

Prof. dr hab. Jarosław Całka
Katedra Fizjologii Klinicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UWM w Olsztynie

Olsztyn, 31.08.2022 roku

Recenzja

pracy doktorskiej lek. wet. Hanny Predki pt. „Ocena wpływu adropiny na metabolizm tkanki kostnej u szczurów w warunkach ustalonej osteopenii” wykonanej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem promotora dr hab. Iwony Puzio i promotora pomocniczego dr Marty Pawłowskiej-Olszewskiej.

Podstawa formalna:

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie prof. dr hab. Marty Konkofer z dnia 20.07.2022 roku powołujące się na uchwałę Rady Dyscypliny Weterynaria z dnia 30.06.2022 roku w sprawie powołania recenzentów pracy doktorskiej lek. wet. Hanny Predki.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 102 strony druku w tym: 2 ryciny, 12 wykresów i 13 tabel opracowanych według klasycznego schematu przyjętego i obowiązującego w przyrodniczych dyscyplinach naukowych. Rozprawę tworzą następujące rozdziały: Przegląd piśmiennictwa, Cel badań, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie (w języku polskim i angielskim) i Piśmiennictwo. Tekst rozprawy doktorskiej zamyka Spis skrótów użytych w tekście obejmujący 125 pozycji i znacząco ułatwiający czytanie opracowania ze zrozumieniem.

Przegląd piśmiennictwa obejmuje 22 strony tekstu i napisany jest rzeczowo i bardzo dobrym językiem. Dzięki temu wprowadzenie do tematu badań czyta się łatwiej, a jednocześnie świadczy to o bardzo dobrej znajomości literatury opisywanego zagadnienia

przez Doktorantkę. Przegląd piśmiennictwa zorganizowany jest w 10 podrozdziałach. W jego tekście cytowane są najistotniejsze pozycje piśmiennictwa dostępne w literaturze światowej w przedmiotowym temacie. Doktorantka zaczyna od opisu struktury, charakterystyki i występowania adropiny w organizmie. Następnie omawia znane czynniki wpływające na ekspresję genu *Enho* (ang. *Energy Homeostasis Associated Gene*) kodującego ekspresję adropiny (ADR). W kolejnych podrozdziałach opisuje wpływ ADR na homeostazę energetyczną organizmu, układ sercowo-naczyniowy i jej przeciwzapalne właściwości. W kolejnych sekcjach wstępu autorka opisuje fizjologię tkanki kostnej, komórki ją tworzące oraz ich rolę w stałym procesie przebudowy kości. Wstęp zamykają aktualne informacje na temat fizjologicznych i fizjopatologicznych uwarunkowań osteopenii i osteoporozy. Rozdział zamyka opis obecnego stanu wiedzy na temat osteoporozy pomenopauzalnej u kobiet. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że w związku z wydłużaniem życia ludzi w podeszłym wieku osteoporoza staje się znaczącym problemem medycznym.

W rozdziale **Cel badań** Doktorantka rzeczowo zdefiniowała istotę podjętego zadania badawczego. Polega ono na określeniu wpływu adropiny na metabolizm i właściwości tkanki kostnej u samic szczurów Wistar w warunkach ustalonej osteopenii wywołanej eliminacją funkcji hormonalnej gonad zabiegami owariektomi. Dodatkowo zadanie obejmowało immunocytochemiczną identyfikację adropiny w tkance kostnej doświadczalnych szczurów.

Materiały i metody zawierają opis procedury przeprowadzonej na zwierzętach w ramach doświadczenia. W dalszej części autorka opisała 7 metod badawczych wykorzystanych do analizy materiału biologicznego. Były to:

1. Analiza densytometryczna składu ciała szczurów oraz całkowitej gęstości i zawartości mineralnej kośćca oraz gęstości i zawartości mineralnej kości. W ramach procedury dokonano pomiaru:
 - masy tkanki tłuszczowej,
 - masy tkanek miękkich beztłuszczowych,
 - oceny całkowitej gęstości mineralnej kośćca,
 - całkowitej zawartości mineralnej kośćca.
2. Analiza tomograficzna kości udowych i piszczelowych. Badania tomograficzne tkanki kostnej gąbczastej przeprowadzono w przynasadzie dalszej kości udowej i przynasadzie

bliższej kości piszczelowej. Natomiast analizę tkanki kostnej zbitej i parametrów przekroju poprzecznego w połowie długości obu badanych kości.

Analiza przeprowadzona w połowie długości trzonów kości udowej i piszczelowej umożliwiła ocenę:

- całkowitej zawartości mineralnej kości,
- całkowitej gęstości mineralnej kości,
- zawartości mineralnej tkanki kostnej zbitej,
- gęstości mineralnej tkanki kostnej zbitej,
- całkowitej powierzchni kości,
- powierzchni tkanki kostnej zbitej,
- grubości tkanki kostnej zbitej,
- obwodu zewnętrznego kości,
- obwodu wewnętrznego kości.

Analiza przeprowadzona w przynasadzie dalszej kości udowych oraz kości piszczelowych w przynasadzie bliższej umożliwiła ocenę:

- całkowitej zawartości mineralnej kości,
- całkowitej wolumetrycznej gęstości mineralnej kości,
- zawartości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej,
- gęstości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej,
- całkowitej powierzchni kości,
- powierzchni tkanki kostnej gąbczastej.

3. Analiza parametrów mechanicznych kości udowych, piszczelowych i ramiennych wykonana z wykorzystaniem trójpunktowego testu ugięcia. Zastosowany test umożliwił ustalenie następujących parametrów wytrzymałościowych badanych kości:

- wartości siły łamiącej,
- stosunku pracy do siły łamiącej,

- modułu Younga.

4. Analiza histologiczna kości udowych podczas, której barwione hematoksyliną/eozyną preparaty histologiczne zostały poddane analizie morfometrycznej programem Micro Images, w celu ustalenia szerokości chrząstki wzrostowej wraz z podziałem na warstwę spoczynkową, proliferacyjną, hipertroficzną i wapniejącą.
5. Analiza lokalizacji adropiny w różnych obszarach tkanki kostnej metodą immunocytochemiczną.
6. Analiza biochemiczna krwi w ramach której określono stężenie glukozy, trójglicerydów, całkowitego cholesterolu, lipoprotein o wysokiej gęstości, lipoprotein o niskiej gęstości, wapnia i fosforu. Ponadto określono aktywność trzech istotnych dla problemu badawczego enzymów: fosfatazy zasadowej, aminotransferazy asparaginianowej i aminotransferazy alaninowej. Oznaczono także stężenie adropiny oraz markerów metabolizmu kostnego (osteokalcyny, N-końcowego usieciowanego telopeptydu kolagenu typu I i izoenzymu kostnego fosfatazy zasadowej).
7. Analiza statystyczna uzyskanych wyników.

Należy podkreślić, że zastosowana w pracy doktorskiej metodyka badawcza obejmuje wiele technik badawczych i pozwoliła Doktorantce na ocenę wielu parametrów medycznych. Recenzent bardzo pozytywnie ocenia mnogość zastosowanych testów ponieważ świadczy ona o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę i pozwoliła na głębszą analizę problemu badawczego.

Wyniki badań opisane na 23 stronach podzielonych na 8 podrozdziałów zawierają 2 ryciny, 12 wykresów i 13 tabel. Przeprowadzone analizy wykazały między innymi:

1. Po 12 tygodniach od ovariectomii wzrost masy ciała samic szczurów otrzymujących płyn fizjologiczny lub adropinę w porównaniu do grupy poddanej operacji rzekomej otrzymującej płyn fizjologiczny.
Największą długością kości piszczelowych cechowały się szczury ovariectomizowane otrzymujące adropinę, różnica długości była statystycznie istotna w stosunku do grupy poddanej operacji rzekomej otrzymujących adropinę.
Stwierdzono statystycznie istotnie więcej masy tkanki tłuszczowej w grupie ovariectomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny niż w grupie rzekomo ovariectomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny.

2. Statystycznie istotną najniższą wartość całkowitej gęstości mineralnej kości w stosunku do zwierząt poddanych rzekomej owariektomii cechowała się grupa owariektomizowana otrzymująca płyn fizjologiczny.

Statystycznie istotną najniższą wartość średnią zawartości mineralną kości piszczelowej w stosunku do pozostałych grup cechowały się zwierzęta owariektomizowane otrzymujące płyn fizjologiczny.

Wartości gęstości mineralnej kości piszczelowych szczurów grup rzekomo owariektomizowanych były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grup zwierząt owariektomizowanych.

Wyższą gęstość mineralną kości kręgosłupa (L5 – L6) u grup rzekomo owariektomizowanych w stosunku do grup owariektomizowanych. Obserwowano większą gęstość w grupie owariektomizowanej otrzymującej adropinę niż w grupie owariektomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny.

Najniższą zawartość mineralną kości kręgosłupa (L5 – L6) w grupie owariektomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny, która była statystycznie istotnie niższa w stosunku do wszystkich pozostałych grup.

Statystycznie istotną wyższą gęstością mineralną kości ramiennej w grupach rzekomo owariektomizowanych w stosunku do grup owariektomizowanych.

Statystycznie istotną wyższą zawartością mineralną kości ramiennej w grupach rzekomo owariektomizowanych w stosunku do grup owariektomizowanych.

Najniższą statystycznie istotną wartość zawartości mineralnej kości udowej w grupie owariektomizowanej i otrzymującej płyn fizjologiczny w stosunku do grup rzekomo owariektomizowanych.

Gęstość mineralna kości udowej szczurów w grupach owariektomizowanych była niższa niż w grupach rzekomo owariektomizowanych.

3.1 Badania kości gąbczastej przynasady dalszej kości udowej przeprowadzone z

wykorzystaniem tomografii komputerowej wykazały, że zabieg owariektomii spowodował statystycznie istotne obniżenie całkowitej zawartości mineralnej, całkowitej wolumetrycznej gęstości mineralnej, zawartości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej oraz gęstości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej u zwierząt owariektomizowanych w stosunku do tych podanych o gonadektomii rzekomej.

3.2 Badania tomograficzne tych samych parametrów przynasady bliższej kości piszczelowej ujawniły zmiany właściwości tej kości podobne do tych obserwowanych w przynasadzie kości udowej.

3.3 Brak istotnych statystycznie różnic w powierzchni tkanki kostnej zbitej i gęstości mineralnej tkanki kostnej zbitej mierzonych w połowie długości trzonu kości udowej między grupami owariektomizowanymi i poddanymi gonadektomii rzekomej.

Tkanka kostna zbita kości udowej szczurów poddanych rzekomej gonadektomii i traktowanych adropiną cechowała się istotnie statystycznie wyższą całkowitą zawartością mineralną kości, zawartością mineralną tkanki kostnej zbitej i grubością tkanki kostnej zbitej, natomiast grupa poddana gonadektomii i traktowana adropiną wyższymi wartościami całkowitej zawartości mineralnej kości, gęstości mineralnej tkanki kostnej zbitej i obwodem zewnętrznym kości w porównaniu z grupą gonadoktemizowaną traktowaną płynem fizjologicznym.

3.4 Samice szczurów poddanych rzekomej owariektomii oraz gonadektomii cechowały się wyższymi wartościami analizowanych parametrów tomograficznych z wyjątkiem obwodów wewnętrznych kości, w porównaniu do samic gonadoktemizowanych otrzymujących płyn fizjologiczny. Stwierdzono statystycznie istotną różnicę między grupami rzekomo owariektomizowaną otrzymującą adropinę, a grupą gonadoktemizowaną otrzymującą płyn fizjologiczny.

4. Najmniejszymi wartościami siły łamiącej oraz stosunku pracy do siły łamiącej wykazały się kości udowe szczurów gonadoktemizowanych otrzymujących płyn fizjologiczny. Były one istotnie statystycznie niższe w stosunku do pozostałych grup.

Podobnie w przypadku kości piszczelowych grupa owariektomizowana traktowana płynem fizjologicznym wykazała statystycznie istotną najniższą wartość siły łamiącej w stosunku do pozostałych grup.

Statystycznie istotne różnice wartości modułu Younga wykazano między grupą gonadoktemizowaną traktowaną płynem fizjologicznym i rzekomo owariektomizowaną otrzymującą adropinę. Analogicznie jak w przypadku kości udowej i piszczelowej najniższą wartość parametrów wytrzymałościowych kości ramiennych wykazano w grupie zwierząt gonadoktemizowanych traktowanych płynem fizjologicznym.

5. Badania immunocytochemiczne wykazały obecność adropiny wewnątrz jak i na zewnątrz chondrocytów we wszystkich strefach chrząstki wzrostowej badanych zwierząt. Ponadto ekspresję adropiny obserwowano w beleczkach kostnych nasady dalszej kości udowej zarówno wewnątrzkomórkowo jak i zewnątrzkomórkowo.

6. Badania histomorfometryczne chrząstki wzrostowej kości udowych wykazały największą szerokość całej chrząstki oraz jej strefy hipertroficzej w grupie rzekomo owariektomizowanej otrzymującej adropinę.

7. Najwyższe statystycznie istotne w stosunku do pozostałych grup stężenie adropiny w osoczu gupy owariektomizowanej otrzymującej adropinę.

Szczury z grup owariektomizowanych i traktowanych płynem fizjologicznym lub adropiną wykazały istotnie większe stężenie osteokalcyny w porównaniu do grup rzekomo owariektomizowanych. Najniższe istotnie stężenie osteokalcyny w porównaniu do grup gonadektomizowanych traktowanej płynem fizjologicznym lub adropiną wykazały zwierzęta grupy rzekomo owariektomizowanej traktowanej płynem fizjologicznym.

Szczurzyce grupy gonadektomizowanej i traktowanej płynem fizjologicznym wykazały najniższe stężenie izoenzymu kostnego fosfatazy zasadowej w osoczu w stosunku do pozostałych grup.

Najwyższe stężenie N-końcowego usieciowanego telopeptydu kolagenu typu I odnotowano w grupie samic gonadektomizowanych otrzymujących płyn fizjologiczny.

8. Badania biochemiczne osocza krwi ujawniły:

- wyższe stężenia całkowitego cholesterolu w grupach owariektomizowanych w porównaniu do grup rzekomo owariektomizowanych,
- istotnie wyższą zawartość trójglicerydów w stosunku do pozostałych grup w grupie gonadektomizowanej traktowanej płynem fizjologicznym,
- istotnie najwyższą aktywność fosfatazy alkalicznej w grupie samic owariektomizowanych otrzymujących płyn fizjologiczny,
- istotnie wyższą aktywność aminotransferazy alaninowej w grupie owariektomizowanej otrzymującej adropinę w stosunku do obydwu grup rzekomo owariektomizowanych,

- grupa rzekomo owarietomizowana traktowana adropiną wykazała statystycznie istotnie większe stężenie fosforu we krwi w stosunku do grupy rzekomo gonadektomizowanej traktowanej płynem fizjologicznym.

Recenzent chciałby podkreślić, że w związku z mnogością przeprowadzonych analiz rozdział Wyniki zawiera dużo danych. Tworzą one spójny obraz wpływu adropiny na właściwości tkanki kostnej. Rozdział napisany jest przejrzysto, a poprawne rozmieszczenie tabel i rycin ułatwia czytanie tekstu.

Rozdział **Dyskusja** obejmuje 14 stron tekstu. Napisany jest w formie jednego rozdziału bez podziału na podrozdziały. W tej części pracy doktorantka kolejno omawia uzyskane wyniki konfrontując je z dostępnym piśmiennictwem międzynarodowym. Analizuje kolejno uzyskane wyniki odnosząc je do dostępnych danych. Dodatkowo rysuje tło fizjologiczne funkcjonowania tkanki kostnej, pogłębiając je informacjami z zakresu fizjopatologii osteopenii i osteoporozy. Powyższe zagadnienia omawia u zwierząt odnosząc się do problemów osteoporotycznych menopauzalnych kobiet oraz kobiet poddanych owarietomii ze wskazań medycznych. Doktorantka obficie cytuje międzynarodową literaturę co potwierdza jej dobrą znajomość realizowanego tematu badawczego. Reasumując Dyskusja napisana jest ładną polszczyzną i mimo dużej złożoności tematu czyta się ją z zainteresowaniem.

Wnioski sformułowane w czterech punktach napisane są poprawnie. Informują o najistotniejszych wynikach uzyskanych w przebiegu badań oraz o ich możliwym wykorzystaniu w praktyce medycznej. Autorka wskazuje na immunocytochemiczną identyfikację adropiny w chrząstce wzrostowej i beleczkach kostnych, kościotwórczy wpływ adropiny na tkankę kostną oraz, że docelową tkanką dla adropiny w warunkach braku oddziaływania estrogenów jest tkanka kostna zbita.

Streszczenie napisane w języku polskim i angielskim w pełni informuje o podjętych badaniach i finalnych wynikach.

Piśmiennictwo cytowane w tekście obejmuje 367 pozycji literatury. Ta duża liczba cytowanych publikacji świadczy o odczytaniu i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu badawczego. Z drugiej strony została wymuszona mnogością zastosowanych technik badawczych i przeprowadzonych analiz. Zdecydowana większość cytowanych prac ukazała się w ciągu ostatnich kilkunastu lat. Świadczy to o aktualności przeprowadzonych badań.

Manuskrypt zamyka **Spis skrótów** nazw występujących w dysertacji obejmujący 125 pozycji. Ta część pracy w związku z dużą liczbą wieloczłonowych technicznych nazw użytych w tekście jest bardzo pomocna, gdyż znacznie ułatwia jej czytanie ze zrozumieniem.

W tekście recenzowanej pracy doktorskiej recenzent odnotował pewną liczbę błędów literowych, które nie wpływają na wysoką jakość naukową pracy.

Podsumowując, pracę doktorską lek. wet. Hanny Predki oceniam pozytywnie. Autorka wykazała się znajomością wielu technik badawczych wykorzystanych podczas jej realizacji. Uzyskane wyniki mają istotny wkład w poznanie roli adropiny w regulacji metabolizmu tkanki kostnej i przyczyn osteoporozy. Sugerują również, że adropina posiada potencjał terapeutyczny i mogłaby być wykorzystana do leczenia osteoporozy wywołanej niskim poziomem estrogenów jajnikowych u kobiet.

Ze względu na zalety naukowe tej pracy wnioskuję o przyznanie Pani Hannie Predce stosownej nagrody naukowej.

Wniosek końcowy

Pod względem merytorycznym zaplanowane doświadczenie i jego realizacja, ale także uzyskane wyniki badań stanowią oryginalne i autorskie rozwiązanie problemu naukowego i stanowią podstawę do nadania lek. wet. Hannie Predce stopnia naukowego doktora. Pogląd ten znajduje potwierdzenie w aktualności naukowej przeprowadzonych badań, rzetelności ich realizacji oraz uzyskanych naukowo istotnych wynikach.

Konkludując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynarii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie lek. wet. Hanny Predki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ
Katedra Fizjologii Klinicznej
10-718 Olsztyn, ul. M. Czapowskiego 13
tel. 89 523 44 60 fax 89 523 38 77
NIP 739-30-33-097

KIEROWNIK KATEDRY
FIZJOLOGII KLINICZNEJ
Jarosław Calka
prof. dr hab. Jarosław Calka