



dr hab. Agata Wawrzyniak prof. UR
Zakład Histologii i Embriologii
Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 22.07.2024r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pana mgr. Wiesława Śleboda pt.: „Ocena możliwości wykorzystania adropiny i iryzyny jako przyżyciowych wskaźników metabolizmu kostnego w warunkach stosowania diety o różnej zawartości tłuszczu.”

Pan mgr Wiesław Śleboda wykonał pracę w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem Pani dr hab. Iwony Puzio prof. UP.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest interesująca i ważna, ponieważ zgodnie z obecnym stanem wiedzy adropina (AD) i iryzyna (IR) to dwa peptydy, które budzą coraz większe zainteresowanie z uwagi na ich potencjalne korzyści zdrowotne. AD to peptyd związany z regulacją homeostazy energetycznej i metabolizmu lipidów. Została odkryta stosunkowo niedawno i wykazuje potencjał w kontroli glikemii oraz poprawie wrażliwości na insulinę. Badania sugerują, że AD może wpływać na zmniejszenie ryzyka chorób metabolicznych, takich jak cukrzyca typu 2 i otyłość. Związek ten wydaje się również korzystny dla osób z problemami sercowo-naczyniowymi, choć potrzebne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć mechanizmy działania AD. IR jest peptydem wydzielanym głównie przez mięśnie szkieletowe w odpowiedzi na wysiłek fizyczny. Uważa się, że IR przekształca tkankę tłuszczową białą w brunatną, co zwiększa wydatkowanie energii i może sprzyjać redukcji masy ciała. Ponadto, IR ma potencjalne działanie przeciwzapalne, może poprawiać funkcjonowanie mózgu oraz przemiany metaboliczne. Istnieją dowody na to, że może chronić przed chorobami neurodegeneracyjnymi i poprawiać funkcje poznawcze.

W przeprowadzonej rozprawie, Doktorant dokonał oceny zależności pomiędzy stężeniem AD i IR we krwi, a parametrami tkanki kostnej w warunkach żywienia karmą o różnej zawartości tłuszczu. Ponadto dokonał próby oceny możliwości wykorzystania AD i IR jako ewentualnych przyżyciowych wskaźników określających zależność pomiędzy

indukowaną dietą otyłością, a parametrami tkanki kostnej. Niniejsza praca posiada duże walory poznawcze, ponieważ do tej pory nie do końca poznano zależności pomiędzy stężeniem AD i IR we krwi, a parametrami tkanki kostnej.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna ją obszerny wstęp literaturowy liczący 22 strony, w którym Autor podsumował dotychczasową wiedzę i w czytelny sposób zaprezentował charakterystykę AD i IR. Wyjaśnił powiązanie tych dwóch peptydów, ich zależności z tkanką kostną, tłuszczową, metabolizmem oraz procesami zapalnymi w organizmie. We wstępie nie zabrakło również opisu dotyczącego wpływu nadwagi i otyłości na tkankę kostną. Rozdziały te stanowią idealne wprowadzenie czytelnika do badań własnych Doktoranta. W prezentowanym rozdziale Autor wykazał się znajomością aktualnej wiedzy dotyczącej tematu pracy, a analiza bieżącego piśmiennictwa stanowi solidne i przejrzyste przedstawienie zagadnień związanych z tematem dysertacji.

Przedstawione po wstępie cele zostały jasno sformułowane. W kolejnych rozdziałach Doktorant w sposób szczegółowy i niebudzący zastrzeżeń przedstawił materiał, metodykę oraz osiągnięte wyniki. W niniejszej dysertacji materiałem badawczym były 24 samice szczura szczepu Wistar, co jest typowym podejściem do eksperymentów laboratoryjnych z uwzględnieniem płci i populacji zwierząt. Zwierzęta były żywione przez 10 tygodni karmą o różnej zawartości tłuszczu: niskotłuszczową (gr. D5 -5,5% kcal z tłuszczu), standardową (gr. D10 - 10% kcal z tłuszczu) i wysokotłuszczową (gr. D45 - 45% kcal z tłuszczu). W swojej rozprawie Doktorant posłużył się różnorodnymi metodami badawczymi. Metoda DXA została użyta do pomiaru składu ciała (masy tkanki tłuszczowej i beztłuszczowej), całkowitej gęstości mineralnej, zawartości minerałów w szkielecie oraz gęstości (BMD) i zawartości mineralnej kości (BMC) izolowanych kości długich. Trójpunktowy test ugięcia pozwolił zbadać parametry wytrzymałościowe kości długich. Doktorant dokonał analizy morfologicznej chrząstki wzrostowej, istoty gąbczastej nasady dalszej kości udowej oraz określił lokalizację i nasilenie reakcji immunohistochemicznej dla AD, IR oraz sklerostyny w chrząstce wzrostowej i beleczkach kostnych przynasady dalszej kości udowej. Doktorant zmierzył w osoczu krwi stężenia AD, IR, sklerostyny oraz markerów metabolizmu kostnego, takich jak osteokalcyna, izoenzym kostny fosfatazy zasadowej (bALP), N-końcowy usieciowany telopeptyd kolagenu typu I (NTx), a także podstawowe parametry biochemiczne. Dodatkowo ocenił masę ciała szczurów, spożycie paszy oraz masę i długość izolowanych kości.

Zrealizowanie oraz opracowanie tak dużej liczby analiz należało do przedsięwzięć bardzo praco i czasochłonnych, wymagających ogromnie cierpliwości, wytrwałości, a przede wszystkim bardzo dobrego przygotowania i znajomości badanej problematyki. Zastosowane

metody są dobrze dobrane do celów badawczych przedstawionych w rozprawie doktorskiej. Obejmują one szeroki wachlarz technik analitycznych, które pozwoliły na kompleksową ocenę wpływu diety o różnej zawartości tłuszczu na parametry tkanki kostnej u szczurów.

Dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych technik badawczych, Doktorant wykazał, że żywienie szczurów karmą wysokotłuszczową wywierało pozytywny wpływ na metabolizm tkanki kostnej, stymulując procesy kościotworzenia i mineralizacji. Przejawem tego był wzrost wartości parametrów densytometrycznych i wytrzymałościowych kości. Badania nie wykazały wpływu zastosowanej diety na stężenie osteokalcyny i NTx. Zastosowane metody badawcze sugerują, że wzrost stężenia bALP u szczurów z grupy D10 i D45 w porównaniu z grupą D5, w połączeniu ze wzrostem parametrów densytometrycznych i siły łamiącej kości długich, wskazują nasilenie procesów kościotworzenia u szczurów, karmionych dietą bogatszą w tłuszcz i energię. Dieta wysokotłuszczowa spowodowała wzrost stężeń IR i AD we krwi. Po diecie niskotłuszczowej zaobserwowano istotne zależności pomiędzy stężeniem AD, a parametrami densytometrycznymi kości, natomiast po diecie wysokotłuszczowej pomiędzy stężeniami AD i IR, a tymi samymi parametrami. Umiejętnie dobrane metody badawcze zastosowane w niniejszej rozprawie umożliwiły Doktorantowi wykazanie silnej korelacji pomiędzy stężeniem IR we krwi, a wartościami większości parametrów densytometrycznych kości szczurów otrzymujących karmę wysokotłuszczową. Wskazuje to, że IR może służyć jako przyżyciowy wskaźnik określający zależności pomiędzy dietą indukowaną otyłością, a parametrami densytometrycznymi tkanki kostnej.

Dyskusja jest napisana dobrze, a Doktorant umiejętnie przeprowadził argumentację otrzymanych wyników, potwierdzając znajomość problematyki oraz orientację w temacie. Doktorant w logiczny sposób dowodzi, że zastosowanie diety o różnej zawartości tłuszczu i energii wpływa na masę i skład ciała oraz parametry tkanki kostnej u szczurów. Analiza wyników wykazała, że szczury karmione dietą wysokotłuszczową osiągnęły największą masę ciała i tkanki tłuszczowej oraz wyższe parametry densytometryczne i wytrzymałościowe kości, w porównaniu do grupy szczurów karmionych dietą niskotłuszczową. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant wysnuł przypuszczenie, że wyższe stężenia AD i IR we krwi, obserwowane u szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową, mogą odgrywać znaczącą rolę w metabolizmie tkanki kostnej. Pomimo braku istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami badanych peptydów, a parametrami wytrzymałościowymi kości, wyższe wartości BMD i BMC u szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową sugerują możliwy związek pomiędzy tą dietą, a zdrowiem kości.

Doktorant przedstawił wnioski końcowe swojej pracy, które pozwoliły na sformułowanie 4 logicznych konkluzji. Stanowią one meritum do stwierdzenia, że karma

wysokotłuszczowa stymulowała u szczurów procesy kościotworzenia i mineralizacji. Spowodowała również wzrost stężeń AD i IR we krwi, przy czym stężenie IR silnie korelowało z parametrami densytometrycznymi.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Wiesława Ślebody ma formę wydruku komputerowego, liczy 91 stron, układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Napisana jest poprawnym językiem polskim, a układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Dysertację rozpoczyna czytelny spis treści, po którym znajduje się przegląd piśmiennictwa, cel pracy, dane o materiale i metodyce badań, omówienie wyników, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis tabel, wykresów i fotografii oraz wykaz skrótów. Zastosowane metody były dobrze dobrane do celów badawczych przedstawionych w rozprawie doktorskiej. Obejmują one szeroki zakres technik analitycznych, które pozwoliły na kompleksową ocenę wpływu diet o różnej zawartości tłuszczu na parametry tkanki kostnej u szczurów. Wyniki zostały opracowane z bardzo dużą starannością oraz dokładnością. Są zaprezentowane w sposób przejrzysty co bardzo usprawnia ich analizę. Opisy wyników są zrozumiałe i przystępne, a całość napisana jest poprawnym językiem bez nadużywania zwrotów anglojęzycznych. Na podkreślenie zasługuje szata graficzna. W swojej rozprawie Doktorant umieścił bardzo dobrej jakości 3 fotografie, 14 tabel oraz 1 wykres, które ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. Bardzo bogate piśmiennictwo jest aktualne, Doktorant umiejętnie je zacytował i krytycznie dobrał do wiedzy teoretycznej dotyczącej omawianych zagadnień. Bibliografia zawiera 338 pozycji, z czego 337 jest po angielsku. Warto zaznaczyć, że 215 z nich pochodzi z ostatnich 10 lat.

Doktorant nie ustrzegł się jednak drobnych błędów. W wstępie tekst napisany jest poprawnie pod względem językowym, jednak możliwe byłoby jego ulepszenie pod kątem przejrzystości i zwięzłości. Szczegółowość tekstu może utrudniać czytanie, dlatego warto go skrócić, zachowując kluczowe informacje. Dodatkowo, proponowane jest dodanie sekcji omawiającej potencjalne zastosowania kliniczne IR, co nie tylko wzbogaci wstęp, ale również pokaże praktyczne implikacje badań. Tekst jest już podzielony na sekcje, jednak dodanie podpunktów lub wyróżnień może ułatwić nawigację i zrozumienie treści. Na przykład, można wyróżnić takie sekcje jak „Definicje nadwagi i otyłości”, „Wpływ nadwagi na tkankę kostną”. Warto dodać również wzmiankę o przyszłych kierunkach badań, co może być inspiracją dla innych naukowców. Tekst dobrze definiuje nadwagę i otyłość oraz wyjaśnia, jak oblicza się BMI. Można jednak dodać więcej informacji o ograniczeniach BMI jako wskaźnika zdrowia np. różnice związane z masą mięśniową. Zdanie: „Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2016 roku na Ziemi żyło ponad 1,9 miliarda ludzi z nadwagą w wieku powyżej 18 lat, a wśród tej grupy ponad 650 milionów było otyłych [WHO]” można skrócić do: „Według

WHO, w 2016 roku ponad 1,9 miliarda dorosłych miało nadwagę, a 650 milionów było otyłych”.

W celu pracy na stronie 22, zamiast „Realizacja powyższych celów pracy jest możliwa...”, lepiej użyć „Realizacja powyższych celów pracy była możliwa...”

Rozdział materiał i metody jest szczegółowy, zawiera istotne informacje dotyczące przeprowadzonych badań, ale w celu poprawy czytelności i stylu, proponowane są drobne poprawki. Np. zamiast: „Badania przeprowadzono na 24 samicach szczura szczepu Wistar, których początkowa masa ciała wynosiła około 220-230 g”, można zastąpić: "Badania przeprowadzono na 24 samicach szczurów szczepu Wistar o początkowej masie ciała wynoszącej około 220-230 g."

W części wyniki warto zwrócić uwagę na interpunkcję i styl, aby tekst był bardziej płynny. Niektóre zdania można skrócić i uprościć, aby poprawić ich czytelność. Np. zamiast: "Średnie dzienne spożycie karmy w grupach D5 i D10 utrzymywało się na zbliżonym poziomie – 14 g/szczura, natomiast w grupie D45 było mniejsze i wynosiło 11 g/szczura (Tabela 2)." Można zastąpić: "Średnie dzienne spożycie karmy wynosiło 14 g na szczura w grupach D5 i D10, podczas gdy w grupie D45 było niższe i wynosiło 11 g na szczura (Tabela 2)." Przy opisach fotografii należałoby dopisać metodę barwienia.

Tekst w dyskusji jest solidny, opiera się na szerokiej bazie literatury, ale wymaga pewnych poprawek głównie stylistycznych i strukturalnych, aby stał się bardziej czytelny, spójny i zgodny z zasadami pisania naukowego. Poprawki uczynią go bardziej zrozumiałym i łatwiejszym do analizy. Np. wyniki dotyczące wpływu diety na stężenie IR i AD we krwi są przedstawione w sposób, który może wydawać się niespójny. Warto bardziej systematycznie przedstawić, te wyniki które były istotne statystycznie, a które nie. Wiele zdań jest bardzo długich i złożonych, co utrudnia czytanie, warto je podzielić na krótsze. W niektórych miejscach można bardziej szczegółowo analizować wyniki, wskazując na ich znaczenie oraz porównać je z wynikami badań innych autorów. W niektórych miejscach tekst zawiera powtarzające się informacje, które można zsyntetyzować. Np. zamiast: "Wzrost masy ciała zachodzi przez zwiększenie masy tkanki tłuszczowej (FM) oraz tkanek miękkich beztłuszczowych (LM), z wyjątkiem otyłości sarkopenicznej, w której obserwuje się obniżenie LM. W przeprowadzonych badaniach zastosowano dietę o różnej zawartości tłuszczu i energii pochodzącej z tłuszczu, co wpłynęło na masę ciała szczurów. Najmniejszą masę ciała cechowały się zwierzęta otrzymujące karmę z najmniejszą zawartością tłuszczu (D5). Natomiast zastosowanie w żywieniu szczurów karmy z większą zawartością tłuszczu spowodowało wzrost masy ciała."

Można zastąpić: "Wzrost masy ciała jest wynikiem zwiększenia ilości tkanki tłuszczowej (FM) oraz tkanek miękkich beztłuszczowych (LM), z wyjątkiem otyłości sarkopenicznej, gdzie obserwuje się spadek LM. W badaniach zastosowano diety o różnej zawartości tłuszczu, co wpłynęło na masę ciała szczurów. Najniższą masę ciała miały zwierzęta otrzymujące dietę niskotłuszczową (D5). Z kolei diety o wyższej zawartości tłuszczu prowadziły do wzrostu masy ciała."

W bibliografii na str. 70 i 85– dwie pozycje napisane są bez spacji

Str. 70: -Jiang X., Hu Y., Zhou Y., Chen J., Sun C., Chen Z., Jing C., Xu L., Liu F., Ni W., Yu X., Chen L.: Irisin protects female mice with LPS-induced endometritis through the AMPK/NF κ B pathway. *Iran J Basic Med Sci.* 2021, 24, 9, 1247-1253

Jo J., Gavrilova O., Pack S., Jou W., Mullen S., Sumner A. E., Cushman S. W., Perival V.: Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol.* 2009, 5, 3)

Str. 85: Yu Z., Guolin M., Honghong W.: Relationship between serum irisin and hydrogen sulfide levels and fracture healing after internal fixation with compression plates in elderly patients with femoral stem fractures. *Chin Med*, 2022, 17:1221

Zang H., Jiang F., Cheng X., Xu H., Hu X.: Serum adropin levels are decreased in Chinese type 2 diabetic patients and negatively correlated with body mass index. *Endocr. J.* 2018, 65, 7, 685-691).

Na str. 82 należałoby uzupełnić bibliografię

Jest: Thapa D., Xie B., Manning J. R., Zhang M., Stoner M. W., Huckestein B. R., Edmunds L. R., Zhang X., Dedousis N. L., O'Doherty R.M., Jurczak M. J., Scott I.: Adropin reduces blood glucose levels in mice by limiting hepatic glucose production. *Physiol. Rep.* 2019, 7

Powinno być: Thapa D., Xie B., Manning J. R., Zhang M., Stoner M. W., Huckestein B. R., Edmunds L. R., Zhang X., Dedousis N. L., O'Doherty R.M., Jurczak M. J., Scott I.: Adropin reduces blood glucose levels in mice by limiting hepatic glucose production. *Physiol. Rep.* 2019 Apr;7(8):e14043. doi: 10.14814/phy2.

Poza drobnymi niedoskonałościami, niniejsza dysertacja jest przykładem poprawnej polszczyzny, a przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej wartości rozprawy. Podsumowując, praca przedstawiona do oceny jest wysoce wartościową publikacją, a opisane w recenzji uchybienia w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej prezentowanej pracy. Staranne omówienie wyników poparte bardzo szeroką bazą piśmiennictwa badań innych autorów, wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta, który wykazał się umiejętnością samodzielnej pracy naukowej i w sposób zwięzły przedstawił wyniki szeroko zakrojonych badań własnych oraz wysnuł logiczne wnioski. Pracę oceniam

bardzo wysoko.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że rozprawa doktorska Pana mgr. Wiesława Ślebody spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. 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). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agata Wawrzyniak