

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Dyscyplina naukowa: Weterynaria

Lek. wet. Cezary Osiak-Wicha

*Rozprawa doktorska*

Egzogenna iryzyna jako modulator rozwoju układu mięśniowo-szkieletowego w  
okresie dojrzewania

***Exogenous Irisin as a Modulator of Musculoskeletal System Development During  
Maturation***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w  
Lublinie

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Marcin B. Arciszewski  
Promotor rozprawy: dr hab. Siemowit Muszyński prof. Uczelni

Lublin, 2026

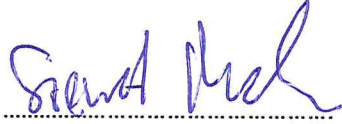
**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 04.09.2026 Podpis promotora 

**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 04.09.2026 Podpis promotora 

**Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej**

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego\* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 04.09.2026 Podpis autora 

\* niepotrzebne skreślić

*Promotorom mojej rozprawy doktorskiej,*

**Szanownemu Panu prof. dr. hab. Marcinowi B. Arciszewskiemu**

*oraz*

**Szanownemu Panu dr. hab. Siemowitowi Muszyńskiemu, prof. uczelni,**

*składam serdeczne podziękowania za opiekę naukową, cenne wskazówki merytoryczne,  
poświęcony czas oraz zaangażowanie w realizację niniejszej rozprawy. Dziękuję za  
stworzenie warunków sprzyjających rozwojowi naukowemu, za cierpliwość, wyrozumiałość  
oraz wsparcie na kolejnych etapach pracy badawczej.*

**Szanownej Pani prof. dr hab. Ewie Tomaszewskiej**

*składam podziękowania za życzliwość, wsparcie oraz pomoc okazywaną od początku  
mojej pracy naukowej. Dziękuję za zaufanie, cenne wskazówki i zaangażowanie, które  
miały istotne znaczenie dla mojego rozwoju naukowego.*

*Dziękuję również pracownikom **Katedry Anatomii i Histologii Zwierząt** za życzliwość,  
pomoc organizacyjną i techniczną oraz wsparcie w realizacji badań.*

## Spis treści

|        |                                                            |    |
|--------|------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | STRESZCZENIE .....                                         | 3  |
| 2.     | ABSTRACT .....                                             | 4  |
| 3.     | WYKAZ SKRÓTÓW .....                                        | 5  |
| 4.     | WSTĘP.....                                                 | 8  |
| 4.1.   | Iryzyna .....                                              | 8  |
| 4.2.   | Charakterystyka wybranych kości układu szkieletowego ..... | 11 |
| 4.2.1. | Żuchwa .....                                               | 11 |
| 4.2.2. | Kość udowa .....                                           | 12 |
| 4.2.3. | Kręgi .....                                                | 14 |
| 4.3.   | Wpływ iryzyny na układ kostny .....                        | 15 |
| 4.4.   | Mięśnie - budowa i różnicowanie włókien mięśniowych .....  | 17 |
| 4.4.1. | Klasyfikacja włókien mięśniowych .....                     | 17 |
| 4.4.2. | Mięsień żwacz .....                                        | 20 |
| 4.4.3. | Mięsień trójgłowy łydki .....                              | 21 |
| 4.4.4. | Mięśnie języka .....                                       | 21 |
| 4.5.   | Miokiny - charakterystyka i mechanizmy działania .....     | 23 |
| 5.     | HIPOTEZY I CELE BADAWCZE .....                             | 26 |
| 6.     | MATERIAŁY I METODY .....                                   | 28 |
| 6.1.   | Doświadczenie .....                                        | 28 |
| 6.2.   | Pobranie materiału .....                                   | 31 |
| 6.3.   | Analiza kości .....                                        | 31 |
| 6.3.1. | Przygotowanie materiału do analiz .....                    | 31 |
| 6.3.2. | Pomiary morfometryczne żuchwy .....                        | 33 |
| 6.3.3. | Ocena gęstości mineralnej i mikroarchitektury kości .....  | 35 |
| 6.3.4. | Analiza mechaniczna kości .....                            | 38 |
| 6.3.5. | Ocena linii kalceinowych .....                             | 39 |
| 6.4.   | Analiza mięśni .....                                       | 43 |
| 6.4.1. | Przygotowanie materiału do analiz .....                    | 43 |
| 6.4.2. | Barwienie z zastosowaniem reakcji NADH-TR .....            | 43 |
| 6.4.3. | Analiza morfometryczna włókien mięśniowych .....           | 48 |
| 6.4.4. | Immunofluorescencyjne wykrywanie dystrofiny .....          | 49 |
| 6.5.   | Analizy statystyczne .....                                 | 52 |
| 7.     | WYNIKI .....                                               | 54 |
| 7.1.   | Masa ciała .....                                           | 54 |
| 7.2.   | Kości .....                                                | 54 |

|         |                                                            |     |
|---------|------------------------------------------------------------|-----|
| 7.2.1.  | Morfometria żuchwy .....                                   | 54  |
| 7.2.2.  | Właściwości strukturalne i geometryczne żuchwy .....       | 56  |
| 7.2.3.  | Właściwości materiałowe żuchwy.....                        | 58  |
| 7.2.4.  | Mineralizacja i mikroarchitektura żuchwy .....             | 60  |
| 7.2.5.  | Dynamiczna histomorfometria żuchwy .....                   | 62  |
| 7.2.6.  | Morfometria kości udowej .....                             | 64  |
| 7.2.7.  | Właściwości strukturalne i geometryczne kości udowej ..... | 67  |
| 7.2.8.  | Właściwości materiałowe kości udowej .....                 | 68  |
| 7.2.9.  | Mineralizacja i mikroarchitektura kości udowej .....       | 70  |
| 7.2.10. | Dynamiczna histomorfometria kości udowej.....              | 72  |
| 7.2.11. | Mineralizacja i mikroarchitektura kręgów .....             | 75  |
| 7.3.    | Mięśnie szkieletowe.....                                   | 76  |
| 7.3.1.  | Ocena integralności sarkolemy.....                         | 76  |
| 7.3.2.  | Mięsień żwacz .....                                        | 77  |
| 7.3.3.  | Mięsień brzuchaty łydki .....                              | 79  |
| 7.3.4.  | Język (mięsień podłużny górny).....                        | 81  |
| 8.      | DYSKUSJA .....                                             | 83  |
| 9.      | WNIOSKI .....                                              | 100 |
| 10.     | PIŚMIENNICTWO .....                                        | 101 |

## 1. STRESZCZENIE

Iryzyna jest proteolitycznie uwalnianym fragmentem białka FNDC5, zaliczanym do miokin ze względu na jej związek z aktywnością mięśni szkieletowych oraz udział w komunikacji między mięśniami a innymi tkankami. Dotychczasowe badania wskazują, że iryzyna może wpływać na metabolizm energetyczny, funkcję mięśni szkieletowych oraz procesy modelowania i przebudowy tkanki kostnej. Większość dostępnych danych dotyczy jednak zwierząt dorosłych, modeli osteoporozy, odciążenia kończyn, starzenia lub zaburzeń metabolicznych. Znacznie mniej wiadomo o działaniu egzogennej iryzyny w okresie dojrzewania, kiedy równocześnie zachodzą intensywne procesy wzrostu, mineralizacji, dojrzewania włókien mięśniowych oraz kształtowania właściwości biomechanicznych szkieletu. Celem pracy było określenie, czy egzogenna iryzyna moduluje rozwój układu mięśniowo-szkieletowego młodych szczurów Wistar oraz czy charakter tej odpowiedzi zależy od lokalizacji anatomicznej, budowy i funkcji analizowanych struktur. Badanie przeprowadzono na samcach i samicach szczurów Wistar od 3. do 7. tygodnia życia. Zwierzęta z grupy doświadczalnej otrzymywały rekombinowaną iryzynę szczurzą w dawce 100 µg/kg masy ciała, podawaną dootrzewnowo raz w tygodniu przez cztery kolejne tygodnie. Analizowano żuchwę, kość udową, kręgi lędźwiowe, mięsień żwacz, mięsień brzuchaty łydki oraz mięsień podłużny górny języka. W kościach oceniano morfometrię, objętościową gęstość mineralną kości beleczkowej, mikroarchitekturę, dynamiczne wskaźniki formowania kości oraz właściwości mechaniczne. W mięśniach oceniano średnicę włókien, liczbę profili włókien na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczka oraz udział poszczególnych klas włókien. Podanie egzogennej iryzyny wywołało zróżnicowaną odpowiedź analizowanych mięśni i kości, bez jednoznacznego wpływu na masę ciała. Uzyskane wyniki wskazują, że egzogenna iryzyna moduluje rozwój układu mięśniowo-szkieletowego młodych szczurów, jednak jej działanie nie ma charakteru jednolitej odpowiedzi anabolicznej. Efekt zależy od lokalizacji anatomicznej, funkcji analizowanej struktury oraz płci zwierząt

**Słowa kluczowe:** FNDC5, Wistar, włókna mięśniowe, micro-CT, biomechanika kości.

## 2. ABSTRACT

Irisin is a proteolytically cleaved fragment of the FNDC5 protein and is classified as a myokine because of its association with skeletal muscle activity and its role in communication between muscle and other tissues. Previous studies indicate that irisin may affect energy metabolism, skeletal muscle function, and processes involved in bone modeling and remodeling. However, most available data concern adult animals, models of osteoporosis, limb unloading, aging, or metabolic disorders. Much less is known about the effects of exogenous irisin during maturation, when growth, mineralization, muscle fiber development, and the formation of biomechanical properties of the skeleton occur simultaneously. The aim of this study was to determine whether exogenous irisin modulates the development of the musculoskeletal system in young Wistar rats and whether the character of this response depends on the anatomical location, structure, and function of the analyzed tissues. The study was performed on male and female Wistar rats from 3 to 7 weeks of age. Animals from the experimental group received recombinant rat irisin at a dose of 100 µg/kg body weight, administered intraperitoneally once weekly for four consecutive weeks. The mandible, femur, lumbar vertebrae, masseter muscle, gastrocnemius muscle, and superior longitudinal muscle of the tongue were analyzed. In bone tissue, morphometry, trabecular volumetric bone mineral density, microarchitecture, dynamic indices of bone formation, and mechanical properties were assessed. In muscle tissue, fiber diameter, the number of fiber profiles per 1 mm<sup>2</sup> of fascicle area, and the proportion of individual fiber classes were evaluated. Administration of exogenous irisin induced a differentiated response in the analyzed muscles and bones, without a clear effect on body weight. The obtained results indicate that exogenous irisin modulates the development of the musculoskeletal system in young rats; however, its action does not represent a uniform anabolic response. The effect depends on anatomical location, the function of the analyzed structure, and sex.

**Keywords:** FNDC5, Wistar rat, muscle fibers, micro-CT, bone biomechanics.

### 3. WYKAZ SKRÓTÓW

**ActRIIB** – receptor aktywiny typu IIB

**ALP** – fosfataza alkaliczna, *alkaline phosphatase*

**AMPK** – kinaza białkowa aktywowana AMP, *AMP-activated protein kinase*

**ANOVA** – analiza wariancji, *analysis of variance*

**ARRIVE** – *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*

**BAT** – brunatna tkanka tłuszczowa, *brown adipose tissue*

**BDNF** – mózgowy czynnik neurotroficzny, *brain-derived neurotrophic factor*

**BFR/BS** – tempo tworzenia kości odniesione do powierzchni kości, *bone formation rate/bone surface*

**BMD** – gęstość mineralna kości, *bone mineral density*

**BMP/SMAD** – szlak sygnałowy białek morfogenetycznych kości i białek SMAD, *bone morphogenetic protein/SMAD signaling pathway*

**BS** – powierzchnia kości, *bone surface*

**BV/TV** – objętość kości odniesiona do objętości całkowitej, *bone volume/tissue volume*

**CaHA** – hydroksyapatyt wapnia, *calcium hydroxyapatite*

**DAB** – 3,3'-diaminobenzzydina

**dLS** – powierzchnia podwójnie znakowana, *double-labeled surface*

**DPX** – medium do zamykania preparatów na bazie ksylenu, *distyrene, plasticizer and xylene*

**E** – pozorny moduł Younga

**ERK1/2** – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2, *extracellular signal-regulated kinases 1/2*

**FD** – wymiar fraktalny, *fractal dimension*

**FITC** – izotiocyanian fluoresceiny, *fluorescein isothiocyanate*

**F<sub>max</sub>** – siła maksymalna

**FNDC5** – białko zawierające domenę fibronektyny typu III 5, *fibronectin type III domain-containing protein 5*

**F<sub>yield</sub>** – siła przy granicy sprężystości

**GLUT4** – transporter glukozy typu 4, *glucose transporter type 4*

**HRP** – peroksydaza chrzanowa, *horseradish peroxidase*

**IL-6** – interleukina 6

**IL-15** – interleukina 15

**IRY** – grupa otrzymująca egzogenną iryzynę

**I<sub>x</sub>** – osiowy moment bezwładności przekroju poprzecznego

**JAK/STAT3** – szlak kinaz Janusowych i białka STAT3, *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway*

**KON** – grupa kontrolna

**MAR** – szybkość apozycji mineralnej, *mineral apposition rate*

**MAPK** – kinazy białkowe aktywowane mitogenami, *mitogen-activated protein kinases*

**micro-CT** – mikrotomografia komputerowa, *micro-computed tomography*

**MHC/MyHC** – ciężki łańcuch miozyny, *myosin heavy chain*

**MS/BS** – powierzchnia mineralizująca odniesiona do powierzchni kości, *mineralizing surface/bone surface*

**mTOR** – mechanistyczny cel rapamycyny, *mechanistic target of rapamycin*

**MYH7** – ciężki łańcuch miozyny 7, marker włókien typu I

**NADH** – zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

**NADH-TR** – reakcja reduktazy tetrazoliowej NADH, *NADH-tetrazolium reductase reaction*

**NBT** – błękit nitrotetrazoliowy, *nitro blue tetrazolium*

**O.C.T.** – medium do zatapiania tkanek w kriostacie, *optimal cutting temperature compound*

**PBS** – buforowana fosforanami sól fizjologiczna, *phosphate-buffered saline*

**PGC-1 $\alpha$**  – koaktywator receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma 1 $\alpha$ , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

**PI3K/Akt** – szlak kinazy fosfatydyloinozytolu 3 i kinazy białkowej B, *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway*

**PRDM16** – białko domeny PR/SET 16, *PR/SET domain 16*

**RBW** – względna masa kości, *relative bone weight*

**ROI** – region zainteresowania, *region of interest*

**RTU** – gotowe do użycia, *ready to use*

**Runx2** – czynnik transkrypcyjny związany z białkiem runt 2, *runt-related transcription factor 2*

**SEM** – błąd standardowy średniej, *standard error of the mean*

**sLS** – powierzchnia pojedynczo znakowana, *single-labeled surface*

**Smad2/3** – białka SMAD 2/3 uczestniczące w przekazywaniu sygnału TGF- $\beta$

**Tb.N** – liczba beleczek kostnych, *trabecular number*

**Tb.Sp** – separacja beleczek kostnych, *trabecular separation*

**Tb.Th** – grubość beleczek kostnych, *trabecular thickness*

**TGF- $\beta$**  – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ , *transforming growth factor beta*

**TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*

**UCP1** – białko rozprzegające 1, *uncoupling protein 1*

**VOI** – objętość zainteresowania, *volume of interest*

**WAT** – biała tkanka tłuszczowa, *white adipose tissue*

**W<sub>max</sub>** – praca do osiągnięcia maksymalnego obciążenia

**W<sub>yield</sub>** – praca do granicy sprężystości

**$\epsilon_{max}$**  – odkształcenie maksymalne

**$\epsilon_{yield}$**  – odkształcenie przy granicy sprężystości

**$\sigma_{max}$**  – naprężenie maksymalne

**$\sigma_{yield}$**  – naprężenie przy granicy sprężystości

## 4. WSTĘP

### 4.1. Iryzyna

Iryzyna, opisana po raz pierwszy przez Boström i in. w 2012 roku, jest proteolitycznie uwalnianym fragmentem białka FNDC5, zaliczanym do miokin ze względu na ekspresję FNDC5 w mięśniach szkieletowych oraz związek jej uwalniania z aktywnością fizyczną (Boström i in., 2012). Obecnie iryzynę opisuje się jednak szerzej niż wyłącznie jako marker wysiłku fizycznego. FNDC5 i iryzynę opisywano również w innych tkankach oraz w różnych stanach fizjologicznych i metabolicznych, w tym w okresie rozwoju, dojrzewania, zaburzeń gospodarki glukozowej i chorób metabolicznych. Wskazuje to, że regulacja obwodowego stężenia iryzyny jest złożona i zależy od wieku, stanu metabolicznego, aktywności mięśni, rodzaju badanego materiału oraz metody oznaczenia. Odkrycie iryzyny zapoczątkowało intensywne badania nad jej rolą w metabolizmie energetycznym, neuroprotekcji, regulacji gospodarki lipidowej i glukozowej oraz funkcjonowaniu bariery jelitowej. Produkcja iryzyny wiąże się z ekspresją genu FNDC5, który koduje białko błonowe składające się z 209 aminokwasów. Proces biosyntezy obejmuje zakotwiczenie FNDC5 w błonie komórkowej oraz proteolityczne odcięcie jego zewnątrz błonowej domeny, co prowadzi do uwolnienia krążącej formy iryzyny (Paoletti & Coccurello, 2024).

Regulacja syntezy iryzyny jest złożonym procesem zależnym od wielu czynników. Najistotniejszym bodźcem jest aktywność fizyczna, szczególnie wysiłek o wysokiej intensywności, który prowadzi do aktywacji koaktywatora transkrypcyjnego PGC-1 $\alpha$  (Gibala i in., 2009; Little i in., 2011). PGC-1 $\alpha$  odgrywa kluczową rolę w mitochondrialnej biogenezie, a jego podwyższona ekspresja w mięśniach pobudza transkrypcję *FNDC5*, co skutkuje wzrostem poziomu iryzyny w krwiobiegu (Boström i in., 2012; Saponaro i in., 2024). Ponadto, wykazano, że ekspozycja na niską temperaturę stymuluje wydzielanie iryzyny, co jest mechanizmem adaptacyjnym organizmu do warunków środowiskowych wymagających wzmożonej termogenezy (Sadier i in., 2024). Poziom iryzyny we krwi może być również modulowany przez cytokiny prozapalne, takie jak IL-6 i TNF- $\alpha$ , co sugeruje jej rolę w odpowiedzi immunologicznej oraz w procesach regeneracyjnych i naprawczych organizmu (Cutuli i in., 2023).

Działanie iryzyny jest możliwe dzięki jej interakcji z receptorami błonowymi, spośród których najlepiej udokumentowane są integryny klasy  $\alpha$ V, przede wszystkim  $\alpha$ V/ $\beta$ 5,

a prawdopodobnie także  $\alpha V/\beta 1$  (Oguri i in., 2020). Po związaniu z receptorem iryzyna aktywuje wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe uczestniczące w regulacji metabolizmu, proliferacji i adaptacji komórkowej. W komórkach mięśniowych wykazano, że iryzyna zwiększa wychwyt glukozy i poprawia funkcję mitochondrialną poprzez aktywację szlaków AMPK oraz p38-MAPK/PGC-1 $\alpha$  (Lee i in., 2015). Ponadto iryzyna może aktywować szlak ERK1/2, który uczestniczy w proliferacji mioblastów i odpowiedzi adaptacyjnej komórek. Jej wpływ na szlak mTOR również był opisywany, jednak w tym przypadku dane są mniej jednoznaczne i wydają się zależeć od typu komórki oraz modelu eksperymentalnego (Kim i in., 2018; Myint i in., 2021).

Jednym z ważnych efektów biologicznych przypisywanych iryzynie jest jej zdolność do indukowania brunatnienia białej tkanki tłuszczowej (WAT). Proces ten prowadzi do pojawiania się w obrębie WAT adipocytów beżowych (beige/brite), wykazujących cechy termogeniczne, w tym zwiększoną ekspresję UCP1 oraz większą aktywność mitochondrialną (Boström i in., 2012; Wu i in., 2012). Adipocyty beżowe stanowią populację odrębną od klasycznych adipocytów brunatnych tworzących brunatną tkankę tłuszczową (BAT), chociaż po aktywacji mogą wykazywać zbliżone właściwości termogeniczne (Harms & Seale, 2013). UCP1 uczestniczy w rozprężaniu fosforylacji oksydacyjnej, umożliwiając rozpraszanie energii pochodzącej z utleniania substratów metabolicznych w postaci ciepła. Iryzyna może nasilać program termogeniczny adipocytów WAT, zwiększając m.in. ekspresję UCP1 i innych genów związanych z termogenezą, co prowadzi do zwiększenia wydatku energetycznego i utleniania substratów metabolicznych (Aladag i in., 2023; J. Qi i in., 2022).

Rola iryzyny w homeostazie glukozy i metabolizmie węglowodanów została dobrze udokumentowana. Badania wykazały, że hormon ten zwiększa wychwyt glukozy przez mięśnie szkieletowe poprzez aktywację transportera GLUT4, co prowadzi do obniżenia poziomu cukru we krwi i poprawy insulinowrażliwości. Ponadto, iryzyna redukuje lipogenezę w hepatocytach i sprzyja utlenianiu kwasów tłuszczowych, co ma szczególne znaczenie w kontekście leczenia chorób metabolicznych, takich jak cukrzyca typu 2 oraz niealkoholowe stłuszczenie wątroby (Reddy i in., 2023).

Coraz więcej danych wskazuje również na neuroprotektoryjne właściwości iryzyny. Badania eksperymentalne wykazały, że iryzyna pochodząca z krążenia może docierać do ośrodkowego układu nerwowego, a zwiększenie jej obwodowego stężenia poprawiało

funkcje poznawcze w zwierzęcych modelach choroby Alzheimera (Islam i in., 2021; Xu i in., 2023). Z działaniem FNDC5/iryzyny wiąże się m.in. zwiększenie ekspresji BDNF w hipokampie, istotnego dla plastyczności synaptycznej i funkcji poznawczych (Wrann i in., 2013). W modelach choroby Alzheimera obniżenie ekspresji FNDC5/iryzyny wiązało się z zaburzeniami plastyczności synaptycznej i pamięci, natomiast zwiększenie jej dostępności częściowo odwracało te zmiany (Lourenco i in., 2019). Neuroprotektoryjne działanie iryzyny wiązano także z modulacją neurozapalenia, stresu oksydacyjnego, funkcji mitochondrialnych oraz przeżywalności neuronów, dlatego jest ona rozpatrywana jako potencjalny cel przyszłych strategii terapeutycznych w chorobach neurologicznych (J.-Y. Qi i in., 2022; Tang i in., 2023).

Dodatkowo, iryzyna wykazuje zdolność do wzmacniania bariery jelitowej, co jest istotnym aspektem jej działania w kontekście zdrowia metabolicznego. Badania wykazały, że hormon ten zwiększa syntezę białek połączeń ścisłych w nabłonku jelitowym, takich jak kładyna i okładyna, co ogranicza przepuszczalność bariery i chroni organizm przed translokacją patogenów oraz toksyn do krwiobiegu (Pesce i in., 2020). Uszkodzenie bariery jelitowej często towarzyszy stanom zapalnym oraz chorobom metabolicznym, a iryzyna może odgrywać kluczową rolę w przeciwdziałaniu tym procesom poprzez stabilizację nabłonka i regulację funkcji komórek odpornościowych w błonie śluzowej jelit.

Podsumowując, iryzyna jest cząsteczką o szerokim potencjale biologicznym, której działanie nie ogranicza się do odpowiedzi mięśni na wysiłek fizyczny. Uczestniczy w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów, homeostazy energetycznej, funkcji mitochondrialnych, aktywności tkanki tłuszczowej, odpowiedzi zapalnej oraz komunikacji między mięśniami a innymi narządami (Boström i in., 2012; Maak i in., 2021; Paoletti & Coccurello, 2024). W tym ujęciu iryzyna może być rozpatrywana jako jeden z elementów ogólnoustrojowej adaptacji tkanek, a jej znaczenie biologiczne nie sprowadza się jedynie do roli markera aktywności fizycznej. Ma to szczególne znaczenie w okresie wzrostu, kiedy równocześnie zachodzą intensywne procesy modelowania kości, dojrzewania mięśni szkieletowych i kształtowania ich wzajemnych zależności mechanicznych oraz metabolicznych. Dlatego ocena wpływu egzogennej iryzyny na układ mięśniowo-szkieletowy młodych zwierząt pozwala analizować jej potencjalną rolę w fizjologicznej przebudowie rozwijających się tkanek, bez sprowadzania jej znaczenia wyłącznie do kontekstu wysiłku fizycznego lub leczenia chorób.

## 4.2. Charakterystyka wybranych kości układu szkieletowego

Kość udowa (*os femoris*), żuchwa (*mandibula*) i kręgi (*vertebrae*) reprezentują odmienne typy kości pod względem anatomicznym i funkcjonalnym. Kość udowa jest kością długą, przystosowaną do przenoszenia obciążeń lokomotorycznych, natomiast żuchwa i kręgi należą do kości nieregularnych, których budowa odzwierciedla bardziej złożone funkcje mechaniczne i podporowe. Struktury te różnią się również pochodzeniem rozwojowym, charakterem działających obciążeń, udziałem tkanki korowej i beleczkowej oraz zakresem adaptacji do czynników biochemicznych i mechanicznych. Z tego względu stanowią użyteczny model do oceny czy działanie iryzyny na tkankę kostną ma charakter uogólniony, czy zależy od lokalizacji anatomicznej i funkcji biomechanicznej danej kości.

### 4.2.1. Żuchwa

Żuchwa, należąca do kości twarzy, rozwija się w obrębie pierwszego łuku gardłowego. Jej szkieletowe elementy powstają głównie z mezenchymy pochodzenia grzebienia nerwowego, a zasadnicza część trzonu i gałęzi żuchwy kostnieje na drodze kostnienia śródbłoniastego. Odróżnia ją to od typowych kości długich kończyn, które wywodzą się z mezodermy płytki bocznej i rozwijają się głównie przez kostnienie śródchrzęstne. Architektura żuchwy jest przystosowana do przenoszenia sił generowanych przez mięśnie żucia, przede wszystkim mięsień żwacz, mięsień skroniowy oraz mięśnie skrzydłowe, które podczas aktu żucia wywołują złożone obciążenia ściskające, zginające, skrętne i ścinające (Tani i in., 2020; Yuan & Chai, 2019).

Mikroarchitektura żuchwy wykazuje dużą zawartość istoty zbitnej i wysoką gęstość mineralną, szczególnie w obszarach wyrostka dziobiastego i trzonu, co umożliwia przenoszenie znacznych obciążeń punktowych generowanych podczas gryzienia i rozdrabniania pokarmu (Dong i in., 2024; M. Zhang i in., 2025). Ze względu na brak funkcji podporowej związanej z przenoszeniem masy ciała, żuchwa podlega innym warunkom mechanicznym niż kości kończyn. Jej modelowanie i przebudowa są kształtowane przede wszystkim przez lokalne oddziaływania związane z czynnością mięśni żucia, obecnością zębów i przyzębia, erupcją zębów oraz wzrostem części twarzowej czaszki (Buvinic i in., 2020; Huang i in., 2003; Riddle & Clemens, 2017). Jednocześnie żuchwa, podobnie jak inne elementy szkieletu, pozostaje pod wpływem ogólnoustrojowych regulatorów metabolizmu kostnego, w tym hormonów, cytokin i miokina. Jak podkreśla Marcé-Nogué, żuchwa pełni kluczową rolę w przetwarzaniu pokarmu, ponieważ

bezpośrednio przenosi siły generowane przez mięśnie żucia na pokarm za pośrednictwem zębów, jest więc nie tylko biernym elementem szkieletowym, ale aktywnym uczestnikiem aktu odżywiania (Marcé-Nogué, 2020). Modele biomechaniczne pokazują, że jej budowa wykazuje wyraźne przystosowania do rodzaju przyjmowanego pokarmu i charakterystyki ugryzienia, co obserwuje się zarówno na poziomie kształtu, jak i grubości oraz ukierunkowania beleczek kostnych. W przeciwieństwie do kości kończyn, które są silnie związane z obciążeniami podporowymi i lokomotorycznymi, żuchwa jest przystosowana do znoszenia lokalnych sił żucia, w tym obciążeń punktowych i momentów zginających działających zwłaszcza w okolicach wyrostka kłykciowego i trzonu. Dzięki temu możliwe jest efektywne przetwarzanie szerokiego spektrum typów pokarmu, od miękkiego po twardy, co potwierdzają badania porównawcze międzygatunkowe wykorzystujące analizę metodą elementów skończonych (Marcé-Nogué, 2020).

#### 4.2.2. Kość udowa

W przeciwieństwie do żuchwy, kość udowa reprezentuje klasyczny przykład kości długiej należącej do szkieletu kończyn. Jej elementy szkieletowe wywodzą się z mezenchymy mezodermy płytki bocznej, która w obrębie zawiązka kończyny ulega kondensacji i różnicowaniu w kierunku śródchrzęstnego modelu kości. Dalszy rozwój kości udowej przebiega przez kostnienie śródchrzęstne, w którym pierwotny model chrzęstny jest stopniowo mineralizowany i zastępowany przez tkankę kostną. Ten sposób osteogenezy umożliwia kontrolowany wzrost długości i grubości kości w okresie rozwoju, co ma kluczowe znaczenie w kontekście adaptacji do rosnących obciążeń biomechanicznych (Marín-Llera i in., 2019).

Anatomicznie kości długie składają się z długiego trzonu (diafizy) zbudowanego głównie z istoty zbitej (kompaktowej), oraz dwóch nasad (epifiz) o strukturze beleczkowatej (gąbczastej), które umożliwiają efektywne amortyzowanie i redystrybucję sił działających podczas ruchu i obciążania kończyny. Istota zbita zapewnia wytrzymałość na zginanie i skręcanie, natomiast struktura beleczkowa działa jak rusztowanie adaptacyjne, którego mikroarchitektura zmienia się w odpowiedzi na siły działające w obrębie stawów biodrowego i kolanowego (Ferretti i in., 2001).

Procesy modelowania i przebudowy kości długich są związane z lokalnym środowiskiem mechanicznym. Klasyczne prawo Wolffa zakłada, że kształt i struktura kości dostosowują się do działających na nie obciążeń, natomiast jego współczesnym

rozwinięciem jest teoria mechanostatu Frosta. Zgodnie z tą koncepcją odpowiedź kości zależy przede wszystkim od lokalnego poziomu odkształceń mechanicznych oraz przekroczenia progów prowadzących do utrzymania, tworzenia lub resorpcji tkanki kostnej (Frost, 1994; Pearson & Lieberman, 2004). Miejscowo zwiększone odkształcenia mogą nasilać aktywność kościotwórczą, prowadząc do pogrubienia warstwy korowej i reorganizacji beleczek. Mechanotransdukcja, czyli proces, w którym komórki kostne reagują na bodźce mechaniczne, zachodzi głównie z udziałem osteocytów, które odbierają bodźce mechaniczne i przekazują sygnały regulujące aktywność osteoblastów i osteoklastów (Frost, 2004; Iordachescu i in., 2021).

Kość udowa jako kość długa kończyny miednicznej, jest dobrym modelem do oceny zależności między wzrostem, geometrią, mikroarchitekturą i właściwościami mechanicznymi szkieletu. Łączy rozbudowany trzon korowy, istotny dla odporności na zginanie i skręcanie, z przynasadą zawierającą kość beleczkową, której organizacja odzwierciedla lokalne warunki obciążenia w pobliżu stawów. Dzięki temu umożliwia równoczesną ocenę parametrów mineralizacji, struktury beleczkowej, geometrii przekroju oraz odpowiedzi mechanicznej całej kości (Colaïanni i in., 2015; Liu i in., 2023; Polk i in., 2000; Qiao i in., 2016; Sun i in., 2022).

U zwierząt czworonożnych, w tym u szczurów, kość udowa stanowi jeden z głównych elementów kończyny miednicznej uczestniczących w podporze ciała, lokomocji i generowaniu siły napędowej. Podczas chodu, biegu i skoku przenosi obciążenia osiowe, zginające i skrętne, wynikające z kontaktu kończyny z podłożem oraz z działania mięśni obręczy miednicznej i uda. W okresie wzrostu kość ta podlega intensywnemu wydłużaniu, modelowaniu trzonu oraz przebudowie części przynasadowej, dzięki czemu jej geometria i mikroarchitektura są dostosowywane do narastających obciążeń mechanicznych. Trzon kości udowej, zbudowany głównie z kości korowej, warunkuje odporność na zginanie i skręcanie, natomiast nasady i przynasady, bogate w kość beleczkową, uczestniczą w rozpraszaniu obciążeń przenoszonych przez stawy biodrowy i kolanowy. Z tego względu kość udowa jest często wykorzystywana jako model kości długiej w badaniach nad wzrostem, mineralizacją, mikroarchitekturą i właściwościami mechanicznymi szkieletu u gryzoni (Monsees i in., 2022; Polk i in., 2000; Turner, 2006).

### 4.2.3. Kręgi

Kręgi jako element szkieletu osiowego wykazują znaczące różnice morfologiczne i funkcjonalne względem kości kończyn czy żuchwy, co wynika zarówno z ich budowy, jak i pełnionej roli biomechanicznej. Są one zbudowane w przeważającej mierze z istoty gąbczastej, która wypełnia trzon kręgu i otoczona jest cienką warstwą istoty zwartej (korowej), pełniącej funkcję ochronną i stabilizującą (Sievänen, 2000). Taka organizacja zapewnia kompromis między wytrzymałością a elastycznością, cechy niezbędne do przenoszenia i tłumienia złożonych sił działających na kręgosłup.

W odróżnieniu od kości długich kończyn, w których obciążenia są względnie jednorodne (np. głównie osiowe i liniowe), kręgosłup narażony jest na siły kompresyjne, ścinające, skrętne oraz zginające, które działają w zmiennych wektorach w zależności od pozycji ciała, chodu, ruchów ogona czy interakcji z otaczającą muskulaturą (Adams & Dolan, 2005; Panjabi & White, 1980). Co więcej, sposób rozchodzenia się sił mechanicznych w obrębie kręgów może znacząco różnić się między segmentami, np. kręgi piersiowe, uczestniczące w podparciu klatki piersiowej, są bardziej odporne na zginanie, podczas gdy kręgi lędźwiowe muszą znosić znaczne siły kompresyjne związane z podparciem tułowia i ruchem kończyn (Yavropoulou & Yovos, 2016).

Pod względem rozwoju embriologicznego, kręgi pochodzą z komórek sklerotomów somitów mezodermy przyosiowej, a ich mineralizacja przebiega w drodze kostnienia śródchrzęstnego, podobnie jak w kościach długich (Fleming i in., 2015). Jednakże, z uwagi na unikalne warunki obciążenia oraz ograniczoną ekspozycję na intensywne bodźce mechaniczne generowane przez ciężar ciała (w porównaniu z kością ramienną czy udową), tempo remodelingu i mineralizacji kręgów jest niższe, a ich odpowiedź adaptacyjna mniej dynamiczna (Clarke, 2008; Iordachescu i in., 2021; Warner i in., 2006). W badaniach wykazano, że kręgi są mniej wrażliwe na zmiany obciążenia mechanicznego niż kości kończyn, co może mieć związek z różnicami w aktywności osteocytów i gęstości naczyń krwionośnych (Christiansen & Bouxsein, 2010).

Znaczącą cechą wyróżniającą kręgi jest również ich segmentacja i modułarna budowa, pozwalająca na elastyczne przenoszenie sił i kompensację ruchów całego tułowia. Dzięki temu kręgosłup zachowuje sztywność niezbędną do ochrony rdzenia kręgowego, przy jednoczesnym umożliwieniu zakresu ruchu dostosowanego do potrzeb lokomotorycznych danego gatunku. W zwierzętach czworonożnych takich jak szczury, kręgi

piersiowo-lędźwiowe są szczególnie narażone na przeciążenia, co sprawia, że stanowią istotny punkt odniesienia przy badaniu remodelingu kostnego i działania czynników anabolicznych, takich jak miokiny (Lelard i in., 2006; Smit, 2002).

Pomimo rosnącej liczby danych wskazujących na osteoanaboliczny potencjał iryzyny, nadal brakuje wystarczających badań bezpośrednio oceniających jej wpływ na tkankę kostną kręgow. Dostępne obserwacje kliniczne sugerują jednak, że iryzyna może pozostawać w związku z parametrami kostnymi układu osiowego, ponieważ wykazano dodatnią zależność pomiędzy jej stężeniem a gęstością mineralną kości, a niższe stężenia iryzyny wiązano również z obecnością złamań osteoporotycznych kręgow. Wskazuje to, że tkanka kostna kręgow może stanowić istotny cel działania iryzyny, choć mechanizmy tego oddziaływania wymagają dalszych badań (Anastasilakis i in., 2014; Colaianni i in., 2021). Oznacza to, że efekty tej miokiny mogą być regionowo specyficzne, co uzasadnia potrzebę badań porównawczych w różnych lokalizacjach anatomicznych, takich jak żuchwa, kręgi i kości kończyn.

#### **4.3. Wpływ iryzyny na układ kostny**

W kontekście układu kostnego iryzyna była początkowo opisywana głównie jako czynnik o działaniu proosteogennym. W badaniach doświadczalnych wykazano, że może zwiększać aktywność osteoblastów, nasilać ekspresję markerów osteogenezy, takich jak Runx2, ALP i osteokalcyna, oraz sprzyjać mineralizacji macierzy kostnej (Colaianni i in., 2015; Qiao i in., 2016; Xue i in., 2022). Opisywano również jej wpływ na szlaki sygnałowe zależne od integryn  $\alpha V$ , które uczestniczą w przekazywaniu sygnału iryzynowego w komórkach tkanki kostnej (H. Kim i in., 2018), a w badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że iryzyna poprawia gęstość mineralną i mikroarchitekturę kości długich, w tym udowej, czego wyrazem był m.in. wzrost ekspresji markerów różnicowania osteoblastycznego, takich jak Runx2, ALP i osteokalcyna, obserwowany na poziomie mRNA i/lub białka w zależności od zastosowanego modelu eksperymentalnego (Kan i in., 2022; Kornel i in., 2021; Sun i in., 2022).

Działanie to wydaje się silniejsze w strukturach intensywnie obciążanych mechanicznie, co może wynikać z synergii między sygnałami biomechanicznymi a aktywnością miokin. W przypadku żuchwy, która nie podlega wpływowi grawitacyjnemu w takim samym stopniu jak kończyny dolne, mechanizmy odpowiedzi na iryzynę mogą różnić się jakościowo i ilościowo. Badania nad wpływem obciążenia mechanicznego na

zuchwę wskazują, że siły żucia, a nie masa ciała, są głównym czynnikiem remodelującym jej strukturę (Inou i in., 1996). To sugeruje, że iryzyna może działać tutaj bardziej poprzez wpływ na mięśnie żucia i ich interakcje z kością, niż przez systemowe mechanizmy aktywacji kostnej obserwowane w kościach długich. Dlatego w żuchwie, mimo że iryzyna również zwiększa aktywność osteoblastów, efekty są mniej wyraźne i ograniczone głównie do obszarów o wysokim napięciu mięśniowym (Dong i in., 2024; M. Zhang i in., 2025). Podobnie w kręgach obserwowano ochronny wpływ iryzyny na strukturę bełczkowatą, wyrażający się ograniczeniem utraty masy kostnej i poprawą parametrów wytrzymałościowych, co wskazuje, że działanie tej miokiny obejmuje również kości szkieletu osiowego (Storlino i in., 2023). Różnice te wynikają także z tempa remodelingu, najwyższe obserwuje się w kościach długich, gdzie cykle przebudowy są intensywne, natomiast w żuchwie i kręgach tempo to jest niższe, co może wpływać na opóźnioną odpowiedź na czynniki endokrynne. Co więcej, badania porównawcze wskazują, że kości rozwijające się na drodze kostnienia śródbłoniastego i śródchrzęstnego różnią się pod względem pochodzenia komórkowego, organizacji tkankowej oraz regulacji szlaków sygnałowych zaangażowanych w osteogenezę, co może stanowić podłoże ich odmiennej reaktywności biologicznej na czynniki regulacyjne (Galea i in., 2021; Shah i in., 2021).

Jednocześnie działanie iryzyny w kości nie powinno być traktowane jako wyłącznie osteoanaboliczne. Dostępne dane wskazują, że jej efekt zależy od dawki, czasu ekspozycji, wieku zwierząt, lokalizacji anatomicznej oraz stanu metabolicznego i mechanicznego szkieletu (Maak i in., 2021). Iryzyna może wpływać nie tylko na osteoblasty, ale również na osteocyty i osteoklasty. Estell i in. wykazali, że iryzyna może bezpośrednio stymulować osteoklastogenezę i resorpcję kości, a wymuszona ekspresja jej prekursora, FNDC5, była związana z niższą masą kostną u myszy (Estell i in., 2020). Oznacza to, że iryzyna może uczestniczyć w regulacji remodelingu kostnego w sposób dwukierunkowy, a jej końcowy efekt zależy od równowagi między tworzeniem i resorpcją tkanki kostnej.

Z tego względu wyniki badań nad iryzyną w układzie kostnym należy interpretować w kontekście badanego modelu. W części doświadczeń, zwłaszcza w modelach utraty masy kostnej, obciążenia lub osteoporozy, iryzyna wykazywała działanie ochronne i sprzyjała poprawie wybranych parametrów kości (Colaianni i in., 2017; Luo i in., 2020; Storlino i in., 2023). Nie wyklucza to jednak odmiennej odpowiedzi w szkielecie młodych, intensywnie rosnących zwierząt, u których równocześnie zachodzą procesy modelowania, mineralizacji, przebudowy kości bełczkowej i dojrzewania właściwości mechanicznych. Dlatego ocena

wpływu egzogennej iryzyny wymaga uwzględnienia nie tylko parametrów mineralizacji i osteogenezy, ale również potencjalnych zmian mikroarchitektury i resorpcji.

Podsumowując, kość udowa, zuchwa i kręgi stanowią trzy odmienne lokalizacje szkieletowe, które różnią się pochodzeniem rozwojowym, budową anatomiczną, udziałem struktury korowej i beleczkowej oraz charakterem działających obciążeń mechanicznych. Kość udowa jako kość długa kończyny, rozwija się z mezodermy płytki bocznej, powstaje na drodze kostnienia śródchrzęstnego i jest przystosowana do przenoszenia obciążeń lokomotorycznych oraz grawitacyjnych. Żuchwa jako kość nieregularna trzewioczaszki pochodzenia grzebienia nerwowego, kostnieje głównie śródbłoniasto i podlega przede wszystkim lokalnym siłom generowanym przez mięśnie żucia. Kręgi, również zaliczane do kości nieregularnych, wywodzą się ze sklerotomów mezodermy przyosiowej, rozwijają się przez kostnienie śródchrzęstne i pełnią funkcję elementów szkieletu osiowego narażonych na złożone obciążenia kompresyjne, zginające i skrętne. Takie zestawienie pozwala ocenić, czy wpływ iryzyny na tkankę kostną u rozwijających się osobników ma charakter ogólnoustrojowy, czy zależy od pochodzenia, architektury i funkcji biomechanicznej analizowanej kości.

#### **4.4. Mięśnie - budowa i różnicowanie włókien mięśniowych**

##### **4.4.1. Klasyfikacja włókien mięśniowych**

Mięśnie szkieletowe, będące podstawowym elementem aparatu ruchu, odgrywają kluczową rolę w generowaniu siły mechanicznej, utrzymaniu postawy oraz wykonywaniu ruchów dowolnych. Zbudowane są z równoległe ułożonych włókien mięśniowych (komórek mięśniowych), które otoczone są błoną podstawową, a następnie łączą się w pęczki otoczone omięśnią, tworząc całościową strukturę mięśnia otoczonego namięśnią. W obrębie pojedynczego włókna obecne są liczne jądra komórkowe położone obwodowo, a także aparat kurczliwy zbudowany z sarkomerów, jednostek funkcjonalnych mięśnia, składających się z filamentów aktynowych i miozynowych (Verdijk i in., 2007).

Histologicznie mięśnie szkieletowe różnią się udziałem włókien o odmiennych właściwościach kurczliwych i metabolicznych, klasyfikowanych przede wszystkim na podstawie ekspresji izoform ciężkich łańcuchów miozyny (MyHC) oraz aktywności enzymatycznej. W uproszczonym ujęciu wyróżnia się włókna typu I, o wolnym i oksydacyjnym profilu, oraz włókna szybkie typu II, obejmujące podtypy IIa, IIx/IIc i IIb,

różniące się szybkością skurczu, potencjałem oksydacyjnym i glikolitycznym oraz odpornością na zmęczenie (Bottinelli & Reggiani, 2000; Schiaffino & Reggiani, 2011). Granice między tymi kategoriami nie zawsze są ostre, ponieważ w mięśniach ssaków występują również włókna hybrydowe, współwyrażające więcej niż jedną izoformę MyHC, szczególnie w obrębie podtypów szybkich IIx/II<sub>d</sub> i IIb (Pette & Staron, 2000; M. Y. Zhang i in., 2010)

Włókna typu I wykazują najwolniejsze tempo skurczu, co wynika z obecności wolnych izoform MyHC (głównie MyHC-I), długiego czasu trwania cyklu skracania oraz niskiej aktywności ATP-azy miozynowej. Ich metabolizm opiera się głównie na fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, co skutkuje wysoką odpornością na zmęczenie. Włókna te są silnie unaczynione i zawierają dużą ilość mioglobiny, co nadaje im ciemnoczerwoną barwę. Ich główną funkcją jest podtrzymywanie długotrwałej, niskointensywnej aktywności, jak np. utrzymanie postawy ciała czy kontrola pozycji głowy i tułowia (Scott i in., 2001; Trovato i in., 2016).

Włókna typu IIa stanowią funkcjonalny kompromis między szybkością a wytrzymałością. Charakteryzują się obecnością szybszych izoform MyHC-IIa, umiarkowaną aktywnością ATP-azy i zdolnością do wykorzystywania zarówno glukozy, jak i produktów przemian tłuszczowych w procesach energetycznych. Dysponują znaczną liczbą mitochondriów i są lepiej unaczynione niż włókna IIb, lecz słabiej niż typ I. Dzięki temu umożliwiają szybkie i relatywnie długotrwałe skurcze, np. podczas aktywności wymagającej zmiennej intensywności, takich jak bieganie czy dynamiczne ruchy kończyn (Hämäläinen & Pette, 1993).

Włókna typu IIb wykazują najwyższą prędkość skurczu i największą siłę skurczową spośród wszystkich typów włókien, jednak ich aktywność energetyczna opiera się niemal wyłącznie na glikolizie beztlenowej, co ogranicza ich odporność na zmęczenie. Są ubogie w mitochondria i kapilary, ale zawierają dużą ilość enzymów glikolitycznych, takich jak kinaza kreatynowa czy dehydrogenaza mleczanowa. Ich obecność dominuje w mięśniach wykonujących krótkotrwałe, maksymalnie intensywne wysiłki, np. w mięśniu trójgłowym ramienia podczas podnoszenia ciężaru (Eggers i in., 2021; Schiaffino & Reggiani, 2011).

Włókna typu IIx, określane u gryzoni również jako IIx/II<sub>d</sub>, należą do włókien szybko-skurczliwych o właściwościach pośrednich między typem IIa a IIb. Charakteryzują się dużą szybkością skurczu, mniejszym potencjałem oksydacyjnym niż włókna IIa, ale

większym niż typowe włókna IIb, oraz znaczną zdolnością do generowania siły w krótkim czasie. W mięśniach ssaków włókna IIx/IIc mogą występować jako odrębna populacja lub jako włókna hybrydowe współwyrażające izoformy MyHC typowe dla włókien IIx/IIc i IIb. Ich obecność odzwierciedla ciągły charakter zróżnicowania włókien szybkich oraz plastyczność fenotypu mięśniowego w odpowiedzi na bodźce czynnościowe i metaboliczne (Pette & Staron, 2000; Schiaffino & Reggiani, 2011; M. Y. Zhang i in., 2010).

Fenotyp włókien mięśniowych jest kształtowany zarówno przez mechanizmy genetyczne, jak i przez czynniki zewnętrzne, w tym wzorzec aktywności nerwowo-mięśniowej, obciążenie mechaniczne, aktywność fizyczną oraz sygnały hormonalne. Ekspresja określonych izoform MyHC stanowi jeden z podstawowych wyznaczników właściwości kurczliwych włókien i może ulegać zmianom w odpowiedzi na zmieniające się wymagania funkcjonalne. Zwiększona i długotrwała aktywność nerwowo-mięśniowa oraz obciążenie mogą sprzyjać transformacji włókien w kierunku wolniejszego i bardziej odpornego na zmęczenie fenotypu. U gryzoni zmiany te mogą przebiegać zgodnie z sekwencją MyHC-IIb  $\rightarrow$  MyHC-IIx/d  $\rightarrow$  MyHC-IIa, a w określonych warunkach również w kierunku MyHC-I (Eggers i in., 2021; Härmäläinen & Pette, 1993; Mukund & Subramaniam, 2020). Z kolei zmniejszenie aktywności nerwowo-mięśniowej lub odciążenie mięśnia może sprzyjać transformacjom w przeciwnym, szybkokurczliwym kierunku. Zjawisko to, określane jako „fiber-type switching”, stanowi jeden z przejawów znacznej plastyczności mięśni szkieletowych, umożliwiającej dostosowanie ich właściwości kurczliwych i metabolicznych do długotrwałych zmian obciążenia i aktywności. Proces ten jest szczególnie widoczny podczas długotrwałego treningu wytrzymałościowego (przekształcanie IIb  $\rightarrow$  IIa  $\rightarrow$  I) lub w warunkach odnerwienia i unieruchomienia (I  $\rightarrow$  IIa  $\rightarrow$  IIb) (Pette & Staron, 2000; Talbot & Maves, 2016).

Funkcjonalne znaczenie typów włókien znajduje odzwierciedlenie w architekturze mięśni i ich przeznaczeniu. Mięśnie statyczne, takie jak mięsień płaszczkowaty, zawierają przewagę włókien typu I, co umożliwia ich długotrwałe napięcie przy minimalnym zużyciu energii. Z kolei mięśnie dynamiczne, np. mięsień dwugłowy uda, charakteryzują się większą zawartością włókien szybkich, umożliwiających generowanie dużej siły w krótkim czasie (Scott i in., 2001).

#### 4.4.2. Mięsień żwacz

Mięsień żwacz (*m. masseter*) należy do podstawowych mięśni żucia i pełni kluczową rolę w generowaniu siły zamykania jamy ustnej oraz w stabilizacji żuchwy podczas aktu gryzienia i rozdrabniania pokarmu. Nie jest on jednak mięśniem jednorodnym ani pod względem budowy, ani funkcji. Badania morfologiczne i immunohistochemiczne wykazały, że u szczura żwacz cechuje się wyraźną heterogenicznością regionalną, obejmującą zarówno skład włókien mięśniowych, jak i ich pole przekroju poprzecznego, część powierzchniowa dominuje we włókna szybkokurczeniowe, natomiast część głęboka zawiera większy udział włókien wolnych i oksydacyjnych, co umożliwia utrzymywanie długotrwałej aktywności podczas żucia (Kawai i in., 2009). W obrębie tego samego mięśnia współistnieją włókna o zróżnicowanym fenotypie kurczeniowym i metabolicznym, przy czym w większości analizowanych regionów dominują włókna szybkie typu IIa i IIx, natomiast włókna typu I są nieliczne lub nieobecne w żwaczu szczura (Sano i in., 2007; Tanaka i in., 2008).

Adaptacyjność żwacza została dobrze udokumentowana, zmiany konsystencji diety czy długotrwałe obciążenia mechaniczne wpływają na proporcje włókien, ich średnicę i aktywność enzymatyczną, świadcząc o wysokiej plastyczności tego mięśnia (Bresin i in., 2000; Sciote i in., 2012). W części powierzchniowej mięśnia wykazano szczególnie wysoką wrażliwość na zmianę obciążeń czynnościowych: u zwierząt karmionych twardą dietą (pokarm wymagający intensywnego gryzienia i rozdrabniania) włókna typu IIa stanowiły około 23,3%, podczas gdy przy diecie miękkiej (pokarm rozdrobniony lub zmiękczone, którego pobieranie wymagało mniejszej aktywności mięśni żucia) ich udział spadał do około 4,2%, czemu towarzyszył wzrost udziału włókien typu IIb. Dane te wskazują, że część powierzchniowa żwacza ma wyraźnie szybki charakter i łatwo ulega adaptacji w kierunku bardziej glikolitycznego fenotypu przy zmniejszeniu obciążenia mechanicznego. Jednocześnie badania regionalne wykazały, że w różnych częściach żwacza proporcje włókien IIa, IIx i IIb nie są jednakowe, a największy udział włókien typu IIb obserwowano w części tylnobocznej warstwy głębokiej (Kawai i in., 2009, 2010). Taka organizacja potwierdza, że żwacz funkcjonuje jako mięsień skompartmentalizowany, w którym poszczególne regiony są wyspecjalizowane do odmiennych zadań biomechanicznych, od generowania dużej siły zwarcia po stabilizację położenia żuchwy podczas długotrwałej aktywności żuciowej.

#### 4.4.3. Mięsień trójgłowy łydki

Mięsień trójgłowy łydki (*m. triceps surae*) stanowi główny zespół mięśniowy odpowiedzialny za generowanie siły napędowej kończyny tylnej u szczura i odgrywa zasadniczą rolę w lokomocji, wybiciu, stabilizacji postawy oraz kontroli stawu skokowego. Kompleks ten obejmuje mięsień płaszczkowaty (*m. soleus*) oraz dwie głowy mięśnia brzuchatego łydki (*m. gastrocnemius*), które różnią się zarówno architekturą, jak i składem włókien mięśniowych. Mięsień płaszczkowaty ma charakter wyraźnie posturalny i zawiera przewagę włókien wolnokurczliwych typu I; u szczura ich udział wynosi około 84–86%, co wiąże się z dużą odpornością na zmęczenie i zdolnością do długotrwałego utrzymywania napięcia. Odmienny profil wykazuje mięsień brzuchaty łydki, w którym dominują włókna szybkie, szczególnie typu IIb i IIx, umożliwiające generowanie krótkotrwałych, silnych i dynamicznych skurczów niezbędnych do napędu kończyny. W ujęciu całego zespołu trójgłowego łydki włókna typu IIb stanowią około 71% całkowitej masy włókien, włókna typu IIx około 18%, włókna typu IIa około 5%, a włókna typu I około 6%, co wskazuje na przewagę fenotypu szybkiego przy równoczesnym zachowaniu komponentu wytrzymałościowego. Taka organizacja sprawia, że mięsień trójgłowy łydki łączy cechy mięśnia napędowego i posturalnego, a jego poszczególne części są wyspecjalizowane do odmiennych zadań biomechanicznych (Delp & Duan, 1996; Eng i in., 2008; Myatt i in., 2011). Zróżnicowanie to ma również charakter adaptacyjny. Wykazano, że trening wytrzymałościowy sprzyja przesunięciu fenotypu w kierunku większego udziału włókien oksydacyjnych, natomiast odciążenie, unieruchomienie lub ograniczenie aktywności prowadzą do zmian w kierunku bardziej glikolitycznym (Roy i in., 1991). Właśnie ta wyraźna wrażliwość na bodźce mechaniczne i metaboliczne sprawia, że mięsień trójgłowy łydki stanowi użyteczny model do badania przebudowy mięśnia szkieletowego w odpowiedzi na czynniki ogólnoustrojowe i lokalne.

#### 4.4.4. Mięśnie języka

Mięśnie języka stanowią szczególny przykład mięśni szkieletowych o bardzo złożonej organizacji czynnościowej, ponieważ uczestniczą zarówno w ruchach precyzyjnych, wymagających wysokiej koordynacji, jak i w czynnościach generujących istotne obciążenia mechaniczne, takich jak pobieranie i transport pokarmu, połykanie, eksploracja jamy ustnej oraz udział w utrzymaniu drożności górnych dróg oddechowych (Kajee i in., 2013; Stål i in., 2003). Z tego względu język nie jest strukturą jednorodną ani

pod względem anatomicznym, ani histochemicznym. Zarówno u ssaków ogólnie, jak i u szczura, w mięśniach języka występują klasyczne fenotypy włókien mięśniowych definiowane przez ekspresję izoform ciężkich łańcuchów miozyny, obejmujące włókna typu I, włókna szybkie typu IIa, IIx oraz IIb (Sokoloff, 2000). Dodatkowo, zwłaszcza u osobników młodych lub w warunkach przebudowy czynnościowej, mogą występować włókna hybrydowe, wykazujące jednoczesną ekspresję więcej niż jednej izoformy MyHC, najczęściej IIa/IIx lub IIx/IIb, a także śladowa obecność rozwojowych izoform miozyny. Taka heterogenność wskazuje, że język jest narządem o dużej plastyczności strukturalnej i czynnościowej (Rahnert i in., 2010).

W ujęciu ogólnym język szczura należy uznać za mięsień z wyraźną przewagą fenotypu szybkiego. Analiza ekspresji mRNA izoform miozyny w trzonie języka (*corpus linguae*) wykazała, że u szczura transkrypty odpowiadające szybkim izoformom MyHC-IIb i MyHC-IIx stanowią łącznie około 98% całkowitej ekspresji MHC, co wskazuje, że narząd ten jest molekularnie zdominowany przez szybkie programy kurczliwe. Należy jednak podkreślić, że dane uzyskane metodą qPCR odnoszą się do całkowitej puli transkryptów w tkance, a więc nie mogą być bezpośrednio utożsamiane z dokładnym odsetkiem poszczególnych włókien ocenianych histologicznie. Niemniej stanowią one bardzo mocny argument przemawiający za tym, że u szczura język, jako całość, ma zasadniczo charakter szybko kurczliwy, z dominacją fenotypów IIx i IIb (Rahnert i in., 2010).

Jednocześnie skład włókien mięśniowych w obrębie języka nie jest jednorodny i zależy zarówno od analizowanego mięśnia, jak i od regionu narządu. Mięśnie wewnętrzne języka, do których należą mięsień podłużny górny (*m. longitudinalis superior*), mięsień podłużny dolny (*m. longitudinalis inferior*), mięsień poprzeczny języka (*m. transversus linguae*) oraz mięsień pionowy języka (*m. verticalis linguae*), odpowiadają przede wszystkim za zmianę kształtu języka, natomiast mięśnie zewnętrzne, w tym mięsień bródkowo-językowy (*genioglossus*), gnykowo-językowy (*hyoglossus*) i rylcowo-językowy (*styloglossus*), uczestniczą głównie w przemieszczaniu języka jako całości (Bailey i in., 2006; Dotiwala & Samra, 2026; Mu & Sanders, 2010).

Badania przeprowadzone na szczurach wykazały, że poszczególne mięśnie języka różnią się wyraźnie profilem włókien mięśniowych, co pozostaje w ścisłym związku z ich funkcją. W mięśniu podłużnym górnym stwierdzono około 13% włókien typu I, 33% włókien typu IIa oraz 54% włókien typu IIx i/lub IIb. Dla mięśnia podłużnego dolnego

wartości te wynosiły odpowiednio 0% dla włókien typu I, 43% dla włókien typu IIa oraz 55% dla włókien typu IIx i/lub IIb. W mięśniu poprzecznym języka wykazano około 17% włókien typu I, 35% włókien typu IIa oraz 47% włókien typu IIx i/lub IIb, natomiast w mięśniu bródkowo-językowym stwierdzono około 24% włókien typu I, 41% włókien typu IIa oraz 37% włókien typu IIx i/lub IIb. Dane te wskazują, że mięśnie wewnętrzne języka, zwłaszcza mięsień podłużny górny i mięsień podłużny dolny, charakteryzują się przewagą szybkich włókien typu IIx/IIb, co odpowiada ich roli w szybkim i precyzyjnym modelowaniu kształtu języka. Z kolei mięsień bródkowo-językowy wykazuje bardziej oksydacyjny profil, z większym udziałem włókien typu I i IIa, co wiąże się z jego większą odpornością na zmęczenie i udziałem w protruzji języka oraz utrzymaniu drożności górnych dróg oddechowych (Brozanski i in., 1993; Fogarty & Sieck, 2021).

Wyniki badań czynnościowych potwierdzają to zróżnicowanie fenotypowe. Mięśnie podłużne, w tym mięsień podłużny górny, generują wysoką maksymalną siłę swoistą, ale jednocześnie wykazują większą podatność na zmęczenie niż mięsień bródkowo-językowy. Wybór mięśnia podłużnego górnego do niniejszego badania jest zatem uzasadniony jego istotną rolą w kształtowaniu ruchów języka, znaczeniem funkcjonalnym w obrębie mięśni wewnętrznych oraz przewagą szybkich włókien mięśniowych, która może sprzyjać uchwyceniu zmian fenotypowych i metabolicznych indukowanych działaniem iryzyny. Mięsień ten stanowi dobry model do oceny potencjalnego wpływu badanego czynnika na strukturę włókien mięśniowych w narządzie o wysokiej plastyczności czynnościowej i dużym zróżnicowaniu histofizjologicznym.

#### 4.5. Miokiny - charakterystyka i mechanizmy działania

Miokiny to białka i peptydy wydzielane przez mięśnie szkieletowe w odpowiedzi na skurcz i aktywność fizyczną, które funkcjonują jako czynniki sygnałowe o działaniu autokrynnym, parakrynnym i endokrynnym. Koncepcja mięśnia jako narządu endokrynnego, zaproponowana przez Pedersena i Febbraio, całkowicie zmieniła postrzeganie fizjologii mięśni. Wykazano, że skurcz mięśniowy prowadzi do wydzielania wielu bioaktywnych cząsteczek, które nie tylko regulują procesy wewnątrz samego mięśnia, lecz także wpływają na metabolizm innych tkanek, takich jak kości, tkanka tłuszczowa, wątroba czy mózg (Das i in., 2020; Hoffmann & Weigert, 2017; Pedersen & Febbraio, 2008).

Do najlepiej poznanych miokin zalicza się IL-6, IL-15, miostatynę, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) oraz iryzynę. Każda z nich pełni odrębną funkcję: IL-6

uczestniczy w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów oraz w odpowiedzi zapalnej; IL-15 wiąże się z regulacją masy mięśniowej i tkanki tłuszczowej; miostatyna działa hamująco na wzrost mięśni, stanowiąc czynnik kataboliczny; natomiast BDNF oraz iryzyna łączą układ mięśniowy z funkcją ośrodkowego układu nerwowego i metabolizmem energetycznym (Das i in., 2020; Hoffmann & Weigert, 2017; Pedersen, 2013).

Mechanizmy działania miokina obejmują aktywację specyficznych receptorów błonowych i wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. IL-6, oddziałując poprzez receptor gp130, aktywuje szlak JAK/STAT3, co prowadzi do zwiększonego wychwytu glukozy przez mięśnie i mobilizacji lipidów z tkanki tłuszczowej (Carey i in., 2006). IL-15 wiąże się z receptorem IL-15R $\alpha$  i aktywuje szlak PI3K/Akt, sprzyjając anabolizmowi mięśniowemu oraz regulacji adipogenezy (Quinn i in., 2009). Z kolei miostatyna, należąca do rodziny TGF- $\beta$ , poprzez receptory ActRIIB i aktywację Smad2/3 hamuje proliferację mioblastów i indukuje procesy degradacji białek (McPherron i in., 1997).

W kontekście interakcji między mięśniami a innymi narządami szczególną uwagę zwraca się na komunikację mięsień-kość. Wydzielane w trakcie aktywności fizycznej miokiny oddziałują na osteoblasty i osteoklasty, regulując procesy formowania i resorpcji kości. Przykładem jest IL-6, która w zależności od warunków może działać pro- lub antyresorpcyjnie, oraz iryzyna, która wykazuje efekt osteoanaboliczny, nasilając ekspresję markerów osteoblastycznych i mineralizację (Colaïanni i in., 2015).

Iryzyna zajmuje szczególne miejsce wśród miokina, ponieważ łączy klasyczne funkcje metaboliczne z bezpośrednim wpływem na tkankę mięśniową i kostną. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że iryzyna stymuluje proliferację i różnicowanie mioblastów poprzez aktywację czynników miogenicznych, takich jak MyoD i myogenina, co sprzyja nie tylko regeneracji, ale także hipertrofii włókien mięśniowych (Reza i in., 2017). Jej działanie obejmuje aktywację szlaków MAPK/ERK oraz p38-MAPK, które regulują cykl komórkowy i fuzję mioblastów w dojrzałe włókna (H. Kim i in., 2018). Ponadto, iryzyna zwiększa ekspresję markerów mitochondrialnych oraz nasila biogenezę mitochondriów, co sprzyja przeprogramowaniu włókien w kierunku fenotypu oksydacyjnego, bardziej odpornego na zmęczenie (Mancinelli i in., 2021).

Istotnym aspektem działania iryzyny jest jej zdolność do ochrony mięśni przed atrofią. W modelach zwierzęcych podawanie iryzyny ograniczało degradację białek kurczliwych w warunkach unieruchomienia lub odnerwienia, a także sprzyjało utrzymaniu

prawidłowej struktury mięśni poprzez regulację autofagii i stresu siateczki śródplazmatycznej (Pan, Xie, i in., 2024). Co więcej, iryzyna modulowała aktywność komórek satelitarnych, kluczowych dla regeneracji mięśni, stymulując ich proliferację i samoodnowę, co skutkowało przyspieszonym odtworzeniem uszkodzonych włókien i poprawą ich funkcji mechanicznej (Guo i in., 2024; Nguyen i in., 2024). Efekt anaboliczny iryzyny przejawia się także w nasileniu syntezy białek mięśniowych, co ma znaczenie w adaptacji do treningu oporowego oraz w warunkach patologicznych, takich jak cukrzyca czy sarkopenia. Zjawisko to wiąże się ze wzrostem aktywności szlaku mTOR oraz zwiększoną ekspresją czynników regulujących translację i metabolizm białek (Arabzadeh i in., 2022; L. Zhang i in., 2025).

Równocześnie iryzyna może uczestniczyć w regulacji metabolizmu włókien mięśniowych, szczególnie poprzez szlaki związane z PGC-1 $\alpha$ , AMPK oraz biogenezą mitochondrialną. Dane doświadczalne wskazują, że iryzyna zwiększa metabolizm oksydacyjny i mitochondrialny w komórkach mięśniowych, natomiast jej wpływ na zmianę udziału poszczególnych typów włókien mięśniowych pozostaje zależny od modelu badawczego i warunków eksperymentalnych (Chen i in., 2021; Mancinelli i in., 2021; Vaughan i in., 2014). Oprócz tego iryzyna wpływa na szeroko rozumiany metabolizm mięśni poprzez regulację szlaków związanych z autofagią, stresem siateczki endoplazmatycznej i homeostazą energetyczną, co pozwala jej działać protekcyjnie w warunkach starzenia i chorób metabolicznych (Balakrishnan & Thurmond, 2022; Pan, Ren, i in., 2024).

W perspektywie endokrynnej iryzyna, podobnie jak inne miokiny, uczestniczy w regulacji komunikacji mięśni z innymi tkankami, w tym z tkanką kostną, gdzie sprzyja procesom anabolicznym, a także z tkanką tłuszczową, nasilając termogenezę i poprawiając wrażliwość insulinową. Dzięki temu jej rola wykracza poza klasyczne działanie lokalne i wpisuje się w szerszą koncepcję mięśnia jako narządu endokrynnego (Das i in., 2020).

## 5. HIPOTEZY I CELE BADAWCZE

Dotychczasowe dane wskazują, że iryzyna może uczestniczyć w regulacji metabolizmu mięśni i kości, jednak jej działanie nie musi mieć jednolitego charakteru we wszystkich elementach układu mięśniowo-szkieletowego. Szczególne znaczenie ma to w okresie intensywnego wzrostu, gdy równocześnie zachodzą procesy dojrzewania włókien mięśniowych, modelowania kości, mineralizacji i kształtowania właściwości mechanicznych szkieletu. Nadal nie wiadomo, czy egzogenne podawanie iryzyny w tym okresie wpływa w podobny sposób na struktury o odmiennym pochodzeniu, budowie anatomicznej i funkcji biomechanicznej.

Hipoteza główna niniejszej rozprawy zakłada, że egzogenna iryzyna moduluje rozwój układu mięśniowo-szkieletowego w okresie dojrzewania, przy czym kierunek i zakres jej działania zależą od budowy anatomicznej oraz funkcji poszczególnych struktur. W konsekwencji jej wpływ na morfologię mięśni oraz modelowanie, mikroarchitekturę i właściwości mechaniczne kości nie jest jednorodny w różnych lokalizacjach anatomicznych.

Na podstawie hipotezy głównej sformułowano następujące hipotezy szczegółowe:

1. Egzogenna iryzyna zmienia rozmiar włókien mięśniowych, gęstość profili włókien na jednostkę powierzchni pęczka oraz profil metaboliczny badanych mięśni szkieletowych.
2. Egzogenna iryzyna modyfikuje mineralizację, mikroarchitekturę oraz dynamiczne wskaźniki formowania kości w badanych lokalizacjach szkieletowych.
3. Zmiany strukturalne kości pod wpływem egzogennej iryzyny przekładają się na zależne od lokalizacji zmiany ich odpowiedzi mechanicznej.
4. Płeć modyfikuje odpowiedź wybranych struktur mięśniowych i kostnych na egzogenną iryzynę.

W celu weryfikacji powyższych hipotez postawiono następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Ocena wpływu egzogennej iryzyny na morfologię włókien mięśniowych w mięśniu żwaczu, mięśniu brzuchatym łydki oraz mięśniu podłużnym górnym języka,

- z uwzględnieniem średnicy włókien, gęstości profili włókien na jednostkę powierzchni pęczka oraz udziału poszczególnych typów włókien.
2. Ocena wpływu egzogennej iryzyny na mineralizację i mikroarchitekturę żuchwy, kości udowej oraz kręgów z zastosowaniem metod obrazowych i histomorfometrycznych.
  3. Ocena wpływu egzogennej iryzyny na dynamiczne wskaźniki formowania kości w wybranych regionach kości korowej i beleczkowej żuchwy oraz kości udowej na podstawie podwójnego znakowania kalceiną.
  4. Ocena wpływu egzogennej iryzyny na właściwości strukturalne, geometryczne i pozorne właściwości materiałowe żuchwy oraz kości udowej z wykorzystaniem trójpunktowego testu zginania i parametrów geometrycznych uzyskanych z analizy micro-CT.
  5. Porównawcza interpretacja wyników uzyskanych dla badanych mięśni i kości w celu określenia czy działanie egzogennej iryzyny ma charakter zbliżony w różnych elementach układu mięśniowo-szkieletowego, czy zależy od lokalizacji anatomicznej, budowy tkankowej i funkcji biomechanicznej analizowanej struktury.

## 6. MATERIAŁY I METODY

### 6.1. Doświadczenie

Badanie przeprowadzono w Ośrodku Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie (nr 31/2024). Wszystkie procedury wykonano zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz zgodnie z zatwierdzonym protokołem doświadczenia.

Do badania wykorzystano młode szczury wędrowne (*Rattus norvegicus*) szczepu Wistar w wieku trzech tygodni, bezpośrednio po odsadzeniu. Zwierzęta pochodziły z Ośrodka Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, wpisanego do rejestru hodowców i dostawców pod numerem 077. Po odsadzeniu zwierzęta przechodziły trzydniowy okres adaptacji do warunków doświadczenia, obejmujący codzienny handling w celu ograniczenia stresu związanego z późniejszym wykonywaniem procedur.

Szczury utrzymywano w kontrolowanych warunkach środowiskowych: temperatura 20–24°C, wilgotność względna 45–65%, wymiana powietrza co najmniej 15 razy na godzinę oraz stały cykl światło-ciemność 12/12 h. Światło włączano stopniowo między godziną 8:30 a 9:00, a po 12 godzinach fazy jasnej wygaszano je w analogiczny sposób. Poziom hałasu w pomieszczeniach dla zwierząt nie przekraczał 60 dB. Zwierzęta utrzymywano w indywidualnie wentylowanych klatkach o powierzchni 800 cm<sup>2</sup>, po 4 osobniki tej samej płci w klatce. Środowisko bytowania wzbogacono o domki dla szczurów oraz klocki drewniane. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody oraz standardowej paszy laboratoryjnej dla szczurów. Stan zwierząt kontrolowano codziennie, uwzględniając ogólny stan kliniczny, zachowanie, pobieranie paszy i wody oraz ewentualne objawy dyskomfortu. Zakres raportowanych warunków utrzymania zwierząt odpowiada zaleceniom ARRIVE 2.0 dotyczącym opisu doświadczeń in vivo, obejmującym warunki środowiskowe, sposób utrzymania, żywienie, wzbogacenie środowiska i monitorowanie zwierząt (Sert i in., 2020). Po okresie adaptacji szczury losowo przydzielono do dwóch grup: kontrolnej, otrzymującej nośnik (KON; n = 16 samców i 16 samic), oraz grupy otrzymującej egzogenną iryzynę (IRY; n = 16 samców i 16 samic). Randomizację przeprowadzono osobno dla samców i samic, tak aby w każdej grupie zachować równą liczebność zwierząt obu płci. Jednostką eksperymentalną było pojedyncze zwierzę.

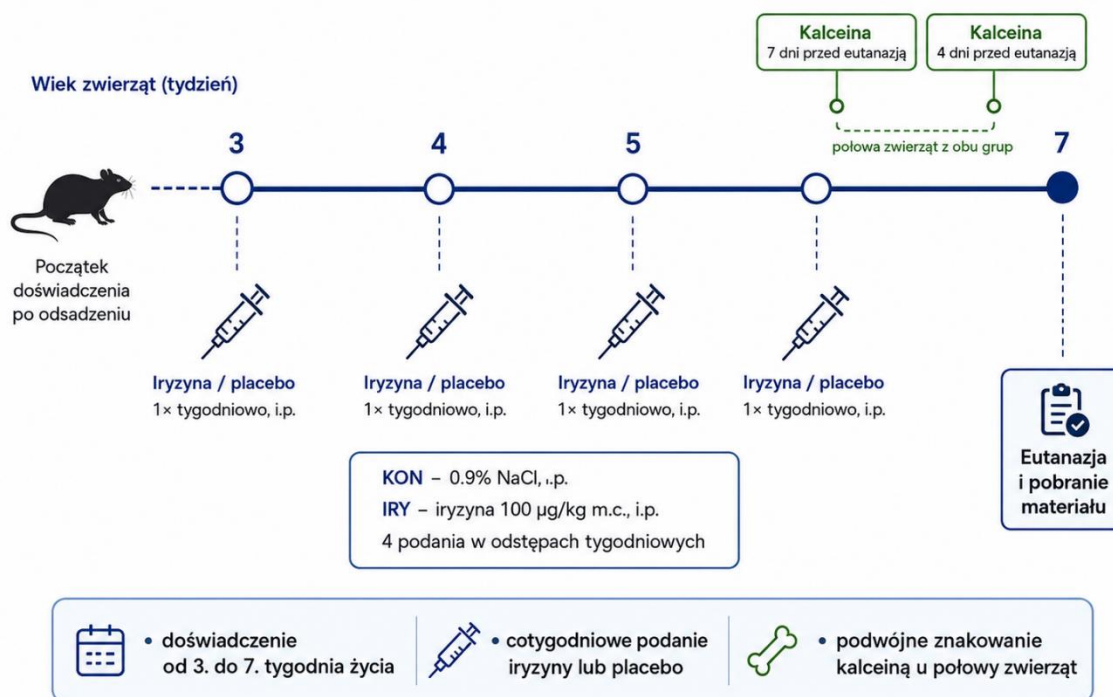
Eksperyment rozpoczęto w trzecim tygodniu życia zwierząt i prowadzono do końca siódmego tygodnia życia. Zwierzęta ważono raz w tygodniu, bezpośrednio przed podaniem badanego związku lub nośnika, a aktualną masę ciała wykorzystywano do obliczenia dawki iryzyny. Procedury iniekcyjne wykonywano w stałym przedziale czasowym, między godziną 10:00 a 13:00. Zwierzętom z grupy IRY podawano dootrzewnowo rekombinowaną iryzynę szczurzą (Cusabio, Wuhan, Chiny; nr kat. CSB-EP810392RA1) w dawce 100 µg/kg masy ciała, raz w tygodniu przez cztery kolejne tygodnie. Iryzynę podawano w 100 µl jałowego roztworu NaCl 0.9%. Stężenie roztworu roboczego dostosowywano do aktualnej masy ciała zwierzęcia, tak aby zachować stałą dawkę 100 µg/kg m.c. przy stałej objętości iniekcji. Zwierzęta z grupy KON otrzymywały dootrzewnowo 100 µl jałowego roztworu NaCl 0.9%. Zastosowany schemat podawania iryzyny oparto na wcześniejszych badaniach doświadczalnych, w których rekombinowaną iryzynę stosowano u gryzoni w dawce 100 µg/kg masy ciała w modelach dotyczących tkanki kostnej, odciążenia kończyn, starzenia, osteoporozy i gojenia złamań (Colaïanni i in., 2015, 2017, 2021; Storlino i in., 2020). W niniejszym badaniu zastosowano czterotygodniowy protokół podań obejmujący okres od 3. do 7. tygodnia życia, odpowiadający fazie intensywnego wzrostu młodych szczurów.

U połowy zwierząt z każdej grupy zastosowano podwójne znakowanie kalceiną w celu oceny dynamicznych wskaźników formowania kości. Do tej części badania wybrano losowo po 8 samców i 8 samic z grupy KON oraz po 8 samców i 8 samic z grupy IRY. Randomizację do podgrupy znakowanej kalceiną przeprowadzono osobno w obrębie każdej płci i grupy doświadczalnej. Kalceinę (Calcein, mixed isomers; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy; nr kat. C0875; CAS: 154071-48-4) podawano dootrzewnowo w dawce 15 mg/kg masy ciała, dwukrotnie: 7 i 4 dni przed planowaną eutanazją. Roztwór kalceiny przygotowywano w 100 µl 2% roztworu wodorowęglanu sodu, chroniono przed światłem i przed podaniem filtrowano przez filtr strzykawkowy z membraną PES o średnicy porów 0.22 µm (Millex-GP; Merck Millipore, Cork, Irlandia).

Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta poddano eutanazji przez wykrwawienie z aorty brzusznej w głębokiej anestezji wziewnej. Do znieczulenia stosowano izofluran (IsoFlo 100% Inhalation Vapour, Zoetis Belgium S.A., Louvain-la-Neuve, Belgia) w tlenie. Indukcję prowadzono przy stężeniu 3%, a podtrzymanie przy stężeniu 1.5%, z przepływem tlenu około 1.5 l/min. Materiał biologiczny pobierano po potwierdzeniu głębokiego znieczulenia i ustania reakcji na bodźce bólowe (Ryc. 1).

Stężenia iryzyny w surowicy nie oznaczano. Decyzję tę podjęto ze względu na krótki czas utrzymywania się rekombinowanej iryzyny w krążeniu po podaniu egzogennym. W badaniach na myszach jej okres półtrwania określano jako krótszy niż 1 godzina, a nowsze analizy farmakokinetyczne wskazywały wartości około 0.30–0.39 h dla natywnej iryzyny (H. Kim i in., 2018; Zhu i in., 2025). Wiarygodna ocena ekspozycji ogólnoustrojowej wymagałaby więc osobnego schematu pobierania krwi w krótkich odstępach czasu bezpośrednio po iniekcji, a nie pojedynczego oznaczenia wykonywanego na końcu doświadczenia. Z tego względu skuteczność biologiczną zastosowanego protokołu oceniano pośrednio, na podstawie parametrów morfologicznych, histomorfometrycznych, mikroarchitektonicznych i biomechanicznych analizowanych tkanek.

## Schemat doświadczenia



**Rycina 1. Schemat doświadczenia.** Oś czasu przedstawiająca okres trwania doświadczenia, tygodniowy schemat podań iryzyny lub placebo, terminy podwójnego znakowania kalceiną oraz punkt zakończenia doświadczenia i pobrania materiału.

## 6.2. Pobranie materiału

Pobieranie materiału biologicznego rozpoczęto po potwierdzeniu ustania czynności życiowych zwierzęcia. Żuchwę, kości udowe oraz kręgi lędźwiowe preparowano z zachowaniem ciągłości tkanek twardych. Każdą kość umieszczano osobno w opisanej probówce kriogenicznej (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), odkładano na wkłady chłodzące, a następnie transportowano do laboratorium i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Mięśnie szkieletowe (żwacz, język oraz mięsień trójgłowy łydki) wyizolowano w całości, odcinając je na ich anatomicznych przyczepach ścięgnistych. Bezpośrednio po wyjęciu każdy mięsień poddawano szybkiemu schłodzeniu przez zanurzenie na 12 sekund w izopentanie (2-Methylbutane, ReagentPlus®,  $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy; nr kat. M32631; CAS: 78-78-4) uprzednio schłodzonym w ciekłym azocie (snap-freezing). Następnie próbki umieszczano w szczelnych krioprobówkach, odkładano na suchy lód i transportowano do laboratorium, gdzie przechowywano je w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszego opracowania.

## 6.3. Analiza kości

### 6.3.1. Przygotowanie materiału do analiz

Po pobraniu materiału kostnego kości oczyszczano z przylegających tkanek miękkich, z zachowaniem ostrożności, aby nie uszkodzić powierzchni okostnowej. Każdą próbkę oznaczano indywidualnie, zgodnie z numerem zwierzęcia, grupą doświadczalną i płcią. Materiał kostny podzielono według strony anatomicznej i rodzaju planowanej analizy. Lewe kości udowe oraz lewe części żuchwy przeznaczono do analizy micro-CT, a następnie do testu trójpunktowego zginania. Prawe kości udowe oraz prawe części żuchwy u zwierząt wybranych do podwójnego znakowania kalceiną przeznaczono do dynamicznej histomorfometrii kości. Kręgi lędźwiowe wykorzystano wyłącznie do oceny densytometrycznej i mikroarchitektonicznej metodą micro-CT.

Materiał przeznaczony do analizy micro-CT rozmrażano w temperaturze pokojowej, a następnie utrzymywano w stanie uwodnionym, aby ograniczyć wysychanie tkanki kostnej. Kości zawijano w gazę nasączoną jałowym roztworem NaCl 0.9% i umieszczano w eppendorfach w sposób ograniczający ich przemieszczanie podczas akwizycji obrazu. Probki ustawiano w powtarzalnej orientacji anatomicznej, zgodnej z późniejszym sposobem wyznaczania objętości zainteresowania. W pomiarach BMD w pojemniku pomiarowym

umieszczano również fantom kalibracyjny. Po zakończeniu skanowania lewe kości udowe i lewe części żuchwy utrzymywano w stanie uwodnionym do czasu wykonania testów mechanicznych. Do analizy mechanicznej wykorzystano te same lewe kości udowe i lewe części żuchwy, które wcześniej poddano skanowaniu micro-CT. Przed testem próbki doprowadzano do temperatury pokojowej i zabezpieczano przed wysychaniem.

Kręgi lędźwiowe nie były poddawane testom mechanicznym. Decyzję tę podjęto ze względu na odmienny charakter badań biomechanicznych kręgów w porównaniu z kośćmi długimi i żuchwą. Kości udowe oraz części żuchwy oceniano w teście trójpunktowego zginania, który pozwala analizować odpowiedź wydłużonej struktury kostnej na obciążenie zginające. W przypadku kręgów typową metodą oceny właściwości mechanicznych jest natomiast test kompresyjny trzonu kręgu lub całego segmentu kręgosłupa, a uzyskiwane parametry odnoszą się do odporności na ściskanie, nie do zginania. Wyniki takich testów nie byłyby bezpośrednio porównywalne z parametrami uzyskanymi dla kości udowej i żuchwy w teście trójpunktowego zginania. Z tego względu analizę kręgów ograniczono do oceny BMD i mikroarchitektury metodą micro-CT, która jest standardową metodą ilościowej oceny struktury kości beleczkowej w modelach gryzoni (Bouxsein i in., 2010).

Materiał przeznaczony do oceny linii kalceinowych przygotowywano bez dekalcyfikacji. Prawe kości udowe i prawe części żuchwy utrwalano w 10% obojętnie buforowanej formalinie, a następnie przenoszono do 70% etanolu. Próbki umieszczano w kasetkach histologicznych i krótko płukano w wodzie destylowanej. Następnie inkubowano je w 5% wodnym roztworze KOH przez 96 godzin w temperaturze pokojowej, przy łagodnym mieszaniu. Po zakończeniu inkubacji materiał płukano pod bieżącą wodą przez 2 godziny i przechowywano w 50% etanolu do czasu dalszego procesowania. Następnie próbki przeprowadzano przez kolejne roztwory odwadniające i prześwietlające: 60% etanol przez 6 godzin 30 minut, 70% etanol przez 30 minut, 80% etanol przez 30 minut, 95% etanol przez 30 minut, cztery zmiany 100% etanolu po 22 minuty, dwie zmiany ksylenu po 30 minut oraz cztery zmiany parafiny infiltracyjnej przez 20, 20, 20 i 30 minut (Porter i in., 2017).

Po zakończeniu infiltracji fragmenty kostne wycinano przy użyciu przecinarki z taśmą diamentową MBS 240/E (Proxxon GmbH, Föhren, Niemcy), a następnie próbki zatapiano w parafinie w orientacji umożliwiającej uzyskanie przekrojów przez analizowane regiony kości udowej i żuchwy. Kość udową orientowano tak, aby możliwa była ocena powierzchni

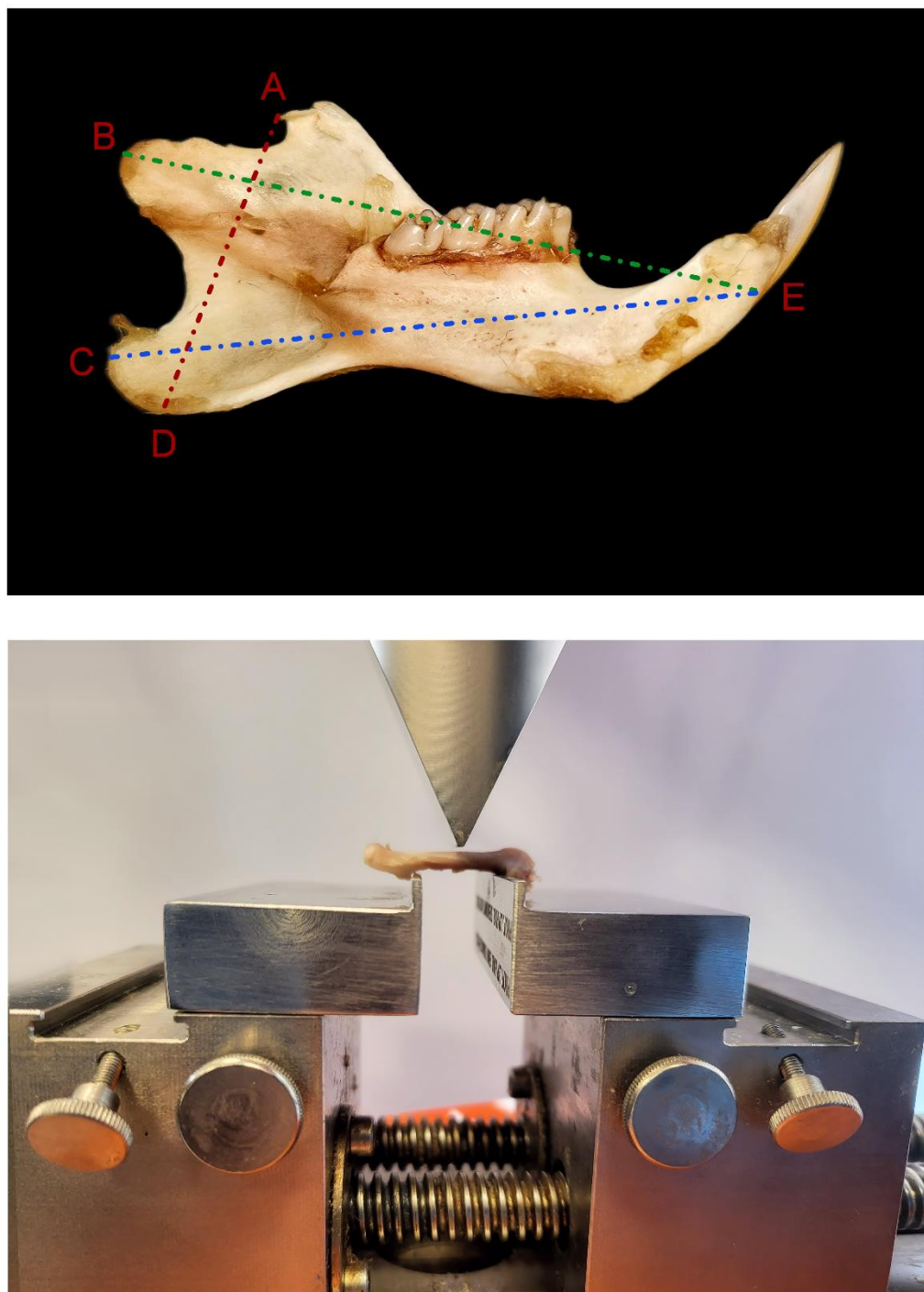
korowej trzonu oraz części beleczkowej dalszej przynasady, natomiast żuchwę tak, aby przekroje obejmowały trzon żuchwy w obszarze położonym dystalnie od pierwszego zęba trzonowego (M1).

### 6.3.2. Pomiary morfometryczne żuchwy

Pomiary morfometryczne żuchwy wykonano na podstawie metody opisanej przez Bieńko i in. (2018), z modyfikacją dostosowaną do zakresu analizowanych parametrów w niniejszym badaniu (Bieńko i in., 2018).

Przed wykonaniem pomiarów na każdej żuchwie wyznaczano pięć stałych punktów orientacyjnych. Punkt A lokalizowano na szczycie wyrostka dziobiastego (*processus coronoideus*), punkt B na szczycie wyrostka kłykciowego (*processus condylaris*), punkt C na szczycie kąta żuchwy (*angulus mandibulae*), punkt D w środkowej części kąta żuchwy, a punkt E w najniższym punkcie spojenia żuchwy (*symphysis mandibulae*).

Na podstawie tak wyznaczonych punktów wykonano trzy pomiary liniowe. Wysokość żuchwy określano jako odległość pomiędzy punktem A i punktem D. Długość podstawy żuchwy mierzono jako odległość pomiędzy punktem C i punktem E. Całkowitą długość żuchwy określano jako odległość pomiędzy punktem B i punktem E. Wszystkie pomiary wykonywano w tej samej orientacji anatomicznej kości, z zachowaniem jednakowych kryteriów identyfikacji punktów orientacyjnych dla wszystkich analizowanych próbek (Ryc. 2).



**Rycina 2. Pomiar morfometryczny i biomechaniczny.** W górnym panelu przedstawiono schemat pomiarów liniowych żuchwy wykonywanych przed analizą biomechaniczną: A–D, wysokość żuchwy; B–E, długość żuchwy; C–E, długość podstawy żuchwy. Dolny panel przedstawia ułożenie kości udowej w układzie trójpunktowego zginania.

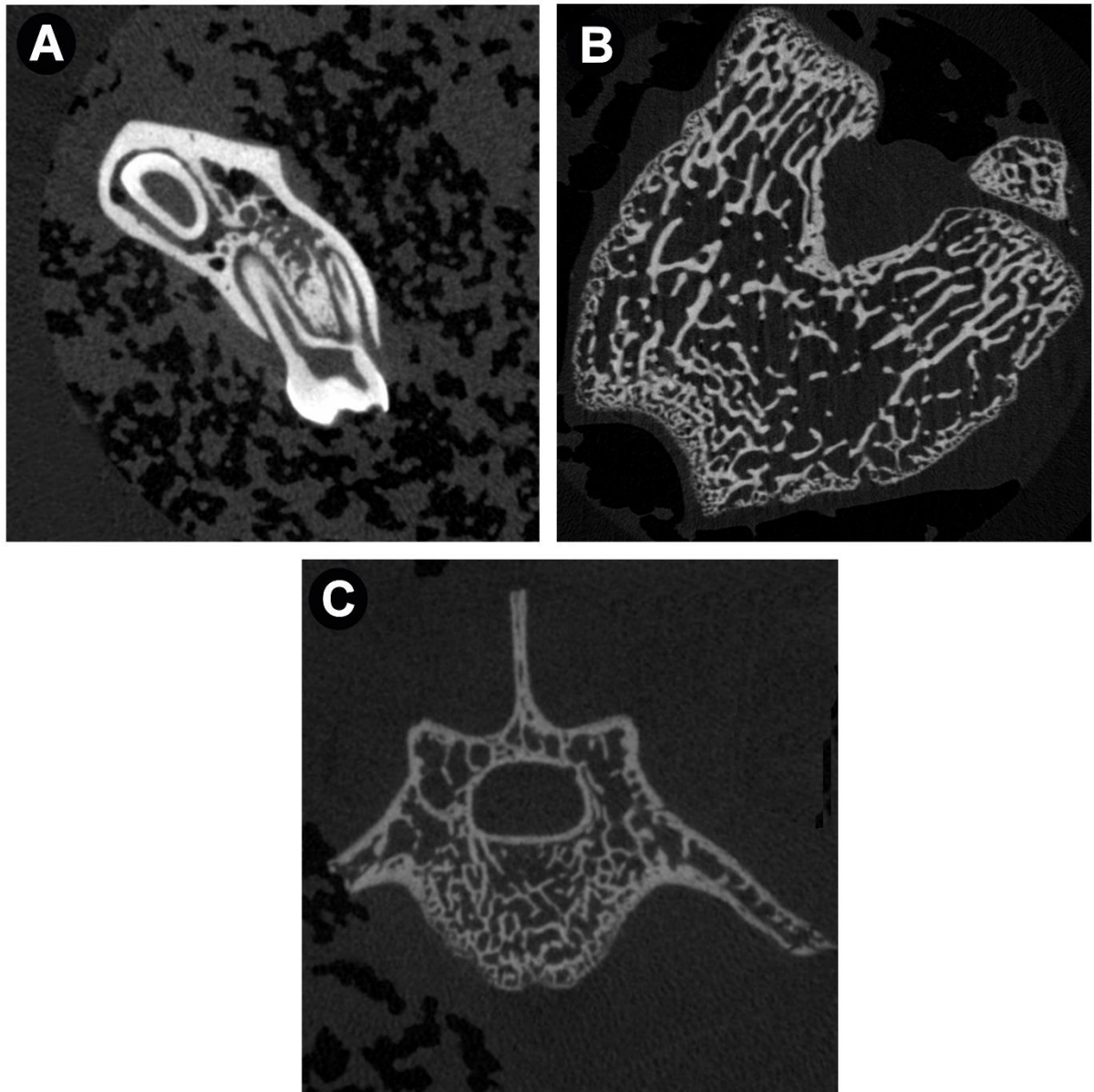
### 6.3.3. Ocena gęstości mineralnej i mikroarchitektury kości

Gęstość mineralną kości (BMD, bone mineral density) oraz parametry mikroarchitektury kości oceniano metodą micro-CT. Skanowanie wykonano z użyciem skanera SkyScan 1273 (Bruker, Kontich, Belgia). Próbkę przed skanowaniem rozmrażano w temperaturze pokojowej. Próbkę ustawiano w powtarzalnej orientacji anatomicznej, zgodnej z przyjętym sposobem wyznaczania objętości zainteresowania (VOI, volume of interest). W pomiarach BMD stosowano dwa fantomy kalibracyjne o znanej gęstości hydroksyapatytu wapnia (CaHA): 0,3 g/cm<sup>3</sup> oraz 1,25 g/cm<sup>3</sup> CaHA.

Skanowanie przeprowadzono przy napięciu lampy rentgenowskiej 100 kV, natężeniu 80  $\mu$ A, czasie ekspozycji 1194 ms i izotropowym rozmiarze voxela wynoszącym 10  $\mu$ m. Zastosowano filtr Al 1 mm + Cu 0.038 mm. Obrazy zapisywano w formacie TIFF, przy głębi 16 bitów. Skanowanie wykonano w zakresie 360°, z krokiem rotacji 0.600°. Rekonstrukcję obrazów wykonano w programie NRecon v2.2.0.6 (Bruker, Kontich, Belgia). Zastosowano korekcję artefaktów pierścieniowych na poziomie 5 oraz korekcję utwardzania wiązki 10%. Wygładzanie ustawiono na 0. Obrazy rekonstruowano z użyciem filtra Hamming i zapisywano jako przekroje BMP w skali szarości.

Analizę ilościową wykonano w programie CT Analyser v1.23.0.2 (Bruker, Kontich, Belgia). VOI wyznaczano ręcznie w kolejnych przekrojach, oddzielnie dla każdej analizowanej lokalizacji kostnej (Ryc. 3). Segmentację tkanki kostnej wykonywano metodą progowania globalnego. Dla kości udowej stosowano zakres progowania 70–255, natomiast dla żuchwy i kręgów 85–255. Zakresy progowania utrzymywano bez zmian w obrębie wszystkich próbek danego typu kości. Po segmentacji stosowano funkcję Despeckle w celu usunięcia drobnych, niepołączonych obiektów powstałych po binaryzacji obrazu. W kości udowej analizę kości beleczkowej prowadzono w dalszej przynasadzie. Punktem odniesienia była płytka wzrostowa nasady dalszej. Początek VOI wyznaczano 0.5 mm proksymalnie od płytki wzrostowej, a analizowany obszar obejmował 1.0 mm wysokości, co przy izotropowym rozmiarze voxela 10  $\mu$ m odpowiadało 100 kolejnym przekrojom. W kości udowej wykonano również analizę części korowej w środkowej części trzonu. VOI wyznaczano w połowie długości kości udowej i obejmował 1.0 mm wysokości, czyli 100 kolejnych przekrojów. W tym regionie oznaczano parametry geometryczne przekroju poprzecznego, obejmujące pole powierzchni przekroju kości, średnią względną grubość ściany korowej, indeks korowy oraz osiowy moment bezwładności przekroju poprzecznego.

W żuchwie VOI wyznaczano ręcznie w obrębie trzonu, w regionie położonym za pierwszym zębem trzonowym. Analizowany obszar obejmował część beleczkową trzonu żuchwy, z wyłączeniem tkanek zęba, ozębnej, jam zębowych oraz warstwy korowej. Analizę kręgów przeprowadzono w obrębie trzonu piątego kręgu lędźwiowego. VOI wyznaczano ręcznie w centralnej części beleczkowej trzonu kręgu, z wyłączeniem warstwy korowej, blaszek granicznych, łuku kręgu i wyrostków (Ahmed & Farook, 2025; Chavez i in., 2021; Demes i in., 1991; Hansson & Ekestubbe, 2004; Hsu i in., 2016; Jiang i in., 2008; Muszyński i in., 2017). W analizie uwzględniono objętościową gęstość mineralną kości beleczkowej (BMD), objętość kości odniesioną do objętości całkowitej (BV/TV, bone volume/tissue volume), liczbę beleczek kostnych (Tb.N, trabecular number), grubość beleczek kostnych (Tb.Th, trabecular thickness), separację beleczek kostnych (Tb.Sp, trabecular separation) oraz wymiar fraktalny (FD, fractal dimension) (Y. Kim i in., 2021; Lewis i in., 2025).



**Rycina 3. Reprezentatywne przekroje rekonstrukcji micro-CT badanych kości.** (A) żuchwa w regionie trzonu, dystalnie od pierwszego zęba trzonowego, (B) dalsza przynasada kości udowej, (C) trzon kręgu lędźwiowego. Obrazy przedstawiają lokalizacje wykorzystywane do wyznaczania VOI i ilościowej oceny objętościowej gęstości mineralnej kości beleczkowej oraz parametrów mikroarchitektury kości beleczkowej.

#### 6.3.4. Analiza mechaniczna kości

Bezpośrednio po izolacji kości oczyszczono z przylegających tkanek miękkich, a następnie wykonano pomiary długości i masy. Na tej podstawie obliczono względną masę kości według wzoru:  $RBW = \text{masa kości} / \text{masa ciała} \times 100$ .

Ocenę właściwości mechanicznych wykonano na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick Z010 (Zwick-Roell GmbH & Co., Ulm, Niemcy) w układzie trójpunktowego zginania. Przed testem próbki doprowadzano do temperatury pokojowej i utrzymywano w stanie uwodnionym. Obciążenie przykładano ze stałą prędkością przesuwu głowicy wynoszącą 5 mm/min, do momentu zniszczenia próbki. Kości udowe układano poziomo na dwóch podporach, z trzonem ustawionym w osi podpór oraz kłykciami skierowanymi ku dołowi. Obciążenie przykładano centralnie między podporami, do środkowej części trzonu kości udowej. Rozstaw podpór wynosił 12 mm. Żuchwy badano jako połówki żuchwy, bez usuwania zębów. Próbki układano na dwóch podporach w powtarzalnym położeniu anatomicznym, z powierzchnią przyśrodkową skierowaną ku dołowi (Rycina 2). Trzon żuchwy ustawiano w osi podpór, a obciążenie przykładano poprzecznie do długiej osi kości w regionie trzonu, za pierwszym zębem trzonowym. Rozstaw podpór wynosił 10 mm. W trakcie próby w sposób ciągły rejestrowano krzywe siła-przemieszczenie, które stanowiły podstawę do wyznaczenia parametrów strukturalnych kości, obejmujących siłę przy granicy sprężystości ( $F_{\text{yield}}$ ), siłę maksymalną ( $F_{\text{max}}$ ), sztywność, pracę do granicy sprężystości ( $W_{\text{yield}}$ ) oraz pracę do osiągnięcia maksymalnego obciążenia ( $W_{\text{max}}$ ). Opracowanie danych mechanicznych przeprowadzono w programie Origin 2022 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Na podstawie wartości uzyskanych z testu trójpunktowego zginania oraz parametrów geometrii obliczono następnie pozorne właściwości materiałowe kości z wykorzystaniem klasycznych równań teorii belek. Wyznaczono odkształcenie przy granicy sprężystości ( $\epsilon_{\text{yield}}$ ), odkształcenie maksymalne ( $\epsilon_{\text{max}}$ ), moduł Younga, naprężenie przy granicy sprężystości ( $\sigma_{\text{yield}}$ ) oraz naprężenie maksymalne ( $\sigma_{\text{max}}$ ). Ze względu na niejednorodny kształt oraz brak idealnie pryzmatycznej budowy kości wartości te traktowano jako przybliżone zależne od geometrii całej kości i warunków obciążenia, a nie jako rzeczywiste właściwości materiałowe w sensie fizycznym. Z tego względu parametry te interpretowano jako pozorne właściwości materiałowe, zachowując klasyczne oznaczenia odkształcenia ( $\epsilon$ ), naprężenia ( $\sigma$ ) oraz pozornego modułu Younga ( $E$ ) (Osiak-Wicha i in., 2023).

### 6.3.5. Ocena linii kalceinowych

Skrawki nieodwapnionej kości oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym z użyciem filtra FITC. Obrazowanie prowadzono przy zakresie wzbudzenia 465–495 nm i zakresie emisji 515–555 nm. Analizę wykonywano przy powiększeniu 20× w wyznaczonych regionach kości korowej i beleczkowej. Obrazy cyfrowe zapisywano w jednakowych warunkach ekspozycji dla wszystkich analizowanych próbek.

W kości udowej oceniano kość korową oraz kość beleczkową w oddzielnie zdefiniowanych regionach zainteresowania (ROI, regions of interest). Analizę kości korowej prowadzono na przekrojach poprzecznych wykonanych w połowie wysokości trzonu. W tym obszarze oceniano powierzchnię okostnową kości korowej. Kość beleczkową oceniano w nasadzie dalszej kości udowej, w powtarzalnym ROI wyznaczanym w obrębie struktury beleczkowej. W żuchwie analizę prowadzono na przekrojach wykonanych dystalnie za pierwszym trzonowcem. Oceniano dwa oddzielne ROI. Pierwszy ROI obejmował powierzchnię okostnową kory żuchwy po stronie policzkowej. Drugi ROI obejmował kość beleczkową położoną w centralnej części trzonu żuchwy, pomiędzy korzeniem pierwszego trzonowca a korzeniem kła.

Obserwacje prowadzono z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego BX-51 DSU light microscope (Olympus, Tokio, Japonia) wyposażonego w kamerę cyfrową DP-70 (Olympus, Tokio, Japonia). Preparaty oceniano w kanale zielonej fluorescencji, przy zastosowaniu ustawień odpowiednich dla sygnału kalceiny. Dokumentację obrazową wykonywano przy powiększeniach 100× i 200×, przy stałych ustawieniach ekspozycji, oświetlenia i powiększenia dla wszystkich analizowanych preparatów. Obrazy rejestrowano z wykorzystaniem oprogramowania cellSens Standard software v1.18, Build 18686 (Olympus, Tokio, Japonia).

Analizę ilościową przeprowadzano w programie ImageJ v1.54s (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), po wcześniejszej kalibracji obrazu względem skali mikrometrycznej. ROI wyznaczano na podstawie stałych kryteriów anatomicznych, a nie intensywności fluorescencji (Ryc. 4 i 5). Z analizy wykluczano obszary zawierające pęknięcia preparatu, ubytki tkanki, artefakty techniczne, rozlany sygnał fluorescencyjny lub linie znakowania niemożliwe do jednoznacznej interpretacji. Dla każdego ROI wyznaczano całkowitą długość ocenianej powierzchni kostnej, określaną jako BS (bone surface). Na tej samej powierzchni identyfikowano odcinki z obecnością dwóch wyraźnie rozdzielonych

linii kalceiny, określane jako dLS (double-labeled surface), oraz odcinki z obecnością pojedynczej linii kalceiny, określane jako sLS (single-labeled surface).

Powierzchnię mineralizującą odniesioną do całkowitej powierzchni kostnej obliczano jako MS/BS (mineralizing surface/bone surface) według wzoru:

$$MS/BS = (dLS + 0,5 \times sLS) / BS \times 100$$

Wynik wyrażano w procentach. W przypadkach, w których nie stwierdzano powierzchni pojedynczo znakowanej, wartość MS/BS obliczano na podstawie powierzchni podwójnie znakowanej według wzoru:

$$MS/BS = dLS / BS \times 100$$

Szybkość apozycji mineralnej, określaną jako MAR (mineral apposition rate), wyznaczano na podstawie odległości pomiędzy dwiema liniami kalceiny. Odległość między liniami mierzono prostopadłe do ich przebiegu, pomiędzy środkami obu pasm fluorescencyjnych. Dla każdego ROI wykonywano serię pomiarów w reprezentatywnych punktach, a następnie obliczano średnią odległość pomiędzy liniami. MAR obliczano według wzoru:

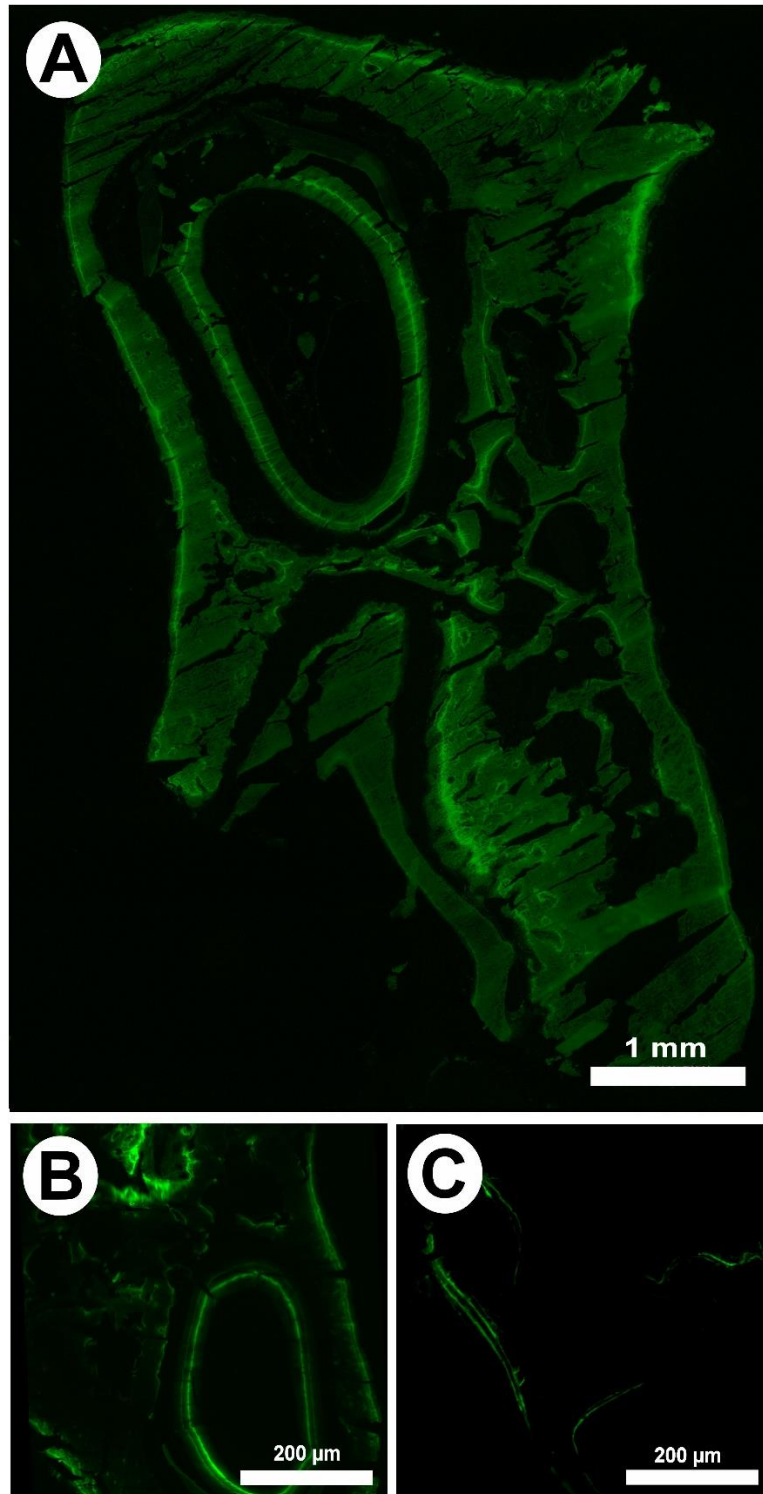
$$MAR = \text{średnia odległość pomiędzy liniami kalceiny} / \text{liczba dni pomiędzy podaniami znacznika}$$

Wynik wyrażano w  $\mu\text{m}/\text{dzień}$ .

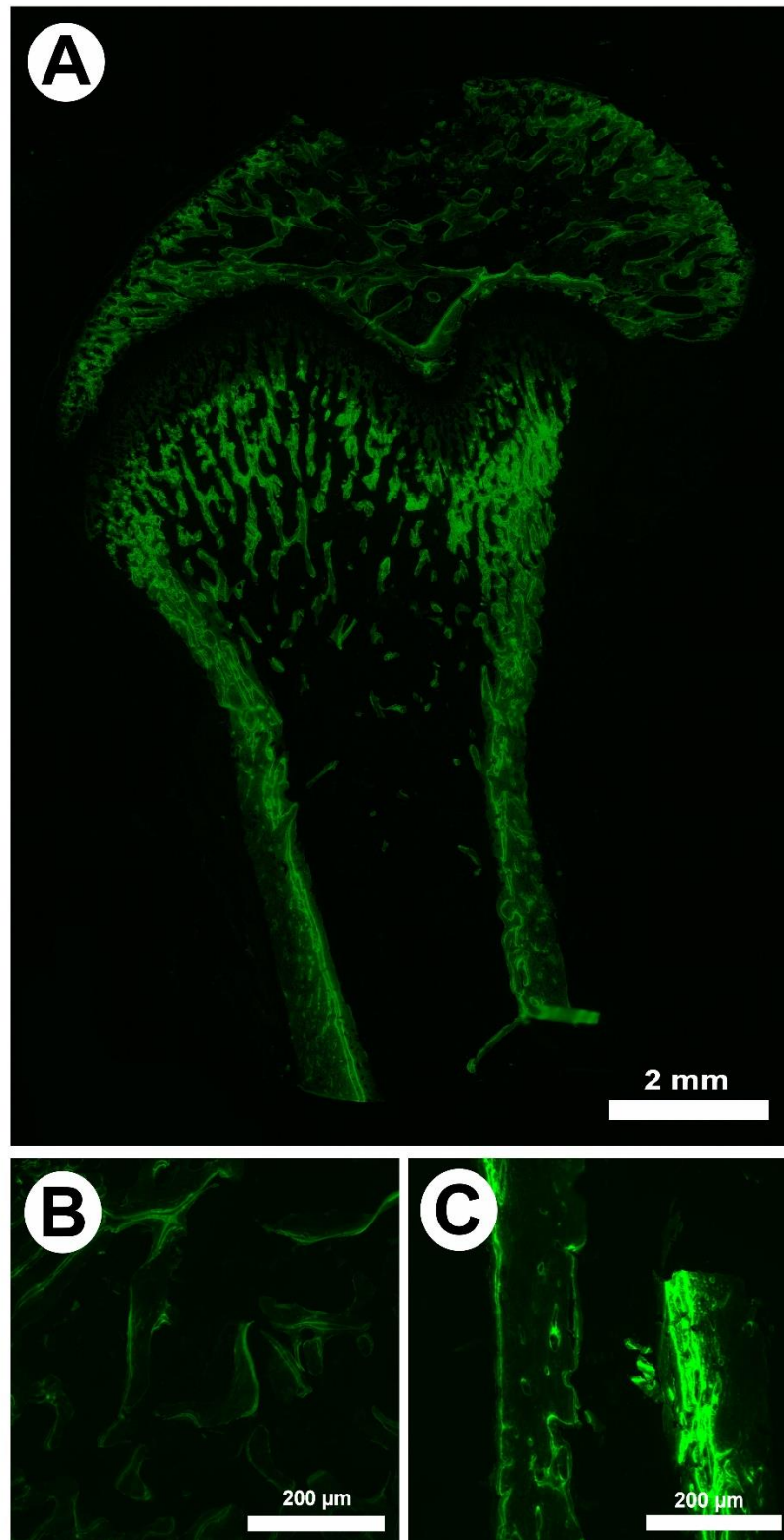
Tempo tworzenia kości odniesione do powierzchni kostnej, określane jako BFR/BS (bone formation rate/bone surface), obliczano jako iloczyn MAR oraz MS/BS:

$$BFR/BS = MAR \times MS/BS$$

Do obliczeń BFR/BS wartość MS/BS stosowano jako ułamek, a nie jako wartość procentową. Wynik wyrażano jako  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dzień}$ . Parametr ten uwzględniał zarówno tempo odkładania nowej zmineralizowanej macierzy, jak i zakres powierzchni objętej aktywną mineralizacją.



**Rycina 4. Reprezentatywne obrazy fluorescencyjne żuchwy znakowanej kalceiną.** (A) przekrój żuchwy, (B) kora żuchwy, (C) kość bełeczkowa żuchwy. Zielony sygnał fluorescencyjny odpowiada liniom znakowania kalceiną w mineralizującej tkance kostnej. Obrazy wykorzystano do oceny dynamicznych wskaźników formowania kości. Skala: (A) 1 mm, (B-C) 200  $\mu\text{m}$ .



**Rycina 5. Reprezentatywne obrazy fluorescencyjne kości udowej znakowanej kalceiną. (A)** przekrój kości udowej, (B) kość beleczkowa kości udowej, (C) kora kości udowej. Zielony sygnał fluorescencyjny odpowiada liniom znakowania kalceiną w mineralizującej tkance kostnej. Obrazy wykorzystano do oceny dynamicznych wskaźników formowania kości. Skala: (A) 2 mm, (B-C) 200  $\mu\text{m}$ .

## 6.4. Analiza mięśni

### 6.4.1. Przygotowanie materiału do analiz

Materiał z mięśni przeznaczony do analiz histologicznych i immunohistochemicznych przygotowywano z wykorzystaniem kriostatu. Przed rozpoczęciem cięcia próbki mięśni umieszczono w komorze kriostatu i pozostawiono przez 30 minut w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$  w celu wyrównania temperatury całej próbki z warunkami panującymi wewnątrz aparatu. Po wyrównaniu temperatury próbki dokładnie otoczono medium do zatapiania Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA). Preparaty ustawiono w taki sposób, aby uzyskać przekroje poprzeczne włókien mięśniowych możliwie najbardziej prostopadłe do ich długiej osi. W przypadku języka cięciu poddawano cały narząd, natomiast do dalszych analiz wybierano obszar odpowiadający mięśniowi podłużnemu górnemu. Z mięśnia trójgłowego łydki do oceny pobierano brzusiec boczny mięśnia brzuchatego łydki, natomiast z mięśnia żwacza analizowano jego część powierzchowną. Następnie materiał krojono w kriostacie na skrawki o grubości  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Cięcie prowadzono stopniowo aż do osiągnięcia środkowej części brzusca mięśnia, co identyfikowano na podstawie uzyskania maksymalnej powierzchni przekroju poprzecznego próbki, dalsze zmniejszanie się wielkości skrawka interpretowano jako przejście poza centralny obszar brzusca. Uzyskane skrawki przenoszono bezpośrednio na szkiełka mikroskopowe. Po zakończeniu cięcia preparaty pozostawiono na 5 minut w temperaturze pokojowej do wyschnięcia. Bezpośrednio po tym etapie przystępowano do wykonywania odpowiednich barwień histochemicznych i immunohistochemicznych.

### 6.4.2. Barwienie z zastosowaniem reakcji NADH-TR

W celu oceny profilu metabolicznego włókien mięśniowych zastosowano barwienie histochemiczne z wykorzystaniem reakcji reduktazy tetrazoliowej NADH (NADH-TR). Metoda ta umożliwia uwidocznienie aktywności enzymów oksydoredukcyjnych związanych głównie z aparatem mitochondrialnym, a tym samym ocenę potencjału oksydacyjnego włókien mięśniowych (Tomaszewska i in., 2024; Wojtysiak & Kaczor, 2011; Wojtysiak & Połtowicz, 2014). Barwienie wykonywano na świeżych, nieutrwalonych skrawkach mięśniowych uzyskanych w kriostacie.

Roztwór inkubacyjny do reakcji NADH-TR przygotowywano bezpośrednio przed użyciem. W tym celu sporządzano bufor Tris o stężeniu  $0.05\text{ M}$  i pH 7.6. Następnie

przygotowywano roztwór roboczy zawierający  $\beta$ -nikotynoamidoadeninodinuokleotyd zredukowany (NADH;  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy; nr kat. N8129; CAS: 606-68-8), błękit nitrotetrazoliowy (NBT; Nitrotetrazolium Blue chloride; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy; nr kat. N6876; CAS: 298-83-9), bufor Tris oraz wodę destylowaną. Całość mieszano bezpośrednio przed zastosowaniem, chroniąc roztwór przed światłem. Tak przygotowany roztwór наносzono na skrawki w objętości zapewniającej całkowite pokrycie preparatu.

Preparaty inkubowano poziomo w komorze wilgotnej przez 30 minut w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu inkubacji skrawki delikatnie płukano trzykrotnie w wodzie destylowanej przez 1 minutę w temperaturze pokojowej. Na tym etapie nie stosowano utrwalania ani zamykania preparatów w medium wodnym, ponieważ skrawki przeznaczano do dalszego etapu podwójnego barwienia immunohistochemicznego na tym samym preparacie.

Oceny obrazu po reakcji NADH-TR dokonywano na podstawie intensywności ziarnistego zabarwienia sarkoplazmy. Włókna o wysokim potencjale oksydacyjnym wykazywały ciemnoniebieskie do niebieskofioletowych ziarnistości, włókna o pośrednim profilu metabolicznym przyjmowały umiarkowanie nasilone niebieskie zabarwienie, natomiast włókna o niskiej aktywności oksydacyjnej pozostawały blade lub niemal niebarwiące się. Barwienie to pozwalało na różnicowanie włókien bardziej oksydacyjnych od bardziej glikolitycznych, jednak nie umożliwiało jednoznacznego wyodrębnienia wszystkich podtypów włókien szybkokurczliwych.

W celu lepszego uwidocznienia włókien typu I na tych samych skrawkach wykonywano dodatkowo barwienie immunohistochemiczne przeciwko wolnej izoformie ciężkiego łańcucha miozyny (MYH7). Po zakończeniu płukania po reakcji NADH-TR blokowano aktywność endogennej peroksydazy za pomocą 3% nadtlenu wodoru przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, w celu ograniczenia nieswoistego wiązania białek, preparaty inkubowano z odczynnikiem UltraVision Protein Block (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zgodnie z zaleceniami producenta (7 minut).

Po etapie blokowania наносzono przeciwciała pierwotne skierowane przeciwko MYH7 i inkubowano preparaty przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki inkubowano przez 30 minut z odczynnikiem BrightVision Poly-HRP anti-mouse/rabbit IgG, biotin-free, one-component, ready-to-use reagent (ImmunoLogic, Duiven, Holandia).

Reakcję peroksydazową rozwijano przy użyciu 3,3'-diaminobenzydyny (DAB; UltraVision Plus Detection System RTU, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji preparaty płukano.

Po zakończeniu barwienia immunohistochemicznego preparaty odwadniano w szeregu alkoholowym, przeprowadzając kolejno przez 75% etanol przez 2 minuty, 96% etanol przez 2 minuty oraz 100% etanol w dwóch zmianach po 2 minuty. Następnie preparaty prześwietlono w ksylenie w dwóch zmianach po 2 minuty i zamykano w medium DPX pod szkiełkiem nakrywkowym.

Interpretację obrazu opierano na łącznej analizie odczynu immunohistochemicznego dla MYH7 oraz reakcji histoenzymatycznej NADH-TR. Odczyn MYH7 wykorzystano do identyfikacji włókien typu I. Włókna MYH7-dodatnie klasyfikowano jako włókna typu I, niezależnie od intensywności reakcji NADH-TR. W obrazie mikroskopowym włókna te wykazywały brunatny odczyn immunohistochemiczny oraz zwykle silną reakcję NADH-TR, co nadawało im brunatno-niebieskie, ziarniste zabarwienie. Włókna MYH7-ujemne klasyfikowano następnie według intensywności reakcji NADH-TR, traktowanej jako wskaźnik potencjału oksydacyjnego włókna. Włókna MYH7-ujemne o pośredniej aktywności oksydacyjnej klasyfikowano jako włókna typu IIa. W obrazie mikroskopowym miały one niebieskie, ziarniste zabarwienie o pośrednim nasileniu. Włókna MYH7-ujemne o niskiej aktywności oksydacyjnej klasyfikowano jako włókna typu IIb. W obrazie mikroskopowym wykazywały one słabą reakcję NADH-TR lub jej brak, dlatego pozostawały blade albo barwiły się jedynie nieznacznie (Ryc. 6).

Zastosowany panel barwień nie obejmował przeciwciał swoistych dla izoform MyHC-IIa, MyHC-IIb ani MyHC-IIx/IId. Z tego względu klasyfikacja włókien szybkich miała charakter operacyjny i opierała się na połączeniu ujemnego odczynu MYH7 z intensywnością reakcji NADH-TR. Metoda ta nie pozwalała na jednoznaczne wyodrębnienie włókien typu IIx/IId ani włókien hybrydowych, dlatego część włókien o fenotypie pośrednim mogła zostać zaklasyfikowana do włókien typu IIa lub IIb zależnie od nasilenia reakcji histochemicznej.

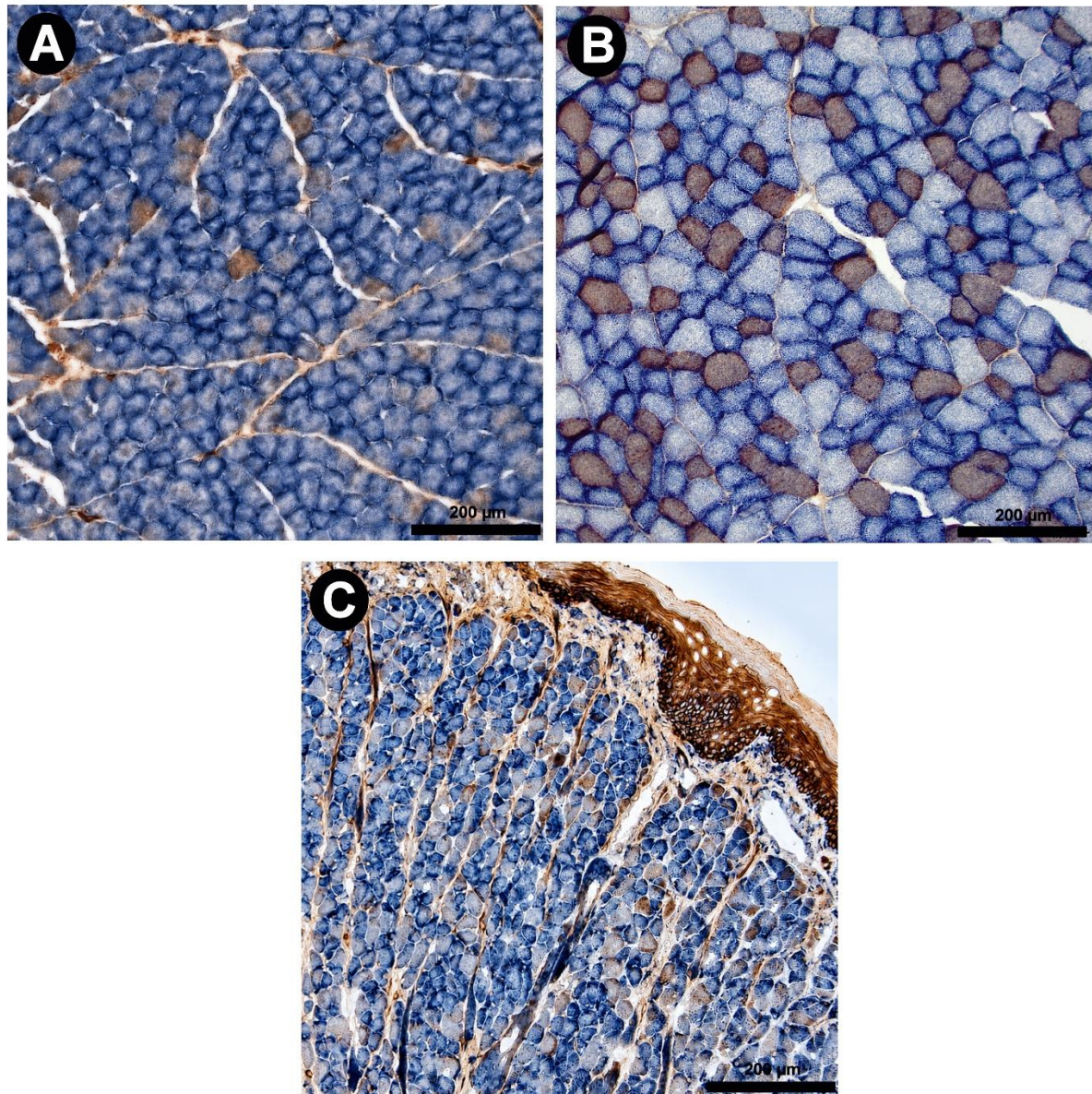
Dla reakcji immunohistochemicznej MYH7 wykonywano kontrolę ujemną przez pominięcie przeciwciała pierwotnego i przeprowadzenie dalszych etapów procedury w identycznych warunkach jak dla skrawków badanych. Brak swoistego odczynu w kontroli ujemnej traktowano jako potwierdzenie ograniczenia nieswoistego tła reakcji. Kontrolę

dotadnią stanowiły włókna MYH7-dodatknie obecne w badanych przekrojach mięśni, których obraz morfologiczny i rozmieszczenie odpowiadały włóknom wolnokurczliwym typu I.

**Tabela 1.** Pierwotne i wtórne przeciwciała wykorzystane w badaniu.

| Antygen docelowy               | Gatunek gospodarza | Producent (kraj)                | Numer katalogowy | Rozcieńczenie    |
|--------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------|------------------|
| <b>Przeciwciała pierwotne</b>  |                    |                                 |                  |                  |
| Anti-MYH7                      | Królik             | Affinity Biosciences<br>(Chiny) | DF12122          | 1:200            |
| Dystrofina                     | Królik             | Proteintech<br>(USA)            | 83609-5-RR       | 1:400            |
| <b>Przeciwciała wtórne</b>     |                    |                                 |                  |                  |
| Anti-mouse/Anti-rabbit         | Koza               | ImmunoLogic<br>(Holandia)       | DPVB-HRP         | RTU <sup>1</sup> |
| Alexa Fluor 594<br>anti-rabbit | Koza               | Thermo Fisher<br>(USA)          | A-11012          | 1:800            |

<sup>1</sup> RTU = Gotowe do użycia (Ready To Use).



**Rycina 6. Reprezentatywne obrazy badanych mięśni po reakcji NADH-TR i immunohistochemicznym oznaczeniu MYH7. (A) mięsień żwacz, (B) mięsień brzuchaty łydki, (C) mięsień podłużny górny języka. Brunatny odczyn oznacza włókna MYH7-dodatnie, klasyfikowane jako typ I. Niebieskie, ziarniste zabarwienie NADH-TR wskazuje aktywność oksydacyjną: włókna MYH7-ujemne o pośrednim nasileniu reakcji klasyfikowano jako typ IIa, a włókna blade lub słabo wybarwione jako typ IIb. Skala: 200 µm.**

### 6.4.3. Analiza morfometryczna włókien mięśniowych

Analizę morfometryczną włókien mięśniowych przeprowadzono na cyfrowych obrazach przekrojów poprzecznych badanych mięśni. Do oceny wybierano pola, w których włókna mięśniowe były przecięte możliwie prostopadłe do ich długiej osi, zachowana była ciągłość struktury tkanki, a granice włókien były jednoznacznie widoczne. Z analizy wykluczano obszary zawierające fałdy preparatu, uszkodzenia mechaniczne, artefakty mrożeniowe, rozerwanie włókien lub niejednoznaczny przebieg granic komórkowych.

Pomiary wykonywano w programie ImageJ v1.54s (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), po wcześniejszej kalibracji obrazu względem skali mikrometrycznej. Wszystkie analizy prowadzono przy stałych ustawieniach powiększenia i kalibracji dla danej serii preparatów. Dla każdego zwierzęcia i każdego analizowanego mięśnia oceniano losowo wybrane, nienakładające się pola widzenia obejmujące reprezentatywne obszary przekroju mięśnia.

Wielkość włókien mięśniowych oceniano na podstawie minimalnej średnicy Fereta. Parametr ten odpowiada najmniejszej odległości pomiędzy dwiema równoległymi stycznymi poprowadzonymi do obrysu włókna i jest stosowany jako stabilny wskaźnik kalibru włókien mięśniowych w przekrojach poprzecznych. Dla każdego zwierzęcia, każdego mięśnia i każdej klasy włókien mierzono do 300 losowo wybranych, prawidłowo przeciętych profili włókien mięśniowych. Jeżeli w analizowanych polach nie uzyskano 300 profili danej klasy, mierzono wszystkie jednoznacznie sklasyfikowane profile włókien tej klasy spełniające kryteria jakościowe. Liczbę zmierzonych profili odnotowywano dla każdego zwierzęcia i każdej klasy włókien.

Dodatkowo oceniano organizację włókien w obrębie pęczków mięśniowych. Dla każdego mięśnia analizowano 10 losowo wybranych pęczków mięśniowych widocznych w przekroju poprzecznym. Granice pęczków wyznaczano na podstawie przebiegu omięsnej oddzielającej sąsiednie pęczki włókien. Dla każdego pęczka mierzono jego powierzchnię przekroju poprzecznego, wyrażoną w mm<sup>2</sup>.

W obrębie każdego analizowanego pęczka liczono całkowitą liczbę włókien mięśniowych oraz liczbę włókien należących do poszczególnych typów. Następnie dla każdego pęczka obliczano procentowy udział poszczególnych typów włókien według wzoru:

*udział danego typu włókien [%] = liczba włókien danego typu / całkowita liczba włókien w pęczku × 100*

Na podstawie całkowitej liczby włókien w pęczku oraz powierzchni pęczka obliczano zagęszczenie włókien mięśniowych, wyrażone jako liczba włókien na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczka:

*liczba włókien/mm<sup>2</sup> = całkowita liczba włókien w pęczku / powierzchnia pęczka [mm<sup>2</sup>]*

Parametr ten wykorzystywano jako wskaźnik upakowania włókien w obrębie pęczka mięśniowego. Dla każdego analizowanego mięśnia raportowano minimalną średnicę Fereta włókien mięśniowych [μm], procentowy udział poszczególnych typów włókien [%] oraz liczbę włókien przypadającą na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczka. Do dalszej analizy statystycznej wprowadzano wyłącznie wartości uśrednione na poziomie osobnika, ponieważ jednostką eksperymentalną było pojedyncze zwierzę.

#### 6.4.4. Immunofluorescencyjne wykrywanie dystrofiny

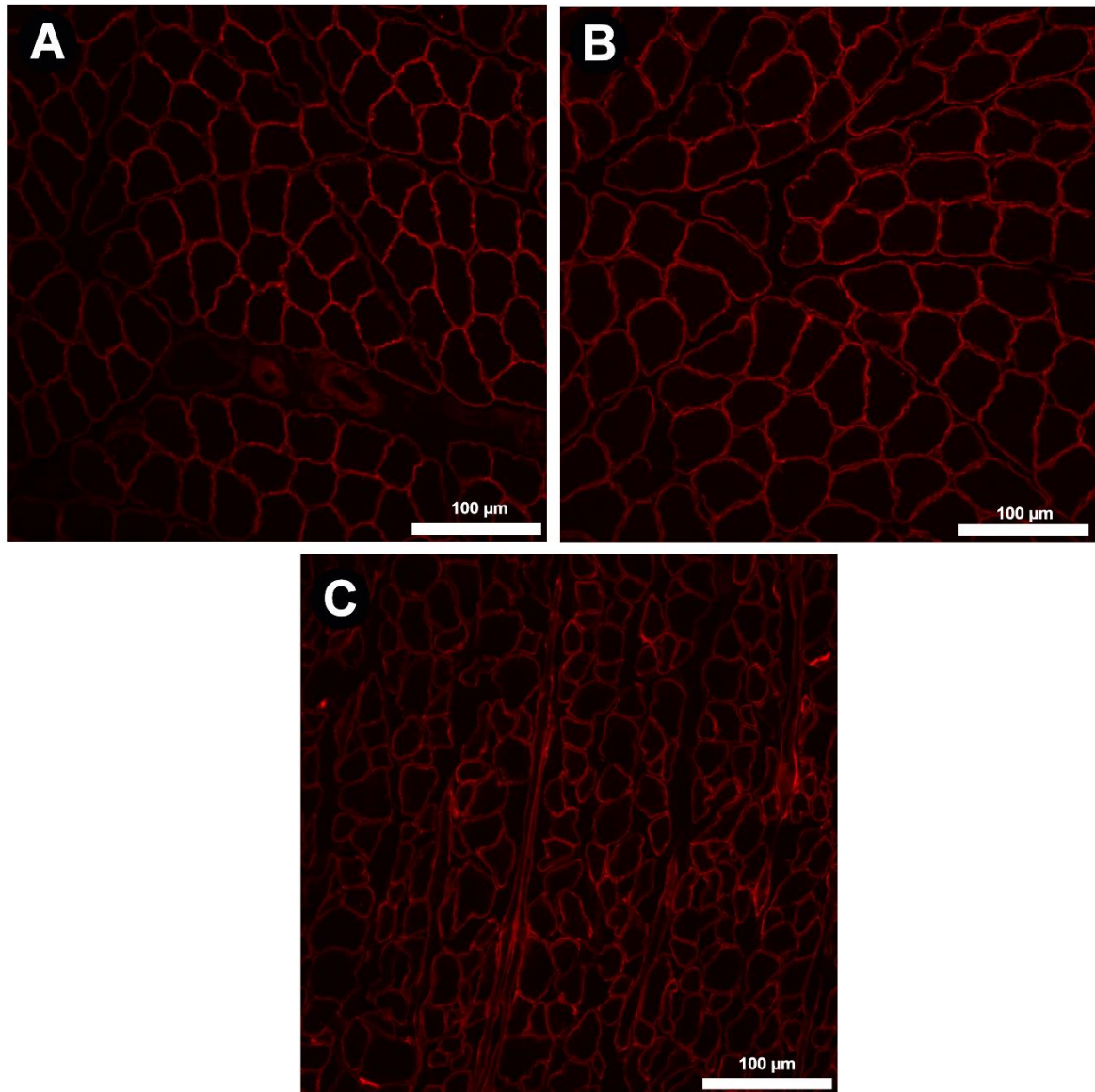
Aby ocenić integralności sarkolemy włókien mięśniowych w badanych mięśniach wykonano immunofluorescencyjne znakowanie dystrofiny. Celem tej analizy było sprawdzenie czy podanie iryzyny nie wiązało się z widocznymi zaburzeniami rozmieszczenia dystrofiny, które mogłyby wskazywać na uszkodzenie błony włókien mięśniowych lub zmiany o charakterze dystroficznym. Ocena ta miała charakter jakościowy i nie obejmowała pomiaru intensywności fluorescencji ani ilościowej analizy ekspresji dystrofiny.

Immunofluorescencyjne wykrywanie dystrofiny przeprowadzono na kriostatowych przekrojach mięśni szkieletowych o grubości 10 μm. Analizę wykonano w celu uwidocznienia obwodowego przebiegu dystrofiny w obrębie sarkolemy włókien mięśniowych, co umożliwiało ocenę ciągłości. Preparaty nanoszono na szkiełka mikroskopowe Superfrost Plus, pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej, a następnie płukano w buforze PBS.

Skrawki inkubowano z przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko dystrofynie (Tabela 1). Inkubację prowadzono przez noc w temperaturze 4°C w komorze wilgotnej. Po zakończeniu inkubacji preparaty płukano trzykrotnie w PBS, po 10 minut każde płukanie, w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała pierwotnego. Następnie skrawki inkubowano z odpowiednim przeciwciałem wtórnym sprzężonym z fluorochromem

Alexa Fluor 594 (Tabela 1). Inkubację prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w warunkach ograniczonego dostępu światła. Po inkubacji preparaty ponownie płukano trzykrotnie w PBS, każde płukanie po 10 minut, a następnie zamykano w medium na bazie glicerolu buforowanego fosforanami o pH 8,2 i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy.

Preparaty oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus BX-51 DSU (Olympus, Tokio, Japonia) z zastosowaniem zestawu filtrów U-MWIY2 odpowiedniego do detekcji Alexa Fluor 594, obejmującego filtr wzbudzający 545–580 nm, zwierciadło dichroiczne 600 nm oraz filtr emisyjny 610IF. Obrazy rejestrowano za pomocą kamery cyfrowej C11440-36U (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japonia). Analizę wykonywano przy stałych ustawieniach ekspozycji, powiększenia i oświetlenia dla wszystkich preparatów (Ryc. 7).



**Rycina 7. Reprezentatywne obrazy immunofluorescencyjnego oznaczenia dystrofiny w badanych mięśniach.** (A) mięsień żwacz, (B) mięsień brzuchaty łydki, (C) mięsień podłużny górny języka. Czerwony sygnał fluorescencyjny wskazuje obecność dystrofiny w obrębie sarkolemy włókien mięśniowych. Ciągły, obwodowy przebieg sygnału wokół włókien wykorzystano do oceny integralności błony komórkowej i wykluczenia zmian o charakterze dystroficznym. Skala: 100 µm.

## 6.5. Analizy statystyczne

Analizę statystyczną Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism v. 11.0.1 (GraphPad Software, Boston, MA, USA). Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Za jednostkę eksperymentalną uznano pojedyncze zwierzę. W przypadku analiz opartych na wielu pomiarach technicznych w obrębie tego samego osobnika, takich jak pomiary włókien mięśniowych, pęczków mięśniowych, pól histologicznych lub regionów pomiarowych, wartości najpierw uśredniano na poziomie osobnika. Do analizy statystycznej wprowadzano wyłącznie wartości osobnicze. Normalność rozkładu oceniano testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Levene'a. W przypadku danych niespełniających założeń analizy parametrycznej stosowano transformację logarytmiczną. Analizę statystyczną wykonywano w takim przypadku na danych transformowanych, natomiast wartości przedstawione na rycinach i w tabelach pozostawiano w jednostkach oryginalnych.

Dane analizowano z użyciem dwuczynnikowej ANOVA, z płcią i grupą doświadczalną jako czynnikami głównymi. Model obejmował efekt płci, efekt podania iryzyny oraz interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna. Założenia modelu oceniano na podstawie wykresów kwantyl-kwantyl (Q-Q) reszt oraz wykresów reszt względem wartości dopasowanych. Po dopasowaniu modelu wykonywano zaplanowane porównania wielokrotne wynikające z układu doświadczenia i hipotez badawczych. Porównania te podzielono na dwie rodziny porównań: pierwsza obejmowała wpływ iryzyny w obrębie każdej płci, czyli KON vs IRY osobno u samców i samic, a druga obejmowała różnice między płciami w obrębie tej samej grupy doświadczalnej, czyli samce vs samice osobno w grupie KON i IRY. W obrębie każdej rodziny stosowano korektę Holma-Bonferroniego. Nie wykonywano eksploracyjnych porównań wszystkich możliwych par grup poza wcześniej zdefiniowanymi rodzinami porównań (Bender & Lange, 2001; Holm, 1979). Dane dotyczące masy ciała analizowano oddzielnie dla samców i samic, ponieważ pomiary wykonywano wielokrotnie u tych samych zwierząt w kolejnych tygodniach doświadczenia. W tym celu zastosowano model dla powtarzanych pomiarów, z czasem jako czynnikiem wewnątrzosobniczym i grupą doświadczalną jako czynnikiem międzyosobniczym. Model obejmował efekt czasu, efekt grupy doświadczalnej oraz interakcję czas  $\times$  grupa doświadczalna. Porównania KON vs IRY w poszczególnych punktach czasowych

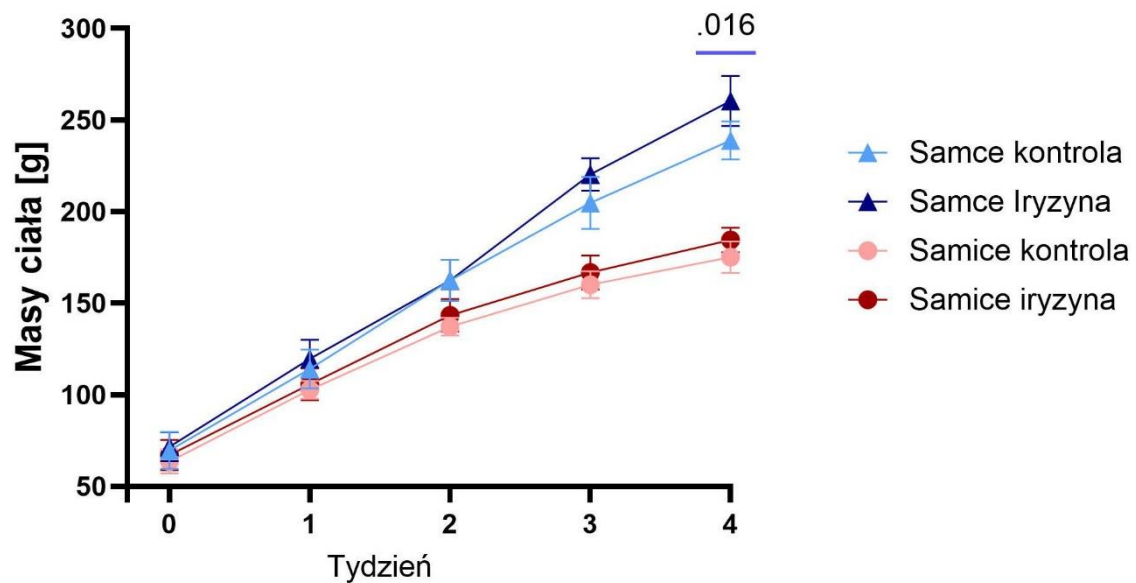
wykonywano jako zaplanowane porównania wielokrotne i korygowano metodą Bonferroniego w obrębie analizowanej płci.

Wyniki modelu ANOVA interpretowano łącznie z zaplanowanymi porównaniami efektów prostych. Efekt interakcji płeć  $\times$  grupa doświadczalna traktowano jako bezpośredni test zależności odpowiedzi na iryzynę od płci. Analogicznie, w analizie masy ciała interakcję czas  $\times$  grupa doświadczalna traktowano jako test zależności wpływu iryzyny od czasu trwania doświadczenia. Za istotne statystycznie uznawano różnice przy  $p < 0.05$ .

## 7. WYNIKI

### 7.1. Masa ciała

Analiza masy ciała w kolejnych tygodniach doświadczenia nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY, z wyjątkiem 4. tygodnia u samców. W tym punkcie czasowym masa ciała samców była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.016$ ; Ryc. 8). U samic nie stwierdzono istotnych różnic między grupami w żadnym z analizowanych tygodni.



Rycina 8. Wpływ egzogennej iryzyny na zmiany w masie ciała przez okres trwania doświadczenia u samców i samic młodych szczurów. Masę ciała monitorowano od rozpoczęcia doświadczenia do 4. tygodnia obserwacji. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Pozioma kreska oznacza istotną różnicę między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci i tego samego punktu czasowego. Wartość  $p$  podano nad kreską.

### 7.2. Kości

#### 7.2.1. Morfometria żuchwy

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla morfometrii żuchwy stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla masy kości ( $p < 0.001$ ), RBW ( $p < 0.001$ ) oraz wszystkich ocenianych wymiarów liniowych: wysokości ( $p < 0.001$ ), długości podstawy ( $p < 0.001$ ) i długości żuchwy ( $p = 0.041$ ).

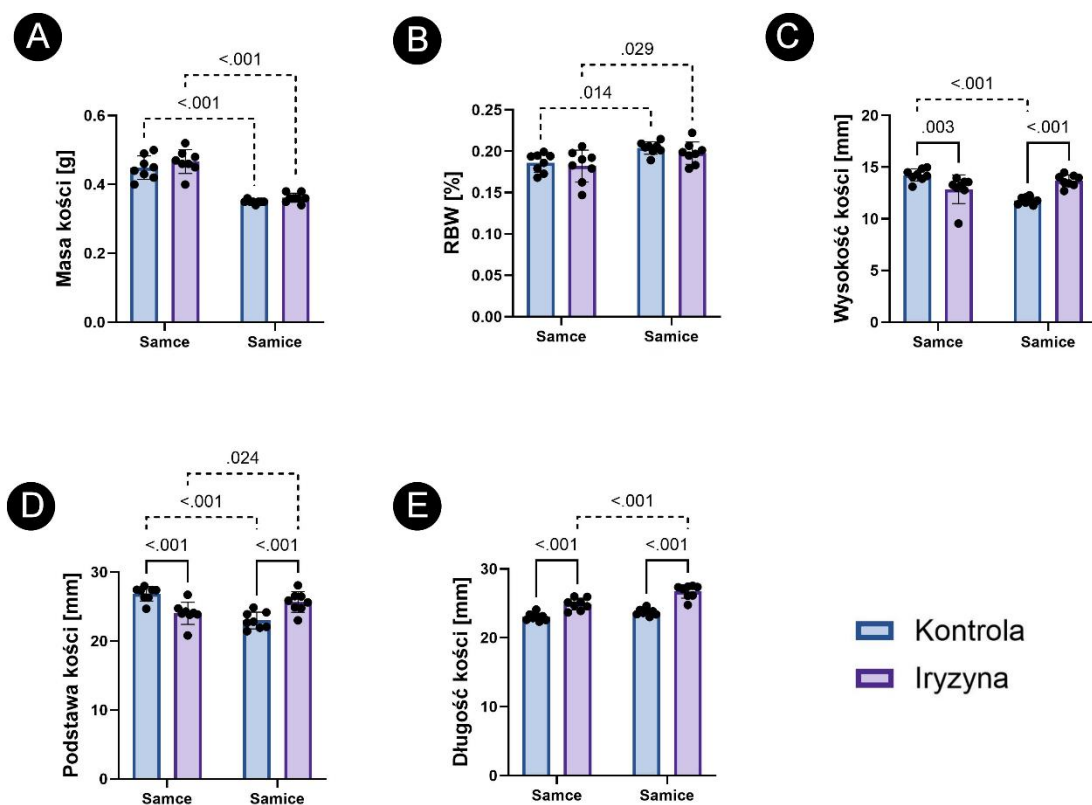
Analiza masy żuchwy wykazała, że zarówno w grupie KON, jak i w grupie IRY, masa żuchwy była większa u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ; Ryc. 9A). Nie stwierdzono istotnego wpływu iryzyny na masę żuchwy ani u samców, ani u samic w porównaniu z odpowiednimi grupami kontrolnymi.

Analiza RBW wykazała, że iryzyna nie wpłynęła istotnie na ten parametr ani u samców, ani u samic. W przeciwieństwie do masy bezwzględnej żuchwy, RBW było większe u samic niż u samców zarówno w grupie KON ( $p = 0.014$ ), jak i w grupie IRY ( $p = 0.029$ ; Ryc. 9B).

Porównanie między płciami w grupie KON wykazało, że wysokość żuchwy była większa u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ). Podanie iryzyny wywołało przeciwstawne zmiany tego parametru u obu płci. U samców wysokość żuchwy była mniejsza w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.003$ ), natomiast u samic była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ). Po podaniu iryzyny różnica między płciami nie była istotna statystycznie (Ryc. 9C).

Podobny wzorzec zmian jak przy wysokości żuchwy stwierdzono dla długości podstawy żuchwy. W grupie KON długość podstawy żuchwy była większa u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ). U samców podanie iryzyny zmniejszyło długość podstawy żuchwy w porównaniu z grupą KON ( $p < 0.001$ ), natomiast u samic parametr ten zwiększył się względem grupy KON ( $p < 0.001$ ). W grupie IRY zależność między płciami uległa odwróceniu, a długość podstawy żuchwy była większa u samic niż u samców ( $p = 0.024$ ; Ryc. 9D).

W grupie KON długość żuchwy była porównywalna u samców i samic. Po podaniu iryzyny długość żuchwy zwiększyła się u obu płci w porównaniu z odpowiednimi grupami kontrolnymi ( $p < 0.001$  dla obu porównań). W grupie IRY długość żuchwy była większa u samic niż u samców ( $p < 0.001$ ; Ryc. 9E).



**Rycina 9. Wpływ egzogennej iryzyny na morfometrię żuchwy u samców i samic młodych szczurów.** (A) masa żuchwy, (B) relatywna masa żuchwy, (C) wysokość żuchwy, (D) długość podstawy żuchwy, (E) długość żuchwy. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.2.2. Właściwości strukturalne i geometryczne żuchwy

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla właściwości strukturalnych i geometrycznych żuchwy stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla  $F_{\text{yield}}$  ( $p < 0.001$ ), sztywności ( $p = 0.002$ ),  $F_{\text{max}}$  ( $p = 0.007$ ),  $W_{\text{max}}$  ( $p < 0.001$ ) oraz  $I_x$  ( $p < 0.001$ ).

Analiza  $F_{\text{yield}}$  wykazała przeciwny kierunek zmian u samców i samic po podaniu iryzyny. W grupie KON  $F_{\text{yield}}$  była większa u samców niż u samic ( $p = 0.012$ ). U samców  $F_{\text{yield}}$  była mniejsza w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.018$ ), natomiast u samic była

większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.005$ ). W konsekwencji w grupie IRY  $F_{\text{yield}}$  była większa u samic niż u samców ( $p = 0.008$ ; Ryc. 10A).

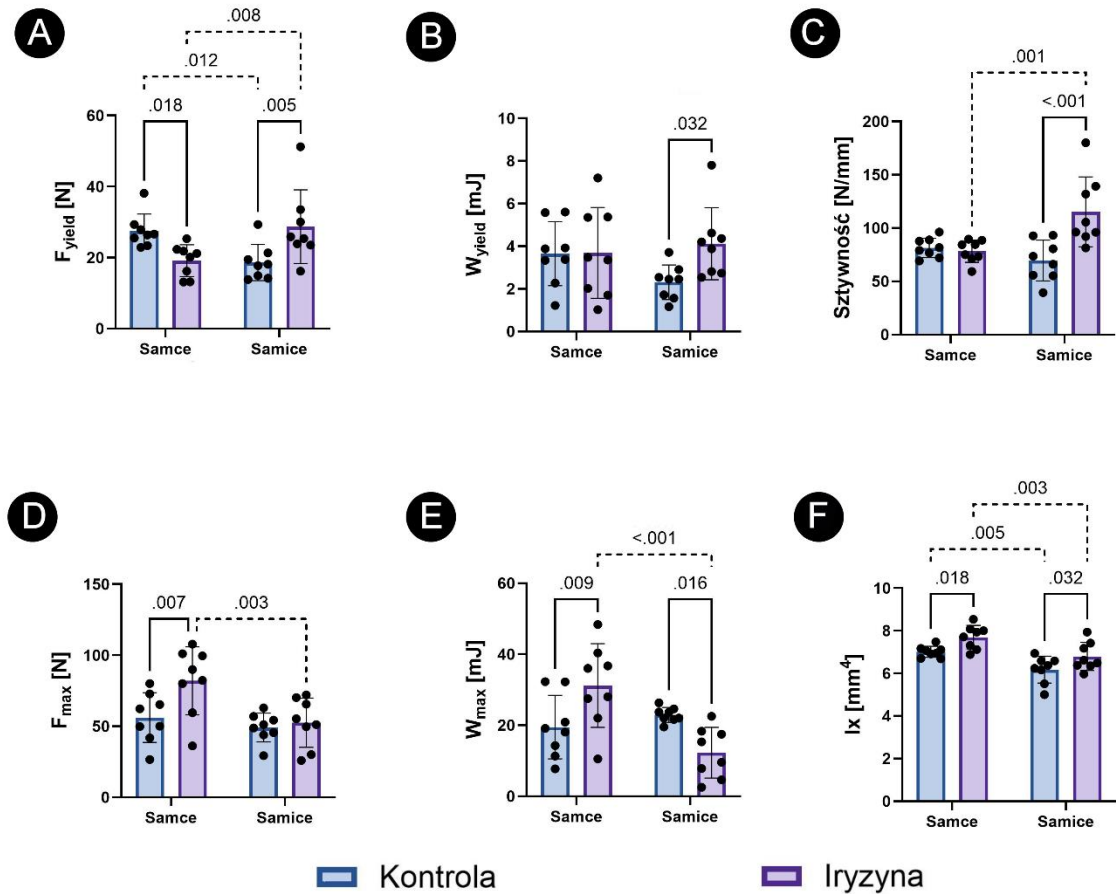
$W_{\text{yield}}$  nie różniła się istotnie między grupami KON i IRY u samców. U samic  $W_{\text{yield}}$  była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.032$ ; Ryc. 10B).

Szttywność żuchwy nie zmieniała się istotnie po podaniu iryzyny u samców, natomiast u samic była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ). W grupie KON sztywność była porównywalna u obu płci, podczas gdy w grupie IRY była większa u samic niż u samców ( $p = 0.001$ ; Ryc. 10C).

$F_{\text{max}}$  była porównywalna u samców i samic w grupie KON. U samców  $F_{\text{max}}$  była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.007$ ), natomiast u samic nie stwierdzono istotnej zmiany tego parametru. W grupie IRY  $F_{\text{max}}$  była większa u samców niż u samic ( $p = 0.003$ ; Ryc. 10D).

$W_{\text{max}}$  zmieniała się po podaniu iryzyny w przeciwnych kierunkach u obu płci. U samców  $W_{\text{max}}$  była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.009$ ), natomiast u samic była mniejsza w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.016$ ). W grupie IRY  $W_{\text{max}}$  była większa u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ; Ryc. 10E).

$Ix$  zwiększył się po podaniu iryzyny zarówno u samców ( $p = 0.018$ ), jak i u samic ( $p = 0.032$ ). W porównaniach między płciami  $Ix$  był większy u samców niż u samic w grupie KON ( $p = 0.005$ ) oraz w grupie IRY ( $p = 0.003$ ; Ryc. 10F).



**Rycina 10. Wpływ egzogennej iryzyny na właściwości strukturalne i geometryczne zuchwy u samców i samic młodych szczurów.** (A) Siła przy granicy sprężystości, (B) praca do granicy sprężystości, (C) sztywność, (D) siła maksymalna, (E) praca do osiągnięcia maksymalnego obciążenia, (F) osiowy moment bezwładności przekroju poprzecznego. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.2.3. Właściwości materiałowe zuchwy

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla pozornych właściwości materiałowych zuchwy stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla  $\sigma_{yield}$  ( $p = 0.002$ ), pozornego modułu Younga ( $p < 0.001$ ),  $\epsilon_{max}$  ( $p = 0.032$ ) oraz  $\sigma_{max}$  ( $p < 0.001$ ).

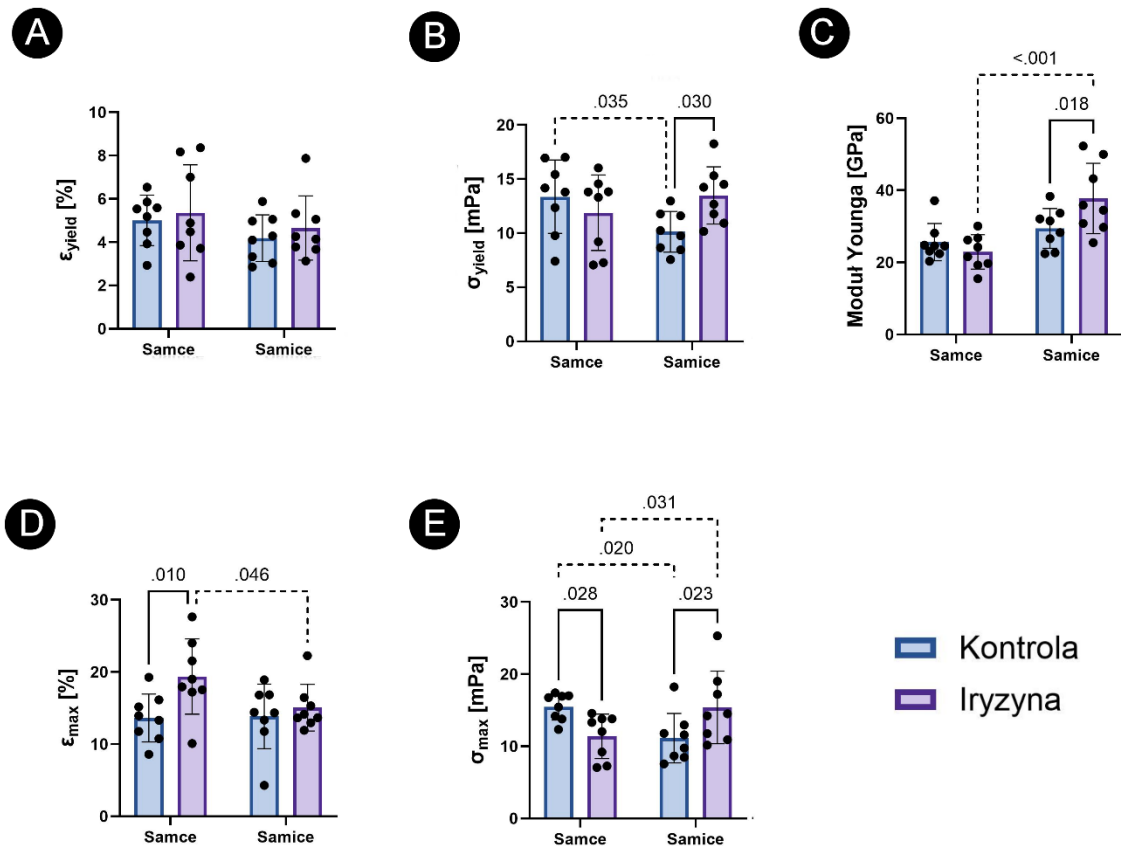
Analiza  $\epsilon_{\text{yield}}$  nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 11A).

$\sigma_{\text{yield}}$  nie zmieniło się istotnie po podaniu iryzyny u samców. U samic  $\sigma_{\text{yield}}$  było większe w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.030$ ). W grupie IRY wartości  $\sigma_{\text{yield}}$  były porównywalne między płciami, natomiast w grupie KON  $\sigma_{\text{yield}}$  było większe u samców niż u samic ( $p = 0.035$ ; Ryc. 11B).

Moduł Younga nie różnił się istotnie między grupami KON i IRY u samców. U samic moduł Younga był większy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.018$ ). W grupie KON nie stwierdzono istotnych różnic między płciami, natomiast w grupie IRY moduł Younga był większy u samic niż u samców ( $p < 0.001$ ; Ryc. 11C).

$\epsilon_{\text{max}}$  zwiększyło się po podaniu iryzyny u samców ( $p = 0.010$ ), natomiast u samic nie uległo istotnej zmianie. W grupie KON  $\epsilon_{\text{max}}$  było porównywalne u obu płci. W grupie IRY  $\epsilon_{\text{max}}$  było większe u samców niż u samic ( $p = 0.046$ ; Ryc. 11D).

$\sigma_{\text{max}}$  zmieniał się po podaniu iryzyny w przeciwnych kierunkach u obu płci. U samców  $\sigma_{\text{max}}$  było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.028$ ), natomiast u samic było większe w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.023$ ). W grupie KON  $\sigma_{\text{max}}$  było większe u samców niż u samic ( $p = 0.020$ ). Po podaniu iryzyny relacja ta uległa odwróceniu; w grupie IRY  $\sigma_{\text{max}}$  było większe u samic niż u samców ( $p = 0.031$ ; Ryc. 11E).



**Rycina 11. Wpływ egzogennej iryzyny na właściwości materiałowe żuchwy u samców i samic młodych szczurów.** (A) Odształcenie przy granicy sprężystości, (B) napężenie przy granicy sprężystości, (C) moduł Younga, (D) odkształcenie maksymalne, (E) napężenie maksymalne. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

#### 7.2.4. Mineralizacja i mikroarchitektura żuchwy

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla parametrów mikroarchitektury kości beleczkowej żuchwy stwierdzono istotną interakcję  $\text{płeć} \times \text{grupa doświadczalna}$  dla BV/TV ( $p < 0.001$ ), Tb.Th ( $p < 0.001$ ) oraz Tb.Sp ( $p < 0.001$ ).

Analiza BMD nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 12A).

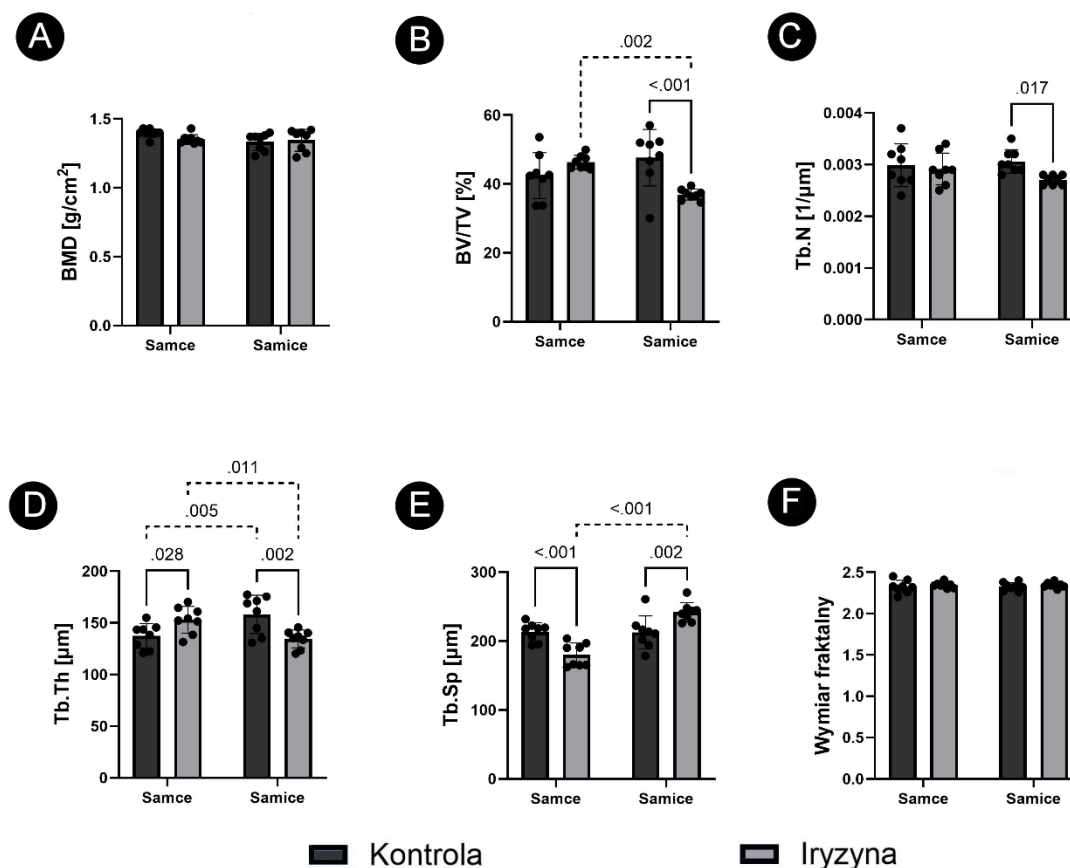
BV/TV nie zmieniło się istotnie po podaniu iryzyny u samców. U samic BV/TV było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ). W grupie KON wartości BV/TV były porównywalne między płciami, natomiast w grupie IRY BV/TV było niższe u samic niż u samców ( $p = 0.002$ ; Ryc. 12B).

Tb.N nie różniło się istotnie między grupami KON i IRY u samców. U samic Tb.N było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.017$ ; Ryc. 12C).

Tb.Th zmieniało się po podaniu iryzyny w przeciwnych kierunkach u obu płci. U samców Tb.Th było większe w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.028$ ), natomiast u samic było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.002$ ). W grupie KON Tb.Th było mniejsze u samców niż u samic ( $p = 0.005$ ). W grupie IRY relacja ta uległa odwróceniu, Tb.Th było większe u samców niż u samic ( $p = 0.011$ ; Ryc. 12D).

Tb.Sp zmieniało się po podaniu iryzyny w przeciwnych kierunkach u obu płci. U samców Tb.Sp było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ), natomiast u samic było większe w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.002$ ). W grupie KON nie stwierdzono istotnych różnic między płciami. W grupie IRY Tb.Sp było mniejsze u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ; Ryc. 12E).

Analiza FD nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 12F).



**Rycina 12. Wpływ egzogennej iryzyny na mineralizację i mikroarchitekturę żuchwy u samców i samic młodych szczurów.** (A) Gęstość mineralna kości, (B) objętość kości odniesiona do objętości całkowitej, (C) liczba beleczek kostnych, (D) grubość beleczek kostnych, (E) separacja beleczek kostnych, (F) wymiar fraktalny. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.2.5. Dynamiczna histomorfometria żuchwy

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla dynamicznej histomorfometrii żuchwy stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna w części korowej dla MS/BS ( $p = 0.005$ ) oraz BFR/BS ( $p = 0.007$ ), a także w części beleczkowej dla MS/BS ( $p < 0.001$ ).

W korze żuchwy analiza MAR nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 13A).

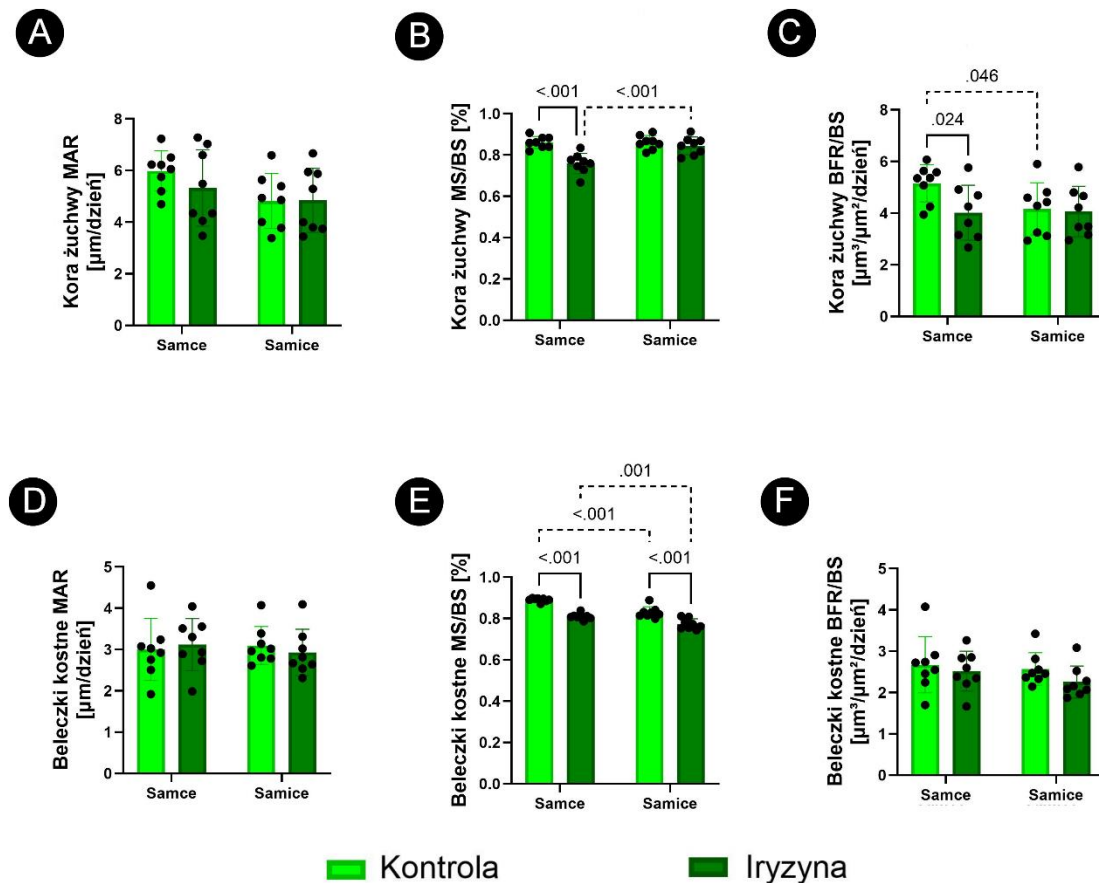
MS/BS nie zmienił się istotnie po podaniu iryzyny u samic. U samców MS/BS był mniejszy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ). W grupie IRY MS/BS był większy u samic niż u samców ( $p < 0.001$ ; Ryc. 13B).

BFR/BS zmniejszył się po podaniu iryzyny u samców ( $p = 0.024$ ), natomiast u samic nie uległ istotnej zmianie. W grupie KON BFR/BS był większy u samców niż u samic ( $p = 0.046$ ). Po podaniu iryzyny różnica między płciami nie była istotna statystycznie (Ryc. 13C).

W kości beleczkowej żuchwy analiza MAR nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 13D).

MS/BS w kości beleczkowej zmniejszył się po podaniu iryzyny u obu płci. U samców MS/BS był mniejszy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.012$ ), a u samic różnica ta była silniej zaznaczona ( $p < 0.001$ ). W porównaniach między płciami MS/BS był większy u samców niż u samic zarówno w grupie KON ( $p < 0.001$ ), jak i w grupie IRY ( $p = 0.001$ ; Ryc. 13E).

BFR/BS w kości beleczkowej żuchwy nie różnił się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 13F).



**Rycina 13. Wpływ egzogennej iryzyny na dynamiczne parametry histomorfometryczne żuchwy oceniane po znakowaniu kalceiną u samców i samic młodych szczurów.** (A) szybkość apozycji mineralnej w korze żuchwy, (B) powierzchnia mineralizująca odniesiona do powierzchni kości w korze żuchwy, (C) tempo tworzenia kości odniesione do powierzchni kości w korze żuchwy, (D) szybkość apozycji mineralnej w kości beleczkowej żuchwy, (E) powierzchnia mineralizująca odniesiona do powierzchni kości w kości beleczkowej żuchwy, oraz (F) tempo tworzenia kości odniesione do powierzchni kości w kości beleczkowej żuchwy. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

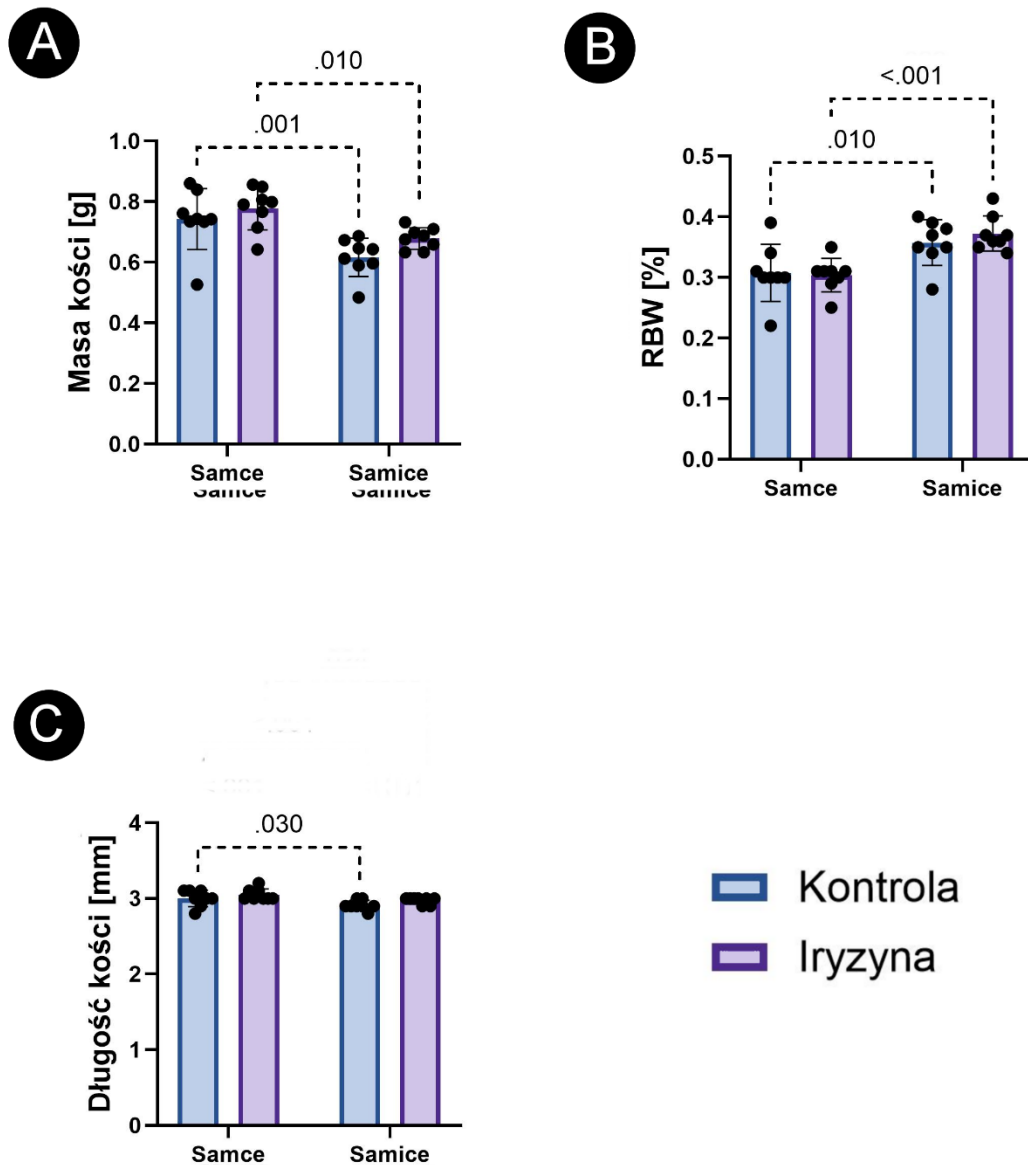
### 7.2.6. Morfometria kości udowej

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla parametrów morfometrycznych kości udowej stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla masy kości ( $p < 0.001$ ), RBW ( $p < 0.001$ ) oraz długości kości ( $p = 0.006$ ).

Analiza masy kości udowej nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic. W porównaniach między płciami masa kości udowej była większa u samców niż u samic zarówno w grupie KON ( $p = 0.001$ ), jak i w grupie IRY ( $p = 0.010$ ; Ryc. 14A).

RBW kości udowej również nie różniło się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic. W przeciwieństwie do masy bezwzględnej, RBW było większe u samic niż u samców zarówno w grupie KON ( $p = 0.010$ ), jak i w grupie IRY ( $p < 0.001$ ; Ryc. 14B).

Długość kości udowej nie zmieniła się istotnie po podaniu iryzyny ani u samców, ani u samic. W grupie KON długość kości udowej była większa u samców niż u samic ( $p = 0.030$ ), natomiast w grupie IRY nie stwierdzono istotnej różnicy między płciami (Ryc. 14C).



**Rycina 14. Wpływ egzogennej iryzyny na morfometrię kości udowej u samców i samic młodych szczurów.** (A) masa kości udowej, (B) relatywna masa kości udowej, (C) Długość kości udowej. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.2.7. Właściwości strukturalne i geometryczne kości udowej

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla właściwości strukturalnych i geometrycznych kości udowej stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla  $F_{\text{yield}}$  ( $p = 0.043$ ),  $W_{\text{yield}}$  ( $p < 0.001$ ), sztywności ( $p = 0.007$ ) oraz  $I_x$  ( $p < 0.001$ ).

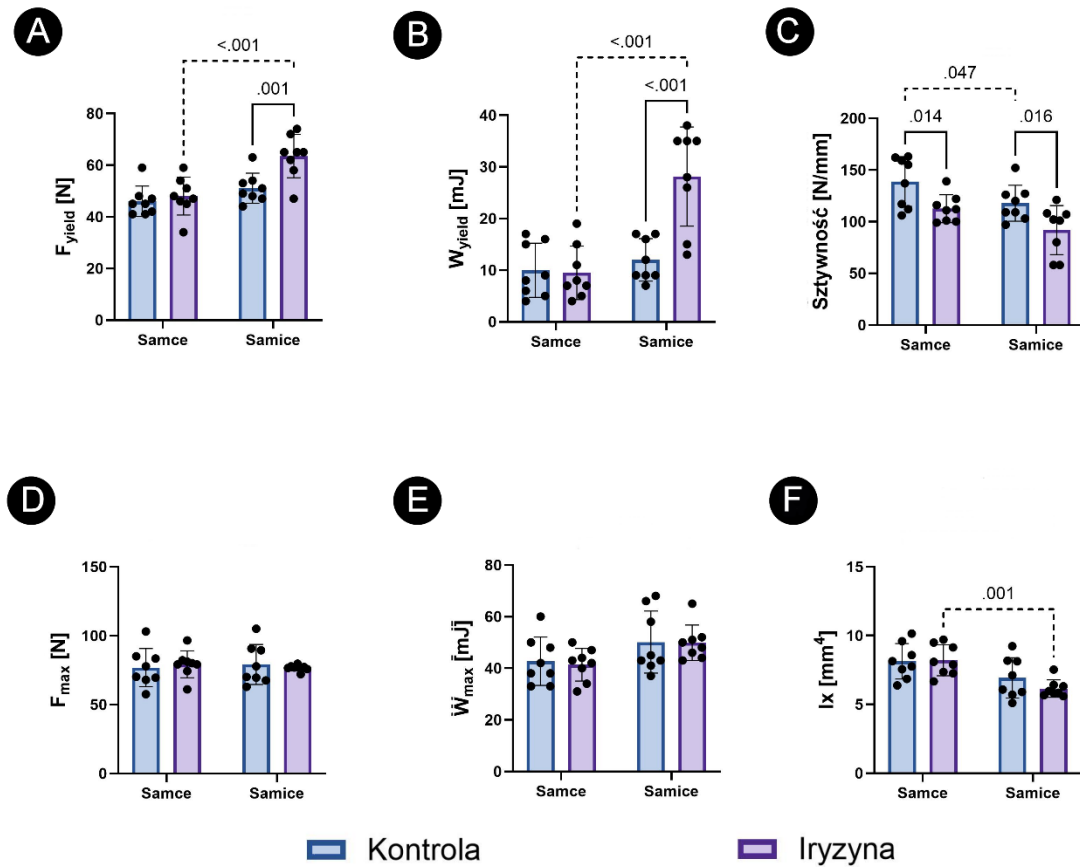
$F_{\text{yield}}$  nie różniła się istotnie między grupami KON i IRY u samców. U samic  $F_{\text{yield}}$  była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.001$ ). W grupie IRY  $F_{\text{yield}}$  była większa u samic niż u samców ( $p < 0.001$ ; Ryc. 15A).

Podobny układ zmian stwierdzono dla  $W_{\text{yield}}$ .  $W_{\text{yield}}$  nie różniła się istotnie między grupami KON i IRY u samców. U samic  $W_{\text{yield}}$  była większa w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ). W grupie IRY  $W_{\text{yield}}$  była większa u samic niż u samców ( $p < 0.001$ ; Ryc. 15B).

Sztywność kości udowej była mniejsza w grupie IRY niż w grupie KON zarówno u samców ( $p = 0.014$ ), jak i u samic ( $p = 0.016$ ). W grupie KON sztywność była większa u samców niż u samic ( $p = 0.047$ ), natomiast w grupie IRY nie stwierdzono istotnej różnicy między płciami (Ryc. 15C).

Analiza  $F_{\text{max}}$  nie wykazała istotnych różnic między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic. Nie stwierdzono również istotnych różnic między płciami w grupie KON ani w grupie IRY (Ryc. 15D). Podobny wynik uzyskano dla  $W_{\text{max}}$ , które nie różniło się istotnie między grupami KON i IRY u samców i samic oraz nie wykazywało istotnych różnic między płciami (Ryc. 15E).

$I_x$  nie zmienił się istotnie po podaniu iryzyny ani u samców, ani u samic. W grupie KON  $I_x$  był większy u samców niż u samic ( $p = 0.001$ ), natomiast w grupie IRY nie stwierdzono istotnej różnicy między płciami (Ryc. 15F).



**Rycina 15. Wpływ egzogennej iryzyny na właściwości strukturalne i geometryczne kości udowej u samców i samic młodych szczurów.** (A) Siła przy granicy sprężystości, (B) praca do granicy sprężystości, (C) sztywność, (D) siła maksymalna, (E) praca do osiągnięcia maksymalnego obciążenia, (F) osiowy moment bezwładności przekroju poprzecznego. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.2.8. Właściwości materiałowe kości udowej

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla pozornych właściwości materiałowych kości udowej stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla  $\epsilon_{yield}$  ( $p < 0.001$ ) oraz  $\sigma_{yield}$  ( $p = 0.008$ ).

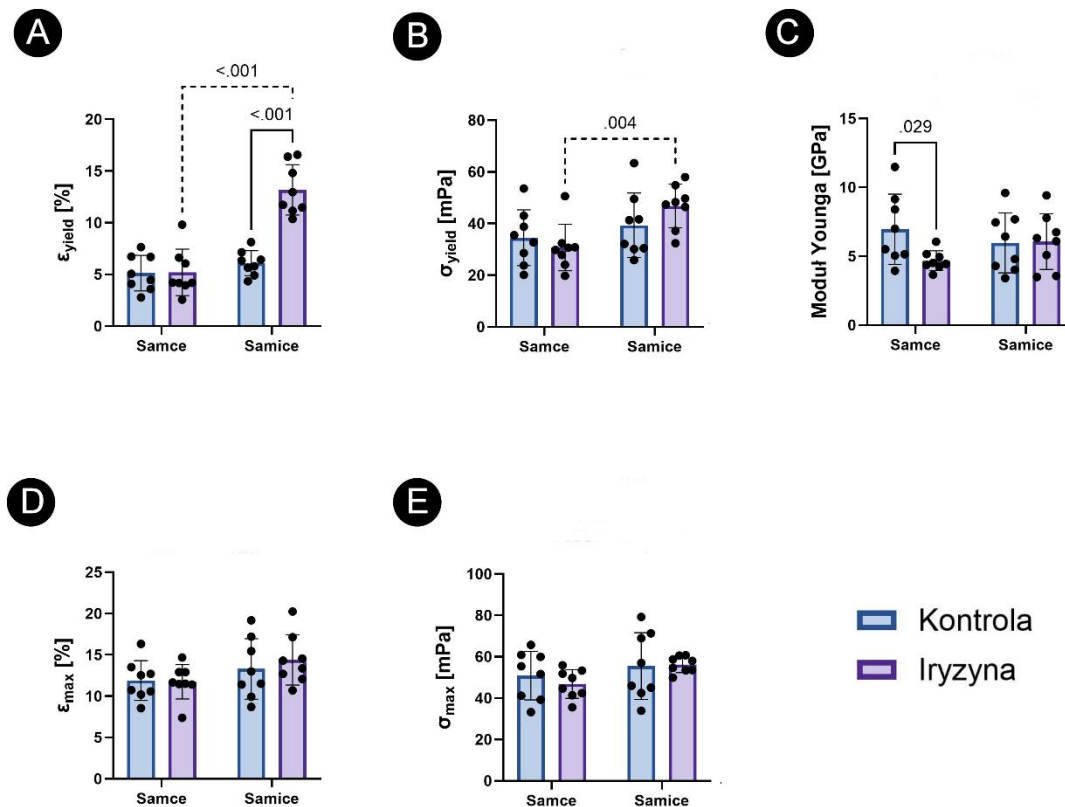
$\varepsilon_{\text{yield}}$  nie różniło się istotnie między grupami KON i IRY u samców. U samic  $\varepsilon_{\text{yield}}$  było większe w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ). W grupie IRY  $\varepsilon_{\text{yield}}$  było większe u samic niż u samców ( $p < 0.001$ ; Ryc. 16A).

$\sigma_{\text{yield}}$  nie zmieniło się istotnie po podaniu iryzyny ani u samców, ani u samic. W grupie IRY  $\sigma_{\text{yield}}$  było większe u samic niż u samców ( $p = 0.004$ ; Ryc. 16B).

Moduł Younga był mniejszy u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.029$ ), natomiast u samic nie stwierdzono istotnej różnicy między grupami. W porównaniach między płciami nie wykazano istotnych różnic ani w grupie KON, ani w grupie IRY (Ryc. 16C).

$\varepsilon_{\text{max}}$  nie różniło się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic. Nie stwierdzono również istotnych różnic między płciami w grupie KON ani w grupie IRY (Ryc. 16D).

$\sigma_{\text{max}}$  nie różniło się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic. Nie stwierdzono również istotnych różnic między płciami w grupie KON ani w grupie IRY (Ryc. 16E).



**Rycina 16. Wpływ egzogennej iryzyny na właściwości materiałowe kości udowej u samców i samic młodych szczurów.** (A) Odształcenie przy granicy sprężystości, (B) naprężenie przy granicy sprężystości, (C) moduł Younga, (D) odkształcenie maksymalne, (E) naprężenie maksymalne. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.2.9. Mineralizacja i mikroarchitektura kości udowej

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla mikroarchitektury kości beleczkowej dalszej przynasady kości udowej stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla parametrów opisujących rozdzielanie i złożoność sieci beleczkowej: Tb.Sp ( $p < 0.001$ ) oraz wymiaru fraktalnego (FD;  $p = 0.028$ ).

BMD było większe w grupie IRY niż w grupie KON zarówno u samców ( $p < 0.001$ ), jak i u samic ( $p = 0.018$ ). Nie stwierdzono istotnych różnic między płciami w grupie KON ani w grupie IRY (Ryc. 17A).

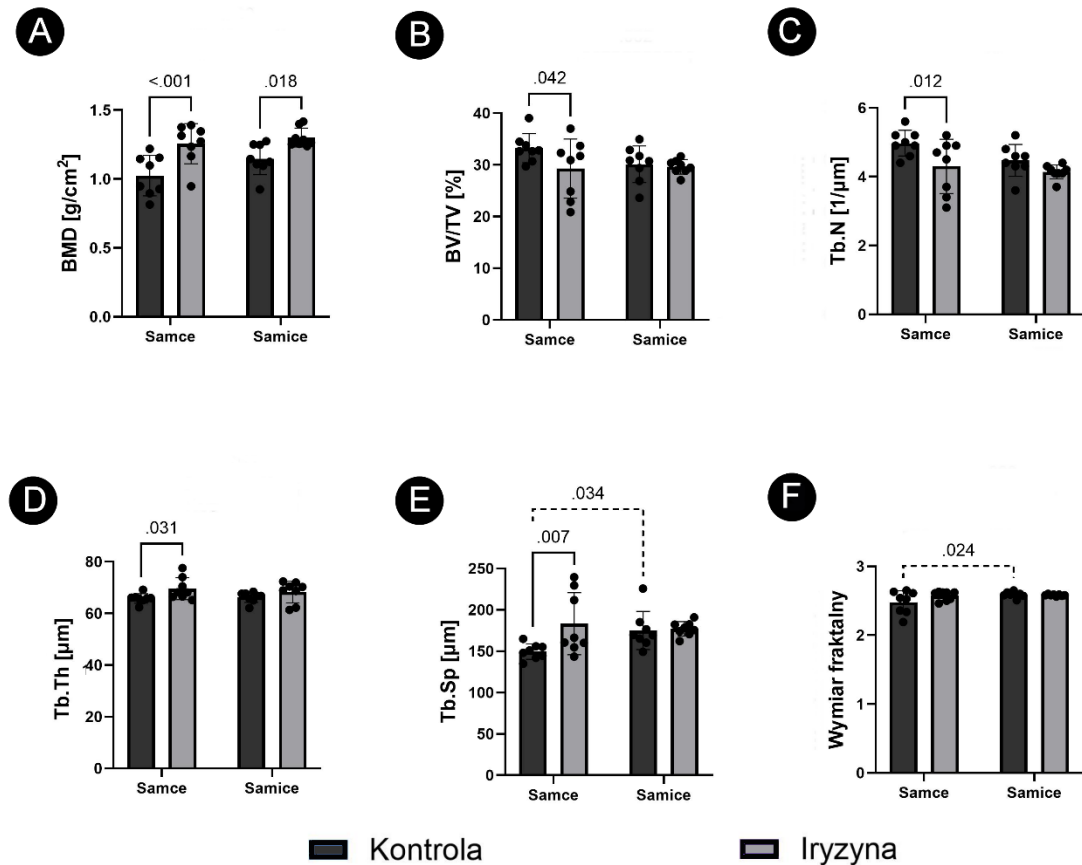
BV/TV było mniejsze u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.042$ ), natomiast u samic nie stwierdzono istotnej różnicy między grupami. W porównaniach między płciami BV/TV nie różniło się istotnie ani w grupie KON, ani w grupie IRY (Ryc. 17B).

Tb.N było mniejsze u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.012$ ), natomiast u samic nie stwierdzono istotnej różnicy między grupami (Ryc. 17C).

Tb.Th było większe u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.031$ ), natomiast u samic nie uległo istotnej zmianie po podaniu iryzyny (Ryc. 17D).

Tb.Sp było większe u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.007$ ). W grupie KON Tb.Sp było mniejsze u samców niż u samic ( $p = 0.034$ ), natomiast w grupie IRY nie stwierdzono istotnej różnicy między płciami (Ryc. 17E).

FD nie różnił się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic. W grupie KON FD był mniejszy u samców niż u samic ( $p = 0.024$ ), natomiast w grupie IRY nie stwierdzono istotnej różnicy między płciami (Ryc. 17F).



**Rycina 17. Wpływ egzogennej iryzyny na mineralizację i mikroarchitekturę kości udowej u samców i samic młodych szczurów.** (A) Gęstość mineralna kości, (B) objętość kości odniesiona do objętości całkowitej, (C) liczba beleczek kostnych, (D) grubość beleczek kostnych, (E) separacja beleczek kostnych, (F) wymiar fraktalny. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

#### 7.2.10. Dynamiczna histomorfometria kości udowej

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla dynamicznej histomorfometrii kości udowej stwierdzono istotną interakcję  $\text{płeć} \times \text{grupa doświadczalna}$  dla wszystkich ocenianych parametrów w części korowej: MAR ( $p = 0.009$ ), MS/BS ( $p < 0.001$ ) i BFR/BS ( $p = 0.003$ ). W części beleczkowej istotną interakcję stwierdzono dla MS/BS ( $p = 0.001$ ).

W korze kości udowej analiza MAR wykazała spadek tego parametru po podaniu iryzyny u obu płci. U samców MAR był mniejszy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p <$

0.001), a u samic również uległ zmniejszeniu w grupie IRY ( $p = 0.029$ ). W grupie KON wartości MAR były porównywalne między płciami, natomiast w grupie IRY MAR był niższy u samców niż u samic ( $p = 0.006$ ; Ryc. 18A).

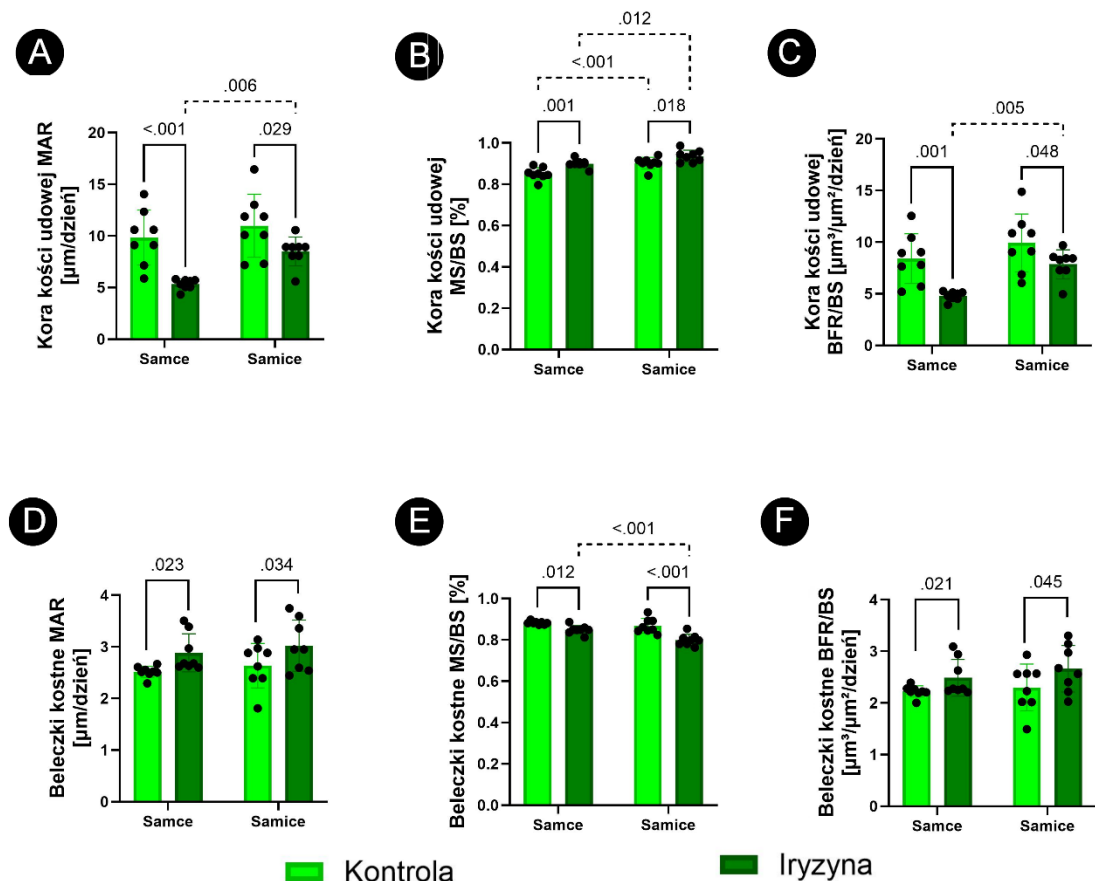
MS/BS w korze kości udowej zwiększył się po podaniu iryzyny zarówno u samców ( $p = 0.001$ ), jak i u samic ( $p = 0.018$ ). W porównaniach między płciami MS/BS był większy u samic niż u samców w grupie KON ( $p < 0.001$ ) oraz w grupie IRY ( $p = 0.012$ ; Ryc. 18B).

BFR/BS w korze kości udowej zmniejszył się po podaniu iryzyny u samców ( $p = 0.001$ ) oraz u samic ( $p = 0.048$ ). W grupie IRY BFR/BS był niższy u samców niż u samic ( $p = 0.005$ ; Ryc. 18C).

W części beleczkowej kości udowej MAR zwiększył się po podaniu iryzyny u obu płci. U samców MAR był większy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.023$ ), a u samic również wzrósł po podaniu iryzyny ( $p = 0.034$ ; Ryc. 18D).

MS/BS w części beleczkowej kości udowej zmniejszył się po podaniu iryzyny zarówno u samców, jak i u samic ( $p < 0.001$  dla obu porównań). W porównaniach między płciami MS/BS był większy u samców niż u samic zarówno w grupie KON, jak i w grupie IRY ( $p < 0.001$  dla obu porównań; Ryc. 18E).

BFR/BS w części beleczkowej kości udowej zwiększył się po podaniu iryzyny u samców ( $p = 0.021$ ) oraz u samic ( $p = 0.045$ ; Ryc. 18F).



**Rycina 18. Wpływ egzogennej iryzyny na dynamiczne parametry histomorfometryczne kości udowej oceniane po znakowaniu kalceiną u samców i samic młodych szczurów.** (A) szybkość apozycji mineralnej w korze kości udowej, (B) powierzchnia mineralizująca odniesiona do powierzchni kości w korze kości udowej, (C) tempo tworzenia kości odniesione do powierzchni kości w korze kości udowej, (D) szybkość apozycji mineralnej w kości bełeczkowej kości udowej, (E) powierzchnia mineralizująca odniesiona do powierzchni kości w kości bełeczkowej kości udowej, oraz (F) tempo tworzenia kości odniesione do powierzchni kości w kości bełeczkowej kości udowej. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.2.11. Mineralizacja i mikroarchitektura kręgów

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla kręgów lędźwiowych stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla parametrów opisujących ilość i rozmieszczenie beleczek kostnych: BV/TV ( $p = 0.006$ ), Tb.N ( $p < 0.001$ ) oraz Tb.Sp ( $p < 0.001$ ).

BMD kręgów było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON zarówno u samców ( $p < 0.001$ ), jak i u samic ( $p = 0.024$ ; Ryc. 19A).

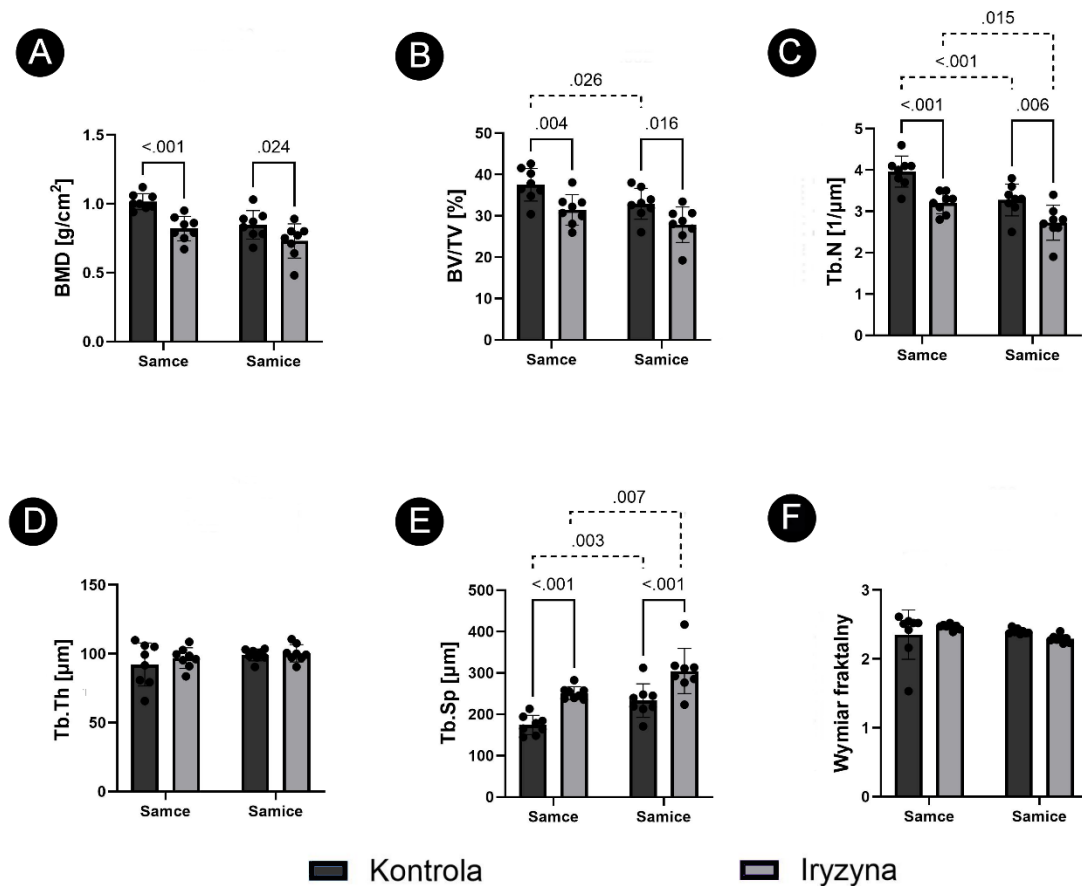
BV/TV było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON u samców ( $p = 0.004$ ) oraz u samic ( $p = 0.016$ ). W grupie KON BV/TV było większe u samców niż u samic ( $p = 0.026$ ), natomiast w grupie IRY nie stwierdzono istotnej różnicy między płciami (Ryc. 19B).

Tb.N było mniejsze w grupie IRY niż w grupie KON zarówno u samców ( $p < 0.001$ ), jak i u samic ( $p = 0.006$ ). W porównaniach między płciami Tb.N było większe u samców niż u samic zarówno w grupie KON ( $p < 0.001$ ), jak i w grupie IRY ( $p = 0.015$ ; Ryc. 19C).

Tb.Th nie różniło się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 19D).

Tb.Sp było większe w grupie IRY niż w grupie KON u samców i samic ( $p < 0.001$  dla obu porównań). W porównaniach między płciami Tb.Sp było większe u samic niż u samców zarówno w grupie KON ( $p = 0.003$ ), jak i w grupie IRY ( $p = 0.007$ ; Ryc. 19E).

FD nie różnił się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic (Ryc. 19F).



**Rycina 19. Wpływ egzogennej iryzyny na mineralizację i mikroarchitekturę kręgów u samców i samic młodych szczurów.** (A) Gęstość mineralna kości, (B) objętość kości odniesiona do objętości całkowitej, (C) liczba beleczek kostnych, (D) grubość beleczek kostnych, (E) separacja beleczek kostnych, (F) wymiar fraktalny. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości  $p$  podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.3. Mięśnie szkieletowe

#### 7.3.1. Ocena integralności sarkolemy

W mięśniu żwaczu, mięśniu brzuchatym łydki oraz mięśniu podłużnym górnym języka stwierdzono regularny, obwodowy sygnał immunofluorescencyjny dystrofiny, zgodny z jej lokalizacją w obrębie sarkolemy włókien mięśniowych. U zwierząt z grupy IRY, zarówno u samców, jak i u samic, nie obserwowano ubytków, przerw, fragmentacji ani nieregularnego zaniku sygnału dystrofinowego. Obraz znakowania był porównywalny z odpowiednimi

grupami KON tej samej płci i nie wskazywał na uszkodzenie struktury błony włókien mięśniowych.

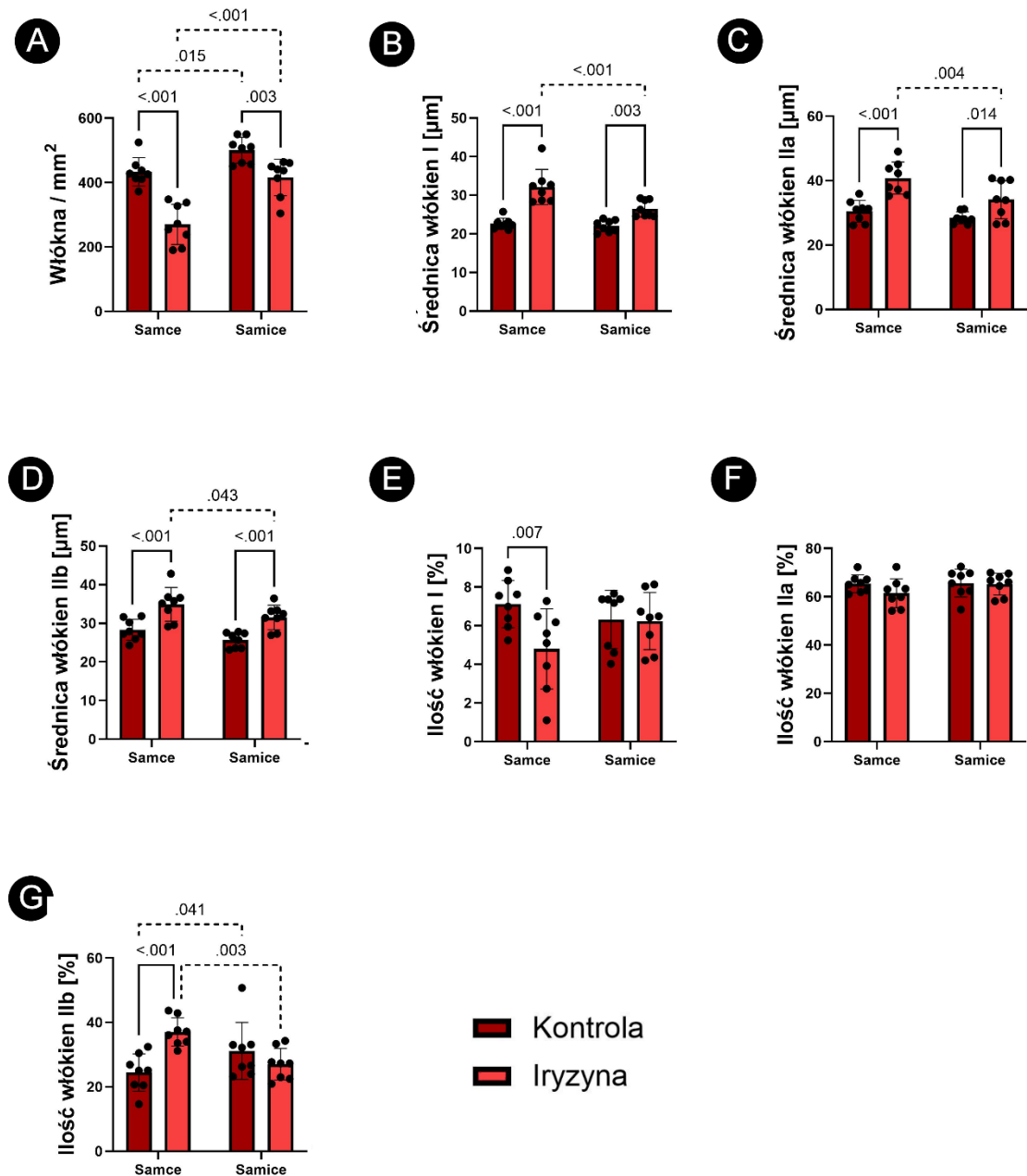
### 7.3.2. Mięsień żwacz

W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla mięśnia żwacza stwierdzono istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna dla liczby profili włókien/mm<sup>2</sup> ( $p = 0.042$ ), minimalnej średnicy Fereta włókien typu I ( $p = 0.014$ ), IIa ( $p = 0.008$ ) i IIb ( $p = 0.012$ ), a także dla udziału włókien typu IIb ( $p < 0.001$ ).

W mięśniu żwaczu liczba włókien/mm<sup>2</sup> była mniejsza w grupie IRY niż w grupie KON zarówno u samców ( $p < 0.001$ ), jak i u samic ( $p = 0.003$ ). W porównaniach między płciami liczba włókien/mm<sup>2</sup> była większa u samic niż u samców w grupie KON ( $p = 0.015$ ) oraz w grupie IRY ( $p < 0.001$ ; Ryc. 20A).

Średnica włókien typu I, IIa i IIb była większa w grupie IRY niż w grupie KON u obu płci. U samców wzrost średnicy osiągnął poziom  $p < 0.001$  dla każdego z analizowanych typów włókien. U samic również obejmował wszystkie typy włókien, przy wartościach  $p = 0.003$  dla typu I,  $p = 0.014$  dla typu IIa oraz  $p < 0.001$  dla typu IIb. (Ryc. 20B-D)

Procent włókien typu I był mniejszy u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.007$ ), natomiast u samic nie zmienił się istotnie. Procent włókien typu IIa nie różnił się istotnie między grupami KON i IRY ani u samców, ani u samic; nie stwierdzono również istotnych różnic między płciami. Procent włókien typu IIb był większy u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ), natomiast u samic nie uległ istotnej zmianie. W grupie IRY udział włókien typu IIb był większy u samców niż u samic ( $p = 0.041$ ; Ryc. 20E-G).



**Rycina 20. Wpływ egzogennej iryzyny na morfometrię włókien mięśniowych w mięśniu żwacz u samców i samic młodych szczurów.** (A) liczba włókien mięśniowych przypadających na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczka mięśniowego, (B) średnica włókien typu I, (C) średnica włókien typu IIa, (D) średnica włókien typu IIb, (E) procentowy udział włókien typu I, (F) procentowy udział włókien typu IIa, oraz (G) procentowy udział włókien typu IIb. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości *p* podano nad odpowiednimi klamrami.

### 7.3.3. Mięsień brzuchaty łydki

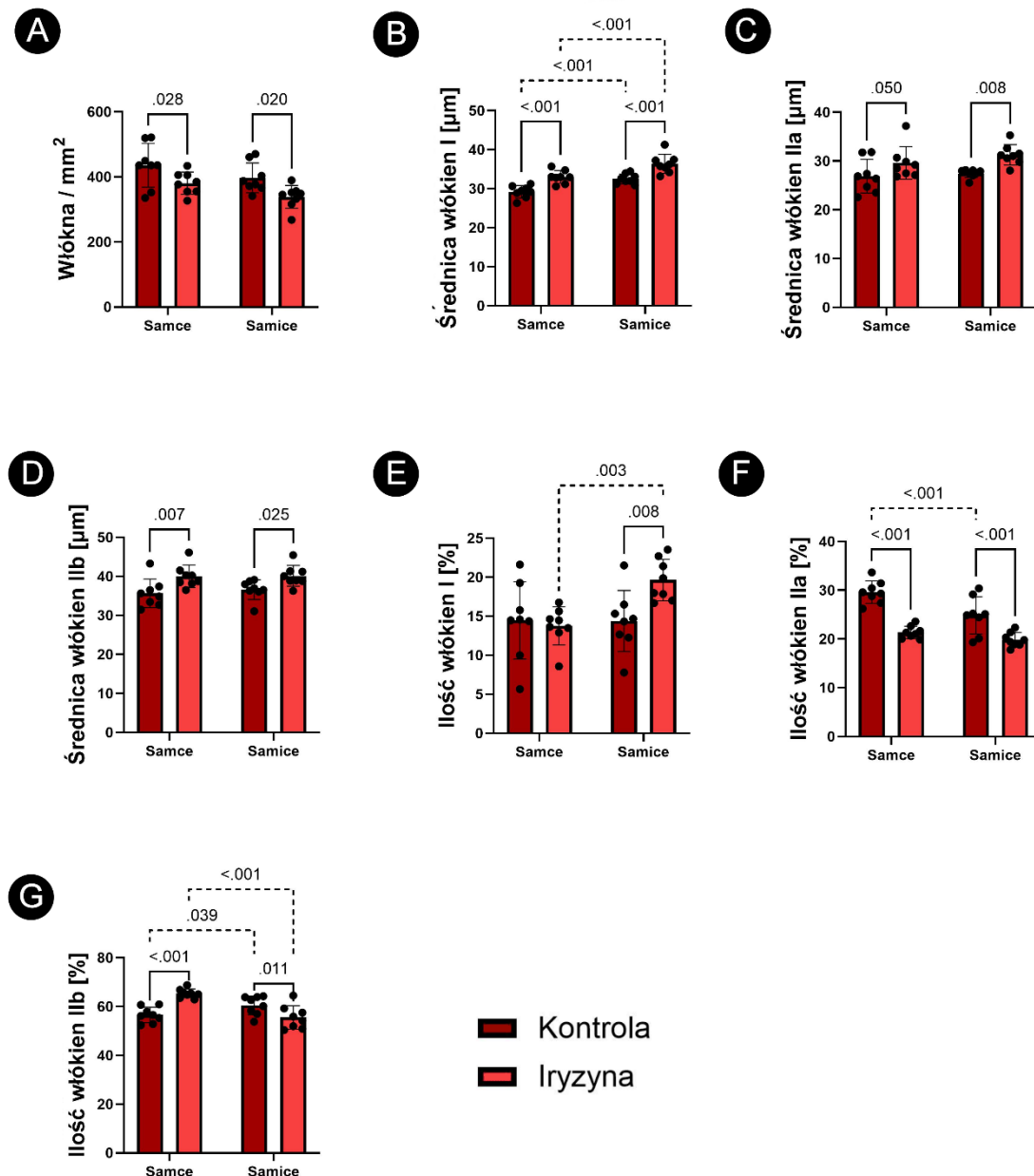
W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla mięśnia brzuchatego łydki istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna stwierdzono dla minimalnej średnicy Fereta włókien typu I ( $p < 0.001$ ) oraz udziału włókien typu I ( $p = 0.029$ ), IIa ( $p < 0.001$ ) i IIb ( $p < 0.001$ ).

W mięśniu brzuchatym łydki liczba włókien/mm<sup>2</sup> była mniejsza w grupie IRY niż w grupie KON zarówno u samców ( $p = 0.028$ ), jak i u samic ( $p = 0.020$ ). W porównaniach między płciami nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie włókien/mm<sup>2</sup> ani w grupie KON, ani w grupie IRY (Ryc. 21A).

Średnica włókien typu I, IIa i IIb była większa w grupie IRY niż w grupie KON zarówno u samców, jak i u samic. U samców różnice wynosiły  $p < 0.001$  dla włókien typu I,  $p = 0.050$  dla typu IIa oraz  $p = 0.007$  dla typu IIb. U samic odpowiednie wartości wynosiły  $p < 0.001$  dla typu I,  $p = 0.008$  dla typu IIa oraz  $p = 0.025$  dla typu IIb. Średnice włókien typu IIa i IIb były porównywalne między płciami w obu grupach. W przypadku włókien typu I średnica była większa u samic niż u samców zarówno w grupie KON, jak i w grupie IRY ( $p < 0.001$  dla obu porównań; Ryc. 21B-D).

Procent włókien typu I nie zmienił się istotnie po podaniu iryzyny u samców. U samic udział tych włókien był większy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.008$ ; Ryc. 21E). Udział włókien typu IIa zmniejszył się po podaniu iryzyny u obu płci ( $p < 0.001$  dla obu porównań). W grupie KON udział włókien typu IIa był większy u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ), natomiast w grupie IRY różnica między płciami nie była istotna statystycznie (Ryc. 21F).

Procent włókien typu IIb zmieniał się po podaniu iryzyny w przeciwnych kierunkach u obu płci. U samców udział włókien typu IIb był większy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ), natomiast u samic był mniejszy w grupie IRY niż w grupie KON ( $p = 0.011$ ). W grupie KON udział włókien typu IIb był mniejszy u samców niż u samic ( $p = 0.039$ ). W grupie IRY relacja ta uległa odwróceniu; udział włókien typu IIb był większy u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ; Ryc. 21G).



**Rycina 21. Wpływ egzogennej iryzyny na morfometrię włókien mięśniowych w mięśniu brzuchatym łydki u samców i samic młodych szczurów.** (A) liczba włókien mięśniowych przypadających na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczka mięśniowego, (B) średnica włókien typu I, (C) średnica włókien typu IIa, (D) średnica włókien typu IIb, (E) procentowy udział włókien typu I, (F) procentowy udział włókien typu IIa, oraz (G) procentowy udział włókien typu IIb. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości *p* podano nad odpowiednimi klamrami.

#### 7.3.4. Język (mięsień podłużny górny)

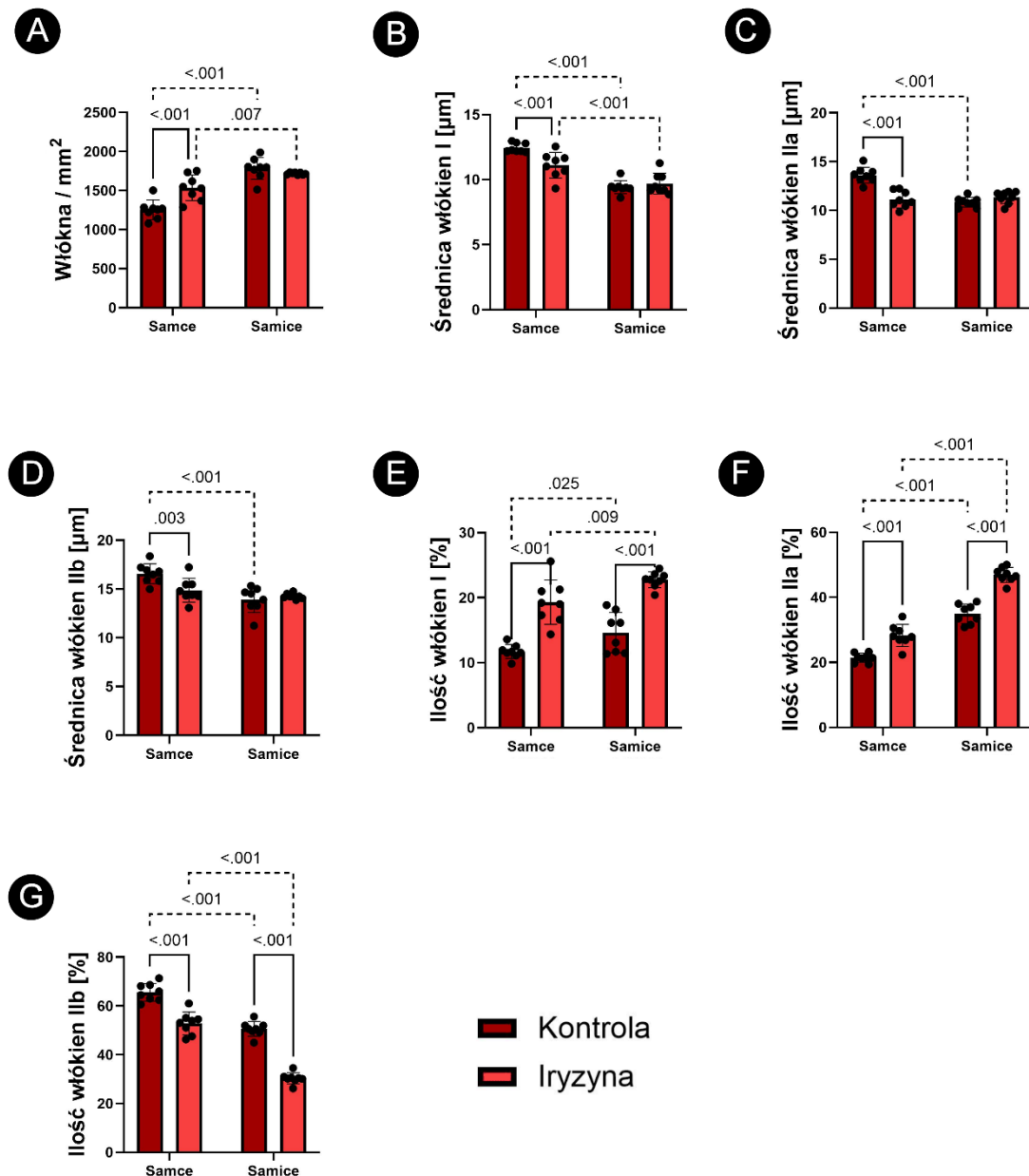
W analizie dwuczynnikowej ANOVA dla mięśnia podłużnego górnego języka istotną interakcję płeć  $\times$  grupa doświadczalna stwierdzono dla wszystkich ocenianych parametrów: liczby profili włókien/mm<sup>2</sup> ( $p < 0.001$ ), minimalnej średnicy Fereta włókien typu I ( $p = 0.003$ ), IIa ( $p < 0.001$ ) i IIb ( $p = 0.009$ ), a także udziału włókien typu I ( $p < 0.001$ ), IIa ( $p = 0.011$ ) i IIb ( $p = 0.005$ ).

W mięśniu podłużnym górnym języka liczba włókien/mm<sup>2</sup> była większa u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ). U samic nie stwierdzono istotnej różnicy między grupami KON i IRY. W porównaniach między płciami liczba włókien/mm<sup>2</sup> była mniejsza u samców niż u samic zarówno w grupie KON ( $p < 0.001$ ), jak i w grupie IRY ( $p = 0.007$ ; Ryc. 22A).

Średnica włókien typu I była mniejsza u samców w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ), natomiast u samic nie uległa istotnej zmianie. Włókna typu I miały większą średnicę u samców niż u samic zarówno w grupie KON, jak i w grupie IRY ( $p < 0.001$  dla obu porównań; Ryc. 22B). Podobny wzorec zmian stwierdzono dla włókien typu IIa. U samców średnica włókien typu IIa była mniejsza w grupie IRY niż w grupie KON ( $p < 0.001$ ), podczas gdy u samic nie wykazano istotnej różnicy między grupami. W grupie KON średnica włókien typu IIa była większa u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ). Po podaniu iryzyny różnica między płciami nie była istotna statystycznie (Ryc. 22C).

Średnica włókien typu IIb również zmniejszyła się po podaniu iryzyny u samców ( $p = 0.003$ ), natomiast u samic nie uległa istotnej zmianie. W grupie KON włókna typu IIb miały większą średnicę u samców niż u samic ( $p < 0.001$ ). W grupie IRY różnica między płciami była mniej zaznaczona i nie osiągnęła istotności statystycznej (Ryc. 22D).

Procent włókien typu I zwiększył się po podaniu iryzyny u obu płci ( $p < 0.001$  dla obu porównań). W porównaniach między płciami udział włókien typu I był mniejszy u samców niż u samic zarówno w grupie KON ( $p = 0.025$ ), jak i w grupie IRY ( $p = 0.009$ ; Ryc. 22E). Procent włókien typu IIa zmieniał się w podobnym kierunku. W grupie IRY był większy niż w grupie KON zarówno u samców, jak i u samic ( $p < 0.001$  dla obu porównań). Różnice między płciami dla tego typu włókien również osiągnęły poziom  $p < 0.001$  (Ryc. 22F). Procent włókien typu IIb zmniejszył się po podaniu iryzyny u obu płci. U samców pozostawał jednak większy niż u samic zarówno w grupie KON, jak i w grupie IRY ( $p < 0.001$  dla wszystkich analizowanych porównań; Ryc. 22G).



**Rycina 22. Wpływ egzogennej iryzyny na morfometrię włókien mięśniowych w mięśniu podłużnym górnym języka u samców i samic młodych szczurów.** (A) liczba włókien mięśniowych przypadających na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczka mięśniowego, (B) średnica włókien typu I, (C) średnica włókien typu IIa, (D) średnica włókien typu IIb, (E) procentowy udział włókien typu I, (F) procentowy udział włókien typu IIa, oraz (G) procentowy udział włókien typu IIb. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Klamry ciągłe oznaczają istotne różnice między grupą kontrolną i grupą otrzymującą iryzynę w obrębie tej samej płci. Klamry przerywane oznaczają istotne różnice między samcami i samicami w obrębie grupy kontrolnej lub doświadczalnej. Wartości *p* podano nad odpowiednimi klamrami.

## 8. DYSKUSJA

Układ mięśniowy i układ szkieletowy należy rozpatrywać jako czynnościową całość, w której mięśnie i kości pozostają ze sobą w stałej zależności mechanicznej i metabolicznej. Tkanka kostna reaguje na obciążenia generowane przez pracę mięśni, natomiast mięśnie uczestniczą w regulacji metabolizmu kości również poprzez wydzielane czynniki humoralne. Do takich czynników należy iryzyna, opisywana jako miokina zależna od aktywności mięśni szkieletowych, mogąca wpływać zarówno na metabolizm mięśni, jak i na przebudowę tkanki kostnej (H. Kim i in., 2018; Kornel i in., 2021; Pedersen & Febbraio, 2008; Severinsen & Pedersen, 2020). Znaczenie tego zagadnienia jest szczególne w okresie wzrostu, gdy równocześnie zachodzi dojrzewanie struktury mięśni szkieletowych, modelowanie kości oraz kształtowanie ich właściwości mechanicznych. W tym czasie odpowiedź na czynnik o działaniu ogólnoustrojowym nie musi być jednakowa w całym układzie mięśniowo-szkieletowym. Może zależeć od lokalizacji anatomicznej, pochodzenia rozwojowego tkanki, udziału kości korowej i beleczkowej, typu obciążeń mechanicznych oraz płci zwierząt.

Uzyskane wyniki wskazują, że egzogenna iryzyna nie wywołała jednorodnej odpowiedzi anabolicznej w obrębie układu mięśniowo-szkieletowego młodych szczurów. Jej działanie miało charakter zależny od lokalizacji anatomicznej i płci, obejmując reorganizację cech włókien mięśniowych oraz zmiany parametrów tkanki kostnej. W mięśniach odpowiedź dotyczyła liczby profili włókien przypadających na jednostkę powierzchni pęczka włókien, minimalnej średnicy Fereta oraz udziału poszczególnych klas włókien. W kościach iryzyna modyfikowała mineralizację, mikroarchitekturę, geometrię, dynamiczne wskaźniki formowania kości oraz właściwości mechaniczne, jednak kierunek tych zmian różnił się między żuchwą, kością udową i badanymi kręgami. Otrzymane wyniki nie wskazują więc na prosty efekt wzrostowy ani jednolite wzmocnienie wszystkich analizowanych struktur, lecz na zróżnicowaną odpowiedź rozwijających się mięśni i kości na egzogeny sygnał iryzyno-pochodny.

Podanie iryzyny nie zmieniło wyraźnie przebiegu wzrostu masy ciała w okresie objętym badaniem. Istotną różnicę między grupami KON i IRY stwierdzono jedynie u samców w 4. tygodniu obserwacji, gdy masa ciała była większa w grupie IRY. W pozostałych punktach czasowych różnice między grupami nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej, mimo że średnie wartości masy ciała były wyższe w grupach otrzymujących iryzynę u obu płci.

Wynik ten wskazuje, że wpływ iryzyny na masę ciała był niewielki i niejednoznaczny w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w tkankach docelowych. Interpretacja tego efektu wymaga ostrożności, ponieważ w pracy nie oceniano składu ciała, pobrania paszy, wydatku energetycznego ani stężenia hormonów płciowych, które w okresie dojrzewania mogły wpływać na tempo wzrostu i odpowiedź metaboliczną zwierząt.

Należy jednak podkreślić, że wpływ iryzyny na masę ciała zależy od modelu doświadczalnego. W pracy Boström i in. iryzynę opisano przede wszystkim jako czynnik nasilający brunatnienie białej tkanki tłuszczowej, ekspresję UCP1 oraz wydatek energetyczny (Boström i in., 2012). Podobny kierunek zmian obserwowano w modelach otyłości i zaburzeń metabolicznych. Alzoughool i in. odnotowali zmniejszenie masy ciała u zwierząt otrzymujących iryzynę, natomiast El Gheit i in. w modelu otyłości pomenopauzalnej u szczurów wykazali zmniejszenie BMI po podaniu iryzyny (Alzoughool i in., 2022; Gheit i in., 2022). Jednocześnie w tym drugim badaniu obserwowano wzrost udziału beztłuszczowej masy ciała, co wskazuje, że sama masa ciała lub BMI nie pozwalają jednoznacznie określić kierunku zmian w składzie ciała. Wyniki niniejszego doświadczenia nie są sprzeczne z obserwacjami przedstawionymi w przytoczonych badaniach, ponieważ badanie przeprowadzono u młodych, intensywnie rosnących szczurów, bez indukowanej otyłości i bez zaburzeń metabolicznych. W takim modelu większa masa ciała po podaniu iryzyny może odzwierciedlać nie efekt obesogeny, lecz przesunięcie dynamiki wzrostu, zwłaszcza w kierunku komponenty mięśniowej. Taką interpretację wspierają wyniki Reza i in., którzy wykazali, że podawanie rekombinowanej iryzyny młodym myszom zwiększało przyrost masy ciała, masę mięśni kończyn, siłę chwytu oraz przekrój poprzeczny włókien mięśniowych, bez równoległego zwiększenia pobrania pokarmu (Reza i in., 2017). W obecnym doświadczeniu nie oceniano składu ciała, dlatego nie można określić, czy obserwowany trend wyższej masy ciała wynikał ze zmian w masie mięśniowej, tkance tłuszczowej czy innych komponentach wzrostu. Biorąc jednak pod uwagę zwiększenie średnicy włókien w żwaczu i mięśni brzuchatym łydki, bardziej prawdopodobna wydaje się interpretacja związana z przebudową tkanek mięśniowo-szkieletowych niż z prostym wzrostem otluszczenia.

W badanych mięśniach iryzyna wpływa na zarówno wielkość włókien, jak i ich rozmieszczenie w obrębie pęczków, jednak odpowiedź nie była jednakowa we wszystkich lokalizacjach. Najbardziej zbliżony obraz stwierdzono w żwaczu i mięśni brzuchatym

łydki. W obu tych mięśniach po podaniu iryzyny średnica włókien typu I, IIa i IIb zwiększyła się u samców i samic. Równocześnie zmniejszyła się liczba włókien/mm<sup>2</sup>. Taki układ zmian jest spójny morfometrycznie, większe włókna zajmują większą powierzchnię przekroju pęczka, dlatego w przeliczeniu na stały obszar analizowany liczba włókien jest mniejsza. Nie wskazuje to więc na utratę włókien, lecz raczej na zwiększenie ich rozmiaru. Podobny kierunek działania iryzyny na mięśnie opisano w badaniach doświadczalnych, w których rekombinowana iryzyna nasilała różnicowanie mioblastów, fuzję komórek mięśniowych, aktywację komórek satelitarnych oraz syntezę białek mięśniowych (J. Lee i in., 2019; Reza i in., 2017). U myszy podawanie iryzyny prowadziło do zwiększenia masy mięśni, wzrostu przekroju poprzecznego włókien oraz poprawy siły chwytu, a w modelu odnerwienia ograniczało zanik mięśniowy (Reza i in., 2017). Również w modelach starzenia wykazano, że niedobór iryzyny wiąże się z nasileniem cech sarkopenii, natomiast jej podanie poprawia masę i funkcję mięśniową (Guo i in., 2024). Wyniki uzyskane w żwaczu i mięśniu brzuchatym łydki są więc zgodne z obserwacjami wskazującymi na pro-miogeny i przeciwanikowy potencjał iryzyny.

Mechanizm tych zmian nie może być w obecnym doświadczeniu określony bezpośrednio, ponieważ nie oceniano ekspresji genów miogeny, aktywności komórek satelitarnych ani szlaków syntezy i degradacji białek. Można jednak odnieść uzyskane wyniki do danych literaturowych. Iryzyna zwiększa aktywność metaboliczną komórek mięśniowych, wpływa na biogenezę mitochondrialną i może regulować szlaki związane z różnicowaniem oraz przebudową mięśni szkieletowych (Vaughan i in., 2014; Zhao i in., 2024). Zwiększenie średnicy włókien w żwaczu i mięśniu brzuchatym łydki mogło więc wynikać z nasilenia procesów anabolicznych w obrębie włókien mięśniowych, ograniczenia degradacji białek lub połączenia obu tych mechanizmów. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia metodami molekularnymi.

Zmiany udziału poszczególnych typów włókien były bardziej zróżnicowane niż zmiany ich średnicy i w większym stopniu zależały od płci. Ma to znaczenie czynnościowe, ponieważ włókna typu I, IIa i IIb różnią się szybkością skurczu, metabolizmem i odpornością na zmęczenie. Włókna typu I mają charakter wolnokurczliwy i oksydacyjny, dlatego lepiej odpowiadają pracy długotrwałej i mniej intensywnej. Włókna typu IIa są szybko kurczliwe, ale zachowują większy potencjał oksydacyjny niż włókna IIb. Włókna typu IIb, szczególnie dobrze rozwinięte u gryzoni, mają charakter szybki i glikolityczny, generują dużą siłę i moc

w krótkim czasie, ale szybciej ulegają zmęczeniu (Schiaffino & Reggiani, 2011; Talbot & Maves, 2016).

W żwaczu zmiany profilu fenotypowego włókien były zaznaczone głównie u samców. Zmniejszenie udziału włókien typu I i zwiększenie udziału włókien typu IIb wskazuje, że po podaniu iryzyny profil tego mięśnia przesunął się u samców w kierunku większego udziału włókien szybkich, glikolitycznych. Przy jednoczesnym zwiększeniu średnicy wszystkich typów włókien może to sugerować adaptację zwiększającą potencjał do generowania krótkotrwałej, większej siły skurczu. W przypadku żwacza taka interpretacja jest biologicznie uzasadniona, ponieważ mięsień ten pracuje w warunkach cyklicznych, zmiennych obciążeń związanych z pobieraniem i rozdrabnianiem pokarmu. U samic wzrost średnicy włókien nie był związany z porównywalną zmianą udziału typów włókien, co sugeruje, że u tej płci odpowiedź miała głównie charakter morfometryczny, a nie fenotypowy. W mięśniu brzuchatym łydki odpowiedź również miała charakter zależny od płci. U samców zmiany udziału włókien wskazywały, podobnie jak w żwaczu, na przesunięcie w kierunku komponenty szybkiej, ponieważ zwiększył się udział włókien typu IIb, a udział włókien typu IIa zmniejszył się. U samic kierunek odpowiedzi był odmienny, wzrost udziału włókien typu I i zmniejszenie udziału włókien typu IIb wskazują raczej na przesunięcie profilu mięśnia w stronę włókien wolniejszych i bardziej odpornych na zmęczenie. Spadek udziału włókien typu IIa u obu płci może świadczyć, że iryzyna nie wywoływała prostego przejścia w kierunku włókien pośrednich, lecz modyfikowała strukturę mięśnia w sposób zależny od płci i lokalnego kontekstu funkcjonalnego.

Takie zróżnicowanie odpowiedzi może wynikać z odmiennych warunków rozwojowych i metabolicznych mięśni samców i samic. Różnice płciowe w mięśniach szkieletowych dotyczą nie tylko masy i wielkości włókien, ale także składu włókien, kinetyki skurczu, ekspresji izoform MyHC oraz regulacji przez hormony płciowe (Haizlip i in., 2015). W badaniach na myszach wykazano również, że metabolizm włókien mięśniowych ma charakter zależny od płci, z przewagą szlaków glikolitycznych u samców i większym udziałem  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych u samic (Christianto i in., 2021). Obecne wyniki dobrze wpisują się w ten schemat interpretacyjny: u samców odpowiedź na iryzynę w żwaczu i mięśniu brzuchatym łydki była związana ze zwiększeniem udziału włókien IIb, natomiast u samic w mięśniu brzuchatym łydki dominowała zmiana w kierunku większego udziału włókien typu I. Nie można jednak jednoznacznie wskazać mechanizmu tej

odmienności, ponieważ w niniejszym doświadczeniu nie oceniano stężenia hormonów płciowych, ekspresji receptorów androgenowych i estrogenowych ani markerów metabolizmu oksydacyjnego i glikolitycznego. Dlatego różnice między samcami i samicami należy interpretować jako zależne od płci biologicznej i lokalnego kontekstu mięśnia, a nie jako bezpośredni dowód udziału konkretnego szlaku hormonalnego.

Odmienny obraz stwierdzono w mięśniu podłużnym górnym języka. U samców po podaniu iryzyny zwiększyła się liczba włókien/mm<sup>2</sup>, a jednocześnie zmniejszyła się średnica włókien typu I, IIa i IIb. Jest to kierunek przeciwny do obserwowanego w żwaczu i mięśniu brzuchatym łydki. Również ten wynik jest spójny morfometrycznie: mniejsze włókna zajmują mniejszą powierzchnię przekroju, dlatego w tej samej powierzchni pęczka może znajdować się ich więcej. U samic średnica włókien mięśnia podłużnego górnego języka nie zmieniła się istotnie, co wskazuje na odmienną odpowiedź tego mięśnia u samców i samic. Jednocześnie w mięśniu podłużnym górnym języka u obu płci zwiększył się udział włókien typu I i IIa, a zmniejszył udział włókien typu IIb. Oznacza to, że mimo zmniejszenia średnicy włókien u samców, obserwowane zmiany nie odpowiadają prostemu obrazowi zaniku mięśniowego. Bardziej prawdopodobna jest przebudowa profilu włókien w kierunku większego udziału komponentu wolniejszego i bardziej odpornego na zmęczenie. Włókna typu I i IIa cechują się większym potencjałem oksydacyjnym niż włókna typu IIb, dlatego taki kierunek zmian może wskazywać na adaptację związaną z utrzymaniem długotrwałej, precyzyjnej aktywności mięśnia, a nie ze zwiększeniem krótkotrwałej siły skurczu (Bloemberg & Quadrilatero, 2012; Fogarty & Sieck, 2021; Schiaffino & Reggiani, 2011).

Taka interpretacja jest szczególnie istotna ze względu na budowę i funkcję analizowanego mięśnia. Mięsień podłużny górny należy do mięśni wewnętrznych języka. W przeciwieństwie do żwacza i mięśnia brzuchatego łydki nie działa jako typowy mięsień przyczepiony do elementów kostnych i przenoszący siłę przez układ dźwigni. Jego początek i koniec znajdują się w obrębie języka, a jego czynność polega przede wszystkim na zmianie kształtu języka, skracaniu go i unoszeniu jego powierzchni (Bailey & Fregosi, 2004; McClung & Goldberg, 2000). Z tego powodu język jest opisywany jako hydrostat mięśniowy, w którym ruch i deformacja wynikają z pracy wzajemnie ułożonych pęczków mięśniowych, bez udziału sztywnego szkieletowego rusztowania (Gilbert i in., 2007; Kier & Smith, 1985). Brak bezpośredniego przyczepu kostnego może mieć znaczenie dla interpretacji obecnych wyników. W żwaczu i mięśniu brzuchatym łydki wzrost minimalnej

średnicy Fereta włókien wskazywał na zwiększenie ich rozmiaru, co na poziomie pojedynczego włókna może być zgodne z większą zdolnością do generowania siły. Nie pozwala to jednak wnioskować o wzroście siły całego mięśnia, ponieważ w pracy nie oceniano całkowitego pola przekroju mięśnia, jego architektury ani właściwości czynnościowych. W mięśniu podłużnym górnym języka znaczenie obserwowanych zmian należy więc rozpatrywać nie w kategoriach prostego zwiększenia potencjału siłowego, lecz raczej reorganizacji cech włókien w mięśniu odpowiedzialnym za lokalną deformację tkanki, koordynację z innymi mięśniami języka oraz powtarzalną aktywność związaną z pobieraniem pokarmu, połykaniem i oddychaniem (Bailey & Fregosi, 2004; Fogarty & Sieck, 2021). W tym kontekście zwiększenie udziału włókien typu I i włókien sklasyfikowanych jako typ IIa przy równoczesnym zmniejszeniu udziału włókien sklasyfikowanych jako typ IIb może wskazywać na przesunięcie profilu mięśnia w stronę większego udziału włókien o wyższym potencjale oksydacyjnym, a nie na przebudowę ukierunkowaną na zwiększenie siły całego mięśnia.

Różnice między mięśniami języka a mięśniami kończyn są dobrze widoczne również w ich organizacji histologicznej. Mięśnie języka wykazują dużą heterogenność włókien, obecność włókien hybrydowych oraz zróżnicowanie regionalne, a ich właściwości skurczowe i odporność na zmęczenie zależą od lokalizacji oraz funkcji danego mięśnia (Cullins & Connor, 2017; Fogarty & Sieck, 2021; Stål i in., 2003). Mięśnie zewnętrzne języka, mające przyczepy kostne i wprowadzające język w ruch jako całość, różnią się od mięśni wewnętrznych, które zmieniają jego kształt i lokalną geometrię (Bailey & Fregosi, 2004; McClung & Goldberg, 2000). Dlatego odpowiedź mięśnia podłużnego górnego na iryzynę nie musi odpowiadać zmianom obserwowanym w żwaczu ani w mięśniu brzuchatym łydki. W obecnym badaniu język reagował przede wszystkim zmianą profilu włókien, a nie zwiększeniem ich kalibru.

Należy również uwzględnić ograniczenia zastosowanej klasyfikacji włókien. U gryzoni w mięśniach szkieletowych występują włókna typu I, IIa, IIx/IIc oraz IIb, a włókna hybrydowe mogą współwyrażać więcej niż jedną izoformę MyHC (Bloemberg & Quadrilatero, 2012; Pette & Staron, 2000; Schiaffino & Reggiani, 2011). W niniejszym doświadczeniu nie wyodrębniano osobno puli włókien typu IIx/IIc. Dlatego zmiany udziału włókien IIa i IIb należy interpretować jako zmianę profilu histochemicznego

i immunohistochemicznego w przyjętym układzie klasyfikacji, a nie jako pełny opis wszystkich izoform MyHC obecnych w analizowanych mięśniach.

Żuchwa stanowi szczególny element układu kostnego, ponieważ łączy cechy kości podporowej, kości twarzy oraz struktury bezpośrednio związanej z narządem żucia. Jej rozwój, kształt i przebudowa zależą nie tylko od ogólnoustrojowej regulacji metabolizmu kostnego, ale również od lokalnych obciążeń mechanicznych przenoszonych przez zęby, staw skroniowo-żuchwowy oraz mięśnie żucia. W odróżnieniu od kości długich, żuchwa ma nieregularną geometrię, złożony układ części korowej i beleczkowej, obecność zębów i przyzębia oraz wyraźnie regionalny charakter obciążeń (Bresin i in., 2000; Buvinic i in., 2020; Mavropoulos i in., 2010). Z tego względu jej odpowiedź na egzogenną iryzynę nie musi być zgodna z reakcją kości udowej.

W obecnym badaniu iryzyna nie zmieniła masy żuchwy ani RBW u samców i samic, co wskazuje, że nie wywołała prostego przyrostu masy tej kości. Jednocześnie zmieniły się jej wymiary liniowe, a kierunek zmian zależał od płci. U samców zmniejszyły się wysokość żuchwy i długość jej podstawy, natomiast u samic oba te parametry wzrosły. Długość żuchwy zwiększyła się u obu płci, przy silniej zaznaczonej odpowiedzi u samic. Taki układ wyników sugeruje, że iryzyna nie działała na żuchwę jako czynnik zwiększający ogólną masę kostną, lecz modyfikowała wzorzec jej wzrostu i modelowania. W okresie intensywnego rozwoju nawet niewielka zmiana aktywności modelowania w określonych regionach kości może prowadzić do zmiany proporcji żuchwy bez równoległej zmiany jej masy. Interpretując te wyniki, należy uwzględnić lokalny charakter przebudowy żuchwy. Badania dotyczące narządów zaangażowanych w proces żucia wskazują, że zmiany obciążeń mechanicznych, wynikające na przykład z modyfikacji konsystencji pokarmu lub ograniczenia funkcji żucia, wpływają na strukturę kości żuchwy w sposób regionalny (Bresin i in., 2000; Mavropoulos i in., 2010, 2014). Odpowiedź ta dotyczy zarówno części korowej, jak i beleczkowej, a jej kierunek zależy od miejsca analizy i rodzaju zmienionego obciążenia. W tym kontekście odmienne zmiany wysokości, podstawy i długości żuchwy u samców i samic mogą odzwierciedlać różnice w lokalnym modelowaniu kości, a nie jednolity efekt ogólnoustrojowy.

Właściwości biomechaniczne żuchwy wskazują, że iryzyna nie wywołała prostego zwiększenia lub zmniejszenia wytrzymałości kości, lecz zmieniła charakter jej odpowiedzi na obciążenie. U samców obraz ten sugeruje przesunięcie w kierunku większej odporności

na końcowe uszkodzenie, ponieważ mimo wcześniejszego osiągnięcia granicy sprężystości kość wytrzymywała większe obciążenie maksymalne i pochłaniała więcej energii przed zniszczeniem. Oznacza to, że po podaniu iryzyny żuchwa samców mogła wcześniej przejść poza zakres odpowiedzi sprężystej, ale jednocześnie zachowywała większą zdolność do przenoszenia obciążenia w dalszej fazie próby. U samic efekt miał inny charakter. Wzrost parametrów związanych z granicą sprężystości, sztywnością i naprężeniem wskazuje na przesunięcie właściwości żuchwy w kierunku większej sztywności i większej odporności na początkowe odkształcenie. Jednoczesne zmniejszenie zdolności do pochłaniania energii przy obciążeniu maksymalnym sugeruje jednak, że nie była to poprawa wszystkich aspektów wytrzymałości. Taki profil może odpowiadać kości bardziej sztywnej, ale mniej zdolnej do rozpraszania energii w końcowej fazie obciążenia. Istotne znaczenie dla interpretacji tych zmian ma wzrost  $I_x$  u obu płci. Przy braku zmian masy żuchwy wskazuje on, że iryzyna mogła wpływać przede wszystkim na rozmieszczenie tkanki kostnej względem osi zginania, a nie na całkowitą ilość tkanki. W przypadku żuchwy, której wynik biomechaniczny zależy silnie od kształtu, lokalnej geometrii i miejsca przyłożenia siły, taka zmiana rozmieszczenia materiału kostnego może istotnie modyfikować odpowiedź mechaniczną nawet bez równoległego wzrostu masy lub BMD. W tym ujęciu obserwowane zmiany biomechaniczne należy traktować jako efekt przebudowy strukturalnej i geometrycznej, a nie jako prosty wynik większej mineralizacji kości.

Analiza mikroarchitektury żuchwy wykazała, że wpływ iryzyny dotyczył przede wszystkim organizacji kości beleczkowej, a nie BMD. Brak istotnych zmian BMD sugeruje, że mineralizacja analizowanego obszaru pozostawała względnie stabilna, natomiast parametry beleczkowe zmieniały się w sposób zależny od płci. U samic wyniki micro-CT wskazywały na rozrzedzenie układu beleczkowego, natomiast u samców obserwowano odmienny kierunek zmian, związany z większą grubością beleczek i mniejszą separacją między nimi. Taki układ wyników potwierdza, że BMD i parametry mikroarchitektoniczne opisują różne składowe jakości kości i nie muszą zmieniać się równolegle (Bouxsein i in., 2010; Faot i in., 2015; Watson i in., 2018). Wyniki te należy interpretować w kontekście specyfiki żuchwy jako kości nieregularnej i regionalnie obciążanej. Właściwości mechaniczne całej żuchwy zależą od rozmieszczenia tkanki kostnej, udziału części korowej, lokalnej geometrii, miejsca przyłożenia siły oraz struktury części beleczkowej. Z tego powodu osłabienie wybranych parametrów beleczkowych nie musi bezpośrednio oznaczać

pogorszenia całej odpowiedzi biomechanicznej kości. Jest to szczególnie istotne u samic, u których mniej korzystny obraz mikroarchitektury beleczkowej współwystępował z większą sztywnością i wyższymi parametrami naprężeniowymi. W żuchwie zmiana jednego przedziału tkanki kostnej może być częściowo równoważona przez zmianę geometrii lub udziału części korowej, dlatego mechaniczna odpowiedź całej kości może odbiegać od tego, czego oczekiwano by wyłącznie na podstawie parametrów beleczkowych (Bresin i in., 1999; Buvinic i in., 2020; Faot i in., 2015). Wyniki znakowania kalceiną dodatkowo wskazują, że iryzyna nie nasilała jednoznacznie aktywności kościotworzenia w żuchwie. Najbardziej stałym elementem odpowiedzi było zmniejszenie MS/BS, szczególnie widoczne w kości beleczkowej, przy braku równoległego wzrostu MAR. Oznacza to, że iryzyna nie zwiększała tempa odkładania nowej tkanki na aktywnych powierzchniach mineralizacji, lecz raczej ograniczała udział powierzchni objętej aktywną mineralizacją. W takim ujęciu zmiany dynamiczne nie wskazują na pobudzenie formowania kości, lecz na przesunięcie zakresu aktywnej przebudowy w obrębie analizowanego VOI.

Zestawienie wyników micro-CT, kalceiny i biomechaniki sugeruje więc, że odpowiedź żuchwy na iryzynę miała charakter przebudowy strukturalnej, a nie prostego wzrostu mineralizacji lub masy kostnej. U samic podawanie iryzyny było związane z mniej korzystną organizacją beleczek, ale równocześnie z większą sztywnością i wyższą odpornością na początkowe odkształcenie. U samców zmiany mikroarchitektoniczne były mniej jednoznaczne i mogły częściowo wspierać większą zdolność kości do przenoszenia obciążenia w końcowej fazie próby. Taki obraz jest biologicznie możliwy, ponieważ żuchwa jest kością czaszkową o nieregularnej geometrii, jej odpowiedź mechaniczna zależy nie tylko od ilości tkanki kostnej, ale także od jej rozmieszczenia, kształtu całej kości, lokalizacji obciążenia oraz regionalnej organizacji części korowej i beleczkowej (Buvinic i in., 2020; Faot i in., 2015; van Eijden, 2000). W praktyce oznacza to, że pogorszenie wybranych parametrów beleczkowych nie musi automatycznie prowadzić do proporcjonalnego pogorszenia właściwości mechanicznych całej żuchwy. Wynik próby biomechanicznej obejmuje odpowiedź całej struktury, w której udział biorą równocześnie część korowa, część beleczkowa, geometria przekroju, rozmieszczenie materiału kostnego względem osi zginania oraz miejsce przyłożenia siły. Dlatego u samic mniej korzystna organizacja beleczek mogła współwystępować z większą sztywnością i wyższą odpornością na początkowe odkształcenie, jeżeli równolegle zmieniła się geometria lub udział przedziału korowego. Podobnie u samców większa zdolność kości do przenoszenia obciążenia

w końcowej fazie próby mogła wynikać nie tylko ze zmian w kości beleczkowej, lecz także z korzystniejszego rozmieszczenia tkanki kostnej, czego pośrednim wskaźnikiem był wzrost  $Ix$ . Takie rozdzielenie między obrazem mikroarchitektury beleczkowej a mechaniką całej kości jest szczególnie prawdopodobne w żuchwie, ponieważ jej sztywność i wytrzymałość zależą od właściwości tkanki, rozmieszczenia kości oraz wielkości i kształtu całej struktury (Bouxsein i in., 2010; Faot i in., 2015; van Eijden, 2000).

Kość udowa stanowi odmienny model odpowiedzi kostnej niż żuchwa. Jest kością długą, powstającą na drodze kostnienia śródchrzęstnego, obciążaną przede wszystkim podczas podporu ciała i lokomocji. Jej właściwości zależą od wzrostu na długość, modelowania trzonu, mikroarchitektury części przynasadowej oraz stopnia mineralizacji tkanki. W przeciwieństwie do żuchwy, której odpowiedź jest silnie związana z lokalną funkcją narządu żucia, kość udowa pozostaje pod wpływem obciążeń typowych dla kończyn oraz ogólnoustrojowej regulacji wzrostu i metabolizmu kostnego (Frost, 1987, 2004; Robling & Turner, 2009).

W obecnym badaniu iryzyna nie zmieniła masy, RBW ani długości kości udowej. Oznacza to, że w zastosowanym czasie doświadczenia nie obserwowano prostego wpływu iryzyny na wzrost liniowy ani na całkowitą masę tej kości. Jest to istotne, ponieważ zwierzęta znajdowały się w okresie intensywnego wzrostu, w którym nawet niewielkie przesunięcia tempa modelowania mogłyby znaleźć odzwierciedlenie w parametrach morfometrycznych. Brak takich zmian sugeruje, że odpowiedź kości udowej dotyczyła raczej jakości tkanki i jej organizacji wewnętrznej niż ogólnego rozmiaru kości. Najbardziej wyraźnym elementem odpowiedzi była zmiana mineralizacji. BMD wzrosło po podaniu iryzyny u obu płci, co wskazuje, że iryzyna mogła zwiększać stopień mineralizacji analizowanego obszaru kości udowej. Taki wynik jest częściowo zgodny z wcześniejszymi badaniami, w których iryzyna była wiązana z poprawą parametrów mineralizacji i aktywności osteoblastycznej. Colaianni et al. (2015) wykazali, że rekombinowana iryzyna podawana młodym samcom myszy zwiększała masę i wytrzymałość kości korowej. Kim et al. (2018) opisali działanie iryzyny przez receptory integrynowe  $\alpha V$ , a Xue et al. (2022) wskazali na aktywację osteogenezy przez szlak BMP/SMAD zależny od integryny  $\alpha V$ . Wyniki obecnego badania są więc zgodne z założeniem, że kość udowa może być wrażliwa na osteotropowe działanie iryzyny, choć zakres tej odpowiedzi nie był jednolity we

wszystkich ocenianych parametrach (Colaïanni i in., 2015; H. Kim i in., 2018; Xue i in., 2022).

Wzrost beleczkowej BMD nie musi oznaczać równoległej poprawy całej sieci beleczkowej ani nasilonego tworzenia nowej kości. U samców po podaniu egzogennej iryzyny obserwowano jednocześnie wyższą beleczkową BMD i większą Tb.Th, ale także mniejsze BV/TV i Tb.N oraz większe Tb.Sp. Taki układ wyników można interpretować jako obraz mniej licznych i bardziej oddalonych beleczek, które równocześnie były grubsze lub silniej zmineralizowane. U rosnących szczurów jest to szczególnie istotne, ponieważ beleczkowa przynasada pozostaje w fazie intensywnego modelowania związanego z kostnieniem śródchrzęstnym, dojrzewaniem pierwotnych beleczek i ich przemieszczaniem się od płytki wzrostowej w kierunku trzonu (Altman i in., 2015). Takie rozdzielenie między beleczkową BMD a parametrami mikroarchitektury nie jest sprzeczne, ponieważ wskaźniki te opisują różne cechy tkanki kostnej. BMD odnosi się do gęstości mineralnej w obrębie analizowanego przedziału beleczkowego, natomiast BV/TV, Tb.N, Tb.Th i Tb.Sp opisują przestrzenną organizację sieci beleczkowej (Bouxsein i in., 2010). Dlatego wyższa beleczkowa BMD może współistnieć z mniejszą liczbą beleczek, jeżeli pozostające beleczki są grubsze lub bardziej zmineralizowane. U samców uzyskany wynik wskazuje więc raczej na zmianę relacji między mineralizacją i organizacją beleczek niż na prosty efekt anaboliczny. Nie można wykluczyć, że część obserwowanych zmian była związana także z odmiennym środowiskiem mechanicznym kości udowej. Zgodnie z teorią mechanostatu Frosta odpowiedź tkanki kostnej zależy od lokalnego poziomu odkształceń mechanicznych i przekroczenia progów prowadzących do utrzymania, tworzenia lub resorpcji kości (Frost, 1994, 2004). Ponieważ kość udowa jest kością podporową kończyny miednicznej, różnice masy ciała i związane z nimi obciążenia mogły wpływać na jej modelowanie w okresie wzrostu. W niniejszej pracy nie oceniano jednak sił działających na kończynę, aktywności lokomotorycznej ani lokalnych odkształceń kości, dlatego mechanostat należy traktować jako możliwy kontekst interpretacyjny, a nie bezpośrednio potwierdzony mechanizm obserwowanych zmian. U samic odpowiedź była słabsza w zakresie mikroarchitektury, ponieważ wzrost beleczkowej BMD nie wiązał się z porównywalną zmianą organizacji sieci beleczkowej. Może to wskazywać, że w tej lokalizacji podanie związku wpływało głównie na mineralizację przedziału beleczkowego, podczas gdy u samców równolegle zmieniały się także wybrane parametry organizacji beleczek.

Właściwości biomechaniczne kości udowej wskazują, że podanie egzogennej iryzyny zmieniło charakter odpowiedzi mechanicznej kości, ale nie prowadziło do jednoznacznego zwiększenia jej wytrzymałości. U samic obserwowano wzrost parametrów związanych z granicą sprężystości, co wskazuje, że kość wymagała większego obciążenia i większej pracy do osiągnięcia punktu granicznego między zakresem sprężystym a dalszym odkształceniem. Jednocześnie brak zmian  $F_{\max}$  i  $W_{\max}$  oznacza, że nie stwierdzono wzrostu maksymalnej nośności kości ani zdolności do pochłaniania energii w końcowej części próby. Spadek sztywności u obu płci wskazuje natomiast na większą podatność kości na odkształcenie w początkowym zakresie obciążenia. Taki profil wyników nie powinien być interpretowany jako prosta poprawa wytrzymałości, lecz jako zmiana sposobu przenoszenia obciążeń przez kość udową. Interpretacja tych wyników wymaga oddzielenia parametrów uzyskanych dla różnych przedziałów anatomicznych kości. Test trójpunktowego zginania kości udowej oceniał odpowiedź mechaniczną całej kości obciążanej w środkowej części trzonu, a więc w regionie z dominującym udziałem tkanki korowej. Z kolei objętościową gęstość mineralną kości beleczkowej oraz parametry mikroarchitektury beleczkowej oznaczano w dalszej przynasadzie kości udowej, a więc w obszarze z dominującym udziałem kości beleczkowej. Test trójpunktowego zginania oceniał natomiast głównie odpowiedź mechaniczną trzonu kości udowej, w którym zasadnicze znaczenie ma część korowa. Z tego względu wyników mineralizacji i mikroarchitektury kości beleczkowej nie można traktować jako bezpośredniego wyjaśnienia zmian biomechanicznych trzonu kości udowej. Zmiany mechaniczne kości udowej należy więc odnosić przede wszystkim do cech strukturalnych całej kości oraz geometrii trzonu, w tym do rozmieszczenia tkanki korowej względem osi zginania. Parametry takie jak naprężenie, odkształcenie i pozorny moduł Younga obliczano na podstawie modelu geometrycznego przyjętego dla testu zginania, dlatego należy je interpretować jako pozorne właściwości materiałowe, zależne od kształtu przekroju i założeń obliczeniowych. Brak równoległego wzrostu  $F_{\max}$  i  $W_{\max}$  przy zmniejszeniu sztywności wskazuje, że podanie egzogennej iryzyny nie zwiększyło globalnej odporności kości udowej na zniszczenie, lecz zmieniło relację między obciążeniem, odkształceniem i pracą do granicy sprężystości. Jest to zgodne z ujęciem, w którym właściwości mechaniczne kości długiej zależą nie tylko od stopnia mineralizacji tkanki, ale również od geometrii przekroju, organizacji kości korowej, porowatości, jakości macierzy kolagenowej i rozmieszczenia materiału kostnego względem osi obciążenia (Bouxsein i in., 2010; Currey, 2003).

Wyniki znakowania kalceiną wskazują, że dynamiczna odpowiedź kości udowej była różna w części korowej i beleczkowej. W korze iryzyna była związana ze zmniejszeniem MAR i BFR/BS przy równoczesnym wzroście MS/BS. Oznacza to, że większy udział powierzchni był objęty aktywną mineralizacją, jednak tempo odkładania nowej zmineralizowanej macierzy na tych powierzchniach było mniejsze, co ostatecznie wiązało się ze zmniejszeniem całkowitego tempa tworzenia kości odniesionego do powierzchni kości. W kości beleczkowej obserwowano odmienny wzorzec odpowiedzi. MS/BS zmniejszył się po podaniu iryzyny, natomiast MAR oraz BFR/BS wzrosły u obu płci. Wskazuje to, że mineralizacja obejmowała mniejszy udział powierzchni beleczkowych, ale na powierzchniach pozostających aktywnie apozycja mineralna przebiegała szybciej. Wzrost BFR/BS mimo zmniejszenia MS/BS wskazuje, że zwiększenie MAR przeważało nad ograniczeniem zakresu powierzchni aktywnie mineralizującej. Odpowiedź kości beleczkowej nie polegała więc na uogólnionym nasileniu aktywności mineralizacyjnej w całym analizowanym obszarze, lecz na zwiększeniu intensywności formowania kości w obrębie mniejszej puli aktywnych powierzchni. Takie rozdzielenie między BMD, mikroarchitekturą, biomechaniką i dynamicznymi wskaźnikami histomorfometrycznymi jest biologicznie możliwe. BMD odzwierciedla stan mineralizacji tkanki w momencie analizy, natomiast znakowanie kalceiną opisuje dynamiczny proces odkładania nowej tkanki w krótkim przedziale czasu przed zakończeniem doświadczenia. Z kolei test biomechaniczny obejmuje odpowiedź całej kości jako struktury. Dlatego wzrost BMD może współistnieć ze zmianą organizacji beleczek oraz odmienną aktywnością formowania kości w poszczególnych przedziałach tkankowych.

Kręgi lędźwiowe stanowią kolejny, odmienny funkcjonalnie element szkieletu. W przeciwieństwie do żuchwy i kości udowej, w niniejszym doświadczeniu kręgi oceniano wyłącznie pod względem BMD oraz mikroarchitektury kości beleczkowej, dlatego ich interpretacja nie może być bezpośrednio odnoszona do właściwości biomechanicznych ani dynamicznych parametrów kościotworzenia. Mimo tego uzyskane wyniki są istotne, ponieważ pokazują, że odpowiedź tkanki kostnej na iryzynę była zależna od lokalizacji anatomicznej.

Obraz micro-CT kręgów wskazywał na mniej korzystną organizację kości beleczkowej po podaniu iryzyny. U obu płci stwierdzono zmniejszenie BMD, BV/TV i Tb.N oraz zwiększenie Tb.Sp, przy braku istotnych zmian Tb.Th. Taki układ wyników sugeruje, że

iryzyna była związana przede wszystkim ze zmniejszeniem liczby beleczek i zwiększeniem odległości między nimi, bez kompensacyjnego pogrubienia pozostałych struktur beleczkowych. W praktyce oznacza to rozrzedzenie sieci beleczkowej kręgów, a nie jedynie zmianę stopnia mineralizacji pojedynczych beleczek. Parametry te należy interpretować łącznie, ponieważ BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th i Tb.Sp opisują różne aspekty jakości kości i dopiero ich zestawienie pozwala ocenić kierunek przebudowy mikroarchitektury (Bouxsein i in., 2010).

Taki obraz różnił się od zmian obserwowanych w kości udowej. W kości udowej BMD wzrosło u obu płci, a u samców wzrostowi temu towarzyszyło zwiększenie Tb.Th, mimo pogorszenia części pozostałych parametrów beleczkowych. W kręgach natomiast spadek BMD współwystępował ze zmniejszeniem BV/TV i Tb.N oraz wzrostem Tb.Sp. Oznacza to, że w kręgach nie obserwowano cech sugerujących dojrzewanie lub pogrubienie pozostających beleczek. Odpowiedź tej lokalizacji miała raczej charakter utraty elementów sieci beleczkowej lub ograniczenia ich utrzymania w analizowanym VOI. Różnica między kością udową i kręgami jest biologicznie możliwa, ponieważ kości te różnią się funkcją, geometrią, kierunkiem, wielkością i rodzajem dominującego obciążenia. Kość udowa jest kością długą, w której istotne znaczenie mają trzon, część korowa i obciążenia związane z lokomocją. Trzon kręgu jest natomiast strukturą bogatą w kość beleczkową, przystosowaną głównie do przenoszenia obciążeń osiowych i kompresyjnych. W przypadku kręgów architektura beleczkowa ma szczególne znaczenie dla właściwości mechanicznych, ponieważ bierze udział w przenoszeniu obciążeń działających na cały trzon kręgu. Badania biomechaniczne wskazują, że zależność między mikroarchitekturą beleczkową a zachowaniem mechanicznym kręgu jest silna, ale zależy również od geometrii całego trzonu i obecności cienkiej warstwy korowej (Barak i in., 2010; Fields i in., 2009).

W tym kontekście zmniejszenie BV/TV i Tb.N przy wzroście Tb.Sp w kręgach może mieć większe znaczenie funkcjonalne niż podobne zmiany w lokalizacji, w której dominującą rolę odgrywa część korowa. Kręgi zawierają stosunkowo duży udział kości beleczkowej, dlatego utrata liczby beleczek i zwiększenie przestrzeni między nimi mogą szybciej przekładać się na pogorszenie jakości strukturalnej trzonu kręgu. Brak zmian FD wskazuje, że mimo zmian poszczególnych parametrów mikroarchitektury nie stwierdzono istotnej zmiany globalnego sposobu organizacji i wypełniania przestrzeni przez sieć beleczkową. Bardziej prawdopodobne jest więc ilościowe rozrzedzenie sieci beleczkowej

niż zasadnicza zmiana jej globalnej organizacji geometrycznej. Bardziej prawdopodobne jest więc ilościowe rozrzedzenie sieci beleczkowej niż zasadnicza zmiana jej globalnej organizacji geometrycznej. Taki profil mikroarchitektury jest zwykle wiązany z mniejszą zdolnością kości beleczkowej do przenoszenia obciążeń. Istotne jest również to, że zwierzęta znajdowały się w okresie intensywnego wzrostu. W rosnącym szkielecie kość beleczkowa powstaje i przekształca się dynamicznie w związku z kostnieniem śródchrzęstnym, modelowaniem i przemieszczaniem nowo utworzonej tkanki od płytki wzrostowej w kierunku dalszych części kości (Altman i in., 2015). W takim układzie spadek Tb.N i wzrost Tb.Sp mogą wynikać nie tylko z nasilonej resorpcji, ale również z zaburzenia równowagi między powstawaniem nowych beleczek, ich utrzymaniem i przebudową.

Uzyskany wynik jest szczególnie interesujący w odniesieniu do wcześniejszych badań nad iryzyną, w których często opisywano jej działanie ochronne wobec kości beleczkowej. W modelu ociążenia kończyn u myszy rekombinowana iryzyna zapobiegała utracie masy kostnej i sprzyjała odtworzeniu parametrów beleczkowych w kręgach lędźwiowych (Colaïanni i in., 2017). Podobnie w modelach osteoporozy związanej ze starzeniem lub niedoborem estrogenów iryzyna była opisywana jako czynnik ograniczający utratę kości i poprawiający wybrane parametry mikroarchitektury (Colaïanni i in., 2017; Li i in., 2024). Wynik niniejszego doświadczenia nie musi być z tym sprzeczny, ponieważ dotyczy młodych, intensywnie rosnących szczurów, bez indukowanej osteoporozy, ociążenia lub zaburzeń metabolicznych. W takim modelu iryzyna mogła wpływać na kość nie jako czynnik odtwarzający utraconą masę kostną, lecz jako modulator przebudowy rozwijającej się sieci beleczkowej. Możliwy jest również udział różnej równowagi między aktywnością osteoblastyczną i osteoklastyczną. Iryzyna bywa opisywana jako czynnik wspierający osteogenezę, ale wykazano także, że może bezpośrednio pobudzać osteoklastogenezę i resorpcję kości, co wskazuje na jej udział w regulacji remodelingu, a nie wyłącznie w pobudzaniu formowania kości (Estell i in., 2020; H. Kim i in., 2018). W kręgach młodych szczurów przesunięcie tej równowagi w kierunku szybszej przebudowy lub utraty części beleczek mogłoby tłumaczyć jednoczesny spadek BMD, BV/TV i Tb.N oraz wzrost Tb.Sp.

Wyniki niniejszego doświadczenia wskazują, że egzogenna iryzyna modyfikowała rozwijający się układ mięśniowo-szkieletowy młodych szczurów, jednak jej działanie nie miało charakteru jednorodnego. Nie stwierdzono obrazu, w którym wszystkie analizowane mięśnie i kości reagowałyby równoległym wzrostem masy, mineralizacji, wytrzymałości lub

aktywności kościotworzenia. Odpowiedź była zależna od lokalizacji anatomicznej, płci oraz rodzaju analizowanej tkanki. Całość wyników wskazuje, że mięśnie i kości nie tworzyły prostego, równoległego wzorca odpowiedzi na iryzynę. W części mięśniowej dominowała przebudowa średnicy i profilu włókien, natomiast w części kostnej obserwowano zmiany zależne od lokalizacji: w żuchwie związane z geometrią, mikroarchitekturą i mechaniką, w kości udowej z mineralizacją i przebudową beleczek, a w kręgach z rozrzedzeniem struktury beleczkowej. Jest to zgodne z koncepcją, że układ mięśniowo-szkieletowy funkcjonuje jako złożona jednostka mechaniczna i endokrynną, w której mięśnie i kości komunikują się zarówno przez obciążenia mechaniczne, jak i przez czynniki humoralne, w tym miokiny (Buvinic i in., 2020; Dalle Carbonare i in., 2023; Severinsen & Pedersen, 2020). Interpretując uzyskane wyniki, należy podkreślić, że w niniejszym doświadczeniu oceniano wpływ iryzyny podawanej egzogennie, a nie fizjologicznej iryzyny uwalnianej w odpowiedzi na aktywność mięśni. Ma to istotne znaczenie biologiczne. W warunkach naturalnych iryzyna jest jednym z wielu sygnałów pojawiających się w odpowiedzi na skurcz mięśni, razem z obciążeniem mechanicznym, zmianami metabolicznymi, aktywacją innych miokin oraz lokalną odpowiedzią tkanek. Podanie rekombinowanej iryzyny z zewnątrz tworzy natomiast ogólnoustrojowy sygnał hormonalny, który nie musi odtwarzać fizjologicznego wzorca wydzielania tej miokiny podczas wysiłku (Maak i in., 2021; Severinsen & Pedersen, 2020). Nie można więc wykluczyć, że u młodych, intensywnie rosnących szczurów egzogenna iryzyna przesuwiała równowagę modelowania i remodelingu poza fizjologiczny zakres typowy dla endogennej odpowiedzi wysiłkowej. Nie oznacza to koniecznie działania toksycznego ani prostego „nadmiaru” iryzyny, ponieważ w badaniu nie oznaczano jej stężenia we krwi i nie porównywano kilku dawek. Jednak dane literaturowe wskazują, że wpływ iryzyny zależy od dawki, czasu ekspozycji i modelu biologicznego, a jej działanie może obejmować zarówno pobudzenie osteogenezy, jak i aktywację osteoklastogenezy oraz resorpcji kości (Alzoughool i in., 2020; Colaianni i in., 2015; Estell i in., 2020). Dlatego bardziej właściwe jest traktowanie iryzyny jako modulatora przebudowy układu mięśniowo-szkieletowego niż jako jednoznacznego czynnika anabolicznego.

Wyniki niniejszego doświadczenia pokazują, że taka regulacja w okresie wzrostu może prowadzić do efektów korzystnych w jednych strukturach i mniej korzystnych w innych. Zwiększenie średnicy włókien żwacza i mięśnia brzuchatego łydki, wzrost BMD kości udowej oraz poprawa niektórych parametrów mechanicznych wskazują na potencjał iryzyny

do modyfikowania rozwijających się tkanek mięśniowo-szkieletowych. Jednocześnie rozrzedzenie beleczek w kręgach, zmniejszenie MS/BS w żuchwie oraz pogorszenie części parametrów mikroarchitektury wskazują, że efekt ten nie był jednoznacznie anaboliczny. Najważniejszym wnioskiem z badania jest więc lokalizacyjnie i płciowo zależny charakter odpowiedzi rozwijającego się układu mięśniowo-szkieletowego na egzogenną iryzynę.

## 9. WNIOSKI

- Egzogenna iryzyna podawana młodym szczurom Wistar w okresie dojrzewania moduluje rozwój układu mięśniowo-szkieletowego, ale nie wywołuje jednolitej odpowiedzi anabolicznej. Kierunek i zakres zmian zależą od badanej struktury, jej lokalizacji anatomicznej i funkcji, a w części parametrów także od płci.
- W mięśniach egzogenna iryzyna reorganizuje cechy włókien mięśniowych, obejmujące ich średnicę, upakowanie w obrębie pęczków oraz profil histochemiczny. Odmierna odpowiedź zwacza, mięśnia brzuchatego łydki i mięśnia podłużnego górnego języka wskazuje, że efekt iryzyny zależy od funkcji analizowanego mięśnia. Zachowany, obwodowy sygnał dystrofiny wskazuje, że obserwowane zmiany nie mają charakteru uszkodzeniowego.
- W kościach egzogenna iryzyna modyfikuje mineralizację, mikroarchitekturę, geometrię, dynamiczne wskaźniki formowania tkanki kostnej oraz właściwości mechaniczne, jednak odpowiedź żuchwy, kości udowej i kręgów nie ma wspólnego kierunku. Działanie iryzyny dotyczy więc organizacji i modelowania tkanki kostnej, a nie prostego zwiększenia masy, mineralizacji lub wytrzymałości wszystkich analizowanych kości.
- Uzyskane wyniki potwierdzają, że egzogenna iryzyna jest modulatorem rozwijającego się układu mięśniowo-szkieletowego. Jej efekt zależy od lokalnego kontekstu biologicznego i nie powinien być utożsamiany z jednokierunkowym działaniem anabolicznym w obrębie całego układu mięśniowo-szkieletowego.

## 10. PIŚMIENNICTWO

1. Adams, M. A., & Dolan, P. (2005). Spine biomechanics. *Journal of Biomechanics*, 38(10), 1972–1983. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.03.028>
2. Ahmed, H. M. A., & Farook, M. S. (2025). Micro-computed tomography analysis and ex-vivo detection of six root canals in a four-rooted mandibular first premolar. *BMC Oral Health*, 25, 498. <https://doi.org/10.1186/s12903-025-05781-1>
3. Aladag, T., Mogulkoc, R., & Baltaci, A. K. (2023). Irisin and Energy Metabolism and the Role of Irisin on Metabolic Syndrome. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 23(20), 1942–1958. <https://doi.org/10.2174/1389557523666230411105506>
4. Altman, A. R., Tseng, W.-J., de Bakker, C. M. J., Chandra, A., Lan, S., Huh, B. K., Luo, S., Leonard, M. B., Qin, L., & Liu, X. S. (2015). Quantification of skeletal growth, modeling, and remodeling by in vivo micro computed tomography. *Bone*, 81, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.037>
5. Alzoughool, F., Al-Zghoul, M. B., Al-Nassan, S., Alanagreh, L., Mufleh, D., & Atoum, M. (2020). The optimal therapeutic irisin dose intervention in animal model: A systematic review. *Veterinary World*, 13(10), 2191–2196. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2191-2196>
6. Alzoughool, F., Al-Zghoul, M. B., Ghanim, B. Y., Gollob, M., Idkaidek, N., & Qinna, N. A. (2022). The Role of Interventional Irisin on Heart Molecular Physiology. *Pharmaceuticals*, 15(7), 863. <https://doi.org/10.3390/ph15070863>
7. Anastasilakis, A. D., Polyzos, S. A., Makras, P., Gkiomisi, A., Bisbinas, I., Katsarou, A., Filippaios, A., & Mantzoros, C. S. (2014). Circulating irisin is associated with osteoporotic fractures in postmenopausal women with low bone mass but is not affected by either teriparatide or denosumab treatment for 3 months. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis*

- and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 25(5), 1633–1642.
- <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2673-x>
8. Arabzadeh, E., Shirvani, H., Ebadi Zahmatkesh, M., Riyahi Malayeri, S., Meftahi, G. H., & Rostamkhani, F. (2022). Irisin/FNDC5 influences myogenic markers on skeletal muscle following high and moderate-intensity exercise training in STZ-diabetic rats. *3 Biotech*, 12(9), 193. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03253-9>
  9. Bailey, E. F., & Fregosi, R. F. (2004). Coordination of intrinsic and extrinsic tongue muscles during spontaneous breathing in the rat. *Journal of Applied Physiology*, 96(2), 440–449. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00733.2003>
  10. Bailey, E. F., Huang, Y.-H., & Fregosi, R. F. (2006). Anatomic consequences of intrinsic tongue muscle activation. *Journal of Applied Physiology*, 101(5), 1377–1385. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00379.2006>
  11. Balakrishnan, R., & Thurmond, D. C. (2022). Mechanisms by Which Skeletal Muscle Myokines Ameliorate Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4636. <https://doi.org/10.3390/ijms23094636>
  12. Barak, M. M., Weiner, S., & Shahar, R. (2010). The contribution of trabecular bone to the stiffness and strength of rat lumbar vertebrae. *Spine*, 35(22), E1153–E1159. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181e5e34b>
  13. Bender, R., & Lange, S. (2001). Adjusting for multiple testing—When and how? *Journal of Clinical Epidemiology*, 54(4), 343–349. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(00\)00314-0](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(00)00314-0)
  14. Bieńko, M., Radzki, R. P., Wolski, D., Dębiak, P., Szkucik, K., Ziomek, M., & Gondek, M. (2018). Influence of snail meat in the diet on mandibular bone loss in male rats: A densitometric, tomographic and morphometric study. *Medycyna Weterynaryjna*, 74(1), 6030–2018. <https://doi.org/10.21521/mw.6030>
  15. Bloemberg, D., & Quadrilatero, J. (2012). Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor

- immunofluorescence analysis. *PloS One*, 7(4), e35273.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035273>
16. Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A., Boström, E. A., Choi, J. H., Long, J. Z., Kajimura, S., Zingaretti, M. C., Vind, B. F., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463–468. <https://doi.org/10.1038/nature10777>
17. Bottinelli, R., & Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: Molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 73(2), 195–262.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00006-7)
18. Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., & Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(7), 1468–1486.  
<https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
19. Bresin, A., Bagge, U., & Kiliaridis, S. (2000). Adaptation of normal and hypofunctional masseter muscle after bite-raising in growing rats. *European Journal of Oral Sciences*, 108(6), 493–503. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.00915.x>
20. Bresin, A., Kiliaridis, S., & Strid, K. G. (1999). Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *European Journal of Oral Sciences*, 107(1), 35–44. <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.1999.eos107107.x>
21. Brozanski, B. S., Daood, M. J., Watchko, J. F., LaFramboise, W. A., & Guthrie, R. D. (1993). Postnatal expression of myosin isoforms in the genioglossus and diaphragm muscles. *Pediatric Pulmonology*, 15(4), 212–219. <https://doi.org/10.1002/ppul.1950150406>
22. Buvinic, S., Balanta-Melo, J., Kupczik, K., Vásquez, W., Beato, C., & Toro-Ibacache, V. (2020). Muscle-Bone Crosstalk in the Masticatory System: From Biomechanical to Molecular

- Interactions. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 606947.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.606947>
23. Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M. J., James, D. E., Kemp, B. E., Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2006). Interleukin-6 Increases Insulin-Stimulated Glucose Disposal in Humans and Glucose Uptake and Fatty Acid Oxidation In Vitro via AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes*, 55(10), 2688–2697. <https://doi.org/10.2337/db05-1404>
24. Chavez, M. B., Chu, E. Y., Kram, V., de Castro, L. F., Somerman, M. J., & Foster, B. L. (2021). Guidelines for Micro-Computed Tomography Analysis of Rodent Dentoalveolar Tissues. *JBMR Plus*, 5(3), e10474. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10474>
25. Chen, W., Wang, L., You, W., & Shan, T. (2021). Myokines mediate the cross talk between skeletal muscle and other organs. *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), 2393–2412. <https://doi.org/10.1002/jcp.30033>
26. Christiansen, B. A., & Bouxsein, M. L. (2010). Biomechanics of Vertebral Fractures and the Vertebral Fracture Cascade. *Current Osteoporosis Reports*, 8(4), 198–204. <https://doi.org/10.1007/s11914-010-0031-2>
27. Christianto, A., Baba, T., Takahashi, F., Inui, K., Inoue, M., Suyama, M., Ono, Y., Ohkawa, Y., & Morohashi, K. (2021). Sex differences in metabolic pathways are regulated by Pfkfb3 and Pdk4 expression in rodent muscle. *Communications Biology*, 4(1), 1264. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02790-y>
28. Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3(Suppl 3), S131–S139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
29. Colaianni, G., Cuscito, C., Mongelli, T., Pignataro, P., Buccoliero, C., Liu, P., Lu, P., Sartini, L., Di Comite, M., Mori, G., Di Benedetto, A., Brunetti, G., Yuen, T., Sun, L., Reseland, J. E., Colucci, S., New, M. I., Zaidi, M., Cinti, S., & Grano, M. (2015). The myokine irisin increases

- cortical bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(39), 12157–12162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516622112>
30. Colaianni, G., Errede, M., Sanesi, L., Notarnicola, A., Celi, M., Zerlotin, R., Storlino, G., Pignataro, P., Oranger, A., Pesce, V., Tarantino, U., Moretti, B., & Grano, M. (2021). Irisin Correlates Positively With BMD in a Cohort of Older Adult Patients and Downregulates the Senescent Marker p21 in Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 36(2), 305–314. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4192>
31. Colaianni, G., Mongelli, T., Cuscito, C., Pignataro, P., Lippo, L., Spiro, G., Notarnicola, A., Severi, I., Passeri, G., Mori, G., Brunetti, G., Moretti, B., Tarantino, U., Colucci, S. C., Reseland, J. E., Vettor, R., Cinti, S., & Grano, M. (2017). Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice. *Scientific Reports*, 7(1), 2811. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02557-8>
32. Cullins, M. J., & Connor, N. P. (2017). Alterations of intrinsic tongue muscle properties with aging. *Muscle & Nerve*, 56(6), E119–E125. <https://doi.org/10.1002/mus.25605>
33. Currey, J. D. (2003). The many adaptations of bone. *Journal of Biomechanics*, 36(10), 1487–1495. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(03\)00124-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(03)00124-6)
34. Cutuli, D., Decandia, D., Giacobazzo, G., & Coccurello, R. (2023). Physical Exercise as Disease-Modifying Alternative against Alzheimer’s Disease: A Gut-Muscle-Brain Partnership. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14686. <https://doi.org/10.3390/ijms241914686>
35. Dalle Carbonare, L., Minoia, A., Zouari, S., Piritore, F. C., Vareschi, A., Romanelli, M. G., & Valenti, M. T. (2023). Crosstalk between Bone and Muscles during Physical Activity. *Cells*, 12(16), 2088. <https://doi.org/10.3390/cells12162088>

36. Das, D. K., Graham, Z. A., & Cardozo, C. P. (2020). Myokines in skeletal muscle physiology and metabolism: Recent advances and future perspectives. *Acta Physiologica*, 228(2), e13367. <https://doi.org/10.1111/apha.13367>
37. Delp, M. D., & Duan, C. (1996). Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *Journal of Applied Physiology*, 80(1), 261–270. <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.80.1.261>
38. Demes, B., Jungers, W. L., & Selpien, K. (1991). Body size, locomotion, and long bone cross-sectional geometry in indriid primates. *American Journal of Physical Anthropology*, 86(4), 537–547. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330860409>
39. Dong, Y., Yuan, H., Ma, G., & Cao, H. (2024). Bone-muscle crosstalk under physiological and pathological conditions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 81(1), 310. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05331-y>
40. Dotiwala, A. K., & Samra, N. S. (2026). Anatomy, Head and Neck, Tongue. W *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507782/>
41. Eggers, B., Schork, K., Turewicz, M., Barkovits, K., Eisenacher, M., Schröder, R., Clemen, C. S., & Marcus, K. (2021). Advanced Fiber Type-Specific Protein Profiles Derived from Adult Murine Skeletal Muscle. *Proteomes*, 9(2), Artykuł 2. <https://doi.org/10.3390/proteomes9020028>
42. Eng, C. M., Smallwood, L. H., Rainiero, M. P., Lahey, M., Ward, S. R., & Lieber, R. L. (2008). Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *Journal of Experimental Biology*, 211(14), 2336–2345. <https://doi.org/10.1242/jeb.017640>
43. Estell, E. G., Le, P. T., Vegting, Y., Kim, H., Wrann, C., Buxsein, M. L., Nagano, K., Baron, R., Spiegelman, B. M., & Rosen, C. J. (2020). Irisin directly stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in vitro and in vivo. *eLife*, 9, e58172. <https://doi.org/10.7554/eLife.58172>

44. Faot, F., Chatterjee, M., de Camargos, G. V., Duyck, J., & Vandamme, K. (2015). Micro-CT analysis of the rodent jaw bone micro-architecture: A systematic review. *Bone Reports*, 2, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2014.10.005>
45. Ferretti, J. L., Cointry, G. R., Capozza, R. F., Capiglioni, R., & Chiappe, M. A. (2001). Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 1(3), 263–274.
46. Fields, A. J., Eswaran, S. K., Jekir, M. G., & Keaveny, T. M. (2009). Role of Trabecular Microarchitecture in Whole-Vertebral Body Biomechanical Behavior. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(9), 1523–1530. <https://doi.org/10.1359/JBMR.090317>
47. Fleming, A., Kishida, M. G., Kimmel, C. B., & Keynes, R. J. (2015). Building the backbone: The development and evolution of vertebral patterning. *Development*, 142(10), 1733–1744. <https://doi.org/10.1242/dev.118950>
48. Fogarty, M. J., & Sieck, G. C. (2021). Tongue muscle contractile, fatigue, and fiber type properties in rats. *Journal of Applied Physiology*, 131(3), 1043–1055. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00329.2021>
49. Frost, H. M. (1987). Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *The Anatomical Record*, 219(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/ar.1092190104>
50. Frost, H. M. (1994). Wolff’s Law and bone’s structural adaptations to mechanical usage: An overview for clinicians. *The Angle Orthodontist*, 64(3), 175–188. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(1994\)064%3C0175:WLABSA%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(1994)064%3C0175:WLABSA%3E2.0.CO;2)
51. Frost, H. M. (2004). A 2003 update of bone physiology and Wolff’s Law for clinicians. *The Angle Orthodontist*, 74(1), 3–15. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(2004\)074%3C0003:AUOBPA%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(2004)074%3C0003:AUOBPA%3E2.0.CO;2)
52. Galea, G. L., Zein, M. R., Allen, S., & Francis-West, P. (2021). Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Developmental Dynamics*, 250(3), 414–449. <https://doi.org/10.1002/dvdy.278>

53. Gheit, R. E. A. E., Younis, R. L., El-Saka, M. H., Emam, M. N., Soliman, N. A., El-Sayed, R. M., Hafez, Y. M., AbuoHashish, N. A., Radwan, D. A., khaled, H. E., Kamel, S., Zaitone, S. A., & Badawi, G. A. (2022). Irisin improves adiposity and exercise tolerance in a rat model of postmenopausal obesity through enhancing adipo-myocyte thermogenesis. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 78(4), 897–913. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00915-3>
54. Gibala, M. J., McGee, S. L., Garnham, A. P., Howlett, K. F., Snow, R. J., & Hargreaves, M. (2009). Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 106(3), 929–934. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90880.2008>
55. Gilbert, R. J., Napadow, V. J., Gaige, T. A., & Wedeen, V. J. (2007). Anatomical basis of lingual hydrostatic deformation. *The Journal of Experimental Biology*, 210(Pt 23), 4069–4082. <https://doi.org/10.1242/jeb.007096>
56. Guo, W., Peng, J., Su, J., Xia, J., Deng, W., Li, P., Chen, Y., Liu, G., Wang, S., & Huang, J. (2024). The role and underlying mechanisms of irisin in exercise-mediated cardiovascular protection. *PeerJ*, 12, e18413. <https://doi.org/10.7717/peerj.18413>
57. Haizlip, K. M., Harrison, B. C., & Leinwand, L. A. (2015). Sex-based differences in skeletal muscle kinetics and fiber-type composition. *Physiology*, 30(1), 30–39. <https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2014>
58. Hämmäläinen, N., & Pette, D. (1993). The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41(5), 733–743. <https://doi.org/10.1177/41.5.8468455>
59. Hansson, S., & Ekestubbe, A. (2004). Area moments of inertia as a measure of the mandible stiffness of the implant patient. *Clinical Oral Implants Research*, 15(4), 450–458. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01021.x>

60. Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252–1263.  
<https://doi.org/10.1038/nm.3361>
61. Hoffmann, C., & Weigert, C. (2017). Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Exercise Adaptations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(11), a029793. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029793>
62. Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6(2), 65–70.
63. Hsu, P.-Y., Tsai, M.-T., Wang, S.-P., Chen, Y.-J., Wu, J., & Hsu, J.-T. (2016). Cortical Bone Morphological and Trabecular Bone Microarchitectural Changes in the Mandible and Femoral Neck of Ovariectomized Rats. *PLOS ONE*, 11(4), e0154367.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154367>
64. Huang, T. H., Lin, S. C., Chang, F. L., Hsieh, S. S., Liu, S. H., & Yang, R. S. (2003). Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *Journal of Applied Physiology*, 95(1), 300–307.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01076.2002>
65. Inou, N., Iioka, Y., Fujiwara, H., & Maki, K. (1996). Functional Adaptation of Mandibular Bone. W K. Hayashi & H. Ishikawa (Red.), *Computational Biomechanics* (s. 23–42). Springer Japan. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-66951-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-4-431-66951-7_2)
66. Iordachescu, A., Hughes, E. A. B., Joseph, S., Hill, E. J., Grover, L. M., & Metcalfe, A. D. (2021). Trabecular bone organoids: A micron-scale ‘humanised’ prototype designed to study the effects of microgravity and degeneration. *Npj Microgravity*, 7(1), 1–21.  
<https://doi.org/10.1038/s41526-021-00146-8>
67. Islam, M. R., Valaris, S., Young, M. F., Haley, E. B., Luo, R., Bond, S. F., Mazuera, S., Kitchen, R. R., Caldarone, B. J., Bettio, L. E. B., Christie, B. R., Schmider, A. B., Soberman, R. J., Besnard, A., Jedrychowski, M. P., Kim, H., Tu, H., Kim, E., Choi, S. H., ... Wrann, C. D. (2021).

- Exercise hormone irisin is a critical regulator of cognitive function. *Nature Metabolism*, 3(8), 1058–1070. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00438-z>
68. Jiang, G.-Z., Matsumoto, H., Hori, M., Gunji, A., Hakoziaki, K., Akimoto, Y., & Fujii, A. (2008). Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 26(2), 130–137. <https://doi.org/10.1007/s00774-007-0811-7>
69. Kajee, Y., Pelteret, J.-P. V., & Reddy, B. D. (2013). The biomechanics of the human tongue. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 29(4), 492–514. <https://doi.org/10.1002/cnm.2531>
70. Kan, T., He, Z., Du, J., Xu, M., Cui, J., Han, X., Tong, D., Li, H., Yan, M., & Yu, Z. (2022). Irisin promotes fracture healing by improving osteogenesis and angiogenesis. *Journal of Orthopaedic Translation*, 37, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2022.07.006>
71. Kawai, N., Sano, R., Korfage, J. A. M., Nakamura, S., Kinouchi, N., Kawakami, E., Tanne, K., Langenbach, G. E. J., & Tanaka, E. (2010). Adaptation of rat jaw muscle fibers in postnatal development with a different food consistency: An immunohistochemical and electromyographic study. *Journal of Anatomy*, 216(6), 717–723. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01235.x>
72. Kawai, N., Sano, R., Korfage, J. A. M., Nakamura, S., Tanaka, E., Van Wessel, T., Langenbach, G. E. J., & Tanne, K. (2009). Functional characteristics of the rat jaw muscles: Daily muscle activity and fiber type composition. *Journal of Anatomy*, 215(6), 656–662. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01152.x>
73. Kier, W. M., & Smith, K. K. (1985). Tongues, tentacles and trunks: The biomechanics of movement in muscular-hydrostats. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 83(4), 307–324. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1985.tb01178.x>
74. Kim, H., Wrann, C. D., Jedrychowski, M., Vidoni, S., Kitase, Y., Nagano, K., Zhou, C., Chou, J., Parkman, V.-J. A., Novick, S. J., Strutzenberg, T. S., Pascal, B. D., Le, P. T., Brooks, D. J.,

- Roche, A. M., Gerber, K. K., Mattheis, L., Chen, W., Tu, H., ... Spiegelman, B. M. (2018). Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via  $\alpha$ V Integrin Receptors. *Cell*, 175(7), 1756-1768.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.025>
75. Kim, Y., Brodt, M. D., Tang, S. Y., & Silva, M. J. (2021). MicroCT for Scanning and Analysis of Mouse Bones. *Methods in Molecular Biology*, 2230, 169–198. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1028-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1028-2_11)
76. Kornel, A., Den Hartogh, D. J., Klentrou, P., & Tsiani, E. (2021). Role of the Myokine Irisin on Bone Homeostasis: Review of the Current Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9136. <https://doi.org/10.3390/ijms22179136>
77. Lee, H. J., Lee, J. O., Kim, N., Kim, J. K., Kim, H. I., Lee, Y. W., Kim, S. J., Choi, J.-I., Oh, Y., Kim, J. H., Suyeon-Hwang, null, Park, S. H., & Kim, H. S. (2015). Irisin, a Novel Myokine, Regulates Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells via AMPK. *Molecular Endocrinology*, 29(6), 873–881. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1353>
78. Lee, J., Park, J., Kim, Y. H., Lee, N. H., & Song, K.-M. (2019). Irisin promotes C2C12 myoblast proliferation via ERK-dependent CCL7 upregulation. *PLOS ONE*, 14(9), e0222559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222559>
79. Lelard, T., Jamon, M., Gasc, J.-P., & Vidal, P.-P. (2006). Postural development in rats. *Experimental Neurology*, 202(1), 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.05.018>
80. Lewis, J. W., Frost, K., Neag, G., Adams, H., Powell, E., Gallagher, O., Bellantuono, I., Naylor, A. J., & McGettrick, H. M. (2025). Protocol for assessing the structural architecture, integrity, and cellular composition of murine bone ex vivo. *STAR Protocols*, 6(2), 103843. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2025.103843>
81. Li, H., Luo, D., Xie, W., Ye, W., Chen, J., Alberton, P., Zhang, M., Feng, E., Docheva, D., & Lin, D. (2024). Irisin reduces senile osteoporosis by inducing osteocyte mitophagy through Ampk activation. *iScience*, 27(11), 111042. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111042>

82. Little, J. P., Safdar, A., Bishop, D., Tarnopolsky, M. A., & Gibala, M. J. (2011). An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1 $\alpha$  and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(6), R1303-1310. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00538.2010>
83. Liu, Z., Wang, Q., Zhang, J., Qi, S., Duan, Y., & Li, C. (2023). The Mechanotransduction Signaling Pathways in the Regulation of Osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14326. <https://doi.org/10.3390/ijms241814326>
84. Lourenco, M. V., Frozza, R. L., de Freitas, G. B., Zhang, H., Kincheski, G. C., Ribeiro, F. C., Gonçalves, R. A., Clarke, J. R., Beckman, D., Staniszewski, A., Berman, H., Guerra, L. A., Forny-Germano, L., Meier, S., Wilcock, D. M., de Souza, J. M., Alves-Leon, S., Prado, V. F., Prado, M. A. M., ... De Felice, F. G. (2019). Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nature Medicine*, 25(1), 165–175. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0275-4>
85. Luo, Y., Ma, Y., Qiao, X., Zeng, R., Cheng, R., Nie, Y., Li, S., A, R., Shen, X., Yang, M., Xu, C. C., & Xu, L. (2020). Irisin ameliorates bone loss in ovariectomized mice. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 23(5), 496–504. <https://doi.org/10.1080/13697137.2020.1745768>
86. Maak, S., Norheim, F., Drevon, C. A., & Erickson, H. P. (2021). Progress and Challenges in the Biology of FNDC5 and Irisin. *Endocrine Reviews*, 42(4), 436–456. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab003>
87. Mancinelli, R., Checcaglini, F., Coscia, F., Gigliotti, P., Fulle, S., & Fanò-Illic, G. (2021). Biological Aspects of Selected Myokines in Skeletal Muscle: Focus on Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8520. <https://doi.org/10.3390/ijms22168520>
88. Marcé-Nogué, J. (2020). *Mandibular biomechanics as a key factor to understand diet in mammals*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil. <https://doi.org/10.23788/mammteeth.04>

89. Marín-Llera, J. C., Garciadiego-Cázares, D., & Chimal-Monroy, J. (2019). Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms That Control Early Cell Fate Decisions During Appendicular Skeletogenesis. *Frontiers in Genetics*, 10, 977.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00977>
90. Mavropoulos, A., Kiliaridis, S., Rizzoli, R., & Ammann, P. (2014). Normal masticatory function partially protects the rat mandibular bone from estrogen-deficiency induced osteoporosis. *Journal of Biomechanics*, 47(11), 2666–2671.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.05.012>
91. Mavropoulos, A., Ödman, A., Ammann, P., & Kiliaridis, S. (2010). Rehabilitation of masticatory function improves the alveolar bone architecture of the mandible in adult rats. *Bone*, 47(3), 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.06.025>
92. McClung, J. R., & Goldberg, S. J. (2000). Functional anatomy of the hypoglossal innervated muscles of the rat tongue: A model for elongation and protrusion of the mammalian tongue. *The Anatomical Record*, 260(4), 378–386. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20001201\)260:4%3C378::AID-AR70%3E3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20001201)260:4%3C378::AID-AR70%3E3.0.CO;2-A)
93. McPherron, A. C., Lawler, A. M., & Lee, S.-J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*, 387(6628), 83–90.  
<https://doi.org/10.1038/387083a0>
94. Monsees, A., Voit, K.-M., Wallace, D. J., Sawinski, J., Charyasz, E., Scheffler, K., Macke, J. H., & Kerr, J. N. D. (2022). Estimation of skeletal kinematics in freely moving rodents. *Nature Methods*, 19(11), 1500–1509. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01634-9>
95. Mu, L., & Sanders, I. (2010). Human Tongue Neuroanatomy: Nerve Supply and Motor Endplates. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 23(7), 777–791.  
<https://doi.org/10.1002/ca.21011>

96. Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 12(1), e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
97. Muszyński, S., Kwiecień, M., Tomaszewska, E., Świetlicka, I., Dobrowolski, P., Kasperek, K., & Jeżewska-Witkowska, G. (2017). Effect of caponization on performance and quality characteristics of long bones in Polbar chickens. *Poultry Science*, 96(2), 491–500. <https://doi.org/10.3382/ps/pew301>
98. Myatt, J. P., Schilling, N., & Thorpe, S. K. S. (2011). Distribution patterns of fibre types in the triceps surae muscle group of chimpanzees and orangutans. *Journal of Anatomy*, 218(4), 402–412. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01338.x>
99. Myint, P. K., Ito, A., Appiah, M. G., Obeng, G., Darkwah, S., Kawamoto, E., Gaowa, A., Park, E. J., & Shimaoka, M. (2021). Irisin supports integrin-mediated cell adhesion of lymphocytes. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100977. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100977>
100. Nguyen, M. H., Kennedy, C. S., Wroblewski, O. M., Su, E., Hwang, D. H., & Larkin, L. M. (2024). Impact of Human Recombinant Irisin on Tissue-Engineered Skeletal Muscle Structure and Function. *Tissue Engineering. Part A*, 30(1–2), 94–101. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2023.0187>
101. Oguri, Y., Shinoda, K., Kim, H., Alba, D. L., Bolus, W. R., Wang, Q., Brown, Z., Pradhan, R. N., Tajima, K., Yoneshiro, T., Ikeda, K., Chen, Y., Cheang, R. T., Tsujino, K., Kim, C. R., Greiner, V. J., Datta, R., Yang, C. D., Atabai, K., ... Kajimura, S. (2020). CD81 Controls Beige Fat Progenitor Cell Growth and Energy Balance via FAK Signaling. *Cell*, 182(3), 563–577.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.021>
102. Osiak-Wicha, C., Tomaszewska, E., Muszyński, S., Dobrowolski, P., Andres, K., Schwarz, T., Świetlicki, M., Mielnik-Błaszczak, M., & Arciszewski, M. B. (2023). Developmental changes in tibia and humerus of goose: Morphometric, densitometric, and

- mechanical analysis. *animal*, 17(10), 100960.  
<https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100960>
103. Pan, S., Ren, W., Zhao, Y., Cai, M., & Tian, Z. (2024). Role of Irisin in exercise training-regulated endoplasmic reticulum stress, autophagy and myogenesis in the skeletal muscle after myocardial infarction. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 80(4), 895–908. <https://doi.org/10.1007/s13105-024-01049-4>
104. Pan, S., Xie, D., Gao, C., & Xiong, K. (2024). Editorial: Characteristic clinical immune phenotypes and molecular mechanisms associated with inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1384971>
105. Panjabi, M. M., & White, A. A. I. (1980). Basic Biomechanics of the Spine. *Neurosurgery*, 7(1), 76.
106. Paoletti, I., & Coccurello, R. (2024). Irisin: A Multifaceted Hormone Bridging Exercise and Disease Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(24), 13480. <https://doi.org/10.3390/ijms252413480>
107. Pearson, O. M., & Lieberman, D. E. (2004). The aging of Wolff's "law": Ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. *American Journal of Physical Anthropology*, 125(S39), 63–99. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20155>
108. Pedersen, B. K. (2013). Muscle as a Secretory Organ. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1337–1362. <https://doi.org/10.1002/j.2040-4603.2013.tb00522.x>
109. Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiological Reviews*, 88(4), 1379–1406. <https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>
110. Pesce, M., Ballerini, P., Paolucci, T., Puca, I., Farzaei, M. H., & Patrino, A. (2020). Irisin and Autophagy: First Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), Artykuł 20. <https://doi.org/10.3390/ijms21207587>

111. Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500–509.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6%3C500::AID-JEMT7%3E3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6%3C500::AID-JEMT7%3E3.0.CO;2-7)
112. Polk, J. D., Demes, B., Jungers, W. L., Biknevičius, A. R., Heinrich, R. E., & Runestad, J. A. (2000). A comparison of primate, carnivoran and rodent limb bone cross-sectional properties: Are primates really unique? *Journal of Human Evolution*, 39(3), 297–325.  
<https://doi.org/10.1006/jhev.2000.0420>
113. Porter, A., Irwin, R., Miller, J., Horan, D. J., Robling, A. G., & McCabe, L. R. (2017). Quick and inexpensive paraffin-embedding method for dynamic bone formation analyses. *Scientific Reports*, 7, 42505. <https://doi.org/10.1038/srep42505>
114. Qi, J., Yang, L., Wang, X., Wang, M., Li, X., Feng, B., Wu, Y., Zhang, K., & Liu, S. (2022). Irisin: A promising treatment for neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, 498, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.07.018>
115. Qi, J.-Y., Yang, L.-K., Wang, X.-S., Wang, M., Li, X.-B., Feng, B., Wu, Y.-M., Zhang, K., & Liu, S.-B. (2022). Irisin: A promising treatment for neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, 498, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.07.018>
116. Qiao, X., Nie, Y., Ma, Y., Chen, Y., Cheng, R., Yin, W., Hu, Y., Xu, W., & Xu, L. (2016). Irisin promotes osteoblast proliferation and differentiation via activating the MAP kinase signaling pathways. *Scientific Reports*, 6, 18732. <https://doi.org/10.1038/srep18732>
117. Quinn, L. S., Anderson, B. G., Strait-Bodey, L., Stroud, A. M., & Argilés, J. M. (2009). Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(1), E191-202.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90506.2008>
118. Rahnert, J. A., Sokoloff, A. J., & Burkholder, T. J. (2010). Sarcomeric myosin expression in the tongue body of humans, macaques and rats. *Cells, Tissues, Organs*, 191(5), 431–442. <https://doi.org/10.1159/000258678>

119. Reddy, I., Yadav, Y., & Dey, C. S. (2023). Cellular and Molecular Regulation of Exercise—A Neuronal Perspective. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(4), 1551–1571. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01272-x>
120. Reza, M. M., Subramaniam, N., Sim, C. M., Ge, X., Sathiakumar, D., McFarlane, C., Sharma, M., & Kambadur, R. (2017). Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy. *Nature Communications*, 8(1), 1104. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01131-0>
121. Riddle, R. C., & Clemens, T. L. (2017). Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis. *Physiological Reviews*, 97(2), 667–698. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2016>
122. Robling, A. G., & Turner, C. H. (2009). Mechanical signaling for bone modeling and remodeling. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 19(4), 319–338. <https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i4.50>
123. Roy, R. R., Baldwin, K. M., & Edgerton, V. R. (1991). The plasticity of skeletal muscle: Effects of neuromuscular activity. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 19, 269–312.
124. Sadier, N. S., El Hajjar, F., Al Sabouri, A. A. K., Abou-Abbas, L., Siomava, N., Almutary, A. G., & Tambuwala, M. M. (2024). Irisin: An unveiled bridge between physical exercise and a healthy brain. *Life Sciences*, 339, 122393. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122393>
125. Sano, R., Tanaka, E., Korfage, J. a. M., Langenbach, G. E. J., Kawai, N., Van Eijden, T. M. G. J., & Tanne, K. (2007). Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. *Journal of Anatomy*, 211(4), 464–470. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00783.x>

126. Saponaro, F., Bertolini, A., Baragatti, R., Galfo, L., Chiellini, G., Saba, A., & D'Urso, G. (2024). Myokines and Microbiota: New Perspectives in the Endocrine Muscle–Gut Axis. *Nutrients*, 16(23), 4032. <https://doi.org/10.3390/nu16234032>
127. Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
128. Sciote, J. J., Horton, M. J., Rowlerson, A. M., Ferri, J., Close, J. M., & Raoul, G. (2012). Human Masseter Muscle Fiber Type Properties, Skeletal Malocclusions, and Muscle Growth Factor Expression. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 70(2), 10.1016/j.joms.2011.04.007. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2011.04.007>
129. Scott, W., Stevens, J., & Binder–Macleod, S. A. (2001). Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Physical Therapy*, 81(11), 1810–1816. <https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810>
130. Sert, N. P. du, Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
131. Severinsen, M. C. K., & Pedersen, B. K. (2020). Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocrine Reviews*, 41(4), 594–609. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa016>
132. Shah, H. N., Jones, R. E., Borrelli, M. R., Robertson, K., Salhotra, A., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2021). Craniofacial and Long Bone Development in the Context of Distraction Osteogenesis. *Plastic and reconstructive surgery*, 147(1), 54e–65e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000007451>

133. Sievänen, H. (2000). A physical model for dual-energy X-ray absorptiometry—Derived bone mineral density. *Investigative Radiology*, 35(5), 325–330.  
<https://doi.org/10.1097/00004424-200005000-00007>
134. Smit, T. H. (2002). The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine – biomechanical considerations. *European Spine Journal*, 11(2), 137–144.  
<https://doi.org/10.1007/s005860100346>
135. Sokoloff, A. J. (2000). Localization and contractile properties of intrinsic longitudinal motor units of the rat tongue. *Journal of Neurophysiology*, 84(2), 827–835.  
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.2.827>
136. Stål, P., Marklund, S., Thornell, L.-E., De Paul, R., & Eriksson, P.-O. (2003). Fibre composition of human intrinsic tongue muscles. *Cells, Tissues, Organs*, 173(3), 147–161.  
<https://doi.org/10.1159/000069470>
137. Storlino, G., Colaianni, G., Sanesi, L., Lippo, L., Brunetti, G., Errede, M., Colucci, S., Passeri, G., & Grano, M. (2020). Irisin Prevents Disuse-Induced Osteocyte Apoptosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 35(4), 766–775. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3944>
138. Storlino, G., Dicarolo, M., Zerlotin, R., Pignataro, P., Sanesi, L., Suriano, C., Oranger, A., Mori, G., Passeri, G., Colucci, S., Grano, M., & Colaianni, G. (2023). Irisin Protects against Loss of Trabecular Bone Mass and Strength in Adult Ovariectomized Mice by Stimulating Osteoblast Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9896.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24129896>
139. Sun, B., Wu, H., Lu, J., Zhang, R., Shen, X., Gu, Y., Shi, C., Zhang, Y., & Yuan, W. (2022). Irisin reduces bone fracture by facilitating osteogenesis and antagonizing TGF- $\beta$ /Smad signaling in a growing mouse model of osteogenesis imperfecta. *Journal of Orthopaedic Translation*, 38, 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2022.10.012>
140. Talbot, J., & Maves, L. (2016). Skeletal muscle fiber type: Using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle

- p>disease.
- Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*
- , 5(4), 518–534.
- 
- <https://doi.org/10.1002/wdev.230>
141. Tanaka, E., Sano, R., Kawai, N., Korfage, J. a. M., Nakamura, S., Izawa, T., Langenbach, G. E. J., & Tanne, K. (2008). Regional differences in fiber characteristics in the rat temporalis muscle. *Journal of Anatomy*, 213(6), 743–748.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00990.x>
  142. Tang, Y., Wang, Y.-D., Wang, Y.-Y., Liao, Z.-Z., & Xiao, X.-H. (2023). Skeletal muscles and gut microbiota-derived metabolites: Novel modulators of adipocyte thermogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1265175>
  143. Tani, S., Chung, U., Ohba, S., & Hojo, H. (2020). Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(8), 1166–1177. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0482-1>
  144. Tomaszewska, E., Wojtysiak, D., Grzegorzewska, A., Świątkiewicz, M., Donaldson, J., Arciszewski, M. B., Dresler, S., Puzio, I., Szymańczyk, S., Dobrowolski, P., Bonior, J., Mielnik-Błaszczak, M., Kuc, D., & Muszyński, S. (2024). Understanding Secondary Sarcopenia Development in Young Adults Using Pig Model with Chronic Pancreatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8735.  
<https://doi.org/10.3390/ijms25168735>
  145. Trovato, F. M., Imbesi, R., Conway, N., & Castrogiovanni, P. (2016). Morphological and Functional Aspects of Human Skeletal Muscle. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, 1(3), 289–302. <https://doi.org/10.3390/jfkm1030289>
  146. Turner, C. H. (2006). Bone strength: Current concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068, 429–446. <https://doi.org/10.1196/annals.1346.039>
  147. van Eijden, T. M. (2000). Biomechanics of the Mandible. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(1), 123–136. <https://doi.org/10.1177/10454411000110010101>

148. Vaughan, R. A., Gannon, N. P., Barberena, M. A., Garcia-Smith, R., Bisoffi, M., Mermier, C. M., Conn, C. A., & Trujillo, K. A. (2014). Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle in vitro. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 16(8), 711–718. <https://doi.org/10.1111/dom.12268>
149. Verdijk, L. B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H. H. C. M., & van Loon, L. J. C. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(1), E151–E157. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00278.2006>
150. Warner, S. E., Shea, J. E., Miller, S. C., & Shaw, J. M. (2006). Adaptations in Cortical and Trabecular Bone in Response to Mechanical Loading with and without Weight Bearing. *Calcified Tissue International*, 79(6), 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00223-005-0293-3>
151. Watson, P. J., Fitton, L. C., Meloro, C., Fagan, M. J., & Gröning, F. (2018). Mechanical adaptation of trabecular bone morphology in the mammalian mandible. *Scientific Reports*, 8, 7277. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25597-0>
152. Wojtysiak, D., & Kaczor, U. (2011). Effect of g.2728G>A and g.3996T>C Polymorphisms at the Leptin Gene Locus on Microstructure and Physicochemical Properties of longissimus lumborum Muscle of Polish Landrace Pigs. *Folia Biologica*, 59(1–2), 77–82. [https://doi.org/10.3409/fb59\\_1-2.77-82](https://doi.org/10.3409/fb59_1-2.77-82)
153. Wojtysiak, D., & Połtowicz, K. (2014). Carcass quality, physico-chemical parameters, muscle fibre traits and myosin heavy chain composition of m. Longissimus lumborum from Puławska and Polish Large White pigs. *Meat Science*, 97(4), 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.006>
154. Wrann, C. D., White, J. P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., Lin, J. D., Greenberg, M. E., & Spiegelman, B. M. (2013). Exercise induces hippocampal

- BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. *Cell Metabolism*, 18(5), 649–659.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.008>
155. Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
156. Xu, X., Zhou, R., Ying, J., Li, X., Lu, R., Qu, Y., & Mu, D. (2023). Irisin prevents hypoxic-ischemic brain damage in rats by inhibiting oxidative stress and protecting the blood-brain barrier. *Peptides*, 161, 170945.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.170945>
157. Xue, Y., Hu, S., Chen, C., He, J., Sun, J., Jin, Y., Zhang, Y., Zhu, G., Shi, Q., & Rui, Y. (2022). Myokine Irisin promotes osteogenesis by activating BMP/SMAD signaling via  $\alpha$ V integrin and regulates bone mass in mice. *International Journal of Biological Sciences*, 18(2), 572–584. <https://doi.org/10.7150/ijbs.63505>
158. Yavropoulou, M. P., & Yovos, J. G. (2016). The molecular basis of bone mechanotransduction. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 16(3), 221–236.
159. Yuan, Y., & Chai, Y. (2019). Regulatory mechanisms of jaw bone and tooth development. *Current Topics in Developmental Biology*, 133, 91–118.  
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.013>
160. Zhang, L., Peng, Y., Kong, Y., Zhang, X., Li, Z., & Jia, H. (2025). Circulating irisin levels in patients with sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. *European Geriatric Medicine*, 16(1), 5–13. <https://doi.org/10.1007/s41999-024-01097-5>
161. Zhang, M., Xiong, W., Qiao, R., Li, M., Zhang, C., Yang, C., Zhu, Y., He, J., & Ma, Z. (2025). Irisin in the modulation of bone and cartilage homeostasis: A review on

- osteoarthritis relief potential. *Frontiers in Physiology*, 16.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1570157>
162. Zhang, M. Y., Zhang, W. J., & Medler, S. (2010). The continuum of hybrid IIX/IIB fibers in normal mouse muscles: MHC isoform proportions and spatial distribution within single fibers. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 299(6), R1582-1591. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00402.2010>
163. Zhao, C., Wu, Y., Zhu, S., Liu, H., & Xu, S. (2024). Irisin Protects Musculoskeletal Homeostasis via a Mitochondrial Quality Control Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), 10116. <https://doi.org/10.3390/ijms251810116>
164. Zhu, J., Zhang, Y., Wang, X., Peng, L., Ma, X., Qiu, Z., Kang, Z., Zheng, F., Zhang, X., Song, M., Du, J., Shi, Y., Yu, L., Gu, C., & Shi, J. (2025). Engineered long-acting Irisin-albumin binding domain fusion protein for enhanced anti-inflammatory efficacy in lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *Communications Biology*, 8, 1592. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-09000-z>