

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Aleksandry Paterek**

**pt. „Ocena zaburzeń obiegu żelaza oraz próba ich korekcji w modelu pozawałowej niewydolności serca u szczura”** wykonanej w Zakładzie Fizjologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie,  
pod promotorską opieką dr hab. Michała Mączewskiego, Prof CMKP

Zaburzenia mechanizmów homeostazy żelaza, towarzyszą niewydolności mięśnia sercowego i mogą one występować nawet u około połowy pacjentów z niewydolnością mięśnia sercowego. Sporo jest opublikowanych prac opisujących skutki suplementacji żelaza na różne aspekty niewydolności mięśnia sercowego u ludzi (*Anvi T et al., Eur J Heart Failure 2012, 14, 423-9*), jednak mechanizmy zaburzeń homeostazy żelaza w mięśniu sercowym, jak również zaburzeń ogólnoustrojowych mechanizmów homeostazy żelaza w niewydolności mięśnia sercowego, nie są ciągle dobrze poznane.

Celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Paterek było poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów homeostazy żelaza w niewydolnym mięśniu sercowym, w szczególności zbadanie zaburzeń hemostazy żelaza w modelu pozawałowej niewydolności serca u szczurów i zbadanie wpływu podaży żelaza na rozwój niewydolności serca w modelu szczurzej pozawałowej niewydolności mięśnia sercowego.

Podstawą rozprawy doktorskiej są 3 opublikowane prace, dwie oryginalne i jedna pogładowa; we wszystkich doktorantka jest pierwszym autorem. Prace oryginalne: *Paterek A., Kępska M., Kołodziejczyk J., Leszek P., Mackiewicz U., Mączewski M. 30 Acute heart rate-dependent hemodynamic function of the heart in the post-myocardial infarction rat model: change over time Can J Cardiol 2018;34(10):1341-1349* oraz *Paterek A., Kępska M., Sochanowicz B., Chajduk E., Kołodziejczyk J., Polkowska-Motrenko H., Kruszewski M., Leszek P., Mackiewicz U., Mączewski M. Beneficial effects of intravenous iron therapy in a rat model of heart failure with preserved systemic iron status but depleted intracellular cardiac stores Scientific reports 2018;8(1):15758*, obie opublikowane są w czasopiśmie o IF>4 (IF=4,122 lub 4,524, MNiSW= 30 lub 40). Podobnie, praca pogładowa opublikowana została w czasopiśmie o podobnej randze; *Paterek A., Mackiewicz U., Mączewski M. Iron and the heart: a paradigm shift from systemic to cardiomyocyte abnormalities Journal of Cellular Physiology 2019; (IF= 4.522, MNiSW =35).*

Układ pracy doktorskiej – obok odbitek prac, jednostronicowych ich streszczeń po polsku, odpowiednich oświadczeń autorów - zawiera 7 stron wstępu, półstronicowy cel pracy, 7 stron dyskusji, jednostronicowe podsumowanie pracy doktorskiej, krótkie

streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, oraz bibliografię. Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Paterek stanowi więc raczej dzieło zwarte.

We wstępie doktorantka przedstawia podstawowe wiadomości na temat niewydolności serca, modeli szczurzych niewydolności serca oraz zagadnienia z zakresu hemostazy żelaza w mięśniu sercowym i zaburzeń metabolizmu żelaza w niewydolności serca. Wstęp jest dobrze napisany, ale jest bardzo zwiezły, jak na szeroki zakres opisywanych zagadnień. Szkoda też, że nie ma w niej rycin. Łatwiej byłoby wtedy czytać podrozdział dotyczący homeostazy żelaza w mięśniu sercowym.

