

Lublin, 2022-06-20

Dr hab. Iwona Taszkun, profesor uczelni
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt
Zakład Diagnostyki Klinicznej i Dermatologii Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Adres mailowy: iwona.taszkun@up.lublin.pl

Recenzja

Rozprawy doktorskiej **mgr Ilony Rowińskiej**

pt. : WPLYW DIETY NA CHOROBY I ZMIANY W OBRĘBIE TKANEK PRZYŻĘBIA
INDUKOWANE PRZEZ MIKROBIOM BAKTERYJNY W STANACH ZAPALNYCH JAMY
USTNEJ LUDZI I ZWIERZĄT

wykonanej w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu Wydział Nauk Biologicznych i
Weterynaryjnych.

Promotorem pracy jest dr hab. Paweł Kowalczyk prof. Instytut Fizjologii i Żywienia
Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polska Akademia Nauk

Promotorem pomocniczym - dr n. med. lek. wet. Robert Paślawski Uniwersytet Mikołaja
Kopernika w Toruniu

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi jednotematyczny cykl publikacji pod
zbiorczym tytułem: Wpływ diety na choroby i zmiany w obrębie tkanek przyzębia
indukowane stresem oksydacyjnym i stanami zapalnymi w jamie ustnej ludzi i zwierząt.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące publikacje:

1. Rowińska I, Szyperska-Ślaska A, Zariczny P, Paślawski R, Kramkowski K, Kowalczyk P.
Impact of the Diet on the Formation of Oxidative Stress and Inflammation Induced by
Bacterial Biofilm in the Oral Cavity. Materials 2021, 14, 1372. doi: 10.3390/ma14061372,
MNiSW: 140 pkt; IF: 3,623. Wkład Doktorantki w autorstwo: 60%. Jej udział polegał na
współtworzeniu koncepcji badania, przeprowadzeniu badań klinicznych, opracowaniu
wyników, analizie statystycznej i przygotowaniu manuskryptu wspólnie z wszystkimi
współautorami.
2. Rowińska I, Szyperska-Ślaska A, Zariczny P, Paślawski R, Kramkowski K, Kowalczyk P. :
The Influence of Diet on Oxidative Stress and Inflammation Induced by Bacterial Biofilms in
the Human Oral Cavity. Materials 2021, 14, 1444. doi: 10.3390/ma14061444, MNiSW: 140
pkt; IF: 3,623. Wkład Doktorantki w autorstwo: 60%, a jej udział polegał na współtworzeniu
koncepcji badania, wykonaniu części klinicznej badania, opracowaniu wyników, analizie
statystycznej i przygotowaniu manuskryptu we współpracy z wszystkimi współautorami.
3. Rowińska I, Lizut R, Zariczny P, Paślawski R, Kramkowski K, Skiba G, Raj S, Kowalczyk
P. Effect of Diet on the Induction of Pathogens in the Oral Cavity of Humans and Animals EC
Veterinary Science 2021, 6.9, doi: MNiSW: 5 pkt; Wkład Doktorantki w autorstwo: 51% , a
jej udział polegał na współtworzeniu koncepcji badania oraz wykonaniu badania klinicznego

Przeprowadziła ona także analizę statystyczną i przygotowała manuskrypt, który omówiła ze wszystkimi współautorami.

Przedstawiona do oceny praca liczy w sumie 130 stron i rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim. Strony od 7 do 13 zawierają dane osobowe Doktorantki i wykaz publikacji. Można z nich się dowiedzieć, że mgr Ilona Rowińska ukończyła studia w 2005 roku na wydziale Pedagogiki i Psychologii w zakresie promocji zdrowia na Akademii Bydgoskiej. Obecnie jest egzaminatorem państwowym oraz nauczycielem mianowanym w zawodach Higienistka stomatologiczna i Asystentka stomatologiczna w Policealnej Szkole Medycznej w Toruniu, w której jest zatrudniona od 2006 roku. Jej dorobek jako współautorki publikacji i projektów, prelegentki czy recenzentki biorącej czynny udział w pracach różnych krajowych ośrodków edukacyjnych w zakresie kształcenia dyplomowanych asystentek i higienistek stomatologicznych jest godny podziwu. Dorobek naukowy Doktorantki to 3 prace naukowe będące podstawą doktoratu oraz 14 publikacji popularno-naukowych wydanych w czasopiśmie spoza listy JCR. Uzyskana suma punktów MNiSW to 345, IF=7,246, cytowania wg Web of Science=25, h-index=2.

