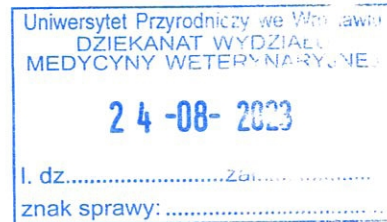


Olsztyn, 15-08-2023

Prof. dr hab. Andrzej Rychlik
Katedra Diagnostyki Klinicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
W Olsztynie



Recenzja pracy doktorskiej

lek. wet. Kacpra Czesława Nowaka

**„Ocena parametrów związanych z gospodarką żelazem w nerce, wątrobie
i śledzionie świń, które przeżyły ostry incydent niedokrwienia mięśnia
sercowego”**

wykonanej pod kierunkiem:

prof. dr hab. Urszuli Paślowskiej

z Katedry Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

oraz

prof. dr hab. Marzenny Podhorskiej- Okołów

z Zakładu Badań Ultrastrukturalnych

Wydziału Lekarskiego

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Podstawę prawną recenzji stanowi pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, powołujące się na uchwałę Rady Dyscypliny z dnia 04 lipca 2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej lek. wet. Kacpra Czesława Nowaka.

Niewydolność serca jest istotnym i rosnącym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Niemal 18 milionów ludzi umiera każdego roku z tego powodu. Choroba jest złożonym i wieloaspektowym schorzeniem, na które składa się szereg czynników fizjologicznych, genetycznych i środowiskowych. Niewydolność serca, ze względu na okoliczności jej wystąpienia, przebieg, dynamikę i czas trwania objawów, można podzielić na ostrą i przewlekłą zastoinową niewydolność serca. Choroba wieńcowa powodująca zawał serca jest jedną z najczęstszych przyczyn ostrej niewydolności serca. W przebiegu ostrej postaci choroby (podobnie jak w przewlekłej) często obserwuje się zaburzenia homeostazy żelaza a odsetek chorych z tymi zaburzeniami może sięgać nawet 80%. Dotychczas nadal nie jest jasne, czy przyczyną rozregulowania metabolizmu żelaza w chorobach serca stanowi wysiłek regulacyjny organizmu w celu utrzymania komórkowej homeostazy żelaza, czy też jest skutkiem choroby. Wiadomo natomiast, że jeżeli zaburzenia gospodarki żelazem trwają długo, to u ludzi obserwowano jednocześnie rozwój anemii z niedoboru żelaza i uszkodzenie hepatocytów z powodu nadmiaru żelaza. W związku z tym podjęcie przez lek. wet. Kacpra Czesława Nowaka badań nad homeostazą żelaza w doświadczalnie wywołanej ostrej niewydolności serca uważam za w pełni uzasadnione.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 107 stron maszynopisu, w tym 18 strony piśmiennictwa, zawierających 140 pozycji literatury. Ponadto praca zawiera 8 tabel i 39 rycin przedstawiających wyniki badań lub ilustrujących podjętą problematykę badawczą. Układ pracy jest zbliżony do klasycznego i zawiera spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel badań, materiał i metody i opis wyników. W kolejnych rozdziałach Autor omawia wyniki swoich badań (dyskusja) i przedstawia wnioski. Końcowe rozdziały monografii zawierają spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo.

Wstęp pracy, obejmujący 29 stron, podzielony został na 8 podrozdziałów. W pierwszym podrozdziale Doktorant (w oparciu o bogate piśmiennictwo) w sposób jasny i czytelny przedstawił definicję niewydolności serca z jej podziałami na różne postacie tej choroby oraz krótko omówił jej społeczne znaczenie dla zdrowia publicznego. W kolejnych omawia wpływ niewydolności serca na funkcje innych narządów oraz przedstawia zwierzęce modele zawału mięśnia sercowego. Autor słusznie podkreślił, że największe nasilenie zmian patologicznych obserwuje się w płucach, w których zaburzenia krążenia doprowadzają do obrzęku. Zwrócił uwagę na fakt, że obniżenie ciśnienia krwi, z uwagi na gorszą perfuzję mózgu może prowadzić do rzadziej wymienianych objawów towarzyszących temu schorzeniu jak upośledzenie funkcji poznawczych, dezorientacja i trudności z koncentracją, które dołączają się do częściej akcentowanych w przebiegu niewydolności serca tj. objawów duszności i odkrztuszania. Następnie Autor przedstawił szczegółowo mechanizmy wpływu upośledzonego krążenia na inne narządy tj. wątrobę, nerki i śledzionę. Zdaniem Recenzenta ważnym podrozdziałem uzasadniającym wybór zastosowanego przez doktoranta modelu badawczego jest charakterystyka modeli zwierzęcych wykorzystywanych do badań nad zawałami serca. Wnikliwy opis, w oparciu o bogatą literaturę, wpływu upośledzonego krążenia na omawiane narządy oraz modeli zawału mięśnia sercowego wraz z uzasadnieniem wybranego w tym doświadczeniu, świadczy o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta do podjętego zadania badawczego. Kolejne rozdziały lek wet. Kacper Czesław Nowak poświęcił diagnostyce zawałów, zaczynając od najpowszechniej stosowanej elektrokardiografii, następnie omówił markery używane w diagnostyce zawałów, kończąc na echokardiografii czyli najbardziej użytecznym sposobie nieinwazyjnego monitorowania zmian morfologicznych i czynnościowych mięśnia sercowego. W kolejnych rozdziałach omówił leczenie zawałów serca. Doktorant słusznie podkreślił, że obecnie „złotym standardem” w leczeniu ostrego zawału serca jest jak najszybsze udrożnienie tętnicy wieńcowej

poprzez implantację stentu w miejscu krytycznego zwężenia a rzadziej stosowane jest pomostowanie aortalno-wieńcowe, czyli tzw. by-passy. Omawiając kolejne metody leczenia słusznie zauważył, że pomimo terapii najnowszymi metodami farmakologicznymi u osób z zawałem serca ich stosowanie nie jest w stanie wyeliminować częstego powikłania jakim jest zwłóknienie mięśnia sercowego. Najciekawszym w tej części wstępu z poznawczego i praktycznego punktu widzenia jest omówienie terapii za pomocą komórek macierzystych. W bogatym w ikonografie podrozdziale omówił, w sposób jasny i czytelny, rodzaje komórek macierzystych, które mogą mieć szerokie zastosowanie w leczeniu zawałów oraz przedstawił sposoby ich podawania. Słusznie podkreślił, że najdokładniejszym sposobem celowanego podawania komórek macierzystych jest mapowanie elektromechaniczne NOGA 3D, które zastosował w swoim doświadczeniu. O dobrej znajomości zagadnienia stosowania komórek macierzystych w leczeniu zawałów świadczy fakt, opisanie przez doktoranta także zagrożeń wynikających z ich podawania.

W kolejnych podrozdziałach Wstępu Autor, w oparciu o bogatą literaturę, omówił rolę żelaza w organizmie, mechanizmy wchłaniania, magazynowania i procesy regulujące stężenie tego mikroelementu. Szczególnie istotne, zdaniem recenzenta, jest omówienie przez doktoranta funkcji hepcydyny, białka regulującego wchłanianie, recykling i zakres magazynowania żelaza w organizmie. Omówienie w tej części opracowania, białek biorących udział w metabolizmie żelaza, łącznie z hormonem hepcydyną jest jak najbardziej uzasadnione, gdyż były one badane przez doktoranta w przebiegu doświadczenia. Końcowy podrozdział Wstępu Doktorant poświęcił zaburzeniom homeostazy ustrojowej żelaza w niewydolności serca. Z dokonanego przez Doktoranta przeglądu dostępnej literatury jednoznacznie wynika, że w niewydolności serca występowały przypadki niedoboru tego mikroelementu, jak i stany hemochromatozy. Autor słusznie zauważa, że niewydolność serca jest stanem, w którym wzrasta synteza cytokin prozapalnych, które stymulują syntezę

hepcydyny. Hormon ten nie tylko zmniejsza wchłanianie żelaza w jelitach, ale również powoduje deponowanie żelaza w układzie siateczkowo-śródbłonkowym szczególnie wątroby. Początkowo wiązano te zaburzenia ze wzrostem stężenia hepcydyny, jednak późniejsze badania wykazały, że u pacjentów kardiologicznych notowano także prawidłowe, a nawet obniżone poziomy hepcydyny. W związku z tym konieczne są dalsze badania nad homeostazą żelaza w chorobach serca. Doktorant, aby wypełnić tę lukę, jako cel pracy stawia ocenę gospodarki żelazowej w odpowiedzi na incydent ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego na modelu świni domowej. W przeprowadzonym doświadczeniu badał czy ostry, krótki incydent niedokrwienno może spowodować długotrwałe zaburzenia gospodarki żelazowej. Drugim celem było zbadanie, czy terapia zawału serca przy wykorzystaniu podania intramiokardialnego dwóch modeli terapii komórkowej wpływa istotnie na homeostazę żelaza w dalszej perspektywie. W tym kontekście podjęty temat należy uznać za bardzo aktualny pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a cel badań logiczny i precyzyjnie określony.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorant szczegółowo opisał procedurę, jaką zastosował w swoich badaniach. Na wykonanie doświadczenia uzyskano uchwałę nr WAW2/185/2019 II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW w Warszawie i dla grupy kontrolnej nr 23/2009 I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Świnie badano trzykrotnie, przed wykonaniem procedury, w 28 dniu i po 3 miesiącach od okluzji tętnicy wieńcowej. Badanie kontrolne obejmowało badanie kliniczne, elektrokardiograficzne, echokardiograficzne, badania morfologiczne i biochemiczne krwi. Po wykonaniu trzeciego badania kontrolnego świnię poddano eutanazji, wykonano badanie sekcyjne i pobrano próbki narządów do badań proteomicznych i histopatologicznych. Metodą western blotting oznaczano łańcuch lekki i ciężki ferrytyny w nerce, wątrobie oraz śledzionie oraz białko

hepcydynę w wątrobie. Oznaczono też wybrane parametry gospodarki żelazowej w surowicy krwi.

Wybór modelu wywołania niewydolności serca i technika wykonania zawału nie budzi zastrzeżeń. Z poznawczego, ale i aplikacyjnego punktu widzenia duże znaczenie ma zrealizowanie badań na modelu świńskim, najbardziej zbliżonym do człowieka pod względem budowy i fizjologii, szczególnie w aspekcie zastosowania w terapii komórek macierzystych. Większość badań, w których badano przeszczepianie komórek macierzystych do leczenia zawału była wykonywana na modelu mysim lub na modelu kawii domowej (świnki morskiej). Układ doświadczenia zaplanowano prawidłowo, przede wszystkim pod względem zastosowanych modeli terapii. Zwierzęta podzielono na cztery grupy. Dwie pierwsze stanowiły zwierzęta grupy kontrolnej oraz grupa z wywoływanym doświadczalnie ostrym niedokrwieniem serca, którym endokardialnie podawano sól fizjologiczną. Natomiast grupę trzecią i czwartą stanowiły zwierzęta, którym podawano komórki w sposób zróżnicowany: jedna otrzymywała drogą iniekcji endokardialnej komórki mezenchymalne tuż po zawale a mioblasty w 28 dniu po zawale, natomiast czwarta otrzymała komórki w 28. Dniu, a tuż po wywołanym zawale, sól fizjologiczną. Taki sposób zaplanowanego doświadczenia eliminował wpływ zabiegu iniekcji endokardialnej na wyniki badań. Wykorzystane w pracy metody badawcze gwarantują uzyskanie wiarygodnych wyników. Szczególnie istotne jest zastosowanie mapowania elektromechanicznego NOGA 3D, który jest jednym z najdokładniejszych sposobów podawania komórek macierzystych. Zastosowane metody badań biochemicznych poszczególnych parametrów, jak i badania histologiczne, gwarantują odpowiednią jakość uzyskanych wyników. Szczegółowo opisane w tym rozdziale kolejne etapy badań, poparte bogatą ikonografią, wskazują na dobre merytoryczne przygotowanie lek. wet. Kacpra Czesława Nowaka do podjętego zadania badawczego.

Autor zaprezentował wyniki badań na 25 stronach, które zawierały 6 tabel i 25 rycin. Przeprowadzone badania wykazały, że u wszystkich świń udało się

skutecznie wywołać zawał serca. Świnie nie wykazywały klinicznych objawów niewydolności serca, ale badania echokardiograficzne potwierdzały obecność blizny pozawałowej, która powodowała postępujące pogorszenie czynności komory lewej, wyrażające się istotnym spadkiem frakcji skracania i frakcji wyrzutowej. Parametry echokardiograficzne nie wykazywały istotnych różnic pomiędzy grupą zawałową (terapia placebo) a grupami z eksperymentalną terapią komórkami macierzystymi. Poziomy markerów uszkodzenia mięśnia sercowego również nie przekraczały wartości referencyjnych ani w badaniu po 28 dniach, ani w badaniu po 3 miesiącach. Prawidłowe stężenie obu markerów uszkodzenia kardiomiocytów niewątpliwie świadczy iż zastosowana metoda intramiokardialnego podawania komórek macierzystych nie spowodowała zwiększenia urazu mięśnia sercowego u świń z zawałem serca, a rozwijająca się dysfunkcja komory lewej nie spowodowała jeszcze istotnego przeciążenia miokardium. Zdaniem recenzenta bardzo istotne jest wykazanie, że nie stwierdzono też obecności arytmii, gdyż w innych badaniach wykazano, że terapia MI komórkami macierzystymi może indukować zaburzenia rytmu. Duże znaczenie w aspekcie postępowania terapeutycznego miała również ocena odległych efektów indukowanego zawału na parametry gospodarki żelazowej w krwi. Wykazała, że systemowy status żelaza nie ulega długoterminowemu zakłóceniu po wystąpieniu incydentu ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego. Podobnie leczenie zawału poprzez intrakardialne podawanie komórek macierzystych również nie zakłóca systemowego statusu żelaza. Według uzyskanych przez Doktoranta wyników u zwierząt z grup, u których dokonano doświadczalnie okluzji naczynia wieńcowego zaobserwowano wzrost zasobów żelaza w wątrobie i śledzionie. Odnotowano wyższe poziomy łańcucha lekkiego ferrytyny w wątrobie oraz łańcucha ciężkiego w wątrobie i korze nerki. Bardzo cenne, w aspekcie zaburzeń homeostazy żelaza, są wyniki uzyskane przez Doktoranta wskazujące, że grupach leczonych komórkami macierzystymi stwierdzono istotnie niższy poziom hepcydyny w tkance wątroby.

