

Prof. dr hab. Marek Pieszka

Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa

Instytutu Zootechniki w Balicach k/Krakowa

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Xiuying Wang** pt.: „Profilaktyczny efekt doustnej suplementacji Sucrosomial® Iron w zapobieganiu niedokrwistości z niedoboru żelaza wcześniaków: badania na nowym eksperymentalnym prosięcym modelu wcześniaczym” wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu pod kierunkiem Prof. dr hab. Rafała Radosława Starzyńskiego.

Wprowadzenie do tematyki pracy:

Żelazo jest jednym z najważniejszych metali podtrzymujących życie, zwłaszcza w okresie szybkiego wzrostu i rozwoju niemowląt. Większość żelaza w organizmie jest związana z hemoglobiną w czerwonych krwinkach (RBC), białkami magazynującymi żelazo (takimi jak ferrytyna i hemosyderyna) w wątrobie oraz mioglobina w tkance mięśniowej. Anemia u prosiąt w okresie neonatalnym jest zaburzeniem, które w zróżnicowanym natężeniu występuje powszechnie u prosiąt wszystkich ras, niezależnie od sposobu żywienia macior i systemu utrzymania prosiąt w okresie przed odsadzeniem od matek. Na podstawie charakterystycznych zmian parametrów czerwonych krwinek, anemię tę zakwalifikowano jako niedobarwliwa (obniżenie stężenia hemoglobiny w erytrocytach), mikrocytowa (zmniejszenie objętości erytrocytu), a więc anemię typową dla niedoboru żelaza. Pierwsze symptomy anemii u nowo narodzonych prosiąt pojawiają się wcześnie - w pierwszym tygodniu po urodzeniu. Stężenie hemoglobiny we krwi, które jest jednym z najbardziej miarodajnych wskaźników anemii, waha się u anemicznych prosiąt w granicach od 8 g/dL (umiarkowana anemia) do 4 g/dL (ostra anemia pociągająca za sobą zwiększoną śmiertelność prosiąt). Typowymi zewnętrznymi objawami przewlekłej anemii u prosiąt związanej z niedoborem żelaza są: wolniejszy wzrost, apatia, szorstkie włosy, pomarszczona skóra, brak apetytu oraz najbardziej charakterystyczna bledność błon śluzowych. Anemiczne prosięta charakteryzują się niższą liczbą leukocytów we krwi, wykazują większą podatność na infekcje bakteryjne i wirusowe.

Ciąża jest okresem akumulacji żelaza w wątrobie płodów. Prosięta rodzą się z niewielkimi zapasami żelaza zgromadzonymi podczas życia płodowego. Zawartość całkowitego żelaza u nowo narodzonych prosiąt wynosi zaledwie 40 mg, a jego stężenie w tkankach wolnych od tłuszczu około 29 ppm. Są to ilości niewielkie zarówno w stosunku do osobników dorosłych, jak i w porównaniu z noworodkami innych gatunków zwierząt gospodarskich, a także człowieka. Zawartość żelaza w sianie i mleku maciory jest bardzo niska; wynosi odpowiednio około 2 i 1 ppm. Przyczyny tak niskiej zawartości nie są znane. Głównym białkiem wiążącym żelazo w sianie i mleku jest laktoferryina. Jest to białko o niezwykle silnym powinowactwie do jonów żelaza, nawet w warunkach obniżonego pH. Poprzez silne wiązanie żelaza laktoferryina ogranicza dostęp tego mikroelementu dla mikroorganizmów chorobotwórczych. W sianie i mleku wysycenie laktoferryiny jonami żelaza wynosi około 30%. Utrzymanie niskiego poziomu żelaza i wysokiej rezerwy apolaktoferryiny w sianie i w mleku, mające na celu ograniczenie proliferacji bakterii, może mieć dla prosięcia większe znaczenie niż zaspakajanie w pełni jego zapotrzebowania na żelazo. W wyniku zmian hodowlanych nowonarodzone prosięta coraz częściej charakteryzują się niską masą okołourodzeniową (częstsze zjawisko wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu płodu - IUGR). Próby kompensacji wzrostu masy noworodków doprowadzają do niedorozwojów systemowych, w tym do pogłębienia anemii oraz problemów z przyswajalnością jonów żelaza z przewodu pokarmowego. Anemia u prosiąt, zwłaszcza u wcześniaków, jest problemem wynikającym z niedoboru żelaza, który jest kluczowy dla produkcji czerwonych krwinek. Prosięta rodzą się z ograniczonymi zapasami żelaza, a w warunkach chowu zamkniętego, gdzie nie mają dostępu do gleby, ich naturalne źródło tego pierwiastka jest ograniczone.

Suplementacja prosiąt żelazem jest powszechnie stosowaną praktyką we wczesnej fazie ich odchowu. Ma na celu dostarczenie żelaza na bieżące potrzeby związane przede wszystkim z intensywnym przebiegiem erytropoezy. Stosuje się dwa główne sposoby podawania preparatów żelaza prosiętom – parenteralnie, drogą iniekcji domięśniowej oraz *per os* w postaci dodatku do paszy. Ze względu na wielkość deficytu żelaza u nowonarodzonych prosiąt dominuje suplementacja parenteralna w postaci iniekcji domięśniowej, polegająca na jedno- lub dwurazowym wprowadzeniu do organizmu dużej ilości żelaza w formie dekstranu żelaza w celu osiągnięcia szybkiego i skutecznego efektu profilaktycznego lub terapeutycznego. Całkowita ilość podanego żelaza waha się od 200 do 400 mg Fe/prosię. Żelazo podane w tej ilości skutecznie koryguje występującą u prosiąt anemię lub zapobiega anemii u prosiąt, u których anemia jeszcze się nie rozwinęła. Czas 1 -szej iniekcji z reguły przypada na 3 dzień

życia prosiąt. Wyniki niektórych dotychczasowych badań dowodzą, że stosowana rutynowo parenteralna suplementacja prosiąt żelazem w trakcie ich odchowu, chociaż skuteczna z punktu widzenia uzupełniania niedoboru żelaza, ingeruje niekorzystnie w procesy fizjologiczne związane z gospodarką jonami żelaza, natomiast wyłączna suplementacja prosiąt *per os* preparatami żelaza podanymi w odpowiedniej ilości do paszy począwszy od 5 dnia życia pociąga występowaniu anemii na tle niedoboru żelaza. Konsekwencją niedoboru żelaza u prosiąt jest obniżona odporność, zwiększone upadki, zmniejszone przyrosty oraz wydłużenie okresu odchowu, co negatywnie wpływa na opłacalność produkcji. Natomiast dzieci, które przychodzą na świat zbyt wcześnie, zwłaszcza te z bardzo małą (< 1500 g) i ekstremalnie małą (< 1000 g) urodzeniową masą ciała są niestety znacznie bardziej narażone na choroby, wpływające na ich długofalowy stan zdrowia i przyszły rozwój. Jedną z chorób o charakterze przewlekłym jest niedokrwistość wcześniaków. Niedokrwistość, inaczej zwana anemią, ujawnia się często w momencie urodzenia lub w pierwszych dniach życia i może trwać wiele tygodni czy miesięcy. Jej przyczyna to przede wszystkim niedostateczne zasoby żelaza, jakie dziecko uzyskało w życiu płodowym. Związane jest to z faktem, że aż ⅔ całej puli żelaza, jaką płód otrzymuje od matki, przypada na ostatni trymestr ciąży. W związku z tym noworodek przedwcześnie urodzony ma we krwi mały zapas żelaza.

