

Akceptacja
[Signature]



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA PRAKTYCZNEJ STOMATOLOGII KLINICZNEJ
KLINIKA ORTODONCJI I DYSFUNKCJI NARZĄDU ŻUCIA

ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. 061 8547-340
tel/fax 061 8547-094

Poznań, dnia 18.10.2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej

lek. dent. Aleksandry Burezyńskiej pt.:

Ocena flory bakteryjnej w zębach z martwicą miazgi oraz ropnym zapaleniem tkanek około wierzchołkowych u osób dorosłych.

Rozprawa doktorska lek. dent. Aleksandry Burezyńskiej pt.: *Ocena flory bakteryjnej w zębach z martwicą miazgi oraz ropnym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych u osób dorosłych* odpowiada klasycznej konstrukcji dla tego typu opracowań. Składa się z 8 rozdziałów ujętych na 209 stronach. Pięć rozdziałów zostało podzielonych na podrozdziały, w których bardzo szczegółowo omówiono poszczególne zagadnienia. Ponadto w pracy zamieszczono *Spis rycin, Spis tabel*, wykaz skrótów i streszczenia w języku polskim i angielskim.

Tytuł pracy został poprawnie sformułowany i ściśle odpowiada zakresowi przeprowadzonych badań.

W rozdziale *Wstęp* Doktorantka bardzo obszernie opisała zagadnienia fizjologicznej mikroflory bakteryjnej i jej charakterystykę zależną od warunków w jamie ustnej. Zwróciła uwagę na strukturę i specyfikę biofilmu oraz jego rolę w patogenezie chorób jamy ustnej i chorób ogólnoustrojowych. Szczegółowo opisała epidemiologię, patogenezę i rolę mikroflory w etiologii próchnicy zębów, chorób przyzębia i stanów chorobowych miazgi i tkanek okołowierzchołkowych. Bardzo interesujące są zagadnienia podkreślające znaczenie technik badań molekularnych w diagnostyce bioróżnorodności mikroflory w zaawansowanych stanach chorób jamy ustnej. Potencjalny wpływ mikroflory jamy ustnej na choroby ogólnoustrojowe został przedstawiony w formie bardzo przejrzystej i stanowi ważny element

[Handwritten mark]

w uzasadnieniu celu podjętych badań. Osobny podrozdział *Metody mikrobiologiczne do oceny mikroflory jamy ustnej* stanowi szerokie opracowanie uwzględniające wskazania do wykonywania badań mikrobiologicznych w stomatologii, sposoby pozyskiwania próbek do badań (ślina, płytka nazębna i biofilm z kanału zęba) ich transportu i przygotowania w laboratorium do badań hodowlanych lub molekularnych. Wysoko oceniam materiał opracowany przez Doktorantkę na temat metod molekularnych stosowanych do identyfikacji materiału genetycznego drobnoustrojów szczególnie w przypadkach pozbawionych możliwości wykonania badań hodowlanych. Doktorantka z dużą starannością opisała powyżej wymienione zagadnienia w oparciu o prawidłowo wybrane pozycje literatury, głównie anglojęzycznej. Odnoszę jednak wrażenie, że *Wstęp* rozprawy doktorskiej został zbyt szeroko opracowany i powinien zamykać się w formie znacznie ograniczonej uwzględniając jedynie ważne aspekty związane z tematem.

Doktorantka poprawnie sformułowała cel główny rozprawy, natomiast cele szczegółowe zostały ujęte w pięciu odrębnych punktach o następującym brzmieniu:

1. Ocena przydatności autorskiej metody pobierania próbek endodontycznych do badań molekularnych.
2. Porównanie składu mikroflory bakteryjnej w próbkach śliny/płytki nazębnej (SP,S/P) oraz w zaawansowanych zmianach próchnicowych powikłanych martwicą miazgi zęba lub stanem ropnym tkanek okołowierzchołkowych (MR, M/R) pobranych od danego pacjenta.
3. Określenie dominujących rodzajów bakterii występujących w próbkach SP oraz MR objętych analizą.
4. Analiza wyników badań metagenomicznych próbek SP oraz MR pod względem wartości indeksów alfa bioróżnorodności oraz indeksów beta bioróżnorodności.
5. Porównanie wyników klasycznych posiewów próbek i badań metagenomicznych w kierunku wykrywania bakterii.

Rozdział *Materiał i metody badań* został opracowany w formie pięciu podrozdziałów. Doktorantka prawidłowo określiła kryteria włączające i wyłączające na potrzeby prowadzonych badań, w sposób przejrzysty przedstawiła schemat realizacji badań. Materiał do badań stanowiły podwójne zestawy próbek: śliny niestymulowanej, naddziąsłowej płytki nazębnej, martwiczej miazgi i treści ropnej z okolicy zmiany okołowierzchołkowej pobierane od 11 pacjentów. Metody pobierania próbek zostały dokładnie przez Doktorantkę opisane i uzupełnione dokumentacją fotograficzną. Próbkki materiału biologicznego zostały pobrane z dużą starannością, a następnie zostały dostarczone do Zakładu Genetyki Instytutu Mikrobiologii UW w celu wykonania badań metagenomicznych oraz do Zakładu

Mikrobiologii CSK Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego gdzie zastosowano metody hodowlane. W badaniu zastosowano następujące podłoża bakteriologiczne: agar McConkey'a, agar Chapmana, agar czekoladowy, agar Columbia. Wyhodowane za pomocą tradycyjnych metod hodowlanych szczepy bakterii identyfikowano przy użyciu metody spektrometrii mas z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu. W diagnostyce molekularnej Doktorantka zastosowała metodę sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z użyciem sekwenatora MiSeq. Przeprowadzona analiza metagenomiczna badanych próbek obejmowała: izolację całkowitego DNA z próbki, przygotowanie amplikonów genu markerowego 16S rRNA w reakcji PCR, sekwencjonowanie amplikonów i analizę bioinformatyczną wyników. W celu porównania zidentyfikowanego mikrobiomu Doktorantka wykonała analizę bioróżnorodności alfa i beta i zastosowała prawidłowe testy statystyczne.

Wyniki badań zostały przedstawione w rozdziale *Wyniki* w formie treści pisanej, tabel i rycin na 38 stronach. Doktorantka udowodniła znaczące różnice między mikrobiomami w próbkach SP i MR oraz zróżnicowanie mikrobioty. W hodowlanych badaniach próbek Doktorantka udowodniła większą różnorodność gatunkową izolatów bakterii uzyskanych w posiewie próbki SP. W badanych próbkach uzyskano dominację bakterii z rzędu *Bacteroidales* oraz *Fusobacteriales* chociaż poziom tych ostatnich różnił się pomiędzy badanymi próbkami. Wyniki badań potwierdziły dominację *Fusobacteriaceae* oraz *Prevotellaceae* na poziomie rodziny zarówno w próbkach SP jak i MR, oraz *Prevotella* i *Fusobacterium* na poziomie rodzaju. Wyniki rozprawy doktorskiej potwierdzają podobieństwo flory bakteryjnej śliny i płytki nazębnej u wszystkich pacjentów, podczas gdy w przypadku zmian ropnych flora bakteryjna jest zróżnicowana z przewagą cech indywidualnych. Doktorantka wykazała istotne różnice między mikrobiomami w obrębie próbek SP i MR z niższą różnorodnością mikrobiologiczną wewnątrz grupy MR oraz istotną różnicę pomiędzy mikrobiomami próbek.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka podjęła próbę interpretacji uzyskanych wyników własnych w oparciu o dane z piśmiennictwa. Rozdział został podzielony na trzy odrębne tematycznie podrozdziały obejmujące zagadnienia technik pobierania próbek z jamy ustnej do badań molekularnych, mikrobiomu jamy ustnej i możliwości diagnostycznych flory bakteryjnej.

Na podstawie wykonanych badań doktorantka sformułowała dziewięć wniosków:

1. Zastosowana autorska procedura umożliwiła precyzyjne pobranie materiałów klinicznych z korzenia zęba i okolicy okołowierzchołkowej bez skażenia mikroflorą śliny, może więc być zalecana w praktyce stomatologicznej.

2. W obu grupach próbek dominowały bakterie z rodzaju *Prevotella* i *Fusobacterium*, jednak wykazano statystycznie istotne różnice w częstości występowania innych rodzajów bakterii w próbkach SP (ślina i płytka nazębna) i MR (martwicza miazga zęba/treść ropna).
3. W niniejszej pracy wykryto występowanie bakterii z rodzaju *Alloprevotella*, *Rikenella* i *Escherichia* oraz gatunku *Corynebacterium durum* z większą częstością w próbkach MR niż w próbkach SP, co wymaga dalszych badań ze względu na brak doniesień w literaturze naukowej o występowaniu tych bakterii w próbkach endodontycznych.
4. W grupie próbek MR zaobserwowano, że większość mikrobiomu (ok. 83%) stanowiło tylko kilka (3 – 5) rodzajów bakterii, natomiast w próbkach SP za ok. 80% składu mikrobiomu odpowiadały bakterie sklasyfikowane w >10 rodzajach.
5. Na podstawie analizy indeksów alfa bioróżnorodności potwierdzono niższą różnorodność mikrobiologiczną wewnątrz grupy MR (martwicza miazga zęba/treść ropna) oraz większą wewnątrz grupy SP (ślina i płytka nazębna).
6. Analiza indeksów beta bioróżnorodności wykazała, że skład flory bakteryjnej śliny i płytki nazębnej (SP) był zbliżony u wszystkich pacjentów objętych badaniem, natomiast skład mikroflory w próbkach martwiczej miazgi zęba i/lub zmian ropnych (MR) był indywidualny dla danego procesu zapalnego.
7. Wyniki badań sekwencjonowania 16S rRNA (ang. next generation sequencing, NGS) próbek SP i MR pobranych od pacjenta nr 7 wykazały dużo większą możliwość identyfikacji bakterii wchodzących w skład mikroflory tych próbek (odpowiednio 30 i 50 taksonów), w porównaniu z wynikami klasycznych posiewów tych próbek (odpowiednio 5 i 2 rodzajów bakterii).
8. Porównanie identyfikacji bakterii w próbce MR pobranej od pacjenta nr 7 wykazało brak wykrycia za pomocą tradycyjnego posiewu gatunku *Rothia dentocariosa* i *Corynebacterium durum*, dominujących w wynikach badania NGS. Podobnie w próbce SP pobranej od tego pacjenta w metodzie hodowlanej nie wykryto gatunku *Prevotella melaninogenica* oraz *Veillonella dispar*, dominujących w wynikach badania NGS tej próbki.
9. Konieczne są dalsze badania w celu określenia znaczenia wyników badań metagenomicznych w etiologii i terapii zakażeń endodontycznych.

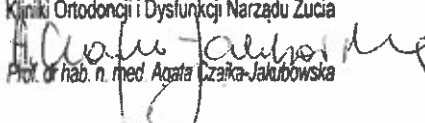
Wnioski zawierają treści, które są powieleniem wyników badań a nie konkluzją wynikającą z uzyskanych wyników. Spośród 9 wniosków jedynie trzy 1,3 i 9, w mojej ocenie zostały poprawnie sformułowane.

Streszczenia w języku polskim i angielskim zostały poprawnie napisane i zawierają najważniejsze elementy pracy. Piśmiennictwo jest obszerne, zawiera aktualne i poprawnie wybrane 262 pozycje z literatury głównie anglojęzycznej.

Podsumowując chciałabym podkreślić pewne cechy ocenianej pracy doktorskiej, które stanowią jej wartość. Podjęty przez Doktorantkę temat badań poświęcony zagadnieniom zróżnicowania mikroflory bakteryjnej w strukturach jamy ustnej jest zagadnieniem bardzo interesującym i aktualnym w rozważaniach badawczych. Ze względu na znaczącą rolę mikroflory w etiologii chorób jamy ustnej, a także chorób ogólnoustrojowych wyniki badań ocenianej rozprawy doktorskiej nabierają szczególnego znaczenia. Należy podkreślić, że wybrane przez Doktorantkę metody badań odpowiadają światowym standardom rekomendowanym do prowadzenia badań w tym zakresie. Opracowane na podstawie literatury z czasopism naukowych zagadnienia są źródłem rzetelnie przekazanej wiedzy a uzyskane wyniki badań uzupełniają obszary, które stanowią aktualny temat rozważań naukowych. Badania zostały przez Doktorantkę bardzo starannie zaplanowane, a zaproponowana metoda własna pozyskiwania materiału do badań świadczy o Jej dojrzałości naukowej. Wnikliwa analiza uzyskanych wyników, umiejętność posługiwania się współczesnym piśmiennictwem świadczą o pracowitości Doktorantki. Autorka w rozprawie doktorskiej uzyskała wyniki o szerokim znaczeniu poznawczym, ale również praktycznym, które mogą stanowić podłoże do rozważań na temat patomechanizmu wielu chorób. Recenzowana rozprawa doktorska jest pracą oryginalną, zaplanowaną w przemyślany sposób i dobrze wykonaną.

Rozprawa doktorska lekarz dentysty Aleksandry Burczyńskiej pt.: Ocena flory bakteryjnej w zębach z martwicą miazgi oraz ropnym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych u osób dorosłych” spełnia warunki określone w art. 13 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.) w związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2018r. poz 1669 z późn.zm.). Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. dent. Aleksandry Burczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. Agata Czajka-Jakubowska

Kierownik
Kliniki Ortodontacji i Dysfunkcji Narządu Żucia
5 
Prof. dr hab. n. med. Agata Czajka-Jakubowska

