Lublin, dn. 26 listopada 2018 r.

Prof. zw. dr hab. n. med. Mirosław Jabłoński
Katedra i Klinika Rehabilitacji i Ortopedii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ LEK. WET. NATALII BURMAŃCZUK
WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYNARYJNEJ
UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO W LUBLINIE
PT. "EFEKT DZIAŁANIA KWASU 2-OKSOGLUTAROWEGO NA METABOLIZM TKANKI KOSTNEJ W WARUNKACH PERINATALNEGO PODAWANIA DEKSAMETAZONU U ŚWINI DOMOWEJ"

(PROMOTOR: PROF. DR HAB. N. WET. EWA TOMASZEWSKA, PROF. NADZW.
PROMOTOR POMOCNICZY: DR HAB. N. MED. TOMASZ BLICHARSKI)

ZLECONA PRZEZ DZIEKANA WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ
PISMEM W.DZ. 531-52015-2016 Z DNIA 7.11.2018 R., ZGODNIE Z UCHWAŁĄ
RADY WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO
W LUBLINIE Z DNIA 26 KWIETNIA 2018 R.

Rozprawa doktorska lek. wet. Natalii Burmańczuk pt. „Efekt działania kwasu 2-oksoglutarowego na metabolizm tkanki kostnej w warunkach perinatalnego podawania deksametazonu u świni domowej" posiada zwykły układ, który rozpoczynają skróty zastosowane w pracy, a po czym następuje rozdział I. Wprowadzenie str. 7-25, II. Cel i uzasadnienie badań str. 26, III. Materiał i metody str. 27-37, IV. Rezultaty str. 38-71, V. Dyskusja 72-91, Wnioski, Piśmiennictwo, Wykaz rysunków i figur, Spis tabel oraz Streszczenie w językach polskim i angielskim - str. 112-115. Oprawiony wolumin komputerowo wydrukowanej pracy liczy115 ponumerowanych stron, w tym 2 rysunki, 16 figur i 18 tabel.

W rozdziale I – Wprowadzenie, autorka przedstawia wybrane zależności procesów adaptacyjnych okresu prenatalnego, koncentrując się na prawidłowym rozwoju i na ocenie dojrzewania funkcjonalnego narządów i układów życiowo ważnych, w tym układów kostnego, pokarmowego i oddechowego. W kontekście oddziaływania endogennych glikokortykoidów, jak również działania tych hormonów podawanych egzogennie, wskazuje na użyteczność glikokortykoidów podawanych również ciężarnym kobietom w stanach zapalnych i chorobach układu immunologiczno-reumatoidalnych, jako leków nie do zastąpienia podobnie jak w sytuacji zaburzeń po przeszczepienie organów. Wskazuje, że steroidy są również stosowane w praktyce pediatrycznej, między innymi w leczeniu wszelkich chorób płuc, astmy czy reumatoidalnego zapalenia stawów, a także są podawane wcześniakom z niedojrzałością płuc. „Wielopoziomowe"

działania glikokortykosteroidów w warunkach długotrwałego stosowania terapeutycznego mogą i prowadzą zwykle do wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu, jak również są przyczyną spowolnienia wzrastania po urodzeniu.

W podrozdziale 1. doktorantka przedstawia wybrane elementy tzw. programowania prenatalnego, wskazując na rolę glikokortykosteroidów. Zwraca uwagę również na słuszność hipotezy prenatalnej etiologii szeregu chorób okresu dorosłego, w tym chorób metabolicznych, takich jak dysfunkcja metabolizmu lipidów i węglowodanów, anoreksji bądź też innych zaburzeń ogólnoustrojowych. Przestawia, że w doświadczeniach nad prenatalnym programowaniem powszechnie stosowany jest model z zastosowaniem egzogennych glikokortykosteroidów. Ciężarnym samicom podaje się wówczas deksametazon lub betametazon. Skutki takiego działania są ciągle intensywnie badane na modelach zwierzęcych z wykorzystaniem m. in. małp rezus, królików, szczurów, myszy, kawii domowej, owiec i świń. Badania na szczurach poddanych działaniu deksametazonu przez cały okres ciąży lub tylko przez ostatni jej tydzień wykazały obecność tzw. „specyficznych okienek czasowych" w okresie prenatalnym. Poddając płód takiemu działaniu wyzwala się konkretne efekty uwidaczniające się w okresie pourodzeniowym. Liczne badania z udziałem świni domowej pokazały, że najbardziej wrażliwym okresem właśnie u tego gatunku jest czas między 70. a 90. dniem ciąży.

Podrozdział 2. odnosi się do programowania prenatalnego postnatalnej homeostazy tkanki kostnej. Autorka krótko wprowadza czytelnika w zależności metabolicznej kości, odnosi się również do „klasyki", czyli prawa Delpecha-Wolffa z końca XIX wieku odnośnie formowania kształtu przez czynności kości. Zwraca uwagę na układ liganda receptorowego aktywatora czynnika jądrowego RANKL, odkryty z końcem XX wieku, który steruje patologią i fizjologią kości w różnych sytuacjach, m. in. w osteoporozie pomenopauzalnej, reumatoidalnym zapaleniu stawów, nowotworach kości, chorobie Pageta i chorobach naczyń krwionośnych. Pod koniec tego podrozdziału doktorantka odnosi się do kości, jako materiału i struktury ciała stałego sprężystego, płynnie przechodząc do zmian chorobowych występujących u prosiąt, które dotyczą najczęściej kości udowych i ramiennych, co jest uznanym metodyczno-modelowym wzorcem badań nad układem kostnoszkieletowym tych zwierząt.

Podrozdział 3 omawia wpływ glikokortykosteroidów na tkankę kostną, wskazując w podsumowaniu na anaboliczne mechanizmy i niekorzystny wpływ tych hormonów na tkankę kostną. Za typowego przedstawiciela tej grupy leków stosowanego do badania nad układem kostnym, doktorantka uważa dekasmetazon.

Podrozdział 4 odnosi się do znaczenia glutaminy w procesach fizjologicznych i tu doktorantka wskazuje, że glutaminy i jej pochodne, takie jak glutaminian, w oparciu o badania z końca XX i początku XXI wieku, mogą przeciwdziałać zahamowaniu wzrostu wynikającemu z ujemnego bilansu azotu w organizmie w następstwie stanów stresowych, niedożywienia, a także słabo zbilansowanej diety. Następnie pisze, iż podobne do glutaminy zachowuje się prekursor, kwas 2-oksoketoglutanowy, zwany inaczej kwasem alfa-ketoglutarowym (AKG). Substancja ta nie wykazująca właściwości toksycznych i powszechnie występująca w organizmach kręgowców jest kluczowym związkiem pośrednim wielu szlaków metabolicznych, m. in. cyklu Krebsa. Następnie autorka zwraca uwagę, że ok. 20% aminokwasów wchodzących w skład prokolagenów to prolina i hydroksyprolina. Suplementacja kwasu 2-oksoketoglutarowego powoduje wzrost zawartości w/w aminokwasów w mięśniach szkieletowych, stymulując procesy ich wzrostu. Autorka wskazuje na fakt, iż w wyniku pokarmowej suplementacji kwasu 2-oksoketoglutarowego u prosiąt od momentu narodzin do odsadzenia nastąpiło zwiększenie masy kości długich, poprawa ich właściwości mechanicznych i zwiększenie mineralizacji. Ponadto związek ten zwiększa grubość chrząstki stawowej, zapobiegając tym samym destrukcyjnemu działaniu deksametazonu. Związek ten wykazał więc w przeciwieństwie do deksametazonu działanie anaboliczne i ochronne na komórki tkanki chrzęstnej jak i kostnej. W odniesieniu do badań biochemicznych kwas α-ketoglutarowy zwiększył istotnie zawartość insulinopodobnego czynnika wzrostu, zmniejszając niekorzystny efekt prenatalnego działania glikokortykosteroidów.

Długotrwała suplementacja tą substancją zwiększyła ekspresję osteokalcyny w płytce wzrostowej i beleczkach kostnych, jednocześnie zmniejszając jej ekspresję w chrząstce stawowej. Pod koniec tego podrozdziału, doktorantka wskazuje jednak na brak satysfakcjonujących danych odnośnie wpływu glutaminy lub α-ketogluteranu na perinatalne formowanie struktury kości noworodków świń, poddanych działaniu glikokortykosteroidów. Stwierdza dalej, że podjęcie badań nad takimi działaniami jest uzasadnione tak poznawczo, jak praktycznie.

W rozdziale II, cele i uzasadnienie badań są sformułowane jasno i wartościowo jako weryfikację hipotezy o możliwości eliminacji lub łagodzenia skutków ubocznych stosowania maksymalnych terapeutycznych dawek glikokortykosteroidów u ciężarnych macior, a następnie u ich potomstwa w okresie neonatalnym. Substancją przeciwdziałającą niekorzystnemu działaniu deksamentazonu w tym modelu byłby kwas α-ketoglutarowy.

Rozdział III to Materiał i metody. Badania były prowadzone na prosiętach rasy Wielka Biała Polska, urodzonych naturalnie przez poród waginalny, które były utrzymywane z matkami i żywione naturalnie przez własne matki. Do badania włączono zdrowe i pozbawione wad wrodzonych prosięta, przebywające w standardowych warunkach hodowlanych. Maciory przez okres doświadczenia miały wolny dostęp do wody i były żywione dwa razy dziennie standardową mieszanką przeznaczoną dla macior ciężarnych i laktujących. Doświadczenie obejmowało okres 60 dni: okres 25 dni ciąży, od 90. dnia do momentu porodu, oraz pierwsze 35 dni życia pourodzeniowego prosiąt. Wszystkie prosięta w miocie w momencie narodzin były ważone i oddzielone zgodnie z płcią, bez alokacji między miotami. Liczba macior użytych w doświadczeniu wynosiła 7, prosiąt 36. Nowonarodzone prosięta zostały zważone bezpośrednio po narodzeniu i przed pobraniem siary. Następnie prosięta, ważono codziennie do 35. dnia życia w celu określenia dawek 2-Ox i deksametazonu. W 35. dniu życia neonatalnego, od prosiąt została pobrana krew do jej wykrzepienia w probówkach, a następnie odwirowana w celu otrzymania surowicy. Następnie prosięta wszystkich grup zostały zważone i poddane eutanazji przez dożylną iniekcję pentobarbitalu. Materiał biologiczny obejmujący kończyny miedniczne, klatkę piersiową oraz surowicę krwi został zabezpieczony po przeprowadzonym doświadczeniu przez zamrożenie w temperaturze -80°C. Badania wykonano w latach 2005-2008 w gospodarstwie Doświadczalnym w Czesławicach należącym do ówczesnej Akademii Rolniczej w Lublinie zgodnie ze zgodą nr 1105 wydaną przez II Lokalną Komisję Etyczną w Lublinie. Zaplanowanie i wykonanie badań oraz analiz składających się na przedkładaną rozprawę doktorską nie było związane z wykorzystaniem żywych zwierząt. W okresie prenatalnym i postnatalnym wyróżnić można grupy: kontrolną zwierząt (n=3), badawczą (n=4), przy czym przez ostatnie 25 dni ciąży macior osobniki kontrolne otrzymywały płyn fizjologiczny w stosownej objętości domięśniowo, zaś badawczej – deksametazon (dex) – 8 mg-4 ml roztworu na maciorę. W okresie postnatalnym w knurki n=6, loszki n=6, jako kontrola i w równej liczbie grupa badawcza, otrzymywały deksametazon i deksametazon oraz α-ketoglutaran (2-Ox), podawany doustnie. Badano obie kości udowe a także żebra od 5 do 8 włącznie. Po usunięciu tkanek miękkich wszystkie wyizolowano i zważono oraz zmierzono ich długość, a następnie ponownie zamrożono do czasu wykonania dalszych badań (-80°C). Charakterystyki biomechaniczne kości przeprowadzono przy pomocy maszyny wytrzymałościowej Zwick Z010 (Zwick GmbH & Comapany KG, Ulm, Niemcy) z użyciem testu trójpunktowego. Test zginania przeprowadzono przy rozstawie podpór 40% całkowitej długości kości. Obciążenie zadawano z szybkością 10mm/min w płaszczyźnie przednio-tylnej aż do złamania. Aparatura rejestrowała krzywą siła-wychylenie, a następnie z uzyskanych danych określano parametry wytrzymałościowe kości, a mianowicie maksymalną siłę sprężystą i siłę łamiącą. Osteometrię kości wykonano z użyciem techniki tomografii komputerowej i wyliczano na tej podstawie średnicę poziomą i pionową (zewnętrzna i wewnętrzną) przekroju poprzecznego środkowej części kości w okolicy złamania. Z odpowiednich wzorów wyliczano następnie moment bezwładności wtórnej, wskaźnik korowo-trzonowy, średnie grubości kości oraz pole poprzecznego przekroju. Dane te posłużyły następnie do kolejnych przekształceń i uzyskiwania

stosownych parametrów biomechanicznych. Gęstość mineralną kości korowej i gąbczastej oceniano z użyciem ilościowej tomografii komputerowej (Somatom Emotion, Siement AG, Berlin, Niemcy), wykonując skany pomiarowe co 2 mm. Gęstość mineralną kości beleczkowej kości udowej w strefie mineralizacji (Tb) określano tuż poniżej chrząstki wzrostowej kości udowej a gęstość mineralną kości zbitej w środkowej części trzonu (Tz). Pomiar został wyrażony w g/cm^3. Planarna gęstość mineralną i zawartość mineralną w kości badano z użyciem densytometru Discovery (Hologic Inc., Bedford, MA, USA). Pomiaru dokonano dla całych kości. Ocenę histologiczną kości beleczkowej wykonano w oparciu o próbki pobierane z obszaru kłykcia bocznego z przekrojów strzałkowych, tak aby otrzymać próbkę przynasady i nasady. Te próbki utrwalano standardowo przez 48h w 4% roztworze zbuforowanej formaliny (pH 7,0), a następnie wypłukano w wodzie bieżącej przez 12 h. Po demineralizacji w 10% roztworze zbuforowanego EDTA (pH 7,4) zatapiano w standardowych warunkach w parafinie w temperaturze 50°C. Tak uzyskane bloczki parafinowe krojono przy pomocy mikrotomu HM 360 (Microm, Walldorf, Niemcy) na skrawki o grubości 4µm. Preparaty następnie barwiono metodą trójchromową Goldnera, aby ocenić chrząstkę wzrostową. Histomorfologię wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego AXIOVERT 200M (Carl Zeiss, Jena, Niemcy) z laserową głowicą skanującą LSM 5 PASCAL oraz zautomatyzowanym mikroskopem polaryzacyjnym Olimpus BX63 wyposażonym w kamerę Olympus UC50. Zdjęcia analizowano za pomocą programu do analizy graficznej obrazu Cellsens Optimus. Określono następujące parametry kości beleczkowej: udział objętościowy kości beleczkowej w tkance kostnej, grubość beleczek kostnych, wielkość przestrzeni międzybeleczkowej, liczbę beleczek kostnych ($1/mm^2$), wielkość przestrzeni międzybeleczkowej w stosunku do objętości kości. Określono również liczbę jamek kostnych na mm^2 beleczki (z obszaru nasady i przynasady), średnią powierzchnię jamki kostnej (μm^2) oraz całkowitą powierzchnię jamek kostnych w przeliczeniu na mm^2 beleczki. Chrząstkę wzrostową analizowano mierząc grupę stref spoczynkowej, proliferującej, hipertroficznej oraz mineralizacji. Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie reakcji immunohistochemicznych pod kątem ekspresji osteokalcyny w chrząstce wzrostowej i beleczkach kostnych. Do tych reakcji wykorzystano odparafinowane skrawki. Antygenowość uzyskano przez trawienie z zastosowaniem proteinazy K (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA) w 37°C, następnie skrawki płukano trzykrotnie w buforze TBS (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA), inkubowano przez 30 min. w 3% roztworze nadtlenku wodoru i metanolu (1:1) w celu zablokowania aktywności endogennej peroksydazy. Następnie skrawki inkubowano przez 60 min. z 5% surowicą bydlęcą (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA) oraz przez całą noc z pierwszym przeciwciałem w temperaturze pokojowej. Jako pierwsze przeciwciało zastosowano mysie przeciwciało monoklonalne do osteokalcyny (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania, rozcieńczone 1:100). Następnie preparaty inkubowano przez 30 min. z drugim przeciwciałem tj. biotynylowaną immunoglobuliną antymysią (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania, rozcieńczone 1:200). Sekcje kontroli negatywnej dla przeciwciała otrzymano przez identyczne barwienie immunohistochemiczne z wykluczeniem pierwszorzędowego przeciwciała, które zastąpiono TBS. Do wizualizacji reakcji posłużył układ odczynników, w skład którego wchodziły biotynylowane kozie przeciwciało (Goat polyclanol to Rabbit IgG, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) sprzężone ze streptawidyną (Streptavidin/HRP DakoCytomation, DakoCytomation A/S, Glostrup, Dania) oraz DAB+ (roztwór (roztwor chromogenu 3,3'-diaminobenzydyny oraz bufor imidazol-HCl, pH 7,5, zawierający nadtlenek wodoru oraz czynnik przeciwbakteryjny) jako barwnik (DakoCytomation A/S, Glostrup, Dania). Dla każdego osobnika wykonano 5 oznaczeń, które sfotografowano w celu dokumentacji oraz dalszej analizy. Ekspresję osteokalcyny opisano w osteocytach beleczkowych oraz w płytce wzrostowej. Jądro brązowe uznano za dodatnią, negatywną – jądro niebieskie. Kolejnym zadaniem badawczym była ocena zawartości hormonu wzrostu, kortyzolu, leptyny, insuliny oraz insulinopodobnego czynnik wzrostu typu I w surowicy krwi. Badania wykonano z użyciem testu immunoenzymatycznego ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wykorzystując komercyjne zestawy przeznaczone do oznaczeń w surowicy krwi świń

(GenAsia Biotech Co. Ltd., Szanghaj, Chiny). Testy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, wykorzystując do odczytu spektrofotometryczny czytnik mikropłytek Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) wyposażony w oprogramowanie Microplate Manager Software wersja 5.2.1. Analizę stężenia kostnej frakcji fosfatazy zasadowej (BAP, Bone Alkaline Phosphatase)i osteokalcyny w surowicy krwi przeprowadzono przy pomocy testu ELISA w oparciu o komercyjne zestawy przeznaczone do oznaczeń w surowicy krwi świń (GenAsia Biotech Co.Ltd., Szanghaj, Chiny). Testy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, wykorzystując do odczytu spektrofotometryczny czytnik mikropłytek Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories,Inc., Hercules, CA, USA). W surowicy krwi określono poziom całkowitego cholesterolu, triacylogliceroli (TG), lipoprotein wysokiej gęstości (HDL), lipoprotein niskiej gęstości (LDL), mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, białka ogólnego, albumin, glukozy, fosfatazy alkaicznej oraz transaminaz wątrobowych – asparaginowej (ASpaT) i alaninowej (AlaT) metodą fotokolorymetryczną. Analiz dokonano w oparciu o komercyjne zestawy enzymatyczne (BioMaxima, Lublin, Polska), wykorzystując bioanalizator Vitalab Flexor (AVL List GmbH, Graz, Austria). Stężenia wybranych mikro- i makroelementów takich jak sód, magnez, fosfor, siarkę, wapń, żelazo, miedź oraz cynk określono w surowicy krwi metodą spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS) przy użyciu spektrometru Ed 2000 (Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, Wielka Brytania). Analizowano z użyciem metody chromatografii jonowymiennej przy użyciu aparatu do automatycznej analizy aminokwasów INGOS AAA-400 (INGOS s.r.o., Praga, Czechy) poziomy wybranych aminokwasów w surowicy krwi. Surowicę krwi poddano odbiałczaniu przy pomocy 6% kwasu salicylowego, a następnie odwirowano w wirowce (12000 rpm przez 15 minut). Aminokwasy rozdzielono w systemie jednokolumnowym na kolumnie wypełnionej żywicą OSTION LG FA z zestawem buforów litowo-cytrynianowych o pH 2,9; 3,1; 3,35; 4,05 i 4,9. Badane aminokwasy poddano reakcji barwnej z ninhydryną, natomiast ich identyfikacja odbyła się na podstawie czasów retencji. Rozdział aminokwasow kwaśnych i zasadowych przeprowadzono odpowiednio w temperaturze 38 °C i 60 °C. Wyniki poddano ocenie statystycznej z użyciem programu Statistica 12.0 (Statistica Inc., Rockville, MD, USA). Wszystkie wyniki przedstawiono w postaci średnich wartości z odchyleniami standardowymi. Badane parametry porównano między grupami przy pomocy testu HSD Tukeya. Jako poziom statystycznej istotności przyjęto wartość $p < 0,05$.

Pomiary mas ciała badanych zwierząt wykazały, że masa urodzonych przez maciory poddane działaniu deksametazonu w czasie ciąży były istotnie niższe od grupy kontrolnej niezależnie od płci. Masa ciała knurków w grupie dex/2-Ox+dex w wieku 35 dni była istotnie niższa w porownaniu do masy ciała knurkow w grupie kontrolnej i dex/2-Ox, w której knurki osiągnęły najwyższą masę ciała. Podobne zmiany zaobserwowano u loszek. Masa i długość kości udowej knurków były istotnie najniższe w grupie dex/2-Ox+dex, cięższe i dłuższe kości stwierdzono w grupie kontrolnej i dex/2-Ox. Gęstość i zawartość mineralna określone dla całej kości udowej knurków bądź tylko dla części dystalnej oraz Tz i Tb były również istotnie najniższe w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe w grupie kontrolnej i najwyższe w grupie dex/2-Ox.

Najniższą wartość parametrów wytrzymałościowych, wtórnego momentu bezwładności oraz pola przekroju poprzecznego stwierdzono w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe wartości w grupie kontrolnej i najwyższe w grupie dex/2-Ox. Wartość średniej względnej grubości ścian trzonu (MRWT) była najniższa w grupie kontrolnej i różniła się istotnie statystycznie od wartości stwierdzonej w grupie dex/2-Ox. Wartość wskaźnika korowo-trzonowego (CI) nie różniła się między grupami. Gęstość mineralna określona dla całej kości udowej loszek, zawartość mineralna części dystalnej oraz Tz były istotnie najniższe w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe wartości stwierdzono w grupie kontrolnej i najwyższe w grupie dex/2-Ox. Zawartość mineralna kości określona dla całej kości udowej przedstawiała się podobnie. Najniższą istotnie wartość parametrów wytrzymałościowych, wtórnego momentu bezwładności oraz pola przekroju poprzecznego trzonu stwierdzono w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe w grupie kontrolnej i najwyższe w grupie dex/2-Ox. Wartości średniej

względnej grubości ściany trzonu (MRWT) i CI nie różniły się między grupami. Podobne zależności stwierdzono dla kości udowych knurków. Zależności badań osteometrycznych, wytrzymałościowych żeber tak loszek jak i knurków przedstawiały się podobnie jak kości udowych. Ocena histologiczna kości beleczkowej wykazała, że procentowa zawartość kości beleczkowej i grubość beleczki była najmniejsza w grupie dex/2-Ox+dex, większa w grupie dex/2-Ox oraz największa w grupie kontrolnej. Przestrzeń międzybeleczkowa była najmniejsza w grupie kontrolnej, większa w grupie dex/2-Ox i największa w grupie dex/2-Ox+dex. Najmniejszą liczbę beleczek stwierdzono w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do grupy kontrolnej i grupie dex/2-Ox. Wielkość przestrzeni międzybeleczkowej w stosunku do objętości kości była najmniejsza w grupie grupie dex/2-Ox+dex, większa w grupie grupie dex/2-Ox i największa w grupie kontrolnej. Podobnie przedstawiały się te zależności w kości udowej knurków. Z podstawowej analizy histomorfometrycznej jamek kostnych wynika, że najmniejszą istotnie liczbę jamek kostnych na obszarze 1 mm^2 stwierdzono w grupie dex/2-Ox+dex, większe ilości były w grupie kontrolnej i dex/2-Ox. Mniejszą średnią powierzchnię jamki kostnej stwierdzono w grupie kontrolnej w porównaniu do pozostałych grup. Jednak całkowita powierzchnia jamek kostnych była najmniejsza w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do powierzchni stwierdzonych w grupie kontrolnej i dex/2-Ox. Ocena histomorfometryczna kości beleczkowej w nasadzie kości udowej loszek pokazała, że procentowa zawartość kości beleczkowej i grubość beleczki była najmniejsza w grupie dex/2-Ox+dex, większa w grupie dex/2-Ox oraz największa w grupie kontrolnej. Przestrzeń międzybeleczkowa była najmniejsza w grupie kontrolnej, większa w grupie dex/2-Ox i największa w grupie dex/2-Ox+dex. Najmniejszą liczbę beleczek stwierdzono w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do grupy kontrolnej i grupy dex/2-Ox. Wielkość przestrzeni międzybeleczkowej w stosunku do objętości kości była najmniejsza w grupie grupie dex/2-Ox+dex, większa w grupie grupie dex/2-Ox i największa w grupie kontrolnej. Ocena histomorfometryczna kości beleczkowej w przy nasadzie kości udowej loszek pokazała, że procentowa zawartość kości beleczkowej była największa w grupie kontrolnej w porównaniu do pozostałych grup. Grubość beleczki była najmniejsza w grupie dex/2-Ox+dex, większa w grupie dex/2-Ox oraz największa w grupie kontrolnej. Wielkość przestrzeni międzybeleczkowej była najmniejsza w grupie kontrolnej i odpowiednio odwrotnie zac howywała się jak procentowa zawartość kości beleczkowej. Najmniejszą liczbę beleczek stwierdzono w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox. Z podstawowej analizy histomorfometrycznej jamek kostnych wynika, że liczba jamek kostnych na obszarze 1 mm^2 i ich średnia powierzchnia nie różniły się między grupami. Jednak całkowita powierzchnia jamek kostnych była najmniejsza w grupie kontrolnej i różniła się istotnie od wielkości tej powierzchni stwierdzonej w grupie dex/2-Ox. Ocena histomorfometryczna chrząstki wzrostowej kości udowej knurków wykazała, że grubość strefy I była istotnie najmniejsza w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox. Grubość strefy II była istotnie większa w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do pozostałych grup. Grubość strefy III była najmniejsza w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do grubości stwierdzonej w grupie kontrolnej i dex/2-Ox, zaś grubość strefy IV nie różniła się istotnie między grupami.