Następne dwie strony pracy zajęła doktorantce lista skrótów i ich objaśnień użytych w pracy, a od strony 17 do 59, Recenzent zapoznaje się ze wstępem, w którym Doktorantka prezentuje zakres aktualnej wiedzy z zakresu funkcji błony śluzowej jamy ustnej, fizjologicznej flory bakteryjnej jamy ustnej, zasad powstawania płytki bakteryjnej i kamienia nazębnego, stanów zapalnych w jamie ustnej oraz wpływu diety i higieny na rozwój chorób przyzębia. Przegląd piśmiennictwa z tego zakresu został opublikowany w pierwszej publikacji wchodzącej w skład dysertacji. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że zdrowie jamy ustnej w znaczny sposób determinuje jakość życia człowieka, a o komforcie życia decyduje: brak bólu, obecność zębów, dostateczna ilość śliny, zdolność żucia, komfort żucia, brak objawów dysfunkcji spowodowanych chorobami przyzębia, estetyczny wygląd twarzy i prawidłowe odczuwanie smaku. Dlatego też błona śluzowa jamy ustnej pełni wiele funkcji: osłaniającą, dzięki wyspecjalizowanej budowie nabłonka i błony śluzowej właściwej jamy ustnej, wchłaniania i wydzielania dzięki unaczynieniu i gruczołom ślinowym, czuciową dzięki rozbudowanemu aparatowi czuciowemu odbierającemu smak, dotyk, ból, ciepło a nawet zapach oraz obronną dzięki mechanizmom immunologicznym nieswoistym i swoistym. Doktorantka opisuje szereg nieswoistych mechanizmów obronnych funkcjonujących w jamie ustnej, do których zalicza się: ciągłość szkliska i błony śluzowej, złuszczenie nabłonka, obecność mikroflory fizjologicznej, automatyczne ruchy mięśni żucia i języka oraz przepływ śliny. Opisuje też swoiste mechanizmy obronne - immunoglobuliny zwracając uwagę szczególnie na IgA. Ich zadaniem jest aglutynacja bakterii bytujących w jamie ustnej, jak również hamowanie procesu ich adhezji do zębów i nabłonka. W tkankach oraz płynie dziąsłowym znajdują się także immunoglobuliny klas IgM, IgG. Przeciwciała te także utrudniają bakteriom kolonizację na tkankach jamy ustnej i hamują ich metabolizm.

Doktorantka sporo uwagi poświęca zróżnicowanej florze mikrobiologicznej jamy ustnej, w skład której wchodzi bakterie, grzyby, mykoplazmy, pierwotniaki oraz wirusy, podkreślając że zmiana środowiska, w którym żyją drobnoustroje w jamie ustnej może spowodować, że z saprofitycznych staną się one chorobotwórcze. Skład flory mikrobiologicznej jamy ustnej zmienia się w trakcie życia człowieka i jest zależny od szeregu czynników. Procesy

stopniowej kolonizacji jamy ustnej przez drobnoustroje nazywane sukcesją ekologiczną, wraz powstawaniem nowych niszy, napływaniem nowych drobnoustrojów, powstawaniem nowych warunków środowiskowych, powoduje że ten ekosystem jamy ustnej osiąga w końcu stabilizację - homeostazę. Kolejność zasiedlania jamy ustnej przez drobnoustrojów zależy od dostępności składników odżywczych, przełamania naturalnej granicy odporności nieswoistej i jest różna zależnie od wieku i stanu uzębienia pacjenta. Doktorantka szczegółowo opisuje czynniki sprzyjające i hamujące procesy kolonizacji przez drobnoustroje błonę śluzową jamy ustnej, policzka, ust, warg, języka oraz powierzchni naddziąsłowej i poddziąsłowej zębów, szczelin i kieszonek dziąsłowych. W kolejnym podrozdziale wstępu, mgr Ilona Rowińska przedstawia etapy rozwoju płytki bakteryjnej i kamienia nazębnego wyjaśniając pojęcie "kompleksu bakteryjnego", które zostało wprowadzone przez Socranksy'ego i wsp. (1998). Zasada podziału wprowadzona przez Socranksy'ego opierała się na założeniu, że wprowadzicie w materiale pobranym z jamy ustnej można zidentyfikować nawet 700 gatunków bakterii, to część saprofitycznej flory może stać się patogenna dla przyzębia. Bakterie, które są częścią fizjologicznej flory, w sytuacji gdy dochodzi do zaburzenia równowagi w biofilmie mogą nabierać nowych zdolności zmieniając skład biofilmu. I właśnie to przesunięcie w składzie biofilmu jest istotą chorób przyzębia - zespołu tkanek otaczających i utrzymujących ząb w zębodole oraz chroniących przed wnikaniem zakażenia. Zapalenie przyzębia (periodontitis) uważa się za chorobę wieloczynnikową. Jej przyczyną jest zaburzenie równowagi między drobnoustrojami biofilmu znajdującego się na powierzchni zębów i dziąseł a mechanizmami obronnymi gospodarza. To właśnie Socranksy i wsp. wyodrębnili ok. 40 bakterii potencjalnie sprzyjających chorobom przyzębia, które na podstawie ich metabolicznych preferencji podzielili na kompleksy, oznaczonych umownie kolorami. Za najważniejsze periopatogeny obecnie uważa się bakterie tzw. kompleksu czerwonego – *Porphyromona gingivalis*, *Tanarella forsythia*, *Treponema denticola* oraz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – bakterię kompleksu zielonego. Do kompleksu czerwonego zalicza się również bakterie wytwarzające czarne barwniki, krętki, enterokoki, streptokoki, bakterie z rodziny *Actinomyces* i *Lactobacillus* oraz grzyby z rodziny *Candida*. Klinicznie bakterie kompleksu zielonego i żółtego są związane z płytkami kieszonkami przyzębnymi, a patogeny kompleksu pomarańczowego i czerwonego z zaawansowaną chorobą przyzębia i głębszymi kieszonkami przyzębnymi. Co ciekawe, gatunki należące do poszczególnych kompleksów są blisko ze sobą związane i w większości przypadków występują wszystkie gatunki z grupy lub żaden co nazwano „teoria wspólnoty”. Za główny czynnik zapalenia przyzębia uważa się bakterie bytujące w płytce nazębnej i kieszonkach przyzębnych, czyli przestrzeni między zębem a dziąsłem. Do czynników ryzyka wystąpienia zapalenia przyzębia (periodontitis) zalicza się złą dietę, stres, niektóre leki, palenie tytoniu i czynniki genetyczne. Omawiając wpływ diety na stan jamy ustnej i przyzębia, Doktorantka analizuje najnowszą literaturę z zakresu wpływu składników odżywczych (węglowodanów w tym cukrów, białek, tłuszczów, witamin, soli mineralnych) oraz antyoksydantów i suplementów diety na rozwój zapalenia przyzębia. Podaje też produkty spożywcze o działaniu przeciwbakteryjnym, listę ziół oraz zasady higieny, które to czynniki hamują rozwój zapalenia przyzębia. Po tak szczegółowym wstępie Doktorantka przedstawiła cztery główne cele pracy, którymi były:

I. Oszacowanie wpływu różnych typów diet w indukcji stanów zapalnych tkanek miękkich w jamie ustnej w obecności zalegającej płytki bakteryjnej i przy braku zalegającej płytki bakteryjnej nad- i poddziąsłowej.

II. Ocena wpływu różnych rodzajów diet na obecność stanów zapalnych tkanek miękkich w jamie ustnej oraz obecność płytki bakteryjnej nad- i poddziąsłowej, u osób nie posiadających zwierząt i właścicieli zwierząt domowych

III. Oszacowanie jaka dieta w największym stopniu wpływa na mikrobiom bakteryjny w jamie ustnej ssaków.

IV. Porównanie biofilmów bakteryjnych ludzi i zwierząt.

W 3im rozdziale pracy „Materiał i metody” na stronach 59-70, Doktorantka informuje, że badania przeprowadzono zgodnie z regulacjami prawnymi prawa polskiego i Unii Europejskiej za dobrowolną zgodą ochotników biorących w nich udział. Wyniki prowadzonych badań zostały opublikowane w artykułach pozycja 2 i 3.

W badaniach udział wzięło sześćdziesiąt dorosłych osób z różnym stanem zdrowia jamy ustnej i zdrowiem ogólnym, w różnym wieku (od 21 do 82 lat), obojga płci, z czego 72,5% stanowiły kobiety. Badania prowadzono w trzech dwudziestoosobowe grupy. Do pierwszej grupy zakwalifikowano osoby nie mające na co dzień kontaktu ze zwierzętami domowymi i gospodarskimi. Drugą grupę stanowią osoby posiadające zwierzęta domowe (psy) i przebywające z nimi co najmniej przez kilka godzin dziennie. Trzecią grupę tworzyły osoby mające kontakt ze zwierzętami gospodarskimi (świniami) przez kilka godzin dziennie (min. 2 godziny dziennie). Osoby zaliczone do grup badawczych podzielono na podgrupy, którym przydzielono określoną dietę. Każdą podgrupę dietetyczną oznaczono:

B - dieta białkowa opierająca się głównie na produktach bogatych w białko.

W - dieta warzywna ukierunkowana głównie na warzywa.

T - dieta bogata w tłuszcze omega-3.

F - dieta mieszana - dieta bez ograniczeń, dowolna, składająca się z tradycyjnych posiłków, zawierających białka, węglowodany, tłuszczone i warzywa.

Na czas badań wszystkie osoby zobowiązały się do spożywania określonej diety i nie zmieniać nawyków higienicznych. Zwierzęta domowe i hodowlane włączone do badania były żywione standardową karmą właściwą dla danego gatunku i wieku.

Po trzech dniach diety, dokonano oceny obecności i lokalizacji biofilmu bakteryjnego w jamie ustnej w gabinecie stomatologicznym w Medyczo-Społecznym Centrum Kształcenia Zawodowego i Ustawicznego w Toruniu. Następnie wykonano zabieg oczyszczenia zębów z kamienia nazębnego nad- i poddziąsłowego. Po kolejnych trzech dniach stosowania zalecanej diety pobierano po raz drugi materiał biologiczny do badań. Aby osiągnąć postawione cele wykonano analizę sekwencyjną biofilmów bakteryjnych w badanych grupach. Pobrane biofilmy bakteryjne naddziąsłowe i ze szczeliny dziąsłowej w postaci inokulum ze wszystkich badanych grup (60 osób, 20 psów, 20 świń). Następnie z uzyskanych kolonii bakteryjnych analizowanych biofilmów wyizolowano bakteryjny DNA i sekwencjonowano przy zastosowaniu metody Sangera i uniwersalnych starterów (primerów).

Do badań Doktorantka wykorzystwała standardowe techniki stomatologiczne, takie jak wskaźnik fuksynowy do wybarwienia złogów nazębnych, wskaźnik API (Aproximal Plaque Index) do uwidocznienia i oszacowania obecności płytki bakteryjnej w przestrzeniach międzyzębowych, wskaźnik Pl.I (Plaque Index) do oceny grubości płytki bakteryjnej w

okolicy szyjki zęba, wskaźnik OHI (Oral Hygiene Index) - higieny jamy ustnej, określający obecność nalotu i kamienia nazębnego oraz wskaźnik CPITN (Community Periodontal Index for Treatment Needs), który świadczy o chorobie przyzębia i określa potrzebę leczenia. Należy uzupełnić autorów/dane literaturowe zastosowanych powyżej technik badawczych.

Doktorantka w pracy zastosowała także techniki biomedyczne, celem oceny stanu biofilmu bakteryjnego metodami mikrobiologicznymi (posiew i metoda sekwencjonowania Sangera).

Analizy statystyczne uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą oprogramowania Statistica (wersja 12, StatSoft, Tulsa, OK, USA) wykorzystując jednokierunkową analizę wariancji ANOVA z testem wielokrotnego porównania post hoc LSD dla uzyskanych danych.

Na stronach 70-88 pracy Doktorantka prezentuje uzyskane „Wyniki” badań.

Dominującą liczebnie grupą bakterii izolowanych z jamy ustnej badanych były bakterie kompleksu czerwonego, następnie pomarańczowego > żółtego > zielonego i fioletowego > niebieskiego. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że wpływ określonego rodzaju diety może stymulować rozwój tzw. pożytecznych bakterii, takich jak np. *Lactobacillus salivarius*, lub szkodliwych bakterii, takich jak np. *Porphyromonas gingivalis*. Analizowane biofilmy bakteryjne u osób pracujących ze zwierzętami hodowlanymi i posiadających zwierzęta domowe różniły się dość istotnie składem mikroflory bakteryjne. U tych osób skład mikroflory jamy ustnej przesunął się w kierunku kompleksów żółtych, niebieskich i pomarańczowych, a sekwencjonowanie drobnoustrojów metodą Sangera wykazało u nich obecność bakterii charakterystycznych dla danego gatunku zwierząt. Z drugiej strony udział biofilmu tworzącego kompleks czerwony był jednolity. Dodatkowo, analizując wyniki wpływu zastosowanej diety na stan przyzębia, Doktorantka wysnuwa wniosek, że zdecydowanie należy zalecić pacjentom ograniczenie spożywania węglowodanów, zwłaszcza tych o lepkiej konsystencji, napojów słodzonych, kwaśnych, gazowanych czy soków. W sytuacji kiedy nie można umyć zębów, można zalecić żucie gumy do żucia bez cukru 5-10 min. (osobom ze zdrowymi stawami skroniowo-żuchwowymi) albo kończyć posiłek warzywem bogatym w witaminy i minerały.

W kolejnym rozdziale „Dyskusja” zamieszczonym na stronach 88-96, który wydaje się Recenzentowi raczej „Omówieniem wyników” zgodnym z postawionymi celami pracy i uzasadniającymi sformułowanie wniosków, Doktorantka omawia w 4rech podrozdziałach uzyskane wyniki badań pod kątem wpływu zastosowanych diet, posiadanych zwierząt i stresu oksydacyjnego na rozwój stanów zapalnych w jamie ustnej oraz przeprowadza analizę uzyskanych wyników biofilmów bakteryjnych ludzi i zwierząt. Rozdział ten został niedokładnie opisany w spisie treści (str. 4). Wyniki uzyskane przez Doktorantkę nie potwierdzają „ogólnie” przyjętej w stomatologii zasady „Zła higiena = stan zapalny dziąseł”. Dotyczy to zwłaszcza podgrupy osób zakwalifikowanych do diety warzywnej W, w której to zaobserwowano spadek stanu zapalnego tkanek miękkich dzięki powiększeniu asortymentu drobnoustrojów i wzrostowi ilości „pożytecznych bakterii”. Uzyskane przez Doktorantkę w grupie W wskaźniki API i PBI badane w tych samych obszarach jamy ustnej nie potwierdzają panującego poglądu, że są one ze sobą skorelowane. Recenzentowi brak jest odniesień do wyników badań innych Autorów, a stwierdzenia „wbrew powszechnej opinii” „paradygmat ...w stomatologii” „panujący ogólnie pogląd” są zbyt lakoniczne i wymagają, celem prawidłowo przeprowadzonej dyskusji, podania źródeł piśmiennictwa i wniosków innych Autorów. A może są to obserwacje własne Doktorantki?

Uzyskane wyniki pozwoliły mgr Ilonie Rowińskiej na postawienie następujących wniosków, które zamieściła na stronie 95 pracy:

1. Opracowany schemat diagnostyczny badania (zaprezentowany na Ryc. 11 jak rozumie Recenzent) pozwala na ocenę stopnia nasilenia stanu zapalnego tkanek przyzębia i identyfikacji bakterii zaangażowanych w ten proces.
2. Wykazano, że dieta istotnie wpływa na zdrowie tkanek miękkich w obrębie przyzębia człowieka, nawet przy obecnej płytce nazębnej.
3. Najsilniejsze efekty ograniczające stres oksydacyjny (Recenzent nie spostrzegł jakimi metodami Doktorantka bada stres oksydacyjny) i stan zapalny przyzębia wykazywała dieta warzywna.
4. Wykazano, że posiadanie zwierząt istotnie wpływa na skład mikroflory jamy ustnej. Nie wykazano, aby zmiany te miały jakikolwiek negatywny wpływ na stan przyzębia ludzi.

Rozdział 7 pracy „Literatura” prezentuje 134 pozycji z czego 7 jest sprzed roku 2000. W tym rozdziale według Recenzenta panuje chaos, co utrudnia zorientowanie się w pozycjach literaturowych zamieszczonych w tekście.

Na stronach 109-130 zamieszczono załączniki, które wykorzystano podczas realizacji pracy, czyli ankiety, oświadczenia pacjentów, karty zdrowia, wzory umów itp.

Pracę kończą miłe podziękowania Doktorantki kierowane do osób, która przyczyniły się do realizacji doktoratu.

Reasumując stwierdzam, że badania będące przedmiotem dysertacji doktorskiej Pani mgr Ilony Rowińskiej pt.: „WPLYW DIETY NA CHOROBY I ZMIANY W OBRĘBIE TKANEK PRZYZĘBIA INDUKOWANE PRZEZ MIKROBIOM BAKTERYJNY W STANACH ZAPALNYCH JAMY USTNEJ LUDZI I ZWIERZĄT” zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane na reprezentatywnym materiale z zastosowaniem nowoczesnych technik badawczych. Zarówno sposób przeprowadzenia badań jak i opracowanie wyników oraz ich konfrontacja z danymi piśmiennictwa (co było dużym wyzwaniem dla Recenzenta), wskazują na opanowanie przez Doktorantkę zagadnień teoretycznych i praktycznych będących przedmiotem recenzowanej dysertacji doktorskiej. Na uznanie zasługuje ogromna pracowitość badań, wyczerpująca i przejrzysta dokumentacja wyników badań, a także duże znaczenie uzyskanych wyników dla praktyki klinicznej. Dzięki zastosowaniu odpowiednich technik badawczych praca Pani mgr Ilony Rowińskiej wnosi ważne elementy dla weterynaryjnej praktyki klinicznej, co szczególnie dla mnie jako lekarza weterynarii jest bardzo interesujące i może mieć zastosowanie w praktyce.

W mojej ocenie przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Ilony Rowińskiej spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W oparciu o przedstawioną powyżej pozytywną ocenę przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Ilony Rowińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Lublin 2022-06-20

dr hab. Iwona Taszkun, profesor uczelni
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

**Zakładu Diagnostyki Klinicznej
i Dermatologii Weterynaryjnej**

Dr hab. Iwona Taszkun