

Szeretném megköszönni Papp Zoltán Professzor Úrnak doktori értekezésem pozitív bírálatát és értékes kérdéseit. A feltett kérdésekre válaszaim a következők:

A formai megjegyzésekre adott válaszaim:

1. A Bíráló megjegyzése arra vonatkozik, hogy a dolgozatban bemutatott diagrammokon a változók értelmezését egyszerűsítette volna a mértékegységek következetes feltüntetése, mely számos esetben elmaradt.

A jogos megjegyzéssel egyetértek, és elnézést kérek, hogy ez több ábra esetében is valóban lemaradt, vagy csak az ábra magyarázatokban vagy a metodikai részben szerepelnek ezek.

2. A bíráló azt is megjegyzi, hogy az ábraszövegekben az ábrák forrásaiként szolgáló saját közlemények referenciáit is hasznos lett volna szerepeltetni.

Az ábrák egy részének esetében ez jogos felvetés, sajnálom, ha a forrás nem mindenhol volt egyértelmű. Sok esetben a korábbi munkáinkból új ábrák készültek a doktori értekezéshez – ezeknél az ábráknál, csak a társult szöveges rész utal a saját közleményekre.

Kérdések

1. Opponensem pontosan világít rá, hogy az szívizomsejtféleségek összejtekéből való létrehozása korlátokkal is jár: az így differenciált sejtek az érett szívizomban megfigyeltekétől eltérhetnek és a sejt kultúrák nem homogén sejt populációt jelentenek. Ezért az első kérdése arra irányult, hogy milyen stratégiával lehet ebben a sokváltozós rendszerben sikert elérni, és az érett szívizomzatra jellemző és homogén szívizomsejt populációt előállítani?

A jelenlegi differenciációs eljárásokkal olyan szívizomsejteket tudunk létrehozni, amelyek éretlen, a késői főtális stádiumra jellemző tulajdonságokat mutatnak (Jiang és mtsai., 2018, Scuderi és Butcher, 2017). Számos olyan protokoll is rendelkezésünkre áll azonban már, amelyekkel ez a fejlődési korlát meghaladható és érettebb tulajdonságú sejtek hozhatóak létre. Ilyenek azok az eljárások, amelyek a születés során végbemenő metabolikus változásokat utánozzák. A születéskor a szívizomzatban a megnövekedett energiaigény miatt az energiafelhasználás módja drámai módon megváltozik, ez a sejtek proliferációs aktivitásának csökkenéséhez vezet, ezzel egyidejűleg pedig a sejtek szarkomer rendszere is rendezettebbé válik (Piquereau és Ventura-Clapier, 2018). Az ekkor végbemenő hormonális változásokat lemásolva, és így a sejteket pajzsmirigy hormonnal vagy szteroidokkal kezelve, mi és más munkacsoportok is azt találtuk, hogy az őssejt eredetű szívizomsejtek érettsége mérsékelten fokozható in vitro, így rendezettebb szarkomer struktúrájú és megnövekedett mitokondriális aktivitású sejteket tudunk létrehozni. A sejt kultúra médium összetevőinek megváltoztatásával, így a glükóz csökkentésével és a zsírsavtartalom egyidejű növelésével is fokozható az érés (Correia és mtsai., 2017; Hu és mtsai., 2018). Egy másik alkalmazható eljárás a sejtérés fokozására a különféle szövetépítési módszerek és a sejtek elektromechanikus stimulációja. A szívizomsejtekből 3-dimenziós, spontán kontraháló, kollagén vagy fibrin-alapú konstruktumok képezhetőek, amelyekben a mechanikai stimulus szintén megnöveli a sejtek érettségét, kontraktilitását és ingervezetőképességét. Az ilyen szívizomsejt struktúrákban az elektromos stimulálásának hatására a sejtek kalcium forgalma, struktúrája és oxidatív kapacitása is a felnőtt humán sejtekkel összevethető szintre javul (Ronaldson-Bouchard és mtsai., 2018). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a laboratóriumban készült konstruktumok kontraktilitása egyelőre továbbra is csak tizede a natív myocardiumban mérhető szinteknek.

2. A bíráló következő kérdése azt járja körül, hogyan megvalósítható a különböző (kamrai, pitvari, vagy pacemaker sajátosságokkal bíró) szívizomsejtek egymástól való elválasztása?

Köszönöm a kérdést. A kamrai és pitvari sejtek számos különbözőséget mutatnak, ezért a sejtek elválasztása és célzott felhasználásuk in vitro gyógyszerfejlesztésben (például pitvarfibrilláció kezelésére), toxicitás vizsgálatokban és betegmodellezésben is jelentős előrelépést jelenthet (Zhao és mtsai., 2019). A preklinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a transzplantált pluripotens őssejt-eredetű szívizomsejtek a szív szövetbe be tudnak épülni infarktust követően (pl. Romagnuolo R és mtsai., 2019). Ezek a vizsgálatok vegyes szívizomsejt populációval történtek, amelyekben a kamrai sejteken kívül pitvari és pacemaker sejtek is voltak. Ez valóban problémát jelenthet, mert befolyásolhatja a graft viselkedését, túlélését, integrációját és ezáltal a betegség kimenetelét is. A korai embrió fejlődését befolyásoló, mára részben megismert jelátviteli utak azonban segítséget jelentenek, hogy a kamrai és pitvari sejteket célzottan és tisztán is elő tudjuk állítani. Ennek alapja, hogy a kamrai és pitvari sejtek más mezodermális populációból származnak. A pitvari sejtek differenciáltatására RALDH2 markerre pozitív mezodermális sejtek alkalmasak: ezek a vitaminnal való kezelése pitvari sejteket eredményez (Lee és mtsai., 2017). A kamrai sejtek viszont egy másik (glycophorin A-pozitív) mezodermális populációból hozhatóak létre. Arra egyelőre nincs válaszunk, hogyan lehet a jobb és bal szívfélre

specifikus sejteket előállítani, bár ezek markereit már részben szintén ismerjük. Végül, a szív ingerképző és vezető rendszerének sejtjei is differenciálthatóak pluripotens őssejtekből; sikeres kísérletek történtek funkcionális sinoatrialis pacemaker sejtek létrehozására. Ennek két módja is van, egyfelől pacemaker-specifikus transzkripciós faktorok, TBX3 vagy SHOX2 fokozott expressziójával (Jung és mtsai., 2014; Ionta és mtsai., 2015). Másfelől a Neuregulin/ErbB jelátvitel célzott módosítása szintén működő pacemaker sejteket eredményez (Zhu és mtsai., 2010). Ezen elkülönülő sejtípusok és a szív egyéb sejtjeinek (AV csomó sejtek), epi- és endokardiális sejtek, koronária endothelium, kardiális makrofágok létrehozásával és szövetépítéssel való kombinálásával juthatunk el fejlettebb szöveti struktúrákig.

3. Ez átvezet az Opponens következő kérdésére, hogy mi lehet a myocardialis sejtterápiák relatív klinikai sikertelenségének a magyarázata? Milyen kiindulási sejtfeleségeket, és milyen módszereket tartok egy jövőbeli és hatékonyabb myocardialis sejtterápia szempontjából perspektivikusnak?

