ZAŁĄCZNIK 3a

Autoreferat

dr Agnieszka Jaźwa-Kusior
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 2018

1. Imię i Nazwisko

Agnieszka Jaźwa-Kusior (z d. Jaźwa)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/~~artystyczne~~ – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Stopień naukowy doktora

Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii

Data nadania stopnia naukowego doktora: 4.11.2008 r. (Rada Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków)

Promotor: prof. dr hab. Józef Dulak

Recenzenci: prof. dr hab. Hanna Rokita (WBBiB UJ); prof. dr hab. Marcin Gruchała (Gdański Uniwersytet Medyczny)

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Zastosowanie bicistronowych wektorów plazmidowych i AAV do transferu genów VEGF i FGF-4 stymulujących procesy neowaskularyzacji*"

Tytuł zawodowy magistra

Magister analityki medycznej

Data nadania tytułu zawodowego magistra: 2.07.2002 r. (Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków)

Promotor: prof. dr hab. Marek Sanak

Recenzent: prof. dr hab. Stefan Chłopicki (Katedra Farmakologii, UJ CM)

Tytuł rozprawy magisterskiej: „*Przydatność metody HPLC w oznaczaniu leukotrienów cysteinylowych we krwi obwodowej*"

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/~~artystycznych~~

Styczeń 2011-obecnie – adiunkt; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Wrzesień 2010-Grudzień 2010 – asystent naukowy; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Lipiec 2009-Lipiec 2010 – asystent naukowy; Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Universidad Autonoma de Madrid, Hiszpania; zagraniczny staż podoktorski

Wrzesień 2008-Lipiec 2009 – asystent naukowy; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

2004–2008 - studia doktoranckie na kierunku Biochemia i Biofizyka, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Sierpień 2003-Wrzesień 2004 – asystent naukowy; Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Maj 2002-Lipiec 2003 – analityk medyczny; II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/~~artystycznego~~

Proangiogenne i przeciwzapalne mechanizmy molekularne i terapia genowa w modelach eksperymentalnych chorób układu sercowo-naczyniowego

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Tomczyk M, Kraszewska I, Dulak J, Jazwa-Kusior A*; 2018; *"Modulation of the monocyte/macrophage system in heart failure by targeting heme oxygenase-1"*; Vascul Pharmacol 2018 Sep 10 (* autor korespondencyjny)

IF (2018): 3,607 punkty MNiSW: 30 Liczba cytowań: 0

2. Tomczyk M, Kraszewska I, Szade K, Bukowska-Strakova K, Meloni M, Jozkowicz A, Dulak J, Jazwa A*; 2017; *"Splenic Ly6C^{hi} monocytes contribute to adverse late post-ischemic left ventricular remodeling in heme oxygenase-1 deficient mice"*; Basic Res Cardiol; 112: 39 (* autor korespondencyjny)

IF (2016): 5,306 punkty MNiSW: 40 Liczba cytowań: 10

3. Jazwa A*, Florczyk U, Grochot-Przeczek A, Krist B, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J; 2016; *"Limb ischemia and vessel regeneration: Is there a role for VEGF?"*; Vascul Pharmacol; 86: 18-30 (* autor korespondencyjny)

IF (2016): 3,718 punkty MNiSW: 30 Liczba cytowań: 8

4. Jazwa A*, Stoszko M, Tomczyk M, Bukowska-Strakova K, Pichon C, Jozkowicz A, Dulak J; 2015; *"HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immune responses - Effects modified by concomitant VEGF overexpression"*; Vascul Pharmacol; 71: 127-38 (* autor korespondencyjny)

IF (2015): 2,500 punkty MNiSW: 30 Liczba cytowań: 8

5. Jazwa A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J*; 2013; *"Gene therapy on demand: site specific regulation of gene therapy"*; Gene; 525: 229-38 (* autor korespondencyjny)

IF (2013): 2,082 punkty MNiSW: 20 Liczba cytowań: 12

6. Jazwa A*, Stepniewski J, Zamykal M, Jagodzinska J, Meloni M, Emanueli C, Jozkowicz A, Dulak J*; 2013; *"Pre-emptive hypoxia-regulated HO-1 gene therapy improves post-ischaemic limb perfusion and tissue regeneration in mice"*; Cardiovasc Res; 97: 115-24 (* autorzy korespondencyjni)

IF (2013): 5,808 punkty MNiSW: 40 Liczba cytowań: 26

c) omówienie celu naukowego/~~artystycznego~~ ww. ~~pracy~~/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Choroby sercowo-naczyniowe (CVD – ang. *cardiovascular disease*) to termin obejmujący grupę schorzeń serca i naczyń krwionośnych. Zaliczamy do nich m.in.: chorobę niedokrwienną serca (CAD, ang. *coronary artery disease*), niedokrwienny udar mózgu i chorobę tętnic obwodowych (PAD, ang. *peripheral artery disease*). CVD od 15 lat stanowią główną przyczynę zachorowalności i przedwczesnych zgonów na świecie[1]. U ich podłoża leży proces miażdżycowy toczący się w różnych obszarach układu krążenia. Jeśli miażdżyca rozwija się w naczyniach wieńcowych, prowadzi do CAD, zawału (MI – ang. *myocardial infarction*) i niewydolności serca (HF – ang. *heart failure*). Niedokrwienny udar mózgu jest

[1] WHO Fact sheet, updated May 2018; http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/

spowodowany miażdżycą tętnic mózgowych. Natomiast, PAD powoduje proces miażdżycowy toczący się w obrębie tętnic zaopatrujących kończyny, zazwyczaj dolne. Niewydolność krążenia w tym obszarze skutkuje upośledzonym gojeniem się ran oraz występowaniem napadowego bólu podczas chodzenia, wymuszającego zatrzymywanie się i odpoczynek (tzw. chromanie przestankowe).

Obecnie znamy wiele czynników ryzyka miażdżycy[2]. Wiadomo również, iż na ryzyko wystąpienia CVD największy wpływ spośród czynników stylu życia ma nieprawidłowa dieta, a spośród medycznych – nadciśnienie tętnicze[2]. Inne ważne czynniki ryzyka CVD to palenie tytoniu, brak ruchu, szybka akcja serca, upośledzona tolerancja glukozy i cukrzyca, otyłość oraz przewlekłe stany zapalne[2]. Wszelkie działania prewencyjne powinny się więc koncentrować na ich zwalczaniu. Na skutek przedłużonego niedokrwienia dochodzi bowiem do zaburzenia równowagi pomiędzy zaopatrzeniem, a zapotrzebowaniem na tlen, co nieuchronnie prowadzi do obumierania komórek w danym obszarze serca, mózgu, czy kończyn dolnych. Tylko szybkie udrożnienie zamkniętej tętnicy może w znacznym stopniu ograniczyć strefę martwicy, poprawić przeżywalność i jakość życia chorych. Niestety, niekiedy nawet przy zastosowaniu farmakoterapii (leki fibrynolityczne, przeciwpłytkowe) oraz zabiegów chirurgicznych tj. przezskórna angioplastyka wieńcowa (metoda z wyboru leczenia pacjentów z ostrym zawałem serca), stosowanie stentów i pomostowanie aortalno-wieńcowe, schorzenia te nie zawsze daje się skutecznie leczyć. Stwarza to potrzebę dalszego poszukiwania skutecznych metod terapeutycznych w tym zakresie.

