

Dr hab. Michał Bulc, prof. UWM  
Katedra Fizjologii Klinicznej  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
UWM w Olsztynie

Olsztyn 6.08.2024

## RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Wiesława Ślebody pt. „Ocena możliwości wykorzystania adropiny i iryzyny jako przyżyciowych wskaźników metabolizmu kostnego w warunkach stosowania diety o różnej zawartości tłuszczu”. Praca wykonana pod kierunkiem promotora dr hab. Iwony Puzio prof. uczelni w Katedrze Fizjologii Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.**

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 2 lipca 2024 roku powołujące się na uchwałę Rady Dyscypliny Weterynaria z dnia 27 czerwca 2024 roku w sprawie powołania recenzentów pracy doktorskiej mgr Wiesława Ślebody.

Rozwój cywilizacyjny przyniósł ogromny postęp w nauce oraz znaczną poprawę warunków życia ludzi, ale stał się jednocześnie przyczyną pojawienia się wielu schorzeń. Dodatkowo niewłaściwe odżywianie i ograniczona aktywność ruchowa powodują postępujący rozwój nadwagi i otyłości. Oba te schorzenia mają złożony patomechanizm oraz negatywnie wpływają na wiele układów, w tym na układ kostny. Obecnie wiadomo, że tkanka tłuszczowa, mięśnie szkieletowe oraz tkanka kostna są źródłem wielu substancji biologicznie czynnych. Do substancji tych zaliczamy odkrytą w 2008 roku adropinę oraz w 2012 roku iryzynę. Wiedza na temat roli tych substancji w przemianie materii, szczególnie w metabolizmie tkanki kostnej jest przedmiotem wielu badań. Możliwość praktycznego wykorzystania oznaczania poziomu tych substancji jako markerów metabolizmu kostnego szczególnie u osób z otyłością wydaje się

bardzo interesująca. Dlatego podjęty przez mgr Wiesława Ślebodę temat badań w mojej opinii jest ciekawy i aktualny, zwłaszcza, że badania mają charakter nie tylko poznawczy, ale również praktyczny i aplikacyjny.

Przedstawiona do oceny praca doktorska w formie monografii naukowej ma konwencjonalny układ i nie budzi zastrzeżeń. Składa się z 91 stron druku, w tym 14 tabel, 1 wykresu i 3 fotografii. Całość została podzielona na rozdziały; przegląd piśmiennictwa, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię obejmującą aż 340 pozycji, wykaz tabel, wykresów i fotografii oraz spis skrótów. Wszystkie wymienione powyżej rozdziały ujęte są w spisie treści. Dodatkowo praca zawiera podpisane oświadczenie Promotora i Doktoranta.

Przeгляд piśmiennictwa obejmuje 21 stron i jest podzielony na 13 podrozdziałów. W rozdziale tym doktorant w sposób czytelny i zrozumiały dokonuje charakterystyki badanych substancji tj. iryzyiny i adropiny. Analiza ta dokonana jest w oparciu o dobrze dobrane pozycje literatury opublikowane w anglojęzycznych periodykach. Badane substancje scharakteryzowane są według tego samego schematu. W pierwszym podrozdziale autor przeprowadza dokładną charakterystykę iryzydyny, opisując mechanizm i regulację jej syntezy oraz dystrybucję w organizmie. Następnie opisuje mechanizm działania iryzyiny na poziomie receptorowym. Podrozdział ten kończy się opisem tkankowej dystrybucji iryzydyny oraz szczegółową analizą czynników wpływających na jej uwalnianie. W kolejnych podrozdziałach doktorant opisuje wpływ wysiłku fizycznego na uwalnianie i poziom iryzydyny, syntezę iryzydyny w tkance tłuszczowej, jej udział w procesach zapalnych oraz metabolizmie. W ostatnim podrozdziale autor dokonuje dokładnego opisu roli iryzydyny w tkance kostnej, co pozwala wprowadzić czytelnika w tematykę przeprowadzonych badań. W podobny sposób autor opisuje drugą badaną substancję czyli adropinę. Przedstawioną charakterystykę badanych substancji uważam za logiczną - pozwala ona czytelnikowi poznać dokładną budowę,

mechanizm działania oraz fizjologiczną rolę badanych substancji w organizmie, jak również prześledzić dynamikę zmian tych substancji w procesach patologicznych ze szczególnym uwzględnieniem nadwagi i otyłości. Przegląd piśmiennictwa kończy najobszerniejszy podrozdział dotyczący wpływu nadwagi na układ kostny. W podrozdziale tym doktorant w zrozumiały sposób przedstawił wzajemną interakcję pomiędzy tkanką tłuszczową a tkanką kostną, opisuje aktywność hormonalną tkanki kostnej w stanie fizjologicznym oraz w przebiegu nadwagi i otyłości.

Na podstawie przeglądu aktualnej literatury autor sformułował 2 cele badawcze:

1. Ocena zależności pomiędzy stężeniem adropiny i iryzydyny we krwi, a parametrami tkanki kostnej w warunkach żywienia karmą o różnej zawartości tłuszczu.
2. Wykazanie możliwości wykorzystania iryzydyny i adropiny jako ewentualnych przyżyciowych wskaźników określających zależność pomiędzy indukowaną dietą otyłością, a parametrami tkanki kostnej.

Cele pracy zostały następnie zweryfikowane w modelu badawczym.

Z opisu materiału i metod wynika, że postawione zadania badawcze zostały zrealizowane na 24 samicach szura szczepu Wistar o początkowej masie ciała 220-230 g. Zwierzęta losowo podzielono na 3 grupy badawcze określone jako grupa D5, D10, D45, gdzie cyfry oznaczają procent kalorii pochodzący z tłuszczu. Każda grupa zawierała 8 zwierząt, a eksperyment trwał 10 tygodni. W trakcie tego czasu zwierzęta w każdej z grup otrzymywały karmę o różnej zawartości tłuszczu. Dokładny skład karmy został przedstawiany w tabeli 1. Następnie autor opisuje procedurę eutanazji zwierząt oraz pobrania i zabezpieczenia materiału do dalszych analiz. Materiał badawczy stanowiła krew, oraz kości kończyn. Przed ich pobraniem dokonano densytometrycznego pomiaru składu ciała szczurów.

Pomiary densytometryczne składu ciała przeprowadzono metodą absorpcji podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego.

Analizie poddano następujące parametry: masa tkanek miękkich beztłuszczowych; masa tkanki tłuszczowej; całkowita gęstość mineralna szkieletu; całkowita zawartość mineralna szkieletu oraz dokonano pomiaru gęstości mineralnej i zawartości mineralnej kości udowych, ramiennych i piszczelowych.

W kolejnych badaniach dokonano analizy parametrów wytrzymałościowych kości wykorzystując do tego test trójpunktowego ugięcia.

Analizie histologicznej poddane zostały kości udowe, z których wykonano skrawki parafinowe, które były następnie barwione hematoksyliną. Analiza histomorfometryczna obejmowała chrząstkę wzrostową oraz istotę gąbczastą. W przypadku chrząstki dokonano oceny całkowitej szerokości chrząstki oraz jej poszczególnych warstw (spoczynkowej, proliferującej, hipertroficzej i wapniejącej). Natomiast w istocie gąbczastej nasady kości udowej oceniono wysokość, szerokość, obwód i pole powierzchni beleczek kostnych.

Badania immunohistochemiczne obejmowały analizę immunoreaktywności (skala plusowa) w chrząstce wzrostowej oraz beleczkach kostnych kości udowej z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko iryzynie, adropinie oraz sklerostynie.

