

Ocena pracy doktorskiej lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej pt.: „Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnie indukowanej cukrzycy typu 1 ”

Zaryzykuje tezę, że nie ma lepiej udokumentowanego naukowo na potrzeby stomatologii związku pomiędzy chorobą układową a stanem jamy ustnej jak związek z cukrzycą. Już w XIX wieku opisywano cukrzycę jako jedną z przyczyn „ropotoku zębodołowego” (m.in. John Riggs 1875 i później Emile Magitot). Dzisiaj powszechnie wiadomo, że cukrzyca jest czynnikiem ryzyka zapaleń przyzębia (nazywanych na tą okoliczność jej „szóstym powikłaniem”), kandydozy jamy ustnej, kserostomii a także zapaleń okołowszczepowych. Związek cukrzycy z zapaleniem przyzębia jest obukierunkowy, a potwierdzają to badania interwencyjne wykazujące istotny wpływ leczenia periodontologicznego na zmniejszenie surowiczego stężenia HbA1c. Biologiczne podstawy tych zależności są również dokładnie znane. Wiadomo również, że cukrzyca jest najczęstszą przyczyną sialozy hormonalnej, lecz jej konsekwencje dla zdrowia jamy ustnej i natura tej patologii są tematem mało znanym i dlatego godnym eksploracji naukowej. Dlatego podjęcie tematu aktywności specyficznej egzoglikozydaz lizosomalnych gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnej cukrzycy u szczurów uważam za temat nowatorski i bezwzględnie wart opracowania w postaci pracy doktorskiej. Przeprowadzenie eksperymentu medycznego na zwierzętach przez lekarza dentystę nie jest obecnie częste, dlatego tym bardziej podkreślić należy ambitny i zgoła nieprzyczynkarski wymiar podjętych badań. Dobre przygotowanie doktorantki do badania doświadczalnego i precyzyjna wizja ich zaplanowania a także jej bardzo dobry warsztat biochemiczny odczuwalne są od pierwszego zetknięcia z tym opracowaniem.

Praca doktorska ma wszystkie typowe części. Zauważalna jest nieproporcjonalna do przeprowadzonych badań krótka dyskusja, tocząca się na zaledwie 11 stronach, co stanowi niespełna 8% całości.

Wstęp stanowi 25% całej pracy i jest dobrym wprowadzeniem do meritum zagadnienia. Doktorantka zarysowała w nim etiologię cukrzycy typu 1, opisała budowę i działanie insuliny, przedstawiła budowę anatomiczno-histologiczną ślinianek szczura a także wpływ cukrzycy typu 1 na ślinianki wraz z opisem amylazy ślinowej jako białka markerowego dla właściwego działania tych gruczołów. W analityczny sposób przedstawiła biochemię enzymów lizosomalnych hy-

drolizujących łańcuchy oligosacharydowe glikokoniugatów macierzy pozakomórkowej tkanek, w tym egzoglikozydazy- N-acetylo- β -heksozaminidazę (HEX), β -galaktozydazę (GAL), β -glukuronidazę (GLU), α -mannozydazę (MAN) i α -fukozydazę (FUC). W tej części pracy zrezygnowałbym z opisu embriogenezy ślinianek szczura a także ich węzłów chłonnych na korzyść wzmocnienia „klinicznego tła stomatologicznego” i bardziej dogłębnego przedstawienia wiedzy o konsekwencjach sialozy cukrzycowej w jamie ustnej.

Przyjęte cele pracy są poprawne i stanowią istotne zagadnienia dla zaplanowanego badania doświadczalnego (szczególnie cel pierwszy, piąty i szósty). Mam tylko wątpliwość dotyczącą celu drugiego- czy dwutygodniowa różnica długości życia w grupach referencyjnych szczurów jest wystarczająca dla wnioskowania o wpływie ich wieku na aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych w płynie nadosadowym przyusznych i podżuchwowych gruczołów ślinowych?

Przebieg części doświadczalnej badania, dobór i wielkość grup referencyjnych szczurów, a także sposób indukcji cukrzycy w grupie badanej nie budzą w mojej opinii wątpliwości. Brakuje jedynie informacji w jakiej zwierzęciarni prowadzono eksperyment oraz gdzie i kiedy przeprowadzono badania biochemiczne. Trudno jest mi w sposób autorytatywny oceniać metodologię przeprowadzonych badań laboratoryjnych. Pragnę jednak podkreślić ich różnorodność: oznaczenia w surowicy krwi (glukoza, insulina), masy ciała i masy obu badanych ślinianek oraz płynu nadosadowego z homogenatów obu ślinianek (całkowita zawartość białka i aktywność amylazy ślinowej dla oceny zdolności sekrecyjnej ślinianek oraz ocena aktywności specyficznej 7 egzoglikozydaz lizosomalnych- HEX, HEX A, HEX B, GAL, GLU, MAN i FUC). Dobór nieparametrycznych testów statystycznych uważam za właściwy. W dwuczynnikowych analizach korelacji przyjęto poprawną interpretację współczynnika korelacji. W jakiej sytuacji wykorzystano test ANOVA Kruskala-Wallisa?

Wyniki zestawiono w 28 tabelach. Zostały one przygotowane bardzo starannie i czytelnie. Za najważniejsze uważam: ocenę aktywności specyficznej HEX, HEX A, GAL, MAN i GLU w homogenatach ślinianki przyusznej i podżuchwowej szczurów z wyindukowaną cukrzycą (tabela 9,10, 12, 13,15), ujemne współzmienności aktywności HEX B ślinianki przyusznej z całkowitą zawartością białka i amylazą w 4 tygodniu eksperymentu w grupie zwierząt z cukrzycą (tabela 21 i 23) oraz profile oznaczanych egzoglikozydaz lizosomalnych w obu śliniankach szczurów z cukrzycą w 2 i 4 tygodniu eksperymentu (tabela 27 i 28). Moje wątpliwości interpretacyjne wzbudzają:

- identyczne wartości współczynników korelacji aktywności egzoglikozydaz ślinianki podżuchwowej grupy kontrolnej w 4 tygodniu eksperymentu ze stężeniem glukozy w surowicy krwi (tabela 20), z całkowitą zawartością białka (tabela 22) i amylazą (tabela 24);
- brak istotnej współzmienności pomiędzy stężeniem glukozy a aktywnością amylazy ślinianki przyusznnej w 2 tygodniu eksperymentu w grupie kontrolnej przy współczynniku korelacji $-0,87$ (tabela 26).

Dyskusja jest dojrzała. Doktorantka potrafi w logiczny sposób omawiać wyniki własnych badań laboratoryjnych i skonfrontować je z dobrze dobranym i współczesnym piśmiennictwem. Najbardziej dowiodła tego przy omawianiu wyników badań aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych (część dyskusji od 1 akapitu na str. 105 do 1 akapitu na str. 111 dotycząca wyników zebranych w tabelach od 9 do 15). *Passus* ten kończy bardzo dobre odniesienie badań modelowych do warunków w jamie ustnej w zależności od aktywności specyficznej ślinowych egzoglikozydaz lizosomalnych i ich wpływu na glikokoniugaty błony śluzowej, glikoproteiny osłonki nabytej na powierzchni zębów i śliny. Doktorantka umie również wykorzystywać wieloprofilową wiedzę medyczną dla wytłumaczenia zaobserwowanych różnic aktywności enzymatycznych w przebiegu eksperymentalnie wywołanej cukrzycy. Największy mój zarzut do dyskusji to jej niezrozumiałe skrócenie i nie odniesienie się do wielu interesujących wyników własnych np. istotnych współzmienności z tabeli 25 dla ślinianki przyusznnej, czy profili egzoglikozydaz lizosomalnych gruczołów ślinowych w grupie badanej i kontrolnej (bardzo interesujące w kontekście kontynuacji podobnych badań). Brakuje mi również próby odniesienia całości przeprowadzonych eksperymentalnych badań u szczurów do sytuacji cukrzycowej sialozy u człowieka i jej następstw dla jamy ustnej.

Doktorantka sformułowała sześć wniosków, które w pełni korelują z założonymi celami pracy i wynikają z przeprowadzonych badań. Największą wartość poznawczą moim zdaniem mają wniosek pierwszy, piąty i szósty. Bardziej uszczegółowiłbym pozytywny wniosek pierwszy, a uogólniłbym negatywny wniosek drugi. Kategoryczność wniosku czwartego w odniesieniu do gruczołów ślinowych szczura z wyindukowaną cukrzycą w świetle uzyskanych wyników nie jest wskazana.

Na piśmiennictwo składają się 164 pozycje z lat 1961-2015, z czego 74% z XXI wieku. Piśmiennictwo w 69% składa się z oryginalnych prac anglojęzycznych z prestiżowych periodyków biochemicznych i ogólnomedycznych (najczęściej cytowano *Nature*) oraz stomatologicznych (najczęściej cytowano *Archives of Oral Biology*). Prace polskojęzyczne stanowią około 20% cytowanych prac (najczęściej cytowano *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*). Zacytowano

także aż 19 podręczników, w tym po cztery z biochemii i diabetologii. Wszystkie pozycje są właściwie cytowane w tekście. W spisie publikacji brak wszystkich autorów dotyczy pozycji 10,24,28,45,57,60-62,65,66,68,74,77,79,84,86,95,107,122,131,134,136,145,146,164 a pełnych danych bibliograficznych dla pozycji 3,9,41,43,135,156.

Praca na ogół napisana jest poprawnie. Tylko niekiedy delikatnie razi nadużywanie w dyskusji pierwszej osoby liczby pojedynczej, brak używania polskich określeń przy opisach zmian histopatologicznych w śliniankach (str. 28 i 110) oraz zbyt często powtarzany skrót myślowy „diabetyczny gruczoł przyuszny”.

Całość pracy doktorskiej *lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej* ocenić należy bezwzględnie pozytywnie. Do największych jej walorów zaliczam: nowatorski charakter podjętych badań eksperymentalnych dotyczących zmian aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych w tkance dwóch gruczołów ślinowych w przebiegu cukrzycy indukowanej streptozotocyną, przeprowadzanie dobrze zaplanowanego eksperymentu medycznego na szczurach oraz wykonanie wielu pracochłonnych badań biochemicznych w surowicy krwi szczurów i w płynie nadosadowym z homogenatów ślinianek. Zarzuty i wątpliwości, które podniosłem służą jedynie uszlachetnieniu tego dojrzałego i precyzyjnie przemyślanego badania. Powstało wartościowe opracowanie poszerzające wiedzę o następstwach cukrzycy typu I w śliniankach i konsekwencjach w postaci upośledzenia czynności sekrecyjnych oraz zmian aktywności specyficznej egzoglikozydaz lizosomalnych wpływających na katabolizm macierzy pozakomórkowej tkanek jamy ustnej. Wyrażam przekonanie graniczące z pewnością, że wybrane wątki tej pracy zostaną opublikowane w prestiżowych czasopiśmie z listy filadelfijskiej.

Doceniając poznawczy wymiar badań przeprowadzonych przez *lek. dent. Agnieszkę Kossakowską* i przedstawionych w pracy pt.: „**Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnie indukowanej cukrzycy typu I**”, z pełnym przekonaniem uważam, że w spełnia ona warunki pracy doktorskiej określone w artykule 13.1 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z 18 marca 2011 roku. Dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie *lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej* do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 15.02.2016

Prof. dr hab. Tomasz Konopka

Prof. dr hab. Tomasz Konopka
Wrocław, ul. Kossaka 38/9
4473822 tel. 071 787 40 58