Terapia genowa polega na wprowadzeniu do komórek somatycznych pacjenta kwasu nukleinowego (zazwyczaj cDNA prawidłowego genu), w celu zastąpienia genu brakującego lub uszkodzonego i uzyskania efektu terapeutycznego. Taki efekt może być przejściowy lub długotrwały, a sama procedura może dotyczyć jedynie komórek somatycznych, gdyż w chwili obecnej modyfikacja genetyczna komórek rozrodczych jest niedozwolona. Transfer genów z wykorzystaniem metod fizycznych oraz wektorów wirusowych i niewirusowych można przeprowadzić bezpośrednio *in vivo* lub *ex vivo* do komórek izolowanych od pacjenta, po czym komórki powracają z powrotem do pacjenta. Jak dotąd, metoda ogólnoustrojowego transferu genów nie była zbyt wydajna, więc większość badań prowadzono w oparciu o

[2] Wytyczne ESC dotyczące prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego w praktyce klinicznej w 2016 roku. Szósta Wspólna Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i innych towarzystw naukowych ds. prewencji sercowo-naczyniowej w praktyce klinicznej. Kardiologia Polska 2016; 74, 9: 821–936.

techniki dostarczania chirurgicznego, bezpośrednio w formie zastrzyku (np. domięśniowego) lub za pośrednictwem cewnika. Wykazano ponadto, że transdukcja *ex vivo* komórek szpiku kostnego jest skuteczna w zastosowaniach klinicznych. Terapia genowa jest obecnie skuteczną formą leczenia chorób jednogenowych, m.in. ciężkiego złożonego niedoboru odporności (SCID)[3], beta-talasemii[4,5], czy wrodzonej ślepoty Lebera[6].

W przypadku CVD tylko niewielka część to tzw. choroby jednogenowe (np. przedwczesny zawał serca, kardiomiopatia rozstrzeniowa i przerostowa, zespół wydłużonego QT, tętniaki aorty). Zdecydowana większość CVD to tzw. choroby wielogenowe, które wydają się być wynikiem interakcji pomiędzy pewnymi czynnikami ryzyka, a czynnikami genetycznymi. Niemniej jednak, szereg badań przedklinicznych i prób klinicznych pokazuje, że terapia genowa może być skuteczną formą leczenia również CVD, nie tylko o podłożu jedno-, ale również wielogenowym[7]. Efektywność tej terapii w dużej mierze zależy jednak od czynników takich, jak: wydajny i bezpieczny nośnik (wektor); genetycznie, ale także chirurgicznie ukierunkowany transfer genów; oraz skuteczny czynnik terapeutyczny lub odpowiednie połączenie takich czynników.

Niedokrwienie tkanek wyzwala spontaniczną odpowiedź angiogenną, czyli powstawanie nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących. Efekt ten jest w dużej mierze uwarunkowany aktywnością czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), który indukuje angiogenezę poprzez stymulację migracji i aktywności proteolitycznej komórek śródbłonka[8]. Niedotlenienie jest jednym z najsilniejszych stymulatorów syntezy VEGF. Niemniej jednak, endogenna produkcja VEGF w takich warunkach może być zaburzona i uniemożliwiać powstawanie tzw. krążenia obocznego, które mogłoby znacznie ograniczyć obszar niedokrwienia[9]. Co ważne,

---

[3] Aiuti A *et al.* Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. N Engl J Med 2009; 360: 447-58.
[4] Cavazzana-Calvo M *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. Nature 2010; 467: 318-22.
[5] Roselli EA *et al.* Correction of beta-thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients. EMBO Mol Med 2010; 2: 315-28.
[6] Maguire AM *et al.* Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet 2009; 374: 1597-605.
[7] Ylä-Herttuala S and Baker A. Cardiovascular Gene Therapy: Past, Present, and Future. Mol Ther, 2017; 25: 1095-1106.
[8] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. Kidney Int 1999; 56: 794-814.
[9] Schultz A, *et al.* Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. Circulation 1999; 100: 547-52.

angiogeneza może być stymulowana *in vivo* w zwierzęcych modelach CAD[10,11] oraz PAD[12,13] poprzez wprowadzenie dodatkowych kopii genu VEGF w wektorach plazmidowych lub wirusowych. Taka proangiogenna terapia genowa przez wiele lat uważana była za potencjalnie alternatywną strategię dla klasycznych metod leczenia chirurgicznego pacjentów kardiologicznych tj. pomostowanie aortalno-wieńcowe, czy przezskórna angioplastyka wieńcowa. Niestety, brak spodziewanych korzyści płynących z tej terapii u ludzi sugeruje, że sama stymulacja terapeutycznej angiogenezy z wykorzystaniem genu VEGF może być niewystarczająca w leczeniu CVD.

Niedotlenienie i stres oksydacyjny odgrywają istotną rolę w patologii chorób serca. Zwiększona ekspresja genów antyoksydacyjnych indukowanych stresem, takich jak manganowa dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza peroksysomów, peroksydaza glutationowa-1 oraz oksygenaza hemowa-1 (HO-1, ang. *heme oxygenase 1*), stanowi system obrony tkanek objętych niedokrwieniem[14]. Uważa się jednak, że niewystarczające lub zmniejszające się z wiekiem właściwości antyoksydacyjne tych enzymów mogą być przyczyną niewystarczającej ochrony przeciwko szkodliwym efektom reaktywnych form tlenu. Terapia genowa polegająca na wprowadzeniu dodatkowych kopii tych genów stwarza nie tylko możliwość poprawy wydajności takich antoksydacyjnych reakcji, ale również może zapewnić dodatkowe efekty cytoprotekcyjne.

HO-1 to enzym degradujący hem do jonu żelaza, tlenku węgla (CO) i biliwerdyny przekształcanej następnie do bilirubiny przez reduktazę biliwerdyny[15]. Okazuje się jednak, że rola HO-1 wykracza daleko poza zwykłą eliminację hemu. Produkty aktywności HO-1 (CO, biliwerdyna/bilirubina oraz ferrytyna indukowana przez uwalniane jony żelaza) chronią komórki przed stresem oksydacyjnym, mają działanie anty-apoptotyczne, proangiogenne i przeciwzapalne[16]. Wykazano to w badaniach *in vitro* oraz w modelach doświadczalnych

---

[10] Su H, *et al.* Adeno-associated viral vector delivers cardiac-specific and hypoxia-inducible VEGF expression in ischemic mouse hearts. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 16280-5.

[11] Koransky ML, *et al.* VEGF gene delivery for treatment of ischemic cardiovascular disease. Trends Cardiovasc Med 2002; 12: 108-14.

[12] Dulak J, *et al.* Gene transfer of naked VEGF plasmid induces the formation of microvessels but not mature collaterals in ischemic limb muscles, Eur Surg 2002; 34: 105-110.

[13] Shimpo M, *et al.* AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. Cardiovasc Res 2002; 53: 993-1001.

[14] Jazwa A, *et al.* New vectors and strategies for cardiovascular gene therapy. Curr Gene Ther 2007; 7: 7-23.

[15] Maines MD and Gibbs PE. 30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. Biochem Biophys Res Commun 2005; 338: 568-77.

