

Streszczenie pracy doktorskiej

pt.

*Wrodzona odpowiedź odpornościowa w następstwie zawału serca
– znaczenie makrofagów tkankowych i oksygenazy hemowej-1*

Mateusz Tomczyk

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Promotor: prof. dr hab. Józef Dulak

Promotor pomocniczy: dr hab. Agnieszka Jaźwa-Kusior

Aktualnie główną przyczyną śmierci na świecie są choroby układu krążenia (CVD, *cardiovascular diseases*). Nie zmienił tego nawet fakt, że na przestrzeni ostatnich 50 lat w wyniku intensywnych badań dotyczących przyczyn, przebiegu i konsekwencji CVD, zaczęto znacznie lepiej rozumieć istotę tych schorzeń, co niejednokrotnie pozwalało na opracowanie nowych, skuteczniejszych sposobów leczenia. W ostatecznym rozrachunku, pół wieku badań przyczyniło się do spadku śmiertelności spowodowanej przez CVD aż o ponad 70% w niektórych wysoko rozwiniętych krajach. Pomimo to, schorzenia te nadal pozostają główną przyczyną śmierci, z wiodącą pozycją choroby niedokrwiennej serca (IHD, *ischemic heart disease*). Do jej rozwoju dochodzi w wyniku ograniczenia lub zatrzymania przepływu krwi w naczyniach wieńcowych, najczęściej na z powodu toczącego się procesu miażdżycowego, lub zdarzenia nagłego, spowodowanego zablokowaniem tętnicy wieńcowej, np. płynącą z prądem krwi skrzepliną wytworzoną w sercu na skutek migotania przedsionków. Całkowite zablokowanie przepływu w naczyniach wieńcowych prowadzi do zawału serca (MI, *myocardial infarction*) i w konsekwencji, o ile nie zakończy się on zgonem, do rozwoju niewydolności serca.

Praca ta zawiera opis badań obejmujących dwa aspekty rozwoju IHD, które wydają się w świetle aktualnej wiedzy stanowić obiecujące podstawy do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Z jednej strony jest to określenie udziału komórek układu odpornościowego w rozwoju IHD. Ostatnie lata badań pokazały, że istotnym elementem układu odpornościowego zaangażowanego w rozwój zmian miażdżycowych i przebudowę mięśnia sercowego po zawale są monocyty i makrofagi. Wykazano, że część makrofagów obecnych w sercu, odmienna od makrofagów pochodzenia monocytarnego (MDM, *monocyte-derived macrophages*), powstała jeszcze w czasie rozwoju embrionalnego (eM, *embryonically-established macrophages*), w przeciwieństwie do MDM przyczynia się do zwiększenia regeneracji mięśnia sercowego po zawale. Populacja eM jako jedyna obok monocytów obecna jest w sercach noworodków myszy przez około 7 dni po urodzeniu i pozwala na niemal całkowitą regenerację ich serca po uszkodzeniu. Drugim celem badań było określenie znaczenia enzymu – oksygenazy hemowej-1 (HO-1, *heme oxygenase-1*) w funkcjonowaniu monocytów i makrofagów w patologii zawału serca. HO-1 i produkty jej aktywności zmniejszają stres oksydacyjny, ograniczają apoptozę, stymulują tworzenie naczyń krwionośnych i w efekcie chronią tkanki przed uszkodzeniem. Ponadto HO-1 odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu i aktywacji makrofagów, co czyni ją interesującym celem strategii terapeutycznych.

W przeprowadzonych badaniach, po indukcji zawału serca u dorosłych myszy typu dzikiego (HO-1^{+/+}) zaobserwowano znacznie większą, niż u odpowiadających im wiekowo myszy pozbawionych HO-1 (HO-1^{-/-}), śmiertelność spowodowaną pęknięciem wolnej ściany serca. Badanie echokardiograficzne serca wykazało jednak, że w ciągu 3 tygodni od indukcji zawału u myszy HO-1^{-/-} dochodzi do większego upośledzenia funkcji serca niż u myszy HO-1^{+/+}. Ponadto obserwowano akumulację makrofagów w obszarze okołozawałowym i większą hipertrofię kardiomiocytów

w porównaniu do osobników typu dzikiego. Wraz z większym uszkodzeniem serca w wyniku MI u myszy pozbawionych HO-1 obserwowano jednocześnie znacznie zwiększoną liczbę krążących, prozapalnych monocytów Ly6C^{high} we krwi 21 dni po zawale. Przedłużona ekspresja białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*) w sercach myszy HO-1^{-/-} wiązała się ze zwiększaniem liczebności populacji makrofagów MHC-II⁺ Ly6C^{high} w czasie trwania eksperymentu. W obrębie wszystkich badanych populacji makrofagów sercowych: MHC-II⁺ Ly6C^{high}, MHC-II^{high} Ly6C^{low} i MHC-II^{low} Ly6C^{low} pojawiły się prozapalne subpopulacje wykazujące wysoką ekspresję CD11c. W celu identyfikacji źródła zwiększonej liczby monocytów u myszy HO-1^{-/-} przeprowadzono kolejne analizy, które pokazały, że w szpiku kostnym tych zwierząt wyjściowo znajdowało się więcej hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych, a po zawale liczby te uległy dodatkowemu zwiększeniu. Wykazano ponadto, że śledziona – narząd, w którym może dochodzić do mielopoëzy pozaszpikowej – jest głównym miejscem powstawania nadmiarowych monocytów u myszy HO-1^{-/-}. Śledziona tych zwierząt zawierała więcej monocytów Ly6C^{high} w porównaniu do osobników typu dzikiego, a po zawale liczba tych komórek była znacznie mniejsza niż u myszy HO-1^{+/+}, przy jednoczesnym wzroście ich liczebności w krwi obwodowej. Może to sugerować mobilizację komórek z rezerwuaru jakim jest śledziona. Usunięcie śledziony poprzedzające MI u myszy HO-1^{-/-} prowadziło do obniżenia liczby monocytów w krwi obwodowej, zmniejszenia liczebności populacji prozapalnych makrofagów w sercu i znacznej poprawy funkcji serca w porównaniu do kontroli z MI bez splenektomii.

W drugiej części badań określono liczebność populacji eM w sercach noworodków myszy typu dzikiego i pozbawionych HO-1, wskazując na znacznie większy udział zarówno eM jak i monocytów w sercach HO-1^{-/-}. Natomiast u dorosłych osobników różnice te ulegają zatarciu. Zwiększona ekspresja MCP-1, którą zaobserwowano już w sercach kilkudniowych noworodków HO-1^{-/-}, sugeruje stopniową utratę populacji eM w wyniku zastępowania jej przez stale rekrutowane do tkanki monocyty. W celu weryfikacji znaczenia eM, przed wywołaniem MI usunięto makrofagi z serca korzystając z liposomów zawierających kłodronian disodowy (CLIP, *clodronate liposomes*). U dorosłych myszy typu dzikiego, w przeciwieństwie do osobników HO-1^{-/-}, po podaniu CLIP i indukcji MI obserwowano znaczne pogorszenie funkcji i przerost serca, co jednocześnie było związane z większą przeżywalnością myszy WT niż po samym MI. U myszy HO-1^{-/-} usunięcie makrofagów nie wpłynęło na badane parametry.

Podsumowując, wykazano, że brak HO-1 z jednej strony poprawia przeżywalność w pierwszych dobach po zawale, ale w perspektywie czasu powoduje zwiększoną mobilizację monocytów do krwi i zwiększoną infiltrację uszkodzonej tkanki. W konsekwencji ekspansja prozapalnych populacji makrofagów przyczynia się do niekorzystnej przebudowy serca po zawale i rozwoju niewydolności. Zidentyfikowano śledzionę jako źródło nadmiarowych monocytów, przyczyniających się do rozwoju niewydolności serca u myszy HO-1^{-/-}. W końcu wykazano, że brak HO-1 już u noworodków przyspiesza wymianę makrofagów w sercu i prawdopodobnie prowadzi do wyczerpania populacji eM. Natomiast usunięcie makrofagów tkankowych u dorosłych myszy typu dzikiego nasila pozawałową niewydolność serca, przez co fenotypowo przypominają one myszy pozbawione HO-1. Zaprezentowane wyniki wskazują, na to, że modulowanie ekspresji HO-1 w sercu może posłużyć jako strategia terapeutyczna, jednak wymaga ona ścisłej kontroli w czasie. Z drugiej strony, ograniczenie infiltracji mięśnia sercowego przez monocyty zapalne wydaje się być dobrym sposobem łagodzącym konsekwencje MI.

11-06-2019

