Kielce 25.08.2023

dr hab. Aleksander Szczurkowski prof. UJK
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Instytut Nauk Medycznych
Zakład Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej
z Pracownią Histologii i Medycyny Sądowej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Małgorzaty Maliny

pt.: „Rozwój unerwienia stawu biodrowego u psa domowego (*Canis familiaris*)" .

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mieści się w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria. Praca została wykonana w Katedrze Anatomii Zwierząt, na Wydziale Weterynarii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem promotora dr. hab. Waldemara Sienkiewicza, prof. UWM.

Podstawa formalna recenzji:

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 7 lipca 2023 r. zostałem powołany na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej.

Ogólna charakterystyka rozprawy:

Rozprawa doktorska pani Małgorzaty Maliny lek. wet. liczy 82 strony, w tym 3 tabele, 3 ryciny, 35 barwnych fotografii oraz 122 pozycje literatury. Manuskrypt pracy ma charakterystyczny dla opracowań eksperymentalnych układ na który składają się rozdziały: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, literaturę oraz zamieszczony na początku wykaz skrótów stosowanych w opisach rycin i fotografii.

Szczegółowa charakterystyka rozprawy:

Wstęp pracy można podzielić na trzy części. Pierwsza przedstawia szczegółowo budowę stawu biodrowego u psa dokumentując to trzema barwnymi schematycznymi rycinami, opisanymi odpowiednio umieszczonymi skrótami.

Druga część wstępu opisuje schorzenia stawu biodrowego, których efektem jest najczęściej silny ból. Mogą to być schorzenia uwarunkowane genetycznie, związane z wiekiem oraz urazami. Autorka omawia tutaj najczęściej występujące choroby stawu biodrowego u psów takie jak: dysplazja stawu biodrowego, martwica głowy kości udowej (choroba Legg Calve Perthesa), postępujące zwyrodnienie stawów (*osteoarthritis*) czy osteochondrozę (martwica chrzęstno-kostna, zaburzenie kostnienia śródchrzęstnego) oraz stosowane metody ich leczenia.

W części trzeciej doktorantka przestawia unerwienie stawu biodrowego, cytując szereg badań przeprowadzonych na różnych gatunkach zwierząt i zwraca uwagę na różnice w unerwieniu tego stawu w porównaniu z człowiekiem. Staw biodrowy oraz jego torebka unerwione są przez włókna czuciowe oraz włókna układu autonomicznego. Rodzaj tych włókien można określić na podstawie obecności w nich charakterystycznych białek – neuropeptydów. Przeprowadzając barwienia immunohistochemiczne można określić ilość i rodzaj tych markerów. Dokonując analizy literatury w tym zakresie autorka opisuje podstawowe substancje wykrywane we włóknach nerwowych zaopatrujących stawy. Należą do nich: peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP), substancja P (SP) – neuropeptyd z rodziny tachikinin będący mediatorem bólowym, neuropeptyd Y (NPY), β-hydrolaza dopaminy (DβH) odpowiedzialna za konwersję dopaminy w noradrenalinę, galanina (GAL), wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) oraz pęcherzykowy nośnik acetylocholiny (VAChT).

Uzasadniając podjęcie swoich badań doktorantka zwraca uwagę na brak w dostępnej literaturze opracowań dotyczących rozwoju unerwienia stawu biodrowego u zwierząt, a

znajomość tego zagadnienia ma istotne znaczenie w leczeniu jego schorzeń zarówno u zwierząt jak i człowieka.

Uwagi dotyczące wstępu związane są jedynie z edycją tekstu. Moim zdaniem warto by w podpisach rycin zamieścić informację czy jest to np. „przekrój podłużny, rzut boczny", itp. Termin „główka" kości udowej należy zastąpić terminem „głowa" str. 5 wiersz 23, str. 8 wiersz 2, str. 9 wiersz 7.

Celem podjętych przez doktorantkę badań było określenie intensywności rozwoju unerwienia stawu biodrowego u psa w życiu płodowym oraz we wczesnym okresie pourodzeniowym, określenie zmian gęstości tego unerwienia w trakcie rozwoju oraz określenie kolejności pojawiania się różnych neurotransmiterów we włóknach nerwowych zaopatrujących badany staw.