Recenzent zwrócił też uwagę na kilka zagadnień poruszanych we wstępie. Autorka pisze, że stosowanie modeli szczurzych niewydolności mięśnia sercowego niesie za sobą wiele korzyści i że te modele są najczęściej i najskuteczniej stosowanymi modelami niewydolności serca w badaniach podstawowych i translacyjnych. Autorka cytuje przy tym stwierdzeniu pracę Hausnera i wsp. (Cir Res 2012), a opisuje tylko kilka organiczeń modeli szczurzych; wyższa częstotliwość rytmu serca, wyższa częstotliwość oddechu, szybszy metabolizm, krótki czas życia szczurów, jednorodność populacji zwierząt. Wstęp nie zwiera też żadnych opisanych ograniczeń stosowanego modelu niedokrwienia mięśnia sercowego u szczurów - bez reperfuzji. Chętnie na te tematy bym z doktorantką podyskutował. Po pierwsze, sadzę że modele mysie poprzez łatwy stosunkowo dostęp do mysich modeli zmodyfikowanych genetycznie, stanowią obecnie pierszoliniowe armamentarium kardiologii doświadczalnej, po drugie uważam, że wywołanie ogromnego (ponad 40 %) zawału mięśnia sercowego u zdrowych młodych szczurów, dalekie jest od realiów klinicznych zawału serca. Fiasko wielu proponowanych strategii kardioprotekcji, które były skuteczne w badaniach doświadczalnych, może wynikać właśnie z tego, że stosowane modele doświadczalne nie odzwierciedlają stanu serca zawałowego w warunkach klinicznych np. u pacjenta podeszłym wieku z cukrzycą, nadciśnieniem, i miażdżycą naczyń wieńcowych.

Recenzent miał również niedosyt lektury opisującej mechanizmy regulujące hemostazę żelaza np. w zakresie działania hepcydyny, bo zaburzenia wytwarzania hepcydyny w wątrobie mogą mieć znaczenie w niewydolności mięśnia sercowego. Warto ten wątek rozwinąć, tym bardziej, że jak czytam we wstępie, hepcydyna jest również wytwarzana w kardiomiocytach. Rodzi się więc pytanie, czy wątrobowa, czy sercowa produkcja hepcydydyny ma największe znaczenie w zakresie regulacji hemostazy żelaza w niewydolności serca?

Recenzent nie ma zastrzeżeń do celu pracy, który jest sformułowany jasno, i podzielony jest na dobrze wydzielone zagadnienia:

1) scharakteryzowanie przebiegu rozwoju niewydolności w modelu pozawałowej niewydolności serca u szczura,

2) zbadanie zaburzenia gospodarki żelazowej w niewydolności serca w opracowanym modelu na poziomie ogólnoustrojowym (oznaczenia stężenia żelaza w surowicy, białka transportowego i wiążącego żelazo w magazynach ustrojowych), jak również w wątrobie i w sercu,

3) zbadanie skuteczności oraz bezpieczeństwa dożyłnej podaży żelaza w niewydolności serca w opracowanym modelu, badając wpływ podaży żelaza na czynnościowe i biochemiczne parametry progresji niewydolności serca (parametry przebudowy lewej komory serca, parametry hemodynamiczne, kurczliwość kardiomiocytów, obieg wapnia) jak również na biochemiczne parametry gospodarki żelazowej, stres oksydacyjny oraz stan zapalny.

W rozprawie doktorskiej nie ma osobnego rozdziału dotyczącej metodyki rozprawy doktorskiej, jest ona ujęta skrótowo w streszczeniu polskim dwóch prac oryginalnych i obejmuje badania czynnościowe *in vivo*, badania na poziomie komórkowym, badania biochemiczne i molekularne.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania pozwoliły Pani mgr Aleksandrze Paterek na dokładną hemodynamiczną analizę modelu szczurzej pozawałowej niewydolności serca, szczegółową analizę zaburzeń gospodarki żelazowej w tym modelu oraz na opisanie korzystnego wpływu podaży żelaza na niewydolność pozawałową mięśnia sercowego.

