



Kraków, 05.09.2019

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Dzięgały

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

Pomimo postępów w dostępności i stosowaniu nowoczesnych metod leczenia, niewydolność serca (NS) pozostaje jednym z najpoważniejszych schorzeń w historii naturalnej chorób człowieka. Rokowanie pozostaje niekorzystne, a u wielu chorych 5-letnie przeżycie jest krótsze niż w przypadku najczęstszych schorzeń nowotworowych. Jednocześnie częstość występowania niewydolności krążenia nie ulega zmniejszeniu. Wskazuje to na niedostateczne zrozumienie patogenezy tego schorzenia jak i patofizjologii jego głównych objawów w tym objawów nietolerancji wysiłku fizycznego, zaburzeniami metabolicznym. Prowadzi to do częstych hospitalizacji oraz wyjątkowo niskiej jakości życia.

Kluczowym elementem w patofizjologii procesów prowadzących do zespołu klinicznego NS jest modeling mięśnia sercowego, w trakcie którego dochodzi do szeregu zmian strukturalnych (przerost/rozstrzeń) jak i czynnościowych (obniżona kurczliwość, asynchronia, upośledzenie napełniania). Prowadzi to do niewydolności mięśnia sercowego jako pompy.

Wraz z coraz głębszym zrozumieniem roli procesów metabolicznych w patogenezie schorzeń sercowo-naczyniowych, w ostatnich latach zwrócono uwagę na rolę nieadekwatnego wykorzystania substratów energetycznych, dysfunkcji mitochondriów, jako kluczowych elementów rozwoju NS. Zmiany energetyczne mają w NS charakter ogólnoustrojowy i są. Obserwowane nie tylko w kardiomiocytach, lecz także w komórkach mięśni szkieletowych, co z jednej strony może służyć jako obwodowy marker zaburzeń w obrębie serca, a z drugiej przyczyniać się do ogólnoustrojowych objawów wyniszczenia obserwowanych w skrajnej NS.

Pani mgr Magdalena Dzięgała podjęła właśnie ten ciekawy nurt badania, skupiając się na roli żelaza w metabolizmie energetycznym mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych. Jest to szczególnie ważny temat, gdyż optymalna dostępność żelaza jest konieczna dla wydajnej produkcji ATP, pod względem zarówno magazynowania tlenu w mioglobinie, jak i optymalnej aktywności mitochondrialnych kompleksów enzymatycznych. Kliniczne znaczenie. Tej tematyki wiąże się z faktem iż niedobór żelaza jest najczęstszym niedoborem żywieniowym na świecie i dotyczy ponad jednej trzeciej populacji. U chorych z zarówno ostrą jak i przewlekłą NS, niedobór żelaza jest znacznie częstszy. Do tego odkrycia w znacznym stopniu przyczynił się zespół promotor doktoratu – Pani Prof. Ewy Jankowskiej i Pana Profesora Ponikowskiego, pokazując, iż w przewlekłej niewydolności serca niedobór żelaza dotyczy nawet 50% chorych. Co więcej, zawartość żelaza w tkance lewej komory jest lokalnie obniżona w niewydolnych sercach ludzkich, niezależnie od współwystępowania anemii. Wiąże się to z rozwojem dysfunkcji mitochondriów w sercu. Mechanizmy te scharakteryzowano zarówno w biopsjach mięśnia sercowego jak i sercach w modelach zwierzęcych. Podejście to nie pozwala jasno ekstrapolować tak uzyskanych wyników do funkcjonowania kardiomiocytów, gdyż w obu tych modelach badawczych badane były tkanki na które składało się wiele komórek. Dlatego tak ważne było podjęcie przez Panią mgr. Magdalenę Dzięgałą badań w modelu izolowanych pierwotnych kardiomiocytach i komórkach mięśni szkieletowych. Praca z użyciem pierwotnych kardiomiocytów jest bardzo trudna (poza komórkami neonatalnymi, które z kolei nie w pełni odpowiadają będą komórkom pacjentów z NS). Aby odtworzyć warunki w m. sercowym Doktorantka poddawała komórki rozciąganiu imitującemu pracę serca.

Celem pracy mgr Magdaleny Dzięgały była ocena wpływu zmiennej dostępności żelaza w środowisku hodowlanym pierwotnych kardiomiocytów ludzkich na geny uczestniczące w metabolizmie energetycznym, zarówno tlenowym jak i beztlenowym, oraz na zewnątrzkomórkową sekrecję mleczanów przez wspomniane komórki. Ponadto celem projektu było opisanie potencjalnych patomechanizmów molekularnych wpływu niedoboru żelaza na metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych u pacjentów z niewydolnością serca. Cele te zostały zrealizowane poprzez realizację siedmiu celów szczegółowych: (1) ocenę wpływu zmiennej dostępności żelaza na ekspresję mRNA genów kodujących kompleksy mitochondrialne w pierwszorzędkowych kardiomiocytach ludzkich hodowanych w warunkach pracy mechanicznej; (2) ocenę wpływu zmiennej dostępności żelaza na ekspresję mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu beztlenowego w pierwszorzędkowych kardiomiocytach ludzkich hodowanych w warunkach pracy mechanicznej; (3) ocenę wpływu zmiennej dostępności żelaza na ekspresję podjednostek białkowych kompleksów mitochondrialnych w pierwszorzędkowych kardiomiocytach ludzkich hodowanych w warunkach pracy mechanicznej;

(4) ocenę wpływu zmiennej dostępności żelaza na ekspresję białkową enzymów metabolizmu beztlenowego w pierwszorzędowych kardiomiocytach ludzkich hodowanych w warunkach pracy mechanicznej; (5) ocenę wpływu zmiennej dostępności żelaza na zewnątrzkomórkową produkcję mleczanów przez pierwszorzędowe kardiomiocyty ludzkie hodowanych w warunkach pracy mechanicznej; (6) badanie potencjalnych patomechanizmów molekularnych niekorzystnego wpływu niedoboru żelaza na metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych u pacjentów z niewydolnością serca oraz (7) przedstawienie niedoboru żelaza jako wspólnego mianownika osłabienia metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych obserwowanego w chorobach przewlekłych takich jak niewydolność serca, przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz cukrzyca typu II.

Licząca 51 stron praca ma klasyczną budowę. Składa się z wstępu, celów i założeń pracy, materiału i metodyki, wyników prezentowanych w postaci jednej pracy oryginalnej oraz jednej pracy poglądowej, acz prezentującej oryginalne hipotezy, podsumowania wyników i wniosków, streszczeń oraz 65 pozycji aktualnego piśmiennictwa. Do pracy załączono spis wartości bibliometrycznych publikacji, choć co dziwne, datowany na 2017 rok oraz oświadczenia współautorów konieczne dla uznania wkładu własnego doktorantki w prezentowaną pracę. Sposób przedstawienia pracy jest czytelny i nie budzi zastrzeżeń. Pracę czyta się z przyjemnością. Na uwagę zasługuje bardzo sprawne posługiwanie się autorki terminologią specjalistyczną. Praca oryginalna załączona zawiera ważne wyniki badań i choć nie jest nadmiernie rozbudowana, spełnia wymogi oryginalności i wkładu wymaganego od kandydatów do stopnia doktora. Z kolei praca poglądowa, jest opublikowana w jednym z wiodących pism w dziedzinie wskazując na wysoką międzynarodową pozycję autorów w tym zakresie. Prezentuje ona wnikliwą analizę tematyki.