Analiza biochemiczna krwi została wykonana przy użyciu analizatora biochemicznego, komercyjnych zestawów diagnostycznych, metody kolorymetrycznej oraz zmodyfikowanej metody kinetycznej. Analiza obejmowała szerokie spektrum wskaźników biochemicznych osocza (aminotransferazy asparaginowej, alaninowej, fosfatazy zasadowej, wskaźników gospodarki lipidowej, glukozy oraz wapnia i fosforu). Ponadto określono stężenie istotnych z punktu widzenia badawczego niniejszej rozprawy białek – iryzyny, adropiny, sklerostyny oraz markerów metabolizmu tkanki kostnej (osteokalcyny, N-końcowego usieciowanego telopeptydu kolagenu typu I, izoenzymu kostnego fosfatazy zasadowej).

Rozdział materiały i metody kończy podrozdział opisujący zastosowane analizy statystyczne do opracowania uzyskanych wyników.

Dobór metodyki badawczej oceniam wysoko. Mnogość zastosowanych technik badawczych umożliwiła uzyskanie cennych wyników pozwalających dokonać dokładnej weryfikacji postawionych celów badawczych. Dodatkowo wszystkie zastosowane techniki badawcze zostały szczegółowo opisane.

Wyniki opisane są na 15 stronach zostały podzielone na 7 podrozdziałów. Kolejność omawiania wyników jest zgodna z kolejnością opisu metod badawczych przedstawionych w rozdziale materiał i metody. Wyniki zawierają 13 tabel, 1 wykres oraz 3 fotografie. Rozdział ten zawiera wyczerpujący opis obserwacji uzyskanych z doświadczenia. Dowiadujemy się z niego:

1. Po 10 tygodniach trwania doświadczenia masa ciała samic szczurów była największa w grupie D45, szczególnie w porównaniu z grupą D5, przy jednoczesnym najmniejszym dziennym zużyciu karmy w grupie D45. Dodatkowo osobniki z grupy D45 cechowały się największą masą kości udowych, piszczelowych oraz ramieniowych. Nie zaobserwowano natomiast różnic w długości badanych kości pomiędzy poszczególnymi grupami.
2. Osobniki z każdej grupy wykazywały taką samą zawartość tkanek miękkich, natomiast ilość tkanki tłuszczowej była większa w grupie D10 i D45 w porównaniu z grupą D5, przy czym różnica ta nie była istotna statystycznie.
3. W badaniach densytometrycznych tkanki kostnej wykazano istotny statystycznie wzrost całkowitej zawartości mineralnej kości i całkowitej gęstości mineralnej kości w grupach D10 i D45 w porównaniu do grupy D5. Natomiast w badanych kościach średnia zawartość mineralna i gęstość mineralna kości była największa w kości udowej i ramieniowej w grupie szczurów D45.
4. W badaniu wytrzymałości w trójpunktowym teście ugięcia wykazano istotnie statystycznie wzrost wartości siły łamiącej kości udowej, piszczelowej i ramiennej

w grupie D45 w stosunku do grupy D5. W odniesieniu do pozostałych wskaźników wytrzymałości nie odnotowano różnic istotnych statystycznie.

5. Na podstawie analizy histomorfometrycznej chrząstki wzrostowej oraz istoty gąbczastej nasady dalszej kości udowej stwierdzono, największą całkowitą szerokość chrząstki wzrostowej w grupie D5. W przypadku pozostałych badanych stref chrząstki wzrostowej statystycznie istotną różnicę zaobserwowano jedynie w strefie wapniejącej pomiędzy grupą D5 a D45. Natomiast badane parametry istoty gąbczastej charakteryzowały się najniższymi wartościami w grupie D5, istotne statystycznie różnice stwierdzono pomiędzy grupą D5, a grupami D10 i D45.
6. Zastosowanie technik immunohistochemicznych umożliwiło poznanie dokładnej lokalizacji adropiny, iryzyny oraz sklerostyny w chrząstce wzrostowej oraz istocie gąbczastej przynasady dalszej kości udowej. Analiza nasilenia reakcji immunocytochemicznej została określona na następującej podstawie; (+/-) – nieznaczna immunoreaktywność; (+) – średnia immunoreaktywność; (++) – duża immunoreaktywność; (+++) – bardzo duża immunoreaktywność. Dodatkowo doktorant dokonał analizy wyżej wymienionych substancji w lokalizacji wewnątrz i zewnątrzkomórkowej. Immunoreaktywność dla adropiny wykazano we wszystkich strefach chrząstki wzrostowej we wszystkich badanych grupach, przy czym najsilniejszą reakcję stwierdzono w zewnątrzkomórkowej strefie wapniejącej i hipertroficznej grupy D5 i D45, a najslabszą w strefie proliferującej, zarówno w lokalizacji wewnątrz zewnątrzkomórkowej grup D5 i D10. W przypadku iryzyny poziom immunoreaktywności był zdecydowanie mniejszy, dodatkowo w strefie proliferującej oraz zewnątrzkomórkowej strefie hipertroficznej nie stwierdzono pozytywnej reakcji. W przypadku sklerostyny poziom immunoreaktywności pozostawał na niskim poziomie we wszystkich grupach i strefach chrząstki wzrostowej

z wyjątkiem wewnątrzkomórkowej strefy wapniejącej, gdzie odnotowano bardzo dużą immunoreaktywność. W przypadku immunoreaktywności badanych substancji w istocie gąbczastej przynasady dalszej kości udowej największy jej poziom zaobserwowano w przypadku sklerostyny, nieco mniejszą immunoreaktywność wykazywała adropina, a najmniejszy iryzyna.

Wszystkie wyniki z barwień immunohistochemicznych udokumentowane są w formie 3 kolorowych fotografii, z których każda zawiera 6 reprezentatywnych zdjęć.

7. Badania krwi w celu określenia stężenia iryzyny, adropiny oraz parametrów biochemicznych wykazały, że grupa D45 charakteryzowała się największym stężeniem adropiny, iryzyny, sklerostyny oraz izoeznu kostnego fosfatazy zasadowej. Najmniejsze zróżnicowanie poziomów markerów kostnych pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi zaobserwowano w stosunku do N-końcowego usieciowanego telopeptydu kolagenu typu 1. Dodatkowo autor nie zaobserwował istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami w wartościach parametrów biochemicznych krwi.
8. W ostatnim podrozdziale autor omawia ocenę zależności między stężeniem iryzyny i adropiny a składem ciała, parametrami tkanki kostnej oraz markerami metabolizmu, co wpisuje się w realizację drugiego celu niniejszej dysertacji.

Szczególnie interesująca jest wszechstronna dyskusja, w której Autor na podstawie przemyśleń własnych, jak również danych zawartych w licznych pozycjach piśmiennictwa omówił uzyskane wyniki badań, starannie znajdując dla nich odpowiednie uzasadnienie. Pomimo, że rozdział ten napisany jest w formie jednolitej, bez podziału na podrozdziały, Autor zachował kolejność zestawienia swoich wyników z danymi literaturowymi w takiej samej kolejności, jak przedstawiane są wyniki w poprzednim podrozdziale co powoduje, że stanowi ona doskonałe podsumowanie całej pracy.

Wnioski niniejszej dysertacji sformułowane są w 4 punktach. Przedstawione wnioski wynikają z przeprowadzonych badań. Są napisane w zwięzły sposób i informują o najważniejszych wynikach uzyskanych w niniejszej pracy. Szczególnie cenny jest wniosek 4, ponieważ łączy on przeprowadzone badania z możliwością zastosowania uzyskanych wyników z praktyką kliniczną.

Streszczenie w języku polskim i angielskim napisane jest poprawnie i w zwięzły sposób przedstawia podjęty temat badawczy oraz uzyskane wyniki.

Bibliografia liczy 340 pozycji - jest to obszerna liczba, ale ze względu na mnogość technik zastosowanych w dysertacji oraz mnogość badań nad iryzyną i adropiną liczba jest adekwatna.

Monografię kończy spis tabel, wykresów i fotografii oraz wykaz skrótów.

Mając na uwadze fakt, że praca doktorska napisana jest w formie monografii, a uzyskane wyniki mogą być opublikowane w formie publikacji naukowej, chciałem przedstawić kilka uwag, które mogą wpłynąć na poprawę pracy przed drukiem. Jednocześnie zaznaczam, że wskazane uwagi mają przede wszystkim charakter redakcyjny i nie obniżają wartości merytorycznej ocenianej dysertacji.

#### **Uwagi:**

- Pierwszy rozdział zatytułowany jest „przegląd piśmiennictwa”. W większości publikacji pierwszy rozdział tytułowany jest jako „wstęp” - w periodykach polskich lub „introduction” - w czasopiśmie anglojęzycznych. Zważywszy na to proponuję zmianę nazwy z „przegląd piśmiennictwa” na „wstęp”.

- Autor używa zwrotu signaling (strona 2, 8) opisując mechanizm działania określonej substancji. Sugeruję zamianę zwrotu na polski odpowiednik np. mechanizm przekazywania sygnału.

- Nie wszystkie użyte w tekście skróty znajdują się w zamieszczonym na końcu dysertacji wykazie: (Strona 2 - AMPK-UCP 2/ brak w wykazie; Strona 2 – CUN/brak w wykazie; Strona



5 – *Cidea*/brak w wykazie; Strona 5 - *Cox7a*/ brak w wykazie; Strona 6 – TLR4/brak pełnej nazwy w tekście; Strona 7 – Aft4, Runx2, Osterix/ brak pełnej nazwy w tekście).

- Podrozdział 1.1.3. zatytułowany jest wpływ iryzyny na metabolizm. W podrozdziale tym doktorant opisuje przede wszystkim wpływ iryzyna na komórki  $\beta$  trzustki, związaną z tym sekrecją insuliny i poziom glukozy. To powoduje rozdzźwięk pomiędzy tytułem podrozdziału a jego treścią. Zdaniem recenzenta należy zmienić nazwę tytuł podrozdziału lub przedstawić w nim informacje dotyczące wpływu iryzyny na przemiany metaboliczne nie tylko w odniesieniu do trzustki i insuliny.

- W rozdziale wyniki – 2 podrozdział (ocena składu ciała i parametrów tkanki kostnej oznaczonych metodą densytometryczną) doktorant opisuje średnie wartości gęstości mineralnej kości i zawartości mineralnej kości dla kręgow. Brak jest informacji, z którego odcinka kręgosłupa pochodziły kręgi, jak również autor nie podaje informacji o pobieraniu kręgow do badań densytometrycznych w rozdziale materiały i metody.

- 10 rozdział monografii stanowi spis tabel, wykresów i fotografii ze względu, że każda z tabel, fotografii i wykres umieszczona w odpowiednim miejscu w rozdziale wyniki jest opisana zmieszczenie dodatkowo opisów na końcu monografii uważam za zbędny.

- W tekście w kilku miejscach pojawiają się również błędy literowe.

### **Wniosek końcowy**

Oceniając rozprawę doktorską mgr Wiesława Ślebudy stwierdzam, że jest ona cenna pod względem naukowym oraz aplikacyjnym, właściwie dobranej metodyki oraz dobrze udokumentowanych wyników badań uzyskanych w oparciu o dobrze zaplanowany i zrealizowany warsztat badawczy.

Mając powyższe na względzie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Wiesława Ślebudy pt. „Ocena możliwości wykorzystania adropiny i iryzyny jako przyżyciowych wskaźników metabolizmu kostnego w warunkach stosowania diety o różnej zawartości

tłuszczu” odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn.zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. z późn.zm. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz. 1669).

Mam zaszczyt przedłożyć Radzie Dyscypliny Weterynaria, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Wiesława Ślebudy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy pracy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy stosowną nagrodą.

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

Michał Bulc