

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Zakład Stomatologii Dziecięcej
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Dorota Olczak-Kowalczyk
Tel (+22) 116 64 24, email: pedodoncja@wum.edu.pl
00-246 Warszawa, ul. Binieckiego 6

Warszawa, 31.07.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Wpływ wybranych kompozytowych materiałów stomatologicznych na ludzkie fibroblasty dziąsła w hodowli”

lek. stom. Jolanty Sułek

Promotor pracy: prof. dr hab. Adam Hołownia

Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Materiałom stomatologicznym, służącym do rekonstrukcji tkanek zębów zniszczonych z powodu próchnicy, urazów lub z wadami rozwojowymi szkliska, stawiane są wysokie wymagania estetyczne i wytrzymałościowe. Powinny silnie wiązać się tkankami zębów tak zapewniać szczelność odbudowy zabezpieczającą przed przeciekami bakteryjnym. Bezwzględnie powinny być także bezpieczne dla pacjenta. Dlatego niezbędne jest poszerzenie wiedzy na temat biokompatybilności stale wprowadzanych na rynek materiałów ale wiedzy opartej o badania naukowe. Dlatego też tematykę pracy lek. stom. Jolanty Sułek pt. „Wpływ wybranych kompozytowych materiałów stomatologicznych na ludzkie fibroblasty dziąsła w hodowli” uważam za przydatną klinicznie i cenną z punktu widzenia naukowego.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska lek. stom. Jolanty Sułek ma postać 57-stronicowe go opracowania, które zawiera wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską (1 strona), wykaz skrótów i oznaczeń (1 strona), wstęp (1 strona), omówienie prac składających się na rozprawę (5 stron), cel pracy (1 strona), materiał i metody (3 strony), wyniki (13 stron), wnioski (1 strona), załączone publikacje (16 stron), streszczenie (3 strony), summary (3 strony), spis piśmiennictwa (7 stron; 70 pozycji), informację o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu (1 strona), informację o braku konieczności zgody Komisji Bioetycznej.

We wstępie Doktorantka uzasadniła tematykę podjętych badań i krótko omówiła charakter prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Są to:

1 - praca poglądowa: *Sulek J, Ossowska A, Marczuk-Kolada G, Hołownia A. Cytotoksyczność i biokompatybilność kompozytowych, światłoutwardzanych żywic stomatologicznych. Nowa Stomatol 2022;27(4):140-144* (autorka w opracowaniu podała, że praca jest przyjęta do druku jednak została już opublikowana)

2 - praca oryginalna pełnotekstowa: *Sulek J, Luczaj-Cepowicz E, Marczuk-Kolada G, Roslan M, Hołownia A. Cytotoxicity of Methacrylate Dental Resins to Human Gingival Fibroblasts. J Funct Biomater. 2022;11;13(2):56. doi: 10.3390/jfb13020056. IF 4.901*

Wkład pracy Doktorantki w obu publikacjach został oszacowany na 60%. Został opisany jako znaczący udział we wszystkich etapach pracy.

W pracy poglądowej dokonała przeglądu piśmiennictwa dotyczącego biokompatybilność materiałów kompozytowych. Wnikliwie przeanalizowała stosowane przez badaczy metody *in vitro*, w tym bezpośrednio i pośrednio. Zwróciła uwagę, że biologiczne i immunologiczne działania niepożądane można oceniać wyłącznie u pacjentów i niestety brakuje modelu eksperymentalnego do ich oceny. Omówiła czynniki odpowiedzialne za cytotoksyczność materiałów kompozytowych, tj. uwalniane wolne monomery, ich mechanizm działania i zawartość w poszczególnych materiałach a także czynniki mające wpływ na cytotoksyczność takie jak czas utwardzania światłem, niewłaściwe obchodzenie się z materiałem, odległość materiału od źródła światła, wilgoć. Praca została zrecenzowana przez recenzentów czasopisma i uzyskała pozytywną recenzję. Stanowi doskonałe źródło wiedzy o cytotoksyczności materiałów, ograniczeniach metodologicznych w jej ocenie i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do przeprowadzenia badań własnych.

Praca oryginalna prezentuje metody zastosowane do oceny cytotoksyczności trzech materiałów: Charisma (zawiera metakrylan bisfenolu A-glicydyłu – BisGMA oraz TEGDM), Estelite Sigma Quick (zawiera BisGMA, TEGDM i wykorzystuje wolnorodnikowe reakcje fotopolimeryzacji) oraz Filtek Z550 (zawiera dimetakrylan uretanu - UDMA, etoksylogowany metakrylan bisfenolu A – BisEMA). Doktorantka podkreśla, że wszystkie szkodliwe substancje wywołują stres oksydacyjny i mogą dyfundować do otoczenia wykazując bezpośrednią toksyczność wobec otaczających tkanek. Badania miały na celu ilościową i jakościową ocenę ostrej i opóźnionej cytotoksyczności dla ludzkich fibroblastów dziąsła w hodowli. Oceniono apoptozę, stres oksydacyjny i dwa biomarkery toksyczności MR (miR-9marker epigenetyczny związany ze stresem i HSP70 – białko opiekuńcze) oraz związek między stresem oksydacyjnym wywołanym MR a reakcją HSP70. Doktoranta bardzo dokładnie opisała zastosowane metody, w tym przygotowanie próbek z żywic i ich zastosowanie do oceny wczesnej i opóźnionej cytotoksyczności, przygotowanie hodowli fibroblastów dziąsła oraz wykonane testy

pozwalające na ocenę żywotności komórek (test MTT, test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej), cyklu komórkowego (cytometria przepływowa), apoptozę (ilościowa ocena komórek), stres oksydacyjny (cytometria przepływowa), ekspresję HSP70 (metoda Western blot przy użyciu przeciwciał), ekspresję miR-9 (metoda odwrotnej transkrypcji i ilościowej reakcji PCR). Wyniki poddała analizie statycznej (analiza wariancji (ANOVA) post-test Bonferroniego dla wielokrotnych porównań przy poziomie ufności 95%).

Wyniki badań przedstawiła w formie opisu, tabel i rycin. Wykazała toksyczność wszystkich świeżo utwardzonych kompozytów, zmniejszenie toksyczności późnej Charismy i zwiększenie Estelite Sigma Quick, zmniejszanie uszkodzenia błony komórkowej w czasie w przypadku Charismy i Estelite Sigma Quick oraz wzrost w przypadku Filtek Z550, stres oksydacyjny wewnątrzkomórkowy powodowany przez wszystkie materiały (z przewagą nekrozy), niejednorodne odpowiedzi w miR-9 i HSP70. Analiza wyników badań z zastosowaniem podwójnej fluorescencji zobrazowała wspólne cechy Estelite Sigma Quick i Filtek Z550, dodatkowo dodatnio skorelowane.

Doktorantka sformułowała 5 wniosków podsumowujących obie prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej. Pierwszy wniosek dotyczy pracy poglądowej. Wskazuje w nim konieczność poprawy algorytmów badań, w celu zwiększenia bezpieczeństwa i efektywności leczenia stomatologicznego. Pozostałe cztery odnoszą się do pracy oryginalnej:

1. Wyniki..... wskazują na udział częściowej polimeryzacji w ostrej toksyczności metakrylowych, kompozytowych materiałów stomatologicznych Charisma, Estelite i Filtek w hodowli fibroblastów dziąsła. W komórkach dochodzi do uszkodzenia błony komórkowej, które może, ale nie musi osiągnąć plateau w 24 godzinie, przy czym, zależnie od badanego materiału, dochodzi do zmian głównie o cechach nekrozy lub słabo wyrażonej apoptozy.
2. Wszystkie badane żywice wywołały znaczące działanie antyproliferacyjne i powodowały stres oksydacyjny, ale nie wszystkie zwiększały ekspresję miR-9 i HSP70.
3. Polaryzacja komórek w układzie dwuwektorowym (naprawa/uszkodzenie), generowała mapy gęstości cech o unikalnym dla każdego materiału charakterze. W przypadku stresu oksydacyjnego i HSP70, wzrost obu parametrów indukowany przez Estelite i Filtek wydaje się być współzależny w znaczącej subpopulacji komórek, natomiast Charisma generowała znaczny wzrost obszaru rozproszenia, o mniej spójnych zmiennych.
4. Wydaje się, że badania toksyczności heterogennych materiałów można w przyszłości oprzeć o tego rodzaju lub podobny model, oceniając zmiany w dystrybucji, wektor zmian (kierunek i rozmiar), a także krotność ogniskowania badanych cech.

Wnioski sformułowane w opracowaniu dobrze podsumowują wyniki prac, świadczą o wnikliwej analizie, dowodzą znaczenia przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, wskazują kierunek i niezbędność ich kontynuacji. Opracowanie nie zawiera dyskusji, z którą można się zapoznać w czasie lektury opublikowanego artykułu, pozytywnie zweryfikowanego przez recenzentów czasopisma *J Funct Biomater*. Struktura dyskusji odpowiada kolenie wykonywanym testom. Jest podzielona na pięć części, w których Doktorantka interpretuje wyniki badań własnych i doniesienia innych badaczy dotyczących poszczególnych badanych parametrów. W mojej opinii bardzo interesujący jest fragment dotyczący ekspresji MiR-9. Jak pisze Doktorantka: *„Rola miR-9 w toksyczności żywic dentystycznych nie jest znana, ale biorąc pod uwagę mutagenne właściwości metakrylanów i ważnych ról niekodujących miRNA we wzroście, apoptozie, różnicowaniu i przeżyciu komórek, kluczowe wydaje się włączenie większej liczby markerów epigenetycznych do systematycznych badań toksyczności MR”*. Ważne jest także podkreślenie, że wyniki badań dotyczące apoptozy indukowanej przez TEGDMA i HEMA są zróżnicowane i wskazane jest aby względna obecność apoptozy była potwierdzana wewnątrzkomórkowymi markerami apoptozy.

omówieniu znalazłam drobne niedociągnięcia, np. brak legendy na rycinie, które w żaden sposób nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. W podsumowaniu stwierdzam, że badania Doktorantki wniosły wiele cennych informacji naukowych, które powinny być wykorzystane w dalszych badaniach i przez producentów materiałów stomatologicznych. Uświadamiają także, że stosowane w praktyce klinicznej materiały kompozytowe do rekonstrukcji mogą negatywnie wpływać na zdrowi człowieka, zwłaszcza gdy są stosowane jednocześnie materiały o skorelowanych cechach toksycznych. Doktorantka, jako lekarz stomatolog, wykazała się nie tylko dużą wiedzą z zakresu materiałoznastwa ale także z zakresu badań na hodowlach komórkowych. Wymagało to od Niej dużego zaangażowania i sumienności.

Przedstawiona mi do oceny praca pt. *„Wpływ wybranych kompozytowych materiałów stomatologicznych na ludzkie fibroblasty dziąsła w hodowli”*, stanowiąca cykl dwóch publikacji, odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim w myśl art.13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki dnia 14 marca 2003 (Dz.U.nr 65, poz.595 z późn. zm.) oraz art.179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1669 z późn. zm.).

Zwracam się zatem z wnioskiem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. stom. Jolanty Sułekdo dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Promotorowi pracy prof. dr hab. Adamowi Hołowni składam gratulacja i wnoszę o wyróżnienie pracy mając na uwadze wartość naukową i kliniczną wyników.

Z wyrazami szacunku

Dorota Oliczak-Kowalczyk

prof. dr hab. n. med. Dorota Oliczak-Kowalczyk
Specjalista II° stomatologii dziecięcej
7053914

