

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DZIEDZINA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH
DYSCYPLINA NAUKOWA BIOTECHNOLOGIA

Rozprawa doktorska

Mgr inż. Zuzanna Iwoń – Szczawińska

**Właściwości regeneracyjne komórek
macierzystych w różnych modelach
niedotlenienia kardiomiocytów**

Promotor
Prof. dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska

Promotor pomocniczy:
Dr Ewelina Krogulec

Warszawa 2025

Składam serdeczne podziękowania

**Pani prof. Elżbiecie Jastrzębskiej i pani dr. Ewelinie Krogulec za
pokierowanie pracą, poświęcony czas, zaangażowanie oraz cenne
rady**

*Pracę dedykuję moim Kochanym Rodzicom oraz
mojemu mężowi Karolowi. Dziękuję Wam za ogrom
wsparcia.*

Streszczenie

Serce jest odpowiedzialne za pompowanie krwi zawierającej tlen i substancje odżywcze, które są dostarczane do każdej komórki w całym organizmie. Choroby układu sercowo-naczyniowego (ang. *cardiovascular diseases*, CVD) są najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. CVD powodują zaburzenia pracy serca i naczyń krwionośnych, które mogą wywoływać niedokrwienie serca (ang. *ischemic heart disease*, IHD), a w konsekwencji całego organizmu. Choroba niedokrwienna serca jest spowodowana przewlekłym, niedostatecznym zaopatrzeniem kardiomiocytów (ang. *cardiomyocytes*, CM) w tlen, wywołując niedotlenienie, w wyniku którego komórki ulegają trwałemu uszkodzeniu i apoptozie. Dodatkowo, nadal brakuje skutecznego leczenia, które wspomogłoby regenerację uszkodzonych komórek serca i przywróciłoby prawidłowe funkcjonowanie tego organu. Pomimo intensywnych badań nad nowymi metodami leczenia, skuteczna terapia wymaga dogłębnego zrozumienia mechanizmów i procesów zachodzących w tkance serca zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych. Kluczowym aspektem w badaniach nad CVD jest opracowanie odpowiedniego modelu komórkowego *in vitro*, który wiernie odwzoruje strukturę i funkcję ludzkiej tkanki serca. Tradycyjne modele dwuwymiarowe (2D) nie odzwierciedlają złożonej i heterogenicznej tkanki serca, zatem prowadzone są badania nad zastosowaniem trójwymiarowych (3D) hodowli opartych na inżynierii tkankowej, m.in. wykorzystujących maty nanowłókniste.

Maty nanowłókniste dzięki swoim właściwościom strukturalnym i mechanicznym naśladują funkcję macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM) tkanki serca, co pozwala na bardziej realistyczne badanie wpływu struktury 3D na funkcję kardiomiocytów. Ponadto, maty nanowłókniste mogą być wykonane z materiałów biokompatybilnych i biodegradowalnych, które minimalizują ryzyko wywołania odpowiedzi zapalnej komórek serca. Maty powinny być porowate, aby była możliwa efektywna dyfuzja tlenu i dostarczanie składników odżywczych do komórek, a także skuteczne usuwanie metabolitów z komórek. Udowodniono, że maty nanowłókniste stymulują adhezję, proliferację i dojrzewanie kardiomiocytów.

W ramach rozprawy doktorskiej wykorzystano maty nanowłókniste z polikaprolaktonu (ang. *poly(ϵ -caprolactone*), PCL) i poliuretanu (ang. *polyurethane*, PU). Obydwa materiały są biodegradowalne, tanie i nietoksyczne oraz charakteryzują się odpowiednią wytrzymałością mechaniczną i elastycznością, dzięki czemu mogą się rozciągać i kurczyć, umożliwiając

komórkom serca wykonywanie rytmicznych, pulsujących ruchów. Do badań zostały wytworzone maty nanowłókniste z PCL i PU o dwóch wartościach średnich średnic włókien, różniące się elastycznością. Charakteryzowały się one wysoką porowatością, podobnie jak włókna budujące ECM serca. Dodatkowo, nanowłókna były równolegle ułożone względem siebie. Maty nanowłókniste zostały zastosowane do sprawdzenia jak ich właściwości fizykochemiczne wpływają na funkcjonowanie komórek serca pochodzących z różnych gatunków (H9c2 – szczurze kardiomioblasty, HCM – ludzkie pierwotne kardiomiocyty, HL-1 – mysie kardiomiocyty). Dodatkowo, oprócz zastosowania komercyjnie dostępnych linii komórkowych, badania zostały przeprowadzone na zróżnicowanych ludzkich kardiomiocytach pochodzących od indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*, iPSC-CM). Przewagą zastosowania iPSC-CM nad komercyjnie dostępnymi liniami jest to, że mogą pochodzić od konkretnego dawcy, co umożliwia rozwój terapii personalizowanej. W ramach badań sprawdzono żywotność, morfologię komórek, ekspresję genów oraz poziom białek związanych z dojrzewaniem kardiomiocytów. Hodowle były prowadzone krótko- (24 h) i długoterminowo (10 dni). Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie odpowiednio dobranych mat nanowłóknistych, pozwala uzyskać bardziej dojrzałe morfologicznie i fizjologicznie komórki serca niż w standardowych warunkach hodowli na płytkach polistyrenowych. Dodatkowo, wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mogą pomóc w badaniach nad zrozumieniem i wyjaśnieniem rozbieżności między mechanizmami komórkowymi gryzoni i człowieka oraz wspomóc badania nad wyborem nanowłókien, które skutecznie pozwolą na uzyskanie ludzkich dojrzałych kardiomiocytów w modelach *in vitro*.

Niedotlenienie tkanki serca jest jedną z głównych przyczyn jej dysfunkcji. Zatem, ważne jest badanie odpowiedzi komórkowej na hipoksję w modelach *in vitro* oraz poszukiwanie właściwych modeli komórkowych, które będą naśladować odpowiedź ludzkich kardiomiocytów na niedotlenienie w warunkach *in vivo*. Z tych względów, w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej sprawdzono funkcjonowanie ludzkich kardiomiocytów hodowanych na matach nanowłóknistych w warunkach hipoksji i hipoksji z reoksygenacją. Założono, że stosowane modele z powodzeniem będą mogły być użyte w badaniach nad niedotlenieniem. Analizowano zmiany w poziomie czynnika indukowanego niedotlenieniem 1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α* , HIF-1 α), ekspresję genów wpływających na pracę komórek serca, reorganizację filamentów aktynowych budujących cytoszkielet komórek oraz typ śmierci komórkowej. Zaobserwowano różnice w

odpowiedzi na niedotlenienie i reoksygenację pomiędzy komórkami HCM i iPSC-CM, które mogą wynikać z odmiennej fizjologii komórek. Uzyskane wyniki badań potwierdziły, że odpowiedź komórkowa kardiomiocytów hodowanych na matach nanowłóknistych różni się od odpowiedzi uzyskiwanej w przypadku hodowli na płytkach polistyrenowych i może być zbliżona do odpowiedzi kardiomiocytów w warunkach *in vivo*.

W badaniach nad chorobami serca ważnym aspektem jest zastosowanie medycyny regeneracyjnej, w tym wykorzystanie komórek macierzystych. Brakuje jednak badań, w których stosowano komórki macierzyste i ludzkie kardiomiocyty w hodowli z wykorzystaniem mat nanowłóknistych. Zatem, celem kolejnego etapu było przeprowadzenie współhodowli ludzkich kardiomiocytów poddanych działaniu hipoksji wraz z komórkami macierzystymi na matach nanowłóknistych. Założono, że maty nanowłókniste stanowić mogą czynnik strukturalny wpływający stymulująco na regenerację ludzkich kardiomiocytów hodowanych wraz z komórkami macierzystymi. Sprawdzono żywotność komórek iPSC-CM poddanych hipoksji współhodowanych z komórkami macierzystymi, w krótko- (24 h) i długoterminowej (10 dni) hodowli. Dodatkowo, oznaczono procent komórek apoptycznych i nekrotycznych. Przeprowadzono również analizę ekspresji genów oraz poziomu białek, które biorą udział w regulowaniu indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz w różnicowaniu komórek macierzystych w kardiomiocyty, jak również są zaangażowane w funkcje naprawcze komórek serca oraz wpływają na pracę kardiomiocytów. W ramach badań wykazano, że możliwe jest uzyskanie współhodowli na matach nanowłóknistych, ludzkich kardiomiocytów poddawanych hipoksji z komórkami macierzystymi. Uzyskane wyniki badań mogą być wykorzystane do dalszych prac nad regeneracją uszkodzonych ludzkich kardiomiocytów.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdzają, że hodowle komórek serca prowadzone na matach nanowłóknistych stanowić mogą modele komórkowe wykorzystywane do badania niedotlenienia, badania wpływu komórek na regenerację komórek serca oraz badania mechanizmów komórkowych w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Wykazano również, że ludzkie komórki macierzyste mogą zostać użyte do wytworzenia modeli komórkowych *in vitro*, które pozwolą na wspomaganie dalszych poszukiwań i optymalizację zmierzającą do uzyskania modelu ludzkiej tkanki serca, jak również badania nad regeneracją serca.

Słowa kluczowe: modele *in vitro*, inżynieria tkankowa, maty nanowłókniste, komórki serca, komórki macierzyste, fizjologia i patofizjologia komórek serca.

Abstract

The heart pumps blood with oxygen and nutrients to the whole organism. Cardiovascular diseases (CVDs) are the most common cause of death worldwide. CVDs cause disorders of the heart and blood vessels that can cause ischemic heart disease (IHD). Ischemic heart disease is caused by a chronic inadequate supply of cardiomyocytes (CMs) with oxygen, which causes hypoxia, then cells undergo permanent damage and apoptosis. Additionally, effective treatments are not to help regenerate damaged cardiac cells and restore cardiac function. Despite research into new treatments, effective therapy requires an understanding of the mechanisms and processes that occur in cardiac tissue under physiological and pathophysiological conditions. Research is the development of an appropriate *in vitro* cellular model that faithfully imitates the structure and function of human heart tissue. Traditional two-dimensional (2D) models do not reflect complex and heterogeneous cardiac tissue, so research is being conducted into three-dimensional (3D) models using tissue engineering with nanofibrous mats.

Nanofibrous mats in 3D models mimic the function of the extracellular matrix (ECM) of cardiac tissue and enable the study of the effects of 3D structure on cardiomyocyte function. In addition, nanofibrous mats should be made of biocompatible and biodegradable materials that reduce inflammation in cardiac cells. The mats should have porosity that will allow efficient diffusion of oxygen, delivery of nutrients to the cells, and efficient removal of metabolites from the cells. Nanofibrous mats have been proven to enable cardiomyocyte adhesion, proliferation, and maturation.

In the thesis, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and polyurethane (PU) nanofibrous mats were used because they are widely used in 3D *in vitro* models that mimic cardiac tissue function. Both materials are biodegradable, cheap, non-toxic, and have adequate mechanical properties for culturing cardiac cells. PCL and PU nanofibrous mats with two mean fiber diameters and different elasticities were designed for the study. In addition, the nanofibers were in parallel arrangements and had high porosity, similar to the collagen fibers that build the ECM of the heart. These nanofibrous mats were then used to research how the physicochemical properties of the nanofibers affect the function of cardiac cells from different species (H9c2 - rat cardiomyoblasts, HCM - human primary cardiomyocytes, HL-1 - mouse cardiomyocytes). Also, studies have been conducted on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs). iPSC-CMs can be derived from a specific donor, enabling

personalized therapy development. At this stage, the selected nanofibrous mats were confirmed to affect cardiac cell function. The study examined cell viability, morphology, gene expression, and the level of proteins associated with cardiomyocyte maturation. Cultures were maintained for short- (24 h) and long-term (10-day) periods. The research indicates that the use of appropriately selected nanofibrous mats allows the obtaining of more morphologically and functionally mature cardiac cells than under standard culture on polystyrene plates. In addition, the work may help in research to understand and explain the differences between the cellular mechanisms of rodents and humans. Also, in the selection of nanofibrous mats will effectively support the production of mature human cardiomyocytes in *in vitro* models.

Hypoxia of heart tissue is one of the main causes of dysfunction. Therefore, it is important to study the cellular response to hypoxia in *in vitro* models and to search for appropriate cellular models that will mimic the response of human cardiomyocytes to hypoxia *in vivo*. For this reason, the doctoral dissertation examined the functioning of human cardiomyocytes cultured under hypoxia and hypoxia with reoxygenation on nanofibrous mats. It was assumed that these models could be applied in hypoxia research. Changes in HIF-1 α levels, the expression of genes affecting cardiac cell function, the reorganization of actin filaments, and the type of cell death were analyzed. Differences in the response to hypoxia and reoxygenation were observed between HCM and iPSC-CM, which may result from different physiology. The results confirmed that the cellular response of cardiomyocytes cultured on nanofibrous mats differs from the cellular response of cardiomyocytes cultured on polystyrene plates and may be similar to the response of cardiomyocytes *in vivo*.

An important aspect of heart disease research is the use of regenerative medicine, including the utilization of stem cells. However, there is a lack of studies using stem cells and human cardiomyocytes in culture with nanofibrous mats. The aim of this study was to co-culture human cardiomyocytes subjected to hypoxia with stem cells on nanofibrous mats. It was assumed that nanofibers could be a structural factor stimulating the regeneration of human cardiomyocytes cultured together with stem cells. The viability of iPSC-CM cells subjected to hypoxia and co-cultured with stem cells was tested in short- (24 h) and long-term (10 days) cultures. In addition, the percentage of apoptotic and necrotic cells was determined. An analysis of gene expression and protein levels was also performed, which are involved in the regulation of induced pluripotent stem cells and the differentiation of stem cells into cardiomyocytes, as well as being involved in the repair functions of heart cells and influencing the work of cardiomyocytes. The study showed that it is possible to co-culture human cardiomyocytes

subjected to hypoxia with stem cells. The results obtained can be used for further work on the regeneration of damaged human cardiomyocytes.

In conclusion, the PhD research confirms that nanofibrous mats in 3D *in vitro* models better reflect the *in vivo* conditions of cardiac tissue than 2D culture on polystyrene plates. The developed 3D models support the study of cellular mechanisms under physiological and pathophysiological conditions, which can support further research on obtaining a human cardiac tissue model and research on cardiac regeneration.

Keywords: *in vitro models, tissue engineering, nanofibrous mats, cardiac cells, stem cells, cardiac cell physiology and pathophysiology*

Wykaz używanych skrótów

2D - dwuwymiarowy (ang. *two-dimensional*)

3D - trójwymiarowy (ang. *three-dimensional*)

7-AAD - 7-aminoaktynomycyna D (ang. *7-aminoactinomycin D*)

5-AZA - 5-azacytydyna (ang. *5-azacytidine*)

AP - potencjał czynnościowy (ang. *action potential*)

ASC - dorosłe komórki macierzyste (ang. *adult stem cells*)

ATP - adenozy-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*)

BM-MSC - mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*)

BMP4 - białko morfogenetyczne kości 4 (ang. *bone morphogenetic protein 4*)

BSA - albumina surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*)

CBP - białko wiążące CREB (ang. *CREB-Binding Protein*)

CAM - kalceina-AM (ang. *calcein-AM*)

cDNA - komplementarne DNA (ang. *complementary*)

CF - fibroblasty serca (ang. *cardiac fibroblasts*)

CMGS - suplement wzrostu ludzkich kardiomiocytów (ang. *cardiac myocyte growth supplement*)

CM - kardiomiocyty (ang. *cardiomyocytes*)

CNT - nanorurki węglowe (ang. *carbon nanotube*)

Cs - chityna (ang. *chitin*)

cTnI - sercowy izoform troponiny I (ang. *cardiac troponin I*)

CVD - choroby układu sercowo-naczyniowego (ang. *cardiovascular diseases*)

DMEM - podstawowe medium do hodowli komórek (ang. *dulbecco essential medium Eagle*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DPBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco (ang. *dulbecco's phosphate buffered saline*)

ECM - macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*)

EC - komórki śródbłónka (ang. *endothelial cells*)

ES - elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*)

ESC - embrionalne komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*)

FBS - płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

Gel - żelatyna (ang. *gelatin*)

GO - utleniony grafen (ang. *graphene oxide*)

GSK-3 - inhibitor kinazy syntazy glikogenu 3 (ang. *glycogen synthase kinase 3*)

HCM - pierwotne ludzkie kardiomiocyty (ang. *primary human cardiomyocytes*)

HF - niewydolność serca (ang. *heart failure*)

HIF-1 – czynnik indukowany niedotlenieniem 1 (ang. *hypoxia inducible factor*)

HIF-1 α – czynnik indukowany niedotlenieniem 1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α*)

H/R – hipoksja/reoksygenacja (ang. *hypoxia/reoxygenation*)

HUVEC - ludzkie pierwotne komórki śródbłónka (ang. *primary human umbilical vein endothelial cells*)

IHD - niedokrwienie serca (ang. *ischemic heart disease*)

iPSC - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells*)

iPSC-CM - kardiomiocyty pochodzących od indukowanym pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*)

iPSC-CPC - progenitorowe komórki serca zróżnicowane z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cell-derived cardiac progenitor cells*)

LVEF - frakcja wyrzutowa lewej komory (ang. *left ventricular ejection fraction*)

MEM NEAA - minimalne podłoże podstawowe Eagle'a (ang. *Eagle's minimum essential medium Non-Essential Amino Acid*)

MI - zawał mięśnia sercowego (ang. *myocardial infraction*)

NCX - kanał powodujący wypompowywanie jonów sodowych i wpompowywanie jonów wapnia (ang. *sodium-calcium exchanger*)

p300 - 300-kilodaltonowe białko koaktywatora (ang. *300-kilodalton coactivator protein*)

PC - poliwęglan (ang. *polycarbonate*)

PCL - polikaprolakton (ang. *poly(ϵ -caprolactone)*)

PDMS - poli(dimetylosiloksan) (ang. *polydimethylsiloxane*)

PFA - paraformaldehyd (ang. *paraformaldehyde*)

PGA - poliglikolid (ang. *polyglycolide*)

PHD - hydrolazy prolilowej (ang. *enzymes prolyl hydroxylase*)

PI - jodek propidyny (ang. *propidium iodide*)

PL - kierunek równoległy (ang. *parallel*)

PLA - polilaktyd, poli(kwas mlekowy) (ang. *polylactic acid*)

PLGA - polilaktyd-kwasu glikolowego (ang. *polylactide-glycolic acid*)

PLLA - kwas poli-l-laktydowy (ang. *poly(lactic acid)*)

PP - kierunek prostopadły (ang. *perpendicular*)

PS - polistyren (ang. *polystyrene*)

PU - poliuretan (ang. *polyurethane*)

RNA - kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RT-PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction*)

SAV - stosunek powierzchni hodowlanej do objętości hodowli (ang. *surface-area-to-volume ratio*)

SBS - rozdmuch roztworu polimeru (ang. *solution blow spinning*)

SEM - skaningowy mikroskop elektronowy (ang. *scanning electron microscope*)

SR - siateczka sarkoplazmatyczna (ang. *sarcoplasmic reticulum*)

ssTnI - izoforma mięśnia szkieletowego troponiny I (ang. *slow skeletal troponin I*)

TE - inżynieria tkankowa (ang. *tissue engineering*)

TGF- β - transformujące czynniki wzrostu β (ang. *transforming growth factor beta*)

UV – promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet light*)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (ang. *vascular endothelial growth factor*)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

VHL – białko Von Hippel-Lindau (ang. *Von Hippel-Lindau protein*)

α -MHC - ciężki łańcuch miozyny, izoform α (ang. *myosin heavy chain, α isoform*)

β -MHC - ciężki łańcuch miozyny, izoform β (ang. *myosin heavy chain, β isoform*)

Spis treści

I. Część literaturowa.....	17
1. Wstęp.....	17
2. Budowa serca	18
3. Choroby układu sercowo-naczyniowego i rola niedotlenienia	20
3.1. Choroby układu sercowo-naczyniowego	20
3.2. Badanie niedotlenienia z wykorzystaniem modeli komórkowych <i>in vitro</i>	21
4. Rola komórek macierzystych wykorzystywanych do badań nad regeneracją tkanki serca	24
4.1. Klasyfikacja komórek macierzystych	24
4.2. Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste.....	26
4.3. Różnicowanie komórek macierzystych do kardiomiocytów i ich charakterystyka	28
5. Modele <i>in vitro</i> do badań funkcjonowania tkanki serca.....	33
5.1. Wytwarzanie mat nanowłóknistych i ich charakterystyka	34
5.2. Maty nanowłókniste w modelach komórkowych <i>in vitro</i> tkanki serca.....	36
5.3. Inne metody stosowane do tworzenie trójwymiarowych modeli tkanki serca.....	43
6. Podsumowanie	46
II. Część eksperymentalna	48
1. Cel pracy	48
2. Materiały i metodyka badań	48
2.1. Materiały, odczynniki i aparatura badawcza	48
2.1.1. Odczynniki	48
2.1.2. Materiał biologiczny	51
2.1.3. Materiały i drobny sprzęt laboratoryjny	52
2.1.4. Aparatura badawcza	53
2.2. Metodyka badań	54
2.2.1. Wytwarzanie nanowłókien	54
2.2.2. Hodowla komórkowa	55
2.2.2.1. Hodowla komórek H9c2	55
2.2.2.2. Hodowla komórek HCM	55
2.2.2.3. Hodowla komórek HL-1	55
2.2.2.4. Hodowla komórek iPSC	56

2.2.2.5.	Różnicowanie komórek iPSC w iPSC-CM.....	56
2.2.3.	Hodowla komórek na matach nanowłóknistych	57
2.2.4.	Badanie niedotlenienia i reoksygenacji w hodowli ludzkich kardiomiocytów.....	58
2.2.5.	Współhodowla komórek macierzystych z ludzkimi kardiomiocytami	58
2.2.6.	Hodowla komórek iPSC-CM po niedotlenieniu z iPSC	59
2.2.7.	Ocena żywotności komórek (test Alamar Blue)	59
2.2.8.	Ocena ułożenia i morfologii komórek.....	59
2.2.9.	Analiza komórkowa z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej	60
2.2.10.	Barwienie immunofluorescencyjne	60
2.2.11.	Cytometria przepływowa	62
2.2.12.	Analiza RT-PCR	62
2.2.13.	Barwienie komórek barwnikiem CellTracker	63
2.2.14.	Analiza typu śmierci komórkowej	64
2.2.15.	Analiza statyczna.....	64
3.	Wyniki i dyskusja.....	65
3.1.	Charakterystyka nanowłókien	65
3.1.1.	Strukturalne właściwości nanowłókien	65
3.1.2.	Charakterystyka właściwości mechanicznych nanowłókien.....	67
3.1.3.	Podsumowanie i dyskusja wyników	67
3.2.	Hodowla komórek serca na matach nanowłóknistych	68
3.2.1.	Hodowla komórek H9c2, HL-1 i HCM	69
3.2.1.1.	Żywotność komórek	69
3.2.1.2.	Wpływ mat nanowłóknistych na ułożenie komórek	70
3.2.1.3.	Analiza dojrzewania komórek serca hodowanych na matach nanowłóknistych.....	76
3.2.2.	Hodowla komórek iPSC-CM	82
3.2.2.1.	Charakterystyka komórek iPSC-CM.....	83
3.2.2.2.	Dobranie warunków hodowli komórek iPSC-CM na matach nanowłóknistych.....	85
3.2.2.3.	Analiza dojrzewania komórek iPSC-CM.....	87
3.2.3.	Podsumowanie i dyskusja wyników	92
3.3.	Badanie niedotlenienia komórek serca hodowanych na matach nanowłóknistych	97

3.3.1.	Ocena wpływu hipoksji i hipoksji z reoksygenacją na ludzkie kardiomiocyty.....	97
3.3.2.	Podsumowanie i dyskusja wyników	111
3.4.	Badanie wpływu mat nanowłóknistych na regenerację ludzkich kardiomiocytów po hipoksji z wykorzystaniem komórek macierzystych	114
3.4.1.	Współhodowla kardiomiocytów z komórkami macierzystymi.....	114
3.4.2.	Współhodowla komórek iPSC-CM poddanych hipoksji z komórkami iPSC na matach nanowłóknistych	118
3.4.3.	Podsumowanie i dyskusja wyników	126
III.	Podsumowanie i wnioski.....	129
IV.	Bibliografia.....	133

I. Część literaturowa

1. Wstęp

Obecnie jednym z powodów największej liczby zgonów ludzi w Polsce i na świecie są choroby układu sercowo-naczyniowego (ang. *cardiovascular diseases*, CVD). CVD obejmują choroby serca w tym chorobę niedokrwienną serca (ang. *ischemic heart disease*, IHD), która powoduje chroniczne niedotlenienie kardiomiocytów wywołując apoptozę lub stałe uszkodzenie komórek. Kardiomiocyty (ang. *cardiomyocytes*, CM) odpowiadają za kurczliwość serca, a w konsekwencji za pompowanie krwi do organizmu. Zaburzenie ich pracy może powodować niedokrwienie i niedotlenienie całego organizmu. Co więcej, kardiomiocyty budujące serce dorosłego człowieka mają znikomą zdolność do proliferacji. Szacuje się, że proliferacja ludzkich kardiomiocytów wynosi około 0,45-1 % rocznie dla ludzi w wieku 25 - 75 lat. Dlatego też, w przypadku uszkodzenia znacznej liczby CM, np. po zawale, komórki nie są zastępowane przez nowe kardiomiocyty, ale przez fibroblasty, które nie mają zdolności do kurczenia się i przewodzenia impulsów elektrycznych, co z kolei zaburza pracę serca.

Obecne metody leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego skupiają się na podawaniu farmaceutyków np. blokerów receptora β -adrenergicznego oraz stosowaniu urządzeń wspomagających pracę serca np. stosowanie rozruszników serca. W wielu przypadkach rozwiązania te nie są, jednak wystarczające i konieczny staje się przeszczep serca. Niestety brak dawców powoduje, że liczba wykonywanych przeszczepów jest niewystarczająca. Pomimo intensywnych badań nad nowymi metodami leczenia, skuteczna terapia chorób układu sercowo-naczyniowego wymaga dogłębnego zrozumienia mechanizmów i procesów zachodzących w tkance serca zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych. Kluczowym aspektem w badaniach nad CVD jest opracowanie odpowiedniego modelu komórkowego *in vitro*, który wiernie odwzoruje strukturę i funkcję ludzkiej tkanki serca. Najczęściej w badaniach *in vitro* wykorzystywane są hodowle dwuwymiarowe (2D) na płaskiej powierzchni. Tkanka mięśnia sercowego jest jednak bardziej złożona. Zbudowana jest m.in. z kilku typów komórek, które oddziałują między sobą oraz posiada macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). Białka budujące ECM serca wspomagają skurcze serca (sarkomery i miofibryle), pomagają w komunikacji komórka-komórka (cytokiny) i wpływają na morfologię oraz fizjologię tkanki serca. Z tego powodu, w celu odwzorowania tkanki serca, coraz więcej badań przeprowadza się

z wykorzystaniem modeli trójwymiarowych (3D), przy zastosowaniu inżynierii tkankowej z matami nanowłóknistymi. Badania potwierdzają, że maty nanowłókniste są zdolne do naśladowania struktury i funkcji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) serca w warunkach *in vitro*. Dlatego ich zastosowanie w hodowli komórek serca może znacząco wspomóc badania nad wpływem trójwymiarowej struktury na adhezję, żywotność, proliferację i dojrzewanie kardiomiocytów, a także na funkcjonowanie komórek macierzystych o właściwościach regeneracyjnych.

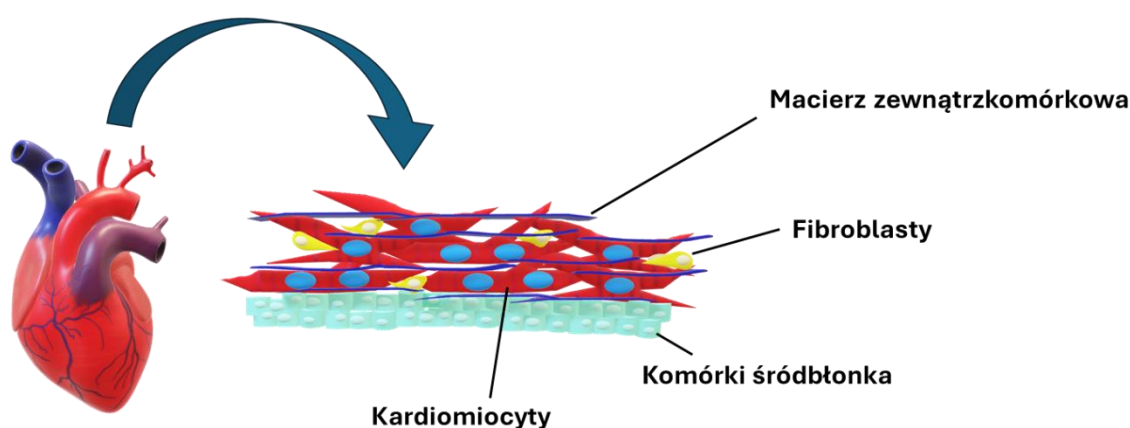
2. Budowa serca

Serce to organ umożliwiający krążenie krwi, która dostarcza tlen i substancje odżywcze do każdej komórki w całym organizmie. Ludzkie serce zbudowane jest z 2 komór i 2 przedsionków oddzielonych od siebie 2 zastawkami przedsionkowo-komorowymi. Pomiędzy prawym przedsionkiem i prawą komorą jest zastawka trójdzielna. Z kolei lewy przedsionek i lewą komorę oddziela zastawka dwudzielna. W sercu obecne są jeszcze 2 inne zastawki u wejść do tętnic wychodzących z serca - zastawka pnia płucnego umiejscowiona u podstawy pnia płucnego i zastawka półksiężycowata aorty leżąca u wejścia aorty. Zastawki umożliwiają jednokierunkowy przepływ krwi. Serce zbudowane jest z trzech warstw: epikardium (nasierdzie), miokardium (mięsień sercowy) i endokardium (wsierdzie) [1]. Za pracę serca odpowiada mięsień sercowy, którego funkcje zależą od komórek zwanych kardiomiocytami (ang. *cardiomyocytes*, CM). CM regulują skurcz i rozkurcz serca. Szczególnie ważne są CM znajdujące się na ścianie prawego przedsionka w węźle zatokowo-predsionkowym. Są one odpowiedzialne za spontaniczne generowanie i wysyłanie impulsów elektrycznych przez co regulują rytm skurczów serca. Kardiomiocyty łączą się ze sobą połączeniami szczelinowymi (ang. *gap junction*). Są to kanały błonowe zbudowane z koneksyny, które umożliwiają transport jonów i zmianę potencjału czynnościowego komórek, powodując kurczenie i rozkurczanie CM. Zmiany potencjałów transbłonowych w kardiomiocytach powodują bicie serca i przepływ krwi [2].

Kardiomiocyty stanowią większość masy serca, jednak nie tylko z nich zbudowana jest tkanka serca (Ryc.1). Licznymi grupami komórek budujących mięsień sercowy są również fibroblasty serca (ang. *cardiac fibroblasts*, CF) oraz komórki śródbłonna (ang. *endothelial cells*, EC). Fibroblasty przyczyniają się do wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej serca (ang. *extracellular matrix*, ECM), która reguluje proliferację kardiomiocytów [3], [4]. ECM to struktura zbudowana z włókien, które otaczają komórki, pełniąc rolę rusztowania. Ponadto, ECM zawiera czynniki wzrostu i pośredniczy w przekazywaniu sygnałów między komórkami.

Macierz zewnątrzkomórkowa składa się z białek i polisacharydów, które można podzielić na glikoproteiny, proteoglikany i glikozaminoglikany. Glikoproteinami są fibronektyna i laminina, a także kolagen i elastyna, które nadają ECM elastyczność. ECM pośredniczy w przekazywaniu sygnałów między komórkami, które regulują funkcję kardiomiocytów, wpływając na różnicowanie, adhezję i proliferację komórek [5].

Komórki śródbłónka (ang. *endothelial cells*, EC) pełnią istotną rolę w funkcjonowaniu tkanki serca. Regulują one selektywne przenikanie substancji odżywczych, tlenu i jonów, wykorzystując takie mechanizmy jak, produkcja czynników parakrynnych regulujących przepuszczalność naczyń krwionośnych, transport międzykomórkowy, endocytozę i transcytozę. Dzięki tym mechanizmom komórki śródbłónka precyzyjnie kontrolują, które substancje odżywcze, w jakiej ilości i w jakim tempie, mogą dotrzeć do kardiomiocytów, jednocześnie chroniąc serce przed potencjalnie szkodliwymi toksynami lub patogenami znajdującymi się we krwi krążącej w naczyniach krwionośnych. Dodatkowo, EC są wrażliwe na zmiany ciśnienia i dynamiki krwi (ang. *shear stress*, naprężenia ścinające) oraz na sygnały chemiczne (np. hormony, mediatory zapalne), przez co dostosowują swoje funkcje transportowe, wydzielnicze i ochronne do obecnych potrzeb kardiomiocytów i tkanki serca. Z tego powodu EC również pełnią istotną rolę w funkcjonowaniu kardiomiocytów w czasie rozwoju embrionalnego lub w zachodzących zmianach chorobowych tkanki serca [6], [7].



Rycina 1 Schemat przedstawiający budowę mięśnia sercowego.

3. Choroby układu sercowo-naczyniowego i rola niedotlenienia

3.1. Choroby układu sercowo-naczyniowego

Choroby układu sercowo-naczyniowego (choroby układu krążenia) obejmują między innymi chorobę niedokrwienną serca, zawał mięśnia sercowego oraz niewydolność serca. CVD są główną przyczyną zachorowalności i śmiertelności na całym świecie. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) podała, że w 2019 z powodu CVD zmarło 17,9 mln osób, co stanowi 32 % wszystkich zgonów na świecie [8], [9]. Choroby układu krążenia powodują zaburzenia pracy serca i naczyń krwionośnych, które mogą wywoływać niedokrwienie całego organizmu. Najczęstszą chorobą, która powoduje uszkodzenie komórek serca, jest choroba niedokrwienna serca (ang. *ischemia heart disease*, IHD). Jest ona spowodowana blokadą naczyń wieńcowych, a jej objawy to nieregularne bicie serca (arytmia), zawał mięśnia sercowego (ang. *myocardial infraction*, MI) i niewydolność serca (ang. *heart failure*, HF). IHD powoduje utrudniony transport tlenu do komórek, indukując niedotlenienie (hipoksję), w wyniku, którego komórki ulegają apoptozie oraz trwałemu uszkodzeniu [8], [9]. Dorosłe kardiomiocyty mają niewielką możliwość regeneracji ze względu na bardzo słabą proliferację - szacuje się, że proliferacja ludzkich kardiomiocytów wynosi około 0,45-1 % rocznie w wieku 25-75 lat [10]. Powoduje to, że w przypadku choroby serca np. ostrego zawału serca, który doprowadza do uszkodzenia 20-30 % całkowitej masy serca, tkanka ta zbudowana głównie z kardiomiocytów nie ma możliwości odpowiedniego zregenerowania się [11]. W takim przypadku CM zastępowane są przez fibroblasty, co z kolei przyczynia się do utworzenia tak zwanej tkanki bliznowatej, która ogranicza zdolność serca do prawidłowego funkcjonowania [3], [12].

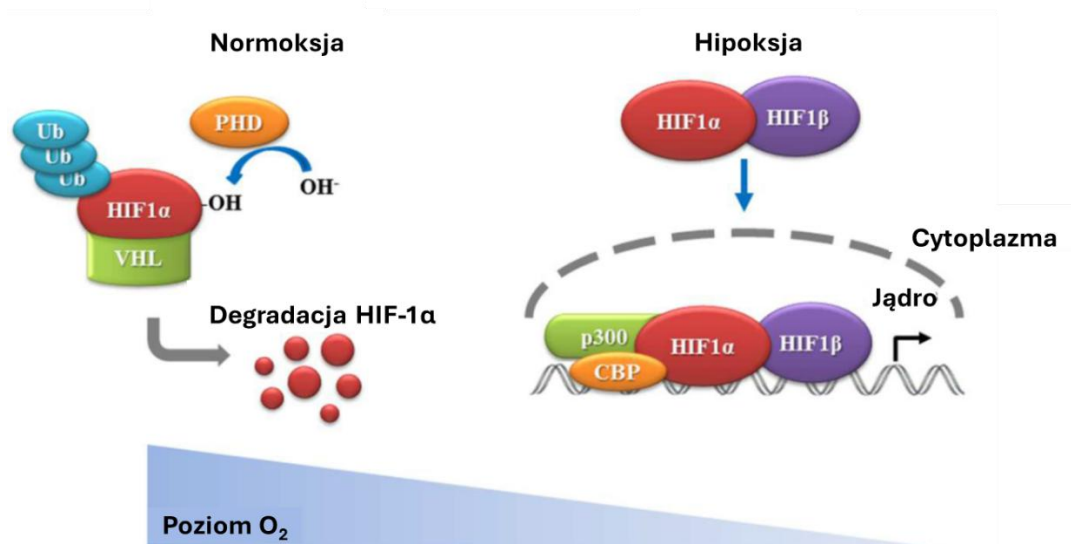
Konwencjonalne metody leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego można podzielić na farmakologiczne (leki przeciwzakrzepowe, beta-blokery, blokery kanałów wapniowych, terapia przeciwzakrzepowa itp.), procedury niechirurgiczne (przezskórna angioplastyka wieńcowa), techniki chirurgiczne (sztuczne serce, pomostowanie aortalno - wieńcowe) i przeszczepy. Poza transplantacją, pozostałe metody leczenia koncentrują się bardziej na zapobieganiu rozwojowi choroby niż na jej leczeniu. Mała ilość dawców powoduje, że liczba wykonywanych przeszczepów jest niewystarczająca. Oprócz konwencjonalnych metod leczenia CVD, kluczowe znaczenie ma prowadzenie zdrowego stylu życia (zdrowa i zbilansowana dieta, brak używek, aktywność fizyczna i unikanie przewlekłego stresu) oraz regularna profilaktyka [13], [14].

3.2. Badanie niedotlenienia z wykorzystaniem modeli komórkowych *in vitro*

Hipoksja (inaczej nazywana niedotlenieniem) to niedobór tlenu, który może występować w różnych narządach, tkankach i komórkach. Może on wywoływać stany patofizjologiczne, jak w chorobie niedokrwiennej serca, nowotworach, reumatoidalnym zapaleniu stawów lub stanach zapalnych [15]. W zdrowym sercu ssaków poziom tlenu wynosi 5-10 %, w zależności od części mięśnia sercowego [16]. Niedotlenienie *in vivo* w tkance serca definiuje się jako stan, w którym poziom tlenu spada poniżej 5 % [17]. Niedostateczna ilość tlenu lub jego brak spowodowany niedrożnością wąskich naczyń wieńcowych, którego najczęstszą przyczyną jest odkładanie się cholesterolu w naczyniach, może skutkować dysfunkcją kardiomiocytów, zaburzeniami szlaków metabolicznych i śmiercią komórek serca w krótkim czasie. Hipoksja powoduje uruchomienie wielu szlaków, które mają na celu przystosowanie i ograniczanie uszkodzeń kardiomiocytów m.in. oddychanie tlenowe z wykorzystaniem łańcucha oddechowego w mitochondriach przechodzi na glikolizę beztlenową. Glikoliza ogranicza efektywność produkcji energii w postaci ATP (ang. *adenosine-5'-triphosphate*, adenozy-no-5'-trifosforan), która powoduje zaburzenia pracy CM, w tym dysfunkcje pomp i kanałów jonowych uczestniczących w kurczeniu i rozkurczaniu komórek serca. Brak tlenu w komórkach powoduje również stabilizację indukowanego niedotlenieniem czynnika 1 (ang. *hypoxia inducible factor*, HIF-1), który prowadzi m.in. do produkcji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) stymulującego angiogenezę i pobudzenia produkcji kinazy dehydrogenazy pirogronianowej, która jest kluczowym enzymem w glikolizie. Dodatkowo, niedotlenienie wywołuje stres oksydacyjny w CM i aktywację czynników zapalnych, które mogą prowadzić do śmierci komórkowej (apoptozy i nekrozy) i uszkodzenia tkanki serca. Badania oddziaływania niedotlenienia na komórki serca obejmują analizę zmian metabolicznych zachodzących w komórkach jak i ich funkcjonowanie w warunkach patologicznych [18], [19]. Nie wszystkie procesy komórkowe wywoływane przez niedotlenienie są jednak w pełni znane, dlatego badanie ich skutków dla komórek serca przy użyciu modeli *in vitro* ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmów zachodzących w komórkach podczas hipoksji.

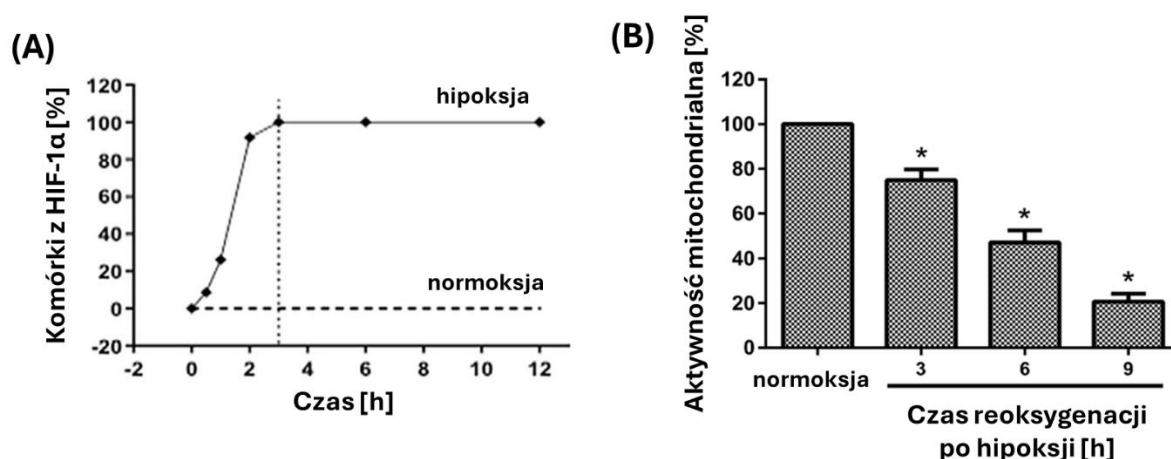
Hipoksje w modelach komórkowych *in vitro* można wywołać poprzez obniżenie poziomu tlenu w środowisku hodowlanym. W tym celu, stosowane są specjalne komory beztlenowe lub inkubatory, w których możliwe jest uzyskanie obniżonego poziomu tlenu [20]. W większości badań stosowane jest stężenie tlenu w zakresie 0-1 % [21]–[26]. Poza analizą

oddziaływania niedotlenienia na metabolizm komórkowy [18], [27], [28] prowadzone są również badania nad wpływem ponownego natlenienia (reoksygenacja) komórek. Reoksygenacja to proces ponownego dostarczenia tlenu do komórek po niedotlenieniu w modelach *in vitro* lub w przypadku badań *in vivo*, gdy krew jest ponownie dostarczana do tkanki (reperfuzja). Przykładem badania hipoksji i reoksygenacji (H/R) *in vitro* mogą być prace prowadzone przez Hafeza i wsp. [21]. Wykorzystali oni pierwotne ludzkie kardiomiocyty (ang. *primary human cardiomyocytes*, HCM) do badania niedotlenienia (94 % N₂, 5 % CO₂, 1 % O₂). Komórki poddano hipoksji przez 30 min oraz 1, 2, 3, 6 i 12 h lub hipoksji i reoksygenacji (w punktach czasowych: hipoksja 3 h, reoksygenacja 3, 6, 9 h). Analizowano poziom czynnika indukowanego niedotlenieniem 1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α* , HIF-1 α), którego poziom zmienia się w zależności od ilości tlenu [21]. HIF-1 α jest jedną z trzech podjednostek białka HIF-1 i odpowiada za adaptację i przeżycie komórek w środowisku z niedoborem tlenu. W warunkach normoksji HIF-1 α jest hydroksylowany przez izoformy domeny hydroksylazy prolinowej (ang. *enzymes prolyl hydroxylase*, PHD) i tlen, a następnie ulega degradacji przez proteasomy. W warunkach niedotlenienia HIF-1 α ulega stabilizacji, a komórki wytwarzają szereg białek, które powodują m.in. stymulację tworzenia nowych naczyń czy przełączenie się komórek z oddychania tlenowego na niezależną od tlenu glikolizę (Ryc. 2) [22].



Rycina 2 Schemat przedstawiający szlak HIF-1 α w warunkach prawidłowego poziomu tlenu (normoksja) i w warunkach niedotlenienia (hipoksja). Poziom O₂ reguluje działanie hydroksylazy prolinowej (PHD), która w normoksji powoduje przyłączenie do HIF-1 α białka Von Hippel-Lindau (ang. *Von Hippel-Lindau protein*, VHL), powodując ubiquitynację i degradację HIF-1 α przez proteasomy. W mikrośrodowisku o obniżonym poziomie tlenu, białka powodujące rozkład HIF-1 α są degradowane, dzięki czemu następuje dimeryzacja i stabilizacja kompleksu HIF-1 α z HIF-1 β . Białka transportowane są do jądra komórkowego i wiążą się z p300 (ang. *300-kilodalton coactivator protein*, 300-kilodaltonowe białko koaktywatora), CBP (ang. *CREB-Binding Protein*, białko wiążące CREB) oraz DNA komórki, regulując ekspresję różnych genów podczas niedotlenienia [29].

Na podstawie wyników *Hafez i wsp.* zauważono, że poziom białka HIF-1 α wzrastał do 3 h w czasie niedotlenienia, a następnie jego poziom stabilizował się (Ryc. 3 A). Dodatkowo, aby sprawdzić, czy zachodzą zmiany metaboliczne w kardiomiocytach po niedotlenieniu i ponownym natlenieniu, zbadano aktywność mitochondrialną komórek HCM po 3 h hipoksji i po 3, 6 i 9 h reoksygenacji. (Ryc. 3 B). Zaobserwowano, spadek aktywności mitochondrialnej wraz z dłuższym czasem reoksygenacji. Dodatkowo, podczas ponownego natlenienia wzrastał poziom reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), które przyczyniały się do dodatkowych uszkodzeń komórek serca [21]. W innych badaniach porównano aktywność mitochondriów, poziom komórkowego ATP i żywotność różnych typów komórek serca po hipoksji i reoksygenacji (H/R) [23], [26]. Przykładowo, hipoksji i reoksygenacji poddano szczurze kardiomioblasty (H9c2) i mysie kardiomiocyty (HL-1). Zaobserwowano, że komórki H9c2 miały niższą aktywność mitochondrialną i żywotność w porównaniu do komórek HL-1. Dodatkowo zauważono, że zmiany zachodzące po H/R w komórkach H9c2 są bardziej zbliżone do tych obserwowanych w pierwotnych kardiomiocytach u gryzoni w warunkach *in vivo* niż w komórkach HL-1 [23].



Rycina 3 (A) Procentowy udział komórek z HIF-1 α w zależności od czasu trwania niedotlenienia w porównaniu do hodowli prowadzonej w warunkach normoksji dla ludzkich kardiomiocytów. (B) Aktywność mitochondrialna po H/R w zależności od czasu reoksygenacji, * - $p < 0,001$ [21].

Oprócz badania szlaków metabolicznych i funkcjonowania komórek serca w warunkach hipoksji i reoksygenacji, prowadzone są również badania nad poznaniem mechanizmów i czynników występujących podczas H/R, które umożliwią ochronę komórek serca przed uszkodzeniami wywołanymi przez brak tlenu (kardioprotekcja) [24], [30], [31]. Na przykład *Xu i wsp.* [32] przeprowadził H/R przez 6 h/12 h dla linii komórkowej H9c2, aby potwierdzić wpływ miozyny 1b (myo1b) na apoptozę komórek i autofagię. Ekspresja miozyny 1b podczas H/R jest wyciszana co powoduje apoptozę, zahamowanie proliferacji i autofagię komórek.

Autorzy wykorzystali plazmidy, aby wprowadzić do komórek H9c2 sekwencję umożliwiającą wywołanie nadekspresji myo1b. Komórki z nadekspresją myo1b wykazywały wyższą żywotność i niższy poziom autofagii niż komórki kontrolne. Zauważono, że wzrost ekspresji miozyny 1b może wpływać na większą odporność komórek na uszkodzenia wywołane H/R [32]. Badania nad modulacją różnych szlaków sygnałowych i czynników uczestniczących w H/R mają na celu poznanie ich oddziaływania na funkcjonowanie komórek serca oraz kontrolę nad nimi by móc chronić komórki przed uszkodzeniami wywołanymi brakiem tlenu. Przeprowadzono liczne badania sprawdzając działanie różnych czynników, w tym jednostek RNA regulujących ekspresję wybranych genów [33]–[35], czynników chemicznych [25], [36] oraz czynników wspomagających tworzenie naczyń krwionośnych (angiogenezę) [26], [37] na kardioprotekcję w trakcie H/R. W badaniach nad porównaniem skuteczności kardioprotekcji w modelach *in vitro* wykorzystywano różne linie komórkowe, takie jak HL-1 [23], [34], [35], H9c2 [26], pierwotne kardiomiocyty szczurze [37], kardiomiocyty mysie [36], kardiomiocyty pochodzące od ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes*, iPSC-CM) [36]. Badania prowadzono również z wykorzystaniem modeli zwierzęcych [30], [38].

Badanie wpływu niedotlenienia oraz niedotlenienia i reoksygenacji na modelach tkanki serca *in vitro* i *in vivo* jest kluczowe dla zrozumienia mechanizmów i procesów zachodzących w komórkach serca, które wywołuje brak tlenu. Ta wiedza może przyczynić się do znalezienia efektywnej metody kardioprotekcji [39]. Jednak nadal brakuje modeli naśladujących skomplikowaną strukturę i funkcję tkanki ludzkiego serca po niedokrwieniu lub reperfuzji. Większość badań *in vitro* przeprowadza się z wykorzystaniem dwuwymiarowych modeli komórkowych. Z kolei badania *in vivo* prowadzone są na organizmach modelowych gryzoni, które nie odzwierciedlają funkcjonowania ludzkiej tkanki serca i nie zawsze są odpowiednimi modelami ze względu na różnice anatomiczne i fizjologiczne między człowiekiem a gryzoniem. Powoduje to, że wyniki badań przedklinicznych często nie odzwierciedlają skuteczności terapii w badaniach klinicznych. W konsekwencji wiele obiecujących metod leczenia nie jest efektywna u pacjentów [40]–[42].

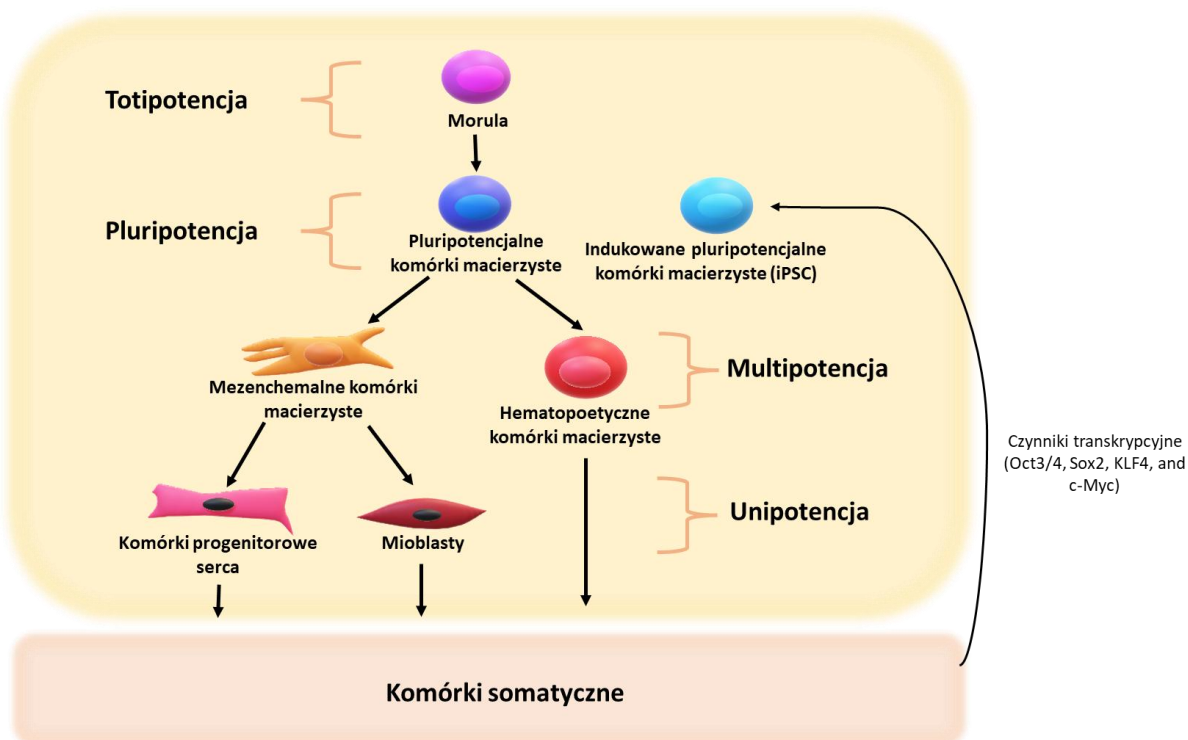
4. Rola komórek macierzystych wykorzystywanych do badań nad regeneracją tkanki serca

4.1. Klasyfikacja komórek macierzystych

Przewlekła hipoksja powoduje apoptozę kardiomiocytów, co wywołuje niewydolność serca, w przypadku której najskuteczniejszą metodą leczenia jest przeszczep serca. Ma ona

jednak ograniczenia m.in. niewystarczającą liczbę dawców oraz możliwość odrzucenia przeszczepu. Alternatywą są badania nad zastosowaniem medycyny regeneracyjnej wykorzystującej komórki macierzyste, które charakteryzują się nieograniczonymi zdolnościami proliferacyjnymi, nieograniczoną liczbą podziałów i zdolnością do różnicowania się w inne typy komórek. Komórki macierzyste można podzielić na dorosłe komórki macierzyste (ang. *adult stem cells*, ASC) i embrionalne komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*, ESC) (Ryc. 4) [43]. Do ESC należą totipotencjalne i pluripotencjalne komórki macierzyste. Komórki totipotencjalne są najbardziej pierwotnymi komórkami macierzystymi, które powstają z zygoty i tworzą morulę. Tworzą one zarodek i struktury pozazarodkowe (na przykład łożysko) i mogą różnicować się w każdy rodzaj komórek występujący w organizmie. Po około czterech dniach morula rozwija się w blastocystę zbudowaną z komórek pluripotencjalnych, które mogą różnicować się w każdy typ komórek budujący organizm, ale nie w komórki budujące zewnętrzną strukturę zarodka [44]. Z kolei dorosłe komórki macierzyste dzielą się na multipotencjalne i unipotencjalne komórki macierzyste. Multipotencjalne komórki macierzyste mają zdolność różnicowania się w kilka typów komórek z tego samego listka zarodkowego. Unipotencjalne komórki macierzyste mogą różnicować się w tylko jeden typ komórek somatycznych (np. komórki progenitorowe serca mogą różnicować się w kardiomiocyty) [45].

Totipotencjalne i pluripotencjalne komórki to komórki budujące zarodek. W związku z czym, ich wykorzystanie budzi zastrzeżenia etyczne, w szczególności w przypadku komórek ludzkich, ponieważ są izolowane z zarodka. Z kolei multipotencjalne i unipotencjalne komórki macierzyste różnicują się w określony typ komórek co ogranicza ich wykorzystanie, a ich izolacja wiąże się z inwazyjną biopsją np. z tkanki serca. Dodatkowo ASC charakteryzuje ograniczona żywotność w warunkach *in vitro* [46]. Ze względu na ograniczenia ASC i ESC, duży potencjał ma zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPSC), które po raz pierwszy uzyskano w 2007 roku przez Yamanaka [47]. Do dojrzałych komórek fibroblastów zostały wprowadzone cztery czynniki transkrypcyjne (Oct3/4, Sox2, KLF4 i c-Myc) z wykorzystaniem wektorów wirusowych, co umożliwiło uzyskanie populacji pluripotencjalnych komórek macierzystych [47]. Według aktualnych badań komórki iPSC mogą mieć szerokie zastosowanie w medycynie, np. regeneracji uszkodzonej tkanki serca.



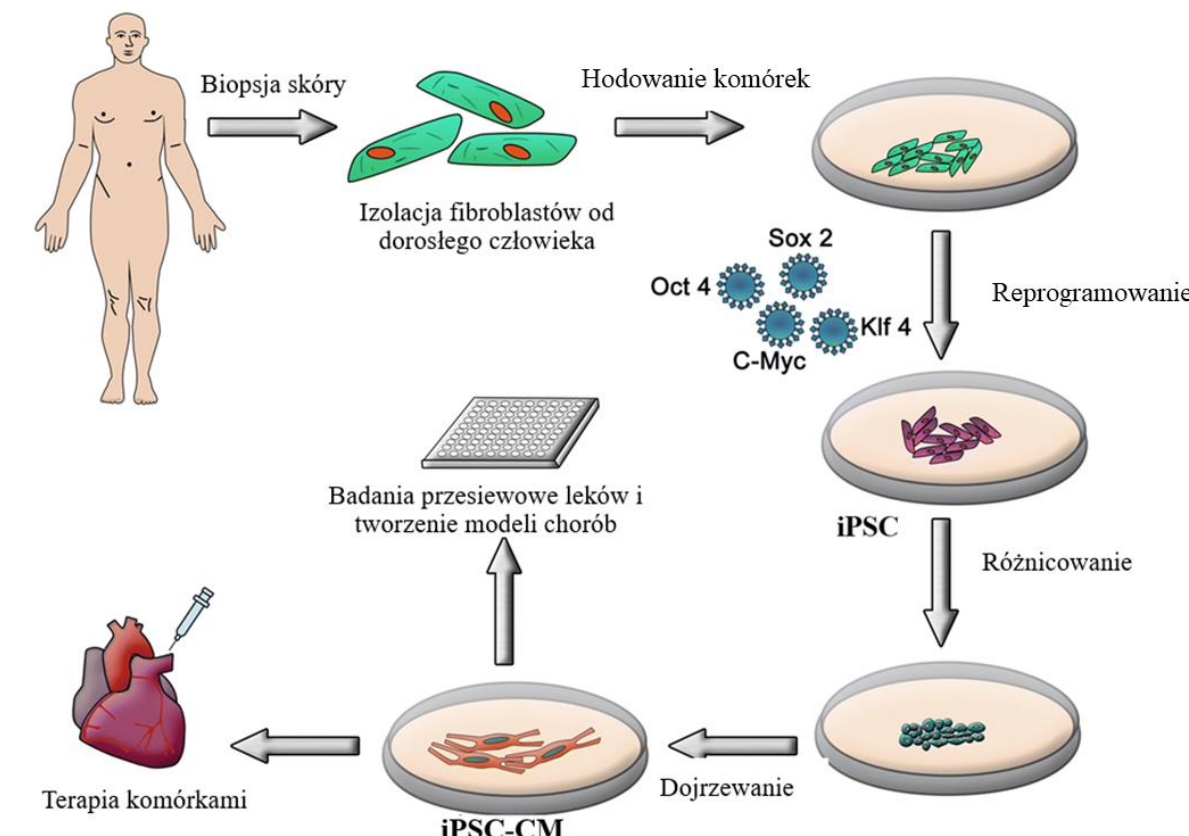
Rycina 4 Klasyfikacja komórek macierzystych.