Pierwsza praca składająca się na rozprawę doktorską, ma wartość metodyczną, jest solidnie wykonana i stanowi punkt odniesienia do dalszych badań z wykorzystaniem modelu pozawałowej niewydolności mięśnia sercowego u szczurów. Najważniejszą częścią rozprawy doktorskiej jest bezprzecnie praca druga, w której szczegółowo zbadano gospodarkę żelazową w modelu pozawałowej niewydolności serca u szczura. W przebiegu niewydolności serca w zastosowanym modelu nie obserwowano objawów niedokrwistości, ogólnoustrojowego czy sercowego niedoboru żelaza, zanotowano jedynie obniżoną zawartość ferrytyny H w mięśniu sercowym, co jak autorka pisze, wskazuje na zmniejszenie zawartości magazynów żelaza w mięśniu sercowym. Doktorantka wykazała, że terapia z zastosowaniem preparatów żelaza zwiększyła w surowicy stężenie żelaza, ferrytyny, wysycenia transferyny, jak również stężenie żelaza w sercu i wątrobie, natomiast nie zwiększyła stężenia ferrytyny w sercu. Terapia z zastosowaniem preparatów żelaza, poprawiła frakcję wyrzutową LV, zmniejszyła rozstrzeń LV, miała wpływ na funkcje białek obiegu  $Ca^{2+}$  w kardiomiocytach LV, wywierała działanie przeciwzapalne obniżając stężenie CRP w osoczu i działanie

antyoksydacyjne (wzrost aktywności SOD w mięśniu sercowym) bez wpływu na osoczowe stężenie izoprostanów.

W sumie doktorantka, w najważniejszej części swojej pracy doktorskiej, wykazała, że choć nie występowały jednoznaczne objawy ogólnoustrojowego, czy sercowego niedoboru żelaza, zmniejszone były zasoby żelaza w kardiomiocytach na podstawie zmniejszonej zawartości ferrytyny H. Podaż żelaza wywarła pozytywny wpływ na przebieg niewydolności, ale nie zmieniła jedyne go parametru obrotu żelaza, który był wyraźnie zmniejszony w niewydolnym sercu tzn. pozostała bez wpływu na zawartość ferrytyny H w mięśniu sercowym. Recenzent nie jest więc przekonany, że efekty opisywane w pracy są związane z poprawą zaburzeń obrotu żelaza w mięśniu sercowym, bo nie ma żadnych na to bezpośrednich dowodów, a w dyskusji pracy doktorantka obraca się w kręgu hipotez, sugerując zwiększoną utlizację żelaza do syntezy białek hemowych lub niehemowych, poprawę czynności mitochondriów, które opisywali inni w pracach o zupełnie innym modelu (np. Haddad S et al., w mysim modelu wybrakowania IRP1 i IRP2). Wzrosty zawartości żelaza w mięśniu sercowym po terapii preparatami żelaza są niewielkie i takie same u zdrowych szczurów i u szczurów po zawale mięśnia sercowego. Natomiast wyraźnie poprawiają się parametry ogólnoustrojowe metabolizmu żelaza (np. stężenie żelaza, ferrytyny, transferin saturation- TSAT, tabela 3 praca 2) może więc mechanizmów terapeutycznych preparatów żelaza w niewydolności serca w tym modelu, trzeba szukać poza sercem?

Po przeczytaniu pracy drugiej i dyskusji rozprawy doktorskiej, nie mam jasności, jaki jest postulowany mechanizm wpływu preparatów żelaza na CRP, czy chodzi o wyciszenie mechanizmów zależnych od interferonu gamma? Nawiasem mówiąc, czy skutek przeciwwzapalny opisany w tej pracy jedynie na poziomie CRP, (który przecież może mieć kilka innych elementów poza CRP ?) nie może tłumaczyć efektu terapeutycznego leczenia preparatami żelaza na postęp pozawałowej niewydolności mięśnia sercowego ? Jak wygląda ogólnoustrojowa i lokalna odpowiedź zapalna w modelu szczurzej pozawałowej niewydolności mięśnia sercowego? Jakie terapie przeciwwzapalne są skuteczne w tym modelu i osiągają podobny skutek terapeutyczny, jak ten opisany w obecnej pracy doktorskiej ?

