

prof. dr hab. n. med. Anna C. Majewska  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PT.  
"WPLYW PŁYNÓW DO PŁUKANIA JAMY USTNEJ  
NA WYBRANE SKŁADNIKI JEJ MIKROBIOTY"

**pana lek. med. Jakuba MOROZ**

z Katedry Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Mikrobiota jamy ustnej stanowi jeden z najbardziej złożonych i różnorodnych zbiorów mikroorganizmów zasiedlających organizm człowieka. W skład mikrobioty jamy ustnej wchodzi wirusy, bakterie, grzyby i pierwotniaki, między którymi zachodzą niezwykle skomplikowane interakcje. Należy dodać, że ilość i skład mikrobioty jamy ustnej jest dynamiczny i zależy, m. in. stylu życia (np. wysokiej zawartości cukrów w diecie, palenia tytoniu, nadużywania alkoholu), od antybiotykoterapii, chemioterapii, zmian hormonalnych, itp. oraz od fenotypowych i genotypowych determinantów danej osoby. Utrzymanie zdrowia jamy ustnej i równowagi między żywicielem a mikroorganizmami wchodzącymi w skład mikrobioty jamy ustnej ma kluczowe znaczenie dla ogólnego stanu zdrowia. Stąd też zaburzenia ilościowe i jakościowe składu mikroorganizmów jamy ustnej mogą prowadzić nie tylko do próchnicy, halitozy, zapalenia dziąseł i przyzębia, ale mogą być także przyczyną wielu innych chorób. Z badań prowadzonych w ostatniej dekadzie wynika, że istnieje związek przyczynowy między zaburzeniami w obrębie jamy ustnej a chorobami układu krążenia, cukrzycy typu II, reumatoidalnego zapalenia stawów, a nawet nowotworów. Zatem stosowanie zabiegów pozwalających na utrzymanie prawidłowej higieny jamy ustnej ma istotne znaczenie w profilaktyce schorzeń jamy ustnej oraz wielu innych chorób.

W piśmiennictwie można znaleźć wiele badań dotyczących bakterii zasiedlających jamę ustną. Natomiast niewiele jest prac dotyczących grzybów występujących w jamie ustnej.

Wobec powyższych danych, zaproponowany przez promotora, pana prof. dr hab. Piotra Kurnatowskiego, temat pracy i zrealizowany przez pana lek. med. Jakuba Moroz, zmierzający do określenia działania komercyjnych płynów do płukania jamy ustnej i organicznych związków chemicznych na grzyby i pierwotniaki stanowiące potencjalnie chorobotwórczą mikrobiotę jamy ustnej, jest wysoce uzasadniony i wiąże się nie tylko z aspektami poznawczymi, ale także aplikacyjnymi. Należy również uwydatnić, że badania

dotyczące oceny wrażliwości *Entamoeba gingivalis* i *Trichomonas tenax* na działanie płynów do płukania jamy ustnej są nowatorskie.

## OPIS FORMALNY ROZPRAWY

Recenzowana rozprawa doktorska pana lek. med. Jakuba Moroz jest bardzo obszerna i liczy 132 strony maszynopisu oraz zawiera 66 tabel, 15 rycin, 5 schematów i 109 pozycji piśmiennictwa. Przedstawiona do oceny praca zawiera wszystkie rozdziały typowe dla rozprawy doktorskiej, które poprzedza szczegółowy spis treści. Krótki, bo liczący niecałe dwie strony wstęp stanowi wprowadzenie do kolejnego rozdziału zatytułowanego Dane piśmiennictwa; rozdział ten stanowi rozwinięcie wstępu i jest podzielony na szereg podrozdziałów. W oparciu o dane z piśmiennictwa Autor przedstawia w nich: (1) mikrobiotę jamy ustnej, (2) znaczenie wybranych mikroorganizmów (grzybów i pierwotniaków) występujących w jamie ustnej w patogenezie chorób, (3) zabiegi stosowane od czasów starożytnych dla utrzymania właściwej higieny jamy ustnej, (4) charakterystykę komercyjnych płynów do płukania jamy ustnej (5) przegląd metod stosowanych w oznaczaniu wrażliwości grzybów na działanie związków chemicznych oraz (6) metod wykorzystywanych w określaniu wrażliwości pierwotniaków na działanie związków chemicznych. W kolejnej części - Badania własne - Doktoranta przedstawił cel pracy i w następnych podrozdziałach szczegółowo opisał materiał i metody, które wykorzystał w swoich badaniach. Uzyskane wyniki wraz z ich omówieniem stanowią najbardziej rozbudowany rozdział rozprawy doktorskiej, bowiem rozdział ten obejmuje aż 69 stron. Kolejne rozdziały stanowią: dyskusja, wnioski oraz spis piśmiennictwa. Rozprawę zamyka streszczenie w języku polskim i angielskim.

## OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Na szczególną uwagę szeroki zakres badań przeprowadzonych przez pana lek. med. Jakuba Moroz. Aby dokonać oceny aktywności komercyjnych płynów do płukania jamy ustnej i czystych, organicznych związków chemicznych wobec wybranych składników mikrobioty jamy ustnej, Doktorant zbadał działanie aż 12 płynów do płukania jamy ustnej i dwóch czystych, organicznych związków chemicznych (benzokainy i chlorheksydyny) wobec ośmiu referencyjnych szczepów grzybów należących do sześciu gatunków, 100 izolatów grzybów należących do dziewięciu gatunków oraz dwóch, referencyjnych szczepów pierwotniaków – *Entamoeba gingivalis* i *Trichomonas tenax*. Według mojej wiedzy, dotychczas nikt nie wykonał podobnych badań w oparciu o tak duży materiał. Z piśmiennictwa wynika, że z reguły badano pojedyncze szczepy lub izolaty grzybów. Jedynie Mahmoudi i współpracownicy (2015) zbadali wrażliwość 150 izolatów grzybów z rodzaju

*Candida* na działanie flukonazolu i preparatu roślinnego z *Euphorbia macroclada*. Choć liczbą zbadanych izolatów grzybów była wyższa niż w pracy lek. med. Jakuba Moroz, to jednak Mahmoudi i współpracownicy oceniali grzybobójcze działanie jedynie dwóch preparatów. Natomiast Doktorant zbadał grzybobójczą aktywność 12 płukanek i dwóch związków chemicznych, co wskazuje, że nakład Jego pracy był niewspółmiernie wyższy. Tym bardziej że, Doktorant zbadał również metodą krążkową osiem leków przeciwgrzybiczych określając wielkość stref zahamowania wzrostu ośmiu referencyjnych szczepów *Candida* oraz pierwotniakobójcze działanie metronidazolu na wzorcowe szczepy *Entamoeba gingivalis* i *Trichomona tenax*. Choć, zbadanie grzybobójczego i pierwotniakobójczego działania leków wobec wzorcowych szczepów grzybów i pierwotniaków nie było celem tej pracy, to jednak świadczy o racjonalnym podejściu Doktoranta do wykonanych badań. Takie podejście umożliwiło bowiem porównanie działania leków i badanych płynów do płukania jamy ustnej.

Przeprowadzenie tak rozległych badań wiązało się jednocześnie z poznaniem i opanowaniem bardzo różnorodnych metod i technik badawczych, dużymi umiejętnościami manualnymi oraz olbrzymią czasochłonnością. Przystępując do realizacji założeń swojej pracy Doktorant musiał się wykazać znajomością i opanowaniem, m. in.:

- metod izolowania i identyfikacji gatunków grzybów; obejmowały one szereg technik laboratoryjnych (np. wykonywanie bezpośrednich i trwałych preparatów barwionych metodą Giemsy, Wrighta oraz kwaśną fuksyną i błękitem laktofenolowym; uzyskiwanie hodowli i mikrohodowli grzybów oraz ich akseńizacja; wykonywanie testu API 20 C AUX); ponadto, musiał mieć wiedzę o składnikach grzybni i ich charakterystycznych cechach;
- metod oznaczania wrażliwości grzybów i pierwotniaków na działanie badanych płynów do płukania jamy ustnej, organicznych związków chemicznych oraz leków grzybobójczych i pierwotniakobójczych, w tym wyznaczenie (1) minimalnego stężenia hamującego wzrost grzybów metodą mikrorozcieńczeń w płynnym podłożu wg EUCAST, metodą dyfuzji w żelu agarowym wg Kadłubowskiego oraz metodą dyfuzyjno-krążkową oraz (2) stężenia powodującego 50% śmiertelność komórek pierwotniaków po 10- i 30-minutowej ekspozycji na działanie badanych preparatów.

Na szczególną uwagę zasługuje także fakt wykorzystania przez pana lek. med. Jakuba Moroz wielu różnych metod statystycznych do analizy uzyskanych danych. Wykorzystanie tak dużej różnorodności metod badawczych świadczy o solidnym podejściu do przeprowadzonych badań i o wysokim poziomie warsztatu badawczego.

Wyniki swoich szerokich badań Doktorant przedstawił w poszczególnych podrozdziałach aż na 69 stronach maszynopisu, ilustrując uzyskane dane w postaci 61 tabel i 10 rycin.

Drobiazgowy opis wyników wraz z ich ilustracją ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z tak olbrzymią ilością danych. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że wszystkie założenia pracy zostały zrealizowane. Na szczególną uwagę zasługują następujące fakty wynikające z przeprowadzonych badań:

- (1) po raz pierwszy wykazano pierwotniakobójcze działanie wszystkich badanych płynów do płukania jamy ustnej;
- (2) po raz pierwszy stwierdzono, że benzokaina, będąca środkiem znieczulającym o działaniu miejscowym, ma działanie grzybobójcze i pierwotniakobójcze; daje to podstawę do prowadzenia dalszych badań nad opracowaniem skuteczniejszych preparatów do utrzymania prawidłowej higieny jamy ustnej;
- (3) ze względu na stwierdzone różnice międzygatunkowe grzybów we wrażliwości na działanie substancji czynnych w płukankach istnieje konieczność identyfikacji gatunków grzybów u pacjentów.

Pan lek. med. Jakub Moroz zamyka rozprawę sześcioma wnioskami, które odpowiadają celom pracy i stanowią logiczne zakończenie uzyskanych wyników oraz przekonują czytelnika o racjonalnych założeniach podjętych badań.

## ZAGADNIENIA DO DYSKUSJI

Pewne spostrzeżenia poczynione w trakcie czytania pracy sprawiają, że chciałabym prosić Doktoranta o chwilę dyskusji w trakcie obrony rozprawy doktorskiej nad niżej wymienionymi zagadnieniami.

- Według mnie, Doktoranta nie zawsze prawidłowo stosuje termin „szczep”; w przypadku populacji grzybów izolowanych od pacjentów należałoby używać terminu „izolat”. Takie dowolne stosowanie terminu „szczep” prowadzi często do wielu niejasności. W związku z tym proszę o wyjaśnienie jaka jest różnica między szczepem a izolatem?
- Jak można wytłumaczyć brak skuteczności grzybobójczej płukanki Eludril Classic? W składzie tej płukanki jest chlorheksydyna (Tabela 2, str. 19). Z badań wielu autorów oraz z badań Doktoranta wynika, że CHX cechuje się wysoką aktywnością grzybobójczą.
- Uprzejmie proszę Doktoranta o wyjaśnienie, dlaczego wybrał tak długi czas ekspozycji działania płukanek na *Entamoeba gingivalis* i *Trichomonas tenax*? Nie sądzę, aby ktoś płukał jamę ustną przez 10 lub 30 minut.

## OCENA STRONY EDYTORSKIEJ ROZPRAWY

W rozprawie doktorskiej pana lek. med. Jakuba Moroz można znaleźć błędy edytorskie i językowe, które nie wpływają na ogólną ocenę merytoryczną pracy. W moim obowiązku jest zwrócenie uwagi na niektóre niedociągnięcia. Większość moich uwag, które poniżej wskazuję, dotyczy poprawnego cytowania piśmiennictwa w rozprawie:

- najczęściej cytowanie sugeruje, że autorami pracy jest więcej niż dwóch autorów ale ze spisu wynika, że jest jeden lub dwóch (m. in.: na str. 4 i 8 - Gregorczyk-Maślanka i wsp. 2016, a w spisie na poz. 29 - Gregorczyk-Maślanka i Kurzawa, 2016; na str. 4 – Zaura i wsp. 2015, a w spisie na poz. 108 i 109 jest odpowiednio Zaura i Mira, 2015 i Zaura i ten Cate 2015; na str. 5 – Mariotti 2009, a w spisie na poz. 62 jest Mariotti i Burrel, 2009; na str. 6 i 12 - Sampalo-Maia i wsp. 2014, a w spisie na poz. 89 jest Sampalo-Maia i Monteiro-Silva, 2014; na str. 7 – Mayers i wsp. 2014, a w spisie na poz. 65 jest Mayers i Curran, 2014; na str. 9 – Underhill i wsp. 2014, a w spisie na poz. 99 jest Underhill i Iliev, 2014; na str. 9 – Nowak i wsp. 2009, a w spisie na poz. 74 jest Nowak i Kurnatowski, 2009; na str. 9 – Harriott i wsp. 2009, a w spisie na poz. 30 jest Harriott i Noverr, 2009; na str. 10 – Kurnatowska A. J. i wsp. 1981, a w spisie na poz. 44 jest Kurnatowska i Sosnowska, 1981; na str. 12 – el Azzouni i wsp. 1994, a w spisie na poz. 20 jest El Azzouni i el Badry, 1994; na str. 12 – Lyons i wsp. 1983, a w spisie na poz. 58 jest Luis i Palmer, 1983; na str. 12 – Kurnatowska A. J. i wsp. 1981, a w spisie na poz. 41 jest Kurnatowska i Kurnatowska, 1981; na str. 14 – Kurnatowski i wsp. 2016, a w spisie na poz. 53 jest Kurnatowski i Moroz, 2016; na str. 14 jest Kurnatowska A. i wsp. 1990, a w spisie na poz. 43 jest Kurnatowska i Kurnatowska, 1990; na str. 14 – Kurnatowska A. J. i wsp. 1999, a w spisie na poz. 48 jest Kurnatowska i Kurnatowski, 1999; na str. 21 i na str. 109 – Balagopal i wsp. 2013, a w spisie na poz. 6 jest Balagopal i Arjunker, 2013; na str. 22, 30, 31 i 32 – Espinel-Ingroff i wsp., a w spisie na poz. 22 jest Espinel-Ingroff i Canton, 2007; na str. 25 – Upcroft i wsp. 2001, a w spisie na poz. 100 jest Upcroft i Upcroft, 2001; na str. 27 – Kurnatowska A. i wsp. 2008, a w spisie na poz. 40 jest Kurnatowska i Kurnatowski 2008; na str. 110 – Prasanth i wsp. 2013, a w spisie na poz. 81 jest Prasanth i Capoor, 2013;
- na str. 37 – Kurnatowska 1985, a w spisie na poz. 38 jest Kurnatowska i wsp., 1985; na str. 110 – Prasanth i wsp. 2011, a w spisie na poz. 82 jest Prasanth, 2011;
- są literówki w nazwisku autora, np. na str. 12 – Luczak i wsp. 2016, a w spisie na poz. 57 jest Luszczyk i wsp. 2016;
- brak w spisie cytowanej na str. 4 pracy Kurnatowskiego i wsp. 2006 oraz cytowanej na str. 112 pracy Radwan-Oczko i wsp. 2013;



- pozycje w spisie piśmiennictwa powinny być ułożone alfabetycznie - patrz pozycje 38 do 53, pozycje 81-82 i 106 do 109;
- ponadto, w spisie należy zastosować jednolity schemat cytowanych publikacji; w przedstawionej do recenzji rozprawie w niektórych pozycjach Doktorant (1) stosuje znak interpunkcyjny po lub między inicjałami autorów, podczas gdy w innych nie; (2) raz podaje pełny tytuł czasopisma, a w innym przypadku tylko skrót; (3) pisze nr zeszytu lub pomija go;
- na str. 25 w ostatnim akapicie Autor pisze „*Inna metoda, opisana szczegółowo w Rozdz. 3.2.3.3....*”, podczas gdy w spisie treści i tekście pracy nie ma takiego rozdziału.
- w pracy są też błędy językowe i literówki, np.: na str. 16 Doktorant napisał „rzymianie” z małej litery, podczas gdy powinno być Rzymianie, ponieważ w tym przypadku odnosi się to do obywateli starożytnego państwa rzymskiego, a nie mieszkańców stolicy Włoch; czasami stosuje niefortunne sformułowania, np. na str. 4 „Jest to stan wolności od ust...”, na str. 23 „*zaszczerpienie rozcieńczeń leków*”;
- uważam, że do numeracji tabel Doktorant powinien stosować zamiast cyfr rzymskich cyfry arabskie, tak jak to zrobił w przypadku rycin i schematów.

Powyższe niedociągnięcia sprawiają wrażenie, że praca nie została przez Doktoranta dokładnie sprawdzona. Mam jednak nadzieję, że ich wykaz ułatwi Doktorantowi przygotowanie pracy do publikacji.

## PODSUMOWANIE

Podsumowując całość, stwierdzam, że recenzowana rozprawa stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego, została zaplanowana i zrealizowana prawidłowo. Jest oryginalna i nowatorska i wiele wnosi od strony badawczej i praktycznej. Analizując poszczególne działy prowadzonych przez pana lek. med. Jakuba Moroz badań należy stwierdzić, że rozprawa wymagała bardzo dużego nakładu pracy i czasu, a jednocześnie wymagała znajomości i opanowania różnorodnych technik badawczych oraz wykonania wielu obliczeń statystycznych. Jest nowoczesna i świadczy o profesjonalnym warsztacie naukowym, w którym została wykonana. Chociaż od strony edytorskiej i językowej praca ma szereg niedociągnięć, to jednak wszystkie one są do poprawienia przed publikacją wyników w indeksowanym czasopiśmie.



Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym na stopień doktora i wobec tego wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie pana lek. med. Jakuba Moroz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Prof. dr hab.  
Anna C. Majewska

Poznań, 10.01.2018 r.