4.2. Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste

Wykorzystanie ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) nie budzi zastrzeżeń etycznych, ponieważ są one uzyskiwane z komórek somatycznych, a nie z zarodków. Przeprowadzono liczne badania, w których potwierdzono, że komórki iPSC na poziomie genów, białek, morfologii, nieograniczonych podziałów i zdolności do proliferacji są zbliżone do pluripotencjalnych komórek macierzystych [48]. Jest kilka możliwości uzyskania komórek iPSC. Strategie reprogramowania komórek somatycznych w komórki iPSC obejmują metody integracyjne lub metody nieintegracyjne. Początkowo, komórki iPSC pozyskiwano dzięki wykorzystaniu integrujących wektorów wirusowych. Metoda ta polega na wbudowaniu do DNA komórki, wektora ze specyficznymi genami (kodującymi czynniki transkrypcyjne - Oct3/4, Sox2, KLF4 i c-Myc), które indukują reprogramowanie komórek somatycznych do komórek iPSC. Były do tego wykorzystywane retrowirusy, jednak zastąpiono je wektorami lentiwirusowymi co poprawiło efektywność uzyskiwania komórek iPSC. Obecnie jest to najczęściej stosowana i najlepiej zbadana metoda reprogramowania komórek iPSC, a jej wydajność szacowana jest na poziomie 0,1-1 % [49]. Innym rodzajem strategii integracyjnej jest wykorzystanie wektora bezwirusowego np. stosowanie transpozonów, które mają zdolność do przemieszczania się w obrębie genomu co może prowadzić do zmian sekwencji DNA i wpływać na funkcjonowanie

genów. Niestety, w przypadku wszystkich wymienionych rodzajów wektorów integrujących z genomem gospodarza, możliwe jest wybudowanie sekwencji w przypadkowe miejsce w genomie i powstawanie zaburzenia w transkrypcji genów kluczowych dla funkcjonowania komórki. Dlatego też, coraz większą popularnością cieszy się zastosowanie wektorów nieintegrujących z genomem komórki. Polegają one na dostarczeniu genów odpowiedzialnych za reprogramowanie komórek przy pomocy samoreplikujących się wektorów i cytoplazmatycznego RNA. Stosowane są strategie wektorów nieintegracyjnych wykorzystujących microRNA (miRNA) do reprogramowania komórek somatycznych w komórki iPSC. Wynika to z tego, że miRNA reguluje ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym, w tym może aktywować geny promujące pluripotentność np. *SOX2*, *NANOG* i *OCT4*, co powoduje, że metoda ta ma wysoką efektywność przy konwersji fibroblastów w komórki iPSC oraz niską możliwość mutacji komórek [48], [49]. Integrujące i nieintegrujące systemy transferu wektorów umożliwiają uzyskanie indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych z wydajnością sięgającą do 4%. Oprócz wybrania metody przeprogramowania komórek somatycznych w komórki iPSC, w dużej mierze wydajność reprogramowania zależy również od pochodzenia komórek somatycznych i wieku dawcy. Wymagane są dalsze optymalizacje wydajności reprogramowania komórek somatycznych w komórki iPSC i poznanie mechanizmów, które umożliwią zwiększenie wydajności uzyskania komórek iPSC.

Zgodnie z aktualnymi badaniami, komórki iPSC mogą być szeroko stosowane w badaniach podstawowych nad wykorzystaniem ich w leczeniu np. chorób układu sercowo-naczyniowego, choroby Parkinsona, Alzheimerza, niewydolności wątroby i trzustki. Przykładowo, komórki iPSC są powszechnie stosowane w badaniach podstawowych nad zastosowaniem komórek zróżnicowanych w kardiomiocyty (iPSC-CM) (Ryc. 5) [50], [51].



Rycina 5 Schemat przedstawiający pozyskanie komórek iPSC i iPSC-CM oraz ich możliwe wykorzystanie [50].

4.3. Różnicowanie komórek macierzystych do kardiomiocytów i ich charakterystyka

Różnicowanie komórek iPSC do kardiomiocytów umożliwia uzyskanie ludzkich komórek serca bez zastrzeżeń etycznych. W badaniach stosowane są różne metody różnicowania komórek pluripotencjalnych w komórki iPSC-CM. Jedną z metod opiera się na wykorzystaniu czynników Aktywiny A i BMP4 (ang. *bone morphogenetic protein 4*, białko morfogenetyczne kości 4), które należą do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu β (ang. *transforming growth factor beta*, TGF- β) (protokół GiAB) [52]. Oba białka uczestniczą w embriogenezie. Metoda ta umożliwia uzyskanie ponad 30 % kardiomiocytów z komórek iPSC [52]. Inna metoda wykorzystuje aktywatory ścieżki sygnałowej Wnt oraz wyciszenie ekspresji β -kateniny z zastosowaniem shRNA (z hodowli komórek iPSC powstaje około 80 % kardiomiocytów - protokół GiSB). Jednak najbardziej popularnym sposobem różnicowania komórek iPSC do iPSC-CM jest zastosowanie inhibitorów ścieżki sygnałowej przez wykorzystanie inhibitora kinazy syntazy glikogenu 3 (ang. *glycogen synthase kinase 3*, GSK-3) z chemicznym inhibitorem ścieżki Wnt (protokół GiWi) [53]. Procedura ta opiera się na modulacji ścieżki sygnałowej Wnt. Udowodniono, że są 3 szlaki sygnałowe Wnt:

kanoniczny, niekanoniczny szlak polaryzacji komórek planarnych i niekanoniczny szlak Wnt/wapń. Kanoniczna ścieżka sygnałowa Wnt jest uznawana za jeden z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za funkcjonowanie komórek i rozwój embrionalny, ponieważ reguluje ona wiele szlaków m.in. powoduje akumulację lub degradację β -kateniny, która kontroluje i koordynuje transkrypcję genów. Akumulacja β -kateniny odbywa się w cytoplazmie komórkowej a następnie jest transportowana do jądra komórek, gdzie działa jako mediator transkrypcyjny. Degradację kontroluje natomiast białko GSK-3 kierując β -kateninę do ubiquitynacji, a następnie do proteasomu w celu jej strawienia [54]. W przypadku protokołu GiWi zastosowanie inhibitora GSK-3 powoduje akumulację β -kateniny, która aktywuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za różnicowanie iPSC do mezodermy. Następnie, wykorzystywany jest inhibitor ścieżki Wnt, co powoduje strawienie β -kateniny i dalsze różnicowanie do mezodermy sercowej i do kardiomiocytów [52]. Dzięki tej procedurze możliwe jest uzyskanie około 85-95 % komórek iPSC-CM.

Komórki iPSC-CM są bardziej podobne do płodowych niż do dojrzałych kardiomiocytów. Płodowe CM i komórki iPSC-CM różnią się od dojrzałych komórek serca, m.in. liczbą mitochondriów i kanałów odpowiedzialnych za transport jonów wapnia, metabolizmem i morfologią. Różnice i podobieństwa zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1 Porównanie właściwości kardiomiocytów dojrzałych, uzyskanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych - iPSC-CM i kardiomiocytów płodowych [55]–[57]. cTnI – sercowa izoforma troponiny I, ssTnI – izoforma troponiny I mięśnia szkieletowego, α -MHC – ciężki łańcuch miozyny, izoform α , β -MHC – ciężki łańcuch miozyny, izoform β .

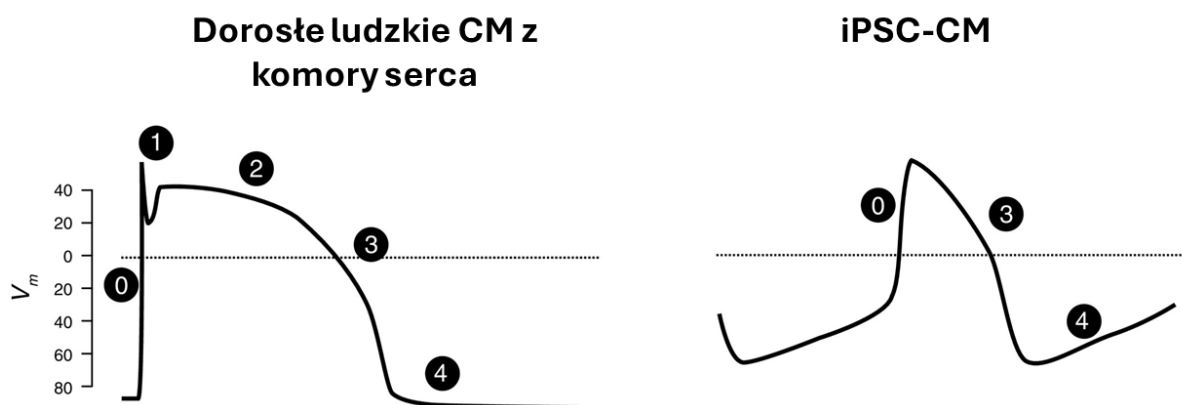
		Dojrzałe kardiomiocyty	iPSC-CM	Kardiomiocyty płodowe
Morfologia	Wielkość i kształt	Duże (objętość $40 \mu\text{m}^3$), wydłużone ($150 \mu\text{m}$)	Małe (objętość $2 \mu\text{m}^3$), okrągłe (średnica $30 \mu\text{m}$)	Małe
	Ilość jąder	Wielojądrowe (zwykle dwa jądra)	Jednojądrowe (najczęściej)	Jednojądrowe
	Organizacja sarkomeru	Obecna	Brak	Brak
	Ukierunkowanie komórek	Ułożenie równoległe względem siebie, uporządkowane	Ułożone w sposób nieuporządkowany	Ułożone w sposób nieuporządkowany
Izoformy białek sarkomeru	Ilościowo przeważająca izoforma troponiny I	cTnI	ssTnI	ssTnI
	Ilościowo przeważająca izoforma łańcucha ciężkiego miozyny	β -MHC (komorowe), β -MHC/ α -MHC (predsionkowe)	α -MHC	α -MHC
Elektrofizjologia	Sposób kurczenia się	Regularne	Spontaniczne	Spontaniczne
	Wartość potencjału spoczynkowego [mV]	~ -90	~ -70	~ -40
Mitochondria i metabolizm	Kształt	Pałeczki	Cienkie pałeczki	Cienkie pałeczki
	Rozmieszczenie	Równomiernie wzdłuż sarkomeru	Blisko jądra komórkowego	Blisko jądra komórkowego
	Główny proces metaboliczny	β -oksydacja	Glikoliza	Glikoliza

Dojrzałe kardiomiocyty charakteryzuje wydłużony, wrzecionowaty, anizotropowy kształt. Ponadto, około 25 – 30 % komórek jest dwujądrzastych [55]. Dorosłe kardiomiocyty w sercu ułożone są równolegle, co umożliwia przewodzenie i synchronizację impulsów elektrycznych, a także ułatwia przepływ cytokin oraz czynników parakrynnych, które z kolei umożliwiają komunikację między komórkami. Niedojrzałe kardiomiocyty (w tym iPSC-CM) mają natomiast jedno jądro, są okrągłe, losowo ułożone i mniejsze niż dojrzałe CM. Również budowa sarkomerów w dorosłych CM jest odmienna niż w CM płodowych np. miofibryle w dojrzałych CM są uporządkowane, podczas gdy w komórkach niedojrzałych są one ułożone w sposób nieregularny. Dodatkowo, porównując budowę sarkomerów w dojrzałych i niedojrzałych kardiomiocytach zauważono, że zmienia się stosunek izoform białka m.in. w przypadku sercowej troponiny T - w kardiomiocytach płodowych przeważa występowanie izoform cTnT1 i cTnT2, a w dojrzałych cTnT3 i cTnT4 [58]. W przypadku troponiny I, płodowa izoforma to ssTnI (ang. *slow skeleton troponin I*, troponina I mięśnia szkieletowego) kodowana przez gen *TNNI1*, a w dorosłych formach CM występuje głównie sercowa izoforma troponiny I (ang. *cardiac troponin I*, cTnI) kodowana przez gen *TNNI3* [59]. Różnice obserwowane są również w przypadku białka łańcucha ciężkiej miozyny (ang. *myosin heavy chain*, MHC). W tkance serca występują dwa typy MHC – α -MHC i β -MHC. W zależności od stopnia dojrzałości komórek serca zmieniają się proporcje α -MHC i β -MHC. W dojrzałych kardiomiocytach pochodzących z ludzkiej komory serca jest znacznie więcej β -MHC, niż α -MHC. Z kolei, dla komórek płodowych i iPSC-CM dominującą izoformą jest α -MHC [60].

Dojrzałe kardiomiocyty w porównaniu do komórek płodowych i iPSC-CM różnią się również elektrofizjologią. Wszystkie wymienione typy kardiomiocytów posiadają kanały jonowe, które umożliwiają transport jonów i powodują powstawanie potencjału czynnościowego (ang. *action potential*, AP). Model dla dojrzałych CM wyjaśniający zmiany potencjału czynnościowego serca dzieli się na 4 fazy (Ryc. 6). Faza 0 to moment depolaryzacji błony komórkowej i zmiany potencjału czynnościowego z -90 mV do $+50$ mV. Spowodowane jest to napływem jonów dodatnich do komórki (Na^+ i Ca^{2+}), dzięki otwarciu kanałów sodowych i wapniowych typu L. Kolejna, faza 1 - repolaryzacja, rozpoczyna się przez zamknięcie kanałów sodowych, zmniejsza się ilość jonów sodowych, jednak ich stężenie jest nadal duże przez co otwiera się kanał, który wypompowuje jony Na^+ i wpompowuje jonów Ca^{2+} (ang. *sodium-calcium exchanger*, NCX). W tej fazie również otwiera się kanał potasowy, który

umożliwia wypompowywanie jonów K^+ na zewnątrz komórek. Potencjał czynnościowy spada do około +30 mV. W fazie 2 (plateau), otwierają się kanały wapniowe typu L i jony wapnia Ca^{2+} są transportowane do wnętrza kardiomiocytów. Powoduje to odwrócenie kanału NCX – do komórki transportowane są jony sodowe, a z komórki jony wapnia. AP pozostaje na podobnym poziomie co w fazie 1. Następnie, w fazie 3 dochodzi do zamknięcia kanałów wapniowych i repolaryzacji błony komórkowej. Potencjał spoczynkowy spada do -90 mV. Faza 4 to faza spoczynkowa [61].

W przypadku komórek płodowych i iPSC-CM, AP spoczynkowe w fazie 4 jest wyższe (między -57 mV do -70 mV) (Ryc.6), ponieważ zmniejszona jest gęstość prądu potasowego. Dodatkowo, mniejsza ilość transportowanych jonów potasowych powoduje nieregularne kurczenie się CM. Dodatkowo, w niedojrzałych kardiomiocytach brakuje fazy 1 i 2 [61].



Rycina 6 Porównanie zmian w fazach potencjału czynnościowego w ludzkich dojrzałych kardiomiocytach komorowych serca oraz komórkach iPSC-CM pochodzących od człowieka. Cyfry oznaczają kolejne fazy AP [57].

W dojrzałych CM, skurcz i rozkurcz osiągane są przez transport jonów. Napływ pozakomórkowych jonów wapnia do CM powoduje uwalnianie Ca^{2+} z siateczki sarkoplazmatycznej (ang. *sarcoplasmic reticulum*, SR), które wiążą się z troponiną C, powodując skurcz. Podczas rozkurczu jony wapnia wychwytywane są do SR przez ATPazę SERCA2 (ang. *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) i wypompowywane przez NCX z komórek. Kardiomiocyty płodowe oraz komórki iPSC-CM charakteryzują się słabo rozwiniętą siateczką sarkoplazmatyczną (SR) oraz niedoborem kanałów wapniowych typu T, które odgrywają kluczową rolę w transporcie jonów wapnia do komórek podczas fazy depolaryzacji. Dodatkowo, poziom białek (np. SERCA2) uczestniczących w transporcie jonów wapnia jest znacznie niższy w porównaniu z dojrzałymi kardiomiocytami [57].

Ze względu na znaczne zapotrzebowanie na energię w postaci ATP (adenozynotrifosforan), dorosłe kardiomiocyty opierają swój metabolizm na β -oksydacji, co związane jest również wzrostem ilości mitochondriów w komórkach w porównaniu do CM płodowych i komórek iPSC-CM. Z kolei CM płodowe i iPSC-CM pokrywają swoje zapotrzebowania energetyczne wykorzystując głównie glikolizę [61].

Płodowe CM i komórki iPSC-CM różnią się od dorosłych CM, dlatego też, aby w odpowiedni sposób odtworzyć funkcjonowanie dorosłych komórek serca i uzyskać model komórkowy dorosłej tkanki serca *in vitro*, prowadzone są liczne badania w celu uzyskania dojrzałych iPSC-CM w modelach *in vitro*. Stosowane są m.in. stymulacje poprzez rozciąganie mechaniczne [62], stymulacje elektryczne [55], dodawanie czynników wzrostu (np. insulinopodobnego czynnika wzrostu - IGF-1) do medium hodowlanego [52], promowanie zmian metabolizmu komórki na β -oksydację kwasów tłuszczowych poprzez stosowanie pożywki o niższym stężeniu glukozy [63]. Komórki iPSC-CM są powszechnie badane nie tylko w celu osiągnięcia dojrzałych form, ale także w badaniach nad regeneracją uszkodzonej tkanki serca [45]. Przykładowo, *Jiang i wsp.* [64] wykorzystali komórki iPSC-CM do regeneracji serca myszy po zawale. Komórki zostały wstrzyknięte do uszkodzonej części tkanki serca, a następnie zbadano zmiany elektryczne serca po 1, 2 i 4 tygodniach. Po czterech tygodniach stwierdzono poprawę frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF), zwiększoną angiogenezę i regenerację natywnej tkanki serca w grupie myszy poddanych terapii z wykorzystaniem komórek iPSC-CM, jednak analiza histologiczna ujawniła zmniejszenie liczby przeszczepionych komórek w porównaniu z początkową ilością [64].

Podsumowując, badania nad zastosowaniem komórek iPSC-CM potwierdzają, że mają one duży potencjał do wykorzystania w badaniach regeneracji mięśnia sercowego. Niemniej jednak niezbędne jest prowadzenie dalszych prac w tym zakresie oraz badań nad poprawą ich funkcjonowania, aby wiernie odzwierciedlały cechy dojrzałych kardiomiocytów.

5. Modele *in vitro* do badań funkcjonowania tkanki serca

Coraz więcej badań prowadzonych jest z wykorzystaniem komórek macierzystych i komórek serca w połączeniu z inżynierią tkankową (ang. *tissue engineering*, TE) [65], [66]. Inżynieria tkankowa łączy zastosowanie inżynierii materiałowej, medycyny i fizjologii w celu uzyskania nowych substytutów tkanek o podobnych funkcjach i cechach fizjologicznych jak w warunkach *in vivo* [67] i może pomóc w wyjaśnieniu i zrozumieniu funkcjonowania tkanki serca w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Zastosowanie inżynierii tkankowej

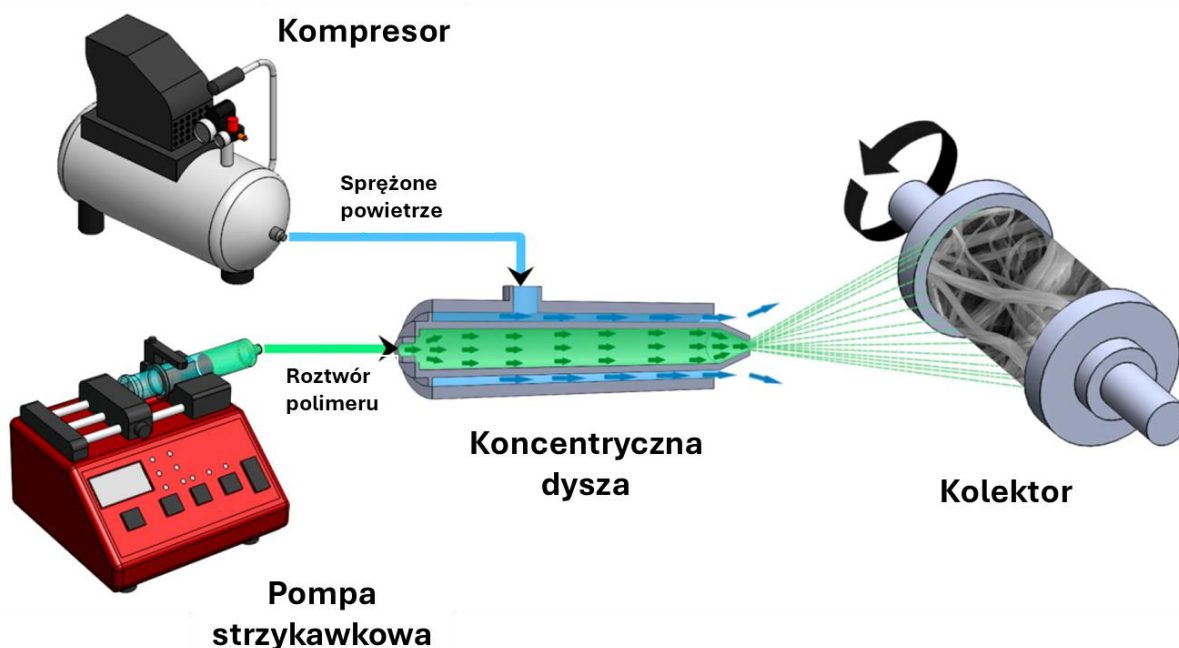
w modelach *in vitro* tkanki serca obejmuje wykorzystanie m.in. kardiomiocytów, komórek macierzystych, czynników biochemicznych, które wpływają na funkcjonowanie komórek oraz czynników strukturalnych (rusztowania), które mają naśladować budowę i funkcjonowanie ECM tkanki serca [68]–[70]. Rusztowania wykorzystywane w inżynierii tkankowej powinny zapewnić odpowiednie właściwości mechaniczne i strukturalne podobne do właściwości ECM tkanki serca [5], [71]. Ponadto, rusztowania powinny być wykonane z materiałów biokompatybilnych i biodegradowalnych, które minimalizują ryzyko wywołania odpowiedzi zapalnej w tkance serca w warunkach *in vivo*. Rusztowania charakteryzują się wysoką porowatością, która umożliwia efektywną wymianę gazową i dostęp składników odżywczych do komórek, a także skuteczne usuwanie metabolitów z komórek [72]. Jednym z typów rusztowań wykorzystywanych w inżynierii tkankowej, które spełniają powyższe kryteria, są maty nanowłókniste, które umożliwiają adhezję komórek oraz mogą stymulować proliferację, żywotność i różnicowanie komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów [73]–[76].

5.1. Wytwarzanie mat nanowłóknistych i ich charakterystyka

Nanowłókno definiowane jest jako jednowymiarowy nanomateriał, gdyż jeden wymiar wykracza poza skalę nanometryczną [77]. Dodatkowo, nanowłókna są liniowe, ich długość jest znacząco większa niż szerokość, wykazują się dużym stosunkiem powierzchni do objętości. Nanowłókna początkowo były określane jako włókna o średnicy poniżej 100 nm, jednak ze względu na ich specyficzne właściwości i procesy wytwarzania, w literaturze jako nanowłókna określa się, struktury o średnicy do 1 μm [78], [79]. Nanowłókna mogą tworzyć maty nanowłókniste, które dzięki ułożeniu warstwowym włókien mają strukturę trójwymiarową (3D). Dodatkowo, między włóknami pozostają wolne przestrzenie (pory), które zapewniają wysoką porowatość nanowłókniny i umożliwiają migrację komórek [78], [79].

W zależności od wykorzystywanego materiału i wymaganych właściwości nanowłókien (takich jak uporządkowane ułożenie, elastyczność, wytrzymałość itp.) stosowane są różne techniki ich wytwarzania. Metody wytwarzania nanowłókien można podzielić na elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*, ES), rozdmuch roztworu polimeru (ang. *solution blow spinning*, SBS), samoorganizację, separację faz, rozdmuchiwanie stopu, przędzenie na mokro, syntezę indukowaną plazmą oraz przędzenie odśrodkowe [80]. Elektroprzędzenie jest najczęściej stosowaną techniką wytwarzania mat nanowłóknistych w inżynierii tkankowej i jest szeroko stosowane przy wykorzystaniu polimerów syntetycznych i naturalnych. Metoda ta polega na zastosowaniu wysokiego napięcia (do 60 kV), które powoduje naładowanie elektryczne roztworu polimeru, a pod wpływem siły elektrostatycznej krople cieczy są

rozciągane, tworząc spiralny strumień [81]. Układ do elektroprzędzenia składa się ze strzykawki, w której znajduje się roztwór polimeru. Strzykawka ta połączona jest z pompą dozującą, która umożliwia kontrolę nad przepływem roztworu polimeru. Na końcu strzykawki znajduje się metalowa igła, która działa jak elektroda i jest podłączona do napięcia zasilającego, które indukuje rozciąganie roztworu polimeru do włókien, a także odparowanie rozpuszczalnika. Ostatnim elementem jest uziemiony kolektor, który zamyka obwód i zbiera nanowłókna [80]. Technika elektroprzędzenia jest prosta i tania, jednak posiada pewne ograniczenia. Głównymi z nich jest niska wydajność procesu i konieczność stosowania wysokiego napięcia, aby wygenerować siłę napędową formowania włókien [82]. Drugą często wykorzystywaną metodą jest metoda rozdmuchu roztworu polimeru (SBS). Metoda ta po raz pierwszy została zastosowana w 2009 roku [81]. W metodzie tej, nanowłókna są wytwarzane przy użyciu koncentrycznej dyszy. Z wewnętrznej dyszy wytłaczany jest roztwór polimeru, a z dyszy zewnętrznej wypływa strumień gazu pod ciśnieniem. Strumień gazu jest wydmuchiwany z dużą prędkością, powodując rozciąganie strugi roztworu polimeru i odparowanie rozpuszczalnika. Nanowłókna następnie zbierane są przez kolektor (Ryc. 7). Metoda ta jest tania, prosta, a wytwarzanie nanowłókien jest wydajniejsze w porównaniu do ES [80]. Zwiększona wydajność SBS wynika z tego, że podczas wytwarzania nanowłókien wykorzystywane jest sprężone powietrze, które umożliwia dynamiczny i ciągły proces formowania włókien, przez co możliwe jest stosowanie nawet 10-krotnie wyższych strumieni roztworu polimeru, niż w procesie ES. Dodatkowo, szybkość wytwarzania nanowłókien w SBS umożliwia produkcję masową. W przypadku wykorzystywania ES wymagana jest generacja pola elektrycznego co ogranicza szybkość procesu oraz produkcję masową. Inne metody wytwarzania mat z nanowłókien są rzadko wykorzystywane do uzyskiwania modeli komórkowych naśladujących tkankę serca. Wynika to np. ze złożoności procedury wytwarzania [81], [83].



Rycina 7 Schemat wytwarzania nanowłókien metodą rozdmuchu roztworu polimeru (SBS) [84].

W trakcie wytwarzania nanowłókien o żądanych właściwościach np. średnicy, porowatości i właściwościach mechanicznych, ważne jest dobranie odpowiednich parametrów procesu. Zalicza się tu stężenie, lepkość i masę cząsteczkową polimeru, jego elastyczność, a także stosowany rozpuszczalnik. Stężenie polimeru jest kluczowe, ponieważ jego wzrost indukuje wzrost średnicy nanowłókien. Zarówno zbyt niskie, jak i zbyt wysokie stężenie polimeru w roztworze może spowodować zakłócenia przebiegu procesu: brak formowania się włókien lub zatkanie dysz i defekty w strukturze otrzymywanych mat nanowłóknistych, dlatego w zależności od zastosowanego polimeru, jego stężenie musi być odpowiednio dobrane [81], [83], [85].

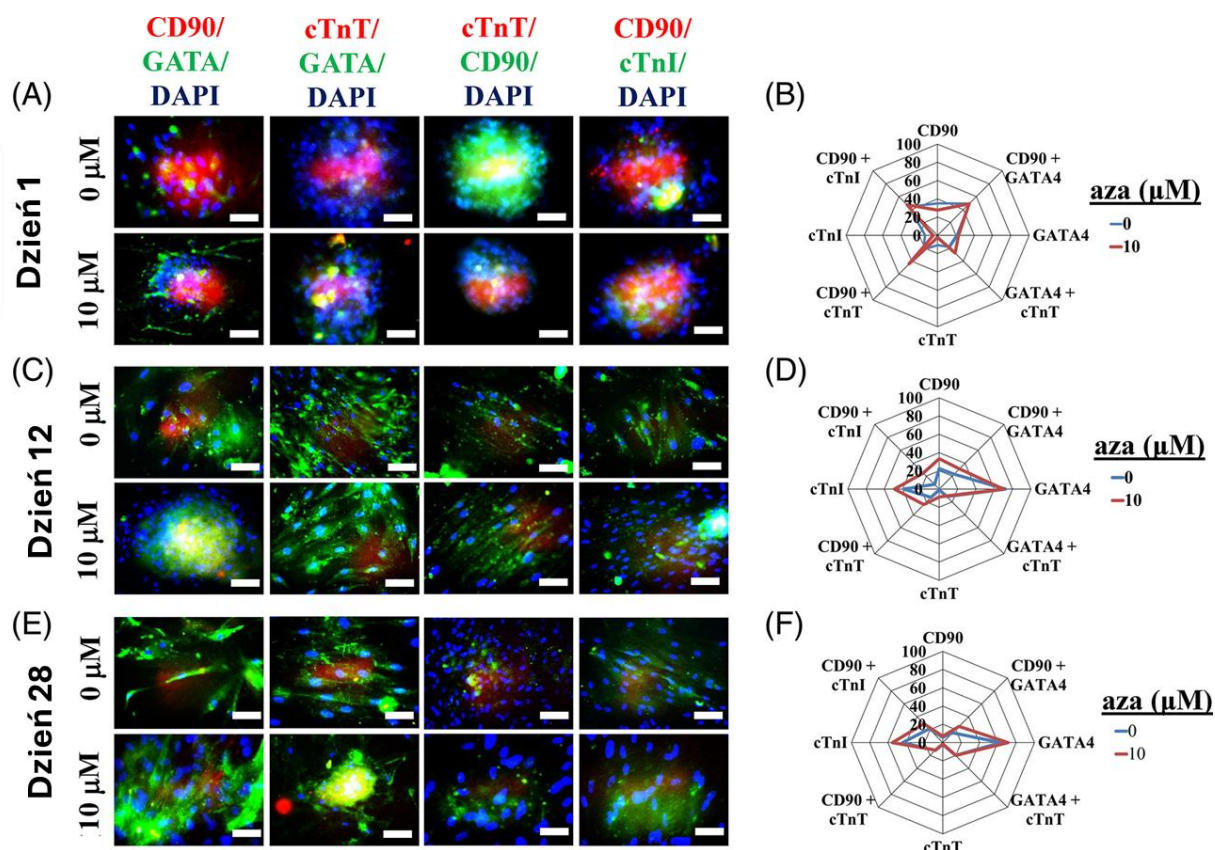
5.2. Maty nanowłókniste w modelach komórkowych *in vitro* tkanki serca

W ostatnich latach wiele prac koncentruje się na rozwoju trójwymiarowych modeli komórkowych *in vitro* tkanki serca wykorzystując nanowłókna wytworzone z różnych biomateriałów. Do tych materiałów należą naturalne polimery takie jak np. kolagen oraz polimery syntetyczne takie jak np. polikaprolakton (ang. *poly(ε-caprolactone)*, PCL) i poliuretan (ang. *polyurethane*, PU) oraz ich kompozyty.

Maty nanowłókniste wytworzone z naturalnych polimerów przede wszystkim wykonane są z kolagenu. Wynika to z tego, że jest on głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej, więc ma odpowiednie właściwości biologiczne i strukturalne. Kolagen

jest białkiem, które występuje w wielu tkankach, takich jak: kości, skóra, mięśnie szkieletowe, serce, chrząstka itp. Jest on biomateriałem łatwo dostępnym, biokompatybilnym i biodegradowalnym [86], co powoduje, że jest szeroko stosowany w inżynierii tkankowej do utworzenia modeli komórkowych tkanki serca. Kolagenowe maty nanowłókniste zostały wykorzystane między innymi do hodowli i badań szczurzych kardiomioblastów (H9c2) [65], ludzkich komórek iPSC-CM [87] oraz mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BM-MSC) [88]. Przykładowo, nanowłókna z kolagenu użyto do badań nad poprawą adhezji i żywotności komórek H9c2. Komórki hodowane na matach nanowłóknistych miały wyższą żywotność niż komórki H9c2 hodowane na płytce polistyrenowej (ang. *polystyrene*, PS) (kontroli). Dodatkowo, komórki hodowane na matach nanowłóknistych miały równolegle ułożone włókna aktywne, co jest charakterystyczne dla dojrzałych kardiomiocytów [65], [89]. W innej pracy, *Joshi i wsp.* [88] badali proliferację i różnicowanie komórek BM-MSC hodowanych na matach z włókien kolagenowych o nieuporządkowanym ułożeniu. Do różnicowania zastosowano dodatkowo roztwór 5-azacytydyny (5-AZA). 5-AZA jest czynnikiem biochemicznym wykorzystywanym do różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów [88]. Przeprowadzono immunobarwienia w celu określenia poziomu białek charakterystycznych dla różnych etapów różnicowania komórek macierzystych w kardiomiocyty. Wykorzystano marker CD90, obecny w komórkach macierzystych, GATA4, obecny we wczesnym etapie różnicowania komórek macierzystych w kardiomiocyty oraz białka cTnT, cTnI, obecne w dojrzałych kardiomiocytach. Po 28 dniach hodowli poziom białek CD90 w hodowli komórkowej znacząco spadł, podczas gdy poziom białek cTnT i cTnI wzrósł. W ramach tych badań potwierdzono, że maty nanowłókniste mogą stanowić czynnik strukturalny wspomagający różnicowanie komórek macierzystych do kardiomiocytów (Ryc. 8). Dodatkowo zaobserwowano, że mimo losowego ułożenia nanowłókien, komórki poddane działaniu 5-AZA były do siebie równolegle ułożone [88].

Badania opisane w literaturze dowiodły, że nanowłókna kolagenowe mogą wpływać na wzrost adhezji i żywotność komórek serca oraz naśladować strukturalnie ECM dzięki swoim właściwościom biologicznym. Niemniej jednak, ich niska wytrzymałość mechaniczna i słabe przewodnictwo elektryczne powodują, że głównie stosowane są jako składnik nanowłókien kompozytowych [65], [82].



Rycina 8 Zdjęcia przedstawiają komórki BM-MSC hodowane na kolagenowych nanowłóknach po immunobarwieniu. W komórkach wybarwiono; CD90 obecny w komórkach macierzystych, GATA4 obecny we wczesnym etapie różnicowania komórek macierzystych w kardiomiocyty oraz cTnT, cTnI obecne w kardiomiocytach (A) 1 dnia, (C) 12 dnia, (E) 28 dnia z dodaniem 10 μM lub bez czynnika 5-AZA. Jądra komórkowe we wszystkich przypadkach zostały wybarwione DAPI. Kwantyfikacja poziomu białek została przedstawiona dla 1 dnia (B), dla 12 dnia (D) i dla 28 dnia (F) dla hodowli BM-MSC na nanowłóknach. Skala 100 μm [88].

Nanowłókna najczęściej wykorzystywane w inżynierii tkankowej są wytworzone z polimerów biodegradowalnych takich jak poliuretan (PU), polikaprolakton (PCL) i kopolimer polilaktydu i kwasu glikolowego (ang. *polylactide-co-glycolic acid*, PLGA). Większość badań z wykorzystaniem nanowłókien z syntetycznych polimerów koncentruje się na hodowli oraz sprawdzeniu wpływu mat nanowłóknistych na adhezję, morfologię i ułożenie komórek, na ich żywotność oraz dojrzewanie. Przykłady zastosowania mat wykonanych z różnych typami biomateriałów do badania komórek serca i komórek macierzystych przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2 Przykłady zastosowania mat nanowłóknistych do badań z wykorzystaniem różnych typów komórek serca i komórek macierzystych.

Typ komórek	Rodzaj nanowłókien	Ułożenie równoległe nanowłókien	Średnica nanowłókien	Elastyczność	Efekt	Lit.
H9c2	Żelatyna	-	1,5 µm	0,6-0,8 MPa	Brak cytotoksyczności, wchłanianie leku przez komórki serca wzrasta	[90]
Różnicowanie iPSC w iPSC-CM	PLGA	-	500 ± 280 nm	Brak danych	Poprawa proliferacji i kardiogenezy	[91]
iPSC-CM	PLGA	+	950 µm	88 MPa	Komórki o równoległym ułożeniu, Zwiększona liczba mitochondriów w komórkach	[92]
Różnicowanie iPSC-CPC w iPSC-CM	PCL	+	700nm	Brak danych	Poprawa różnicowania iPSC-CPC do CM, zwiększenie ekspresji cTnT, zsynchronizowana wewnątrzkomórkowa oscylacja Ca ²⁺	[93]
CPC, HUVEC	PCL	+	600-800 nm	10-30 MPa	Poprawiona proliferacja i adhezja, większa liczba komórek wykazuje równoległe ułożenie, Zwiększona angiogeneza	[94]
HL-1, iPSC-CM	PCL	+	400-500 nm	350-370 MPa	Poprawiony spontaniczny skurcz CM, więcej komórek wykazuje równoległe ułożenie	[95]
badania <i>in vivo</i> , iPSC-CM	PLGA	+	500-2000 nm	Brak danych	Dojrzewanie CM, zwiększona aktywność elektryczna i odpowiedź na leki, poprawa funkcjonowania uszkodzonego serca	[96]
Różnicowanie iPSC w iPSC-CPC i iPSC-CM	PCL/Gel	-	2-3 µm	Brak danych	Zwiększona ekspresja genów charakterystycznych dla progenitorowych komórek serca	[97]
CPCs	Alginate/PCL/GO	-	11-26 µm	3-4 MPa	Wzrost żywotności, proliferacji i adhezji komórek	[98]
HCM	Gel/PCL/GO	-	210-500 nm	10-70 MPa	Poprawiona przewodność nanowłókien, zwiększona proliferacja komórek	[99]
H9C2	PU/Cs/CNT	+ i -	100-200 nm	0,1-13 MPa	Większa adhezja i proliferacja komórek, komórki mają anizotropowy, wydłużony kształt	[100]
H9C2, HUVEC	PU/CNT	-	90-300 nm	0,38-5,83 MPa	Lepsza komunikacja komórka-komórka i komórka-rusztowanie, wysoka proliferacja komórek	[101]

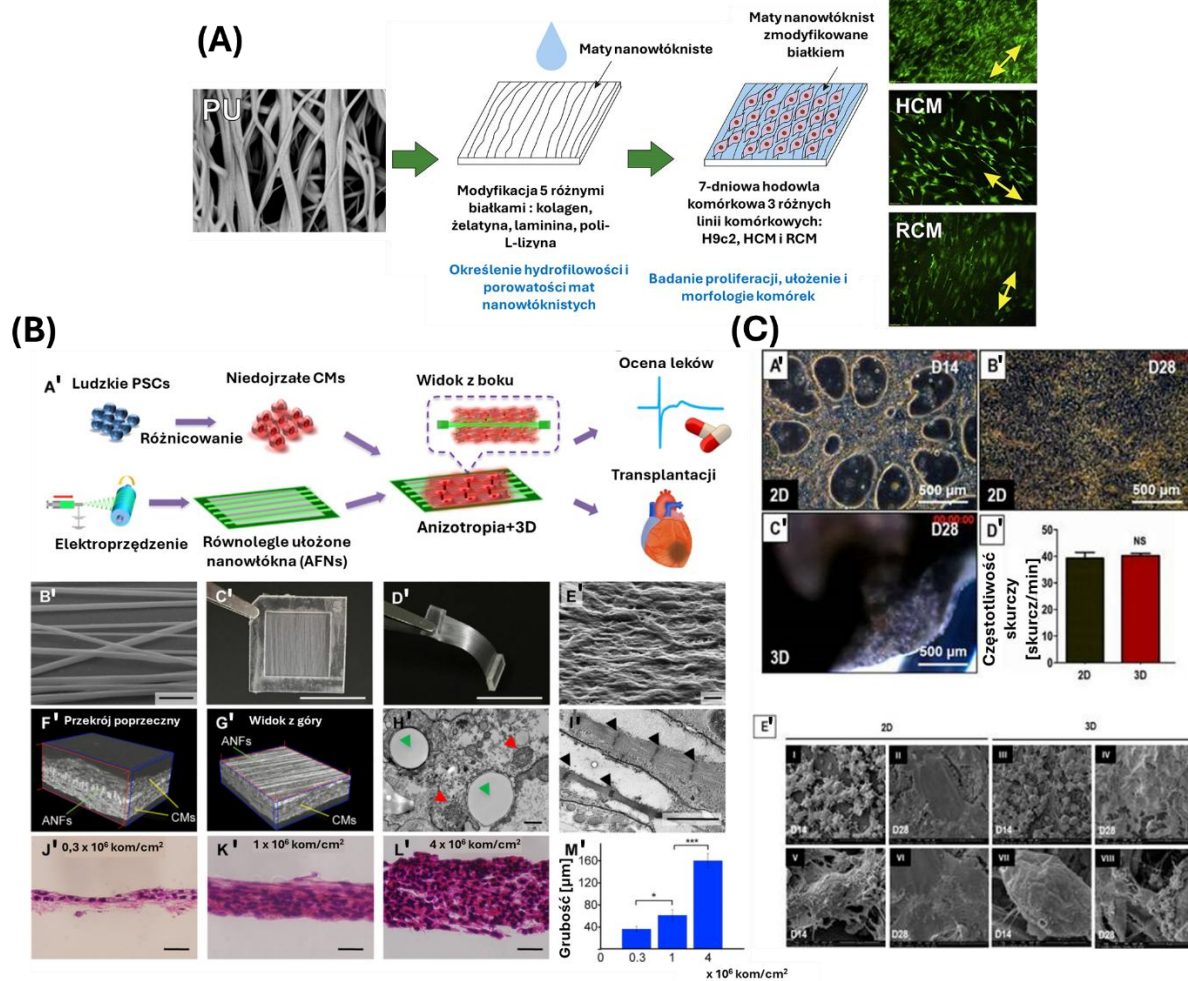
Wykaz skrótów: H9c2- szczurze kardiomioblasty, iPSC – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, iPSC-CM – kardiomiocyty zróżnicowane z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, PLGA - polilaktyd - kwasu glikolowego, iPSC-CPC- progenitorowe komórki serca zróżnicowane z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, PCL- polikaprolakton, HUVEC – ludzkie pierwotne komórki śródbłonna, HL-1 – mysie kardiomiocyty, Gel-żelatyna, GO – utleniony grafen, Cs- chityna, CNT – nanorurki węglowe, PU - poliuretan.

Kolejnym materiałem stosowanym do wytwarzania nanowłókien jest polikaprolakton. Nanowłókna PCL są biokompatybilne, biodegradowalne, są wytrzymałe mechanicznie oraz są elastyczne. Dzięki czemu zachowują trwałość podczas ciągłego rozciągania i ściskania, odzwierciedlającego pulsacyjne ruchy komórek serca. Nanowłókna z PCL są najczęściej wykorzystywane, wśród nanowłókien z polimerów syntetycznych, do wytwarzania modeli komórkowych tkanki serca (Ryc. 9) [102], [103]. Na przykład, *Ding i wsp.* [93] hodowali progenitorowe komórki serca zróżnicowane z indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cell-derived cardiac progenitor cells*, iPSC-CPC) na matach nanowłóknistych z PCL o uporządkowanym ułożeniu. Następnie, po 14 dniach hodowli przeprowadzono immunobarwienie i analizę ekspresji genów, w celu sprawdzenia czy nanowłókna PCL wpływają na różnicowanie komórek iPSC-CPC w kardiomiocyty. Stwierdzono wzrost poziomu białka specyficznego dla dojrzałych kardiomiocytów – troponinę T i ekspresję genów *TNNT2*, *MYH6* i *MYH7* w przypadku komórek hodowanych na matach nanowłóknistych. Świadczyć to może o tym, że maty mogą stymulować różnicowanie komórek iPSC-CPC w kardiomiocyty [93]. PCL wykorzystywane jest również do wytwarzania kompozytowych nanowłókien. Przeprowadzono badania, w których maty wytworzone z PCL i żelatyny wykorzystano do różnicowania komórek iPSC do iPSC-CPC i iPSC-CM (hodowle 3D) i porównano wyniki z hodowlami na płytkach polistyrenowych (hodowle 2D) (Ryc. 9 C). Wykazano, że komórki iPSC po 72 h hodowli na matach nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych mają wysoką żywotność. Następnie, komórki macierzyste różnicowano i po 28 dniach przeprowadzono analizę ekspresji genów *SIRPA* i *ISL-1* - charakterystycznych dla komórek progenitorowych serca oraz *TNNT2* – charakterystycznego dla kardiomiocytów. W hodowli 3D zauważono najwyższą ekspresję genów *SIRPA* i *ISL-1* i znaczny wzrost ekspresji *TNNT2* w porównaniu do hodowli komórek przed rozpoczęciem różnicowania. Z kolei w hodowli 2D wzrost ekspresji genów charakterystycznych dla CPC był niższy, za to ekspresja *TNNT2* była najwyższa w porównaniu do hodowli 3D. Wykazano, że ludzkie komórki iPSC hodowane na matach nanowłóknistych wykonanych z PCL i żelatyny chętniej różnicują się do komórek progenitorowych serca niż do kardiomiocytów [97]. W innych badaniach, maty nanowłókniste z PCL zmodyfikowane roztworem żelatyny o stężeniu 0,1 % (1 g/l) wykorzystano do hodowli i różnicowania indukowanych mysich pluripotentjalnych komórek macierzystych (miPSC) [104]. Poprzez analizę ilościową białek specyficznych dla dojrzałych kardiomiocytów: cTnT i α -aktyniny, potwierdzono różnicowanie komórek macierzystych do kardiomiocytów. Dodatkowo, potwierdzono, że komórki hodowane na matach nanowłóknistych różnicowały się do kardiomiocytów z większą wydajnością niż komórki

hodowane na standardowych płytkach polistyrenowych. Podsumowując, maty nanowłókniste z PCL są szeroko stosowane w badaniach nad różnicowaniem komórek macierzystych w kardiomiocyty. Niemniej jednak, wciąż konieczne są dalsze badania w tym zakresie [64], [91], [105].

Kolejnym przykładem polimeru wykorzystywanego do wytworzenia nanowłókien stosowanych w inżynierii tkankowej jest poliuretan. Nanowłókna wykonane z tego materiału są hydrofobowe, dlatego do badań najczęściej stosowane są maty nanowłókniste z PU, poddane modyfikacji zwiększającej hydrofilowość. Stosowane są również kompozyty z polimerami naturalnymi [103], [106]. Tomecka *i wsp.* [106] porównali żywotność i ułożenie szczurzych kardiomioblastów (H9c2), noworodkowych szczurzych kardiomiocytów (RCM) i ludzkich pierwotnych kardiomiocytów (HCM), hodowanych na matach nanowłóknistych wykonanych z PU, modyfikowanych białkami takimi jak: kolagen, poli-L-lizyna, żelatyna, laminina i fibronektyna. Zauważono, że komórki H9c2, RCM i HCM hodowane na zmodyfikowanych matach nanowłóknistych z PU były bardziej wydłużone, i równolegle ułożone względem siebie. Miały one również wyższą żywotność niż komórki hodowane na płytkach polistyrenowych (Ryc. 9 A). Dodatkowo wykazano, że modyfikacja mat nanowłóknistych białkami miała wpływ na żywotność komórek.

Kolejnym przykładem polimeru wykorzystywanego do wytwarzania nanowłókien jest PLGA, który jest kopolimerem PLA i PGA. Przykładowo, naukowcy hodowali komórki iPSC-CM na matach nanowłóknistych z PLGA, w których włókna były równolegle ułożone względem siebie [96]. Po 14 dniach hodowli, zaobserwowano zmianę w morfologii komórek hodowanych na matach nanowłóknistych. Komórki miały wydłużony i anizotropowy kształt, podczas gdy komórki hodowane na płytce polistyrenowej nie wykazywały takiego ułożenia. W komórkach hodowanych na matach nanowłóknistych wzrósł poziom troponiny T oraz α -aktyniny, które są markerami dojrzałych kardiomiocytów, a także wzrosła ilość białka β -MHC, który uczestniczy w skurczu mięśnia sercowego. Dodatkowo, zwiększyła się ekspresja genów strukturalnych (*ACTN2*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYH7*) oraz genów odpowiedzialnych za regulację transportu jonów Ca^{2+} (*PLN* i *RYR2*). Uzyskane hodowle komórek iPSC-CM na matach z PLGA zostały również wykorzystane w badaniach *in vivo*. Komórki wysiano na matach nanowłóknistych i po 6 dniach hodowli, wszczepiono je do uszkodzonej tkanki serca szczura. W wyniku badań potwierdzono integrację implantu z tkanką serca szczura i zniwelowanie arytmii w tkance bliznowatej, która powstała po zawale (Ryc. 9 B) [96], [105].



Rycina 9 (A) Schemat mat nanowłóknistych z równolegle ułożonymi nanowłóknami pokrytymi różnymi białkami do badania proliferacji i ułożenia 3 typów komórek serca (H9c2, HCM i RCM) [106]. (B) (A') Schemat wytworzonych modeli 3D z wykorzystaniem komórek serca hodowanych na uporządkowanych nanowłóknach, (B') zdjęcia SEM równolegle ułożonych nanowłókien polilaktydu kwasu glikolowego (PLGA), (C'), (D') obrazy mat nanowłóknistych umieszczonych na płytce z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), (E')-(I') zdjęcia hodowli CM z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM) wyhodowanych na matach nanowłóknistych, (J')-(L') histologia trójwymiarowych modeli komórek serca o różnej gęstości wysiewu komórek. (M') Grubość trójwymiarowych modeli komórek serca o różnej gęstości wysiewu komórek. (C) (A')-(C') morfologia komórek iPSC w hodowli 2D (płytki polistyrenowa) i 3D (komórki hodowane na matach nanowłóknistych PCL-żelatyna) po 14- i 28-dniowej hodowli. (D') Analiza ilościowa częstotliwości skurczów komórek iPSC podczas różnicowania kardiomiocytów w hodowli 2D i 3D, (E') obrazy SEM morfologii iPSC hodowanych w kulturach 2D i 3D podczas różnicowania w kulturach 2D (I-II, V-VI) i 3D (III-IV, VII-VIII) w D14 i D28 [97].

Zgodnie z aktualną wiedzą, jedną z kluczowych kwestii w regeneracji uszkodzonych komórek serca jest stymulacja angiogenezy. Angiogeneza jest procesem morfogenetycznym, który tworzy nowe naczynia włosowate z już istniejących. Tworzenie sieci mikronaczyń może poprawić dostarczanie składników odżywczych, tlenu i czynników wzrostu do komórek w modelach komórkowych 3D *in vitro*. Wpłynąć to może na wzrost proliferacji, żywotności

i różnicowania komórek [107]. Udowodniono, że zastosowanie komórek macierzystych w połączeniu z angiogenezą poprawia skuteczność regeneracji uszkodzonych kardiomiocytów [45], [108], [109]. Przykładowo, ludzkie kardiomiocyty hodowano wraz z komórkami śródbłonna i fibroblastami na biodegradowalnych, porowatych matach nanowłóknistych wykonanych z mieszaniny kopolimeru polilaktydu i kwasu glikolowego oraz poli(kwasu L-mlekowego) (PLGA/PLLA). Po dwóch tygodniach hodowli obserwowano spontaniczne kurczenie komórek rosnących na matach. Maty przeszczepiono do szczurzej lewej komory serca. Po kolejnych dwóch tygodniach eksperymentu potwierdzono, przewodzenie impulsów elektrycznych przez wszczepiony implant, nie powodując zaburzeń pracy komory serca szczura. Pojawiły się również nowe naczynia krwionośne, które zintegrowały się z naczyniami krwionośnymi gospodarza, umożliwiając prawidłowe funkcjonowanie serca [75].

Nanowłókna wykonane z różnych biomateriałów znajdują szerokie zastosowanie w inżynierii tkanki serca. Dzięki swoim właściwościom, takim jak biokompatybilność, biodegradowalność, mechaniczna wytrzymałość oraz możliwość modyfikacji powierzchni, maty nanowłókniste tworzą środowisko sprzyjające adhezji, umożliwiające uzyskanie dużej żywotności komórek oraz wspomagają dojrzewanie kardiomiocytów. Nanowłókna oddziałują na organizację komórek, stymulują ekspresję genów specyficznych dla serca oraz wspierają funkcje mechaniczne i elektryczne modeli tkanki serca. Inżynieria tkankowa z wykorzystaniem mat nanowłóknistych umożliwia lepsze poznanie oddziaływania struktury 3D na komórki mięśnia sercowego i komórki macierzyste. Wiedza ta może pomóc w wyjaśnieniu i zrozumieniu funkcjonowania komórek serca, złożonych mechanizmów działania tkanki serca, a w konsekwencji wspierać poszukiwanie modelu komórkowego, który będzie lepiej odzwierciedlał funkcję ludzkiej tkanki serca.

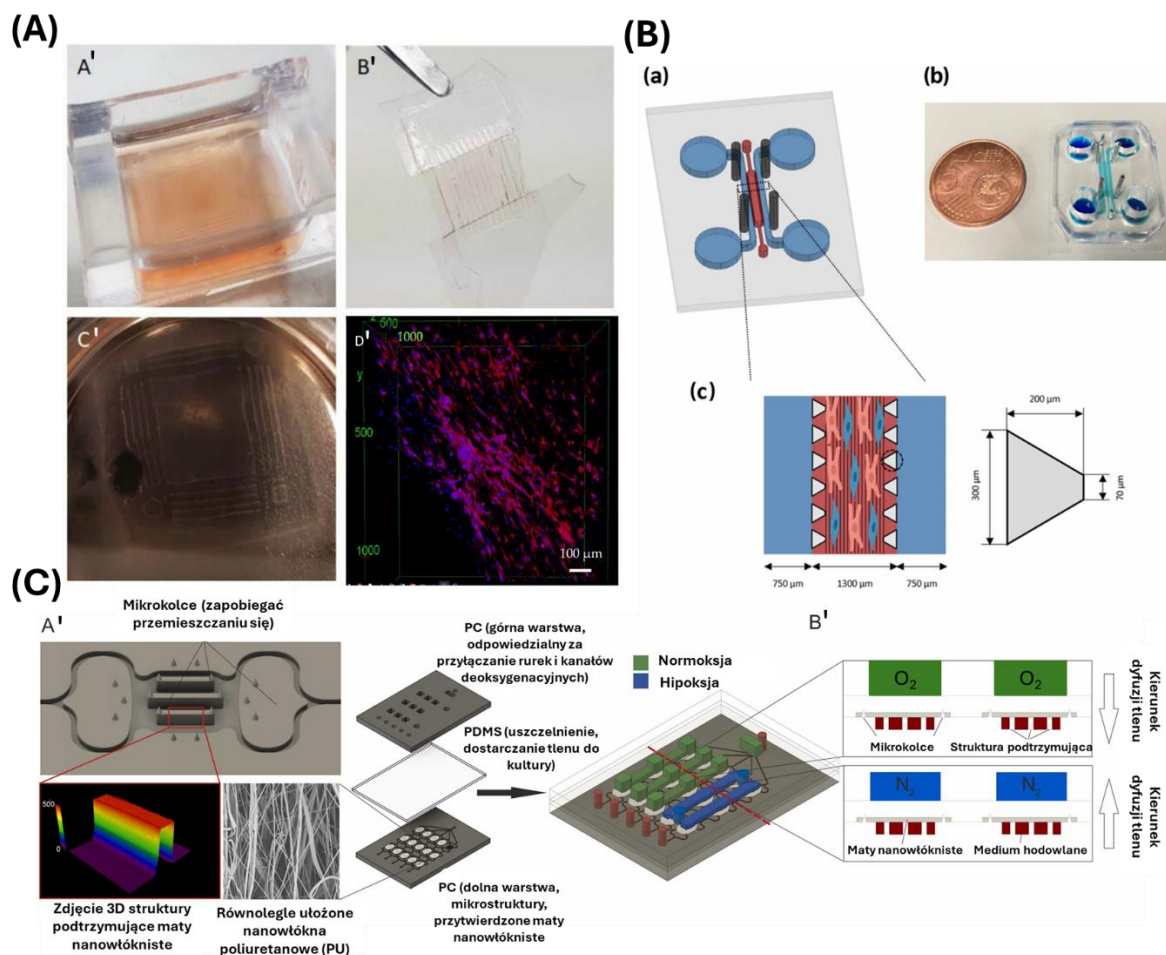
5.3. Inne metody stosowane do tworzenie trójwymiarowych modeli tkanki serca

W ostatnich latach prowadzone są badania nad zastosowaniem technologii *Lab-on-a-chip* (LoC) w inżynierii tkankowej. *Lab-on-a-chip* są to mikroukłady przepływowe, które umożliwiają kontrolę mikro środowiska hodowli komórek i manipulacje płynami. Uwzględnienie warunków przepływowych stanowi przewagę nad hodowlą komórek na płytkach wielodołkowych. Dzięki temu uzyskiwane są warunki naśladujące w pewnym stopniu te panujące w tkance serca. Dodatkowo, w mikroukładach przepływowych możliwa jest analiza hodowli komórkowej w czasie rzeczywistym [110].

