

**Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**

Pani mgr Ilona Rowińska

pt.” Wpływ diety na choroby i zmiany w obrębie tkanek przyzębia indukowane przez mikrobiom bakteryjny w stanach zapalnych jamy ustnej ludzi i zwierząt”

Stany zapalne w jamie ustnej, w szczególności zapalenie dziąseł, tkanek przyzębia oraz stany chorobowe mające wpływ na przyzębie, a także choroby i zmiany w obrębie tkanek wokół implantów stanowią coraz większy problem we współczesnym świecie. Choroby przyzębia są już wręcz traktowane jako choroba cywilizacyjna. Nieleczone zapalenie przyzębia może uszkodzić dziąsła i kości wyrostka zębodołowego, prowadzić do paradontozy i przedwczesnej utraty zębów. Ponadto wykazano iż zapalenie przyzębia przyczynia się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, tj. miażdżyca czy zapalenie wsierdzia. Choroby układu krążenia są jednymi z najczęstszych przyczyn zgonów pacjentów nie tylko w Polsce ale na całym świecie, w szczególności w krajach wysoko rozwiniętych. Uprzednio wykazano, że leczenie zapalenia przyzębia (paradontozy) można wspierać odpowiednim żywieniem np. ochronnie działają owoce, warzywa, oleje, orzechy, nasiona, zioła, przyprawy, ryby, witamina C oraz koenzym Q.

Rozprawa doktorska Pani mgr Ilony Rowińskiej wpisuje się w ten ważny i aktualny temat badawczy. Poświęcona jest analizie problemu wpływu różnych typów diet na rozwój stanów zapalnych tkanek miękkich w jamie ustnej w odniesieniu do składu mikrobiomu jamy ustnej badanych pacjentów, z uwzględnieniem podziału na grupy osób nie posiadających zwierząt i na osoby posiadające psy lub zwierzęta hodowlane – świnie. Doktorantka analizowała wpływ czterech diet, w której każdy posiłek był zakończony produktem wchodzącym w skład tej diety: diety białkowej (każdy posiłek był zakończony produktem bogatym w białko bez cukru np. kefirem, serem żółtym lub białym), dietę warzywną (na koniec posiłku spożywano warzywo), dietę bogatą w tłuszcze omega-3 (na koniec posiłku spożywano ryby, olej rzepakowy lub orzechy) oraz dietę mieszaną składającą się z tradycyjnych posiłków. W czasie trwania badań osoby zachowywały stałe nawyki higieniczne jamy ustnej. Po trzech dniach diety, w której każdy posiłek kończył się zaleconym produktem dokonano oceny obecności i lokalizacji biofilmu bakteryjnego w okolicy naddziąsłowej i w szczelinie dziąsłowej. Następnie wykonano zabieg oczyszczenia zębów z kamienia nazębnego nad-

poddiąsłowego. Po kolejnych trzech dniach stosowania zalecanej diety pobierano po raz drugi materiał biologiczny do badań.

Doktorantka prowadziła badania na reprezentatywnej grupie sześćdziesięciu dorosłych osób z różnym stanem zdrowia jamy ustnej i zdrowiem ogólnym, w różnym wieku, obojga płci. Osoby te podzielono losowo na trzy dwudziestoosobowe grupy. Do pierwszej grupy zakwalifikowano osoby nie mające na co dzień kontaktu ze zwierzętami domowymi lub gospodarskimi. Drugą grupę stanowią osoby posiadające zwierzęta domowe (psy) i przebywające z nimi co najmniej przez kilka godzin dziennie (min. 2 godziny). Trzecią grupę tworzyły osoby mające kontakt ze zwierzętami gospodarskimi (świniami) przez kilka godzin dziennie (min. 2 godziny). Grupę osób nie posiadających zwierząt i grupę osób posiadających psy podzielono na 4 podgrupy po 5 osób, którym przydzielono określoną dietę. Prowadzenie badania na tak dużej i reprezentatywnej grupie osób uwzględniającej różnorodne czynniki było warunkiem do prawidłowego przeprowadzenia całego badania i pozwoliło Doktorantce na wyciągnięcie poprawnych wniosków. Wszystkie osoby przed przystąpieniem do programu badawczego wypełniły niezbędne dokumenty, w tym poprawnie przygotowane ankiety żywieniowe i dotyczące stanu ogólnego zdrowia oraz higieny w jamie ustnej, udzielili zgody na badania i uzyskiwanie informacji o ich zdrowiu oraz dokumentacji medycznej. Ponadto pacjenci otrzymali niezbędne wskazania dotyczące udziału w badaniach. W załączniku nr 8 Doktorantka umieściła całą dokumentację badań, w tym w/w ankiety i oświadczenia.

Rozprawa doktorska jest zwarta, liczy 130 stron druku, a jej układ jest typowy. Napisana jest w przystępny sposób a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz analizę uzyskanych wyników. Dodatkowo przed rozdziałem Wstęp rozpoczynającym rozprawę doktorską, Pani mgr I. Rowińska przedstawiła swoją karierę zawodową, wymieniła posiadane dyplomy, stopnie naukowe oraz tytuły prac dyplomowych, a także wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej – trzech z listy JCR (łącznie IF = 7,246, MEiN = 285 pkt.) i listę 14 publikacji popularno-naukowych opublikowanych w czasopiśmie spoza listy JCR (MEiN = 70 pkt.). Wartość h-index wynosi 2. Według recenzenta przy tak skonstruowanej rozprawie doktorskiej, opartej na cyklu publikacji, publikacje te powinny być dołączone do rozprawy. Dodatkowo w trzeciej wzmiankowanej publikacji - Rowińska I, Lizut R, Zariczny P, Pasławski 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, nie ma podanego nr DOI, a sama publikacja jest niemożliwa do znalezienia w internecie.

W 42-stronnicowym Wstępie Doktorantka rzeczowo przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą zagadnień związanych z tematyką rozprawy: (1) opisuje jamę ustną, w tym fizjologiczne funkcje jakie pełni, (2) charakteryzuje mikrobiom jamy ustnej z podziałem na poszczególne nisze ekologiczne, (3) przedstawia proces kolonizacji jamy ustnej przez drobnoustroje, uwzględniając wpływ na ten proces różnych czynników zewnętrznych tj. temperatura, pH czy wartość potencjału oksydoredukcyjnego, (4) opisuje powstawanie płytki bakteryjnej i kamienia nazębnego, (5) charakteryzuje stany zapalne w jamie ustnej wskazując na stres oksydacyjny jako jedną z przyczyn chorób tkanek przyzębia, a także (6) krótko opisuje różne diety i ich wpływ na rozwój choroby przyzębia. Wstęp stanowi teoretyczne dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Wstęp uzasadnia wybór tematyki badawczej pracy. Wstęp został oparty na publikacji przeglądowej wchodzącej w cykl rozprawy doktorskiej - 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](https://doi.org/10.3390/ma14061372)

Część doświadczalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Eksperymenty zostały zaplanowane logicznie z jasno postawionym celem. W recenzowanej pracy doktorskiej zastosowano cały szereg metod zarówno (1) z obszaru badań klinicznych (zbierając wywiady, ankiety i oświadczenia od badanych osób), (2) stomatologicznych (prowadząc analizy wskaźników stomatologicznych jak wskaźnik fuksynowy, P1.I, OHI,API, PBI), (3) mikrobiologicznych (wykonano izolację bakterii z pobranych od pacjentów materiałów), (4) statystycznych, a także (5) genetycznych (w rozprawie podano wyniki sekwencjonowania materiału bakteryjnego metodą Sangera). Stosowanie rozmaitych, poprawnie dobranych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktorantkę.

Uzyskane w pracy wyniki Doktorantka przedstawiła w 8 tabelach i na jednej rycinie. Dokładna analiza uzyskanych wyników oraz ich skondensowana dyskusja, połączona ze wskazaniem uzyskanych przez innych badaczy zbliżonych rezultatów, została przeprowadzona w sposób poprawny, z analizą dostępnego piśmiennictwa przedmiotu. Zacytowane piśmiennictwo jest obszerne i aktualne, obejmuje 134 pozycji.

W rozdziale Wnioski Końcowe postawione przez Doktorantkę wnioski uważam za merytorycznie poprawne.

W rozprawie doktorskiej Pani mgr Ilony Rowińska w wyniku wykonanych badań i przeprowadzonej analizy uzyskała szereg interesujących wyników, spośród których za najważniejsze uważam:

1. Oszacowanie wpływu różnych najbardziej popularnych w krajach wysoko rozwiniętych typów diet (białkowej, warzywnej, tłuszczowej i mieszanej) na stan zdrowia przyzębia i rozwój stanu zapalnego tkanek miękkich w jamie ustnej w zależności od obecności płytki nad- i poddziąsłowej. Wszyscy badani ochotnicy mieli stwierdzoną płytkę nazębną (miękką lub twardą), której obecność jak wiadomo sprzyja powstawaniu i podtrzymywaniu stanów zapalnych przyzębia. Doktorantka wykazała że najkorzystniejszy wpływ na stan zdrowia przyzębia ma dieta warzywna i to niezależnie od poziomu higieny jamy ustnej. Stosowanie diety warzywnej (każdy posiłek zakończony zjedzeniem warzyw) u badanych ochotników sprzyjał występowaniu „klinicznie zdrowego przyzębia” albo łagodnego stanu zapalnego. W przypadku stosowania innych typów diet poziom higieny jamy ustnej miał znaczący wpływ na rozwój stanów zapalnych przyzębia. Spożywanie warzyw po każdym posiłku powinno być jak najszerzej rozpropagowane w każdym społeczeństwie. Dieta warzywna stymuluje rozwój pożytecznych dla człowieka bakterii z rodzajów np. *Bifidobacterium* lub *Ligilactobacillus*, które konkurują o zasiedlenie jamy ustnej z bakteriami patogennymi.

2. Na podstawie przeprowadzonych badań i dokładnej analizy danych Doktorantka wykazała, że posiadanie zwierząt domowych jak i hodowlanych wpływa na skład mikrobiomu jamy ustnej. U ludzi opiekujących się zwierzętami Doktorantka wykazała przewagę kompleksów bakteryjnych charakterystycznych dla danej populacji zwierząt. Jednak zmiany w składzie mikrobiomu nie mają negatywnego wpływu na stan przyzębia badanych pacjentów.

Moje uwagi i sugestie dotyczące rozprawy doktorskiej oraz związane z tym pytania:

1. Według recenzenta przy tak skonstruowanej rozprawie doktorskiej, opartej na cyklu publikacji, publikacje te powinny być dołączone do rozprawy. Ponadto wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej powinny zostać zacytowane przez Doktorantkę i zawarte w rozdziale 7. Literatura. Natomiast brak jest obecności w tym rozdziale publikacji z cyklu o numerach: 3 ze str. 12, oraz 9 i 11 ze str. 13 oraz 12 i 13 ze str. 14. Dodatkowo w trzeciej wzmiankowanej publikacji - Rowińska I, Lizut R, Zariczny P, Paślowski 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, nie ma podanego nr DOI, a sama publikacja jest niemożliwa do znalezienia w internecie.

2. Pierwsza publikacja z cyklu wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej - 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](https://doi.org/10.3390/ma14061444) jest publikacją przeglądową. Zdziwienie recenzenta budzi deklarowany wkład Doktorantki w tą publikację tj. „przeprowadzenie badań klinicznych, opracowanie wyników, analiza statystyczna”. Ponadto w publikacji w opisie czynności wykonywanych przez poszczególnych autorów Doktorantka nie jest wymieniona przy pisaniu draftu manuskryptu ani przy prowadzeniu korespondencji z recenzentami. Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienie i komentarz w tej sprawie.

3. Dotyczy rozdziału Wyniki „4.1.8. Analiza podobieństw w występowaniu drobnoustrojów i porównanie składu płytki bakteryjnej ludzi przebywających ze zwierzętami gospodarskimi lub domowymi co najmniej kilka godzin dziennie, a osobami nie mającymi takiego kontaktu”. Zgodnie z tytułem rozdziału Recenzent spodziewał się analizy danych pomiędzy osobami które miły kontakt ze zwierzętami a osobami pozbawionymi tego kontaktu. Natomiast w w/w rozdziale nie ma danych dotyczących osób bez kontaktu ze zwierzętami. Proszę Doktorantkę o komentarz i podanie analiz zgodnie z tytułem rozdziału.

4. Bardzo proszę o wytłumaczenie stosowanych oznaczeń liczb porządkowych np. „1a-1d” w tabelach 6, 7, 6a i 7a oraz celowości grupowania ich pod jedną wspólną cyfrą np. „1”.

5. Czy Doktorantka sama wykonywała sekwencjonowanie, czy samodzielnie otrzymywała matryce DNA do sekwencjonowania, czy samodzielnie analizowała dane z sekwencjonowania? Doktorantka w opisie rozdziału „3.5 Analiza biofilmów bakteryjnych” cytuje metodykę ze swoich publikacji [55-56] oraz z pracy Kucia i wsp 2020 [45]. Natomiast publikacja 56 jest pracą przeglądową i nie zawiera metodyki sekwencjonowania. W pracy [55] jest cytat dotyczący sekwencjonowania z pracy „Kucia, M.; Wietrak, E.; Szymczak, M.; Kowalczyk, P. Effect of LigiLactobacillus salivarius and Other Natural Components against Anaerobic Periodontal Bacteria. *Molecules* 2020, *25*, 4519” która jednakże nie dotyczy sekwencjonowania. Co do podanego w rozprawie doktorskiej cytatu Kucia i wsp 2020 [45] – praca 45 nie jest pracą tych autorów, a sąsiednia praca nr 46 jest pracą autorów Kucia i wsp. jak powyżej czyli nie zawiera sekwencjonowania (w rozprawie doktorskiej dodatkowo pomyłka w tytule). Reasumując proszę Doktorantkę o podanie dokładnej metodyki sekwencjonowania łącznie ze starterami.

6. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie na podstawie jakich parametrów i jakich otrzymanych danych liczbowych szacowała w rozprawie doktorskiej wpływ pokarmów na poziom stresu oksydacyjnego w jamach ustnych ludzi i zwierząt.

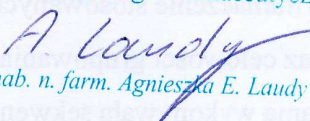
7. Ponadto rozprawa doktorska zawiera liczne drobne uchybienia, nieprawidłowości stylistyczne zdań oraz niepoprawne sformułowania – skróty myślowe, a także niekiedy brak pisowni kursywą nazw bakterii lub brak konsekwencji w stosowaniu skrótów nazw gatunkowych bakterii, które jednak nie wpływają na zawartość merytoryczną pracy.

Wniosek:

W oparciu o powyższą recenzję, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora zgodnie z Ustawą „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Ilony Rowińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Warszawa, dnia 25.08.2022 r.

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej


dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy