

Załącznik 2

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Teresa Grzelak
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca, roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej
 - 1994 r. – świadectwo dojrzałości – III Liceum Ogólnokształcące im. K. Brodzińskiego w Tarnowie (profil biologiczno-chemiczny)
 - 1999 r. – tytuł zawodowy magistra analityki medycznej – Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (AMP), praca magisterska wykonana w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii AMP
 - 2003 r. – uzyskanie uprawnień do wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego, Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa
 - 2005 r. – stopień naukowy doktora nauk medycznych (z zakresu biologii medycznej) na podstawie pracy doktorskiej (przedstawionej w postaci monografii) pt.: *„Uwarunkowania przezotrzewnowego transportu makrocząsteczek. Badania modelowe in vitro”*, promotor: Prof. dr hab. Krystyna Czyżewska, recenzenci: Prof. dr hab. Tomasz Tyrakowski, Prof. dr hab. Alicja Grzegorzewska, praca wyróżniona przez Radę Wydziału Lekarskiego II AMP
 - 2014 r. – dyplom menedżera projektu badawczo-rozwojowego – praca dyplomowa wykonana na Wydziale Finansów i Bankowości Wyższej Szkoły Bankowej w Poznaniu (roczne studia podyplomowe)
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

Okres	Zajmowane stanowisko	Instytucja
01.10.2000-13.06.2005	Doktorant w ramach Stacjonarnego 4-letniego Studium Doktoranckiego	Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej AMP Pracownia Patofizjologii Błon Biologicznych
01.06.2004-31.10.2005	Starszy referent techniczny na etacie naukowo-technicznym	
01.11.2005-30.09.2008	Starszy specjalista na etacie naukowo-technicznym	Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej AMP (przekształcona 27.02.2007 r. w Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu - UMP) Pracownia Patofizjologii Błon Biologicznych (przekształcona 27.12.2007 r. w Zakład Biologii Chorób Cywilizacyjnych)
01.10.2008-30.09.2012	Asystent	Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej UMP, Zakład Biologii Chorób Cywilizacyjnych
01.10.2012-nadal	Adiunkt	

4. Wskazanie osiągnięcia, wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Nowe diagnostyczne wykładniki w wybranych chorobach z nieprawidłowym stanem odżywienia” – praca na podstawie cyklu publikacji:

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Publikacja nr 1. Teresa Grzelak, Marta Tyszkiewicz-Nwafor, Agata Dutkiewicz, Aniceta Ada Mikulska, Monika Dmitrzak-Węglarz, Agnieszka Słopeń, Krystyna Czyżewska, Elżbieta Paszyńska. Neuropeptide B and vaspin as new biomarkers in anorexia nervosa. BioMed Res. Int. 2018; <https://www.hindawi.com/journals/bmri/aip/9727509/> Punktacja MNiSW: 25, IF: 2,476

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, współudziale w przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej oraz wniosku o dofinansowanie badań (otrzymanie grantu), wykonaniu wszystkich oznaczeń biochemicznych, analizie i interpretacji wyników badań (w tym statystycznego opracowania danych), wykonaniu zestawień graficznych (tabel, rycin), zebraniu i doborze piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu i pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego (prowadzeniu dyskusji z recenzentami, a także przygotowaniu edycji wersji ostatecznej). Mój udział procentowy szacuję na 85%.

Publikacja nr 2. Teresa Grzelak, Marta Tyszkiewicz-Nwafor, Agata Dutkiewicz, Aniceta Ada Mikulska, Monika Dmitrzak-Węglarz, Agnieszka Słopeń, Krystyna Czyżewska, Elżbieta Paszyńska. Vaspin (but not neuropeptide B and neuropeptide W) as possible predictor of body weight normalization in anorexia nervosa. Arch. Med. Sci. 2018; doi: <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.74969>. Punktacja MNiSW: 30, IF: 1,969

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, współudziale w przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej oraz wniosku o dofinansowanie badań (otrzymanie grantu), przeprowadzeniu wszystkich analiz biochemicznych, interpretacji otrzymanych wyników badań (w tym statystycznego opracowania danych), wykonaniu wszystkich zestawień graficznych, zebraniu i doborze piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu i pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego (prowadzeniu dyskusji z recenzentami, a także przygotowaniu edycji wersji ostatecznej). Mój udział procentowy szacuję na 85%.

Publikacja nr 3. Elżbieta Paszyńska, Marta Tyszkiewicz-Nwafor, Agnieszka Słopeń, Monika Dmitrzak-Węglarz, Agata Dutkiewicz, Teresa Grzelak. Study of salivary and serum vaspin and total antioxidants in anorexia nervosa. Clin. Oral Inv. 2018, <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2370-9>. Punktacja MNiSW: 35, IF: 2,308

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu badań, przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej oraz wniosku o dofinansowanie badań (otrzymanie grantu), przeprowadzeniu wszystkich analiz biochemicznych, statystycznym opracowaniu otrzymanych danych, udziale w interpretacji wyników badań, przygotowaniu zestawień graficznych, zebraniu piśmiennictwa i napisaniu manuskryptu oraz dyskusji z recenzentami, a także edycji wersji ostatecznej. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

Publikacja nr 4. Marcelina Sperling, Teresa Grzelak, Marta Pelczyńska, Paula Jasińska, Paweł Bogdański, Danuta Pupek-Musialik, Krystyna Czyżewska. Concentrations of omentin and vaspin versus insulin resistance in obese individuals. Biomed. Pharmacoth. 2016, 83: 542-547, doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.012. Punktacja MNiSW: 25, IF: 2,759

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu badań, przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej i wniosku o dofinansowanie badań (otrzymanie grantu), rekrutacji osób do badań, zabezpieczeniu materiału biologicznego oraz wykonaniu analiz antropometrycznych, przeprowadzeniu wszystkich analiz biochemicznych, statystycznym opracowaniu otrzymanych danych, współudziale w interpretacji wyników, przygotowaniu zestawień graficznych, zebraniu piśmiennictwa i napisaniu manuskryptu, a także przeprowadzeniu dyskusji z recenzentami i przygotowaniu edycji wersji ostatecznej. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

Publikacja nr 5. Teresa Grzelak, Anna Wędrychowicz, Joanna Grupińska, Marta Pelczyńska, Aniceta Ada Mikulska, Marcelina Sperling, Violetta Naughton, Krystyna Czyżewska. Neuropeptide B and neuropeptide W as new serum predictors of nutritional status and of clinical outcomes in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus treated with the use of pens or insulin pumps. Arch. Med. Sci. 2018. doi: <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.75818>. Punktacja MNiSW: 30, IF: 1,969

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu badań i przeprowadzeniu analiz biochemicznych, interpretacji otrzymanych wyników badań, statystycznym opracowaniu danych, przygotowaniu zestawień graficznych, zebraniu i doborze piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu i pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego (prowadzeniu dyskusji z recenzentami, a także przygotowaniu edycji wersji ostatecznej). Mój udział procentowy szacuję na 85%.

Łączny IF (ww. publikacji): 11,481 (Punktacja MNiSW: 145)

c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Biomarker/wykładnik należy do biologicznych wskaźników medycznych, umożliwiających obiektywną (precyzyjną i powtarzalną) ocenę procesów fizjologicznych lub patofizjologicznych [Strimbu et Tavel 2010]. Pojęcie to spotykane jest w fachowej literaturze tematu od stosunkowo niedawna. Definicja „biomarkera” stworzona w 2001 roku przez grupę ekspertów z Międzynarodowego Programu Bezpieczeństwa Chemicznego Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* - WHO) i Międzynarodowej Organizacji Pracy (*International Labor Organization*) wskazuje, iż jest to każda substancja, struktura lub proces, możliwy do oceny, który służy do przewidzenia występowania choroby lub zdarzenia [Biomarkers 2001, WHO 2001]. Zastosowanie biologicznych wskaźników medycznych w praktyce klinicznej umożliwia m.in.

wczesną diagnostykę, ocenę progresji zmian, wykrycie zagrożenia ich wystąpienia, monitorowanie leczenia i/lub powikłań schorzenia.

Zgodnie z aktualnymi wytycznymi *The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* oraz zaleceniami objętymi w dokumencie PN-EN ISO/IEC 15189 i standardach ISO9001, w badaniach z zastosowaniem biomarkerów należy uwzględnić parametry walidacyjne (m.in. specyficzność, selektywność, czułość, zakres pomiarowy, błąd pomiaru) [<https://www.iso.org>]. Jednym z coraz bardziej rozpowszechnionych badań statystycznych użytecznych w tym aspekcie są analizy krzywych ROC (*Receiver Operating Characteristic*), które przedstawiają zmienność wychwycenia klasy faktycznie pozytywnej w zależności od poziomu błędu popełnianego na klasie faktycznie negatywnej [Kamarudin et al. 2017].

Szczególnie interesujące, ze względu na aspekty poznawcze i aplikacyjne, jest poszukiwanie parametrów o potencjalnym znaczeniu klinicznym w przypadku chorób o nieznannej etiologii czy mechanizmie zaburzeń, a także schorzeń ważnych dla rozwoju medycyny (o globalnym występowaniu, wzroście zachorowalności i/lub wysokiej śmiertelności). Umożliwia to wprowadzenie nowego biomarkera w panel badań (obowiązkowych, uzupełniających), służących do oceny ryzyka zachorowania czy wystąpienia powikłań (profilaktyka pierwotna/wtórna). Szeroko rozumiana promocja zdrowia to jeden z najlepszych sposobów poprawy stanu zdrowotnego społeczeństwa [The International Conference]. Odgrywa ona szczególną rolę w przypadku chorób przebiegających z zaburzeniami stanu odżywienia. Do schorzeń tych zalicza się choroby, w których aspekty żywieniowe mają duże znaczenie, najczęściej zarówno w etiopatogenezie, jak i terapii. W cyklu prezentowanych prac, w celu poszukiwania nowych biomarkerów/wykładników oraz analizy znaczenia niedoboru/nadmiaru tkanki tłuszczowej i zaburzeń w poziomie tkanki mięśniowej uwzględniono grupy pacjentów różniących się znacznie wskaźnikami antropometrycznymi – od skrajnego niedożywienia w *anorexia nervosa* (AN) i zaburzeń w utrzymaniu właściwej masy ciała, po znaczną otyłość, w tym II i III stopnia (otyłość olbrzymią) u osób z nieprawidłową insulinowrażliwością tkanek oraz występowanie specyficznych deficytów insuliny i funkcjonalnie dostępnej glukozy dla komórek w cukrzycy typu 1 (T1DM). Uwzględniono w nich niewłaściwe proporcje składu ciała (przede wszystkim udziału tkanki tłuszczowej) oraz swoiste niedobory. Przekładało się to na dysfunkcje obserwowane zarówno w biochemicznych parametrach krwi pełnej, surowicy, osocza, jak i śliny.

Ocena przydatności otrzymanych danych do diagnostyki nie byłaby możliwa bez zastosowania zaawansowanych metod matematycznych. Planując realizację badań, określałam każdorazowo minimalną liczebność prób, po uwzględnieniu obliczeń z użyciem programu statystycznego Statistica 12.5 z Zestawem Medycznym (StatSoft Inc., USA), opierając się na wynikach badań pilotażowych, przy założeniach siły testu na poziomie 0,9 oraz błędu typu alfa (α) równego 0,05 (czyli parametrów często stosowanych w badaniach medycznych). Przeprowadziłam jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla badanych parametrów, które spełniły założenia o: mierzalności zmiennych zależnych, losowości próby i niezależności pomiarów. Ponadto wykonałam analizy porównań median dla danych powiązanych (testami

Wilcoxona, t-Studenta) oraz niepowiązanych (testami: U-Manna-Whitneya, Welch ANOVA) i korelacji badanych zmiennych (testami: Spearmana, Pearsona), a przy wyborze poszczególnych testów uwzględniłam spełnienie założeń o normalności rozkładu analizowanych zmiennych zależnych (wg testów Shapiro-Wilka dla liczebności w grupach poniżej 50 osób i Kołmogorova-Smirnova w przypadku większej populacji) oraz w aspekcie jednorodności wariancji (wg testu Levene'a) [Riffenburgh 2012]. Do określenia wydajności klasyfikatorów binarnych zastosowałam analizy krzywych ROC, porównując pole powierzchni (*Area Under Curve*, AUC) pod krzywymi ROC oraz wyznaczając punkty odcięcia, czułość i precyzję pomiaru. Dzięki zastosowaniu analizy ROC możliwe były badania czułości diagnostycznej (TPR) i swoistości diagnostycznej (TNR). Wyznaczenie wartości TPR umożliwiło analizę przydatności metody do stawiania prawidłowej diagnozy, natomiast TNR – użyteczności podczas wykluczania z grupy podejrzanej o schorzenie/nieprawidłowość [Riffenburgh 2012, Hosmer et Lemeshow 2013]. Wyniki analizy regresji wielokrotnych w ramach zastosowanych modeli przedstawiłam jako poprawiony współczynnik determinacji ($R^2_{adj.}$), który uwzględnia korektę na liczbę zmiennych niezależnych. Podczas selekcji parametrów zastosowałam automatyczną metodę doboru zmiennych do modelu (regresję hierarchiczną krokową wsteczną). Jako istotny statystycznie przyjął poziom błędu typu α nieprzekraczający wartości 0,05, po uwzględnieniu poprawki Bonferroni'ego dla porównań wielokrotnych [Riffenburgh 2012].

Współcześnie tematyka zaburzeń stanu odżywienia, w tym niedożywienia (ilościowego i/lub jakościowego) może się wydawać problemem dotyczącym głównie ubogich krajów rozwijających się (przede wszystkim usytuowanych na terenach Subsaharyjskiej Afryki). Wyniki badań potwierdzają jednak, iż nie można bagatelizować obniżonego statusu odżywienia (z różnych przyczyn), występującego coraz częściej w państwach wysoko- i średniorozwiniętych, w tym w Polsce. Dodatkowo wyróżnić można jednostki chorobowe charakteryzujące się znacznym niedożywieniem, niezależnie od ekonomicznego statusu kraju. Rozpoczęłam swoje analizy od badań u pacjentek ze skrajnie niskimi wartościami masy ciała i wskaźników antropometrycznych, które z definicji charakteryzują się zarówno niedożywieniem ilościowym, jak i jakościowym. Badania te wyróżniały się znaczną trudnością – wymagały, m.in. dużego wysiłku organizacyjnego w celu nawiązania współpracy ze starannie ukrywającymi swoje schorzenie pacjentkami, a także specyficznych problemów związanych z objęciem badaniami osób ze skrajnie ciężką postacią choroby (*Body Mass Index* - *BMI* w zakresie 11-15 kg/m²). W przypadku takiego stanu występują zaburzenia zdrowotne bezpośrednio zagrażające życiu, a tym samym znaczne trudności w gromadzeniu materiału biologicznego. Dostępne badania różnych autorów, poszukujących biochemicznych zależności występujących w *anorexia nervosa* dotyczyły najczęściej małych grup chorych, często z pomijaniem populacji ze skrajnie ciężkim stadium schorzenia [Oświęcimska et al. 2005, Lechin et al. 2010, Zhang et al. 2012, Omodei et al. 2015], ponieważ zaawansowana postać niedożywienia znacznie utrudnia wykonanie procedury medycznej typu pobranie krwi. Analizy stężeń neuropeptydu B (NPB) i neuropeptydu W (NPW) w surowicy krwi oraz całościowa ocena stanu antyoksydacyjnego w różnych materiałach biologicznych były pierwszymi, jakie przeprowadzono wśród chorych z AN (zwłaszcza w ekstremalnym stadium tej choroby) i T1DM

[publikacja nr 1, publikacja nr 2, publikacja nr 3, publikacja nr 5], podobnie jak analizy poziomów waspiny w ślinie tych pacjentów [publikacja nr 3], stąd w większości przypadków odnoszono je do wyników otrzymanych w modelach zwierzęcych *in vivo* lub *in vitro*.

Anorexia nervosa należy do jednostek chorobowych o słabo poznanej etiologii. Jej rozpowszechnienie stale rośnie, a skuteczność stosowanego leczenia pozostaje niezadowalająca - około 9% pacjentów umiera w ciągu kilku lat od diagnozy (najwyższa śmiertelność wśród chorób psychicznych) [Welch et Ghaderi 2015, Stheneur et al. 2017]. Dominuje pogląd, że schorzenie należy do polietiologicznych, specyficznych zaburzeń odżywienia (objawiającym się m.in. intencjonalnym ograniczeniem odżywiania). Symptomy AN i powikłania mają charakter somatyczny (przede wszystkim w obrębie układów hormonalnego, sercowo-naczyniowego oraz często pomijanego w opracowaniach naukowych - układu stomatognatycznego), a także psychiatryczny i społeczny [Stheneur et al. 2017].

Niezależnie od zastosowanego sposobu leczenia, normalizacja masy ciała u chorych najczęściej nie oznacza ustąpienia wszystkich objawów choroby, bowiem pacjenci nadal prezentują liczne zaburzenia, zarówno nieprawidłowości związane z odżywianiem, jak i te o charakterze depresyjno-obsesyjnym [Lian et al. 2017]. Chorzy z *anorexia nervosa*, jako specyficzna populacja osób niedożywionych, stali się w mojej pracy zawodowej swoistą grupą badawczą nad czynnikami doprowadzającymi do utrzymywania restrykcyjnego modelu odżywiania się, który z kolei prowadzi do niewłaściwego stanu odżywienia. W ich leczeniu, obok psychoterapii i ewentualnej farmakoterapii, ważną rolę odgrywa, prowadzona równolegle, terapia żywieniowa. W pracy poglądowej [Grzelak et al. 2017], na podstawie systematyzacji i syntezy rozproszonych danych literaturowych, wyodrębnione zostały determinanty nieprawidłowych postaw i zachowań, związanych z przyjmowaniem pożywienia, ze szczególnym uwzględnieniem patomechanizmów, które sprzyjają restrykcjom dietetycznym u osób chorujących na *anorexia nervosa*. Czynniki wpływające na ich kształtowanie się mają podłoże: neurobiochemiczne, afektywno-motywacyjne oraz poznawczo-behawioralne i powiązane są siecią wzajemnych złożonych zależności. Przykładowo, zmieniona aktywność neuroprzekaźników, modulujących nastroj chorych po konsumpcji pożywienia oraz współlistniejące zaburzenia w odpowiedzi organizmu na enterohormony, nakładają się na aspekty motywacyjne i poznawcze, co znacznie utrudnia korektę postaw żywieniowych. Dlatego przebieg dietoterapii w omawianej jednostce chorobowej powinien być fazowy i zindywidualizowany, a także zmieniać się wraz z poprawą stanu somatycznego i psychicznego osoby chorej. Zrozumienie mechanizmów działania czynników wpływających na utrzymywanie się nieprawidłowych postaw i zachowań związanych z jedzeniem (w tym biochemicznych) może przyczynić się do poprawy efektywności terapii pacjentów z niskim statusem odżywienia i zminimalizowania ryzyka wystąpienia nawrotu choroby [Haynos et al. 2016, Grzelak et al. 2017].

Różnorodność determinantów restrykcyjnego stylu odżywiania się pacjentów z *anorexia nervosa* dodatkowo modyfikuje naturę omawianego zaburzenia. Pacjenci z AN charakteryzują się zmianą zachowań żywieniowych, prowadzącą do uzyskania i utrzymania masy ciała znacznie poniżej oczekiwanej dla płci i wieku (przynajmniej o 15% poniżej normy), co często prowadzi do

wyniszczenia, a nawet śmierci [Grzelak et al. 2017, Treasure et Cardi 2017]. Ostatnie wytyczne *American Psychiatric Association* klasyfikują stopień zaawansowania choroby wg *Body Mass Index*, wyszczególniając postać łagodną (*mild AN*; $BMI \geq 17,00 \text{ kg/m}^2$), umiarkowaną (*moderate AN*; BMI w zakresie $16,00\text{-}16,99 \text{ kg/m}^2$), ciężką (*severe AN*; BMI $15,00\text{-}15,99 \text{ kg/m}^2$) i skrajnie ciężką (*extreme AN*; $BMI < 15,00 \text{ kg/m}^2$) [American Psychiatric Association 2013]. Unikanie przyjmowania pokarmów i/lub prowokowanie wymiotów, stosowanie leków przeczyszczających czy moczopędnych z jednoczesnym zwiększaniem wydatków energetycznych organizmu, głównie poprzez nasiloną aktywność fizyczną, są często praktykowane przez pacjentów z *anorexia nervosa* (zwłaszcza płci żeńskiej) w celu osiągnięcia/utrzymania bardzo szczupłego wyglądu [Coniglio et al. 2017]. W przypadku populacji męskiej dominują głównie forsowne ćwiczenia fizyczne, które wpływają na powstawanie niedożywienia ilościowego i jakościowego, ze znacznym niedoborem zawartości tkanki tłuszczowej [Strother et al. 2012].

U osób płci żeńskiej niski status odżywienia prowadzi przede wszystkim do powikłań endokrynologicznych (np. w obrębie osi podwzgórze-przysadka mózgowa-jajniki i podwzgórze-przysadka mózgowa-nadnercza), kardiologicznych (m.in. zaburzeń rytmu serca, hipotensji), trudności w utrzymaniu właściwej ciepłoty ciała oraz licznych nieprawidłowości, w tym w obrębie układów: pokarmowego, kostnego i rozrodczego. Powyższym stanom towarzyszą dodatkowe zmiany (głównie natury hematologicznej i biochemicznej) [De Filippo et al. 2016, DeBoer 2007, Treasure et Cardi 2017]. Mimo utrzymujących się od dłuższego czasu przed hospitalizacją szeregu objawów, wiele chorych osób trafia pod opiekę specjalistów zbyt późno, przede wszystkim z powodu ukrywania symptomów *anorexia nervosa* przed otoczeniem oraz wciąż niskiej wiedzy społeczeństwa na temat symptomatologii i poważnych konsekwencji nieleczenia tego schorzenia [Lian et al. 2017]. Wyróżnia się dwa typy *anorexia nervosa*: restrykcyjny – z utratą masy ciała i znacznym ograniczeniem podaży kalorii oraz bulimiczny – z epizodami objadania się i stosowaniem różnych sposobów oczyszczających, przy czym pierwszy z nich charakteryzuje się gorszymi rokowaniami i częstszymi powikłaniami natury metabolicznej [American Psychiatric Association 2013, Rylander et al. 2017].

W związku z wielokrotnie wyższą częstością występowania *anorexia nervosa* w populacji żeńskiej niż męskiej, głównie u dziewcząt w okresie adolescencyjnym, kiedy dochodzi do znacznych modyfikacji w rozmieszczeniu tkanki tłuszczowej [Kostro et al. 2014, Nagata et al. 2017], przy współpracy z Kliniką Psychiatrii Dzieci i Młodzieży Katedry Psychiatrii UMP i Zakładem Genetyki w Psychiatrii w tej samej Katedrze wielokierunkowymi badaniami objęto 76 nastolatków w wieku 12-17 lat, w tym 46 osób z ekstremalnie ciężką postacią AN o typie restrykcyjnym (w większości hospitalizowanych po raz pierwszy) i 30 zdrowych (somatycznie i psychicznie) rówieśniczek z prawidłowymi wartościami wskaźników antropometrycznych (grupa kontrolna). Wśród przebadanych pacjentów z *anorexia nervosa* wykluczono osoby z współtowarzyszącymi innymi chorobami psychicznymi. Kryteria włączenia do grupy kontrolnej obejmowały brak zaburzeń odżywiania (także w przeszłości oraz u rodziny I stopnia) czy uzależnień od środków psychoaktywnych, dobry stan zdrowia – potwierdzony lekarskimi badaniami podmiotowymi i przedmiotowymi oraz wynikami analiz laboratoryjnych, w oparciu o

dokładny wywiad.

Głównym celem badań opisanych w publikacji nr 1 była ocena zależności pomiędzy poziomami w surowicy krwi NPB, NPW, waspiny i statusu antyoksydacyjnego a stanem odżywienia pacjentek z *anorexia nervosa*. Analizy biochemiczne objęły ocenę stężeń NPB, NPW i waspiny metodami immunoenzymatycznymi oraz *Total Antioxidant Status* (TAS) z zastosowaniem opatentowanej cząsteczki 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid] (ABTS^{•-}). Wartości parametrów obliczyłam na podstawie krzywych wzorcowych wyznaczonych z użyciem 4-parametrowego algorytmu (*4-parameter-algorithm*; *SigmaPlot 11.00 Software*), przygotowywanych każdorazowo dla poszczególnych serii oznaczeń. Współczynniki precyzji (*Coefficients of Variation* - CVs) wewnątrzseryjnej (*CV intra-assay*) wyniosły dla NPB 3,5%, a międzyseryjnej (*CV inter-assay*) 6,1%. Parametry te w przypadku NPW sięgały odpowiednio: 4,3% i 6,2%, waspiny: 2,5% i 3,0%, a TAS: 4,0% i 5,9%. Zakresy pomiarowe dla nierozcieńczonych materiałów biologicznych kształtowały się na poziomie 5-1000 pg/mL dla NPB, natomiast 2,5-720 pg/mL w przypadku oznaczeń NPW oraz 4-4000 pg/mL dla waspiny. Względna reaktywność krzyżowa z pokrewnymi peptydami/białkami (w zakresie stężeń występujących w ludzkiej surowicy) nie przekraczała 0,006% [publikacja nr 1].

Pacjentki z AN charakteryzowały się wyższymi stężeniami we krwi NPB (wzrost wartości mediany o 62%) i waspiny (o 43%) oraz niższymi poziomami TAS (o 18%), masy ciała (o 50%) i analizowanych wskaźników antropometrycznych, tj. *Body Mass Index* (o 45%) w porównaniu do grupy kontrolnej, pomimo podobnego wieku i wysokości ciała. Stwierdziłam także niskie wartości *Body Mass Index z-score* oraz *Body Mass Index-for-age percentile*, adekwatne do stopnia zaawansowania choroby. Analizy regresji wielokrotnej wykazały występowanie dodatniej korelacji pomiędzy wartościami stężeń NPB i waspiny u pacjentek z *anorexia nervosa* ($p < 0,001$) oraz analogiczne powiązania pomiędzy poziomami NPW i waspiny w tej samej grupie ($p < 0,001$), a także NPW vs. NPB w grupach AN ($p < 0,000001$) i kontrolnej ($p < 0,0005$). Analiza porównawcza krzywych ROC wskazała, iż skorygowany poziom we krwi NPB względem BMI (AUC=0,700) jest najlepszym (z analizowanych) parametrów predykcyjnych dla restrykcyjnego typu *anorexia nervosa* w ekstremalnie ciężkiej postaci choroby, zaś mniejszą czułość predykcyjną w tym zakresie stwierdziłam w przypadku analogicznie skorygowanych poziomów we krwi waspiny (AUC=0,647) i TAS (AUC=0,583) [publikacja nr 1]. W tym ostatnim przypadku wyniki wskazują na ograniczoną przydatność w predykcji zaburzeń, ponieważ większość uznanych markerów diagnostycznych w medycynie charakteryzuje się wartością AUC na krzywych ROC w zakresie 0,8-0,9; a przy wartościach 0,7 i powyżej predyktor uznawany jest za satysfakcjonujący [Mezaour 2005, Hosmer et Lemeshow 2013]. Na podstawie analiz przeprowadzonych w *anorexia nervosa* i danych otrzymanych dla innych jednostek chorobowych [Körner et al. 2011, Solmi et al. 2016, Oświęcimska et al. 2016], można wnioskować, iż poziomy waspiny i całkowitego statusu antyoksydacyjnego we krwi pacjentek z AN zależą od różnych czynników, m.in. stanu zapalnego czy zaburzeń w gospodarce węglowodanowej i hormonalnej [Körner 2011, Solmi 2016, Oświęcimska et al. 2016].

Brakuje bezpośrednich danych w literaturze tematu w kontekście badań stężeń NPB we

krwi u człowieka. Pojedyncze analizy, przeprowadzone na gryzoniach, wskazują na wpływ tego neuropeptydu na zachowania żywieniowe. Wyniki badań *in vivo* wykonanych na modelach zwierzęcych sugerują znaczenie NPB jako czynnika supresyjnego dla leptyny [Skrzypski et al. 2012], a prawdopodobny mechanizm działania upatruje się w regulacji ośrodką głodu i/lub sytości oraz poziomu insuliny i glukozy we krwi. Wcześniejsze analizy, przeprowadzone w Klinice Psychiatrii Dzieci i Młodzieży Katedry Psychiatrii UMP u pacjentek z *anorexia nervosa* w skrajnie ciężkim stadium choroby ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$), wskazują na niskie stężenie leptyny we krwi, które normalizowało się po hospitalizacji chorych [Rybakowski et al. 2014].

NPB jako jedyne znane białko u ssaków jest połączone z cząsteczką bromu (modyfikacja N-końca reszty tryptofanu poprzez bromowanie). Dodatkowo, razem z NPW nie wykazują homologii sekwencji do członków innych znanych rodzin peptydów/białek, ale charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji aminokwasów względem siebie, tworząc odrębną rodzinę peptydów [Sakurai 2013]. NPB i NPW są jedynymi, ze znanych, naturalnymi ligandami specyficznych receptorów sprzężonych z białkami G czyli NPBWR1 i NPBWR2, które długo pozostawały tzw. „sieroce”, przy czym u gryzoni stwierdzono brak ekspresji NPBWR2 (obecność receptora NPBWR2-podobnego) [Li et al. 2018].

Znaczenie analizy poziomów waspiny we krwi w przypadku skrajnie ciężkiej postaci *anorexia nervosa* podkreślono w badaniach własnych [publikacja nr 1], a także w pracy Oświęcimskiej i wsp. z 2016 roku [Oświęcimska et al. 2016], w której przeanalizowano grupy pacjentek z AN, obejmującej osoby znacznie różniące się wartościami BMI ($11,4\text{-}17,3 \text{ kg/m}^2$), bez wyodrębnienia podgrup z BMI poniżej 15 kg/m^2 . Mediany stężeń tej adipocytokiny były wyższe u nastolatków, podobnie jak w prezentowanych badaniach własnych, w porównaniu z osobami płci żeńskiej bez tej choroby [Oświęcimska et al. 2016]. Waspina jest białkiem produkowanym zarówno w tkance tłuszczowej trzewnej, jak i podskórnej oraz w komórkach trzustki, żołądka i podwzgórza [Li et al. 2011]. Badania przeprowadzone na gryzoniach wykazały wielokrotnie silniejsze działanie anoreksygenne waspiny, w porównaniu do leptyny, które polegało na zahamowaniu poboru pożywienia i obniżeniu masy ciała po podaniu tej adipocytokiny do komór mózgu w fazie jasnej (dzień) lub dootrzewnowo, utrzymujące się do 24h po jednorazowej dawce [Kim et Youn 2011]. Mechanizm działania waspiny wiąże się ze ścieżką sygnalizacyjną Stat3 (*hypothalamic signal transduction-activated transcript*) i skutkuje zmianami w wydatkowaniu energii i poborze tlenu. Dodatkowo udowodniono znaczenie aktywności tej adipocytokiny jako inhibitora proteazy serynowej, ponieważ zastosowanie zmodyfikowanej waspiny (z mutacją w domenie serpinowej) częściowo znosiło ten efekt [Kim et Youn 2011]. Wprowadzenie egzogennej formy tego białka do hodowli komórkowych preadipocytów linii 3T3-L1 skutkowało ograniczeniem pobudzenia przez cytokiny ścieżki sygnalizacyjnej związanej z czynnikiem jądrowych κB ($IKK\alpha/\beta$, $I\kappa B$, $NF\kappa B$) [Zieger et al. 2018a]. W warunkach fizjologicznych omawiana adipocytokina jest wydzielana pulsacyjnie, przy czym – co zaskakujące – poziom we krwi u kobiet jest około dwa razy wyższy niż u mężczyzn [Koiou et al. 2011]. Przyczyny dysproporcji nie są znane, podobnie jak uwarunkowania wielokrotnie wyższej częstotliwości występowania *anorexia nervosa* w populacji żeńskiej niż męskiej [Klump et al. 2017].

Wykazano, że stężenie waspiny we krwi na czczo w warunkach fizjologicznych jest niskie, natomiast 1-2 godziny przed spodziewanym posiłkiem zaczyna się podwyższać [Jeong et al. 2010]. Brakuje badań w aspekcie ewentualnych nieprawidłowości wydzielania tej adipocytokiny w *anorexia nervosa* w różnych porach dnia czy modyfikacji skorelowanych względem przyjmowania posiłków. Prezentowane badania własne, jak i nieliczne dostępne w literaturze analizy z udziałem pacjentek z *anorexia nervosa* czy innymi schorzeniami [publikacja nr 1, publikacja nr 2, publikacja nr 3, publikacja nr 4, Oświęcimska et al. 2016, Ostrowska et al. 2016] wykonywano tylko na czczo. W analizach przeprowadzonych u mężczyzn wykazano jedynie, iż submaksymalny 30-minutowy wysiłek aerobowy nie zmienia poziomu waspiny we krwi (mimo obniżenia stężeń insuliny, glukozy i poziomu *homeostasis model assessment insulin resistance*) bezpośrednio po ćwiczeniach oraz po 30-minutowym odpoczynku. Często spotykane różnice w aktywności fizycznej u AN względem grupy kontrolnej, prawdopodobnie nie wpływają więc na poziom tej adipocytokiny [Bashiri et al. 2014]. Nie można zaś wykluczyć obecności waspinooporności u pacjentów z *anorexia nervosa* – podobnego mechanizmu do grelinooporności, stwierdzonego w tej jednostce chorobowej. Podwyższone stężenia greliny we krwi osób z AN prawdopodobnie stanowią mechanizm kompensacyjny, nieprzynoszący jednak oczekiwanego skutku w postaci zwiększonego spożycia pokarmu [Nedvidková et al. 2003, Cruz-Domínguez et al. 2014].

Niski poziom całkowitej zdolności antyoksydacyjnej u przebadanych pacjentów, mimo stosunkowo wysokiego stężenia waspiny (białka o właściwościach przeciwutleniających) [publikacja nr 1] oraz analiza wcześniejszych badań (określających poziom/aktywność wybranych antyoksydantów czy poziom reakcji z TBARS [(the thiobarbituric acid reactive substances), wskazujący stan peroksydacji lipidów], przeprowadzonych w grupach chorych z *anorexia nervosa* wskazuje na przewagę w organizmie procesów prooksydacyjnych nad antyoksydacyjnymi, chociaż wyniki w tym zakresie nie są jednoznaczne [Li et al. 2014c, Solmi et al. 2016, Fichter et al. 2017]. W warunkach prawidłowych reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (RNS), występując w niskich stężeniach, działają przede wszystkim jako wtórne przekaźniki, mogące regulować szlaki transdukcji sygnałów w komórce. W celu zapobiegania zaburzeniom homeostazy, nadmiar rodników jest eliminowany przez wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe mechanizmy ochronne, w których uczestniczą enzymatyczne i nieenzymatyczne antyoksydanty [Dal et Sigrist 2016]. Natomiast niekontrolowane zwiększenie poziomu reaktywnych form rodnikowych (wskutek m.in. niewłaściwego sposobu żywienia czy chorób) wywiera szkodliwe działanie na strukturę i funkcję komórek na wielu poziomach (głównie kwasów nukleinowych, białek i nienasyconych kwasów tłuszczowych) [Peluso et Raguzzini 2016].

Metaanaliza przeprowadzona w 2015 roku wykazała, iż pacjenci z *anorexia nervosa* charakteryzują się wysokim stężeniem we krwi markera stresu oksydacyjnego - apolipoproteiny B, przy porównywalnym poziomie antyoksydacyjnych białek - albumin we krwi, w odniesieniu do rezultatów otrzymanych u osób z prawidłową masą ciała. Stwierdzono także niższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej we krwi, a w jednej analizie - podwyższoną aktywność katalazy i wysoki poziom TBARS oraz niskie stężenia glutationu i wolnej cysteiny we krwi [Solmi et al. 2015]. Ponadto wykazano wysoką produkcję reaktywnych form tlenu w *anorexia nervosa* [Victor

et al. 2014]. Całkowity status antyoksydacyjny, analizowany w badaniach własnych, jest parametrem obejmującym zdolność przeciwutleniającą surowicy, na którą składają się zarówno enzymy antyoksydacyjne, jak również antyoksydanty niskocząsteczkowe, a jego ocena opisuje właściwości przeciwdziałające wolnym rodnikom w przypadku złożonych układów biologicznych lepiej niż suma stężeń/aktywności wszystkich antyoksydantów mierzonych oddzielnie.

Podsumowując tę część analiz, po raz pierwszy wykazałam istnienie zaburzeń w poziomach NPB (hiperneuropeptydemie B) oraz obniżenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego we krwi pacjentek ze skrajnie ciężką postacią AN. Głównym wnioskiem płynącym z otrzymanych rezultatów (opisanych w publikacji nr 1) jest potrzeba rozważenia wprowadzenia badań uzupełnionych o analizy biochemiczne w *anorexia nervosa*, uwzględniające m.in. pomiary stężeń NPB w szczegółowej diagnostyce chorych, zwłaszcza u osób z nawracającymi objawami i trudnościami w leczeniu.

Niedożywienie ilościowe i jakościowe, stwierdzone u osób z AN, zarówno przed postawieniem diagnozy, jak i w trakcie podjęcia specjalistycznego leczenia, jest negatywnym czynnikiem rokowniczym, a stopień niedoborów wpływa znacząco na jakość i długość życia pacjentów. Jednym z kluczowych aspektów (często pomijanych) wydają się znaczne deficyty zawartości tkanki tłuszczowej w AN, która dzięki przełomowym odkryciom ostatnich dziesięcioleci, jest obecnie uważana za duży, aktywny organ dokrewny, odpowiedzialny za syntezę/sekwestrację/wydzielanie licznych, biologicznie czynnych związków, zwanych adipokinami (lub adipocytokinami - jeśli znane są inne niż adipocyty tkankowe źródła sekrecji) [Gill et al. 2016, Ahsan et al. 2017]. Fizjologia tej tkanki jest stosunkowo słabo poznana, a zrozumienie mechanizmów działania niedoboru/nadmiaru endokrynnych substancji przez nią uwalnianych, może - w mojej opinii - przybliżyć poznanie patomechanizmów towarzyszących chorobom przebiegającym ze skrajnym zaburzeniem stanu odżywienia. Do niedawna tkanka ta była postrzegana jako nieaktywny metabolicznie organ, stanowiący głównie rezerwuuar energii zgromadzonej w postaci triacylogliceroli - powszechnie uważano bowiem, że znaczenie tkanki tłuszczowej wiąże się głównie z funkcją termoizolacyjną i ochronną przed mechanicznymi uszkodzeniami narządów wewnętrznych. W związku z powyższym zainteresowanie funkcjami fizjologicznymi/patofizjologicznymi czy wpływem na biochemiczne parametry tego organu było ograniczone [Ma et al. 2016].

Ponieważ większość chorych ze skrajnym niedożywieniem spowodowanym *anorexia nervosa* nie zgadza się na terapię lub wycofuje zgodę na jej kontynuację po krótkotrwałym pobycie w szpitalu, ważnym etapem współpracy z Kliniką Psychiatrii Dzieci i Młodzieży Katedry Psychiatrii UMP były kolejne badania, trwające około 2-3 miesiące (średni okres $\pm$ odchylenie standardowe: 76 ± 10 dni) [publikacja nr 2]. Określono w nich profil zmian surowiczych biomarkerów/wskaźników względem stanu odżywienia przed i po hospitalizacji pacjentek, u których otrzymano zadawalające przyrosty wartości *BMI* minimum o 3 kg/m^2 (średnia zmiana $\pm$ odchylenie standardowe: $3,5 \pm 0,5 \text{ kg/m}^2$), obejmujące zarówno tkankę mięśniową, jak i tłuszczową. W trakcie pobytu w szpitalu 30-osobowa grupa młodzieży płci żeńskiej ze skrajnie ciężką postacią *anorexia nervosa* (*BMI* w zakresie $11,2\text{-}14,9 \text{ kg/m}^2$) była intensywnie leczona

(m.in. nawadniana i odżywiana doustnie i/lub parenteralnie) w celu ograniczenia ryzyka wystąpienia/nasilenia śmiertelnych powikłań somatycznych, w połączeniu z terapią psychologiczną, a niekiedy także stosowaniem standardowych preparatów farmaceutycznych. W przypadku doustnego leczenia dietetycznego tego schorzenia szczególną trudność sprawiała konieczność zindywidualizowania terapii, uzależnionej od zmieniającego się stanu chorych [publikacja nr 2]. Nie jest to możliwe bez ciągłego, indywidualnego monitorowania każdego pacjenta, z uwzględnieniem m.in. zmian we wskaźnikach antropometrycznych oraz modyfikacji parametrów biochemicznych i morfologicznych krwi [publikacja nr 2, Grzelak et al. 2017, Gentile et al. 2013]. Jednocześnie prowadzona terapia żywieniowa (właściwie dobrana) i reedukacja dietetyczna (zarówno pacjenta, jak i jego rodziny/opiekunów) zwiększają szansę na uzyskanie pożądanej efektywności postępowania terapeutycznego, w tym ograniczenia ryzyka nawrotów objawów. Idealnym punktem końcowym leczenia jest osiągnięcie przez pacjenta zdolności do prawidłowej percepcji stanu głodu i sytości, co wydaje się niedościgłym wzorem skutecznej terapii [Dutkiewicz et Grzelak 2016, publikacja nr 2]. W badaniach własnych - na początku i na końcu hospitalizacji, po uzyskaniu częściowej normalizacji masy ciała (uwzględniając wiek, wysokość ciała i stan początkowy), wykonano analizy antropometryczne i biochemiczne krwi. Pierwsze z nich obejmowały pomiary masy i wysokości ciała oraz obliczenia wskaźników: *Queteleta (Body Mass Index, BMI)*, *Body Mass Index z-score* oraz *Body Mass Index-for-age percentile*. W obrębie badań biochemicznych ujęłam analizy surowiczych stężeń NPB, NPW, waspiny oraz poziomu TAS. Uzyskane wyniki porównane zostały do grupy kontrolnej, a w obrębie populacji z AN – zestawione także przed i po hospitalizacji [publikacja nr 2].

Pacjenci ze skrajnie ciężką postacią *anorexia nervosa* (AN-I), a także po hospitalizacji i częściowej normalizacji parametrów antropometrycznych (AN-II), charakteryzowali się niższymi (w porównaniu do grupy kontrolnej) wartościami wskaźników *BMI*, *Body Mass Index z-score*, *Body Mass Index-for-age percentile* oraz wyższymi stężeniami we krwi NPB, utrzymującymi się na stałym poziomie niezależnie od statusu odżywienia (AN-I i AN-II), co zostało po raz pierwszy wykazane u pacjentów z tą chorobą w okresie remisji. Wydaje się, że długotrwała hiperneuropeptydemia B, występująca u pacjentek z *anorexia nervosa*, pomimo uzyskania zadawalających wskaźników antropometrycznych, może być czynnikiem opóźniającym pełne zdrowienie [publikacja nr 2]. Badania przeprowadzone w Klinice Psychiatrii Dzieci i Młodzieży UMP ukazały, że pacjentki, pomimo przyrostu wartości *BMI* w trakcie hospitalizacji, nadal prezentują niektóre objawy zaburzeń odżywiania i depresji. Stwierdzono ponadto, iż przyrosty poziomu leptyny we krwi przeanalizowanych pacjentek z AN (przed i po wzroście *BMI* o średnio $3,2 \pm 1,3 \text{ kg/m}^2$) były skorelowane z ograniczeniem objawów depresji wg skali HDRS (*Hamilton Depression Rating Scale*), natomiast nie stwierdzono zależności pomiędzy zmianami leptynemii a wynikami testu psychometrycznego wg Inwentarza Depresji Becka – *Beck Depression Inventory*, BDI [Rybakowski et al. 2012]. Ostatni z wymienionych należy do testów z zastosowaniem samoopisowej skali, który pozwala ocenić poziom depresyjności, stąd wniosek o utrzymujących się zmianach natury neuropsychicznej.

Przypuszczalnie w przypadku pacjentek z *anorexia nervosa* sytuacje stresowe zaburzają

regulację ścieżki związanej z NPB [Sakurai 2013]. Pewne przesłanki w tym zakresie dają wyniki badań przeprowadzonych na zwierzęcych modelach w przypadku osobników *Npw*^{-/-} i zmian obserwowanych podczas wywoływania sytuacji stresowych [Motoike et al 2016]. Chociaż NPW i NPB u gryzoni pobudzają takie same receptory - NPBWR1 i NPBWR2-podobny [Sakurai 2013], ich wzajemna rola w kształtowaniu reakcji na stres jest słabo poznana i wymaga dalszych analiz. We wcześniejszych badaniach, przeprowadzonych u zwierząt, wykazano bowiem odrębne działania NPB i NPW w aspekcie kontroli poboru żywienia i wydzielania aldosteronu, co m.in. tłumaczy się współudziałem innych dróg metabolicznych (np. związanych z leptyną i osią podwzgórze-przysadka mózgowa-nadnercza) [Kelly et al. 2005, Motoike et al. 2016]. Stwierdzono bowiem, że myszy z wyłączonym genem *Npb*^{-/-} lub genem *Npbwr1*^{-/-} charakteryzują się hiperfagią i rozwijają otyłość [Kelly et al. 2005], natomiast badania z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych z wyłączonym genem *Npw*^{-/-} wykazały brak różnic w aspekcie poboru pożywienia, w porównaniu do osobników dzikich [Motoike et al. 2016].

Ciekawe pozostaje zrozumienie przyczyn patomechanizmów prowadzących do hiperneuropeptydemii B w *anorexia nervosa*. Jedną z hipotez tłumaczących wysokie poziomy wybranych neuropeptydów w tej chorobie są niedobory specyficznych autoprzeciwciał. Stwierdzono bowiem niskie poziomy we krwi autoprzeciwciał skierowanych przeciwko takim neuropeptydom, jak *α-melanocyte-stimulating hormone* (α-MSH), wazopresyna i oksytocyna w AN, w porównaniu do grup pacjentów z *bulimia nervosa* i kontrolnej. Ponieważ autoprzeciwciała te, w przeciwieństwie do neuropeptydów, charakteryzują się wysoką trwałością (kilkadziesiąt dni vs. kilkanaście minut), przez co poprzez analogię z białkami transportowymi, można upatrywać się ich znaczenia w kontrolowaniu gospodarki związanej z neuropeptydami. Stwierdzono bowiem istnienie korelacji pomiędzy poziomami autoprzeciwciał i wartościami *BMI* w *anorexia nervosa*, ale nie w *bulimia nervosa* czy w grupie kontrolnej, a dodatkowo w przypadku stężeń α-MSH – wykazano specyficzne powiązanie z wynikami uzyskanymi w testach psychometrycznych (otrzymanie przeciwnych korelacji, porównując rezultaty w grupach pacjentów z AN i *bulimia nervosa*) [Fetissov et al. 2005].

Kolejnym etapem moich badań była ocena profilu zmian stężenia waspiny podczas hospitalizacji 30 pacjentów ze skrajnie ciężką postacią AN, jako przedstawiciela adipocytokin o działaniu anoreksogennym, antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym [Kim et Youn 2011, Qi et al. 2017]. U osób z *anorexia nervosa* mediana stężeń tej molekuly we krwi kształtowała się na wysokim poziomie na początku leczenia szpitalnego i obniżyła się na końcu hospitalizacji (o 33%, $p < 0,05$, AN-II), w porównaniu do stanu przed leczeniem (AN-I), osiągając wartości zbliżone do uzyskanych w grupie kontrolnej. Stwierdziłam występowanie dodatniej korelacji stężeń tej adipocytokiny w grupie AN-II z osiągniętą masą ciała ($p < 0,05$). Intensywne leczenie i uzyskana częściowa normalizacja stanu pacjentek może wskazywać na ograniczenie zapotrzebowania na czynniki przeciwdziałające procesom zapalnym/antyoksydacyjnym (m.in. waspiny). Dodatkowo, ponieważ adipocytokina ta należy do inhibitorów proteaz serynowych (jest jedynym znanym endogennym antagonistą proteazy o nazwie kalikreina 7), a tym samym ogranicza kontrolowany przez wspomniany enzym rozkład insuliny do nieaktywnych podjednostek [Zieger et al. 2018a],

jej działanie może okazać się ważnym elementem w specyficznym systemie kompensacyjnym przeciwdziałającym zaburzeniom gospodarki węglowodanowej. Myszy z wyłączonym genem dla kalikreiny 7 w obrębie tkanki tłuszczowej (*ATK1k7-/-*) wykazywały mniejszy przyrost masy ciała, niższy poziom leptyny i lepszą wrażliwość na insulinę przy stosowaniu diety wysokotłuszczowej, w porównaniu do dzikich osobników [Zieger 2018b]. Hiperwaspinemia w skrajnie ciężkich postaciach *anorexia nervosa* może sugerować specyficzną ochronę przed niedoborami aktywnej insuliny u przebadanych osób, przy czym powyższy mechanizm nie jest konieczny w przypadku stabilizacji stanu pacjenta (grupa AN-II). Zwłaszcza, że metaanaliza 13 badań klinicznych wykazała wyższą insulinowrażliwość tkanek w tej chorobie, w porównaniu do grupy kontrolnej [Ilyas et al. 2017], a w modelach zwierzęcych stwierdzono, że waspina pozytywnie wpływa na przekazywanie sygnału przez insulinę poprzez zwiększenie stymulowanej tym hormonem fosforylacji kluczowego mediatora - kinazy białkowej B (AKT) [Liu et al. 2017]. Wysoka ekspresja waspiny w komórkach β wysp trzustki [Li et al. 2011] wskazuje dodatkowo na ważną rolę tego białka w homeostazie gospodarki węglowodanowej.

Dodatnie korelacje pomiędzy wartościami stężeń waspiny i NPB w grupach AN-I ($R=0,46$; $p<0,02$), AN-II ($R=0,45$; $p<0,013$) oraz waspiny vs. NPW na początku i na końcu hospitalizacji pacjentek (odpowiednio $R=0,54$; $p<0,02$; $R=0,44$; $p<0,015$) mogą sugerować istnienie wzajemnych sieci powiązań pomiędzy badanymi peptydami/białkami w *anorexia nervosa*. Zależności te wydają się silniejsze i bardziej uniwersalne w przypadku badanych neuropeptydów NPB i NPW [bardzo wysokie wartości współczynnika korelacji zarówno w grupach AN-I ($R=0,95$; $p<0,000001$), jak i AN-II ($R=0,97$; $p<0,000001$), a także kontrolnej ($R=0,90$; $p<0,0005$)] niż względem waspiny i poszczególnych neuropeptydów.

Częściowa normalizacja masy ciała i stabilizacja poziomu antyoksydacyjnego białka – waspiny – u pacjentek podczas hospitalizacji bez wpływu na status TAS [publikacja nr 2] wskazują na złożony mechanizm zaburzeń układów pro- i antyoksydacyjnych, który ma miejsce w tej chorobie [Solmi et al. 2016, Fichter et al. 2017]. Metaanaliza 7 badań klinicznych, obejmująca 104 pacjentów z *anorexia nervosa* wykazała, że doustna dietoterapia ze znacznym zwiększeniem masy ciała w tej chorobie wprowadzie podwyższa poziom antyoksydacyjnych białek (albumin) i aktywność katalazy, ale towarzyszy im spadek stężeń/aktywności innych przeciwutleniaczy, tj. apolipoproteiny B i dysmutazy ponadtlenkowej [Solmi et al. 2016].

Podsumowując tę część analiz pacjentów ze skrajnie ciężką postacią *anorexia nervosa*, po raz pierwszy wykazałam, że hiperneuropeptydemia B nie zmienia się wraz z normalizacją masy ciała i poziomów we krwi waspiny oraz nie zależy od ogólnego stanu antyoksydacyjnego. Utrzymywanie się wysokich stężeń NPB we krwi, zarówno w grupie pacjentów ze skrajnie ciężką postacią choroby, jak i u tych samych osób po kilkunastu tygodniach hospitalizacji, w porównaniu do zdrowych rówieśników, sugeruje przewlekły stan neuroendokrynnych zaburzeń w omawianym schorzeniu. Obecność neurobiologicznych i psychicznych determinantów restrykcyjnego stylu odżywiania się pacjentek z *anorexia nervosa* wymusza potrzebę kompleksowej oceny przyczyn zachorowania i/lub utrzymywania się objawów choroby.

W celu poszerzenia wiedzy w tym zakresie, dzięki współpracy z Zakładem Stomatologii Zintegrowanej UMP, powstała praca dotycząca zastosowań nieinwazyjnie i bezboleśnie pobieranego materiału biologicznego w postaci śliny mieszanej (pochodzącej ze wszystkich gruczołów ślinowych) stymulowanej i spoczynkowej w diagnostyce i monitorowaniu *anorexia nervosa* u osób, u których średni czas trwania choroby wyniósł $11,5 \pm 5,6$ miesięcy [publikacja nr 3]. Bezproblemowa procedura zabezpieczenia próbek do analizy ogranicza lęk pacjenta, przez co zachęca do częstszych badań. Przyczynić się to może do wykrycia choroby na wczesnym etapie, a także usprawnienia monitorowania procesu terapii [Fontana et al. 2005]. Obecnie analizy śliny należą do rzadkości i stanowią niewielką część wykonywanych rutynowo oznaczeń (teoretycznie można ją używać w diagnozowaniu niektórych chorób infekcyjnych, nowotworowych, endokrynologicznych i kardiologicznych, a także do oceny poziomu ksenobiotyków, chociaż popularność stosowania w warunkach klinicznych – z różnych przyczyn – jest na razie niewielka). W skład śliny, oprócz wody i elektrolitów (Na, K, Mg, Ca, wodorowęglany i fosforany) wchodzi peptydy/białka (np. albuminy, transferryna, laktoferyna, ceruloplazmina, immunoglobuliny, mucyny, enzymy typu laktoperoksydaza, mieloperoksydaza, dysmutaza ponadtlenkowa, reduktaza glutationowa, kalikreina), tłuszcze (wolne kwasy tłuszczowe, cholesterol, lecytyna, fosfolipidy), niebiałkowe substancje azotowe (m.in. kwas moczowy, mocznik, aminokwasy) oraz inne molekuły (np. glukoza, leki i ich metabolity) [Malamud et Rodriguez-Chavez 2011]. Ponadto stwierdzono w ślinie obecność hormonów typu insulina czy kortyzol. Podkreśla się, iż w przypadku steroidowych związków hormonalnych, występujących w tym materiale biologicznym, w przeciwieństwie do osocza – dominują formy aktywne (niezwiązane ze specyficznymi białkami wiążącymi). Aktywne związki są odpowiedzialne za bezpośrednie działanie, zaś frakcje związane stanowią biologicznie nieaktywny rezerwuar. Szacuje się, że około 30% białek krwi występuje w ślinie, chociaż dane naukowe, które potwierdziłyby dokładny skład tego materiału biologicznego, są niepełne [Schulz et al. 2013].

Spoczynkowa i stymulowana (dzięki zastosowaniu 5-minutowego żucia gumy parafinowej – *CRT Paraffin, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*) ślina mieszana była pobierana od pacjentek z restrykcyjnym typem AN zgodnie z zaleceniami Fontany i wsp. [Fontany et al. 2005]. W celu minimalizacji wpływu czynników, które mogłyby oddziaływać na wydzielanie tego materiału biologicznego (m.in. wahań sezonowych i dobowych aktywności gruczołów ślinowych), pacjenci zostali przebadani o tej samej porze roku (jesień/zima) i dnia (w godzinach 9.00-11.00), z zachowaniem minimum 60-minutowego odstępu od przyjmowania posiłków/napojów oraz zakończenia procedur związanych z utrzymaniem higieny w obrębie jamy ustnej (typu szczotkowanie czy nitkowanie zębów). Ponieważ funkcjonowanie gruczołów ślinowych pozostaje pod ścisłą kontrolą autonomicznego układu nerwowego, nerwy przywspółczulne, dzięki acetylocholinie, stymulują produkcję płynu, natomiast współczulne (z udziałem noradrenaliny) indukują wytwarzanie peptydów/protein, a łańcuch reakcji, zaczynający się od wiązania α -adrenergicznych receptorów muskarynowych i β -adrenergicznych receptorów muskarynowych do błony komórkowej komórek wydzielniczych gruczołów ślinowych, przekazuje sygnał do produkcji i sekrecji wody, elektrolitów oraz innych składników śliny. Zaburzenia w przekaźnictwie sygnału

nerwowego lub nadmierny poziom noradrenaliny u pacjentek z *anorexia nervosa* może powodować ograniczenia w produkcji śliny i modyfikować jej skład (co stwierdzono w badaniach opisanych w publikacji nr 3) [Nunn et al. 2012].

W tej jednostce chorobowej często postępują patofizjologiczne objawy w obrębie układu stomatognatycznego. Między innymi obserwuje się zespół zaburzeń morfologiczno-czynnościowych tkanek miękkich i twardych w obrębie jamy ustnej oraz twarzoczaszki, biorących udział w żuciu, trawieniu i połykaniu, a więc pobieraniu pokarmu i wstępnej jego obróbce. Nie pozostaje to bez wpływu na dalsze restrykcje pokarmowe i utrzymywanie stanu niedożywienia, zwłaszcza, że stwierdzono nieprawidłową aktywność gruczołów ślinowych [publikacja nr 3] oraz enzymów trawiennych [Paradowska et al. 2010, Paszyńska et al. 2015]. Powyższe modyfikacje mogą prowadzić do przesuszenia, pęknięcia i zapalenia kąтового warg, co nakłada się na chemicznie i mechanicznie wywołane pourazowe zmiany w obrębie błony śluzowej. Nie bez znaczenia w tym zakresie są modyfikacje w *anorexia nervosa* stężeń niektórych białek w ślinie, ale wyniki badań przedstawione w literaturze tematu są niejednoznaczne [Romanos et al. 2012].

Głównym zadaniem postawionym w badaniach własnych było porównanie poziomów wskaźników w surowicy krwi i ślinie mieszanej pacjentów z restrykcyjnym typem *anorexia nervosa* oraz analiza wielkości jej produkcji, w porównaniu do zdrowych rówieśników. Po przebadaniu w sumie 120 próbek śliny mieszanej (w tym 60 spoczynkowej i 60 stymulowanej), pochodzących od osób w wieku $15,3 \pm 1,7$ lat, po raz pierwszy stwierdziłam obecność waspiny w ślinie człowieka (a dokładnie w populacji młodzieży żeńskiej z AN i bez choroby), czyli po około 2 latach od wykrycia tego białka w łzach [Pradeep et al. 2015] i po kilku latach od potwierdzenia występowania we krwi człowieka [Youn et al. 2008]. Jej stężenie kształtowało się na stosunkowo wysokim poziomie (w porównaniu do hormonów steroidowych) – przy czym wartość mediany w niestymulowanej ślinie mieszanej stanowiła około 52% wartości tego parametru w surowicy krwi pacjentów z restrykcyjnym typem AN i 25% w grupie kontrolnej (współczynniki precyzji wewnątrzserijnej analiz były podobne – niezależnie od rodzaju materiału biologicznego i wyniosły dla tego białka 3,5%, a międzyseryjnej: 6,0%, przy zakresie pomiarowym dla nierozcieńczonych próbek mieszczącym się w granicach: 4-4000 pg/mL) [publikacja nr 3, Youn et al. 2008]. Obecność stosunkowo wysokich poziomów waspiny w ślinie oraz wspomniane wcześniej - występowanie w niej insuliny i kalikrein [Malamud et Rodriguez-Chavez 2011], może sugerować miejscowe działanie ochronne w zabezpieczeniu homeostazy węglowodanowej. Nie wyklucza się także znaczenia antyoksydacyjnego i antyzapalnego tego białka w obrębie jamy ustnej (w ramach działania lokalnego). Zarówno w ślinie, jak i surowicy, przebadanych przeze mnie pacjentek z restrykcyjnym typem AN, wykazano podwyższenie stężeń waspiny oraz istnienie korelacji obserwowanych zmian w surowiczych poziomach tej adipocytokiny ze wskaźnikiem antropometrycznym (*Ideal Body Weight* [%], wg wzoru Lorentza) [publikacja nr 3, Nahler 2009], a dodatkowo inni badacze wykazali zmiany jej poziomu we krwi wraz z poprawą stanu pacjentów z *periodontitis* [Bozkurt et al. 2016].

Poziom TAS w ślinie stanowił około 59% wartości uzyskanych w surowicy krwi w przypadku pacjentek z *anorexia nervosa* i 65% w grupie kontrolnej (współczynniki precyzji wewnątrzseryjnej w przypadku analizowanych materiałów biologicznych kształtowały się średnio na poziomie 4,0%, zaś analogiczne współczynniki precyzji międzyseryjnej wynosiły średnio: 8,0% przy zakresie pomiarowym: 0,01-2,5 mmol/L). Stwierdzono ponadto obecność korelacji pomiędzy wartościami tego parametru w obu materiałach biologicznych. Dodatkowo, przeprowadzone analizy wskazały na występowanie znacznych zaburzeń w wydzielaniu śliny (redukcja o 50% produkcji śliny spoczynkowej i 24% w przypadku śliny stymulowanej) u osób z restrykcyjnym typem AN oraz wzrostu poziomu TAS w ślinie wraz z wyższą jej produkcją w warunkach niestymulowanych (występowanie dodatniej korelacji pomiędzy w/w parametrami). Analiza *Total Antioxidant Status* z zastosowaniem cząsteczki ABTS[•] w ślinie u pediatrycznych pacjentów poradni ortodontycznej bez próchnicy i stanów zapalnych wykazała stopniowy wzrost jego poziomu z wiekiem dzieci i czasem leczenia aparatem ortodontycznym [Guler et al. 2015]. Sugeruje to pośrednio ochronne działanie śliny, pod warunkiem jej prawidłowego składu [publikacja nr 3, Guler et al. 2015, Ginsburg et al. 2013]. Niskie poziomy statusu antyoksydacyjnego w organizmie (w tym w ślinie) są niebezpieczne w warunkach nadwyżki produkcji reaktywnych form tlenu i azotu, z współwystępującym deficytem w poziomie przeciwutleniaczy (w tym dostarczanych z pokarmem). W warunkach klinicznych może to przejawiać się jako dysfunkcja w przekazywaniu sygnałów komórkowych i zwiększać zagrożenie wystąpienia dodatkowych nieprawidłowości w funkcjonowaniu różnych układów [publikacja nr 3, Ginsburg et al. 2013].

Analizy krzywych ROC wykazały, iż badania *Total Antioxidant Status* w ślinie jako predyktora formy restrykcyjnej *anorexia nervosa*, charakteryzują się wyższą czułością i swoistością, w porównaniu do tego parametru w surowicy krwi. Badania potwierdziły przydatność wykorzystania tego nieinwazyjnego materiału biologicznego w diagnostyce i monitorowaniu pacjentów z omawianą formą AN [publikacja nr 3]. Wyniki badań mogą być ważne nie tylko dla lekarzy medycyny, ale także lekarzy stomatologii czy diagnostów laboratoryjnych i dietetyków. Zwłaszcza tych spośród personelu medycznego, którzy mają bezpośredni kontakt z pacjentami niedożywionymi w okresie dorastania (a tym samym mogą prowadzić badania przesiewowe w kierunku chorób związanych z nieprawidłowościami stanu odżywienia). Jest to szczególnie istotne, ponieważ chorzy na *anorexia nervosa* należą do „trudnej” populacji, m.in. z powodu zaprzeczania istnienia jakichkolwiek zaburzeń. Nieinwazyjne pobieranie materiału do badań jest więc podwójnie ważne u tych pacjentów ze względu na znaczny stopień wyniszczenia w przebiegu schorzenia oraz specyfikę chorych, wymagających ostrożnego traktowania, by nie doszło do przerwania terapii. Wielokrotnie podkreśla się rolę zdrowia jamy ustnej i jej wpływ na stan ogólny organizmu, także na status psychiczny. Wyniki badań przedstawionych w publikacji nr 3 sugerują, że sytuacja odwrotna powinna być także uwzględniana, tzn. nieprawidłowości natury psychiatrycznej – działające niekorzystnie na stan jamy ustnej, nasilać mogą problemy z przyjmowaniem pokarmów, a tym samym pogłębiać niekorzystny status odżywienia. Ciągłe poszerzająca się wiedza na ten temat pozwala przypuszczać, że już niedługo badania śliny staną

się bardziej rozpowszechnione, zwłaszcza w diagnostyce dzieci i młodzieży oraz osób niedożywionych w różnym wieku.

Zmiany poziomów wapnia we krwi najczęściej obserwowano dotąd w przypadku populacji z nadmiarem tkanki tłuszczowej, chociaż wyniki w tym zakresie nie są jednoznaczne [Körner et al. 2011, Saboori et al. 2013]. Paradoksalnie, niedożywienie jakościowe często utrzymuje się u osób otyłych i z zaburzeniami metabolicznymi (a w populacji po 65 roku życia może także współwystępować z niedoborem tkanki mięśniowej, prowadząc do otyłości sarkopenicznej, a niekiedy nawet w połączeniu z nieprawidłowościami w obrębie tkanki kostnej – objawiających się zespołem osteosarkopenicznej otyłości) [Lee et al. 2016, JafariNasabian et al. 2017]. Wynika to z faktu, iż wysokokaloryczny, zachodni model żywienia coraz popularniejszy w Europie, nie obfituje w adekwatną wartość odżywczą (w związku z niską tzw. gęstością odżywczą pokarmów), powodując tym samym niedobory pokarmowe i zaburzenia homeostazy. Dodatkowo nadmiar tkanki tłuszczowej podwyższa stan zapalny w organizmie, a tym samym zapotrzebowanie na niektóre związki, w tym antyoksydacyjne składniki diety, czego nie uwzględniają nawet aktualnie obowiązujące normy zapotrzebowania [Jarosz et al. 2017a, Wojtasik et al. 2017].

Dodatkowe badania biochemiczne i żywieniowe (wykonane w grupie osób dorosłych z *BMI* powyżej 30 kg/m², opisanej w publikacji nr 4), z wykorzystaniem metod retrospektywnych (szczegółowy wywiad żywieniowy, uwzględniający m.in. częstość spożycia wybranych grup pokarmów) i prospektywnych (analiza 3-dniowego dzienniczka żywieniowego, w tym jednego z dnia świątecznego, z użyciem komputerowych programów dietetycznych), przeprowadzone w populacjach pacjentów otyłych z i bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz dobranej wiekowo i pod względem płci grupy kontrolnej, wykazały powszechność występowania niedożywienia jakościowego u osób otyłych. Dane z wypełnionych dzienniczków żywieniowych (obejmujących w sumie 192 jadłospisy w całej badanej populacji), przygotowane na podstawie *Albumu fotografii produktów i potraw* Instytutu Żywności i Żywienia w Warszawie [Szponar et al. 2000] oraz w oparciu o przykładowe jadłospisy, po przeszkoleniu respondentów, przeanalizowane zostały z zastosowaniem programu dietetycznego, w celu indywidualnej oceny stopnia realizacji zapotrzebowania na energię oraz poszczególne składniki odżywcze w diecie (w sumie kilkadziesiąt parametrów) [Jarosz et al. 2017a, Wojtasik et al. 2017]. Dodatkowe analizy wykazały, że grupa badana z otyłością charakteryzowała się obniżonym całkowitym stężeniem 25-hydroksyergokalcysterolu i 25-hydroksycholekalcyferolu ocenionym metodą elektrochemiluminescencyjną na immunoanalyzerze cobas e (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), tzn. uzyskano wartości stężeń we krwi poniżej 30 ng/mL [Płudowski et al. 2018], a także wyróżniała się niższą od zapotrzebowania (dostosowanego do wieku i płci) podażą z dietą tej witaminy i wapnia [Płudowski et al. 2018, Jarosz et al. 2017a, Wojtasik et al. 2017]. Ponadto 70% przebadanej populacji z otyłością przyjmowało za małe ilości magnezu, a co trzecia osoba - niższą niż zalecane dawki witaminy E i cynku (kluczowych antyoksydantów) w codziennych racjach pokarmowych [Jarosz et al. 2017a, Wojtasik et al. 2017]. Analizy żywieniowe wykazały liczne błędy dietetyczne, zwłaszcza wśród otyłych pacjentów, polegające przede wszystkim na

wielokrotnym przechodzeniu na tzw. diety redukcyjne (ponad 50% przyznało się do takich praktyk, najczęściej bez kontroli specjalisty), nieregularności spożywania posiłków, powszechnym podjadaniu niezdrowych przekąsek, nadużywaniu kwasów tłuszczowych o konfiguracji *trans* oraz mono- i disacharydów, a także niewystarczającej konsumpcji ryb i warzyw, a tym samym ważnych źródeł antyoksydantów (dane przygotowane do publikacji).

Szczególną grupą osób otyłych są pacjenci z insulinoopornością, których niski status wrażliwości tkanek na działanie insuliny powoduje swoisty stan restrykcji w dostarczeniu składników pokarmowych do poszczególnych komórek. Biorąc powyższe pod uwagę głównym celem badań przedstawionych w publikacji nr 4 była identyfikacja i ocena zależności pomiędzy parametrami antropometrycznymi i wskaźnikami insulinooporności oraz insulinowrażliwością tkanek a stężeniem wazpiny, omentyny, profilem lipidowym, glikemią i insulinemią u osób w wieku 30-60 lat. Dzięki współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego UMP, a także Katedrą Leczenia Otyłości, Zaburzeń Metabolicznych i Dietetyki Klinicznej UMP do badania włączono populację pacjentów z otyłością prostą, w której wyodrębniono dwie podgrupy – z prawidłową tolerancją glukozy (*normal glucose tolerance*, NGT) oraz z zaburzoną tolerancją glukozy (*abnormal glucose tolerance*, AGT, nie poddanych jeszcze leczeniu doustnymi lekami hipoglikemizującymi czy insuliną). Otrzymane dane porównano do grupy kontrolnej dobranej pod względem płci i wieku, charakteryzującej się prawidłową masą ciała (wg *BMI*) i normoglikemią. U osób otyłych został ponadto wykonany doustny test tolerancji glukozy (*oral glucose tolerance test*, OGTT) [publikacja nr 4].

W grupie badanej i kontrolnej przeprowadzono analizy antropometryczne (uwzględniające ocenę rozmiarów i składu ciała, a także biochemiczne (ocena stężenia wazpiny, omentyny, profilu lipidowego, glikemii i insulinemii). Określono ponadto stopień insulinooporności tkanek wykorzystując *homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)*, *insulin sensitivity index (ISI_{basal})*, *insulin sensitivity index for glycaemia, QUICKI - quantitative insulin sensitivity check index (ISI_{gly})*, *the triglycerides x glucose index (TYG)*, a także *visceral adiposity index (VAI)* [Matthews et al. 1985, Lorenzo et al. 2010, Belfiore et al. 1998, Petta et al. 2011, Liu et al. 2016]. Współczynniki precyzji wewnątrzseryjnej wyniosły dla wazpiny 12,4%, a międzyseryjnej 13,6%, zaś parametry te w przypadku analiz omentyny kształtowały się odpowiednio: 11,0% i 12,1% - stosując rozcieńczony materiał biologiczny, przy zakresie pomiarowym bez rozcieńczeń na poziomie 0,012-1 ng/mL oraz 0,5-64 ng/mL, odpowiednio dla obu białek. W badaniach antropometrycznych uwzględniono pomiary wysokości i masy ciała, obwodów talii oraz bioder, a także ocenę składu ciała (analizy beztłuszczowej masy ciała, masy tkanki tłuszczowej i wody oraz procentowej zawartości tkanki tłuszczowej i tkanki tłuszczowej wisceralnej w organizmie) przy pomocy analizatora BODYSTAT 1500 firmy Bodystat Ltd. (Isle of Man, United Kingdom), opartego o metodę bioimpedancji. Wszystkie osoby z grupy badanej cechowała otyłość (wartości *Body Mass Index* powyżej 30 kg/m², *Waist to Hip Ratio (WHR)* > 1,00 u mężczyzn i > 0,80 u kobiet). Obwody talii i wartości WHR w grupie tej wskazały na istnienie otyłości wisceralnej. Wartości glikemii na czczo różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a osobami z otyłością i normoglikemią oraz populacją otyłą z zaburzoną tolerancją glukozy [publikacja nr 4].

Aktywności/stężenia we krwi insuliny, glukozy i trójglicerydów na czczo oraz wybrane pomiary antropometryczne zostały wykorzystane do oceny insulinooporności w tkankach według wzorów: $HOMA-IR = \text{glikemia na czczo (mmol/L)} - \text{insulina na czczo (mU/L)} / 22,5$ [Matthews et al. 1985], $ISI_{basal} = 10^4 / [\text{insulina na czczo (mU/mL)} - \text{glikemia na czczo (mg/dL)}]$, $ISI_{gly} = 2 / [(\text{insulinemia na czczo (mU/mL)} / 12 \times (\text{glikemia na czczo (mg/dL)} / 100) + 1]$ [Lorenzo et al. 2010, Belfiore et al. 1998], $Quicki = 1 / [\log (\text{insulina na czczo (mU/mL)}) + \log (\text{glikemia na czczo (mg/dL)})]$ [Lorenzo et al. 2010], $TyG = \text{Ln} [\text{triglicerydemia na czczo (mg/dL)} - \text{glikemia na czczo (mg/dL)} / 2]$ [Petta et al. 2011] i $VAI_{male} = \text{obwód w talii (cm)} / 39,68 + (1,88 \times BMI (\text{kg/m}^2)) \times (\text{triglicerydemia (mmol/L)} - \text{insulinemia (mmol/L)} / 1,03) \times [1,31 / HDL (\text{mmol/L})]$ w przypadku mężczyzn, a dla populacji żeńskiej: $VAI_{female} = \text{obwód talii (cm)} / 39,58 + [1,89 \times BMI (\text{kg/m}^2)] \times (\text{triglicerydemia na czczo (mmol/L)} / 0,81) \times [1,52 / HDL (\text{mmol/L})]$ [Liu et al. 2016].

Do oceny przydatności badań, czułości oraz specyficzności nowych parametrów jako wczesnych predyktorów insulinooporności, zastosowałam analizy krzywych ROC dla zaproponowanych przeze mnie wskaźników $waspina/HOMA-IR$ i $omentyna/HOMA-IR$, weryfikując pole pod krzywą ROC. Mediany wartości wskaźnika, określającego stosunek stężenia badanej adipocytokiny do stopnia insulinooporności tkanek, tj. $omentyna/HOMA-IR$, okazały się istotnie statystycznie różne, konfrontując grupę badaną i kontrolną, a także po porównaniu podgrup NGT vs. AGT, natomiast takich zależności nie zaobserwowałam w przypadku wskaźnika $waspina/HOMA-IR$. Dodatkowo w całej badanej populacji występowała ujemna korelacja pomiędzy stężeniem omentyny w surowicy a wynikami pomiarów ciśnienia skurczowego krwi. Wartości wskaźnika $omentyna/HOMA-IR$ istotnie korelowały z wynikami większości parametrów antropometrycznych, wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, stężeniami trójglicerydów i HDL cholesterolu. W przypadku wskaźnika $waspina/HOMA-IR$ wyniki wskazały na obecność jedynie dodatniej korelacji pomiędzy jego wartością a stężeniem HDL cholesterolu [publikacja nr 4].

Model regresji wielokrotnej wykazał znaczący wpływ poziomów cholesterolu klasy HDL i beztłuszczowej masy ciała [%] na zmienność wskaźnika $omentyna/HOMA-IR$ u całej badanej populacji (obejmującej zarówno osoby otyłe, jak i z prawidłową masą ciała; $p < 0,0000001$, $R^2_{adj} = 46\%$). Do opisu tego zjawiska bardziej precyzyjnie, jako dodatkowa zmienna została uwzględniona w modelu wartość skurczowego ciśnienia krwi. Dodanie tego parametru do zaproponowanego wielowymiarowego modelu pozwoliło nieco lepiej wyjaśnić zmienność we wskaźniku $omentyna/HOMA-IR$ (wzrost R^2_{adj} do 48%), $p < 0,0000001$). W przypadku drugiego parametru - wskaźnika $waspina/HOMA-IR$, analiza z zastosowaniem tego samego modelu wielowymiarowego (obejmującego kluczowe parametry dla zespołu metabolicznego), wykazała brak wpływu poziomu HDL cholesterolu, beztłuszczowej masy ciała [%] oraz wartości skurczowego ciśnienia krwi na jego zmienność [publikacja nr 4].

Przeprowadzone do tej pory badania sugerują, że omentyna i waspina reprezentują adipocytokiny przejawiające potencjalnie ochronne działanie przeciw zaburzeniom metabolicznym związanym z otyłością, w szczególności nieprawidłowościami łączącymi się z typem trzewnym tej choroby i insulinoopornością [von Loeffelholz et al. 2010, Li et al. 2014b].

Wcześniej wykazano, iż molekuly te charakteryzują się działaniem insulinomimetycznym, ale wraz z nadmiarem masy tkanki tłuszczowej działanie waspiny staje się ograniczone, prawdopodobnie z powodu narastania waspinooporności [Moradi et al. 2016, Escoté et al. 2017]. W przypadku omentyny podkreśla się specyficzną rolę w zwiększaniu wykorzystania dokomórkowego transportu glukozy. Ponadto pośrednio udowodniono, że białko to zwiększa produkcję tlenku azotu w osoczu i stymuluje angiogenezę, a tym samym ogranicza stan niedoboru składników pokarmowych w poszczególnych komórkach. Wykazuje ono także działanie przeciwzapalne, ograniczając sekrecję cząsteczek adhezji komórkowej i migrację miocytów gładkich do ściany naczyń krwionośnych [Escoté et al. 2017].

Głównym wnioskiem, płynącym z tego etapu badań, jest wyższa przydatność pomiarów stężeń omentyny, w porównaniu z waspiną, jako predyktora nasilających się zaburzeń metabolicznych (w tym pośrednio narastania niedożywienia jakościowego) w populacji osób otyłych.

Kolejną chorobą dietozależną przebiegającą ze specyficznymi niedoborami (deficytami insuliny i funkcjonalnie dostępnej glukozy w komórkach), o nie w pełni poznanej etiopatogenezie, jest cukrzyca typu 1 (T1DM). Oprócz czynników immunologicznych istnieją przesłanki potwierdzające wpływ nieprawidłowych zachowań żywieniowych (DES - Diabetes Eating Disorder) [Eilanden et al. 2017] oraz roli ośrodkowego układu nerwowego, tkanki tłuszczowej i kostnej w rozwoju i przebiegu tej choroby [Tsentedis et al. 2013, Oury et al. 2013, Neumann et al. 2016]. Tkanki te pełnią funkcje endokryne, polegające na wydzielaniu cząsteczek (m.in. leptyny, adiponektyny, osteokalcyny, liganda receptora dla aktywatora czynnika jądrowego κ B), modyfikujących metabolizm węglowodanów i/lub regulujących ośrodki głodu i sytości [Neve et al. 2011, Starup-Linde 2013, Harris 2014, Matsuda et Shimomura 2014]. Z danych literaturowych wynika, że analizy stężeń NPB i NPW u pacjentów diabetologicznych zostały wykonane po raz pierwszy [publikacja nr 5]. Celem pracy było określenie zależności pomiędzy poziomami we krwi tych neuropeptydów a wskaźnikami stanu odżywienia, statusem antyoksydacyjnym oraz wybranymi surowiczymi cząsteczkami wytwarzanymi przez tkankę tłuszczową (leptyną, adiponektyną) i kostną (osteokalcyną, wolną postacią rozpuszczalnego liganda receptora dla aktywatora czynnika jądrowego κ B - free sRANKL) u pediatrycznych pacjentów z T1DM, stosujących peny lub pompy insulinowe. Z analiz literaturowych wynika, że NPW i NPB wykazują ekspresję w obrębie komórek β trzustki [Tokenoya et al. 2015]. Istnieją przesłanki łączące NPW z lokalnym zwiększeniem wydzielania insuliny, wynikającym ze wzrostu poziomu jonów Ca^{2+} w cytozolu komórek β trzustki u zwierząt doświadczalnych. W przypadku wysokich stężeń glukozy stopień modyfikacji sekrecji tego hormonu zależał od stężenia zastosowanego neuropeptydu, natomiast nie obserwowano zmian przy niskim poziomie tej heksozy lub po zastosowaniu specyficznego blokera kanału wapniowego (*an L-type Ca^{2+}*) [Dezaki et al. 2008].

Jak już wspomniano, w tkance tłuszczowej syntetyzowanych jest wiele biologicznie czynnych cząsteczek, m.in. leptyna i adiponektyna [Harris 2014, Matsuda et al. 2014]. Pierwsza z nich, oprócz adipocytów, jest wydzielana także m.in. przez tkankę mięśniową, komórki żołądka i układu nerwowego, a do stymulantów sekrecji leptyny należą: insulina i glikokortykosteroidy.

Omawiana adipocytokina należy do cząsteczek o plejotropowym działaniu. Oprócz funkcji w ograniczaniu łaknienia (głównie przez hamowanie syntezy podwzgórzowego neuropeptydu Y), zwiększa wydatkowanie energii, wpływając na homeostazę gospodarki węglowodanowej i lipidowej [Harris 2014]. Redukcja wydzielania insuliny wiąże się m.in. z oddziaływaniem leptyny na ATP wrażliwe kanały potasowe w komórkach β trzustki, poprzez wpływ na AMPK (*AMP-activated protein kinase*) i PK (*cAMP-dependent protein kinase*), a także depolaryzację aktywnych F [Chen et al. 2013]. Przy zastosowaniu mysiego modelu *in vivo* wykazano, iż wyłączenie genu receptora dla leptyny (*leptin receptor knockout mouse*) częściowo normalizuje wydzielanie insuliny zależne od glukozy, ale tylko u młodych osobników płci żeńskiej [Soedling et al. 2015]. W aspekcie etiopatogenezy T1DM wydaje się także istotny wpływ tej adipocytokiny na stymulację produkcji cytokin prozapalnych [Bernotiene et al. 2006].

Metabolizm glukozy, ale także centralna kontrola łaknienia i regulacja energetyczna organizmu zależy m.in. od adiponektyny. Ta adipocytokina modyfikuje aktywność AMPK, PKB (*protein kinase B*), ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), profil p38 (*mitogen-activated protein kinase*), cAMP (*3',5'-cyclic adenosine monophosphate*) oraz generację ROS (*reactive oxygen species*). Adiponektyna hamuje ponadto działanie NF κ B (*nuclear factor κ B*). Wzrost stężenia tej adipocytokiny stwierdzono w chorobach przebiegających ze spadkiem masy ciała (*anorexia nervosa*, niewydolność nerek), natomiast u osób z otyłością, wysokie jej stężenia wiązały się z obniżonymi poziomami glikemii we krwi [Khalil et Hachem 2014].

Syntetyzowana przez dojrzałe osteoblasty oraz osteocyty osteokalcyna, należąca do białek niekolagenowych, do tej pory kojarzona była głównie z regulacją obrotu kostnego, w tym mineralizacją kości [Neve et al. 2011], przy czym karbonylowana forma tej cząsteczki w kwaśnym środowisku jest przekształcana do aktywnej postaci (*undercarbonylated osteocalcin*). Jej powiązania z gospodarką węglowodanową są często pomijane, pomimo, że insulina poprzez sprzyjanie resorpcji kości, w pętli sprzężenia zwrotnego promuje aktywację omawianej cząsteczki, co zwrótnie napędza syntezę i wydzielanie tego hormonu. Podawana dootrzewnowo osteokalcyna stymuluje uwalnianie insuliny i proliferację komórek β trzustki u zwierząt laboratoryjnych. Pobudza także komórki obwodowe do pobierania glukozy [Ferron et al. 2008], zwiększa wydatkowanie energii bez wpływu na aktywność zwierząt oraz poprawia tolerancję glukozy i reguluje insulinowrażliwość, także w przypadku osobników karmionych dietą wysokotłuszczową [Ferron et al. 2012]. Poziom osteokalcyny we krwi zmienia się po przyjęciu pożywienia [Motyl et al. 2010]. Wiadomo, że gryzonie z wyłączonym genem dla osteokalcyny charakteryzują się zaburzeniem gospodarki węglowodanowej oraz problemami z płodnością w przypadku płci męskiej [Ferron et al. 2010]. Podobne nieprawidłowości stwierdzono u mężczyzn będących heterozygotami z mutacją w domenie transbłonowej receptora dla osteokalcyny (GPCR6A) [Oury et al. 2013].

Z kolei, RANKL należy do rodziny białek czynnika martwicy nowotworów, które występują w organizmie w postaci trzech izoform, przy czym RANKL3 tworzy formę rozpuszczalną (sRANKL) tej proteiny [Ikeda et al. 2003]. Jego poziom badano głównie w aspekcie gospodarki kostnej, ale wyniki analiz wskazują także na zaburzenia sekrecji RANKL w T1DM [Motiur et al.

2015, Starup-Linde 2013]. Brak jest jednak danych literaturowych w zakresie powiązań wolnej postaci tego związku (free sRANKL) z gospodarką węglowodanową w przypadku wskazanej choroby. Wiadomo zaś, że remodelowanie kości ściśle zależy od insuliny i innych czynników endokrynnych, w tym cząsteczek wydzielanych przez adipocyty. RANKL jest wytwarzany przez dojrzałe osteoblasty i ich prekursory, ale także fibroblasty, komórki zrębu szpiku kostnego oraz aktywne limfocyty T, a jego główną rolą pozostaje aktywacja osteoklastogenezy i hamowanie apoptozy osteoklastów [Motiur et al. 2015]. Z zastosowaniem zwierzęcego modelu doświadczalnego wykazano, że wyłączenie genu kodującego RANKL prowadzi nie tylko do zaburzeń w obrębie układu kostnego, ale także upośledza różnicowanie limfocytów T. Cytokiny prozapalne, takie jak TNF- α i IL-1, pobudzają komórki kościotwórcze i zwiększają ekspresję genu *RANKL*, co skutkuje zaburzeniami metabolizmu kości [Starup-Linde 2013]. Badania stężeń we krwi całkowitej puli rozpuszczalnej formy RANKL wskazują, iż jest ona predyktorem zaburzeń kościotworzenia u chorych z T1DM, zarówno w przypadku populacji pediatrycznych, jak i osób dorosłych [Tsentedis et al. 2013].

We współpracy z Polsko-Amerykańskim Instytutem Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz przy udziale *Biomedical Sciences Research Intitute z Ulster University* kompleksowo przebadano populację 110 dzieci i młodzieży, z której po uwzględnieniu ścisłych kryteriów wyłączenia z badań wyodrębniono grupę 83 osób, w tym 58 z cukrzycą typu 1 (T1DM) i 25 zdrowych rówieśników. Wśród przebadanych osób 53% pacjentów stosowało insulinę podawaną metodą wielokrotnych wstrzyknięć za pomocą penów (T1DM pens), zaś pozostali – leczeni byli z zastosowaniem osobistych pomp insulinowych (T1DM pumps). W całej populacji wykonano badania biochemiczne krwi metodami: immunoenzymatycznymi (NPB, NPW, leptyny, adiponektyny, osteokalcyny, free sRANKL) i spektrofotometryczną (TAS) oraz analizy antropometryczne, w celu oceny wskaźników: *Body Mass Index*, *Body Mass Index z-score (BMI z-score)*, wskaźnika Cole'a i *Body Mass Index-for-age percentile*. W przypadku T1DM dodatkowo zastosowano wysokorozdzielczą chromatografię cieczową HPL do pomiarów poziomów hemoglobiny glikowanej A1c (HbA1c [%]). Wyniki poddano analizom statystycznym z zastosowaniem porównań średnich/median oraz odchyłeń standardowych, analiz korelacji, a także zaawansowanych obliczeń matematycznych - regresji wielokrotnej oraz porównań krzywych ROC [publikacja nr 5].

W grupie T1DM poziomy badanych neuropeptydów, leptyny i TAS w surowicy krwi były niższe, natomiast adiponektyny wyższe, w porównaniu z grupą kontrolną, przy zbliżonych wartościach stężeń osteokalcyny i free sRANKL w całej populacji. Ponadto w przypadku T1DM stwierdzono niższe wartości masy ciała, *BMI*, *BMI z-score* oraz *Body Mass Index-for-age percentile* niż w grupie kontrolnej. Oprócz stwierdzonej istotnej dodatniej korelacji pomiędzy stężeniami leptyny w surowicy krwi a wartościami *BMI*, *BMI z-score* wykazano również specyficzne powiązania leptynemii vs. osteokalcynemii we wszystkich przebadanych grupach. Interesujące okazały się ponadto wyniki wskazujące na dodatnią korelację surowiczych poziomów NPB vs. leptyny oraz NPB vs. wartości wskaźników antropometrycznych (zwłaszcza w populacji męskiej). Zaobserwowano także specyficzne powiązania pomiędzy stężeniami

NPB vs. NPW we wszystkich przebadanych grupach, tj. T1DM, kontrolnej, całej populacji żeńskiej i całej populacji męskiej. Grupa pacjentów stosujących pompy insulinowe wyróżniała się korzystniejszym profilem HbA1c [%] w porównaniu do populacji z grupy T1DM stosującej peny. Ponadto, pacjenci używający pomp insulinowych charakteryzowali się stężeniami NPW zbliżonymi do obserwowanych w grupie kontrolnej zaś osoby prowadzone z użyciem wielokrotnych wstrzyknięć insuliny za pomocą penów wykazywali niższe poziomy NPB i NPB (czyli hiponeuropeptydemię W i hiponeuropeptydemię B). Analiza regresji wielokrotnej wykazała, iż w grupie T1DM pens, ale nie w przypadku T1DM pumps czy grupy kontrolnej, wartości indeksu Cole'a i TAS (oprócz znaczącej roli parametru NPB) wpływały na stężenie NPW. Analiza porównawcza krzywych ROC wskazała, iż stężenia we krwi NPB, NPW, leptyny i adiponektyny są dobrymi wskaźnikami predykcyjnymi dla T1DM, co nie dotyczyło osteokalcyny i free sRANKL [publikacja nr 5].

Uzyskane rezultaty częściowo potwierdziły wyniki badań otrzymanych w modelach zwierzęcych, w których wykazano rolę NPB i NPW w modulacji gospodarki węglowodanowej i energetycznej organizmu. Stwierdzono w nich, że podskórne iniekcje NPB podwyższały stężenia glukozy we krwi i obniżały insulinemię [Ruciński et al. 2007]. Ponadto badania *in vitro* wskazały potencjalny mechanizm działania NPW w aspekcie lokalnej sekrecji insuliny przez komórki β trzustki w przypadku hiperglikemii (ale nie normoglikemii) [Dezakia et al. 2008]. Dodatkowo otrzymane w badaniach własnych wyniki świadczą o powiązaniu niskich poziomów NPB i NPW z obniżonym statusem odżywienia w T1DM względem rówieśników [publikacja nr 5]. Jedyne analizy dostępne w tym zakresie, jak dotąd, zostały przeprowadzone na modelach zwierzęcych. Wskazują one na wpływ podawanej dożołądkowo glukozy (ale nie tłuszczu) na zwiększenie poziomu ekspresji mRNA dla genu *Npw* w komórkach mięśni żołądka u myszy płci żeńskiej [Li et al. 2014a]. Dodatkowo, wykazano że długotrwałe (trwające do 12 tygodni) przekarmianie wysokotłuszczową dietą w przypadku modeli zwierzęcych z użyciem samic, nie zmieniało poziomu ekspresji genu dla tego neuropeptydu, zaś krótkotrwałe głodzenie (do 17h) obniżało ten parametr [Li et al. 2013]. Stwierdzenie występowania dodatniej korelacji pomiędzy poziomami NPB i leptyny w przypadku przebadanej populacji męskiej oraz braku takich zależności w grupie żeńskiej, wskazuje na znaczenie płci w powiązaniach ww. cząsteczek [publikacja nr 5]. Wyniki te korespondują z rezultatami uzyskanymi w badaniach doświadczalnych [Ishii et al. 2003]. Udowodniono bowiem, że wprowadzie szczury obu płci NPW-knockout charakteryzowały się brakiem różnic w poziomie przyjmowanego pokarmu [Motoike et al. 2016], ale w przypadku tylko zwierząt płci męskiej NPW-knockout rozwijała się otyłość [Ishii et al. 2003]. Powiązania pomiędzy stężeniami leptyny i NPB (ale nie NPW) może pośrednio potwierdzać większe znaczenie NPB niż NPW w kontroli stanu odżywienia zależnego od szlaku leptyny [publikacja nr 5], co sugerowały wyniki badania przeprowadzonego na modelu zwierzęcym [Skrzypski et al. 2012]. Warto dodać, iż metaanaliza obejmująca 88 subpopulacji z cukrzycą typu 1 wykazała znacznie niższą śmiertelność w populacji męskiej niż żeńskiej, przy czym przyczyny obserwowanych różnic nie zostały jak dotąd wyjaśnione [Lung 2014].

Stwierdzenie wysokiej ekspresji genów dla NPB i NPW oraz ich receptorów w skupiskach

ciał komórek ośrodkowego układu nerwowego związanych z regulacją bilansu energetycznego oraz zmiany poboru pożywienia po wprowadzeniu tych neuropeptydów do komórek mózgowych gryzoni, wskazują na ich specyficzne działanie w zakresie kontroli łaknienia i/lub sytości [Ruciński et al. 2007, Takenoya et al. 2015]. Zwłaszcza, że udowodniono hamujący wpływ NPW na aktywność nerwu błędnego w badaniach *in vitro* [Li et al. 2015]. Dodatkowo stwierdzono, że poziom ekspresji mRNA dla tego neuropeptydu zmienia się wraz z wiekiem, ale nie zależy od płci zwierząt doświadczalnych [Li et al. 2015]. Wyniki przedstawionych badań ukazują kolejne szlaki metaboliczne o potencjalnej roli w utrzymaniu bilansu energetycznego i kontroli gospodarki węglowodanowej oraz wskazują nowe kierunki poszukiwań w tym aspekcie.

W analizach własnych stwierdzono brak zależności pomiędzy stężeniami free sRANKL i badanymi parametrami antropometrycznymi oraz biochemicznymi u pacjentów z T1DM i w grupie kontrolnej [publikacja nr 5]. W myśl „hipotezy wolnych hormonów”, tylko cząsteczki niezwiązane z białkami osocza mogą swobodnie migrować przez błony komórkowe i oddziaływać metabolicznie, dlatego wyniki stężeń wolnej postaci RANKL (free sRANKL), niezwiązanej z osteoprotegeryną, wydają się być niezależne od poziomu białek transportowych osocza. Podobne rezultaty do autorskich przedstawił Loureiro et al., w których stwierdzono porównywalne poziomy we krwi całkowitej frakcji sRANKL (łącznie puli rozpuszczalnej: wolnej i związanej z osteoprotegeryną) u pacjentów z cukrzycą typu 1 i w grupie kontrolnej, natomiast stężenie rozpuszczalnej formy jego antagonisty (s-osteoprotegeryny) obniżało się, co stymulowało zwiększoną resorpcję kości. Także ekspresja genu *RANKL* w leukocytach krwi obwodowej była porównywalna w grupach dzieci i młodzieży z dobrze i słabo wyrównaną cukrzycą typu 1 (wg poziomu HbA1c) oraz kontrolną [Loureiro et al. 2014]. Z kolei systematyczny przegląd literatury tematu, przeprowadzony przez *Starup-Linde* wskazał na powiązania stężeń całkowitej puli rozpuszczalnej formy RANKL we krwi z zaburzeniami w gospodarce węglowodanowej (hamowanie sekrecji w przypadku hiperglikemii oraz obecność korelacji pomiędzy stężeniami RANKL a leptyną, adiponektyną, wskaźnikami stanu oksydacyjnego oraz stężeniem insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 u pacjentów z cukrzycą typu 1) [Starup-Linde 2013]. Brakuje danych na temat powiązań surowiczych stężeń free sRANKL z aktywnością endokrynną tkanki tłuszczowej czy statusem odżywienia u pacjentów z tą chorobą.

Obniżenie poziomu statusu antyoksydacyjnego w przypadku przebadanych pacjentów z T1DM sugeruje przewagę procesów prooksydacyjnych nad antyoksydacyjnymi [publikacja nr 5]. Podobne zależności stwierdzono w badaniach przeprowadzonych wcześniej u pacjentów z cukrzycą typu 1 (niższe wartości o 31%) oraz ich rodzeństwa (26%), w porównaniu ze zdrowymi rówieśnikami bez przypadków tej choroby w rodzinie [Salmonowicz et al. 2014]. Wskazuje to na znaczenie genetycznego patomechanizmu występowania niższych poziomów antyoksydantów u osób predysponowanych do cukrzycy typu 1 i sugeruje udział stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie choroby [publikacja nr 5]. Zwłaszcza, że wykazano brak korelacji pomiędzy poziomem TAS i czasem trwania choroby oraz wartościami HbA1c [%] w badaniach własnych [publikacja nr 5] oraz analizach *Salmonowicz et al.* [Salmonowicz et al. 2014], a także stwierdzono, że stres oksydacyjny prowadzi do zmian aktywności kanałów potasowych

(adenosine-5'-triphosphate channel), a tym samym funkcji komórek β trzustki [Drews et al. 2010]. Z uwagi na powyższe, oznaczanie poziomu TAS we krwi wydaje się być cennym narzędziem rokowniczym u osób z grupy ryzyka wystąpienia T1DM [Gehrmann et al. 2010, Drews et al. 2010].

Dodatkowo w przypadku przebadanych chorych z T1DM nie stwierdzono zależności otrzymanych wartości całkowitego statusu antyoksydacyjnego od stężeń leptyny, zaś wykazano obecność takich powiązań w grupie kontrolnej. Sugeruje to istnienie modyfikacji w poziomie wskaźnika przedstawiającego stosunek prooksydantów względem przeciwutleniaczy, przy zaburzeniach w gospodarce węglowodanowej, przebiegających z niedoborem leptyny [publikacja nr 5]. W badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym obserwowano bowiem obniżenie poziomu w surowicy krwi *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (a tym samym statusu peroksydacji lipidów) oraz normalizację glikemii i insulinemii po podaniu leptyny u myszy *ob/ob*. Poszerzenie analiz o badania genetyczne wykazało, iż adipocytokina ta zmieniała ekspresję 1276 genów, w tym 86 zaangażowanych w stres oksydacyjny, procesy immunologiczne i zapalne [Sainz et al. 2010].

W ostatnim czasie podkreśla się znaczenie problemu występowania nieprawidłowej masy ciała u pacjentów z cukrzycą typu 1 oraz konsekwencji metabolicznych związanych z niewłaściwymi proporcjami pomiędzy tkanką tłuszczową i mięśniową. Przedstawione ostatnio wyniki antropometrycznych badań, przeprowadzonych na dużej grupie pediatrycznych pacjentów z cukrzycą typu 1 (z Europy Zachodniej i USA) w ramach wielośrodkowej współpracy wykazały, iż około 40% przebadanej populacji charakteryzuje się nieprawidłowościami w składzie masy ciała, a w grupach wiekowych 6-17 lat stwierdza się specyficzną zależność pomiędzy wskaźnikiem *Body Mass Index z-score* i HbA1c [%] [Du Bose et al. 2015]. Stany niedoboru leptyny mogą częściowo wyjaśniać problemy z „podjadaniem”, a tym samym trudności w wyrównywaniu metabolicznym pacjentów z cukrzycą typu 1. Podobne zależności stwierdzono u osób z *anorexia nervosa*, charakteryzujących się niskim stężeniem we krwi leptyny, które borykają się z trudnościami w uzyskaniu prawidłowej masy ciała [Meier et Gressner 2001]. Ostatnie badania wskazują, iż stosowanie tej adipocytokiny w przypadku zwierzęcych modeli metabolicznych z niewłaściwie kontrolowaną cukrzycą typu 1, częściowo normalizuje gospodarkę węglowodanową [Neuman et al. 2016].

Stwierdzenie w analizach własnych występowania ujemnej korelacji pomiędzy poziomami leptyny i osteokalcyny w grupie pacjentów z T1DM [publikacja nr 5], sugeruje obecność specyficznych powiązań pomiędzy działaniem wybranych cząsteczek wydzielanych przez tkankę tłuszczową i kostną. Stężenia osteokalcyny kształtowały się na podobnym poziomie u przebadanych pacjentów oraz grupy kontrolnej, analogicznie jak w badaniach Loureiro et al., w których wykazano ponadto występowanie ujemnych korelacji pomiędzy poziomami osteokalcyny i hemoglobiny glikowanej u pacjentów z cukrzycą typu 1 (mediana HbA1c na poziomie 7,65%). W innych analizach, dotyczących osób z tą chorobą, trwającą minimum 3 miesiące i przebiegającą bez powikłań nefrologicznych, wykazano także brak różnic stężeń osteokalcyny, w porównaniu do zdrowych rówieśników, przy obecności małej gęstości masy kości w grupie osób z niskimi

wartościami *Body Mass Index* [Ishikawa 2015].

Wyższe stężenia adiponektyny u pacjentów z T1DM, w porównaniu ze zdrowymi rówieśnikami, wykazano w analizach własnych [publikacja nr 5], jak i badaniach *Al Saeed* [Al Saeed 2013] oraz *Frystyk et al.* [Frystyk et al. 2005]. W tym ostatnim przypadku stwierdzono dodatkowo wyższe wartości stężeń adiponektyny u chorych z cukrzycą typu 1 i obecnością nefropatii, w porównaniu z pacjentami bez tych powikłań [Frystyk et al. 2005]. Wpływ zaburzonej funkcji nerek na wartość klirensu adiponektyny i/lub jej sekrecji z adipocytów zostały potwierdzone w badaniach *Chudek et al.*, w których po transplantacji nerek nastąpiło obniżenie stężeń tej adipocytokiny [Chudek et al. 2003]. Brak jest zgodności czy hiperadiponektynemia u chorych z cukrzycą typu 1 [publikacja nr 5] to zjawisko etiopatogenetycznie związane z powstawaniem mikroangiopatii cukrzycowej, czy raczej mechanizm kontrregulacyjny, chroniący przed rozwojem powikłań naczyniowych.

Na podstawie przeprowadzonych analiz można wnioskować, iż badania stężeń NPW i NPB we krwi, a zwłaszcza leptyny i adiponektyny warto uwzględnić w szczegółowej diagnostyce dzieci i młodzieży z T1DM leczonych penami, przede wszystkim w grupach z zaburzeniami stanu odżywienia i statusu antyoksydacyjnego. Brak zależności pomiędzy poziomem HbA1c a mierzonymi parametrami wskazuje na niewielki wpływ wyników leczenia insuliną (substytucyjnego, objawowego) na stopień odżywienia i procesy energetyczne, które zależą w znacznym stopniu od funkcji układu nerwowego, homeostazy endokrynnej i uwarunkowań genetycznych (płci).

Podsumowując wyniki badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe - objęcie szeregu ząbających się ścieżek doprowadziło do zdefiniowania złożonych zależności, jakie zachodzą w niedożywieniu jakościowym i ilościowym, ściśle powiązanych ze sobą, a także wytyczyło nowe kierunki analiz:

1. **Badania biochemiczne, obejmujące ocenę poziomu we krwi słabo poznanego neuropeptydu B (jedyne białko ze znanych, charakteryzujących się zdolnością do wiązania bromu u człowieka), wskazują na potencjalną jego rolę w etiopatogenezie i/lub przebiegu restrykcyjnej formy *anorexia nervosa*.**
2. **Hiperwaspinemia i wysokie stężenia waspiny w ślinie sugerują obecność systemowego i miejscowego, ochronnego mechanizmu kompensacyjnego, m.in. w zakresie poziomu aktywnej formy insuliny u pacjentek ze skrajnie ciężką postacią AN.**
3. **U chorych z formą restrykcyjną *anorexia nervosa*, utrzymująca się hiperneuropeptydemia B, mimo normalizacji waspinemii i wskaźników antropometrycznych oraz niezależnie od statusu antyoksydacyjnego podczas długotrwałego leczenia szpitalnego, wskazuje na przewlekły stan zaburzeń neuroendokrynnych w tej grupie pacjentów.**
4. **Stwierdzenie obecności waspiny (adipocytokiny o właściwościach antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych) w ślinie osób z niedożywieniem**

jakościowym i ilościowym (przebiegającym z niedoborem zawartości tkanki tłuszczowej i beztłuszczowej) oraz wykazanie jej wysokich stężeń, w porównaniu do grupy rówieśników z prawidłową masą ciała, potwierdza przydatność tego nieinwazyjnie pobieranego materiału biologicznego w monitorowaniu stanu chorych.

5. Warto rozważyć ocenę poziomu *Total Antioxidant Status* w ślinie pacjentek z restykcijną formą *anorexia nervosa*, ze względu na wyższą precyzję i czułość, w porównaniu do badań tego parametru w surowicy krwi.
6. Z powodu narastającej waspinooporności tkanek u pacjentów z niedożywieniem jakościowym, przebiegającym z nadmiarem procentowej zawartości tkanki tłuszczowej, spadek poziomu wskaźnika omentyna/*HOMA-IR*, ale nie wskaźnika waspina/*HOMA-IR*, jest czynnikiem predykcyjnym narastania ryzyka wystąpienia dodatkowych zaburzeń metabolicznych (głównie dyslipidemii z niskim poziomem ochronnej frakcji cholesterolu – klasy HDL i obniżenia poziomu beztłuszczowej masy ciała).
7. Obecność swoistego deficytu insuliny i specyficzny niedobór funkcjonalnego dostępu komórek do glukozy w cukrzycy typu 1, oprócz sprzyjania stanom zaburzeń antropometrycznych, hipoleptynemii, hiperadiponektynemii oraz obniżonym wartościom poziomów całkowitego statusu antyoksydacyjnego, wiąże się z niskimi stężeniami neuropeptydu B i neuropeptydu W w surowicy krwi.
8. Pacjenci z cukrzycą typu 1 intensywnie leczeni osobistymi pompami insulinowymi (ale nie osoby stosujące technikę wielokrotnych wstrzyknięć z użyciem penów) charakteryzują się wartościami poziomów neuropeptydemii W zbliżonymi do populacji zdrowej oraz stosunkowo niskimi poziomami hemoglobiny glikowanej A1c.
9. Badania stężeń we krwi neuropeptydu B i neuropeptydu W, obok analiz leptynemii i adiponektynemii warto uwzględnić w szczegółowej diagnostyce dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1, przede wszystkim w populacji z nieprawidłowymi poziomami hemoglobiny glikowanej A1c, wskaźników antropometrycznych i stanu antyoksydacyjnego.

Ponieważ uważa się, że zmiany stężeń wybranych adipocytokin i neuropeptydów oraz poziomu całkowitego statusu antyoksydacyjnego mogą znacznie wyprzedzić objawy dalszych powikłań metabolicznych towarzyszących niedożywieniu jakościowemu i ilościowemu, ich monitorowanie (zwłaszcza z zastosowaniem nieinwazyjnych materiałów biologicznych) jest szczególnie ważne. Nieliczne prace podejmujące ten temat stanowią w moim przekonaniu o nowatorskim charakterze przeprowadzonych przeze mnie analiz.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

Sumaryczny *Impact Factor* moich opublikowanych prac naukowych (wg *Journal Citation Reports*) wynosi 31,951 (w tym **11,481** stanowi IF cyklu publikacji). Punktacja MNiSW = 614 (w tym **145** za cykl publikacji). Prace były cytowane (bez autocytowań) łącznie **48** razy (wg bazy *Web of Science*), a *Index Hirscha* wynosi **4**.

Poza omówionym powyżej cyklem publikacji, jestem współautorem opublikowanych 144 publikacji naukowych, w tym 53 artykułów naukowych (34 prac oryginalnych i 19 prac poglądowych) w regularnych zeszytach, 2 prac w suplementach czasopism, 3 rozdziałów w monografiach oraz 86 streszczeń (20 prac zostało upowszechnionych w materiałach pokonferencyjnych a 66 opublikowanych w polskich (27) i zagranicznych (39) recenzowanych czasopismach naukowych), w tym z listy filadelfijskiej, charakteryzujących się wysokim współczynnikiem wpływu – *Impact Factor*. W 46 (z 53 artykułów naukowych) jestem pierwszym lub drugim autorem. Kolejne manuskrypty – 3 rozdziały do monografii są przyjęte do druku, zaś 4 prace oryginalne i 1 poglądowa – wysłane do redakcji naukowych czasopism recenzowanych (obecnie są na etapie recenzji wydawniczej).

Mój rozwój naukowy przebiegał w kilku etapach. Podczas ostatnich lat studiów magisterskich (1998-1999 r.) zajmowałam się procesem starzenia ustroju człowieka, powikłanego obecnością stanu zapalnego. Wyniki prowadzonych badań w tym okresie, m.in. dotyczące interleukiny-6 u osób w wieku podeszłym i starczym (65-89 lat) oraz stulatków (100-105 lat) zostały przeze mnie przedstawione na konferencji naukowej i opublikowane w formie artykułu pt.: *Ocena stężenia interleukiny-6 w surowicy krwi u osób w wieku podeszłym. Diag. Lab. 2000* oraz częściowo stały się podstawą pracy magisterskiej o podobnym tytule.

Pierwszy etap rozwoju naukowego po uzyskaniu tytułu zawodowego magistra (2000-2012 r.)

Od 2000 roku, jako uczestnik 4-letnich stacjonarnych studiów doktoranckich w Katedrze Chemii i Biochemii Klinicznej AMP, a także asystent Zakładu Biologii Chorób Cywilizacyjnych zajmowałam się zagadnieniami niedożywienia u osób dializowanych, wchodzącymi w zakres patofizjologii klinicznej, stosując w analizach układy modelowe wielokomórkowych błon biologicznych, tj. błony otrzewnej i ściany jelita *in vitro*. W badaniach tych wykorzystywałam matematyczny model transportu masy, opracowany we współpracy z Instytutem Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Państwowej Akademii Nauk w Warszawie, a także analizy morfologiczne i morfometryczne struktur otrzewnej, tj. mezotelium, *interstitium* i warstw płynu stagnacyjnego/ochronnego (w ramach współpracy z Zakładem Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii i Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej AMP). Ostatnie badania warstwy interstycjalnej sugerują, iż stanowi ona ważny m.in. w procesie zwłóknienia i przerzutowania, odrębny organ człowieka [Benias et al. 2018].

Powstały wówczas współautorskie prace dotyczące przezotrzewnowego transportu

związków endogennych o zróżnicowanej masie cząsteczkowej i ładunku elektrycznym (np. albuminy, glukozy, kwasu moczowego, mocznika, kreatyniny), m.in. artykuły poglądowe: *Uwarunkowania transportu makromolekuł przez błonę otrzewnową*. Pol. Arch. Med. Wewn. 2002, *Problemy dializy otrzewnowej - historia i perspektywy badań*. Prz. Lek. 2009, a także prace o charakterze oryginalnym: *Peritoneal transport dynamics of glucose and icodextrin: The in vitro comparative studies*. Adv. Perit. Dial. 2005, *Dynamika transportu kreatyniny przez błonę otrzewnową - badania in vitro*. Now. Lek. 2009, *Transperitoneal transport of uric acid: Impact of p-cresol, sodium hyaluronan, and sodium deoxycholate in vitro*. Adv. Perit. Dial. 2010.

Z kolei w zakresie badań transferu związków egzogennych, w tym leków stosowanych dootrzewnowo i związków cytoprotekcyjnych, na uwagę zasługują współautorskie opracowania poglądowe (*Możliwości oceny działania leku na otrzewną w warunkach doświadczalnych*. Nefrol. Dial. Pol. 2003, *Wpływ hialuronianu na przepuszczalność błony otrzewnowej dla makrocząsteczek in vitro*, Pol. Arch. Med. Wewn. 2005) oraz artykuły oryginalne dotyczące wybranych antybiotyków i związków hormonalnych: *Wpływ gentamycyny i insuliny na otrzewnową dyfuzję cząsteczek: badania in vitro*. Nefrol. Dial. Pol. 2002, *Effect of hyaluronan and deoxycholate on transperitoneal insulin and albumin transport in vitro*. Adv. Perit. Dial. 2006, *Urea transport across peritoneal membrane in vitro: influence of protamine sulfate, glyoxal and methylglyoxal*. Adv. Perit. Dial. 2009, *Influence of prednisolone on glucose and uric acid transport across peritoneal membrane in vitro*. Adv. Perit. Dial. 2011.

W wymienionych opracowaniach podkreślono m.in., iż polimer glukozy jako onkotycznie czynny wielkocząsteczkowy związek, stosowany w płynach dializacyjnych, łatwo ulega enzymatycznej degradacji. Szczególne znaczenie tego procesu wykazano w przypadku pacjentów dializowanych otrzewnowo i jednocześnie chorych na cukrzycę w związku z interferencją metabolitów omawianego polimeru podczas oceny poziomu glikemii. Zwrócono także uwagę na ochronne działanie wysokocząsteczkowych frakcji hialuronianu sodowego na struktury otrzewnej, a tym samym na funkcje transportowe tej złożonej błony biologicznej. Istotnym elementem mojego rozwoju naukowego było uczestnictwo jako wykonawca w **projekcie finansowanym przez Komitet Badań Naukowych pt.: „Patofizjologia przetrzewnowego transportu makrocząsteczek” w latach 2002-2004 (nr 4 PO5A 122 22)**. Zwieńczeniem badań w tym zakresie była rozprawa doktorska pt.: *„Uwarunkowania przetrzewnowego transportu makrocząsteczek. Badania modelowe in vitro”*, która zgodnie z decyzją Rady Wydziału Lekarskiego II AMP oraz wnioskami recenzentów - otrzymała wyróżnienie i była podstawą przyznania Nagrody Rektora AM za wybitne osiągnięcia naukowe (2005 r.).

Równolegle prowadziłam prace dotyczące wpływu wybranych substancji szkodliwych oraz osmotycznie i onkotycznie czynnych na transport błonowy (wyniki w tym zakresie opisane zostały m.in. w pracach: *Przetrzewnowy transport ikodekstryny in vitro: badania czynnościowe i morfometryczne*. Nefrol. Dial. Pol. 2005, *Factors affecting icodextrin peritoneal transport in vitro*. Adv. Perit. Dial. 2007, *Hyaluronan influence on diffusive permeability of the peritoneum in vitro*. Adv. Perit. Dial. 2008, *Influence of osmotic and oncotic factors on gentamicin and insulin transport across the peritoneal membrane in vitro*. Adv. Perit. Dial. 2011). Wykazano w nich

wielokierunkowe negatywne efekty działania pochodnych aldehydowych oraz glukozy (w wysokich stężeniach), w odniesieniu do efektywności dializy otrzewnowej, wynikające m.in. ze zmian histologicznych i morfometrycznych błony otrzewnowej (najważniejsze artykuły dotyczące tego problemu badawczego to: *Metyloglioksal zmienia przepuszczalność dyfuzyjną otrzewnej in vitro*. *Nefrol. Dial. Pol.* 2004, *Otrzewna jako błona specyficzna*. *Prz. Lek.* 2007, *Icodextrin peritoneal transport in vitro: Effect of sodium deoxycholate, glucose, and methylglyoxal*. *Artif. Organs* 2007).

W latach 2012-2013 jako **kierownik i jednocześnie główny wykonawca ministerialnego projektu „Młodzi naukowcy” pt.: „Wpływ genisteiny, hialuronianu i prednizolonu na funkcje transportowe złożonych błon biologicznych – badania elektrofizjologiczne i przenikaniowe”** (nr 502-14-02228371-08585), dzięki współpracy Zakładu Biologii Chorób Cywilizacyjnych z Katedrą i Zakładem Patobiochemii i Chemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy, poszerzyłam warsztat badawczy umożliwiający analizy czynnościowych prądów jonowych (elektrogeniczny transport jonów) z zastosowaniem precyzyjnego zestawu pomiarowego typu EVC 4000 sprzężonego z komputerowym systemem akwizycji danych doświadczalnych z użyciem programu LAB-TRAX-4. Analizy oddziaływania związków hormonalnych zaowocowały opracowaniem wyników w postaci artykułów i materiałów naukowych prezentowanych na kongresach międzynarodowych (*32nd Annual Dialysis Conference, San Antoni, Texas, U.S.A*, *XLIX Congress of European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association, Paris, France*, *39th Annual Meeting of European Society for Artificial Organs, Rostock, Germany*). W przeprowadzonych badaniach wykazałam, iż prednizon jako agonista receptorów glikokortykosterydowych obniża opór elektryczny ściany jelita grubego po kilkudziesięciu minutach od zastosowania, bez wpływu na przeznabłonkową różnicę potencjału elektrycznego, przy czym krótki czas wystąpienia pierwszych zmian wskazuje na niegenomowe oddziaływanie tego glikokortykosterydu. Dysfunkcja kanałów jonowych, będących ważnym ogniwem w systemach sygnalizacyjnych, występuje w komórkach ściany jelitowej, np. w stanach zapalnych (wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego i chorobie Leśniowskiego-Crohn’a), nowotworach jelita grubego oraz mukowiscydozie, a mechanizm obserwowanych zmian w wymienionych jednostkach chorobowych oraz modyfikacji pod wpływem sterydoterapii, jak dotąd pozostaje słabo poznany.

Drugi etap pracy naukowej (2012-2018 r.)

Zainteresowanie ilościowym i jakościowym niedożywieniem obserwowanym podczas dializy otrzewnowej, poszerzyłam w latach 2012-2018 o aspekty związane z chorobami dietozależnymi, żywnością funkcjonalną i suplementacją diety, ze szczególnym uwzględnieniem neuroendokrynnej funkcji tkanki tłuszczowej i kostnej oraz poszukiwaniem specyficznych biomarkerów/wykładników. Wiązało się z rozwojem nowej dziedziny nauki – nutrigenomiki (oprócz dorobku w ramach osiągnięcia naukowego jestem współautorem wielu prac w tym zakresie, m.in. *Benefits and risks associated with genetically modified food products*. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2013, *Korzyści i zagrożenia związane z konsumpcją naturalnych zamienników*

sacharozy. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2015, *The merits of fat replacers in low-calorie food.* *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus.* 2016, *Evaluation of using dietary supplements among Polish adult people below and over 60 years of age.* *J. Med. Sci.* 2017).

Równolegle zajmowałam się poszukiwaniem genetycznych i biochemicznych wykładników wybranych chorób/nieprawidłowości. Dzięki współpracy z Katedrą Biologii i Biochemii Molekularnej oraz Katedrą i Kliniką Neurologii UMP, swoje zainteresowania naukowe poszerzyłam o **analizy podłoża molekularnego chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych** (badania polimorfizmów genów *5HTR2A*, *5HTR1B*, *5HTR2C*, *TPH1*, *TPH2*, *MAOA*, *COMT*, *NET*, *GABRB1*, *ESR1*, *MTHFR*, *MTR* i *MTHFD1*, zmiany w ekspresji wybranych genów, m.in. podjednostki $\alpha 7$ receptora nikotynowego dla acetylocholiny) oraz chromatograficzne (analizy poziomu homocysteiny), związanymi m.in. z takimi problemami klinicznymi jak depresja, migrena, choroba Alzheimera oraz procesy pro- i antyoksydacyjne. Wyniki badań zostały przedstawione w kolejnych opracowaniach: *Memantine up-regulates nicotinic acetylcholine receptors expression in the cortex and sub-cortical white matter of aging rat brain.* *Acta Neurobiol. Exp.* 2013, *Elevated expression of $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor during the early stages of damage by oxidative stress in the aging rat brain.* *Acta Neurobiol. Exp.* 2013, *The MAOA, COMT, MTHFR and ESR1 gene polymorphisms are associated with the risk of depression in menopausal women.* *Maturitas* 2016).

Współpraca z Katedrą i Kliniką Neurologii UMP w ramach badań polimorfizmów w genach serotoniny i hipokretyny-1 (oraz poziomów białek) u pacjentów z migreną przebiegającą z aurą i bez aury oraz niespokrewnionych osób zdrowych, które zostały wykonane z zastosowaniem analizy topnienia w wysokiej rozdzielczości - HRMA (*High-Resolution Melting Analysis*), a do oznaczeń stężeń serotoniny we krwi - użyto wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej połączonej z detekcją elektrochemiczną, zaowocowało przygotowaniem współautorskiej pracy pt.: *The new *G29A and G1222A of HCRT1, 5-HTTLPR of SLC6A4 polymorphisms and hypocretin-1, serotonin concentrations in migraine patients.* *Front. Mol. Neurosci.* 2018 (IF=5,076).

Badania biochemicznych biomarkerów, którymi się zajmowałam, dotyczyły ponadto innych jednostek chorobowych, m.in. zespołu metabolicznego i schorzeń reumatycznych. Efektem tych analiz były kolejne publikacje, dotyczące poziomów adipoliny, neprilizyny, chemeryny, *glypican-4* (*Adipolin, neprilysin and chemerin - new adipokines connecting excess of adipose tissue with insulin resistance.* *Congressus Dietetica* 2015, *Stężenie adipoliny we krwi a powikłania metaboliczne u otyłych osób.* *Congressus Dietetica* 2016, *Glypican-4 jako nowy predyktor zaburzeń gospodarki węglowodanowej.* *Congressus Dietetica* 2017), które powstały dzięki ścisłej współpracy z zespołem badaczy z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego UMP oraz Katedry Leczenia Otyłości, Zaburzeń Metabolicznych i Dietetyki Klinicznej UMP. Z kolei współdziałanie w aspekcie aplikowania o granty naukowe **Narodowego Centrum Nauki** z Katedrą i Kliniką Reumatologii i Chorób Wewnętrznych UMP zaowocowało serią prac, dotyczących biochemicznych wykładników u pacjentów z chorobami reumatycznymi o różnym nasileniu stanu zapalnego, stopniem

niedożywienia jakościowego i intensywnością terapii glikokortykosteroidowej (*Chemerin, resistin, and adiponectin in patients with connective tissue diseases. J. Med. Biochem. 2018; Cytokines and nutrition in rheumatic diseases* – manuskrypt wysłany do druku).

Ważnymi badaniami, w których uczestniczyłam, wykonując analizy biochemiczne, a także żywieniowe i antropometryczne, a przede wszystkim biorąc udział w zaplanowaniu badań i tworzeniu hipotez badawczych były projekty dotyczące gospodarki witaminą D i poszczególnych wykładników zespołu metabolicznego. Pomimo zainteresowania się tą tematyką przez różne ośrodki naukowe - łączenie jej form wolnej i biodostępnej oraz białek wiążących witaminę D z nieprawidłowościami w tkance tłuszczowej, należą do innowacyjnych. Podczas projektowania badań, oprócz analiz parametru określającego status tej witaminy – metabolitu 25-hydroksywitaminy D - 25(OH)D (25-hydroksycholekalcyferolu i 25-hydroksyergokalcyferolu), uwzględniono wolną [free25(OH)D] i biodostępną formę hydroksywitaminy D [bio25(OH)D] oraz białka transportowe dla 25(OH)D (Gc-globulinę, albuminy), w myśl „hipotezy wolnych hormonów”. Najważniejsze opracowania w tym zakresie zostały nagrodzone na ogólnopolskich konferencjach naukowej i opublikowane w czasopismach z wysokim wskaźnikiem oddziaływania – *Impact Factor*: np. współautorskie prace: *Relationship between deficiency of vitamin D and exponents of metabolic syndrome. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2015*, *Hypovitaminosis D and adipose tissue: Cause-effect relationships in obesity. Ann. Agric. Environ. Med. 2016*, *Witamina D a funkcje adipocytów, Post. Hig. Med. Dośw. 2017*.

Realizowane obecnie projekty są kontynuacją wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Biologii Chorób Cywilizacyjnych oraz uwzględniają nowe aspekty naukowe. Między innymi dotyczą endokrynnych zaburzeń w obrębie tkanki kostnej oraz żywności funkcjonalnej. Równorzędnym kierunkiem moich zainteresowań są oddziaływania aktywności fizycznej i zaburzeń snu (ciągły monitoring z użyciem monitorów z czujnikami ruchu i rozbudowaną pamięcią) na biochemiczne modyfikacje proteomu surowicy krwi i śliny (*glypican-4*, iryzyna, kryptochrom-1, całkowita zdolność antyoksydacyjna). Ważnym obszarem zainteresowań naukowych są także projekty związane ze statusem składników mineralnych, profilem zmian biochemicznych, zaburzeniami stanu odżywiania, stanem prooksydacyjnym i jakością życia kobiet z inwazyjnym rakiem piersi w trakcie pooperacyjnej chemioterapii oraz pacjentów z rakiem jelita grubego. Obecnie dopracowuję projekt badawczy dotyczący **profilu mikroRNA w surowicy krwi chorych onkologicznie (aplikacja grantowa w ramach NCN)**.

Wszystkie wymienione powyżej osiągnięcia i działania, oprócz wartości poznawczej, mają istotne znaczenie praktyczne. Powstały one dzięki ścisłej współpracy z lekarzami, stomatologami, dietetykami, psychologami, chemikami i/lub biotechnologami z wielu katedr/zakładów/klinik Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego oraz badaczami z wiodących jednostek naukowych w kraju i zagranicą.

Powyższe działania naukowe są powiązane ze współpracą w ramach komitetów redakcyjnych czasopism. Jestem aktywnym członkiem Rad Redakcyjnych dwóch czasopism naukowych (*EC Nutrition, Journal of Pharma & Pharmaceutical Sciences*). W latach 2008-2018 w sumie 48 razy byłam powoływana na **recenzenta wydawniczego** w 20 anglojęzycznych

czasopismach naukowych (w tym z *Impact Factor*). Ważnym elementem mojej pracy zawodowej jest także udział w kształceniu młodej kadry i działalność dydaktyczna. Na podstawie decyzji Rady Wydziału Lekarskiego II UMP z dnia 16.09.2015 r. zostałam powołana na **promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej** pt.: „Udział wybranych adipokin w patogenezie zaburzeń metabolicznych towarzyszących otyłości wisceralnej” doktorantki Stacjonarnego Studium Doktoranckiego w Zakładzie Biologii Chorób Cywilizacyjnych UMP - mgr Marceliny Sperling. Ponadto byłam **promotorem ukończonych 49 prac magisterskich (w tym 12 wyróżnionych) i 38 licencjackich (6 wyróżnionych)** na Wydziałach Lekarskim II UMP i Wydziale Nauk o Zdrowiu UMP, a kolejne 42 prace magisterskie i 22 licencjackie oceniłam jako recenzent w latach 2010-2018 na Wydziałach Lekarskim II UMP, Wydziale Farmaceutycznym UMP i Wydziale Nauk o Zdrowiu UMP (prace dyplomowe studentów na kierunkach: dietetyka, *6-year Doctor of Pharmacy Program*, kosmetologia, pielęgniarstwo, zdrowie publiczne i promocja zdrowia). Obecnie prowadzę jako promotor kolejne prace magisterskie i licencjackie, a także jestem opiekunem Studenckiego Koła Naukowego Nutrigenomiki, działającego przy Zakładzie Biologii Chorób Cywilizacyjnych. Do głównych osiągnięć w ramach tej aktywności zaliczyć należy opiekę nad przygotowanymi wystąpieniami naukowymi studentów, których efektem była nagroda za najlepszy referat pt.: „*Superfoods* – wybrane zagadnienia nutrigenomiczne”, wygłoszony na Międzyczelnianej Studenckiej Konferencji Naukowej (Poznań, 15.12.2017 r.) oraz wyróżnienie prezentacji posterowej pt.: „Polimorfizmy genetyczne i udział tłuszczów w diecie a kształtowanie poziomu wskaźnika insulinooporności” na VIII Ogólnopolskiej Konferencji Dietetyki „Congressus Dietetica” (Łódź, 04-05.04.2018 r.).

Moja działalność dydaktyczno-organizacyjna jest realizowana na wielu płaszczyznach. Zostałam powołana na pełnomocnika rektora ds. praktyk studenckich na I, II i III roku kierunku dietetyka UMP w roku akademickim 2008/2009 oraz przewodniczącą Rady Programowej kierunku dietetyka UMP (począwszy od roku akademickiego 2012/2013 – nadal – kolejno SUM I rok lub SUM II rok - Wydział Lekarski II), a także na opiekuna I lub II roku SUM na tym kierunku (od 2012 - nadal). Byłam członkiem Komisji ds. Krajowych Ram Programowych dla kierunku dietetyka na Wydziale Lekarskim II w latach 2014-2015. Ponad 140 razy byłam członkiem komisji podczas egzaminów dyplomowych oraz obron prac magisterskich lub licencjackich studentów na Wydziale Lekarskim II, Wydziale Farmaceutycznym i Wydziale Nauk o Zdrowiu UMP w latach 2010-2018.

Jestem współautorem założeń programowych i prowadzę/prowadziłam zajęcia na Wydziale Lekarskim I i Wydziale Lekarskim II UMP z obligatoryjnych przedmiotów - Nutrigenomika (seminaria), Genetyka (seminaria), Choroby Cywilizacyjne a Starzenie Ustroju (seminaria i ćwiczenia), Biochemia (seminaria), Diagnostyka Laboratoryjna (ćwiczenia), Pracownia Specjalistyczna (seminaria), a także fakultatywnych: Biologiczne Podstawy Chorób Cywilizacyjnych (seminaria), Biologiczne Podstawy Zaburzeń Dietozależnych (seminaria) oraz Biologiczne Uwarunkowania Starzenia się Ustroju (seminaria) w latach 2000-2018 na kierunkach: lekarski, lekarsko-dentystyczny, dietetyka, farmacja, analityka medyczna, pielęgniarstwo, położnictwo, ratownictwo medyczne, optometria, higiena dentystyczna, protetyka słuchu, zdrowie

publiczne - techniki dentystyczne, estetyka twarzy. Powyższe zajęcia obejmują/obejmowały studia: podyplomowe, stacjonarne i niestacjonarne magisterskie lub licencjackie UMP oraz Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu (zajęcia dydaktyczne w wymiarze przekraczającym obowiązujące pensum, przewidziane w przypadku pełnego etatu asystenta/adiunkta w Zakładzie Biologii Chorób Cywilizacyjnych Katedry Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu).

W ramach działalności organizacyjnej na rzecz UMP jestem osobą odpowiedzialną za rozliczanie pensum dydaktycznego w Zakładzie Biologii Chorób Cywilizacyjnych od 2010 roku. W latach 2013/2014, 2014/2015, 2015/2016, 2016/2017 i 2017/2018 (nadal) decyzją Rady Wydziału Lekarskiego II zostałam powołana na członka Wydziałowego Zespołu Doskonalenia i Zapewnienia Jakości Kształcenia. Od 2008 roku jestem współodpowiedzialna za przygotowywanie wniosków do komisji bioetycznej, dotyczących badań klinicznych i analiz nad zwierzętami w Zakładzie Biologii Chorób Cywilizacyjnych. W latach 2009-2015 nadzorowałam w tej jednostce, zgodnie z uchwałą Lokalnej Komisji Etycznej, doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych. Ponadto, współpracuję od kilkunastu lat z Inspektorem ds. Ochrony Środowiska w sprawie utylizacji środków chemicznych pochodzących z Zakładu Biologii Chorób Cywilizacyjnych, a w latach 2009-2015 także w sprawie odpadów weterynaryjnych. Od 2016 roku (nadal) jestem także aktywnym członkiem Rady Wydziału Lekarskiego II UMP.

W mojej pracy naukowo-badawczej znaczącą rolę pełni wymiana poglądów i doświadczeń na ogólnopolskich i międzynarodowych konferencjach, gdzie współautorskie osiągnięcia były wielokrotnie nagradzane/wyróżniane. W sumie otrzymałam 11 nagród i 4 wyróżnienia na ogólnokrajowych i zagranicznych (Belgia, USA) konferencjach naukowych za wystąpienia ustne i posterowe. W celu pogłębienia wiedzy i umiejętności aktywnie uczestniczyłam w kursach specjalizacyjnych, warsztatach, szkoleniach i stażach naukowych w jednostkach badawczych w Polsce i poza jej granicami (szczegóły w załączniku).

Piśmiennictwo

1. Al Saeed M. The utility of adiponectin and nitric oxide metabolites as biomarkers for prediction and follow-up of vascular complications in children with type 1 diabetes mellitus. *Saudi Journal for Health Sciences* 2013; 2(3): 156-160.
2. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.
3. Ahsan F, Sharif MK, Butt MS, Shehzad A, Khan MI. Pathophysiological role of leptin for human health: A review. *Pakistan Journal of Food Sciences* 2017; 27(1): 46-52.
4. Belfiore F, Iannello S, Volpicelli G. Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Molecular Genetics and Metabolism* 1998; 2: 134-141. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096719297926585>.
5. Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, Klavan H, Reidy J, Buonocore D, Miranda M, Kornacki S, Wayne M, David L, Carr-Locke DL, Theise ND. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues *Scientific Reports* 2018; 8: 4947, doi:10.1038/s41598-018-23062-6
6. Bashiri J, Rahbaran A, Gholami F, Ahmadizad S, Nikoukheslat S, Moradi A. The effect of acute exercise on serum vaspin level and its relation to insulin sensitivity in overweight elderly men. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2014; 16(8): 16-19.

7. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2001; 69: 89-95.
8. Bernotiene E, Palmer G, Gabay C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: 217. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779438/>
9. Bozkurt DS, Ongoz DF, Balli U, Sertoglu E. Levels of vaspin and omentin-1 in gingival crevicular fluid as potential markers of inflammation in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Oral Science* 2016; 58(3): 379–389. <https://doi.org/10.2334/josnuds.15-0731>.
10. Chen PC, Kryukova YN, Shyng SL. Leptin regulates KATP Channel trafficking in pancreatic β -cells by a signaling mechanism involving AMP-activated protein kinase (AMPK) and cAMP-dependent protein kinase (PKA). *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288: 34098-34109.
11. Chudek J, Adamczak M, Karkoszka H, Budzinski G, Ignacy W, Funahashi T, Matsuzawa Y, Cierpka L, Kokot F, Wiecek A. Plasma adiponectin concentration before and after successful kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 2003; 35: 2186-2189.
12. Coniglio KA, Becker KR, Franko DL, Zayas LV, Plessow F, Eddy KT, Thomas JJ. Won't stop or can't stop? Food restriction as a habitual behavior among individuals with anorexia nervosa or atypical anorexia nervosa. *Eating Behaviors* 2017; 26: 144-147. doi: 10.1016/j.eatbeh.2017.03.005.
13. Cruz-Domínguez MP, Cortés DH, Zarate A, Tapia-González L, Alvarez-Acosta S, Damasio L. Relationship of ghrelin, acid uric and proinflammatory adipocytokines in different degrees of obesity or diabetes. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2014; 7(5): 1435-1441.
14. Dal S, Sigrist S. The protective effect of antioxidants consumption on diabetes and vascular complications. *Diseases* 2016. doi: 10.3390/diseases4030024.
15. DeBoer MD. What can anorexia nervosa teach us about appetite regulation? *Nutrition* 2007; 27: 405-406.
16. De Filippo E, Marra M, Alfinito F, Di Guglielmo ML, Majorano P, Cerciello G, De Caprio C, Contaldo F, Pasanisi F. Hematological complications in anorexia nervosa. *European Journal of Clinical Nutrition* 2016; 70(11): 1305-1308. doi: 10.1038/ejcn.2016.115.
17. Dezakia K, Kageyamab H, Sekib M, Shiodab S, Yadaa T. Neuropeptide W in the rat pancreas: Potentiation of glucose-induced insulin release and Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels in β -cells and localization in islets, *Regulatory Peptides* 2008; 145; 1-3: 153-158.
18. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2010; 460: 703-718.
19. DuBose SN, Hermann JM, Tamborlane WV, Beck RW, Dost A, DiMeglio LA, Schwab KO, Holl RW, Hofer SE, Maahs DM. Type 1 diabetes exchange clinic network and diabetes prospective follow-up registry. Obesity in youth with type 1 diabetes in Germany, Austria, and the United States. *The Journal of Pediatrics* 2015; 167(3): 627-632.e4.
20. Dutkiewicz A, Grzelak T. Dietoterapia doustna u pacjentów z anoreksją. *Psychiatria i Psychologia Kliniczna* 2016; 16 (2): 104-109.
21. Eilanden MM, de Wit M, Rotteveel J, Aanstoot HJ, Bakker-van Waarde WM, Houdijk EC, Nuboer R, Winterdijk P, Snoek FJ. Disturbed eating behaviors in adolescents with type 1 diabetes. How to screen for yellow flags in clinical practice? *Pediatric Diabetes* 2017; 18(5): 376-383.
22. Escoté X, Gómez-Zorita S, López-Yoldi M, Milton-Laskibar I, Fernández-Quintela A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ, Portillo MP. Role of omentin, vaspin, cardiotrophin-1, TWEAK and NOV/CCN3 in obesity and diabetes development. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(8): 1770. doi: 10.3390/ijms18081770.
23. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 5266-5270.
24. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*

- 2012; 50: 568-575.
25. Fetissov SO, Harro J, Jaanisk M, Järv A, Podar I, Allik J, Nilsson I, Sakthivel P, Lefvert AK, Hökfelt T. PMID: PMC1253594 Neuroscience autoantibodies against neuropeptides are associated with psychological traits in eating disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(41): 14865-14870. doi: 10.1073/pnas.0507204102.
26. Fichter MM, Quadflieg N, Crosby RD, Koch S. Long-term outcome of anorexia nervosa: Results from a large clinical longitudinal study. *International Journal of Eating Disorders* 2017; 50(9): 1018-1030. doi: 10.1002/eat.22736.
27. Fontana M, Zunt S, Eckert GJ, Zero D. A screening test for unstimulated salivary flow measurement. *Operative Dentistry* 2005; 30(1): 3-8.
28. Frystyk J, Tarnow L, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A. Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications. *Diabetologia* 2005; 48(9): 1911-1918.
29. Gentile MG, Lessa C, Cattaneo M. Metabolic and nutritional needs to normalize Body Mass Index by doubling the admission body weight in severe anorexia nervosa. *Clinical Medicine Insights: Case Reports* 2013; 6: 51-56.
30. Gehrmann W, Elsner M, Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes Obesity Metabolism* 2010; 12: 149-158.
31. Gill CM, Torriani M, Murphy R, Harris TB, Miller KK, Klibanski A, Bredella MA. Fat attenuation at CT in anorexia nervosa. *Radiology* 2016; 279(1): 151-157. doi: 10.1148/radiol.2015151104.
32. Ginsburg I, Kohen R, Shalish M, Varon D, Shai E, Koren E. The oxidant-scavenging abilities in the oral cavity may be regulated by a collaboration among antioxidants in saliva, microorganisms, blood cells and polyphenols: A chemiluminescence-based study. *Public Library of Science One* 2013; 8(5): e63062. doi: 10.1371/journal.pone.0063062.
33. Grzelak T, Dutkiewicz A, Paszyńska E, Dmierzak-Węglarz M, Słopeń A, Tyszkiewicz-Nwafor M. Neurobiochemical and psychological factors influencing the eating behaviors and attitudes in anorexia nervosa. *J. Physiol. Biochem.* 2017, 73(2): 297-305.
34. Guler C, Toy E, Ozturk F, Gunes D, Karabulut AB, Otlu O. Evaluation of salivary total oxidant-antioxidant status and DNA damage of children undergoing fixed orthodontic therapy. *Angle Orthodontist* 2015; 85(2): 239-244. doi: 10.2319/110113-798.1.
35. Harris RBS. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochimica Biophysica Acta* 2014; 1842: 414-423.
36. Haynos AF, Snipes C, Guarda A, Mayer LE, Attia E. Comparison of standardized versus individualized caloric prescriptions in the nutritional rehabilitation of inpatients with anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders* 2016; 49(1): 50-58.
37. Hosmer D, Lemeshow S. *Applied logistic regression*, 2nd edition. John Wiley & Sons Incorporated, New York, 2013. <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470582472>.
38. Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, Kuroyama H, Seki S, Utsuyama M, Hirokawa K. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 47217-47222.
39. Ishii M, Fei H, Friedman JM. Targeted disruption of GPR7, the endogenous receptor for neuropeptides B and W, leads to metabolic defects and adult-onset obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 10540-10545.
40. Ishikawa K, Fukui T, Nagai T, Kuroda T, Hara N, Yamamoto T, Inagaki K, Hirano T. Type 1 diabetes patients have lower strength in femoral bone determined by quantitative computed tomography: A cross-sectional study. *Journal of Diabetes Investigation* 2015; 6: 726-733.
41. Ilyas A, Hubel C, Ismail K, Treasure J, Breen G, Kan C. Anorexia nervosa and insulin sensitivity: A systematic review and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology* 2017; 27, Suppl. 4, doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(17\)31180-X](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(17)31180-X).
42. ISO 15189:2007. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-2:v1:en:sec:A>. Data wejścia: 06.02.2018.

43. JafariNasabian P, Inglis JE, Kelly OJ, Ilich JZ. Osteosarcopenic obesity in women: impact, prevalence, and management challenges. *International Journal of Women's Health* 2017; 9: 33-42. doi: 10.2147/IJWH.S106107.
44. Jarosz M, Stoś K, Przygoda B, Matczuk E, Stolińska-Fiedorowicz H, Kłys W. Witaminy [W:] Normy żywienia dla populacji Polski. Jarosz M. [red.], Intytut Żywności i Żywienia, Warszawa, 2017; 130-202.
45. Jeong E, Youn B-S, Kim DW, Kim EH, Park JW, Namkoong C, Jeong JY, Yoon SY, Park JY, Lee K-U, Kim M-S. Circadian rhythm of serum vaspin in healthy male volunteers: Relation to meals. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95: 1869-1875. doi: 10.1210/jc.2009-1088.
46. Kamarudin AN, Cox T, Kolamunnage-Dona R. Time-dependent ROC curve analysis in medical research: current methods and applications. *BMC Medical Research Methodology* 2017; 17: 53. <https://doi.org/10.1186/s12874-017-0332-6>.
47. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis International* 2011; 22: 187-194.
48. Kelly MA, Beuckmann CT, Williams SC, Sinton CM, Motoike T, Richardson JA, Hammer RE, Garry MG, Yanagisawa M. Neuropeptide B-deficient mice demonstrate hyperalgesia in response to inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(28): 9942-9947.
49. Khalil RB, Hachem C. Adiponectin in eating disorders. *Eating and Weight Disorders* 2014; 19: 3-10.
50. Kim M-S, Youn B-S. Method of preventing or treating body weight-related disorders by employing vaspin. Zgłoszenie patentowe nr WO2011138977 A1, 2011.
51. Klump KL, Culbert KM, Sisk CL. Sex differences in binge eating: Gonadal hormone effects across development. *Annual Review of Clinical Psychology* 2017; 13: 183-207. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032816-045309>.
52. Koïou E, Kalaitzakis E, Tziomalos K, Mavridis S, Dinas K, Tantanasis T, Katsikis I, Loufopoulos A, Panidis D. Vaspin: a novel adipokine, member of the family of serine protease inhibitors. *Aristotle University Medical Journal* 2011; 38(3): 7-18.
53. Kostro K, Lerman JB, Attia E. The current status of suicide and self-injury in eating disorders: a narrative review. *Journal of Eating Disorders* 2014; 2: 19. doi: 10.1186/s40337-014-0019-x.
54. Körner A, Neef M, Friebe D, Erbs S, Kratzsch J, Dittrich K, Blüher S, Kapellen TM, Kovacs P, Stumvoll M, Blüher M, Kiess W. Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children. *International Journal of Obesity: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 2011; 35(4): 578-586. doi: 10.1038/ijo.2010.196.
55. Lechin F, Van der Dijs B, Pardey-Maldonado B, Rivera JE, Baez S, Lechin ME. Anorexia nervosa depends on adrenal sympathetic hyperactivity: Opposite neuroautonomic profile of hyperinsulinism syndrome. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2010; 3: 311-317.
56. Lee D, Shook RP, Drenowatz C, Blair SN. Physical activity and sarcopenic obesity: definition, assessment, prevalence and mechanism. *Future Science OA* 2016; 2(3): FSO127. doi: 10.4155/fsoa-2016-0028.
57. Lian Q, Zuo X, Mao Y, Luo S, Zhang S, Tu X, Lou Ch, Zhou W. Anorexia nervosa, depression and suicidal thoughts among Chinese adolescents: a national school-based cross-sectional study. *Environmental Health and Preventive Medicine* 2017; 22: 30. doi: 10.1186/s12199-017-0639-2.
58. Li H, Feinle-Bisset Ch, Frisby C, Kentish S, Wittert GA, Page AJ. Gastric neuropeptide W is regulated by meal-related nutrients. *Peptides* 2014; 28: 6-14.
59. Li H, Frisby CL, O'Donnell TA, Kentish SJ, Wittert GA, Page AJ. Neuropeptide W modulation of gastric vagal afferent mechanosensitivity: Impact of age and sex. *Peptides* 2015; 71: 141-148.
60. Li H, Kentish SJ, Kritas S, Young RL, Isaacs NJ, O'Donnell TA, Blackshaw LA, Wittert GA, Page AJ. Modulation of murine gastric vagal afferent mechanosensitivity by neuropeptide W. *Acta Physiologica Scandinavica* 2013; 209: 179-191.
61. Li H, Kentish SJ, Wittert GA, Page AJ. The role of neuropeptide W in energy homeostasis. *Acta Physiologica* 2018; 222. doi: 10.1111/apha.12888.

62. Li K, Li L, Yang M. Short-term plasma vaspin levels in patients with type 2 diabetes mellitus concomitant with improvement in insulin sensitivity. *European Journal of Endocrinology* 2011; 164(6): 905-910.
63. Liu PJ, Ma F, Lou HP, Chen Y. Visceral Adiposity Index is associated with pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus in Chinese adults aged 20-50. *Annals of Nutrition & Metabolism* 2016; 68(4): 235-243. doi: 10.1159/000446121.
64. Liu S, Li X, Wu Y, Duan R, Zhang J, Du F, Zhang Q, Li Y, Li N. Effects of vaspin on pancreatic β cell secretion via PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways. *Public Library of Science One* 2017; 12(12): e0189722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189722>.
65. Li XP, Zeng S, Wang M, Wu XP, Liao EY. Relationships between serum omentin-1, body fat mass and bone mineral density in healthy Chinese male adults in Changsha area. *The Journal of Endocrinological Investigation* 2014; 37(10): 991-1000.
66. Li Y, Browne RW, Bonner MR, Deng F, Tian L, Mu L. Positive relationship between Total Antioxidant Status and chemokines observed in adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014; 693680. doi: 10.1155/2014/693680.
67. Lorenzo C, Haffner SM, Stancáková A, Laakso M. Relation of direct and surrogate measures of insulin resistance to cardiovascular risk factors in nondiabetic offspring of type 2 diabetic individuals. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95(11): 5082-5090. doi: 10.1210/jc.2010-1144.
68. Loureiro MB, Ururahy MA, Freire-Neto FP, Oliveira GH, Duarte VM, Luchessi AD, Brandão-Neto J, Hirata RD, Hirata MH, Maciel-Neto JJ, Arrais RF, Almeida MG, Rezende AA. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2014; 103(3): 452-457. doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.018.
69. Lung TW, Hayes AJ, Herman WH, Si L, Palmer AJ, Clarke PM. A meta-analysis of the relative risk of mortality for type 1 diabetes patients compared to the general population: exploring temporal changes in relative mortality. *PLoS One* 2014; 26, 9(11): e113635. doi: 10.1371/journal.pone.0113635.
70. Ma J, Karlsen MC, Chung M, Jacques PF, Saltzman E, Smith CE, Fox CS, McKeown NM. Potential link between excess added sugar intake and ectopic fat: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition Reviews* 2016; 74(1): 18-32. doi: 10.1093/nutrit/nuv047.
71. Malamud D, Rodriguez-Chavez IR. Saliva as a diagnostic fluid. *Dental Clinics of North America* 2011; 55(1): 159-178.
72. Matsuda M, Shimomura I. Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2014; 15: 1-10.
73. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7): 412-419. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3899825>.
74. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clinical Biochemistry* 2001; 50(9): 1511-1525.
75. Mezaour AD. Filtering Web documents for a thematic warehouse case study: aDots a food risk date warehouse (extended) In: *Intelligent Information Processing and Web Mining, Proceedings of the International IIS IIPWM'05 Conference held in Gdansk, Poland, June 13-16: 2005*.
76. Moradi S, Mirzaei K, Abdurahman AA, Keshavarz SA, Hossein-Nezhad A. Mediatory effect of circulating vaspin on resting metabolic rate in obese individuals. *European Journal of Nutrition* 2016; 55(3): 1297-1305.
77. Motiur RM, Takeshita S, Matsuoka K, Kaneko K, Naoe Y, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Ikeda K. Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL: Cell density as a determinant of osteoclast formation. *Bone* 2015; 81: 392-399.
78. Motoike T, Long JM, Tanaka H, Sinton CM, Skach A, Williams SC, Hammer RE, Sakurai T, Yanagisawa M. Mesolimbic neuropeptide W coordinates stress responses under novel environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016; 113: 6023-6028. doi: 10.1073/pnas.1518658113.

79. Motyl KJ, McCabe LR, Schwartz AV. Bone and glucose metabolism: a two-way street. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010; 503: 2-10.
80. Nagata JM, Golden NH, Peebles R, Long J, Murray SB, Leonard MB, Carlson JL. Assessment of sex differences in body composition among adolescents with anorexia nervosa. *Journal of Adolescent Health* 2017; 60 (4): 455-459.
81. Nedvidková J, Kryrková I, Barták V, Papezová H, Gold PW, Alesci S, Pacak K. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88(4): 1678-1682.
82. Neumann UH, Denroche HC, Mojibian M, Covey SD, Kieffer TJ. Insulin knockout mice have extended survival but volatile blood glucose levels on leptin therapy. *Journal of Endocrinology* 2016; 157(3): 1007-1012. doi: 10.1210/en.2015-1890.
83. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research* 2011; 343: 289-302.
84. Nunn K, Frampton I, Lask B. Anorexia nervosa – a noradrenergic dysregulation hypothesis. *Medical Hypotheses* 2012; 78(5): 580-584.
85. Omodei D, Pucino V, Labruna G, Procaccini C, Galgani M, Perna F, Pirozzi D, De Caprio C, Marone G, Fontana L, Contaldo F, Pasanisi F, Matarese G, Sacchetti L. Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism* 2015; 64(3): 396-405. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.025.
86. Ostrowska Z, Ziora K, Oświęcimska J, Świętochowska E, Marek B, Kajdaniuk D, Strzelczyk J, Gołębek K, Morawiecka-Pietrzak M, Wołkowska-Pokrywa K, Kos-Kudła B. Vaspin and selected indices of bone status in girls with anorexia nervosa. *Endokrynologia Polska* 2016; 67(6): 599-606. doi: 10.5603/EP.2016.0070.
87. Oświęcimska J, Ziora K, Geisler G, Broll-Waśka K. Prospective evaluation of leptin and neuropeptide Y (NPY) serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuroendocrinology Letters* 2005; 26(4): 301-304.
88. Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, Srinivas P, Chamouni A, Lugani F, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I, Karsenty G. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *The Journal of Clinical Investigation* 2013; 123: 2421-2433.
89. Paradowska A, Sieja A. Oral cavity in oral disorders. *Gastroenterologia Polska* 2010; 17(2): 111-114.
90. Paszyńska E, Schlueter N, Slopian A, Dmitrzak-Weglarz M, Dyszkiewicz-Konwinska M, Hannig C. Salivary enzyme activity in anorexic persons – a controlled clinical trial. *Clinical Oral Investigations* 2015; 19(8): 1981-1989. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1442-3>.
91. Peluso I, Raguzzini A. Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans. *Pathology Research International* 2016; ID 5480267. doi: 10.1155/2016/5480267.
92. Petta S, Di Marco V, Di Stefano R, Cabibi D, Cammà C, Marchesini G, Craxì A. TyG index: HOMA score and viral load in patients with chronic hepatitis C due to genotype 1. *Journal of Viral Hepatitis* 2011; 18(7): e372-e380. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01439.x.
93. Płudowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MM, Haq A, Povoroznyuk V, Balatska N, Barbosa AP, Karonova T, Rudenka E, Misiorowski W, Zakharova I, Rudenka A, Łukaszewicz J, Marcinowska-Suchowierska E, Łaszcz N, Abramowicz P, Bhattoa HP, Wimalawansa SJ. Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2018; 175: 125-135.
94. Pradeep AR, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K. Vaspin: a new adipokine correlating the levels of crevicular fluid and tear fluid in periodontitis and obesity. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 2017. doi: 10.1111/jicd.12149.
95. Qi D, Wang D, Zhang C, Tang X, He J, Zhao Y, Deng X. Vaspin protects against LPS-induced ARDS by inhibiting inflammation, apoptosis and reactive oxygen species generation in pulmonary endothelial cells via the Akt/GSK-3 β pathway. *International Journal of Molecular Medicine* 2017; 40: 1803-1817.
96. Riffenburgh RH. *Statistics in medicine* (Third Edition). Elsevier, Boston, 2012.
97. Romanos GE, Javed F, Romanos EB, Williams RC. Oro-facial manifestations in patients with eating disorders. *Appetite* 2012; 59(2): 499-504.
98. Ruciński M, Nowak KW, Chmielewska J, Ziółkowska A, Malendowicz LK. Neuropeptide W exerts a potent suppressive effect on blood leptin and insulin concentrations in the rat.

- International Journal of Molecular Medicine 2007; 9: 401-405.
99. Rybakowski F, Słopeń A, Tyszkiewicz-Nwafor M. Inverse relationship between leptin increase and improvement in depressive symptoms in anorexia nervosa. *Neuroendocrinology Letters* 2014; 35, 1: 64-67.
100. Rylander M, Brinton JT, Sabel AL, Mehler PS, Gaudiani JL. A comparison of the metabolic complications and hospital course of severe anorexia nervosa by binge-purge and restricting subtypes. *Eating Disorders* 2017; 25(4): 345-357. doi: 10.1080/10640266.2016.1269555.
101. Sabooria S, Hosseinzadeh-Attara MJ, Yousefi E, Hosseini M, Mirzaei K, Ahmadvand Z. The comparison of serum vaspin and visfatin concentrations in obese and normal weight women. *Diabetes & Metabolic Syndrome* 2015; 9(4): 320-323. doi: 10.1016/j.dsx.2013.10.009.
102. Sakurai T. NPBWR1 and NPBWR2: Implications in energy homeostasis, pain, and emotion. *Frontiers in Endocrinology NLM* 2013; 4: 23. doi: 10.3389/fendo.2013.00023.
103. Sainz N, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Ramírez B, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G. Leptin administration downregulates the increased expression levels of genes related to oxidative stress and inflammation in the skeletal muscle of ob/ob mice. *Mediators Inflammation* 2010; 784343. doi: 10.1155/2010/784343.
104. Salmonowicz B, Krzystek-Korpacka M, Noczyńska A. Trace elements, magnesium, and the efficacy of antioxidant systems in children with type 1 diabetes mellitus and in their siblings. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2014; 23,(2): 259-268.
105. Schulz BL, Cooper-White J, Punyadeera CK. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Critical Reviews in Biotechnology* 2013; 33(3): 246-259. doi: 10.3109/07388551.2012.687361.
106. Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmałek E, Ruciński M, Szczepankiewicz D, Sassek M, Wojciechowicz T, Kaczmarek P, Kołodziej PA, Strowski MZ, Malendowicz LK, Nowak KW. Neuropeptide B and W regulate leptin and resistin secretion, and stimulate lipolysis in isolated rat adipocytes. *Regulatory Peptides* 2012; 176: 51-56.
107. Soedling H, Hodson DJ, Adrianssens AE, Gribble FM, Reimann F, Trapp S, Rutter GA. Limited impact on glucose homeostasis of leptin receptor deletion from insulin- or proglucagon-expressing cells. *Molecular Metabolism* 2015; 25: 619-630.
108. Solmi M, Veronese N, Luchini C, Manzato E, Sergi G, Favaro A, Santonastaso P, Correll CU. Oxidative stress and antioxidant levels in patients with anorexia nervosa after oral re-alimentation: A systematic review and exploratory meta-analysis. *European Eating Disorders Review* 2016; 24(2): 101-105. doi: 10.1002/erv.2420.
109. Solmi M, Veronese N, Manzato E, Sergi G, Favaro A, Santonastaso P, Correll CU. Oxidative stress and antioxidant levels in patients with anorexia nervosa: A systematic review and exploratory meta-analysis. *International Journal of Eating Disorders* 2015; 48(7): 826-841. doi: 10.1002/eat.22443.
110. Starup-Linde J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2013; 8: 21. doi: 10.3389/fendo.2013.00021. eCollection 2013.
111. Stheneur C, Ali A, Tric L, Curt F, Hubert T, Godart N. Impact of somatic severity on long-term mortality in anorexia nervosa. *Eating and Weight Disorders* 2017; 22(2): 285-289. doi: 10.1007/s40519-016-0346-9.
112. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion HIV AIDS*. 2010; 5: 463-466.
113. Strother E, Lemberg R, Stanford SC, Turberville D. Eating disorders in men: underdiagnosed, undertreated, and misunderstood. *Eating Disorders* 2012; 20: 346-355.
114. Szponar L, Wolnicka K, Rychlik E. Album fotografii produktów i potraw. Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie, Warszawa 2000.
115. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use James Lind Institute. <https://www.jlitedu.com>. Data wejścia: 06.02.2018.
116. Takenoya F, Wang L, Kageyama H, Hirako S, Wada N, Hashimoto H, Ueta Y, Sakagami J, Nonaka N, Shioda S. Neuropeptide W - induced hypophagia is mediated through corticotropin-releasing hormone-containing neurons. *Journal of Molecular Neuroscience* 2015; 56: 789-798.

117. Treasure J, Cardi V. Anorexia nervosa, theory and treatment: Where are we 35 years on from Hilde Bruch's Foundation Lecture? *European Eating Disorders Review* 2017; 25(3): 139-147. doi: 10.1002/erv.2511.
118. Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, Doulgeraki A, Marmarinos A, Gali-Tsinopoulou A, Karavanaki K. Higher levels of s-RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: A multivariate cross-sectional analysis. *Osteoporosis International* 2016; 27: 1631-1643.
119. Victor VM, Rovira-Llopis S, Saiz-Alarcon V, Sangüesa MC, Rojo-Bofill L, Bañuls C, Falcón R, Castelló R, Rojo L, Rocha M, Hernández-Mijares A. Altered mitochondrial function and oxidative stress in leukocytes of anorexia nervosa patients. *PLoS One*. 2014; 25, 9(9): e106463. doi: 10.1371/journal.pone.0106463.
120. von Loeffelholz C, Möhlig M, Arafat AM, Isken F, Spranger J, Mai K, Randeva HS, Pfeiffer AF, Weickert MO. Circulating vaspin is unrelated to insulin sensitivity in a cohort of nondiabetic humans. *European Journal of Endocrinology* 2011; 162: 507-513. <http://www.eje-online.org/content/162/3/507.long>. Data wejścia: 06.02.2018.
121. Welch E, Ghaderi A. Mortality in anorexia nervosa – a look back at and beyond one of the most cited papers in the field. *Advances in Eating Disorders* 2015; 3(2): 221-229 <https://doi.org/10.1080/21662630.2014.968177>. Data wejścia: 06.02.2018.
122. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>. Data wejścia: 06.02.2018.
123. Wojtasik A, Jarosz M., Stoś K. Składniki mineralne [W:] Normy żywienia dla populacji Polski, Jarosz M. [red.], Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2017; 203-237.
124. Youn B-S, Klötting N, Kratzsch J, Lee N, Park JW, Song E-S, Ruschke K, Oberbach A, Fasshauer M, Stumvoll M, Blüher M. Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2008; 57(2): 372-377. <https://doi.org/10.2337/db07-1045>. Data wejścia: 06.02.2018.
125. Zhang L, Yagi M, Herzog H. The role of NPY and ghrelin in anorexia nervosa. *Current Pharmaceutical Design* 2012; 18(31): 4766-4778.
126. Zieger K, Weiner J, Krause K, Schwarz M, Kohn M, Stumvoll M, Blüher M, Heiker JT. Vaspin suppresses cytokine-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes via inhibition of NFκB pathway. *Current Pharmaceutical Design* 2018; 460: 181-188. doi: 10.1016/j.mce.2017.07.022.
127. Zieger K, Weiner J, Kunath A, Gericke M, Krause K, Kern M, Stumvoll M, Klötting N, Blüher M, Heiker JT. Ablation of kallikrein 7 (KLK7) in adipose tissue ameliorates metabolic consequences of high fat diet-induced obesity by counteracting adipose tissue inflammation in vivo. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018; 75(4): 727-742. doi: 10.1007/s00018-017-2658-y.

Teresa Góral