Mikroukłady przepływowe stosowane do hodowli i analizy komórek serca (ang. *Heart-on-a-chip*) prezentowane dotychczas w literaturze umożliwiają hodowlę kardiomiocytów w warunkach dynamicznych, stymulację mechaniczną i elektryczną komórek. Czynniki te w pewnym stopniu zapewniają naśladowanie warunków zbliżonych do tych występujących w tkance serca [68]. Prowadzono badania, w których mikrosystemy wykorzystywano np. do testowania leków regulujących pracę serca [111], analizy potencjału regeneracyjnego ludzkich komórek serca przy użyciu komórek macierzystych [112], a także do oceny funkcjonowania komórek serca w warunkach dynamicznych oraz hodowanych na matach nanowłóknistych [113]–[116].

Do wytwarzania mikroukładów do hodowli komórek, najczęściej wykorzystywanym materiałem jest poli(dimetylosiloksan) (ang. *poly(dimethylsiloxane)*, PDMS). Wynika to z właściwości tego materiału. Jest on przezroczysty, dzięki czemu jest możliwa analiza optyczna. Jest on również biokompatybilny, tani i przepuszczalny dla gazów (m.in. dla tlenu i dwutlenku węgla). Materiał ten jest hydrofobowy, jednak możliwa jest jego modyfikacja np. z wykorzystaniem plazmy tlenowej i zmiany powierzchni na hydrofilową. Poniżej przedstawiono kilka przykładów zastosowania systemów typu *Heart-on-a-Chip* wykonanych z PDMS, wykorzystanych do hodowli i analizy komórek serca (Ryc. 10). Przykładowo, *Navaee i wsp.* [117] opracowali mikroukład, w którym znajdowały się mikrorowki wypełnione hydrożelem (mieszaniną macierzy zewnątrzkomórkowej bez komórek i fibrynogenu), które wykorzystali do hodowli kokultury komórek H9c2 (kardiomioblasty) i Nor10 (fibroblasty). Komórki hodowane w mikrosystemie z hydrożelem miały równoległe ułożenie, były wydłużone i miały wrzecionowaty kształt, przez co ich morfologia była zbliżona do komórek w natywnej tkance serca. Dodatkowo, komórki hodowane w modelu 3D w hydrożelu wykazują poprawę synchronizacji kurczenia się komórek (Ryc. 10 A). *Canosa i wsp.* [113] przeprowadzili hodowlę i stymulację elektryczną mysich kardiomiocytów i fibroblastów pochodzących z serca w systemie mikroprzepływowym zintegrowanym z nanowłóknami PLA. Po 7 dniach hodowli komórki miały wydłużony, wrzecionowaty kształt i wysoką ekspresję genów *GJA1* (kodujący białko koneksynę 43, które jest odpowiedzialne za komunikację międzykomórkową) i *TNNI3*. Wyniki te potwierdzają, że w mikrosystemie możliwe jest uzyskanie dojrzałych form badanych komórek serca niż w przypadku standardowej hodowli (Ryc. 10 B). Mikroukłady przepływowe z matami nanowłóknistymi wykorzystywano również do badań nad hipoksją. Przykładowo, wytworzono mikroukład, zintegrowany z matami nanowłóknistymi z PU. Dzięki odpowiednio zaprojektowanej geometrii mikroukładów

możliwe było prowadzenie jednoczesnej hodowli komórek serca w warunkach hipoksji i normoksji. Potwierdzono, że komórki hodowane w warunkach niedotlenienia mają zmniejszoną aktywność metaboliczną w porównaniu do komórek utrzymywanych w warunkach normoksji (Ryc. 10 C) [107].



Rycina 10 (A) (A') i (B') Zdjęcie mikroukładu przepływowego z mikrorówkami i hydrożelem, (C') ułożenie komórek H9c2 w mikrorówkach, (D') komórki wybarwione falloidyną i DAPI wykazują wydłużony, anizotropowy kształt po 7 dniach hodowli [117]. (B) (a) Schemat mikroukładu przepływowego obejmującego mikrokomorę hodowlaną (czerwony), mikrokanały z medium hodowlanym (niebieski) i elektrody stymulujące (ciemnoszare), (b) zdjęcie mikroukładu, (c) schemat przedstawiający mikrokomorę, w której kardiomiocyty i sercowe fibroblasty rosną na matach nanowłóknistych [113]. (C) (A') Schemat mikrokomory w mikroukładzie przepływowym, zawierającej mikrokolce, podtrzymujące maty nanowłókniste z PU, (B) schemat przedstawiający geometrie mikroukładu przeznaczonego do prowadzenia hipoksji i normoksji [107].

Najnowsze badania wskazują, że mikroukłady przepływowe stanowią innowacyjne narzędzie w inżynierii tkankowej, umożliwiające odwzorowanie warunków fizjologicznych tkanki serca. Mikroukłady mają potencjał do szerokiego zastosowania w testowaniu leków, badaniach nad regeneracją tkanek oraz analizie mechanizmów chorób. W przyszłości mogą one wspomóc badania nad stworzeniem heterogenicznej, złożonej struktury naśladującej ludzkie serce, co mogłoby wesprzeć prace nad skutecznym poszukiwaniem metody leczenia CVD.

6. Podsumowanie

Choroby układu sercowo-naczyniowego mają najwyższy wskaźnik śmiertelności wśród ludzi na całym świecie. Liczba zgonów z powodu tej choroby stale rośnie, a prognozy na przyszłość wskazują, że ta tendencja nie zmieni się. Naukowcy prowadzą badania nad wprowadzeniem efektywnych metod leczenia CVD, jednak do ich rozwoju potrzebny jest m.in. odpowiedni model komórkowy *in vitro*, który będzie w stanie odzwierciedlić strukturę i funkcjonowanie ludzkiej tkanki serca. Ważne jest, aby szczegółowo zrozumieć mechanizmy i procesy zachodzące w komórkach w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Niedotlenienie tkanki serca jest jedną z głównych przyczyn jej dysfunkcji, dlatego ważne jest badanie odpowiedzi komórkowej na hipoksję w modelach *in vitro* oraz poszukiwanie właściwych modeli komórkowych, które będą naśladować odpowiedź ludzkich kardiomiocytów na niedotlenienie w warunkach *in vivo*. Ta wiedza może przyczynić się do znalezienia efektywnej metody ochrony komórek serca (kardioprotekcji) przed uszkodzeniami i śmiercią związaną z niedotlenieniem. Oprócz badań nad kardioprotekcją, sprawdzane jest zastosowanie innych metod jak np. wykorzystanie komórek macierzystych do regeneracji uszkodzonych komórek serca. W tym przypadku duży potencjał ma zastosowanie komórek macierzystych (iPSC) oraz kardiomiocytów iPSC-CM. Wykorzystywanie obu tych typów komórek do badań umożliwia rozwój medycyny regeneracyjnej, uzyskanie modelu komórkowego *in vitro* z ludzkich komórek serca i komórek macierzystych oraz rozwój badań nad terapią personalizowaną.

Jedną z dziedzin, w której badania skupiają się nad poznaniem i naśladowaniem procesów zachodzących w tkance serca w różnych stadiach rozwoju jest inżynieria tkankowa z wykorzystaniem trójwymiarowej struktury w postaci mat nanowłóknistych. Zastosowanie mat nanowłóknistych umożliwia lepsze poznanie działania czynnika strukturalnego na funkcjonowanie komórek mięśnia sercowego i komórek macierzystych. Badania te mogą pomóc w wyjaśnieniu i zrozumieniu funkcjonowania komórek serca, działaniu złożonych mechanizmów tkanki serca, a w konsekwencji mogą wesprzeć poszukiwanie skutecznej metody regeneracji uszkodzonej tkanki. Do badań stosowane są maty nanowłókniste wytwarzane z różnych materiałów, różniących się średnicą, elastycznością, porowatością, przewodnością elektryczną. Następnie sprawdzany jest ich wpływ na adhezję, żywotność i proliferację komórek serca oraz efektywność różnicowania i dojrzewania kardiomiocytów. Przeprowadzono wiele badań z wykorzystaniem mat nanowłóknistych, jednak wciąż brakuje danych, które potwierdzą jakie właściwości fizykochemiczne (jaki biomateriał, średnica,

elastyczność itp.) powinny mieć maty nanowłókniste, aby zapewnić odpowiednie mikrośrodowisko do prawidłowego funkcjonowania kardiomiocytów i komórek macierzystych. Dodatkowo, brakuje doniesień literaturowych, w których analizowano oddziaływanie mat nanowłóknistych na funkcjonowanie kardiomiocytów po niedotlenieniu i kardiomiocytów we współhodowli z komórkami macierzystymi. Badania tego typu są ważne i mogą wnieść istotną wiedzę w zakresie wykorzystania komórek macierzystych w regeneracji komórek serca.

II. Część eksperymentalna

1. Cel pracy

Choroby układu sercowo-naczyniowego pozostają główną przyczyną zgonów na świecie, dlatego niezbędne jest opracowanie modeli *in vitro* odzwierciedlających strukturę i funkcję ludzkiej tkanki serca. Inżynieria tkankowa z wykorzystaniem mat nanowłóknistych umożliwia badanie wpływu trójwymiarowej struktury na pracę komórek mięśnia sercowego i komórek macierzystych, co może przyczynić się do rozwoju modeli *in vitro*. Nadal jednak brakuje prac określających optymalne właściwości fizykochemiczne mat nanowłóknistych, które wspierałyby poprawne funkcjonowanie i regenerację kardiomiocytów, zwłaszcza po niedotlenieniu i w warunkach współhodowli z komórkami macierzystymi.

Celem rozprawy doktorskiej była ocena zastosowania różnych mat nanowłóknistych jako podłoża do hodowli i badania komórek serca. Zakres pracy obejmuje określenie wpływu właściwości fizykochemicznych mat nanowłóknistych na funkcjonowanie komórek serca oraz komórek macierzystych w warunkach fizjologicznych oraz patofizjologicznych. Za warunki patofizjologiczne przyjęto hodowlę komórek w obniżonym stężeniu tlenu (niedotlenienie). Ponadto, oceniona została możliwość wykorzystania komórek macierzystych w badaniach nad chorobami układu sercowo-naczyniowego.

Sformułowano hipotezę badawczą, według której zastosowanie mat nanowłóknistych o określonych właściwościach fizykochemicznych umożliwi opracowanie modelu komórkowego *in vitro* odwzorowującego mikrośrodowisko tkanki serca dokładniej niż standardowe hodowle dwuwymiarowe (2D). Modele te mogą posłużyć do badania niedotlenienia oraz wpływu komórek macierzystych na regenerację kardiomiocytów.

2. Materiały i metodyka badań

2.1. Materiały, odczynniki i aparatura badawcza

2.1.1. Odczynniki

- 3 % roztwór surowiczej albuminy wołowej (ang. *bovine serum albumin*, BSA) w DPBS (Thermo Fisher Scientific, B10710)
- 4 % roztwór paraformaldehydu (ang. *paraformaldehyde*, PFA) w PBS (Thermo Fisher Scientific, FB002)
- 7AAD 200x (ang. *7-aminoactinomycin D*, Abcam, Apoptosis/Necrosis Assay Kit, ab176749)

- Acetometoksy pochodna kalceiny (Kalceina-AM) 1mg/ml (Thermo Fisher Scientific, C3100MP)
- AlamarBlue® (Bio Rad, BUF012A)
- Alkohol etylowy 96 % cz.d.a. (POCH, 396420113)
- Barwnik fluorescencyjny - CellTracker™ Green CMFDA Dye (dioctan 5-chlorometylfluoresceiny) (Thermo Fisher Scientific, C2925)
- Bufor do testów (ang. *assay buffer*, Abcam, Apoptosis/Necrosis Assay Kit, ab176749)
- Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. *phosphate buffered saline*, PBS)
- Buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco 1x - (ang. *dulbecco's phosphate buffered saline*, DPBS), 1X (ATCC, 30-2200)
- CHIR99021 (Selleckchem, S1263-25 mg)
- Czynnik sieciujący (Sylgard 184, 24001673921)
- Dimetylosulfotlenek, DMSO (POCH, 363550117)
- Falloidyna sprzężona z barwnikiem Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, A12380)
- Fibronektyna (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, F1141)
- Fiolet cytokalceinowy 450 200x (Abcam, Apoptosis/Necrosis Assay Kit, ab176749)
- Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, H1399)
- Inhibitor IWP-2 (Tocris, 3533-10 mg)
- Izopropanol (POCH, 751500111)
- Jodek propidyny (PI) (Sigma Aldrich, P4864)
- Kozie przeciwciało anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A11008)
- Kozie przeciwciało anty-mysie IgG sprzężone z Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, A11005)
- Królicze monoklonalne rekombinowane przeciwciało skierowane przeciwko sercowej troponinie T (abcam, ab209813)
- Królicze poliklonalne przeciwciało skierowane przeciw Oct4 (Merck, POU5F1, MAB4419)
- Królicze poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko MYH6 (Proteintech, 22281-1-AP, określenie przez producenta na białko MHC- α)

- Kwas L-askorbinowy (Sigma-Aldrich, A7506)
- L-Glutamina 100X 200mM (Biowest, X0550)
- Matrigel (Corning, 354230)
- Maty nanowłókniste z poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL, Sigma Aldrich Mn=80 000) i poliuretanu (PU, ChronoFlex C75D, AdvanSource Biomaterials) uzyskane były w ramach współpracy z dr. inż. Michałem Wojasińskim oraz mgr inż. Iwoną Łopianiak z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej
- Medium Essential 8 (E8) do hodowli iPSC (Life Technology, A1517001)
- Medium Essential 8 Flex (E8 Flex) do hodowli iPSC (Life Technology, A2858501)
- MEM NEAA – minimalne podłoże podstawowe Eagle'a ang. *eagle's minimum essential medium non-essential amino acid* (Sigma-Aldrich, M7145-100ML)
- Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko HIF-1 α (Novus Biologicals, NB100-105)
- Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko MYH7 (Santa Cruz Biotechnology, 53090, określenie przez producenta na białko MHC- β)
- Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko α -aktynie (Sigma-Aldrich, A7732)
- Norepinefryna [($\pm$)-Arterenol] (Sigma-Aldrich, A0937)
- Penicylina-Streptomycyna roztwór 100X (Biowest, L0022)
- Płodowa surowica cielęca (ang. *fetal bovine serum*, FBS) (Biowest, S181B)
- Podstawowe medium do hodowli komórek Claycomb Medium (Sigma-Aldrich, 51800C)
- Podstawowe medium do hodowli komórek DMEM bez glukozy (Thermo Fisher Scientific, 11966025)
- Podstawowe medium do hodowli komórek DMEM z wysoką zawartością glukozy, ang. *dublecco essential medium eagle, high glucose* (Biowest, L0101)
- Podstawowe medium do hodowli komórek DMEM/F-12, ang. *dulbecco modified eagle medium: nutrient mixture F-12* (Thermo Fisher Scientific, 31330038)
- Podstawowe medium do hodowli komórek RPMI 1640 ze stabilną glutaminą (Biowest, L0498)
- Poli -L-lizyna 10 mg/ml (ScienCell, 0413)

- Poli(dimetylosiloksan), PDMS (Sylgard 184, 2401673921)
- ROCK inhibitor (Tocris, 1254)
- Roztwór buforujący do płukania Wash Buffer (Thermo Fisher Scientific, A1285801)
- Roztwór Versene 0,48 mM (Thermo Fisher Scientific, 15040066)
- Sól sodowa fluoresceiny (Sigma Aldrich, F6377)
- Startery dla wybranych genów (Sigma Aldrich) (Tabela 3)
- Suplement B-27 bez insuliny (Thermo Fisher Scientific, A1895601)
- Suplement B-27 z insuliną (Thermo Fisher Scientific, 17504044)
- Suplement GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, 35050061)
- Suplement wzrostu ludzkich kardiomiocytów (ang. *cardiac myocyte growth supplement*, CMGS) (ScienCell, 6252)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787)
- TrypLe Express 10X bez czerwieni fenolowej (Thermo Fisher Scientific, A1217701)
- Trypsyna 0,25% - EDTA w HBSS (Biowest, L0931)
- Zestaw H Minus First Strand cDNA (RevertAid™, K1632)
- Zestaw RNase-Free DNase (QIAGEN, 79256)
- Zestaw RNeasy Mini (QIAGEN, 74106)
- Zestaw SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725270)
- Zielony wskaźnik Apopxin 100x (Abcam, Apoptosis/Necrosis Assay Kit, ab176749)
- Żelatyna ze skóry cielęcej (Sigma-Aldrich, G9391)
- Żywica do drukarki 3D μ MICROFLUIDICS RESINS (CADworks3D)

2.1.2. Materiał biologiczny

Linia komórkowa H9c2 - szczurze kardiomioblasty (ATCC, CRL-1446). Komórki wyizolowane z komory serca embrionów, które nie wykazują spontanicznego kurczenia i rozkurczania się.

Linia komórkowa HL-1 - unieśmiertelnione mysie kardiomiocyty (Sigma-Aldrich, SCC05). Komórki wyizolowane z przedsionka serca dorosłej myszy. Komórki wykazują spontaniczne kurczenie się i rozkurczanie.

Linia komórkowa HCM - pierwotne ludzkie kardiomiocyty (ScienceCell, #6200). Komórki wyizolowane z komory serca dorosłego człowieka. HCM przypominają komórki progenitorowe i nie są w pełni dojrzałe. Niekurczące, ale po stymulacji elektrycznej wykazują możliwość spontanicznego kurczenia. Do badań wykorzystywano komórki do 6 pasażu. Zbadano, że dla wyższych pasażu obserwowany był spadek ekspresji genów specyficznych dla kardiomiocytów [118].

Linia komórkowa iPSC - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste. Linia ludzkich komórek IIMCBi001-A, uzyskana z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Linię wyprowadzono z fibroblastów skóry pobranych od zdrowej, 10-letniej dziewczynki rasy kaukaskiej. Pobrane fibroblasty poddano reprogramowaniu przy użyciu czynników Yamanakiego (OCT4, SOX2, KLF4 i c-Myc) oraz wektorów lentiwirusowych, uzyskując komórki iPSC [119].

Komórki iPSC-CM - ludzkie kardiomiocyty uzyskane w wyniku różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych z wykorzystaniem protokołu GiWi opracowanego przez *Lian i współ.* [53]. Komórki iPSC-CM fizjologicznie i morfologicznie są zbliżone do niedojrzałych kardiomiocytów. Charakteryzują się możliwością spontanicznego kurczenia się i rozkurczania, są komórkami nie proliferującymi.

2.1.3. Materiały i drobny sprzęt laboratoryjny

- Butelki do hodowli komórkowych 25 cm² (Thermo Fisher Scientific, 156367)
- Folia do sklejanie płytek (Bio-Rad, MSB1001)
- Kolumny RNeasy z zestawu RNeasy Mini 250 (QIAGEN, 74106)
- Końcówki do pipet (Gilson)
- Licznik komórek Fast-Read® 102 (Biosigma)
- Pipety automatyczne (Gilson)
- Pipety elektroniczne (Mettler-Toledo, Rainin, model: E4XLS)
- Pipety Pasteura (Wuxi NEST Biotechnology)
- Pipety serologiczne (Wuxi NEST Biotechnology)
- Płytki 24-dołkowe do hodowli komórkowych (SARSTEDT, 83.3922)
- Płytki 6-dołkowe do hodowli komórkowych (SARSTEDT, 83.3920)
- Płytki 96-dołkowe do PCR Hard-Shell® (Bio-Rad HSP9601)
- Płytki do liczenia komórek Fast-Read® 102 (Biosigma)

- Probówki typu ependorf (Nest)
- Probówki typu Falcon 15 ml (Genoplast Biochemicals)
- Probówki typu Falcon 50 ml (Wuxi NEST Biotechnology)
- Szalki ze szklanym dnem CELLview™ (Greiner Bio-One, 627870)
- Szalki ze szklanym dnem CELLview™ (Greiner Bio-One, 627870)
- Szkiełka mikroskopowe (ChemLand, 296.202.01)
- Szkiełka nakrywkowe (Carl Roth, L26.1)

2.1.4. Aparatura badawcza

- Aparatura do naświetlania UV CureZone (CADworks3D)
- Cytometr przepływowy (FACSCalibur, BD Biosciences)
- Drukarka 3D (CADworks3D)
- Generator plazmy tlenowej (Diener)
- Inkubator CO₂ MCO-170AICD-PE (PHCBI)
- Inkubator Heracell™ 150 (Thermo Fisher Scientific)
- Komora laminarna BioOptima Class II (Telstar)
- Łaźnia wodna (WSL)
- Mikroskop fluorescencyjny odwrócony (Olympus, IX71)
- Mikroskop fluorescencyjny odwrócony Eclipse Ts2-FL (Nikon)
- Mikroskop konfokalny LEXT OLS4000 (Olympus)
- Mikroskop konfokalny Zeiss Axio Observer 7+LSM 900
- Mikroskop świetlny EVOS™ XL Core (Invitrogen™)
- Mikrowirówka Centrifuge 5418 R (Eppendorf)
- Ploter laserowy (Universal VLS2.30DT)
- Skaningowy mikroskop elektronowy (ang. *scanning electron microscope*, SEM, SU 8230, Hitachi High-Technologies Corporation)
- Spektrofotometr NanoPhotometer™ N50-Touch (Implen)
- Sterylizator laboratoryjny SRW 115 STD (POL-EKO-APARATURA)
- Suszarka laboratoryjna (Binder)
- Termocykler do Real-Time PCR CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)
- Termocykler XT96 do syntezy cDNA (VWR)
- Turbomolekularny system natryskiwania powłok (Quorum Q150 TS, Quorum Technologies)

- Wielodetekcyjny czytnik płytek SpectraMax iD3 (Syngen)
- Wielokanałowa pompa perystaltyczna (IsmatecTM REGLO ICC)
- Wirówka (Centurion Scientific)

2.2. Metodyka badań

2.2.1. Wytwarzanie nanowłókien

Do wytworzenia nanowłókien z polikaprolaktonu (PCL, Sigma Aldrich Mn=80 000) i poliuretanu (PU, ChronoFlex C75D, AdvanSource Biomaterials) wykorzystano metodę rozdmuchu polimeru (SBS). W tym celu, PCL o stężeniu 8 % i 10 % rozpuszczono w 2-2-2-trifluoroetanolu (>99 %, ABCR) (m/m). Z kolei roztwory PU o stężeniu 5 % i 5,5 % przygotowano w 1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropanolu (>99 %, ABCR) (m/m). Przygotowane roztwory polimerów mieszano przez noc w temperaturze pokojowej, aby zapewnić odpowiednią relaksację łańcucha polimerowego, co umożliwiło efektywne przędzenie jednolitych włókien. Następnie, do produkcji nanowłókien zastosowano następujące parametry: odległość robocza między dyszą a kolektorem: 30 cm, natężenie przepływu roztworu polimeru: 30 ml/h, ciśnienie sprężonego gazu: 1 bar oraz prędkość obrotowa cylindrycznego kolektora: 15 000 obr/min. Zastosowana prędkość obrotowa kolektora pozwoliła na uzyskanie włókien o równoległym ułożeniu (włókna ukierunkowane). Średnice i ułożenie nanowłókien oceniono na podstawie zdjęć ze skaningowego mikroskopu elektronowego przy użyciu programu ImageJ. W celu określenia porowatości, maty nanowłókniste zostały pocięte na prostokątne próbki. Powierzchnię i grubość każdej próbki zmierzono za pomocą oprogramowania do analizy obrazu NIS Elements (Nikon). Dokładna procedura została opisana w literaturze [106]. Zbadano wytrzymałość na rozciąganie mat nanowłóknistych przy pomocy uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej (Instron 3345, Instron). Z każdego rodzaju maty nanowłóknistej pobrano 5 próbek o szerokości 5 mm i długości 20 mm. Następnie próbki były rozciągane z prędkością 5 mm/min. Wytrzymałość mechaniczną materiałów nanowłóknistych mierzono w dwóch kierunkach - równoległym (ang. *parallel*, PL) i prostopadłym (ang. *perpendicular*, PP) do ułożenia włókien. Maty nanowłókniste i charakterystyka zostały wykonane na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej w ramach współpracy z dr. inż. Michałem Wojasińskim oraz mgr inż. Iwoną Łopianiak.

2.2.2. Hodowla komórkowa

W badaniach wykorzystywano pięć typów komórek. Wszystkie hodowle komórkowe prowadzono w inkubatorach (temp. 37 °C, 5 % CO₂). Poniżej przedstawiono skład medium hodowlanych dla poszczególnych linii komórkowych.

2.2.2.1. Hodowla komórek H9c2

Komórki H9c2 hodowano w pożywce DMEM z wysoką zawartością glukozy (ang. *dulbecco's modified eagle medium high glucose*) wzbogacone o 10 % (v/v) termicznie inaktywowany FBS, 1 % (v/v) 100 mM penicyliny-streptomycyny i 1 % (v/v) 200 mM L-glutaminy.

2.2.2.2. Hodowla komórek HCM

Komórki HCM hodowano w pożywce DMEM/F12 (ang. *dulbecco modified eagle medium: nutrient mixture F-12*) wzbogaconą 10 % (v/v) termicznie inaktywowany FBS, 1 % (v/v) 100 mM penicyliny-streptomycyny, 1% (v/v) 200 mM L-glutaminy, 1 % (v/v) 100 mM pirogronianu sodu, 1 % (v/v) suplementu wzrostu miocytów serca (CMGS) i 0,01 % (v/v) MEM NEAA.

Komórki HCM wykorzystano również do badań niedotlenienia (hipoksji). Pożywka stosowana podczas hipoksji składała się z DMEM bez glukozy i 1 % (v/v) 100 mM penicyliny-streptomycyny. Jej skład został dobrany na podstawie literatury [21].

2.2.2.3. Hodowla komórek HL-1

Komórki HL-1 hodowano w pożywce Claycomb Medium wzbogacone o 10 % (v/v) termicznie inaktywowany FBS, 1 % (v/v) 100 mM penicyliny-streptomycyny, 1 % (v/v) 200 mM L-glutaminy i 1 % (v/v) 10 mM norepinefryny.

Wykorzystywane w badaniach powyższe linie komórkowe hodowano w standardowych butelkach do hodowli komórek adherentnych (25 cm²). Świeże medium hodowlane wymieniano co drugi dzień dla hodowli komórek H9c2 i HCM oraz codziennie dla hodowli komórek HL-1. W momencie osiągnięcia przez komórki 80-90 % konfluencji, przeprowadzano pasaż komórek. W tym celu, komórki przemyto 1 ml PBS i trypsynizowano 0,25 % trypsyną (1,5 ml). Następnie, po odklejeniu komórek w celu zneutralizowania trypsyny dodano medium hodowlane (1,5 ml), komórki zwirowano (1200 RPM, 5 min). Supernatant usunięto, a osad komórkowy ponownie zawieszono w ok. 5 ml medium i przeniesiono do nowych butelek hodowlanych. Przed wysianiem komórek HCM oraz HL-1, butelkę hodowlaną modyfikowano poprzez 24 h inkubację z odpowiednimi białkami. W przypadku komórek HCM powierzchnie

hodowlaną butelki pokrywano roztworem 0,01 % poly-L-lizyny, w przypadku komórek HL-1 butelki pokrywano roztworem 5 µg / ml fibronektyny w 0,2 mg / ml żelatynie.

2.2.2.4. Hodowla komórek iPSC

Komórki iPSC hodowano w medium hodowlanym Essential 8™ (E8) na 6-dołkowej płytce polistyrenowej, której powierzchnię wcześniej zmodyfikowano 100x rozcieńczonym Matrigel'em w DMEM/F12. Medium zmieniano codziennie (1,5 ml/dołek). Po uzyskaniu około 90 % konfluencji, komórki iPSC przemyto DPBS (1 ml/dołek). Następnie, w celu odklejenia komórek dodano Versen (1 ml/dołek) i inkubowano przez ok. 5 min w inkubatorze (37 °C, 5 % CO₂). Następnie, do komórek dodano medium hodowlane E8, otrzymując zawiesinę komórkową, którą zwirowano (1200 RPM, 5 min). Zawiesinę komórkową uzyskaną z 1 dołka wysiano na 6-dołkową płytkę w medium E8 (2 ml/dołek) wzbogaconym o 5 µM ROCK inhibitor (1 µl/ml medium).

2.2.2.5. Różnicowanie komórek iPSC w iPSC-CM

Różnicowanie ludzkich iPSC w iPSC-CM przeprowadzono zgodnie z protokołem GiWi opisanym przez *Lian i wsp.* [53]. Proces ten opiera się na modulacji szlaku kanonicznego Wnt za pomocą inhibitora GSK3 z wykorzystaniem CHIR99021 i inhibitora Wnt z użyciem IWP-2. W tym celu, komórki iPSC hodowano w medium hodowlanym E8, aż osiągnęły 90 % konfluencji. Następnie, usunięto starą pożywkę z nad komórek i dodano po 2 ml/dołek medium RPMI 1640 ze stabilną glutaminą wzbogacone o 1 % (v/v) 100 mM penicyliny-streptomycyny, 2 % (v/v) suplementu B-27 bez insuliny (dalej nazywane RPMI/B-27 bez insuliny) i uzupełniono o 12 µM (stężenie końcowe) CHIR99021. Po 24 h medium hodowlane zmieniono na medium RPMI/B-27 bez insuliny. W 3 dniu różnicowania (72 h po dodaniu 12 µM CHIR99021) połowę objętości medium usunięto z dołka hodowlanego i do pozostawionej części dodano świeżego medium RPMI/B-27 bez insuliny z dodatkiem IWP-2 o stężeniu końcowym 5 µM. Piątego dnia różnicowania medium hodowlane wymieniono na RPMI/B-27 bez insuliny. Po kolejnych 2 dniach hodowli, medium hodowlane zmieniono na RPMI 1640 ze stabilną glutaminą wzbogacone o 1 % (v/v) 100 mM penicyliny-streptomycyny, 2 % (v/v) suplementu B-27 z insuliną (dalej nazywane RPMI/B-27 z insuliną) i zmieniano medium co 3 dni. Zgodnie z protokołem GiWi, możliwe jest uzyskanie komórek, które charakteryzują się spontanicznym kurczeniem i rozkurczaniem po około 14 dniach od rozpoczęcia różnicowania.

Tak uzyskane komórki nie poddawano pasażowaniu. Wykorzystywano je bezpośrednio do zaplanowanych eksperymentów.

W celu wysiania komórek iPSC-CM, przemyto je DPBS (1 ml/dołek) i odklejono od podłoża hodowlanego za pomocą TrypLE (1 ml/dołek). W celu zneutralizowania TrypLE dodano 1 ml pożywki na dołek. Komórki zawieszono w pożywce RPMI 1640 ze stabilną glutaminą, z 20 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) 100 mM penicyliny-streptomycyny (dalej nazywana medium RPMI/20 % FBS). Następnie, komórki zwirowano (1200 RPM, 5 min) i ponownie zawieszono w medium RPMI/20 % FBS z dodatkiem 5 μ M inhibitora ROCK (1 μ l/ml pożywki). Po 48 h pożywkę zastąpiono RPMI/B-27 z insuliną i wymieniano co 2 dni.

Komórki iPSC-CM zostały wykorzystane do badania niedotlenienia. Medium hodowlane stosowane w badaniu hipoksji składało się z DMEM bez surowicy i glukozy, zawierającą 1 % (v/v) MEM NEAA, 1 % (v/v) GlutaMAX i 1 % (v/v) 100 mM penicyliny/streptomycyny. Jej skład został dobrany na podstawie literatury [120].

2.2.3. Hodowla komórek na matach nanowłóknistych

Wszystkie eksperymenty z wykorzystaniem mat nanowłóknistych prowadzone były na płytkach 24-dołkowych. W celu umieszczenia mat w dołkach płytki, za pomocą plotera laserowego Universal VLS2.30DT (moc 17 %, prędkość 13 %, 800 PPI) wycięto maty nanowłókniste o średnicy 9 mm. W celu stabilnego utrzymania mat nanowłóknistych na dnie dołków hodowlanych dodatkowo wykorzystano krążki z poliwęglanu (ang. *polycarbonate*, PC). Wielkość krążków została dostosowana do rozmiaru dołka hodowlanego. Krążki zostały wykonane metodą mikrofrezowania we współpracy z mgr inż. Dominikiem Kołodziejkiem (Wydział Chemiczny PW). Odpowiednio umieszczone w dołkach hodowlanych maty nanowłókniste sterylizowano 70 % roztworem etanolu przez 30 min i suszono w temp. 40 °C. W celu poprawy właściwości hydrofilowych mat nanowłóknistych ich powierzchnia została zmodyfikowana plazmą tlenową (0,3 mbar, 90 s). Dodatkowo, w celu zwiększenia adhezji komórek, maty nanowłókniste pokryto roztworami białek (400 μ l) i inkubowano przez 24 h. W przypadku hodowli komórek H9c2 i HCM zastosowano 0,01 % roztwór poli-L-lizyny, dla hodowli komórek HL-1 zastosowano 5 μ g/ml roztworu fibronektyny w roztworze żelatyny o stężeniu 0,2 mg/ml, a dla hodowli komórek iPSC-CM, wykorzystano 0,1 % roztworu żelatyny. W przypadku współhodowli komórek iPSC-CM z iPSC maty nanowłókniste i płytki polistyrenowe (kontrola) pokrywano 100-krotnie rozcieńczonym Matrigel'em w DMEM/F12 (takie stężenie stosowane jest do hodowli iPSC i jest zalecane przez producenta Matrigel'u).

Po 24 h roztwory białek usuwano i wysiewano komórki o gęstości: $3,3 \times 10^4$ komórek/cm² (dla H9c2) oraz - $6,6 \times 10^4$ komórek/cm² (dla HCM i HL-1). Komórki iPSC-CM w pierwszym etapie badań wysiewane były z gęstością $1,5 \times 10^5$, 2×10^5 , $2,5 \times 10^5$ i 3×10^5 komórek/cm². Do dalszych etapów badań stosowano gęstość 2×10^5 komórek/cm². W trakcie prowadzenia hodowli na matach nanowłóknistych, medium hodowlane wymieniano co drugi dzień w przypadku hodowli komórek H9c2, HCM i iPSC-CM oraz codziennie w przypadku komórek HL-1. Hodowla komórek na płytce polistyrenowej została wykorzystana jako kontrola.

2.2.4. Badanie niedotlenienia i reoksygenacji w hodowli ludzkich kardiomiocytów

W badaniu niedotlenienia zastosowano ludzkie kardiomiocyty – HCM oraz iPSC-CM. Hodowle komórkowe prowadzono w 24-dołkowej płytce, z wykorzystaniem mat nanowłóknistych wykonanych z PCL i PU. Przed rozpoczęciem eksperymentów z komórkami, w celu usunięcia tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym, media do hipoksji dla obu typów komórek były przetrzymywane w inkubatorze bez tlenu przez 24 h. Następnie, dodawano 500 µl medium do hipoksji do każdego dołka hodowlanego i prowadzono niedotlenienie przez 6 h w inkubatorze do hipoksji wyposażonego w czujnik poziomu tlenu. Poziom O₂ wynosił 1 %. W celu przeprowadzenia reoksygenacji, komórkom HCM i iPSC-CM poddanym niedotlenieniu przez 6 h zmieniono medium hodowlane na medium dedykowane do hodowli w warunkach normoksji (500 µl) i inkubowano przez 24 h (21 % O₂, 5 % CO₂ i 37 °C). Jako kontrola wykorzystano hodowlę komórek na płytce polistyrenowej w standardowym medium hodowlanym wykorzystywanym w warunkach normoksji (21 % O₂, 5 % CO₂ i 37 °C).

2.2.5. Współhodowla komórek macierzystych z ludzkimi kardiomiocytami

Przeprowadzono współhodowlę kardiomiocytów z komórkami macierzystymi: komórek HCM i iPSC oraz komórek iPSC-CM i iPSC. W celu przygotowania hodowli komórkowych, sporządzono zawiesiny komórek HCM, iPSC-CM oraz iPSC o gęstości 1×10^5 komórek/cm² każda, zgodnie z procedurami przedstawionymi kolejno w podrozdziałach 2.2.2.3, 2.2.2.5 oraz 2.2.2.4. Komórki (HCM i iPSC lub iPSC-CM i iPSC) wysiano na 24 - dołkową płytkę i hodowano przez 72 h. Następnie, prowadzono hodowlę komórek w medium hodowlanym do HCM, iPSC-CM lub iPSC i analizowano morfologię komórek, aby dobrać optymalne warunki do współhodowli komórek.

2.2.6. Hodowla komórek iPSC-CM po niedotlenieniu z iPSC

Do dalszych badań niedotlenienia zastosowano wyłącznie współhodowlę komórek iPSC-CM oraz iPSC. W pierwszym etapie przygotowano hodowlę komórek iPSC-CM na płytkach polistyrenowych oraz matach nanowłóknistych wykonanych z poliuretanu. Komórki iPSC-CM poddano niedotlenieniu zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 2.2.4. Następnie, usunięto medium do hipoksji i dodano zawiesinę komórek iPSC o gęstości 1×10^5 komórek/cm². Komórki iPSC były zawieszone w medium RPMI/B-27 bez insuliny. Po 24 h od przyklejenia komórek iPSC do podłoża hodowlanego zmieniono medium hodowlane na RPMI/B27 z dodatkiem insuliny. Medium hodowlane dla współhodowli dobrano na podstawie literatury [121]. Współhodowlę komórek iPSC-CM po niedotlenieniu z iPSC prowadzono przez 24 h i 10 dni.

2.2.7. Ocena żywotności komórek (test Alamar Blue)

Wykonanie testów z AlamarBlue zostało zastosowane do oceny żywotności komórek hodowanych na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU. Stosowany w testach barwnik AlamarBlue jest nietoksyczny dla komórek. Przygotowano roztwór AlamarBlue o stężeniu 10 % (obj.) w medium hodowlanym bez FBS stosowanym do hodowli komórek H9c2, HCM lub HL-1. Następnie, roztwór ten dodano do hodowli komórkowych prowadzonych na płytce PS oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU i inkubowano przez 3 h w temp. 37 °C. Intensywność fluorescencji mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek przy długości fali wzbudzenia 552 nm i długości fali emisji 582 nm. Test AlamarBlue przeprowadzono po 24 h i 10 dniach hodowli komórek H9c2, HL-1 i HCM.

2.2.8. Ocena ułożenia i morfologii komórek

Do oceny ułożenia i morfologii komórek H9c2, HCM, HL-1 i iPSC-CM hodowanych na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PCL i PU, przeprowadzono barwienie komórek z wykorzystaniem kalceiny-AM (CAM). Kalceina-AM jest niefluorescencyjnym barwnikiem, który może biernie przenikać przez błonę komórkową żywych komórek. Kalceina-AM w żywych komórkach jest przekształcana przez esterazy w kalceinę, która emituje zielone promieniowanie fluorescencyjne przy długości fali 470-510 nm. Badania z wykorzystaniem CAM były wykonane po 24 h i 10 dniach prowadzenia hodowli. Barwnik kalceina-AM (1 mg/ml w bezwodnym DMSO) rozcieńczono do 0,5 µg/ml w medium do hodowli komórek H9c2, HCM, HL-1 lub iPSC-CM (bez dodatku FBS). Następnie, usunięto medium znad hodowli komórek H9c2, HCM, HL-1 lub iPSC-CM i dodano roztwór CAM (po 500 µl/dołek) i inkubowano przez 30 min. Po tym czasie, przeprowadzono

obserwacje mikroskopowe wybarwionych komórek z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego i na podstawie uzyskanych obrazów przeprowadzono analizę morfologii i ułożenia komórek przy użyciu programu ImageJ.

Dodatkowo, barwnik kalceina-AM wraz z jodkiem propidyny (PI) został wykorzystany do obrazowania żywotności w badaniu współhodowli komórek HCM z iPSC lub iPSC-CM z iPSC na 24-dołkowych płytkach po 72 h hodowli. PI wiąże się z DNA martwych lub uszkodzonych komórek (w przypadku żywych komórek barwnik nie przenika przez błonę komórkową). Intensywność fluorescencji jodku propidyny mierzono przy długości fali wzbudzenia 535 nm i długość fali emisji 617 nm.

Przygotowano roztwór 2 μ l/ml jodku propidyny oraz 0,5 μ g/ml kalceiny-AM (rozcieńczono do stężenia w DMEM/F12 lub E8 dla współhodowli komórek HCM z iPSC oraz w medium RPMI/B27 bez insuliny lub E8 dla współhodowli komórek iPSC-CM z iPSC). Następnie, usunięto medium hodowlane znad komórek i dodano roztwory CAM i PI. Po 30 min inkubacji, komórki obserwowano z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego.

2.2.9. Analiza komórkowa z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej

Do oceny morfologii i ułożenia komórek HCM i iPSC-CM po 10 dniach hodowli na szkiełkach nakrywkowych (kontrola) i na matach nanowłóknistych z PCL i PU w 24-dołkowej płytce, przeprowadzono obrazowanie z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego. W tym celu, komórki iPSC-CM przepłukano trzykrotnie roztworem DPBS, a HCM roztworem PBS. Komórki utrwalano w 4 % paraformaldehydzie przez 30 min, przepłukano ponownie roztworem buforowanej soli fizjologicznej i przechowywano w temp. 4 °C przez 24 h. Następnego dnia, odwodniono komórki inkubując je przez 15 min przy użyciu roztworów etanolu o wzrastającym stężeniu (5 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %). Tak przygotowane komórki pokryto 20 nm warstwą złota i palladu i obserwowano za pomocą mikroskopu SEM.

2.2.10. Barwienie immunofluorescencyjne

Barwienia immunofluorescencyjne zostały przeprowadzone w celu wyznakowania białek specyficznych dla kardiomiocytów takich jak: α -aktynina, troponina T, MYH6 i MYH7. Analizę wykonano dla 10-dniowej hodowli komórek H9c2, HCM, HL-1 i iPSC-CM prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL i PU. Z kolei w badaniach nad hipoksją i

hipoksją z reoksygenacją (H/R) wykonano immunobarwienie białek HIF-1 α oraz F-aktyny. Dodatkowo, we współhodowli komórek iPSC-CM po hipoksji z iPSC hodowanych na matach nanowłóknistych z PU po 24 h i 10 dniach oznaczano OCT4, białko specyficzne dla pluripotencjalnych komórek macierzystych, oraz troponinę T, białko specyficzne dla kardiomiocytów. We wszystkich testach, kontrolę stanowiły hodowle prowadzone w 4-dzielnym szalkach ze szklanym dnem. Z kolei hodowle komórek na matach nanowłóknistych prowadzone były w 24-dołkowych płytkach, a następnie w celu obserwacji mikroskopowej, maty umieszczano na szkiełkach nakrywkowych.

Procedura barwienia immunofluorescencyjnego wyglądała następująco, znad hodowli komórkowych usunięto medium hodowlane, następnie przepłukano je przy użyciu Wash Buffer i utrwalano w 4 % paraformaldehydzie przez 10 min w temperaturze pokojowej (RT). W celu permabilizacji błon komórkowych dodano do komórek 250 μ l 0,5 % Triton X-100 w PBS. W celu zmniejszenia niespecyficznego wiązania hydrofobowego użyto 250 μ l 2,4 % roztworu albuminy surowicy bydlęcej (BSA w PBS) (surowica blokująca) (50 min, RT), następnie komórki ponownie przemyto 0,1 % roztworem Tritonu X-100. Po usunięciu Tritonu, do komórek dodano po 200 μ l roztworów z I-rzędowymi przeciwciałami i inkubowano je w temp. 4 °C przez noc. Stosowano w zależności od eksperymentu: królicze monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko sercowej troponinie T (1:100 w 2,4 % BSA), mysie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko α -aktynie (1:100 w 2,4 % BSA), mysie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko OCT4 (1:100 w 2,4 % BSA), mysie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko HIF-1 α (1:100 w 2,4 % BSA), królicze poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko MYH6 (1:100 w 2,4 % BSA) lub mysie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko MYH7 (1:100 w 2,4 % BSA). Następnie, komórki płukano 0,1 % roztworem Tritonu X-100 i inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi: kozim przeciwciałem anti-króliczym sprzężonym z Alexa Fluor 488 (1:200 w 2,4 % BSA) i kozim przeciwciałem anti-mysim sprzężonym z Alexa Fluor 594 (1:200 w 2,4 % BSA) lub z falloidyną sprzężoną z barwnikiem Alexa Fluor 568 (1:400 w 2,4 % BSA) przez 1 h. Następnie, dodano 250 μ l Hoechst 33342 (10 μ g/ml w PBS). Po 5 min komórki przepłukano 0,1 % Tritonem X-100. Wybarwione komórki obserwowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego.

2.2.11. Cytometria przepływowa

Analizę cytometrii przepływowej przeprowadzono w celu oszacowania skuteczności różnicowania komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów, zgodnie z dobrze opisanym protokołem [53]. W tym celu, zróżnicowane komórki iPSC-CM z 6-dołkowej płytki zostały odklejone i zwirowane (1200 RPM, 5 min). Następnie, do komórek dodano 1 ml 1 % paraformaldehydu w PBS, inkubowano 20 min w temp. pokojowej i ponownie zwirowano. Osad komórkowy zawieszono w 90 % zimnym metanolu i inkubowano w temp 4 °C przez 15 min. Następnie, komórki iPSC-CM zwirowano i zawieszono w 2 ml 0,5 % BSA. Komórki ponownie zwirowano i wyznakowano po 100 µl I-rzędowym przeciwciałami anti-troponina T (1:100 w 5 % BSA) i mysimi przeciwciałami monoklonalnymi anti- α -aktynina (1:100 5 % BSA) przez 1 h w temp. pokojowej, a także po 100 µl odpowiednimi przeciwciałami II-rzędowymi oślim przeciwciałem anti-mysim sprzężonym z Alexa Fluor 488 (1:200 w 5 % BSA) i kozim przeciwciałem anti-króliczym sprzężonym z Alexa Fluor 488 (1:200 w 5 % BSA). Komórki przepłukano trzykrotnie buforem FACS (bufor stosowany do cytometrii przepływowej, ang. *fluorescent activated cell sorting buffer*), ponownie zawieszono w 0,5 ml PBS, a następnie analizowano z zastosowaniem cytometru przepływowego. Dane analizowano przy użyciu oprogramowania FlowJo (Tree Star, Ashland, USA).

2.2.12. Analiza RT-PCR

Badania z wykorzystaniem RT-PCR zostały wykorzystane do analizy ekspresji genów uczestniczących w dojrzewaniu kardiomiocytów w hodowli komórek H9c2, HCM, HL-1 i iPSC-CM prowadzonej na płytce polistyrenowej i matach nanowłóknistych po 10 dniach hodowli. Analizę tę prowadzono również w przypadku badań nad hipoksją i H/R w hodowli komórek ludzkich HCM i iPSC-CM na matach nanowłóknistych z PCL i PU, a także dla badań nad współhodowlą komórek iPSC-CM poddanej hipoksji z komórkami iPSC hodowanymi na matach nanowłóknistych z PU po 24 h i 10 dniach. RNA wyizolowano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit na podstawie protokołu dostarczonego przez producenta. Następnie, wyizolowany materiał biologiczny poddano reakcji odwrotnej transkrypcji do cDNA w temp. 42 °C przez 1 h przy użyciu zestawu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Następnie, w temperaturze 72 °C przez 10 min dezaktywowano enzymy stosowane w odwrotnej transkrypcji. RT-PCR przeprowadzono przy użyciu SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix na CFX Connect Real-Time PCR System przy użyciu *GAPDH* jako genu referencyjnego. Do badań wybrano określone geny (Tabela 3). Analizę względnych

poziomów ekspresji każdego genu przeprowadzono w trzech powtórzeniach, znormalizowano do ekspresji genu referencyjnego i obliczono przy użyciu metody $\Delta\Delta CT$.

Tabela 3 Sekwencje wykorzystanych starterów.

Gen	Starter przedni	Starter wsteczny
Szczur, <i>TNNT2</i>	<i>GCGGAAGAGTGGGAAGAGACA</i>	<i>CCATAGCTCCTTGGCCTTCT</i>
Szczur, <i>TNNI3</i>	<i>CCTCATTCCAGCCGTGGTC</i>	<i>CTCTGACTTGCGGAGGTATGG</i>
Szczur, <i>SERCA2</i>	<i>GCGTGTCATGTGCGTTGTTA</i>	<i>GCTGGGGGCTGTTCTATTCT</i>
Szczur, <i>GAPDH</i>	<i>GACATGCCGCCTGGAGAAAC</i>	<i>AGCCCAGGATGCCCTTTAGT</i>
Mysz, <i>TNNT2</i>	<i>GCTACAGACTCTGATCGAGGCT</i>	<i>GCTCATTGCGAATACGCTGCTG</i>
Mysz, <i>TNNI3</i>	<i>CTCTGCCAACTACCGAGCCTAT</i>	<i>CGTTCCATCTCCTGCTTCGCAA</i>
Mysz, <i>ACTN2</i>	<i>CACCTGGAGTTTGCCAAGAGAG</i>	<i>GCCTTGAACTGCTCATGTGCAG</i>
Mysz, <i>MYL2</i>	<i>GCAAAGGGTCACTGAAGGCTGA</i>	<i>AAAGGCTGCGAACATCTGGTTCG</i>
Mysz, <i>SCN5A</i>	<i>ACCCTCGGAGTAACTGTCCT</i>	<i>GACCACATCCTCTGAAGCCG</i>
Mysz, <i>SERCA2</i>	<i>GTGAAGTGCCATCAGTATGACGG</i>	<i>GTGAGAGCAGTCTCGGTAGCTT</i>
Mysz, <i>GAPDH</i>	<i>CATCACTGCCACCCAGAAGACTG</i>	<i>ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG</i>
Człowiek, <i>HIF-1α</i>	<i>TATGAGCCAGAAGAAGCTTTTAGGC</i>	<i>CACCTCTTTTGGCAAGCATCCTG</i>
Człowiek, <i>MAP4K</i>	<i>CCAATGGCAACTCCGAGTCTGT</i>	<i>GGGTCACTGAAGGAATGGGATC</i>
Człowiek, <i>TNNT2</i>	<i>AAGAGGCAGACTGAGCGGGAAA</i>	<i>AGATGCTCTGCCACAGCTCCTT</i>
Człowiek, <i>SCN5A</i>	<i>AGGTCGGAAACCTGGTAAGG</i>	<i>TCCTTACCCATGAAGGCTGTG</i>
Człowiek, <i>SERCA2</i>	<i>GGACTTTGAAGGCGTGGAATTGTG</i>	<i>CTCAGCAAGGACTGGTTTTTCGG</i>
Człowiek, <i>GATA-4</i>	<i>GCGGTGCTTCCAGCAACTCCA</i>	<i>GACATCGCACTGACTGAGAACG</i>
Człowiek, <i>ACTN2</i>	<i>GTGAACACCCCTAAACCCGA</i>	<i>AGGGGGATCCTTCCACAGAG</i>
Człowiek, <i>MYL2</i>	<i>CGGAGAGGTTTTCCAAGGAGGA</i>	<i>CTCTTCTCCGTGGGTGATGATG</i>
Człowiek, <i>TNNI3</i>	<i>CGTGTGGACAAGGTGGATGAAG</i>	<i>GCCGCTTAACTTGCCCTCGAAG</i>
Człowiek, <i>Nanog</i>	<i>CCAACATCCTGAACCTCAGC</i>	<i>TGCGTCACACCATTGCTATT</i>
Człowiek, <i>GAPDH</i>	<i>GTGGACCTGACCTGCCGTCT</i>	<i>GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT</i>

2.2.13. Barwienie komórek barwnikiem CellTracker

W celu wyznakowania komórek iPSC we współhodowli z komórkami iPSC-CM i potwierdzenia ich obecności w hodowli zastosowano barwnik CellTracker™ Green CMFDA Dye (dioctan 5-chlorometylofluoresceiny). Jest to fluorescencyjny barwnik wykorzystywany, w celu monitorowania i obrazowania komórek. W pierwszym etapie, komórki iPSC-CM wysiano na 24-dołkową płytkę polistyrenową z gęstością 1×10^5 komórek/cm² (zgodnie z podrozdziałem 2.2.2.5) po 500 μ l/dołek i inkubowano je w 37 °C, 5 % CO₂ przez 48 h. Następnie, z roztworu wyjściowego CellTracker™ Green CMFDA Dye o stężeniu 10 mM (w DMSO) przygotowano roztwór o stężeniu 10 μ M. W celu wybarwienia komórek odklejono komórki iPSC (jak opisano w podrozdziale 2.2.2.4.) i zawieszono je w medium hodowlanym RPMI/B-27 bez insuliny, komórki zwirowano (1200 RPM, 5 min). Komórki iPSC ponownie zawieszono w takim samym medium i następnie dodano przygotowany barwnik CellTracker™

Green CMFDA i inkubowano w 37 °C, 5 % CO₂ przez 30 min. Komórki ponownie zwirowano, zawieszono w medium RPMI/B-27 bez insuliny z ROCK inhibitorem (1 µl/ml) i wysiano w gęstości 1×10^5 komórek/cm² do hodowli iPSC-CM. Po 24 h hodowli wykonano zdjęcia współhodowli z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej.

2.2.14. Analiza typu śmierci komórkowej

Do oceny typu śmierci komórek zastosowano zestaw Apoptosis/ Necrosis Assay Kit. Analizę typu śmierci komórek wykonano w badaniach hipoksji i H/R dla hodowli komórek HCM i iPSC-CM na matach nanowłóknistych z PCL i PU. Oceniono również odsetek komórek żywych, apoptycznych i nekrotycznych dla współhodowli komórek iPSC-CM po niedotlenieniu z komórkami iPSC hodowanymi na matach nanowłóknistych z PU i na płytkach polistyrenowych po 24 h i 10 dniach. Komórki znakowano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta, z wykorzystaniem trzech barwników fluorescencyjnych: CytoCalcein Violet 450 (Ex/Em = 405/450 nm), Appoxin Green (Ex/Em=490/525 nm) i 7-AAD (ang. 7 - aminoactinomycin D) (Ex/Em = 546/647 nm). CytoCalcein Violet 450 jest przepuszczalnym dla komórek barwnikiem hydrolizowanym do barwnika fluorescencyjnego w żywych komórkach. Appoxin Green wiąże się z fosfatydyloseryną na powierzchni komórek apoptotycznych. 7-AAD jest barwnikiem nieprzepuszczalnym przez błonę komórkową żywych komórek i wiąże się z podwójną nicią DNA i znakuje komórki w późniejszych etapach apoptozy lub nekrozy. Hodowle komórkowe przepłukano 200 µl Assay Buffer na dołek. Następnie, do komórek dodano roztwór Assay Buffer, Appoxin Green (100 x), 7AAD (200 x) oraz CytoCalcein Violet 450 (200 x) w stosunku objętościowym 200:2:1:1 µl i inkubowano 50 min w RT. Po tym czasie, komórki obserwowano z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego. Ponadto, przeprowadzono analizę ilościową żywych, apoptotycznych i nekrotycznych komórek przy użyciu oprogramowania ImageJ.

2.2.15. Analiza statyczna

Wszystkie badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono w minimum trzech niezależnych próbach (n = 3). Istotność statystyczną określono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD) za pomocą testów t-Studenta lub ANOVA dla minimum trzech niezależnych eksperymentów przy użyciu oprogramowania OriginPro 8. Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie i oznaczono gwiazdką.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Charakterystyka nanowłókien

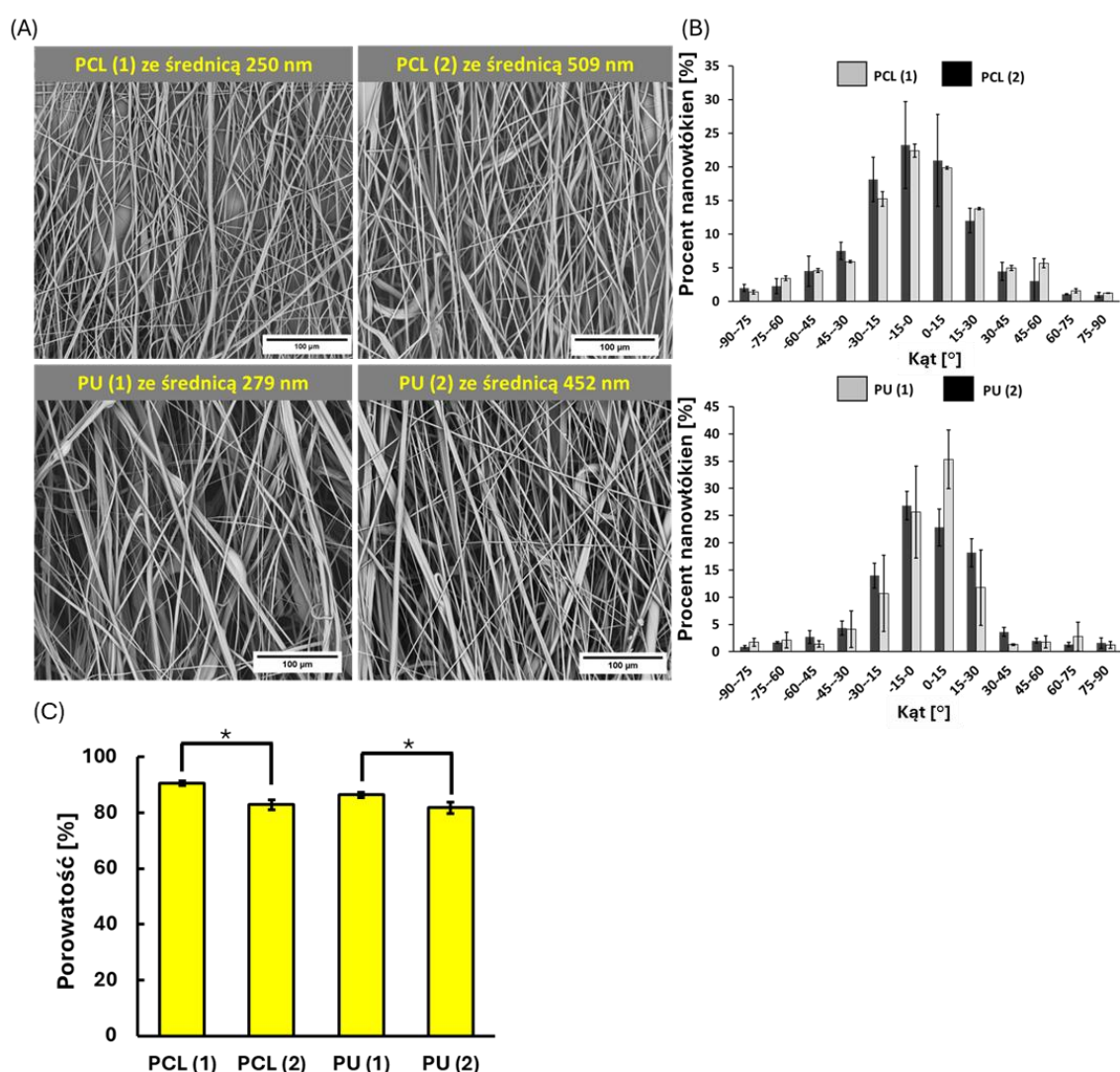
W standardowych, dwuwymiarowych (2D) hodowlach komórkowych najczęściej stosowane są szalki oraz płytki polistyrenowe. Hodowle tego typu nie odwzorowują złożonej i trójwymiarowej struktury tkanki serca. W ostatnich latach prowadzone są badania, w których analizuje się możliwość zastosowania innych rozwiązań technologicznych, które umożliwiłyby uzyskanie warunków bardziej złożonych niż hodowle 2D. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie mat nanowłóknistych. W ramach niniejszej pracy doktorskiej, podjęto badania mające na celu analizę tego czy maty nanowłókniste mogą stanowić podłoża do hodowli i badań komórek serca, które będą naśladować strukturalnie i funkcjonalnie macierz zewnątrzkomórkową (ECM) serca.

