



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA STOMATOLOGII DZIECIĘCEJ  
ZAKŁAD STOMATOLOGII GRUP RYZYKA

ul. Bukowska 70  
60-812 Poznań

tel. 61 854 70 53

Poznań, 29.07.2023

## **RECENZJA**

### **rozprawy doktorskiej**

**mgr inż. technologii żywności Magdaleny Pajączkowskiej**

pt. „Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych i promieniowania laserowego na drobnoustroje izolowane z przewlekłych zakażeń jamy ustnej”

Zdolność zarówno grzybów jak i bakterii do tworzenia struktur biofilmu ma bardzo istotne znaczenie w patogenezie licznych chorób, w tym także tych związanych z jamą ustną. Tworzenie dynamicznej i złożonej przestrzennie struktury biofilmu, a zarazem odmienne cechy fizjologiczne tworzących go drobnoustrojów, mogą częściowo uzasadniać jego wysoką odporność na działanie zróżnicowanych czynników, jak np. antybiotyki, co niewątpliwie prowadzi do trudności w terapii. Dlatego też aktualnie leczenie tego rodzaju zakażeń stanowi znaczące wyzwanie w stomatologii, co determinuje konieczność poszukiwania alternatywnych metod terapeutycznych. Stąd też w opinii recenzenta wybór przez Doktorantkę tematu dysertacji jest w pełni uzasadniony zarówno w aspekcie naukowym jak i klinicznym.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. technologii żywności Magdaleny Pajączkowskiej opracowana została, pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. n. med. Grażyny Gościński oraz Promotora pomocniczego dr hab. n. med. Kingi Grzech-Leśniak, prof. Uczelni, w postaci wydrukowanej monografii

pt. „Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych i promieniowania laserowego na drobnoustroje izolowane z przewlekłych zakażeń jamy ustnej”. Dysertacja jest zgodna z ogólnie przyjętymi wymogami dla tego rodzaju opracowań. Praca liczy łącznie 205 stron druku i obejmuje kolejno spis rycin, schematów, tabel i fotografii; wykaz skrótów; wstęp; cel pracy; materiał; metody; wyniki; dyskusję; wnioski; streszczenie; abstract; wykaz piśmiennictwa; suplement oraz aneks. W dysertacji zawartych zostało 8 rycin, 1 schemat, 45 tabel oraz 24 fotografie. Piśmiennictwo obejmuje 158 pozycji, w tym 147 (93%) publikacji napisanych w języku angielskim oraz 11 (7%) opracowań naukowych w języku polskim.

W 33-stronnicowym wstępie Autorka przybliżyła czytelnikowi temat projektu badawczego opisując między innymi zagadnienia odnoszące się do mikrobiomu jamy ustnej, etiologii próchnicy zębów, etiologii i patogenezы kandydozy jamy ustnej, a także leczenia chorób w obrębie jamy ustnej, w tym z zastosowaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych jako alternatywy konwencjonalnej terapii czy laseroterapii.

Cel badań został prawidłowo sformułowany przez Doktorantkę i dotyczył oceny wpływu peptydów przeciwdrobnoustrojowych, lasera i fototerapii na biofilm jednogatunkowy i mieszany.

Materiał do badań stanowiły drobnoustroje uzyskane z wymazów pobieranych z jamy ustnej osób z nawracającą grzybicą. Wymazy pozyskiwano od pacjentów zgłaszających się do Prywatnego Centrum dr Macieja Kozłowskiego w Oleśnicy. Do analizy włączono także szczepy wzorcowe pochodzące z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych, w tym *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida dubliniensis* (ATCC MYA 646), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) oraz *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595). Zarówno szczepy kliniczne i jak i wzorcowe przechowywano w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Na pierwszym etapie badania przeprowadzono z wykorzystaniem 43 szczepów *Candida spp.*, 2 szczepów *S. mutans* oraz 18 szczepów *Lactobacillus spp.* Stopień adhezji drobnoustrojów oraz tworzenie biofilmów (jedno-, dwu- i trzygatunkowych) oceniono ilościowo testem z fioletem krystalicznym. Ponadto dokonano oznaczeń żywotności biofilmów testem redukcji soli tetrazoliowej MTT.

Na dalszym etapie do badań wybrano szczepy wykazujące się najlepszą zdolnością tworzenia biofilmów, w tym 14 szczepów *Candida spp.*, 2 szczepy *S. mutans* oraz 13 szczepów *Lactobacillus rhamnosus*. Ocenie poddano liczbę jednostek koloniotwórczych w dojrzałych biofilmach jedno- i wielogatunkowych.

Podczas prowadzenia badań zastosowano dwa lipopeptydy, tj. Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> i Pal-CKKKKC-NH<sub>2</sub>, które zostały zsyntetyzowane w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Przeżywalność drobnoustrojów w biofilmie wobec peptydów badano metodą mikrorozcieńczeń w płytkach titracyjnych. Wrażliwość szczepów na lipopeptydy określona została poprzez wyznaczenie wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC). Aktywność wobec dojrzałego biofilmu, jedno- i wielogatunkowego, oceniono poprzez wyznaczenie minimalnego stężenia eradykującego biofilm (MBEC). Podczas badań zastosowano dwa lasery diodowe, tj. Smart M LASOTRONIX o długości fali 405 nm, 635 nm i 808 nm oraz MMO LASER DUO o długości fali 660 nm i 808 nm. Do oceny wpływu promieniowania laserowego na biofilm mieszany wykorzystywano test z fioletem krystalicznym oraz określano liczbę jednostek koloniotwórczych. Natomiast analiza struktury biofilmu po zastosowaniu peptydu i fototerapii została oszacowana z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła w formie opisu, a także licznych tabel, rycin i fotografii. Należy podkreślić, iż graficzna prezentacja danych zastosowana przez Autorkę ułatwia czytelnikowi odbiór treści dysertacji.

W dyskusji Doktorantka zwróciła uwagę na najważniejsze i najciekawsze informacje, a rozważania przeprowadziła z bardzo dobrą znajomością tematu. Rozdział ten dowodzi, iż Autorka znakomicie opanowała materiał badawczy, ale także z wprawą dokonała odpowiedniego oszacowania wyników badań własnych w odniesieniu do danych pozyskanych przez innych naukowców.

Analiza uzyskanych przez Doktorantkę wyników skłoniła Ją do wysunięcia pięciu bardzo interesujących wniosków:

1. Szczepy *S. mutans* i *Lactobacillus spp.* miały najsilniejsze zdolności tworzenia biofilmu. *C. albicans* i *C. dubliniensis* tworzyły biofilm w stopniu umiarkowanym.
2. Biofilm mieszany *Candida* – *S. mutans* charakteryzował się większą biomasą biofilmu a także znaczącą ilością komórek *Candida spp.* i *S. mutans*. Udział *Lactobacillus spp.* w 3 gatunkowym biofilmie *Candida* - *Streptococcus* – *Lactobacillus* powodował obniżenie liczebności komórek *S. mutans* i *C. albicans*.
3. Wykazano oddziaływania synergistyczne w biofilmie mieszanym *Candida* – *Streptococcus*, natomiast *Lactobacillus rhamnosus* działał antagonistycznie w stosunku do gatunków partnerskich obecnych w biofilmie mieszanym.
4. Lipopeptydy były skuteczne w niszczeniu struktur biofilmu jedno-

i wielogatunkowego. W przypadku peptydu Pal-CKKKKC-NH<sub>2</sub> wykazano 79% eradykację biofilmu *Candida spp.* Najwyższą aktywność przeciwbiofilmową wobec *S. mutans* w biofilmie dwugatunkowym *Candida - Streptococcus* wykazał peptyd Pal-KKKK-NH<sub>2</sub>.

5. Fototerapia istotnie wpływała na eradykację biofilmu. Zdecydowanie lepsze efekty PDT uzyskano w redukcji biofilmów jednogatunkowych *Candida spp.* i *S. mutans*. Użycie samego fotouczulacza jak i światła lasera nie wpływało istotnie na redukcję biofilmu.

Na prowadzenie badań Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (opinia nr KB – 198/2019), której kopia została zamieszczona w aneksie na końcu dysertacji.

W opinii recenzenta poruszona przez Doktorantkę tematyka jest niezwykle ważna. Natomiast podjęty projekt posiada duże walory poznawcze zarówno w aspekcie klinicznym jak i naukowym.


Przedstawiona do oceny dysertacja stanowi logiczną całość i świadczy o odpowiednim przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań naukowych oraz ich prezentacji. Uzyskane przez Autorkę wyniki zostały zaprezentowane w kompleksowy, przejrzysty i usystematyzowany sposób, a także dobrze udokumentowane poprzez prezentację licznych tabel, rycin i fotografii. Mgr inż. technologii żywności Magdalena Pajączkowska uzyskała odpowiedzi na założone cele badania, które podsumowała we wnioskach.

Jednakże z obowiązku recenzenta zmuszona jestem do zwrócenia uwagi, iż niestety Doktorantka nie ustrzegła się w rozprawie od wielu uchybień językowych. Ponadto Autorka nie dokonała wyjaśnień w języku polskim niektórych skrótów, w tym np. „CLSM” w ich wykazie na stronie 14 czy „PACT” na stronie 15. Dodatkowo spostrzeżono rozbieżności pomiędzy numeracją fotografii opisywanych w tekście a tą przy nich zawartą (np. w ostatniej linii na str. 53 powinno być odniesienie do fot. 2, która znajduje się na str. 54, zamiast do fot. 1). W spisie piśmiennictwa także spostrzeżono drobne uchybienia, w tym np. Autorka nie podała tytułu czasopisma (pozycja 72 na str. 162, bądź pozycja 110 na str. 165).

Należałoby przy tym podkreślić, iż wszystkie przedstawione spostrzeżenia nie umniejszają jednak wartości merytorycznej dysertacji, która wnosi wiele cennych informacji. Tematyka przedłożonej do oceny pracy doktorskiej stanowi istotny wkład w poszerzaniu wiedzy, która może zostać wykorzystana dla dobra licznych pacjentów.

Podsumowując niniejszą recenzję uważam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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, z późn. zm.). Stąd też zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr inż. technologii żywności Magdaleny Pajączkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym o dopuszczenie do publicznej obrony oraz wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

Kierownik Katedry  
Stomatologii Dziecięcej  
  
Prof. dr hab. n. med. Karolina Gerreth