w czasie rzeczywistym była analiza ekspresji na poziomie białka za pomocą techniki immunoblotowania typu Western. Analizie poddano próbki białek uzyskane odpowiednio z populacji mioblastów natywnych (MbWT), mioblastów transfekowanych pustym plazmidem (MbpCiNeo), jak również mioblastów transfekowanych plazmidem z wprowadzoną sekwencją dla genu koneksyny 43 (MbCX43).

Przed rozdziałem elektroforetycznym białek konieczny był etap standaryzacji stężenia białka w analizowanych próbkach. W tym celu przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne

z zastosowaniem metody Lowry'ego, która opiera się na analizie porównawczej według przeprowadzonej krzywej standardowej. Stężenie uzyskanych białek zamieszczono w Tabeli 31.

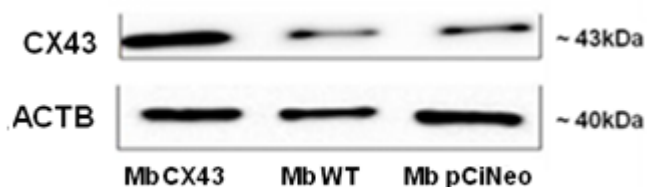
Tabela 31. Stężenia ekstraktów białkowych izolowanych z próbek badanych populacji mioblastów

Nazwa próby	Stężenie [mg/ml]
MbWT	42,85
MbpCiNeo	131,93
MbCX43	11,6

Skróty: **MbWT**- mioblasty natywne, **MbpCiNeo**- mioblasty transfekowane pustym wektorem, **MbCX43**- mioblasty transfekowane wektorem z wprowadzoną sekwencją dla ludzkiej koneksyny 43.

Dowodem na obecność wysokiego poziomu białka koneksyny 43 w komórkach transfekowanych (MbCX43) była reakcja luminescencyjna. Względna ilość produktu białkowego koneksyny 43 została określona w stosunku do ekstraktu białkowego uzyskanego z mioblastów natywnych MbWT oraz MbpCiNeo i znormalizowana w odniesieniu do stężenia białka referencyjnego (ACTB). Mioblasty modyfikowane genetycznie za pomocą plazmidu pCiNeo-CX43 wykazywały około 4-krotny wzrost ekspresji białka w porównaniu z mioblastami nатыwnymi.

W podrozdziale 1.6 w Tabeli 20 zestawiono zastosowane w immunoblotowaniu przeciwciała.



Rycina 27. Potwierdzenie ekspresji CX43 na poziomie białka. Należy zwrócić uwagę na wciąż obecną, choć niską ekspresję koneksyny 43 w mioblastach nатыwnych (MbWT). Ekspresja CX43 została znormalizowana względem białka referencyjnego ACTB.

Skróty: **MbCX43**- mioblasty modyfikowane koneksyną 43, **MbWT**- mioblasty niemodyfikowane, **MbpCiNeo**- mioblasty modyfikowane pustym wektorem.

4. Badania *in vivo* w modelu zwierzęcym

4.1 Indukcja zawałów i interwencje komórkowe

Eksperymentalnym zabiegom wywołania zawału mięśnia sercowego poddano grupę 50 szczurów. U 9 z nich odnotowano zgon w trakcie zabiegu, a u 4 zgon w okresie pooperacyjnym (1 szczur w 10 dni po wywołaniu MI, 3 szczury w 13 dni po indukcji MI).

W trakcie ponownej operacji mającej na celu podanie dosercowe komórek i/lub 0.9 % roztworu soli fizjologicznej, utracono dalszych 6 zwierząt. Ostatecznie analizie poddano 31 szczurów w następujących grupach:

1. grupa terapeutyczna (transplantacja genetycznie modyfikowanych komórek MbCX43), n=10
2. grupa z podanymi dosercowo mioblastami natywnymi (MbWT), n=6
3. kontrolna typu 'sham' z podaniem 0.9% roztworu NaCl, n=15

Po zakończeniu doświadczeń zwierzęta uśmiercano i pozyskiwano serca, które przechowywano poprzez zamrożenie tkanek w oparach ciekłego azotu. Następnie część z nich poddawano procesowi skrawania i przeprowadzano barwienie wyznaczające rejon zwłóknienia otrzymując w rezultacie preparaty mikroskopowe wykazujące stopień uszkodzenia mięśnia sercowego. Na innych przygotowanych skrawkach wykonywano barwienie immunohistologiczne z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, co umożliwiło w następnych doświadczeniach identyfikację ludzkich mioblastów w pozawałowym sercu szczurzym.



Rycina 28. Zdjęcie przedstawiające zabieg indukowania zawału mięśnia sercowego u szczura poprzez podwiązanie odgałęzienia lewej tętnicy wieńcowej.

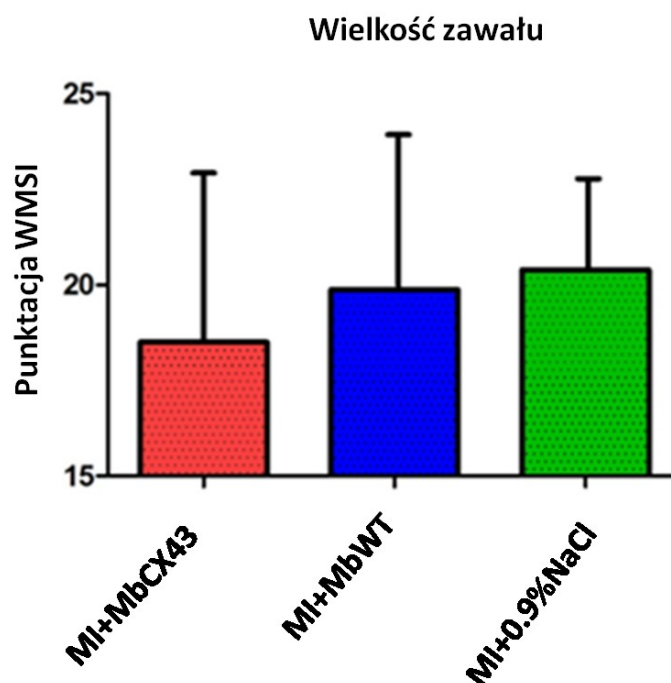
4.2 Wyniki analiz echokardiograficznych – WMSI

Wielkość zawału mięśnia sercowego określano wykonując badanie echokardiograficzne oraz posługując się wskaźnikiem całkowitej kurczliwości ściany komory. Opis tego badania podano w podrozdziale 2.5.4 Wyniki z przeprowadzonej analizy wykazane są w poniższej Tabeli 32 oraz zostały zilustrowane na Rycinie 29. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w wielkości zawału w badanych grupach eksperymentalnych szczurów.

Tabela 32. Wyniki uzyskane w wyniku oceny wielkości indukowanego zawału mięśnia sercowego

	MI+MbCX43 ECHO (WMSI)	MI+MbWT ECHO (WMSI)	MI+0.9 %NaCl ECHO (WMSI)
Wartość	18,50	19,88	20,40
Odchylenie standardowe	4,428	3,603	2,074

Skróty: MI+MbCX43- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano terapeutyczne komórki z nadekspresją koneksyny 43, MI+MbWT- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane, MI+0.9%NaCl- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano roztwór soli fizjologicznej, ECHO- echokardiografia, WMSI- wskaźnik kurczliwości lewej komory mięśnia sercowego (ang. *Wall Motion Score Index*)

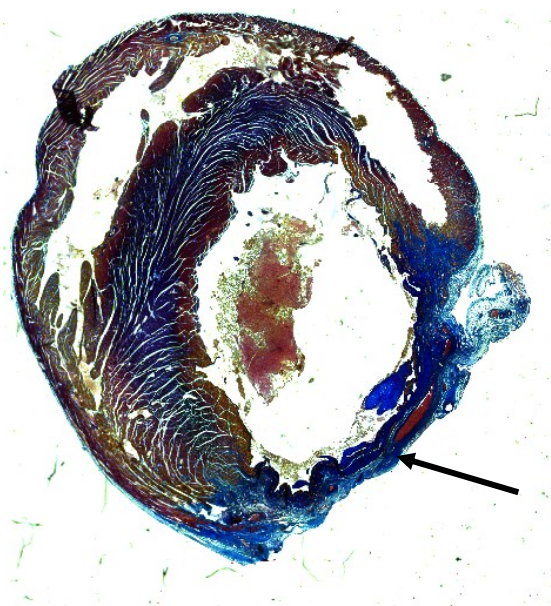


Rycina 29. Wielkość indukowanego zawału mięśnia sercowego w poszczególnych badanych grupach szczurów. Do oceny wielkości zawału zastosowano wskaźnik WMI lewej komory serca. Nie stwierdzono różnic istotnie statystycznych w wielkości zawału pomiędzy badanymi grupami szczurów.

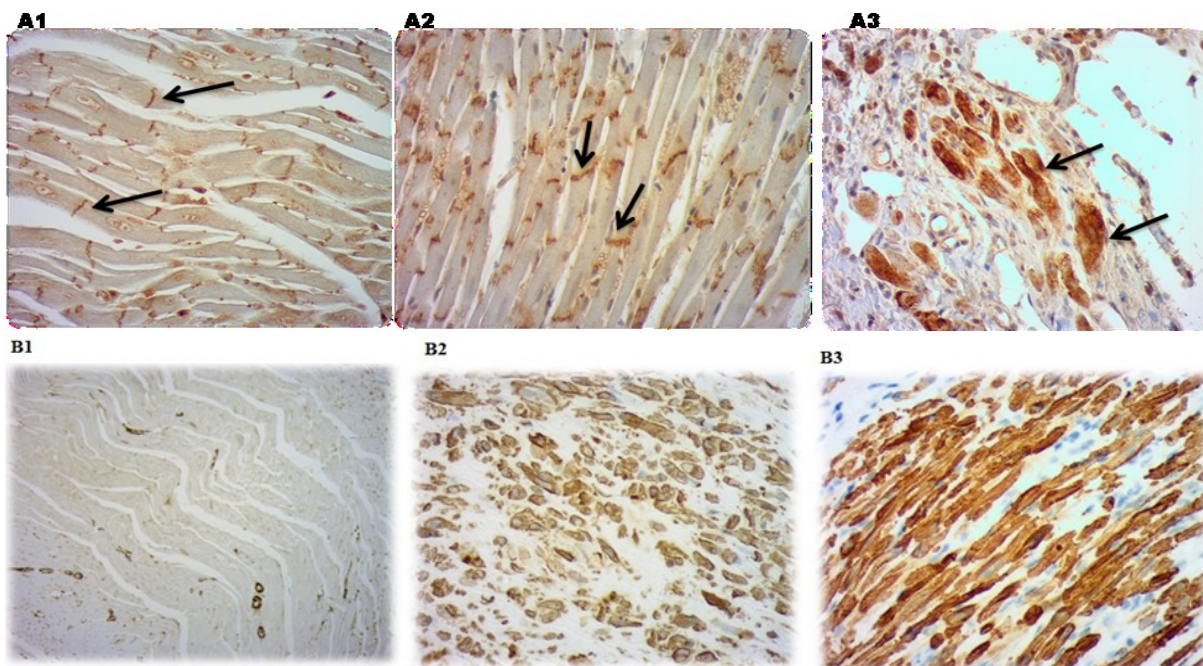
Skróty: **MI+MbCX43**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano terapeutyczne komórki z nadekspresją koneksyny 43, **MI+MbWT**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane, **MI+0.9%NaCl**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano roztwór soli fizjologicznej, **WMSI**- wskaźnik kurczliwości lewej komory mięśnia sercowego (ang. *Wall Motion Score Index*).

4.3 Wyniki barwień immunohistochemicznych

Wyniki barwień immunohistochemicznych przeprowadzonych na wycinkach tkankowych skolekcjonowanych z lewych komór serc szczurzych (MI+MbCX43, MI+MbWT, MI+0.9%NaCl) są badaniami jakościowymi. Poniżej zamieszczona została dokumentacja zdjęciowa obrazująca wyniki barwień dla hematoksyliny i eozyny, jak również barwienia trójkromianem wg. Massona, (*Rycina 30*). Otrzymane skrawki wykorzystano również do immunohistochemii w celu wykazania obecności koneksyny 43, (*Rycina 31, Panel A*), jak również aktyny mięśni gładkiej, (*Rycina 31, Panel B*), oraz ludzkich jąder komórkowych (*Rycina 32*). Dzięki zastosowaniu odpowiednich przeciwciał potwierdzono obecność mioblastów ludzkich z genem *GJA1* w pozawałowym sercu szczurzym, w miesiąc po przeprowadzonych interwencjach komórkowych.

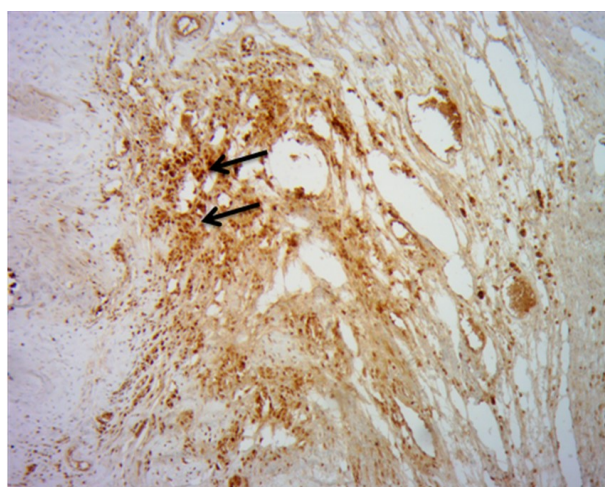


Rycina 30. Barwienie identyfikujące włóknienie serca wg. Massona. Obserwowano zmniejszenie grubości ściany serca, oraz jej włóknienie (strzałka). Niebieskie zabarwienie świadczy o wykryciu włókien kolagenowych (blizny łącznotkankowej). (Powiększenie 40x).



Rycina 31. Panel A: Wyniki barwienia immunohistochemicznego przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko koneksynie 43. Na zdjęciu A1 (MI+0.9%NaCl) i A2 (MI+MbWT) widoczne jest typowe barwienie dla koneksyny 43, które występuje w kardiomiocytach szczura. Na zdjęciu A3 (MI+MbCX43) widoczne są ludzkie genetycznie zmodyfikowane mioblasty wypełnione białkami koneksyny 43 (strzałki). Panel B: wyniki barwienia immunohistochemicznego przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko SMA w miokardium szczura (wybarwione na brązowo). SMA jest nieobecny w miokardium w grupie szczurów MI+0.9%NaCl (B1), podczas gdy jego obecność jest widoczna zarówno po interwencjach u szczurów MI+MbWT (B2), jak i MI+MbCX43 (B3). Należy zwrócić uwagę na fakt, iż mioblasty z nadekspresją CX43 (B3) mają strukturę ukierunkowaną równoległą do komórek serca biorczego (Powiększenie 100x).

Skróty: SMA- aktyna mięśni gładkich (ang. *Smooth muscle actin*), **MI+0.9%NaCl**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano ekwiwalent objętościowy roztworu soli fizjologicznej, **MI+ MbCX43**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano terapeutyczne komórki- z nadekspresją koneksyny 43, **MI+MbWT**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane.



Rycina 32. Wyniki odczynu barwnego skierowanego przeciw markerowi ludzkiego jądra komórkowego. Na zdjęciu widoczne są wybarwione na brązowo ludzkie jądra komórkowe, które są dowodem na obecność ludzkich mioblastów w pozawałowym sercu szczura w 4 tygodnie po przeprowadzonych interwencjach komórkowych. (Powiększenie 100x).

4.4 Wyniki indukcji komorowych zaburzeń w rytmie serca

W ostatnim dniu eksperymentu (dzień 42) wywoływano indukcję komorowych zaburzeń rytmu w sercu pobudzając je prądem o zmiennym natężeniu. (Opis doświadczenia znajduje się w podrozdziale 2.5.6). Wyniki analizowano posługując się punktowym zapisem arytmii serca (Tabela 33) zliczając liczbę pojawiających się pobudzeń dodatkowych serca w zapisie EKG.

Tabela 33. Punktowy zapis arytmii serca

Punktowy opis arytmii serca (ang. <i>Arrhythmia scoring system B</i>)	
0	<10 przedwczesne pobudzenia komorowe, PVCs; (ang. <i>Premature ventricular contraction</i>)
1	>10 przedwczesne pobudzenia komorowe, PVCs; (ang. <i>Premature ventricular contraction</i>)
2	1 – 5 epizodów częstoskurczu komorowego, VT; (ang. <i>Ventricular tachycardia</i>)
3	NVF bądź >5 epizodów częstoskurczu komorowego, VT (czas trwania VT i VF <40s); (ang. <i>Nonspontaneous converting VF, Ventricular tachycardia, Ventricular fibrillation</i>)
4	NVF bądź >5 epizodów częstoskurczu komorowego, VT (czas trwania VT i VF <80s); (ang. <i>Nonspontaneous converting VF, Ventricular tachycardia, Ventricular fibrillation</i>)
5	NVF bądź >5 epizodów częstoskurczu komorowego, VT (czas trwania VT i VF <160s); (ang. <i>Nonspontaneous converting VF, Ventricular tachycardia, Ventricular fibrillation</i>)
6	NVF bądź >5 epizodów częstoskurczu komorowego, VT (czas trwania VT i VF >160s); (ang. <i>Nonspontaneous converting VF, Ventricular tachycardia, Ventricular fibrillation</i>)
7	Migotanie komór prowadzące do śmierci/ częstoskurcz komorowy prowadzący do śmierci

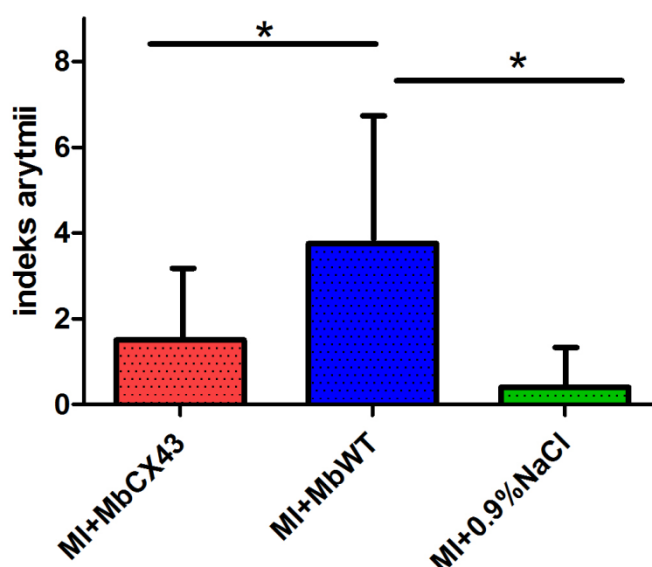
Zaobserwowano, że mioblasty z wprowadzonym genem „terapeutycznym” (MbCX43) znacznie zmniejszyły występowanie dodatkowych pobudzeń komorowych w sercach szczurów, w porównaniu z grupą, w której podano ‘natywne’ mioblasty (MbWT). Efekt ten był obserwowany 1 miesiąc po interwencjach komórkowych. Wyniki z przeprowadzonego doświadczenia znajdują się w Tabeli 34 oraz zostały graficznie zilustrowane na Rycinie 33.

Tabela 34. Wyniki uzyskane po eksperymentalnej indukcji komorowych zaburzeń rytmu serca

	MI+MbCX43 ECHO (WMSI)	MI+MbWT ECHO (WMSI)	MI+0.9%NaCl ECHO (WMSI)
Wartości średnie	1,500*	3,750*	0,4000*
Odchylenie standardowe	1,269	2,605	0,5477

Gwiazdki oznaczają poziom istotności statystycznej: *p<0.05

Skróty: **MI+MbCX43**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano terapeutyczne komórki z nadekspresją koneksyny 43, **MI+MbWT**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane, **MI+0.9%NaCl**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano ekwiwalent objętościowy roztworu soli fizjologicznej, **ECHO**- echokardiografia (ang. *Echocardiography*), **WMSI**- wskaźnik kurczliwości lewej komory mięśnia sercowego (ang. *Wall Motion Score Index*).



Rycina 33. Ocena zjawisk arytmogennych dla grupy szczurów poddanych badaniom. Indeks arytmii obliczono na podstawie systemu oceny punktowej arytmii przedstawionego w Tabeli 35. Gwiazdki oznaczają poziom istotności statystycznej: Gwiazdki oznaczają poziom istotności statystycznej: *p<0.05.

Skróty: **MI+MbCX43**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano terapeutyczne komórki z nadekspresją koneksyny 43, **MI+MbWT**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane, **MI+0.9%NaCl**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano ekwiwalent objętościowy roztworu soli fizjologicznej.

5. Badania *ex vivo* genów funkcjonalnych odpowiedzialnych za procesy arytmogenne i przebudowę mięśnia sercowego

5.1 Pozyskiwanie materiału biologicznego

W ostatnim dniu eksperymentu (dzień 42) zwierzęta uśmiercano poprzez zabieg dyslokacji kręgów szyjnych. Ze zwierząt pobierano serca, które przemywano trzykrotnie roztworem soli fizjologicznej i oddzielano lewe komory serca. Część pozyskanego materiału przechowywano w roztworze RNALater w -80°C , do późniejszej izolacji RNA (podrozdział 2.3.1) oraz białek (podrozdział 2.4.4), zaś pozostały materiał biologiczny przechowywano w banku ciekłego azotu do dalszych badań, w tym immunohistochemii.

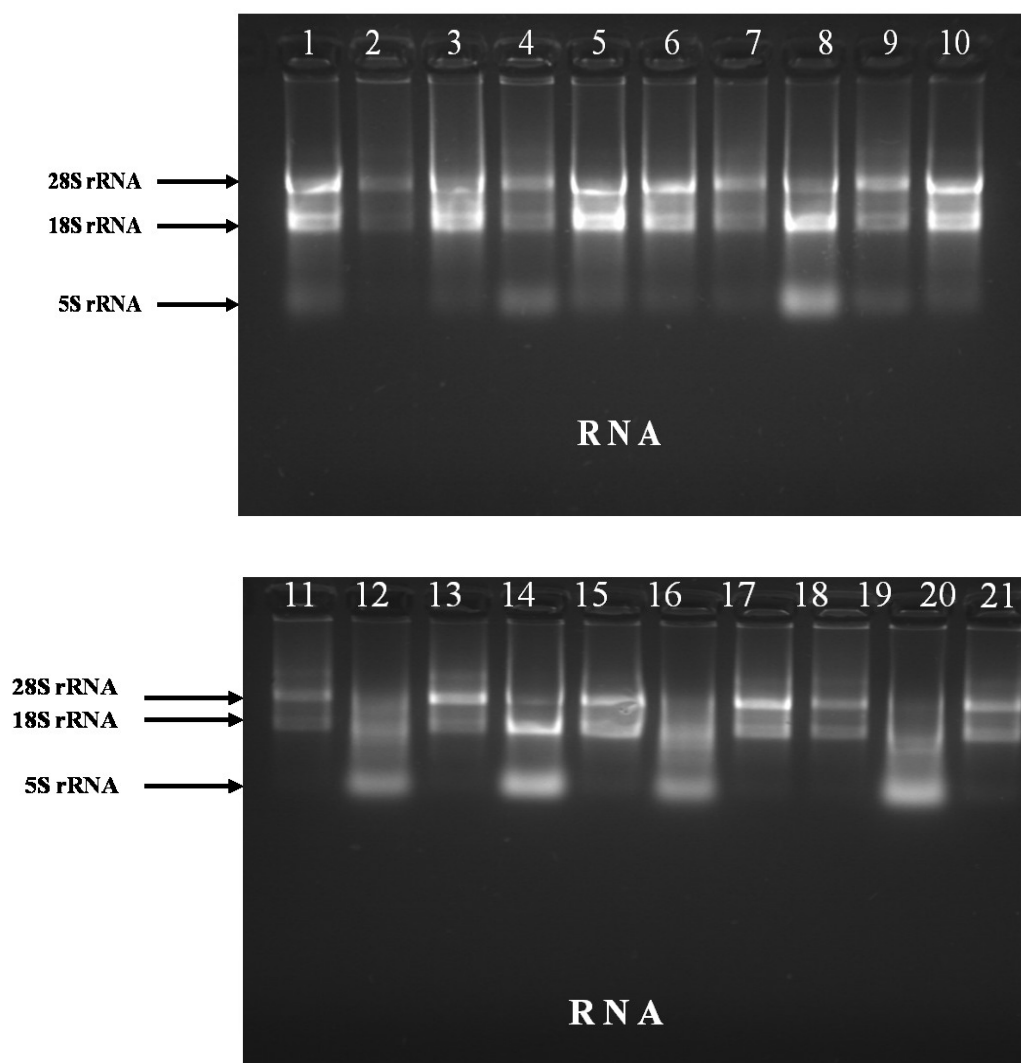
5.2 Ocena ekspresji genów pro-arytmogennych oraz odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę serca po zawale

Równoczesna ekstrakcja RNA i białek z tej samej próbki (z lewej komory serca) ma kluczowe znaczenie dla określenia dokładnych korelacji pomiędzy ekspresją genową i białkową.⁸⁷ Materiał genomowy i białkowy był izolowany z lewych komór serc szczurzych, które fragmentowano i wkładano do 1 ml odczynnika TriReagent. Dalszy opis izolacji znajduje się w podrozdziale 2.3.1 (izolacja RNA) oraz w podrozdziale 2.4.4 (izolacja białek).

5.2.1 Ocena jakości izolowanego RNA

Ocenę jakościową izolowanego RNA przeprowadzano w 1,5 % żelu agarozowym, a ocenę ilościową dokonywano na spektrofotometrze firmy NanoDrop[®]. Zwrócono uwagę na współczynnik 260/280, mówiący o czystości izolowanego RNA (*Rycina 34*). Współczynnik powyżej 1,8 świadczył o braku zanieczyszczeń próbki DNA czy białkami. Takie próbki można było następnie poddać procedurze oczyszczania z pozostałych frakcji RNA a następnie reakcji odwrotnej transkrypcji. Indywidualny wykaz szczurów oraz stężenia wyizolowanego RNA z serca znajdują się w *Tabeli 35*.

O wysokiej jakości próbki RNA świadczyła obecność prążków odpowiadających dwóm podjednostkom rybosomowym 18S i 28S rRNA.



Rycina 34. Obraz rozdziału elektroforetycznego próbek RNA po oczyszczeniu z genomowego DNA. Próbkę od 1-8 (grupa MI+MbCX43); próbki od 9-13 (grupa MI+MbWT); próbki od 14-20 (grupa MI+0.9%NaCl).

Skróty: MI+MbCX43- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano terapeutyczne komórki z nadekspresją koneksyny 43, MI+MbWT- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane, MI+0.9%NaCl- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano ekwiwalent objętościowy roztworu soli fizjologicznej.

Tabela 35. Indywidualny wykaz szczurów oraz stężenia wyizolowanego RNA z serca

Grupa szczurów	Nr próbki	Stężenie [ng/μl]	260/280
MI+MbWT	T 17	737,81	1,96
	T19	59,46	1,98
	T3	1305,29	1,96
	14/10	1639,54	2,0
	T32	35,87	2,03
MI+0.9%NaCl	T25	1037,04	1,80
	T20	723,61	1,80

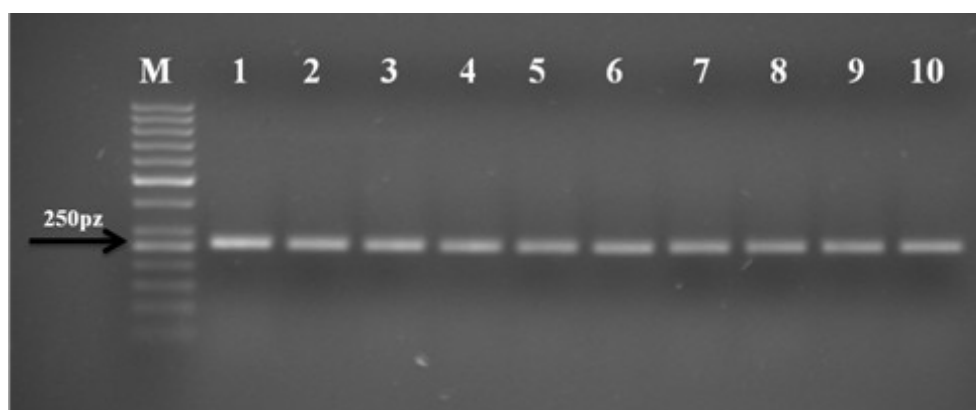
	16/11	1940,88	1,93
	11/9	642,17	1,97
	T26	32,56	1,86
	10/9	1816,55	1,95
	1A	1296,73	2,0
MI+MbCX43	33	1985,45	1,97
	2A/1	949,31	1,99
	3A	1862,95	1,85
	T2	1862,95	1,95
	T29	1236,38	1,83
	T31	719,46	2,0
	T4	1316,76	1,94
	T24	963,14	1,96

Skróty: **MI+MbCX43**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano komórki z nadekspresją koneksyny 43, **MI+MbWT**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane, **MI+0.9%NaCl**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano ekwiwalent objętościowy roztworu soli fizjologicznej.

5.2.2 Weryfikacja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano na oczyszczonym z użyciem mikrosfer Oligo (dT)₂₅ matrycowym RNA wyizolowanym z całej lewej komory serca szczura. Wykonano weryfikację odwrotnej transkrypcji techniką PCR ze starterami specyficznymi dla szczurzego genu referencyjnego *Hprt* (produkt 263 pz). Produkty tej reakcji poddawano następnie rozdzielowi elektroforetycznemu w 2 % żelu agarozowym.

Tak przygotowane i sprawdzone cDNA służyło następnie jako matryca do ilościowego badania ekspresji wybranych genów przy użyciu techniki PCR w czasie rzeczywistym.



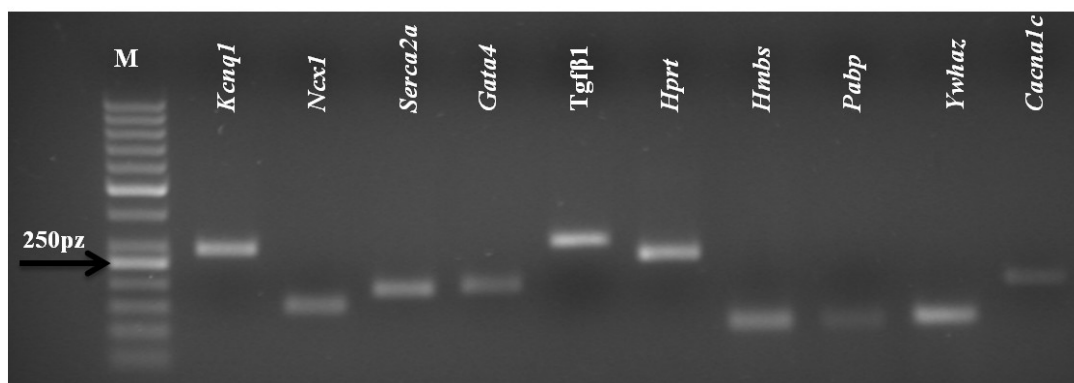
Rycina 35. Przykładowy reprezentatywny obraz rozdzielu elektroforetycznego amplifikowanego genu *Hprt* (263 pz) po przeprowadzonej reakcji odwrotnej transkrypcji i rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym. Wartości 1-10 odpowiadają próbkom izolowanym z lewych komór serc szczurów.

5.2.3 Przygotowanie krzywych standardowych

Dla genów poddanych analizie ekspresji oraz trzech referencyjnych wykonano krzywe standardowe w oparciu o szereg rozcieńczeń liczby kopii DNA od 10^2 do 10^8 cząsteczek w jednym mikrolitrze roztworu.

5.2.4 Amplifikacja sekwencji wybranych badanych genów

Przygotowane cDNA używano do reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych starterów dla wybranych analizowanych genów. Otrzymane produkty PCR rozdzielano w 2 % żelu agarozowym. Rozdział na żelu pozwolił na weryfikację wielkości amplifikowanych produktów zgodnie z oczekiwanymi wielkościami.



Rycina 36. Rodział elektroforetyczny uzyskanych produktów PCR według zaprojektowanych starterów dla wybranych genów, M- markery wielkości 50 pz.

5.2.4.1 Wyznaczenie krzywych standardowych dla badanych genów techniką PCR w czasie rzeczywistym

Krzywe standardowe niezbędne do przeprowadzenia analizy PCR w czasie rzeczywistym przygotowano według opisu znajdującego się w podrozdziale 2.3.5. Oprócz spełnienia określonych warunków, tj. współczynnik korelacji (R^2) bliski 1, nachylenia krzywej (ang. *slope*) w przedziale pomiędzy -3,3 a -3,8, i wydajności reakcji (E) w granicy 80-100 % zwracano również uwagę, aby temperatura topnienia produktów reakcji dla danego genu była bardzo zbliżona pomiędzy kolejnymi powtórzeniami i rozcieńczeniami.

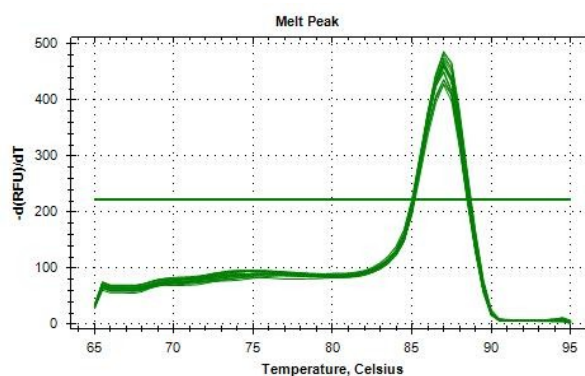
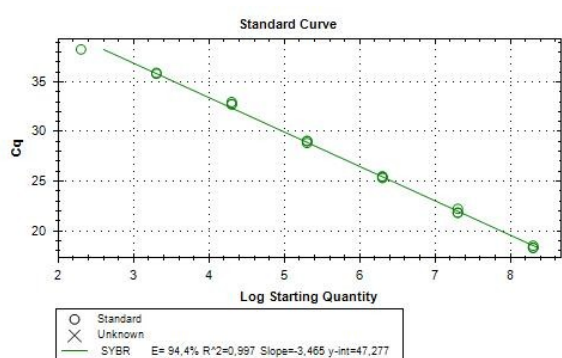
Transkrypty (mRNA) pochodzące z lewych komór serc szczura poddawano analizie ekspresji wobec genów pro-arytmogennych: *Kcnq1*, *Cacna1c*, *Ncx1*, *Serca2a* oraz genów

odpowiedzialnych za występowanie niekorzystnej przebudowy serca po zawale: *Gata* oraz *Tgfb1*. Próby pochodziły z następujących grup szczurów:

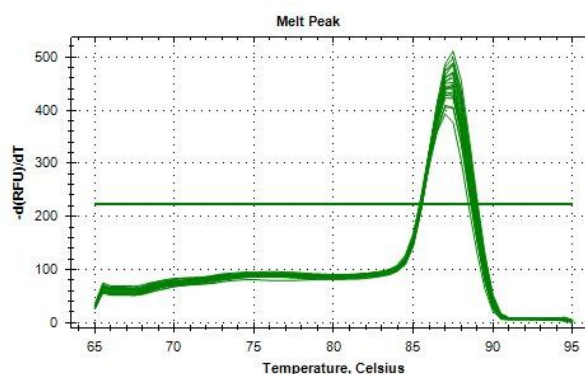
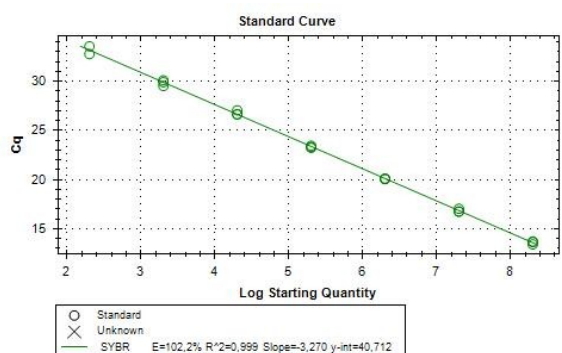
- MI+MbCX43 – szczury, które otrzymały mioblasty z nadekspresją genu koneksyny 43 (MbCX43),
- MI+MbWT- szczury, które otrzymały mioblasty natywne (MbWT),
- MI+0.9%NaCl- szczury, które otrzymały ekwiwalenty objętościowy roztworu soli fizjologicznej (Mb0.9%NaCl)

Analizowano krzywe standardowe oraz krzywe topnienia produktów PCR dla każdego z wyżej wymienionych genów, zarówno badanych, jak i referencyjnych: *Hmbs*, *Pabp*, *Ywhaz*. Temperatury topnienia uzyskiwanych produktów PCR wynosiły odpowiednio: *Kcnq1*=87,5°C, *Cacnalc*=88°C, *Ncx1*=84°C, *Serca2a*=85°C, *Hmbs*=84°C, *Pabp*=80°C, *Ywhaz*=80°C, *Gata4*=88°C, *Tgfb1*=87°C.

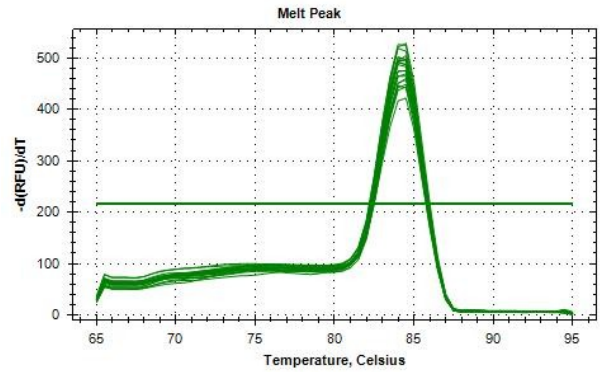
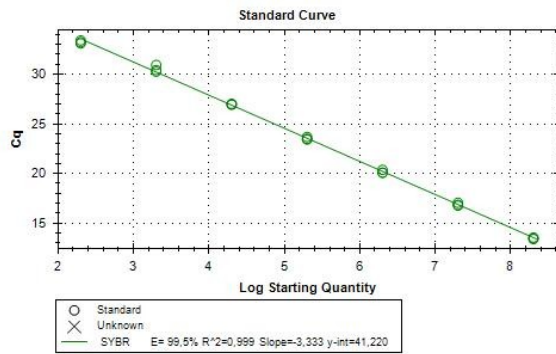
1) *Kcnq1*



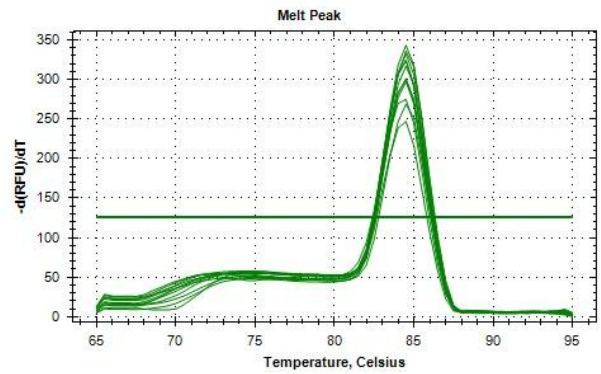
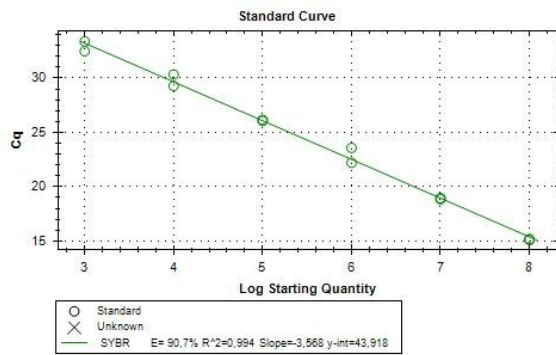
2) *Cacnalc*



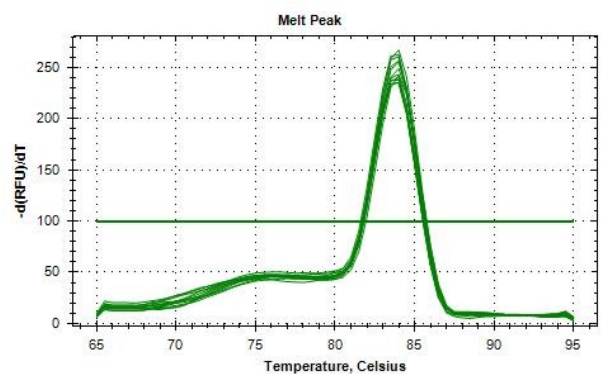
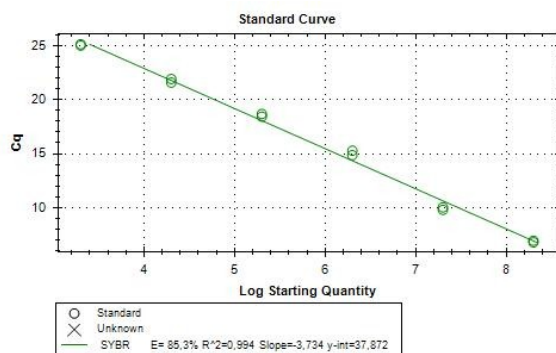
3) *Ncx1*



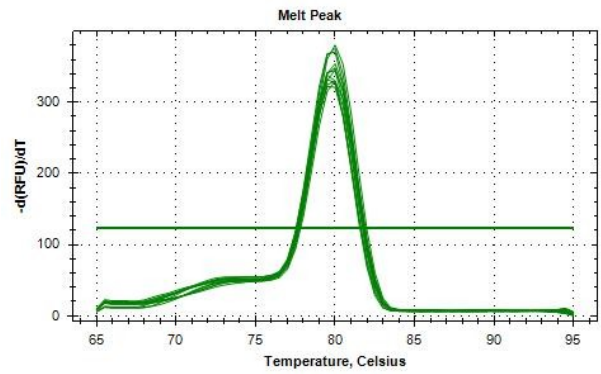
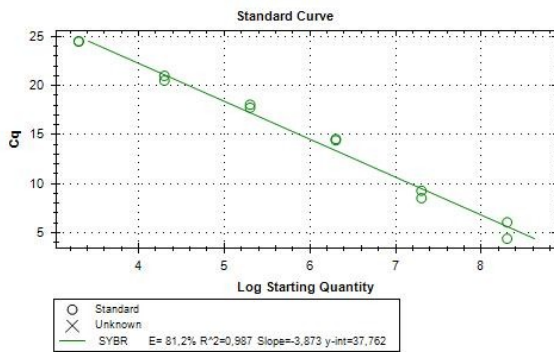
4) *Serca2a*



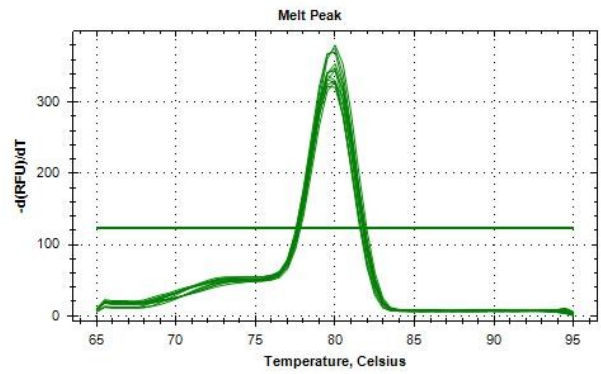
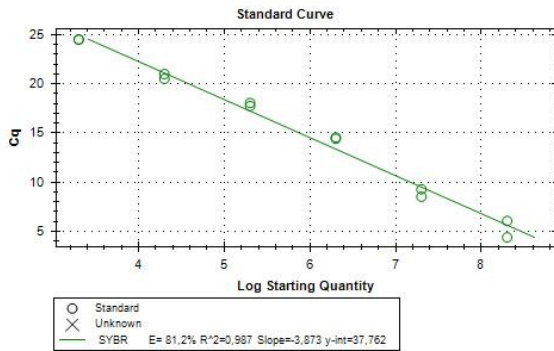
5) *Hmbs*



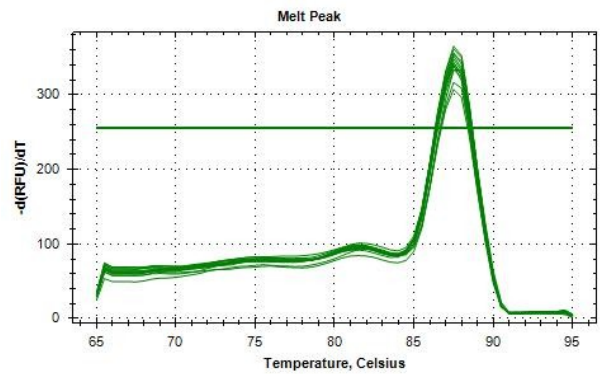
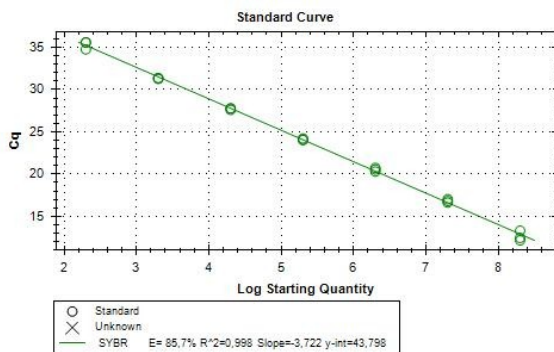
6) *Pabp*



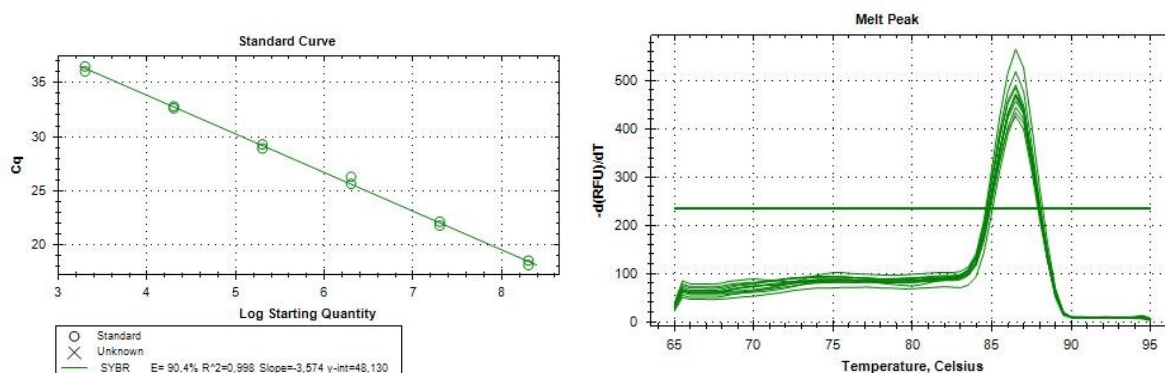
7) *Ywhaz*



8) *Gata4*



9) *Tgfb1*



Rycina 37. Krzywe standardowe oraz krzywe topnienia genów poddanych badaniu: 1) *Kcnq1*, 2) *Cacna1c*, 3) *Ncx1*, 4) *Serca2a*, 5) *Hmbs*, 6) *Pabp*, 7) *Ywhaz*, 8) *Gata4*, 9) *Tgfb1*.

5.2.5 Badanie metodą PCR w czasie rzeczywistym ekspresji genów pro-arytmogennych i odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę serca po zawale

Analizie za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym poddano grupę genów szczurzych odpowiedzialnych za występowanie arytmii w sercu, tj.: genu kodującego kanał potasowy (*Kcnq1*), kanał wapniowy (*Cacna1c*, *Serca2a*), kanał sodowo-wapniowy (*Ncx1*); jak również geny odpowiedzialne za występowanie niekorzystnej pozawałowej przebudowy sercowej, tj.: *Gata4*, *Tgfb1*. Poziom ekspresji genów dla poszczególnych próbek został określony na podstawie wartości cyklu progowego i znormalizowany w oparciu o poziom ekspresji trzech genów referencyjnych (*Hmbs*, *Pabp*, *Ywhaz*) za pomocą programu *GeNorm*.

Podsumowując poziomy ekspresji badanych genów, można zauważyć, że interwencje komórkowe (MbCX43 lub MbWT) powodowały pewne zmiany w ekspresji genów (na poziomie mRNA), a zmiany te były długotrwałe i obserwowane w aspekcie całej lewej komory serca. Zaobserwowano, że ekspresja genów kodujących kanały jonowe była raczej obniżona w grupie szczurów, które poddano terapii genetycznie modyfikowanymi mioblastami (MbCX43) w porównaniu do grupy szczurów z interwencjami za pomocą mioblastów natywnych (MbWT), za wyjątkiem kanału wapniowego typu L (*Cacna1c*). Nie zaobserwowano istotności statystycznych w ekspresji genu *Gata4* pomiędzy badanymi grupami szczurów, jak również zaobserwowano istotne zwiększenie ekspresji genu *Tgfb1* w grupie szczurów MI+MbCX43.

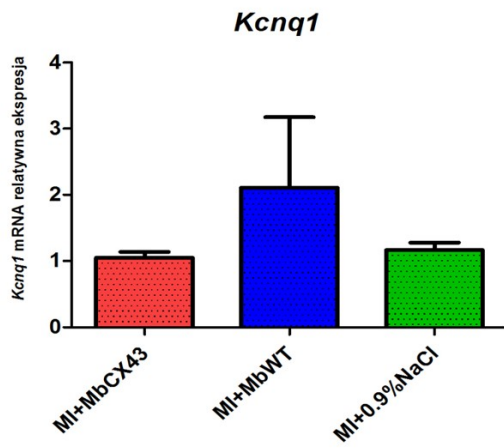
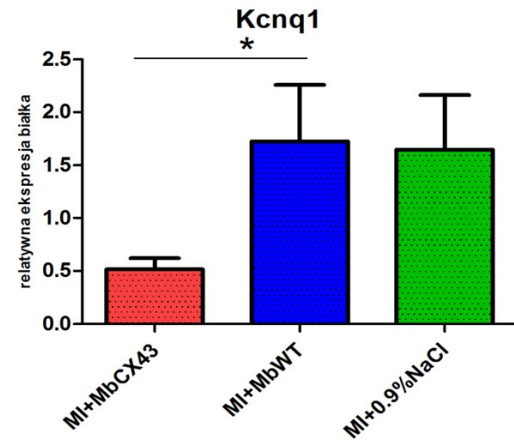
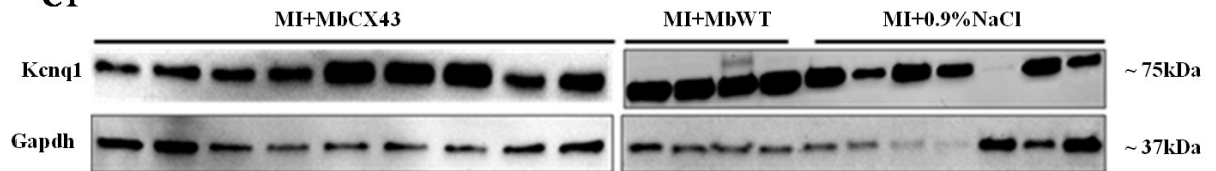
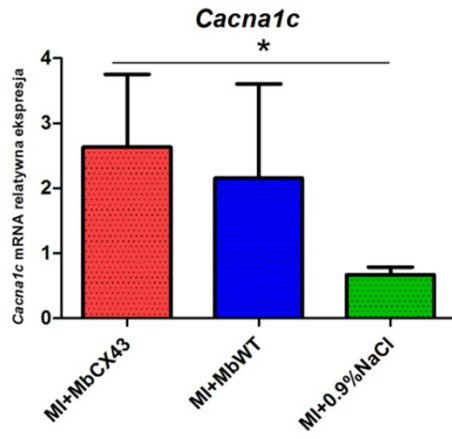
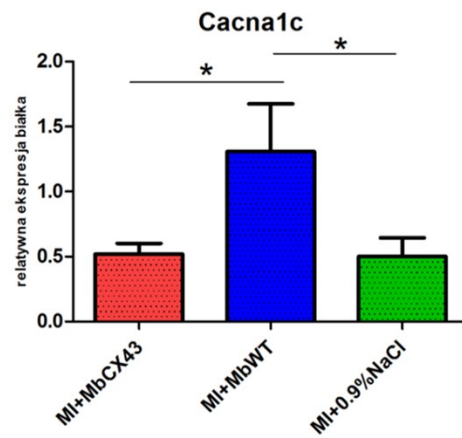
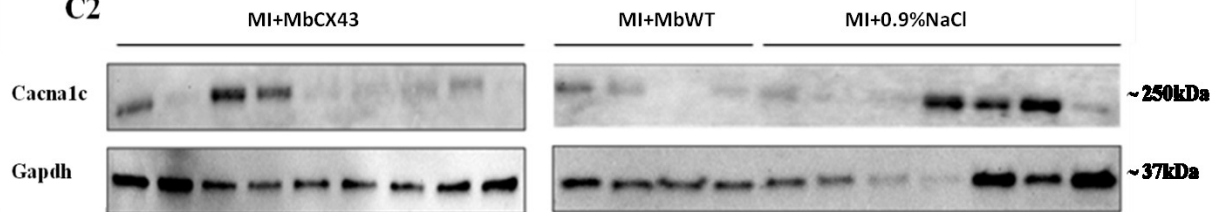
Podsumowując uzyskany profil genetyczny (Rycina 38) był on nieco rozczarowujący z uwagi na fakt, że ujawniony poziom ekspresji genów nie korelował dobrze z oczekiwanymi

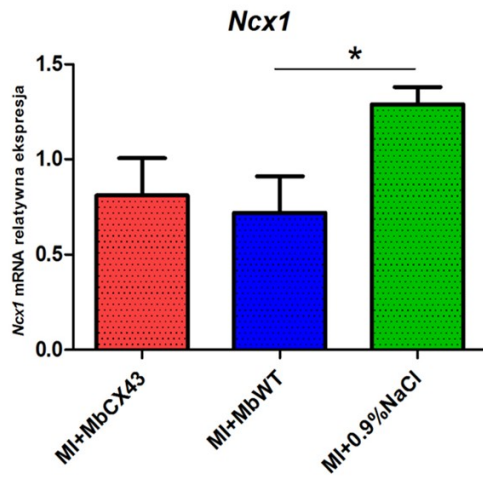
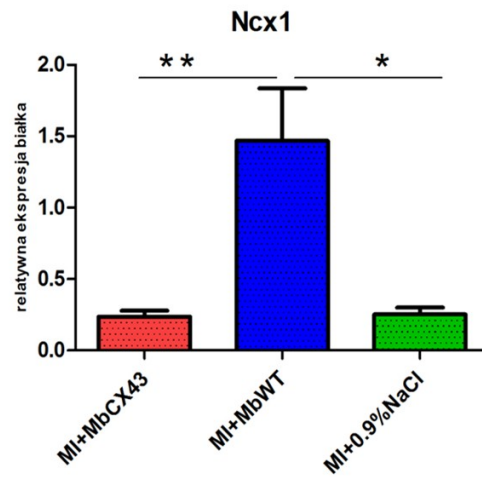
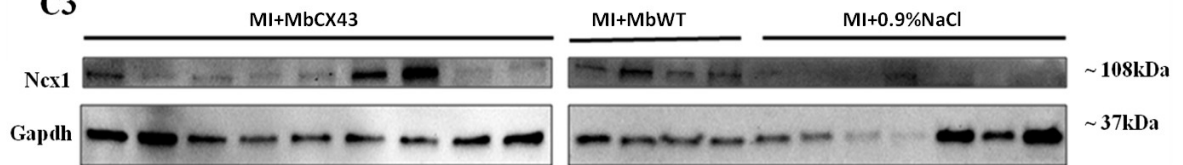
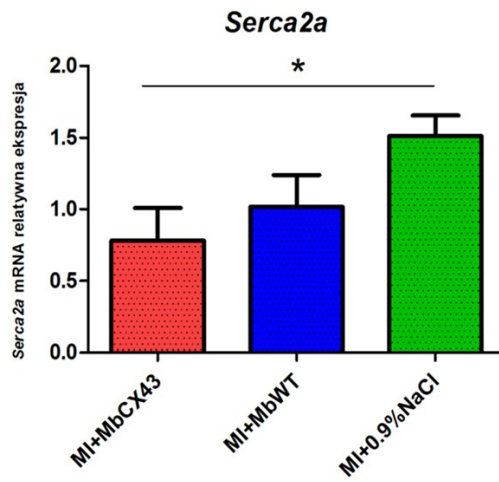
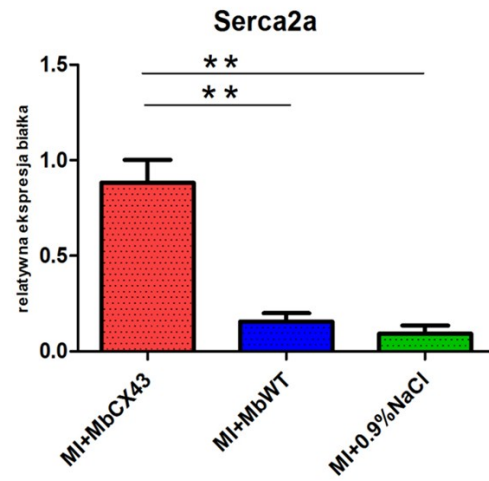
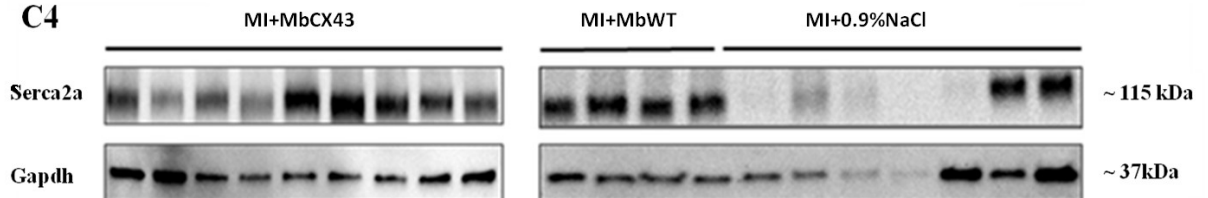
wynikami uzyskanymi z badań czynnościowych *in vivo* (Rycina 33). Należy jednak podkreślić, że krytyczne dla prawidłowego funkcjonowania komórki są raczej białka aniżeli transkrypty mRNA, dlatego też, zbadano poziom korespondujących produktów białkowych za pomocą techniki immunoblotowania typu Western.

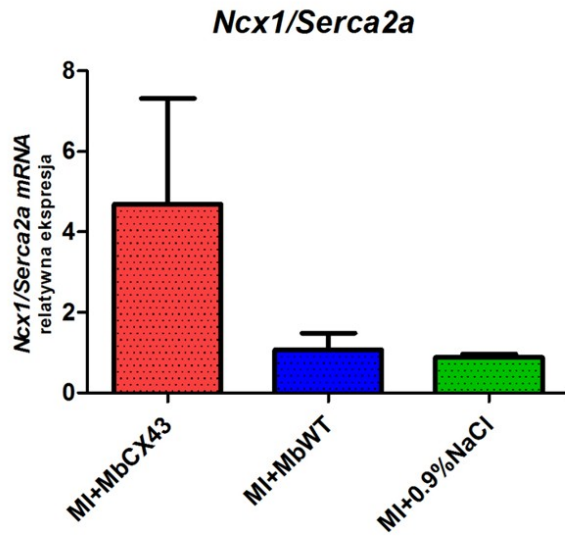
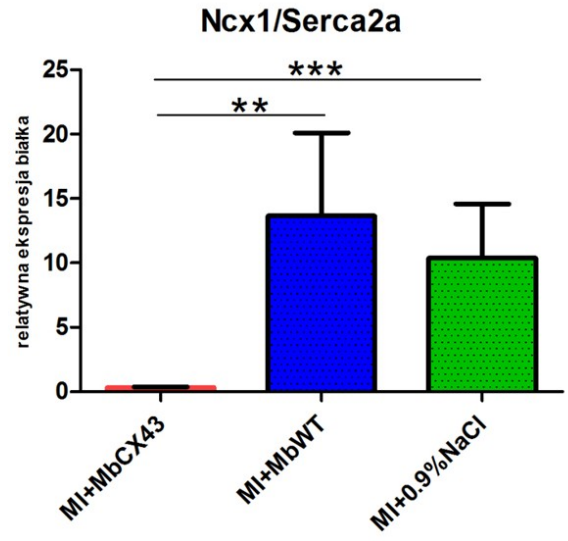
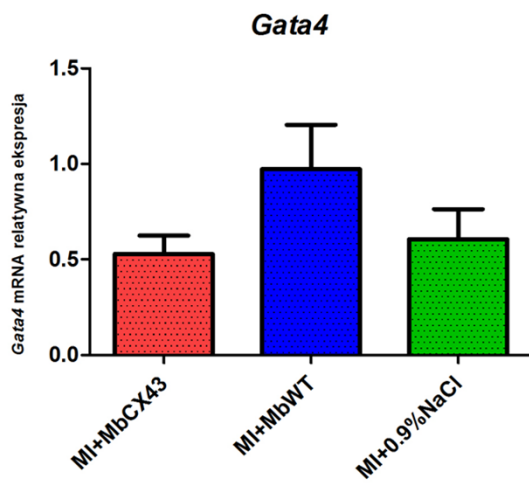
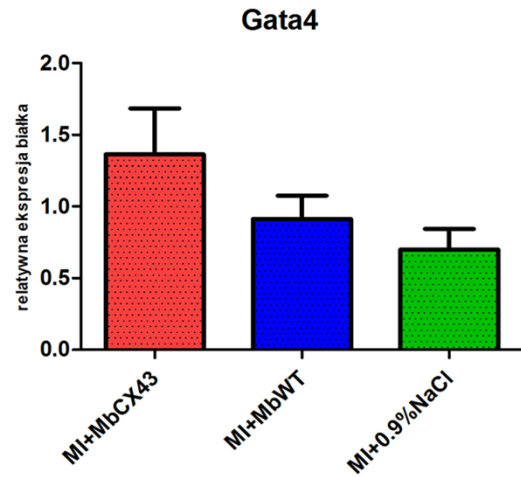
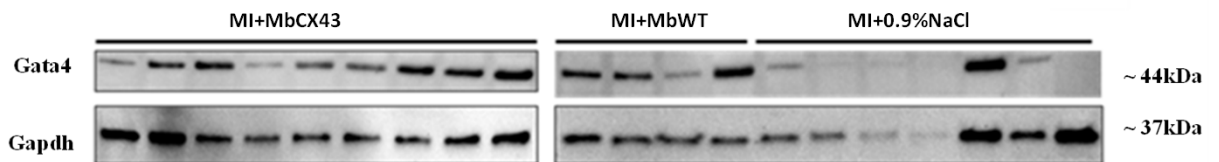
5.2.6 Ocena ekspresji białek pro-arytmogennych oraz odpowiedzialnych za niekorzystną przebudowę serca po zawale

Wyniki uzyskane z reakcji PCR w czasie rzeczywistym były dalej weryfikowane poprzez analizę na poziomie białka techniką immunoblotowania typu Western z ekstraktów białkowych uzyskanych z izolacji całych lewych komór szczurzych w 42 dniu eksperymentu. Analizie poddano 20 próbek: MI+MbCX43 (n=7), MI+MbWT (n=6), MI+0.9%NaCl (n=7). Względny poziom produktu białkowego dla poszczególnych analizowanych próbek był interpretowany wobec poziomu białka w grupie szczurów MI+MbWT i normalizowana w odniesieniu do ekspresji białka referencyjnego Gapdh. Na podstawie analizy można wywnioskować, że interwencje MbCX43 zmieniły ekspresję transbłonowych struktur białkowych formujących kanały dla jonów wapniowych, sodowych i potasowych w sercu szczura. Wyniki wskazują, że u szczurów z interwencjami MbCX43 poziom białek Kcnq1 ($p<0.05$), Cacna1c ($p<0.05$) i Ncx1 ($p<0.01$) obniżył się w stosunku do grupy MI+MbWT. Inne analizowane białko, Serca2a było zaś znacząco podwyższone ($p<0.01$), co może być dowodem na antyarytmiczną ochronę wszczepionych komórek z nadekspresją koneksyny 43 w sercu szczura po zawale. Poziom produktu białka Gata-4 był podwyższony u szczurów poddanych interwencji MbCX43, ale niezmiennie statystycznie. Do analizy ekspresji białka Tgfb1 zastosowano cztery różne przeciwciała, ale nie uzyskano pozytywnych wyników, co może sugerować brak translacji białka w mięśniu sercowym szczura w badanym punkcie czasowym.

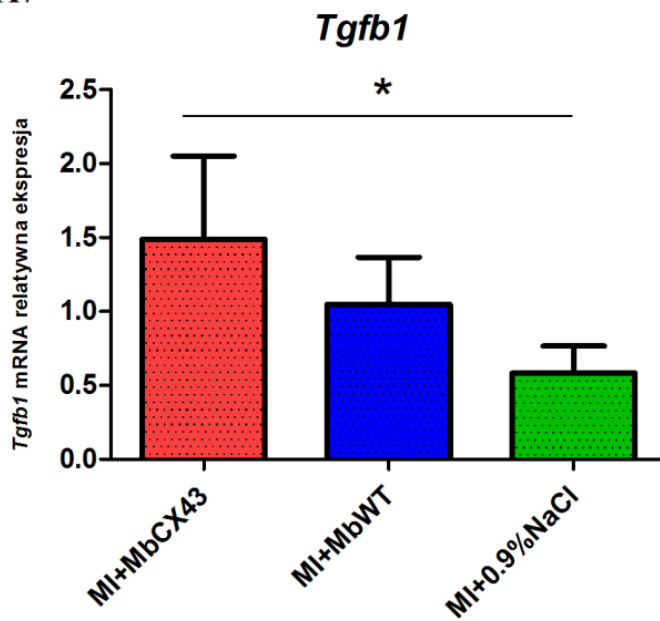
W celu łatwiejszego porównania profilu ekspresji genów i odpowiadającym im produktom białkowym, wszystkie wyniki przedstawiono zbiorczo na Rycinie 38.

A1**B1****C1****A2****B2****C2**

A3**B3****C3****A4****B4****C4**

A5**B5****A6****B6****C6**

A7



Rycina 38. Wykresy przedstawiające długoterminowy wpływ interwencji komórkowych na ekspresję wybranych genów w mięśniu sercowym w 42 dniu po indukcji zawału. Ekspresję wyselekcjonowanych genów znormalizowano wobec trzech genów referencyjnych (*Ywhaz*, *Hmbs*, *Pabp*). Panel A ilustruje ekspresję genów zaś Panel B odpowiedniego produktu białkowego. Panel C ukazuje wykryte białka w próbkach tkanek serca techniką immunoblotowania typu Western. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Skróty: **MI+MbCX43**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano komórki z nadekspresją koneksyny 43, **MI+MbWT**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano mioblasty niemodyfikowane, **MI+0.9%NaCl**- szczury z zawałem mięśnia sercowego, którym podano ekwiwalent objętościowy roztworu soli fizjologicznej.

6. DYSKUSJA

Zawał mięśnia sercowego jest główną przyczyną zgonów ludzi na świecie. Aktualnie żadna standardowa metoda leczenia nie jest w stanie wygenerować *de novo* kurczliwej tkanki serca lub przywrócić funkcjonalność niedokrwionemu miokardium pomimo intensywnego leczenia farmakologicznego i chirurgicznego poprawiającego stan kliniczny pacjentów. Kierując się najnowszym/nowatorskim podejściem terapeutycznym z wykorzystaniem komórek macierzystych opartym na założeniu współistniejących procesów pro-regeneracyjnych odbywających się również w tkance mięśnia sercowego, pokłada się duże oczekiwania i nadzieje.

W literaturze przedmiotu opisano różne źródła komórek macierzystych, tj.: embrionalne, indukowane pluripotencjalne lub dorosłe/tkankowe komórki macierzyste w tym: (mezenchymalne, krwiotwórcze, mięśni szkieletowych, komórki progenitorowe macierzyste serca). Wiele publikacji wskazuje na udane wykorzystanie komórek macierzystych do wzbudzenia regeneracji uszkodzonego miokardium zarówno w modelach zwierzęcych, jak i ludzkich.⁸⁷⁻⁹⁴ Jednak niezbędne są dalsze badania, porównujące skuteczność regeneracyjną komórek różnego pochodzenia, tak by wybrać optymalne źródło dla regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego.

Transplantacja progenitorowych komórek mięśniowych jest obiecującą strategią leczenia niewydolności serca. Jednakże zaistniał duży problem związany z brakiem rozwoju funkcjonalnych połączeń szczelinowych ludzkich mioblastów nie kontaktujących się prawidłowo z kardiomiocytami narządu biernego, co jest niezbędne dla prawidłowego, synchronicznego skurczu. Jest to spowodowane brakiem ekspresji CX43 (funkcjonalnego białka) w dojrzałych miotubach.^{95,96} Zjawisko to jest groźne ze względu na występowanie niebezpiecznych dla życia pacjentów arytmii.⁹⁷ **Oczekuje się, że wytworzenie funkcjonalnych połączeń pomiędzy zmodyfikowanymi genetycznie komórkami (mioblastami z nadekspresją CX43), a kardiomiocytami narządu biernego doprowadzi do prawidłowej komunikacji międzykomórkowej i tym samym zniweluje występowanie zjawisk arytmogennych obserwowanych po transplantacji natywnych mioblastów do pozawałowego mięśnia sercowego. Głównym celem niniejszej dysertacji było sprawdzenie skuteczności genetycznie modyfikowanych ludzkich mioblastów ze**

zwiększoną ilością białka koneksyny 43 w zapobieganiu arytmii, w szczurzym sercu pozawałowym.

6.1 Istota budowy połączeń szczelinowych warunkowanych koneksyną 43

W sercu funkcjonalne koneksyny pośredniczą w połączeniach elektrochemicznych pomiędzy sąsiadującymi kardiomiocytami tworząc szlaki: „komórka–komórka” dla uporządkowanego rozprzestrzeniania się fal pobudzenia elektrycznego, odpowiedzialnego za prawidłowy skurcz. W kardiomiocytach najobficiej występującą izoformą jest koneksyna 43, a zmiany w ekspresji i lokalizacji tego białka obserwowane są w różnych jednostkach chorobowych.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Niedokrwienie, przerost mięśnia sercowego, czy też jego niewydolność, cukrzyca, jak również hipercholesterolemia indukują przebudowę GJs powodując obniżenie ekspresji CX43, zmniejszenie wielkości połączeń szczelinowych pomiędzy miocytami, jak również zwiększoną heterogenność GJs oraz defosforylację CX43. Wspomniane zjawisko defosforylacji nie tylko zmniejsza przewodnictwo elektryczne, ale także przepuszczalność dla cząsteczek chemicznych przepływających pomiędzy kardiomiocytami, będąc powodem niebezpiecznych dla życia arytmii komorowych.¹⁰¹

6.2 Modyfikacja genetyczna mioblastów

Przechowywane w banku ciekłego azotu próbki komórek macierzystych/progenitorowych mięśni szkieletowych były rozmrażane i używane do dalszych doświadczeń. Pierwszym etapem badań była transfekcja *in vitro* ludzkich mioblastów ekspresyjnym plazmidem eukariotycznym pCiNeo-CX43. Ponieważ zastosowanie wektorów wirusowych w terapii genowej wiąże się z szeregiem wyzwań związanych z ich immunogennością, ograniczeniem wielkości wprowadzanego fragmentu DNA, jak również zmienną wydajnością ekspresji transgenu¹⁰¹⁻¹⁰⁴, do transfekcji ludzkich mioblastów wybrano stosunkowo bezpieczną metodę niewirusową–elektroporację. Metoda elektroporacji sprzyja wysokowydajnemu wychwytywaniu DNA przez ludzkie komórki miogenne, co było obserwowane w badaniach w niniejszej pracy, gdyż wśród pozostałych po procedurze komórek żywych odnotowano zadowalający poziom ekspresji GFP, w ok. 87 % (*Rycina 19*). Mimo, że ta metoda transfekcji pociąga za sobą zwiększony odsetek komórek martwych (ok. 50 %), nie miało to dużego znaczenia, gdyż pozbywano się ich kolejnego dnia hodowli *in vitro*. Podobne wyniki dla

mioblastów ludzkich zostały opublikowane w innej pracy, w której stwierdzono, że elektroporacja sprzyja wysokowydajnemu wychytowi DNA przez ludzkie komórki miogenne, jednak wydajność tego procesu była niższa niż obserwowana w niniejszych badaniach i wynosiła ok. 60-70 %.¹³⁰

6.2.1 Charakterystyka zmodyfikowanych genetycznie ludzkich mioblastów

6.2.1.1 Badanie poziomu ekspresji miogennych czynników transkrypcyjnych

Badanie poziomów mRNA czynników transkrypcyjnych miogennych: *MYOD*, *MYF5*, *MYOG*, *MYHCI* wykazało istotne statystycznie ($p < 0.05$) obniżenie ekspresji trzech genów: *MYOD*, *MYOG*, *MYHCI* (w mioblastach ludzkich) pod wpływem transfekcji. Zaobserwowano także nieco zwiększony poziom ekspresji genu *MYF5*, ale był on statystycznie nieistotny ($p > 0,05$).

Miogenina kodowana przez gen *MYOG* uaktywnia się szczególnie w komórkach różnicujących się i tworzących miotuby, a więc w końcowych etapach miogenezy.¹⁰⁶ W komórkach transfekowanych wektorem pCiNeo-CX43 zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji genu *MYOG* (w porównaniu z komórkami natywnymi, MbWT) co może być zjawiskiem korzystnym, ponieważ spadek ekspresji świadczyć może o wydłużeniu etapu proliferacji komórkowej, jednocześnie spowalniając formowanie dojrzałych włókien mięśniowych. Jednak można przypuszczać, że na obniżenie ekspresji *MYOG* miało także wpływ samo przeprowadzenie elektroporacji, gdyż gen ten uległ obniżeniu również w grupie transfekowanej pustym wektorem (MbpCiNeo). Otrzymane wyniki mogą jednakże sugerować, że przeszczepione komórki efektywniej uzupełnią braki powstałe podczas zawału mięśnia sercowego, gdyż po ich przeszczepieniu można spodziewać się dalszej ich proliferacji oraz towarzyszącej produkcji białka CX43, co może być istotne w terapii pro-regeneracyjnej pozawałowego mięśnia sercowego.

6.2.1.2 Badanie poziomu koneksyny 43

Badanie efektywności funkcjonalnej mioblastów z nadekspresją koneksyny 43 w celu polepszenia ich komunikacji z kardiomiocytami było przedmiotem badań kilku zespołów. Reinecke i wsp. sprawdzali sprzężenie elektromechaniczne kardiomiocytów z wszczepionymi do serca mioblastami.⁹⁵ Głównym wnioskiem z ich badań było stwierdzenie, iż mioblasty szkieletowe charakteryzują się znacznym poziomem ekspresji N-kadheryny oraz koneksyny 43, jednak ekspresja tych dwóch białek ulegała obniżeniu w czasie procesu różnicowania w miotuby. To zaś z kolei prowadziło do problemów w uformowaniu się połączeń elektromechanicznych z kardiomiocytami gospodarza, niezbędnymi dla synchronicznych skurczów serca wraz z przebudową komunikacji międzykomórkowej.

Inni, w badaniach na szczurzych mioblastach linii L6 wykazali, że transplantacja MbCX43 skutkowała poprawą w tworzeniu funkcjonalnych połączeń międzykomórkowych typu szczelinowego, co może być istotne dla synchronicznego skurczu przeszczepianych mioblastów do serca. Ponadto, komórki te wykazywały szybsze różnicowanie, mogłyby to w pewnych sytuacjach być korzystne w terapii pro-regeneracyjnej pozawałowego mięśnia sercowego.¹⁰⁷

W 2007 roku ukazała się w *Nature* kolejna publikacja, w której autorzy donosili, iż transplantacja embrionalnych kardiomiocytów do mięśnia sercowego po zawale u myszy znacznie zmniejszała występowanie tachykardii komrowych wywoływanych sztuczną ich stymulacją *in vivo*.¹⁰⁸ Wszczepienie eCM skutkowało ponadto lepszym sprzężeniem elektromechanicznym pomiędzy kardiomiocytami otaczającymi obszar zawału, zwiększając prędkość przewodzenia pomiędzy komórkami. Co więcej, wykazano, że MbCX43 zapewniały podobną ochronę co eCM przed indukowanym częstoskurczem komorowym w pozawałowym sercu myszy (jakkolwiek serce myszy jest kwestionowanym modelem badania arytmii mięśnia sercowego).

Podobne badania wykonano w 2009 roku, w których transplantowano autologiczne miocyty.⁹⁷ Siedem dni po ligacji odgałęzienia lewej tętnicy wieńcowej, szczury podzielono losowo na trzy grupy: a) grupę kontrolną, która otrzymała mioblasty natywne, b) grupę 'zerową' z mioblastami transdukowanymi pustym wektorem lentiwirusowym oraz c) grupę, która otrzymywała mioblasty z nadekspresją koneksyny 43 (transdukcja wektorem lentiwirusowym). Jednak w tym przypadku występowanie zjawisk arytmogennych nie różniło

się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami (odpowiednio 58 %, 64 % i 48 % dla grupy kontrolnej (n=12), zerowej (n=14) i z nadekspresją CX43 (n=23). Wykorzystując monitorowanie potencjału czynnościowego mono-fazowego w badaniach *in vivo* obserwowano synchroniczną aktywność elektryczną pomiędzy mioblastami z nadekspresją koneksyny 43 a kardiomiocytami narządu biorczego, podczas gdy taka synchronizacja nie występowała w grupie z mioblastami transdukowanymi pustym wektorem. Sugeruje to, że transplantacja mioblastów z nadekspresją CX43 *ex vivo* poprawiła międzykomórkowe sprzężenie elektrochemiczne mioblastów z kardiomiocytami gospodarza, jednak w ich obserwacjach uzyskane sprzężenie elektryczne nie było wystarczające do istotnego zmniejszenia zjawisk arytmii w sercu.

Badaniem kurczliwości pozawałowego mięśnia sercowego zajęli się również Giuard i wsp., którzy zastosowali podobną terapię miogennymi komórkami macierzystymi. Po dwóch tygodniach od zaindukowania MI, dorosłe szczury zostały podzielone na trzy grupy: pierwsza z nich otrzymała mioblasty (n=8), druga grupa otrzymywała roztwór medium (n=6), a trzecia należała do grupy kontrolnej 'sham'. Na podstawie badania echokardiograficznego badacze ocenili czynność serca, jak również skurcz z wyizolowanych kardiomiocytów przy użyciu systemu Langendorfa. Zaobserwowali oni pogorszenie frakcji wyrzutowej (ang. *Ejection fraction*, EF) u samic szczurów, którym wstrzyknięto roztwór medium oraz w grupie 'sham', (odpowiednio: od $40,7 \pm 11,4$ % do $33 \pm 5,5$ % i od $41,8 \pm 8$ % do $33,5 \pm 8,3$ %), natomiast w grupie szczurów z mioblastami wartość ta była ustabilizowana (od $35,9 \pm 6$ % do $36,4 \pm 9,7$ %).¹⁰⁹

Inni badacze: Abraham i wsp. przeprowadzili podobne badania z wykorzystaniem mioblastów z nadekspresją koneksyny 43 (modyfikacja z użyciem stabilnego wektora lentiwirusowego) i dowiedli, iż komórki te zmniejszyły arytmogenność w hodowlach *in vitro* prowadzonych z miocytami sercowymi. W naszym badaniu zastosowaliśmy metodę transfekcji bezwirusowej, która wprawdzie jest przejściowa, ale wydaje się być bezpieczniejsza, w przypadku zastosowania jej u ludzi.⁵⁶

W niniejszej pracy, w ramach rozprawy doktorskiej, przeprowadzono podobny eksperyment, ale w znacznie bardziej istotnym kontekście pod względem klinicznym. Założeniem badań była próba eliminacji arytmogennych właściwości mioblastów dla potencjalnego ich

wykorzystania w terapii pozawałowego mięśnia sercowego. W tym celu do pozawałowych serc szczurów rasy Wistar wszczepiano ludzkie mioblasty z nadekspresją CX43 w celu sprawdzenia czy wszczepiane komórki wykażą antyarytmiczny charakter.

We wcześniejszych badaniach (*in vitro*) przeprowadzonych w naszym Zakładzie wykazano, że ludzkie genetycznie modyfikowane mioblasty (MbCX43) wywierały pozytywny wpływ na biologię i funkcję komórek macierzystych pochodzenia miogenne (*in vitro*), co również udowodniono w niniejszej pracy (*Rycina 25*), co więcej, we wcześniejszych naszych badaniach wykazaliśmy pozytywny wpływ wszczepianych komórek (ludzkich mioblastów) na mysie serce po zawale (*in vivo*) w aspekcie hamowania niekorzystnej jego przebudowy.¹¹⁰

Zapewne słabszą stroną przedstawionych badań jest fakt, że nie badano kurczliwości mięśnia sercowego zarówno przed wywołaniem zawału mięśnia sercowego jak i po jego indukcji, oraz równolegle po interwencyjnej iniekcji komórek/ ekwiwalentu roztworu soli fizjologicznej, co wzbogaciłoby wartość merytoryczną niniejszej pracy. Niemniej, założeniem pracy była weryfikacja antyarytmicznego charakteru ludzkich komórek progenitorowych z nadekspresją CX43 w sercu pozawałowym i bezpieczeństwo ich stosowania, nie zaś wykazanie potencjalnych możliwości pro-regeneracyjnych.

Jednym z celów było uzyskanie pierwotnej zawiesiny ludzkich mioblastów z nadekspresją genu kodującego koneksynę 43 i sprawdzenie, czy taka nadekspresja może być odzwierciedlona zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Otrzymano wysoką ekspresję na poziomie mRNA (około 40-krotnie wyższą niż w nietransfekowanych próbach kontrolnych), a także na poziomie białka, którego było 4-krotnie więcej w porównaniu do poziomu w kontrolnych komórkach typu dzikiego (MbWT). Stosując szczurzy model niedokrwiennego serca, wykazano, że transplantacja ludzkich mioblastów z nadekspresją koneksyny 43 zapobiegała rozwojowi spontanicznych zjawisk arytmogennych (*Rycina 33*).

Powyższe badania wydają się uzupełniać wcześniej otrzymane w naszym Zakładzie w modelu mysim wyniki dotyczące tworzenia połączeń typu szczelinowego pomiędzy MbCX43 a kardiomiocytami.¹¹⁰ Wydaje się, więc że zastosowana przejściowa metoda modyfikacji genetycznej mioblastów (z nadekspresją CX43) jest odpowiednia do przeprowadzania prospektywnych prób klinicznych dla niwelowania arytmii.

6.3 Sposoby implantowania komórek

Ważnym czynnikiem decydującym o sukcesie terapii komórkami macierzystymi w sercu jest wybór drogi dostarczania komórek. Wpływa to na ich los i zasiedlanie się, co ma swoje odzwierciedlenie w wynikach takiej interwencji. Jednakże, obecnie nie ma jednej optymalnej drogi dostarczania komórek odpowiedniej dla każdego stanu chorobowego serca i/lub każdego typu komórki macierzystej. Obecnie dwiema głównymi technikami skutecznego dostarczania komórek do mięśnia sercowego są: **infuzja komórek do pozawałowej tętnicy wieńcowej** oraz **bezpośrednia iniekcja (intramiokardialna) komórek macierzystych w obrębie blizny pozawałowej**. Chociaż obie metody mają swoje zalety, retencja komórek oraz ich przeżycie w miokardium są niezadowalające, ograniczając ich potencjalne działanie terapeutyczne.

Idealna metoda dostarczenia komórek macierzystych musiałaby spełniać następujące kryteria: a) wszczepione komórki powinny w znacznej liczbie przeżyć w narządzie docelowym, zachowując swoje kluczowe funkcje; b) procedura dostarczania komórek nie powinna powodować uszkodzenia mięśnia sercowego; c) powinna być dobrze tolerowana przez pacjentów z ciężką niewydolnością serca i nie powodować (lub ograniczać występowanie) skutków ubocznych; d) metoda powinna być dostępna dla większości szpitali bez konieczności wyposażania ich w dodatkowe urządzenia, co znacznie zwiększyłoby koszty przeprowadzonych interwencji; e) powinna być technicznie prosta i możliwa do wykonania przez większość kardiologów. Byłoby także korzystne, gdyby technika dostarczania komórek miała zastosowanie dla różnych typów komórek macierzystych oraz w wielu sytuacjach chorobowych, począwszy od pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego do stanu chronicznego serca po zawale odległym w czasie.

Niestety, na chwilę obecną żadna metoda podawania komórek macierzystych do serca pozawałowego nie spełnia wyżej wymienionych kryteriów. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy promocyjnej wybrano **metodę bezpośredniej iniekcji do mięśnia sercowego**, dzięki której zawiesiny komórek macierzystych są bezpośrednio lokowane w mięśniu sercowym oraz w pożądanej okolicy (miejsce pozawałowe). Umożliwia to ukierunkowanie komórek na obszar graniczny zawału, tzw. *border zone*, ponieważ strefa ta ma duży wpływ na przebudowę komory serca po MI. Ponadto strefa graniczna cechuje się lepszym ukrwieniem, co zapewnia lepsze przeżycie komórek w sercu pozawałowym.

Dotychczasowa liczba badań przedklinicznych przeprowadzonych na małych zwierzętach pozwala stwierdzić, iż wykorzystywanie techniki bezpośredniej iniekcji dokardialnej jest właściwym wyborem. Co więcej, metoda ta była również stosowana w badaniach klinicznych¹¹¹, gdyż bezpośrednia iniekcja komórek nie powoduje ryzyka wystąpienia zatoru wieńcowego, zatem perfekcyjnie nadaje się do podawania większych objętościowo komórek macierzystych, takich jak mioblasty, czy mezenchymalne komórki macierzyste.

Z kolei infuzja dowieńcowa jest szeroko stosowaną metodą w autologicznych przeszczepach komórek macierzystych szpiku kostnego (przechodzących przez naczynia) u pacjentów w stanie ostrym, natomiast w przewlekłym niedokrwieniu, bezpośrednia iniekcja narządowa, wydaje się zapewniać lepsze wyniki kliniczne.¹¹² Vrtovec i wsp. wykonali pierwsze badanie transplantacji komórek do pozawałowej tętnicy wieńcowej metodą przezwieńcową uzyskując wyższe wskaźniki retencji komórek w mięśniu sercowym i większą poprawę funkcjonalną u pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak metody bezpośredniej iniekcji do mięśnia sercowego zwykle przeprowadzano w próbach klinicznych w połączeniu z operacją na otwartym sercu, np. podczas pomostowania aortalno-wieńcowego (ang. *Coronary Artery Bypass Graft*, CABG) lub implantowania urządzenia wspomagającego funkcjonowanie lewej komory serca.

Również w modelu mysim badano dynamikę przeżycia wszepionych komórek macierzystych metodą bezpośredniej iniekcji w mięsień sercowy. Dziesięć minut po wstrzyknięciu komórek w mięsień sercowy około 40 % początkowej ilości komórek było obecnych w narządzie bioczym, po czym wartość ta zmniejszyła się do około 15 % w ciągu 24 godzin od podania i spadła poniżej 10 % po przekroczeniu doby.¹¹³

Nie są to wyniki zadowalające, jednak **jako że mioblasty nie mają zdolności przenikania przez ścianę naczyń krwionośnych, wybór przedsięwziętej metody, bezpośredniego wszczepiania ich do pozawałowego mięśnia sercowego wydawał się być bezdyskusyjny.**

6.4 Barwienia immunohistochemiczne

Aktyna mięśni gładkich jest białkiem, które występuje w mioblastach w okresie embrionalnym, w miofibroblastach oraz w naczyniach mięśni gładkich. Badaniem obecności tego białka zajmował się Springer i wsp., którzy zaobserwowali, że zarówno w pierwotnych

mioblastach izolowanych z mięśni szkieletowych nowonarodzonych myszy oraz w mioblastach linii C2C12 (po ich hodowli w medium różnicującym) komórki te potrafią produkować SMA przez okres kilku godzin.¹¹⁴ Poprzez implantacje mioblastów do mięśni szkieletowych myszy zaobserwowano, że SMA jest obecne tylko przez okres 9-ciu dni od momentu implantacji co świadczy o jego braku w dojrzałych miotubach.

Na *Rycinie 31, Panel B* znajdują się wyniki pozytywnego odczynu barwnego osiągniętego przy użyciu specyficznego przeciwciała przeciwko aktynie SMA. Jak widać na dokumentacji zdjęciowej, wybarwione komórki w żaden sposób nie przypominają morfologią miofibroblastów, czy komórek naczyń mięśni gładkich. Wyniki z przeprowadzonych barwień immunohistologicznych wykazały, że ekspresja białka SMA występowała w miotubach zróżnicowanych z MbCX43 w miesiąc po ich implantacji, w okolicę blizny pozawałowej. Co więcej, cechą która pozwoliła wysunąć bezdyskusyjny wniosek o typie obecnych w pozawałowym sercu szczura ludzkich komórek są wyraźnie widoczne na zdjęciach poprzeczne prążkowania, charakterystyczne jedynie dla komórek mięśni szkieletowych (nie dla miofibroblastów, czy komórek mięśni gładkich).

Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami innych autorów, którzy uwidocznili wszczepione natywne mioblasty do pozawałowego mięśnia sercowego szczurów rasy Wistar. Odczyny histologiczne zostały wykonane podobnie jak w niniejszej pracy doktorskiej, tj. w miesiąc po ich implantacji do serca pozawałowego. Za pomocą immunohistochemicznego barwienia przeglądowego z użyciem hematoksyliny i eozyny uwidoczniono wydłużone, wielojądrzaste struktury typowe dla miotubul i włókien mięśniowych. Komórki te znajdowały się wzdłuż długiej lub krótkiej osi serca, oraz w granicznych obszarach zawału serca. Immunobarwieniem z przeciwciałem przeciwko zarodkowemu ciężkiemu łańcuchowi miozyny (ang. *Embryonic myosin heavy chain*, EMHC) stanowiącym swoisty marker mioblastów szkieletowych ujawniono zarówno małe, jak i wydłużone komórki w obszarze pozawałowym u szczurów, którym wstrzyknięto pierwotne komórki mioblastów. Natomiast barwienie na obecność desminy ujawniło obecność tkanki otaczającej wyspy komórek mięśni szkieletowych w granicznych strefach zawału. Co ciekawe, nie zidentyfikowano mioblastów, miotubuli i włókien mięśniowych, które tworzyły się w pozawałowym sercu z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko koneksynie 43. Podsumowując, wszczepione mioblasty identyfikowano w obrębie i na brzegach włóknistej blizny pozawałowej poprzez ich pozytywne barwienie dla EMHC i desminy, co umożliwiło ich odróżnienie od

otaczających kardiomiocytów gospodarza. Jednak nie udało się ukazać sprzężenia koneksynowego z komórkami narządu biorczego (barwienie przeciwko koneksynie 43).¹¹⁵

Dzięki wykonanym barwieniom immunohistochemicznym przedstawionym w niniejszej pracy (*Rycina 31* i *Rycina 32*) po raz pierwszy udało się wykazać, że oba rodzaje przeszczepionych ludzkich mioblastów (natywne i modyfikowane koneksyną 43) były obecne w tkance pozawałowego serca w miesiąc po ich implantacji. Zwrócić należy szczególną uwagę na sposób ułożenia wszczepianych komórek. Na *Rycinie 31, Panel B*, zaobserwować można, że wszczepione „natywne” mioblasty były rozproszone, podczas gdy MbCX43 były ułożone w typowe równoległe i uporządkowane struktury utworzone przez kardiomiocyty. Wydaje się, że przeprowadzona modyfikacja genetyczna mioblastów spowodowała, że komórki z nadekspresją koneksyny 43 mogły łatwo łączyć się ze sobą i z otaczającymi je kardiomiocytami tworząc funkcjonalne syncytium, i być może polepszać przez to funkcję kurczliwą i LV (ang. *Left ventricle*, LV) serca. Polepszona funkcja kurczliwości zmniejszała prawdopodobnie rozkurczowy stres ścian, który jest głównym czynnikiem wyzwalającym niekorzystną przebudowę serca, zarówno na poziomie narządowym, komórkowym jak i molekularnym. W pracy Butter i wsp. wykazano, że zwiększona kurczliwość spowodowana zastosowaniem terapii modulacyjnej kurczliwości serca (ang. *Cardiac Contractility Modulation*, CCM) wywołało zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w regulację homeostazy wapnia i zjawiska arytmii (tj. *Ncx1*, *Serca2a*, *RyR*) już w 2 godziny po zainicjowaniu sygnału modulującego w obszarze elektrod. Po 3 miesiącach leczenia CCM zarówno lokalne, jak i odległe miejsca od zawału wykazały taką samą poprawę poziomu ekspresji białka.¹¹⁶

Co więcej, stres ściany jest głównym regulatorem syntezy peptydu natiuretycznego typu B (ang. *NT-proB-type Natriuretic Peptide*, BNP) w kardiomiocytach komorowych. Stwierdzono, że ekspresja *Serca2a* jest negatywnie regulowana przez BNP prawdopodobnie poprzez szlak zależny od Ca^{2+} .¹¹⁷ Jest możliwe, że mioblasty modyfikowane koneksyną 43 zwiększając kurczliwość mięśnia sercowego LV, zmniejszały stres ścian komórki i syntezę BNP, co prowadziło do wzrostu ekspresji *Serca2a* stwierdzonej w grupie szczurów z interwencją MI+MbCX43. Ponadto, zwiększona ekspresja białka *Serca2a* powoduje zwiększenie zawartości Ca^{2+} w SR, amplitudę przejściowego Ca^{2+} i skracanie komórek. Zwiększona siła skurczu poszczególnych kardiomiocytów poprawia funkcję LV i dodatkowo zmniejsza napięcie ściany rozkurczowej, co może sprzyjać regulacji ekspresji innych genów.

Podsumowując, można wnioskować że mioblasty wzbogacone w koneksynę 43 znacznie lepiej tworzą funkcjonalne syncytium kardiomiocytów niż natywne, co może mieć swoje odzwierciedlenie w poprawie kurczliwości, zmniejszeniu stresu ściany, promując korzystne zmiany w ekspresji genów pro-arytmogennych i ostatecznie obniżając wskaźnik arytmii serca po niedokrwieniu.

6.5 Przebudowa funkcjonalna niewydolnego mięśnia sercowego

W niewydolności serca dochodzi do wielu zmian w jego funkcjonowaniu a także, jak się okazuje, w ekspresji genów kodujących jednostki strukturalne kanałów jonowych, które są zaangażowane w kształtowanie potencjału spoczynkowego i wysiłkowego serca. Zmiany w ich ekspresji określane są jako przebudowa elektrofizjologiczna serca, co często skutkuje występowaniem arytmii w niewydolnym mięśniu sercowym.¹¹⁸ Zsynchronizowane skurcze serca zależą od odpowiedniego tworzenia i rozprzestrzeniania się aktywności elektromechanicznej. Podstawową jednostką tego działania jest potencjał czynnościowy, który tworzony jest przez wyspecjalizowane białka (kanały jonowe i transportery), kontrolujące przepływ jonów przez błony komórkowe miocytów sercowych.¹¹⁹ Choroby serca modyfikują działanie tych cząsteczek, sprzyjając występowaniu arytmii. Nieregularny rytm mięśnia sercowego powoduje dalsze patofizjologiczne implikacje, które przyczyniają się do zwiększonej śmiertelności u ludzi.

Zagrażające życiu zaburzenia rytmu serca wywołane niedokrwieniem obejmują częstoskurcz komorowy i migotanie komór (głównie pochodzenia pierwotnego). Większość takich zdarzeń jest zapoczątkowana przez (1) dodatkowe rytmy skurczowe komory (wyzwalacz), które współlistnieją ze (2) sprzyjającymi warunkami elektrofizjologicznymi (tzw. substrat elektrofizjologiczny, tj.: czas trwania heterogenicznego potencjału czynnościowego oraz zmniejszona prędkość przewodzenia komorowego). Stymulujące rytmy są wyzwalane przez wczesne depolaryzacje następcze, które występują podczas fazy *plateau* lub w czasie repolaryzacji potencjału czynnościowego i opóźnione postdepolaryzacje, które występują po zakończeniu potencjału czynnościowego. Zaburzenia w przepływie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (przeciążenie SR, niekontrolowany przeciek Ca^{2+} z kanałów wapniowych SR, tak zwane receptory rianodynowe, zwiększona ekspresja Na^{+}/Ca^{2+} (Ncx1) i zredukowana aktywność ATP-azy SR (Serca2a)) są głównym źródłem DAD. Z drugiej strony, EAD wynika

ze zwiększonego czasu trwania potencjału czynnościowego spowodowanego obniżoną aktywnością kanałów potasowych lub zwiększoną kanałów wapniowych lub sodowych. Ponadto, niejednorodne przedłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego w sąsiadujących grupach komórek (dyspersja repolaryzacji) może spowodować jednokierunkowy blok, inicjujący zjawisko *reentry*. Co więcej, *reentry* jest faworyzowany przez powolne przewodzenie, które może być spowodowane zmniejszoną amplitudą AP, redukcją połączeń międzykomórkowych i zwiększonym zwłóknieniem mięśnia sercowego.¹²⁰ Podsumowując, głównymi czynnikami zagrażającym życiu są: 1) nieprawidłowości w wewnątrzkomórkowym przepływie z Ca^{2+} , 2) zmiana czasu trwania działania bodźca (w szczególności w przypadku heterogenności wyzwalanych potencjałów), 3) przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej powodująca nadmierne zwłóknienie tkanki i 4) zmniejszenie dynamiki połączeń międzykomórkowych.

W niewydolnym mięśniu sercowym najczęściej dochodzi do spadku aktywności kanałów potasowych, co prowadzi do destabilizacji potencjału czynnościowego. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że obniżenie potencjału potasowego znacząco przyczynia się do zwiększonej labilności procesu repolaryzacji w niewydolności serca, predysponując do wczesnych depolaryzacji, dyspersji repolaryzacji i komorowych zaburzeń rytmu. Redukcja zewnętrznych potencjałów potasowych może być również zaangażowana w zwiększoną wrażliwość niewydolnego mięśnia sercowego na czynniki wyzwalające, takie jak hipokaliemia, niedokrwienie i środki antyarytmiczne z efektami klasy III.¹²¹ Spadek aktywności kanałów potasowych zarówno *Ks (slow)*, jak i *Kr (rapid)*, odpowiedzialnych za repolaryzację mięśni po fazie *plateau* powoduje wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego, zwiększając jednocześnie prawdopodobieństwo ponownego otwarcia kanałów dla jonów wapniowych i/lub sodowych podczas tego samego pobudzenia i tym samym wywołania wzrostu potencjału w czasie fazy repolaryzacji. Konsekwencją jest występowanie wczesnych depolaryzacji następczych, EAD. Inną zmianą obserwowaną w NS są zaburzenia w inaktywacji kanału sodowego. W zdrowym sercu kanały dla Na^{+} otwierają się w bardzo szybkim impulsie wynoszącym 2 ms. W niewydolnym mięśniu sercowym otwarcie tego kanału przedłuża się na fazę *plateau* potencjału czynnościowego i sprzyja powstawaniu EAD.^{36,37} Zmiany w ekspresji koneksyny 43 w NS również nie są całkowicie neutralne, gdyż zmniejszenie liczby elektrycznych połączeń międzykomórkowych, obniża szybkość przewodzenia i sprzyja wystąpieniu arytmii w mechanizmie pobudzenia nawrotowego.¹²²

Po zakończonym eksperymencie, z serc szczurów izolowano RNA w celu zbadania poziomu ekspresji genów i produktów białkowych głównych kanałów dla jonów: potasu (*Kcnq1*), wapnia (*Serca2a*, *Cacna1c*) i kanałów wapniowo-sodowych (*Ncx1*). Aby móc porównać poziom ekspresji danego genu z jego odpowiednim produktem białkowym, zwrócono szczególną uwagę na to, aby izolacje były wykonane z tych samych analizowanych próbek, które reprezentowały całą lewą komorę serca szczura. *Rycina 38* podsumowuje uzyskane wyniki z badania ekspresji zarówno na poziomie mRNA jak i białka dla wszystkich badanych kanałów. Przy analizie wyników można zauważyć, że ekspresja mRNA niekoniecznie korelowała dodatnio z obserwowaną ekspresją na poziomie białka. Jednak należy pamiętać, że w komórkach ssaków korelacja pomiędzy ekspresją mRNA i białka jest słabsza, gdyż zależy od aktywności i typu komórki. Co więcej, na komórki działa wiele mechanizmów, które wpływają na ich transkrypcję i translację; jak również znaczenie ma okres półtrwania różnych typów białek i może on wynosić od minuty do kilku dni. Wpływ na poziom ekspresji ma również szybkość degradacji mRNA, która wynosi od 2 do 7 godzin w komórkach ssaczy, w porównaniu z 48 godzinami wymaganymi do degradacji białka.¹²³

Można zaobserwować, że zastosowane interwencje komórkowe (MbWT lub MbCX43) spowodowały pewne zmiany w ekspresji genów w mięśni lewej komory serca. Zmiany te były długotrwałe (w porównaniu z grupą kontrolną) i odnosiły się do całej lewej komory serca, w której następowały interwencje komórkowe. Ogólnie poziomy ekspresji genów kodujących elementy strukturalne analizowanych kanałów jonowych były raczej obniżone za wyjątkiem *Cacna1c*, który koduje podjednostkę kanału wapniowego typu L. Zaobserwowano neutralny wpływ na ekspresję genu zaangażowanego w niekorzystną przebudowę serca po zawale, tj. *Gata-4* oraz zaobserwowano wzrost ekspresji genu *Tgfb1*, który koduje cytokinę biorącą udział w inhibicji prozapalnej ale i modulacji zwłóknienia po zawale.

Jak można wywnioskować z *Ryciny 38:A1*, w przypadku genu *Kcnq1* zauważyć można, że jego ekspresja jest obniżona po interwencji MbCX43, a także znacząco zmniejszona na poziomie produktu białkowego. Gen *Kcnq1* koduje bramkowany napięciem kanał potasowy wymagany do fazy repolaryzacji potencjału czynnościowego serca. Zmiany w ekspresji tego kanału mogą przyczynić się do nieprawidłowości w zakresie repolaryzacji związanej z niewydolnością serca. Obniżona aktywność kanału potasowego może wydłużyć czas

trwania potencjału czynnościowego, który może być odpowiedzialny za nieprawidłową automatyzację serca¹²⁴, co było wspomniane już wcześniej. Taką sytuację obserwuje się również u pacjentów cierpiących na zespół wydłużonego QT, u których utrata funkcji w kanale potasowym jest spowodowana mutacjami w genie *Kcnq1*.¹²⁵ Zmiany w zapisie kodującym genu przyczyniają się do zmniejszenia repolaryzacji kanału Ks i wydłużenia odstępu QT. Można więc sądzić, że interwencja komórkowa w grupie szczurów, którym do pozawałowego mięśnia sercowego wszczepiano mioblasty wykazujące nadekspresję koneksyny 43 ujawniła potencjalny proarytmogenny efekt przeszczepianych komórek w niniejszej pracy. Jednak co jest interesujące, analizując wyniki uzyskane z badania poziomów ekspresji genu i białka w stosunku do kanału wapniowego (*Cacna1c*) zaobserwowano wynik odwrotny, gdyż zaobserwowane obniżenie ekspresji białka *cacna1c* pozytywnie wpływa na czas trwania potencjału czynnościowego *Rycina 38: A2, B2, C2*.

Gen *Cacna1c* koduje podjednostkę alfa-1 kanału wapniowego zależnego od napięcia. Kanał ten pośredniczy w napływie jonów wapnia do komórki w czasie polaryzacji błony komórkowej, dlatego też ekspresja tego kanału wpływa również na czas trwania potencjału czynnościowego serca.¹²⁶ Podsumowując uzyskane w niniejszej pracy wyniki, można by wnioskować, że komórki z nadekspresją koneksyny 43, MbCX43 w badanej grupie interwencji (MI+MbCX43) indukowały zwiększoną ekspresję genu kanału wapniowego (*Cacna1c*) (*Rycina 38:A2*) jednocześnie obniżały poziom białka *cacna1c* (*Rycina 38:B2*). Można zatem założyć, że jest to zjawisko kompensacyjne dla przedłużonego czasu trwania potencjału czynnościowego (spowodowane przez niższą ekspresję białka *Kcnq1*), gdyż obniżenie ekspresji kanału wapniowego (na poziomie białka) powoduje obniżenie czasu trwania potencjału czynnościowego. Podsumowując zatem, można z pewną ostrożnością stwierdzić, że interwencja MbCX43 spowodowała zatem raczej działanie antyarytmiczne.

Kolejnym analizowanym kanałem odpowiedzialnym za wewnątrzkomórkowy obieg wapni jest wymiennik sodowo-wapniowy kodowany przez gen *Ncx1*. W miocytach sercowych stężenia jonów wapnia zmieniają się w czasie skurczu (wysokie stężenie) i relaksacji (niskie stężenie). Wymiennik sodu/wapnia (*Ncx1*) jest głównym elementem zapewniającym, że jony wapniowe są uwalniane z komórki podczas relaksacji mięśnia sercowego.¹²⁷ Analiza poziomu ekspresji genu *Ncx1* wykazała, że interwencja mioblastów w grupach MI+MbWT i MI+MbCX43 obniżała poziom tego genu w porównaniu do grupy MI+0.9%NaCl ($p=0,0464$) (*Rycina 38:*

A3). Jednak zwiększona ekspresja na poziomie białka (Ncx1) może sprzyjać ponownej polaryzacji, która wywołuje przedwczesne pobudzenie komorowe.¹²⁸ Efekt ten można zaobserwować w grupie z natywnymi mioblastami (MbWT) (*Rycina 38: B3, C3*). Jednakże, wszczepione mioblasty do serc szczurów po zawale w grupie interwencyjnej MI+MbCX43 wykazywały istotnie statystycznie ($p=0,0082$) zmniejszenie poziomu ekspresji kanału Ncx1 w porównaniu z grupą MI+MbWT, co może świadczyć o antyarytmicznym środowisku zapewnianym przez mioblasty z nadekspresją koneksyny 43.

Badania dowodzą, że terapia genowa z zastosowaniem genu *Serca2a* obniża podatność na arytmie wywołaną przez pobudzenia nawrotowe poprzez obniżenie fosforylacji receptora rianodynowego, a tym samym zapobiega wyciekowi jonów wapnia, który jest proarytmogenny, gdyż wzrost aktywności *Serca2a* prowadzi do poprawy stanu niewydolnego serca. Na modelu świńskim wykazano, że długotrwała nadekspresja *Serca2a* ma pozytywny efekt, gdyż utrzymuje prawidłowe funkcje skurczowe i rozkurczowe, jak również wpływa na poprawę budowy serca pozawałowego.¹²⁹ Terapia związana z wprowadzeniem genu *Serca2a* do pozawałowego mięśnia sercowego wiąże się z następującymi korzyściami: zmniejszeniem napięcia ścian komory i/lub negatywnych skutków mechaniczno-elektrycznego sprzężenia zwrotnego, ulepszeniem funkcji mitochondriów oraz funkcji energetycznej komórki. Zatem pożądanym efektem terapeutycznym byłby wzrost poziomu ekspresji *Serca2a* po zastosowanej terapii komórkowej (MbCX43). Uzyskane wyniki po przeprowadzeniu reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykazały, że implantowane komórki (MbCX43) do pozawałowego mięśnia sercowego szczurów powodowały jednak istotne obniżenie poziomu ekspresji genu *Serca2a* w porównaniu do grupy kontrolnej (MI+0.9%NaCl) ($p=0.01$) (*Rycina 38: A4*). W innych publikacjach wykazano zarówno obniżenie, jak i brak zmian w ekspresji genu *Serca2a*.^{130,131} Jednak w niniejszej rozprawie, w badanej grupie zwierząt z interwencją (MI+MbCX43) poziom białka *Serca2a* był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grup kontrolnych: MI+MbWT ($p=0.004$), MI+0.9% NaCl ($p=0.0024$) (*Rycina 38: B4, C4*). Wynik ten jest bardzo satysfakcjonujący, ponieważ *Serca2a* jest traktowany jako marker poprawności leczenia. Wiąże się to z faktem iż utrzymanie zwiększonej aktywności *Serca2a* w niewydolnym sercu może zmniejszyć pole zwłóknienia mięśnia sercowego, a także polepszyć jego kurczliwość, jak również przyczynić się do zmniejszenia arytmii komorowych.¹³²⁻¹⁴¹

Porównany został również stosunek poziomów ekspresji czynników Ncx1/Serca2a na poziomie genu i białka w celu dalszego wnioskowania na temat charakteru przeprowadzonych interwencji dosercowych, tj. zwłaszcza wprowadzeniem MbCX43 do serca po zawale (*Rycina 38: A5, B5*). Analiza wykazała, że w badanej grupie (MI+ MbCX43) poziom białka Ncx1 był znacząco obniżony, a poziom współczynnika Serca2a uległ pozytywnej regulacji w porównaniu z grupami kontrolnymi: MI+MbWT ($p=0.02$), oraz MI+0.9%NaCl ($p=0.0007$). **To z kolei może przemawiać za antyarytmicznym charakterem interwencji z zastosowaniem mioblastów charakteryzujących się nadekspresją koneksyny 43.**

Analizę poziomu ekspresji genu *Tgfb1* ($p=0.0378$) wykonano tylko na poziomie mRNA (*Rycina 38: A7*) i wykazano istotnie statystycznie wzrost ekspresji genu w przypadku interwencji komórkami MbCX43. Ze względu na niejednoznaczny charakter *Tgfb1*, który ogólnie uważano za cząsteczkę przeciwzapalną połączoną ze zdolnością do indukowania zwłóknienia, trudno jest stwierdzić, czy fenomen ten powinien być traktowany jako zjawisko pozytywne, czy negatywne.

Podsumowując, w badaniach niniejszej pracy promocyjnej stwierdzono bez wątpliwości, że w tkance LV serca po wszczepieniu genetycznie zmodyfikowanych mioblastów (MbCX43) ekspresja Ncx1 na poziomie białka była znacząco zmniejszona, podczas gdy poziom Serca2a wzrastał (stosunek Ncx1/Serca2a zatem znacząco spadał), (*Rycina 38: A5, B5*). To bardzo ważne odkrycie w kontekście arytmicznej skłonności niewydolnego serca. Sugeruje to, że więcej Ca^{2+} jest transportowana do SR, a mniej przez błonę komórkową poprzez Ncx1. Wymiennik sodowo-potasowy pracujący w normalnym trybie transportuje 1 jon Ca^{2+} z komórki i 3 jony Na^{+} w kierunku przeciwnym. Transportowi temu towarzyszy prąd depolaryzacyjny, główne źródło DAD. Zmniejszona ekspresja Ncx1 wraz ze zwiększoną ekspresją Serca2a oznacza zatem mniejsze możliwości indukcji dla DAD. Ponadto wykazano, że zmniejsza się ekspresja kanałów potasowych (Kcnq1) na poziomie białka, która może przedłużać APD i promować EAD. Jednak jednocześnie ekspresja kanałów wapniowych (Cacna1c) była zmniejszona w sercach po interwencji MI+MbCX43 przeciwdziałając wydłużeniu czasu trwania potencjału czynnościowego, a więc efektem netto nie byłaby zmiana skłonności do indukcji EAD. Wreszcie, zmodyfikowane genetycznie mioblasty, których wykazano odpowiednie ułożenie na terenie serca, jak i ich prawidłowe połączenie funkcjonalne z sąsiadującymi kardiomiocytami, utrzymują prawdopodobnie lepszą prędkość

przewodzenia międzykomórkowego niż rozproszone, niezwiązane z kardiomiocytami natywne mioblasty. Lepsze przewodnictwo wewnątrzkomórkowe oznacza zatem mniejsze ryzyko indukcji i utrzymywania się zaburzeń rytmu powrotnego.

Reasumując, wyniki te wskazują na potencjalne korzyści z wprowadzanych dosercowo genetycznie modyfikowanych ludzkich mioblastów z nadekspresją koneksyny 43 w niewydolnym mięśniu sercowym po zawale.

7. WNIOSKI

1. Udokumentowano, że genetycznie modyfikowane mioblasty transfekowane plazmidem pCiNeo-CX43, zawierającym gen kodujący koneksynę 43, wykazały istotnie zwiększoną transkrypcję wprowadzonego genu, a także poziom białka CX43.

2. Wykazano, że przeprowadzenie modyfikacji genetycznej mioblastów zmniejszyło występowanie zjawisk arytmogennych typu wtórnego w porównaniu z interwencją natywnymi mioblastami u szczurów po zawale (obserwowanych po czterech tygodniach od interwencji intramiokardialnych; $p < 0.05$)

3. Analiza ekspresji genów i odpowiadającym im produktom białkowym tworzących elementy strukturalne kanałów jonowych wykazała, że wprowadzone MbCX43 wykazują charakter antyarytmiczny, wpływając pozytywnie na długość trwania potencjałów czynnościowych w pozawałowym mięśniu sercowym (jony wapnia). Ekspresja białek Ncx1 i Cacna1c była statystycznie istotnie zmniejszona ($p < 0.05$, $p < 0.01$) w grupie szczurów MI+MbCX43 w porównaniu z interwencją mioblastami natywnymi (MI+MbWT), co przemawia za antyarytmicznym oddziaływaniem podawanych komórek z nadekspresją koneksyny 43 (MbCX43).

Ponadto zaobserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji białka Serca2a po interwencji MbCX43 w porównaniu z interwencjami MI+MbWT i MI+0.9%NaCl. Może to być postrzegane jako silny dowód terapeutycznego charakteru komórek MbCX43, albowiem poziom ekspresji Serca2a jest biomarkerem skutecznego zapobiegania niekorzystnej przebudowy mięśnia sercowego.

4. Ponadto, wykazano, że genetycznie modyfikowane ludzkie komórki macierzyste/progenitorowe pochodzenia miogenne podane intramiokardialnie były obecne w mięśniu sercowym szczura po okresie jednego miesiąca od przeprowadzonych interwencji wykazując charakterystyczne uporządkowanie położenie względem miocytów sercowych.

8. STRESZCZENIE

Zawał mięśnia sercowego jest jedną z najczęstszych przyczyn śmiertelności ludzi na świecie. Podczas zamknięcia światła tętnicy wieńcowej kardiomiocyty umierają i są zastępowane tkanką włóknistą, która nie wykazuje funkcji kurczliwych. Tak więc, istnieje niewątpliwa potrzeba regeneracji pozawałowego serca, na przykład za pomocą komórek macierzystych.

Nadzieje na skuteczne leczenie uszkodzonego miokardium oferują nowe terapie komórkowe, w których są wykorzystywane różne rodzaje komórek macierzystych, np. komórki macierzyste mięśni szkieletowych, znane również jako mioblasty. Ten typ komórek ma wiele zalet, ale pomimo tego, istnieje poważny problem związany z ich zastosowaniem w terapii pro-regeneracyjnej wynikający z ich niewystarczającej synchronizacji elektrofizjologicznej z kardiomiocytami narządu biorczego. Przyczyną tego zjawiska jest brak ekspresji białka koneksyny 43 w zróżnicowanych miocytach odpowiedzialnego za wytwarzanie połączeń szczelinowych.

Głównym celem niniejszej dysertacji było opracowanie terapii komórkowej używając genetycznie modyfikowanych ludzkich komórek macierzystych (transfekcja sekwencją kodującą dla koneksyny 43), jako prewencji wobec występowania pobudzeń dodatkowych komorowych w niewydolnym sercu szczurów po zawale.

Uzyskane wyniki wskazują, że genetycznie modyfikowane mioblasty transfekowane plazmidem pCiNeo-CX43 (zawierającym gen kodującym koneksynę 43) objawiły istotnie podwyższoną ekspresję na poziomie genu i białka. Co więcej, wykazano, że interwencje z użyciem modyfikowanych genetycznie ludzkich mioblastów zmniejszyły występowanie zjawisk spontanicznych i indukowanych komorowych zaburzeń rytmu serca w porównaniu z interwencją mioblastami natywnymi u szczurów po zawale.

Analiza ekspresji genów i ich odpowiednich produktów białkowych tworzących elementy strukturalne kanałów jonowych wykazała, że mioblasty z nadekspresją koneksyny 43 wykazują charakter antyarytmiczny, wpływając pozytywnie na długość trwania potencjałów czynnościowych w mięśniu sercowym (jony wapnia). Ekspresja białek dla *Ncx1* i *Cacna1c* była statystycznie istotnie zmniejszona w grupie MI+MbCX43 w porównaniu z interwencją w grupie MI+MbWT, co świadczy o efekcie antyarytmicznym zastosowanych komórek (MbCX43). Ponadto, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji białka *Serca2a*

w porównaniu z interwencjami MI+MbWT i MI+0.9%NaCl wykonanymi w kontrolnych grupach szczurów. Może to być postrzegane jako dodatkowy dowód na terapeutyczny charakter zastosowanych komórek MbCX43, ponieważ wzrost ekspresji Serca2a może być biomarkerem potencjalnie zaświadcającym o skutecznym leczeniu niekorzystnej przebudowy mięśnia sercowego po zawale.

Dodatkowo, udokumentowano obecność ludzkich modyfikowanych genetycznie mioblastów na terenie mięśnia sercowego po zawale u szczurów z charakterystycznym równoległym uporządkowaniem w stosunku do kardiomiocytów, wskazując tym samym na występowanie funkcjonalnych koneksionów pomiędzy wprowadzonymi komórkami a miocytami narządu biorcy.

9. ABSTRACT

Myocardial infarction is one of the most common causes of human mortality world wide. It is caused by the occlusion of one of the coronary arteries. During this process cardiomyocytes die and are usually replaced by fibrotic tissue, which does not demonstrate contractility. Therefore, there is an obvious need for novel therapy to regenerate the post-infarcted heart, for example applying cellular therapies.

Our hope for effective treatment of damaged myocardium might be novel therapies based on stem cell application. Different types of stem cells have been used so far, e.g. myogenic stem cells, also known as myoblasts. This type of stem cells have many advantages, but their major obstacles have been associated with insufficient electrophysiological synchronization with recipient organ cardiomyocytes. The reason for this phenomenon is the lack of expression of the connexin 43 protein responsible for gap junctions formation.

So, the main goal of this dissertation was to develop a stem cell protocol therapy by using cells with genetic modification (provided by transient transfection of plasmid containing coding sequence for connexin-43) which might solve a problem associated with the occurrence of additional simulations in post-infarcted heart (arrhythmia).

The results obtained have shown that genetically modified myoblasts (transfected with plasmid pCiNeo-CX3 containing gene encoding connexin-43) demonstrated significantly increased transcription of this introduced gene as well as translated CX43 protein. Moreover, it was observed that the introduced genetic modification decreased the occurrence of spontaneous and induced ventricular arrhythmias when compared to native myoblasts intervention in post-infarcted heart in rat model, (observed at four weeks after cells delivery).

Analysis of gene expression and their respective protein products structuring ion channels showed that connexin-43 overexpressing myoblasts revealed pre-vailing antiarrhythmic character, positively impacting the length of duration of the action potentials in the myocardium (in respect to calcium ions). Ncx1 and cacnalc proteins were statistically significantly reduced in MI+MbCX43 group of rats comparing to MI+MbWT intervention, and this was demonstrated studying the anti-arrhythmic effect of administered cells (MbCX43). In addition, we have observed a statistically significant increase in expression of the Serca2a protein when compared with control MI+MbWT and MI+0.9%NaCl

interventions. This can be perceived as the additional proof of therapeutic character of MbCX43 cells since an increase in expression of Serca2a can be a potentially considered as the validating biomarker of successful prevention of myocardial remodeling after MI.

Additionally, it has been documented the presence of genetically modified human myoblasts in post-infarction myocardium of rats with characteristic alignment in parallel to recipient organ cardiomyocytes which must possibly induced formation of functional connexons among both cell types.

10. LITERTURA

- ¹. Grzybiak M. Serce, Anatomia człowieka. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Wozniak W. Wydawnictwo medyczne Urban&Partner. Wrocław 2003;275-276.
- ². Grzybiak M. Serce. Anatomia człowieka. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Wozniak W. Wydawnictwo medyczne Urban&Partner. Wrocław 2003;265-269.
- ³. van Weerd JH, Christoffels VM. The formation and function of the cardiac conduction system. *Development*. 2016;143: 197-210
- ⁴. Lewartowski B. Fizjologia Serca, Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej. Pod red. Traczyk W, Trzebski A. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2004;455-459.
- ⁵. Kowert A. „Moje dziecko ma wadę serca” pod red.: prof. E. Malca, dr hab. K. Januszewskiej, M. Pawłowskiej. Wydawnictwo: Fundacja Mam serce, Fundacja na rzecz Dzieci z Wadami Serca Cor Infantis.
- ⁶. Mackiewicz U. Przebudowa elektryczna serca i komórkowe podłoże arytmii. Patofizjologia niewydolności serca. Wydawnictwo Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2010;102-103.
- ⁷. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic Ion-Channel Remodeling in the Heart: Heart Failure, Myocardial Infarction, and Atrial Fibrillation. *Physiol Rev*. 2007;87(2):425-56.
- ⁸. Kashani A, Barold SS. Significance of QRS Complex Duration in Patients With Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; 2183-2192, ISSN 0735-1097.
- ⁹. Informed Health Online Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. How does the blood circulatory system work? 2010 Mar 12 [Updated 2016 Aug 1]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279250/> (dostęp dnia 05.05.2018)
- ¹⁰. Bruska M, Wozniak W. Układ sercowo-naczyniowy. Anatomia człowieka. Podręcznik dla studentów i lekarzy Pod red. Wozniak W. Wydawnictwo medyczne Urban&Partner. Wrocław 2003;51-53.
- ¹¹. Nielsen SH, Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, Genovese F, Karsdal M, Lindsey ML. Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes. *Matrix Biol*. 2017; S0945-053X(17)30268-8.
- ¹². Oficjalna strona Ministerstwa Zdrowia w Polsce www2.mz.gov.pl/wwwmz/index?mr=b3&ms=0&ml=pl&mi=0&mx=0&mt=&my=748&ma=016206 (dostęp 04.05.2018r.)

13. Baig MK, Mahon N, McKenna WJ et al. The pathophysiology of advanced heart failure. *Heart Lung*. 1999;28:87-101 .
14. Anand S, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, Keltai M, Diaz R, Rangarajan S. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *European Heart Journal*. Volume 29, Issue 7, 1 April 2008; 932–940 .
15. White HD, Norris RM, Brown MA, et al. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987;76:44–51.
16. Moussa HN, Movahedian M, Leon MG, and Sibai BM. Acute Myocardial Infarction Due to Coronary Artery Dissection in the Postpartum Period. *AJP Rep*. 2015; 5(2): e093–e096.
17. Bugajska J, Jędryka-Góral A, Konarska M. Występowanie czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca a praca zawodowa. *Bezpieczeństwo pracy*, 4/2006.
18. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101: 2981-2988.
19. Yacoub M, Suzuki K, Rosenthal N. The future of regenerative therapy in patients with chronic heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; Suppl 1:S133-5.
20. Struthers A. The pathophysiology of myocardial infarction-induced heart failure. *Heart*. 2005; 91(Suppl 2): ii14–ii16.
21. Zaidi, Abbas & Sheikh, Nabeel & Jongman, Jesse & Gati, Sabiha & Panoulas, Vasileios & Carr-White, Gerald & Papadakis, Michael & Sharma, Rajan & Behr, Elijah & Sharma, Sanjay. Clinical Differentiation Between Physiological Remodeling and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Athletes With Marked Electrocardiographic Repolarization Anomalies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65. 2702-11.
22. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(4):255-62.
23. Gleissner CA, Galkina E, Nadler JL and Ley K. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2007;4(3): 185–196.
24. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161–1172.
25. Rouleau JL, de Champlain J, Klein M, et al. Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:390–398.
26. Warren SE, Royal HD, Markis JE, et al. Time course of left ventricular dilation after myocardial infarction: influence of infarct-related artery and success of coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol*. 1988;11:12–19.
27. Sun Y. Intracardiac renin-angiotensin system and myocardial repair/remodeling following infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48(3): 483–489.

- ²⁸. Neurohormony i cytokiny. Michał Mączewski Patofizjologia niewydolności serca, Wydawnictwo Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2010;131-134.
- ²⁹. Stavros G, Drakos MD. Combining Left Ventricular Volume Reduction Techniques With Cell Therapies: Quo Vadis? *Hellenic Journal of Cardiology* Volume 58, Issue 2, March–April 2017; 133-134.
- ³⁰. Kowalczyk B, Czyż R, Kaźmierska B. Niewydolność serca - definicja, klasyfikacja, epidemiologia, objawy i leczenie = Heart failure - definition, classification, epidemiology, symptoms and treatment. *Journal of Education, Health and Sport*. 2016;6(11):352-367. eISSN 2391-8306.
- ³¹. Jaszczyszyn E, Panaszek B. Podstawy elektrofizjologiczne, przyczyny i klasyfikacja zaburzeń rytmu serca – implikacje rokownicze i terapeutyczne. *Family Medicine & Primary Care Review*. 2013;4, 573-580
- ³². Kantharia BK, Mehta R, Nagra B, et al. Expeditious evaluation of paroxysmal supraventricular tachycardia: what is the mechanism? *Heart Rhythm*. 2007;4: 533–534.
- ³³. Mackiewicz U. The role of sympathetic-parasympathetic balance in arrhythmogenesis. *Borgis – Postępy Nauk Medycznych* 7/2014;s. 470-478.
- ³⁴. Backer CL, Tsao S, Deal BJ, Mavroudis C. Maze Procedure in Single Ventricle Patients *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. 2008;44-8.
- ³⁵. Aehlert BJ. EKG ŁATWO ZROZUMIEĆ. Zaburzenia rytmu serca typu przedsionkowego. Elsevier Urban & Partner. Wrocław 2001, wyd.1 str.1 05-119
- ³⁶. Liu MB. et al. Delayed afterdepolarizations generate both triggers and a vulnerable substrate promoting reentry in cardiac tissue. *Heart Rhythm*. *Heart Rhythm*. 2015;12(10):2115-24.
- ³⁷. Tse G. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Arrhythm*. 2016; 32(2): 75–81.
- ³⁸. Czarnowska E, Gajerska-Dzieciatkowska M, Kusmierski K, et al. Expression of SDF-1-CXCR4 axis and an antiremodelling effectiveness of foetal-liver stem cell transplantation in the infarcted rat heart. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58: 729-744.
- ³⁹. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92: 139-150.
- ⁴⁰. Seidel M, Borczynska A, Rozwadowska N, Kurpisz M. Cellbased therapy for heart failure: skeletal myoblasts. *Cell Transplant*. 2009;18: 695-707.
- ⁴¹. Wu R, Hu X, Wang J. Concise Review: Optimized Strategies for Stem Cell-Based Therapy in Myocardial Repair: Clinical Translatability and Potential Limitation. *Stem Cells*.2018 ;36(4):482-500.
- ⁴². Nguyen PK, Rhee JW, Wu JC. Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: a systematic review. *JAMA Cardiol*.2016;1(7): 831–841.

- ⁴³. Cambria E, Pasqualini FS, Wolint P, Günter J, Steiger J, Bopp A, Hoerstrup SP, Emmert MY. Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types. *npj Regenerative Medicine*.2017;2:17.
- ⁴⁴. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges, *European Heart Journal*. 2011;Volume 32, Issue 10, 1197–1206..
- ⁴⁵. Hassan N, Tchao J, Tobita K. Concise Review: Skeletal Muscle Stem Cells and Cardiac Lineage: Potential for Heart Repair. *Stem Cells Transl Med*.2014;3(2): 183–193.
- ⁴⁶. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: Developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation*. 2009;119:e391–e479.
- ⁴⁷. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008;117:1189–1200.
- ⁴⁸. Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles MER, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, Vila TV, Rodrigues JS, Lear PV, Bravo SB. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(2):R89-R111.
- ⁴⁹. Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, et al. Cardiomyocyte formation by skeletal muscle-derived multi-myogenic stem cells after transplantation into infarcted myocardium. *PLoS One*. 2008;3:e1789.
- ⁵⁰. Kessler PD, Byrne BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: Cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:219–242.
- ⁵¹. Hansson EM, Lindsay ME, Chien KR. Regeneration next: Toward heart stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2009;5:364–377.
- ⁵². Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008;451:937–942.
- ⁵³. Oshima H, Payne TR, Urish KL, et al. Differential myocardial infarct repair with muscle stem cells compared to myoblasts. *Mol Ther*. 2005;12:1130–1141.
- ⁵⁴. Ūsas A, Mačiulaitis J, Mačiulaitis R, et al. Skeletal muscle-derived stem cells: Implications for cell-mediated therapies. *Medicina*. 2011;47:469–479.
- ⁵⁵. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, et al. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: Long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006;114:I108–I113.
- ⁵⁶. Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, et al. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res*. 2005;97:159–167.

- ⁵⁷. Gavira JJ, Herreros J, Perez A, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131:799–804.
- ⁵⁸. Lavine L, Upcott H. Myocardial ischaemia treated by graft of skeletal muscle to the heart. *Proc R Soc Med.* 1937;30:772.
- ⁵⁹. Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* 2001;357:279–280.
- ⁶⁰. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282, 1145-1147.
- ⁶¹. Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001;19, 193-204.
- ⁶². van Laake L, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Verkleij AJ, Lips DJ, Freund C, den Ouden K, Ward-van Oostwaard D, Korving J, Tertoolen LG, van Echteld CJ, Doevendans PA, Mummery CL. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 2007;1, 9-24.
- ⁶³. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology.* 2007;25:1015-1024.
- ⁶⁴. Funakoshi S, Miki K, Takaki T et al. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Scientific reports.* 2016;6:19111.
- ⁶⁵. Tachibana A, Santoso MR, Mahmoudi M et al. Paracrine Effects of the Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes Salvage the Injured Myocardium. *Circulation research.* 2017;121:e22-e36.
- ⁶⁶. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart.* 2006;92(12): 1724–1727.
- ⁶⁷. Kumar NM, Gilula NB. The Gap Junction Communication Channel. *Cell*, Volume 84, Issue 3, 1996; 381-388,
- ⁶⁸. Li G, Whittaker P, Yao M. The gap junction uncoupler heptanol abrogates infarct size reduction with preconditioning in mouse hearts. *Cardiovasc Pathol.* 2002;11(3):158-65.
- ⁶⁹. Solan JL, Lampe PD. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1711(2):154-63.
- ⁷⁰. Pieperhoff S, Franke WW. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates-IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adherens junction components-late processes in mammalian heart development. *Eur.J.Cell.Biol.* 2007;86(3),77–391.

- ⁷¹. Del Rya S, Moscato S, Bianchi F, Morales MA, Dolfi QA, Burchielli S, Cabiati M, Mattii L. Altered expression of connexin43 and related molecular partners in a pig model of left ventricular dysfunction with and without di-pyridamoletherapy. *Pharmacol. Res.* 2015;28–31.
- ⁷². Jansen JA. Cardiac connexins and impulse propagation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;48(1),76–82.
- ⁷³. Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, Kodama I. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 2000;86, 871–878.
- ⁷⁴. Gmeiner M, Zimpfer D, Holfeld J, Seebacher G, Abraham D, Grimm M, Aharinejad S. Improvement of cardiac function in the failing rat heart after transfer of skeletal myoblasts engineered to overexpress placental growth factor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 141(5):1238-45.
- ⁷⁵. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DSW, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 2000;151 (6), 1221-1233.
- ⁷⁶. Rudnicki MA, Schnegelsberg PNJ, Stead RH, Braun T, Arnold H-H, Jaenisch R. MYOD or Myf5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 1993; 75, 1351-1359.
- ⁷⁷. Olson EN. MYOD family: a paradigm for development? *Genes Dev*, 1990;4, 1454-1461.
- ⁷⁸. Hasty P, Bradey A, Morris JH, Edmondson DG, Venutl JM, Olson EN, Klein WH, Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 1993;364, 501-506.
- ⁷⁹. National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4619> (dostęp: 07.05.2018).
- ⁸⁰. U.S National Library of Medicine <https://ghr.nlm.nih.gov> (dostęp 07.05.2018)
- ⁸¹. National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (dostęp 07.05.2018)
- ⁸². Boyman L, Hagen BM, Giladi M, Hiller R, Lederer WJ, Khananshvili D. Proton-sensing Ca²⁺ binding domains regulate the cardiac Na⁺/Ca²⁺ Exchange. *J. Biol. Chem.* 2011;286, pp. 28811-2882
- ⁸³. Wahlquist C, Jeong D, Rojas-Muñoz A, Kho C, Lee A, Mitsuyama S, van Mil A, Park WJ, Sluijter JP, Doevendans PA, Hajjar RJ, Mercola M. Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature*. 2014;508(7497):531-5.
- ⁸⁴. Black BL, McCulley DJ. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Current Topics in Developmental Biology*, 2012;100: 253–277.
- ⁸⁵. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 1983;258 (11): 7155–60.

- ⁸⁶. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, 1985;316 (6030): 701–5.
- ⁸⁷. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circulation research*, 2013;113:810-834.
- ⁸⁸. Chong JJ, Yang X, Don CW et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*, 2014;510:273-277.
- ⁸⁹. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*, 2016;538:388-391.
- ⁹⁰. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet (London, England)*. 2004;364:141-148.
- ⁹¹. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC medicine*. 2015;13:162.
- ⁹². Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. 2005;111:2198-2202.
- ⁹³. Gao LR, Chen Y, Zhang NK et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC medicine*. 2015;13:162.
- ⁹⁴. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *Jama*. 2012;308:2369-2379.
- ⁹⁵. Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol*. 2000;149(3):731-40.
- ⁹⁶. Balogh S, Naus CC, Merrifield, PA. Expression of gap junctions in cultured rat L6 cells during myogenesis. *Dev. Biol*. 1993;155, 351-360
- ⁹⁷. Fernandes S, van Rijen HV, Forest V, Evain S, Leblond AL, Mérot J, Charpentier F, de Bakker JM, Lemarchand P. Cardiac cell therapy: overexpression of connexin43 in skeletal myoblasts and prevention of ventricular arrhythmias. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3703-12
- ⁹⁸. Liao J, Hong T, Xu J, Zeng E, Tang B, Lai W. Expression of Connexin43 in Cerebral Arteries of Patients with Moyamoya Disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(4):1107-1114.
- ⁹⁹. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP. i wsp. Gap junction remodelling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem*. 2003;242, 135–144.

- ¹⁰⁰. Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG. Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 1996;76, 412–417.
- ¹⁰¹. Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kleber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ. Res*. 2000;87, 656–662.
- ¹⁰². Rogers GL, Martino AT, Aslanidi GV, Jayandharan GR, Srivastava A, Herzog RW. Innate Immune Responses to AAV Vectors. *Front Microbiol*. 2011;2:194.
- ¹⁰³. Schaffer DV, Koerber JT, Lim KI. Molecular engineering of viral gene delivery vehicles. *Annu Rev Biomed Eng*. 2008;10:169–194.
- ¹⁰⁴. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet*. 2011;12:341–355.
- ¹⁰⁵. Espinos, E et al. Efficient non-viral DNA-mediated gene transfer to human primary myoblasts using electroporation *Neuromuscular Disorders*. 2001;Volume 11 , Issue 4 , 341 – 349.
- ¹⁰⁶. Hernández-Hernández JM, García-González EG, Brun CE, Rudnicki MA. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Volume 72, 2017;10-18.
- ¹⁰⁷. Suzuki K, Brand NJ, Allen S, Khan MA, Farrell AO, Murtuza B, Oakley RE, Yacoub MH. Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2001;Volume 122, Issue 4, 759-766.
- ¹⁰⁸. Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang SM, Bostani T, von Maltzahn J, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI, Fleischmann BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*. 2007;450(7171):819-24.
- ¹⁰⁹. Giraud MN, Liechti EF, Tchantchaleishvili V, Siepe M, Cook S, Carrel TP, & Tevearai, H. T. Myocardial injection of skeletal myoblasts impairs contractility of host cardiomyocytes. *International Journal of Cardiology*. 2010;138(2), 131–137.
- ¹¹⁰. Kolanowski TJ, Rozwadowska N, Malcher A, Szymczyk E, Kasprzak JD, Mietkiewski T, Kurpisz M. 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*. 2014;173(1):55-64.
- ¹¹¹. Perin EC, López J. Methods of stem cell delivery in cardiac diseases. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2006;Volume3, S110–S113.
- ¹¹². Halum SL, Naidu M, Delo DM, Atala A, Hingtgen CM. Injection of autologous muscle stem cells (myoblasts) for the treatment of vocal fold paralysis: a pilot study. *Laryngoscope*. 2007;117(5):917-22.

- ¹¹³. Suzuki K., Murtuza B., Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-Carver A, Fukushima S., et al. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J.* 2004;18(10):1153-5.
- ¹¹⁴. Springer ML, Ozawa CR, & BlauHM. Transient production of α -smooth muscle actin by skeletal myoblasts during differentiation in culture and following intramuscular implantation. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 2002;51(4), 177–186.
- ¹¹⁵. Scorsin M, Hagège A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasché P. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2000;Volume 119, Issue 6, 1169-1175.
- ¹¹⁶. Butter C, Rastogi S, Minden HH, Meyhöfer J, Burkhoff D, Sabbah HN. Cardiac contractility modulation electrical signals improve myocardial gene expression in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1784-9.
- ¹¹⁷. Toischer K, Kögler H, Tenderich G, Grebe C, Seidler T, Van PN, Jung K, Knöll R, Körfer R, Hasenfuss G. Elevated afterload, neuroendocrine stimulation, and human heart failure increase BNP levels and inhibit preload-dependent SERCA upregulation. *Circ Heart Fail.* 2008 Nov;1(4):265-71
- ¹¹⁸. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev.* 2007;87(2):425-56.
- ¹¹⁹. Bers DM. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circulation Research.* 2002;90(1), 14–17.
- ¹²⁰. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic Ion-Channel Remodeling in the Heart: Heart Failure, Myocardial Infarction, and Atrial Fibrillation. *Physiol Rev* 2007;87:425-56.
- ¹²¹. Näbauer M, Kääh S. Potassium channel down-regulation in heart failure, *Cardiovascular Research.* 1998;Volume 37, Issue 2, Pages 324–334.
- ¹²². Peters N.S., Severs N.J., Coromilas J., Wit A.L. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 1997;95, 988–996.
- ¹²³. Vogel, C, & Marcotte, EM. Insights into regulation of protein abundance from proteomics and transcriptomics analyses. *Nature Reviews Genetics.* 2013;13(4), 227–232.
- ¹²⁴. Mackiewicz U, Gerges JY, Chu S, Duda M, Dobrzynski H, Lewartowski B, Maczewski M. Ivabradine Protects Against Ventricular Arrhythmias in Acute Myocardial Infarction in the Rat. *Journal of Cellular Physiology.* *J Cell Physiol.* 2014;229(6):813-23.
- ¹²⁵. Moss AJ, Shimizu W, Wilde AA, Towbin JA, Zareba W, Robinson JL, Qi M, Vincent GM, Ackerman MJ, Kaufman ES, Hofman N, Seth R, Kamakura S, Miyamoto Y, Goldenberg I, Andrews ML, McNitt S. Clinical Aspects of Type-1 Long-QT Syndrome by Location,

Coding Type, and Biophysical Function of Mutations Involving the KCNQ1 Gene. *Circulation*. 2007;115(19):2481-9

¹²⁶. Molina-Navarro MM, Roselló-Lletí E, Ortega A, Tarazón E, Otero M, Martínez-Dolz L, Lago F, González-Juanatey JR, España F, García-Pavía P, Montero JA, Portolés M, Rivera M. Differential Gene Expression of Cardiac Ion Channels in Human Dilated Cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(12): e79792.

¹²⁷. Herrmann S, Lipp P, Wiesen K, Stieber J, Nguyen H, Kaiser E, Ludwig A. The cardiac sodium–calcium exchanger NCX1 is a key player in the initiation and maintenance of a stable heart rhythm. *Cardiovascular Research*. 2013;Volume 99, Issue 4, 780–788.

¹²⁸. Roos KP, Jordan MC, Fishbein MC, Ritter MR, Friedlander M, Chang HC, Rahgozar P, Han T, Garcia AJ, MacLellan WR, Ross RS, Philipson KD. Hypertrophy and Heart Failure in Mice Overexpressing the Cardiac Sodium-Calcium Exchanger. *J Card Fail*. 2007;13(4):318-29.

¹²⁹. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takewa Y, Sakata S, Peluso R, Zsebo K, Gwathmey JK, Tardif JC, Tanguay JF, Hajjar RJ. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(11) 1112-9.

¹³⁰. Barry WH, Bridge JHB. *FRsearch Advances Series Intracellular Calcium Homeostasis in Cardiac Myocytes*. 1993;(3), 1806–1815.

¹³¹. PeriasamyM, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*. 2007;35(4), 430–442.

¹³². Davia K, Bernobich E, Ranu HK, et al. SERCA2A overexpression decreases the incidence of aftercontractions in adult rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(5):1005–1015.

¹³³. del Monte F, Harding SE, Schmidt U, et al. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation*. 1999;100(23):2308–2311.

¹³⁴. Hajjar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, Rosenzweig A. Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation*. 1997;95(2):423–429.

¹³⁵. He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, et al. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest*. 1997;100(2):380–389.

¹³⁶. Niwano K, Arai M, Koitabashi N, et al. Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol Ther*. 2008;16(6):1026–1032.

¹³⁷. Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID trial), a first-in-human Phase I/II clinical trial. *J Card Fail*. 2009;15(3):171–181.

- ¹³⁸. Hajjar RJ, Zsebo K, Deckelbaum L, et al. Design of a Phase I/II trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *J Card Fail.* 2008;14(5):355–367.
- ¹³⁹. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a Phase II trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 2011;124(3):304–313.
- ¹⁴⁰. Zsebo KM, Yaroshinsky A, Rudy JJ, et al. Long term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res.* 2014;114(1):101-8.
- ¹⁴¹. Peters N.S., Severs N.J., Coromilas J., Wit A.L. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation.* 1997;95, 988–996.
- ¹⁴¹. Mączewski M, Mączewska J. Hypercholesterolemia Exacerbates Ventricular Remodeling in the Rat Model of Myocardial Infarction. *Journal of Cardiac Failure.* Volume 12, Issue 5, 2006;399-405
- ¹⁴². Goonasekera SA, Hammer K, Auger-Messier M, Bodi I, Chen X, Zhang H, Reiken S, Elrod JW, Correll RN, York AJ, et al. Decreased cardiac L-type Ca²⁺(+) channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice. *J Clin Invest.* 2012;122:280–290
- ¹⁴³. Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques.* 2007;42(4):467-70, 472.

Finansowanie badań:

PRELUDIUM 2012/07/N/NZ4/02117 Narodowe Centrum Nauki
„Wpływ ekspresji koneksyny 43 w ludzkich komórkach miogennych na poziom zjawisk
arytmogennych w modelu szczura pozawałowego.”

Projekt badawczy NCBiR w ramach Programu STRATEGMED
nr STRATEGMED1/233624/5/NCBR/2014
„Niskocząsteczkowe modulatory epigenetyczne jako aktywatory pluripotencji komórek
dla potrzeb medycyny regeneracyjnej.”

Projekt NCBiR realizowany w ramach Programu Badań Stosowanych nr PBS3/A7/27/2015
„Molekularne obrazowanie (z zastosowaniem nanotechnologii) dla monitorowania
implantowanych komórek macierzystych i ich funkcji regeneracyjnych – STEMNanoT.”