[16] Loboda A *et al.* Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 2008; 10: 1767-812.

chorób układu krążenia wykorzystując zwierzęta transgeniczne z narządowo- bądź komórkowo-specyficzną nadekspresją HO-1 oraz myszy z nokautem tego genu (prace przeglądowe[16,17]). Co istotne, badania te mogą mieć implikacje kliniczne. U ludzi bowiem w promotorze genu HO-1, około 250 par zasad powyżej miejsca startu transkrypcji znajduje się różna (od n=11 do n=40) liczba powtórzeń GT [*(GT)n repeat polymorphism*], wpływających na transkrypcję. Obecność krótszych sekwencji powtórzeń (GT)n<25 koreluje z wyższym poziomem i aktywnością HO-1. Natomiast, obecność dłuższych sekwencji powtórzeń (GT)n związana jest z niższym poziomem i aktywnością HO-1, co koreluje ze zwiększonym ryzykiem rozwoju CVD[18]. Uważa się, że może to mieć związek właśnie z antyoksydacyjną, proangiogenną i przeciwzapalną aktywnością HO-1, ale mechanizmy warunkujące te efekty nie zostały jeszcze dobrze poznane.

W związku z powyższym, przewodnim celem prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe habilitantki, była analiza proangiogennych i przeciwzapalnch mechanizmów molekularnych oraz terapia z wykorzystaniem genów HO-1 i VEGF w modelach eksperymentalnych chorób układu sercowo-naczyniowego. Prace te miały na celu uzupełnienie i podsumowanie wiedzy podstawowej w tym zakresie w celu lepszego zrozumienia patogenezy CVD oraz poszukiwania nowych strategii terapeutycznych.

Ocena aktywności HO-1 w modelu eksperymentalnym ostrego niedokrwienia kończyn

Zwięzła charakterystyka prac przedstawionych w publikacjach:

Jazwa A*, Stoszko M, Tomczyk M, Bukowska-Strakova K, Pichon C, Jozkowicz A, Dulak J; 2015; *"HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immune responses - Effects modified by concomitant VEGF overexpression"*; Vascul Pharmacol; 71: 127-38 (* autor korespondencyjny)

Jazwa A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J*; 2013; *"Gene therapy on demand: site specific regulation of gene therapy"*; Gene; 525: 229-38 (* autor korespondencyjny)

Jazwa A*, Stepniewski J, Zamykal M, Jagodzinska J, Meloni M, Emanueli C, Jozkowicz A, Dulak J*; 2013; *"Pre-emptive hypoxia-regulated HO-1 gene therapy improves post-ischaemic limb perfusion and tissue regeneration in mice"*; Cardiovasc Res; 97: 115-24 (* autorzy korespondencyjni)

[17] Czibik G *et al.* Heme oxygenase-1: an emerging therapeutic target to curb cardiac pathology. Basic Res Cardiol 2014; 109: 450.

[18] Daenen KE *et al.* Association of HO-1 (GT)n Promoter Polymorphism and Cardiovascular Disease: A Reanalysis of the Literature. Can J Cardiol 2015; 32: 160-168.

Główne cele naukowe prac:

- badanie skutków ostrego niedokrwienia kończyn u myszy typu dzikiego oraz myszy z wyłączonym genem HO-1 (HO-1 KO)
- ocena skuteczności terapii genowej ostrego niedokrwienia kończyn u myszy z wykorzystaniem wektorów plazmidowych do nadekspresji HO-1 aktywowanej w warunkach niedotlenienia tkanek
- ocena bezpieczeństwa i skuteczności dostarczania transgenu do mięśni szkieletowych z wykorzystaniem techniki sonoporacji
- podsumowanie aktualnego stanu wiedzy (praca przeglądowa) nt. terapii genowej ze szczególnym uwzględnieniem nośników, w których ekspresja genów regulowana jest za pomocą tzw. bodźców wewnętrznych z mikrośrodowiska (np. niedotlenienie)

Krytyczne niedokrwienie kończyn (CLI – ang. *critical limb ischemia*) jest zaawansowaną formą PAD, wynikającą z progresji miażdżycy i stopniowej redukcji napływu krwi do kończyny w wyniku zamykania światła tętnic doprowadzających krew do tkanek najczęściej kończyn dolnych. CLI definiuje pacjentów z przewlekłym bólem niedokrwiennym w spoczynku, owrzodzeniami lub martwicą kończyn w wyniku zmian miażdżycowych[19]. W krajach rozwiniętych, w tym w Polsce, szacuje się, że zaburzenie to występuje u 500 do 1000 osób rocznie[20,21] i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zgonu. Niestety, tylko około 30% pacjentów kwalifikuje się do chirurgicznej rewaskularyzacji, czyli pomostowania naczyń (ang. *by-pass*) lub przezskórnej angioplastyki balonowej (ang. *percutaneous transluminal angioplasty*)[19-21]. Ponadto, skuteczność tradycyjnego leczenia farmakologicznego jest ograniczona i nie zatrzymuje postępu choroby. W wielu przypadkach jedyną metodą ratowania życia chorych jest amputacja kończyn, która sama w sobie jest związana z niską przeżywalnością[20]. Stwarza to potrzebę dalszego poszukiwania skutecznych metod leczenia.

Eksperymentalne modele zwierzęce CLI zostały opracowane zarówno u małych, jak i u dużych zwierząt w celu badania patologicznych mechanizmów leżących u podstaw tej choroby, a także oceny skuteczności nowych strategii terapeutycznych[22] (szczegółowa

[19] Aronow WS, Peripheral arterial disease of the lower extremities, Arch. Med. Sci. 8 (2012) 375–388.
[20] Garcia LA, Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. J. Endovasc. Ther. 13 (Suppl. 2) 2006; II3–II9.
[21] Bodzon W *et al.* Leczenie wewnątrznaczyniowe krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych u chorych niekwalifikujących się do leczenia operacyjnego. Chirurgia Polska 2007; 9:18–24.
[22] Jazwa A *et al.* Limb ischemia and vessel regeneration: Is there a role for VEGF? Vascul Pharmacol 2016; 86: 18-30.

charakterystyka tych modeli opisana została w pracy przeglądowej[22] wchodzącej w cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe). Ogromna większość modeli eksperymentalnych, w tym również model stosowany w naszych badaniach, opiera się na ostrym niedokrwieniu zdefiniowanym jako nagły spadek perfuzji. U ludzi taka sytuacja jest spowodowana głównie zakrzepem w miejscu pęknięcia blaszki miażdżycowej lub zatorowością wywołaną przez oderwany fragment blaszki miażdżycowej lub uformowaną na niej skrzepliną. Tak więc, pacjenci z PAD również mogą doświadczyć ostrego niedokrwienia kończyn dolnych z powodu niedrożności naczyń (ang. *acute-on-chronic ischemia*), która nagle zagraża żywotności tkanek poniżej miejsca niedokrwienia.

Zanim podjęliśmy nasze badania, dane literaturowe wskazywały na korzystne efekty nadekspresji HO-1 w modelach zwierzęcych CVD (prace przeglądowe[16,17]). Korzystne z terapeutycznego punktu widzenia proangiogenne (stymulujące powstawanie nowych naczyń krwionośnych) właściwości tego enzymu wydają się być w znacznej mierze zależne od uwalnianego CO poprzez stymulację rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej w komórkach śródbłonka[23]. Dodatkowo, wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Biotechnologii Medycznej wykazały, że HO-1 może wpływać na ekspresję miogenicznych czynników regulatorowych (MRF, ang. *myogenic regulatory factors*) oraz mikroRNA (ang. *microRNAs, miRNAs*) zaangażowanych w proces odbudowy uszkodzonych włókien mięśniowych z komórek satelitowych[24]. Takie efekty aktywności HO-1 sugerowały możliwość działania terapeutycznego w CLI.

