



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Patryka Ślusarczyka

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

wykonanej w Laboratorium Homeostazy Żelaza,

w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

pod opieką

dr hab. Wojciecha Pokrzywy i dr Katarzyny Młeczko-Saneckiej

Charakterystyczną cechą obrotu żelaza u ssaków jest brak fizjologicznego, podlegającego regulacji szlaku usuwania tego mikroelementu z organizmu. Pociąga to za sobą ścisłą, wieloczynnikową kontrolę wchłaniania żelaza w układzie pokarmowym (głównie w dwunastnicy), której celem jest między innymi niedopuszczenie do nadmiernej akumulacji żelaza w tkankach, a tym samym ograniczenie jego toksycznego oddziaływania polegającego na udziale w generowaniu rodnika wodorotlenkowego. Ze względu na stosunkowo niską zawartość żelaza w przeciętnej (standardowej) diecie oraz ograniczoną wydajność jego absorpcji, nie jest ona procesem, który zapewnia niezwłoczne zaspokojenie zapotrzebowania na żelazo związanego z erytropoezą. Zapotrzebowanie to jest głównie równoważone w wyniku tzw. recyklingu żelaza, czyli odzyskiwaniu żelaza erytrocytarnego przez makrofagi, co odbywa się dzięki ich zdolności do erytrofagocytozy, proteolizy hemoglobiny, enzymatycznego rozkładu hemu oraz przekierowania elementarnego żelaza do krwioobiegu, w celu ponownego wykorzystania głównie w procesie erytropoezy. Chociaż redystrybucja żelaza przez makrofagi jest największym ilościowo, dziennym, przemieszczeniem tego mikroelementu w organizmie, to jednak jest to proces, którego regulacja jest stosunkowo mało poznana. Tak więc, podjęcie zagadnienia recyklingu żelaza w rozprawie doktorskiej mgr inż. Patryka Ślusarczyka jest ze wszech miar zasadne, tym bardziej, że dotyczy okresu



starości, gdy jego efektywność zmniejsza się, co prowadzi do niedokrwistości na tle funkcjonalnego niedoboru żelaza.

Główną część przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej stanowią 2 spójne tematycznie artykuły naukowe: artykuł przeglądowy pt *The Multiple Facets of Iron Recycling*, Genes, 2021, 12(9):1-22 (IF: 4,141, MEIN: 100pkt) i artykuł oryginalny pt *Impaired iron recycling from erythrocytes is an early hallmark of aging*, eLife, 2023, 12:1-39 (IF: 8,713 MEIN: 200). W obu artykułach Doktorant jest pierwszym Autorem. Ponadto rozprawa zawiera opracowanie, które w skrótovej formie, przyjmuje strukturę typową dla rozpraw doktorskich przygotowywanych w postaci monografii. Znalazły się w nim między innymi: wykaz skrótów, polsko- i anglojęzyczne streszczenia, wstęp, założenia i cele pracy, podsumowanie i wnioski, bibliografia, opinie komisji bioetycznej i dodatkowo oświadczenia współautorów publikacji.

Uważam, że rozdział 4. **Wstęp**, omawiający ogólnoustrojowy i komórkowy metabolizm żelaza, jest najsłabszym ogniwem rozprawy. Zredagowany jest w konwencji opisu popularno-naukowego, momentami dość chaotycznego. Zawiera szereg błędów językowych, stylistycznych, niezręcznych sformułowań, czasami merytorycznych nieścisłości i niedopowiedzeń. Podaję tu kilka przykładów: *żelazo może akumulować się w nadmiarze, prowadząc do jego przeładowania w tkankach*. (raczej należy mówić o przeładowaniu tkanek żelazem), *Wchłanianie żelaza to dynamiczny proces, który zależy przede wszystkim od absorbowania tego pierwiastka z pożywienia*. (w tym kontekście absorpcja i wchłanianie to synonimy), *Oś ferroportyna-hepcydyna* (raczej oś hepcydyna-ferroportyna), *posiadają one maszynię pozwalającą na skuteczne...* (zbyt dosłowna kalka z j. angielskiego; owszem, jest to określenie, którego często używa się w artykułach naukowych ale dodając molekularna, itp.). Ponadto trudno uznać za pełny opis wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza, całkowicie pomijający rolę białek regulatorowych IRPs (Iron Regulatory Proteins).

Podrozdział 4.7 **Omówienie osiągnięcia naukowego** powinien być wydzielony z rozdziału 4. **Wstęp** jako odrębny rozdział, gdyż dotyczy on bezpośrednio części doświadczalnej rozprawy, a nie opisu metabolizmu żelaza.



W rozdziale 5. **Założenia i cele pracy** Doktorant nie wspomina w odniesieniu do jakiego gatunku ssaków są formułowane. Ten brak jest szczególnie dotkliwy, gdy Doktorant jako jeden z celów wymienia w sposób bardzo ogólny *stworzenie modelu dysfunkcji RPMs podczas starzenia*. Same cele są zasadniczo czytelne, chociaż niektóre z nich są sformułowane niezręcznie.

W rozdziale 6. **Publikacje stanowiące prace doktorską** załączono wspomniane wyżej artykuły naukowe. Artykuł przeglądowy dostarcza wszechstronną i wnikliwą wiedzę na temat recyklingu żelaza w organizmie. Publikacja ta charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym i redakcyjnym. Opis obejmuje wszystkie etapy recyklingu od rozpoznania starych i/lub uszkodzonych erytrocytów przez makrofagi, poprzez proces erytrofagocytozy, modulowanie wewnątrzmakrofagalnego metabolizmu żelaza, którego jednym z elementów jest regulacja genu *Slc40a1* kodującego ferroportynę, jedyne, jak dotąd, poznane białko, transportujące żelazo w formie jonowej do środowiska zewnątrzkomórkowego. Niektóre rozdziały tego artykułu wychodzą poza typowy schemat opisywania recyklingu żelaza i poszerzają naszą wiedzę o nowe, mało jeszcze poznane i niezależne od klasycznej erytrofagocytozy jego mechanizmy, takie jak indukowana lokalnie, w mikrośrodkowisku śledziony hemoliza erytrocytów, w wyniku której powstają kompleksy hemoglobina-haptoglobina, usuwane następnie przez receptor CD163 na makrofagach czerwonej miazgi. Zwracają również uwagę interesujące rozdziały poświęcone fenotypowej plastyczności zarówno komórek Kupffera, jaki i makrofagów miazgi czerwonej śledziony oraz zależności między recyklingiem żelaza a funkcjami immunologicznymi makrofagów. Artykuł dopełniają bardzo staranne i precyzyjne ryciny, przedstawiające graficzne podsumowania poszczególnych etapów recyklingu. Konkludując, praca opublikowana w *Genes*, rozlegle udokumentowana, jest wartościową pozycją naukową i stanowi prawdziwe kompendium wiedzy o recyklingu żelaza. Posiada, moim zdaniem, wysoki potencjał cytowania. Jak dotąd została zacytowana 10-krotnie (na podstawie Web of Knowledge).

Praca przeglądowa stanowi perfekcyjne wprowadzenie do zagadnienia recyklingu żelaza przez makrofagi miazgi czerwonej śledziony w okresie starzenia, które Doktorant podjął w artykule oryginalnym opublikowanym w czasopiśmie *eLife*. Wyniki opisane w tym artykule składają się na wyniki rozprawy. Zamieszczone są w aż 27 wieloczęłonowych rycinach



(w 7 rycinach części głównej i w 20 rycinach uzupełniających), co świadczy o bardzo szerokim zakresie doświadczeń wykonanych przez Doktoranta, w których porównywano funkcje makrofagów śledziony młodych (2-3-miesięcznych) i starych (11-12-miesięcznych) myszy. Dodatkowo badano funkcje makrofagów starych myszy, którym od 5 tygodnia życia podawano paszę o zawartości żelaza 25 ppm, a więc 8-krotnie niższej od zawartości w tzw. paszy standardowej, którą aplikowano myszom z dwóch głównych grup doświadczalnych. Celem zastosowania tej diety była próba ograniczenia zaburzeń funkcji makrofagów, które nasilają się wraz z wiekiem. Należy dodać, w dużej mierze, próba udana. Większość wyników jest przedstawiona w formule porównania parametrów ogólnoustrojowego i wewnątrzmakrofagowego metabolizmu żelaza oraz funkcji makrofagów czerwonej miazgi śledziony w trzech grupach doświadczalnych. Generalną zaobserwowaną prawidłowością był wzrost poziomu żelaza (różnych jego frakcji) w śledzionie i w makrofagach czerwonej miazgi starych myszy, w porównaniu do młodych. Za prawdopodobną przyczynę Doktorant uznał przede wszystkim obniżoną ekspresję białka ferroportyny w makrofagach starych myszy. Nasuwa się jednak pytanie, czy za około 3-krotny wzrost poziomu żelaza niehemowego w śledzionie oraz podobny wzrost poziomu żelaza całkowitego w makrofagach śledziony starych myszy odpowiada jedynie stosunkowo umiarkowany spadek poziomu ferroportyny, rzędu 20%? Należy podkreślić, że zmiany w parametrach żelaza jak i zaburzenia funkcji makrofagów śledziony (zmniejszona aktywność fagocytna, obniżona enzymatyczna aktywność rozkładu hemu, a tym samym upośledzenie recyklingu żelaza, zmniejszona aktywność lizosomalna) oraz zmniejszenie ich liczby (spowodowane ferroptozą i proteotoksycznością) miały na ogół charakter całkowicie lub w dużym stopniu odwracalny wskutek zastosowania diety „25 ppm Fe”. Co ciekawe, większość zmian odnotowanych u myszy 10-11-miesięcznych pojawiała się już u osobników 5-miesięcznych i na ogół nie ulegała dalszemu nasileniu. Porównanie „kondycji” erytrocytów cyrkulujących we krwi obwodowej oraz erytrocytów ulegających retencji w śledzionie starych myszy, wskazuje, że te ostatnie charakteryzują się zaburzeniem wewnątrzkomórkowej homeostazy, podlegają lokalnie hemolizie i przyczyniają się do powstania pozakomórkowych, nieodegradowalnych białkowych agregatów żelaza. Szczegółowa analiza agregatów zawierających żelazo hemowe i



niehemowe wykazała, że ich komponentem są zmodyfikowane, podatne na agregację białka prawdopodobnie pochodzące z uszkodzonych makrofagów śledziony.

Mam pytanie o interpretację danych dotyczących wysokiego stężenia hemu oznaczonego w osoczu krwi pobranej z żyły wrotnej i jednocześnie wysokiego poziomu w surowicy jego białkowego ligandu - hemopeksyny. Zazwyczaj hemolizie wewnątrznaczyniowej i wyrzutowi hemu do krwi towarzyszy niski poziom hemopeksyny w surowicy krwi, czy wręcz jej zanik, co wiąże się z szybkim klarowaniem kompleksu hem-hemopeksyna przez receptor CD91 z krwioobiegu.

Uzyskane wyniki wskazują na potencjalne mechanizmy niedokrwistości w okresie starości, chociaż należy stwierdzić, że akurat anemia obserwowana u starych myszy, badanych w pracy, ma dość łagodny charakter (spośród parametrów czerwonekrwinkowych stwierdzono jedynie nieznaczne obniżenie stężenia hemoglobiny). Trudno też wnioskować definitywnie o niedoborze żelaza u starych myszy, gdyż jedynym jego kryterium przedstawionym w pracy jest wyraźnie obniżone wysycenie transferyny żelazem, który to parametr jest wypadkową poziomu żelaza w surowicy (osoczu) i całkowitej zdolności transferyny do wiązania żelaza (TIBC). Wartości tych dwóch składowych nie podano. Z drugiej strony, trzeba przyznać, że wykazano pobudzenie aktywności erytropoetycznej u starych myszy (oznaczenie poziomu erytropoetyny w osoczu krwi), co zwykle wiąże się z występowaniem anemii.

W moim przekonaniu artykuł przedstawia jedną z najbardziej wszechstronnych analiz recyklingu żelaza, z jaką miałem okazję się zapoznać. Wyniki uzyskano w oparciu o wyjątkowo bogaty warsztat metodyczny. Warto zauważyć, że podbudowano je i potwierdzono licznymi próbami walidacyjnymi oraz analizami kontrolnymi na rzadko spotykaną skalę. Podobnie jak w pracy przeglądowej, w artykule opublikowanym w *eLife* przedstawiono niezwykle przydatne dla czytelnika/recenzenta graficzne podsumowanie uzyskanych wyników.

Za główny element dyskusyjny części doświadczalnej rozprawy uważam podawanie myszom w okresie poprzedzającym osiągnięcie wieku 10-11 miesięcy, paszy o zawartości żelaza 200 ppm. Z jednej strony dieta o takiej zawartości żelaza jest określana jako dieta standardowa i faktycznie była stosowana przez wielu Autorów. Prace niektórych spośród



nich są cytowane w rozprawie (Kautz et al., 2008; Pagani et al., 2011). Z drugiej strony, sam Doktorant przytacza publikację (Sorbie and Valberg, 1974), z której wynika, że zawartość żelaza w stosowanej diecie przewyższa 8-krotnie zawartość niezbędną dla zaspokojenia potrzeb erytropoezy. Ponadto, warto zauważyć, że w ramach norm żywieniowych ustanowionych dla myszy (Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995 National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition Washington (DC): National Academies Press (US); 1995), normę dotyczącą żelaza ustalono na poziomie 38 ppm (ponad 5-krotnie mniej niż w diecie zastosowanej w doświadczeniu). Nasuwa się więc pytanie, czy wyniki przeprowadzonych doświadczeń charakteryzują zaburzenia funkcji makrofagów miazgi czerwonej śledziony w okresie fizjologicznej starości, czy też przyczynia się do nich (przynajmniej częściowo) długotrwała ekspozycja myszy na dietę o zawyżonej zawartości żelaza? Co istotne, taką sugestię wyraża Doktorant wraz ze współautorami w dosłownie ostatnim zdaniu artykułu w *eLife*. W tym kontekście, profilaktyczny efekt zastosowania diety „25 ppm Fe”, mocno akcentowany w rozprawie, wymaga być może reinterpretacji. Nie wykluczone, że w warunkach stosowania diety o niższej zawartości żelaza zmiany obserwowane przez Doktoranta u myszy 10-11-miesięcznych pojawiłyby się zdecydowanie później i miałyby jakościowo inny charakter. Brakuje mi w pracy porównanie przynajmniej niektórych z badanych parametrów i funkcji RPM u myszy 5-miesięcznych poddanych diecie o zawartości żelaza 25 i 200 ppm. Jak już wspomniałem zmiany w metabolizmie żelaza i zaburzenia funkcji makrofagów obserwowano już u myszy 5-miesięcznych (których raczej nie można uznać za myszy stare), którym podawano paszę „200 ppm Fe”. Ciekawe, czy podobne zmiany zaobserwowano by u myszy w tym samym wieku, eksponowanych na paszę „25 ppm Fe”. Jeśli nie, to byłby to dość mocny argument przemawiający za tym, że obserwowane dysregulacje są wywołane dietą o wysokim poziomie żelaza. Kontynuując ten wątek, w opublikowanym artykule nie podano precyzyjnie informacji, od jakiego wieku podawano myszom paszę o zawartości żelaza 200 ppm. Czy miało to miejsce z chwilą odsadzenia od matek? Zwykle potomstwo odsadza się od matek w wieku 3 tygodni i wówczas przechodzi ono na paszę standardową. Z opisu metodycznego wynika, że paszę o zredukowanej zawartości żelaza podawano myszom od 5 tygodnia życia. Czy wcześniej podawano im paszę „200 ppm Fe”? Jest to pytanie o tyle



ważne, że okres po odsadzeniu charakteryzuje się bardzo intensywną absorpcją żelaza związaną między innymi ze zmianą jej molekularnych mechanizmów. Na koniec, istotna jest informacja, w jakiej postaci (w formie jakich związków) występuje żelazo w paszy zadawanej myszom.

Niezależnie od moich komentarzy, uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Patryka Ślusarczyka wnosi bardzo cenne informacje na temat funkcjonowania jednego z najbardziej istotnych dla ogólnoustrojowej homeostazy żelaza procesów biologicznych, jakim jest recykling żelaza przez makrofagi. Ponadto za istotny przekaz rozprawy uważam zwrócenie uwagi na specyfikę homeostazy żelaza w okresie starości. Uzyskane wyniki potwierdzają, że nie istnieje jeden wzorzec regulacji homeostazy żelaza, i że na poszczególnych etapach ontogenezy musimy do jej oceny stosować inne kryteria.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Patryka Ślusarczyka pt. *Badanie zależności pomiędzy akumulacją żelaza w starzeniu a zdolnością do recyklingu żelaza w makrofagach czerwonej miazgi śledziony* spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Przedstawiam zatem Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie pana mgr inż. Patryka Ślusarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jastrzębiec, 31 lipca 2023

Prof. dr hab. Paweł Lipiński
Zespół Biologii Molekularnej Żelaza
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN