



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
ZAKŁAD DERMATOLOGII ESTETYCZNEJ
KATEDRY CHOROÓB SKÓRNYCH I WENERYCZNYCH PUM
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Mariola Marchlewicz

Szczecin, dnia 11.08.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Domian
„Ocena komórek błony śluzowej jamy ustnej u pacjentów z uzupełnieniami
protetycznymi” wykonanej w Zakładzie Histologii i Cytofizjologii
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem prof. dr hab. Ireny Kasackiej

Jama ustna jest początkowym odcinkiem przewodu pokarmowego, pełni ona wiele ważnych funkcji związanych z pobieraniem, rozdrabnianiem i przygotowaniem pokarmów do połknięcia. Wykazywane w literaturze powiązania między poważnymi problemami układowymi a zmianami patologicznymi jamy ustnej potwierdzają, że jej zdrowie może mieć wpływ na cały organizm. Prawidłowa czynność jamy ustnej zależna jest od wielu czynników, zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych. W związku, między innymi, ze zwiększaniem się liczby osób starszych w populacji, wzrasta liczba pacjentów z częściowym lub całkowitym brakiem uzębienia. Braki w uzębieniu powodują znaczne upośledzenie funkcji układu stomatognatycznego, wpływając na zaburzenia żucia, utrudniając poprawną wymowę, zmieniając rysy twarzy. Rekonstrukcja i rehabilitacja protetyczna w przypadku częściowego lub całkowitego braku uzębienia ma na celu czynnościowe i estetyczne odtworzenie brakujących zębów. Jedną z najbardziej powszechnych metod stosowanych w protetyce stomatologicznej są ruchome protezy akrylowe.

Każdy materiał obcy, wprowadzany do ludzkiego organizmu w celu terapii czy rehabilitacji, może spowodować działania niepożądane. Dotyczy to w szczególności materiałów stomatologicznych czy protetycznych, których długotrwały kontakt z błoną śluzową jamy ustnej może zaburzać jej funkcje i prowadzić do poważnych zmian, zarówno lokalnych, jak i dotyczących całego organizmu. Materiały stosowane do produkcji protez mają długotrwały kontakt ze środowiskiem jamy ustnej, a zatem ich wpływ na kondycję błony śluzowej może być znaczący. Doniesienia wskazują, że 20% - 70% pacjentów mających ruchome protezy dotkniętych jest stomatopatiami protetycznymi.

Dlatego histopatologiczna ocena komórek błony śluzowej jamy ustnej u pacjentów używających ruchome częściowe i całkowite uzupełnienia protetyczne, z wykorzystaniem łatwo dostępnego materiału diagnostycznego, jakim są komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej oraz ślina, przeprowadzone w ocenianej Rozprawie mogą pozwolić na lepsze zrozumienie zmian

zachodzących w tkankach jamy ustnej wskutek długotrwałego kontaktu z materiałem, z którego wykonane są uzupełnienia protetyczne.

Przedłożona do recenzji Rozprawa zawarta jest 116 stronach. Na początku pracy został umieszczony wykaz stosowanych skrótów, z objaśnieniami w języku polskim i angielskim. Rozprawa podzielona została na 10 rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników, wnioski, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, załączniki oraz piśmiennictwo. **Podział pracy na rozdziały i ich wzajemne proporcje nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Poza tym, że rozdział Wstęp wydaje się proporcjonalnie nieco zbyt długi w stosunku do rozdziału Dyskusja, ale może to wynikać z nowatorskiej tematyki pracy i niezbyt dużej liczby publikacji, z którymi Autorka mogłaby przedyskutować uzyskane przez siebie wyniki.**

Na uznanie zasługuje umieszczenie w pracy 13 rycin i 4 tabel oraz 33 fotografii sporządzonych profesjonalnie przez Doktorantkę.

Rozdział **Wstęp** liczący 43 strony, został podzielony na 5 podrozdziałów. Każdy z nich został precyzyjnie zaplanowany.

W **pierwszym** podrozdziale, podzielonym jeszcze na 3 kolejne, Doktorantka opisała budowę oraz funkcje błony śluzowej jamy ustnej oraz czynniki zarówno miejscowe, jak i ogólnoustrojowe, wpływające na stan błony śluzowej. Niektóre z przedstawianych informacji podsumowała w czytelnych, przejrzystych tabelach.

W **drugim** podrozdziale **Wstępu** Doktorantka przedstawiła skład i główne funkcje śliny, czynniki regulujące jej wydzielanie oraz stany mające wpływ na zwiększenie lub zmniejszenie wydzielania śliny. Opisała także jej wykorzystanie w diagnostyce podkreślając, że materiał diagnostyczny jakim jest ślina cieszy się coraz większą popularnością między innymi ze względu na dostępność i łatwość w pobieraniu, co pozwala na wykrycie w ślinie np.: markerów nowotworowych, wykładników stanu zapalnego, substancji biologicznie czynnych – hormonów, leków, substancji toksycznych.

W kolejnym, **trzecim** podrozdziale **Wstępu**, podzielonym na 5 kolejnych części Doktorantka opisała różne metody uzupełnień protetycznych, protezy częściowe i całkowite, stomatopatie protetyczne oraz działania niepożądane ruchomych uzupełnień protetycznych. Podkreśliła, że rozwiązaniem problemu ubytków w jamie ustnej są protezy zębowe, które odtwarzają funkcjonalność żucia i poprawiają samopoczucie pacjenta, jednak problemem mogą być skutki uboczne użytkowania protez akrylowych, wynikające z ucisku na błonę śluzową i na kość, co prowadzi do zaniku kości. Etiologia stomatopatii protetycznych jest złożona i wieloczynnikowa. Głównymi czynnikami sprzyjającymi powstawaniu stomatopatii są: niedostateczna higiena protez, kolonizacja protez grzybami drożdżopodobnymi, urazy mechaniczne, schorzenia układowe (cukrzyca), reakcje alergiczne, czynniki chemiczne.

W **czwartym** podrozdziale **Wstępu** Doktorantka opisała apoptozę. Podkreśliła, że dla zachowania homeostazy organizmu bardzo istotna jest kontrola procesów proliferacji i zaprogramowanej śmierci komórek (programmed cell death – PCD). Doktorantka podkreśliła, że oba te zjawiska stanowią podstawowe mechanizmy w procesie adaptacji. Opisała szereg zmian morfologicznych, charakterystycznych dla komórek umierających w wyniku apoptozy. W dalszej części podkreśliła rolę kaspaz, enzymów proteolitycznych odgrywających kluczową rolę w mechanizmie apoptozy. Ze względu na rolę, jaką pełnią w komórce, podzieliła je na inicjatorowe (8, 9, 10) oraz efektorowe (3, 6, 7). Opisała też udział kaspaz w procesach, niezwiązanych z apoptozą, zachodzących w komórce, takich jak: modulacja odpowiedzi zapalnej, proces różnicowania i proliferacji.

Dalej, Doktorantka przedstawiła informacje co do roli antyapoptotycznej oraz proapoptotycznej, jaką odgrywa transkrypcyjny czynnik jądrowy κB (nuclear factor - κB). Wykazano antyapoptyczne działanie czynników transkrypcyjnych Rel/NF- κB w wielu rodzajach

komórek. Najlepiej poznanymi białkami, które podlegają ścisłej kontroli NF- κ B są białka c-IAP – komórkowe inhibitory apoptozy. Wykazują one zdolność do hamowania kaspaz efektorowych 3 i 6, jak również blokowania aktywacji prokaspaz 6 i 9. Odgrywając istotną rolę w procesach odpornościowych oraz zapalnych, poprzez wzmożenie ekspresji genów odpowiedzi immunologicznej, NF- κ B wpływa głównie na szlak wewnątrzpochodny apoptozy. Zauważyła istotny fakt, że coraz więcej jest doniesień na temat czynnika NF- κ B i jego roli jako inhibitora bądź aktywatora apoptozy, w zależności od typu komórki oraz rodzaju czynnika wywołującego ten rodzaj śmierci komórki.

W dalszej części **Wstępu** Doktorantka opisała rolę białka p53 w apoptozie. Podkreśliła, że prawidłowe funkcjonowanie organizmu zależy od obecności skutecznych mechanizmów regulujących procesy życiowe każdej komórki do których należy białko p53. Białko to chroni przed reprodukcją komórek z uszkodzeniami DNA, poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego i wywołanie aktywacji mechanizmów naprawy komórek/wywołanie śmierci komórki. W procesie apoptozy białko p53 zaangażowane jest w aktywację kaspaz, które odpowiedzialne są za degradację wielu białek.

W kolejnym, **piątym Wstępie** rozdziale Doktorantka opisała czynniki wewnątrz lub zewnątrzpochodne (fizyczne – urazy mechaniczne, wysoka lub niska temperatura, promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, pole magnetyczne; chemiczne – kwasy, zasady, terpentyna, karagenina; biologiczne – bakterie, wirusy, grzyby, pierwotniaki, egzotoksyny, endotoksyny) wywołujące proces zapalny, który przebiega z zaangażowaniem wielu mechanizmów fizjologicznych i różnych typów komórek.

W kolejnym podrozdziale opisała cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2). COX-1 bierze udział zarówno w utrzymaniu homeostazy organizmu w prawidłowych warunkach, jak i we wczesnych etapach odczynu zapalnego (0-1 godzina). Z kolei COX-2 jest zaangażowana w późniejsze etapy reakcji zapalnej (> 1 godzina), kiedy dochodzi do rozwoju odpowiedzi immunologicznej.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że informacje przedstawione we **Wstępie** pracy doktorskiej **świadczą o bardzo dobrej znajomości aktualnej literatury światowej i dużej wiedzy Doktorantki dotyczącej przedmiotu jej zainteresowań badawczych.**

Celem, który wyznaczyła sobie Doktorantka w obecnej pracy jest ocena wpływu uzupełnień protetycznych na błonę śluzową jamy ustnej w zależności od rodzaju protezy i czasu jej użytkowania.

Cel ten realizowała poprzez:

- Ocenę morfologiczną komórek nabłonkowych błony śluzowej jamy ustnej pacjentów użytkujących ruchome uzupełnienia protetyczne
- Ocenę reakcji immunohistochemicznych w komórkach błony śluzowej jamy ustnej z zastosowaniem swoistych przeciwciał wykazujących kaspazę 3, kaspazę 8, kaspazę 9, NF- κ B, białko p53
- Ocenę ekspresji kaspazy 3, kaspazy 8, kaspazy 9, NF- κ B, p53 i COX-2 metodą Western Blot.

Cele podjętych badań zostały sformułowane jasno i przejrzysto.

Doktorantka uzyskała na przeprowadzenie badań zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, (nr zgody: R-I-002/503/2015).

Rozdział **Materiał i metody** zawarto na 7. stronach. Analiza dotyczyła grupy 45 zdrowych osób w wieku od 42 do 65 lat (24 kobiet i 21 mężczyzn), będących pacjentami Zakładu Chirurgii Stomatologicznej i Zakładu Protetyki Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Z każdym pacjentem został przeprowadzony dokładny wywiad. Następnie zostało przeprowadzone rutynowe badanie stomatologiczne, w standardowych warunkach. Oceniano: stan i liczbę zębów, rodzaje wypełnień, stan higieny

jamy ustnej, stan dziąseł, objawy stanu zapalnego. Do badania zostali zakwalifikowani pacjenci bez żadnych zmian klinicznych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej.

Pacjenci zostali podzieleni na 5 grup w zależności od czasu użytkowania i rodzaju protezy:

A – grupa kontrolna, 5. ogólnie zdrowych pacjentów nie użytkujących uzupełnień protetycznych,

B – 10. ogólnie zdrowych pacjentów użytkujących protezę częściową krócej niż dwa lata,

C – 10. ogólnie zdrowych pacjentów użytkujących częściową protezę dłużej niż dwa lata,

D – 10. ogólnie zdrowych pacjentów użytkujących protezę całkowitą krócej niż dwa lata,

E – 10. ogólnie zdrowych pacjentów użytkujących protezę całkowitą dłużej niż dwa lata.

Materiał do badań histologicznych stanowiły wymazy z błony śluzowej jamy ustnej mającej kontakt z uzupełnieniem protetycznym. Wymazy barwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy. Mikroskopowej ocenie poddano wielkość, kształt, jądro komórkowe oraz wybarwienie cytoplazmy komórek nabłonkowych błony śluzowej jamy ustnej, poddano je też komputerowej analizie morfometrycznej. Przeanalizowano: pole powierzchni komórki (CA), pole powierzchni jądra komórkowego (NA) i stosunek objętości jądra do objętości cytoplazmy (NA/CA).

Do przeprowadzenia reakcji **immunohistochemicznych** w komórkach z wymazów, z jamy ustnej zastosowano odpowiednie przeciwciała (Anti-Caspase-3 antibody, Caspase 8 antibody, Caspase 9 antibody, Anti-NF-kB p65 antibody, Anti-p53 antibody). W próbkach śliny oznaczono metodą Western Blot ekspresję kaspazy-3, kaspazy-8, kaspazy-9, NF-kB p65, p53, beta aktyny.

