



Poznań, dnia 28 października 2024 r.

Prof. dr hab. Michał Jank  
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgra Rafała Mazgaja pt. „Studies on the regulation of iron homeostasis during pregnancy using mouse (*Mus musculus*) and pigs (*Sus scrofa*) models” wykonanej w Zespole Biologii Molekularnej Żelaza, Zakładu Biologii Molekularnej, Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt w Jastrzębcu pod kierunkiem Pana promotora prof. dr hab. Rafała Starzyńskiego.**

Od wielu lat niedokrwistość z niedoboru żelaza (IDA) występująca u nowonarodzonych prosiąt stanowi poważny problem w hodowli trzody chlewnej. Choroba prowadzi do spowolnionego wzrostu i zwiększonej śmiertelności w okresie pourodzeniowym, zaś jej główną przyczyną są niewystarczające zapasy żelaza w wątrobie, stanowiące główne źródło tego pierwiastka u prosiąt w pierwszych tygodniach życia. Niedobór może być spowodowany niedostatecznym transferem żelaza od lochy do płodów poprzez łożysko w czasie ciąży, a także ograniczoną zdolnością prosiąt do absorpcji żelaza z pokarmu w ilościach dostosowanych do bardzo szybkiego tempa ich wzrostu. I chociaż od lat standardem w zwalczaniu objawów tej choroby są iniekcje domięśniowe dekstranu żelaza u prosiąt w pierwszych dniach po porodzie, to jednak nadal bardzo duże zainteresowanie hodowców wzbudzają możliwości suplementacji tego pierwiastka zarówno u ciężarnych loch, w celu potencjalnego zwiększenia transferu żelaza przez łożysko, jak i bezpośrednio u nowonarodzonych prosiąt. W przypadku suplementacji jednak dość istotnym ograniczeniem może być relatywnie niska biodostępność żelaza podawanego doustnie, a z drugiej strony konieczność unikania przedawkowania, które może doprowadzić do toksyczności tego pierwiastka. W efekcie nadal nie jest jasne czy możliwe jest opracowanie standardowych metod prowadzenia suplementacji żelaza u ciężarnych loch jako potencjalnego środka zapobiegającego IDA u prosiąt. Właściwie brak jest jednoznacznych zaleceń dotyczących preferowanej formy doustnych preparatów żelaza, schematów prowadzenia suplementacji – sposobu podawania i dawki, a także potencjalnego ryzyka związanego z przedawkowaniem. Oznacza to także, że lekarze weterynarii zajmujący się trzodą chlewną wykonują codziennie dziesiątki iniekcji u nowonarodzonych prosiąt oczekując na bardziej przyjazne dla dobrostanu zwierząt rozwiązanie problemu IDA.

Mając powyższe na uwadze należy docenić potencjalne znaczenie badań podjętych przez mgr. Rafała Mazgaja, który postanowił przeprowadzić badania nad regulacją homeostazy żelaza podczas ciąży na modelu mysim i świńskim w oparciu o dwie hipotezy badawcze.





Pierwsza z nich zakłada, że zmniejszenie poziomu krążącej hepcydyny w organizmie ciężarnej matki jest mechanizmem adaptacji w homeostazie żelaza umożliwiającym zwiększenie wchłaniania tego pierwiastka i jego mobilizację z magazynów, aby sprostać zapotrzebowaniu rozwijających się płodów. Druga hipoteza zakłada z kolei, że to łożysko jest odpowiedzialne za transfer żelaza do płodu poprzez regulację ekspresji i aktywności najważniejszych białek transportujących żelazo, co pozwala na wydajne pobieranie żelaza przez płód, nawet w sytuacji jego niedoboru w organizmie ciężarnej matki. Realizacja tych zamierzeń została zaplanowana w dwóch szczegółowych celach badawczych, a mianowicie:

- 1) Zbadanie mechanizmu wchłaniania i dystrybucji żelaza w organizmie ciężarnej myszy i lochy.
- 2) Zbadanie roli osi regulacyjnej ferroportyna – hepcydyna w homeostazie żelaza podczas ciąży.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach z listy JCR w formie dwóch oryginalnych artykułów naukowych, a mianowicie:

1. Effect of oral supplementation of healthy pregnant sows with sucrosomial ferric pyrophosphate on maternal iron status and hepatic iron stores in newborn piglets. Rafał Mazgaj, Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Ewa Smuda, Marian Kamyczek, Beata Cieślak, Dorine Swinkels, Małgorzata Lenartowicz, Rafał R. Starzyński. **Animals (Basel); 2020**. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10071113>. (IF= 2,752; MNiSW – 100.)
2. Marginally reduced maternal hepatic and splenic ferroportin under severe nutritional iron deficiency in pregnancy maintains systemic iron supply. Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Eunice Sindhuvi Edison, Aleksandra Bednarz, Robert Staroń, Olga Haberkiewicz, Małgorzata Lenartowicz, Ewa Smuda, Aneta Jończy, Rafał R Starzyński. **American Journal of Hematology; 2021** DOI: 10.1002/ajh.26152 (IF=13.265; MNiSW= 140)

Do przedstawionego do oceny cyklu jednotematycznych artykułów stanowiącego podstawę pracy doktorskiej Doktorant dołączył ponadto pracę przeglądową:

3. Iron Supplementation of Pregnant Sows to Prevent Iron Deficiency Anemia in Piglets: A Procedure of Questionable Effectiveness. Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Rafał R Starzyński. **International Journal of Molecular Sciences; 2024** DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25074106> (IF= 5,6; MNiSW = 140)

Bardzo dobre parametry czasopism naukowych, w których ukazały się artykuły (sumaryczna wartość IF wynosi 21,617, a sumaryczna liczba punktów MNiSW wynosi 380) wskazują na bardzo wysoką jakość i wartość badań przeprowadzonych przez Doktoranta. We wszystkich opublikowanych artykułach mgr Rafał Mazgaj jest pierwszym autorem. W zamieszczonych na końcu pracy oświadczeniach współautorów udział Doktoranta oszacowano na 60% w przypadku wszystkich trzech publikacji, co świadczy o jego wiodącej roli w ich przygotowaniu.





Wartość merytoryczna wyników przedstawionych w poszczególnych publikacjach tworzących ww. cykl została już wcześniej oceniona przez dwóch lub trzech niezależnych recenzentów podczas każdego procesu wydawniczego. Recenzja niniejszej rozprawy doktorskiej skupia się przede wszystkim na ocenie spójności cyklu przedstawionych artykułów naukowych. Oprócz ww. trzech publikacji dysertacja doktorska mgr Rafała Mazgaja składa się również z autoreferatu w języku angielskim, stanowiącego podsumowanie badań opisanych wcześniej w pracach oryginalnych. Ten autoreferat posiada tradycyjny układ i składa się ze spisu treści, streszczenia w języku angielskim i polskim, wprowadzenia, hipotez badawczych oraz celu pracy, opisu materiałów i metod, omówienia wyników, dyskusji wyników, wniosków oraz piśmiennictwa. W dalszej kolejności dołączono podsumowanie udziału Doktoranta w przygotowaniu poszczególnych publikacji.

Rozdział pierwszy autoreferatu, czyli wprowadzenie, składa się z dwóch części. Pierwsza z nich opisuje ogólną regulację metabolizmu żelaza, zaś druga regulację żelaza w łożysku. Doktorant korzystając z najnowszych publikacji przedstawił aktualny stan wiedzy w tych obszarach, wspomagając się odpowiednio dobranymi rycinami. Wprowadzenie pozwala na zrozumienie istoty problemów wynikających z niedostatecznej wiedzy na temat mechanizmów regulujących homeostazę żelaza w organizmie oraz ułatwia powiązanie szeregu mechanizmów zachodzących na poziomie molekularnym z kluczowym problemem klinicznym wynikającym z zaburzeń homeostazy żelaza, a mianowicie niedokrwistością spowodowaną niedoborem żelaza. Wprowadzenie w sposób jasny i logiczny prowadzi czytelnika do kolejnych rozdziałów autoreferatu prezentujących hipotezy i cele pracy, które zostały poprawnie sformułowane.

Kolejny rozdział pracy przedstawia metodykę badań z podziałem na eksperyment 1 (opisany w publikacji nr 1) oraz eksperyment 2 (opisany w publikacji nr 2). Ponadto szczegółowy opis wykonywanych doświadczeń i użytych metod analitycznych znajduje się także w treści załączonych artykułów naukowych. Przedstawiona metodyka pracy – układ eksperymentów oraz użyte metody analityczne, nie wzbudzają żadnych wątpliwości ani nie wymagają uwag ze strony Recenzenta. Z obowiązku Recenzenta trzeba jednak wskazać, że ani w publikacji nr 2 ani w autoreferacie nie ma informacji o liczebności grupy ciężarnych myszy, na której wykonano eksperyment 2.