W ramach przeprowadzonych doświadczeń w modelu ostrego, chirurgicznie wywołanego niedokrwienia kończyny tylnej (podwiązanie tętnicy udowej wraz z żyłą udową) u myszy wykazaliśmy istotne różnice w rewaskularyzacji i reperfuzji obszaru niedokrwienia pomiędzy myszami typu dzikiego (WT) oraz pozbawionymi genu HO-1 (HO-1 KO)[25]. Analiza histologiczna preparatów tkankowych wykazała znacznie mniejszą u myszy HO-1 KO, niż u myszy WT, liczbę kapilarnych naczyń krwionośnych oraz większą liczbę komórek, które uległy apoptozie po incydencie niedokrwienia. Dodatkowo, lokalna nadekspresja HO-1 w mięśniu łydki (dużo poniżej miejsca podwiązania tętnicy) u myszy C57Bl/6 przyspieszała

[23] Jozkowicz A *et al.* Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. Antioxid Redox Signal 2003;5:155–162.
[24] Kozakowska M *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs. Antioxid Redox Signal 2012;16:113–127.
[25] Jazwa A *et al.* Pre-emptive hypoxia-regulated HO-1 gene therapy improves post-ischaemic limb perfusion and tissue regeneration in mice. Cardiovasc Res 2013; 97: 115-24.

regenerację niedokrwionej tkanki mięśniowej poprzez zwiększoną rewaskularyzację (obecność większej liczby naczyń kapilarnych w obrazie histologicznym), zmniejszony stan zapalny (mniejszy naciek komórek zapalnych i niższy poziom cytokin prozapalnych) oraz zmianę ekspresji czynników MRF (miogenina, MyoD, Pax7) oraz miRNA (miR-206) biorących udział w odbudowie uszkodzonych włókien mięśniowych z komórek satelitarnych[25]. Miarą skuteczności zastosowanej terapii była również istotna poprawa perfuzji uprzednio niedokrwionych kończyn tylnych myszy w obrazie laserowego skanera dopplerowskiego (LDPI, PIM II, Perimed)[25].

W wyniku kolejnych badań wykazaliśmy, że lokalna nadekspresja HO-1 w mięśniu łydki u myszy z wyłączonym genem HO-1 pozwala zniwelować zaobserwowane wcześniej różnice pomiędzy WT i HO-1 KO w reperfuzji kończyn po incydencie niedokrwienia[26]. Nadekspresja HO-1 w niedokrwionym mięśniu szkieletowym u myszy HO-1 KO podnosiła liczbę kapilarnych naczyń krwionośnych oraz małych tętniczek, jak również obniżała poziom cytokin prozapalnych (IL-1β, IL-6, TNFα) oraz. indukowaną w warunkach niedokrwienia oraz na skutek podania do mięśni plazmidów zawierających immunogenne sekwencje CpG, ekspresję receprorów toll-podobnych (TLR, ang. *toll-like receptors*)[26].

W ramach tych badań ocenialiśmy również skuteczność i bezpieczeństwo transferu genów poprzez domięśniowe podanie plazmidowego DNA zmieszanego z mikropęcherzykami wypełnionymi gazem (MicroMarker™, VisualSonics) w połączeniu z ekspozycją miejsca iniekcji na fale dźwiękowe o niskiej częstotliwości (1 MHz; Vevo SoniGene, VisualSonics), czyli tzw. sonoporacji. Wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazywały bowiem, że zastosowanie takiej technologii znacznie zwiększa wydajność transferu genów *in vivo* i tym samym poprawia efekt terapeutyczny[27]. W naszych badaniach, pomiary bioluminescencji *in vivo* (IVIS Lumina II, Caliper) faktycznie wykazały znacznie wyższą ekspresję wprowadzonego transgenu po zastosowaniu metody sonoporacji, niż po domięśniowej iniekcji samego plazmidu[26]. Z kolei analiza histologiczna tkanki mięśniowej z kończyny tylnej myszy po zastosowaniu sonoporacji nie wykazała uszkodzeń i nacieku komórek zapalnych, a oznaczony metodą ELISA poziom prozapalnej IL-1β był porównywalny z poziomem występującym u zwierząt kontrolnych[26].

---

[26] Jazwa A *et al.* HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immune responses - Effects modified by concomitant VEGF overexpression. Vascul Pharmacol 2015; 71: 127-38.

[27] Newman CM, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. Gene Ther 2007; 14: 465-75.

W opisanych wyżej badaniach[25,26] zdecydowaliśmy się na wykorzystanie systemu do nadekspresji aktywowanego w warunkach niedotlenienia (hipoksji). System ten opiera się na dobrze poznanym mechanizmie regulacji ekspresji genów przez czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją 1 (HIF-1, ang. *hypoxia-inducible factor 1*)[28]. Wiązanie HIF-1 do elementu odpowiedzi na niedotlenienie (HRE, ang. *hypoxia response element*), sekwencji obecnej w regionie promotorowym, umożliwiło przejściową, krótkotrwałą nadekspresję HO-1 w komórkach, które uległy niedotlenieniu w wyniku zablokowania dopływu krwi[25,26]. Taka strategia znacznie podnosi bezpieczeństwo terapii ze względu na możliwość włączania ekspresji transgenu tylko w obszarze objętym niedokrwieniem. Ponadto, w przeciwieństwie do promotorów konstytutywnych, promotory regulowane hipoksją umożliwiają produkcję czynnika terapeutycznego tylko w warunkach, kiedy jest on niezbędny, co ogranicza występowanie potencjalnych efektów ubocznych mogących się pojawić w wyniku długotrwałej nadekspresji transgenu. Dokładną charakterystykę tego i innych systemów regulacji ekspresji genów za pomocą tzw. bodźców wewnętrznych z mikrośrodowiska (np. niedotlenienie, stres oksydacyjny), jak również systemów opartych na podawanych z zewnątrz ligandach (np. rapamycyna, tetracyklina), komórkowo-specyficznych promotorów, sekwencji wiążących miRNA, i innych podano w pracy przeglądowej[29] wchodzącej w cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe.

Osiągnięte wyniki:

- wykazano, że myszy HO-1 KO charakteryzuje upośledzona, w porównaniu do myszy WT, rewaskularyzacja i reperfuzja po incydencie niedokrwienia kończyn
- wykazano, że lokalna i krótkotrwała nadekspresja HO-1 aktywowana niedotlenieniem poprawia unaczynienie oraz regenerację tkanki mięśniowej w kończynach myszy po incydencie niedokrwienia
- wykazano, że sonoporacja może być uważana za bezpieczną metodę dostarczania genów, nie powodującą uszkodzenia tkanek i nie wywołującą odczynu zapalnego, a ponadto znacznie poprawiającą efektywność transferu genów *in vivo*

[28] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. J. Lab Clin Med 1998; 131: 207–214.
[29] Jazwa A *et al.* Gene therapy on demand: site specific regulation of gene therapy. Gene 2013; 525: 229-38.