Analizę statystyczną przeprowadzono **prawidłowo**, przy użyciu pakietu statystycznego Statistica wersja 12.5 PL (StatSoft Inc. USA), w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Duncana. Za istotne statystycznie przyjęto różnice między średnimi przy $p < 0,05$.

Przy przygotowywaniu pracy do druku można byłoby zamieścić informację czy uzyskane wyniki cechował rozkład normalny.

Rozdział **Wyniki** został dokładnie i szczegółowo opracowany przez Doktorantkę.

Doktorantka oceniła morfologię komórek nabłonkowych błony śluzowej jamy ustnej osób ze wszystkich grup. Wykazała, że obraz komórek nabłonka błony śluzowej pacjentów użytkujących częściowe protezy **krócej niż dwa lata** różnił się istotnie od obserwowanego u pacjentów grupy kontrolnej. Różnice morfologiczne dotyczyły zarówno wielkości i kształtu, jak i barwności cytoplazmy badanych komórek. Niektóre komórki cechowało zaburzenie stosunku objętościowego jądra i cytoplazmy, w innych występowały małe, ciemno wybarwione, pyknotyczne jądra. Zmiany morfologiczne komórek nabłonkowych błony śluzowej jamy ustnej pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne częściowe **dłużej niż dwa lata** (Grupa C - proteza częściowa dłużej niż dwa lata) były mniej zaznaczone, w porównaniu do pacjentów grupy B (proteza częściowa krócej niż dwa lata). Najbardziej nasilone były zmiany w morfologii komórek błony śluzowej pacjentów użytkujących **całkowite uzupełnienia protetyczne krócej niż dwa lata** (grupa D) vs pacjenci pozostałych grup. W obrazie mikroskopowym obserwowano komórki o bardzo zróżnicowanej wielkości, kształcie i barwności. Wyraźnie zaburzony był stosunek objętości jądra do objętości cytoplazmy. Kształt i wielkość jąder komórkowych były zróżnicowane. W wymazach z błony śluzowej jamy ustnej pacjentów użytkujących **całkowite uzupełnienia protetyczne dłużej niż dwa lata** obserwowano mniej nasilone zmiany w obrazie morfologicznym komórek nabłonkowych vs grupa D (protezy całkowite krócej niż dwa lata).

U pacjentów grupy kontrolnej reakcja immunohistochemiczna nie wykazała kaspazy 3 podczas, gdy u **wszystkich pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne**, wynik reakcji był pozytywny, z różnym nasileniem w poszczególnych grupach badanych. **Najsilniejszą reakcję** immunohistochemiczną wykazującą kaspazę 3 stwierdzono w komórkach nabłonkowych pacjentów **użytkujących całkowite uzupełnienia protetyczne krócej niż dwa lata**. W miarę upływu czasu użytkowania uzupełnień protetycznych, zarówno częściowych, jak i całkowitych intensywność reakcji była słabsza. W wymazach z błony śluzowej jamy ustnej pacjentów z grupy kontrolnej nie stwierdzono immunoekspresji kaspazy 8, natomiast u **wszystkich pacjentów** z pozostałych grup wynik reakcji był pozytywny. **Najsilniejszą** reakcję stwierdzono w komórkach nabłonkowych pacjentów użytkujących częściowe i całkowite protezy przez **okres krótszy niż dwa lata**. Nie stwierdzono dodatniej reakcji immunohistochemicznej wykazującej kaspazę 9 w komórkach nabłonkowych pacjentów z grupy kontrolnej i tylko śladową lub ujemną u pacjentów z innych grup badanych.

Immunoekspresję **NF-kB** stwierdzono w jądrach komórkowych i w cytoplazmie komórek zarówno w grupie kontrolnej, jak i we wszystkich grupach badanych. Nasilenie reakcji w komórkach nabłonka błony śluzowej pacjentów grupy kontrolnej było bardzo słabe lub śladowe. U pacjentów z uzupełnieniami protetycznymi immunoreaktywność NF-kB była zróżnicowana, w zależności od typu uzupełnienia i czasu użytkowania protezy. **Najsilniejszą** reakcję stwierdzono w komórkach nabłonkowych pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne **krócej niż dwa lata** (D,B). U pacjentów z grup C, E reakcja była silniejsza niż w grupie kontrolnej, jednak słabsza niż u pacjentów z grup B,D.