Materiał badawczy został pozyskany podczas owariohisterektomii aborcyjnej suk ciężarnych oraz poddanych eutanazji ślepych miotów (szczenięta do 3 dnia życia). Wyróżniono cztery grupy badawcze po 10 osobników. W grupie pierwszej znalazły się płody do trzeciego tygodnia życia, w drugiej płody pięciotygodniowe, w trzeciej ośmiotygodniowe, a w czwartej 2-3 dniowe szczenięta ze ślepych miotów. W celu uwidocznienia rozwijających się struktur nerwowych zaopatrujących staw biodrowy wykonano preparaty makromorfologiczne, jak również przeprowadzono pojedyncze i podwójne barwienia immunohistochemiczne na skrawkach mrożeniowych. Zastosowane przeciwciała pierwotne i wtórne przedstawiono w formie tabelarycznej – Tabela 1, oraz Tabela 2.

Przedstawione przez doktorantkę wyniki dla każdej grupy badawczej zostały podzielone na dwie części. Pierwsza część to fotografie preparatów makromorfologicznych stawu biodrowego. Niewątpliwie zaletą tej pracy jest precyzyjna preparatyka tych niewielkich struktur, która umożliwiła dokładne wskazanie włókien nerwowych zaopatrujących badany staw. Druga część to badania immunohistochemiczne. Zastosowane zostały tu surowice:

mysie, królicze, szczurze, skierowane przeciwko acetylowanej tubulinie (Acc Tub), β-hydrolazie dopaminy (DβH), substancji P (SP), peptydowemu kodowany genem kalcytoniny (CGRP), galaninie (GAL), neuropeptydowi Y (NPY), wazoaktywnemu peptydowi jelitowemu (VIP). Wykazano obecność włókiem immunoreaktywnych dla wymienionych substancji. Na podkreślenie zasługuje tutaj bardzo dobra jakość fotografii umożliwiająca obserwację bardzo drobnych włókien nerwowych. Niestety w pracy nie zamieszczono wyników barwień przeciwko syntazie tlenku azotu (NO) , którą wymieniono w tabeli nr 1.

Moje drobne uwagi dotyczę jedynie oznaczeń. Fotografia 3 jest powiększeniem wskazanego strzałką obszaru na fotografii 2, a nie 6. Ponadto nieprecyzyjny jest podpis fotografii 9, jest: „powiększenie obszaru górnej stawu biodrowego", brakuje słowa „części". Podpisy fotografii 14 i 15 nie informują jaki jest to przekrój. W opisie fotografii 28 zastosowano oznaczenie M.G.S. – mięsień pośladkowy powierzchowny, którego nie oznaczono na wymienionej fotografii, a z kolei na fotografii są oznaczenia M.S., M.G. oraz T.M.O.F. które nie są wyjaśnione.

W rozdziale dyskusja doktorantka omawia dane literaturowe, porównując je z otrzymanymi wynikami. Jakkolwiek w literaturze prezentowane są opracowania dotyczące unerwienia stawu biodrowego, ale dotyczą one głównie dorosłych osobników. Otrzymane w niniejszych badaniach wyniki wykazały, że staw biodrowy jest zaopatrzony przez włókna nerwowe pochodzące z nerwów: kulszowego, pośladkowego przedniego, zasłonowego i udowego. Autorka zwraca uwagę na istotną różnicę w unerwieniu badanego stawu opisywanego u dorosłych psów, gdzie nie wykazano udziału nerwu zasłonowego, co nie jest zgodne z otrzymanymi przez nią wynikami, które jednoznacznie wykazały obecność gałązek stawowych pochodzących od tego nerwu. Podobne rozbieżności literaturowe dotyczą braku udziału nerwu udowego w zaopatrzeniu stawu biodrowego, co nie znalazło potwierdzenia w otrzymanych wynikach, gdzie obserwowano gałązki pochodzące od tego nerwu. Uzasadnioną

wydaje się być sugestia doktorantki, że spotykane w literaturze różnice związane z unerwieniem badanego stawu mogą być wynikiem różnic międzygatunkowych, a nawet osobniczych.

