

Kraków, 22.08.2023



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

OCENA

**Pracy doktorskiej pana mgr inż. Patryka Ślusarczyka,
doktoranta Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej
i Komórkowej w Warszawie**

Tytuł pracy:

**"Badanie zależności pomiędzy akumulacją żelaza w starzeniu
a zdolnością do recyklingu żelaza w makrofagach
czerwonej miazgi śledziony"**

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

Badania prowadzone na poziomie całego organizmu, nie ograniczające się do wybranych szlaków transdukcji sygnału w modelowych komórkach hodowanych *in-vitro* są bardzo potrzebne, ale trudne. Konieczne jest w nich uwzględnienie specyfiki różnych narządów oraz interakcji między nimi, w tym wzięcie pod uwagę mechanizmów regulacyjnych działających lokalnie i systemowo. Największym problemem jest brak modeli badawczych pozwalających na wykonywanie szybkich i jednoznacznie interpretowalnych doświadczeń. Decyzja o prowadzeniu przez Doktoranta badań na poziomie organizmu, zwłaszcza w kontekście zmian związanych ze starzeniem była więc ambitna i zasługuje na uznanie.

Jednym z procesów, których znaczenie jest powszechnie uznawane, ale których szczegółowe mechanizmy wciąż kryją wiele niejasności jest gospodarka żelazem, a zwłaszcza odzyskiwanie żelaza z uszkodzonych lub starych erytrocytów. Wiadomo, że bardzo istotną rolę w recyklingu żelaza odgrywają makrofagi czerwonej miazgi śledziony (RPM). Ich dysfunkcja lub niedobór może prowadzić do anemii. Nie wiadomo jednak na ile może mieć to związek z anemią obserwowaną w starzejących się organizmach.

Rola erytrofagocytozy jest kluczowa dla erytropoezy, bardziej istotna niż pobieranie żelaza z diety. O ile receptory odpowiedzialne za rozpoznawanie uszkodzonych i starych erytrocytów są opisywane coraz bardziej szczegółowo, o tyle poznanie mechanizmów regulacyjnych dostosowujących erytro-

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

fagocytozę i eksport odzyskanego żelaza do rzeczywistych potrzeb organizmu jest wciąż niewystarczające. Podjęta przez Doktoranta próba ich lepszego zrozumienia, była więc dobrze przemyślana i wartościowa.

Pan mgr inż. Patryk Michał Ślusarczyk prowadził badania przede wszystkim w układach *in-vivo*, na młodych i starych samicach myszy C57BL/6J. Były to doświadczenia czasochłonne i dotyczyły zjawisk regulowanych wieloczynnikowo, gdzie uzyskiwane wyniki nie zawsze są łatwe do interpretacji. Bardzo pomysłowym i merytorycznie uzasadnionym podejściem było długotrwałe utrzymywanie myszy na diecie z ograniczoną dostępnością żelaza, zmniejszoną znacząco, ale w stopniu nie wywołującym anemii. Dobrym pomysłem było także połączenie doświadczeń *in-vivo* z eksperymentami *ex-vivo* prowadzonymi na komórkach pierwotnych różnicowanych do RPM. To pozwalało na bardziej mechanistyczną analizę badanych zagadnień i podjęcie próby zrozumienia istniejących między nimi zależności, wykraczającego poza prosty opis obserwowanych zmian.

Realizacja projektu wymagała zastosowania przez Doktoranta wielu bardzo różnorodnych technik biologii molekularnej i komórkowej, w tym całościowych badań wykonywanych na poziomie transkryptomu i proteomu. Wybór i jakość przeprowadzonych analiz to silna strona rozprawy. Doktorant wykorzystywał między innymi cytometrię przepływową zarówno do fenotypowania komórek jak i testów funkcjonalnych, sortowanie komórek w oparciu o cechy fenotypowe, mikroskopię fluorescencyjną i barwienia immunohistochemiczne, transmisyjną mikroskopię elektronową, analizy ekspresji genów na poziomie mRNA i białka oraz badania transkryptomu i proteomu wykorzystujące RNA-seq i LC-MS/MS. Na podkreślenie zasługują badania funkcjonalne prowadzone *in-vivo*, np. określanie czasu życia erytrocytów czy poziomu erytrofagocytozy.