Ocena aktywności VEGF w modelu eksperymentalnym ostrego niedokrwienia kończyn

Zwięzła charakterystyka prac przedstawionych w publikacjach:

Jazwa A*, Florczyk U, Grochot-Przeczek A, Krist B, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J; 2016; *"Limb ischemia and vessel regeneration: Is there a role for VEGF?"*; Vascul Pharmacol; 86: 18-30 (* autor korespondencyjny)

Jazwa A*, Stoszko M, Tomczyk M, Bukowska-Strakova K, Pichon C, Jozkowicz A, Dulak J; 2015; *"HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immune responses - Effects modified by concomitant VEGF overexpression"*; Vascul Pharmacol; 71: 127-38 (* autor korespondencyjny)

Główne cele naukowe prac:

- ocena efektów biologicznych jednoczesnej nadekspresji HO-1 i VEGF w niedokrwionych mięśniach szkieletowych
- podsumowanie aktualnego stanu wiedzy (praca przeglądowa) nt. potencjału terapeutycznego VEGF w CLI z uwzględnieniem badań w modelach eksperymentalnych oraz prób klinicznych

Oprócz opisanych w poprzednim rozdziale badań nad skutkami nadekspresji HO-1 w niedokrwionych mięśniach szkieletowych, prowadziliśmy też badania dotyczące efektów biologicznych nadekspresji VEGF (VEGF-A) po incydencie niedokrwienia. Jak wspomniano we wstępie, VEGF to jedno z najistotniejszych białek regulujących proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych[8]. Wcześniejsze dane literaturowe wskazywały na duży potencjał terapeutyczny tego czynnika w zwierzęcych modelach CAD[10,11] oraz PAD[12,13]. W naszych badaniach chcieliśmy sprawdzić, czy jednoczesna stymulowana niedotlenieniem nadekspresja HO-1 i VEGF pozwoli uzyskać efekt synergistyczny w działaniu proangiogennym oraz czy będzie to skutkowało jeszcze lepszym efektem terapeutycznym w niedokrwieniu kończyn. W tym celu myszom HO-1 KO do mięśnia szkieletowego łydki wprowadzono poprzez sonoporację gen HO-1 oraz dodatkowe kopie genu VEGF w jednym wspólnym plazmidowym wektorze bicistronowym (pHRE-HO-1-VEGF; Ryc. 1). Okazało się, że taka łączona terapia faktycznie przyspiesza (dzień 7), w porównaniu do nadekspresji tylko HO-1 (dzień 14), reperfuzję kończyn tylnych myszy i znacznie obniża liczbę palców nekrotycznych po incydencie niedokrwienia[26]. Co ciekawe, efekt ten nie był związany ze zwiększoną, w porównaniu do nadekspresji tylko HO-1, liczbą naczyń krwionośnych w mięśniach

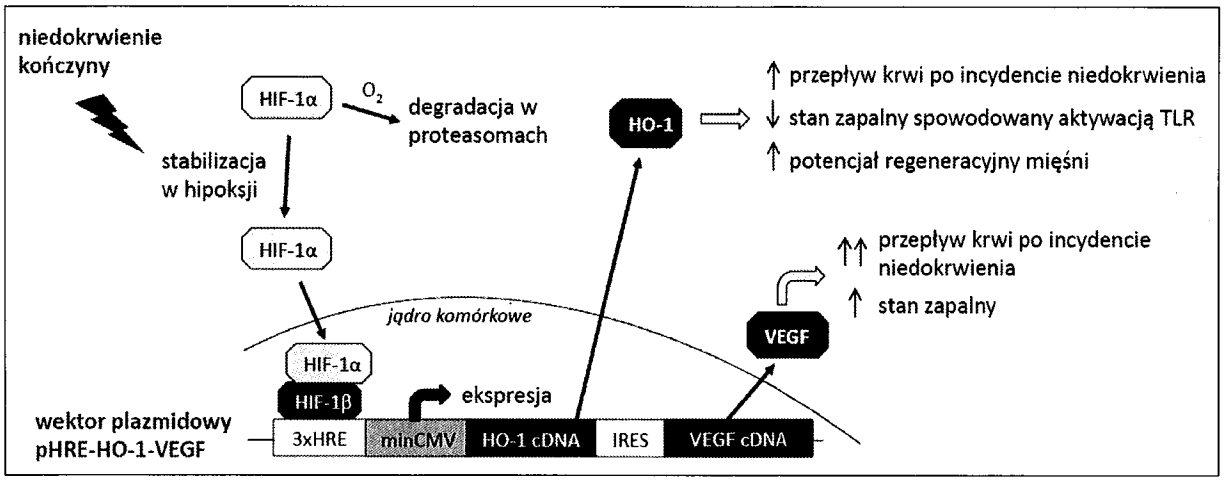
szkieletowych (ich liczba w obu grupach była w porównywalnym stopniu zwiększona w stosunku do niedokrwionych kontroli bez transferu genów). Nie zaobserwowaliśmy więc synergizmu w proangiogennym działaniu HO-1 i VEGF. Co więcej, po podaniu wektora bicistronowego zaobserwowaliśmy podniesioną, w porównaniu do wszystkich innych grup, ekspresję cytokin prozapalnych (zwłaszcza IL-1β i IL-6)[26]. Podniesiony stan zapalny, zwłaszcza w dłuższej perspektywie czasowej, może upośledzać regenerację mięśni, co stawia pod znakiem zapytania możliwość wykorzystania VEGF w terapii PAD/CLI.

Badania w których miałam możliwość uczestniczyć podczas trzymiesięcznego stażu w laboratorium profesora Seppo Yla-Herttuala na Uniwersytecie w Kuopio w Finlandii wykazały, że długotrwała nadekspresja VEGF w mięśniach szkieletowych królika, oprócz znacznej poprawy perfuzji, skutkuje nadmierną depozycją macierzy pozakomórkowej oraz zwłóknieniem mięśni[30]. Praca ta nie wchodzi w cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe ponieważ rola habilitantki w jej powstawaniu nie była wiodąca. Wart podkreślenia jest jednak fakt, że te badania również poddają w wątpliwość możliwość terapeutycznego wykorzystania VEGF w PAD/CLI. W obliczu także innych doniesień w tym zakresie postanowiliśmy przygotować pracę przeglądową opisującą biologiczne efekty indukcji endogennej ekspresji VEGF przez bodźce z mikrośrodowiska, tj. niedotlenienie w niedokrwionej tkance, jak również skutki nadekspresji VEGF po wprowadzeniu dodatkowych kopii genu u zwierząt laboratoryjnych i ludzi[22]. W pracy tej zawarliśmy ponadto niepublikowane wcześniej wyniki własne, które mogą pomóc w wyjaśnieniu opisywanych w literaturze różnic w endogennej ekspresji VEGF w odpowiedzi na niedotlenienie. Wykorzystując znacznik Hypoxyprobe™ (chlorowodorek pimonidazolu) w modelu niedokrwienia kończyny tylnej u myszy, metodą cytometrii przepływowej wykazaliśmy istotne różnice w odsetku niedotlenionych komórek (śródbłonka, mięśniowych oraz leukocytów) pomiędzy mięśniem łydki (gastrocnemius muscle), a mięśniem przywodzącym uda (adductor muscle). Skutki niedotlenienia wydają się więc być uzależnione od odległości tkanki względem miejsca zablokowania przepływu w głównym naczyniu doprowadzającym krew do kończyn (tętnica udowa) – odległe mięśnie łydki zawierały znacznie większy odsetek niedotlenionych komórek, niż bliżej położone mięśnie uda[22]. Takie różnice mogą skutkować różnym poziomem endogennej ekspresji VEGF oraz różną aktywnością proangiogenną.

[30] Karvinen H *et al.* Long-term VEGF-A expression promotes aberrant angiogenesis and fibrosis in skeletal muscle. Gene Ther 2011; 18: 1166-72.

