



Prof. dr hab. med. Rafał Filip
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

Lublin, 06.09.2022 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej pt. „Ocena wpływu adropiny na metabolizm tkanki kostnej u szczurów w warunkach ustalonej osteopenii” wykonanej przez lek. wet. Hannę Predka w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Tkanka kostna nie jest jednolitym materiałem, ale żywą, skomplikowaną tkanką podlegającą stale procesowi odnowy, mającemu na celu regenerację powstających w warunkach fizjologicznych mikrouszkodzeń. Przebudowa kości (*remodeling*) jest najistotniejszym procesem w odbudowywaniu nowej tkanki kostnej, a fizjologiczna równowaga pomiędzy procesami resorpcji i odbudowy tkanki kostnej powoduje, że masa kostna utrzymuje się na względnie stałym poziomie. Wpływ wieku oraz deficytu estrogenów na metabolizm tkanki kostnej przejawia się przede wszystkim w zwiększeniu przebudowy kości oraz przewadze utraty masy kostnej. Tempo przebudowy kości podwaja się po wystąpieniu menopauzy, potraja się po 13 latach od menopauzy, ponadto pozostaje na stałym, wysokim poziomie w przypadku wystąpienia osteoporozy. Przyspieszony remodeling powoduje pojawienie się zwiększonej liczby śródkostnych zatok resorpcyjnych, ponieważ

odbudowa de novo jest procesem znacznie wolniejszym w porównaniu z resorpcją tkanki kostnej. Proces ten istotnie zaburza mikroarchitekturę tkanki kostnej, co w konsekwencji osłabia jej właściwości mechaniczne, w tym przede wszystkim wytrzymałość. Zmniejszająca się wraz z wiekiem elastyczność kości jest spowodowana gorszą jakością nowo tworzonego minerału. Zmiany te są wynikiem m.in. tworzenia kryształów hydroksyapatytu o większych rozmiarach oraz upośledzeniem jakości kolagenu kostnego.

Opisana w 2008 roku adropina (ADR) jest białkiem związanym z błoną komórkową, o nieustalonej jednoznacznie roli fizjologicznej. Jednak w dostępnej literaturze naukowej podkreśla się jej rolę w utrzymywaniu homeostazy energetycznej i procesach metabolicznych organizmu; związek z otyłością, insulinoopornością oraz procesami zapalnymi. Dodatkowo, z uwagi na istniejące zależności między jej stężeniem a ekspresją cytokin prozapalnych tj. IL-1, IL-6 oraz TNF- α , które odgrywają bardzo ważną rolę w rozwoju osteoporozy, można przypuszczać, że ADR może odgrywać istotną rolę w metabolizmie tkanki kostnej.

Podstawowym celem pracy doktorskiej lek. wet. Hanny Predka było określenie wpływu adropiny na metabolizm i właściwości tkanki kostnej szczurów Wistar, płci żeńskiej w warunkach ustalonej osteopenii wywołanej chirurgiczną eliminacją funkcji hormonalnej gonad.

Dodatkowy cel badań koncentrował się na zagadnieniu występowania adropiny w tkance kostnej.

Badania zostały przeprowadzone na 40 szczurach, samicach, które podano operacji rzekomej lub bilateralnej owariektomii. Następnie zwierzęta zostały podzielone na 4 grupy otrzymujące i.p. codziennie przez 8 tyg. płyn fizjologiczny lub adropinę w dawce 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. Z wykorzystaniem metody DXA dokonano pomiarów densytometrycznych całego ciała w celu oceny składu ciała, całkowitej zawartości mineralnej (TotBMC) i całkowitej gęstości mineralnej (TotBMD) całego szkieletu, jak również zawartości mineralnej (BMC) i gęstości mineralnej (BMD) izolowanych kości długich. Z wykorzystaniem metody pQCT określono parametry tomograficzne kości gąbczastej oraz parametry kości zbitej i parametry przekroju poprzecznego mierzone w połowie długości trzonu kości długich. Wykorzystując trójpunktowy test ugięcia określono również parametry wytrzymałościowe wybranych fragmentów szkieletu.

W następnym etapie oceniono morfologię chrząstki wzrostowej, określając szerokość jej poszczególnych stref, a także określono lokalizację i immunoekspresję ADR w chrząstce wzrostowej oraz beleczkach kostnych z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej.

Dodatkowe oznaczenia obejmowały podstawowe parametry biochemiczne krwi (TotCH, TG, LDL, HDL, Glu, AST, ALP, ALT, Ca, P) oraz osoczowe stężenia markerów metabolizmu kostnego (osteokalcyny, OST; izoenzymu kostnego fosfatazy zasadowej, bALP; N-końcowego usieciowanego telopeptydu kolagenu typu I, NTx).

Przedstawiona do recenzji praca ma charakter oryginalnej rozprawy naukowej o układzie typowym dla tego typu opracowań. Liczy w sumie 86 stron wydruku komputerowego z zachowaniem odpowiednich proporcji między jej częściami. Na wstęp poświęcono 22 strony, materiał i metodyka stanowi 8 stron. Opis wyników zawarto na 23 stronach tekstu oraz udokumentowano je dodatkowo 2 rycinami, 12 wykresami oraz 13 tabelami, omówienie wyników i dyskusję zawarto na 11 stronach. Piśmiennictwo (zawarte w Rozdziale 9) liczy w sumie 367 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 1-22. Autorka przedstawia w nim strukturę i biologiczną rolę ADR oraz dokładnie opisuje anatomię i fizjologię tkanki kostnej. Następnie opisuje mechanizmy wpływu ADR na poszczególne funkcje fizjologiczne ustroju, głównie w kontekście jej działania przeciwzapalnego. Na szczególne podkreślenie zasługują fragment opisujący wzajemne interakcje, w tym główne mechanizmy i główne mediatory, biorące udział w patogenezie osteopenii i osteoporozy. Z 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 fizjologicznej roli ADR, szczegółowo i krytycznie wprowadzają czytelnika w tematykę i mogą stanowić samodzielną pracę przeglądową.

Zwięźle i jasno sformułowane *cele pracy* objęły bardzo ambitne zadania nawiązujące do współczesnych problemów związanych z chorobami cywilizacyjnymi, do których zaliczają się również choroby metaboliczne kości. Zdaniem recenzenta dotyczą one bardzo ważnego wątku badań poszukującego nowych metod profilaktyki osteoporozy pomenopauzalnej.

W rozdziale *Materiał i metody* Autorka przedstawia zastosowany materiał oraz wykorzystane metody badawcze. Dokładnie został opisany sposób przeprowadzenia eksperymentu, metoda podziału zwierząt na grupy, warunki hodowlane, sposób przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych oraz pobrania materiału do badań pQCT i badań

wytrzymałościowych kości. Opisano również sposób żywienia zwierząt. W dalszej części Autorka opisała 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. W dalszej części Autorka przedstawia metodologię analiz histologicznych kości udowych oraz oznaczeń immunohistochemicznych dla ADR w chrząstce wzrostowej i beleczkach kostnych. 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 13.1 PL, a wybór testów należy uznać za odpowiedni dla tego typu badań.

W rozdziale *Wyniki* Autorka prezentuje wyniki badań własnych w formie opisowej (23 strony) oraz odwołuje się do 13 tabel oraz 12 wykresów.

Na podstawie przeprowadzonych przez Autorkę eksperymentów na modelu szczura wykazano, że ADR we znajduje się wszystkich strefach chrząstki wzrostowej oraz beleczkach kostnych, zarówno wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo. W dalszym toku prac nie stwierdzono wpływu ADR na metabolizm tkanki kostnej u samic szczurów z zachowaną funkcją jajników. Natomiast wskazano, że podawanie ADR pozytywnie wpływa na metabolizm tkanki kostnej w warunkach eliminacji funkcji hormonalnej jajników, czego wyrazem są zmiany w wartościach parametrów densytometrycznych, tomograficznych i wytrzymałościowych kości. Zmiany stężenia markerów metabolizmu kostnego, tj. wzrost stężenia OST i bALP oraz obniżenie stężenia NTx pod wpływem podawania ADR, jak również zmiany w wartościach ww. parametrów wskazują, że protekcyjne oddziaływanie ADR na tkankę kostną wynika ze stymulacji kościotworzenia i hamowania resorpcji tkanki kostnej. Podsumowując autorka stwierdziła, że antyosteopeniczne działanie ADR w warunkach eliminacji funkcji hormonalnej jajników może być punktem do dalszych badań nad możliwością jej wykorzystania terapeutycznego.

W *Dyskusji*, przeprowadzonej na 11 stronach, Autorka skonfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób uwypukliła 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 4 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.

Wstęp

1. Str. 20 W akapicie opisującym skutki osteoporozy, oprócz złamań kręgow i złamania dalszej nasady kości promieniowej, warto było wspomnieć również o najbardziej charakterystycznym i jednocześnie najbardziej okaleczającym osoby w podeszłym wieku złamaniu szyjki kości udowej.

Material i metody

1. W rozdziale *Material i metody* brak jest informacji na temat czasu w jakim przeprowadzono eksperymenty na zwierzętach. Podana data uzyskania zgody Komisji Etycznej sugeruje, że eksperymenty najprawdopodobniej przeprowadzono po 2015 r.

2. Brak jest również informacji na temat miejsca przeprowadzenia eksperymentów, zabiegów chirurgicznych oraz analiz histologicznych (jednocześnie Autorka dokładnie opisuje miejsce wykonania badań densytometrycznych i pQCT).

3. Pewien niedosyt budzi również fakt niedołączenia tabeli opisującej skład zastosowanych pasz. Jest to ważne w kontekście, częściowo opisywanego zresztą przez Autorkę we *Wstępie*, możliwego wpływu poszczególnych składników diety na stężenia i działanie ADR w organizmie, a także odwrotnie- wpływu podawania ADR na przyswajanie poszczególnych składowych pokarmu.

4. Str. 31 Przy opisie wybranych testów ELISA (adropina, OST, NTx, bALP) autorka posługuje się pojęciem „zakresu pomiarowego”, co wydaje się niewystarczające. Generalnie standardy w tym zakresie w opracowaniach naukowych obejmują, oprócz metody oznaczeń i producenta zestawów, podania czułości i specyficzności testu.

5. Str. 56. Autorka nieprawidłowo używa „ALP” zamiast bALP, a przecież zdanie odnosi się do frakcji kostnej ALP.

Dyskusja

1. Str. 58 [cytuję] „... różnice nie wykazują cech istotności statystycznej...” Zdanie powinno zostać przeredagowane.

2. Str. 58 [cytuję] „...są zbieżne z wynikami badań własnych”. W Dyskusji autorka kilkakrotnie używa sformułowania „wyniki badań własnych” co jest mylące, ponieważ sugeruje powoływanie się na opublikowane wcześniej wyniki badań nie będące przedmiotem recenzowanej pracy. Proponuję zastąpienie tego sformułowania innym, jak na przykład „uzyskane wyniki” itp.

3. Str. 59 [cytuję] „Mechanizmy przez które estrogeny oddziałują na tkankę kostną nie są do końca znane.” Nie jest to prawda, zwłaszcza w ciągu ostatnich 10 lat nastąpił bardzo duży postęp wiedzy w tym zakresie. Autorka opisuje te mechanizmy poczynając od następnego akapitu.

4. Kontynuując (str. 59-61). Autorka na blisko 3 strony poświęca na relatywnie dokładny opis molekularnych mechanizmów wpływu estrogenów na metabolizm tkanki kostnej, co w żaden sposób nie odnosi się do uzyskanych przez Autorkę wyników. Fragment ten, po skróceniu o co najmniej połowę, mógłby ewentualnie stanowić część wstępu recenzowanej rozprawy doktorskiej.

5. Str. 6. Fragmenty [cytuję] (akapit 3) „Oceny wpływu różnych czynników na tkankę kostną można dokonywać na podstawie analizy masy...” oraz (akapit 4) „Jak już wspomniano wcześniej, DXA jest uznana metodą badania...” – nie powinny znajdować się w rozdziale *Dyskusja*.

6. Str 63. Omawiając wyniki Autorka stwierdza, że [cytuję} „Brak istotnego wpływu owariektomii na parametry kości zbitej i przekroju kości stwierdzono również w innych badaniach”. Zdanie to powinno zostać opatrzone odpowiednim komentarzem dotyczącym czasu trwania eksperymentów. W dostępnej literaturze dotyczącej tematu można znaleźć liczne prace dokumentujące odwrotną korelację stężeń estrogenów i parametrów jakościowych tkanki kostnej zbitej, która ujawnia się jednak po dłuższym czasie obserwacji. W opinii Recenzenta, brak tej zależności w uzyskanych wynikach może być spowodowany relatywnie krótkim czasem trwania eksperymentu.

7. Str. 65. [cytuję] Badanie cech mechanicznych izolowanych kości na działanie sił obciążających wykonano z wykorzystaniem ...” – zdanie to stanowi powtórzenie z rozdziału „materiał i metody”, powinno być usunięte z Dyskusji.

8. Str. 68 W pierwszym akapicie autorka dwukrotnie używa sformułowania „zawartość Ca i P we krwi”. W przedstawianym kontekście powinny raczej być „stężenie Ca i P we krwi”.

9. Str. 68. Brak referencji dotyczących sformułowania [cytuję] „Potwierdzeniem tych przypuszczeń są dane literaturowe odnośnie zależności między stężeniem krwi ADR iL-1, iL-6 oraz TNF-alpha w stanach chorobowych przebiegających z objawami zapalenia.”

Wnioski.

1. Pierwszy wniosek „Adropina wykazuje immunoekspresję...” powinien być przeredagowany.

2. Z punktu widzenia przedstawionych przez Autorkę celów głównego i dodatkowego pracy (Str.23), pierwszeństwo w kolejności powinien mieć wniosek nr 2.

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. Hanny Predka jest wartościowym opracowaniem. Badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane w oparciu o adekwatne w stosunku do założonego celu metody badawcze. Autorka wykazała 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. Hanny Predka pt. „**Ocena wpływu adropiny na metabolizm tkanki kostnej u szczurów w warunkach ustalonej osteopenii**” **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. Hanny Predka 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

Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Katedry Chorób Wewnętrznych
PROF. DR HAB. S. MED. RAFAŁ FILIP