Produkcja CRP w wątrobie jest stymulowana przez IL-6, która też reguluje wytwarzanie hepcydyny w wątrobie. Można sobie więc wyobrazić, że terapia preparatami żelaza normalizuje zwiększone wytwarzanie hepcydyny w wątrobie i w ten sposób normalizuje relatywny deficyt żelaza w tkankach i poprawia ogólnoustrojową hemostazę żelaza. Czy doktorantka mierzyła stężenia hepcydyny w osoczu w przeprowadzonych

doświadczeniach? Jaka jest rola tak ogromnego wzrostu żelaza w wątrobie w osiągnięciu skutków terapeutycznych preparatów żelaza opisywanych w przedstawionej pracy? Powyższe pytania nasuwają się recenzentowi po przeanalizowaniu wyników pracy drugiej, a nie znalazł na nie odpowiedzi w zbyt krótkiej dyskusji rozprawy doktorskiej.

Na szczególną uwagę zasługuje unikatowa metodologia badania czynnościowego lewej komory z zastosowaniem pętli ciśnienie-objętość, którą to metodę zastosowano szeroko do opisu zmian hemodynamicznych serca w pracy pierwszej, obok badań USG, jednak w pracy drugiej, stosowano ją tylko do oceny niektórych parametrów. Być może doktorantka mogłaby pokusić się o dyskusję porównawczą tych dwóch metod, i ma też pełne wyniki analizy zmian czynności mięśnia sercowego pod wpływem terapii preparatami żelaza z wykorzystaniem pętli ciśnienie-objętość. Recenzent zauważył, że są efekty terapii preparatami żelaza na EF i LVEDA (przedstawione na rycinie 2, pracy 2), ale nie ma efektu na inne parametry czynnościowe pracy lewej komory mierzone z zastosowaniem pętli ciśnienie-objętość (np,  $+dP/dt$  max,  $-dP/dt$  min, LVESP, LVEDP etc. tabela 1). Nie znalazłem obszernego wytłumaczenia tych zaskakujących dla recenzenta wyników w dyskusji rozprawy doktorskiej i prosiłbym o ich krytyczną dyskusję na obronie doktorskiej. Tym bardziej, że mam wrażenie, że kurczliwość pojedynczych wyizolowanych kardiomiocytów badanych *ex vivo* pochodzących z tego modelu niewydolności serca jest zachowana (z jakiego obszaru mięśnia sercowego pochodzą te kardiomiocyty?), a zaburzenia obrotu wapnia nie są dramatyczne i chyba nie mogą tłumaczyć rozstrzeni mięśnia sercowego, która się rozwija i którą częściowo odwraca terapia preparatami żelaza.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Paterek pt. „Ocena zaburzeń obiegu żelaza oraz próba ich korekcji w modelu pozawałowej niewydolności serca u szczura” stanowi solidnie wykonaną, unikatową porcję badań dotyczących zaburzeń hemostazy żelaza w niewydolności mięśnia sercowego. Doktorantka, opisała zaburzenia gospodarki żelazowej w niewydolności serca w opracowanym modelu pozawałowej niewydolności mięśnia sercowego i wykazała na korzystny wpływ terapii preparatami żelaza na rozwój niewydolności mięśnia sercowego. Uwagi krytyczne, które przedstawiłem w recenzji tej pracy, należy traktować jako zaproszenie do dyskusji w celu lepszego wyjaśnienia opisywanych zjawisk, bowiem uzyskane wyniki są przedyskutowane dość pobieżnie. Recenzent chciałby usłyszeć więcej argumentów przemawiających za wnioskami z tej pracy, lub też usłyszeć alternatywne hipotezy, które wyjaśniałyby skutki terapeutyczne preparatów żelaza w niewydolności mięśnia sercowego.

Pomimo uwag krytycznych, o których mowa powyżej, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Paterek stanowi wartościowe dzieło i oceniam je wysoko. Z przyjemnością pragnę więc stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Paterek spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Stefan Chłopicki