

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	08-01-2020
L. dz. RN-BM/	61/2020

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej lek.dent. Joanny Toczewskiej pt. „Wybrane parametry antyoksydacyjne u pacjentów z zapaleniami przyzębia” z Katedry Periodontologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Choroba przyzębia w swojej zaawansowanej formie dotyczy ponad 740 milionów osób na całym świecie. Istotą choroby jest niszczenie tkanek utrzymujących ząb w zębodole. Według współczesnej wiedzy proces ten jest przede wszystkim zależny od nieswoistej komponenty odpowiedzi zapalnej, która jest reakcją gospodarza na obecność w kieszonce przyzębnej dysbiotycznej mikroflory. Komponenta ta jest warunkowana funkcją dwóch rodzajów komórek. Pierwszym typem są makrofagi, przejawiające nieswoistą fagocytozę i zdolne do prezentacji antygenów, co inicjuje komponentę swoistą odpowiedzi zapalnej. Istotniejsza rola w patomechanizmie zapalenia przyzębia przypada jednakże granulocytom obojętnochłonnym – neutrofilom. Komórki te po migracji w kierunku ogniska zakażenia dokonują degranulacji ziarnistości lizosomalnych, zawierających przede wszystkim enzymy proteolityczne i oksydazy. Pierwsza grupa enzymów prowadzi do degradacji tkanki łącznej, druga – do powstania wolnych rodników tlenowych. Rodniki te, krótkoterminowo działając korzystnie, przy przewlekłej obecności w tkance nasilają procesy degradacyjne. Zjawisko przewlekłej obecności wolnych rodników tlenowych i nasilającej się niezdolności organizmu do ich skutecznego usuwania nazywane jest stresem oksydacyjnym. Z tego powodu jedną z istotnych składowych strategii leczenia przyzębia jest stosowanie antyoksydantów, między innymi w diecie. Z powyższych powodów uznaję temat pracy lek. dent. Joanny Toczewskiej jako uzasadniony naukowo, a również niezwykle istotny dla współczesnej periodontologii klinicznej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi samodzielną 307-stronicową dysertację z podziałem na wstęp, cele pracy, materiał, metodykę, wyniki badań, dyskusję, wnioski w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, tabele i ryciny, oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Wstęp stanowi interesujące podsumowanie współczesnej wiedzy periodontologicznej i wykazanie celowości przeprowadzanego badania. Doktorantka umiejętnie przedstawiła zagadnienie zapalenia przyzębia i towarzyszącej mu reakcji immunologicznej. Za cenny i interesujący uważam wywód Doktorantki szczegółowo opisujący nowe zrozumienie patomechanizmu choroby przyzębia jako efektu dysbiozy. Za równie interesujące i inspirujące naukowo uważam omówienie wpływu stresu oksydacyjnego na przebieg stanu zapalnego, chorób sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych i autoimmunologicznych, a także choroby nowotworowej. W moim subiektywnym odczuciu przy omawianiu wpływu zapalenia przyzębia na zaburzenia poznawcze istotnym wkładem byłoby uzupełnienie wstępu omówieniem najnowszych, tegorocznych badań autorów nowozelandzkich i polskich dotyczących wpływu *P.gingivalis* na chorobę Alzheimera. Zdaję sobie jednakże sprawę z procesu powstawania pracy doktorskiej i mając na uwadze fakt, że są to najnowsze doniesienia, nie traktuję braku tego omówienia jako niedociągnięcia. Tym bardziej że Doktorantka wyczerpująco omówiła to zagadnienie w dyskusji, bazując na wcześniejszych doniesieniach.

Wstęp nie jest pozbawiony niewielkich błędów lub nieściśłości merytorycznych. Nie dotyczą one istoty rozprawy i nie wpływają na jej ocenę, uważam jednak, że ich korekta poprawi jakość i tak znakomitego opracowania:

- na stronie 9 Doktorantka opisując I stadium zapalenia przyzębia pisze: „(...) pojawia w odpowiedzi na utrzymujące się zapalenie dziąseł i dysbiozę biofilmu. (...)” – zdanie jest prawdziwe, choć w

3197908 | dr hab. n. med. JAN KOWALSKI  
spec. stomatologia ogólna  
specjalista periodontolog  
05-870 Błonie, ul. Piłsudskiego 2/4

kontekście dalszego opisu kolejnych stadiów może sugerować, że one z kolei nie są efektem dysbiozy – co nie jest prawdą. Być może warto byłoby dodać jedno zdanie opisujące charakter zapalenia przyzębia ogólnie, a potem przy I stadium dodać, że jest to najmniej zaawansowana, początkowa forma zapalenia.

- Stosunkowo dużym ogólnym błędem merytorycznym jest wadliwie objaśniona na stronie 9 różnica między stadium III i IV zapalenia przyzębia. W żadnym z cytowanych przez Doktorantkę dokumentów źródłowych (Papapanou i wsp., Tonetti i wsp.) nie ma mowy o parametrze głębokości kieszonki jako kryterium rozróżnienia między tymi dwoma stadiami choroby.

Zdaję sobie sprawę z faktu, że przy tak obszernym opracowaniu pomyłki redaktorskie są nie do uniknięcia. Jednocześnie generalnie uważam, że ich obecność nie wpływa na odbiór merytoryczny pracy, pozwałam sobie więc wykaz znalezionych błędów umieścić w załączniku do niniejszej recenzji. Do niektórych chciałbym jednak dodać komentarz się w tym miejscu.

- Generalna uwaga do wykazu skrótów – znakomita większość użytych skrótów to akronimy pochodzenia angielskiego. Jakkolwiek więc rozumiem intencje Doktorantki objaśnienia skrótów powszechnie stosowanych w periodontologii, myślę że ich angielskie rozwinięcie można pominąć.

- Objaśniony na stronie 7 skrót PMN oczywiście przetłumaczony jest prawidłowo, jednakże dokładne tłumaczenie niewiele wnosi do zrozumienia, co być może jest winą rozbieżności w nomenklaturze histologicznej i immunologicznej. W praktyce periodontologicznej PMN to neutrofile, co zresztą słusznie zauważa Doktorantka na stronie 15. Oczywiście eozynofile i bazofile również zalicza się do PMN, ale ich obecność w tkankach przyzębia jest incydentalna.

Dziewięć celów pracy zostało przez Doktorantkę sformułowane w sposób prawidłowy. Dotyczą one aktywności oksydacyjnej i antyoksydacyjnej w tkance przyzębia i ślinie. Obejmują pomiar ekspresji antyoksydantów, zbadanie aktywności oksydantów i antyoksydantów, oszacowanie kompleksowej aktywności antyoksydacyjnej płynu dziąsłowego i śliny, zbadanie wpływu stresu oksydacyjnego na proteiny i lipidy, także ewaluację parametrów stresu oksydacyjnego najsilniej korelujących ze stanem klinicznym i mogących służyć jako markery prognostyczne. Jako drobne niedociągnięcie traktuję wspomnienie w tym miejscu po raz pierwszy o dysmutazie ponadtlenkowej 1. Wcześniej, na stronie 26 wstępu, Doktorantka wspomina o istnieniu trzech izoform enzymu, jednakże używa tam jedynie skrótów.

Badaniem objęto 90 osób, z czego 60 osób zostało podzielonych na dwie podgrupy – zależnie od zaawansowania destrukcji tkanek przyzębia (36 osób z mniej zaawansowanym stanem zapalnym 24 z bardziej zaawansowanym), a 30 osób stanowiło grupę kontrolną. Moje uznanie budzi zastosowanie prawidłowych, ścisłych kryteriów włączenia i wyłączenia, umożliwiające wiarygodną ocenę uzyskanych wyników przy minimalizacji zaburzeń wynikających z niepożądanych interakcji. W metodyce pojawia się po raz kolejny błąd dotyczący różnic pomiędzy stadiami choroby. W oczywisty sposób wynika on z konsekwencji Autorki dysertacji. Jak już napisałem wcześniej, błąd ten nie wpływa na mój odbiór merytoryczny pracy jako całości, gdyż Autorka ma prawo zastosować takie kryteria podziału grup pod względem obrazu klinicznego, jakie uznaje za zasadne. Zastosowany podział na grupę I zapalenia przyzębia (lżejszy przebieg procesu chorobowego) i grupę II zapalenia przyzębia (cięższy przebieg procesu chorobowego) nie budzi moich zastrzeżeń, jest uzasadniony klinicznie i w mojej ocenie nie wpływa na generalną interpretację wyników. Badanie kliniczne zostało przeprowadzone z użyciem standardów powszechnie przyjętych w periodontologii, nie mam większych zastrzeżeń do zastosowanych parametrów oceny stanu przyzębia. Sugerowałbym, aby wprowadzić większy porządek przy omawianiu parametrów klinicznych. Doktorantka wspomina o ośmiu parametrach klinicznych. Po dokładniejszym wyczytaniu się można się zorientować, o jakie

dr hab. n. med. JAN KOWALSKI  
spec. Fstomatologia ogólna  
specjalista periodontolog  
05-870 Błonie, ul. Piłsudskiego 2/4





parametry konkretnie chodzi. Jednakże większą przejrzystość osiągnięto by wymieniając wspomniane osiem parametrów, a dopiero potem podając parametry wtórne wyliczane na podstawie PD i CAL (tym bardziej, że dalej w wynikach pojawiają się parametry nie wyszczególnione w tym miejscu).