Ocena zawartości wybranych hormonów IGF-I i poziomu markerów obrotu kostnego w surowicy krwi wskazała, że stężenie hormonu wzrostu było najniższe u knurków z grupy dex/2-Ox+dex, większe w grupie dex/2-Ox i największe w grupie kontrolnej. Stężenie IGF-I było istotnie niższe w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do stężenia IGF-I określonego w grupie kontrolnej i dex/2-Ox. Stężenie leptyny było istotnie wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu do grup prosiąt poddanych działaniu prenatalnemu deksametazonu, niezależnie od neonatalnego podawania 2-Ox. Aktywność kostnej frakcji fosfatazy zasadowej była istotnie niższa w grupie kontrolnej w porównaniu do pozostałych grup. Stężenie osteokalcyny było istotnie najniższe w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox. Stężenie insuliny było najwyższe w grupie kontrolnej w porównaniu do pozostałych grup. Stężenie kortyzolu było istotnie najniższe

w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe stężenia stwierdzono w grupach kontrolnej i dex/2-Ox. Stężenie hormonu wzrostu i IGF-I było istotnie niższe u loszek z grupy dex/2-Ox+dex w porównaniu do ich stężeń stwierdzonych w grupie kontrolnej i dex/2-Ox. Stężenie leptyny było istotnie wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu do grup prosiąt poddanych działaniu prenatalnemu deksametazonu, niezależnie od neonatalnego podawania 2-Ox. Aktywność kostnej frakcji fosfatazy zasadowej była istotnie niższa w grupie kontrolnej w porównaniu do pozostałych grup. Stężenie osteokalcyny było istotnie najniższe w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe w grupie kontrolnej i najwyższe w grupie dex/2-Ox. Stężenie insuliny było najwyższe w grupie kontrolnej w porównaniu do pozostałych grup. Stężenie kortyzolu było istotnie najniższe w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe w grupie dex/2-Ox i najwyższe w grupie kontrolnej.

Badania nad wybranymi stężeniami mikro- i makroelementów w surowicy krwi prosiąt wykazały iż stężenie sodu, magnezu, fosforu, siarki, wapnia i żelaza nie różniło się istotnie między poszczególnymi grupami. Stężenie miedzi i cynku w surowicy krwi knurków w grupie dex/2-Ox+dex było istotnie niższe w porównaniu do stężeń stwierdzonych w grupie kontrolnej i dex/2-Ox. Podobnie w grupie loszek stężenie sodu, magnezu, fosforu, siarki, wapnia i żelaza nie różniło się istotnie między poszczególnymi grupami. Stężenie miedzi i cynku w surowicy krwi loszek w grupie dex/2-Ox+dex było istotnie niższe w porównaniu do stężeń stwierdzonych w grupie kontrolnej i dex/2-Ox.

Poziomy wybranych aminokwasów w surowicy krwi knurków przedstawiają się następująco. Poziom asparaginy i kwasu glutaminowego był istotnie wyższy w surowicy krwi knurków, które otrzymywały 2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom glutaminy i seryny był istotnie najniższy w grupie kontrolnej, wyższy w grupie dex/2-Ox i najwyższy w grupie dex/2-Ox+dex. Poziom glicyny i proliny był istotnie wyższy w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do pozostałych grup. Poziom alaniny był istotnie wyższy w grupach suplementowanych 2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom cytruliny nie różnił się między grupami. Analiza poziomów aminokwasów egzogennych wykazała, że poziom waliny, metioniny, izoleucyny, histydyny i argininy nie różnił się między grupami. Zaś poziom leucyny i lizyny był istotnie wyższy w grupach doświadczanych w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom tryptofanu był istotnie wyższy w grupie dex/2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox+dex. W grupie knurków poziom asparaginy, kwasu glutaminowego, glutaminy i seryny był istotnie wyższy w surowicy krwi tych zwierząt, które otrzymywały 2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom seryny był istotnie najniższy w grupie kontrolnej, wyższy w grupie dex/2-Ox i najwyższy w grupie dex/2-Ox+dex. Poziom glicyny był istotnie wyższy w grupie dex/2-Ox+dex i dex/2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom proliny i alaniny był istotnie wyższy w grupie dex/2-Ox+dex w porównaniu do pozostałych grup. Poziom cytruliny nie różnił się między grupami. Analiza poziomów aminokwasów egzogennych wykazała, że poziom waliny i metioniny był istotnie wyższy w grupach doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną. Poziom izoleucyny i argininy nie różnił się między grupami. Poziom leucyny, lizyny i histydyny był istotnie wyższy w grupach doświadczanych w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom tryptofanu był istotnie wyższy w grupie dex/2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox+dex.

Ocena podstawowych parametrów biochemicznych w surowicy krwi prosiąt, informuje że stężenie cholesterolu, triacylogliceroli, HDL, mocznika, kwasu moczowego, białka ogólnego i albumin nie różniło się istotnie między grupami. Stężenie LDL i kreatyniny było istotnie wyższe w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie glukozy oraz aktywność ASpaT i AlaT istotnie wzrosły w grupie dex/2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox+dex. Aktywność fosfatazy alkalicznej była istotnie wyższa w grupie dex/2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej. U loszek stężenie triacylogliceroli, mocznika, kwasu moczowego, białka ogólnego i albumin nie różniło się istotnie między grupami. Stężenie HDL i kreatyniny było istotnie wyższe w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie LDL było najwyższe w grupie dex/2-Ox+dex, niższe w grupie kontrolnej i najniższe

w grupie dex/2-Ox. Stężenie glukozy było istotnie najniższe w grupie dex/2-Ox+dex, wyższe w grupie kontrolnej i najwyższe w grupie dex/2-Ox. Aktywność ASpaT i AlaT istotnie wzrosła w grupie dex/2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox+dex. Aktywność fosfatazy alkalicznej była istotnie wyższa w grupie dex/2-Ox w porównaniu do grupy kontrolnej i dex/2-Ox+dex. Ocena ekspresji osteokalcyny w chrząstce wzrostowej i beleczkach kostnych wykazała, że najbardziej widoczną reakcję immunohistochemiczną potwierdzającą dużą ekspresję OCN w chrząstce wzrostowej stwierdzono w grupie kontrolnej u obu płci prosiąt w wieku 35 dni. Reakcja była widoczna głownie w chondrocytach w strefie proliferacyjnej i w niewielkiej liczbie komórek w strefie hipertroficznej. Silną reakcję w porównaniu do reakcji obserwowanej w grupie dex/2-Ox+dex i słabszą w porównaniu do reakcji obserwowanej w grupie kontrolnej niezależnie od płci stwierdzono w chondrocytach obu omawianych stref w grupie knurków i loszek poddanych działaniu dex/2-Ox. Strefy spoczynkowa i kostnienia były również wolne od reakcji. W odniesieniu do osteocytów kostnych, najsilniejszą reakcję zaobserwowano w grupie kontrolnej. Bardzo słabą reakcję lub jej brak stwierdzono w większości osteocytów w grupie dex/2-Ox+dex, niezależnie od płci. Dobrze widoczną reakcję stwierdzono również w wielu osteocytach w beleczkach kostnych w grupie dex/2-Ox, również niezależnie od płci.

W bogatej dyskusji zawartej na 21 stronach, Autorka słusznie zwraca uwagę na wieloprzyczynowość etiologii różnych chorób okresu postnatalnego ssaków. Akcentuje, iż w medycynie ludzkiej od dawna łączy się występowanie zaburzeń metabolicznych z nieprawidłowym rozwojem organizmu w okresie płodowym. Zwraca tez uwagę na kierunek przyczyn programowania osteopenii i osteoporozy czy niskiej masy kostnej w okresie prenatalnym. Podkreśla, że jedynie badania na zwierzętach mogą stanowić model przybliżenia tych fascynujących naukowo zjawisk. Powszechność stosowania glikokortykoidów w różnych sytuacjach klinicznych, jak wskazywa wstępie mocno uzasadnia takie badania. Przy okazji oceny działania deksametazonu akcentuje bardzo zróżnicowane jego efekty anatomiczne w odniesieniu do stosowanych dawek oraz ich trybu podania hormonu. Zwraca również uwagę, iż ta sama substancja wywiera różny skutek w zależności od płci. Własne badania doktorantki wykazały obniżenie średniej masy urodzeniowej zarówno płci żeńskiej jak i męskiej świń w grupie deksametazonowej przy czym odnotowała większą masę knurków niż loszek. Pewien wpływ ochronny w tym aspekcie wywarła suplementacja 2-Ox. Obserwowane anaboliczne i kataboliczne działanie tej substancji pozostaje zgodne z wcześniejszymi innymi obserwacjami. Autorka rozprawy zwraca więc uwagę na skutek tego prekursora glutaminy w suplementacji żywieniowej oraz samej glutaminy w organizmie. Podobnie obserwowano również zmiany w badanym modelu rozwoju kości długich, a obserwowany schemat zmian długości kości w grupie dex/2-Ox był zgodny z tym obserwowanym dla mas ciała i stwierdzono spadek masy kości udowych o 35% u knurków i ok. 38% u loszek, jak i ich skrócenie średnio o 11% i 15%, odpowiednio u knurków i loszek.

W grupie, której podawano po urodzeniu 2-Ox, odnotowano znaczy wzrost masy ciała. Nie był on jednak odpowiedni do zmiany w masach kości knurków. Analiza długości koście nie wskazywała, aby zwierzęta mimo większej masy ciała i cięższej kości była znacząco wyższe, gdyż zmianę stwierdzono jedynie dla kości udowej i wynosiła ona 3%. Wyraźniejszy efekt anaboliczny 2-Ox w tym układzie doświadczalnym stwierdzono u loszek, których masa kości istotnie wzrosła średnio o 22%, a długość kości udowej wzrosła blisko o 4%.

Badania densytometryczne wykazały osteopenię, jako skutek podawania deksametazonu. Największe spadki tych parametrów, czyli BMD i BMC, wystąpiły w grupie dex/2-Ox+dex. Ubytki masy kostnej zaobserwowane u loszek w badaniu planarnym miały stosowne odzwierciedlenie w badaniu QCT. U samic najbardziej podatna na zmiany okazała się kość udowa, gdzie największą redukcję gęstości mineralnej stwierdzono w obszarze kości zbitej, wynoszącą 12%. Na podstawie danych z piśmiennictwa Autorka zauważyła, że osteoporoza posteroidowa u mężczyzn ma mniejsze nasilenie

niż u kobiet. Podobne też obserwacje poczyniła w doświadczeniu własnym. Przy czym większy efekt ochronny 2-Ox wystąpił u samców.

Analiza pierwiastków w surowicy krwi nie odzwierciedlała tych zmian anatomicznych. Stwierdzono głównie zmiany zawartości miedzi i cynku, pierwiastków, które wpływają przede wszystkim na proces syntezy kolagenu. Brak różnic stężenia wapnia i fosforu doktorantka tłumaczy zachowanymi fizjologicznymi mechanizmami kompensacyjnymi utrzymującymi homeostazę organizmów badanych zwierząt. Rozważania doktorantki w oparciu o literaturę, dostępne piśmiennictwo a odnoszące się do szkieletu osiowego i obwodowego i rytmu tego rozwoju, wskazują iż płeć i rasa nie determinują osiąganej masy kostnej. Wykonane doświadczenie dotyczyło zwierząt urodzonych w jednym sezonie- w lecie. Trudno więc porównać różnice między miotami urodzonymi w różnych porach roku. Autorka odnotowała podobnie jak wyniki badań densytometrycznych, wyniki badań wytrzymałości mechanicznej badanych kości, a 2-Ox wykazał słaby efekt anaboliczny w grupie zwierząt poddanych glikokortykoidowemu programowaniu perinatalnemu. Większy spadek maksymalnej siły elastycznej obserwowano w grupie loszek w porównaniu do knurków. Podobnie zachowywały się właściwości mechaniczne żeber, a osłabienie było wyższe. Podawany 2-Ox wykazał efekt antyosteoporotyczny, co okazało się w badaniach histomorfometrycznych kości.

Ocena formowania kości na podstawie struktury histologicznej kości wykazała, że deksametazon zaburza proces ten proces. Stwierdzono obniżony poziom proliny w surowicy zwierząt poddanych działaniu deksametazonu oraz glicyny, glutaminy i glutaminianu. Może to pośrednio świadczyć o obniżeniu syntezy kolagenu, wskazując pośrednio, ze ubytek tkanki kostnej nie musiał być związany jedynie ze spadkiem jej mineralizacji, co zaobserwował wcześniej Dobrowolski i współautorzy. Ostatecznie autorka w dyskusji konkluduje, że podawanie 2-Ox w okresie neonatalnym i postnatalnym prosiętom pozostającym pod wpływem prenatalnego działania deksametazonu zapobiega utracie masy kości, istotnie poprawia parametry mechaniczne i geometryczne kości, zmniejsza, a nawet odwraca niekorzystne odziaływanie glikokortykoidu.

Rozważania na temat analizy profili aminokwasów egzogennych i endogennych w surowicy krwi w wykonanym doświadczeniu prowadzą do wniosku, że szereg zmian w ich stężeniach może wynikać nie tylko z samego podania 2-Ox, ale wzajemnie przenikających się zależności w szlakach metabolicznych tych aminokwasów i katabolicznego działania przy zastosowaniu glikokortykosteroidów. W podsumowaniu dyskusji doktorantka stwierdza, że otrzymane wyniki są zgodnie w swojej istocie z wynikami innych badań i potwierdzają możliwość prenatalnego programowania rozwoju kości przez czynniki hormonalne, podobnie jak i noworodkową lub poporodową modyfikację poprzez funkcjonalne odżywianie. Przeprowadzone badanie stało się okazją do poszerzenia wiedzy nie tylko o skutkach ubocznych glikokortykoterapii w stosunku do procesów metabolicznych i rozwoju układu kostnego, a także pozwoliło na poznanie innych niż dotychczas znanych efektów suplementacji 2-Ox w porównaniu do poprzednich badań. Prawdopodobnie ze względu na wiele rożnych szlaków metabolicznych w jakich bierze udział 2-Ox istnieje możliwość występowania specyficznych m echanizmów regulacyjnych działania tej substancji. Przedstawione obserwacje mogą zdaniem autorki mieć zastosowanie u dzieci i młodzieży.

Przeprowadzone badania pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie hipotezy postawionej w celu pracy i na tej podstawie sformułowanie następujących wniosków:

1. Podawanie w okresie neonatalnym 2-Ox prosiętom urodzonym przez maciory otrzymujące deksametzon w wysokich dawkach terapeutycznych (0,08 mg/kg m.c./48 h) od 90. dnia ciąży powoduje zwiększenie masy ciała nowonarodzonych prosiąt i masy badanych kości.

2. Podawanie 2-Ox w okresie neonatalnym prosiętom zmniejsza negatywne efekty prenatalnej ekspozycji na wysokie dawki terapeutyczne (0,08 mg/kg m.c./48 h) w odniesieniu do ekspresji osteokalcyny w kości beleczkowej i chrząstce wzrostowej oraz ogranicza rozwój zmian osteopenicznych w kościach długich.
3. W przypadku łącznego podawania 2-Ox z deksametazonem (1mg/kg m.c./24h; i.m.) w okresie neonatalnym prosiętom urodzonym przez maciory otrzymujące deksametzon w wysokich dawkach terapeutycznych (0,08 mg/kg m.c./48 h) od 90. dnia ciąży, prekursor glutaminy nie zredukował znacząco skutków ubocznych działania GK o czym świadczy masa ciała prosiąt, masa i długość kości oraz ich geometria, wyniki testów wytrzymałościowych i densytometrycznych, analiza histomorfometryczna kości beleczkowej i struktury chrząstki stawowej oraz ocena ekspresji osteokalcyny.

Nieliczne niedostatki redakcyjne, jak brak wielkich liter po kropkach na końcu zdania np. s.72, 79 nie wpływają na wartość naukową pracy.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani lek. wet. Natalii Burmańczuk uważam, że Autorka pracy posiadła wymaganą znajomość warsztatu metodycznego i potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy eksperymentalnej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość merytoryczną i praktyczną pracy oraz jej nowatorski charakter wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą zgodnie z kompetencjami Wysokiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani lek. wet. Natalii Burmańczuk pt. „Efekt działania kwasu 2-oksoglutarowego na metabolizm tkanki kostnej w warunkach perinatalnego podawania deksametazonu u świni domowej" odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz.U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. W dz. U. z 2015 r. poz. 249) i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Natalii Burmańczuk z wyróżnieniem do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
KATEDRY I KLINIKI REHABILITACJI I ORTOPEDII
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Mirosław Jabłoński