Dyskusja w recenzowanej rozprawie doktorskiej obejmuje praktycznie wszystkie elementy związane z badanym zagadnieniem. Istotne w aspekcie poznawczym ale i praktycznym, jest wykazanie przez Doktoranta faktu, że ostrym stanom zawałowym nie towarzyszą ogólnoustrojowe zaburzenia gospodarki żelazem, które mogą być wykryte badaniami laboratoryjnymi ukierunkowanymi na ocenę homeostazy żelaza w organizmie. Również istotne są również wyniki badań immunohistochemicznych stwierdzające, że mimo braku ogólnoustrojowych zaburzeń żelaza, w nerce, wątrobie i śledzionie można zaobserwować różnice dotyczące gospodarki żelazem, które towarzyszą stanom zawałowym i przybierają formę magazynowania większej ilości żelaza oraz większej ekspresji łańcucha lekkiego czy ciężkiego ferrytyny. W przebiegu doświadczenia wykazano, że terapia komórkowa nie poprawiła czynności skurczowej serca po indukowanym zawale. Pomimo, że jak pisze Doktorant, oczekiwania były inne to wynik przeprowadzonych przez niego badań uważam za bardzo istotny. Może stanowić impuls do poszukiwania innych form terapii.

Przedstawione, jako końcowy podrozdział Dyskusji, wnioski znajdują uzasadnienie merytoryczne w uzyskanych wynikach badań. Lek. wet. Kacper Czesław Nowak omówił uzyskane wyniki i porównał je z danymi przedstawionymi przez innych autorów. Z uwagi, że publikacji omawiających zbliżoną tematykę jest niewiele, z powierzonego zadania wywiązał się bardzo dobrze. Trudno jest bowiem polemizować i porównywać swoje wyniki do innych badaczy przy niewielkim materiale do dyskusji. Zdaniem Recenzenta we wniosku pierwszym proponuję jednak zamienić frazę „nie towarzyszą ogólnoustrojowe zaburzenia, które można wykryć stosując badania laboratoryjne” na „stosując badania biochemiczne”, gdyż wykryto zmiany w badaniach immunohistochemicznych, a to też są badania laboratoryjne. Spadek ekspresji hepcydyny wykryto również u świń z wywołanym zawałem ale bez leczenia więc wniosek trzeci proponuję nieco zmodyfikować na akcentujący fakt, że leczenie przy użyciu komórek macierzystych może mieć wpływ na ekspresję hepcydyny.

Zdaniem Recenzenta, jeżeli to możliwe, wnioski stanowiące podsumowanie całości pracy powinny być zredagowane w sposób bardziej ogólny.

Oceniana rozprawa została zaplanowana, wykonana i przedstawiona poprawnie. Została napisana czytelnym i zrozumiałym językiem. Praca napisana bardzo starannie z bardzo małą liczbą błędów edytorskich, tzw. literówek. Jedynie na stronie 40 lub w wykazie skrótów brakuje wyjaśnienia skrótu ESA – środki stymulujące erytropoezę.

Podsumowując ocenę całokształtu dysertacji, pragnę jeszcze raz podkreślić trafność i przydatność tematu. Przeprowadzone badania mają dużą wartość poznawczą i aplikacyjną. Wykazały, że ostry incydent niedokrwienia serca nie powoduje długotrwałych zaburzeń w systemowym statusie żelaza, które można wykryć klinicznie lub stosując badania biochemiczne. Zdaniem Recenzenta wnioski zamieszczone w pracy mogą stanowić podstawę do dalszych badań, na co Doktorant zwrócił uwagę w czwartym wniosku dysertacji.

W konkluzji stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autora lek. wet. Kacpra Czesława Nowaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 15.08.2023