W wymazach z jamy ustnej pacjentów z grupy kontrolnej nie stwierdzono immunoekspresji **białka p53**. Najbardziej nasiloną reakcję wykazującą białko p53 stwierdzono w komórkach nabłonkowych pacjentów użytkujących częściowe i całkowite uzupełnienia protetyczne przez okres **krótszy niż dwa lata**, w przypadku dłuższego niż 2 lata użytkowania protez wynik reakcji był pozytywny, ale o mniejszym nasileniu.

Metodą Western blot wykazano **zwiększoną** ekspresję kaspazy 3, kaspazy 8, kaspazy 9, NF-kB i białka p53 w ślinie pacjentów z uzupełnieniami protetycznymi (B, C, D, E) vs grupa kontrolna (A). Najwyższą ekspresję kaspazy 3 stwierdzono u pacjentów z całkowitymi uzupełnieniami protetycznymi przez okres **krótszy niż dwa lata**, również w pozostałych grupach była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono istotny wzrost ekspresji kaspazy 8 w grupach pacjentów C, D i E. Nie stwierdzono istotnie statystycznego wzrostu ekspresji kaspazy 9 w żadnej z badanych grup. **Najwyższy** poziom ekspresji NF-kB i białka p53 stwierdzono w ślinie pacjentów użytkujących protezy **całkowite krócej niż dwa lata**. Nie wykazano wzrostu ekspresji cyklooksygenazy 2 w żadnej z badanych grup.

Sposób prezentacji wyników świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu metodycznego niezbędnego do przygotowania, przedstawienia i interpretacji uzyskanych wyników badań.

Rozdział **Dyskusja**, liczący 8 stron, napisany został bardzo czytelnie i poprawnie merytorycznie. Doktorantka porównała i umiejętnie przedyskutowała, w nim wyniki uzyskane w swojej pracy, z uzyskanymi przez innych badaczy.

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza uzyskanych wyników pozwoliła na sformułowanie **pięciu Wniosków**, które są odpowiedzią na postawione cele pracy:

1. Badania wykazały, że uzupełnienia protetyczne mogą mieć wpływ na metabolizm komórek nabłonka jamy ustnej, czego konsekwencją są zaobserwowane zmiany w morfologii komórek.

2. Wzrost immunoreaktywności kaspazy 3, kaspazy 8, NF- κ B i białka p53 w komórkach nabłonka jamy ustnej pacjentów użytkujących protezy sugeruje wzmożone procesy apoptotyczne.
3. Zwiększona ekspresja kaspazy 8 w komórkach nabłonka jamy ustnej pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne, może wskazywać na szlak receptorowy procesu apoptozy.
4. Brak różnic ekspresji COX-2 w ślinie badanych pacjentów może sugerować, że apoptoza nie była inicjowana stanem zapalnym.
5. Nasilenie obserwowanych zmian zależy od czasu użytkowania protez.

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczają nowych, wcześniej niepublikowanych informacji na temat wpływu ruchomych protez zarówno częściowych jak i całkowitych na kondycję błony śluzowej jamy ustnej. W świetle powyższych badań i konkluzji ważne byłoby przeprowadzenie dalszych badań i zweryfikowanie wpływu, najczęściej stosowanych protez w celu dokładnego wyjaśnienia patomechanizmu zmian zaobserwowanych w nabłonku jamy ustnej. Wiedza przedstawiona w niniejszej pracy może stanowić dobry wstęp do dalszego badania wpływu uzupełnień protetycznych na środowisko jamy ustnej.

Piśmiennictwo jest dobrze dobrane i liczy 161 pozycji literatury, głównie anglojęzycznej, z których większość pochodzi z lat 2009-2011 - 73 pozycje (ok. 61%). Zostały również zacytowane prace starsze, klasyczne, ważne dla tematyki pracy. Prace są zacytowane w tekście prawidłowo, recenzent nie dopatrył się błędów w przedstawionym spisie literatury. Pod względem edytorskim praca została przygotowana prawidłowo.

Jako recenzent chciałabym podkreślić duży wkład pracy Doktorantki w przygotowanie niniejszej rozprawy.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że praca doktorska mgr Natalii Domian dotyczy ważnego i aktualnego zagadnienia oraz poszerza naszą wiedzę w badanym zakresie. Wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie przeprowadzonych badań.

Rozprawa spełnia warunki stawiane na stopień naukowy doktora nauk medycznych określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r., nr 65, poz. 595, Dz.U. z 2005r., nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455), dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Natalii Domian do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Dermatologii Estetycznej
M. Marchlewicz
prof. dr hab. n. med. Mariola Marchlewicz