

dr hab. n. wet. Małgorzata Dzierżęcka  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Katedra Nauk Morfologicznych  
SGGW, Warszawa  
malgorzata\_dzierzecka@sggw.edu.pl

Warszawa, 3 czerwca 2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej - Stolarczyk pod tytułem: „Wpływ pyłku sosnowego na mineralizację i wytrzymałość mechaniczną układu kostnego samców szczurów w warunkach doświadczalnej osteopenii wywołanej orchidektomią” wykonanej w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.**

Niniejsza recenzja została wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 25 kwietnia 2024 r., w postępowaniu wszczętym w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria, w myśl zapisów Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm).

Przedstawiona do recenzji dysertacja Pani lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej - Stolarczyk, wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Radosława Piorta Radzkiego oraz dr n. med. Pawła Polaka, jako promotora pomocniczego.

Praca została przygotowana jako monografia i zawiera 10 rozdziałów: Przegląd piśmiennictwa, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis skrótów, Piśmiennictwo, Streszczenie oraz Summary. Rozprawa doktorska liczy 105 stron, zawiera 8 tabel i 14 rycin oraz 306 pozycji literaturowych.

W pierwszej części pracy, zatytułowanej „Przegląd piśmiennictwa”, liczącej 23 strony, Autorka opisuje na początku biologiczne znaczenie związków fitosterolowych oraz ich korzystny wpływ na organizm człowieka oraz zwierząt. Doktorantka podkreśla podobieństwo strukturalne związków izolowanych z roślin i hormonów zwierzęcych, takich jak estrogeny oraz androgeny, powołując się przy tym na bogate piśmiennictwo naukowe. Autorka zwraca szczególną uwagę na działania związków zawartych w roślinach, takich jak fitoestrogeny, będące niesteroidowymi związkami, które swoją budową strukturalną przypominają 17 $\beta$ -estradiol oraz fitoandrogeny, których struktura chemiczna jest podobna do androgenów. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka przedstawia szczegółową charakterystykę oddziaływania związków o charakterze fitoandrogenów na organizm człowieka. Opisuje ich

wielorakie działanie, podkreślając przy tym oddziaływanie pobudzające na receptory androgenowe. Autorka zwraca jednocześnie uwagę na działanie innych związków należących do tej grupy, które wywołują odpowiedź antagonistyczną. Następnie w sposób jasny i przejrzysty opisuje stosowanie poszczególnych fitoandrogenów w medycynie ludzkiej, szczególnie na okoliczność zaburzeń ze strony układu rozrodczego oraz nerwowego. W mojej ocenie, obszerny wstęp, w którym Autorka powołuje się na liczne źródła naukowe, świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjętych badań. Rozdział ten w szczegółowy i rzetelny sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia stanowiące temat dysertacji doktorskiej.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Cel pracy” zostały sformułowane cele jakimi było: określenie osteotropowego wpływu dwóch różnych dawek pyłku sosnowego na metabolizm tkanki kostnej, na gęstość mięśni podudzia oraz na kumulację w mięśniach tkanki tłuszczowej u samców szczurów po obustronnej orchidektomi. Należy zauważyć, że w ostatnich latach w medycynie ludzkiej pojawił się trend powrotu do naturalnych metod leczenia. W tym kontekście cele postawione przez Doktorantkę nabierają szczególnego znaczenia. Rosnące zainteresowanie naturalnymi metodami terapeutycznymi wskazuje na potrzebę poszukiwania alternatywnych rozwiązań, szczególnie w odniesieniu do chorób przewlekłych oraz problemów związanych z opornością na leki. Zatem podjęta przez Doktorantkę tematyka jest jak najbardziej aktualna.

Rozdział 3, zatytułowany „Materiał i Metody” obejmuje 10 stron. Aby zrealizować zamierzone cele, Doktorantka jako grupę badawczą wybrała samce szczurów należące do szczepu Wistar w liczbie 40 osobników. Autorka podzieliła badane zwierzęta na 5 grup, liczących po 8 szczurów. Osobniki przynależne do 4 spośród 5 grup, zostały poddane orchidektomii. Osobniki z pierwszej grupy, miały pozostawione jądra i stanowiły grupę kontrolną. W tabeli 1 Doktorantka zaprezentowała dawkowanie oraz sposób podawania płynu fizjologicznego, testosteronu oraz pyłku sosnowego w dwóch różnych dawkach w poszczególnych grupach zwierząt. W kolejnej części tego rozdziału, Autorka w szczegółowy i precyzyjny sposób opisała metodę pośmiertnego przeprowadzenia densytometrycznej oceny szkieletu badanych osobników. Doktorantka określała zawartość mineralną, gęstość mineralną kośćca i jego powierzchnię oraz zawartość mineralną, gęstość mineralną i powierzchnię izolowanych kości piszczelowych. Tomograficzna analiza kości została wykonana dzięki zastosowaniu obwodowego ilościowego tomografu komputerowego z użyciem referencyjnego oprogramowania. Doktorantka przeprowadziła ponadto analizę wytrzymałościową badanych kości piszczelowych z wykorzystaniem metody trójpunktowego testu ugięcia. Do analizy morfometrycznej istoty gąbczastej kości piszczelowych Autorka



zastosowała mikrotomograf komputerowy SkyScan. Wyniki analizy struktury wewnętrznej badanych kości zostały wygenerowane za pomocą oprogramowania dedykowanego do powyższego tomografu.

Kolejnym etapem badań była ocena tkanki mięśniowej prawej kończyny miedniczej. W badaniu tym Doktorantka posłużyła się obwodowym ilościowym tomografem komputerowym (pQCT).

Autorka dokonała także oceny wybranych wskaźników metabolicznych tkanki kostnej w surowicy. Były to następujące wskaźniki: C-końcowy telopeptyd kolagenu typu I, osteokalcyna oraz specyficzna dla kości fosfataza zasadowa. W badaniach zastosowano komercyjne testy immunoenzymatyczne (ELISA). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. W mojej ocenie na uwagę zasługuje szczegółowy i precyzyjny opis metodyki przeprowadzonych pomiarów.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Wyniki”, obejmującym 18 stron, zostały zaprezentowane wyniki przeprowadzonego eksperymentu. Dane zostały przedstawione w sposób przejrzysty zarówno w formie opisowej, jak też w formie starannie opisanych dwunastu, rycin oraz czterech tabel. Niezwykle ciekawym odkryciem, dokonany dzięki zastosowaniu analizy densytometrycznej było wykazanie, że w grupach szczurów, po orchidektomii, podawanie testosteronu lub wysokich dawek doustnych pyłku sosnowego, w podobnym stopniu zapobiega zmniejszeniu zawartości składników mineralnych w szkieletach badanych osobników. Zjawisko powyższe stwierdzono w odniesieniu zarówno do całego szkieletu, jak też w odniesieniu do wyizolowanych kości piszczelowych. Zawartość mineralna tkanki kostnej (BMC) całego szkieletu jak również gęstość mineralna (BMD) tkanki kostnej całego szkieletu były jednocześnie zbliżone do tychże wartości w grupie kontrolnej, czyli w grupie osobników nie poddanych orchidektomii.

Analiza wybranych parametrów wyizolowanych kości piszczelowych, wykonana metodą tomografii komputerowej, potwierdziła, że podawanie pyłku sosnowego w wyższej dawce, hamuje zmiany zanikowe istoty zbitnej kości i pozwala na zachowanie parametrów wytrzymałościowych na poziomie grupy kontrolnej oraz grupy otrzymującej testosteron. Innym niezwykle ciekawym spostrzeżeniem było wykazanie, że podawanie testosteronu lub pyłku sosnowego w odpowiednio wysokich dawkach, hamuje zmiany zanikowe mięśni po orchidektomii.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Dyskusja”, a liczącym 16 stron, Autorka omówiła szczegółowo otrzymane wyniki porównując je z dostępną literaturą naukową, pochodzącą w dużej mierze z ostatnich lat.

Osiągnięte wyniki pozwoliły na sformułowanie pięciu, w pełni uzasadnionych wniosków. Doktorantka wykazała, że pyłek sosnowy posiada działanie osteoprotekcyjne a wpływ na zawartość minerałów oraz gęstość mineralna w tkance kostnej zależy od zastosowanej dawki. Kolejnym ciekawym spostrzeżeniem była ocena zależności dawki podawanego pyłku sosnowego na istotę zbitą i istotę gąbczastą tkanki kostnej. Autorka w swoim doświadczeniu wykazała, że podawanie niższej dawki pyłku sosnowego skutkuje osteoprotekcyjnym działaniem wyłącznie na istotę gąbczastą, podczas gdy zastosowanie trzykrotnie wyższej dawki hamuje zmiany zanikowe kości, wywołane brakiem oddziaływania testosteronu, zarówno w obrębie istoty zbitej, jak również istoty gąbczastej tkanki kostnej. Doktorantka zaobserwowała, że wyższe dawki pyłu sosnowego dodatkowo hamują kataboliczny wpływ orchidektomii na mięśnie podudzia, jak również ograniczają kumulację śródmięśniowej i podskórnej tkanki tłuszczowej.

Uzupełnieniem dysertacji doktorskiej jest spis skrótów oraz wykaz piśmiennictwa, który obejmuje imponującą liczbę 306 pozycji naukowych. Cytowane prace są właściwie dobrane i w dużej mierze pochodzą z ostatnich lat.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma istotną wartość poznawczą i aplikacyjną. Zaprezentowane wyniki dostarczają cennej wiedzy na temat osteoprotekcyjnej skuteczności stosowania wysokich dawek pyłku sosnowego i mogą być wykorzystane w profilaktyce osteoporozy u samców różnych gatunków ssaków w tym także u mężczyzn. Praca została prawidłowo zaprojektowana i zrealizowana, wnosząc istotne dane do dyscypliny Weterynaria.

Z obowiązku recenzenta, pozwolę sobie zwrócić uwagę na niektóre błędy występujące w pracy, jak również pewne informacje budzące moje wątpliwości:

- W tytule pojawia się błąd literowy: jest „... w warunkach doświadczalne”, powinno być : „w warunkach doświadczalnej”.
- Na str. 2, Autorka przytacza cytat: „primum non nocere” - „po pierwsze nie szkodzić”, co jest łacińskim odpowiednikiem podstawowej zasady postępowania lekarza, sformułowanej po grecku przez Hipokratesa. Doktorantka jako autora tej sentencji podaje natomiast Imhotepa.
- Pojawiają się niejasne sformułowania, takie jak na przykład: „Uszkodzenia oksydacyjne są istotnym czynnikiem etiologicznym wielu przewlekłych chorób człowieka...”. Uszkodzenia oksydacyjne są raczej następstwem niekorzystnych czynników takich jak np. niewłaściwa dieta, promieniowanie UV, metale ciężkie itd. Wówczas powstają wolne rodniki, które nie są zatem czynnikiem etiologicznym samym w sobie, lecz raczej pojawiają się w wyniku działania ww. bodźców.



- Niezrozumiałe są niektóre zdania, np.: „Pyłek sosnowy [...] pochodzi głównie z gatunków *Pinus massoniana* Lamb., z *Pinus tabuliformis* Carriere i innych roślin tego samego gatunku.” Albo: „... wydzielenie testosteronu przez komórki Leydiga jest dwuetapowe. Rozpoczyna się u ludzi w ok. 6 tyg. życia płodowego, a następnie w okresie dojrzewania.”
- Autorka powołuje się w pracy na medycynę chińską, przytaczając informacje nieprecyzyjne i niezrozumiałe: „... właściwości zdrowotne pyłku sosnowego opisano po raz pierwszy w chińskiej książce o rolnictwie i roślinach leczniczych, w której wskazano, że pyłek sosnowy może [...] „rozpraszać zimno lub gorąco w sercu i brzuchu”, a jeśli stosowany jest przez długi czas, może "rozjaśniać ciało" i przedłużać życie. Przypisuje się mu również zdolność do uzupełniania energii qi, która w tradycyjnej medycynie chińskiej uważana jest za filar prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu”. Tego typu sformułowania, są kontrowersyjne. Z racji tego, że Doktorantka powołuje się na źródła naukowe, zatem pozostawienie tych fragmentów w dysertacji jest elementem do polemiki.
- Pierwszy akapit rozdziału „Cel pracy” stanowi kontynuacją wstępu i powinien należeć do wcześniejszego rozdziału. Z kolei informacje znajdujące się na końcu tego rozdziału, dotyczące grupy badawczej, sugerują przeniesienie do rozdziału kolejnego – „materiał i metody”.
- W opisie materiału badawczego brakuje danych na temat wieku szczurów, które zostały wykorzystane w badaniach. Doktorantka opisuje wprawdzie na początku rozdziału, tj. na str. 25, że były to samce „Dojrzałe pod względem hodowlanym”, jednak w dalszej części tego rozdziału, na str. 31, podaje, że w kościach były obecne „płytki wzrostowe”. Istotne jest zatem doprecyzowanie wieku badanych osobników oraz określenie czy były to szczury dojrzałe szkieletowo czy też posiadały chrząstki wzrostowe.
- W tabeli 1 nie do końca jasny jest opis dawkowania płynu fizjologicznego, testosteronu oraz pyłku sosnowego w poszczególnych grupach zwierząt. Co oznacza określenie: 0,5 ml/100 g m.c./24h p.o. Domyślam się, że chodzi tutaj o dawkowanie 0,5 ml/100 g m.c./co 24 godziny p.o., jednak należałoby to uściślić.
- W tabeli 1 Autorka podaje informację, że grupa oznaczona symbolem ORX-TEST otrzymywała testosteron: „7 mg/ kg masy ciała/7 dni s.c.”, natomiast na kolejnej stronie podaje: „podawanie płynu fizjologicznego, testosteronu oraz dwóch dawek pyłku sosnowego, trwało 60 dni”. Także w tym przypadku istotne byłoby doprecyzowanie jak dawkowano omawiane substancje.
- Ze stwierdzeń: „Krew pobrana została z punkcji dosercowej, a po odwirowaniu otrzymano osocze do badań biochemicznych. Całość uzyskanego w toku doświadczenia materiału

biologicznego została zamrożona w temp. -30 °C do dalszych analiz.” wynikałoby, że osocze także zostało zamrożone. Należałoby to uściślić.

- zamiast określeń: tkanka kostna zbita oraz tkanka kostna gąbczasta, sugeruję stosowanie mian: istota zbita, *substantia compacta* oraz istota gąbczasta *substantia spongiosa*, które to należą do tkanki kostnej drobnowłoknistej (blaszkowatej), *textus osseus lamellaris*.

- Rozdział 10., zatytułowany jest w spisie treści jako „Summary”, natomiast w dalszej części pracy nosi tytuł „Abstract”, ponadto po streszczeniu zarówno w języku polskim jak i angielskim brakuje słów kluczowych.

Podsumowując niniejszą recenzję, po uwzględnieniu wymogów stawianych rozprawom doktorskim stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej - Stolarczyk stanowi oryginalne rozwiązanie problemu zdefiniowanego w tytule, jak i celu. Doktorantka posiada dobre rozeznanie w światowej literaturze związanej z prowadzonymi badaniami i potrafi z niej umiejętnie korzystać. Pani lek. wet. Małgorzata Manastyrska - Stolarczyk wykazała się umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Z recenzowanej rozprawy doktorskiej wynika, że Doktorantka jest w stanie zaprojektować proces badawczy, uzyskać i opracować materiał, dobrać odpowiednie metody badawcze i w prawidłowy sposób z nich korzystać. Uwzględniając powyższe uwagi, należy uznać, że przedstawiona rozprawa doktorska może być podstawą nadania stopnia naukowego doktora. Pomimo wskazanych w recenzji uwag, dysertacja w pełni spełnia wszystkie wymogi dla rozprawy doktorskiej określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm). Dlatego, też zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej - Stolarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Małgorzata Dziągwa*