Osiągnięte wyniki:

- wykazano, że lokalna, krótkotrwała i połączona nadekspresja HO-1 i VEGF poprawia (w porównaniu do terapii wykorzystującej tylko gen HO-1) perfuzję niedokrwionych kończyn myszy i chroni przed nekrozą, ale jednocześnie VEGF nasila lokalny stan zapalny (Ryc. 1)
- stopień niedotlenienia mięśni szkieletowych zależy od lokalizacji względem miejsca zablokowania przepływu w głównej tętnicy doprowadzającej krew do kończyn, co może tłumaczyć rozbieżności w literaturze nt. endogennej ekspresji VEGF w niedokrwionych tkankach



Ryc. 1. Biologiczne efekty przejściowej nadekspresji HO-1 i VEGF w mysim modelu niedokrwienia kończyny z wykorzystaniem plazmidowego wektora bicistronowego z sekwencjami HRE w regionie promotorowym (pHRE-HO-1-VEGF). Zaadaptowano z[26] (abstrakt graficzny, zmodyfikowano). minCMV – minimalny promotor CMV; IRES - wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu.

Ocena aktywności HO-1 w modelu eksperymentalnym ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego

Zwięzła charakterystyka prac przedstawionych w publikacjach:

Tomczyk M, Kraszewska I, Dulak J, Jazwa-Kusior A*; 2018; *"Modulation of the monocyte/macrophage system in heart failure by targeting heme oxygenase-1"*; Vascul Pharmacol 2018 Sep 10 (* autor korespondencyjny)

Tomczyk M, Kraszewska I, Szade K, Bukowska-Strakova K, Meloni M, Jozkowicz A, Dulak J, Jazwa A*; 2017; *"Splenic Ly6C^{hi} monocytes contribute to adverse late post-ischemic left ventricular remodeling in heme oxygenase-1 deficient mice"*; Basic Res Cardiol; 112: 39 (* autor korespondencyjny)

Główne cele naukowe prac:

- ocena przeżywalności i funkcji serca po ostrym niedokrwieniu mięśnia sercowego u myszy typu dzikiego oraz myszy z wyłączonym genem HO-1 (HO-1 KO)
- ocena roli HO-1 w pozawałowej mobilizacji monocytów ze śledziony oraz infiltracji mięśnia sercowego przez komórki fagocytujące
- podsumowanie aktualnego stanu wiedzy (praca przeglądowa) nt. potencjału terapeutycznego HO-1 w HF w kontekście modulowania aktywności monocytów i makrofagów

W krajach rozwiniętych CVD wynikające z niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego, należą do głównych przyczyn śmiertelności[31]. Nagła okluzja głównej tętnicy wieńcowej w sercu powoduje szybką śmierć kardiomiocytów i innych komórek w obszarze niedokrwienia. Fagocyty (neutrofile i makrofagi) natychmiast rozpoczynają usuwanie martwych komórek oraz uwolnionej przez nie zawartości. Strukturalna integralność miokardium jest zapewniona dzięki aktywności miofibroblastów, które we współpracy z komórkami zapalnymi, wyzwalają reparacyjne zwłóknienie i przebudowę (zmiany w rozmiarze, kształcie, strukturze i funkcji) mięśnia sercowego. Zapalenie jest powszechnie uważane za reakcję obronną organizmu umożliwiającą neutralizację czynnika uszkadzającego oraz naprawę uszkodzenia tkanki. Dane literaturowe wskazują jednak, że nadmierna i długotrwała reakcja zapalna po MI może nasilać degradację macierzy zewnątrzkomórkowej i powodować nadmierną ekspansję strefy zawału, jak również niekorzystną przebudowę serca i rozwój HF[32].

Prowadzone przez nas w tym zakresie badania miały na celu lepsze poznanie mechanizmów związanych z HF, a w szczególności chcieliśmy sprawdzić, czy HO-1 – białko o dobrze poznanych właściwościach przeciwzapalnych, może w jakimś stopniu modulować reakcje zapalne po MI. W ramach przeprowadzonych doświadczeń w mysim modelu ostrego, chirurgicznie wywołanego niedokrwienia mięśnia sercowego (podwiązanie lewej gałęzi zstępującej tętnicy wieńcowej) zaobserwowaliśmy istotne różnice w funkcji serca po MI

[31] Go AS *et al.* Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. Circulation 2014; 129: e28-e292.
[32] Nahrendorf M *et al.* Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. Circulation 2010; 121: 2437-45.

pomiędzy myszami WT i HO-1 KO[33]. Analiza echokardiograficzna z wykorzystaniem ultrasonografu Vevo2100 (VisualSonics) wykazała dużo większe obniżenie pozawałowej frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF – ang. *left ventricular ejection fraction*) u myszy HO-1 KO niż u WT we wszystkich analizowanych punktach pomiarowych (dzień 7, 14, 21 po MI). Towarzyszyła temu znacznie podniesiona we krwi myszy HO-1 KO w dniu 21 po MI liczba monocytów z wysoką ekspresją markera powierzchniowego Ly6C ($Ly6C^{high}$), czyli monocytów pośrednich ($Ly6C^{++}CD43^{++}$) i klasycznych ($Ly6C^{++}CD43^{+}$) związanych ze stanem zapalnym. Analiza cytometryczna wykazała ponadto, że w sercach myszy HO-1 KO po MI znajduje się znacznie więcej, niż u myszy WT po MI, makrofagów pochodzenia monocytarnego o charakterze zapalnym. Taka zwiększona infiltracja była związana z nasiloną ekspresją białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1 – ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) oraz molekuł adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1, E-selektyna) w sercach myszy HO-1 KO po MI. Co ciekawe, zabieg splenektomii odwrócił niekorzystne efekty związane z MI u myszy HO-1 KO, zaobserwowaliśmy bowiem obniżenie liczby monocytów we krwi (głównie monocytów pośrednich), zmniejszenie liczby prozapalnych makrofagów w sercu oraz poprawę LVEF[33]. Pokazaliśmy w ten sposób, że śledziona odgrywa istotną rolę w pozawałowej mobilizacji monocytów do krwi obwodowej, przebudowie mięśnia sercowego i rozwoju HF u zwierząt pozbawionych HO-1 (Ryc. 2).