Najciekawsze moim zdaniem wyniki uzyskane przez Doktoranta to i) pokazanie, że aktywność erytrofagocytarna RPM (ale nie sama zdolność do fagocytozy) zmienia się z wiekiem i jej osłabienie zależy od nadmiernej ekspozycji na żelazo; ii) wyjaśnienie pochodzenia i natury złogów żelaza w starzejącej się śledzionie; iii) wskazanie na możliwe znaczenie tlenku węgla w regulacji aktywności erytrofagocytarnej RPM, co jest szczególnie intrygujące



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

biorąc pod uwagę indukcję ekspresji oksygenazy hemowej-1, w odpowiedzi na pochodzący z erytrocytów hem.

Rozprawa doktorska pana mgr inż. Patryka Michała Ślusarczyka nie ma klasycznej kompozycji, lecz opiera się przede wszystkim na dwóch publikacjach. Jedna z nich to praca przeglądowa w Genes opublikowana w roku 2021, druga zaś to praca badawcza opublikowana w eLife w roku 2023, zawierająca całość wyników i opis wykorzystanych metod. W obu pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a autorem korespondencyjnym jest Promotor Pomocniczy, pani dr Katarzyna Mleczko-Sanecka. Przed tekstem publikacji znajduje się Streszczenie i anglojęzyczne Summary oraz Wstęp, zakończony Omówieniem osiągnięcia naukowego. Osobny podrozdział stanowią Założenia i cele pracy. Po tekstach publikacji Doktorant umieścił Podsumowanie i wnioski, Bibliografię, Informacje o zgodach komisji bioetycznych na prowadzenie badań na zwierzętach oraz Oświadczenia współautorów publikacji. Rozprawa doktorska zawiera również wykaz skrótów i spis treści, które przygotowane są prawidłowo. W wykazie skrótów wkradło się kilka drobnych błędów edytorskich (np. brak konsekwencji w stosowaniu dużych i małych liter w nazwach), ale nie ma to znaczenia merytorycznego.

Streszczenie (podobnie jak angielskie Summary) jest napisane poprawnie, dobrze uzasadnia i przedstawia ogólny cel badań, przybliża zastosowaną metodykę oraz prezentuje wyniki i wnioski wynikające z przeprowadzonych doświadczeń. Opis jest prawidłowy, choć niektóre z wniosków są sformułowane nieco zbyt mocno. Wnioskowanie korelacyjne może z dużym stopniem prawdopodobieństwa wskazywać na mechanizm obserwowanych zmian, ale nie pozwala na jego jednoznaczne udowodnienie – np. że to obniżenie poziomu białka ferroportyny spowodowało przeładowanie RPM żelazem, czy że osłabiona erytrofagocytoza wynika między innymi z obniżenia aktywności oksygenazy hemowej-1, tym bardziej, że aktywność taka nie była mierzona. Zgadzam się z Doktorantem, że zaproponowane wyjaśnienia są bardzo prawdopodobne, niemniej lepsze byłoby używanie precyzyjniejszych sformułowań. Zastanawiam się też czy użycie określenia „stworzenie protokołu umożliwiającego różnicowanie monocytów” lub w wersji anglojęzycznej „a newly established *in-vitro* model” jest w pełni uzasadnione. Tekst opublikowanej pracy wskazuje, że była to raczej



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

optymalizacja lub rozwinięcie modelu opisanego przez Lu et al. (Immunity 2020).

Liczący 7 stron Wstęp jest krótki, ale ciekawy, a dobór treści potwierdza dobre zrozumienie tematu przez Doktoranta. Wstęp omawia najważniejsze zagadnienia związane z gospodarką żelazem, zwłaszcza regulacją wchłaniania żelaza w jelitach oraz recyklingiem żelaza w makrofagach. Sporo uwagi poświęca omówieniu osi hepcydyna-ferroportyna i regulacji gospodarki żelazem na poziomie komórki. Nieco brakuje mi tu szerszego i bardziej systematycznego omówienie transportu i pobierania różnych form żelaza, odniesienia się do roli obu receptorów transferryny i białek z nimi związanych, różnic między mechanizmami aktywnymi w komórkach hematopoetycznych, enterocytach i hepatocytach oraz omówienia sygnałów zapotrzebowania na żelazo wysyłanych ze szpiku. Są to jednak uwagi czysto subiektywne i zakres tematyczny wybrany przez Doktoranta może być uznany za prawidłowy. Generalnie, Wstęp napisany jest komunikatywnym językiem, dobrze wprowadza w zagadnienia będące głównym tematem pracy, choć korzystne byłoby wyraźniejsze definiowanie luk w wiedzy, uzasadniające wybór szczegółowych zadań badawczych.

Cele pracy sformułowane bardzo ambitnie. Obejmują określenie wpływu starzenia na funkcjonowanie RPM i recykling żelaza z uwzględnieniem dynamiki zmian i wskazaniem ich mechanizmu, zbadanie jaki jest wpływ zmieniającej się aktywności RPM na funkcjonowanie organizmu oraz określenie wpływu diety z ograniczoną ilością żelaza na aktywność RPM i na zmiany związane ze starzeniem. Sformułowanie ostatniego celu szczegółowego „stworzenie modelu dysfunkcji RPMs podczas starzenia” nie jest dla mnie jasne. Można mieć wątpliwości czy chodzi o model badawczy do prowadzenia kolejnych doświadczeń np. *in-vitro* czy o model tłumaczący zmiany aktywności RMP w starzeniu. Warto też zauważyć, że cel nr 4: „scharakteryzowanie jakie konsekwencje dla organizmu ma dysfunkcja makrofagów w starzeniu” jest metodologicznie wymagający, o ile nie planuje się jedynie poszukiwania korelacji między obserwowanymi zmianami.

Najważniejszą częścią rozprawy są dwie publikacje. Pierwsza z nich to artykuł przeglądowy omawiający różne aspekty recyklingu żelaza. Zgodnie z informacją zawartą przez Doktoranta w podrozdziale Omówienie osiągnięcia



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918
alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

naukowego, stanowi on uzupełnienie Wstępu. Zakres tematyczny i merytoryczny powoduje jednak, że publikacja staje się raczej zasadniczą częścią wstępu. To w pełni akceptowalne, choć nietypowe rozwiązanie. Wykorzystana praca jest starannym i ciekawie napisanym opracowaniem, omawiającym między innymi mechanizmy rozpoznawania uszkodzonych lub starych erytrocytów przez komórki fagocytyzujące, usuwanie składników erytrocytów poddanych hemolizie i proponowane modele recyklingu żelaza. Szczegółowo opisane są znane mechanizmy regulacji erytrofagocytozy i gospodarki żelazem na poziomie komórki. Bardzo ciekawe i wartościowe jest także omówienie pochodzenia RPM i roli komórek wywodzących się z monocytów szpikowych. Dobrym elementem publikacji, znacznie ułatwiającym lekturę, są schematy podsumowujące omawiane zagadnienia. Nieco brakuje mi natomiast odniesienia się przez Doktoranta do specyficzności gatunkowej oraz podobieństw i możliwych odmienności w gospodarce żelazem u myszy i ludzi (np. w strukturze i aktywności hematopoetycznej śledziony, częstości występowania i lokalizacji komórek CD163+, ekspresji i roli antygenu F4/80) oraz odmienności obserwowanych w różnych szczepach myszy, a związanych z gospodarką żelazem, takich jak np. mutacje w transporterze NRAMP1, którego rola jest omawiana w publikacji, a który może być dysfunkcyjny u myszy C57BL/6J czy BALB/c, wykorzystywanych w późniejszych badaniach Doktoranta. W moim subiektywnym odbiorze wykorzystany artykuł przeglądowy to w większym stopniu kompendium wiedzy na temat recyklingu żelaza i omówienie kolejnych dostępnych publikacji (cytowanych jest 160 prac), niż zaprezentowanie sposobu rozumienia zagadnienia przez Doktoranta czy próby reinterpretacji dotychczas dominujących poglądów. W efekcie powstało rozległe i bardzo wielowątkowe, choć miejscami nieco powierzchowne opracowanie, wskazujące na szereg luk w wiedzy i wciąż aktualnych pytań, wraz z propozycjami kierunków kolejnych pożądanych badań. Takie opracowania są potrzebne i chętnie wykorzystywane przez czytelników. W kontekście rozprawy doktorskiej i pracy pełniącej rolę rozbudowanego wstępu powstaje jednak wrażenie, że Doktorant będzie szukał odpowiedzi na kolejne stawiane w publikacji pytania, co tylko częściowo pokrywa się z celami wskazanymi we właściwym wstępie. Być może warto było przy omówieniu osiągnięcia naukowego wspomnieć o



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

jakich potrzebnych kierunkach badań mówi pierwsze publikacja i na które ze stawianych pytań poszukiwane będą odpowiedzi w doświadczeniach opisanych w drugiej pracy. Moje wątpliwości dotyczą jednak założeń kompozycyjnych i struktury opracowania, nie mają zaś wpływu na wysoką ocenę merytoryczną publikacji.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Doktoranta opisane są w pracy badawczej opublikowanej w eLife. Jej najważniejszym celem było określenie zmian związanych z wiekiem w liczebności i aktywności makrofagów czerwonej miazgi śledziony u samic myszy C57BL/6J oraz wskazanie jak zmiany te wpływają na akumulację i biodostępność różnych form żelaza. W doświadczeniach wykorzystywano dobrze przemyślane strategie i bogaty warsztat metodyczny. Pozwoliło to na uzyskanie wartościowych wyników, wnoszących nową wiedzę i rzeczywisty wkład w zrozumienie zmian zachodzących z wiekiem w gospodarce żelazem u myszy. Bardzo istotną częścią badań była analiza wpływu diety o zmniejszonej zawartości żelaza lub skutków podania młodym myszom nadmiaru żelaza i pokazanie które ze zmian mogą zostać w ten sposób powstrzymane lub wywołane. To wzbogaca pracę o elementy poznawania mechanizmów biologicznych badanych zjawisk. Ułatwia to też odróżnienie zmian zależnych od ekspozycji na wysokie poziomy żelaza od zmian powstających z wiekiem, dotyczących między innymi hematopoezy, ale od żelaza niezależnych. Wartościowe są również doświadczenia prowadzone *ex-vivo*, pozwalające na modyfikację wybranych szlaków i potwierdzanie ich udziału w regulacji badanych procesów oraz na zbadanie specyficzności obserwowanych zależności. Dobrym podejściem jest np. porównywanie zmian w zdolności do fagocytozy uszkodzonych erytrocytów i fagocytozy zymosanu. To wzmacnia wiarygodność wnioskowania.

Opublikowana praca opisuje szeroko zakrojone badania, wykorzystujące różnorodne i uzupełniające się metody. Jakość prezentowanych wyników jest bardzo dobra, a ich analiza statystyczna nie budzi wątpliwości. Opis metod wykorzystanych w pracy jest wystarczający, choć korzystne byłoby nieco szersze omówienie przygotowania próbek i analizy agregatów pozakomórkowych (Fig. 2J). Wnioski sformułowane są jasno i znajdują potwierdzenie w doświadczeniach. Należy podkreślić, że wartość



UNIWE^{RS}YTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

merytoryczna przeprowadzonych doświadczeń to najsilniejszy punkt prezentowanej rozprawy.

Przy prezentacji publikacji jako części rozprawy doktorskiej dobrym podejściem byłoby pokazanie nie tylko głównej części artykułu, ale również załączników z dodatkowymi rycinami. Przedstawione w nich wyniki są istotne dla oceny wnioskowania. Dodatkowe ryciny są oczywiście dostępne on-line, ale ich włączenie w treść rozprawy wskazywałoby na większą staranność. To jednak uwaga o charakterze edytorskim, a nie merytorycznym.

Przy lekturze publikacji badawczej nasunęły mi się jeszcze następujące pytania:

- Poziom wysycenia transferryny u myszy starych na diecie z obniżoną zawartością żelaza jest statystycznie istotnie wyższy niż u starych myszy na diecie standardowej (Fig. 1C). Bezwzględne różnice są jednak stosunkowo niewielkie. Jaka jest opinia Doktoranta na temat biologicznego znaczenia tych różnic?

- Bardzo ciekawym zaproponowanym modelem jest różnicowanie makrofagów szpikowych do iRPM. Metodyka oparta jest częściowo na pracy Lu et al. Immunity 2020. Jakie elementy opisanej metodyki zostały zoptymalizowane przez Doktoranta? (stężenia IL-33 i heminy, czasy inkubacji?) Czy były prowadzone badania porównujące działanie analizowanego czynnika (np. ekspozycji na żelazo) na komórki przed różnicowaniem i po różnicowaniu, lub porównujące iRPM z innymi makrofagami? Tego typu analizy byłyby bardzo ciekawe w kontekście określenia specyficzności obserwowanych zależności. Czy zaobserwowano różnice w efektywności różnicowania komórek pochodzących ze szpiku młodych i starych zwierząt?

- Bardzo ciekawa jest obserwacja wskazująca na rolę CO w regulacji erytrofagocytozy. Jaki może być przypuszczalny mechanizm tego działania?

- Badania koncentrują się na śledzionie, nie uwzględniają natomiast ani szpiku jako głównego miejsca erytropoezy ani jelita jako miejsca pobierania żelaza. Czy w trakcie prowadzenia badań były wykonywane analizy enterocytów (np. poziomu ekspresji ferroportyny) i wysp erytroblastycznych? Informacje związane z pobieraniem żelaza z diety i jego wykorzystaniem w erytropoezie byłyby pomocne przy dyskusji systemowego znaczenia zaburzeń recyklingu.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

- Doktorant prowadził wszystkie analizy na samicach myszy, gdyż u samców nie zaobserwowano tworzenia agregatów białkowych. Jaki może być mechanizm takich różnic? Czy u samców nie obserwowano żadnego efektu starzenia i diety czy też nie było wpływu tylko na niektóre badane parametry? Informacja o podobieństwach i różnicach na poszczególnych etapach przy odmiennym efekcie końcowym (obecność lub brak agregatów) mogłaby w dużym stopniu pomóc w określeniu zależności przyczynowych.

Pod względem edytorskim rozprawa doktorska przygotowana jest w sposób wystarczająco poprawny. Wszystkie fragmenty, które nie są częścią opublikowanych artykułów zawierają błędy literowe i edytorskie, prowadzące miejscami do pojawiania się błędów gramatycznych. To jednak nie utrudnia zrozumienia tekstu i nie wpływa na jego wartość merytoryczną.

Podsumowując, badania opisane przez Doktoranta dotyczą bardzo ważnych zagadnień, o dużym znaczeniu dla zrozumienia podstawowej fizjologii. Dzięki wykorzystaniu dobrze zaplanowanych układów doświadczalnych badania pozwoliły na uzyskanie wartościowych wyników i wyciągnięcie ciekawych wniosków. Duża liczba różnorodnych i starannie opisanych danych będzie niewątpliwie wykorzystywana również przez innych badaczy jako źródło informacji. Uważam, że Doktorant prawidłowo zrealizował założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z tym proszę wysoką Radę Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pana mgr inż. Patryka Ślusarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl