



WOJSKOWY INSTYTUT MEDYCZNY

Klinika Kardiologii i Chorób Wewnętrznych
Kierownik: pplk dr hab. n. med. Paweł Krzesiński

04-141 Warszawa, ul. Szaserów 128
tel. 261 817 294, tel. kom. 665 707 580

wpl. dnia	09-05-2019
L.dz. Dz.	1389/19
Znak sprawy Dz.	

Warszawa, 06.05.2019

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Marii Dzięgała

pt. „*Wpływ zmiennej dostępności żelaza na funkcjonowanie i aktywność metaboliczną ludzkich kardiomiocytów i miocytów szkieletowych*“

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ewa A. Jankowska

Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wprowadzenie do recenzji

Szacuje się, że niewydolność serca (NS) dotyczy w krajach rozwiniętych 1–2% dorosłej populacji. Wraz z wiekiem częstość występowania NS wzrasta i w grupie powyżej 70. roku życia obejmuje nawet ponad 10% populacji. Co istotne, u chorych po 65 r.ż NS jest najczęstszą przyczyną hospitalizacji. W Polsce, choruje na nią ok 800 tysięcy osób. Prognozy wskazują, że zachorowalność na NS w najbliższym czasie znacznie wzrośnie, co jest związane z obserwowanym procesem starzenia się społeczeństwa.

Do najczęstszych objawów NS należy ograniczenie tolerancji wysiłku fizycznego, duszność, zaburzenia metaboliczne, a spośród schorzeń współtowarzyszących istotne znaczenie dla stanu funkcjonalnego mają m. in.: arytmia, choroba wieńcowa, przewlekła obturacyjna choroba płuc, niewydolność nerek i anemia. W ostatnich latach zwrócono szczególną uwagę na rolę zaburzeń metabolicznych, w tym nieprawidłowości przemian energetycznych w patomechanizmie NS. Równocześnie udowodniono znaczenie żelaza w utrzymaniu sprawnego metabolizmu energetycznego komórek i obrony antyoksydacyjnej. W badaniach klinicznych wykazano, że systemowy niedobór tego mikroelementu wiąże się z gorszą wydolnością fizyczną i zwiększono śmiertelnością, a jego suplementacja poprawia stan funkcjonalny i jakość życia pacjentów z NS. Siła dowodów z tych badań znalazła odzwierciedlenie w obowiązujących wytycznych dotyczących postępowania z chorymi z NS,

w których ujęto zalecenie dożylniej suplementacji żelaza u chorych z jego niedoborem i nawet łagodnie upośledzoną frakcją wyrzutową lewej komory.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Dziegala pt. „*Wpływ zmiennej dostępności żelaza na funkcjonowanie i aktywność metaboliczną ludzkich kardiomiocytów i miocytów szkieletowych*“ dotyczy zatem tematu jak najbardziej aktualnego, zarówno w aspekcie badań podstawowych, jak i użyteczności w codziennej praktyce klinicznej. Wobec skąpych i nie w pełni spójnych danych z badań eksperymentalnych, podjęcie badań nad podłożem molekularnym działania żelaza w mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych, było jak najbardziej pożądane.

Omówienie rozprawy

Opis ogólny

Rozprawa doktorska opiera się na omówieniu dwóch ściśle powiązanych ze sobą publikacjach, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. Dziegala M, Kobak KA, Kasztura M, Bania J, Josiak K, Banasiak W, Ponikowski P, Jankowska EA. *Iron Depletion Affects Genes Encoding Mitochondrial Electron Transport Chain and Genes of Non-Oxidative Metabolism, Pyruvate Kinase and Lactate Dehydrogenase, in Primary Human Cardiac Myocytes Cultured upon Mechanical Stretch. Cells. 2018;7(10). pii: E175. doi: 10.3390/cells7100175. (IF 4,829, pkt. MNiSW: 5 pkt)*
2. Dziegala M, Josiak K, Kasztura M, Kobak K, von Haehling S, Banasiak W, Anker SD, Ponikowski P, Jankowska E. *Iron deficiency as energetic insult to skeletal muscle in chronic diseases. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2018;9(5):802-815. doi: 10.1002/jcsm.12314. (IF 12,511, pkt. MNiSW: 45 pkt)*

Pierwsza jest pracą oryginalną, a druga obszerną pracą przeglądową (*review*). W obu tych pracach mgr Magdalena Dziegala jest pierwszym autorem. Ich łączna punktacja to IF 17,34 pkt; pkt. MNiSW: 50 pkt.

Rozprawa doktorska ma układ poprawny, typowy dla rozpraw doktorskich opartych na cyklu opublikowanych prac, liczy 64 strony (wraz z załącznikami). Problem badawczy został przedstawiony na 4 stronach zwięzłego **Wprowadzenia**. Opis jest przejrzysty i zachęca do zapoznania z pełnymi publikacjami. Na oddzielnej stronie ujęto **Cele** pracy a następnie krótki zwięzły opis **Materiału** badawczego i **Metodyki** pracy oryginalnej (nr 1). Można by oczekiwać nieco bardziej obszernego opisu zastosowanych metod badawczych w języku polskim, ale wobec szczegółowego opisu w treści samej publikacji (nr 1) uwaga ta ma niewielkie znaczenie. Warto podkreślić, że wyniki są efektem projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (UMO-2012/05/E/NZ5/00590), a badania zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej (warto byłoby uzupełnić numer zgody).

W treści **Wyniki** na kolejnych 25 stronach rozprawy zostały zaprezentowane obie publikacje w formie wydruków. Ich interpretację umieszczono w części **Podsumowanie i Wnioski**, podkreślając wartość

poznawczą rozprawę oraz możliwość jej wykorzystania zarówno w dalszych badaniach w zakresie nauk podstawowych, jak i wnioskowaniu klinicznym. W mojej ocenie ta część zyskałaby na przejrzystości, gdyby wnioski zostały ujęte w punktach korespondujących z wypunktowanymi wcześniej celami. Zasadniczą część pracy kończą **Streszczenia** w języku polskim (3 strony) i angielskim (2 strony). Następnie w **Załącznikach** zaprezentowano podsumowanie dorobku naukowego Doktorantki i oświadczenia wszystkich współautorów, których analiza potwierdza wiodący wkład Doktorantki w powstanie omawianych publikacji.

Dobór literatury, zarówno w samej rozprawie doktorskiej, jak i obydwu pracach jest bardzo dobry i świadczy zarówno o doskonałej znajomości piśmiennictwa w temacie, jak również umiejętności jego trafnego wykorzystania. Adekwatnie do typu publikacji: w pracy oryginalnej (nr 1) odwołano się do 31 pozycji piśmiennictwa (w tym niemal połowa z ostatniej dekady) a w pracy przeglądowej do aż 169 pozycji piśmiennictwa (w tym również niemal połowa z ostatniej dekady). Sama rozprawa doktorska odwołuje się do 65 dobrze dobranych referencji. Część z nich, co zrozumiałe, została wykorzystana w ww. publikacjach.

Praca przygotowana jest przejrzysto i nowocześnie, napisana poprawnym i komunikatywnym językiem. Drobne i sporadyczne usterki edycyjne (np. rozwinięcie skrótu ATP – str 6, ROS – str 7) i stylistyczne (np. „...*Do niedawna będąc wiązany z niedokrwistością,*” – sr. 7) nie mają istotnego wpływu na ocenę pracy.

Cele rozprawy

Cele projektu badawczego, którego efektem jest rozprawa doktorska zostały trafnie i precyzyjnie sformułowane. Głównymi celami była ocena wpływu zmiennej dostępności żelaza w środowisku hodowlanym pierwszorzędnym kardiomiocytów ludzkich na geny uczestniczące w metabolizmie energetycznym, zarówno tlenowym jak i beztlenowym, oraz na zewnątrzkomórkową sekrecję mleczanów przez wspomniane komórki (co ujęto w pracy nr 1) oraz prezentacja potencjalnych patomechanizmów molekularnych wpływu niedoboru żelaza na metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych u pacjentów z niewydolnością serca (praca nr 2).

Problematyka rozprawy jest zatem trafna, a przedstawione hipotezy badawcze i cele zostały sformułowane poprawnie. Założenia badawcze rozprawy świadczą o jej oryginalności.

Ocena merytoryczna

W publikacji „*Iron Depletion Affects Genes Encoding Mitochondrial Electron Transport Chain and Genes of Non-Oxidative Metabolism, Pyruvate Kinase and Lactate Dehydrogenase, in Primary Human Cardiac Myocytes Cultured upon Mechanical Stretch. Cells.*” udowodniono znaczenie różnych stężeń żelaza dla ekspresji białek uczestniczących w beztlenowej glikolizie, produkcji mleczanów oraz mitochondrialnym metabolizmie tlenowym. Czytelnika w temat pracy wprowadza zwięzła część wstępna dobrze uzasadniająca podjęcie badań. Opis metodyki jest bardzo szczegółowy i

uporządkowany, pozwala odtworzyć eksperyment badawczy. Dokładnie opisano plan eksperymentu, warunki hodowli pierwszorzędowych kardiomiocytów, zastosowane metody genetyki molekularnej oraz identyfikacji i oceny ilościowej produktów białkowych. Wykorzystano nowoczesne, wystandaryzowane metody badacze. **Dobór narzędzi jest trafny i zostały one zastosowane prawidłowo.** Szczególnym atutem pracy jest zastosowanie oceny ekspresji mRNA genów kodujących badanych białka, następnie ekspresji tychże białek, a ostatecznie „efektu metabolicznego” – zewnątrzkomórkowej produkcji mleczanów. Co więcej, oceny dokonano oddzielnie w warunkach statycznych oraz stresu mechanicznego. Wyniki są zaprezentowane zwięźle, w sposób uporządkowany i logiczny. Zastosowanie 100 uM deferoksaminy spowodowało ok. 2-krotne zmniejszenie zawartości żelaza wewnątrzkomórkowego wobec kontroli, a dodanie do podłoża soli żelaza zwiększyło jego stężenie ok. 5-krotnie. Szczegóły zaprezentowano na rycinach, a najważniejsze wyniki skomentowano w tekście. Mam jedynie wątpliwość co do numeracji na Rycinie 2 – w tekście mówi się o 2A-2F a na Rycinie są jedynie wyniki 2A-C (?).

Udowodniono, że redukcja ilości żelaza w środowisku hodowlanym kardiomiocytów powoduje zmniejszenie ekspresji kompleksów enzymatycznych kluczowych dla przemian tlenowych oraz zwiększa ekspresję enzymów odpowiedzialnych za mniej korzystne przemiany beztlenowe (kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej). Równocześnie najwyraźniejszym efektem nadmiaru żelaza była inhibicja ekspresji dehydrogenazy mleczanowej (choć obserwowano również mniejszą ekspresji kompleksów mitochondrialnych pod wpływem stresu mechanicznego niż w kontroli). Znalazło od odzwierciedlenia w niższym poziomie mleczanów w porównaniu do kardiomiocytów hodowanych w środowisku z niedoborem żelaza, ale nie wobec kontroli. Niewątpliwie kluczowymi wnioskami opartymi na wynikach tej pracy jest niekorzystne działanie niedoboru żelaza na przemiany energetyczne kardiomiocytów, co może tłumaczyć niekorzystne efekty kliniczne. Równocześnie nadmiar żelaza okazał się nie mieć wyraźnych skutków negatywnych a na poziomie ekspresji wybranych enzymów może być potencjalnie korzystny. Doktorantka podchodzi do tego wniosku z adekwatną do zakresu uzyskanych wyników badań ostrożnością, co świadczy o dojrzałości naukowej. W publikacji „*Iron deficiency as energetic insult to skeletal muscle in chronic diseases*” dokonano zaś bardzo szczegółowego przeglądu piśmiennictwa dotyczącego znaczenia żelaza dla funkcjonowania mięśni szkieletowych. Choć nie jest to praca oryginalna, to ściśle nawiązuje do pierwszej publikacji a jej dojrzałość świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki w tym temacie.

Problematykę udziału żelaza w metabolizmie mięśni szkieletowych ujęto w następujących wątkach tematycznych: 1/ metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych, 2/ znaczenie żelaza w kontekście metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych, 3/ niedobór żelaza i zaburzenia metaboliczne w mięśniach szkieletowych, 4/ powiązanie niedoboru żelaza, zaburzeń oksydacyjnych, wydolności funkcjonalnej u pacjentów ze schorzeniami przewlekłymi i miopatią. Taki układ pracy tworzy logiczną całość, prowadząc czytelnika od podstaw (pato)fizjologicznych do objawów klinicznych. Opracowanie jest obszerne, ale zarazem zwięźle. Poparte licznym piśmiennictwem. Treść pracy

ilustrują szczegółowe i przejrzyste, bardzo dobrej jakości ryciny. Szczegółowo przedstawiono niuanse przemian tlenowych i beztlenowych w miocytach, z uwzględnieniem różnych źródeł energii oraz mechanizmów regulacyjnych. Zwrócono szczególną uwagę na rolę mitochondriów oraz udział żelaza w cyklu Krebsa, procesach oksydacyjnej fosforylacji oraz metabolizmie lipidów. Opisano również skutki niedoboru żelaza na poziomie tkankowym, komórkowym i molekularnym. Ostatnia część pracy stanowi prezentację przyczyn miopatii związanych ze schorzeniami przewlekłymi, głównie NS i powiązania niedoboru żelaza z tą patologią. Szczególnie ciekawy jest rozdział dotyczący zaburzeń odpowiedzi metaboreceptorów u chorych z NS, co wtórnie może prowadzić do aktywacji układu współczulnego, zaburzeń hemodynamicznych oraz ograniczenia tolerancji wysiłku na tle nasilonego odczuwania duszności. Tak szerokie ujęcie tematu świadczy o dużej swobodzie w poruszaniu się w tym trudnym obszarze wiedzy.

Wnioski przedstawione w części rozprawy *Podsumowanie i Wnioski* w pełni odpowiadają na postawione cele i znajdują potwierdzenie w treści prac pełnotekstowych. Obie prace stanowią spójne zestawienie i wzajemnie się uzupełniają. Stanowią one źródło cennych, nowatorskich informacji, czego najlepszym dowodem jest ich opublikowanie w renomowanych czasopismach naukowych. Należy podkreślić, że ten fakt, sam w sobie, czyni ocenę rozprawy przez Recenzenta łatwiejszą.

Uwagi dodatkowe

Wartym podkreślenia jest bogaty dorobek naukowy mgr Magdaleny Dziegala nie wchodzący w skład rozprawy doktorskiej. Stanowi go 7 prac pełnotekstowych (6 z nich opublikowano w renomowanych czasopismach, w 2 z nich mgr Magdaleny Dziegala była pierwszym autorem) oraz 17 streszczeń prac prezentowanych na zjazdach międzynarodowych. Dorobek ten jest spójny z tematyką rozprawy doktorskiej, co świadczy o konsekwentnym rozwoju naukowym Doktorantki. Łączna punktacja to MNiSW = 209 pkt oraz IF = 37,284 pkt, co na tym etapie rozwoju naukowego stanowi osiągnięcie godne wyróżnienia.

Pytania i uwagi do Doktorantki

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Magdaleny Dziegala nasuwają mi się następujące pytania:

Czy Doktoranka zastanawiała się, dlaczego przy niższej ekspresji LDHA w warunkach stresu mechanicznego w porównaniu do kontroli, poziom produkcji mleczanów był porównywalny?

Czy przy mniejszych dawkach soli żelaza (w wykonanym eksperymencie przeładowanie żelazem komórkowym po ich podaniu było istotne - stężenie było 5-krotnie większe niż w kontroli) można by się spodziewać „korzystniejszego” efektu, lepszego nawet niż w grupie kontrolnej?

Czy Doktoranka rozważała - np. jako kontynuację badań - ocenę wpływu uzupełnienia żelaza na badane parametry w środowisku z jego wcześniejszym niedoborem? Aby sprawdzić czy uzupełnienie niedoboru koryguje zaburzenia z nim związane?

W jakim stopniu wyniki badań in vitro można ekstrapolować na zjawiska in vivo, w których kardiomiocyt znajduje się w otoczeniu innych komórek miokardium (vide praca Melenovsky ref. 24)?

Wnioski końcowe

Niezależnie od przedstawionych powyżej drobnych uwag, głównie technicznych, oraz postawionych powyżej pytań, wynikających z wzbudzonego zainteresowania tematem, rozprawę doktorską mgr Magdaleny Dziegąła oceniam bardzo wysoko. **Otrzymane wyniki są nowatorskie, mają istotne znaczenie dla postępu wiedzy na temat znaczenie gospodarki żelaza u chorych z NS i innymi schorzeniami przewlekłymi, inspirują do dalszego zgłębiania tego tematu.** Uważam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Dziegąła stanowi doskonały dowód, że badania z zakresu nauk podstawowych mogą stanowić istotny wkład w postęp diagnostyki i leczenia chorych. Równocześnie jest ona najlepszym przykładem, że realizacja badań w zespole interdyscyplinarnym kreuje ekspertów potrafiących nie tylko usystematyzować wiedzę z pogranicza różnych dziedzin nauki, ale i wskazać nowe obszary badań.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Dziegąła spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Niniejszym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Dziegąła do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie z uwagi na wysoką wartość naukową rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Dziegąła składam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o przyznanie jej wyróżnienia.

dr hab. med. Paweł Krześciński

dr hab. n. med. Paweł Krześciński
specjalista chorób wewnętrznych
KARDIOLOG
1316559