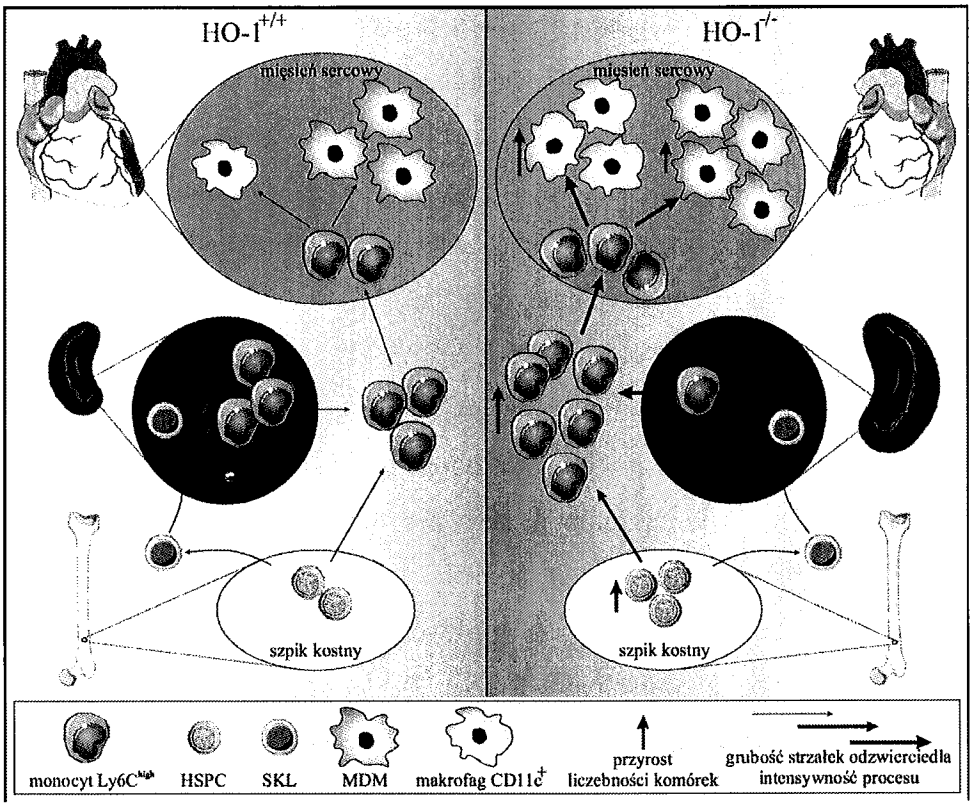
W ramach przeprowadzonych doświadczeń dokonaliśmy jeszcze jednej ciekawej obserwacji. Okazało się, że myszy HO-1 KO charakteryzuje znacznie lepsza, w porównaniu do myszy WT, przeżywalność w pierwszych dobach po MI[33]. Praktycznie we wszystkich przypadkach przyczyną zgonu były pęknięcia wolnej ściany serca (FWR – ang. *free wall rupture*), które u HO-1 KO wystąpiły sporadycznie. W celu wyjaśnienia tego zjawiska przeprowadziliśmy analizę poziomu kolagenu typu I za pomocą metody western blot. Obniżona ekspresja tego białka była bowiem wcześniej wiązana z nadmierną ekspansją strefy zawału i FWR[34]. Nasza analiza wykazała, że w 4 dniu po MI poziom kolagenu typu I w sercach myszy HO-1 KO jest znacznie podniesiony w porównaniu do myszy WT[33]. Wskazuje to na ważny mechanizm protekcyjny, zapobiegający powstawaniu FWR u myszy z niedoborem HO-1.

---

[33] Tomczyk M *et al.* Splenic $Ly6C^{hi}$ monocytes contribute to adverse late post-ischemic left ventricular remodeling in heme oxygenase-1 deficient mice. Basic Res Cardiol 2017; 112: 39.

[34] Gao XM *et al.* Lower risk of postinfarct rupture in mouse heart overexpressing beta 2-adrenergic receptors: importance of collagen content. J Cardiovasc Pharmacol 2002; 40:632–640.

Biologiczne efekty aktywności HO-1 w pozawałowej niewydolności serca, ze szczególnym uwzględnieniem roli tego białka w modulowaniu reakcji zapalnych zależnych od monocytów i makrofagów, przedyskutowaliśmy w niedawno opublikowanej pracy przeglądowej[35] wchodzącej w cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe.



Ryc. 2. Biologiczne efekty HO-1 w mysim modelu zawału mięśnia sercowego. Zaadaptowano z[35] (zmodyfikowano). Monocyt Ly6C^{high} – monocyt z wysoką ekspresją Ly6C na powierzchni; HSPC - macierzyste i progenitorowe komórki krwiotwórcze; SKL – komórki Sca-1$^+$c-kit$^+$lin$^-$; MDM – makrofagi pochodzenia monocytarnego; makrofag CD11c$^+$ – makrofag z ekspresją CD11c na powierzchni.

Osiągnięte wyniki:

- wykazano, że myszy HO-1 KO charakteryzuje znacznie bardziej upośledzona, w porównaniu do myszy WT, funkcja serca po ostrym niedokrwieniu mięśnia sercowego
- wykazano, że w nieobecności HO-1 zwiększona mobilizacja monocytów prozapalnych do krwi obwodowej oraz ich masowy napływ do serca po zawale nasila niekorzystną przebudowę i dysfunkcję LV (istotna rola śledzionowego rezerwuaru monocytów u myszy HO-1 KO; Ryc. 2)

[35] Tomczyk M *et al.* Modulation of the monocyte/macrophage system in heart failure by targeting heme oxygenase-1; Vascul Pharmacol 2018 Sep 10.

- wykazano, że zwiększona produkcja kolagenu typu I w sercach myszy HO-1 KO po MI jest związana z obniżoną podatnością tych zwierząt na FWR

Podsumowanie

Prace badawcze przedstawione jako osiągnięcie naukowe habilitantki pozwoliły na przybliżenie podstawowych mechanizmów regulujących angiogenezę i stan zapalny w CVD, ze szczególnym uwzględnieniem roli HO-1 i VEGF w tych procesach. Badania prowadzono w mysich modelach CLI i MI, a opracowanie tych modeli (zwłaszcza MI) było również istotną częścią niniejszego osiągnięcia naukowego. W ramach przeprowadzonych badań wykazano znamienną rolę HO-1 w incydentach niedokrwiennych tj. ostre niedokrwienie kończyny i ostre niedokrwienie mięśnia sercowego. O ile w pierwszym przypadku efekty niedoboru oraz przejściowej nadekspresji HO-1 w mięśniach szkieletowych były jednoznaczne, odpowiednio – szkodliwe i protekcyjne, o tyle w przypadku MI te efekty nie były tak jednoznaczne. Z jednej strony, niedobór HO-1 w pierwszych dobach po zawale działał protekcyjnie zapobiegając FWR, z drugiej jednak strony w późniejszym okresie niedobór HO-1 wiązał się ze zwiększonym stanem zapalnym, co sprzyja niekorzystnej przebudowie i dysfunkcji serca po zawale. Terapia genowa w mysim modelu CLI pozwoliła uzyskać korzystne proangiogenne efekty nadekspresji HO-1 oraz brak synergizmu w tym zakresie przy jednoczesnym wprowadzeniu genów HO-1 i VEGF do mięśnia szkieletowego. Niemniej jednak, taka łączona terapia prowadziła do szybszej reperfuzji i skutecznie chroniła przed martwicą tkanek. Wykazano ponadto, że nawet krótkotrwała nadekspresja VEGF w mięśniach szkieletowych nasila stan zapalny, a endogenna, indukowana niedokrwieniem ekspresja tego czynnika może być uzależniona od lokalizacji tkanki względem miejsca, w którym doszło do niedrożności tętnicy. Niewątpliwie, uzyskane w ramach niniejszego osiągnięcia naukowego wyniki poszerzają naszą wiedzę w zakresie patofizjologii CVD i skłaniają nas do dalszych prac mających na celu opracowanie nowych form terapii tych schorzeń. W związku z tym prowadzimy obecnie doświadczenia m.in. z wykorzystaniem drobnocząsteczkowego inhibitora CCR2 (receptor MCP-1) oraz prace nad nowymi wektorami do terapii genowej CVD.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych ~~(artystycznych)~~

Poniżej przedstawiono skrótowo pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, powstałe od chwili uzyskania stopnia naukowego doktora, w wyniku uczestnictwa w obecnie realizowanych oraz zakończonych projektach, w podziale na ważniejsze grupy tematyczne.

Analiza ekspresji miRNA i poziomu cytokin zapalnych w sarkoidozie

Mimo wielu lat badań wskazujących na kluczowe znaczenie procesów zapalnych w patogenezie sarkoidozy, mechanizmy molekularne leżące u podstaw rozwoju tej choroby nie są dobrze poznane. Niezbyt dobrze poznana jest rola komórek układu immunologicznego, w tym limfocytów T regulatorowych (Treg), w sarkoidozie. Z diagnostycznego punktu widzenia ważne jest również znalezienie odpowiedniego biomarkera lub profilu biomarkerów, które pozwoliłyby na nieinwazyjną diagnostykę chorych oraz monitorowanie efektów leczenia. W ramach prowadzonych w tym zakresie badań w Zakładzie Biotechnologii Medycznej we współpracy z Oddziałem Klinicznym Kliniki Pulmonologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, w których uczestniczyła habilitantka, analizowano populację komórek PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) oraz komórki Treg, jak również osocze krwi osób zdrowych i chorych z sarkoidozą w celu znalezienia miRNA oraz cytokin, które charakteryzowałyby chorych z sarkoidozą. W wyniku tych badań powstały następujące publikacje:

Kachamakova-Trojanowska N, **Jazwa-Kusior A**, Szade K, Kasper L, Soja J, Andrychiewicz A, Jakiela B, Plutecka H, Sanak M, Jozkowicz A, Sladek K, Dulak J; 2018; *"Molecular profiling of regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis"*; J Autoimmun 2018 Jul 23; pii: S0896-8411(18)30237-3; doi: 10.1016/j.jaut.2018.07.012.

Bak M, **Jazwa A**, Kasper L, Kachamakova-Trojanowska N, Jozkowicz A, Sladek K, Dulak J; 2015; *"Involvement of microRNAs in the inflammatory pathways of pulmonary sarcoidosis"*; J Physiol Pharmacol; 66: 635-42.

Jazwa A, Kasper L, Bak M, Sobczak M, Szade K, Jozkowicz A, Sladek K, Dulak J; 2015; *"Differential inflammatory microRNA and cytokine expression in pulmonary sarcoidosis"*; Arch Immunol Ther Exp (Warsz); 63: 139-46.

Terapia komórkowa pozawałowej niewydolności serca z wykorzystaniem komórek mezenchymalnych

Habilitantka uczestniczy w aktualnie prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii Medycznej we współpracy ze Śląskim Centrum Chorób Serca oraz Kardio-Med Silesia w Zabrzu badaniach, które mają na celu uzyskanie regeneracji mięśnia sercowego po zawale. Nasze wstępne badania prowadzone w mysim modelu MI, jak również najnowsze wyniki badań klinicznych wskazują jednak, iż terapie komórkowe z wykorzystaniem komórek somatycznych, często określanych niesłusznie jako macierzyste[36,37], w tym również komórek pochodzenia szpikowego, nie przynoszą spodziewanych efektów w leczeniu uszkodzeń mięśnia sercowego. Szczegółowe omówienie tego zagadnienia zawarliśmy w poniższej pracy przeglądowej:

Langrzyk A, Nowak WN, Stepniewski J, **Jazwa A**, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J; 2018; *"Critical view on mesenchymal stromal cells in regenerative medicine"*; Antioxid Redox Signal; 29: 169-190.

Analiza rewaskularyzacji i reperfuzji w eksperymentalnych modelach CLI

Pomimo licznych skutecznych prób proangiogennej terapii genowej, wyniki badań klinicznych nie spełniają pokładanych w niej oczekiwań. Różne czynniki mogą być odpowiedzialne za brak spodziewanych efektów, m.in. nieskuteczny czynnik terapeutyczny, nieodpowiednia dawka wektora, mało optymalna droga podania, nieefektywny system dostarczania genów lub zbyt krótki czas leczenia. Habilitantka uczestniczyła w pracach badających niektóre z tych aspektów, m.in. proangiogenne efekty czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz komórek pochodzenia szpikowego z różnym poziomem ekspresji HO-1 w modelu niedokrwienia kończyny tylnej u myszy. Dodatkowo, wyszczególniona tu została wspomniana już wcześniej praca badająca proangiogenny potencjał nadekspresji VEGF w modelu niedokrwienia kończyny tylnej królika. Badania te, miały z jednej strony niewątpliwie istotny charakter poznawczy, a z drugiej - również mogą się przyczynić do optymalizacji proangiogennej terapii genowej CLI. Wyniki tych analiz zostały zawarte w następujących publikacjach:

---

[36] Rita R. Unproven but Profitable: The Boom in US Stem Cell Clinics. JAMA 2018; 320: 1421-1423.
[37] Sipp D *et al.* Clear up this stem-cell mess. Nature 2018; 561: 455-457.

Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Kozakowska M, Starowicz K, Jagodzinska J, Stachurska A, Volger OL, Bukowska-Strakova K, Florczyk U, Tertil M, **Jazwa A**, Szade K, Stepniewski J, Loboda A, Horrevoets AJ, Dulak J, Jozkowicz A; 2014; *„Heme oxygenase-1 is required for angiogenic function of bone marrow-derived progenitor cells: role in therapeutic revascularization"*. Antioxid Redox Signal; 20: 1677-92.

Florczyk U, **Jazwa A**, Maleszewska M, Mendel M, Szade K, Kozakowska M, Grochot-Przeczek A, Viscardi M, Czauderna S, Bukowska-Strakova K, Kotlinowski J, Jozkowicz A, Loboda A, Dulak J; 2014; *„Nrf2 regulates angiogenesis: effect on endothelial cells, bone marrow-derived proangiogenic cells and hind limb ischemia"*; Antioxid Redox Signal; 20: 1693-708.

Karvinen H, Pasanen E, Rissanen TT, Korpisalo P, Vähäkangas E, **Jazwa A**, Giacca M, Ylä-Herttuala S; 2011; *"Long-term VEGF-A expression promotes aberrant angiogenesis and fibrosis in skeletal muscle"*; Gene Ther; 18: 1166-72.

Określenie neuroprotekcyjnego działania czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz HO-1 w eksperymentalnym modelu choroby Parkinsona

W trakcie stażu podoktorskiego w Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" Universidad Autonoma de Madrid (Madryt, Hiszpania) habilitantka uczestniczyła w badaniach, które wykazały, iż związek chemiczny sulforafan, składnik warzyw krzyżowych, przenika przez barierę krew-mózg oraz powoduje zależną od czynnika transkrypcyjnego Nrf2 aktywację enzymów anty-oksydacyjnych II fazy (HO-1, NQO-1, GCL) w istocie czarnej oraz prążkowiu mózgu myszy. Wykazano, iż zwiększonej ekspresji tych białek towarzyszy zmniejszony poziom cytokin prozapalnych oraz zmniejszony naciek komórek astro- i mikrogleju, co wskazuje na mniejsze uszkodzenie mózgu spowodowane podaniem toksyny 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) wywołującej parkinsonizm u gryzoni oraz u naczelnych, włączając człowieka. Sulforafan skutecznie chronił neurony dopaminergiczne myszy przed śmiercią spowodowaną podaniem MPTP. Ponadto, myszy z niedoborem Nrf2 i HO-1 charakteryzowały się różną podatnością na uszkodzenia związane z podaniem MPTP. Wyniki tych badań zostały zawarte w poniższych publikacjach:

Jazwa A, Rojo AI, Innamorato NG, Hesse M, Fernandez-Ruiz J, Cuadrado A; 2011; *"Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism"*. Antioxid Redox Signal; 14: 2347-60.

Jazwa A, Cuadrado A; 2010; *"Targeting Heme Oxygenase-1 for Neuroprotection and Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases"*. Curr Drug Targets; 11: 1517-31.

Innamorato NG, **Jazwa A**, Rojo AI, Garcia C, Fernandez-Ruiz J, Grochot-Przeczek A, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, Cuadrado A; 2010; *"Different susceptibility to the Parkinson's toxin MPTP in mice lacking the redox master regulator Nrf2 or its target gene heme oxygenase-1"*; PLoS One; 5(7):e11838.