Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Marii Radziejewskiej
„Analiza wpływu transporterów Pcft, Rfc, Dmt1, Tfr2 na gospodarkę folianami i żelazem"
przygotowanej pod kierunkiem
prof. n. med. i n. o zdr. Agaty Chmurzyńskiej
w Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki, na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt znakomitej większości prac naukowych z zakresu biologii żelaza, w których głównym lejtmotywem jest Janusowe oblicze tego mikroelementu, wykorzystywanego przez niemal wszystkie organizmy żywe. Z jednej bowiem strony rozprawa odnosi się do konsekwencji niedoboru żelaza, najczęściej występującego u ludzi niedoboru żywieniowego, polegających na zaburzeniu procesu erytropoezy i rozwoju niedokrwistości. Ciekawym i nowatorskim posunięciem jest analiza tego zagadnienia w warunkach równolegle występującego niedoboru kwasu foliowego, związku o dobrze udokumentowanym znaczeniu w regulacji procesu erytropoezy. Z drugiej strony, w rozprawie podjęto próbę zbadania negatywnych konsekwencji uzupełniania niedoboru żelaza, które jest tylko pozornie łatwą procedurą. Przedawkowanie, niewłaściwy sposób podania egzogennego żelaza może wywołać szereg efektów toksycznych, u podstaw których leżą stres oksydacyjny i stan zapalny. Przedmiot rozprawy wymaga solidnej wiedzy w zakresie molekularnej regulacji metabolizmu żelaza. W ostatnich 20 latach w dziedzinie tej, dokonała się rewolucja na niespotykaną skalę. Jej ostatnimi zdobyczami jest odkrycie tkankowo specyficznych regulacji metabolizmu żelaza np. w dwunastnicy, sercu, mięśniach, niezależnych od ogólnoustrojowej osi regulatorowej hepcydyna-ferroportyna, a także odkrycie ferroptozy, procesu ukierunkowanej, zależnej od żelaza śmierci komórkowej.

W związku z powyższym, podjęcie przez Doktorantkę próby molekularnej analizy wybranych transporterów żelaza i kwasu foliowego w dwunastnicy i wątrobie w warunkach ich niedoboru a następnie suplementacji tymi dwoma składnikami pokarmowymi jest jak najbardziej uzasadnione. Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorantka zdecydowała się na osadzenie swoich badań w ramach oryginalnego modelu, podwójnego niedoboru zarówno żelaza jak i kwasu foliowego, wywołanego ich brakiem w diecie. Jest to ambitne zamierzenie ze względu na słabo jeszcze zbadane wzajemne oddziaływania między metabolizmami żelaza i kwasu foliowego.

Głównym elementem rozprawy doktorskiej jest cykl 3 tematycznie powiązanych ze sobą, oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2020-2021 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wyszczególnionych w bazie PubMed. Publikacje te opatrzono syntezą, która w skrócie zawiera typowe elementy rozprawy doktorskiej w formie monografii: streszczenie, wprowadzenie, hipotezy, cele, metodykę badań, syntetyczne omówienie wyników, wnioski i bibliografię. Jak zwykle taka formuła rozprawy doktorskiej stawia jej recenzenta przed trudnym zadaniem wyrażenia opinii na temat już pozytywnie zweryfikowanych i przyjętych do publikacji artykułów naukowych. Krytykę naukową przeprowadza się oczywiście na podstawie ujednoliconych, ściśle ustalonych kryteriów ale jest ona również pochodną indywidualnego podejścia do wyników badań, ich interpretacji, które z kolei wynikają z indywidualnego doświadczenia badawczego i wniosków wyciąganych z lektury prac naukowych. Dlatego w dalszej części recenzji pozwolę sobie na dosłownie kilka krytycznych uwag dotyczących już opublikowanych artykułów.

Tymczasem zacznę od omówienia syntezy, która, jak już wspomniałem, jest swoistym spoiwem publikacji stanowiących przedmiot recenzowanej rozprawy.

Sam tytuł rozprawy pomija wątek niedoboru żelaza i kwasu foliowego, a przecież, to właśnie w warunkach niedoboru tych składników pokarmowych przeprowadzono wszystkie analizy. Ponadto w przeciwieństwie do tytułów załączonych publikacji, tytuł rozprawy nie wskazuje na model zwierzęcy, w oparciu o który przeprowadzono badania, a moim zdaniem powinien.

W akapicie *Wprowadzenie* zdecydowanie zabrakło zwięzłego ale wyczerpującego opisu absorpcji żelaza i kwasu foliowego, ich przemian metabolicznych w wątrobie i wreszcie ich oddziaływania na proces erytropoezy. Wątki transportu żelaza i kwasu foliowego przez błoną apikalną enterocytów dwunastnicy oraz transportu tych składników do wątroby, podjęte przez Doktorantkę mają mimo wszystko dość fragmentaryczny charakter na tle całościowych przemian metabolicznych żelaza i folianów. Dlatego też, to krótkie tematyczne podsumowanie, pozwoliłoby umiejscowić przedmiot rozprawy doktorskiej w szerszym kontekście. Przykładowo, ani w syntezie, ani w załączonych publikacjach nie wspomniano ani słowem o ferroportynie, transporterze żelaza występującym na błonie komórkowej enterocytów (na błonie podstawno-bocznej) i hepatocytów, który jest kluczowym białkiem determinującym wypływ żelaza do

środowiska zewnątrzkomórkowego. Jest to o tyle zaskakujące, że w publikacji nr. 2 Doktorantka analizowała w surowicy krwi poziom hepcydyny, peptydu regulującego ekspresję ferroportyny na błonie komórkowej. Doktorantka nie wspomniała również o roli czynnika transkrypcyjnego HIF-2α (*Hypoxia Inducible Factor-2α*), który w świetle badań z minionej dekady urasta do nadrzędnego regulatora absorpcji żelaza [Mastrogiannaki I wsp., 2013; Simpson i McKie, 2009]. Ponadto, moim zdaniem, we *Wprowadzeniu* Doktorantka powinna przynajmniej wspomnieć, że białko Pcft, uznane za transporter folianów [Qiu i wsp., 2006], zidentyfikowano również jako transporter hemu - *heme carrier protein 1* (HCP1), zlokalizowany na błonie apikalnej enterocytów absorpcyjnych [Shayeghi wsp., 2005]. Obie prace opublikowano w prestiżowym czasopiśmie *Cell*. Co prawda w diecie podawanej szczurom dominującą formą żelaza jest żelazo niehemowe, to jednak, biorąc pod uwagę tematykę rozprawy, kwestia Pcft/HCP1 jako potencjalnego nośnika zarówno folianów jaki i hemu powinna być opatrzona komentarzem Doktorantki.

Hipotezy są sformułowane w sposób bardzo ogólny i ostrożny, co wydaje się uzasadnione, w warunkach zastosowania nowatorskiego układu doświadczalnego. Zabrakło w nich odniesienia do niedoboru żelaza i kwasu foliowego.

Główny cel zawiera moim zdaniem błąd stylistyczny. Proponuję następujące sformułowanie tego celu: Poznanie wpływu transporterów żelaza i folianów w dwunastnicy i wątrobie na wchłanianie tych składników pokarmowych, ich status w organizmie szczurów oraz parametry stanu zapalnego.

Cele szczegółowe wydają się oczywiste i nie mam do nich uwag.

W sferze metodyki, na podkreślenie zasługuje fakt, że układ doświadczalny przyjęty przez Doktorantkę ma nowatorski charakter. Polega on na próbie wywołania u szczurów jednoczesnego niedoboru kwasu foliowego i żelaza, a następnie na suplementacji zwierząt żelazem, kwasem foliowym oraz łącznie żelazem i kwasem foliowym. Istotnym elementem układu doświadczalnego jest utrzymanie przez cały czas doświadczenia (7 tygodni) grupy zwierząt poddanych diecie pozbawionej kwasu foliowego i żelaza (grupa D) oraz diecie kontrolnej (grupa C), o standardowej zwartości tych składników pokarmowych. Za niezwykle istotne uważam, że ten układ doświadczalny obowiązywał w doświadczeniach, na bazie których powstały 3 załączone do rozprawy publikacje. Dzięki temu publikacje będące przedmiotem

rozprawy stanowią *par excellence* rzeczywistą całość, spójny cykl tematyczny. Oznacza to, że np. parametry erytrocytarne i status żelaza w surowicy krwi opisane w publikacji nr. 1 można bezpośrednio odnieść do wyników z publikacji nr. 2 czy 3. Do pozostałych elementów metodyki, jak również do uzyskanych wyników ustosunkuję się przy omawianiu kolejnych artykułów cyklu Wnioski. Stwierdzenie we wniosku nr. 1 nie uwzględnia, moim zdaniem, wyników analizy statystycznej, jeśli dobrze odczytuję objaśnienie w stopce Tabeli 6. Wniosek nr. 2 w odniesieniu do genu kodującego transporter żelaza – DMT1 powinien zawierać stwierdzenie dotyczące nie tylko transkrypcyjnej ale również potranskrypcyjnej regulacji przez system IRP/IRE.

Publikacja nr. 1. Uderza stosunkowo niska skuteczność wywołania niedoboru żelaza przy zastosowaniu diety pozbawionej żelaza i kwasu foliowego. Na podstawie wyników przedstawionych w Tabelach 5 i 6 można stwierdzić, że dieta ta aż do drugiego punktu czasowego, okazała się nieskuteczna w wywołaniu u szczurów nie tylko niedokrwistości ale nawet niedoboru żelaza mierzonego stężeniem żelaza w surowicy krwi. Świadczy o tym porównanie wartości parametrów czerwonokrwinkowych i żelazowych w surowicy krwi między grupą deficytową (D) a grupą kontrolną (C). O pierwszych symptomach niedokrwistości z niedoboru żelaza można wnioskować dopiero w 49 dniu stosowania diety. Wyniki te, z jednej strony, zupełnie mnie nie dziwią, gdyż 8-tygodniowe szczury posiadają wystarczająco duże zapasy żelaza w wątrobie do utrzymania przez długi czas ciągłości erytropoezy nawet przy braku dopływu egzogennego żelaza. Z drugiej strony, bardzo szkoda, że Doktorantka nie oznaczyła zawartości żelaza w wątrobie szczurów. Jestem przekonany, że ta prosta analiza bezbłędnie „uchwyciłaby" stopniowy ubytek żelaza z wątroby, co mogłoby stanowić miernik postępującego, „ukrytego" niedoboru żelaza. Skuteczność tylko suplementacji łącznej żelazem i kwasem foliowym w przywróceniu statusu czerwonokrwinkowego szczurów wskazuje na synergistyczne działanie pomiędzy tymi składnikami pokarmowymi w stymulacji erytropoezy i jest ważnym wynikiem.

Odnośnie szczegółowej metodyki mam pytanie, czy startery wybrane do oznaczenia poziomu transkryptu DMT1 w dwunastnicy są specyficzne dla formy mRNA DMT1 zawierającej sekwencje regulatorowe IRE (*Iron Responsive Element*) w końcu 3'UTR, tym samym podatnej na potranskrypcyjną regulację przez żelazo, czy też dla formy bez IRE, czy może dla obu ? Prosiłbym również o wyjaśnienie, w jaki sposób walidowano przeciwciała do DMT1 i Pcft

zastosowane w technice Western blot. Stwierdzenie o zbadaniu specyficzności tych przeciwciał bez podania szczegółów, czy też bez powołania się na wcześniejsze publikacje znalazło się w tekście publikacji.

Jak wykazała Doktorantka, brak kwasu foliowego w diecie prowadzi do drastycznego obniżenia poziomu folianów w surowicy krwi szczurów już w pierwszym punkcie czasowym ($p<0,001$). Z zestawienia tego deficytu z pozostającymi w normie parametrami czerwonokrwinkowymi (szczególnie w pierwszym i drugim punkcie czasowym) płynie istotny wniosek, że ostry niedobór folianów nie prowadzi do większego zaburzenia procesu erytropoezy i gospodarki żelazem u szczurów. Jest to bardzo cenna obserwacja, która moim zdaniem nie została wystarczająco uwypuklona i przedyskutowana w publikacji i całej rozprawie.

Mam prośbę o szersze zinterpretowanie braku różnic pomiędzy grupami w ekspresji DMT1 na poziomie białka. Wydaje mi się, że interpretacja przedstawiona w publikacja jest dość powierzchowna i nie do końca zrozumiała. Co mianowicie w zdaniu „*This was most likely due to other transporters*[30] *and regulatory mechanisms which we have not (been ?-PL) investigated, such as two motifs in the 5' regulatory region*[31],..." oznacza określenie „*two motifs in the 5' regulatory region*" ? Z kolei w zdaniu „*This physiological effect was reflected by changes in gene transcription, but not in protein levels*", w ostaniem paragrafie dyskusji określenie „*changes in gene transcription*" (odnoszące się do transkrypcji genu kodującego DMT1) jest nieścisłe, gdyż zmiany w poziomie mRNA DMT1 mogły być, owszem, skutkiem regulacji transkrypcyjnej genu *Slc11a2* prawdopodobnie przez czynnik HIF-2α, ale również regulacji potranskrypcyjnej przez system IRP/IRE, stabilizującej/destabilizującej już istniejące w enterocytach mRNA DMT1. Naukowy niedosyt w publikacji nr. 1 wzbudza brak danych dotyczących ekspresji ferroportyny w dwunastnicy doświadczalnych szczurów. Wydawałoby się, że wobec braku różnic pomiędzy grupami w poziomie białka DMT1, analiza ekspresji ferroportyny jawi się wręcz jako obowiązkowa. W pełni doceniam konstatację Doktorantki w końcu dyskusji w publikacji nr. 1, że czynnikiem ją ograniczającym jest brak analizy innych transporterów żelaza i folianów. Mimo wszystko ferroportyna powinna być tutaj jednak wyjątkiem. Brak danych dotyczących ekspresji genu *Slc40a1*, kodującego ferroportynę zatrzymuje analizę absorpcji żelaza w przyjętym układzie doświadczalnym w połowie drogi.

Publikacja nr. 2. Wybór receptora transferyny 2 (TfR2) jako białka odpowiedzialnego za transport żelaza do wątroby jest co najmniej dyskusyjny. Receptor ten charakteryzuje się 25-30-krotnie mniejszym powinowactwem do transferryny niż TfR1 [Kawabata i wsp., 2000; West i wsp, 2000] i jego rola w transporcie żelaza do wątroby jest dość powszechnie podważana [Kawabata, 2019]. Ponadto, w przeciwieństwie do TfR1, ekspresja TfR2 nie podlega wewnątrzkomórkowej regulacji przez żelazo, w tym regulacji przez system IRP/IRE. Doktorantka słusznie zauważyła, że TfR2 odgrywa rolę w szlaku sygnalizacyjnym hepcydyny. Wydaje się jednak, że powołując się na publikację Ross i wsp., 2012 opublikowaną w *Cell Metabolism*, mylnie interpretuje mechanizm regulacji hepcydyny przez TfR2, według niej polegający na indukcji hepcydyny przez kompleks TfR2-transferyna. Tymczasem, konsensus wokół regulacji hepcydyny przez TfR2 zakłada, że w przypadku niskiego wysycenia transferryny jonami żelaza, białko to wiąże się głównie do białka HFE na błonie komórkowej hepatocytów. Gdy wysycenie transferryny wzrasta, wówczas powinowactwo holo-transferyny do TfR1 zwiększa się, co powoduje, że holo-transferryna wypiera HFE z kompleksu z TfR1, a uwolnione białko HFE wiąże się z TfR2 i następnie, kompleks HFE-TfR2 oddziałuje na zespół receptorów białka morfogenetycznego kości wraz z hemojuweliną (*bone morphogenetic protein (BMP) type I and II receptors and hemojuvelin, BMPRs/HJV*), inicjując wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacji hepcydyny.

Generalnie w przypadku rozpatrywania roli TfR2 w ogólnoustrojowej homeostazie żelaza istotna jest nie tyle zmiana ekspresji samego receptora, ile jego zdolność do tworzenia kompleksu z białkiem HFE na błonie komórkowej, co bezsprzecznie udowodniono u myszy i u pacjentów z mutacjami genu *Tfr2/TFR2*, w wyniku których TfR2 traci zdolność tworzenia kompleksu z HFE, co prowadzi do obniżenia ekspresji hepcydyny i do wywołania hemochromatozy typu 3 [Gobbi i wsp., 2018].

Analiza stężenia hepcydyny w surowicy krwi szczurów doświadczalnych nie wskazuje na występowanie niedoboru żelaza wskutek zastosowania diety pozbawionej żelaza i kwasu foliowego nawet w 49 dniu doświadczenia (brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami C i D). Co ciekawe, analiza pokazuje pozytywny wpływ suplementacyjnego żelaza ale nie kwasu foliowego (istotny wzrost stężenia hepcydyny w grupach DFE i FEFOL ale nie w grupie DFOL). Może z tego wyciągnąć intersujący i ważny wniosek (pominięty jednak przez

Doktorantkę), że foliany nie wpływają na regulację ekspresji hepcydyny. Warunkiem koniecznym jest tutaj suplementacja żelazem. Opierając się na własnych doświadczeniach z pomiarem stężenia hepcydyny w osoczu krwi ciężarnych myszy z niedoborem żelaza, mam w tym miejscu uwagę dotyczącą czułości komercyjnych testów ELISA do detekcji hepcydyny.

Wydaje się, że przy ich pomocy łatwo wykryć nawet niewielki wzrost poziomu hepcydyny ponad wartości kontrolne, natomiast nie są one przystosowane do rejestrowania stężenie peptydu poniżej stężeń fizjologicznych, które i tak są już dość niskie. Dlatego szkoda, że w publikacji nie zawarto oceny ekspresji hepcydyny na podstawie oznaczenia poziomu mRNA tego peptydu w wątrobie metodą Real-Time PCR. Jestem przekonany, że przy użyciu tej metody Doktorantka byłaby w stanie wykryć w grupie D znaczny, istotny statystycznie spadek poziomu transkryptu hepcydyny.

Publikacja nr. 3. Publikacja ta przynosi w większości negatywne wyniki, które same w sobie, są jednak nośnikiem ważnych informacji. Na przykład, brak różnic między grupami w stężeniu białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi szczurów, świadczy między innymi o tym, że zastosowana suplementacja żelazem nie jest suplementacją agresywną, zdolną wywołać stan zapalny w organizmach szczurów. Jest to tym bardziej istotne, że suplementacyjne żelazo podawano szczurom o niezbyt obniżonym statusie żelaza. Wynika stąd wniosek, że suplementacja żelazem zastosowana przez Doktorantkę w doświadczeniu charakteryzuje się dużą tolerancją. Dodam, że w przypadku uzyskania negatywnych wyników oznaczeń CRP należało, być może, użyć innych markerów stanu zapalnego np. interleukiny-6 (która jest cytokiną indukującą transkrypcyjnie ekspresję genu kodującego hepcydynę), ewentualnie markerów stresu oksydacyjnego (np. 8-izoprostan).

Podsumowując, rozprawa opiera się na oryginalnym założeniu, że równoczesny niedobór żelaza i kwasu foliowego w diecie wpływa na gospodarkę tymi składnikami, co w konsekwencji może prowadzić do zaburzenia procesu erytropoezy i wystąpienia niedokrwistości. Zastosowanie w układzie doświadczalnym 3 różnych sposobów suplementacji szczurów należy uznać za cenny zabieg metodyczny, pozwalający na badanie interakcji pomiędzy metabolizmem żelaza i folianów i procesem erytropoezy. Badanie szlaków absorpcji żelaza i kwasu foliowego w

dwunastnicy oraz ich transport poprzez określenie ekspresji wybranych transporterów jest cennym elementem rozprawy, nawet jeśli większość porównań nie przyniosła istotnych statystycznie różnic. Niektóre moje krytyczne uwagi zwarte w tej recenzji nie są imperatywne, mają charakter polemiczny i chętnie usłyszę, jak ustosunkuje się do nich Doktorantka w trakcie obrony rozprawy. Mam nadzieję, że Doktorantka przyjmie niektóre moje sugestie i będzie miała okazję przeprowadzenia dodatkowych analiz w oparciu o już zebrane próbki biologiczne, gdyż, moim zdaniem, tkwi w nich jeszcze pokaźny, niewykorzystany potencjał badawczy.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (załącznik do obwieszczenia Marszałka Sejmu RP z dnia 2 grudnia 2014r. - Dz. U. poz. 1852). Zwracam się więc do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Anny Marii Radziejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jastrzębiec, 25 lipca 2021

Prof. dr hab. Paweł Lipiński