We wstępie Doktorantka szczegółowo opisuje najpierw zagadnienia podstawowej biologii i kontekst kliniczny niewydolności serca. W dalszej części wstępu mgr Dzięgała omówiła krótko zagadnienia metabolizmu energetycznego mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych. W następnym podrozdziale przedstawiła rolę żelaza w metabolizmie energetycznym mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych by następnie przedstawić problematykę niedoboru żelaza w niewydolności serca. Omawiając te zagadnienia Doktorantka zacytowała najważniejsze pozycje piśmiennictwa, pomijając jednak dość duży zakres informacji i prac. Wstęp jest napisany jasno. Brak rycin jest w pełni uzasadniony faktem iż zawarta w rozprawie praca poglądowa jest bogata w bardzo dobrze przygotowane Ryciny. We Wstępie oraz w pracy poglądowej wprowadzone zostały wszystkie konieczne dla dalszego zrozumienia pracy terminy i omówiony aktualny stan wiedzy. Co zasługuje na uwagę Doktorantka dobrze przedstawiła uzasadnienie i nowatorskość wyboru głównego modelu badawczego – pierwotnych kardiomiocytów

poddawanych naprężeniom/rozciąganiu. Podsumowując ocenę tej części rozprawy, we wstępie mgr Dzięgała jasno przedstawiła potrzebę określenia zaburzeń szlaków molekularnych związanych z metabolizmem komórkowym w kontekście niedoboru żelaza. Przejrzyste i jasne ujęcie tematu we wstępie i w pracy poglądowej wskazuje, że Doktorantka dobrze zapoznała się z omawianymi zagadnieniami i potrafi wiedzę syntetyzować i jasno przekazać.

Cele badań są przedstawione jasno, choć bardzo obszernie jak na pojedynczą pracę oryginalną. Zostały one jednak zrealizowane w toku rozprawy doktorskiej.

Opis metodyki badań jest rzetelny zarówno w 1-stronicowej części doktoratu poświęconej metodyce/opisowi eksperymentu jak i w metodyce samej pracy oryginalnej, choć nie jest do końca jasny sens powtarzania tych informacji w formie skróconego 1-stronicowego opisu eksperymentu. Opis Metod wskazuje na samodzielność wykonanej pracy, a także na świadomy wybór wiarygodnych i dostępnych technik badawczych.

Wyniki badań obejmują 2 publikacje, opublikowane w periodykach naukowych w 2018 roku. Kopie prac są załączone.

W pierwszej z publikacji pt. „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 Oct; 7(10): 175) badania wykonano na modelu pierwotnych kardiomiocytów ludzkich, które hodowano przez 48 godzin w warunkach stacjonarnych bądź w warunkach pracy mechanicznej. Doktorantka porównała wpływ zredukowanego, optymalnego lub zwiększonego stężenia żelaza w środowisku hodowlanym. Analizie poddano ekspresję podjednostek mitochondrialnych kompleksów enzymatycznych (kompleksy I-V) oraz enzymów metabolizmu beztlenowego, kinazy pirogronianowej (PKM2) i dehydrogenazy mleczanowej (LDHA) zarówno na poziomie mRNA metodą qRT-PCR, jak i białka metodą Western Blotting. Oceniono również stężenie mleczanów wydzielanych do medium hodowlanego. Na uwagę zasługuje kompleksowa ocena badanych szlaków zarówno na poziomie RNA jak i białka jak i metabolitów. Stanowi to niewątpliwą wartość prezentowanej pracy. W badaniach tych zaobserwowano, iż obniżone stężenie żelaza w warunkach stresu mechanicznego spowodowało zmniejszenie ekspresji kompleksów I-V przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji PKM2 oraz LDHA, jak również stężenia mleczanów w medium hodowlanym. Co ciekawe, kardiomiocyty wystawione na zwiększone stężenie żelaza podczas wysiłku mechanicznego wykazywały zredukowaną ekspresję kompleksów mitochondrialnych I-V, jednakże spadek był mniejszy niż w przypadku zastosowania chelatora żelaza. Podwyższone stężenie żelaza w medium hodowlanym spowodowało zmniejszenie ekspresji LDHA, przy czym nie wpłynęło na zewnątrzkomórkową

sekrecję mleczanów. Podsumowując, w pracy tej wykazano, iż w pracujących kardiomiocytach ludzkich niedobór żelaza wywiera bardziej niekorzystny efekt niż zwiększone stężenie tego mikroelementu zarówno na geny metabolizmu tlenowego, jak i na produkcję mleczanów. Co więcej, podwyższone stężenie żelaza w środowisku hodowlanym pracujących kardiomiocytów zdaje się posiadać pewne właściwości protekcyjne w kontekście genów metabolizmu beztlenowego, nie wpływając przy tym na zewnątrzkomórkową sekrecję mleczanów. Podczas gdy użycie pierwotnych kardiomiocytów jest bardzo wartościowe zastanawia tytuł pracy w którym autorka sugerowała porównanie z mięśniami szkieletowymi. Niestety, w wynikach oryginalnych takiego porównania nie możemy znaleźć. Co więcej wyniki te wzbudziły moje pytanie, w jakim stopniu obserwowane na poziomie kardiomiocytów zmiany odpowiadają tym obserwowanym w niewydolnym mięśniu sercowym i czy kardiomiocyty pierwotne z serc z niewydolnością krążenia wykazują podobne zachowanie. Zaciekało mnie wreszcie w jakim mechanizmie wg Autorki, dochodzi do podobnych zmian ekspresji białek kompleksów mitochondrialnych I-V zarówno w niedoborze jak i w nadmiarze żelaza?

Mięśni szkieletowych natomiast dotyczy druga z prac - praca pogładowa pt. „Iron deficiency as energetic insult to skeletal muscle in chronic diseases” opublikowana w *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018 Oct; 9(5): 802–815. W pracy tej opisano potencjalne patomechanizmy molekularne prowadzące do osłabienia przemian tlenowych metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych, co jest obserwowane u pacjentów z chorobami przewlekłymi takimi jak niewydolność serca, przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz cukrzyca typu II. Podkreślono, iż patomechanizmy na poziomie komórkowym występujące w wymienionych chorobach są podobne. Zwrócono również uwagę na fakt częstego współwystępowania u tych chorych niedoboru żelaza, który poprzez opisane patomechanizmy wywiera niekorzystny wpływ na maszynę molekularną metabolizmu tlenowego i jako istotny czynnik może przyczyniać się do pogorszenia energetyki mięśni szkieletowych i miopatii szkieletowej obserwowanej w niewydolności serca, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc i cukrzycy typu II. Pewien niedosyt recenzenta wzbudził fakt, iż cenne byłoby, w przypadku włączenia takiej pracy jako części rozprawy doktorskiej, zastosowanie ściśle zaplanowanej i opisanej metodyki przygotowania prac pogładowych np. w postaci przeglądu systematycznego. Zwiększyłyby to wartość pracy jako części rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie wyników i wnioski przedstawione są zwięźle. Są klarowne i odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom badania, w pewnych miejscach wykraczając poza postawione cele.

Trochę brak poszerzonej dyskusji, która mogłaby nadać kontekst i porównanie między metabolizmem kardiomiocytów i mięśni szkieletowych, co bardzo zaciekało

mnie jako recenzenta.

W podsumowaniu, prezentowana praca opisuje wpływ zmiennej dostępności żelaza (zarówno niedoboru jak i zwiększonego jego stężenia) na geny i białka uczestniczące w metabolizmie tlenowym i beztlenowym w pierwszorzędowych kardiomiocytach ludzkich poddanych rozciąganiu imitującemu pracę serca. Dalej rozprawa traktuje szczegółowo o możliwych patomechanizmach molekularnych wpływu niedoboru żelaza na osłabiony metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych obserwowany u pacjentów z niewydolnością serca. Co więcej, niedobór żelaza zaproponowany zostaje jako wspólny mianownik wspomnianych nieprawidłowości metabolicznych obecnych w mięśniach szkieletowych w chorobach przewlekłych takich jak niewydolność serca, przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz cukrzyca typu II.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska mgr Magdaleny Dzięgały spełnia wymogi rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytet Medyczny im Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr. Magdaleny Dzięgały do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam, iż praca ta stanowi cenny wkład do światowego piśmiennictwa w tym zakresie, wskazując na nowe mechanizmy regulacji metabolizmu kardiomiocytów, a następnie prezentuje tę dysfunkcję w mięśniach szkieletowych w ważnym patofizjologicznym kontekście klinicznym.

„Rozprawa doktorska 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.)”.



Prof. dr hab. med. Tomasz Guzik
Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie