



Rzeszów, dnia 14.07.2024

Prof. dr hab. n. med. Rafał Filip  
Katedra Chorób Wewnętrznych  
Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego  
Klinika Gastroenterologii  
z Ośrodkiem Kompleksowego Leczenia NChZJ  
KSW 2 w Rzeszowie

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

***Wpływ pyłku sosnowego na mineralizację i wytrzymałość mechaniczną układu kostnego  
samców szczurów w warunkach doświadczalnej osteopenii wywołanej orchidektomią***

wykonanej przez lek. wet. Małgorzatę Manastyrską-Stolarczyk

i zrealizowanej w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Roślinne sterole (fitosterole), są powszechnie występującym składnikiem diety u ludzi i zwierząt. Od wielu lat są intensywnie badane z uwagi na ich duży potencjał w zakresie właściwości prozdrowotnych i możliwe zastosowanie jako substancji pomocniczych w leczeniu i zapobieganiu wielu chorobom. Pomimo że wyniki wielu eksperymentów dotyczących prozdrowotnych właściwości fitosteroli są niejednoznaczne, to aktualny stan wiedzy pozwala na coraz szersze ich zastosowanie do leczenia i profilaktyki schorzeń metabolicznych, jak na przykład dyslipidemie czy otyłość, a także niektórych zaburzeń immunologicznych i neurologicznych.

Szczególnie interesującą grupę stanowią roślinne sterole, których chemiczna struktura przypomina hormony płciowe - tj. estrogeny i androgeny. Dlatego też podkreśla się ich potencjalne prozdrowotne właściwości tych substancji, między innymi w aspekcie korzystnego wpływu na metabolizm tkanki kostnej. Dotychczasowe doniesienia naukowe dotyczące wpływu fitoandrogenów na kości koncentrują się głównie na *Eucommia ulmoides*, od wieków stosowanej w medycynie tradycyjnej dalekiego wschodu z uwagi na udokumentowane właściwości wzmacniania układu kostno-szkieletowego.

Jednym z najbogatszych źródeł fitoandrogenów w przyrodzie jest pyłek sosnowy (*Pinus tabulaeformis*), który od tysięcy lat jest stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej jako suplement diety zwiększający diurezę, pobudzający krążenie, a także zwiększający wydolność fizyczną organizmu. Współczesne badania naukowe dodatkowo dokumentują jego działanie immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i antyoksydacyjne, a także przeciwzapalne i hepatoprotekcyjne. Pomimo, że w swoim składzie zawiera liczne substancje odżywcze jak aminokwasy (arginina, leucyna, lizyna, metionina, fenyloalanina, cysteina, tryptofan i tyrozyna), mikro i makroelementy (selen, żelazo, mangan, miedź, fosfor, potas), witaminy z grupy B i witaminę D3, kwas fenolowy, lignany oraz alfa oraz beta-pinen, borneol, octan bornylu, limonen, izoborneol, torpineol, karen, felandreny, kariofilen, kamafen, to jednak najistotniejsza wydaje się zawartość testosteronu oraz dehydroepiandrostenonu (DHEA). Badania dotyczące wpływu testosteronu i DHEA pyłku sosnowego na organizm ludzi i zwierząt wykazały kilka ich właściwości bardzo interesujących z punktu widzenia opóźnienia procesów starzenia, a także wykazały ich silny efekt przeciwzapalny i przeciwbólowy.

W medycynie powszechnie znany jest pozytywny wpływ syntetycznego testosteronu na metabolizm tkanki kostnej, jednakże powszechne zastosowanie hormonalnej terapii zastępczej u mężczyzn w okresie andropauzy jest ograniczone m.in. dość istotnymi działaniami ubocznymi testosteronu. Dlatego też interesującą alternatywą z punktu widzenia bezpieczeństwa terapii wydaje się zastosowane hormonów pochodzenia naturalnego – fitoandrogenów. Z uwagi na powyższe, badania osteotropowego wpływu różnych dawek pyłku sosnowego, podawanego *per os* na metabolizm tkanki kostnej samców szczurów w warunkach rozwoju zmian zanikowych kości indukowanych obustronną orchidektomią stanowią bardzo interesujący i innowacyjny kierunek w żywieniu i dietoterapii człowieka i zwierząt.

### **Ocena formalna rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska, to praca o strukturze typowej dla prac biomedycznych. Praca zawarta jest na 104 ponumerowanych stronach, w tym zasadniczego tekstu jest 68 stron. Pozostała część pracy stanowią streszczenie polskie (strony 98-100), streszczenie angielskie (strony 101-104). W tekście rozprawy zawarto 8 tabel oraz 14 rycin, które są komplementarne do prezentowanego tekstu pracy.

Na przeprowadzenie badań stanowiących podstawę recenzowanej rozprawy Autorka uzyskała zgodę Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Lublinie, która została zawarta w uchwale nr 92/2019. Badania zostały przeprowadzone w Ośrodku Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, natomiast analizę materiału biologicznego wykonano w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Praca została przygotowana z zachowaniem reguł języka polskiego. Konstrukcje gramatyczne zdań są poprawne i jasne, a tekst pracy został poprawnie sformatowany. Na uwagę zasługuje staranność Doktorantki w przygotowania manuskryptu rozprawy doktorskiej.



## Ocena merytoryczna rozprawy

**Wstęp** pracy to 18 stronicowe opracowanie, w którym Autorka podała podstawowe informacje na temat związków fitosterolowych oraz zaznajomiła czytelnika ze związkiem fitoandrogenów z zaburzeniami seksualnymi, potencjalnym ich wpływem na onkogenezę, a także przedstawiła ich związek z otyłością i zespołem metabolicznym. Kolejno opisuje aktywność przeciwutleniająca fitoandrogenów a także ich wpływ na kości. Dalsza części rozdziału poświęcona jest pyłkowi sosnowemu oraz wpływowi jego głównych składników-fitoandrogenów na metabolizm tkanki kostnej u samców. Rozdział wieńczy kilka stron poświęconych problematyce osteoporozy u mężczyzn.

Rozdział **Wstęp** został przygotowany w oparciu prawidłowo dobraną literaturę w liczbie aż 306 pozycji. Świadczy to o dogłębnej znajomości podjętego tematu, a opis dotychczasowego stanu wiedzy w przedmiocie sprawy, przedstawiony przez Autorkę, uzasadnia podjęcie przez nią przedstawionej powyżej tematyki badawczej. Ponadto, z uwagi na fakt, że rozdział ten cechuje spójność i systematyczność w zakresie prezentowanej wiedzy, po jego niewielkiej modyfikacji, mógłby zostać opublikowany jako praca przeglądowa.

Część badawczą rozpoczyna jasno sformułowany **Główny cel badań** uzupełniony dwoma drugorzędowymi celami badawczymi, którymi lek. wet. Małgorzatę Manastyrską-Stolarczyk postanowiła wzbogacić swoje przedsięwzięcie badawcze. Zdaniem recenzenta wszystkie one dotyczą one bardzo ważnego wątku badań poszukującego nowych metod profilaktyki osteoporozy poandropauzalnej u mężczyzn.

W rozdziale **Materiał i metody** Autorka przedstawia zastosowany materiał oraz wykorzystane metody badawcze. Dokładnie został opisany sposób przeprowadzenia eksperymentu, metoda podziału zwierząt na grupy, warunki hodowlane, sposób przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych oraz pobrania materiału do badań pQCT i badań wytrzymałościowych kości. Opisano również sposób żywienia zwierząt. W dalszej części Autorka opisała metodę (tj. absorpcjometrię podwójnej wiązki promieniowania rentgenowskiego - DXA) oraz warunki i sposób oznaczenia gęstości mineralnej tkanki kostnej i składu ciała. W podobny sposób przedstawiona została metodologia badań z zastosowaniem obwodowej tomografii komputerowej kości (pQCT) wraz z dokładnym opisem, w formie tabelarycznej, wszystkich parametrów tomograficznej oceny kośćca. Kolejny opis dotyczy

sposobu wyznaczania parametrów wytrzymałościowych izolowanych kości udowych oraz piszczelowych w oparciu o trójpunktowy test ugięcia dla próbki o przekroju rury. W dalszej części Autorka przedstawia metodologię analiz tkanki mięśniowej z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT) włączając w to szczegółowy opis uzyskanych parametrów tj. powierzchni mięśni (mCSA), gęstości mięśni (MD), powierzchni tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej (IMAT), oraz powierzchni tkanki tłuszczowej podskórnej (SAT). Końcowe fragmenty rozdziału **Materiał i metody** przedstawiają listę i podstawowa charakterystykę wykonanych oznaczeń biochemicznych - markerów obrotu kostnego. Generalnie, całość opisów postępowań metodycznych spełnia podstawowe wymagania stawiane współczesnym pracom badawczym, a opisy świadczą o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i jego znajomości praktycznej.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników autor przeprowadziła przy użyciu programu STATISTICA 13.3 PL, a wybór testów należy uznać za odpowiedni dla tego typu badań.

Rozdział pt. **Wyniki** Autorka zawarła ją na 19 stronach tekstu. Opis wyników badań został uzupełniony 3 tabelami oraz 12 rycinami. Wyniki zaprezentowane są w sposób komunikatywny. Chcę podkreślić, że zrealizowanie, a następnie opracowanie uzyskanych wyników należało do przedsięwzięć praco- i czasochłonnych, wymagających od Doktorantki cierpliwości i wytrwałości, a ponad to dobrego przygotowania oraz znajomości badanej problematyki.

Przeprowadzone przez Autorkę eksperymenty na modelu szczura z rozwijającymi się zmianami zanikowymi kości wykazały, zależne od dawki, osteoprotekcyjne działanie pyłku sosnowego. Dawka 150 mg/kg m.c całkowicie hamowała zmiany zanikowe kości wywołane brakiem ochronnego wpływu hormonów gonadalnych, a efekt ten był widocznym zarówno w obrębie tkanki kostnej zwartej, jak i gąbczastej. Podawanie orchidektomizowanym szczurom mniejszych dawek pyłku tj. 50 mg/kg m.c oznaczało mniej spektakularny, ale również zauważalny efekt osteoprotekcyjny, głównie w zakresie tkanki kostnej gąbczastej. W dalszym toku prac stwierdzono, że zwiększone dawkowanie pyłku sosnowego hamowała kataboliczny wpływ orchidektomii na mięśnie podudzia, czego wyrazem było utrzymanie ich gęstości i



wielkości powierzchni na poziomie grupy operowanej rzekomo i grupy otrzymującej testosteron. Dodatkowo widoczny był efekt hamowania kumulacji śródmięśniowej i podskórnej tkanki tłuszczowej. Podsumowując Autorka stwierdziła, że obserwowane osteoprotekcyjne efekty aplikacji dużych dawek pyłku sosnowego mogą być punktem wyjścia do dalszych badań w zakresie możliwego ich zastosowania w profilaktyce rozwoju osteoporozy będącej wynikiem deficytu androgenów zarówno u ludzi, jak i u zwierząt.

W dalszej części rozprawy doktorskiej następuje krytyczna **Dyskusja** wyników badań własnych w świetle badań już opublikowanych, wskazując w jakim stopniu są one zgodne, a w jakim różnią się one od tych w dostępnych publikacjach i jak te różnice można wyjaśnić. Dodać należy, że im więcej nowych elementów i zależności wnosi praca, tym wymaga ona szerszego omówienia, co też zaprezentowała Doktorantka, dowodząc tym samym dojrzałości do prowadzenia samodzielnej działalności naukowo-badawczej.

Całość rozprawy doktorskiej podsumowuje 5 wniosków, które są uogólnieniem obserwacji zebranych w trakcie realizacji pracy. Nawiązują one do postawionego celu pracy.

Streszczenie polskojęzyczne, jak i angielskie odpowiadają zawartości rozprawy i pozwalają na szybkie zorientowanie się w jej treści.

Lista bibliografii zawiera 306 pozycji. Doktorantka zastosowała system cytowania prac typowy dla publikacji w czasopismach biomedycznych. Dużym ułatwieniem w zapoznaniu się z literaturą jest zastosowanie listowania referencji zgodnie z ich cytowaniem w tekście rozprawy. Należy podkreślić, że bibliografia jest dobrana starannie i adekwatnie do omawianego tematu. Zwraca uwagę fakt, że cytowana literatura zasadniczo obejmuje prace nowe.

Podsumowując merytoryczną ocenę rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej-Stolarczyk muszę podkreślić, że jest to ważna praca, wnosząca dużo do pogłębienia wiedzy w zakresie badań nad patogenezą zaburzeń metabolizmu tkanki kostnej w stanach niedoboru hormonów androgenowych. Dodatkowo praca ta wpisuje się w szeroki, światowy trend badań nad substancjami pochodzenia naturalnego które mają potencjał w zakresie zapobiegania, a nawet leczenia wybranych chorób cywilizacyjnych, w tym oczywiście również osteoporozy.

Badania zostały przeprowadzone w najlepszym w Polsce i jednym z wiodących w Europie Ośrodku badawczym z wieloletnim doświadczeniem w zakresie badań doświadczalnych nad tkanką kostną, wspieranym odpowiednim zapleczem diagnostycznym w zakresie badań densytometrycznych, obrazowych i wytrzymałościowych kości, jak również naukowym gwarantowanym przez osobę Promotora - Profesora Radosława Piotra Radzkiego.

W bardzo dobrze zorganizowanych badaniach obejmujących reprezentatywną populację zwierząt (szczury szczepu Wistar) podzieloną na 5 grup doświadczalnych Autorka wykazała, że pyłek sosnowy wykazuje działanie osteoprotekcyjne u samców szczurów z rozwijającą się osteopenią indukowaną orchidektomią, a efekty kostne zależne są od użytej dawki. Podawanie pyłku sosnowego w dawce 50mg/kg m.c. skutkuje osteoprotekcyjnym wpływem wyłącznie w obrębie tkanki kostnej gąbczastej, natomiast dawce 150 mg/kg m.c. całkowicie hamuje zmiany zanikowe kości zarówno w obrębie tkanki kostnej zbitej, jak i gąbczastej. Dodatkowo pyłek sosnowy stosowany w większej dawce hamuje kataboliczny wpływ orchidektomii na mięśnie podudzia, czego wyrazem jest utrzymanie ich gęstości i wielkości powierzchni na poziomie grupy operowanej rzekomo i grupy otrzymującej testosteron. Tak dobrana dawka pyłku sosnowego ograniczała również kumulację śródmięśniowej i podskórnej tkanki tłuszczowej. Warto podkreślić implikacje kliniczne uzyskanych wyników. Mianowicie na podstawie uzyskanych wyników Autorka słusznie sugeruje możliwość wykorzystania pyłku sosnowego w profilaktyce osteopenii i osteoporozy zarówno u ludzi jak i u zwierząt.

Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych niedociągnięć językowych i typograficznych. Oczywiście takie mankamenty są nieuniknione i nie mają żadnego wpływu na stronę merytoryczną pracy, którą oceniam jednoznacznie pozytywnie, dlatego ich dokładne wymienianie uznałem za zbędne. Jedyna uwaga jaką chcę zawrzeć w swojej recenzji dotyczy nie wykonania oznaczeń hormonalnych tj. w minimalnym zakresie poziomów testosteronu DHEA co wzbogaciło by pracę pod względem naukowym i pozwoliło głębiej wniknąć w mechanizmy zjawisk opisywanych przez Autorkę.



### Ocena końcowa

Rozprawa doktorska lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej-Stolarczyk jest wartościowym opracowaniem. Badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane w oparciu o adekwatne w stosunku do założonego celu metody badawcze. Autorka wykazała się odpowiednią znajomością warsztatu metodycznego, potrafi tę umiejętność odpowiednio wykorzystywać w pracy eksperymentalnej, a otrzymane wyniki prawidłowo zinterpretować. W zakończeniu przedkładanej recenzji stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej-Stolarczyk pt. **Wpływ pyłku sosnowego na mineralizację i wytrzymałość mechaniczną układu kostnego samców szczurów w warunkach doświadczalne osteopenii wywołanej orchidektomią** odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej lek. wet. Małgorzaty Manastyrskiej-Stolarczyk i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie pragnę podkreślić zdecydowanie ponadprzeciętną pracowitość przeprowadzonych badań oraz duży potencjał aplikacyjny, dlatego też jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie recenzowanej dysertacji.