Anemia jest procesem rozwijającym się przy braku podaży żelaza i/lub braku wytwarzania hemoglobiny przez niedojrzały lub niesprawny układ krwionośny. Dlatego konieczne jest podawanie preparatów, które zawierają ten pierwiastek. Wyniki te świadczą o tym, że dotychczasowe procedury uzupełniania niedoboru żelaza u prosiąt, pozornie optymalne, wymagają modyfikacji opartej na najnowszej wiedzy z zakresu molekularnej regulacji homeostazy żelaza u ssaków w okresie neonatalnym. Doustne podawanie żelaza jest najprostszą i najbardziej opłacalną interwencją mającą na celu zmniejszenie niedoboru żelaza. Jednak doustne podawanie żelaza zazwyczaj wiąże się ze słabą absorpcją i biodostępnością, a także potencjalnymi działaniami niepożądanymi, takimi jak zahamowanie wchłaniania mikroelementów, zaburzenie równowagi mikrobioty jelitowej, dolegliwości żołądkowo-jelitowe, nudności, biegunka, zaparcia i zachorowalność noworodków. Aby rozwiązać ten problem, opracowano nowe formułacje żelaza o powolnym uwalnianiu, takie jak chelatowane, mikrokapsułkowane związki żelaza. Związki te mogą zwiększać wchłanianie żelaza i zmniejszać działania niepożądane, zapobiegając kontaktowi żelaza z błoną śluzową jelit. Sucrosomial® Iron (SI) to innowacyjny doustny preparat żelaza, w którym pirofosforan żelaza jest otoczony dwuwarstwą fosfolipidową i macierzą sucresterową (sacharozą). Matryca

fosfolipidowa chroni żelazo przed kwaśnym płynem żołądkowym, umożliwiając nienaruszone dotarcie SI do błony śluzowej jelita.

Podjęte przez Panią mgr Xiu Wang badania stanowią naukowy krok do wyjaśnienia problemu statusu żelaza u wcześniaków ludzkich na modelu wcześniaków prosięcych.

Postawione cele przez autorkę badań zostały w pełni zrealizowane poprzez: Opracowanie modelu późnego wcześniactwa u ludzi z wykorzystaniem prosiąt urodzonych przez cesarskie cięcie; porównanie statusu żelaza u prosiąt urodzonych przedwcześnie i prosiąt donoszonych; ocenę skuteczności doustnej suplementacji SI u prosiąt przedwcześnie urodzonych, ze szczególnym uwzględnieniem jej wpływu na ogólnoustrojową homeostazę żelaza i kolonizację mikrobiomu przewodu pokarmowego oraz porównanie skuteczności doustnej suplementacji SI u prosiąt przedwcześnie urodzonych z doustnym „złotym standardem” suplementem FeSO_4 .

Rozprawa doktorska mgr Xiuying Wang

Ocena formalna pracy:

Podstawą do ubiegania się o dopuszczenie do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia nauk rolniczych, stanowi, przedłożone przez Autorkę opracowanie, które obejmuje 114 stron maszynopisu, zawierające omówienie 3 oryginalnych prac naukowych oraz ich kserokopie. W 3 wymienionych poniżej pracach, doktorantka jest pierwszym autorem. Spis cytowanej literatury obejmuje 289 dobrze dobranych pozycji.

1. Wang Xiuying, Lipiński Paweł, Ogłuszka Magdalena, Starzyński Radosław Rafał (2025). Iron status and risk of iron disorders in neonates: A narrative review of recent studies in animal models. *Nutrition Research Reviews* 1-14. doi: 10.1017/S0954422425000034
2. Wang Xiuying, Lenartowicz Małgorzata, Mazgaj Rafał, Ogłuszka Magdalena, Szkopek Dominika, Zaworski Kamil, Kopec Zuzanna, Żelazowska Beata, Lipiński Paweł, Woliński Jarosław, Starzyński Rafał Radosław (2024). Preterm Piglets Born by Cesarean Section as a Suitable Animal Model for the Study of Iron Metabolism in Premature Infants. *International Journal of Molecular Sciences* 25, 11215. <https://doi.org/10.3390/ijms252011215>
3. Wang Xiuying, Lipiński Paweł, Ogłuszka Magdale, Rafał Mazgaj, Jarosław Woliński, Szkopek Dominika, Dominika Zaworski Dominika, Kopec Zuzanna, Żelazowska Beata, Tarantino Germano, Brillie Elisa, Starzyński Rafał Radosław

(2025). Oral supplementation with Sucrosomial® Iron improves the iron status of preterm piglets delivered by cesarean section. *Food and Function*, 16: 3525-3541.

