



Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
lek. stom. Jolanty Sulek
pt. „Wpływ wybranych kompozytowych materiałów stomatologicznych
na ludzkie fibroblasty dziąsła w hodowli”

Promotor pracy: Prof. dr hab. n. farm. Adam Hołownia

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy bardzo istotnego zagadnienia, jakim jest zgodność biologiczna materiałów kompozytowych stosowanych współcześnie w stomatologicznej praktyce klinicznej.

Zagadnienie to jest szczególnie aktualne, gdyż kompozyty stały się podstawowymi materiałami w stomatologii zachowawczej (oprócz szkłojonomerów, kompomerów, giomerów, ormocerów) na wypełnienia ubytków techniką warstwową lub „*bulk fill*” po wprowadzeniu zakazu stosowania amalgamatu srebra zawierającego rtęć. Żywice te są również stosowane w innych dziedzinach stomatologii: w protetyce (osadzanie wkładów, nakładów, ceramicznych licówek i koron protetycznych, mosty adhezyjne), w ortodoncji (mocowanie elementów stałych aparatów na zębach), w periodontologii (mocowanie szyn z włókna szklanego na rozchwianych zębach), w stomatologii estetycznej (w procedurach „*flow injection*” czy „*bondingu*”). Podkreślić też należy, że kompozyty typu „*flow*” szeroko obecnie stosowane, ze względu na znacznie mniejszą zawartość wypełniacza, charakteryzują się większą toksycznością niż klasyczne kompozyty. Jak słusznie Doktorantka podkreśla „w piśmiennictwie jest wiele prac dotyczących ostrej toksyczności żywic kompozytowych, nieznane pozostają subtelne efekty biochemiczne i immunologiczne. W tym zakresie ciągle

brakuje danych, choć można uznać, że elementy składowe żywic są dobrze scharakteryzowane toksykologicznie.” (str. 8). Zatem podjęcie tego tematu przez Autorkę uważam za w pełni uzasadnione i istotne dla szerokiej praktyki stomatologicznej.

Układ pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej, będącej zbiorem publikacji; zawiera 57 stron i składa się z 14 rozdziałów przedstawionych kolejno w Spisie treści:

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską
2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń
3. Wstęp
4. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską
5. Cel pracy
6. Materiały i metody
7. Wyniki
8. Wnioski
9. Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską
10. Streszczenie
11. Summary
12. Spis piśmiennictwa
13. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach z szacunkowym określeniem wkładu
14. Zgoda Komisji Bioetycznej

Odnosząc się do tytułów rozdziałów przedstawionych w *Spisie treści*:

- rozdział 1 powinien być zatytułowany: Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz pozostałych prac (proponowałabym podać również ich tytuły z pełną bibliografią) oraz streszczeń zjazdowych
- rozdział 9 powinien być zatytułowany: Publikacje stanowiące rozprawę doktorską
- rozdział 14: badania przeprowadzono w warunkach *in vitro* na hodowlach komórek, zatem nie wymagały zgody Komisji Bioetycznej, informację tę proponowałabym umieścić w rozdziale Materiały i metody, a nie w odrębnym rozdziale.

Trzon rozprawy stanowią dwie monotematyczne publikacje, w których Doktorantka jest pierwszym autorem:

1. Praca pogładowa: Sulek J. Ossowska A., Marczuk-Kolada G., Hołownia A.: Cytotoksyczność i biokompatybilność kompozytowych, światłoutwardzalnych żywic stomatologicznych. Nowa Stomatol. 2022;27 (4): 129-133. Punkty MNiE: 40 [wyd. Borgis]

- Praca oryginalna: Sulek J., Łuczaj-Cepowicz E., Marczuk-Kolada G., Roslan M., Hołownia A. Cytotoxicity of methacrylate dental resins to human gingival fibroblasts. J. Funct. Biomater. PMID: 35645264, IF: 4,901, p. MNiE: 100 [wyd. MDPI]

W krótkim *Wstępie* (rozdz. 3) oraz kolejnym rozdziale (4) zatytułowanym *Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską* Autorka przedstawia zarys tematu, który podjęła w ramach dysertacji doktorskiej, w szczególności właściwości szeroko stosowanych we współczesnej stomatologii materiałów kompozytowych i czynników łączących je z tkankami twardymi zęba, skupiając się na ich biokompatybilności (praca 1, poglądowa). W prezentacji pracy eksperymentalnej na hodowli komórek – fibroblastach dziąsła ludzkiego oceniła wpływ żywic kompozytowych na wybrane cechy biologiczne tych komórek. Zaproponowała (wraz ze współautorami) nowe podejście do tego zagadnienia, polegające na jednoczesowej ocenie kilku parametrów określających żywotność komórek (praca 2, oryginalna).

Głównym celem pracy Doktorantki było zbadanie i wyjaśnienie mechanizmów cytotoksyczności powszechnie stosowanych w praktyce stomatologicznej trzech wybranych materiałów kompozytowych: *Charisma*, *Estelite Sigma Quick* i *Filtek Z550* wobec hodowli fibroblastów dziąsła ludzkiego, w szczególności ocena ilościowa i jakościowa ostrej i opóźnionej cytotoksyczności tych żywic.

Przygotowując się do pracy nad osiągnięciem założonego celu Autorka zebrała informacje dotyczące tego zagadnienia opublikowane w światowym i polskim piśmiennictwie i przedstawiła je w pierwszej pracy – poglądowej.

W rozdziale *Materiały i metody* Doktorantka przedstawiła bardzo dobrze zaplanowaną koncepcję eksperymentu. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie bardzo nowoczesnych metod oceny cytotoksyczności żywic kompozytowych w odniesieniu do hodowli komórek – fibroblastów dziąsła ludzkiego.

Do oceny Autorka wybrała trzy powszechnie stosowane w stomatologicznej praktyce klinicznej materiały kompozytowe: *Charisma* (Heraeus GmbH, Niemcy), *Estelite Sigma Quick* (Tokuyama Dental Corporation, Japonia) oraz *Filtek Z550* (3M ESPE) zawierające uznane za cytotoksyczne monomery podstawowe i komonomery: bisGMA, UDMA, EGDMA, TEGDMA, bisEMA, HEMA i szereg innych. Ze względu na wielkość cząsteczek wypełniacza, drugi z wymienionych kompozytów określany jest jako suprananohybrydowy, trzeci – nanohybrydowy. Co do pierwszego kompozytu – brak jest informacji, czy jest to

Charisma Classic (mikrohybrydowy), czy *Charisma Diamond*, *Charisma Topaz* (nanohybrydowe) czy też *Charisma Opal* (submikrohybrydowy).

Próbki materiałów (cylindry 5x5 mm²), polimeryzowane niebieskim światłem lampy LED o mocy 1000 mW/cm² przez 2 x 20 s obustronnie, umieszczano w insertach z membraną PET i zanurzano w płynnym medium hodowlanym zawierającym monowarstwę komórek ludzkich fibroblastów dziąsła (komercyjna linia komórkowa ATCC® CRL-2014HGF-1). Zbadano toksyczność ostrą materiałów – bezpośrednio po polimeryzacji próbek oraz toksyczność opóźnioną – po 24 godzinach (próbki przechowywano w płynie hodowlanym)

Przeprowadzono:

- 1) testy cytotoksyczności – test MTT i uwolnienia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz określono cykl komórkowy za pomocą cytometrii przepływowej (FC) na podstawie oceny ilości komórkowego DNA związanego z fluorescencyjnym jodkiem propidyny
- 2) określono ilościowo liczbę komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą cytometrii przepływowej
- 3) oznaczono stres oksydacyjny poprzez analizę wytworzonych reaktywnych pochodnych tlenu metodą cytometrii przepływowej;
- 4) oznaczono ekspresję białka szoku cieplnego (opiekuńczego) – HSP70 metodą Western blot;
- 5) rolę wywołanego żywicą stresu oksydacyjnego (uszkodzenia) w odpowiedzi (naprawie) HSP70 oceniono za pomocą binarnego znakowania fluorescencyjnego;
- 6) oznaczono mikroRNA-9 (miR-9) poprzez zastosowanie odwrotnej transkrypcji i ilościowej reakcji PCR.

W analizie statystycznej bardzo obszernych wyników badań zastosowano dobrze dobrane testy statystyczne (analiza wariancji ANOVA, post-test Bonferoniego dla wielokrotnych porównań). Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Obszerne, bardzo interesujące wyniki badań Doktorantka przedstawiła w odpowiednim rozdziale (7). Doktorantka wraz z zespołem badaczy wykazała, że wszystkie oceniane spolimeryzowane żywice kompozytowe były cytotoksyczne, tzn. zmniejszały liczbę żywych komórek i ich proliferację oraz uszkadzały ich błony komórkowe; największą cytotoksyczność wywoływała *Charisma*, w mniejszym stopniu kolejno *Filtek Z550* i *Estelite Sigma Quick*; po 24 godzinach od polimeryzacji cytotoksyczność opóźniona *Charisimy* znacznie zmalała, w niewielkim stopniu cecha ta widoczna była w przypadku kompozytu *Filtek Z550*, cytotoksyczność *Estelite Sigma Quick* nawet nieznacznie wzrosła.

Wszystkie trzy żywice kompozytowe powodowały wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny z dominującą martwicą komórek, ponadto wywoływały niejednorodne odpowiedzi w mRNA-9 i HSP70. Najwyższy poziom stresu oksydacyjnego wytworzył mniej toksyczny *Filtek Z550*, nie zaś bardziej cytotoksyczne *Charisma* i *Estelite Sigma Quick*.

Uwaga: na stronie 22 w ostatnim akapicie jest: „Największy wzrost (...) zaobserwowałam w komórkach hodowlanych z E, a nieco niższy z C i E”. Powinno być: Najwyższy wzrost (...) zaobserwowałam w komórkach z F, a nieco niższy... udokumentowałam w komórkach hodowanych z C i E. Ten sam błąd występuje w oryginalnej publikacji).

Oprócz cytotoksyczności wszystkie kompozyty wywoływały znaczące działanie antyproliferacyjne (uszkodzenie DNA); cechą tą najwyraźniej charakteryzował się kompozyt *Estelite Sigma Quick*, w mniejszym stopniu *Filtek Z550*, a w najmniejszym *Charisma*. Dodać należy, że cytotoksyczność kompozytów nie była powiązana z ich antyproliferacyjnym działaniem. Eksperymenty z podwójną fluorescencją (uszkodzenie/naprawa wskazały na wspólne cechy kompozytów *Estelite Sigma Quick* i *Filtek Z550*, lecz nie *Charisma*). W podzbiorze komórek odpowiedź binarna wywołana przez dwa pierwsze kompozyty była podobna do siebie i dodatnio powiązana, odmienna od wywołanej przez materiał *Charisma*.

Brak odrębnego rozdziału „Dyskusja” uzasadnia fakt, iż Doktorantka odnosi swoje wyniki eksperymentu do uzyskanych przez innych badaczy, prezentując je w rozdziale *Wyniki badań*, ponadto zawarta jest ona w oryginalnej pracy stanowiącej rozprawę doktorską. Omówienie wyników i konfrontacja ich z danymi z piśmiennictwa przedstawione są w sposób interesujący i świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

Cztery wnioski (2, 3, 4, 5) sformułowane są poprawnie i wynikają z przeprowadzonych badań i w pełni odpowiadają celowi pracy. W mojej opinii pierwszy wniosek (również pierwszy cel pracy doktorskiej) należy wycofać, ponieważ zebrane i przedstawione w pracy poglądowej (publikacja 1) informacje na temat badań biozgodności kompozytowych materiałów stomatologicznych stanowią wstęp do zapoznania się z tym problemem i przygotowania metodyki badań eksperymentalnych, których rezultaty Doktorantka przedstawiła w bardzo interesującej pracy oryginalnej (publikacja 2).

Pragnę podkreślić nowatorski charakter badań, nowoczesny warsztat badawczy zasługujący na duże uznanie oraz duże znaczenie uzyskanych wyników dla stomatologicznej praktyki klinicznej.

Piśmiennictwo wykorzystane w przygotowaniu rozprawy doktorskiej obejmuje 70 pozycji, głównie anglojęzycznych, jest aktualne i właściwie merytorycznie dobrane.

Streszczenia w języku polskim i angielskim są obszerne, obejmują najważniejsze elementy pracy.

Uwagi, które przedstawiłam wcześniej, jak również nieliczne błędy edycyjne nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy.

Autorka wykazała się dobrą znajomością podjętej w rozprawie problematyki, ma też umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, zrealizowała też postawiony przed sobą cel badań. Uzyskane przez Nią wyniki stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy w zakresie problematyki biogodności stomatologicznych materiałów kompozytowych. Rozprawa niniejsza jest nowoczesną pracą oryginalną, w aspekcie praktycznym bardzo przydatną dla klinicznej praktyki stomatologicznej.

W mojej opinii przedstawiona do oceny dysertacja pt. „Wpływ wybranych kompozytowych materiałów stomatologicznych na ludzkie fibroblasty dziąsła w hodowli” spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.).

Zwracam się zatem do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej lek. stom. Jolanty Sułek i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zabrze, dnia 11.08.2023 r.

Kierownik Katedry i Zakładu
Stomatologii Wieku Rozwojowego
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Dr hab. n. med. Lidia Postek-Stefańska, prof. SUM

Lidia Postek - Stefańska