

Dr hab. med. Rafał Filip

Lublin, 20.08.2018 r.

Klinika Gastroenterologii

Z Ośrodkiem Kompleksowego Leczenia

Nieswoistych Chorób Zapalnych Jelit

Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2

im. Św. Jadwigi Królowej W Rzeszowie

Katedra Chorób Wewnętrznych

Wydział Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego

Ocena

rozprawy doktorskiej pt. **„PROGRAMOWANIE ROZWOJU UKŁADU SZKIELETOWEGO POTOMSTWA W DNIU ODSADZENIA ORAZ KOLEJNYCH ETAPACH ŻYCIA W WARUNKACH KONTYNUACJI NAWYKÓW ŻYWIENIOWYCH RODZICÓW I PO ICH ZMIANIE”** wykonanej przez lek. wet. Dariusza Józefa Wolskiego w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Pomimo, że w ostatnich latach coraz częściej pojawiają się doniesienia o nowych molekułach syntetyzowanych przez adipocyty o potencjalnym modulującym wpływie na metabolizm tkanki kostnej, jednakże wzajemne interakcje pomiędzy tkanką tłuszczową a szkieletem wciąż nie zostały dostatecznie poznane. Podobnie, brak jest również wiarygodnych danych naukowych opisujących wpływ nadmiaru kalorii w diecie ciężarnych na stan czynnościowy tkanki kostnej, czy też oceniających osteotropowe efekty modyfikacji żywienia organizmu w okresie jego rozwoju oraz w wieku dojrzałym. Zwłaszcza to drugie zagadnienie jest szczególnie interesujące, zwłaszcza z punktu widzenia tzw. teorii programowania rozwojowego, u podstaw której leży założenie, że każde zaburzenie w życiu płodowym może odgrywać istotną rolę w patogenezie schorzeń ujawniających się dopiero w wieku dojrzałym, włączając otyłość i zaburzenia metabolizmu kości.

Podstawowym celem pracy doktorskiej lek. wet. Dariusza Józefa Wolskiego była ocena wpływu rodzaju odżywiania (dieta standardowa vs wysokoenergetyczna) matek na rozwój układu szkieletowego potomstwa jak efektów jego oddziaływania w okresie postnatalnym. Dodatkowe cele badań koncentrowały się na odpowiedzi na pytania: czy zmiana diety u potomstwa, dotychczas stosowanej u rodziców wpływa modulująco na uprzednio programowany, oddziaływaniem żywieniowym, stan czynnościowy układu szkieletowego w kolejnych etapach życia oraz, czy kontynuowanie u potomstwa nawyków żywieniowych rodziców warunkuje utrwalenie programowanego wcześniej, oddziaływaniem żywieniowym, stanu czynnościowego układu kostnego?

Badania zostały przeprowadzone w 3 etapach. Etap I, trwający 90 dni, obejmował adaptację zwierząt do warunków laboratorium, a następnie wywołanie otyłości za pomocą diety wysokoenergetycznej. II etap, trwający łącznie do ok. 60 dni, obejmował czas potrzebny na uzyskanie potomstwa, okres ciąży oraz pierwsze 21 dni po porodzie. III etap, trwający do ok. 70 dni, obejmował czas obserwacji od odsadzenia tj. 21 dnia, do 90 dnia życia potomstwa.

Następne faza badań obejmowała analizę gęstości mineralnej (BMD), zawartości mineralnej (BMC), a także powierzchni (Ar) całego kośćca oraz izolowanych kości udowych i piszczelowych z wykorzystaniem metody podwójnej absorpcjometrii promieniowania rentgenowskiego (DXA). Z użyciem tej metody wykonane zostały również pomiary składu całego ciała, tj. tkanki mięśniowej (LM), jak i tłuszczowej (FM). Tomograficzna analiza kości udowych i piszczelowych wykonana została przy pomocy obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (PQCT). Izolowane kości udowe oraz piszczelowe poddane zostały również badaniu wytrzymałościowemu w oparciu o trójpunktowy test ugięcia dla próbki o przekroju rury. Analiza przeprowadzona została za pomocą specjalistycznego urządzenia do badań wytrzymałościowych a dla każdej kości oceniono siłę maksymalną (F max), moduł elastyczności Young'a (E mod) oraz pracę do siły maksymalnej (W/Fmax). Badania biochemiczne, w tym markery obrotu kostnego OC i CTX, oznaczono w oparciu o metodę spektrofotometryczną z użyciem komercyjnych testów diagnostycznych.

Przedstawiona do recenzji praca ma charakter oryginalnej rozprawy naukowej o układzie typowym dla tego typu opracowań. Liczy w sumie 106 stron wydruku komputerowego z zachowaniem odpowiednich proporcji między jej częściami. Na wstęp poświęcono 21 stron, materiał i metodyka stanowi 11 stron. Opis wyników zawarto na 39 stronach tekstu oraz udokumentowano je dodatkowo 11 rycinami oraz 20 tabelami, omówienie wyników i dyskusję zawarto na 20 stronach. Piśmiennictwo (zawarte w Rozdziale 9) liczy w sumie 222 pozycji, w tym w zdecydowanej większości anglojęzyczne o tematyce zbieżnej z zakresem pracy.

Pracę rozpoczyna *Wykaz używanych skrótów* stanowiący użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu.

Wstęp zawarty jest na stronach 8-29. Autor przedstawia w nim problematykę otyłości oraz zaburzeń metabolicznych tkanki kostnej w kontekście jakim stanowią obecnie zagrożenia zdrowotne o charakterze cywilizacyjnym. Na szczególne podkreślenie zasługują fragment opisujący wzajemne interakcje, w tym główne mechanizmy i główne mediatory, pomiędzy tkanką tłuszczową a szkieletem. Z wielką satysfakcją stwierdzam, że zawarte we *Wstępie* opisy stanowiące przegląd aktualnego piśmiennictwa, a zwłaszcza bardzo dokładne omówienie wyników przeprowadzonych dotychczas na świecie eksperymentów naukowych i ich znaczenia dla poszerzenia wiedzy na temat patogenezy zaburzeń metabolicznych, szczegółowo i krytycznie wprowadzają czytelnika w tematykę i mogą stanowić samodzielną pracę przeglądową na temat teorii programowania rozwojowego.

Zwięźle i jasno sformułowany *cel pracy* objął bardzo ambitne zadania nawiązujące do współczesnych problemów żywienia i chorób cywilizacyjnych, a zwłaszcza wpływu żywienia matek na stan zdrowia ich potomstwa. Zdaniem recenzenta dotyczą one bardzo ważnego wątku badań poszukującego naturalnych metod profilaktyki chorób dietozależnych, w tym przypadku otyłości i metabolicznych chorób kości. Bardzo ważnym wątkiem jest również istotnie poszerzenie wiedzy na temat roli tkanki tłuszczowej jako największego narządu endokrynnego rozwijającego się organizmu ssaka..

W rozdziale *Materiał i metody* Autor przedstawia zastosowany materiał oraz wykorzystane metody badawcze. Dokładnie został opisany sposób przeprowadzenia eksperymentu, metoda podziału zwierząt na grupy, warunki hodowlane oraz warunki zapłodnienia i rozrodu. Opisano również skład zastosowanych pasz oraz sposób żywienia zwierząt. W dalszej części Autor opisał metodę (tj. absorpcjometrię podwójnej wiązki

promieniowania rentgenowskiego - DXA) oraz warunki i sposób oznaczenia gęstości mineralnej tkanki kostnej i składu ciała. W podobny sposób przedstawiona została metodologia badań z zastosowaniem obwodowej tomografii komputerowej kości (pQCT) wraz z dokładnym opisem, w formie tabelarycznej, wszystkich parametrów tomograficznej oceny kośćca. Kolejny opis dotyczy sposobu wyznaczania parametrów wytrzymałościowych izolowanych kości udowych oraz piszczelowych w oparciu o trójpunktowy test ugięcia dla próbki o przekroju rury. Końcowe fragmenty rozdziału **Material i metody** przedstawiają listę i podstawowa charakterystykę wykonanych oznaczeń biochemicznych, w tym markerów obrotu kostnego. Generalnie, całość opisów postępowań metodycznych spełnia podstawowe wymagania stawiane współczesnym pracom badawczym, a wyniki świadczą o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i jego znajomości praktycznej.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników autor przeprowadziła przy użyciu programu STATISTICA 13.0 PL, a wybór testów należy uznać za odpowiedni dla tego typu badań.

W rozdziale **Wyniki** Autor prezentuje wyniki badań własnych w formie opisowej (39 stron) oraz odwołuje się do 16 tabel oraz 6 rycin.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów na modelu szczura autor wykazuje, że otyłość u szczurów indukowana dieta wysokokaloryczną, wpływa programująco na układ szkieletowy potomstwa, czego efektem jest poprawa właściwości strukturalnych, densytometrycznych oraz wytrzymałości mechanicznej kości udowych i piszczelowych. Jednakże wyniki kolejnej fazy eksperymentu wskazują, że zmiana diety z wysokoenergetycznej na standardową skutkuje znaczącym zahamowaniem rozwoju układu kostno-szkieletowego u samic i samców, szczególnie widocznym w okresie wzrostu i rozwoju organizmu (tj. w 49. dniu życia). Zależność ta była również widoczna po uzyskaniu przez zwierzęta dojrzałości somatycznej (90. dzień życia). III faza eksperymentu wykazała, że zastąpienie u potomstwa paszy standardowej, stosowanej u rodziców, dietą wysokoenergetyczną zwiększa stopień mineralizacji i wytrzymałość mechaniczną badanych fragmentów szkieletu samic szczura, trendu tego nie obserwowano u samców. Powyższe zależności uzależnione były od stopnia wzrostu i rozwoju młodych organizmów. Podsumowując, wyniki eksperymentów zasadniczo potwierdziły założone hipotezy badawcze. Biorąc pod uwagę możliwe duże znaczenie praktyczne w dietoprofilaktyce oraz dietoterapii chorób metabolicznych, za najistotniejsze uznałbym skuteczne połączenie nowoczesnych metod badania układu kostnego, uwzględniających ocenę jego gęstości mineralnej, jakości strukturalnej i wytrzymałości

mechanicznej na działanie sił obciążających oraz metod biochemicznej oceny wskaźników metabolizmu kostnego. Na podkreślenie zasługuje satysfakcjonujące przedstawienie graficzne wyników badań tj. dobra jakość rycin, przejrzystość i czytelność załączonych tabel oraz dobre opracowanie statystyczne uzyskanych wyników.

W *Dyskusji*, przeprowadzonej na 20 stronach, Autor skonfrontował swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób uwypuklił istniejące rozbieżności, co jest wykładnikiem krytycznego podejścia również i do własnej pracy, ale jednocześnie jest dowodem dogłębnej znajomości opisywanych zagadnień oraz dobrego opanowania warsztatu pisarskiego.

Wnioski. Wnioski opracowane zostały w konwencji 8 punktów, które są uogólnieniem obserwacji zebranych w trakcie realizacji pracy. Nawiązują one do postawionego celu pracy.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne wątpliwości oraz drobne uchybienia zauważone podczas czytania rozprawy.

1. Str. 17 (wstęp) W akapicie opisującym rolę makro- i mikroelementów w prawidłowym metabolizmie kości (w tym kolagenu kostnego), oprócz witamin. C, B i K, warto było wspomnieć również o jednym z metabolitów cyklu Krebsa tj. kwasie alfa-ketoglutarowym, który jest substratem dla produkcji w enterocytach proliny, jednego z głównych aminokwasów kolagenu kostnego.

2. Str. 24 W akapicie rozpoczynającym się od zdania „Niezwyczajnie istotny wpływ w metabolizmie tkanki kostnej odgrywa również witamina D₃. W przebiegu otyłości jej poziom ulega znaczącemu obniżeniu....” Autor dokładnie opisuje metaboliczne skutki niedoboru wit. D₃, jednakże zauważalny jest brak jakiegokolwiek wzmianki na temat przyczyn/mechanizmów prowadzących do niedoboru wit. D₃, a zwłaszcza jej aktywnych metabolitów, u osób otyłych (np. upośledzenie wątrobowej hydroksylacji w NAFLD/NASH).

3. Str. 27 Akapit dotyczący roli niedożywienia matki w promocji otyłości u jej potomstwa jest bardzo krótki, a sam opis niejasny. Z punktu widzenia ogółu zagadnień będących tematem dysertacji, warto by było to zagadnienie rozszerzyć, opisując przynajmniej podstawowe mechanizmy/zaburzenia leżące u podstaw tego zjawiska.

4. Str. 30 (Cel pracy) Krótkie wprowadzenie przed listą celów pracy jest w zasadzie powtórzeniem informacji zawartych wcześniej we *Wstępie* i nie wnosi nic nowego do dysertacji. Sugeruję usunięcie tego akapitu z pracy.

5. Str. 36 Dlaczego Rycinę 2 opisującą przyrosty masy ciała samic i samców otrzymujących dietę *S* oraz *F* umieszczono w rozdziale ***Materiał i metody***, a nie w rozdziale ***Wyniki***?

6. Str. 42 (Materiał i metody) [cytuję] „Wskaźniki metabolizmu tkanki kostnej oznaczone zostały w oparciu o metodę spektrofotometryczną oraz zestawy do oznaczeń tą metodą”. Opis zdecydowanie niewystarczający. Minimalne standardy w tym zakresie opracowaniach naukowych obejmują, oprócz metody oznaczeń, podania również producenta zestawów laboratoryjnych oraz ich czułości i swoistości. Podobnie, rozszerzenia wymagają również opisy metodologiczne badań: DXA i pQCT., które Autor z jakiegoś powodu umieścił w Dyskusji na stronach 92 i 94 (powinny być częścią rozdziału ***Materiał i metody***).

7. Str. 91 (Dyskusja) [cytuję] „Zatem badania nad mechanizmami regulującymi zmiany w masie kostnej u dzieci, oparte na wynikach uzyskanych na populacji osób dorosłych, mogą być obarczone dużym błędem”. Autorowi chodziło chyba o to, że wyniki badań nad mechanizmami regulującymi zmiany w masie kostnej przeprowadzone u dorosłych nie powinny być bezkrytycznie ekstrapolowane na dzieci?

8. Pomimo dość dokładnego przedstawienia przez Autora wzajemnych interakcji tkanka tłuszczowa – kości, brakuje jednak wzmianki o tradycyjnym podejściu tj. fizycznym oddziaływaniu zwiększonej masy ciała na szkielet (zjawisko piezoelektryczne w kościach). 2-3 zdania na ten temat poparte odpowiednimi referencjami powinny, zdaniem Recenzenta, znaleźć się we ***Wstępie*** lub w ***Dyskusji***.

9. Str. 100 [cytuję] „... analizowane parametry wytrzymałościowe były wyższe u potomstwa obu płci w wieku 21 dni pochodzącego od rodziców karmionych dietą wysokoenergetyczną, co przekłada się bezpośrednio na większą wytrzymałość materiału kostnego w porównaniu do potomstwa, którego rodzice otrzymywali dietę standardową. Przypuszczalnie wynika to z faktu, że ekspozycja na zwiększony dopływ substancji odżywczych w okresie płodowym, a następnie wpływ żywienia mlekiem matek otrzymujących dietę wysokoenergetyczną przyczynia się do intensywniejszej krystalizacji kryształów hydroksyapatytów oraz wzrostu ich całkowitej liczby” - wniosek ten jest zbyt spekulacyjny, zwłaszcza, że autor nie poparł go żadnymi referencjami. Istnieje wiele danych świadczących o tym, że przyczyn takiego stanu rzeczy można upatrywać w intensywniejszej syntezie kolagenu kostnego czy też bardziej efektywnej jego potranslacyjnej modyfikacji, co może być wynikiem lepszej dostępności potrzebnych aminokwasów, które w przypadku stosowania diety wysokoenergetycznej, nie były zużywane jako materiał energetyczny (np. dla enterocytów).

10. Str. 104 [cytuję] „ W warunkach nadmiernej kumulacji tkanki tłuszczowej u pacjentów diagnozowana jest nadczynność przytarczyc, często współistniejąca z normokalcemią, ale przy obniżonym stężeniu 25(OH)D3„. Wg Recenzenta, z medycznego punktu widzenia, to stwierdzenie nie odzwierciedla aktualnego stanu wiedzy i wymaga przeredagowania.

W Pracy pojawiło się również kilka drobnych błędów literowych i stylistycznych, jak na przykład:

Str. 3 (Opis stosowanych skrótów) [cytuję] „DXA – podwójna absorpcja wiązki promieniowania Rtg”. Powinno być DXA – podwójna absorpcjometria wiązki promieniowania Rtg. Skrót dotyczy metody pomiaru a nie zjawiska fizycznego.

Str. 5 [cytuję] „PGE2 – prostaglandyny z grupy 2”. Powinno być prostaglandyna E2. Litera oznacza rodzaj prostaglaniny, a cyfra liczbę wiązań nienasyconych w łańcuchu.

Str. 10 [cytuję] „... w zależności od miejsca lokalizacji”.

Str. 12 [cytuję] „... tkanka tłuszczowa podlega lokalizacji”.

Str. 29 [cytuję] „...Również wyniki badań prowadzonych na szczurach z kolei wyniki badań na szczurach nie wskazują jednoznacznego charakteru zmian...”.

Str. 84, 86, 89 błędy interpunkcyjne

Str. 85 [cytuję] „... główne źródło zapasu energii...”

Generalnie, poczynione uwagi mają charakter redakcyjny i nie wpływają na merytoryczną wartość ocenianej dysertacji, a mają na celu uniknięcie nieścisłości i powinny być uwzględnione przed oddaniem jej do druku.

Ocena końcowa

Rozprawa doktorska lek. wet. Dariusza Józefa Wolskiego jest wartościowym opracowaniem. Badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane w oparciu o adekwatne w stosunku do założonego celu metody badawcze. Autor wykazał się odpowiednią znajomością warsztatu metodycznego, potrafi tę umiejętność odpowiednio wykorzystywać w pracy eksperymentalnej, a otrzymane wyniki prawidłowo zinterpretować.

W zakończeniu przedkładanej recenzji stwierdzam iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Dariusza Józefa Wolskiego pt. ***PROGRAMOWANIE ROZWOJU UKŁADU SZKIELETOWEGO POTOMSTWA W DNIU ODSADZENIA ORAZ KOLEJNYCH ETAPACH ŻYCIA W WARUNKACH KONTYNUACJI NAWYKÓW ŻYWIENIOWYCH RODZICÓW I PO ICH ZMIANIE*** odpowiada warunkom określonym w Art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o tytule i stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej lek. wet. Dariusza Józefa Wolskiego i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie pragnę podkreślić zdecydowanie ponadprzeciętną pracowitość przeprowadzonych badań oraz duży potencjał aplikacyjny, dlatego też jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie recenzowanej dysertacji.

Rafał Filip

