

Akceptuję


Prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz
Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej
Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34
00-725 Warszawa

Warszawa dnia 30.09.24

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. dent. Aleksandry Burczyńskiej

Pt. „Ocena flory bakteryjnej w zębach z martwicą miazgi oraz ropnym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych u osób dorosłych „

Dynamiczny rozwój nowych metod diagnostycznych w mikrobiologii opartych o analizę genomów znacząco wzbogacił naszą wiedzę na temat drobnoustrojów zasiedlających organizm człowieka i zmienił szereg dotychczasowych poglądów dotyczących ich obecności i roli w organizmie człowieka. Wprawdzie definicja mikrobiomu i mikrobioty została wprowadzona ponad 20 lat temu to jednak szerokie jej zrozumienie i stosowanie to kwestia ostatnich lat. Intensywne badania nad mikrobiomem pozwoliły na określenie jego podstawowego składu („uczestników”) w różnych lokalizacjach/układach organizmu człowieka. Okazało się, że jest on często znacznie odmienny i powiązany z funkcjami danego układu. Może także stanowić ochronę przed patogenami, a także nowotworzeniem. Ponadto, zostało mu przypisanych wiele funkcji specyficznych dla poszczególnych układów/miejsc organizmu człowieka. Zaburzenie mikrobiomu mogą prowadzić do rozwoju różnych stanów patologicznych.

Mikrobiom jamy ustnej jest bardzo bogaty i jedynie bogatszym jest mikrobiom przewodu pokarmowego. Mikrobiom jamy ustnej odgrywa kluczową rolę nie tylko w utrzymywaniu zdrowia w tej anatomicznej lokalizacji ale także w zapobieganiu chorobom w innych miejscach organizmu.

Zmiany w obrębie mikrobiomu jamy ustnej mogą prowadzić nie tylko do zaburzeń i zmian chorobowych w jej obrębie ale także skutkować poważnymi następstwami w innych układach jak pokarmowy, sercowo-naczyniowy, oddechowy, czy nerwowy.

Dzięki rozwojowi nowoczesnych technik badawczych udało się zwiększyć wiedzę na temat kompozycji i właściwości mikrobiomu jamy ustnej człowieka i lepiej zrozumieć jego udział w utrzymywaniu zdrowia a także roli niekorzystnych w nim zmian na obraz chorobowy zarówno w obrębie jamy ustnej jak i w odległych miejscach organizmu człowieka. Potrzebne są dalsze badania w tym obszarze celem zrozumienia interakcji między drobnoustrojami.

W związku z powyższym przedstawiona mi do oceny rozprawa wpisuje się w ważny w światowej nauce temat badawczy.

Praca ma układ typowy i zawiera się na 209 stronach (!).

Wstęp obejmuje 60 stron, założenia i cel pracy 2 strony, Materiał i Metody 22 s, Wyniki 40 s, dyskusja 21 s i, wnioski w liczbie 9, piśmiennictwo zawiera 204 pozycje. Dołączona jest także zgoda Komisji Bioetycznej WUM na prowadzenie badań, informacja dla pacjenta i jego świadoma zgoda

Praca poprzedzona jest spisem treści, rycin i tabel a także wykazem stosowanych w rozprawie skrótów, streszczeniem w j. polskim i angielskim

Wstęp (60 s) podzielony na rozdziały a często także na podrozdziały, co ułatwia czytanie i zwiększa przejrzystość pracy. Jest jednak nadmiernie rozbudowany i bardzo szczegółowy.

Zawarte na początku Wstępu bardzo przydatne definicje są niepotrzebnie wzbogacone o szereg komentarzy co powoduje, że gubią się w tekście.

Niepotrzebnie jest także rozbudowany temat mikroflory j. ustnej w chorobach ogólnoustrojowych. Można było ująć to w tabeli.

Rozdział Metody mikrobiologiczne do oceny mikroflory jamy ustnej jest wartościową częścią rozprawy ale niektóre części można było pominąć jak np. opis podłoży hodowlanych a metody identyfikacji mogłyby się znaleźć w tabelce. Załączenie rysunków w tej części i dalszych częściach pracy stanowi ładną graficznie ozdobę ale ich tak wielka liczba nie jest merytorycznie potrzebna.

Należy skomplementować opis metod molekularnych. Mam jednak parę uwag.

Nie jest prawdą, że metody molekularne oparte są wyłącznie na wykrywaniu materiału genetycznego, tak jak sugeruje pierwsze zdania tego podrozdziału. Metody molekularne mogą

być oparte również na wykrywaniu białek. Dlatego właściwsze by było gdyby Autorka użyła sformułowania „metody molekularne mogą być oparte na...”

Przykładem próbki nie może być układ oddechowy, pokarmowy czy choroby przyzębia.. Autorka powinna przywołać możliwe nazwy próbek z cytowanych układów, np. identyfikacja określonego gatunku [...] lub panelu drobnoustrojów [...] które mogą być obecne w danej próbce (np. popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe, kał, płytka nazębna)

Moja ogólna uwaga do tego podrozdziału jest następująca. Metody molekularne w ogromnym stopniu przyspieszają diagnostykę i ją usprawniają. I to powinien być wstęp do dalszego opisu wykrywania „trudnych” gatunków.

Bromek etydyny jako barwnik interpolujący nici DNA wykorzystywany jest coraz rzadziej. Obecnie stosuje się barwniki fluoroscencyjne.

Obecnie większość narzędzi bioinformatycznych jest przystosowanych do analizy sekwencji otrzymanych zarówno z wykorzystaniem technologii Illuminy (druga generacja) jak i MinION (trzecia generacja)

Obecnie do identyfikacji stosuje się coraz częściej metodę ANI (Average Nucleotide Identity), a więc porównywanie otrzymanych genomów z genomami wzorcowymi.

Założenia i cel pracy są jasno przedstawione (2s).

Materiał i Metody (22.s) zawiera demograficzną i kliniczną charakterystykę 11 dorosłych pacjentów. Uważam, że wartościową informacją byłoby uzyskanie dane na temat nawyków np. palenie papierosów, spożywanie alkoholu, choroby przewlekłe, bowiem to z pewnością może to rzutować na mikroflorę jamy ustnej. Część dotycząca stosowanych podłoży hodowlanych, metod identyfikacji oraz sekwencjonowania następnej generacji jest zbyt szczegółowo ilustrowana a niektóre zdjęcia nic merytorycznie nie wnoszą.

Wyniki podzielone są na podrozdziały i zawarte zostały na 40 stronach. Opis pacjentów jest bardzo przydatny aczkolwiek nie rozumiem co Doktorantka miała na myśli pisząc, że ..”nie uzyskano materiału genetycznego od pacjentów nr 5 i 6..” Czy to jest tożsame z materiałem biologicznym? Nie uzyskano więc żadnego materiału?

Doktorantka przedstawiła wyniki identyfikacji bakterii uzyskanych drogą hodowli i identyfikacji za pomocą spektrofotometrii mas i sekwencjonowania następnej generacji. Wyniki przedstawiono w sposób czytelny. Nie jest dla mnie zrozumiałym, dlaczego

doktorantka jedynie w jednym przypadku (pacjent nr 7) wykonała klasyczną diagnostykę bakteriologiczną (próbki SP i MR) ? Wartościowe byłyby wyniki uzyskane od wszystkich pacjentów, zwłaszcza, że nie było ich wielu.

Otrzymane wyniki wskazują na obecność większej liczby gatunków bakteryjnych w próbkach pobranych ze śliny i płytki nazębnej niż miazgi zęba/treści ropnej. Warto byłoby wykonać więcej niż jeden posiew aby zobaczyć stabilność tej flory, ewentualnie jej zmienność.

Wyniki sekwencjonowania następnej generacji przedstawiono dla próbek pobranych od pacjentów 1-4 i 7-11. I w przypadku tej metody badawczej nie jest dla mnie zrozumiałym dlaczego nie uzyskano materiału od pacjentów nr 5 i 6?

Ta część rozprawy jest bardzo szczegółowa i bogato ilustrowana. Uzyskano wyniki identyfikacji na poziomie rzędu, rodziny i rodzaju bakterii. Szkoda, że doktorantka nie podjęła próby zaproponowania, tak pięknie przez nią opisanego, mikrobiomu rdzeniowego.

W kolejnej części Rozprawy tj dyskusji, która w mojej opinii przypomina bardziej pracę przeglądową niż omówienie własnych wyników. Doktorantka podkreśla i bardzo słusznie, wagę jakości badanych próbek przywołując autorską technikę ich pobierania zastosowaną w przedstawionej Rozprawie. Brak wyjaśnienia na czym polega jej przewaga nad dotychczasowymi metodami? Co wnosi? Nie bardzo rozumiem odniesienie się do jakości próbek z dróg oddechowych, które od lat powszechnie ocenia się ilościowo?

Przytacza szereg światowych badań dotyczących sekwencjonowania genu 16S rRNA bakterii, które jak pisze Doktorantka można uznać za mikrobiom rdzeniowy jamy ustnej ale nie porównuje tych wyników z uzyskanymi przez nią w prezentowanej Rozprawie. Podobnie jest z innymi zagadnieniami takimi jak np. mikrobiom śliny czy płytki naddziąsłowej, wtórne zakażenia oraz bioróżnorodność populacji bakterii w zależności od miejsca pobrania próbki, opisując wyniki z różnych ośrodków na świecie ale nie dyskutuje ich z własnymi. W większości przypadków gdy przytacza wyniki własnych badań nie są one poparte dyskusją z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy.

Na zakończenie Rozprawy Autorka przedstawia Wnioski, jednak jedynie dwa z nich sformułowane są jak wnioski a pozostałe 7 to powtórzenie wyników. Z łatwością da się to naprawić.

Rozprawę zamyka bardzo bogaty wykaz piśmiennictwa liczący 162 pozycje i obejmujący szereg najnowszych pozycji.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że temat Rozprawy wpisuje się w najważniejsze obecnie tematy badawcze w medycynie i to zasługuje na szczególne wyróżnienie..

Wstęp jest bardzo rozbudowany ale stanowi doskonały materiał do pracy przeglądowej do czego Doktorantkę zachęcam. Świadczy także o znakomitym przygotowaniu Doktorantki do podjętych badań. Doktorantka wykazała bogactwo gatunków bakteryjnych tworzących mikrobom jamy ustnej. Należałoby mocniej podkreślić zbieżność i różnice wyników własnych badań w odniesieniu do badań światowych. Cel badań został osiągnięty a zastosowane metody odpowiadają obecnym kierunkom badawczym. Należy skomplementować opracowanie własnej Autorskiej metody pobierania materiału klinicznego.

Biorąc powyższe pod uwagę, rozprawa doktorska lek.dent Aleksandry Burczyńskiej pt. „Ocena flory bakteryjnej w zębach z martwicą miazgi oraz ropnym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych u osób dorosłych „, spełnia w mojej opinii warunki stawiane tego typu rozprawom 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. nr65, poz595 z późn. zm.)w zawiązku z art.179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. a 2018 r. poz.1669 z późn.zm.) i dlatego przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki lek. dent Aleksandry Burczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wojciech Rymkiewicz

