Prof. dr hab. Izabela Maciejewska

Katedra i Zakład Protetyki Stomatologicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

OCENA

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. dent. Elżbiety Klimuszko pt. **„Ocena niektórych makro i mikroelementów w szkliwie zębów bez zmian patologicznych".**

Pochodzące z ektodermy szkliwo zęba buduje najbardziej zewnętrzną część korony zęba chroniącą warstwy wewnętrzne zębinę i miazgę. Szkliwo jest strukturą bezkomórkową, wytwarzaną przez komórki szkliwotwórcze — ameloblasty, których ilość zmniejsza się o około 50% w wyniku apoptozy w trakcie ostatniej fazy amelogenezy. Po zakończeniu morfogenezy korony zęba i uformowaniu dojrzałego szkliwa, pozostałe ameloblasty łączą się z komórkami wewnętrznej ściany woreczka zębowego tworząc oszkliwie. Stąd, szkliwo raz ukształtowane w trakcie amelogenezy nie może być odnawiane z powodu całkowitego braku komórek szkliwotwórczych w dojrzałym organizmie.

Zależnie od lokalizacji warstwa szkliwa różni się szerokością (grubością) na poszczególnych powierzchniach korony zęba. Najszersza warstwa wynosząca około 2,5 mm występuje w okolicy szczytów guzków umiejscowionych na powierzchni okluzyjnej zębów trzonowych i przedtrzonowych. Następnie, sukcesywnie grubość szkliwa zmniejsza się do około 1,3 mm na powierzchniach bocznych korony zęba aż do bardzo cienkiej około 0,01 mm warstwy zlokalizowanej w okolicy szyjki zęba. Prawidłowo zbudowane, dojrzałe szkliwo jest najbardziej zmineralizowaną strukturą organizmu ludzkiego osiągając stopień mineralizacji na poziomie 96%. Tak wysoki stopień mineralizacji zapewnia szkliwu odporność na siły zgryzowe (ściskania) oraz abrazję w trakcie żucia pokarmów. Pomimo dużej twardości szkliwo zęba wykazuje pewien stopień elastyczności wynikający z określonej, a podlegającej ścisłej kontroli orientacji przestrzennej podstawowych jednostek strukturalnych szkliwa nazwanych pryzmatami. Przestrzeń pomiędzy pryzmatami wypełniona jest szkliwem międzypryzmatycznym. Zarówno pryzmaty szkliwa jak i szkliwo międzypryzmatyczne zbudowane są z hydroksyapatytów wapnia ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) będących podstawową jednostką budulcową minerału szkliwa i stanowiących 88-90% jego objętości. Pozostałą część stanowią komponenty organiczne tj białka oraz niewielka ilość wody (około 2%). Uważa się, że zawartość minerału w kolejnych warstwach szkliwa nie jest równomierna i rozkłada się gradientowo od największej jego zawartości w warstwie powierzchniowej do najniższej w okolicy granicy szkliwno-zębinowej.

Formowanie szkliwa rozpoczyna w obszarze tzw. węzłów sygnalizacyjnych zlokalizowanych w okolicy szczytów późniejszych guzków na powierzchniach żujących zębów wieloguzkowych oraz w okolicy brzegu siecznego zębów bezguzkowych i przebiega w trzech fazach: - sekrecyjnej, - przejściowej oraz dojrzewania. Faza sekrecyjna rozpoczyna się od wydzielania do przestrzeni zewnątrzkomórkowej ameloblastów, organicznej macierzy zawierającej białka budulcowe głównie amelogeniny i nieamelogeniny, w tym enamelinę oraz ameloblastynę oraz liczne białka enzymatyczne. Niemal równocześnie do przestrzeni

zewnątrzkomórkowej wydzielane są jony budujące kryształy minerału, co sprawia, że świeżo uformowane szkliwo pierwotne jest zmineralizowane w około 30%. Dopiero po uformowaniu się całej ostatecznej warstwy szkliwa ameloblasty zmieniają swój fenotyp i podejmują funkcję intensywnej mineralizacji polegającej na sukcesywnej degradacji składników organicznych i zastępowaniu ich kryształami hydroksyapatytu. Dzieje się to w fazie przejściowej i fazie mineralizacji szkliwa. W tym czasie ameloblasty intensywnie transportują do przestrzeni zewnątrzkomórkowej makroelementy (jony wapnia, fosforany) oraz mikroelementy, wszystkie budujące kryształy minerału. W konsekwencji, minerały wydzielane poprzez wypustkę Tomesa formują pryzmaty szkliwne, a te wydzielane przez ścianę komórkowa poza wypustką Tomesa dają początek szkliwu międzypryzmatycznemu.

Z uwagi na fakt, że warunkiem powstania prawidłowo zbudowanego szkliwa jest degradacja białek wydzielanych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej ameloblasta we wczesnej fazie formowania szkliwa oraz zastąpienie fazy organicznej minerałem o właściwym składzie, **tematyka pracy podjęta w rozprawie doktorskiej przez lekarz dentystę Elżbietę Klimuszko jest w pełni uzasadniona, niezwykle atrakcyjna i aktualna. Z uznaniem przyjmuję fakt podjęcia przez Doktorantkę tak trudnego tematu, głęboko zakorzenionego w badaniach związanych z naukami podstawowymi i biochemią struktur budujących ząb.**

Praca ma typowy układ charakterystyczny dla prezentacji wyników badań eksperymentalnych. Rozprawa obejmuje 135 stron tekstu z 24 rycinami i 21 tabelami oraz 210 pozycji piśmiennictwa. Cytowane piśmiennictwo stanowi obszerną bibliografię prac, poświęconą w większości rozwojowi struktur organicznych oraz minerału szkliwa, a także procesom metabolicznym modulującym powstawanie prawidłowego szkliwa. Znamienita większość piśmiennictwa (aż 75%) stanowią pozycje anglojęzyczne.

Na 29 stronach *Wstępu* Doktorantka szczegółowo przedstawiła zagadnienia związane z budową i rozwojem szkliwa uwzględniając skład mineralny szkliwa. Szczególny nacisk położyła Doktorantka na opis minerałów, które następnie badała w swojej pracy eksperymentalnej. Szeroki opis dotyczący rozwoju szkliwa zawiera etapy formowania zawiązka zęba z pełnym opisem procesu amelogenezy zarówno w aspekcie składowych organicznych szkliwa, w tym białek strukturalnych amelogeniny, ameloblasty, enameliny oraz tufteliny, jak i najważniejszych dla amelogenezy białek enzymatycznych metaloproteinazy 20 (enamelizyny, MMP-20) i proteinazy serynowej 1 (kalikreiny-4; KLK-4). We wstępie uwzględniono również opis mechanizmu mineralizacji szkliwa oraz opisano czynniki genetyczne mogące mieć wpływ na powstanie szkliwa wadliwego.

W tej części pracy Doktorantka nie ustrzegła się jednak kilku błędów i niezręcznych sformułowań wynikających po części z tłumaczenia nazw angielskich na polskie. Na stronie 20, Doktorantka użyła sformułowania „histodyferencjacja", która jest niczym innym jak różnicowaniem histologicznym. Dodatkowo naleciałością anglojęzyczną wydaje się używanie w całym tekście słowa „proteina". W nomenklaturze polskiej odpowiednikiem angielskiego słowa *protein* jest białko, natomiast nie istnieje pojecie chemiczne proteina. Stąd opisywana nieco dalej sialoproteinaza zębinowa i/lub fosforoteinaza zębinowa są odpowiednio białkiem sialowym zębiny oraz białkiem fosforowym zębiny. Dodatkowo sformułowanie proteinaza (końcówka – aza) nasuwa chemiczne przypuszczenie, że jest to białko enzymatyczne rozkładające białka, podczas gdy zarówno białko sialowe jak i fosforowe zębiny są białkami strukturalnymi niewykazującymi żadnych właściwości enzymatycznych.

Na stronie 9 autorka podaje, że..."kryształy hydroksyapatytu są wydzielane przez wypustkę Tomes'a jednego, centralnego ameloblastu"... . Stwierdzenie to błędnie nasuwa przypuszczenie, że cały kryształ jest wydzielany przez komórkę do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, podczas gdy komórka szkliwotwórcza – ameloblast transportuje do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jony, które następnie ulegają precypitacji, dochodzi do nukleacji kryształu, a następnie jego wzrostu. W opisie odontogenezy na stronie 16 Doktorantka wymienia, iż ..."Rozwinięty narząd szkliwotwórczy zbudowany jest z nabłonka zewnętrznego, nabłonka wewnętrznego narządu szkliwotwórczego, miazgi oraz komórek nabłonka wewnętrznego bocznej części narządu szkliwotwórczego"... Ten ostatni twór jako taki nie jest częścią składową narządu szkliwotwórczego. Dodatkową składową jest natomiast część komórek złożonych z około 4-warstw tworzących tzw. warstwę pośrednią odpowiedzialną za odżywianie komórek nabłonka wewnętrznego narządu szkliwotwórczego. Komórki, o których pisze Doktorantka są szybko dzielącymi się komórkami nabłonka wewnętrznego narządu szkliwotwórczego odpowiedzialnymi za formowanie ostatecznego kształtu przyszłej korony zęba. Na stronie 18 oraz 28 wstępu istnieje niespójność danych polegająca na podaniu informacji, iż w fazie sekrecji..."początkowa zawartość minerałów wynosi 15%", podczas gdy na stronie 28 Doktorantka opisując początki formowania kryształów hydroksyapatytów (mające miejsce praktycznie równocześnie z wydzieleniem organicznej macierzy) stwierdza, że ..."powstaje szkliwo zawierające 30% substancji nieorganicznych". Te ostatnią informację uznaje się obecnie za prawidłową gdyż w przeciwieństwie do mineralizacji zębiny, mineralizacja szkliwa rozpoczyna się praktycznie w tym samym czasie kiedy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej ameloblasta zostają wydzielone białka strukturalne szkliwa.

Na stronie 22 istnieje błędna informacja iż białka DSPP i SIBLING działają jako cząsteczki sygnałowe, podczas gdy białka z rodziny SIBLING (DSPP również należy do tej rodziny) są białkami strukturalnymi biorącymi aktywny udział w budowie macierzy organicznej kości i zębiny. Na stronie 24 Doktorantka stwierdza... „Białko to (ameloblastyna przyp. recenzenta) w dalszym przebiegu amelogenezy, przyłącza się do ameloblasta, utrzymując sekrecyjny fenotyp komórki i jej podziały". Ameloblastyna jest białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej, a nie białkiem cyklu komórkowego więc nie może odpowiadać za podziały ameloblasta. Na stronie 25 w opisie enamelizyny zakradło się przekłamanie w stwierdzeniu, że jest to metaloproteinaza odpowiedzialna za rozwój wszystkich białek szkliwa. MMP-20 jest enzymem degradującym (rozkładającym) białko więc korzystniej byłoby użyć stwierdzenia, że MMP-20 odpowiada za modyfikacje potranslacyjne lub po prostu rozkład białek strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej szkliwa.

Błędy zawiera podrozdział 1.2.5 omawiający czynniki genetyczne wpływające na rozwój szkliwa. W pierwszym zdaniu Autorka stwierdza, że tworzenie szkliwa jest kontrolowane genetycznie i jest zakodowane w genach i DNA; i kolejno, że geny nie mogą kodować minerału, w związku z tym DNA koduje RNA, a ten koduje białka (str. 30 wers 5-7). Stwierdzenia powyższe sugerują, iż geny i DNA to odrębne struktury kodujące, podczas gdy gen jest fragmentem DNA odpowiedzialnym za kodowanie konkretnego białka, gdyż 99,9% kodującego genomowego DNA koduje białka. Wyjaśnić należy również, że przepisywanie informacji genetycznej każdorazowo odbywa się poprzez transkrypcję DNA na RNA i kolejno translację RNA na białka. Cały proces dotyczy ekspresji wszystkich 25 tysięcy genów ulegających transkrypcji w ludzkim genomie. Dodatkowo, informacja genetyczna przekazywana do białek sygnalizacyjnych, transferowych, białek kodujących kanały wapniowe, białek transportujących jony itp. sprawia, że składowe

niezbędne do budowy szkliwa, w tym jony tworzące hydroksyapatyt są transportowane przez ameloblast do przestrzeni pozakomórkowej, a sterowane przez białka macierzy, formują właściwą strukturę szkliwa. W tym samym podrozdziale zawarto informację, iż gen kodujący amelogeninę jest zlokalizowany na chromosomie X. W gruncie rzeczy gen kodujący amelogeninę jest zlokalizowany zarówno na chromosomie X jak i Y i jest wykorzystywany w medycynie sądowej do oznaczania pochodzenia próbek biologicznych, gdyż obydwie sekwencje różnią się ilością kodonów. Na stronie 31 zmodyfikować należałoby sformułowanie „gen autosomalny recesywny" gdyż jest to rodzaj skrótu myślowego. Gen jest dziedziczony zawsze od rodzica, bez względu jaką informację genetyczną przenosi, natomiast fenotyp wynikający z kodowanej informacji może być dziedziczony w sposób autosomalny recesywny bądź dominujący.