Za godne pochwały uważam zastosowanie najnowszej klasyfikacji chorób przyzębia, zwłaszcza mając na uwadze fakt, że jej kryteria do dziś są przedmiotem dyskusji (czego przejawem są moje marginalne uwagi do przyjętego przez Doktorantkę podziału. Seminarium Polskiego Towarzystwa Periodontologicznego poświęcone wyłącznie nowej klasyfikacji odbyło się 22 listopada 2019 roku).

Metodyka badań laboratoryjnych nie budzi zastrzeżeń. Analizie poddano aktywność oksydazy NADPH, enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy ślinowej, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej-1 i reduktazy glutationowej) i aktywność antyoksydantów nieenzymatycznych (zredukowanego glutationu, kwasu moczowego i polifenoli). Zbadano również całkowity potencjał antyoksydacyjny, całkowity potencjał oksydacyjny (na ich podstawie wyliczono indeks stresu oksydacyjnego) i zdolność redukcji jonów żelaza. Oznaczono także zawartość AGE, stężenie końcowych produktów oksydacji białek, stężenie dialdehydu malonowego, zawartość modyfikowanych glikooksydacyjnie aminokwasów, zawartość beta-amyloidu, stężenie tlenu azotu, S-nitrozotoli, nadtlenoazotynu i białka całkowitego. W sumie u każdego pacjenta oceniano 15 zmiennych klinicznych, 5 zmiennych dodatkowych, 6 zmiennych genetycznych i 72 zmiennych biochemicznych. Moja jedyna uwaga do metodyki - na stronie 43, w opisie badań biochemicznych Doktorantka (słusznie) zaznacza, że wszystkie oznaczenia biochemiczne (jeżeli nie podano inaczej) wykonano w próbach podwójnych i wystandaryzowano na mg białka całkowitego. Dodawanie tego opisu przy poszczególnych oksydantach i antyoksydantach (z wyłączeniem polifenoli, pomiaru całkowitego potencjału antyoksydacyjnego/oksydacyjnego i pomiaru zdolności redukcji jonów żelaza) jest wg mnie zbędnym powtórzeniem.

Analiza statystyczna została przeprowadzona prawidłowo, z wykorzystaniem adekwatnych testów nieparametrycznych i parametrycznych. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń. Na wyróżnienie zasługuje zastosowanie analizy wariancji, umożliwiającej badanie obserwacji zależnej wieloczynnikowo (choroba przyzębia z pewnością się do nich zalicza) i modelu regresji logistycznej, umożliwiającego (w odróżnieniu od regresji liniowej) wiarygodną ocenę wpływu konkretnego czynnika na zmienną zależną, jaką w przypadku badania jest stan kliniczny przyzębia.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań umożliwiły ocenę parametrów biochemicznych i ich wpływ na parametry kliniczne w wyodrębnionych grupach. Stwierdzono znamienne wyższe stężenie tlenu azotu w ślinie stymulowanej i niestymulowanej (bez różnic w GCF) między grupami badanymi a grupą kontrolną. Interesujące i zaskakujące dla mnie było zaobserwowanie zmienności stężeń enzymów antyoksydacyjnych. Stwierdzono znamienne niższe stężenie oksydazy NADPH w ślinie stymulowanej osób chorych, przy odwrotnych wynikach dla śliny niestymulowanej i GCF. Równie zaskakujące było stwierdzenie dokładnie odwrotnego wzorca stężeń przy analizie oksydazy glutationowej – wyższe w ślinie stymulowanej, a niższe w niestymulowanej i GCF. Stężenie katalazy było z kolei znacząco wyższe w GCF, a niższe w ślinie stymulowanej i niestymulowanej osób chorych. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej-1 była znacząco niższa u osób chorych w każdym z badanych środowisk. Stężenie reduktazy glutationowej było niższe w ślinie niestymulowanej, wyższe w GCF, a w ślinie stymulowanej pozostawało na zbliżonym poziomie. Stężenia wszystkich antyoksydantów nieenzymatycznych były znacząco niższe we wszystkich badaniach.

Zaobserwowano wyższe stężenia dialdehydu malonowego, dityrozyny i nadtlenoazotynu. Zawartości beta-amyloidu i S-nitrozotoli były wyższe w ślinie, a porównywalne w GCF. Zawartość

3197908 | dr hab. n. med. JAN KOWALSKI  
spec. stomatologia ogólna  
specjalista periodontolog  
05-870 Błonie, ul. Piłsudskiego 2/4



AGE, końcowych produktów oksydacji białek i tryptofanu była wyższa u osób chorych zarówno w ślinie, jak i w płynie dziąsłowym.

Zarówno zawartość N-formylokininureny, jak i kininureny była wyższa u osób chorych w ślinie niestymulowanej i GCF, w ślinie stymulowanej pozostawała na niezmiennym poziomie.

W ślinie stymulowanej, niestymulowanej i płynie dziąsłowym u osób chorych całkowity potencjał oksydacyjny i indeks stresu oksydacyjnego były znacząco wyższe, a całkowity potencjał antyoksydacyjny - znacząco niższy. Zdolność redukowania jonów żelaza w ślinie osób chorych była znamienne niższa, w GCF różnica nie była znamienna.

Ekspresja enzymów i białek antyoksydacyjnych była niższa w dziąśle, a wyższa w ślinie osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną (z wyłączeniem dysmutazy ponadtlenkowej, w przypadku której w ślinie nie zaobserwowano różnic).

Analiza korelacyjna przyniosła szereg obserwacji statystycznych przydatnych do dalszej interpretacji klinicznej. Moje uznanie budzi ilość pracy analitycznej przeprowadzonej przez Doktorantkę. Analizie korelacyjnej poddane zostały nie tylko parametry kliniczne z biochemicznymi, ale również parametry biochemiczne. Ogółem praca doktorska lek. dent. Joanny Toczewskiej zawiera 74 tabele oraz 42 ryciny.

Analizując wyniki dopatryłem się dwóch nieścisłości. Doktorantka wspomina na stronie 67 bo parametrze klinicznym „ilość miejsc z CAL  $\geq$  3mm na powierzchniach międzystycznych”. O parametrze tym nie wspomniała wcześniej przy omawianiu metodyki badań. Na stronie 68 Doktorantka wspomina o korelacji pomiędzy stężeniem końcowych produktów oksydacji białek, a obciążeniem genetycznym zapaleniem przyzębia. Nie wspomniano w metodyce, w jaki sposób oceniano obciążenie genetyczne.

W dyskusji Doktorantka dokładnie omawia wyniki badań własnych, grupując je w siedem podrozdziałów. Zaletą tej części pracy jest wnikliwe omówienie poszczególnych zagadnień, połączone ze skrupulatnym cytowaniem i dyskutowaniem doniesień o podobnej tematyce z literatury światowej. Piśmiennictwo pracy doktorskiej obejmuje 299 pozycji, w tym najnowsze doniesienia z omawianej dziedziny. Uwagi Doktorantki cechują się dużą wnikliwością, odnoszą się bezpośrednio do tematu bieżącej dyskusji i świadczą o biegłości w pracy naukowej. Przychylam się do wnioskowanego w dyskusji przez Doktorantkę włączenia suplementacji antyoksydacyjnej do protokołów leczenia periodontologicznego, co więcej, uważam za celowe ich stosowanie również w profilaktyce pierwszorzędowej.

Wnioski stanowią logiczną konsekwencję przedstawionych wyników i w pełni odpowiadają celom pracy. Zaobserwowano obniżenie tkankowej ekspresji mRNA enzymów antyoksydacyjnych, nasilenie aktywności czynników i wykładników prooksydacyjnych, oraz obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w płynie dziąsłowym i ślinie. Stwierdzono również obniżenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Stres oksydacyjny wpływał zarówno na lipidy, jak i proteiny. W modelu regresji logistycznej stwierdzono silny związek między prawdopodobieństwem rozpoznania zapalenia przyzębia, a stężeniem tlenu azotu w ślinie niestymulowanej, ekspresją mRNA tioredoksyny w ślinie, oraz wzrostem aktywności reduktazy glutationowej w płynie dziąsłowym. Rozróżnieniu pomiędzy lżejszym a cięższym przebiegiem choroby przyzębia odpowiadało stężenie zredukowanego glutationu w płynie dziąsłowym.



Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. dent. Joanny Toczewskiej wpisuje się w aktualny nurt badań nad patomechanizmem zapalenia przyzębia. Nowatorskie wyniki pracy doktorskiej wskazują na potencjał stosowania markerów reakcji redoks w diagnostyce zapalenia przyzębia, zarówno w płynie dziąsłowym, jak i w ślinie.

**Pracę doktorską lek. dent. Joanny Toczewskiej oceniam pozytywnie. 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.). Jednocześnie ze względu na walory poznawcze i aspekt praktyczny ocenianej rozprawy doktorskiej zwracam się do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.**

Warszawa, dn. 04.12.2019

Dr hab.n.med. Jan Kowalski

3197908 | dr hab. n. med. JAN KOWALSKI  
spec. I<sup>o</sup> stomatologia ogólna  
specjalista periodontolog  
05-870 Błonie, ul. Piłsudskiego 2/4