A kardiovaszkuláris sejtterápia első korszakában a hematopoetikus sejtek klinikai alkalmazására koncentrált. Közel 200 klinikai vizsgálat eredményeit összegezve az látszik, hogy a főként autológ adott csontvelői sejtek érdemben nem voltak hatékonyak, hosszútávú terápiais előnyük nem volt igazolható. Bár az őssejtek által szekretált faktorok kardiális hatásokat is mutatnak, ezek az őssejtek nem képesek kardiális sejtekké alakulni, és így új myocardiumot létrehozni. Miután a randomizált vizsgálatok nem igazolták ezen sejtek hatékonyságát, a kutatások a valódi myocardiumot is létrehozni képes sejtek felé fordultak. A pluripotens sejtek egy ilyen, második generációs lehetőséget jelentenek. A pluripotens sejtekkel zajló preklinikai vizsgálatok biztatóak, azonban a differenciált sejtek megtapadásának, szívsvöveti integrációjának és biztonságos alkalmazásának (így tumormentesség és alacsony arrhythmogenitás) pontos feltételeit még nem ismerjük. Az első ilyen 18 hónapos követési idejű fázis I klinikai vizsgálat a humán embrionális őssejtekből differenciált SSEA1⁺ISL1⁺ kardiovaszkuláris progenitorokkal történt. A sejtek fibrinbe ágyazva javították a szív szisztolés funkcióját szívelégtelen betegekben (Menasché és mtsai., 2018). Ennek során, feltételezhetően a sejtek éretlen volta és alacsony száma miatt, nem képződött új myocardium, a pozitív hatások kapcsán ismét a parakrin faktorok szerepe merül fel. Ezért két irány látszik körvonalazódni ezeket figyelembe véve: egyfelől 3D, beültethető szívsvöveti struktúrák létrehozása laboratóriumi körülmények között, másfelől a sejtek által termelt faktorok pontosabb meghatározása és azok célzott bejuttatása egy sejtmentes kezelési módon.

4. A Bíráló következő kérdése az volt, hogy mivel magyarázható az érett humán szívizom, az embrionális szívhez és más fajokhoz képest korlátozottabb regenerációs képessége? Elképzelhető-e, hogy az érett humán szívben érvényre jutó jelátviteli rendszerek áthangolásával a felnőtt szív regenerációs képessége is fokozódjon?

A felnőtt emberi szívizomsejtek alacsony proliferációs aktivitást mutatnak; az izotópos mérések szerint a myocardium nem több mint 1%-a újul csak meg évente (Bergmann és mtsai., 2009). Ez érdemben alacsonyabb más fajokhoz, például a kérdésben felsorolt zebrahalhoz és újszülött egerekhez képest. Egy kísérletesen is igazolt elképzelés szerint ennek a különbségnek a hátterében az eltérő oxigén szintek állhatnak. Így például a halak alacsonyabb szöveti oxigénszintje fokozottabb szöveti regenerációval társul. Ez az emlősöknél is megfigyelhető, de csak embrionális és korai újszülött korban. A születést követően a szervezet alkalmazkodik az oxigéndús környezethez, ennek során az glikolitikus anyagcsere felől a zsírsav oxidáció felé tolódik el az egyensúly. Ez fokozott a reaktív szabadgyökök termelődését, a DNS részleges károsodását eredményezheti a szívizomsejtekben, amely azok regenerációs kapacitást is csökkentheti (Puente és mtsai., 2014). Megfordítva: a hypoxia a szív regenerációját fokozza (Nakada és mtsai., 2017). Emellett a posztnatális szív megnövekedett terhelése is hozzájárul a csökkenő proliferációhoz, erre a bal kamrai eszközös támogatás során elvégzett mérések is utalnak (Canseco és mtsai., 2015).

5. Az in vivo kísérletekre vonatkozik a bíráló következő kérdése. Mi lehet az oka, hogy patkányokban alkalmazott AH-130 hepatoma modellben a β 1-antagonista bisoprolol és aldosteron-antagonista sprironolaktonnal szemben az ACE-gátló imidapril a túlélési és a szívspecifikus jelátviteli folyamatokban hatástalan volt? Elképzelhető-e, hogy más ACE-gátló esetében hasonló rendszerekben eltérő hatás alakuljon ki?

Köszönöm a kérdést. A cikkünk megjelenését követő további tanulmányok arra utalnak, hogy az imidapril hatástalansága nem általánosítható, a renin-angiotenzin rendszer más irányú gátlása befolyásolhatja a tumorhoz társult szívspecifikus folyamatokat. Az angiotenzin receptor antagonistá losartan csökkenti a tumoros angiogenezist, a kollagén termelődést és a tumor progresszióját is egér modellben (Stevens és mtsai., 2015). Klinikai bizonyíték is van a gátlásra: az ACE inhibitor enalapril magas dózisban előnyösnek bizonyult a kemoterápia indukálta kardiális dysfunctióban (Bosch és mtsai., 2013; Cardinale és mtsai. 2006). Ehhez képest az imidapril érdemi hatástalansága nem tisztázott. Ez egy olyan hosszú hatású gátlószer, amelyet a máj alakít az aktív metabolitjává, imidaprilattá. Az imidapril a szív és erek ACE aktivitását is közvetlenül gátolja. Saját munkánkban a kardiális súlyvesztést és funkcióromlást nem

védté ki, csak a zsírszövetre és vázizomra volt hatása. Az imidaprilt fázis III vizsgálatban próbálták nem-kissejtes tüdőrákban, colorectalis tumorban és hasnyálmirigyrákban, ezekben szignifikánsan csökkentette a testtömegvesztést (az első kettőben, de hasnyálmirigyrákban nem) (Schanze és Springer, 2012). A válasz tehát nem egyértelmű, de felvethető, hogy nem minden daganat típusban és szövetben hatásos az imidapril.

6. Az utolsó kérdés arra irányul, hogy milyen szerepe lehet egy esetleges immunosuppresszív jellegű terápiának a jövőbeli kardiológiai betegellátásban? Milyen kardiológiai kórképekben és klinikai körülmények között lehet hasznos az immunosuppresszió terápia?

Az immunosuppresszió megkerülhetetlen kérdés, amikor a sejterápiák klinikai alkalmazását tervezzük. Az állatkísérletes modellek jelentős részében a humán őssejt-származékok xenotranszplantációját végezzük. A nagyállatmodellek esetében a megfelelő immunosuppresszió központi probléma: a beadott humán sejtek rossz megtapadása, esetleg rejekciója jelentősen rontja a beavatkozás hatékonyságát. Ezt támasztja alá a dolgozatban is szereplő in vitro munkánk, valamint együttműködő partnereinkkel közösen végzett immunosuppressziós vizsgálataink is, sertés modellben. A humán iPSC sejtek alkalmazása az autológ alkalmazást is lehetővé teheti elvileg, azonban a klinikai minőségű sejtek alkalmazásának ennek komoly pénzügyi és időbeli korlátai vannak, amely az olcsóbb és gyorsabb az allogén transzplantációk irányába tolja az érdeklődést (Chakradhar, 2016). Az életre szóló immunosuppresszió kikerülhetőnek tűnik ezekben a kezelésekből is, ennek megoldására olyan hiPSC vonalak állnak már rendelkezésünkre, amelyekben humán leukocita antigén (HLA) eltávolításra került, ezáltal univerzális donor sejt-ként alkalmazhatóak allogén, nem csak autológ terápiaként is.

A kérdések megválaszolása után még egyszer köszönöm Papp Zoltán Professor Úr bírálatát és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását!

Tisztelettel és köszönettel:



Dr. Földes Gábor doktorjelölt

Budapest, 2019. augusztus 23.

Hivatkozások:

1. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98.
2. Bosch X, Rovira M, Sitges M, Domènech A, Ortiz-Pérez JT, de Caralt TM, Morales-Ruiz M, Perea RJ, Monzó M, Esteve J. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (prevention of left Ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive Chemotherapy for the treatment of Malignant hemopathies). *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:2355.
3. Canseco DC, Kimura W, Garg S, Mukherjee S, Bhattacharya S, Abdisalaam S, Das S, Asaithamby A, Mammen PP, Sadek HA. Human ventricular unloading induces cardiomyocyte proliferation. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:892.
4. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, Martinelli G, Veglia F, Fiorentini C, Cipolla CM. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*. 2006;114:2474.
5. Chakradhar S. An eye to the future: Researchers debate best path for stem cell-derived therapies. *Nat Med*. 2016;22:116.
6. Correia C, Koshkin A, Duarte P, Hu D, Teixeira A, Domian I, Serra M, Alves PM. Distinct carbon sources affect structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2017;7:8590.
7. Hu D, Linders A, Yamak A, Correia C, Kijlstra JD, Garakani A, Xiao L, Milan DJ, van der Meer P, Serra M, Alves PM, Domian IJ. Metabolic maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by inhibition of HIF1 α and LDHA. *Circ Res*. 2018;123:1066.
8. Ionta V, Liang W, Kim EH, Rafie R, Giacomello A, Marbán E, Cho HC. SHOX2 overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability. *Stem Cell Reports*. 2015;4:129.
9. Jiang Y, Park P, Hong SM, Ban K. Maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells: current strategies and limitations. *Mol Cells*. 2018;41:613-621.