Doktorantka nie ustrzegła się błędów dotyczących genu *DSPP* kodującego białko sialofosforowe zębiny (str.31 ostatni akapit). Gen *DSPP* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 4q21 i koduje jedno białko DSPP, które ulega podziałowi na DSP oraz DPP. W tekście błędnie podano informację, że DSP jest produkowana w zębinie i cienkiej warstwie szkliwa, gdyż białko DSP nie może być biosyntetyzowane oddzielnie od DPP. Dodatkowo na następnej stronie stwierdzono, że DSP powoduje wzrost twardości szkliwa, podczas gdy nadmierna ekspresja DPP powoduje powstanie szkliwa wadliwego. Białko DSPP jest syntetyzowane głównie w zębinie, w stężeniu 400 krotnie wyższym niż w innych tkankach. Dopiero w wyniku modyfikacji potranslacyjnych ulega podziałowi na DSP, które jest białkiem hamującym proces mineralizacji oraz DPP które odpowiada za nukleację i mineralizację kryształów hydroksyapatytu zębiny (badania Boskey et all). Stąd, nie jest możliwe stymulowanie mineralizacji przez DSP. Jednocześnie pozycja piśmiennictwa nr 199 cytowana w tym miejscu przez Doktorantkę jako tekst źródłowy nie omawia wyników badań nad DSPP, a badania nad odpornością szkliwa na pękanie powstające w wyniku nacisków na szkliwo w różnych osiach.

W rozdziale *Materiał* i *Metody* autorka wyczerpująco opisała stosowaną procedurę analityczną łącznie z podaniem normy zawierającej zalecenia dotyczące sposobu preparacji oraz przechowywania zębów. Eksperyment przeprowadzono na 15 ludzkich zębach siecznych górnych pozyskanych z banku zębów, co eliminowało konieczność uzyskania zgody stosownej Komisji Bioetyki. W ww rozdziale Doktorantka zawarła informacje o odległościach szlifu poszczególnych warstw w zależności od przebiegu linii Retziusa (str. 37), jednak nie określiła w jaki sposób oznaczała ilość kolejnych linii. Należałoby zaznaczyć czy uśredniano dobową ilość odkładanego szkliwa, a tym samym ilość linii w kontekście pobierania próbek co 150μm, czy też kolejne linie liczono obserwując obraz pod dużym powiększeniem.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń wraz z analizą statystyczną doktorantka opisała na 31 stronach. Wyniki te są uzupełnione 10 rycinami i 20 tabelami. Jest to imponujący materiał. Otrzymane rezultaty są przedstawione czytelnie, a analizę statystyczną przeprowadzono na reprezentatywnym materiale, wykorzystując metody stosowne do osiągniętych wyników badań i liczebności porównywanych grup. Drobna uwaga recenzenta dotyczy jedynie faktu, iż ze względu na wysokie wartości odchylenia standardowego, przekraczające w niektórych grupach wartości średniej (tabela 2, 3, 4), bardziej czytelne byłoby podanie wartości mediany i/lub przy próbie 15 składowych w grupie pokazanie wykresu w postaci punktów ukazujących rozkład wyników jednostkowych. Pozyskane prze Doktorantkę wyniki wykazały, iż najniższe stężenie wapnia, magnezu, cynku oraz miedzi występowało w najbardziej powierzchownej warstwie szkliwa. Największe stężenie wapnia i magnezu odnotowano odpowiednio na głębokości 750-900 μm oraz 900-1050 μm. Natomiast, stężenie

cynku i miedzi rosło do najwyższej wartości odpowiednio w warstwie 150-300 μm oraz 450-600 μm. Taki rozkład stężeń badanych minerałów skutkował, iż najniższa wzajemna proporcja pomiędzy wapniem a magnezem, wapniem a cynkiem oraz wapniem a miedzią wystąpiła w warstwie na głębokości 450-600 μm. Odnotowano również gwałtowne wzrosty proporcji magnezu do cynku oraz magnezu do miedzi odpowiednio w warstwach 750-900 μm oraz 900-1050 μm. Wnikliwa analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice stężeń wapnia oraz cynku pomiędzy kolejnymi badanymi warstwami oraz zależność pomiędzy zawartością wapnia i magnezu w kolejnych warstwach na głębokościach 150 – 900 μm. Stwierdzono również korelację pomiędzy zawartością wapnia i cynku w warstwie na głębokości 150-300 μm. Korelacje wartości magnezu w kolejnych badanych warstwach wystąpiły jedynie w płytkich warstwach szkliwa (150-600 μm), natomiast korelacje magnezu do cynku dotyczyły warstw 150-300 μm, 450-600 μm oraz 900-1050 μm. Jedyną stwierdzoną korelacją stężeń miedzi wykazano w relacji miedzi do cynku i dotyczyła ona warstwa 150-300 μm, 450-600 μm oraz 600-750 μm. Ze względów edytorskich należałoby usunąć podrozdziały 5.2.2.2., 5.2.3.2., 5.2.3.3., 5.2.4.2. 5.2.4.3. oraz 5.2.4.4. gdyż stanowią one odwróconą relację podrozdziałów 5.2.1.2., 5.2.1.3., 5.2.2.3., 5.2.1.4., 5.2.2.4. oraz 5.2.3.4.

W rozdziale Dyskusja na 16 stronach tekstu przedstawiona jest szczegółowa analiza otrzymanych wyników. Doktorantka omawia kolejno znaczenie badanych minerałów dla budowy zdrowego szkliwa oraz potencjalne konsekwencje kliniczne zmian w ich stężeniu dla rozwoju oraz dojrzewania szkliwa, a także przemian metabolicznych zachodzących w trakcie procesu amelogenezy. Ponadto Doktorantka metodycznie analizuje wpływ zmian w zawartości poszczególnych minerałów na powstawanie szkliwa wadliwego, ulegającego szybkiemu ścieraniu, co wymusza nie tylko konieczność interwencji lekarskiej, niejednokrotnie w postaci rozległego leczenia protetycznego odbudowującego utracone twarde tkanki zęba, ale może również skutkować powstaniem zaburzeń czynnościowych całego układu stomatognatycznego. Doktorantka umiejętnie dyskutuje z innymi autorami wyniki swoich badań wskazując na te zgodne z wynikami uzyskanymi we własnych eksperymentach, jak również odmienne od dotychczas opisanych. W przypadku wyników rozbieżnych, Doktorantka podejmuje próbę wyjaśnienia przyczyn, dla których wyniki różną się, wykazując przy tym rozwagę wynikającą niewątpliwie z bardzo znaczącej wiedzy jaką Doktorantka posiadła w trakcie wykonywania doświadczeń jak również zaznajamiania się z dostępną literaturą.

Pracę wieńczy sześć wniosków, które doktorantka sformułowała na podstawie analizy uzyskanych wyników. Obserwacje te odpowiadają celom pracy. Z ostrożnością należy podejść do interpretacji wniosku piątego w zakresie stwierdzenia, że w okresie poerupcyjnym istnieje wymiana jonowa na granicy szkliwno-zębinowej. Natomiast wniosek szósty ..”wyznaczone zawartości badanych pierwiastków oraz ich wzajemne proporcje tworzą normę świadczącą o prawidłowym przebiegu procesu mineralizacji i dojrzewania szkliwa w okresie przederupcyjnym” nie wypływa z założeń i celu pracy i powinien być traktowany z dużą ostrożnością gdyż przyjęło się, iż tzw. normę fizjologiczną można określać po przebadaniu 1000 lub więcej próbek.

W całości pracę lekarz dentysty Elżbiety Klimuszko oceniam bardzo pozytywnie. Od strony edytorskiej praca została wykonana bardzo starannie. Uważam, że otrzymane przez Doktorantkę wyniki w istotny sposób przyczynią się do lepszego zrozumienia mechanizmów powstania zdrowego szkliwa o właściwym składzie procentowym. **Stanowią one oryginalny wkład do wiedzy na temat składu i wzajemnych proporcji minerałów budulcowych**

(wapnia i magnezu) oraz mikroelementów (cynku i miedzi) tworzących zdrowe szkliwo, a także ich wzajemnych relacji w poszczególnych warstwach szkliwa, co przyczynia się również do pogłębienia wiedzy na temat etapowego przebiegu procesu amelogenezy. Chcę zaznaczyć, że przedstawione w mojej ocenie uwagi i zauważone błędy dotyczą głównie części opisowej dysertacji i w niczym nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej pracy. **Pozwala mi to z pełnym przekonaniem wystąpić do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie lekarz dentystę Elżbietę Klimuszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Gdańsk, dn. 10-04-2016r.

prof. dr hab. n. med. Izabela Maciejewska
spec. protetyki stomatologicznej
80-172 Gdańsk, ul. Nobla 8