Recenzent nie zgłasza zastrzeżeń do układu pracy. Rozprawa zawiera wszystkie elementy jakie powinny znaleźć się w opracowaniu tego typu.

Materiał i metody:

Wszystkie procedury eksperymentalne zostały zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie (WAW2/125/2021). W tym eksperymencie wykorzystano sześć loch rasy polskiej białej zwislouchej: trzy do uzyskania wcześniaków i trzy do uzyskania prosiąt donoszonych. W 109. dniu ciąży u trzech loch wykonano cesarskie cięcie w celu urodzenia wcześniaków. Uzyskano 24 wcześniaki obojga płci. Nasuwa się pytanie: w której ciąży były lochy? Jaka była średnia masa prosiąt przy urodzeniu? Podobnie odnośnie prosiąt urodzonych o czasie: jaka była ich liczebność i masa urodzeniowa.

Odnosnie diety loch, jaka była zawartość żelaza w paszy i poziom najważniejszych składników pokarmowych mieszanki paszowej: białka ogólnego, tłuszczu surowego oraz zawartość najważniejszych aminokwasów: lizyny, metioniny, treoniny, tryptofanu, waliny, leucyny, izoleucyny, fenyloalaniny, histydyny i argininy? Proszę o przedstawienie różnic w składzie mleka kobycego a mlekiem loch.

Dobór technik i sprzętu analitycznego został właściwie dobrany. Przykładowo, wskaźniki RBC i retikulocytów oraz parametry żelaza w osoczu zostały oznaczone za pomocą analizatora hematologicznego. Stężenie żelaza w osoczu i całkowitą zdolność wiązania żelaza (TIBC) oznaczano metodą kolorymetryczną. Stężenie ferrytyny w osoczu oznaczano za pomocą zestawu ELISA dedykowanych dla świń. Stężenia hepcydyny-25, erytropoetyny, erytroferronu, czynnika różnicowania wzrostu 15 (GDF15) i IL-6 w osoczu oznaczono ilościowo za pomocą komercyjnych zestawów ELISA. Poziomy białka C-reaktywnego (CRP), malondialdehydu i 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG) wykorzystano komercyjne zestawy ELISA. Analizę PCR w czasie rzeczywistym wykonano za pomocą systemu izolacji całkowitego RNA SV (Promega, Madison, WI, USA). Pomiaru poziomu białka błonowego (DMT1 i FPN) i cytozolowego (łańcucha lekkiego ferrytyny (LFT) i łańcucha ciężkiego ferrytyny (HFT) wykonano metodą Western blot. Analizę różnorodności mikrobiologicznej z treści jelita grubego prosiąt wykonano poprzez całkowitą ekstrakcję DNA, następnie amplifikację PCR, oczyszczanie produktów, konstrukcję biblioteki i sekwencjonowanie przeprowadzono zgodnie z standardowym protokołem BGI.

Obliczenia statystyczne

Analiza statystyczna została właściwie przeprowadzona. Dane z dnia 0 po urodzeniu (PND0) poddano analizie statystycznej za pomocą niezależnych testów t (SPSS Statistics 26, IBM, Armonk, NY, USA). Dane z dnia 11 po urodzeniu (z wyłączeniem prosiąt przedwcześnie urodzonych podawanych FeSO₄) przeanalizowano metodą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), uwzględniając sposób porodu (donoszony poród naturalny i przedwczesny przez cesarskie cięcie), dietę (z lub bez suplementacji SI) oraz interakcje między nimi jako źródła zmiennych (SPSS).

Wyniki i ich omówienie

Sekcja wyników została bardzo dobrze udokumentowana i zebrana na 12 stronach w postaci tekstu zawierającego 5 tabel, 6 wykresów i 1 fotografię, co zasługuje na szczególne wyróżnienie. Przejrzysta i logiczna prezentacja wyników rzutuje bardzo pozytywnie na całość rozprawy doktorskiej. Pełne teksty artykułów wchodzących w skład dysertacji zostały dołączone do manuskryptu pracy.

Za najważniejsze wyniki rozprawy uważam:

1. Opracowanie wiarygodnego, zwalidowanego zwierzęcego modelu wcześniactwa na modelu świni odzwierciedlającego ogólnoustrojowy metabolizm żelaza u wcześniaków.
2. Zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA hepcydyny w wątrobie u wcześniaków w porównaniu do prosiąt donoszonych, co świadczy o transkrypcyjnym wpływie hepcydyny na poziom żelaza w wątrobie.
3. Eksperyment ten potwierdził niski poziom żelaza u wcześniaków i podkreślił znaczenie suplementacji żelaza u wcześniaków z niedoborem żelaza. Stwierdzono, że doustne podawanie SI łagodzi negatywne skutki zaburzeń równowagi żelaza spowodowane wcześniactwem.
4. Uzyskane wyniki wskazują na istotne zaburzenia rozwojowe mikrobioty wcześniaków. Suplementacja SI sprzyjała namnażaniu się bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i sprzyjało wzrostowi bakterii z rodzaju *Limosilactobacillus*, *Leyella* i *Segatella* u wcześniaków lub prosiąt donoszonych.

Dyskusja jest precyzyjnie napisana i została podzielona na podrozdziały odnoszące się do poszczególnych wyników badań. Rozprawę doktorską kończą trzy poprawnie sformułowane wnioski.

Nasuwa się jednak kilka dodatkowych pytań, które byłyby warte wyjaśnienia:

1. Jakie przesłanki skłoniły Panią do wyboru komercyjnego preparatu Sucrosomial® Iron do suplementacji wcześniaków? Dlaczego wybrano taką formę preparatu żelazowego? a nie np. formę liposomalną?
2. Proszę o wyjaśnienie najważniejszych problemów wchłaniania żelaza u noworodków wraz z ich konsekwencjami?
3. Proszę o wyjaśnienie różnicy we wchłanianiu żelaza we wczesnym okresie po urodzeniu u prosiąt ras szlachetnych w porównaniu do osesków dzika?

Wniosek końcowy:

Reasumując należy uznać, że praca doktorska pani mgr Xiuying Wang jest pracą naukową o charakterze poznawczym. Praca została zredagowana i napisana w poprawnej formie, zgodnie z kanonami obowiązującymi przy pisaniu tego rodzaju opracowań. Odnosząc się do zakresu przedstawionych informacji należy uznać, że Doktorantka posiada dużą wiedzę w zakresie badanej tematyki naukowej. Posiada również umiejętność prawidłowego doboru i wykorzystania warsztatu badawczego. Wskazane w recenzji uchybienia są przede wszystkim sugestiami mający podnieść wartość opracowania i zwiększyć jakość prezentowanych wyników. Mając na uwadze wysoką jakość badań, dojrzałość naukową Doktorantki, jak i potencjał aplikacyjny wyników rozprawy doktorskiej nie ma wątpliwości, że przedstawiona rozprawa mgr Xiuying Wang pod tytułem „Profilaktyczny efekt doustnej suplementacji Sucrosomial® Iron w zapobieganiu niedokrwistości z niedoboru żelaza wcześniaków: badania na nowym eksperymentalnym prosięcym modelu wcześniaczym” spełnia wszystkie wymagania określone dla rozpraw doktorskich w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu o dopuszczenie Pani mgr Xiuying Wang do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Balice, 12 sierpnia, 2025 r.

Prof. dr hab. Marek Pieszka