Znaczącym wynikiem przeprowadzonych przez autorkę badań jest analiza rozwoju unerwienia stawu biodrowego, który wykazuje stopniowy wzrost wraz z wiekiem substancji biologicznie czynnych. Dotyczy to przede wszystkim odpowiedzialnych za transmisję czuciową włókien immunoreaktywnych dla substancji P (SP), dla peptydu związanego z kodowaniem genu kalcytoniny (CGRP) oraz włókien SP/CGRP pozytywnych. Jak wykazuje literatura ilość tych substancji również wyraźnie wzrasta w stanach zapalnych, chorobie reumatoidalnej stawów. Podawanie odpowiednich blokerów umożliwia zmniejszenie stanów zapalnych w chorobach u pacjentów z chorobami zwyrodnieniowymi. W strukturach nerwowych badanego stawu włókna nerwowe zawierają neuropeptyd Y (NPY) oraz NPY wraz z β-hydrolazą dopaminy (DβH). Jak wskazuje literatura niedobory tych substancji skutkują zaburzeniami krążenia oraz problemami o charakterze neurologicznym (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona). Ponadto włókna nerwowe wykazujące obecność pęcherzykowego nośnika acetylocholiny (VAChT) mogą pochodzić nie tylko z neuronów przywspółczulnego autonomicznego układu nerwowego ale również z neuronów czuciowych zaopatrujących staw biodrowy. W niniejszych badaniach wraz z rozwojem organizmu obserwowano wzrost ilości włókien VAChT pozytywnych w ścianie naczyń krwionośnych, co sugeruje ich udział w regulacji przepływu krwi. Jak wskazuje literatura wiąże się to z prawidłowym rozwojem jak i funkcjonowaniem stawu. Zarówno spadek jak i wzrost tego markera u człowieka i dorosłych zwierząt skutkuje zaburzeniami krążenia. Szereg badań potwierdza obecność galaniny (GAL) w neuronach rdzeniowych i autonomicznych zaopatrujących staw biodrowy. Natomiast wzrost poziomu galaniny w wywołanym eksperymentalnie zapaleniem stawu powoduje zmniejszeniem reaktywności na ból i zmniejszeniem stanu zapalnego. Doktorantka w swoich

badaniach wykazuje stopniowy wzrost galanino pozytywnych (GAL+) włókien nerwowych. Pojawiają się one początkowo w błonie włóknistej i ścianach naczyń krwionośnych a następnie w pozostałych strukturach stawu. Świadczyć to może o szerokiej funkcji tego neuropeptydu począwszy od transmisji czuciowej, regulację przepływu krwi czy produkcję mazi stawowej. Jak wynika z literatury wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) pełni funkcję regulacyjną w wielu narządach. Autorka wskazuje na stopniowy wzrost ilości włókien VIP+ zaopatrujących staw biodrowy wraz z wiekiem badanego zwierzęcia a największa ich ilość obserwowana była w błonie maziowej badanego stawu. Natomiast w literaturze odnotowano pewne sprzeczności co do wpływu poziomu tego peptydu (VIP) na rozwój osteoarthritis (zapalenie stawów). Zarówno jego obniżenie jak i wzrost może zwiększać szanse na rozwój tej choroby. Szeroko cytowane przez doktorantkę badania wykazały, że VIP działa przeciwzapalnie i może być stosowany w leczeniu bólu związanego z zapaleniem stawów. W badaniach eksperymentalnych ujawniono działanie obniżające poziom czynników zapalnych i autoimmunologicznych przyczyniających się do reumatoidalnego zapalenia stawów oraz zmniejszenie opuchlin. W przedstawionych przez doktorantkę badaniach często peptyd ten współwystępował z markerem cholinergicznym (VIP/VAChT). Zarówno lokalizacja tych włókien jak i ich możliwe pochodzenie, sugerują takie ich funkcje jak: transmisja czuciowa (włókna w błonie włóknistej, więzadle głowy kości udowej), regulacja przepływu krwi (włókna w ścianie naczyń krwionośnych) czy produkcja mazi stawowej (włókna w błonie maziowej).

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w poznanie rozwoju unerwienia stawu biodrowego z uwzględnieniem najbardziej charakterystycznych markerów neuronalnych. Autorka wykazała się opanowaniem precyzyjnej preparatyki, co skutkowało wykonaniem preparatów anatomicznych z różnych etapów rozwoju badanego

stawu oraz opanowaniem technik barwień immunohistochemicznych, doskonale udokumentowanych i określających stopień, gęstość oraz zakres unerwienia stawu biodrowego. Korekty wymagają niektóre sformułowania niezgodne z nomenklaturą anatomiczna np. „dość grube włókna". Ponadto należy poprawić spis literatury, który nie uwzględnia wszystkich wymienionych w tekście pozycji. Chciałbym wyraźnie podkreślić, że wszystkie moje uwagi mają przede wszystkim charakter edytorski i nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy. Uważam, że przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem anatomicznym i stanowi cenny element wiedzy na temat unerwienia stawu biodrowego.

Stwierdzam, że przedstawiona ro recenzji rozprawa doktorska lek. wet. Małgorzaty Maliny pt.: „Rozwój unerwienia u psa domowego (*Canis familiaris*)" spełnia wymagania określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm. Dz. U. z 2021 r. poz. 478).

Z uwagi na powyższe zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie lek. wet. Małgorzaty Maliny do dalszych etapów postepowania o nadanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych.

Aleksander Szczurkowski



Kielce 25.08.2023