Opis wyników wykonanych badań jest także podzielony na wyniki eksperymentu 1 oraz eksperymentu 2. W przypadku eksperymentu 1, w którym Doktorant oceniał wpływ suplementacji ciężarnych loch dwoma rodzajami preparatów żelazowych (sukrozomialnym oraz klasycznym siarczanem żelaza) na homeostazę żelaza u nowonarodzonych płodów, w opisie wyników lub w dyskusji warto byłoby zwrócić uwagę na dwie kwestie: występowanie potencjalnych efektów klinicznych podawania żelaza u ciężarnych loch oraz różnice w biodostępności użytych w eksperymencie form żelaza. W pierwszym przypadku to zwykła ciekawość Recenzenta nakazuje zapytać czy ponad 30-dniowe podawanie żelaza ciężarnym lochom nie powoduje wystąpienia u nich niepożądanych objawów klinicznych, jakie niekiedy występują u innych gatunków zwierząt w czasie takiej suplementacji. Oczywiście niewielka liczebność grup doświadczalnych (po pięć osobników) nie pozwala na wyciąganie ogólnych wniosków, ale z klinicznej praktyki weterynaryjnej wynika, że tak długa suplementacja u psów czy kotów może być klinicznie problemem. Drugim z wskazanych przez Recenzenta wątków





są różnice w biodostępności żelaza podawanego w użytych suplementach. W przedstawionych wynikach Doktorant ocenił skuteczność suplementacji poprzez ocenę parametrów czerwonych krwinek oraz poziomu żelaza oraz ferrytyny w osoczu loch. Wg uzyskanych wyników sposób suplementacji nie miał wpływu na te parametry. Ale wybierając takie a nie inne formy żelaza do suplementacji Doktorant na pewno miał świadomość, że biodostępność żelaza sukrozomialnego może być zupełnie inna niż klasycznego siarczanu żelaza. Czy nie należało wobec tego skorygować wielkości dawek podawanego żelaza uwzględniając jego biodostępność?

Wyniki przeprowadzonych badań doprowadziły do sformułowania ogólnego wniosku, że suplementacja żelaza u ciężarnych loch nie wpływa na jego homeostazę w organizmach matek ani nie zwiększa zapasów żelaza u nowonarodzonych prosiąt, co oznacza, że nie chroni ich przed potencjalnym rozwojem niedokrwistości spowodowanej niedoborem żelaza po urodzeniu. Ale wg Recenzenta zaskakującym wynikiem jest wzrost poziomu hepcydyny w łożyskach oraz u nowonarodzonych prosiąt pochodzących od loch suplementowanych żelazem sukrozomialnym. Taki wynik pokazuje z jednej strony istotną różnicę we wpływie rodzaju podawanego lochom żelaza na prosięta, ale także oznacza, że przy podawaniu żelaza sukrozomialnego w organizmach prosiąt rozwinął się mechanizm odwrotny od zamierzonego. Jeżeli bowiem podawanie żelaza lochom miało zwiększyć jego transfer do płodów, a co za tym idzie jego poziom w organizmach nowonarodzonych prosiąt, to stwierdzony przez Doktoranta wzrost poziomu hepcydyny przekładający się na zmniejszenie poziomu białka ferroportyny *de facto* ogranicza ilość żelaza przekazywanego do krążenia płodów. I nawet jeżeli zaobserwowane zmiany są hipotetyczną formą ochrony płodów przed nadmiarem żelaza, a co za tym idzie formą ochrony jego toksycznością, to wystąpienie tego zjawiska w grupie zwierząt otrzymujących żelazo sukrozomialne oznacza, że suplementacja tej formy żelaza była zdecydowanie bardziej efektywna i została „zauważona” przez łożysko i organizm płodu. Logiczne wydaje się więc także pytanie, jaki efekt na organizm lochy i prosiąt może wywoływać podawanie samych liposomów, nie zawierających wewnątrz żelaza.

Wyniki eksperymentu 2, w którym Doktorant na modelu mysim oceniał wpływ niedoboru żelaza u matki na gospodarkę żelaza u płodów, wykazały, że 12-krotne zmniejszenie podaży żelaza w diecie matki powoduje przestawienie w jej organizmie gospodarki żelazem i jego pozyskiwanie głównie ze starzejących się erytrocytów, a także, że w przypadku niedoboru żelaza w organizmie ciężarnej matki jest ono preferencyjnie wychwytywane przez łożysko, które staje się swego rodzaju rezerwuarem żelaza. W takiej sytuacji głównym regulatorem ilości żelaza przekazywanej do krążenia płodu, a także do wątroby płodu staje się ferroportyna, która odpowiada za przekazywanie żelaza z łożyska do krążenia, a także za ograniczenie jego usuwania z wątroby płodu, dzięki czemu możliwa jest erytropoeza. Uzyskane wyniki pozwalają na stworzenie modelu regulacji poziomu żelaza w układzie matka – łożysko – płód w przypadku jego niedoboru w diecie matki i wskazują, że w takim przypadku głównym źródłem żelaza są starzejące się krwinki matki, zaś głównym narządem gromadzącym żelazo (choć może w sposób niewystarczający) jest łożysko.

Z przeprowadzonych badań Doktorant wyciągnął dwa wnioski, które są dość ostrożne, aczkolwiek bardzo dobrze odzwierciedlają uzyskane wyniki. Potwierdzają one kluczową rolę żelaza w przebiegu ciąży, a szczególnie negatywne konsekwencje jego niedoborów. Na





marginesie, nie potwierdzają natomiast występowania korzystnych efektów jego dodatkowej suplementacji w czasie ciąży. Ponadto przeprowadzone badania wskazują na znaczenie interakcji pomiędzy poziomem żelaza w diecie, sposobem jego transportu w organizmie a hormonami regulacyjnymi, takim jak hepcydyna. Mając jednak na uwadze wykonane badania oraz dyskusję uzyskanych wyników nasuwa się pytanie dotyczące alternatywnych dla układu hepcydyna-ferroportyna sposobów regulacji homeostazy żelaza. Czy nie jest bowiem możliwe, że w przeprowadzonych eksperymentach nie zbadano szlaków lub mechanizmów, których potencjalna aktywność lub jej brak mogłyby znacznie ułatwić interpretację uzyskanych wyników?

Jak wspomniano na początku niniejszej recenzji – Doktorant przedłożył do oceny jako rozprawę doktorską trzy publikacje naukowe, z których jedna była pracą przeglądową i nie była szerzej omawiana w autoreferacie. Praca ta powstała już po opublikowaniu prac oryginalnych i stanowi krytyczne spojrzenie na efektywność suplementacji ciężarnych loch w celu ograniczenia występowania niedokrwistości z niedoboru żelaza u prosiąt. Taka kolejność publikacji pozwala na wykorzystanie w artykule przeglądowym wyników własnych badań uzyskanych w czasie wykonywania pracy doktorskiej, ale jednocześnie trzeba przyznać, że jest doskonały wstęp do uzasadnienia celowości przeprowadzonych badań. Artykuł ten ponadto wskazuje jednoznacznie, że bez zaawansowanych badań podstawowych nie jest możliwe rozwiązanie problemu klinicznego, jakim niedokrwistość z niedoboru żelaza. Zawarte w niej informacje i przedstawione wyniki pozwalają jednak Recenzentowi na postawienie jeszcze jednego ogólniejszego pytania – czy anemia spowodowana niedoborem żelaza nie jest raczej problemem pourodzeniowym i próby jej przeciwdziałania w okresie przedurodzeniowym są skazane na niepowodzenie? A może żelazo jest tak toksycznym pierwiastkiem, że organizmy naturalnie ograniczają możliwość jego gromadzenia się w tkankach (w wątrobie), aby uniknąć negatywnych konsekwencji jego nadmiaru?

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Rafała Mazgaja ma bardzo wysoką wartość merytoryczną i poznawczą. Szeroki zakres przeprowadzonych badań, a przede wszystkim kompleksowe podejście do problemu i wykonanie eksperymentów na dwóch zupełnie różnych grupach badawczych w warunkach *in vivo* wymagało dużego nakładu pracy i zaangażowania Doktoranta. Poza wszelką dyskusją jest także aplikacyjność uzyskanych wyników. O dużej wartości naukowej uzyskanych przez Doktoranta wyników świadczy ich opublikowanie w czasopiśmie o bardzo dobrych wskaźnikach bibliometrycznych i światowym zasięgu.

### **Wniosek końcowy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Rafała Mazgaja pt. „**Studies on the regulation of iron homeostasis during pregnancy using mouse (*Mus musculus*) and pigs (*Sus scrofa*) models**” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu o dopuszczenie mgr. Rafała Mazgaja do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Ze względu na wysoką wartość



przedstawionych w rozprawie wyników, aplikacyjność pracy oraz wysokie parametry bibliometryczne publikacji stanowiących podstawę rozprawy wnioskują o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr. Rafała Mazgaja.