3.1.1. Strukturalne właściwości nanowłókien

Maty nanowłókniste wykorzystane w niniejszej pracy zostały opracowane przez dr inż. Michała Wojasińskiego i mgr inż. Iwonę Łopianiak z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Do wytwarzania mat nanowłóknistych z polikaprolaktanu (PCL) i poliuretanu (PU) zastosowano metodę rozdmuchu roztworu polimeru (SBS). Zdjęcia struktury mat nanowłóknistych wykonano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), które przedstawiono na rycinie 11 A. Wytworzono cztery rodzaje mat nanowłóknistych; dwa wytworzone z PCL o średniej średnicy włókien wynoszącej 250 ± 78 nm i 509 ± 178 nm, oraz dwa wytworzone z PU o średniej średnicy włókien wynoszącej 279 ± 108 nm i 452 ± 151 nm. W dalszych etapach badań, wykorzystywane nanowłókniny o średniej średnicy włókna ok. 250 nm nazywano jako nanowłókna PCL (1) i PU (1), a nanowłókniny o średniej średnicy włókna ok. 500 nm określono jako nanowłókna PCL (2) i PU (2).

Analiza właściwości strukturalnych wykonanych mat nanowłóknistych została przeprowadzona z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Zaobserwowano, że średnica wytworzonych nanowłókien zależała od zastosowanego początkowego stężenia polimeru w roztworze, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi na temat procesu SBS [122]. Uzyskane nanowłókna miały ułożenie równoległe względem siebie (Ryc. 11 B). Potwierdzono to poprzez pomiary kątów odchylenia poszczególnych włókien od założonego ukierunkowania (0°). Wykazano, że nanowłókna z PU są bardziej ukierunkowane (ułożone równoległe względem siebie) (dla PU (1) i PU (2) jest to kolejno 61 % i 50 % wszystkich nanowłókien) niż nanowłókna PCL (dla PCL (1) i PCL (2) jest to kolejno 42 % i 45 %) dla

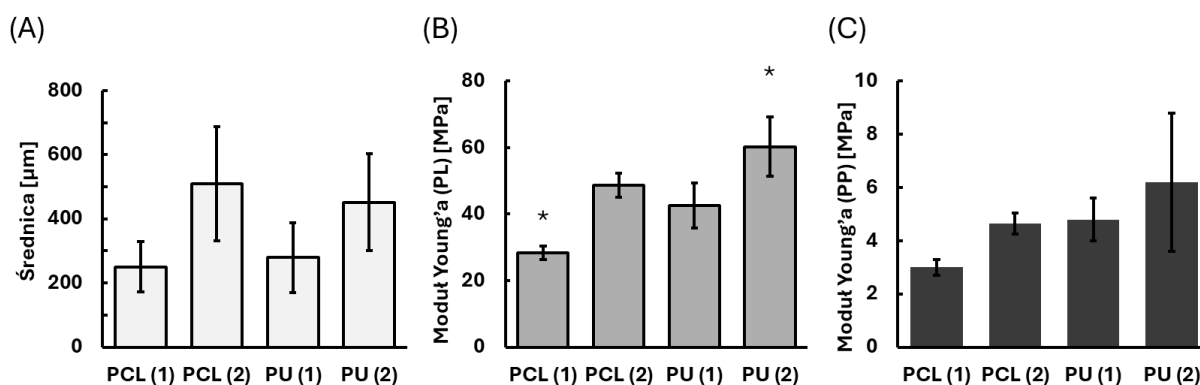
pomiarów od kąta ułożenia -15° do $+15^{\circ}$. W celu zapewnienia odpowiedniego dostarczania substancji odżywczych, biomateriały wykorzystywane w inżynierii komórkowej powinny charakteryzować się wysoką porowatością. Wyznaczona porowatość wytworzonych mat nanowłóknistych była wysoka w przypadku obu typów zastosowanych materiałów. Na rycinie 11 C przedstawiono wyniki porowatości (wolne przestrzenie w próbkach) otrzymanych materiałów. Mieściła się ona w zakresie 80 % - 90 %. Zaobserwowano, że maty nanowłókniste z nanowłóknami o mniejszych średnicach mają wyższą porowatość. Dla PCL (1) i PU (1) wynosiła ona kolejno 90 % i 86 %, podczas gdy dla PCL (2) i PU (2) wynosiła ona kolejno 83 % i 82 %.



Rycina 11 (A) Zdjęcia z SEM nanowłókien wykonanych z polikaprolaktonu (PCL) o średnicy 250 ± 78 nm i 509 ± 178 nm oraz nanowłókien wykonanych z poliuretanu (PU) o średnicy 279 ± 108 nm i 452 ± 151 nm. (B) Rozkład kąta odchylenia włókien od założonego ukierunkowania dla nanowłókien PCL i PU. (C) Analiza porowatości mat z nanowłókien PCL i PU. *- $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie jednokierunkowej ANOVA. $n \geq 3$.

3.1.2. Charakterystyka właściwości mechanicznych nanowłókien

Na rycinie 12 przedstawiono właściwości mechaniczne nanowłókien, takie jak średnica i moduł Young'a w kierunku równoległym (ang. *parallel*, PL) i prostopadłym (ang. *perpendicular*, PP) do ułożenia włókien. Moduł Young'a opisuje elastyczność materiałów. Moduł Young'a dla nanowłókien PCL (2) w kierunku PL wynosił 48,6 MPa, a w kierunku PP 4,6 MPa. Podobny moduł Younga odnotowano dla nanowłókien PU (1). Jego wartość w kierunku PL wynosiła 42,6 MPa, a w kierunku PP 4,8 MPa. Zaobserwowano, że nanowłókna o największej sztywności zarówno dla PL jak i PP to nanowłókna z PU o większej średnicy. Z kolei, największą elastycznością charakteryzowały się maty nanowłókniste wykonane z nanowłókien PCL o mniejszej średnicy. Elastyczność nanowłókien PCL (2) i PU (1) była zbliżona.



Rycina 12 Właściwości fizyczne nanowłókien wykonanych z PCL i PU. (A) Średnica nanowłókien (B) i (C) wytrzymałość na rozciąganie mierzona równoległe (PL) i prostopadle (PP) do ułożenia włókien. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie jednokierunkowej ANOVA. $n \geq 3$.

3.1.3. Podsumowanie i dyskusja wyników

W ramach tego etapu badań wytworzono i scharakteryzowano maty nanowłókniste wykonane z polikaprolaktonu i poliuretanu. Maty nanowłókniste tego typu są szeroko stosowane w modelach komórkowych 3D *in vitro*, w tym m.in. w hodowli i badaniu komórek serca. PCL i PU są biodegradowalne, tanie, nietoksyczne, mają odpowiednią wytrzymałość mechaniczną i elastyczność do hodowli komórek serca, co zostało potwierdzone w literaturze [123], [124]. Strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej w tkance ludzkiego serca budują włókna o średnicy do 300 nm [133], [134]. W modelach komórkowych *in vitro* naśladujących strukturę i funkcjonowanie tkanki serca wykorzystuje się najczęściej materiały włókniste o średnicy 200 - 700 nm [135], [136]. Dlatego też, do badań na tym etapie zostały wykonane maty nanowłókniste z PCL i PU o włóknach opisywanych dwiema średnimi wartościami średnic, zbliżonych do średnicy włókien ECM serca. Dodatkowo wykazano, że nanowłókna były

równolegle ułożone względem siebie, co może wpływać również na równoległe ułożenie komórek, które mają kardiomiocyty budujące dorosłą tkankę serca. Z kolei wysoka porowatość mat miała zapewnić odpowiednie dostarczanie składników odżywczych komórkom. Według literatury maty nanowłókniste wykorzystywane w inżynierii tkankowej do hodowli komórek serca miały elastyczność dla modułu Young'a od 20 kPa do 92 MPa [65], [125]. Maty nanowłókniste wykonane w ramach niniejszej pracy miały elastyczność, która znajdowała się w tym zakresie. Dodatkowo, maty wytworzono o różnej elastyczności, w celu sprawdzenia wpływu tej właściwości na hodowlę komórek serca.

Podsumowując, wytworzono maty nanowłókniste różniące się właściwościami fizykochemicznymi, tj. rodzajem polimeru, średnicą włókien i elastycznością. Wszystkie typy wytworzonych mat nanowłóknistych zostały wybrane do kolejnego etapu badań związanych z analizą hodowli wybranych typów komórek serca.

3.2. Hodowla komórek serca na matach nanowłóknistych

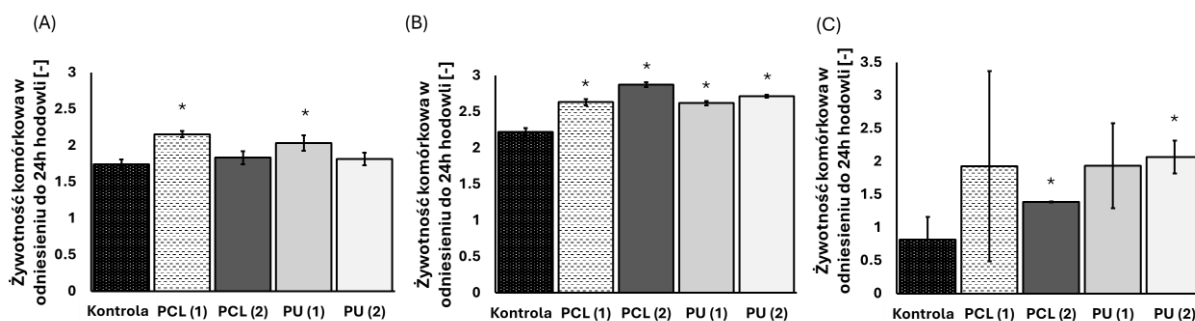
Tak jak zaznaczono w części literaturowej, zastosowanie mat nanowłóknistych umożliwia odwzorowanie strukturalne i funkcjonalne macierzy zewnątrzkomórkowej serca. Pozwala to na zbadanie oddziaływania czynnika strukturalnego na funkcjonowanie komórek mięśnia sercowego i komórek macierzystych. Brakuje jednak, badań porównawczych, w których sprawdzono jakie właściwości fizykochemiczne powinny mieć maty nanowłókniste, aby zapewnić optymalne mikrośrodowisko do hodowli kardiomiocytów. Dodatkowo, nie ma prac, w których oceniono zastosowanie mat do hodowli różnych typów komórek serca, aby sprawdzić czy odpowiedzi komórek będą podobne. Celem tego etapu było sprawdzenie jak maty nanowłókniste o różnych właściwościach fizykochemicznych wpływają na żywotność, ułożenie, morfologię i dojrzewanie komórek serca pochodzących z różnych gatunków. Do badań wybrano szczurze kardiomioblasty (H9c2) wyizolowane z komory serca, unieśmiertelnione mysie kardiomiocyty (HL-1) wyizolowane z przedsionka serca, pierwotne ludzkie kardiomiocyty (HCM) wyizolowane z komory serca oraz ludzkie kardiomiocyty zróżnicowane z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM). Analizowano krótko- (24 h) i długoterminową (10 dni) hodowlę komórek różnego typu na matach nanowłóknistych na funkcjonowanie wybranych typów komórek. Założono, że zastosowane maty nanowłókniste będą oddziaływać na morfologię oraz fizjologię komórek serca, co da możliwość uzyskania modelu komórkowego *in vitro* odwzorowującego mikrośrodowisko tkanki serca. Badania te mogą pomóc zrozumieć różnice między

mechanizmami komórkowymi występującymi w komórkach serca gryzoni i człowieka oraz różnice między liniami komórkowymi, które zostały wyizolowane z komory i przedsionka serca. Ponadto, mogą one wesprzeć badania nad wyborem mat nanowłóknistych jako podłoża do hodowli i badania pracy ludzkich komórek serca w modelach *in vitro*.

3.2.1. Hodowla komórek H9c2, HL-1 i HCM

3.2.1.1. Żywotność komórek

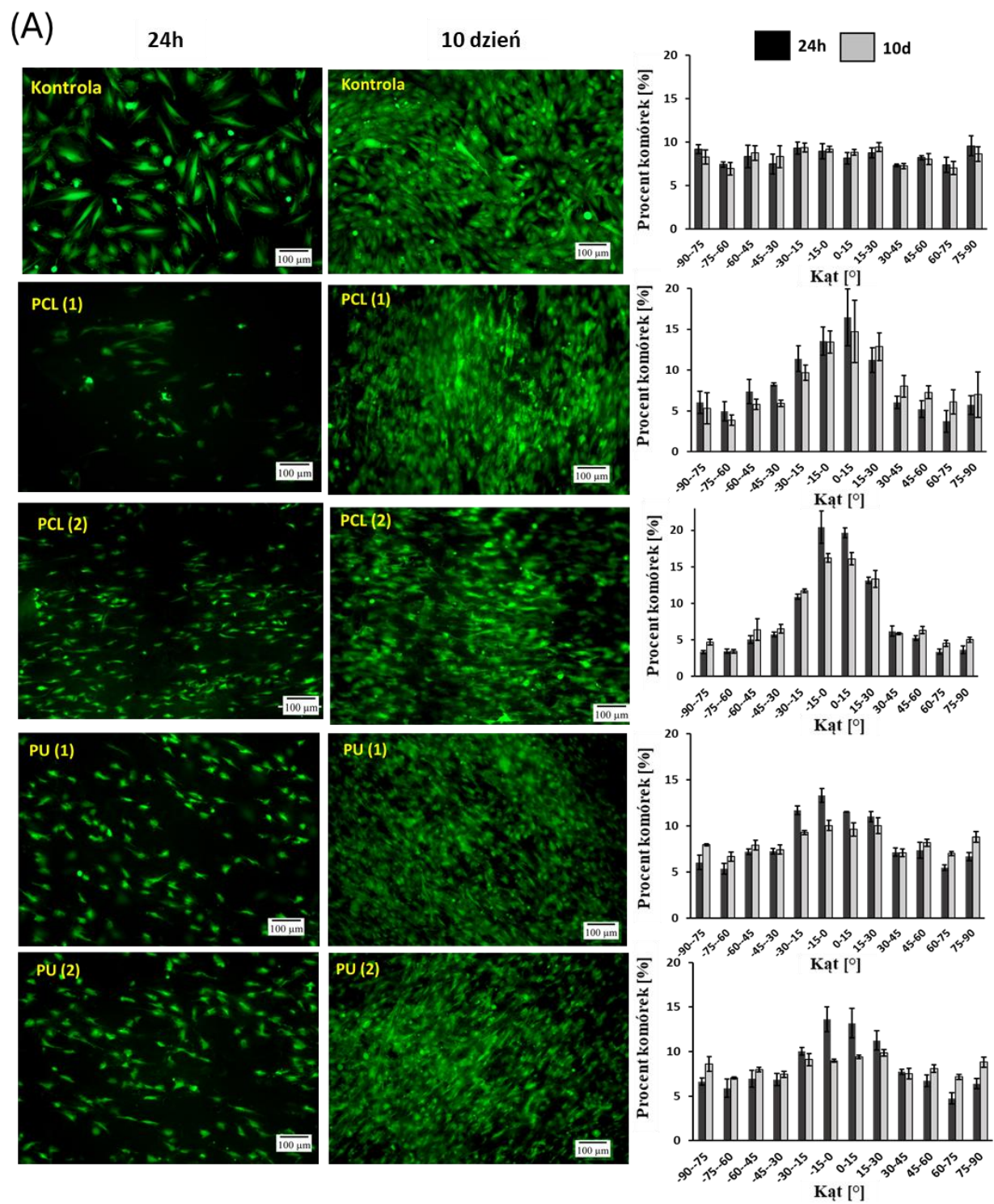
W pierwszym etapie badań analizowano żywotność komórek H9c2, HL-1 i HCM hodowanych na matach nanowłóknistych. Jako kontrolę wykorzystano hodowlę prowadzoną na płytkach polistyrenowych (standardowa hodowla komórek). Na rycinie 13, przedstawiono wyniki dla hodowli po 10 dniach w odniesieniu do hodowli komórek po 24 h. Zaobserwowano, wzrost żywotności komórek gryzoni tj. H9c2 i HL - 1 po 10 dniach hodowli na matach nanowłóknistych i na płytkach polistyrenowych. Analizując 10-dniowe hodowle zauważono znaczący wzrost żywotności komórek H9c2 hodowanych na matach z PCL (1) i PU (1) w porównaniu do kontroli (Ryc. 13 A). Z kolei dla komórek HL-1 we wszystkich 10-dniowych hodowlach prowadzonych na matach nanowłóknistych obserwowany był wzrost żywotności komórek w porównaniu do kontroli (Ryc. 13 B). Najwyższy wzrost żywotności komórek pochodzących od gryzoni obserwowany był dla hodowli prowadzonych na matach z PCL. Dla komórek H9c2 hodowanych na PCL (1) był on 2,2 razy większy od kontroli, a dla HL-1 hodowanych na PCL (2) - 2,9 razy większy. Dla ludzkich kardiomiocytów HCM również obserwowano wyższą żywotność komórek w 10-cio dniowe hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych. Najwyższą żywotność uzyskano w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU (2) (była ona 2,1 wyższą niż hodowla komórek po 24 h). Badania wykazały, że w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych obserwowany jest wzrost żywotności komórek H9c2, HL-1 i HCM w porównaniu do standardowych hodowli na płytkach polistyrenowych.

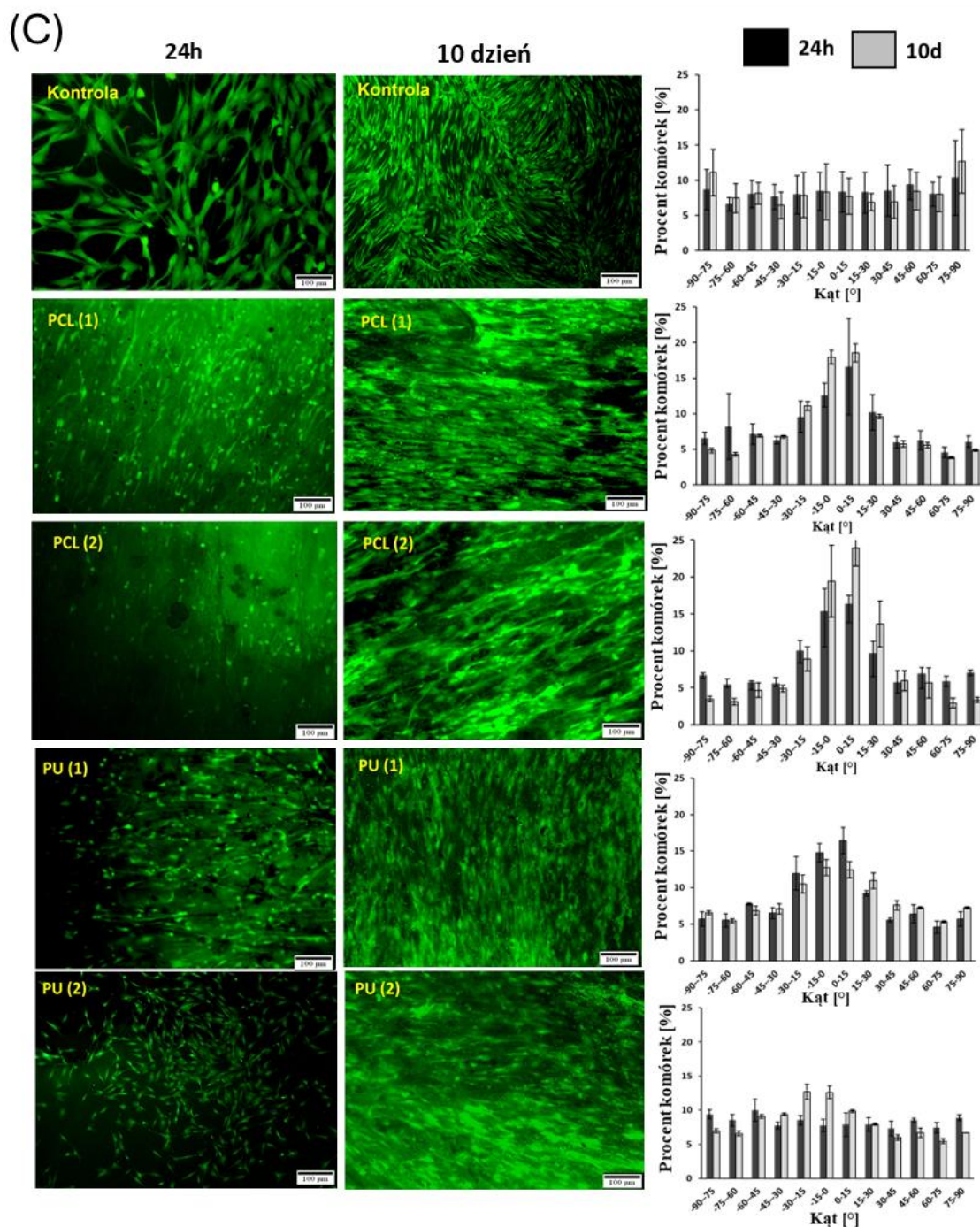


Rycina 13 Żywotność komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C) hodowanych na matach nanowłóknistych po 10 dniach w odniesieniu do hodowli 24 h. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotny wzrost żywotności komórek został określony za pomocą testu t-Studenta w porównaniu do hodowli prowadzonych na płytkach polistyrenowych (kontrola) po 10 dniach hodowli. $n=3$.

3.2.1.2. Wpływ mat nanowłóknistych na ułożenie komórek

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu mat nanowłóknistych na ułożenie komórek w hodowlach *in vitro*. W tkance serca kardiomiocyty ułożone są względem siebie równolegle. W ramach niniejszej pracy zastosowano maty nanowłókniste charakteryzujące się wysokim uporządkowaniem nanowłókien. Założono, że ich zastosowanie wpłynie na równoległe ułożenie komórek, co naśladować będzie ułożenie komórek serca w warunkach *in vivo*. W celu oceny ukierunkowania (ułożenia komórek w danym kierunku) komórek H9c2, HL-1 i HCM przeprowadzono barwienie z wykorzystaniem kalceiny-AM. Następnie, przeprowadzono obserwacje mikroskopową i analizę kątów (za pomocą ImageJ) ułożenia wybarwionych komórek. Wykazano, że komórki H9c2, HL-1 i HCM hodowane na płytkach polistyrenowych były ukierunkowane losowo (Ryc.14 i Tabela 4). Największy odsetek komórek H9c2 i HCM ułożonych w zakresie -15° do $+15^\circ$ obserwowano w hodowli prowadzonej na matach z PCL (2), natomiast największy odsetek równolegle ułożonych komórek HL-1 na matach z PU (2) (Tabela 4). Obserwowano zmianę ułożenia komórek w zależności od czasu trwania hodowli, jednak różniła się ona w zależności od typu komórek. Porównując hodowlę 10-cio dniową do 24 h hodowli na matach nanowłóknistych zaobserwowano, że dla komórek H9c2 i HL-1 odsetek komórek ułożonych równolegle względem siebie zmniejszył się wraz z czasem, natomiast dla komórek HCM wzrósł. W ramach powyższego etapu badań potwierdzono, że zastosowanie mat nanowłóknistych powoduje wzrost liczby komórek serca ułożonych równolegle względem siebie w porównaniu do hodowli prowadzonych na płytkach polistyrenowych.





Rycina 14 Komórki (A) H9c2, (B) HL-1 i (C) HCM wybarwione kalceinę-AM (CAM) (kolor zielony), hodowane przez 24 h i 10 dni na matach nanowłóknistych z polikaprolaktonu (PCL) oraz poliuretanu (PU). Jako kontrolę zastosowano płytki polistyrenowe. Po prawej stronie przedstawiono wykresy ułożenia komórek względem siebie w tych hodowlach. Skala 100 μm .

Tabela 4 Liczba komórek H9c2, HL-1 i HCM o równoległym ułożeniu hodowanych na matach nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych (kontrola). * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontroli określono za pomocą testu t-Studenta. $n \geq 3$.

Podłoże		% Komórek			
		od (-) 15° do 15°		od (-) 30° do (-) 15° i od 15° do 30°	
		24h	10 dzień	24h	10 dzień
Kontrola	H9c2	17	18	18	19
	HL-1	14	16	17	17
	HCM	17	16	16	15
PCL (1)	H9c2	30*	28	23*	23
	HL-1	22	20*	21*	21*
	HCM	29	37	20	20
PCL (2)	H9c2	40*	32*	24*	25*
	HL-1	24*	20*	23	20*
	HCM	32*	43*	19	23
PU (1)	H9c2	25*	20	23*	19
	HL-1	24*	22	22*	21*
	HCM	31	25	21	22
PU (2)	H9c2	27*	18	21	19
	HL-1	26*	22*	24*	22*
	HCM	16	22	16	21

Dojrzałe kardiomiocyty (CM) mają anizotropowe, wrzecionowate wydłużone kształty (wysoki stosunek długości do szerokości i mniejszą okrągłość) i ułożone są równolegle względem siebie. Z kolei, niedojrzałe kardiomiocyty są okrągłe, mniejsze niż dorosłe CM i są rozmieszczone losowo [126]. W związku z tym, przeprowadzono analizę morfologii komórek, aby sprawdzić czy maty nanowłókniste wpływają na zmianę morfologii komórek serca na bliższą dojrzałym kardiomiocytom. Potwierdzono, że komórki H9c2, HL-1 i HCM hodowane na matach mają wyższy stosunek długości do ich szerokości oraz mniejszą okrągłość niż komórki hodowane na płytkach polistyrenowych. Można zauważyć, że komórki H9c2 hodowane na matach nanowłóknistych PCL (2) mają najbardziej wydłużony kształt (stosunek długości do szerokości komórek wynosił 5,8, a okrągłość komórek osiągnęła 20,0 %, podczas gdy dla kontroli stosunek długości do szerokości komórki wynosił 2,1, a okrągłość 61,2 %) w porównaniu do pozostałych hodowli. Zaobserwowano, że komórki HCM miały bardziej

wrzecionowaty, wydłużony kształt również w hodowli na matach nanowłóknistych z PCL (dla PCL (1) stosunek długości do szerokości komórek wynosił 5,9, a okrągłość wynosiła 18,9 %; z kolei, stosunek długości do szerokości komórek wynosił 5,7, a okrągłość 19,7 na matach nanowłóknistych PCL (2) w porównaniu do hodowli kontrolnej. W przypadku komórek wyizolowanych z przedsionka serca – HL-1 najbardziej wrzecionowaty kształt zaobserwowano dla hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych PU (2) (stosunek długości do szerokości komórki osiągnęły 2,4, a okrągłość 51,7 %, podczas gdy dla kontroli wynosiły one 1,8 i 56,6 %). Komórki HL-1 są mniej wydłużone niż komórki H9c2 i HCM (Tabela 5). Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że komórki hodowane na matach z włóknami o większej średnicy (tj. około 500 nm) wykazują bardziej anizotropowy, wrzecionowaty, wydłużony kształt niż komórki hodowane na matach z włóknami o mniejszej średnicy i płycie polistyrenowej. Podsumowując wykazano, że komórki hodowane na wytworzonych matach mają morfologię bardziej zbliżoną do dorosłych kardiomiocytów niż komórki hodowane w standardowej hodowli wykorzystującej płytki polistyrenowe.

*Tabela 5 Analiza morfologii komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C). * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne zmiany w porównaniu z kontrolą (test t-Studenta). Analizę przeprowadzono dla 10-dniowej hodowli. $n \geq 3$.*

(A)

Podłoże	Długość [μm]	Szerokość [μm]	Długość/Szerokość	Powierzchnia [μm ²]	Okrągłość [%]
Kontrola	42,0±6,9	21,1±5,5	2,1±0,8	895.3±217.8	61.2±17.3
PCL (1)	42,8±9,5	12,1±1,8	3,7±1,1*	373.9±92.1	29.4±9.3*
PCL (2)	74,8±14,4	14,3±4,5	5,8±2,2*	755.5±236.2	20.0±5.8*
PU (1)	36,6±6,5	14,4±3,5	2,7±0,7	637.6±254.9	50.3±18.1*
PU (2)	29,8±7,7	12,1±3,3	2,7±1,2	434.0±139.0	50.0±19.7*

(B)

Podłoże	Długość [μm]	Szerokość [μm]	Długość/Szerokość	Powierzchnia [μm ²]	Okrągłość [%]
Kontrola	28,8±9,2	16,3±4,0	1,8±0,7	355,1±162,6	56,6±14,5
PCL (1)	28,8±6,1	16,7±3,7	1,8±0,4	364,5±139,3	59,1±12,8
PCL (2)	32,6±10,8	15,9±3,3	2,1±0,7	382,7±162,4	51,9±17,3
PU (1)	31,9±8,9	16,2±4,6	2,1±0,7	401,0±131,2	51,7±15,7
PU (2)	31,1±8,0	13,9±3,0	2,4±1,0*	313,9±84,5	47,5±17,0

(C)

Podłoże	Długość [μm]	Szerokość [μm]	Długość/Szerokość	Powierzchnia [μm ²]	Okrągłość [%]
Kontrola	109,3±41,4	28,0±6,5	4,0±1,5	2189,5±967,6	29,2±14,3
PCL (1)	103,3±32,5	18,2±3,9	5,9±2,2*	1217,5±500,4	18,9±8,0*
PCL (2)	125,0±44,3	23,7±7,9	5,7±2,5*	1844,2±727,5	19,7±10,1*
PU (1)	91,2±22,4	23,1±15,5	4,7±1,9	1417,8±727,5	23,1±8,7
PU (2)	91,5±32,9	23,6±7,5	4,0±1,1	1490,1±649,0	25,6±8,3

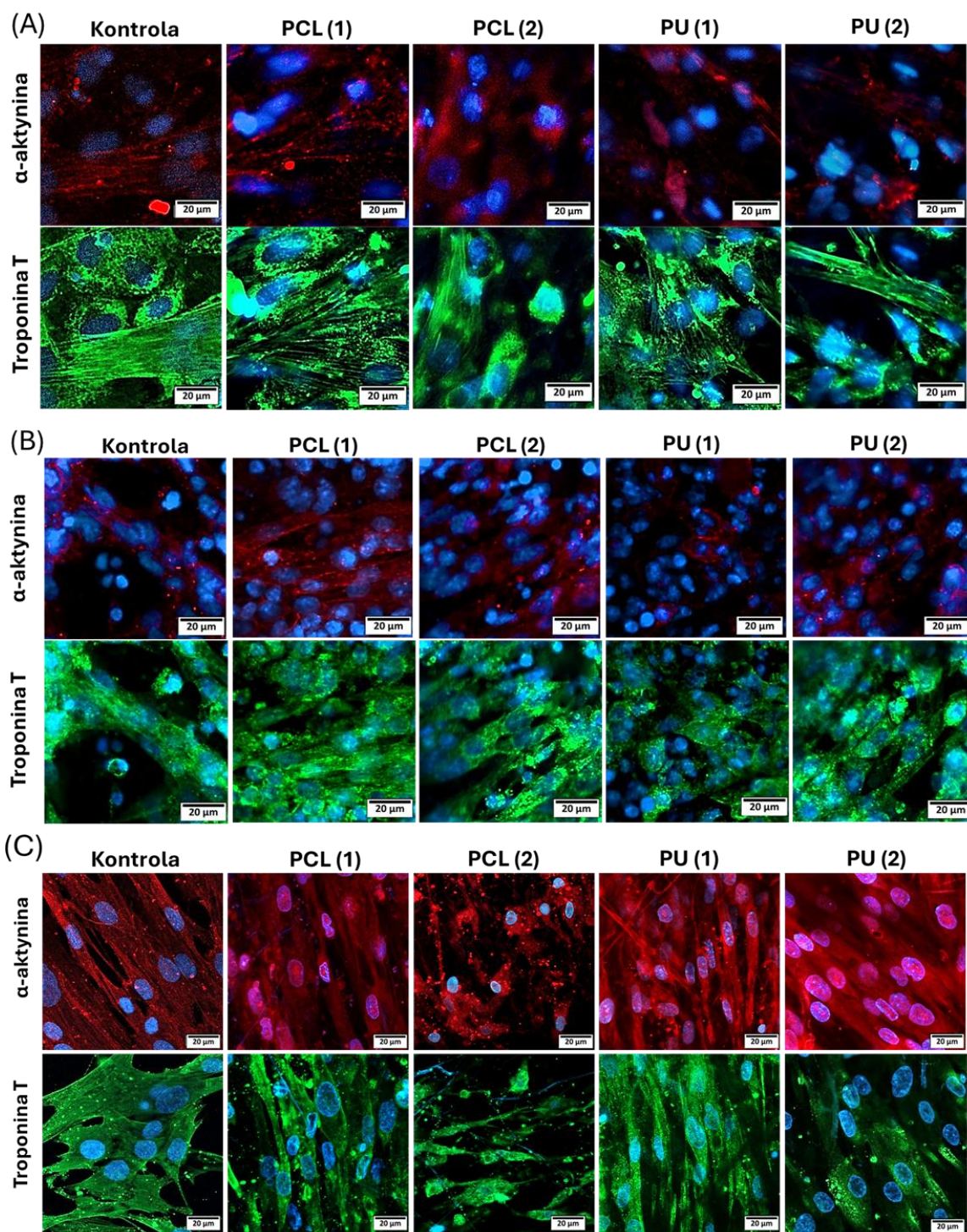
W ramach powyższego etapu badań wykazano, że maty nanowłókniste mają istotny wpływ na ukierunkowanie i morfologię hodowanych komórek serca. W porównaniu do hodowli prowadzonej na płytkach polistyrenowych, komórki hodowane na matach mają bardziej uporządkowane i równoległe ułożenie, co lepiej odzwierciedla naturalną strukturę dorosłej tkanki serca. Dodatkowo, analiza morfologii wykazała, że komórki hodowane na matach miały bardziej wydłużony, wrzecionowaty kształt, co jest również cechą dojrzałych kardiomiocytów. Zmiany te były najbardziej widoczne dla komórek rosnących na nanowłóknach o większej średnicy (ok. 500 nm). Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć również, wpływ biomateriału na komórki wyizolowane z różnych części serca. Komórki wyizolowane z komory serca takie jak H9c2 i HCM wykazywały większe ukierunkowanie i wydłużony kształt w hodowli prowadzonej na matach z PCL, podczas gdy komórki wyizolowane z przedsionka serca, HL-1, cechowała dojrzała morfologia w hodowli prowadzonej na matach z PU.

3.2.1.3. Analiza dojrzewania komórek serca hodowanych na matach nanowłóknistych

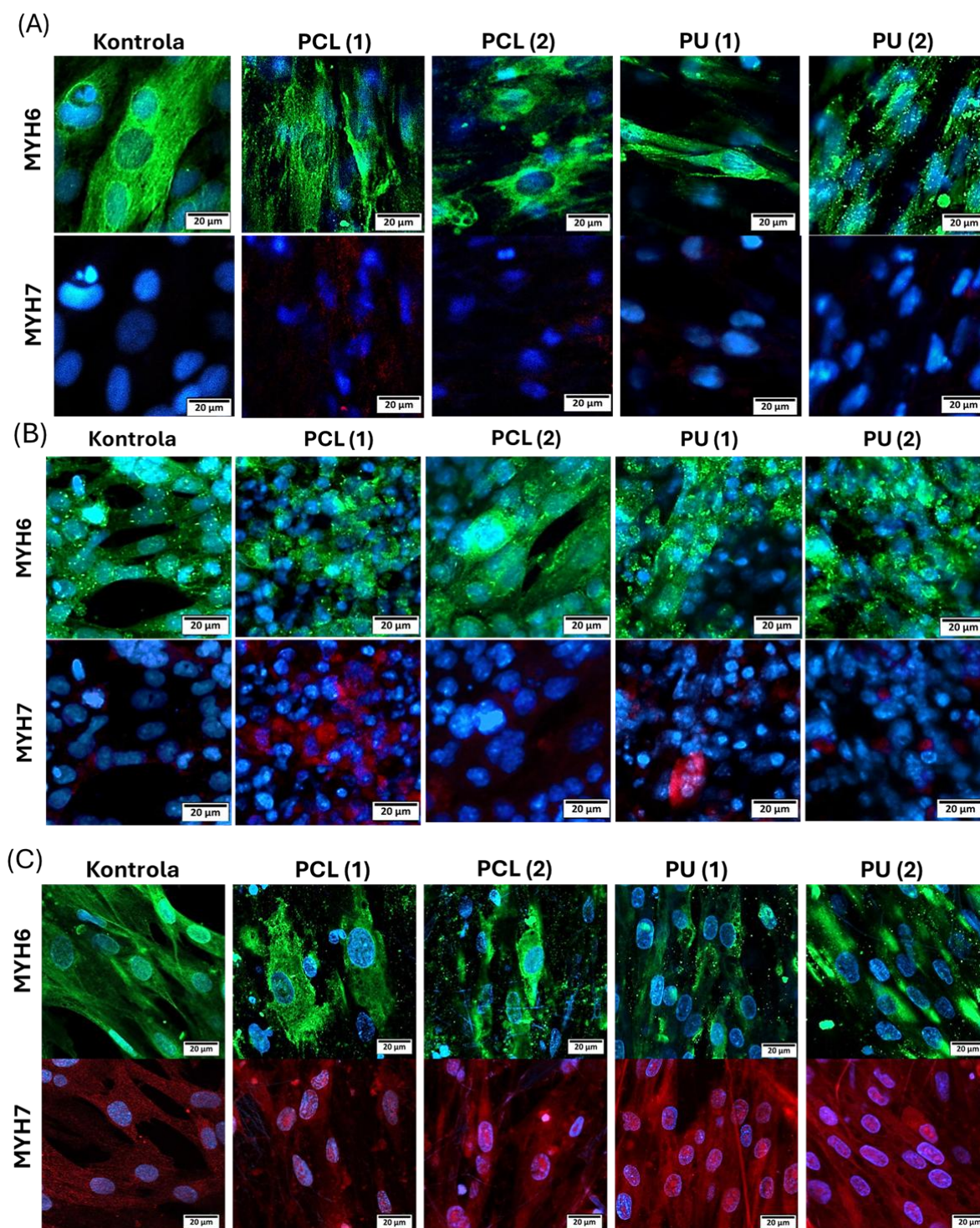
W celu zbadania czy w trakcie hodowli komórek serca prowadzonej na matach nanowłóknistych obserwowane jest dojrzewanie kardiomiocytów, przeprowadzono analizę ekspresji genów i poziomu białek uczestniczących w dojrzewaniu komórek serca. W ramach badań analizowano zmianę poziomu białek specyficznych dla kardiomiocytów, takich jak α - aktynina, troponina T, MYH6, oraz MYH7. Zauważono, że komórki H9c2 hodowane na matach nanowłóknistych wykazują wyższy poziom α -aktyniny w porównaniu do hodowli prowadzonej na płytkach polistyrenowych (kontrola). Zauważono również zwiększony poziom α -aktyniny oraz troponiny T w hodowli komórek HL-1 prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL (1), PCL (2) i PU (2). Z kolei nie zauważono znaczących różnic

w poziomie białek w przypadku hodowli komórek HCM prowadzonej na matach nanowłóknistych jak i na płytce polistyrenowej (Ryc. 15). Łańcuch ciężkiej miozyny (ang. *myosin heavy chain*, MHC) posiada dwie izoformy, których poziom zmienia się w zależności od stopnia dojrzałości tkanki serca [59]. U ludzi płodową izoformą jest α -MHC kodowana przez gen *MYH6*, a dojrzałą izoformą jest β -MHC kodowana przez gen *MYH7*. Podczas dojrzewania poziom obu białek rośnie, jednak dla ludzkich kardiomiocytów poziom białka MYH7 wzrasta znacznie, podczas gdy MYH6 wykazuje niewielki wzrost. Z kolei, w komórkach gryzoni również ilość MYH6 i MYH7 rośnie podczas dojrzewania, jednak dominującą izoformą jest MYH6 [59]. Dodatkowo, stosunek ilości białek MYH6 do MYH7 zależy od części serca. [127]. MYH7 jest główną izoformą MHC w komorze serca u dorosłego człowieka. Ludzkie kardiomiocyty z przedsionka serca charakteryzuje większa ilość MYH6 niż w komórkach z komory serca. MYH7 nadal jednak jest dominującą izoformą. Z kolei w przypadku gryzoni jest odwrotnie; MYH6 jest główną izoformą MHC budującą komorę serca. Natomiast w przedsionku serca obserwuje się obie izoformy, MYH6 i MYH7, ale poziom MYH7 jest niższy niż MYH6 [59], [127].

Na podstawie zdjęć na rycinie 16, które przedstawiają wybarwione białka MYH6 i MYH7 w komórkach H9c2, HL-1 i HCM hodowanych na matach nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych obserwowane są zmiany w komórkach, które są zgodne z wiedzą na temat ekspresji izoform MYH6 i MYH7 i potwierdzają różnice między kardiomiocytami pochodzącymi z różnych części serca oraz między gatunkami. W komórkach szczurzych H9c2, które zostały wyizolowane z komory serca, zaobserwowano znaczącą ilość białka MYH6. Natomiast białko MYH7 nie jest widoczne lub występuje w śladowych ilościach w komórkach hodowanych zarówno na matach nanowłóknistych, jak i w kontroli. Różnica w poziomie białka MYH6 w ludzkich komórkach pochodzących z komory serca - HCM hodowanych na płytce PS i na matach nanowłóknistych nie jest zauważalna. Poziom białka MYH7 niższy niż w komórkach hodowanych na nanowłóknach jest jednak wyższy w porównaniu do komórek rosnących na płytce polistyrenowej. Z kolei w mysich komórkach HL-1, wyizolowanych z przedsionka serca, hodowanych na matach nanowłóknistych zaobserwowano zwiększony poziom MYH7 w porównaniu do komórek hodowanych w kontroli. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zmiany w poziomie białek MYH6 i MYH7 obserwowane w komórkach H9c2, HL-1 i HCM hodowanych na matach nanowłóknistych są bliższe do tych zachodzących podczas dojrzewania komórek serca u ludzi i gryzoni niż w hodowlach dwuwymiarowych prowadzonych na płytkach polistyrenowych [59], [127].



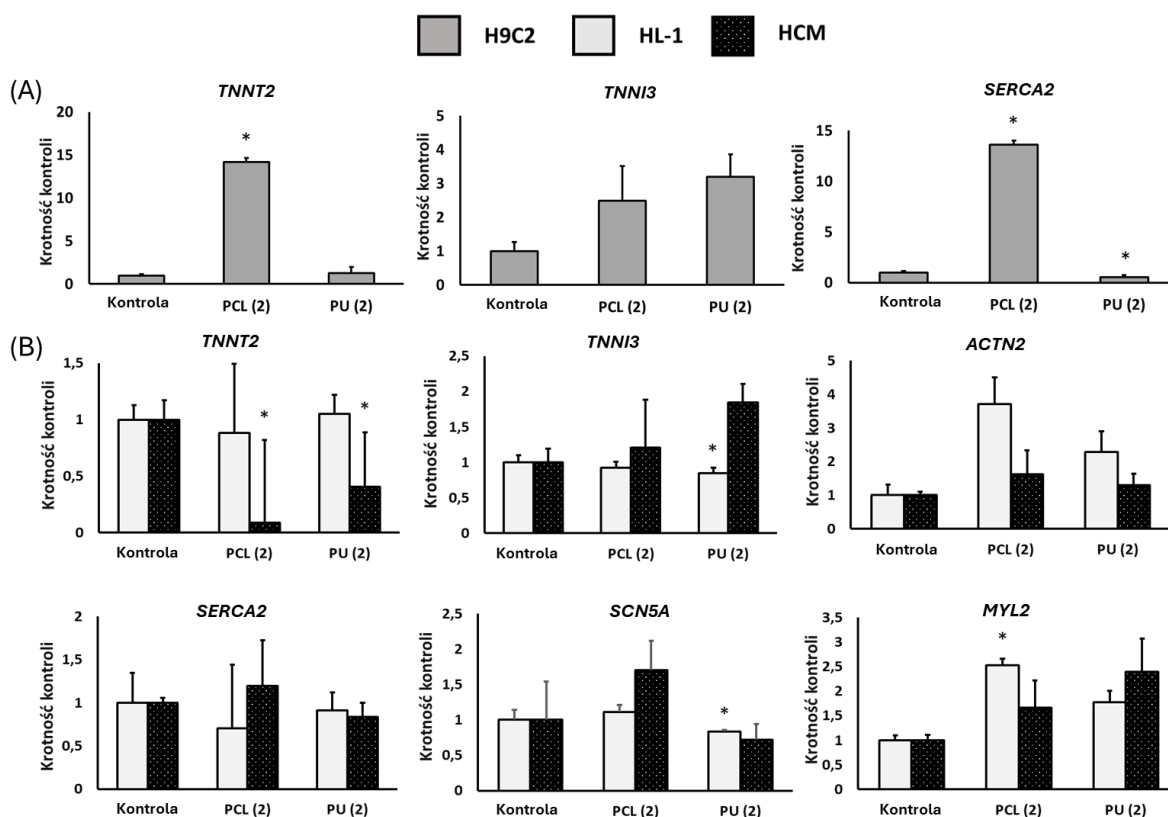
Rycina 15 Zdjęcia komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C) po immunobarwieniu: α -aktynina (kolor czerwony), troponina T (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski). Immunobarwienie przeprowadzono po 10 dniach hodowli na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych PCL i PU. Skala 20 μ m.



Rycina 16 Zdjęcia komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C) po immunobarwieniu: MYH7 (kolor czerwony), MYH6 (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski). Immunobarwienie wykonano po 10 dniach hodowli na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych PCL i PU. Skala 20 μm.

Na podstawie powyższych badań zauważono, że komórki hodowane na matach z włóknami o większych średnicach wykazywały większe zmiany w morfologii komórek i poziomie badanych białek. W związku z tym, do dalszych etapów badań wybrano dwa rodzaje mat z PCL i PU o włóknach z większą średnicą ~ 500 nm. Następnie, przeprowadzono na nich

hodowlę komórek i analizę ekspresji wybranych genów. W przypadku szczurzych kardiomioblastów (H9c2) określono ekspresję genów takich jak *TNNT2* (troponina T), *TNNI3* (troponina I) i *SERCA2* (ATPaza wapniowa typu 2). Z kolei, dla hodowli mysich i ludzkich kardiomiocytów dodatkowo wykonano analizę ekspresji genów *ACTN2* (α -aktynina sercowa), *MYL2* (lekki łańcuch miozyny komorowej 2) i *SCN5A* (podjednostka 5 alfa kanału sodowego) (Ryc. 17).



Rycina 17 Ilościowa analiza ekspresji genów metodą qRT-PCR komórek serca hodowanych na płytce polistyrenowej, matach nanowłóknistych z PCL (2) i PU (2) hodowanych przez 10 dni. (A) troponina T (*TNNT2*), troponina I (*TNNI3*), ATPaza wapniowa typu 2 (*SERCA2*) dla H9c2, (B) troponina T (*TNNT2*), troponina I (*TNNI3*), α -aktynina sercowa (*ACTN2*), ATPazy wapniowej typu 2 (*SERCA2*), podjednostka 5 alfa kanału sodowego (*SCN5A*) i lekki łańcuch miozyny komorowej 2 (*MYL2*) dla kardiomiocytów HL-1 i HCM. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola) (test t-Studenta). $n=3$.

W warunkach *in vivo* gen *TNNT2* koduje izoformę troponiny T, której poziom wzrasta podczas różnicowania się komórek serca w trakcie rozwoju płodowego. W okresie noworodkowym oraz w dorosłych kardiomiocytach poziom tej izoformy spada, ponieważ zostaje ona zastąpiona przez inne izoformy troponiny T, kodowane przez geny *TNNT3* i *TNNT4* [58]. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że *TNNT2* wzrosła w komórkach H9c2 hodowanych na matach nanowłóknistych PCL (2) (14,2-krotność kontroli), a zmniejszyła się w komórkach HCM, które hodowano na nanowłóknach PCL (2) (0,1-krotność kontroli)

i PU (2) (0,4-krotność kontroli) (Ryc. 17). Komórki H9c2 to nie w pełni zróżnicowane komórki serca, które zostały wyizolowane z zarodków. Zatem, są bardziej podobne morfologicznie i fizjologicznie do kardiomiocytów płodowych niż dorosłych CM. Może się to przyczyniać do znacznego wzrostu ekspresji *TNNT2* obserwowanego w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych i świadczyć o dojrzewaniu komórek H9c2 [59]. Komórki HCM są izolowane z ludzkiego dorosłego serca i spadek ekspresji *TNNT2* może oznaczać, że komórki dojrzewają [58]. Z kolei, *TNNI3* jest izoformą troponiny I, która wzrasta podczas dojrzewania kardiomiocytów i jest najwyższa w dorosłych komórkach serca [58], [128]. Stwierdzono, że komórki HCM i H9c2 hodowane na matach nanowłóknistych PCL (2) i PU (2) miały wyższą ekspresję *TNNI3* niż te hodowane na płytkach polistyrenowych. Zaobserwowano korelację między ekspresją *TNNT2* i *TNNI3*, co jest zgodne ze zmianami zachodzącymi podczas procesu dojrzewania w kardiomiocytach w warunkach *in vivo* tzn. ekspresja *TNNT2* wzrasta podczas różnicowania komórek i spada na dalszych etapach rozwoju kardiomiocytów [58], a ekspresja *TNNI3* wzrasta na późniejszym etapie dojrzewania [58], [59], [128].

Gen *ACTN2* uczestniczy w dojrzewaniu kardiomiocytów, zwłaszcza w fazie postnatalnej, chociaż zachodzące mechanizmy są nadal nieznane [59]. W badaniach przedstawionych na rycinie 17 B zaobserwowano wzrost ekspresji genu *ACTN2* dla komórek HCM i HL-1, w tym najwyższy dla HL-1 hodowanych na matach nanowłóknistych PCL (2). Ekspresja *MYL2* w warunkach *in vivo* wzrasta znacząco podczas dojrzewania ludzkich kardiomiocytów komory serca od stadium noworodkowego do dorosłego. Dla komórek mięśnia sercowego gryzoni ekspresja *MYL2* wzrasta również od stadium noworodkowego do dorosłego dla kardiomiocytów przedsionka i komory serca, jednak dla komórek z komory serca wzrost ten jest dużo wyższy niż dla kardiomiocytów z przedsionka serca [126], [129]. W przypadku komórek HCM i HL-1 zaobserwowano wzrost ekspresji *MYL2* w komórkach hodowanych na obu rodzajach mat nanowłóknistych w porównaniu z kontrolą. Dla komórek HCM, najwyższą ekspresję *MYL2* zaobserwowano w hodowli prowadzonej na matach PU (2) (2,4-krotność kontroli), podczas gdy dla komórek HL-1, dla hodowli prowadzonej na matach PCL (2) (1,8 - krotność kontroli).

Podczas rozwoju serca od stadium płodowego do dorosłego, elektrofizjologia CM również ulega zmianie [58], [130]. Jony wapnia odgrywają istotną rolę w skurczu kardiomiocytów i w elektrofizjologii. W kardiomiocytach płodowych, białka transportujące wapń (w tym *SERCA2*) nie są rozwinięte, dlatego skurcz jest słabszy niż w dorosłym sercu [58]. Podczas dojrzewania kardiomiocytów od stadium płodowego do dorosłego następuje stały

wzrost ekspresji *SERCA2* [58]. W ramach przeprowadzonych badań zaobserwowano, że wzrost ekspresji *SERCA2* komórek hodowanych na matach w porównaniu do kontroli zależał od etapu rozwoju komórek mięśnia sercowego. Najwyższy wzrost ekspresji *SERCA2* zaobserwowano dla kardiomioblastów H9c2, niższy dla niedojrzałych kardiomiocytów HCM, a najniższy dla kardiomiocytów HL-1 o dojrzałej elektrofizjologii. Innym rodzajem genu regulującego transport jonów, który analizowano był *SCN5A*. Jest to podjednostka kanału sodowego bramkowanego napięciem i jego ekspresja również wzrasta podczas rozwoju serca [58]. Dla komórek HL-1 ekspresja *SCN5A* zmienia się nieznacznie w każdego typu hodowli, a dla komórek HCM hodowanych na nanowłóknach PCL (2) zaobserwowano wzrost ekspresji (1,7-krotność kontroli).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że w trakcie prowadzenia hodowli komórek na matach nanowłóknistych obserwowane są zmiany na poziomie genów, m.in. odpowiedzialnych za dojrzewanie kardiomiocytów. Ekspresja wybranych genów uległa większym zmianom w hodowlach prowadzonych na matach z PCL. Niemniej jednak, w hodowlach prowadzonych na matach z PU również odnotowano zmianę ekspresji genów odpowiedzialnych za mechanizmy zaangażowane w dojrzewanie kardiomiocytów. Różnice między odpowiedziami komórkowymi mogą być związane z tym, że maty nanowłókniste z PCL i PU wpływają w odmienny sposób wpływają na proces dojrzewania komórek serca.

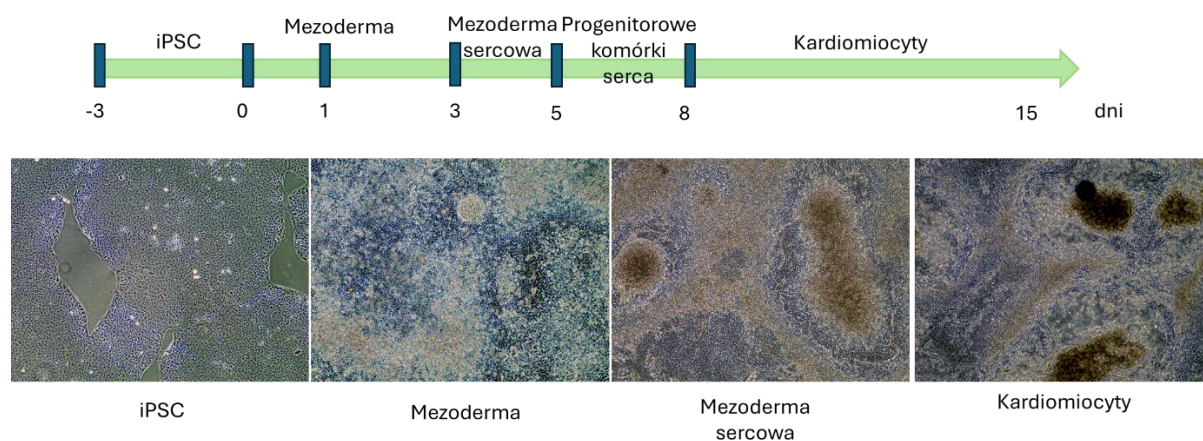
3.2.2. Hodowla komórek iPSC-CM

W badaniach *in vitro* nad chorobami układu sercowo-naczyniowego szeroko opisywane w literaturze i wykorzystywane są komórki kardiomioblastów oraz kardiomiocytów pochodzenia zwierzęcego (np. H9c2 i HL-1). Ze względu na różnice gatunkowe ważne jest jednak prowadzenie badań z wykorzystaniem komórek ludzkich m.in. linii komórek HCM. Jednak ze względu na jej ograniczenia (np. brak kurczliwości), w ostatnich latach coraz częściej wykorzystywane są ludzkie kardiomiocyty pochodzące z indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM). Komórki iPSC-CM uzyskuje się z komórek macierzystych iPSC [131]. Większość metod stosowanych do różnicowania iPSC w kardiomiocyty wykorzystuje hodowlę dwuwymiarową w monowarstwie (2D). Uzyskiwane komórki serca są fizjologicznie i morfologicznie bliższe kardiomiocytom płodowym niż tym, obecnym w natywnej tkance serca dorosłego człowieka [55]. Możliwe jest jednak zastosowanie w późniejszych etapach hodowli dodatkowych czynników (np. stymulacji strukturalnej), które wpłynąć mogą na dojrzewanie komórek iPSC-CM. Dodatkowo, w modelach *in vitro* tkanki serca możliwe jest wytworzenie struktur naśladujących funkcjonowanie natywnej macierzy

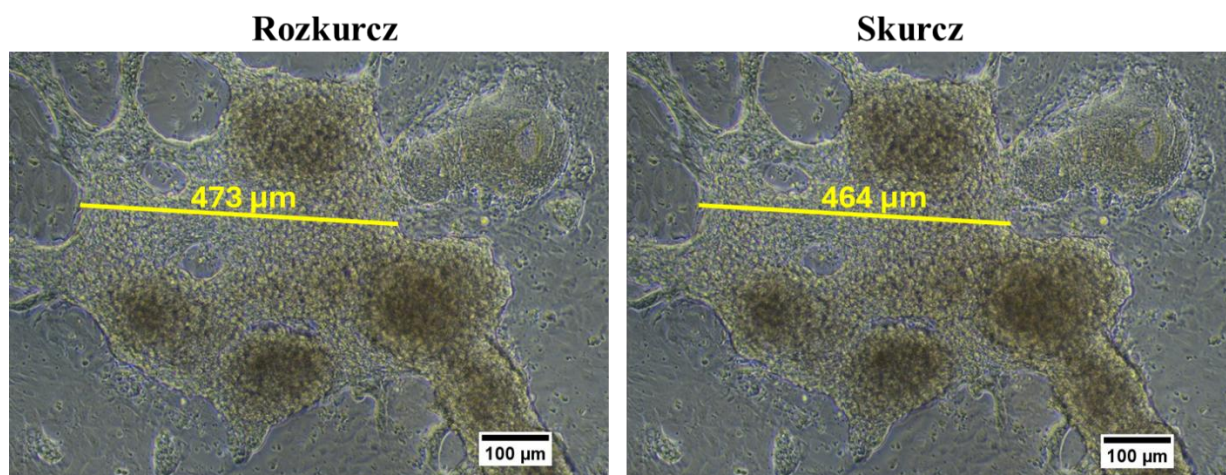
zewnątrzkomórkowej (ECM) serca np. poprzez zastosowanie rusztowań, mat nanowłóknistych. W poprzednim etapie badań potwierdzono, że wykorzystanie mat nanowłóknistych z PCL i PU umożliwiło uzyskanie komórek serca (H9c2, HL-1 oraz HCM) o dojrzałszej fizjologii i morfologii w porównaniu do standardowej hodowli prowadzonej na płytkach polistyrenowych. Komórki iPSC-CM charakteryzują się niedojrzałą fizjologią. Założono, że zastosowanie mat nanowłóknistych z PCL i PU do hodowli komórek iPSC-CM może stanowić czynnik strukturalny wpływający na ich morfologię oraz dojrzewanie. W badaniach wykorzystano maty z PCL i PU o średnicy około 500 nm, różniące się elastycznością. Przeprowadzono analizę morfologii i ułożenia komórek, a także ekspresji wybranych genów i poziomu specyficznych białek w długoterminowej hodowli.

3.2.2.1. Charakterystyka komórek iPSC-CM

Przed przystąpieniem do właściwych badań przeprowadzono różnicowanie komórek iPSC w iPSC-CM, w oparciu o modulację szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina pod wpływem inhibitora szlaku GSK3 - czynnika CHIR99021 i inhibitora szlaku Wnt - czynnika IWP-2. W celu przeprowadzenia różnicowania, pierwszego dnia dodawano CHIR99021 i inkubowano z komórkami przez 24 h. Inkubacja komórek iPSC z CHIR99021 powoduje aktywację β -kateniny, która transportowana jest z cytoplazmy do jądra komórkowego i bierze udział w transkrypcji genów promujących różnicowanie iPSC do mezodermy. Następnie, czynnik CHIR usuwano, a po 72 h od rozpoczęcia różnicowania dodawano czynnik IWP-2, który powoduje ubikwitynację i degradację β -kateniny. To z kolei przyczynia się do różnicowania mezodermy w mezodermę sercową, a następnie komórki mezodermy sercowej spontanicznie różnicują się w kardiomiocyty. Pierwsze spontaniczne skurcze zróżnicowanych iPSC-CM obserwowano między 8 a 14 dniem od rozpoczęcia procedury różnicowania (Ryc. 18 i 19).

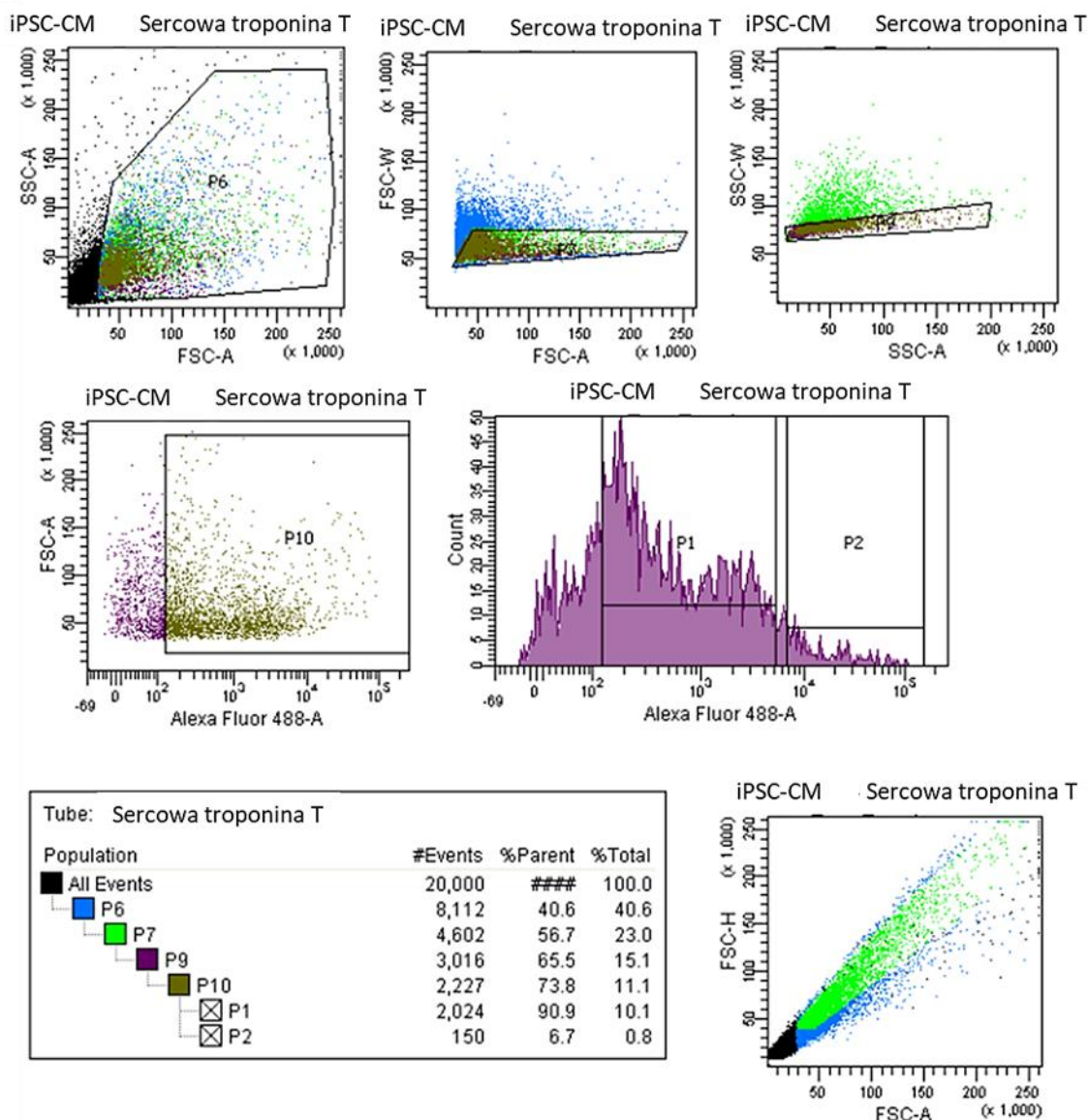


Rycina 18 Schemat przedstawiający proces różnicowania iPSC w iPSC-CM oraz zdjęcia hodowli komórek w kolejnych dniach różnicowania.



Rycina 19 Zdjęcia ludzkich kardiomiocytów zróżnicowanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM) w trakcie hodowli.

Dodatkowo, w celu sprawdzenia skuteczności procesu różnicowania komórek iPSC w iPSC-CM wykorzystano cytometrię przepływową. W badaniach sprawdzono odsetek komórek, w których wybarwiono specyficzne białko dla kardiomiocytów, troponinę T. Na podstawie analizy odsetka komórek, w których wybarwiono troponinę T w porównaniu do całej badanej populacji potwierdzono, że wydajność procesu różnicowania komórek wyniosła 90,9 %, (Ryc. 20). Badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz analizę wyników przeprowadzono we współpracy z Panią dr Ewelina Krogulec i technikiem z Pracowni Cytometrycznej z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie.

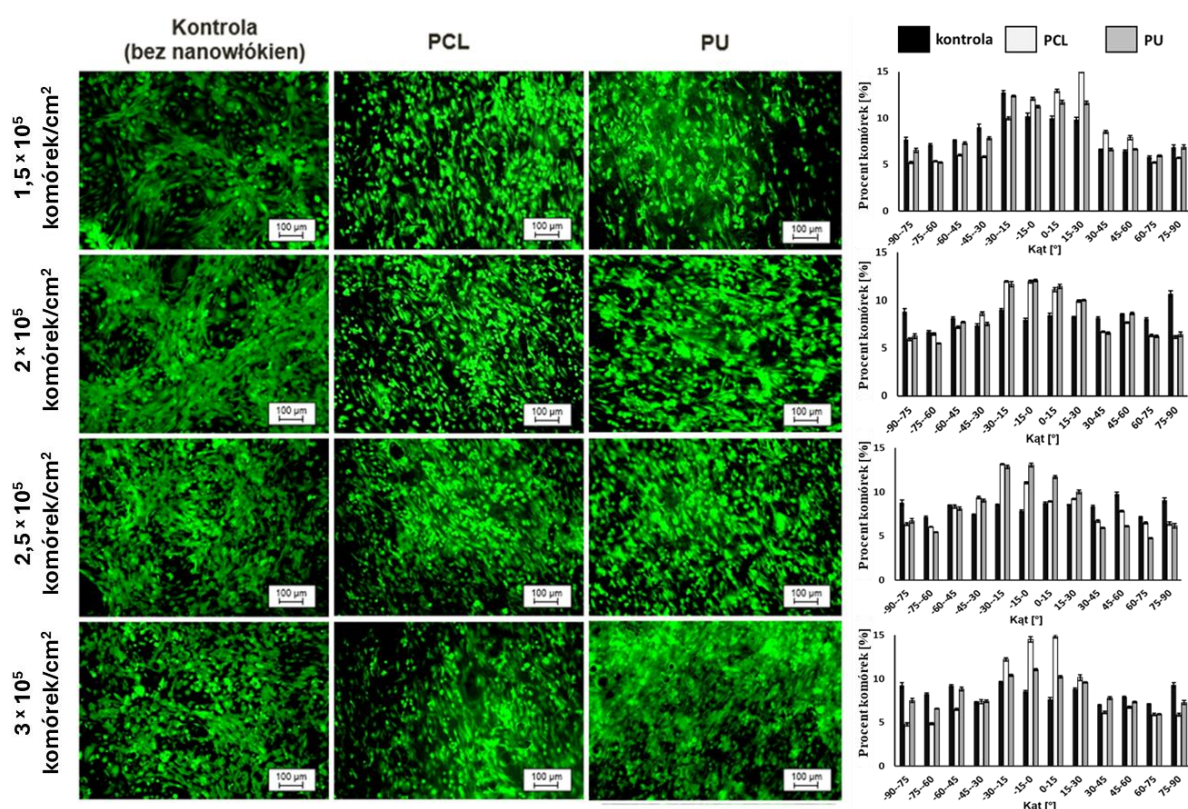


Rycina 20 Odsetek komórek iPSC-CM, w których wybarwiono troponinę T. Analizę wykonano w 15 dniu hodowli kardiomiocytów po różnicowaniu iPSC za pomocą protokołu GiWi. Odsetek komórek, w których wyznaczono troponinę T obliczono na podstawie analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej dla co najmniej 20 000 komórek.

3.2.2.2. Dobranie warunków hodowli komórek iPSC-CM na matach nanowłóknistych

W pierwszym etapie badań dobrano gęstość wysiewania komórek iPSC-CM na wytworzonych matach nanowłóknistych. W tym celu, wysiano komórki iPSC-CM o różnej gęstości tj. $1,5 \times 10^5$ komórek/cm², $2,0 \times 10^5$ komórek/cm², $2,5 \times 10^5$ komórek/cm², $3,0 \times 10^5$ komórek/cm² i hodowano na matach nanowłóknistych z PCL i PU przez 72 h. Po tym czasie, badano żywotność, morfologię oraz ułożenie komórek iPSC-CM. W celu przyklejenia komórek do powierzchni płytki polistyrenowej lub mat nanowłóknistych przez pierwsze 48 h hodowano je w pożywce do wysiewania iPSC-CM. Następnie, zmieniono pożywkę na

standardową pożywkę do hodowli iPSC-CM (RPMI z suplementem B27 z insuliną) i komórki hodowano przez kolejne 24 h. Po tym czasie, przeprowadzono barwienie kalceiną-AM. Zaobserwowano wysoką żywotność komórek w hodowlach prowadzonych na matach nanowłóknistych z PCL oraz PU jak również na płytkach polistyrenowych (kontrola) (Ryc. 21). Komórki iPSC-CM hodowane na matach nanowłóknistych nie wykazywały ukierunkowania i równoległego ułożenia względem siebie (charakterystyczne dla dojrzałych CM), jednak zaobserwowano, że gęstość wysiewania miała wpływ na zmianę morfologii komórek. Komórki hodowane na matach nanowłóknistych PCL i PU wysiane w gęstościach $2,0 \times 10^5$ komórek/cm² i $2,5 \times 10^5$ komórek/cm² wykazywały najbardziej wydłużony i wrzecionowaty kształt w porównaniu do kontroli i hodowli na matach nanowłóknistych, które zostały wysiane w gęstości $1,5 \times 10^5$ komórek/cm² i $3,0 \times 10^5$ komórek/cm² (Tabela 6). W oparciu o powyższe wyniki, wywnioskowano, że gęstość wysiania komórek iPSC-CM nie wpływała na żywotność komórek. Do dalszych etapów badań wybrano gęstość komórek równą $2,0 \times 10^5$ komórek/cm².



Rycina 21 Zdjęcia komórek iPSC-CM wybarwionych kalceiną-AM (CAM) (kolor zielony) hodowane przez 72 h na matach nanowłóknistych z PCL i PU w zależności od gęstości wysiewu komórek. Jako kontrolę zastosowano płytki polistyrenowe. Po prawej stronie znajdują się wykresy przedstawiające ukierunkowanie komórek w poszczególnych hodowlach. $n \geq 3$.

Tabela 6 Morfologia komórek iPSC-CM w zależności od gęstości wysianych komórek. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie testu t-Studenta, w porównaniu do kontroli. $n \geq 3$.

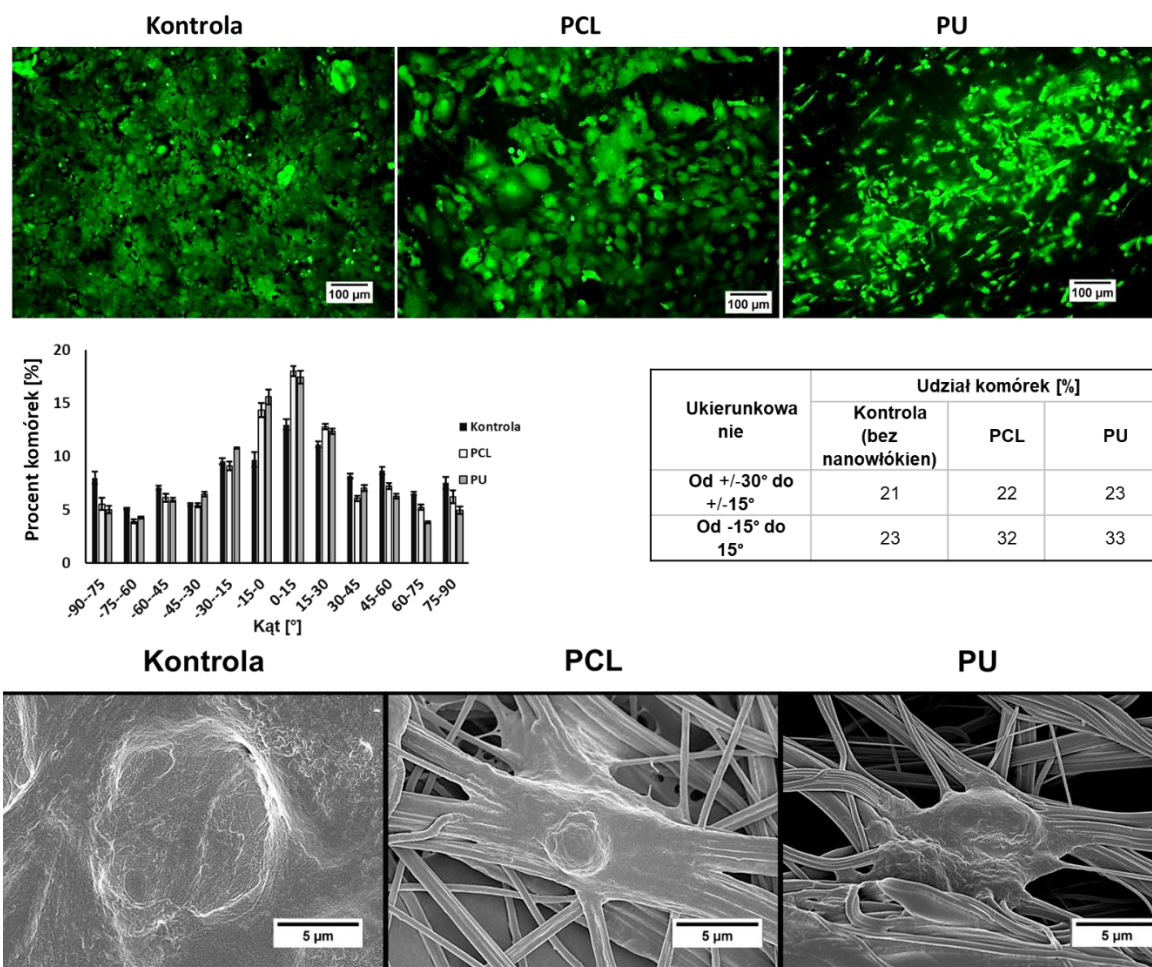
Gęstość [komórki/cm ²]	Podłoże	Stosunek długości do szerokości	Okrągłość [%]
$1,5 \times 10^5$	Kontrola	2,6	56,3±16,3
	PCL	3,3	55,4±12,9
	PU	4,2*	47,4±10,2
2×10^5	Kontrola	2,7	60,3±13,7
	PCL	3,6	47,0±6,2
	PU	4,7*	39,6±9,7*
$2,5 \times 10^5$	Kontrola	2,4	63,7±10,4
	PCL	4,4*	45,2±8,7*
	PU	3,5	52,1±9,5
3×10^5	Kontrola	2,1	71,3±7,0
	PCL	4,1*	46,8±9,5*
	PU	3,4	56,4±6,9*

3.2.2.3. Analiza dojrzewania komórek iPSC-CM

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę wpływu mat nanowłóknistych jako czynnika strukturalnego na zmianę morfologii oraz fizjologii komórek iPSC-CM, podobnie jak obserwowano to w przypadku komórek serca z linii komercyjnie dostępnych. Przeprowadzono badania, w których sprawdzono jak typ biomateriału oraz elastyczność mat nanowłóknistych wpływa na hodowlę komórek iPSC-CM w porównaniu do hodowli komórek H9c2, HCM oraz HL-1. W tym celu, przeprowadzono długoterminową hodowlę komórek (10 dni). Następnie analizowano morfologię i ukierunkowanie komórek oraz ekspresję genów i poziom białek uczestniczących w procesie dojrzewania kardiomiocytów. Do oceny morfologii i ułożenia komórek zastosowano barwienie roztworem kalceiny-AM (Ryc. 22 i Tabela 7). Zaobserwowano, że komórki iPSC-CM wydłużają się i mają wysoką żywotność zarówno na

matach z PCL jak i PU w hodowli długoterminowej. Dodatkowo potwierdzono, że elastyczność zastosowanych biomateriałów nie wpływa na spadek żywotności hodowanych komórek. Ponadto, po 10 dniach hodowli komórki na matach nanowłóknistych wykazywały równoległe ułożenie, podczas gdy komórki hodowane na płytkach PS jak również w hodowli krótkoterminowej (24 h) na matach nanowłóknistych rozmieszczone były losowo. Wyznaczono, że dla komórek hodowanych na płytkach polistyrenowych procent komórek ułożonych pod kątem od -15° do $+15^{\circ}$ wynosił 23 %, podczas gdy w hodowli na matach z PCL i PU wynosił kolejno 32 % oraz 33 %. Ponadto, przeprowadzono analizę morfologii komórek z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej. Potwierdzono, że komórki hodowane na płycie polistyrenowej (kontrola) rosną w monowarstwie. Z kolei, komórki iPSC-CM hodowane na matach nanowłóknistych umieszczone były wzdłuż nanowłókien, na różnych głębokościach oraz obszarach mat, tworząc trójwymiarową strukturę (Ryc. 22 C).

Podsumowując wykazano, że maty nanowłókniste mogą być wykorzystane do hodowli komórek iPSC-CM i wpływają na ich morfologię. Podobnie jak w przypadku hodowli komórek H9c2, HL-1 oraz HCM, komórki iPSC-CM ulegały wydłużeniu oraz rosły równolegle względem siebie. Nie zaobserwowano różnic w wynikach uzyskanych dla mat matach nanowłóknistych, w związku z czym obydwa typy biomateriałów wykorzystane zostały w dalszych etapach badań.



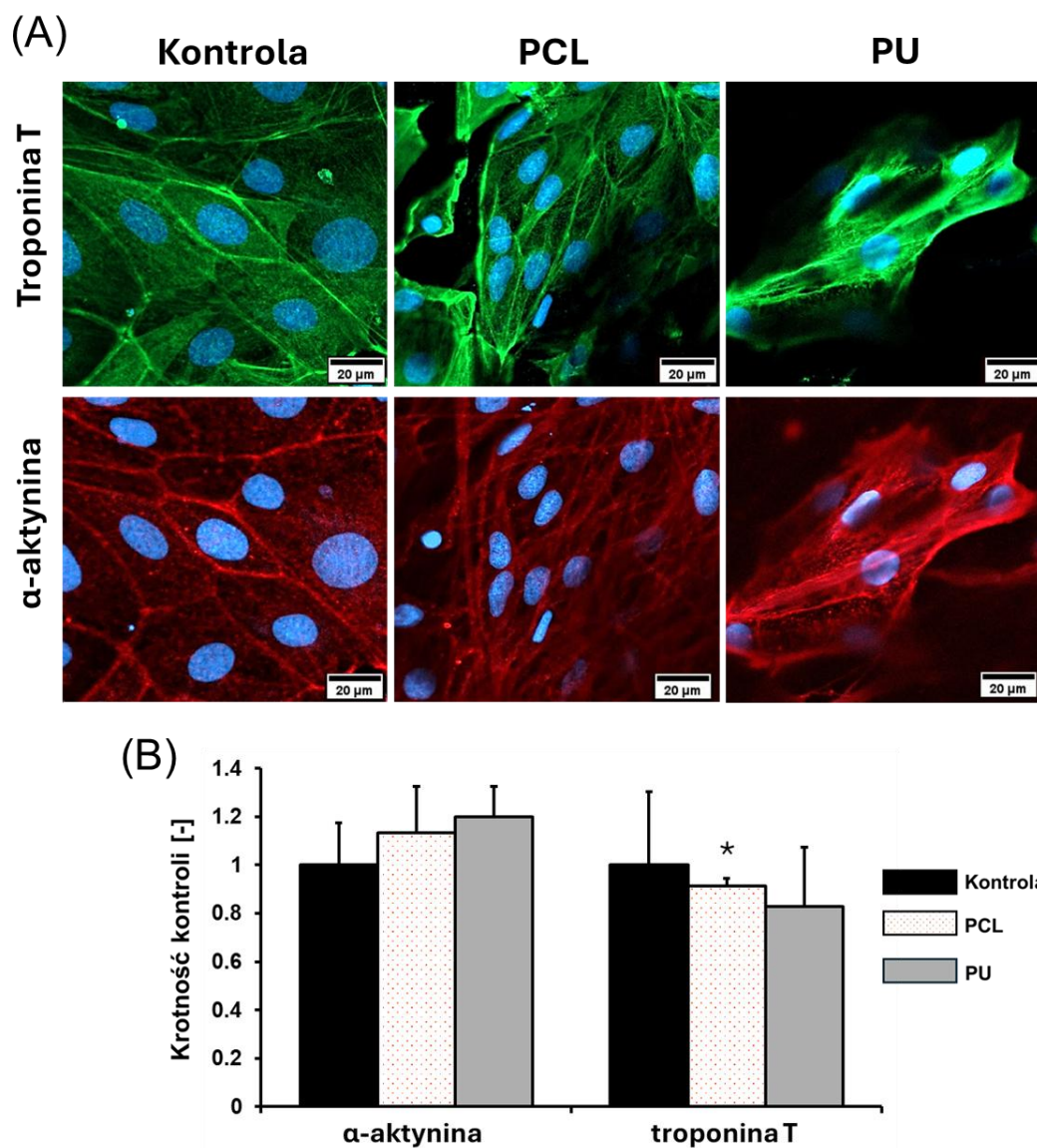
Rycina 22 (A) Zdjęcie komórek iPSC-CM wybarwionych kalceiną-AM (CAM) (kolor zielony) po 10 dniach hodowli na matach nanowłóknistych z PCL i PU. Hodowle na płytkach polistyrenowych zostały użyte jako kontrola. Skala 100 μ m. (B) Wykresy i tabele przedstawiające ukierunkowany wzrost komórek iPSC-CM w 10 dniu hodowli. Założono, że orientacja nanowłókien wynosi 0° . (C) Zdjęcia z SEM przedstawiają iPSC-CM na płytkach polistyrenowych (kontrola) i na matach nanowłóknistych (PCL i PU) po 10 dniach, skala 5 μ m. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie testu t -Studenta i porównując do kontroli. $n \geq 3$.

Tabela 7 Morfologia komórek iPSC-CM po 10 dniach hodowli. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie testu t -Studenta i porównując do kontroli. $n \geq 3$.

Podłoże	Długość [μ m]	Szerokość [μ m]	Stosunek długości do szerokości	Okrągłość [%]
Kontrola	25.1	16.5	1.5	63.6
PCL	32.9	12.1	2.7*	49.3*
PU	45.4	14.4	3.2*	46.9*

W kolejnym etapie badań, w celu sprawdzenia zmian wynikających z procesu dojrzewania kardiomiocytów w hodowli komórek iPSC-CM prowadzonej na matach nanowłóknistych, zbadano poziom białek i ekspresję genów charakterystycznych dla kardiomiocytów. Analizowano poziom białek takich jak α -aktynina i troponina T (Ryc. 23) oraz ekspresję genów takich jak *TNNT2*, *TNNI3*, *SERCA2*, *SCN5A*, *ACTN2* i *MYL2* w hodowli długoterminowej (10 dni) (Ryc. 24).

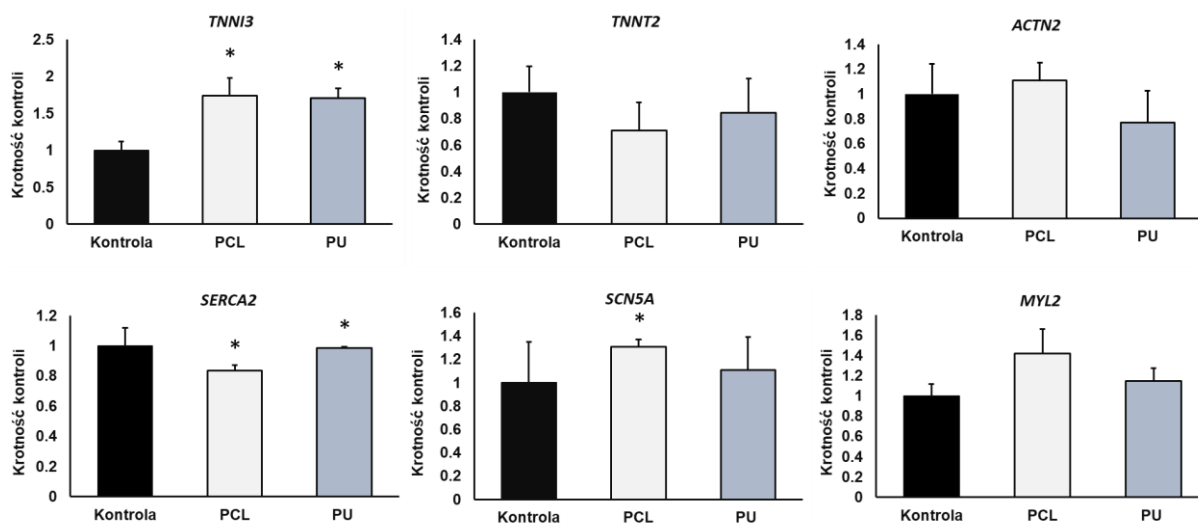
Zaobserwowano, że poziom białka α -aktyniny w komórkach iPSC-CM hodowanych na matach nanowłóknistych wykonanych z PCL i PU był wyższy niż w kontroli (dla hodowli na matach nanowłóknistych z PCL wynosił 1,1-krotność kontroli, dla PU wynosił 1,2-krotność kontroli). Z kolei poziom białka troponiny T był niższy w komórkach iPSC-CM hodowanych na matach nanowłóknistych niż w kontroli (dla PCL 0,9-krotnie, podczas gdy dla PU 0,8-krotnie). W przeprowadzonym badaniu zastosowano przeciwciała anty-troponina T, które są specyficzne dla izoformy cTnT2/TNNT2. Spadek poziomu cTnT2 może być związany z dojrzewaniem ludzkich kardiomiocytów na nanowłóknach, co z kolei wiąże się ze zmianami proporcji izoform cTnT1 i cTnT2 na korzyść izoform cTnT3 i cTnT4 w dojrzewających komórkach serca. Zgodnie z literaturą, gen *TNNT2* koduje izoformę troponiny T, której poziom jest wyższy w płodowych niż w dorosłych kardiomiocytach [58].



Rycina 23 (A) Zdjęcia komórek po immunobarwieniu: α -aktynina (wybarwione czerwone), troponina T (wybarwione na zielono) i jądra komórkowe (wybarwione na niebiesko) w iPSC-CM oraz (B) względna intensywność fluorescencji po 10 dniach hodowli na płytce polistyrenowej (kontrola) oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU. Skala 20 μ m. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola) (test t-Studenta). $n \geq 3$.

W przypadku genu *TNNT2* zauważono spadek jego ekspresji dla hodowli prowadzonych na matach nanowłóknistych. Dla komórek iPSC-CM spadek ekspresji *TNNT2* wynosił 0,3-krotności oraz 0,2-krotności kontroli dla mat nanowłóknistych kolejno z PCL i PU. Z kolei, zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost (1,7 razy) ekspresji *TNNI3* (kodującego izoformę troponiny I dominującą w dorosłych kardiomiocytach) dla hodowli na obu typach mat nanowłóknistych w porównaniu do kontroli. Ponadto, zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genów *SCN5A*, *MYL2* i *ACTN2* w hodowlach prowadzonych na matach nanowłóknistych z PCL w porównaniu do kontroli. Dla hodowli na matach nanowłóknistych

z PU również obserwowano wzrost ekspresji genów *SCN5A* i *MYL2*. Z kolei obserwowano znaczny spadek ekspresji *SERCA2*, który koduje ATPazę odpowiedzialną za transport jonów wapnia w hodowli na obydwu typach mat nanowłóknistych.



Rycina 24 Analiza qRT-PCR ekspresji genów w iPSC-CM hodowanych na płytce polistyrenowej oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU przez 10 dni. Ekspresja genów troponiny T (*TNNT2*), troponiny I (*TNNI3*), α -aktyniny sercowej (*ACTN2*), ATPazy wapniowej typu 2 (*SERCA2*), podjednostka 5 alfa kanału sodowego (*SCN5A*) i lekki łańcuch miozyny komorowej 2 (*MYL2*). * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola) (test t-Studenta). $n=3$

Wykazano, że obydwa typy badanych mat nanowłóknistych jako czynniki strukturalne wpływają na stan hodowli komórek iPSC-CM. Potwierdzono, że komórki hodowane na matach charakteryzują się dojrzałym fenotypem niż komórki w hodowli 2D. Komórki miały wydłużony kształt, rosły wzdłuż nanowłókien. Ponadto, zmiana poziomu białek troponiny T i α -aktyniny oraz ekspresja badanych genów świadczą o dojrzewaniu kardiomiocytów. Zmiany te były różne dla badanych mat wkonanych z PCL i PU. Komórki hodowane na matach z PU miały bardziej wydłużony kształt i najmniejszą okrągłość oraz wyrażały najwyższy wzrost poziomu białek α -aktyninę i spadek cTnT2 co jest charakterystyczne dla dojrzewania kardiomiocytów. Z kolei, hodowla iPSC-CM prowadzona na matach nanowłóknistych z PCL spowodowała większe zmiany w ekspresji badanych genów, wskazując na wzrost dojrzałości komórek. Podsumowując, oba rodzaje materiałów nanowłóknistych stymulowały dojrzewanie komórek mięśnia sercowego, ale prawdopodobnie w różny sposób.

3.2.3. Podsumowanie i dyskusja wyników

Maty nanowłókniste wykorzystywane są jako rusztowania w modelach *in vitro*, w celu strukturalnego i funkcjonalnego naśladowania sercowej macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wspomagania badań nad wyjaśnieniem oddziaływań struktury 3D na komórki serca [94], [99],

[113], [132]. W ramach powyższego etapu badań sprawdzono i porównano właściwości fizykochemiczne wytworzonych mat nanowłóknistych różniących się materiałem, elastycznością i średnicą oraz ich wpływem na dojrzewanie komórek serca pochodzących z różnych gatunków i innych części serca (komory i przedsionka serca). Analizowano żywotność, ułożenie, morfologię komórek serca oraz ekspresję genów i poziom białek dla hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych w krótko- i długoterminowej hodowli. Oprócz zastosowania komercyjnie dostępnych linii komórkowych, badania przeprowadzono z wykorzystaniem zróżnicowanych kardiomiocytów pochodzących z komórek macierzystych. Przewagą zastosowania iPSC-CM nad liniami komercyjnie dostępnymi jest to, że mogą pochodzić od konkretnego dawcy co umożliwia rozwój terapii personalizowanej. Na tym etapie badań potwierdzono, że wybrane maty nanowłókniste różniące się typem materiału, elastycznością oraz porowatością wpływają na dojrzewanie kardiomiocytów. Stanowią one czynnik strukturalny, który w odmienny sposób wpływa na morfologię i fizjologię komórek serca wyizolowanych z komory i przedsionka, pochodzących z różnych gatunków.

Dotychczas w badaniach nad poznaniem fizjologii tkanki serca z wykorzystaniem modeli *in vivo* głównie stosowane są myszy i szczury. Wynika to z dostępności tych modeli oraz pewnego podobieństwa fizjologicznego do człowieka. Jednak należy podkreślić, że modele te obarczone są ograniczeniami takimi jak różnice międzygatunkowe, które nie są w pełni wyjaśnione i zrozumiałe. Dodatkowo, brakuje pełnej zgodności w modelach chorób, które nie rozwijają się u gryzoni w taki sam sposób jak u ludzi, co ogranicza skuteczność modelowania ich przebiegu [133]. Z tego powodu, coraz więcej badań skupia się na wytworzeniu alternatywnych modeli komórkowych *in vitro*, które będą naśladować funkcjonowanie dorosłej ludzkiej tkanki serca. Badania przedstawione na tym etapie rozprawy doktorskiej obrazują różnice i podobieństwa między mechanizmami komórkowymi występującymi w komórkach serca gryzoni i ludzi w czasie hodowli na matach nanowłóknistych różnych typów. Dodatkowo, uzyskane wyniki wskazują, w jaki sposób hodowle na matach nanowłóknistych wpływają na funkcjonowanie komórek serca.

Obecnie prowadzone są badania nad zastosowaniem mat nanowłóknistych (np. z PCL, PU, PLLA) w hodowli komórek i analizie tego w jaki sposób struktura, kompozyt materiałów i modyfikacja nanowłókien wpływają na adhezję, żywotność, ułożenie i morfologię komórek serca [98], [106], [134]. W warunkach *in vivo* maty nanowłókniste z PCL ulegają szybszej biodegradacji i nie powodują powstawania stanów zapalnych. Z kolei maty z PU mają wyższą

wytrzymałość na rozciąganie i odporność na degradację [135]. Obydwa materiały wykazują właściwości hydrofobowe, dlatego najczęściej stosuje się je w kompozytach lub poddaje modyfikacji powierzchniowej np. za pomocą plazmy tlenowej oraz roztworów białek, takich jak żelatyna, fibronektyna czy poli-L-lizyna [123], [124]. Należy podkreślić, że niewiele badań porównuje wpływ mat nanowłóknistych o różnych właściwościach fizykochemicznych na funkcjonowanie komórek serca [91], [98], [106]. W badaniach prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wykorzystano maty nanowłókniste z równolegle ułożonymi nanowłóknami z syntetycznego polimeru, takiego jak PCL lub takiego jak PU. Maty wytworzono metodą rozdmuchu roztworu z polimeru (SBS).

W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem komórek H9c2, HCM i HL-1 zauważono, że średnica nanowłókien oraz biomateriał z jakich wykonano maty nanowłókniste mają wpływ na morfologię i fizjologię komórek serca. Żywotność komórek hodowanych na matach nanowłóknistych różniła się zdecydowanie w zależności od badanej linii komórkowej. Dla hodowli H9c2 największą żywotność komórek zaobserwowano na matach nanowłóknistych PCL (1), dla HL-1 na PCL (2), a dla HCM na PU (2). Badane linie komórkowe różnią się proliferacją co może wpływać na uzyskane wyniki żywotności. H9c2 to komórki embrionalne, HL-1 to komórki uniesmiertelnione, które mają nieograniczoną możliwość do proliferacji, a HCM to komórki pierwotne, których proliferacja zatrzymuje się po ograniczonej liczbie podziałów komórkowych [118]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że komórki serca hodowane na matach nanowłóknistych z PCL i PU charakteryzują się wysoką żywotnością, co wskazuje, że mogą być stosowane do hodowli różnych typów komórek serca [106], [132].

Dodatkowo wykazano, że równoległe ułożenie nanowłókien stymuluje komórki (zarówno H9c2, HL-1, HCM jak i iPSC-CM) do równoległego ułożenia względem siebie. W rezultacie wszystkie badane typy komórek przyjmują wydłużony kształt, który jest bardziej zbliżony do kształtu kardiomiocytów w warunkach *in vivo* [94], [114], [132], [136], [137]. Z kolei komórki hodowane na płytkach polistyrenowych były rozmieszczone losowo i nie miały wydłużonego kształtu. W oparciu o uzyskane wyniki, można stwierdzić, że pomimo iż maty nanowłókniste z PU mają większy odsetek włókien ułożonych pod tym samym kątem niż maty nanowłókniste z PCL to, jednak dla większości hodowli, komórki miały morfologię bliższą dorosłym kardiomiocytom w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL. W pracy określono również wpływ porowatości mat nanowłóknistych (porowatość nanowłókien: PCL (1) > PU (1) > PCL (2) ~ PU (2)) na funkcjonowanie komórek serca.

Zaobserwowano, że maty nanowłókniste o mniejszej porowatości miały większy wpływ na dojrzewanie badanych komórek serca niż te o większej porowatości. Materiały nanowłókniste wykorzystywane w modelach komórkowych *in vitro* naśladujące tkankę serca i opisywane dotychczas w literaturze mają szeroki zakres elastyczności [65], [125]. W ramach niniejszej pracy wykorzystano maty nanowłókniste o różnej elastyczności: PCL (1) > PCL (2) ~ PU (1) > PU (2) (dane przedstawione na rycinie 12). Nie zaobserwowano jednak znaczących różnic w fenotypie komórek serca w zależności od elastyczności zastosowanych mat. Dodatkowo badano, jak rodzaj biomateriału wpływa na stymulację mechanizmów komórkowych powiązanych z dojrzewaniem komórek serca. Zauważono, że komórki wyizolowane z komory serca, takie jak H9c2 i HCM hodowane na matach PCL miały najbardziej zbliżoną morfologię do dorosłych kardiomiocytów jak i indukowały zmiany w ekspresji większości badanych genów świadczącą o dojrzewaniu. Z kolei komórki izolowane z przedsionka serca, takie jak HL-1, wykazywały bardziej anizotropowy i wrzecionowaty kształt w hodowlach na matach nanowłóknistych z PU, jednak zmiany w ekspresji genów świadczących o dojrzewaniu obserwowano zarówno w hodowlach prowadzonych na matach z PCL i z PU. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że morfologia komórek serca hodowanych na matach nanowłóknistych o średnicy ok. 500 nm była bardziej podobna do morfologii dorosłych kardiomiocytów niż na matach nanowłóknistych o średnicy ok. 250 nm. W związku z tym, do dalszych badań wybrano maty o większej średnicy włókien.

Istotnym elementem pracy było zbadanie możliwości zastosowania wybranych mat nanowłóknistych jako czynnika strukturalnego wpływającego na funkcję kardiomiocytów pochodzących z komórek macierzystych (iPSC-CM). Komórki iPSC-CM pochodzą od wybranego pacjenta, co umożliwia rozwój terapii personalizowanej. W populacji komórek iPSC-CM mogą być dwa rodzaje komórek, te które morfologicznie i fizjologicznie są bliższe kardiomiocytom pochodzącym z komory serca, jak i te, którym bliżej fenotypem jest do kardiomiocytów pochodzącym z przedsionka serca [138]. Są doniesienia literaturowe opisujące badania, w których kardiomiocyty pochodzące z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych hodowano na matach nanowłóknistych różnego typu i wysiewano je w różnych gęstościach [93], [103], [105]. Brakuje jednak informacji czy gęstość wysiewanych komórek ma wpływ na funkcjonowanie iPSC-CM (np. na ich morfologię). W związku z czym przeprowadzono badania, w których sprawdzono czy gęstość wysiewania komórek iPSC-CM i hodowli na matach nanowłóknistych może mieć wpływ na żywotność, morfologię oraz dojrzewanie komórek. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono wysoką żywotność

komórek dla każdej z badanych gęstości komórek. Z kolei analiza morfologii i ułożenia komórek, wskazała, że komórki miały najbardziej wydłużony i wrzecionowaty kształt na matach nanowłóknistych po wysianiu w gęstościach; 2×10^5 komórek/cm² i $2,5 \times 10^5$ komórek/cm².

W ramach przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że badane biomateriały mogą stanowić czynnik strukturalny wpływający na zmianę morfologii, ekspresji genów i poziomu białek związanych z dojrzewaniem komórek serca. Niemniej jednak trudno jest jednoznacznie określić, które maty nanowłókniste są bardziej odpowiednie do hodowli danego typu komórek serca. Zgodnie z literaturą, może to wynikać z różnic między typem komórek i rodzajem zastosowanych biomateriałów. Na przykład, komórki pochodzące z komory serca wymagają biomateriałów, które będą bardziej elastyczne, np. takich jak PCL, podczas gdy do hodowli komórek przedsionkowych mogą być stosowane materiały o większej sztywności, np. takich jak PU [124], [139]. Komórki z komory i przedsionka serca mają inną elektrofizjologię i potencjał błonowy, z tego powodu biomateriały PU i PCL różniące się powierzchniowymi grupami funkcyjnymi mogą oddziaływać odmiennie na fizjologię komórek [139]. Uzyskane w ramach tej części pracy wyniki wspomagają badania nad poznaniem różnic w hodowli kardiomiocytów pochodzących z różnych gatunków hodowanych na biomateriałach.

Podsumowując, w ramach tego etapu badań wykazano, że właściwości fizykochemiczne mat nanowłóknistych takie jak średnica, materiał, równoległe ułożenie włókien oraz porowatość mają wpływ na dojrzewanie i funkcjonowanie komórek serca zarówno dla komercyjnie dostępnych linii komórkowych (H9c2, HL-1, HCM), jak i dla kardiomiocytów pochodzących z komórek macierzystych (iPSC-CM) w krótko- i długoterminowej hodowli. Hodowle prowadzone na matach nanowłóknistych z PCL i PU wszystkich badanych linii komórkowych charakteryzują się wysoką żywotnością. Ponadto, komórki wykazywały bardziej wydłużony, anizotropowy kształt na matach o włóknach z większą średnicą i o mniejszej porowatości. Maty nanowłókniste z PCL i PU wpływają na różne procesy związane z dojrzewaniem kardiomiocytów. Zastosowanie mat nanowłóknistych jako czynników strukturalnych umożliwiło uzyskanie dojrzalszych fenotypowo komórek serca niż w standardowej hodowli prowadzonej na płytkach polistyrenowych. Wyniki przedstawione w tym rozdziale mogą pomóc w dalszych badaniach nad znalezieniem odpowiedniego modelu *in vitro* dla dojrzałej ludzkiej tkanki serca. Wyniki badań przedstawione w powyższym rozdziale stały się przedmiotem 2 publikacji naukowych [140], [141].

3.3. Badanie niedotlenienia komórek serca hodowanych na matach nanowłóknistych

W poprzednim etapie badań sprawdzono możliwość zastosowania różnego typu mat nanowłóknistych do hodowli komórek serca oraz określono wpływ właściwości fizykochemicznych mat na fizjologię i morfologię komórek serca. Potwierdzono, że maty nanowłókniste oddziałują na funkcjonowanie komórek serca i możliwe jest opracowanie modelu *in vitro*, który jest bliższy strukturalnie i funkcjonalnie do natywnej tkanki serca niż hodowle prowadzone na płytkach polistyrenowych. Na podstawie doniesień literaturowych badania funkcjonowania kardiomiocytów w czasie i po niedotlenieniu są istotne, ponieważ niedotlenienie jest główną przyczyną obumierania komórek serca. Zrozumienie odpowiedzi kardiomiocytów na hipoksję pozwala na opracowanie efektywniejszych metod leczenia i ochrony mięśnia sercowego przed uszkodzeniami związanymi z hipoksją. Z tego powodu w kolejnym etapie badań sprawdzono funkcjonowanie ludzkich kardiomiocytów hodowanych w warunkach hipoksji na matach nanowłóknistych. Założono, że stosowane modele z powodzeniem będą mogły być zastosowane do badania niedotlenienia.

W tej części badań zastosowano kardiomiocyty ludzkie różniące się morfologią, fizjologią i źródłem pochodzenia: komercyjnie dostępną linię komórkową pierwotnych kardiomiocytów (HCM) oraz kardiomiocyty uzyskane poprzez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM). Komórki hodowano na matach nanowłóknistych z PCL i PU o średnicy ok. 500 nm i analizowano ich funkcjonowanie w warunkach niedotlenienia. Dodatkowo, przeprowadzono analizę komórek poddanych hipoksji i reoksygenacji (H/R).

3.3.1. Ocena wpływu hipoksji i hipoksji z reoksygenacją na ludzkie kardiomiocyty

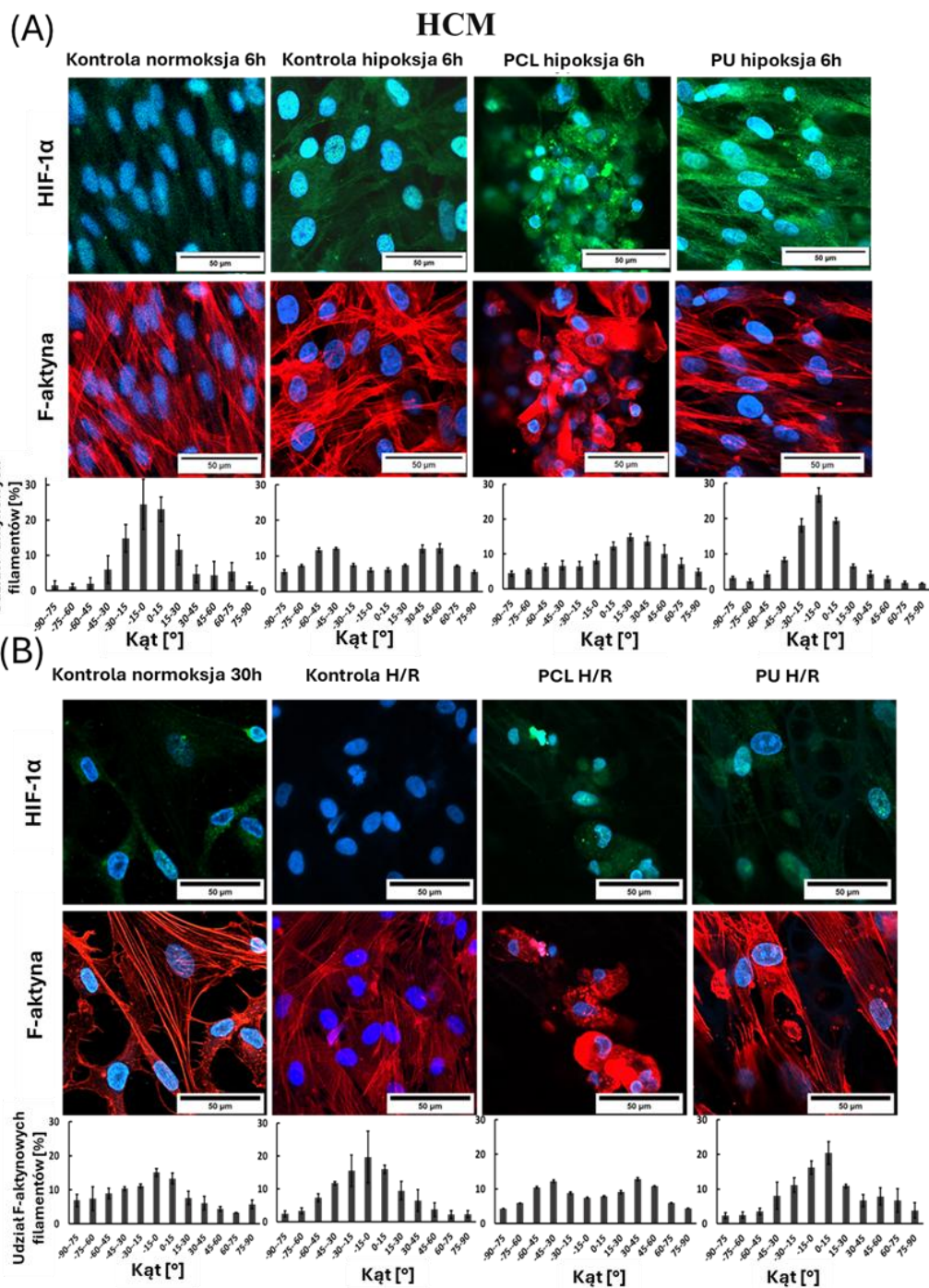
W celu sprawdzenia i porównania odpowiedzi ludzkich kardiomiocytów na niedotlenienie i H/R hodowanych na matach nanowłóknistych z PCL i PU oraz na płytkach polistyrenowych (kontrola) badano poziom białka HIF-1 α . Białko to, jest kluczowym regulatorem odpowiedzi komórkowej na niedotlenienie. Dodatkowo, analizowano ułożenie filamentów aktynowych (F-aktynę) budujące sarkomery w cytoszkielecie kardiomiocytów. Dla dojrzałych i zdrowych kardiomiocytów charakterystyczne są filamenty aktynowe ułożone równolegle, w uporządkowany sposób [142].

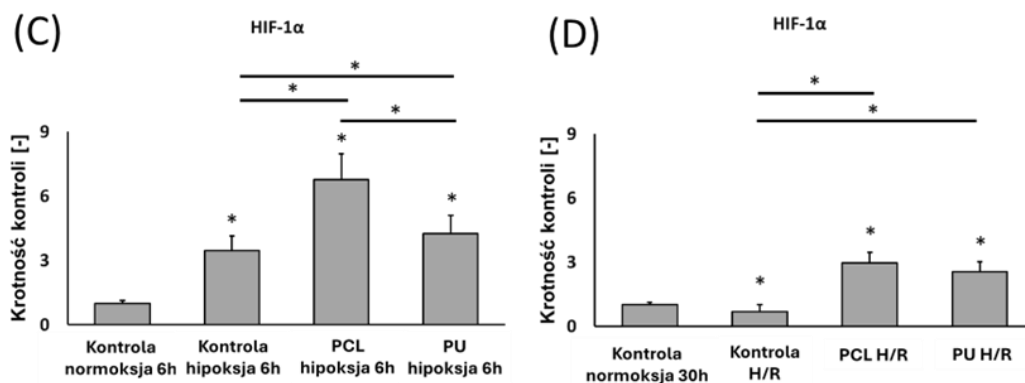
W ramach przeprowadzonych badań wykazano, że komórki HCM hodowane na płytkach polistyrenowych w warunkach normoksji miały równolegle ułożone filamenty aktynowe (74 % filamentów aktynowych ułożonych było w zakresie kąta od -30° do +30°)

(Ryc. 25 A). Natomiast, komórki hodowane na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PCL i PU poddane hipoksji miały zaburzoną strukturę cytoszkieletu, w tym najbardziej dla hodowli na matach nanowłóknistych z PCL (27 % filamentów aktynowych ułożonych było w zakresie kąta od -30° do $+30^{\circ}$). Ponadto, hipoksja komórek HCM spowodowała podwyższenie poziomu białka HIF-1 α (3,5-krotnie dla kontroli po hipoksji, 6,8 - krotnie dla hodowli na matach z PCL i 4,3-krotnie dla hodowli na matach z PU w porównaniu do poziomu HIF-1 α w komórkach hodowanych w warunkach normoksji) (Ryc. 25). Wyniki te sugerują, że komórki HCM hodowane na matach nanowłóknistych z PCL są bardziej wrażliwe na warunki niedotlenienia (Ryc. 25 A).

Istnieją badania, które wskazują, że ponowne dostarczenie tlenu (reoksygenacja) po niedotlenieniu ma kluczowy wpływ na uszkodzenia komórek serca [32], [35], [143]. W związku z tym zbadano wpływ reoksygenacji na funkcję ludzkich kardiomiocytów w modelach 2D (hodowla na płytkach polistyrenowych) i 3D (hodowla na matach nanowłóknistych). W hodowlach komórek HCM prowadzonych na matach nanowłóknistych z PU i na płytce polistyrenowej w warunkach H/R zaobserwowano nieznaczne zaburzenia ułożenia włókien F-aktyny. Z kolei komórki hodowane na matach nanowłóknistych z PCL po H/R charakteryzowały się zaburzeniem równoległego ułożenia włókien aktynowych. Ponadto zaobserwowano różnice w poziomie białka HIF-1 α zarówno dla komórek hodowanych na płytkach polistyrenowych, jak i na matach nanowłóknistych po H/R w porównaniu do hodowli w normoksji. Poziom białka HIF-1 α jest niższy dla hodowli PS, podczas gdy dla hodowli na matach nanowłóknistych z PCL i PU zaobserwowano wzrost. Może to wskazywać na to, że maty nanowłókniste spowalniają przepływ tlenu do komórek, wpływając na poziom białka HIF-1 α w kardiomiocytach.

Porównując wyniki uzyskane po hipoksji i H/R, zaobserwowano, że poziom HIF-1 α był znacznie niższy dla H/R. W przypadku komórek HCM hodowanych na matach nanowłóknistych z PCL, obserwowano zaburzoną strukturę włókien F-aktynowych w hodowlach po niedotlenieniu i H/R. Z kolei, w komórkach HCM hodowanych na płytkach polistyrenowych oraz matach z PU zarówno w warunkach hipoksji i po H/R obserwowano równoległe ułożenie filamentów aktynowych, podobnie jak w warunkach normoksji.





Rycina 25 (A, B) Zdjęcia wybarwionych komórek HCM: białko F-aktyny (wybarwione na kolor czerwony), HIF-1 α (wybarwiono na kolor zielony) oraz jądra komórkowe (wybarwione na kolor niebieski) hodowanych na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU w warunkach normoksji (21 % O₂), (A) 6 h hipoksji (1 % O₂) i (B) 6 h hipoksji + 24 h reoksygenacji. Pod zdjęciami znajdują się wykresy przedstawiające ułożenie filamentów aktynowych względem siebie w tych hodowlach. Rozkład kąta odchylenia włókien od założonego ukierunkowania dla włókien aktynowych oceniony przy użyciu oprogramowania ImageJ. Poziom białka HIF-1 α w komórkach HCM po (C) hipoksji i (D) po hipoksji + reoksygenacji (H/R) zbadany na podstawie względnej intensywności fluorescencyjnej. *- $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontroli hodowanej w warunkach normoksji, —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. $n \geq 3$. Skala 50 μ m.

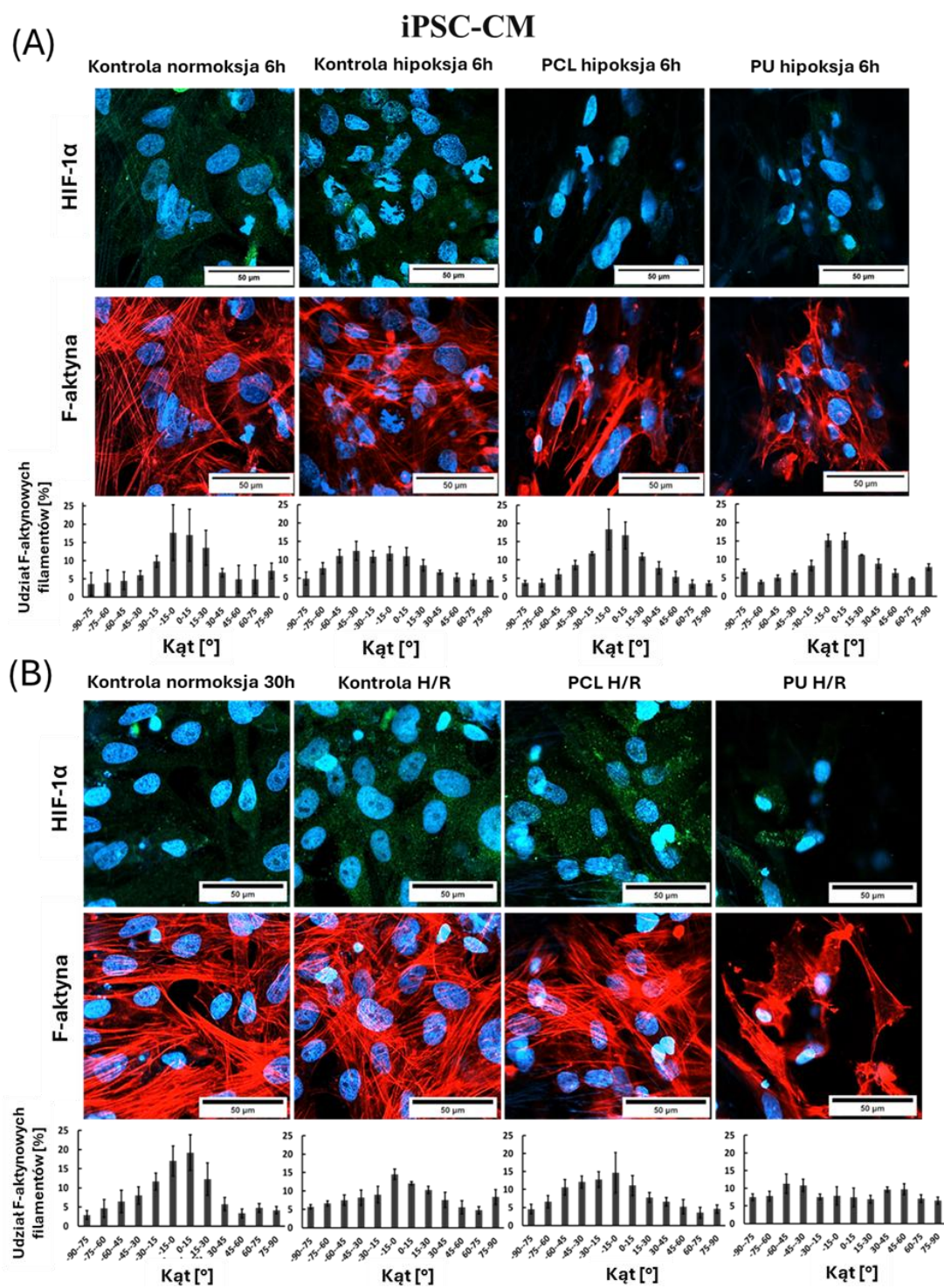
Analogiczne badania przeprowadzono z wykorzystaniem komórek iPSC-CM, aby porównać odpowiedź na poziomie komórkowym dwóch typów ludzkich kardiomiocytów po niedotlenieniu i H/R. Metabolizm iPSC-CM podobnie jak kardiomiocytów płodowych oparty jest głównie na beztlenowej glikolizie, w związku z czym są bardziej odporne na niedotlenienie niż dojrzałe kardiomiocyty [144]. Zatem, ich odpowiedź na niedotlenienie i H/R może być inna niż w przypadku komórek HCM.

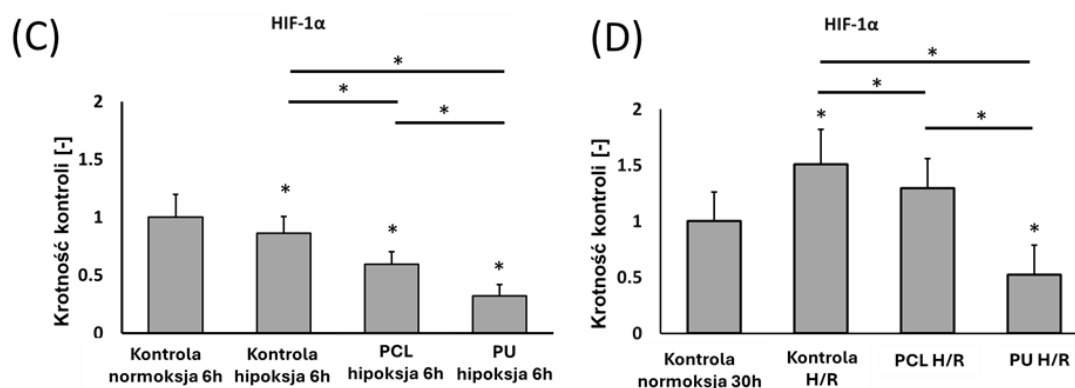
Barwienie F-aktyny i HIF-1 α w komórkach iPSC-CM przedstawiono na rycinie 26 A i B. W przypadku komórek hodowanych na płytce polistyrenowej w warunkach normoksji zaobserwowano większy odsetek równolegle ułożonych filamentów aktynowych (58 % filamentów aktynowych ułożonych jest w zakresie kąta od -30° do +30°), w porównaniu do komórek poddanych hipoksji na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PU (dla PS 42 %, dla PU 50 % filamentów aktynowych ułożonych w zakresie kąta od -30° do +30°). Może to wskazywać na uszkodzenie komórek hodowanych w warunkach niedotlenienia. Z kolei, dla hodowli iPSC-CM prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL po niedotlenieniu nie zauważono zwiększonych zaburzeń w ułożeniu filamentów aktynowych (dla PCL 57 % filamentów aktynowych ułożonych jest w zakresie kąta od -30° do +30°). Zauważono spadek poziomu czynnika HIF-1 α w komórkach iPSC-CM poddanych hipoksji, w porównaniu do hodowli prowadzonej w warunkach normoksji (Ryc. 26 C).

W kolejnym etapie badań przeprowadzono hodowlę komórek iPSC-CM w warunkach hipoksji i reoksygenacji (H/R). W tym przypadku komórki hodowane na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PCL wykazywały większy odsetek filamentów aktynowych ułożonych pod tym samym kątem (równolegle ułożone) podczas gdy dla komórek hodowanych na matach nanowłóknistych z PU wzrósł odsetek nieuporządkowanych filamentów

(29 % filamentów aktynowych ułożonych jest w zakresie kąta od -30° do $+30^{\circ}$). Ponadto, zaobserwowano wzrost poziomu czynnika HIF-1 α dla komórek po H/R hodowanych na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PCL (dla hodowli na płytkach 1,5 - krotny, a dla PCL 1,3-krotny) w porównaniu do kontroli (Ryc. 26 D). W przypadku komórek iPSC-CM hodowanych na matach nanowłóknistych z PU, również obserwowano wzrost poziomu HIF-1 α po H/R w porównaniu do tego samego typu hodowli po hipoksji. Jednak był on znacznie niższy niż poziom tego białka w komórkach utrzymywanych w warunkach normoksji. Porównując wyniki dla komórek iPSC po hipoksji i H/R nie stwierdzono istotnych różnic w ułożeniu włókien aktynowych w komórkach. Natomiast poziom białka HIF-1 α zmieniał się znacząco w zależności od podłoża i warunków prowadzenia hodowli. Zaobserwowano wzrost poziomu białka HIF-1 α po H/R na matach nanowłóknistych, w porównaniu do hodowli po samej hipoksji, jednak brakuje jednoznacznego wyjaśnienia tego mechanizmu dla komórek iPSC-CM w modelach 3D *in vitro*.

Porównując funkcjonowanie komórek HCM i iPSC-CM hodowanych na matach nanowłóknistych, zauważono uszkodzenia filamentów aktynowych po niedotlenieniu i H/R, jednak dezorganizacja ułożenia włókien F-aktyny różni się w zależności od rodzaju hodowli i zastosowanych mat nanowłóknistych. Wykazano, że struktura filamentów aktynowych była najbardziej zaburzona dla komórek HCM hodowanych na matach z PCL, podczas gdy dla komórek iPSC-CM w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU. Ponadto, komórki HCM i iPSC-CM różnią się zmianami na poziomie białka HIF-1 α , co może wynikać z odmiennej fizjologii komórek i ich odpowiedzi na niedotlenienie i hodowlę w modelu 3D.





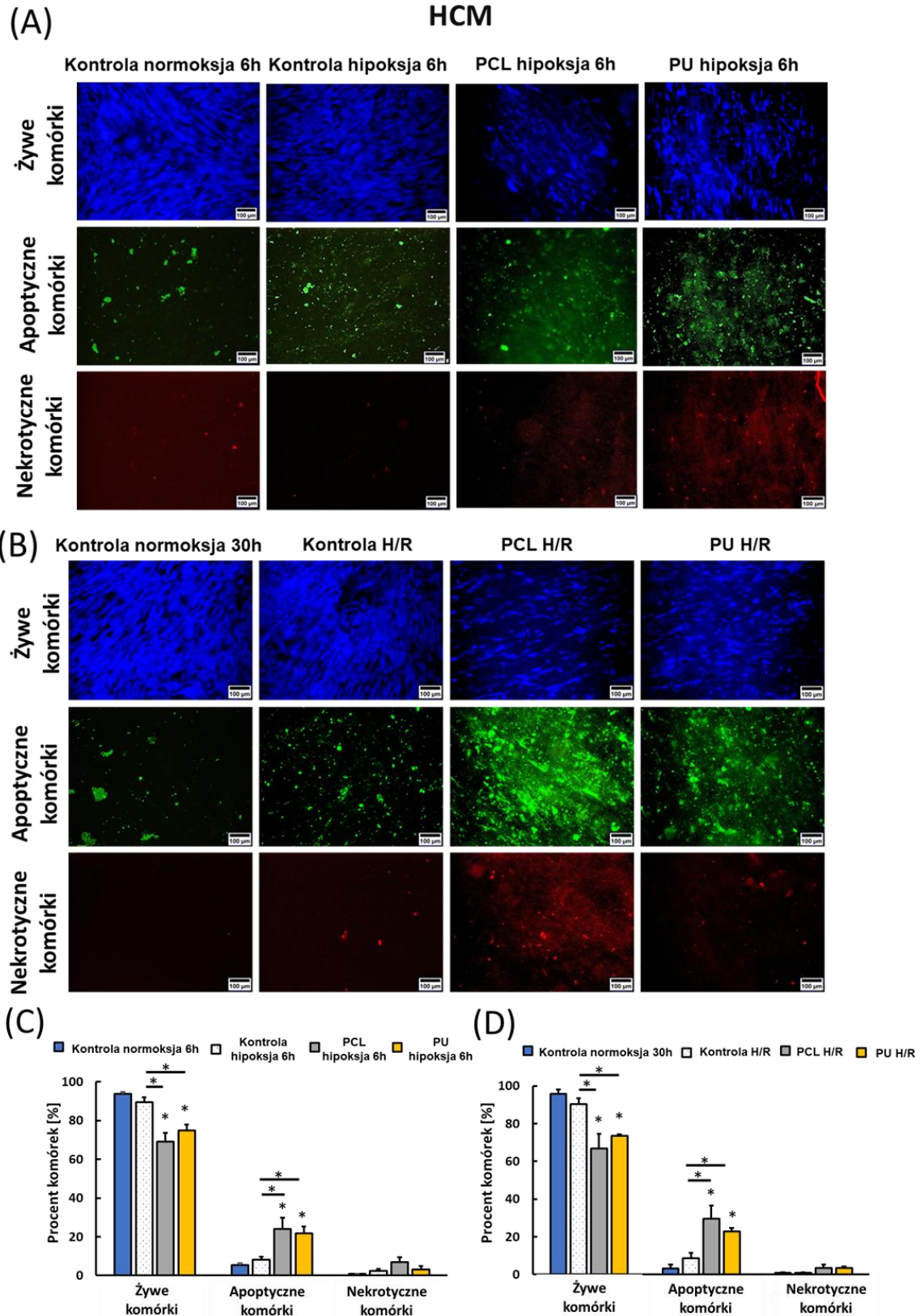
Rycina 26 (A, B) Zdjęcia wybarwionych komórek iPSC-CM: białko F-aktyny (wybarwione na kolor czerwony), HIF-1α (wybarwione na kolor zielony) oraz jądra komórkowe (wybarwione na kolor niebieski) hodowanych na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU w warunkach normoksji (21 % O₂), (A) 6 h hipoksji (1 % O₂) i (B) 6 h hipoksji + 24 h reoksygenacji. Pod zdjęciami znajdują się wykresy przedstawiające ułożenie filamentów aktynowych względem siebie w tych hodowlach. Rozkład kąta odchylenia włókien od założonego ukierunkowania dla włókien aktynowych oceniony przy użyciu oprogramowania ImageJ. Poziom białka HIF-1α w komórkach iPSC-CM po (C) hipoksji i (D) po hipoksji + reoksygenacji (H/R) zbadany na podstawie względnej intensywności fluorescencyjnej. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontrolnej hodowanej w warunkach normoksji, —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. $n \geq 3$. Skala 50 μm .

Zaburzenia F-aktyny mogą wskazywać, że kardiomiocyty ulegają śmierci apoptycznej. W celu potwierdzenia tej hipotezy zbadano odsetek komórek żywych, apoptycznych i nekrotycznych. Hodowla komórek HCM w warunkach niedotlenienia lub niedotlenienia z reoksygenacją spowodowała znaczny wzrost liczby komórek apoptycznych w hodowlach prowadzonych na matach nanowłóknistych (Ryc. 27). Procent apoptycznych komórek HCM wynosił 5,3 % dla hodowli prowadzonej na płytkach PS w warunkach normoksji. Z kolei w hodowli prowadzonej w warunkach hipoksji wynosił on kolejno: 8,1 % dla hodowli na płytkach PS, 24,0 % dla hodowli na matach z PCL, 21,8 % dla hodowli na matach nanowłóknistych z PU (Ryc. 27 C). Z kolei w badaniach dotyczących analizy hipoksji i reoksygenacji procent apoptycznych komórek HCM wynosił: 3,2 % dla hodowli prowadzonej na płytkach PS w warunkach normoksji, 8,6 % dla komórek po H/R hodowanych na płytkach PS, 29,6 % dla hodowli po H/R prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL, 23 % dla hodowli po H/R prowadzonej na matach z PU (Ryc. 27 D).

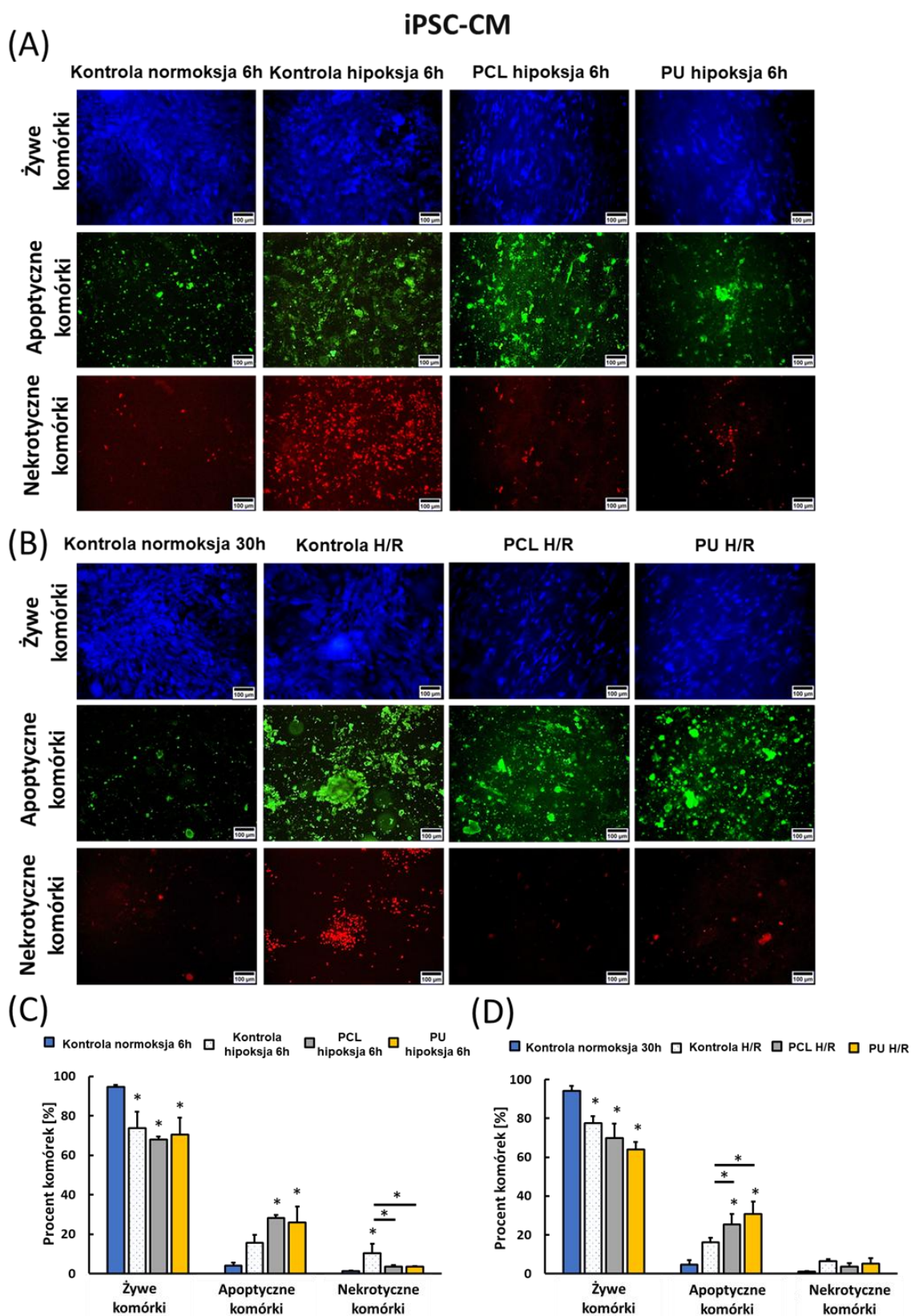
Komórki iPSC-CM są niedojrzałymi kardiomiocytami, które mogą być mniej wrażliwe na warunki beztlenowe i jednocześnie ulegać w większym stopniu śmierci nekrotycznej w porównaniu do dorosłych kardiomiocytów [120], [145]. Hodowla iPSC-CM na płytkach polistyrenowych w warunkach niedotlenienia spowodowała wzrost liczby komórek nekrotycznych (10,5 %) (Ryc. 28 A). W przypadku hodowli prowadzonych na matach nanowłóknistych z PCL i PU nekrozie uległo 3,6 % komórek. Zauważono, że w hodowlach

komórek iPSC-CM na matach nanowłóknistych po hipoksji i H/R był znacznie niższy odsetek komórek nekrotycznych w porównaniu do hodowli na płytkach PS poddanych hipoksji i H/R. Podobnie jak w przypadku komórek HCM, zauważono wzrost liczby apoptycznych komórek iPSC-CM hodowanych w warunkach niedotlenienia (wynosił on 15,7 %, 28,3 % i 25,9 % dla hodowli prowadzonej odpowiednio na płytkach PS, na matach z PCL i na matach z PU) w porównaniu z hodowlą prowadzoną w warunkach normoksji na płytkach PS (4,1 %) (Ryc. 28 A i C). W przypadku badań z wykorzystaniem H/R, liczba apoptycznych komórek iPSC-CM wynosiła 4,7 % dla normoksji, 16,1 % dla hodowli na PS po H/R, 25,5 % dla hodowli na matach z PCL po H/R i 30,1 % dla hodowli na matach z PU po H/R (Ryc. 28 B i D). Niedotlenienie indukuje apoptozę dorosłych kardiomiocytów w warunkach *in vivo* [146]. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, że dla hodowli prowadzonych na matach nanowłóknistych zwiększa się liczba komórek ulegających apoptozie po hipoksji i H/R w porównaniu z hodowlą prowadzoną na płytkach polistyrenowych.

Zaobserwowano, że zarówno w hodowli komórek HCM jak i iPSC-CM prowadzonych na matach nanowłóknistych poddanych hipoksji i hipoksji z reoksygenacją wzrasta liczba komórek apoptycznych w porównaniu do hodowli prowadzonej na płytkach polistyrenowych. Dodatkowo, w hodowlach po H/R zaobserwowano wyższy odsetek komórek apoptycznych w porównaniu do hodowli poddanych hipoksji, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie.



Rycina 27 Wyniki oznaczenia typu śmierci komórkowej dla linii komórkowej HCM po 6 h hipoksji (A, C) lub hipoksji z reoksygenacją (6/24 h) (B, D) hodowanych na matach nanowłóknistych z PCL i PU oraz na płytkach polistyrenowych (kontrola poddana hipoksji lub H/R) w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normoksji. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu z kontrolą hodowaną w warunkach normoksji, — * - $p < 0,05$ istotne różnice pomiędzy grupami. $n \geq 3$. Skala 100 μm .



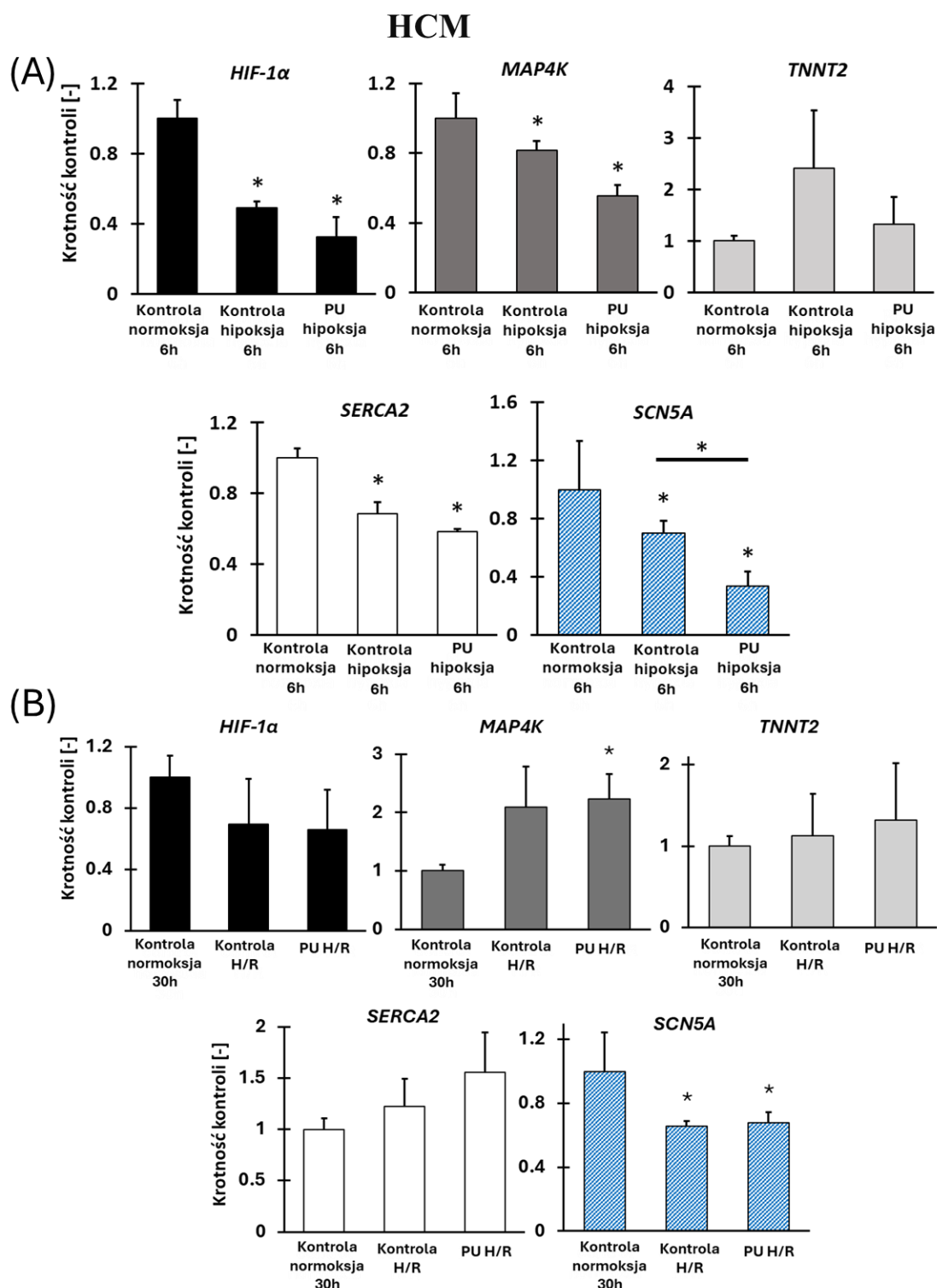
Rycina 28 Wyniki oznaczenia typu śmierci dla komórek iPSC-CM po 6 h hipoksji (A, C) lub hipoksji z reoksygenacją (6/24 h) (B, D) hodowanych na matach nanowłóknistych z PCL i PU oraz na płytkach polistyrenowych (kontrola poddana hipoksji lub H/R) w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normoksji. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu z kontrolą normoksji, —* - $p < 0,05$ statystycznie istotne różnice między grupami. $n \geq 3$. Skala 100 μm .

W celu sprawdzenia i porównania zmian w funkcjonowaniu ludzkich kardiomiocytów poddanych hipoksji oraz H/R hodowanych na matach nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych (kontrola) przeprowadzono analizę ekspresji genów; czynnika indukowanego niedotlenieniem 1-alfa (*HIF-1α*), kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 4 (*MAP4K*), *TNNT2*, *SERCA2* i *SCN5A*. Wybrane geny związane są między innymi ze zmianami i zaburzeniami zachodzącymi w CM spowodowanymi niedotlenieniem. Zmiany w ekspresji *HIF-1α* są odpowiedzią kardiomiocytów na niedotlenienie i są zaangażowane w wyzwalanie szeregu procesów patofizjologicznych [147]; *MAP4K* jest odpowiedzialny za regulację stresu oksydacyjnego, indukcję stanu zapalnego i śmierć komórki [148]; *TNNT2* reguluje skurcze kardiomiocytów [149], zmiany w ekspresji genów kodujących kanały jonowe (takie jak *SCN5A* i *SERCA2*) mogą wskazywać na zaburzenia potencjału błonowego [58], [150]. Do tego i dalszych etapów badań zostały wybrane maty nanowłókniste z PU. W hodowli komórkowej prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL izolowano śladowe ilości materiału genetycznego. Może to prowadzić do problemów z detekcją i błędnej interpretacji danych w dalszych etapach RT-PCR, dlatego na tym etapie zrezygnowano z prowadzenia analizy ekspresji genów dla hodowli na matach nanowłóknistych z PCL.

Wykazano, że ekspresja większości badanych genów zmniejszyła się (dla genów *HIF-1α*, *MAP4K*, *SERCA2*, *SCN5A*) dla hodowli komórek HCM po hipoksji (Ryc. 29 A) w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normoksji. Dodatkowo, największy spadek ekspresji *HIF-1α*, *MAP4K*, *SERCA2* i *SCN5A* zaobserwowano w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU. W przypadku genu *TNNT2*, jego ekspresja wzrosła 2,4 - krotnie dla hodowli prowadzonej na płytkach polistyrenowych i 1,3-krotnie dla hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU poddanych hipoksji w porównaniu do hodowli prowadzonej w warunkach normoksji.

Analogiczne badania przeprowadzono dla hodowli HCM poddanych hipoksji i reoksygenacji. W tym przypadku ekspresja *TNNT2*, *MAP4K* oraz *SERCA2* była wyższa dla hodowli komórek prowadzonej na matach nanowłóknistych PU w porównaniu do hodowli na płytkach PS prowadzonej zarówno w warunkach normoksji jak i H/R. Jednak ekspresja genu *TNNT2* dla hodowli po H/R na matach nanowłóknistych PU była niższa w porównaniu do hodowli prowadzonej w warunkach niedotlenienia. Na podstawie literatury wzrost ekspresji genu *MAP4K* świadczyć może o zwiększonym stresie oksydacyjnym po H/R [151]. Ekspresja innych genów (*HIF-1α* i *SCN5A*) zmniejszyła się dla hodowli prowadzonej na matach

nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych po H/R w porównaniu do hodowli komórek prowadzonej w warunkach normoksji.

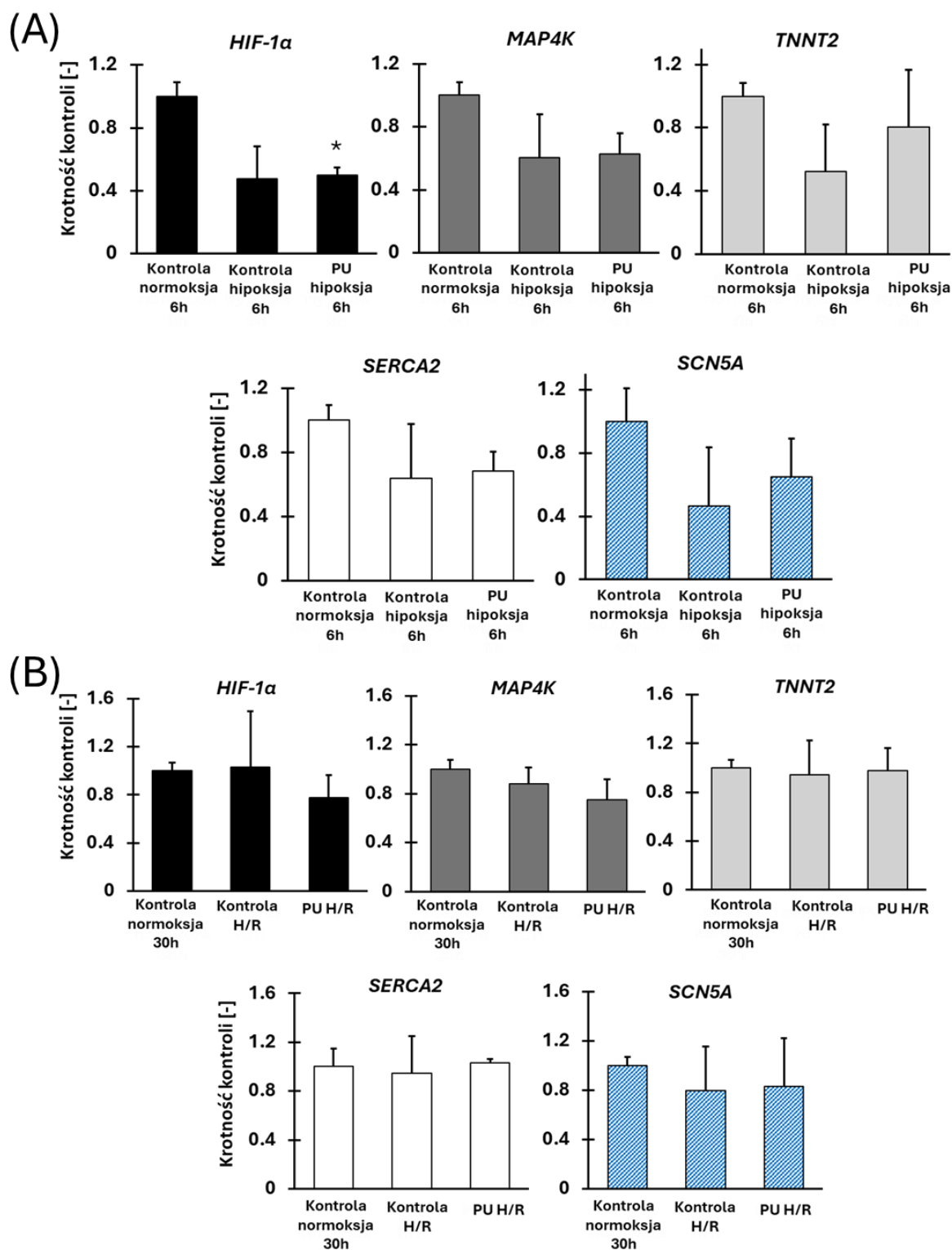


Rycina 29 Analiza ekspresji genów dla komórek HCM hodowanych na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PU w warunkach (A) hipoksji i (B) hipoksji z reoksygenacją dla: HIF-1α, MAP4K, TNNT2, SERCA2 i SCN5A. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola hodowana w warunkach normoksji). —* - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. $n = 3$.

Następnie, przeprowadzono analizę ekspresji genów *HIF-1α*, *MAP4K*, *TNNT2*, *SERCA2* i *SCN5A* dla hodowli niedojrzałych ludzkich kardiomiocytów (iPSC-CM) prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU poddanych hipoksji i H/R (Ryc. 30). Celem tego badania było porównanie funkcjonowania różnych typów kardiomiocytów w modelach 3D, z zastosowaniem mat nanowłóknistych w warunkach niedotlenienia i H/R. Zaobserwowano, że ekspresja wszystkich badanych genów jest niższa dla hodowli prowadzonej w warunkach niedotlenienia na matach nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych w porównaniu do kontroli (normoksja PS). Ekspresja wszystkich badanych genów w hodowlach komórek iPSC-CM na matach nanowłóknistych z PU i na płytkach polistyrenowych poddanych H/R wzrasta w porównaniu do komórek poddanych hipoksji. Poziom ekspresji genów dla kardiomiocytów po H/R jest zbliżony do poziomu ekspresji dla kontroli hodowanych w warunkach normoksji.

Zmiany w ekspresji genów w komórkach iPSC-CM po niedotlenieniu i H/R może być spowodowana tym, że są one mniej wrażliwe na warunki niedotlenienia w porównaniu do dojrzałych kardiomiocytów, co może ograniczać ich odpowiedź komórkową na zmianę warunków hodowli [152]. Ponadto, reoksygenacja może przywracać równowagę metaboliczną i stymulować procesy naprawcze, które prawdopodobnie oddziałują na przywracanie prawidłowego poziomu ekspresji genów sprzed niedotlenienia [145].

iPSC-CM



Rycina 30 Analiza ekspresji genów dla komórek iPSC-CM hodowanych na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PU (A) w warunkach hipoksji i (B) hipoksji z reoksygenacją dla genów *HIF-1α*, *MAP4K*, *TNNT2*, *SERCA2* i *SCN5A*. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola hodowana w warunkach normoksji). $n=3$.

3.3.2. Podsumowanie i dyskusja wyników

W ramach powyższego etapu badań analizowano wpływ hipoksji i hipoksji/reoksygenacji (H/R) na funkcjonowanie kardiomiocytów hodowanych w modelach 3D (na matach nanowłóknistych) i w hodowlach dwuwymiarowych (na płytkach polistyrenowych). W badaniach wykorzystano dwa typy ludzkich komórek serca, komercyjnie dostępną linię pierwotnych ludzkich kardiomiocytów - HCM oraz ludzkie kardiomiocyty uzyskane przez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych - iPSC-CM.

Komórki HCM są pierwotnymi ludzkimi kardiomiocytami, podobnymi do dojrzałych kardiomiocytów pod względem morfologii i fizjologii. Ponadto, metabolizm tych komórek opiera się na utlenianiu kwasów tłuszczowych, a nie na glikolizie, jak w komórkach płodowych [126]. Jednak komórki te nie kurczą się, a ich zastosowanie jest ograniczone ze względu na liczbę pasaży, które można wykonać [21], [118]. Zatem opracowanie protokołu, który umożliwia ich efektywne otrzymanie komórek iPSC-CM umożliwiło nieograniczony dostęp do ludzkich kardiomiocytów bez wzbudzania zastrzeżeń etycznych. Komórki iPSC-CM są coraz częściej wykorzystywane w badaniach nad medycyną regeneracyjną [45], [64], pomimo ich różnic w stosunku do dojrzałych kardiomiocytów. Wykorzystanie iPSC-CM daje szansę na terapię personalizowaną dla wybranego pacjenta [153].

Znane są prace, w których badano odpowiedź komórkową na warunki niedotlenienia i ponownego natlenienia [16]. Przeprowadzono hodowlę i analizę odpowiedzi komórek serca (ludzkich i szympanskich komórek iPSC-CM) w warunkach niedotlenienia i ponownego natlenienia [16]. Odpowiedź komórkowa i ekspresja genów dla kardiomiocytów pochodzących z różnych gatunków poddanych hipoksji z reoksygenacją była zbliżona. Brakuje jednak badań, w których sprawdzono oddziaływanie hipoksji na hodowlę ludzkich kardiomiocytów różniących się morfologią, fizjologią i źródłem pochodzenia (komórki pierwotne vs. komórki zróżnicowane). Celem niniejszych badań było sprawdzenie czy komórki HCM i iPSC-CM wykazują różnice w odpowiedzi na niedotlenienie na matach nanowłóknistych. Dotychczasowe badania potwierdziły, że hodowla komórek serca na matach nanowłóknistych ma wpływ na ich morfologię, stymuluje adhezję i proliferację [88], [91]–[93], dlatego też założono, że mogą wpływać na funkcjonowanie komórek w niedotlenieniu.

Zaobserwowano, że zarówno w komórkach HCM, jak i iPSC-CM poddanych hipoksji, filamenty F-aktyny ulegają dezorganizacji w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych

i płytkach polistyrenowych. Taką samą zależność zaobserwowano w przypadku hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych po H/R. Zgodnie z literaturą, zaburzona organizacja struktury cytoszkieletu dorosłych kardiomiocytów po niedotlenieniu i H/R wskazuje na uszkodzenie komórek [154]. Wzrost poziomu białka HIF-1 α jest konsekwencją obniżonego poziomu tlenu w komórkach i wystąpienia stresu komórkowego [21]. W badaniach przedstawionych w tym rozdziale zaobserwowano wzrost poziomu HIF-1 α w hodowlach HCM prowadzonych na matach nanowłóknistych po hipoksji. Z kolei w przypadku komórek iPSC-CM zaobserwowano spadek poziomu białka HIF-1 α w hodowlach poddanych hipoksji. W literaturze spadek poziomu białka HIF-1 α może być również regulowany przez szlaki niezależne od tlenu [155], [156]. Obniżenie poziomu HIF-1 α tłumaczy się tym, że może być on spowodowany stresem komórkowym wywołanym naprężeniami mechanicznymi podłoża hodowlanego [155]. Na naprężenie mechaniczne może wpływać elastyczność podłoża, na którym hodowane są kardiomiocyty [157]. W badaniu zastosowano maty nanowłókniste z PU i PCL różniące się elastycznością. Hodowla komórkowa iPSC-CM na matach nanowłóknistych z PU o mniejszej elastyczności może powodować wzrost stresu komórkowego związanego z większymi naprężeniami mechanicznymi, co może wpływać na obniżenie poziomu białka HIF-1 α w porównaniu do hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL o większej elastyczności. Na podstawie wyników przedstawionych w powyższym rozdziale zauważono, że w komórkach HCM poddanych niedotlenieniu, poziom białka HIF-1 α różni się od ekspresji genu *HIF-1 α* . Gen *HIF-1 α* ulega aktywacji w warunkach niedotlenienia, jednak jego ekspresja gwałtownie spada po ponownym kontakcie komórek z tlenem [20]. Z kolei białko HIF-1 α pozostaje stabilne dłużej [158], co umożliwiło jego obserwację po wybarwieniu białka w hodowlach komórkowych [20].

Niedotlenienie w dorosłej ludzkiej tkance serca powoduje apoptozę kardiomiocytów [159]. Przeprowadzono badania sprawdzające odsetek komórek żywych, apoptycznych i nekrotycznych. Potwierdzono wzrost liczby komórek apoptycznych HCM i iPSC-CM w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych poddanych niedotlenieniu i H/R w porównaniu do hodowli na płytkach polistyrenowych. Dodatkowo, zaobserwowano niewielki wzrost liczby uszkodzonych komórek po H/R w porównaniu do komórek HCM i iPSC-CM po niedotlenieniu. Może być to wywołane reoksygenacją, która powoduje ponowne dostarczenie tlenu do kardiomiocytów, jednocześnie uruchamiając mechanizmy komórkowe, które wywołują zaburzenia w funkcjonowaniu kardiomiocytów [160]. Z tego powodu komórki HCM po H/R wykazywały wzrost ekspresji genu *MAP4K*, który jest wskaźnikiem stanu

zapalnego w komórce [161]. Ekspresja genu *TNNT2* wzrasta dla komórek HCM po niedotlenieniu, jednak dla iPSC-CM spada. Gen *TNNT2* koduje sercową troponinę T, która reguluje funkcję kardiomiocytów m.in. w warunkach niedotlenienia. Spadek ekspresji genu *TNNT2* w niedojrzałych komórkach iPSC-CM może być wywołany tym, że płodowe kardiomiocyty jako główny szlak pozyskania energii przyjmują glikolizę beztlenową, co powoduje zmniejszoną ekspresję sercowej troponiny T [162]. Z kolei, dojrzałe kardiomiocyty, wykorzystują fosforylację oksydacyjną jako źródło energii i poziom sercowej troponiny T podczas hipoksji wzrasta [162] – tak było również w przypadku komórek HCM. W wyniku niedotlenienia serca aktywowane są szlaki metaboliczne, które zmniejszają zapotrzebowanie na tlen i chronią kardiomiocyty przed negatywnymi skutkami jego braku [27]. Dłuższy brak tlenu może powodować zmniejszenie aktywności dehydrogenazy pirogronianowej, co z kolei powoduje konwersję pirogronianu do mleczanu [19]. Nagromadzenie mleczanu w kardiomiocytach wiąże się z zakwaszeniem środowiska komórkowego, co prowadzi do zaburzeń wiązania wapnia z troponiną. Tlen jest niezbędny do przeżycia komórek, ale reoksygenacja wywołuje również zmiany, które mogą negatywnie wpływać na funkcjonowanie kardiomiocytów np. przyczynia się do akumulacji w komórkach serca, jonów Na^+ zamiast H^+ . To aktywuje pompy odpowiedzialne za wymianę jonów Na^+ na Ca^{2+} . Zmiany te powodują destabilizację w transporcie jonów co skutkuje zaburzeniami potencjału błonowego. Może to indukować spadek poziomu ekspresji *SCN5A* [58]. Z kolei ekspresja genu *SERCA2* (kodujący białko odpowiedzialne za przenoszenie jonów wapnia z cytozolu do retikulum sarkoplazmatycznego) spada podczas niedotlenienia serca (również powodująca akumulację Ca^{2+}). Przywrócenie dostępności tlenu do komórek zwiększa ekspresję tego genu, zapobiegając rozwojowi zaburzeń związanych z kurczeniem i rozkurczaniem się CM [150].

Przeprowadzone badania potwierdziły, że zarówno pierwotne komórki HCM, jak i niedojrzałe komórki iPSC-CM wykazują różne mechanizmy adaptacyjne do warunków hipoksji i reoksygenacji. Niedotlenienie komórek HCM, które zostały wyizolowane z tkanki serca dorosłego człowieka, aktywują szlaki zapalne i metaboliczne umożliwiające przetrwanie. Z kolei komórki iPSC-CM, ze względu na swój niedojrzały fenotyp i odmienny metabolizm, wykazują mniejszą wrażliwość na niedotlenienie, co skutkuje zmniejszoną ekspresją genów związanych z funkcją kardiomiocytów. Jednocześnie komórki te ulegają w większym stopniu śmierci nekrotycznej w porównaniu do dorosłych kardiomiocytów. Wykazano, że maty nanowłókniste wpływają na funkcjonowanie ludzkich kardiomiocytów HCM i iPSC-CM hodowanych w warunkach niedotlenienia oraz niedotlenienia z reoksygenacją. Zastosowanie

mat nanowłóknistych w modelach 3D *in vitro* umożliwia badanie niedotlenienia. Uzyskane wyniki potwierdziły, że odpowiedź komórkowa kardiomiocytów hodowanych na matach nanowłóknistych różni się od hodowli na płytkach polistyrenowych i może być zbliżona do odpowiedzi kardiomiocytów w warunkach *in vivo*. Podsumowując, w ramach powyższych badań uzyskano modele *in vitro* oparte na wykorzystaniu mat nanowłóknistych, w których porównano funkcjonowanie dwóch typów ludzkich kardiomiocytów hodowanych w warunkach niedotlenienia i H/R. Badania te mogą wspierać opracowanie modeli *in vitro*, które będą naśladować funkcjonowanie ludzkiej tkanki serca w patofizjologicznych warunkach. Wyniki badań przedstawione w powyższym rozdziale stały się przedmiotem publikacji naukowej [118].

3.4. Badanie wpływu mat nanowłóknistych na regenerację ludzkich kardiomiocytów po hipoksji z wykorzystaniem komórek macierzystych

Na podstawie wyników uzyskanych we wcześniejszych badaniach potwierdzono, że maty nanowłókniste wpływają na funkcjonowanie komórek serca poddanych niedotlenieniu. Dodatkowo, zaobserwowane zmiany w odpowiedzi ludzkich kardiomiocytów hodowanych na matach mogły być bardziej podobne do odpowiedzi komórkowej na niedotlenienie w warunkach *in vivo* niż hodowle na płytkach polistyrenowych. Na podstawie badań przedstawionych w literaturze, kardiomiocyty mają znikomą możliwość do proliferacji. Powoduje to, że w przypadku choroby serca w większości spowodowanych niedotlenieniem (np. zawał serca) uszkodzone CM zastępowane są fibroblastami, co z kolei przyczynia się do utworzenia tkanki bliznowatej, która ogranicza zdolność serca do prawidłowego funkcjonowania i skurczu [3], [12]. Z tego powodu badania nad regeneracją uszkodzonych kardiomiocytów mają szczególne znaczenie kliniczne.

Celem niniejszego badania było przeprowadzenie współhodowli ludzkich kardiomiocytów poddanych działaniu hipoksji wraz z komórkami macierzystymi na matach nanowłóknistych. W tym celu zastosowano wcześniej wybrane maty z poliuretanu. Założono, że maty nanowłókniste stanowią mogą czynnikiem strukturalny wpływający stymulująco na regenerację ludzkich kardiomiocytów w hodowli z komórkami macierzystymi.

3.4.1. Współhodowla kardiomiocytów z komórkami macierzystymi

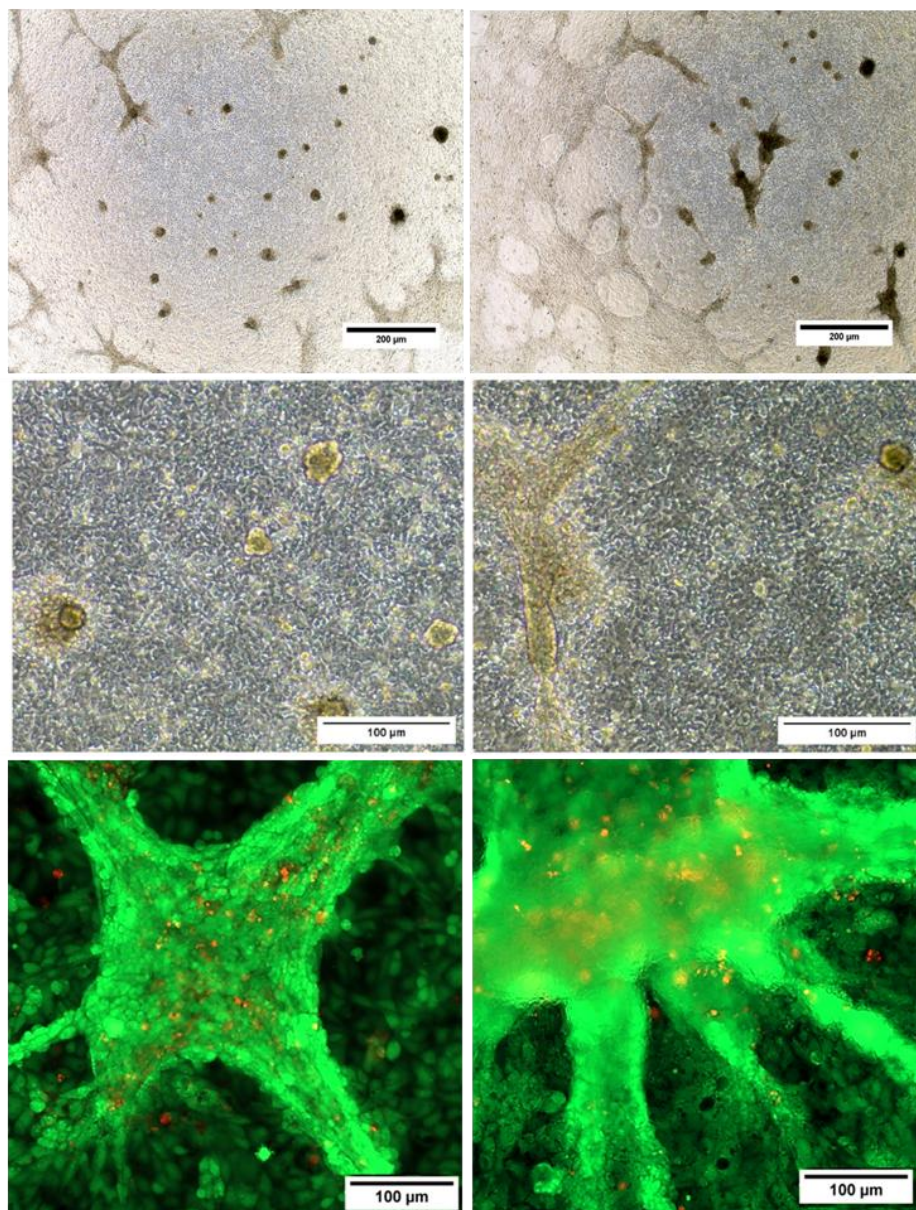
Brakuje doniesień literaturowych potwierdzających w jaki sposób współhodowla komórek macierzystych (iPSC) wpływać może na uszkodzone (w wyniku działania hipoksji) ludzkie kardiomiocyty. Ponadto, brakuje badań z wykorzystaniem hodowli ludzkich

kardiomiocytów z komórkami macierzystymi. W związku z tym, w pierwszym etapie badań sprawdzono czy utworzenie współhodowli komórek iPSC z różnymi typami ludzkich kardiomiocytów (HCM lub iPSC-CM) jest możliwa oraz dobrano odpowiednie medium hodowlane. W tym celu, po 72 h hodowli komórek HCM/iPSC lub iPSC-CM/iPSC (zgodną z procedurą opisaną w metodyce pracy), wykonano obserwacje mikroskopowe żywych i martwych komórek. Hodowla komórek HCM/iPSC była prowadzona w pożywkach E8 (stosowanej do hodowli komórek iPSC) lub DMEM/F12 (stosowanej do hodowli komórek HCM). Z kolei dla hodowli komórek iPSC-CM z komórkami iPSC wykorzystano pożywkę E8 lub RPMI/B27 (stosowaną do hodowli komórek iPSC-CM). Zaobserwowano, że komórki HCM/iPSC hodowane w medium E8 i DMEM/F12 tworzyły agregaty i następnie ulegały odklejeniu od podłoża (Ryc. 31). Z kolei w przypadku współhodowli komórek iPSC/iPSC-CM, komórki były rozpląszczone na podłożu hodowlanym i wykazywały wysoką żywotność (Ryc. 32) zarówno w przypadku zastosowania medium hodowlanego RPMI/B27 jak również E8. W związku z tym, do dalszej części badań wybrano współhodowlę komórek iPSC/iPSC-CM. Do hodowli zastosowano medium hodowlane RPMI/B27 bez insuliny między innymi ze względu na to, że jest to medium stosowane do różnicowania komórek iPSC do kardiomiocytów. Zatem może to wspomóc różnicowanie komórek iPSC utrzymywanych we współhodowli z komórkami iPSC-CM.

Współhodowla HCM i iPSC

Medium E8

Medium DMEM/F12

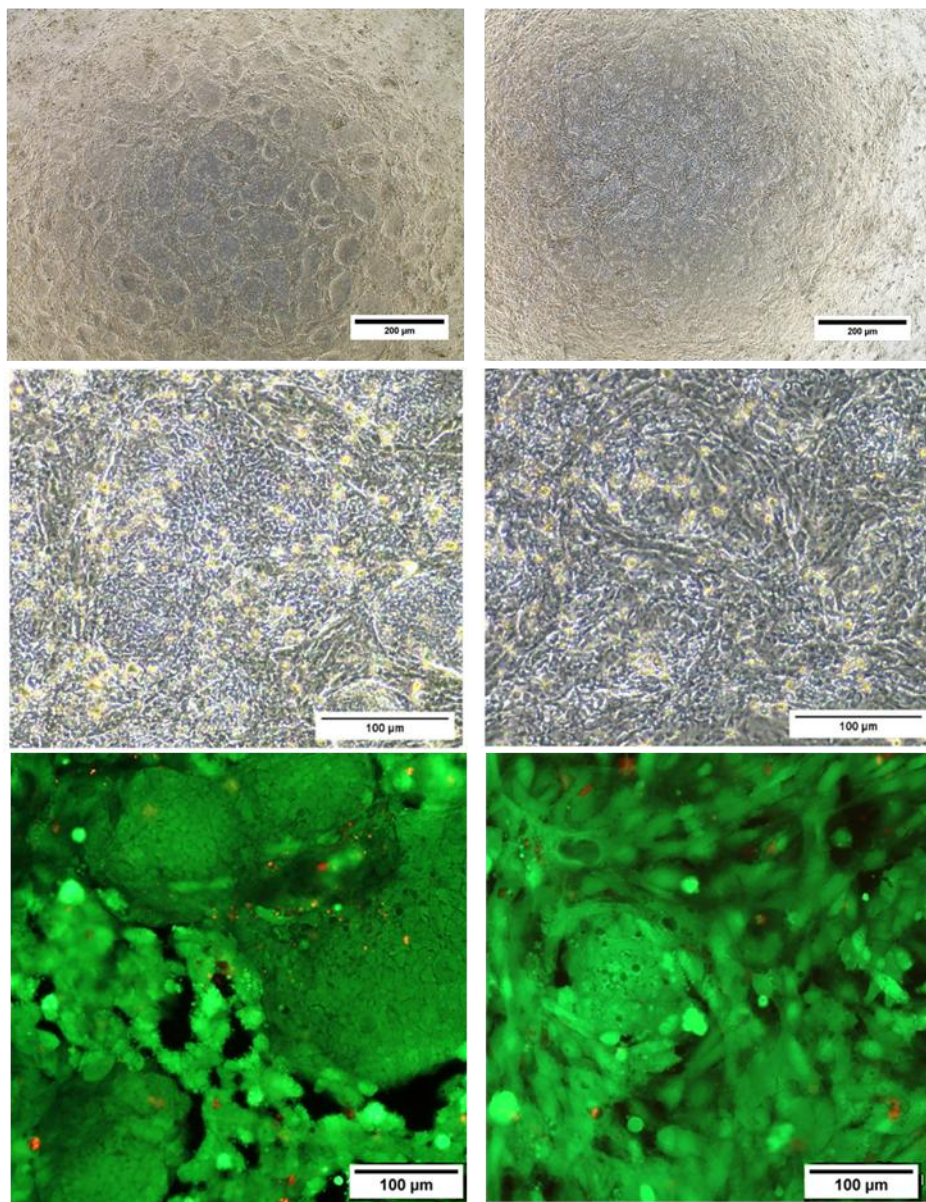


Rycina 31 Zdjęcia współhodowli komórek HCM i iPSC hodowanych w medium hodowlanym E8 lub DMEM/F12 przez 72 h. Powiększenie 4x i 10x. Zdjęcia komórek wybarwionych kalceiną-AM (komórki wybarwione na zielono – żywe) i jodkiem propidyny (komórki wybarwione na czerwono – martwe) po 72 h. Skala 100 µm.

Wspólhodowla iPSC-CM i iPSC

Medium E8

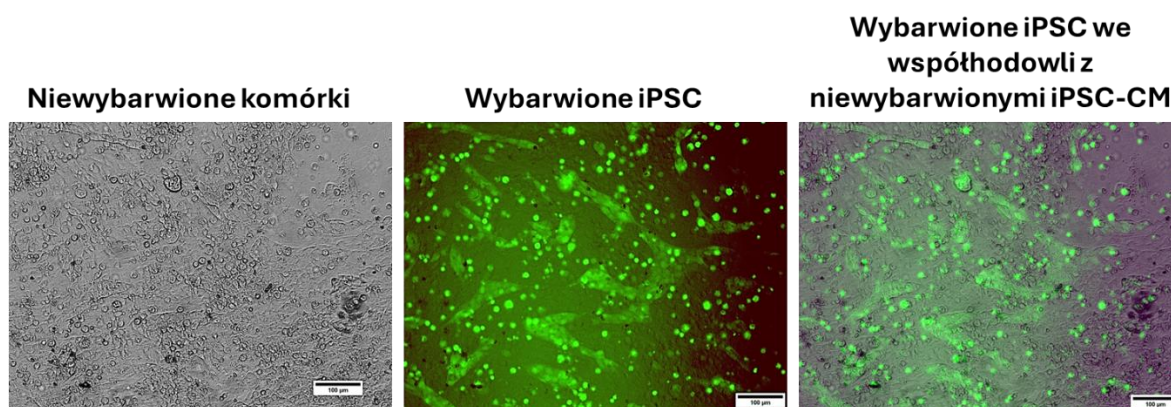
Medium RPMI/B27



Rycina 32 Zdjęcia współhodowli komórek iPSC-CM i iPSC hodowanych w medium E8 lub RPMI/B27 po 72 h. Powiększenie 4x i 10x, zdjęcia komórek wybarwionych kalceiną-AM (komórki wybarwione na zielono – żywe) i jodkiem propidyny (komórki wybarwione na czerwono – martwe) po 72 h. Skala 100 µm.

Przeprowadzono badania potwierdzające, że po dodaniu do kardiomiocytów komórek iPSC, są one obecne we współhodowli. Komórki macierzyste są wrażliwe na środowisko hodowli, a niekorzystne warunki inkubacji mogą przyczyniać się np. do odklejania komórek od podłoża. W celu sprawdzenia czy warunki współhodowli sprzyjają adhezji komórek iPSC, najpierw do dołków hodowlanych wysiano nieznakowane komórki iPSC-CM i hodowano

je przez 48 h. Następnie, dodano komórki iPSC wyznakowane barwnikiem wielopokoleniowym (CellTracker) i kontynuowano hodowlę przez kolejne 24 h. Jak przedstawiono na rycinie 33, komórki iPSC (widoczne jako komórki wybarwione na zielono) opłaszczają podłoże hodowlane i tworzą współhodowlę z iPSC-CM.

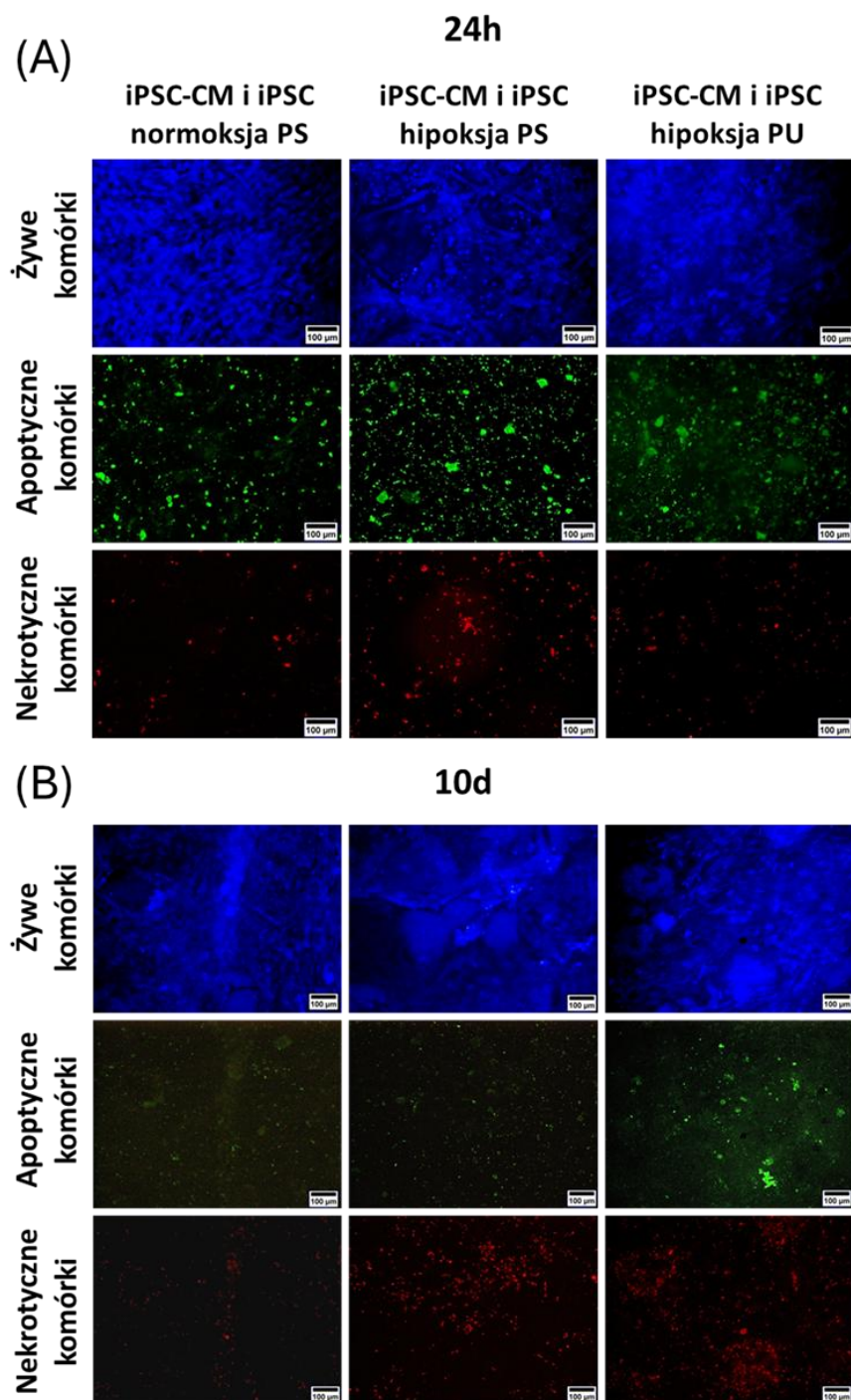


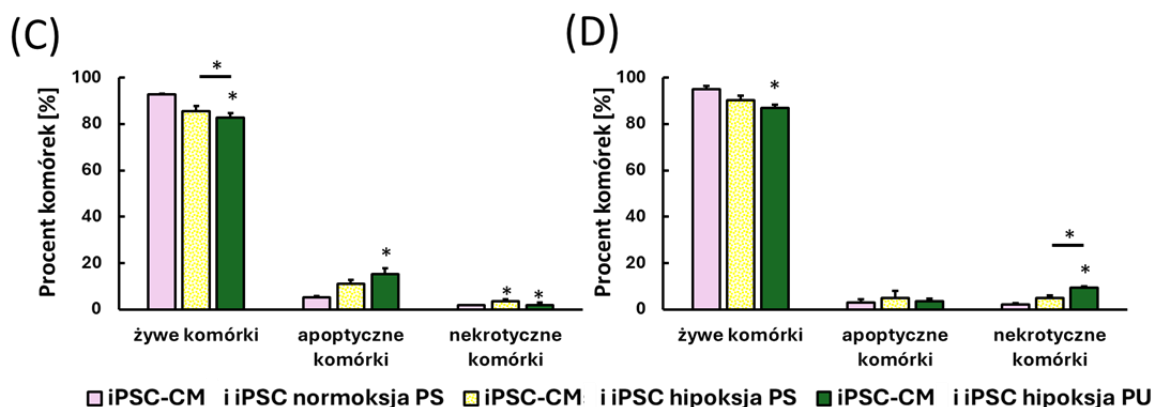
Rysunek 33 Zdjęcia współhodowli komórek iPSC wybarwionych CellTracker z komórkami iPSC-CM po 24 h. Skala 100 µm.

3.4.2. Współhodowla komórek iPSC-CM poddanych hipoksji z komórkami iPSC na matach nanowłóknistych

Celem tego etapu badań było sprawdzenie funkcjonowania ludzkich komórek iPSC-CM poddanych niedotlenieniu we współhodowli z komórkami iPSC. Dodatkowo, zastosowano czynnik strukturalny, maty nanowłókniste z PU, mogący wpływać na funkcjonowanie i dojrzewanie komórek serca, co udowodniono w toku wcześniej prowadzonych badań. Założono, że komórki hodowane na matach nanowłóknistych będą wpływać stymulująco na pracę komórek iPSC-CM utrzymywanych we współhodowli z komórkami iPSC. W pierwszym etapie sprawdzono żywotność komórek iPSC-CM poddanych hipoksji współhodowanych z komórkami macierzystymi, w krótko- (24 h) i długoterminowej (10 dni) hodowli. Dodatkowo, oznaczono procent komórek apoptycznych i nekrotycznych. Jako kontrolę zastosowano współhodowlę komórek iPSC-CM hodowaną w warunkach normoksji z komórkami iPSC, prowadzoną na płytkach polistyrenowych (dalej nazywana skrótowo iPSC - CM po normoksji/iPSC na PS). W celu zaobserwowania różnic pomiędzy hodowlą komórek prowadzoną w warunkach normoksji i hipoksji zastosowano współhodowlę komórek iPSC-CM poddaną hipoksji z komórkami iPSC, na płytkach polistyrenowych (dalej nazywana iPSC-CM po hipoksji/iPSC). Z kolei, aby ocenić wpływ czynnika strukturalnego na komórki, zastosowano współhodowlę komórek iPSC-CM poddanych hipoksji z komórkami iPSC, którą hodowano na matach nanowłóknistych z PU (dalej nazywana iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PU).

Zauważono, że zarówno po 24 h jak i 10 dniach we wszystkich badanych wariantach hodowli (iPSC-CM z iPSC) komórki wykazują wysoką żywotność, wynoszącą powyżej 80 % (Ryc. 34). Po 24 h, liczba żywych komórek we współhodowli, gdzie komórki iPSC-CM poddano niedotlenieniu była jednak niższa (dla hodowli na PS wynosiła 85 %, dla nanowłókien z PU 83 % żywych komórek), w porównaniu do kontroli (93 %). Podobną zależność obserwowano w 10-dniowej hodowli: kontrola – 95 %, iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS – 90 %, iPSC-CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU – 87 %. Wzrost liczby żywych komórek po długoterminowych hodowlach może wynikać z proliferacji komórek iPSC. We współhodowlach, w których iPSC-CM poddano hipoksji, po 24 h obserwowano więcej komórek apoptycznych niż nekrotycznych. Z kolei, w hodowlach 10-dniowych zaobserwowano większą liczbę komórek nekrotycznych niż apoptycznych, w szczególności w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU (Ryc. 34). Dla iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS po 24 h, procent komórek apoptycznych wynosił 11 %, a nekrotycznych 2 %, z kolei po 10 dniach odsetek komórek nekrotycznych wynosił 5 %. Dla komórek iPSC-CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU odsetek komórek apoptycznych dla hodowli 24 h wynosił 15 %, a komórek nekrotycznych 2 %, z kolei po 10 dniach 4 % stanowiły komórki apoptyczne, a 10 % komórki nekrotyczne. Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono, że warunki niedotlenienia negatywnie wpływają na funkcjonowanie komórek iPSC-CM, jednak żywotność współhodowli z komórkami iPSC jest wysoka. Warunki hodowli w hipoksji zostały odpowiednio dobrane (m. in. czas hodowli, ilość tlenu, medium hodowlane), co pozwoliło na uzyskanie śmierci części populacji komórek (w wyniku apoptozy lub nekrozy), a tym samym potwierdziło uzyskanie modelu badawczego dobrze naśladującego warunki panujące w niedotlenionej tkance serca. Dodatkowo, zaobserwowano znaczny wzrost liczby komórek nekrotycznych we współhodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU w długoterminowej hodowli. Może to wynikać np. z trójwymiarowej struktury mat, gdzie komórki martwe umieszczone pomiędzy włóknami nie były odmywane w trakcie hodowli.





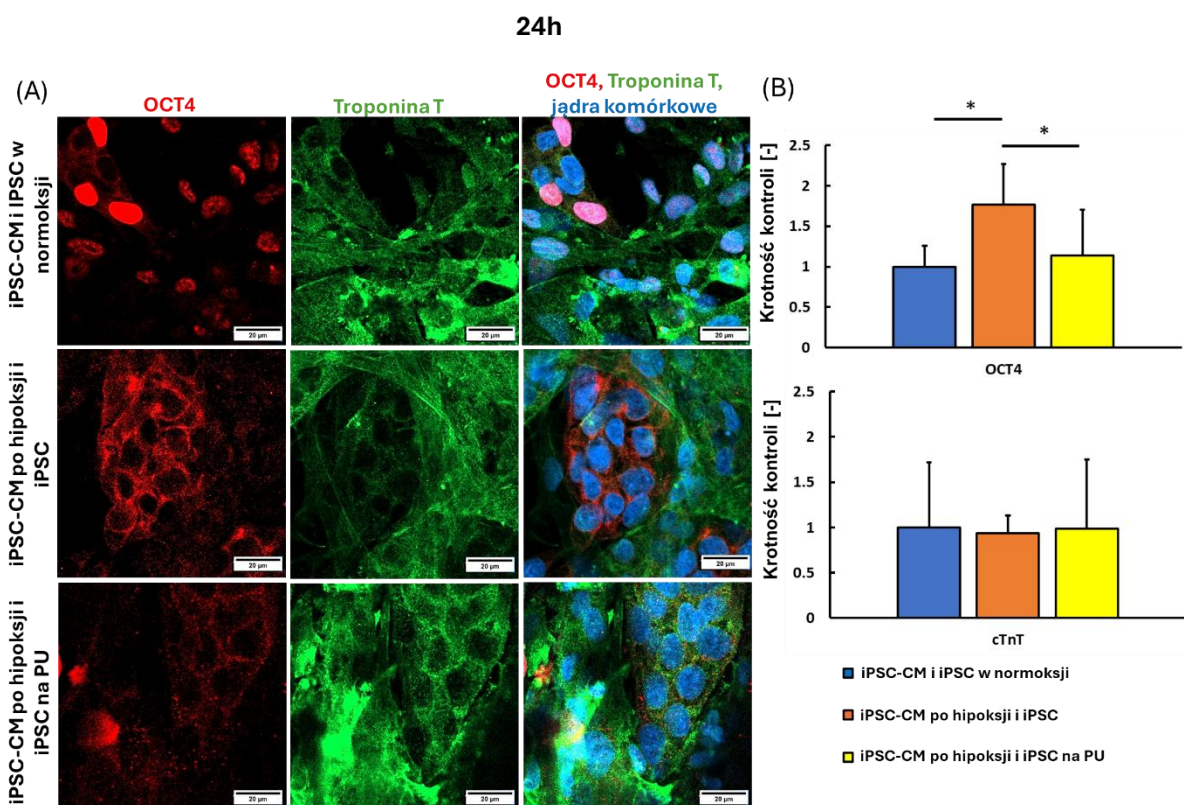
Rycina 34 Wyniki oznaczenia typu śmierci komórek (A, C) po 24 h hodowli w normoksji (kontrola) na płytkach polistyrenowych, iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU lub (B, D) po 10 dniach hodowli w normoksji (kontrola) na płytkach polistyrenowych, iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu z kontrolą normoksji, * - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. $n \geq 3$. Skala 100 μm .

W kolejnym etapie badań określono poziom białka OCT4 [163] (marker komórek iPSC), które reguluje pracę indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz białka cTnT2 (marker kardiomiocytów) uczestniczące w regulacji funkcjonowania kardiomiocytów (Ryc. 35 i 36) [129] we współhodowli 24 h i 10 dniowej. Miało to na celu oszacowanie czy w trakcie prowadzenia hodowli zmieniała się proporcja komórek iPSC vs. iPSC-CM. Podczas różnicowania iPSC w kardiomiocyty w komórkach powinien zmieniać się poziom białek - poziom troponiny T powinien rosnać, a OCT4 maleć.

Zaobserwowano, że dla 24 h hodowli, poziom białka OCT4 był znacząco wyższy w komórkach we współhodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC (1,77-krotny wzrost) w porównaniu do kontroli i hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU. Również poziom białka OCT4 w komórkach we współhodowli na matach nanowłóknistych był wyższy (1,14-krotnie) w porównaniu do kontroli. Zmiana ta jednak nie była istotna statystycznie. Dodatkowo, zauważono, że w przypadku współhodowli, w których komórki iPSC-CM były poddane hipoksji, białko OCT4 zmienia lokalizację w komórkach. Dla kontroli (hodowla prowadzona w warunkach normoksji) białko OCT4 gromadziło się głównie w jądrach komórkowych, podczas gdy we współhodowlach, w których kardiomiocyty poddano niedotlenieniu, białko OCT4 w komórkach iPSC było widoczne przede wszystkim w cytoplazmie komórkowej. W przypadku cTnT2 poziom białka dla wszystkich badanych współhodowli był podobny.

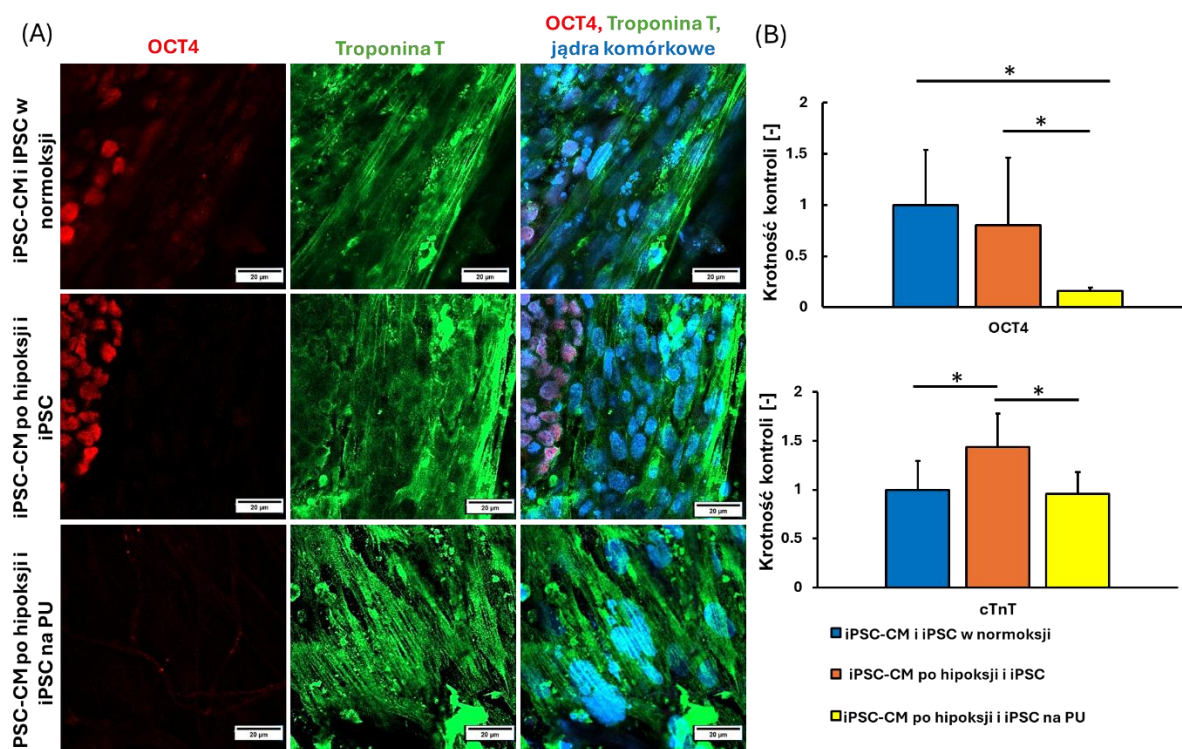
Następnie, przeprowadzono analizę poziomu białek OCT4 i cTnT2 w komórkach we współhodowlach prowadzonych przez 10 dni. Zaobserwowano, że poziom białka OCT4

zmniejszył się w komórkach we współhodowlach, w których iPSC-CM zostały poddane hipoksji. Dodatkowo, w przeciwieństwie do hodowli krótkoterminowej można zauważyć, że dla współhodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC, białko OCT4 występuje w iPSC wyłącznie w jądrach komórkowych. Zauważono również znaczny wzrost poziomu białka cTnT2 w komórkach dla hodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC hodowanych na PS (1,4-krotność kontroli). Dla współhodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PU, poziom białka cTnT2 w komórkach był podobny do poziomu troponiny T w kontroli.



Rycina 35 (A) Zdjęcia komórek z wybarwionymi białkami OCT4 (kolor czerwony), troponiny T (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski) we współhodowli iPSC-CM/iPSC oraz (B) względna intensywność fluorescencji po 24 h hodowli w warunkach normoksji na płytkach polistyrenowych (kontrola), iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU. Skala 20 μ m. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych w warunkach normoksji (kontrola). —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami.

10d



Rycina 36 (A) Zdjęcia komórek z wybarwionymi białkami OCT4 (kolor czerwony), troponiny T (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski) we współhodowli iPSC-CM/iPSC oraz (B) względna intensywność fluorescencji po 10 dniach hodowli w warunkach normoksji na płytkach polistyrenowych (kontrola), iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU. Skala 20 μm . * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych w warunkach normoksji (kontrola). —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami.

W celu potwierdzenia zmian zachodzących we współhodowlach świadczących o różnicowaniu iPSC w kardiomiocyty przeprowadzono analizę ekspresji genów: *Nanog* kodujący białko o tej samej nazwie i uczestniczący w utrzymywaniu pluripotencji komórek [164], *GATA4* kodujące białko GATA4, które bierze udział w rozwoju serca, w różnicowaniu komórek macierzystych w komórki serca oraz uczestniczy w naprawach dorosłej tkanki serca [165], *TNNI3*, *MAP4K* oraz *SERCA2* - uczestniczą w rozwoju kardiomiocytów oraz w ich funkcjonowaniu. W celu porównania zmian zachodzących we współhodowlach, badania ekspresji były prowadzone dla 24 h i 10 dniowej hodowli (Ryc. 37).

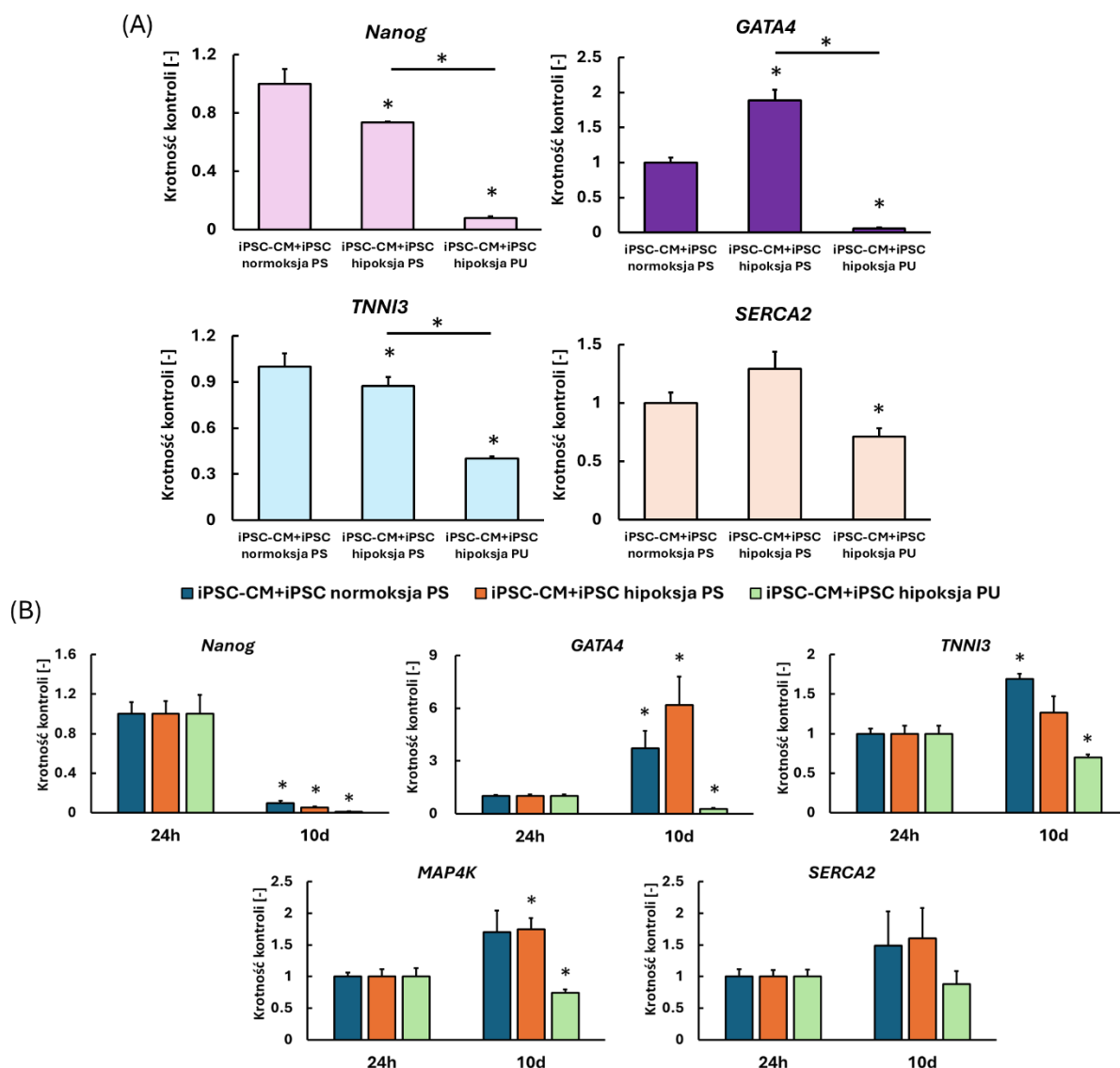
W hodowli prowadzonej przez 10 dni zauważono, że ekspresja genu *Nanog* i *TNNI3* była niższa dla współhodowli, w których kardiomiocyty zostały poddane niedotlenieniu. Ekspresja *Nanog* dla współhodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS wynosiła 0,7 - krotności kontroli, z kolei dla współhodowli na PU wynosiła 0,1 – krotności kontroli. Ekspresja *TNNI3* dla hodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS wynosiła 0,9 - krotności kontroli, a dla

współhodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PU 0,4. W przypadku genu *GATA4* zaobserwowano znaczący wzrost jego ekspresji dla hodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS - 1,9 razy większy niż w kontroli. Podobnie dla genu *SERCA2*. W przypadku współhodowli prowadzonych na matach nanowłóknistych zarówno ekspresja *GATA4* i *SERCA2* była znacznie niższa niż w kontroli.

Następnie, porównano zmiany w ekspresji genów pomiędzy hodowlą krótko- i długoterminową (Ryc. 37 B). Celem analizy było sprawdzenie czy w prowadzonych hodowlach następuje na różnicowanie i dojrzewanie komórek we współhodowli iPSC-CM/iPSC, a także na potencjalną stymulację mechanizmów naprawczych kardiomiocytów w odpowiedzi na hipoksję w trakcie trwania hodowli. W przypadku hodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU, ekspresja wszystkich wybranych genów spadała. Nie znaleziono jednak doniesień literaturowych, które tłumaczą jakimi mechanizmami komórkowymi może to być spowodowane. W przypadku hodowli iPSC-CM/iPSC w normoksji na PS oraz iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS również zauważono znaczny spadek ekspresji genu *Nanog*. Może to wynikać z różnicowania się komórek macierzystych w kardiomiocyty, w szczególności, że dla obu typów współhodowli widoczny jest wzrost ekspresji genów uczestniczących w różnicowaniu komórek macierzystych w kardiomiocyty (*GATA4*, *TNNI3* oraz *SERCA2*). Gen *GATA4* jest kluczowym czynnikiem biorącym udział w kardiogenezie, który uczestniczy także w procesach naprawczych w dorosłej tkance serca [165]. Znaczny wzrost jego ekspresji może świadczyć o różnicowaniu komórek iPSC oraz wskazywać na potencjalną stymulację mechanizmów naprawczych zachodzących w kardiomiocytach. Dodatkowo, wzrasta ekspresja genu *MAP4K*. W literaturze zostało potwierdzone, że rodzina kinaz MAPK reguluje fosforylację *GATA4* i jej aktywność. Wzrost poziomu MAPK i fosforylacja *GATA4* może być reakcją na uszkodzenia tkanki serca oraz powodować stymulację mechanizmów naprawczych kardiomiocytów [165]. Na podstawie badań przedstawionych na tym etapie, zaobserwowano wzrost *MAP4K* i *GATA4* dla współhodowli iPSC-CM/iPSC w normoksji i iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS (Ryc. 37 B). Dodatkowo, porównując hodowlę prowadzoną w warunkach normoksji i hipoksji, zaobserwowano, że ekspresja tych genów jest wyższa w przypadku współhodowli, w której komórki iPSC-CM poddane były hipoksji (ekspresja *GATA4* wynosiła 3,7 - i 6,2 - krotności kontroli kolejno dla normoksji i hipoksji kardiomiocytów; *MAP4K* – 1,7 - i 1,8 - krotność kontroli kolejno dla normoksji i hipoksji kardiomiocytów). Może to świadczyć o uruchomieniu mechanizmów naprawczych w komórkach [165]. Dodatkowo, we współhodowlach

przebieganych na płytkach PS, zauważono wzrost ekspresji *SERCA2* i *TNNI3* w kolejnych dniach hodowli (wzrost ekspresji tych genów świadczy o rozwoju i dojrzewaniu kardiomiocytów tak jak dyskutowano w rozdziale 3.2.). Porównując hodowle 10-dniową i 24 h zaobserwowano wyższy wzrost ekspresji genu *TNNI3* dla współhodowli prowadzonej w warunkach normoksji na PS (1,7 razy) niż współhodowli po hipoksji (dla PS – 1,3; dla PU – 0,7). Z kolei najwyższą ekspresję *SERCA2* uzyskano we współhodowli iPSC-CM po hipoksji/iPSC na PS (1,6 krotność kontroli).

Podsumowując, wyniki mogą wskazywać na różnicowanie i dojrzewanie komórek we współhodowli iPSC-CM/iPSC na PS, a także na potencjalną stymulację mechanizmów naprawczych kardiomiocytów w odpowiedzi na hipoksję. Jednak, hodowla na matach nanowłóknistych z PU wykazuje niższą ekspresję genów związanych z kardiogenezą i dojrzewaniem kardiomiocytów w porównaniu do hodowli na PS. Z tego powodu wymagane są dalsze badania jak np. wydłużenie hodowli, aby sprawdzić czy może to spowodować różnicowanie komórek macierzystych w komórki serca oraz dokładniejsze badanie mechanizmów komórkowych oraz zmian zachodzących podczas współhodowli.



Rycina 37 (A) Analiza ekspresji genów dla współhodowli prowadzonej w warunkach normoksji (kontrola) na płytkach polistyrenowych, iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU: po 10 dniach hodowli dla Nanog kodujący Nanog, GATA4 kodujący GATA4, TNNI3 kodujący troponinę I, SERCA2 kodujący ATPazę wapniową typu 2. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytce polistyrenowej (kontrola normoksji). *z linią poziomą - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice między grupami. $n=3$. (B) Analiza ekspresji genów w odniesieniu porównując hodowle 10 dni do 24h dla Nanog, GATA4, TNNI3, MAP4K i SERCA2. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie do 24 h hodowli. $n=3$.

3.4.3. Podsumowanie i dyskusja wyników

Obecne leczenie zawału mięśnia sercowego opiera się na łagodzeniu objawów i brakuje metod, które skutecznie regenerują uszkodzoną tkankę serca u dorosłego człowieka. Z tego powodu coraz większym zainteresowaniem wśród naukowców cieszy się wykorzystanie ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, które mają możliwość różnicowania się we wszystkie komórki w ludzkim organizmie, również w kardiomiocyty. Dzięki temu mają one potencjał do wykorzystania ich w przyszłości w medycynie

regeneracyjnej i kardiologii. Nadal poszukuje się odpowiednich modeli *in vitro* ludzkiej tkanki serca, które będą odzwierciedlać jej strukturę i funkcjonowanie. Ze względu na właściwości strukturalne i funkcjonalne mat nanowłóknistych, dzięki którym naśladują macierz zewnątrzkomórkową tkanki serca, założono, że ich zastosowanie może wpływać na funkcję komórek serca poddanych hipoksji oraz wspomagać różnicowanie komórek macierzystych.

W przeprowadzonych badaniach sprawdzono żywotność komórek w krótko- i długoterminowej hodowli. Potwierdzono wysoką żywotność komórek dla każdej badanej współhodowli. W długoterminowej hodowli nie obserwowano spadku liczby żywych komórek. Zauważono jednak, że zmienia się liczba komórek apoptycznych i nekrotycznych dla współhodowli, w których komórki iPSC-CM poddano hipoksji. Komórek apoptycznych było więcej w krótkoterminowej hodowli, podczas gdy liczba komórek nekrotycznych wzrosła w długoterminowej. Szczególnie było to zauważalne dla komórek hodowanych na matach nanowłóknistych z PU. Komórki w hodowli na matach rosną wzdłuż nanowłókien przyjmując strukturę trójwymiarową. Po przeprowadzeniu hipoksji, komórki mogą obumierać i pozostawać w strukturze mat nanowłóknistych. Martwe komórki mogą uwalniać czynniki prozapalne [166]. Pomimo, że ilość komórek nekrotycznych w porównaniu do komórek żywych jest znacznie mniejsza, to jest to typ śmierci komórkowej, który w warunkach *in vivo* powoduje powstawanie stanów zapalnych [167]. Z kolei, na płytkach polistyrenowych komórki hodowane są w monowarstwie (hodowla 2D) co umożliwia łatwe usunięcie martwych komórek [166].

Do utrzymania pluripotencjalności wymagany jest odpowiedni poziom białek takich jak OCT4, Nanog i Sox2 [119]. Zmiana w ich poziomie powoduje embriogenezę [119]. Podczas różnicowania komórek iPSC w kardiomiocyty zmniejsza się poziom białek i genów związanych z pluripotencją takich jak: OCT4, Nanog i Sox2. W trakcie różnicowania embrionalnych komórek macierzystych poziom białka Nanog spada [119]. Mechanizm działania białka OCT4 nie jest dobrze poznany, wiadomo jednak, że w bardzo wczesnej fazie różnicowania komórek iPSC zmienia się poziom OCT4. Jeśli poziom tego białka w komórkach spada do < 50 % w porównaniu do niezróżnicowanych komórek iPSC to komórki różnicują się w egzodermę. Jeśli poziom OCT4 wzrasta o 50 % to komórki różnicują się do mezodermy i endodermy. Dodatkowo, w komórkach iPSC, białko OCT4 pozostaje w jądrach komórkowych, jednak we wczesnym stadium różnicowania komórek iPSC, OCT4 może przemieszczać się między jądrem komórkowym, a cytoplazmą komórkową (dynamika nucleocytoplazmatyczna) [168]. W ramach przeprowadzonych badań, przedstawionych

w powyższym rozdziale zaobserwowano, że we współhodowlach po 24 h, w których komórki iPSC-CM zostały poddane niedotlenieniu, poziom białka OCT4 jest wyższy niż w komórkach hodowanych w warunkach normoksji. Natomiast po 10 dniach hodowli poziom białka OCT4 we współhodowli z komórkami iPSC-CM poddanymi hipoksji jest niższy w porównaniu do kontroli (hodowla komórek w normoksji). Dodatkowo, dla 24 h hodowli komórek iPSC-CM po niedotlenieniu/iPSC, białko OCT4 znajduje się zarówno poza jądrem komórkowym jak i w nim. Dodatkowo, dla 10-dniowej hodowli dla kokultury iPSC-CM po niedotlenieniu/iPSC na PS wzrasta poziom białka cTnT2 w porównaniu do innych hodowli, co świadczyć może o różnicowaniu komórek.

Przeprowadzono również analizę ekspresji genów, których ekspresja powinna zmieniać się podczas różnicowania komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów, dla krótko- i długoterminowej współhodowli komórek iPSC-CM/iPSC. Zauważono, że w hodowli iPSC - CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU spada poziom OCT4 (OCT4), jak i ekspresja wszystkich badanych genów, w tym charakterystycznych dla pluripotencji. W literaturze nie ma jednoznacznego wyjaśnienia z czego taka tendencja może wynikać. Jedną z przyczyn jest możliwość, że komórki nekrotyczne obecne w hodowli powodują powstanie stanu zapalnego i obniżenie ekspresji genów charakterystycznych dla kardiomiocytów. Drugą możliwością jest to, że komórki macierzyste pod wpływem m.in. takich czynników jak (mikrośrodowisko po niedotlenieniu, hodowla 3D, typ biomateriału) rozpoczęły różnicowanie w inny typ komórek, co mogło spowodować spadek ekspresji genów, także charakterystycznych dla pluripotencjalnych komórek macierzystych. Niemniej jednak, nie są to jednoznaczne wnioski i wymagają one dalszych badań sprawdzających funkcjonowanie iPSC na matach nanowłóknistych.

Podsumowując, na tym etapie badań przeprowadzono współhodowlę komórek iPSC-CM z komórkami iPSC w warunkach normoksji na PS, komórek iPSC-CM po hipoksji z komórkami iPSC na PS oraz komórek iPSC-CM po hipoksji z komórkami iPSC na matach nanowłóknistych z PU. Wyniki mogą wskazywać na różnicowanie i dojrzewanie komórek we współhodowli iPSC-CM/iPSC na PS, a także na potencjalną stymulację mechanizmów naprawczych kardiomiocytów w odpowiedzi na hipoksję. Jednak na tym etapie wymagane są dalsze badania, aby uzyskać potwierdzenie czy maty nanowłókniste mogą być wykorzystywane jako modele komórkowe 3D, do badań nad regeneracją komórek iPSC-CM poddawanych hipoksji. Dodatkowo, badania były prowadzone na niedojrzałych iPSC-CM i w dalszych perspektywach należałoby sprawdzić jak dojrzałe kardiomiocyty funkcjonują w hodowli

przewodzonej w warunkach niedotlenienia i we współhodowli z komórkami iPSC na matach nanowłóknistych. Wyniki przedstawionych badań w niniejszym rozdziale są elementem przygotowywanej publikacji.

III. Podsumowanie i wnioski

Choroby układu krążenia powodują największą liczbę zgonów wśród ludzi na całym świecie. W rezultacie potrzebne są badania mające na celu znalezienie skutecznej metody leczenia chorób serca. W związku z tym, istnieje potrzeba ciągłego doskonalenia modeli komórkowych *in vitro*, które będą odpowiednio naśladować złożoną pracę tkanki serca. W obecnych badaniach większość modeli *in vitro* wykorzystuje niedojrzałe komórki serca o innej morfologii i fizjologii niż dorosłe kardiomiocyty. Konwencjonalne modele hodowli 2D wykorzystujące płytki hodowlane nie odzwierciedlają warunków panujących w natywnej tkance serca oraz złożonej i trójwymiarowej struktury tkanki serca. Dlatego też coraz więcej badań prowadzonych jest z wykorzystaniem mat nanowłóknistych, które strukturalnie i mechanicznie przypominają macierz zewnątrzkomórkową serca. Ponadto, w oparciu o wcześniejsze badania udowodniono, że maty nanowłókniste wpływają na ułożenie, morfologię, proliferację i dojrzewanie komórek serca [132], [136], [140], [141], [169]–[172]. Maty nanowłókniste są stosowane jako podłoże do hodowli komórek serca, brakuje jednak opracowań nad wpływem właściwości fizykochemicznych mat, takich jak średnica włókien, elastyczność i rodzaj biomateriału, na funkcjonowanie kardiomiocytów [98], [100], [106].

W ramach obecnej rozprawy doktorskiej zastosowano różne maty nanowłókniste jako podłoża do hodowli i badania komórek serca. Określono również jak różne właściwości fizykochemiczne mat nanowłóknistych wpływają na funkcjonowanie komórek serca oraz komórek macierzystych w warunkach fizjologicznych oraz patofizjologicznych.

W pierwszym etapie badań opisanych w pracy sprawdzono jak maty nanowłókniste o różnych właściwościach fizykochemicznych (wykonane z polimerów PCL i PU) wpływają na żywotność, ułożenie, morfologię, ekspresję genów i dojrzewanie komórek serca pochodzących z różnych gatunków. Do badań wybrano szczurze kardiomioblasty (H9c2) wyizolowane z komory serca, unieśmiertelnione mysie kardiomiocyty (HL-1) wyizolowane z przedsionka serca, pierwotne ludzkie kardiomiocyty (HCM) oraz ludzkie kardiomiocyty zróżnicowane z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM). Analizowano krótko- (24 h) i długoterminową (10 dni) hodowlę na matach nanowłóknistych. Na podstawie wyników potwierdzono, że badane maty nanowłókniste nie wpływają

niekorzystnie na żywotność wszystkich badanych typów komórek serca. Dodatkowo, zaobserwowano, że hodowla komórek na równoległe ułożonych włóknach o większej średnicy (~500 nm) sprzyja uzyskaniu morfologicznie dojrzałych komórek serca. Zauważono również, że rodzaj biomateriału, z którego zostały wyprodukowane maty nanowłókniste może stanowić czynnik wpływający na zmianę morfologii, ekspresji genów i poziomu białek związanych z dojrzewaniem komórek serca. Niemniej jednak trudno jest jednoznacznie określić, które maty nanowłókniste są bardziej odpowiednie do hodowli danego typu komórek serca. Badania wskazują, że zastosowanie odpowiednio dobranych mat nanowłóknistych pozwala uzyskać bardziej dojrzałe fenotypowo komórki serca niż w standardowych warunkach hodowli na płytkach polistyrenowych. Wyniki te wspomagają badania nad poznaniem różnic międzygatunkowych w odpowiedzi kardiomiocytów na typ zastosowanego biomateriału, średnicę i elastyczność mat nanowłóknistych. Dodatkowo, praca może pomóc w badaniach ukierunkowanych na zrozumienie i wyjaśnienie rozbieżności między mechanizmami komórkowymi gryzoni i człowieka oraz przy wyborze nanowłókien, które skutecznie wesprą uzyskanie ludzkich dojrzałych kardiomiocytów w modelach *in vitro*.

Potwierdzono, że maty nanowłókniste stanowią czynnik strukturalny wpływający na funkcjonowanie komórek. Uzyskano modele komórkowe *in vitro* bliższe w naśladowaniu morfologii i fizjologii dorosłych kardiomiocytów w porównaniu do hodowli prowadzonych na płytkach polistyrenowych. Z tego powodu, w kolejnym etapie badań wykorzystano maty nanowłókniste PCL i PU do badań nad fizjologią ludzkich kardiomiocytów w warunkach niedotlenienia oraz niedotlenienia z reoksygenacją. Doniesienia literaturowe wskazują na istotny wpływ niedotlenienia na pracę kardiomiocytów. Jest to czynnik wpływający na obumieranie kardiomiocytów i wywołuje rozwój chorób serca. Zbadanie wpływu hipoksji na kardiomiocyty przyczyni się do opracowania efektywniejszych metod leczenia i ochrony mięśnia sercowego przed uszkodzeniami związanymi z niedotlenieniem. Do hodowli zastosowano dwa typy ludzkich kardiomiocytów: pierwotne komórki HCM oraz niedojrzałe komórki iPSC-CM. Badania potwierdziły, że maty nanowłókniste mają wpływ na funkcjonowanie kardiomiocytów po niedotlenieniu i po H/R. Analizowano zmiany w poziomie HIF-1 α , ekspresję genów wpływających na pracę komórek serca, reorganizację filamentów aktynowych budujących cytoszkielet komórek oraz typ śmierci komórkowej. Zaobserwowano różnice w odpowiedzi na niedotlenienie i reoksygenację pomiędzy HCM i iPSC-CM, które mogą wynikać z odmiennej fizjologii. Uzyskane wyniki potwierdziły, że odpowiedź kardiomiocytów hodowanych na matach nanowłóknistych różni się od odpowiedzi komórek

w hodowli na płytkach polistyrenowych i może być zbliżona do odpowiedzi kardiomiocytów w warunkach *in vivo*.

W badaniach nad chorobami układu sercowo-naczyniowego ważnym aspektem jest zastosowanie medycyny regeneracyjnej w tym wykorzystanie komórek macierzystych. Zastosowanie ludzkich komórek pluripotencjalnych (iPSC) w badaniach nad regeneracją uszkodzonej tkanki serca cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród naukowców. Wykorzystanie iPSC umożliwia stosowanie komórek o właściwościach charakterystycznych dla pluripotencjalnych komórek macierzystych, bez zastrzeżeń etycznych, ponieważ są one uzyskiwane z komórek somatycznych, a nie z zarodków. Komórki iPSC można różnicować w kardiomiocyty (iPSC-CM), które znajdują szerokie zastosowanie w inżynierii tkankowej serca. Dodatkowo, wykorzystanie iPSC-CM umożliwia tworzenie spersonalizowanych modeli komórkowych. Jednak nadal niewiele jest doniesień opisujących wykorzystanie biomateriałów do hodowli komórek macierzystych i ludzkich kardiomiocytów.

Z badań przedstawionych w literaturze wynika, że kardiomiocyty mają znikomą możliwość do proliferacji. Zatem, w przypadku chorób serca w większości spowodowanych niedotlenieniem (np. zawał serca), uszkodzone CM zastępowane są fibroblastami, co z kolei przyczynia się do tworzenia tkanki bliznowatej, która ogranicza zdolność serca do prawidłowego funkcjonowania [3], [12]. Z tego powodu badania nad regeneracją uszkodzonych kardiomiocytów mają szczególne znaczenie kliniczne. W ostatnim etapie rozprawy doktorskiej analizowano funkcjonowanie ludzkich kardiomiocytów po niedotlenieniu we współhodowli z komórkami macierzystymi i hodowanymi na matach nanowłóknistych. W ramach badań wykazano, że możliwe jest prowadzenie współhodowli ludzkich kardiomiocytów poddanych niedotlenieniu wraz z komórkami macierzystymi. Sprawdzone żywotność komórek w krótko- (24 h) i długoterminowej (10 dni) współhodowli. Dodatkowo, oznaczono procent komórek apoptycznych i nekrotycznych. Przeprowadzono również analizę ekspresji genów oraz poziomu białek, które biorą udział w regulowaniu indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz różnicowaniu komórek macierzystych w kardiomiocyty, jak również są zaangażowane w funkcje naprawcze komórek serca oraz wpływają na pracę kardiomiocytów. Wykazano, że wszystkie współhodowle cechowały się wysoką żywotnością komórek. Zaobserwowano zwiększoną liczbę komórek apoptycznych po 24 h, jednak po 10 dniach współhodowli wzrosła liczba komórek nekrotycznych, zwłaszcza w hodowlach prowadzonych na matach nanowłóknistych. Wyniki mogą wskazywać na różnicowanie i dojrzewanie komórek we współhodowlach na płytkach

polistyrenowych, a także na potencjalną stymulację mechanizmów naprawczych w komórkach kardiomiocytów w odpowiedzi na hipoksję. Zaobserwowano w hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych niższą ekspresję genów związanych z kardiogenezą i dojrzewaniem kardiomiocytów w porównaniu do hodowli na PS. W związku z tym, na tym etapie wymagane są dalsze prace, aby uzyskać potwierdzenie czy maty nanowłókniste mogą być wykorzystywane do modeli komórkowych 3D, do badań nad regeneracją komórek iPSC-CM poddawanych hipoksji.

W ramach przeprowadzonych badań potwierdzono, że zastosowanie mat nanowłóknistych umożliwia opracowanie modelu komórkowego *in vitro* odwzorowującego mikrośrodowisko tkanki serca lepiej niż standardowe hodowle dwuwymiarowe (2D). Opracowane modele mogą posłużyć do badania mechanizmów komórkowych w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych (w warunkach niedotlenienia) oraz wpływu komórek macierzystych na regenerację komórek serca. Dodatkowo wykazano, że ludzkie komórki macierzyste mogą zostać zastosowane do wytworzenia modeli komórkowych *in vitro* i mogą być wykorzystywane w badaniach nad regeneracją kardiomiocytów.

IV. Bibliografia

- [1] A. J. Weinhaus, ‘Anatomy of the Human Heart’, in *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*, P. A. Iaizzo, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 61–88. doi: 10.1007/978-3-319-19464-6_5.
- [2] N. J. Severs, ‘The cardiac muscle cell’, *Bioessays*, vol. 22, no. 2, pp. 188–199, Jan. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<188::AID-BIES10>3.0.CO;2-T.
- [3] W. Chen, W. Bian, Y. Zhou, and J. Zhang, ‘Cardiac Fibroblasts and Myocardial Regeneration’, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 599928, Mar. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.599928.
- [4] H. Venugopal, A. Hanna, C. Humeres, and N. G. Frangogiannis, ‘Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction’, *Cells*, vol. 11, no. 9, p. 1386, Apr. 2022, doi: 10.3390/cells11091386.
- [5] A. C. Silva, C. Pereira, A. C. R. G. Fonseca, P. Pinto-do-Ó, and D. S. Nascimento, ‘Bearing My Heart: The Role of Extracellular Matrix on Cardiac Development, Homeostasis, and Injury Response’, *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 621644, Jan. 2021, doi: 10.3389/fcell.2020.621644.
- [6] J. D. Allbritton-King and G. García-Cardena, ‘Endothelial cell dysfunction in cardiac disease: driver or consequence?’, *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, p. 1278166, Oct. 2023, doi: 10.3389/fcell.2023.1278166.
- [7] P. C. H. Hsieh, M. E. Davis, L. K. Lisowski, and R. T. Lee, ‘ENDOTHELIAL-CARDIOMYOCYTE INTERACTIONS IN CARDIAC DEVELOPMENT AND REPAIR’, *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 68, no. 1, pp. 51–66, Jan. 2006, doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.124629.
- [8] O. Gaidai, Y. Cao, and S. Loginov, ‘Global Cardiovascular Diseases Death Rate Prediction’, *Current Problems in Cardiology*, vol. 48, no. 5, p. 101622, May 2023, doi: 10.1016/j.cpcardiol.2023.101622.
- [9] A. Sakaguchi and W. Kimura, ‘Metabolic regulation of cardiac regeneration: roles of hypoxia, energy homeostasis, and mitochondrial dynamics’, *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 70, pp. 54–60, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.gde.2021.05.009.
- [10] L. He and X. Chen, ‘Cardiomyocyte Induction and Regeneration for Myocardial Infarction Treatment: Cell Sources and Administration Strategies’, *Adv Healthcare Materials*, vol. 9, no. 22, p. 2001175, Nov. 2020, doi: 10.1002/adhm.202001175.

- [11] K. A. Bednarowicz and M. Kurpisz, 'Biological Bases of Cardiac Function and the Pro-regenerative Potential of Stem Cells in the Treatment of Myocardial Disorder', in *Cardiac Cell Culture Technologies*, Z. Brzozka and E. Jastrzebska, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 79–108. doi: 10.1007/978-3-319-70685-6_5.
- [12] H. Tani *et al.*, 'Direct Reprogramming Improves Cardiac Function and Reverses Fibrosis in Chronic Myocardial Infarction', *Circulation*, vol. 147, no. 3, pp. 223–238, Jan. 2023, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058655.
- [13] H. S. Shin, H. H. Shin, and Y. Shudo, 'Current Status and Limitations of Myocardial Infarction Large Animal Models in Cardiovascular Translational Research', *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 673683, Apr. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.673683.
- [14] Z. Brzozka and E. Jastrzebska, Eds., *Cardiac Cell Culture Technologies*. Cham: Springer International Publishing, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-70685-6.
- [15] H. K. Eltzschig and P. Carmeliet, 'Hypoxia and Inflammation', *N Engl J Med*, vol. 364, no. 7, pp. 656–665, Feb. 2011, doi: 10.1056/NEJMr0910283.
- [16] M. C. Ward and Y. Gilad, 'A generally conserved response to hypoxia in iPSC-derived cardiomyocytes from humans and chimpanzees', *eLife*, vol. 8, p. e42374, Apr. 2019, doi: 10.7554/eLife.42374.
- [17] P.-S. Chen *et al.*, 'Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases', *J Biomed Sci*, vol. 27, no. 1, p. 63, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12929-020-00658-7.
- [18] Y. Zhao *et al.*, 'Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system: pathogenesis and therapeutic targets', *Sig Transduct Target Ther*, vol. 8, no. 1, p. 431, Nov. 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01652-9.
- [19] J. Veldhuizen *et al.*, 'Cardiac ischemia on-a-chip to investigate cellular and molecular response of myocardial tissue under hypoxia', *Biomaterials*, vol. 281, p. 121336, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121336.
- [20] H. Liu *et al.*, 'Heart-on-a-Chip Model with Integrated Extra- and Intracellular Bioelectronics for Monitoring Cardiac Electrophysiology under Acute Hypoxia', *Nano Lett.*, vol. 20, no. 4, pp. 2585–2593, Apr. 2020, doi: 10.1021/acs.nanolett.0c00076.
- [21] P. Hafez *et al.*, 'Development of an In Vitro Cardiac Ischemic Model Using Primary Human Cardiomyocytes', *Cardiovasc Eng Tech*, vol. 9, no. 3, pp. 529–538, Sep. 2018, doi: 10.1007/s13239-018-0368-8.
- [22] T. Sato and N. Takeda, 'The roles of HIF-1 α signaling in cardiovascular diseases', *Journal of Cardiology*, vol. 81, no. 2, pp. 202–208, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.jjcc.2022.09.002.

- [23] A. V. Kuznetsov, S. Javadov, S. Sickinger, S. Frotschnig, and M. Grimm, 'H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1853, no. 2, pp. 276–284, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.11.015.
- [24] J. Mester-Tonczar *et al.*, 'Novel Identified Circular Transcript of RCAN2, circ-RCAN2, Shows Deviated Expression Pattern in Pig Reperfused Infarcted Myocardium and Hypoxic Porcine Cardiac Progenitor Cells In Vitro', *IJMS*, vol. 22, no. 3, p. 1390, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22031390.
- [25] J. Heliste, A. Jokilampi, K. Vaparanta, I. Paatero, and K. Elenius, 'Combined genetic and chemical screens indicate protective potential for EGFR inhibition to cardiomyocytes under hypoxia', *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, p. 16661, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-96033-z.
- [26] S. Spinelli *et al.*, 'The ABA-LANCL1/2 Hormone-Receptors System Protects H9c2 Cardiomyocytes from Hypoxia-Induced Mitochondrial Injury via an AMPK- and NO-Mediated Mechanism', *Cells*, vol. 11, no. 18, p. 2888, Sep. 2022, doi: 10.3390/cells11182888.
- [27] Z. Su, Y. Liu, and H. Zhang, 'Adaptive Cardiac Metabolism Under Chronic Hypoxia: Mechanism and Clinical Implications', *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 625524, Feb. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.625524.
- [28] M. Jiang, X. Fan, Y. Wang, and X. Sun, 'Effects of hypoxia in cardiac metabolic remodeling and heart failure', *Experimental Cell Research*, vol. 432, no. 1, p. 113763, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.yexcr.2023.113763.
- [29] B. R. B. Pires, A. L. Menciaha, G. M. Ferreira, C. Panis, R. C. M. C. Silva, and E. Abdelhay, 'The Hypoxia-Inducible Factor-1 α Signaling Pathway and its Relation to Cancer and Immunology', *American Journal of Immunology*, vol. 10, no. 4, pp. 215–224, Apr. 2014, doi: 10.3844/ajisp.2014.215.224.
- [30] W. Lei *et al.*, 'MARCH5 restores endothelial cell function against ischaemic/hypoxia injury via Akt/eNOS pathway', *J Cellular Molecular Medi*, vol. 25, no. 7, pp. 3182–3193, Apr. 2021, doi: 10.1111/jcmm.16386.
- [31] S. Cui *et al.*, 'miR-145 attenuates cardiac fibrosis through the AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway by directly targeting SOX9 in fibroblasts', *J of Cellular Biochemistry*, vol. 122, no. 2, pp. 209–221, Feb. 2021, doi: 10.1002/jcb.29843.

- [32] J. Xu, J. Huang, X. He, M. Hu, S. Su, and P. Liu, 'Myosin 1b Participated in the Modulation of Hypoxia/Reoxygenation-Caused H9c2 Cell Apoptosis and Autophagy', *Analytical Cellular Pathology*, vol. 2022, pp. 1–10, Nov. 2022, doi: 10.1155/2022/5187304.
- [33] O. Gidlöf *et al.*, 'Inhibition of the long non-coding RNA NEAT1 protects cardiomyocytes from hypoxia in vitro via decreased pri-miRNA processing', *Cell Death Dis*, vol. 11, no. 8, p. 677, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41419-020-02854-7.
- [34] V. T. Thu, N. T. H. Yen, N. H. Tung, P. T. Bich, J. Han, and H. K. Kim, 'Majonoside-R2 extracted from Vietnamese ginseng protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury via modulating mitochondrial function and biogenesis', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 36, p. 127814, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.bmcl.2021.127814.
- [35] S. S. Ali, L. Noordin, R. A. Bakar, S. Zainalabidin, Z. Jubri, and W. A. N. Wan Ahmad, 'Current Updates on Potential Role of Flavonoids in Hypoxia/Reoxygenation Cardiac Injury Model', *Cardiovasc Toxicol*, vol. 21, no. 8, pp. 605–618, Aug. 2021, doi: 10.1007/s12012-021-09666-x.
- [36] W. Shen, H. Li, H. Su, K. Chen, and J. Yan, 'FTO overexpression inhibits apoptosis of hypoxia/reoxygenation-treated myocardial cells by regulating m6A modification of Mhrt', *Mol Cell Biochem*, vol. 476, no. 5, pp. 2171–2179, May 2021, doi: 10.1007/s11010-021-04069-6.
- [37] L. Zhao, T. Johnson, and D. Liu, 'Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases', *Stem Cell Res Ther*, vol. 8, no. 1, p. 125, Dec. 2017, doi: 10.1186/s13287-017-0578-2.
- [38] R. Niu *et al.*, 'MicroRNA-582-5p targeting Creb1 modulates apoptosis in cardiomyocytes hypoxia/reperfusion-induced injury', *Immunity Inflam & Disease*, vol. 10, no. 11, p. e708, Nov. 2022, doi: 10.1002/iid3.708.
- [39] D. Wu and P. Yotnda, 'Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture', *JoVE*, no. 54, p. 2899, Aug. 2011, doi: 10.3791/2899.
- [40] J.-W. Wu, H. Hu, J. Hua, and L.-K. Ma, 'ATPase inhibitory factor 1 protects the heart from acute myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK signaling pathway', *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 18, no. 2, pp. 731–741, 2022, doi: 10.7150/ijbs.64956.
- [41] Y. Xing *et al.*, 'Blunting TRPML1 channels protects myocardial ischemia/reperfusion injury by restoring impaired cardiomyocyte autophagy', *Basic Res Cardiol*, vol. 117, no. 1, p. 20, Dec. 2022, doi: 10.1007/s00395-022-00930-x.

- [42] L.-J. Tang *et al.*, ‘Ubiquitin-specific protease 7 promotes ferroptosis via activation of the p53/TfR1 pathway in the rat hearts after ischemia/reperfusion’, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 162, pp. 339–352, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.307.
- [43] M. R. Hashemzadeh, M. E. Taghavizadeh Yazdi, M. S. Amiri, and S. H. Mousavi, ‘Stem cell therapy in the heart: Biomaterials as a key route’, *Tissue and Cell*, vol. 71, p. 101504, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.tice.2021.101504.
- [44] E. H. Ntege, H. Sunami, and Y. Shimizu, ‘Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions’, *Regenerative Therapy*, vol. 14, pp. 136–153, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.reth.2020.01.004.
- [45] R. M. Aly, ‘Current state of stem cell-based therapies: an overview’, *Stem Cell Investig*, vol. 7, pp. 8–8, May 2020, doi: 10.21037/sci-2020-001.
- [46] N. Rajabzadeh, E. Fathi, and R. Farahzadi, ‘Stem cell-based regenerative medicine’, *Stem Cell Investig*, vol. 6, pp. 19–19, Jul. 2019, doi: 10.21037/sci.2019.06.04.
- [47] K. Takahashi *et al.*, ‘Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors’, *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [48] M. S. Poetsch, A. Strano, and K. Guan, ‘Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine’, *Stem Cells*, vol. 40, no. 6, pp. 546–555, Jun. 2022, doi: 10.1093/stmcls/sxac020.
- [49] M. A. M. Aboul-Soud, A. J. Alzahrani, and A. Mahmoud, ‘Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)—Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening’, *Cells*, vol. 10, no. 9, p. 2319, Sep. 2021, doi: 10.3390/cells10092319.
- [50] H. Abou-Saleh *et al.*, ‘The march of pluripotent stem cells in cardiovascular regenerative medicine’, *Stem Cell Res Ther*, vol. 9, no. 1, p. 201, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13287-018-0947-5.
- [51] J. Wolnik *et al.*, ‘A novel 3D cardiac microtissue model for investigation of cardiovascular complications in rheumatoid arthritis’, *Stem Cell Res Ther*, vol. 15, no. 1, p. 382, Oct. 2024, doi: 10.1186/s13287-024-03956-1.
- [52] X. Lian, J. Zhang, K. Zhu, T. J. Kamp, and S. P. Palecek, ‘Insulin Inhibits Cardiac Mesoderm, Not Mesendoderm, Formation During Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells and Modulation of Canonical Wnt Signaling Can Rescue This Inhibition’, *Stem Cells*, vol. 31, no. 3, pp. 447–457, Mar. 2013, doi: 10.1002/stem.1289.

- [53] X. Lian *et al.*, ‘Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions’, *Nat Protoc*, vol. 8, no. 1, pp. 162–175, Jan. 2013, doi: 10.1038/nprot.2012.150.
- [54] V. V. Balatskyi, A. Sowka, P. Dobrzyn, and O. O. Piven, ‘WNT/ β -catenin pathway is a key regulator of cardiac function and energetic metabolism’, *Acta Physiologica*, vol. 237, no. 3, p. e13912, Mar. 2023, doi: 10.1111/apha.13912.
- [55] P. Wu, G. Deng, X. Sai, H. Guo, H. Huang, and P. Zhu, ‘Maturation strategies and limitations of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes’, *Bioscience Reports*, vol. 41, no. 6, p. BSR20200833, Jun. 2021, doi: 10.1042/BSR20200833.
- [56] S. S. Parikh *et al.*, ‘Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes’, *Circ Res*, vol. 121, no. 12, pp. 1323–1330, Dec. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311920.
- [57] B. Goversen, M. A. G. Van Der Heyden, T. A. B. Van Veen, and T. P. De Boer, ‘The immature electrophysiological phenotype of iPSC-CMs still hampers in vitro drug screening: Special focus on IK1’, *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 183, pp. 127–136, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.001.
- [58] G. J. Scuderi and J. Butcher, ‘Naturally Engineered Maturation of Cardiomyocytes’, *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 5, p. 50, May 2017, doi: 10.3389/fcell.2017.00050.
- [59] Y. Guo and W. T. Pu, ‘Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development’, *Circulation Research*, vol. 126, no. 8, pp. 1086–1106, Apr. 2020, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315862.
- [60] J. Li, X. Feng, and X. Wei, ‘Modeling hypertrophic cardiomyopathy with human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells’, *Stem Cell Res Ther*, vol. 13, no. 1, p. 232, Dec. 2022, doi: 10.1186/s13287-022-02905-0.
- [61] P. Wu, G. Deng, X. Sai, H. Guo, H. Huang, and P. Zhu, ‘Maturation strategies and limitations of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes’, *Bioscience Reports*, vol. 41, no. 6, p. BSR20200833, Jun. 2021, doi: 10.1042/BSR20200833.
- [62] M. Carlos-Oliveira, F. Lozano-Juan, P. Occhetta, R. Visone, and M. Rasponi, ‘Current strategies of mechanical stimulation for maturation of cardiac microtissues’, *Biophys Rev*, vol. 13, no. 5, pp. 717–727, Oct. 2021, doi: 10.1007/s12551-021-00841-6.
- [63] D. A. M. Feyen *et al.*, ‘Metabolic Maturation Media Improve Physiological Function of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes’, *Cell Reports*, vol. 32, no. 3, p. 107925, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107925.

- [64] X. Jiang, Z. Yang, and M. Dong, ‘Cardiac repair in a murine model of myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes’, *Stem Cell Res Ther*, vol. 11, no. 1, p. 297, Dec. 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01811-7.
- [65] M. Kitsara, O. Agbulut, D. Kontziampasis, Y. Chen, and P. Menasché, ‘Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering’, *Acta Biomaterialia*, vol. 48, pp. 20–40, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.014.
- [66] L. Léger *et al.*, ‘Combinatorial effects of surface plasma-treating and aligning PCL/chitosan nanofibers on the behavior of stem cell-derived cardiomyocytes for cardiac tissue engineering’, *Applied Surface Science*, vol. 655, p. 159680, May 2024, doi: 10.1016/j.apsusc.2024.159680.
- [67] A. Ostadfar, ‘Tissue Engineering of Cardiovascular System’, in *Biofluid Mechanics*, Elsevier, 2016, pp. 323–339. doi: 10.1016/B978-0-12-802408-9.00009-0.
- [68] A. H. Nguyen *et al.*, ‘Cardiac tissue engineering: state-of-the-art methods and outlook’, *J Biol Eng*, vol. 13, no. 1, p. 57, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13036-019-0185-0.
- [69] R. Augustine *et al.*, ‘Stem cell-based approaches in cardiac tissue engineering: controlling the microenvironment for autologous cells’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 138, p. 111425, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111425.
- [70] L. Wang, V. Serpooshan, and J. Zhang, ‘Engineering Human Cardiac Muscle Patch Constructs for Prevention of Post-infarction LV Remodeling’, *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, p. 621781, Feb. 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.621781.
- [71] H. Li, M. Bao, and Y. Nie, ‘Extracellular matrix-based biomaterials for cardiac regeneration and repair’, *Heart Fail Rev*, vol. 26, no. 5, pp. 1231–1248, Sep. 2021, doi: 10.1007/s10741-020-09953-9.
- [72] J. A. Roacho-Pérez *et al.*, ‘Artificial Scaffolds in Cardiac Tissue Engineering’, *Life*, vol. 12, no. 8, p. 1117, Jul. 2022, doi: 10.3390/life12081117.
- [73] P. Izadpanah, A. Golchin, T. Firuzyar, M. Najafi, A. Jangjou, and S. Hashemi, ‘The effect of shear stress on cardiac differentiation of mesenchymal stem cells’, *Mol Biol Rep*, vol. 49, no. 4, pp. 3167–3175, Apr. 2022, doi: 10.1007/s11033-022-07149-y.
- [74] D. M. Dos Santos, D. S. Correa, E. S. Medeiros, J. E. Oliveira, and L. H. C. Mattoso, ‘Advances in Functional Polymer Nanofibers: From Spinning Fabrication Techniques to Recent Biomedical Applications’, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 41, pp. 45673–45701, Oct. 2020, doi: 10.1021/acsami.0c12410.

- [75] M. A. C. Williams, D. B. Mair, W. Lee, E. Lee, and D.-H. Kim, 'Engineering Three-Dimensional Vascularized Cardiac Tissues', *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 28, no. 2, pp. 336–350, Apr. 2022, doi: 10.1089/ten.teb.2020.0343.
- [76] H. Nazari *et al.*, 'Incorporation of two-dimensional nanomaterials into silk fibroin nanofibers for cardiac tissue engineering', *Polymers for Advanced Techs*, vol. 31, no. 2, pp. 248–259, Feb. 2020, doi: 10.1002/pat.4765.
- [77] R. Rasouli, A. Barhoum, M. Bechelany, and A. Dufresne, 'Nanofibers for Biomedical and Healthcare Applications', *Macromolecular Bioscience*, vol. 19, no. 2, p. 1800256, Feb. 2019, doi: 10.1002/mabi.201800256.
- [78] S. Bashir and J. Liu, 'Nanomaterials and Their Application', in *Advanced Nanomaterials and their Applications in Renewable Energy*, Elsevier, 2015, pp. 1–50. doi: 10.1016/B978-0-12-801528-5.00001-4.
- [79] P. J. Brown and Textile Institute, Eds., *Nanofibers and nanotechnology in textiles*, 1. publ. in Woodhead publishing in textiles. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- [80] M. Keshvardoostchokami, S. S. Majidi, P. Huo, R. Ramachandran, M. Chen, and B. Liu, 'Electrospun Nanofibers of Natural and Synthetic Polymers as Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering', *Nanomaterials*, vol. 11, no. 1, p. 21, Dec. 2020, doi: 10.3390/nano11010021.
- [81] G. C. Dadol *et al.*, 'Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: Materials, methods, and applications', *Materials Today Communications*, vol. 25, p. 101656, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.mtcomm.2020.101656.
- [82] W. Huang, M. Huo, N. Cheng, and R. Wang, 'New Forms of Electrospun Nanofibers Applied in Cardiovascular Field', *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, p. 801077, Jan. 2022, doi: 10.3389/fcvm.2021.801077.
- [83] Y. Gao *et al.*, 'Recent progress and challenges in solution blow spinning', *Mater. Horiz.*, vol. 8, no. 2, pp. 426–446, 2021, doi: 10.1039/D0MH01096K.
- [84] R. Atif *et al.*, 'Solution Blow Spinning of High-Performance Submicron Polyvinylidene Fluoride Fibres: Computational Fluid Mechanics Modelling and Experimental Results', *Polymers*, vol. 12, no. 5, p. 1140, May 2020, doi: 10.3390/polym12051140.
- [85] G. Chakrapani, S. Ramakrishna, and M. Zare, 'Functionalization of electrospun nanofiber for biomedical application', *J of Applied Polymer Sci*, vol. 140, no. 23, p. e53906, Jun. 2023, doi: 10.1002/app.53906.

- [86] V. Schwach and R. Passier, 'Native cardiac environment and its impact on engineering cardiac tissue', *Biomater. Sci.*, vol. 7, no. 9, pp. 3566–3580, 2019, doi: 10.1039/C8BM01348A.
- [87] N. J. Kaiser, R. J. Kant, A. J. Minor, and K. L. K. Coulombe, 'Optimizing Blended Collagen-Fibrin Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering with Human iPSC-derived Cardiomyocytes', *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 2, pp. 887–899, Feb. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b01112.
- [88] J. Joshi, D. Brennan, V. Beachley, and C. R. Kothapalli, 'Cardiomyogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cell spheroids within electrospun collagen nanofiber mats', *J Biomedical Materials Res*, vol. 106, no. 12, pp. 3303–3312, Dec. 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36530.
- [89] M. Kitsara *et al.*, 'Fabrication of cardiac patch by using electrospun collagen fibers', *Microelectronic Engineering*, vol. 144, pp. 46–50, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.mee.2015.02.034.
- [90] T. Carvalho, N. Z. Ezazi, A. Correia, C. Vilela, H. A. Santos, and C. S. R. Freire, 'Gelatin-Lysozyme Nanofibrils Electrospun Patches with Improved Mechanical, Antioxidant, and Bioresorbability Properties for Myocardial Regeneration Applications', *Adv Funct Materials*, vol. 32, no. 21, p. 2113390, May 2022, doi: 10.1002/adfm.202113390.
- [91] M. Torabi *et al.*, 'Efficient cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells on PLGA nanofibers enriched by platelet-rich plasma', *Polymers for Advanced Techs*, vol. 32, no. 3, pp. 1168–1175, Mar. 2021, doi: 10.1002/pat.5164.
- [92] M. Khan *et al.*, 'Evaluation of Changes in Morphology and Function of Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes (HiPSC-CMs) Cultured on an Aligned-Nanofiber Cardiac Patch', *PLoS ONE*, vol. 10, no. 5, p. e0126338, May 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126338.
- [93] M. Ding *et al.*, 'Aligned nanofiber scaffolds improve functionality of cardiomyocytes differentiated from human induced pluripotent stem cell-derived cardiac progenitor cells', *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 13575, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-70547-4.
- [94] B. W. Streeter, J. Xue, Y. Xia, and M. E. Davis, 'Electrospun Nanofiber-Based Patches for the Delivery of Cardiac Progenitor Cells', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, no. 20, pp. 18242–18253, May 2019, doi: 10.1021/acsami.9b04473.
- [95] S. Eom, S. M. Park, D. G. Hwang, H. W. Kim, J. Jang, and D. S. Kim, 'Fabrication of an align-random distinct, heterogeneous nanofiber mat endowed with bifunctional

- properties for engineered 3D cardiac anisotropy', *Composites Part B: Engineering*, vol. 226, p. 109336, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.compositesb.2021.109336.
- [96] J. Li *et al.*, 'Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue-like Constructs for Repairing the Infarcted Myocardium', *Stem Cell Reports*, vol. 9, no. 5, pp. 1546–1559, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.007.
- [97] D. Sridharan *et al.*, 'In situ differentiation of human-induced pluripotent stem cells into functional cardiomyocytes on a coaxial PCL-gelatin nanofibrous scaffold', *Materials Science and Engineering: C*, vol. 118, p. 111354, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111354.
- [98] S. N. H. Karimi, R. M. Aghdam, S. A. S. Ebrahimi, and Y. Chehrehsaz, 'Tri-layered alginate/poly(ϵ -caprolactone) electrospun scaffold for cardiac tissue engineering', *Polymer International*, vol. 71, no. 9, pp. 1099–1108, Sep. 2022, doi: 10.1002/pi.6371.
- [99] A. Fakhrali *et al.*, 'Fabrication and characterization of PCL/Gel nanofibrous scaffolds incorporated with graphene oxide applicable in cardiac tissue engineering', *Polymer-Plastics Technology and Materials*, vol. 60, no. 18, pp. 2025–2041, Dec. 2021, doi: 10.1080/25740881.2021.1939716.
- [100] P. Ahmadi, N. Nazeri, M. A. Derakhshan, and H. Ghanbari, 'Preparation and characterization of polyurethane/chitosan/CNT nanofibrous scaffold for cardiac tissue engineering', *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 180, pp. 590–598, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.001.
- [101] N. Shokraei, S. Asadpour, S. Shokraei, M. Nasrollahzadeh Sabet, R. Faridi-Majidi, and H. Ghanbari, 'Development of electrically conductive hybrid nanofibers based on CNT-polyurethane nanocomposite for cardiac tissue engineering', *Microscopy Res & Technique*, vol. 82, no. 8, pp. 1316–1325, Aug. 2019, doi: 10.1002/jemt.23282.
- [102] M. Zhang *et al.*, 'Three-Dimensional Poly-(ϵ -Caprolactone) Nanofibrous Scaffolds Promote the Maturation of Human Pluripotent Stem Cells-Induced Cardiomyocytes', *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, p. 875278, Aug. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.875278.
- [103] Y. Chen, J. P. Y. Chan, J. Wu, R. Li, and J. P. Santerre, 'Compatibility and function of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes on an electrospun nanofibrous scaffold, generated from an ionomeric polyurethane composite', *J Biomedical Materials Res*, vol. 110, no. 12, pp. 1932–1943, Dec. 2022, doi: 10.1002/jbm.a.37428.
- [104] Y. Chen *et al.*, 'Three-dimensional poly-(ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds directly promote the cardiomyocyte differentiation of murine-induced pluripotent stem cells

- through Wnt/ β -catenin signaling', *BMC Cell Biol*, vol. 16, no. 1, p. 22, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12860-015-0067-3.
- [105] L. Liu *et al.*, 'Integrated Manufacturing of Suspended and Aligned Nanofibrous Scaffold for Structural Maturation and Synchronous Contraction of HiPSC-Derived Cardiomyocytes', *Bioengineering*, vol. 10, no. 6, p. 702, Jun. 2023, doi: 10.3390/bioengineering10060702.
- [106] E. Tomecka, M. Wojasinski, E. Jastrzebska, M. Chudy, T. Ciach, and Z. Brzozka, 'Poly(l-lactic acid) and polyurethane nanofibers fabricated by solution blow spinning as potential substrates for cardiac cell culture', *Materials Science and Engineering: C*, vol. 75, pp. 305–316, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.055.
- [107] D. Kołodziejek *et al.*, 'Cardiac Tissue Modeling Using Flow Microsystems and Nanofiber Mats: Evaluating Hypoxia-Induced Cellular and Molecular Changes', *Sensors and Actuators B: Chemical*, p. 135169, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.snb.2023.135169.
- [108] Y. Jiang *et al.*, 'Dual human iPSC-derived cardiac lineage cell-seeding extracellular matrix patches promote regeneration and long-term repair of infarcted hearts', *Bioactive Materials*, vol. 28, pp. 206–226, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.05.015.
- [109] M. Sekuła-Stryjewska *et al.*, 'Graphene-based materials enhance cardiomyogenic and angiogenic differentiation capacity of human mesenchymal stem cells in vitro – Focus on cardiac tissue regeneration', *Materials Science and Engineering: C*, vol. 119, p. 111614, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111614.
- [110] J. Kieda *et al.*, 'Advances in cardiac tissue engineering and heart-on-a-chip', *J Biomedical Materials Res*, vol. 112, no. 4, pp. 492–511, Apr. 2024, doi: 10.1002/jbm.a.37633.
- [111] Y. Zhao *et al.*, 'Towards chamber specific heart-on-a-chip for drug testing applications', *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 165–166, pp. 60–76, 2020, doi: 10.1016/j.addr.2019.12.002.
- [112] A. Kobuszevska, D. Kołodziejek, M. Wojasinski, T. Ciach, Z. Brzozka, and E. Jastrzebska, 'Study of Stem Cells Influence on Cardiac Cells Cultured with a Cyanide-P-Trifluoromethoxyphenylhydrazine in Organ-on-a-Chip System', *Biosensors*, vol. 11, no. 5, p. 131, Apr. 2021, doi: 10.3390/bios11050131.
- [113] A. López-Canosa *et al.*, 'A microphysiological system combining electrospun fibers and electrical stimulation for the maturation of highly anisotropic cardiac tissue', *Biofabrication*, vol. 13, no. 3, p. 035047, Jul. 2021, doi: 10.1088/1758-5090/abff12.

- [114] A. Kobuszevska, D. Kolodziejek, M. Wojasinski, E. Jastrzebska, T. Ciach, and Z. Brzozka, 'Lab-on-a-chip system integrated with nanofiber mats used as a potential tool to study cardiovascular diseases (CVDs)', *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 330, p. 129291, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.129291.
- [115] S. C. Inbody, B. E. Sinquefield, J. P. Lewis, and R. E. Horton, 'Biomimetic microsystems for cardiovascular studies', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 320, no. 5, pp. C850–C872, May 2021, doi: 10.1152/ajpcell.00026.2020.
- [116] F. Xu *et al.*, 'Architecture design and advanced manufacturing of heart-on-a-chip: scaffolds, stimulation and sensors', *Microsyst Nanoeng*, vol. 10, no. 1, p. 96, Jul. 2024, doi: 10.1038/s41378-024-00692-7.
- [117] F. Navaee *et al.*, 'A Three-Dimensional Engineered Cardiac In Vitro Model: Controlled Alignment of Cardiomyocytes in 3D Microphysiological Systems', *Cells*, vol. 12, no. 4, p. 576, Feb. 2023, doi: 10.3390/cells12040576.
- [118] Z. Iwoń, E. Krogulec, A. Kierłańczyk, M. Wojasiński, and E. Jastrzębska, 'Hypoxia and re-oxygenation effects on human cardiomyocytes cultured on polycaprolactone and polyurethane nanofibrous mats', *J Biol Eng*, vol. 18, no. 1, p. 37, Jun. 2024, doi: 10.1186/s13036-024-00432-5.
- [119] E. Liszewska *et al.*, 'Establishment of two hiPSC lines (IIMCBi001-A and IIMCBi002-A) from dermal fibroblasts of healthy donors and characterization of their cell cycle', *Stem Cell Research*, vol. 52, p. 102225, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.scr.2021.102225.
- [120] M. Häkli *et al.*, 'Electrophysiological Changes of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes during Acute Hypoxia and Reoxygenation', *Stem Cells International*, vol. 2022, pp. 1–15, Dec. 2022, doi: 10.1155/2022/9438281.
- [121] A. J. Chu, E. J. Zhao, M. Chiao, and C. J. Lim, 'Co-culture of induced pluripotent stem cells with cardiomyocytes is sufficient to promote their differentiation into cardiomyocytes', *PLoS ONE*, vol. 15, no. 4, p. e0230966, Apr. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0230966.
- [122] I. Łopianiak *et al.*, 'Characterization of Blow-Spun Polyurethane Scaffolds–Influence of Fiber Alignment and Fiber Diameter on Pericyte Growth', *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 7, pp. 4388–4399, Jul. 2024, doi: 10.1021/acsbiomaterials.4c00051.
- [123] S. Homaeigohar and A. R. Boccaccini, 'Nature-Derived and Synthetic Additives to poly(ϵ -Caprolactone) Nanofibrous Systems for Biomedicine; an Updated Overview', *Front. Chem.*, vol. 9, p. 809676, Jan. 2022, doi: 10.3389/fchem.2021.809676.

- [124] N. Jirofti, D. Mohebbi-Kalhari, A. Samimi, A. Hadjizadeh, and G. H. Kazemzadeh, 'Small-diameter vascular graft using co-electrospun composite PCL/PU nanofibers', *Biomed. Mater.*, vol. 13, no. 5, p. 055014, Aug. 2018, doi: 10.1088/1748-605X/aad4b5.
- [125] D. Kai, M. P. Prabhakaran, G. Jin, and S. Ramakrishna, 'Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering', *J Biomed Mater Res*, vol. 98B, no. 2, pp. 379–386, Aug. 2011, doi: 10.1002/jbm.b.31862.
- [126] E. Karbassi *et al.*, 'Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine', *Nat Rev Cardiol*, vol. 17, no. 6, pp. 341–359, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41569-019-0331-x.
- [127] A. M. Gacita *et al.*, 'Genetic Variation in Enhancers Modifies Cardiomyopathy Gene Expression and Progression', *Circulation*, vol. 143, no. 13, pp. 1302–1316, Mar. 2021, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050432.
- [128] M. A. Branco *et al.*, '3D Microwell Platform for Cardiomyocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells', in *Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells*, vol. 2454, A. Nagy and K. Turksen, Eds., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2454. , New York, NY: Springer US, 2020, pp. 127–143. doi: 10.1007/7651_2020_336.
- [129] S. L. Padula, N. Velayutham, and K. E. Yutzey, 'Transcriptional Regulation of Postnatal Cardiomyocyte Maturation and Regeneration', *IJMS*, vol. 22, no. 6, p. 3288, Mar. 2021, doi: 10.3390/ijms22063288.
- [130] T. J. Kolanowski, C. L. Antos, and K. Guan, 'Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives', *International Journal of Cardiology*, vol. 241, pp. 379–386, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.ijcard.2017.03.099.
- [131] J. Gorecka *et al.*, 'The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing', *Stem Cell Res Ther*, vol. 10, no. 1, p. 87, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1185-1.
- [132] K. Lu *et al.*, 'Biofabrication of aligned structures that guide cell orientation and applications in tissue engineering', *Bio-des. Manuf.*, vol. 4, no. 2, pp. 258–277, Jun. 2021, doi: 10.1007/s42242-020-00104-5.
- [133] N. Anto Michel, S. Ljubojevic-Holzer, H. Bugger, and A. Zirlik, 'Cellular Heterogeneity of the Heart', *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 9, p. 868466, Apr. 2022, doi: 10.3389/fcvm.2022.868466.
- [134] H. Nazari *et al.*, 'Incorporation of SPION-casein core-shells into silk-fibroin nanofibers for cardiac tissue engineering', *J of Cellular Biochemistry*, vol. 121, no. 4, pp. 2981–2993, Apr. 2020, doi: 10.1002/jcb.29553.

- [135] S. F. Karkan *et al.*, ‘Electrospun polyurethane/poly (ϵ -caprolactone) nanofibers promoted the attachment and growth of human endothelial cells in static and dynamic culture conditions’, *Microvascular Research*, vol. 133, p. 104073, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.mvr.2020.104073.
- [136] D. Kołodziejek, I. Łopianiak, O. Tadko, M. Drozd, M. Wojasiński, and E. Jastrzębska, ‘Magnetic polyurethane nanomaterials: A novel approach for in vitro cardiac cell maturation and culture’, *Polymer Testing*, vol. 127, p. 108190, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.polymertesting.2023.108190.
- [137] M. M. O. Simbara, A. R. Santos, A. J. P. Andrade, and S. M. Malmonge, ‘Comparative study of aligned and nonaligned poly(ϵ -caprolactone) fibrous scaffolds prepared by solution blow spinning’, *J Biomed Mater Res*, vol. 107, no. 5, pp. 1462–1470, Jul. 2019, doi: 10.1002/jbm.b.34238.
- [138] M. Ben-Ari *et al.*, ‘Developmental changes in electrophysiological characteristics of human-induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes’, *Heart Rhythm*, vol. 13, no. 12, pp. 2379–2387, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.hrthm.2016.08.045.
- [139] S. Y. Ng, C. K. Wong, and S. Y. Tsang, ‘Differential gene expressions in atrial and ventricular myocytes: insights into the road of applying embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for future therapies’, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 299, no. 6, pp. C1234–C1249, Dec. 2010, doi: 10.1152/ajpcell.00402.2009.
- [140] Z. Iwoń *et al.*, ‘Improving rodents and humans cardiac cell maturity in vitro through polycaprolactone and polyurethane nanofibers’, *Biomed. Mater.*, vol. 19, no. 2, p. 025031, Mar. 2024, doi: 10.1088/1748-605X/ad240a.
- [141] Z. Iwoń *et al.*, ‘Maturation of human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) on polycaprolactone and polyurethane nanofibrous mats’, *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, p. 12975, Jun. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-63905-z.
- [142] M. Colpan, J. Iwanski, and C. C. Gregorio, ‘CAP2 is a regulator of actin pointed end dynamics and myofibrillogenesis in cardiac muscle’, *Commun Biol*, vol. 4, no. 1, p. 365, Mar. 2021, doi: 10.1038/s42003-021-01893-w.
- [143] C. Tan, J. Li, Z. Yuan, and Y. Mu, ‘Circular RNA ciRs-126 promotes hypoxia/reoxygenation cardiac injury possibly through miR-21’, *Thrombosis J*, vol. 20, no. 1, p. 2, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12959-021-00355-x.
- [144] M. C. Peters *et al.*, ‘Metabolic Maturation Increases Susceptibility to Hypoxia-induced Damage in Human iPSC-derived Cardiomyocytes’, *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 11, no. 10, pp. 1040–1051, Oct. 2022, doi: 10.1093/stcltm/szac061.

- [145] M. Häkli *et al.*, ‘Human induced pluripotent stem cell-based platform for modeling cardiac ischemia’, *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, p. 4153, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83740-w.
- [146] M. Ouyang, J. Lu, Q. Ding, T. Qin, C. Peng, and Q. Guo, ‘Knockdown of long non-coding RNA PVT1 protects human AC16 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and autophagy by regulating miR-186/Beclin-1 axis’, *Gene*, vol. 754, p. 144775, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.gene.2020.144775.
- [147] I. S. Elgenaidi and J. P. Spiers, ‘Hypoxia modulates protein phosphatase 2A through HIF-1 α dependent and independent mechanisms in human aortic smooth muscle cells and ventricular cardiomyocytes’, *British J Pharmacology*, vol. 176, no. 11, pp. 1745–1763, Jun. 2019, doi: 10.1111/bph.14648.
- [148] A. E. V. Quaglio, A. C. S. Castilho, and L. C. Di Stasi, ‘Experimental evidence of MAP kinase gene expression on the response of intestinal anti-inflammatory drugs’, *Life Sciences*, vol. 136, pp. 60–66, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2015.06.012.
- [149] Y. Liu *et al.*, ‘Cardiac Troponin T (TNNT2) plays a potential oncogenic role in colorectal carcinogenesis’, *Cancer Cell Int*, vol. 23, no. 1, p. 146, Jul. 2023, doi: 10.1186/s12935-023-02977-9.
- [150] F. Gonnot *et al.*, ‘SERCA2 phosphorylation at serine 663 is a key regulator of Ca²⁺ homeostasis in heart diseases’, *Nat Commun*, vol. 14, no. 1, p. 3346, Jun. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-39027-x.
- [151] P. A. Golforoush *et al.*, ‘Selective protection of human cardiomyocytes from anthracycline cardiotoxicity by small molecule inhibitors of MAP4K4’, *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 12060, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68907-1.
- [152] A. Brodarac *et al.*, ‘Susceptibility of murine induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to hypoxia and nutrient deprivation’, *Stem Cell Res Ther*, vol. 6, no. 1, p. 83, Dec. 2015, doi: 10.1186/s13287-015-0057-6.
- [153] A. Bizy and M. Klos, ‘Optimizing the Use of iPSC-CMs for Cardiac Regeneration in Animal Models’, *Animals*, vol. 10, no. 9, p. 1561, Sep. 2020, doi: 10.3390/ani10091561.
- [154] M. Vogler *et al.*, ‘Hypoxia Modulates Fibroblastic Architecture, Adhesion and Migration: A Role for HIF-1 α in Cofilin Regulation and Cytoplasmic Actin Distribution’, *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, p. e69128, Jul. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0069128.

- [155] L. Iommarini, A. M. Porcelli, G. Gasparre, and I. Kurelac, ‘Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer’, *Front. Oncol.*, vol. 7, p. 286, Nov. 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00286.
- [156] T. Bishop and P. J. Ratcliffe, ‘HIF Hydroxylase Pathways in Cardiovascular Physiology and Medicine’, *Circulation Research*, vol. 117, no. 1, pp. 65–79, Jun. 2015, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305109.
- [157] P. A. Janmey, D. A. Fletcher, and C. A. Reinhart-King, ‘Stiffness Sensing by Cells’, *Physiological Reviews*, vol. 100, no. 2, pp. 695–724, Apr. 2020, doi: 10.1152/physrev.00013.2019.
- [158] J. H. Marxsen *et al.*, ‘Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases’, *Biochemical Journal*, vol. 381, no. 3, pp. 761–767, Aug. 2004, doi: 10.1042/BJ20040620.
- [159] T. K. Johnson *et al.*, ‘Exosomes derived from induced vascular progenitor cells promote angiogenesis in vitro and in an in vivo rat hindlimb ischemia model’, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 317, no. 4, pp. H765–H776, Oct. 2019, doi: 10.1152/ajpheart.00247.2019.
- [160] Y. Fu, Q. Wang, D. Wang, and Y. Li, ‘Dexmedetomidine Inhibits Ferroptosis to Alleviate Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiomyocyte Injury by Regulating the HDAC2/FPN Pathway’, *Cardiovasc Drugs Ther*, Jan. 2025, doi: 10.1007/s10557-024-07664-z.
- [161] L. Piacentini and J. S. Karliner, ‘Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart’, *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 83, no. 1, pp. 21–37, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0163-7258(99)00010-8.
- [162] Y. Sun *et al.*, ‘Effects of hypoxia on cardiomyocyte proliferation and association with stage of development’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 118, p. 109391, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109391.
- [163] H. Kang *et al.*, ‘Development of a next-generation endogenous OCT4 inducer and its anti-aging effect in vivo’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 257, p. 115513, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115513.
- [164] C. Xu *et al.*, ‘Establishment of an iPSC line (BCHNDi001-A) from a patient with nicotinamide nucleotide repair system deficiency caused by biallelic NAXD mutations’, *Stem Cell Research*, vol. 76, p. 103346, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.scr.2024.103346.
- [165] M. J. Välimäki and H. J. Ruskoaho, ‘Targeting GATA4 for cardiac repair’, *IUBMB Life*, vol. 72, no. 1, pp. 68–79, Jan. 2020, doi: 10.1002/iub.2150.

- [166] K. Poornima *et al.*, ‘Implications of Three-Dimensional Cell Culture in Cancer Therapeutic Research’, *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 891673, May 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.891673.
- [167] T. Vanden Berghe *et al.*, ‘Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo’, *Methods*, vol. 61, no. 2, pp. 117–129, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.ymeth.2013.02.011.
- [168] M. Oka, T. Moriyama, M. Asally, K. Kawakami, and Y. Yoneda, ‘Differential Role for Transcription Factor Oct4 Nucleocytoplasmic Dynamics in Somatic Cell Reprogramming and Self-renewal of Embryonic Stem Cells’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 21, pp. 15085–15097, May 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.448837.
- [169] Y. Tang *et al.*, ‘Induction and differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional cardiomyocytes on a compartmented monolayer of gelatin nanofibers’, *Nanoscale*, vol. 8, no. 30, pp. 14530–14540, 2016, doi: 10.1039/C6NR04545F.
- [170] E. Querdel *et al.*, ‘Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner’, *Circulation*, vol. 143, no. 20, pp. 1991–2006, May 2021, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047904.
- [171] J. Li *et al.*, ‘Developing Thick Cardiac Tissue with a Multilayer Fiber Sheet for Treating Myocardial Infarction’, *Adv. Fiber Mater.*, vol. 5, no. 6, pp. 1905–1918, Dec. 2023, doi: 10.1007/s42765-023-00313-4.
- [172] H. A. Aglan, H. H. Ahmed, H. H. Beherei, B. M. Abdel-Hady, B. Ekram, and M. S. Kishta, ‘Generation of cardiomyocytes from stem cells cultured on nanofibrous scaffold: Experimental approach for attenuation of myocardial infarction’, *Tissue and Cell*, p. 102461, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.tice.2024.102461.

Spis rycin

Rycina 1 Schemat przedstawiający budowę mięśnia sercowego.	19
Rycina 2 Schemat przedstawiający szlak HIF-1 α w warunkach prawidłowego poziomu tlenu (normoksja) i w warunkach niedotlenienia (hipoksja). Poziom O ₂ reguluje działanie hydroksylazy prolilowej (PHD), która w normoksji powoduje przyłączenie do HIF-1 α białka Von Hippel-Lindau (ang. Von Hippel-Lindau protein, VHL), powodując ubikwitynację i degradację HIF-1 α przez proteasomy. W mikrośrodkowisku o obniżonym poziomie tlenu, białka powodujące rozkład HIF-1 α są degradowane, dzięki czemu następuje dimeryzacja i stabilizacja kompleksu HIF-1 α z HIF-1 β . Białka transportowane są do jądra komórkowego i wiążą się z p300 (ang. 300-kilodalton coactivator protein, 300-kilodaltonowe białko koaktywatora), CBP (ang. CREB-Binding Protein, białko wiążące CREB) oraz DNA komórki, regulując ekspresję różnych genów podczas niedotlenienia [29].	22
Rycina 3 (A) Procentowy udział komórek z HIF-1 α w zależności od czasu trwania niedotlenienia w porównaniu do hodowli prowadzonej w warunkach normoksji dla ludzkich kardiomiocytów. (B) Aktywność mitochondrialna po H/R w zależności od czasu reoksygenacji, * - p < 0,001 [21].	23
Rycina 4 Klasyfikacja komórek macierzystych.	26
Rycina 5 Schemat przedstawiający pozyskanie komórek iPSC i iPSC-CM oraz ich możliwe wykorzystanie [50].	28
Rycina 6 Porównanie zmian w fazach potencjału czynnościowego w ludzkich dojrzałych kardiomiocytach komorowych serca oraz komórkach iPSC-CM pochodzących od człowieka. Cyfry oznaczają kolejne fazy AP [57].	32
Rycina 7 Schemat wytwarzania nanowłókien metodą rozdmuchu roztworu polimeru (SBS) [84].	36
Rycina 8 Zdjęcia przedstawiają komórki BM-MSC hodowane na kolagenowych nanowłóknach po immunobarwieniu. W komórkach wybarwiono; CD90 obecny w komórkach macierzystych, GATA4 obecny we wczesnym etapie różnicowania komórek macierzystych w kardiomiocyty oraz cTnT, cTnI obecne w kardiomiocytach (A) 1 dnia, (C) 12 dnia, (E) 28 dnia z dodaniem 10 μ M lub bez czynnika 5-AZA. Jądra komórkowe we wszystkich przypadkach zostały wybarwione DAPI. Kwantyfikacja poziomu białek zostały przedstawione dla 1 dnia (B), dla 12 dnia (D) i dla 28 dnia (F) dla hodowli BM-MSC na nanowłóknach. Skala 100 μ m [88].	38
Rycina 9 (A) Schemat mat nanowłóknistych z równolegle ułożonymi nanowłóknami pokrytymi różnymi białkami do badania proliferacji i ułożenia 3 typów komórek serca (H9c2, HCM i	

RCM) [106]. (B) (A)' Schemat wytworzonych modeli 3D z wykorzystaniem komórek serca hodowanych na uporządkowanych nanowłóknach, (B)' zdjęcia SEM równolegle ułożonych nanowłókien polilaktydu kwasu glikolowego (PLGA), (C)', (D)' obrazy mat nanowłóknistych umieszczonych na płytce z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), (E)'-(I)' zdjęcia hodowli CM z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM) wyhodowanych na matach nanowłóknistych, (J)'-(L)' histologia trójwymiarowych modeli komórek serca o różnej gęstości wysiewu komórek. (M)' Grubość trójwymiarowych modeli komórek serca o różnej gęstości wysiewu komórek. (C) (A)'-(C)' morfologia komórek iPSC w hodowli 2D (płytki polistyrenowa) i 3D (komórki hodowane na matach nanowłóknistych PCL-żelatyna) po 14- i 28-dniowej hodowli. (D)' Analiza ilościowa częstotliwości skurczów komórek iPSC podczas różnicowania kardiomiocytów w hodowli 2D i 3D, (E)' obrazy SEM morfologii iPSC hodowanych w kulturach 2D i 3D podczas różnicowania w kulturach 2D (I-II, V-VI) i 3D (III-IV, VII-VIII) w D14 i D28 [97]. 42

Rycina 10 (A) (A)' i (B)' Zdjęcie mikroukładu przepływowego z mikrorówkami i hydrożelem, (C)' ułożenie komórek H9c2 w mikrorówkach, (D)' komórki wybarwione falloidyną i DAPI wykazują wydłużony, anizotropowy kształt po 7 dniach hodowli [117]. (B) (a) Schemat mikroukładu przepływowego obejmującego mikrokomorę hodowlaną (czerwony), mikrokanaly z medium hodowlanym (niebieski) i elektrody stymulujące (ciemnoszare), (b) zdjęcie mikroukładu, (c) schemat przedstawiający mikrokomorę, w której kardiomiocyty i sercowe fibroblasty rosną na matach nanowłóknistych [113]. (C) (A)' Schemat mikrokomory w mikroukładzie przepływowym, zawierającej mikrokolce, podtrzymujące maty nanowłókniste z PU, (B) schemat przedstawiający geometrie mikroukładu przeznaczonego do prowadzenia hipoksji i normoksji [107]. 45

Rycina 11 (A) Zdjęcia z SEM nanowłókien wykonanych z polikaprolaktonu (PCL) o średnicy 250 ± 78 nm i 509 ± 178 nm oraz nanowłókien wykonanych z poliuretanu (PU) o średnicy 279 ± 108 nm i 452 ± 151 nm. (B) Rozkład kąta odchylenia włókien od założonego ukierunkowania dla nanowłókien PCL i PU. (C) Analiza porowatości mat z nanowłókien PCL i PU. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie jednokierunkowej ANOVA. $n \geq 3$ 66

Rycina 12 Właściwości fizyczne nanowłókien wykonanych z PCL i PU. (A) Średnica nanowłókien (B) i (C) wytrzymałość na rozciąganie mierzona równolegle (PL) i prostopadle (PP) do ułożenia włókien. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie jednokierunkowej ANOVA. $n \geq 3$ 67

Rycina 13 Żywotność komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C) hodowanych na matach nanowłóknistych po 10 dniach w odniesieniu do hodowli 24 h. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotny

wzrost żywotności komórek został określony za pomocą testu t-Studenta w porównaniu do hodowli prowadzonych na płytkach polistyrenowych (kontrola) po 10 dniach hodowli. n=3.70	
Rycina 14 Komórki (A) H9c2, (B) HL-1 i (C) HCM wybarwione kalceiną-AM (CAM) (kolor zielony), hodowane przez 24 h i 10 dni na matach nanowłóknistych z polikaprolaktonu (PCL) oraz poliuretanu (PU). Jako kontrolę zastosowano płytki polistyrenowe. Po prawej stronie przedstawiono wykresy ułożenia komórek względem siebie w tych hodowlach. Skala 100 µm.	73
Rycina 15 Zdjęcia komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C) po immunobarwieniu: α-aktynina (kolor czerwony), troponina T (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski). Immunobarwienie przeprowadzono po 10 dniach hodowli na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych PCL i PU. Skala 20 µm.	78
Rycina 16 Zdjęcia komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C) po immunobarwieniu: MYH7 (kolor czerwony), MYH6 (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski). Immunobarwienie wykonano po 10 dniach hodowli na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych PCL i PU. Skala 20 µm.	79
Rycina 17 Ilościowa analiza ekspresji genów metodą qRT-PCR komórek serca hodowanych na płytce polistyrenowej, matach nanowłóknistych z PCL (2) i PU (2) hodowanych przez 10 dni. (A) troponina T (TNNT2), troponina I (TNNI3), ATPaza wapniowa typu 2 (SERCA2) dla H9c2, (B) troponina T (TNNT2), troponina I (TNNI3), α-aktynina sercowa (ACTN2), ATPazy wapniowej typu 2 (SERCA2), podjednostka 5 alfa kanału sodowego (SCN5A) i lekki łańcuch miozyny komorowej 2 (MYL2) dla kardiomiocytów HL-1 i HCM. * - p<0,05 - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola) (test t-Studenta). n=3.	80
Rycina 18 Schemat przedstawiający proces różnicowania iPSC w iPSC-CM oraz zdjęcia hodowli komórek w kolejnych dniach różnicowania.	83
Rycina 19 Zdjęcia ludzkich kardiomiocytów zróżnicowanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM) w trakcie hodowli.	84
Rycina 20 Odsetek komórek iPSC-CM, w których wybarwiono troponinę T. Analizę wykonano w 15 dniu hodowli kardiomiocytów po różnicowaniu iPSC za pomocą protokołu GiWi. Odsetek komórek, w których wyznaczono troponinę T obliczono na podstawie analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej dla co najmniej 20 000 komórek.	85
Rycina 21 Zdjęcia komórek iPSC-CM wybarwionych kalceiną-AM (CAM) (kolor zielony) hodowane przez 72 h na matach nanowłóknistych z PCL i PU w zależności od gęstości wysiewu	

komórek. Jako kontrolę zastosowano płytki polistyrenowe. Po prawej stronie znajdują się wykresy przedstawiające ukierunkowanie komórek w poszczególnych hodowlach. $n \geq 3$ 86

Rycina 22 (A) Zdjęcie komórek iPSC-CM wybarwionych kalceiną-AM (CAM) (kolor zielony) po 10 dniach hodowli na matach nanowłóknistych z PCL i PU. Hodowle na płytkach polistyrenowych zostały użyte jako kontrola. Skala 100 μm . (B) Wykresy i tabele przedstawiające ukierunkowany wzrost komórek iPSC-CM w 10 dniu hodowli. Założono, że orientacja nanowłókien wynosi 0° . (C) Zdjęcia z SEM przedstawiają iPSC-CM na płytkach polistyrenowych (kontrola) i na matach nanowłóknistych (PCL i PU) po 10 dniach, skala 5 μm . * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie testu t-Studenta i porównując do kontroli. $n \geq 3$ 89

Rycina 23 (A) Zdjęcia komórek po immunobarwieniu: α -aktynina (wybarwione czerwone), troponina T (wybarwione na zielono) i jądra komórkowe (wybarwione na niebiesko) w iPSC-CM oraz (B) względna intensywność fluorescencji po 10 dniach hodowli na płycie polistyrenowej (kontrola) oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU. Skala 20 μm . * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola) (test t-Studenta). $n \geq 3$ 91

Rycina 24 Analiza qRT-PCR ekspresji genów w iPSC-CM hodowanych na płycie polistyrenowej oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU przez 10 dni. Ekspresja genów troponiny T (TNNT2), troponiny I (TNNI3), α -aktyniny sercowej (ACTN2), ATPazy wapniowej typu 2 (SERCA2), podjednostka 5 alfa kanału sodowego (SCN5A) i lekkich łańcuch miozyny komorowej 2 (MYL2). * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola) (test t-Studenta). $n = 3$ 92

Rycina 25 (A, B) Zdjęcia wybarwionych komórek HCM: białko F-aktyny (wybarwione na kolor czerwony), HIF-1 α (wybarwiono na kolor zielony) oraz jądra komórkowe (wybarwione na kolor niebieski) hodowanych na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU w warunkach normoksji (21 % O_2), (A) 6 h hipoksji (1 % O_2) i (B) 6 h hipoksji + 24 h reoksygenacji. Pod zdjęciami znajdują się wykresy przedstawiające ułożenie filamentów aktynowych względem siebie w tych hodowlach. Rozkład kąta odchylenia włókien od założonego ukierunkowania dla włókien aktynowych oceniony przy użyciu oprogramowania ImageJ. Poziom białka HIF-1 α w komórkach HCM po (C) hipoksji i (D) po hipoksji + reoksygenacji (H/R) zbadany na podstawie względnej intensywności fluorescencyjnej. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontroli hodowanej

w warunkach normoksji, —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. $n \geq 3$. Skala 50 μm	100
Rycina 26 (A, B) Zdjęcia wybarwionych komórek iPSC-CM: białko F-aktyny (wybarwione na kolor czerwony), HIF-1 α (wybarwione na kolor zielony) oraz jądra komórkowe (wybarwione na kolor niebieski) hodowanych na płytkach polistyrenowych (kontrola) oraz matach nanowłóknistych z PCL i PU w warunkach normoksji (21 % O ₂), (A) 6 h hipoksji (1 % O ₂) i (B) 6 h hipoksji + 24 h reoksygenacji. Pod zdjęciami znajdują się wykresy przedstawiające ułożenie filamentów aktynowych względem siebie w tych hodowlach. Rozkład kąta odchylenia włókien od założonego ukierunkowania dla włókien aktynowych oceniony przy użyciu oprogramowania ImageJ. Poziom białka HIF-1 α w komórkach iPSC-CM po (C) hipoksji i (D) po hipoksji + reoksygenacji (H/R) zbadany na podstawie względnej intensywności fluorescencyjnej. *- $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontrolnej hodowanej w warunkach normoksji, —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. $n \geq 3$. Skala 50 μm	103
Rycina 27 Wyniki oznaczenia typu śmierci komórkowej dla linii komórkowej HCM po 6 h hipoksji (A, C) lub hipoksji z reoksygenacją (6/24 h) (B, D) hodowanych na matach nanowłóknistych z PCL i PU oraz na płytkach polistyrenowych (kontrola poddana hipoksji lub H/R) w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normoksji. *- $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu z kontrolą hodowaną w warunkach normoksji, —* - $p < 0,05$ istotne różnice pomiędzy grupami. $n \geq 3$. Skala 100 μm	105
Rycina 28 Wyniki oznaczenia typu śmierci dla komórek iPSC-CM po 6 h hipoksji (A, C) lub hipoksji z reoksygenacją (6/24 h) (B, D) hodowanych na matach nanowłóknistych z PCL i PU oraz na płytkach polistyrenowych (kontrola poddana hipoksji lub H/R) w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normoksji. *- $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu z kontrolą normoksji, —* - $p < 0,05$ statystycznie istotne różnice między grupami. $n \geq 3$. Skala 100 μm	106
Rycina 29 Analiza ekspresji genów dla komórek HCM hodowanych na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PU w warunkach (A) hipoksji i (B) hipoksji z reoksygenacją dla: HIF-1 α , MAP4K, TNNT2, SERCA2 i SCN5A. *- $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola hodowana w warunkach normoksji). —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. $n = 3$	108
Rycina 30 Analiza ekspresji genów dla komórek iPSC-CM hodowanych na płytkach polistyrenowych i matach nanowłóknistych z PU (A) w warunkach hipoksji i (B) hipoksji z	

reoksygenacją dla genów HIF-1 α , MAP4K, TNNT2, SERCA2 i SCN5A. * - p<0,05 - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych (kontrola hodowana w warunkach normoksji). n=3.	110
Rycina 31 Zdjęcia współhodowli komórek HCM i iPSC hodowanych w medium hodowlanym E8 lub DMEM/F12 przez 72 h. Powiększenie 4x i 10x. Zdjęcia komórek wybarwionych kalceiną-AM (komórki wybarwione na zielono – żywe) i jodkiem propidyny (komórki wybarwione na czerwono – martwe) po 72 h. Skala 100 μ m.	116
Rycina 32 Zdjęcia współhodowli komórek iPSC-CM i iPSC hodowanych w medium E8 lub RPMI/B27 po 72 h. Powiększenie 4x i 10x, zdjęcia komórek wybarwionych kalceiną-AM (komórki wybarwione na zielono – żywe) i jodkiem propidyny (komórki wybarwione na czerwono – martwe) po 72 h. Skala 100 μ m.	117
Rysunek 33 Zdjęcia współhodowli komórek iPSC wybarwionych CellTracker z komórkami iPSC-CM po 24 h. Skala 100 μ m.	118
Rycina 34 Wyniki oznaczenia typu śmierci komórek (A, C) po 24 h hodowli w normoksji (kontrola) na płytkach polistyrenowych, iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU lub (B, D) po 10 dniach hodowli w normoksji (kontrola) na płytkach polistyrenowych, iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU. *- p<0,05- statystycznie istotne różnice w porównaniu z kontrolą normoksji, —* - p<0,05 - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami. n $\geq$ 3. Skala 100 μ m.	121
Rycina 35 (A) Zdjęcia komórek z wybarwionymi białkami OCT4 (kolor czerwony), troponiny T (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski) we współhodowli iPSC-CM/iPSC oraz (B) względna intensywność fluorescencji po 24 h hodowli w warunkach normoksji na płytkach polistyrenowych (kontrola), iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU. Skala 20 μ m. * - p<0,05 - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych w warunkach normoksji (kontrola). —* - p<0,05 - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami.	122
Rycina 36 (A) Zdjęcia komórek z wybarwionymi białkami OCT4 (kolor czerwony), troponiny T (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski) we współhodowli iPSC-CM/iPSC oraz (B) względna intensywność fluorescencji po 10 dniach hodowli w warunkach normoksji na płytkach polistyrenowych (kontrola), iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU. Skala 20 μ m. * - p<0,05 -	

statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytkach polistyrenowych w warunkach normoksji (kontrola). —* - $p < 0,05$ - różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami.	123
Rycina 37 (A) Analiza ekspresji genów dla współhodowli prowadzonej w warunkach normoksji (kontrola) na płytkach polistyrenowych, iPSC -CM po hipoksji/iPSC na płytkach polistyrenowych oraz iPSC -CM po hipoksji/iPSC na matach nanowłóknistych z PU: po 10 dniach hodowli dla Nanog kodujący Nanog, GATA4 kodujący GATA4, TNNI3 kodujący troponinę I, SERCA2 kodujący ATPazę wapniową typu 2. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie z komórkami hodowanymi na płytce polistyrenowej (kontrola normoksji). *z linią poziomą - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice między grupami. n=3. (B) Analiza ekspresji genów w odniesieniu porównując hodowle 10 dni do 24h dla Nanog, GATA4, TNNI3, MAP4K i SERCA2. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono przez porównanie do 24 h hodowli. n=3.	126

Spis tabel

Tabela 1 Porównanie właściwości kardiomiocytów dojrzałych, uzyskanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych - iPSC-CM i kardiomiocytów płodowych [55]–[57]. cTnI – sercowa izoforma troponiny I, ssTnI – izoforma troponiny I mięśnia szkieletowego, α – MHC – ciężki łańcuch miozyny, izoform α , β -MHC – ciężki łańcuch miozyny, izoform β	30
Tabela 2 Przykłady zastosowania mat nanowłóknistych do badań z wykorzystaniem różnych typów komórek serca i komórek macierzystych.	39
Tabela 3 Sekwencje wykorzystanych starterów.....	63
Tabela 4 Liczba komórek H9c2, HL-1 i HCM o równoległym ułożeniu hodowanych na matach nanowłóknistych i płytkach polistyrenowych (kontrola). * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontroli określono za pomocą testu t-Studenta. $n \geq 3$	74
Tabela 5 Analiza morfologii komórek H9c2 (A), HL-1 (B) i HCM (C). * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne zmiany w porównaniu z kontrolą (test t-Studenta). Analizę przeprowadzono dla 10-dniowej hodowli. $n \geq 3$	75
Tabela 6 Morfologia komórek iPSC-CM w zależności od gęstości wysianych komórek. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie testu t-Studenta, w porównaniu do kontroli. $n \geq 3$	87
Tabela 7 Morfologia komórek iPSC-CM po 10 dniach hodowli. * - $p < 0,05$ - statystycznie istotne różnice określono na podstawie testu t-Studenta i porównując do kontroli. $n \geq 3$	89

DOROBK NAUKOWY

Publikacje związane z tematyką doktoratu

1. **Iwoń Z**, Krogulec E, Kierłańczyk A, Baranowska P, Łopianiak I, Wojasiński M, Jastrzębska E. Improving rodents and humans cardiac cell maturity in vitro through polycaprolactone and polyurethane nanofibers. *Biomed Mater.* 2024 Feb 12;19(2). doi: 10.1088/1748-605X/ad240a
2. **Iwoń, Z.**, Krogulec, E., Kierłańczyk, A. *et al.* Hypoxia and re-oxygenation effects on human cardiomyocytes cultured on polycaprolactone and polyurethane nanofibrous mats. *J Biol Eng* **18**, 37 (2024). doi: 10.1186/s13036-024-00432-5
3. **Iwoń, Z.**, Krogulec, E., Tarnowska, I. *et al.* Maturation of human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) on polycaprolactone and polyurethane nanofibrous mats. *Sci Rep* **14**, 12975 (2024). doi: 10.1038/s41598-024-63905-z

Publikacje niezwiązane z tematyką doktoratu

1. D. Kołodziejek, Urszula Sierańska, **Zuzanna Iwoń**, Iwona Łopianiak, Ewelina Krogulec, Michał Wojasiński, Elżbieta Jastrzębska, ‘Cardiac Tissue Modeling Using Flow Microsystems and Nanofiber Mats: Evaluating Hypoxia-Induced Cellular and Molecular Changes’, *Sensors and Actuators B: Chemical*, p. 135169, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.snb.2023.135169

Konferencje

Materiał pokonferencyjny

1. **Z. Iwoń**, M. Wojasiński, I. Łopianiak, A. Kierłańczyk, P. Dobrzyń, T. Ciach, E. Jastrzębska: Study of the application of polymer nanofibers in a cardiac cellular model in vitro, Monograph: 10th European Young Engineers Conference, Numer artykułu: 8.9, 2022, Politechnika Warszawska, ISBN 978-83-953822-0-8, s. 76
2. Baranowska, Patrycja, Magdalena Flont, Agnieszka Żuchowska, Dominik Kołodziejek, Joanna Konopka, Oliwia Tadko, **Zuzanna Iwoń-Szczawińska**, i Elżbieta Jastrzębska. Systemy Lab-on-a-Chip w inżynierii komórkowej, W: XIV Sympozjum Techniki Laserowej, 9-13września 2024, Zamek Ryn, Materiały Konferencyjne / Piramidowicz Ryszard, Anders Krzysztof Paweł (red.), 2024, ul. Koszykowa 75, 00-662 Warszawa, Instytut Mikroelektroniki i Optoelektroniki PW, s.60-60, Numer artykułu:#O-19 , ISBN 978-83-64102-06-6

Ustne prezentacje międzynarodowe

1. **Z. Iwon**, M. Wojasinski, I. Lopianiak, A. Kierlanczyk, P. Dobrzyn, T. Ciach, E. Jastrzębska, Study of the application of polymer nanofibers in a cardiac cellular model in vitro, 10th European Young Engineers Conference, 04-06.04.2022, Warszawa, Polska (jako autor prezentujący)
2. **Z. Iwon**, D. Kolodziejek, I. Tarnowska, U. Sierańska, E. Krogulec, M. Wojasinski, I. Lopianiak, E. Jastrzębska, Advancing Cardiac Cell Modeling: From Nanofiber Scaffolds to Integrated Microsystems, NanoBio Tech, 12-15.11.2023, Montreux, Szwajcaria

3. D. Kolodziejek, M. Wojasinski, I. Lopianiak, **Z. Iwon**, E. Jastrzębska ; „Heart-on-a-chip system with polymeric nanofiber mats as a new approach for mimicking heart tissue microphysiology”, Organoids and Organs-on-Chips Europe 2022, 21-22. 06. 2022 - Rotterdam, Niderlandy

Postery międzynarodowe

1. **Z. Iwoń** , D. Kołodziejek , M. Wojasinski , I. Łopianiak , P. Sokołowska , E. Krogulec, E. Jastrzębska, Micro- and nano-technology approach to study cardiac cell function, prezentacja, NanoBio Tech, 14-16.11 2022, Montreux, Szwajcaria
2. **Zuzanna Iwon**, Aleksandra Kierlanczyk, Ewelina Krogulec, Michał Wojasinski, Iwona Łopianiak, Elżbieta Jastrzebska, Nanofibers with different physicochemical properties as a new substrate for micro- and nanoengineering used for hypoxia simulation human cardiomyocytes, The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2023), 15-19.10.2023 (jako autor prezentujący)
3. Dominik Kolodziejek, **Zuzanna Iwon** , Aleksandra Szlachetka , Marcin Drozd , Michał Wojasinski , Ewelina Krogulec , Elżbieta Jastrzębska „ *Organ-on-a-chip driven regeneration: investigating nanofibrous mat impact on human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (ipsc-cm) post-hypoxia*”, microTAS 13-17.10.2024, Montreal, Kanada
4. Dominik Kołodziejek, **Zuzanna Iwoń**, Iwona Łopianiak, Ewelina Krogulec, Michał Wojasinski, Elżbieta Jastrzębska, „*Evaluating the Impact of Polymer Nanofibers on Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Hypoxia Studies: Insights from a Heart-on-a-Chip Model*” EUROoCS Annual Meeting 2024, 3-5.07.2024, Mediolan, Włochy

Postery krajowe

1. **Z. Iwoń**, M. Wojasinski, T. Ciach, P. Dobrzyń, E. Jastrzębska „Badanie żywotności i ukierunkowania szczurzych kardiomioblastów hodowanych na nanowłóknach z polikaprolatonu” XVII Warszawskim Seminarium Doktorantów Chemików Chemsession 2021, 24.09.2021, Warszawa (jako autor prezentujący)
2. **Z. Iwoń**, I. Łopianiak, P. Sokołowska, E. Krogulec, T. Ciach, E. Jastrzębska, Badanie zastosowania nanowłókien polimerowych w hodowli ludzkich kardiomiocytów, XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, PoKoChA 2022, 19-23 czerwca 2022, Łódź (jako autor prezentujący)
3. **Z. Iwoń**, M. Wojasinski, I. Tarnowska, E. Krogulec, E. Jastrzębska, The nanofibrous mats for human cardiac cells culture, Xth Intercollegiate Biotechnology Symposium “SymbiozaXI, 12-14.05.2023, Warszawa (jako autor prezentujący)
4. Dominik Kołodziejek, **Zuzanna Iwoń**, Aleksandra Szlachetka, Ewelina Krogulec, Marcin Drozd, Michał Wojasinski, Elżbieta Jastrzebska, „*Badanie regeneracji komórek serca w systemie typu Heart-On-A-Chip*”, XX Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików, 28.06.2024
5. **Zuzanna Iwoń**, Julia Białota, Aleksandra Szlachetka, Michał Wojasinski, Dominik Kołodziejek, Ewelina Krogulec, Elżbieta Jastrzębska „*Zastosowanie nanowłókien polimerowych w badaniu hipoksji ludzkich kardiomiocytów*” 66 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 15-20.09.2024, Poznań

Udział w projektach

1. Wykonawca w NCN SONATA BIS 9 nr 2019/34/E/ST5/00381 o tytule Badania nad zastosowaniem systemów Lab-on-a-chip do analizy regeneracji komórek serca.
2. Wnioskodawca i główny wykonawca w IDUB YOUNG II o tytule Różnicowanie i dojrzewanie hodowli kardiomiocytów i organoidów serca pochodzących od

indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych w mikrosystemie w warunkach przepływowych i statycznych.