10. Jung JJ, Husse B, Rimmbach C, Krebs S, Stieber J, Steinhoff G, Dendorfer A, Franz WM, David R. Programming and isolation of highly pure physiologically and pharmacologically functional sinus-nodal bodies from pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;2:592.
11. Lee JH, Protze SI, Laksman Z, Backx PH, Keller GM. Human pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes develop from distinct mesoderm populations. *Cell Stem Cell*. 2017;21:179.
12. Menasché P, Vanneaux V, Hagège A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, Cacciapuoti I, Al-Daccak R, Benhamouda N, Blons H, Agbulut O, Tosca L, Trouvin JH, Fabreguettes JR, Bellamy V, Charron D, Tartour E, Tachdjian G, Desnos M, Larghero J. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors for severe ischemic left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:429.
13. Nakada Y, Canseco DC, Thet S, Abdisalaam S, Asaithamby A, Santos CX, Shah AM, Zhang H, Faber JE, Kinter MT5, Szweda LI, Xing C, Hu Z, Deberardinis RJ, Schiattarella G, Hill JA, Oz O, Lu Z, Zhang CC, Kimura W, Sadek HA. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature*. 2017;541:222.
14. Piquereau J, Ventura-Clapier R. Maturation of cardiac energy metabolism during perinatal development. *Front Physiol*. 2018;9:959.
15. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, Grinsfelder D, Rothermel BA, Chen R, Garcia JA, Santos CX, Thet S, Mori E, Kinter MT, Rindler PM, Zacchigna S, Mukherjee S, Chen DJ, Mahmoud AI, Giacca M, Rabinovitch PS, Aroumougame A, Shah AM, Szweda LI, Sadek HA. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell*. 2014;157:565.
16. Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sánchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, Qi X, Massé S, Magtibay K, Kawajiri H, Wu J, Valdman Sadikov T, Rothberg J, Panchalingam KM, Titus E, Li RK, Zandstra PW, Wright GA, Nanthakumar K, Ghugre NR, Keller G, Laflamme MA. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate the infarcted pig heart but induce ventricular tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports*. 2019;12:967.
17. Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D, Morikawa K, Teles D, Yazawa M, Vunjak-Novakovic G. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature*. 2018;556:239.
18. Schanze N, Springer J. Evidence for an effect of ACE inhibitors on cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012;3:139.
19. Scuderi GJ, Butcher J. Naturally engineered maturation of cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:50.
20. Stevens SC, Velten M, Youtz DJ, Clark Y, Jing R, Reiser PJ, Bicer S, Devine RD, McCarthy DO, Wold LE. Losartan treatment attenuates tumor-induced myocardial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;85:37.
21. Zhao Y, Rafatian N, Feric NT, Cox BJ, Aschar-Sobbi R, Wang EY, Aggarwal P, Zhang B, Conant G, Ronaldson-Bouchard K, Pahnke A, Protze S, Lee JH, Davenport Huyer L, Jekic D, Wickeler A, Naguib HE, Keller GM, Vunjak-Novakovic G, Broeckel U, Backx PH, Radisic M. A Platform for generation of chamber-specific cardiac tissues and disease modeling. *Cell*. 2019;176:913.
22. Zhu WZ, Xie Y, Moyes KW, Gold JD, Askari B, Laflamme MA. Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res*. 2010;107:776.