



Łódź, 25.11.2019

Dr hab. n. med. Natalia Lewkowicz  
Zakład Chorób Błony Śluzowej  
Jamy Ustnej i Przyzębia  
Katedra Stomatologii Odtwórczej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

## OCENA

### **rozprawy doktorskiej lekarz dentysty Joanny Toczewskiej „Wybrane parametry antyoksydacyjne u pacjentów z zapaleniem przyzębia”**

Zapalenie przyzębia to choroba o wieloczynnikowej etiologii, w której aktywacja odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez biofilm bakteryjny odgrywa kluczową rolę. Ze względu na powszechność choroby, jak również ogólnoustrojowe konsekwencje stanu zapalnego przyzębia, należy uznać, że stanowi ona problem społeczny i zagrożenie dla zdrowia publicznego. Wczesne wykrywanie grup osób o zwiększonym ryzyku wystąpienia zapalenia przyzębia wraz z włączeniem postępowania prewencyjnego leży w interesie społecznym i pozwoli ograniczyć koszty ponoszone przez opiekę zdrowotną. Rozpoznanie zapalenia przyzębia wymaga wykonania czasochłonnego badania periodontologicznego i wnikliwej analizy obrazu radiologicznego tkanek przyzębia, dlatego też lekarze dentyści często rozpoznają zapalenie przyzębia będącego już w dość zaawansowanym stadium. Ponadto u pacjentów z już rozpoznaniem zapalenia przyzębia nie zawsze udaje się optymalnie zaplanować fazę podtrzymującą, co prowadzi do progresji choroby. Poszukiwanie markerów ułatwiających zarówno wczesne wykrycie zapalenia przyzębia, jak pozwalających zakwalifikować pacjenta do konkretnego stadium choroby oraz przewidzieć tempo rozwoju choroby w przyszłości jest obecnie przedmiotem wielu badań. Dlatego też tematykę podjętą przez Doktorantkę należy uznać za niezwykle trafną i będącą w głównym nurcie badań światowych w tym zakresie.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 307 stron, zawiera 69 tabel i 42 ryciny. Układ pracy jest typowy, składa się z wykazu skrótów, wstępu, celu pracy, materiału

i metod, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa, zestawienia tabel i rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Wstęp w sposób przejrzysty wprowadza w problematykę dysertacji. Autorka szczegółowo omawia zagadnienia dotyczące etiologii zapalenia przyzębia, podkreślając potencjalny wpływ zapalenia przyzębia na wiele patologii ogólnoustrojowych. Następnie wprowadza czytelnika w patofizjologię mechanizmów stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej organizmu, a także przedstawia implikacje etiopatologiczne stresu oksydacyjnego w chorobach ogólnoustrojowych i w zapaleniu przyzębia. Wstęp zwieńczony jest konkluzją o konieczności pogłębiania wiedzy o znaczeniu stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie zapalenia przyzębia, jako czynnika istotnego zarówno miejscowo w tkankach przyzębia, jak i czynnika o zasięgu ogólnoustrojowym mogącym łączyć zapalenie przyzębia z chorobami ogólnoustrojowymi.

Autorka sformułowała 9 celów badawczych. Siedem pierwszych celów *de facto* można byłoby skondensować w jeden o brzmieniu: „Ocena aktywności czynników pro- i antyoksydacyjnych u pacjentów z zapaleniem przyzębia”, który jest środkiem do osiągnięcia celów nr 8 i 9: „Wyłonienie markerów stresu oksydacyjnego najsilniej związanych z rozpoznaniem zapalenia przyzębia, a także jego stadium i stopniem”.

Doktorantka zakwalifikowała do badań 60 pacjentów z zapaleniem przyzębia dzieląc tych pacjentów ze względu na stopień zaawansowania choroby na dwie grupy: do I grupy włączono pacjentów z zapaleniem przyzębia stadium II (1 pacjent!) i III według Klasyfikacji Chorób Przyzębia z 2017r.; do II grupy włączono pacjentów w stadium IV choroby, ale tylko tych z utratą CAL $\geq$ 8 mm i utratą kości powyżej 2/3 długości korzenia. Grupę kontrolną stanowiło 30 osób ze zdrowym przyzęciem dopasowanych wiekiem i płcią do osób z grupy badanej. Doktorantka także szczegółowo opisała kryteria wyłączenia z badań. Następnie szczegółowo przedstawiono metodykę pozyskiwania materiału do badań (płyn dziąsłowy, ślina niestymulowana i stymulowana oraz tkanka dziąsła) oraz metody oceny stanu klinicznego pacjentów i opis zastosowanych metod badań laboratoryjnych. Wybrane metody były niezwykle przemyślane i pozwalały na prawidłowe przeprowadzenie badań. Zastosowane metody analizy statystycznej także nie budzą zastrzeżeń. Na badania została uzyskana zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła w formie opisowej oraz w postaci tabel i rycin. W monografii umieszczono 18 tabel zbiorczych przedstawiających indywidualne wyniki wszystkich badań, co nie było konieczne, gdyż nie było odwołań do pojedynczych wyników przy ich omawianiu, a co utrudniało dotarcie do tabel z wartościami średnimi omawianymi przez

Doktorantkę w rozdziale Wyniki. Autorka najpierw przeanalizowała różnice w wartościach średnich parametrów gospodarki pro- i antyoksydacyjnej pomiędzy badanymi grupami, wykazując w wielu sytuacjach, że wartości czynników prooksydacyjnych w dziąśle, płynie dziąsłowym i ślinie były statystycznie istotnie wyższe u osób z zapaleniem przyzębia w porównaniu do osób zdrowych oraz odwrotnie wartości czynników antyoksydacyjnych w dziąśle, płynie dziąsłowym i ślinie były statystycznie istotnie niższe u osób z zapaleniem przyzębia w porównaniu do osób zdrowych. W konsekwencji, u pacjentów z zapaleniem przyzębia zawartość produktów peroksydacji lipidów oraz oksydacji i karbonylacji białek w płynie dziąsłowym i ślinie była znacząco wyższa w porównaniu do osób zdrowych. Tylko jeden parametr był istotnie statystycznie różny u pacjentów z IV stadium zapalenia przyzębia w porównaniu ze stadium III – stężenie zredukowanego glutationu w płynie dziąsłowym.

Następnie Doktorantka opisała wyniki analizy korelacji pomiędzy badanymi parametrami gospodarki pro- i antyoksydacyjnej, a także pomiędzy tymi parametrami, a poszczególnymi zmiennymi statusu periodontologicznego osób badanych. Analiza korelacji w tym pierwszym zestawieniu umożliwiła wykazanie, że najbardziej odpowiednim materiałem biologicznym do badania gospodarki pro- i antyoksydacyjnej u pacjentów z zapaleniem przyzębia jest płyn dziąsłowy, gdzie korelacje pomiędzy badanymi parametrami były najbardziej spójne. Z punktu widzenia poszukiwania markerów związanych z zapaleniem przyzębia szczególnie interesujące wydaje się być wykazanie korelacji pomiędzy badanymi parametrami stresu oksydacyjnego i rozpoznaniem zapalenia przyzębia, również w odniesieniu do stadium zaawansowania i stopnia progresji. Stosując model regresji logistycznej, doktorantka wykazała, że z rozpoznaniem zapalenia przyzębia wiąże się zmiana w stężeniu tlenu azotu i mRNA tioredoksyny w ślinie, oraz aktywności reduktazy glutationowej w płynie dziąsłowym. Iloraz szans (OR) wyniósł odpowiednio 1,016, 2,32 i 1,036. Analiza korelacji w odniesieniu do stadium zaawansowania zapalenia przyzębia wykazała silną korelację pomiędzy produktami peroksydacji lipidów, oksydacji i karbonylacji białek i  $\beta$ -amyloidem w płynie dziąsłowym, a IV stadium zapalenia przyzębia. Nie udało się natomiast wykazać korelacji pomiędzy badanymi parametrami gospodarki pro- i antyoksydacyjnej a klinicznymi parametrami PD i CAL czy stopniem progresji choroby.

Rozdział szósty zawiera dyskusję otrzymanych wyników na tle danych z piśmiennictwa. Doktorantka w sposób wyczerpujący konfrontuje uzyskane w toku badań wyniki z danymi uzyskanymi przez innych badaczy. Słusznie zauważa, że występujące różnice pomiędzy badaniami własnymi, a wynikami innych autorów mogą wynikać m.in. z różnic

metodologicznych w oznaczaniu parametrów stresu oksydacyjnego. Prawidłowo interpretuje różnice w badanych parametrach wynikające ze specyfiki różnych rodzajów materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu, podkreślając, że najmniej miarodajne wyniki uzyskuje się z oceny śliny stymulowanej. Doktorantka na podstawie badań własnych i analizy piśmiennictwa wyciągnęła słuszny wniosek, że najbardziej odpowiednim materiałem biologicznym do badania gospodarki pro- i antyoksydacyjnej jest płyn dziąsłowy, i pomimo trudności metodologicznych nie może on być zastąpiony badaniem śliny.

W kolejnym rozdziale Autorka formułuje dziewięć wniosków, które znajdują oparcie w wynikach przeprowadzonych badań własnych i jednocześnie są odpowiedzią na postawione cele pracy.

Kolejnym rozdziałem jest spis piśmiennictwa liczący 299 pozycji, głównie anglojęzycznych. Cytowana literatura jest aktualna, odpowiednio dobrana oraz trafnie przytoczona w pracy. Streszczenie jest kwintesencją zawartych w pracy doktorskiej treści, zabrakło w nim jednak zwięzłego przedstawienia wniosków.

Przedstawioną mi do oceny pracę doktorską lek. dent. Joanny Toczewskiej oceniam bardzo wysoko. Doktorantka w sposób kompleksowy podeszła do zagadnienia gospodarki pro- i antyoksydacyjnej w zapaleniu przyzębia oznaczając wiele parametrów laboratoryjnych z materiału tkankowego, płynu dziąsłowego, śliny niestymulowanej i stymulowanej. Jest to według mojej wiedzy jedno z najbardziej wyczerpujących opracowań o tej tematyce, pozwalające wyciągnąć wiążące wnioski w zakresie przydatności zbadanych markerów w określaniu różnic pomiędzy zdrowiem a chorobą, a także różnic pomiędzy stadium zaawansowania choroby i stopniem możliwej progresji. Przeprowadzone badania pozwoliły na wytypowanie takich parametrów, jak poziom tlenu azotu i mRNA genu dla tioredoksyny w ślinie oraz aktywność reduktazy glutationowej w płynie dziąsłowym, silnie związanych z rozpoznaniem zapalenia przyzębia. W odniesieniu do stadium zaawansowania zapalenia przyzębia udało się wytypować jeden marker – poziom zredukowanego glutationu w płynie dziąsłowym, natomiast nie udało się wykazać, aby któryś z oznaczonych parametrów pozwalał na zróżnicowanie pacjentów ze względu na potencjalny stopień progresji.

Po analizie dysertacji nasunęły mi się następujące uwagi. Niewłaściwe było zakwalifikowanie do grupy osób z ze stadium III zapalenia przyzębia jednej osoby ze stadium II. Ponadto opis parametrów stadium IV zapalenia przyzębia nie jest prawidłowy. Nie jest jasne, czy Doktorantka celowo kwalifikowała do badań spośród pacjentów ze stadium IV tylko tych, którzy mieli CAL $\geq$ 8 mm i utratę kości  $>2/3$  długości korzenia, czy przypadkowo okazało się, że

wszyscy pacjenci zakwalifikowani jako stadium IV (CAL>5 mm, PD>6 mm, utrata kości >1/3 długości korzenia, F2 i F3, utrata >4 zębów) mieli bardziej zaawansowaną postać choroby. Doktorantka nie uzasadniła ponadto, dlaczego z badań zostali wykluczeni osoby powyżej 55 roku życia. W metodyce zabrakło też opisu obliczania objętości płynu dziąsłowego uzyskanego na sączkach papierowych na podstawie wagi (jaka waga została zastosowana, z jaką dokładnością były dokonywane pomiary), co byłoby mile widziane, gdyż metodą częściej spotykaną w piśmiennictwie jest zastosowanie urządzenia Periotron. Kolejna moja uwaga dotyczy przedstawienia tych samych wyników w tabelach i na rycinach. Nie wiadomo, dlaczego niektóre dane z tabel doktorantka zechciała przedstawić także na rycinach. Ponadto na rycinach nie zaznaczono różnic istotnych statystycznie.

Całość pracy doktorskiej lek. dent. Joanny Toczewskiej oceniam niezwykle pozytywnie. Zastrzeżenia i wątpliwości zawarte w tej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej i poznawczej niniejszej pracy, a mogą być przydatne do przygotowania publikacji do druku.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Zwracam się, zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarsko - Stomatologicznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza dentysty Joanny Toczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, ze względu na wysoką wartość merytoryczną i duże walory poznawcze pracy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku,

