

Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Zakład Stomatologii Dziecięcej  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Dorota Olczak-Kowalczyk  
Tel (+22) 502 20 31, email: [pedodoncja@wum.edu.pl](mailto:pedodoncja@wum.edu.pl)  
00-246 Warszawa, ul. Miodowa 18

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt.**

**„Wykorzystanie biologicznego potencjału niedojrzałych zębów stałych w regeneracji  
kompleksu miazgowo-zębinowego w następstwie obumarcia miazgi  
badania kliniczne i doświadczalne”**

**lek. dent. Renaty Pazery**

**Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Joanna Szczepańska**

**Katedra i Zakład Stomatologii Wieku Rozwojowego**

**Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Apeksyfikacja z wykorzystaniem nietwardniejących materiałów wodorotlenkowo-wapniowych jest od wielu lat stosowaną metodą leczenia pulpopatii nieodwracalnych zębów stałych z nieukończonym rozwojem korzenia. Metoda ta umożliwia wprawdzie zamknięcie otworu wierzchołkowego lub wytworzenie twardej bariery jednak nie zapewnia dalszego wzrostu korzenia na długość i pogrubienia jego ściany. Wymaga często wielomiesięcznego leczenia, jest obciążona ryzykiem reinfekcji i złamań zęba w okolicy jego szyjki. Wprowadzenie apeksyfikacji z zastosowaniem materiałów typu MTA istotnie skraca czas leczenia i zmniejsza ryzyko powikłań związanych z długoczasowym stosowaniem wodorotlenku wapnia. Materiał MTA umożliwia dodatkowo tworzenie szczelniejszej bariery w porównaniu z wodorotlenkiem wapnia. Mimo niewątpliwych zalet apeksyfikacji z zastosowaniem materiału typu MTA problemem pozostają cienkie ściany korzenia leczonego zęba. Dalszy wzrost korzenia na długość i pogrubianie jego ścian obserwowano w zębach leczonych metodą rewaskularyzacji, określanej również jako regeneracja miazgi zęba. Istotą tej metody jest odtworzenie miazgi w wyjąłowanym kanale zęba przez komórki macierzyste osadzające się na białkowym rusztowaniu skrzepu krwi przy obecności odpowiednich czynników wzrostu. Dotychczasowe obserwacje wskazują jednak, że powstająca tkanka, określana jako tkanka miazgowo-ozębnopodobna, zawiera komórki zębino-, cemento- i kostnopodobne. Wzrost długości i grubości korzenia może być wynikiem odkładania się więc tkanki cemento- lub kościopodobnej. Obecnie wiadomo, że komórki macierzyste miazgi zęba

mogą różnicować się w różnorodne linie komórkowe w zależności od działających bodźców. Podejmowane są więc badania poszukujące czynników ukierunkowujących różnicowanie się komórek macierzystych w komórki niezbędnych do odtworzenia miazgi zęba oraz sposobów postępowania klinicznego ograniczających możliwość ich uszkodzenia. Dlatego tematykę pracy lek. dent. Renaty Pazery uważam za aktualną i bardzo interesującą zarówno z punktu widzenia naukowego jak i klinicznego.

Praca składa się z 10 rozdziałów ujętych na 241 stronach, poprzedzonych wykazem skrótów i spisem treści. Rozdział ósmy stanowią streszczenia w języku polskim i angielskim, dziesiąty - załączniki, wśród których znalazły się: Zgoda Komisji Bioetycznej, wzór karty badania pacjenta, certyfikat DPSC, spis rycin (liczbie 114) i spis tabel (w liczbie 14). Spis piśmiennictwa zawiera 174 pozycje, w większości angielskojęzyczne, które są aktualne (tylko 8 pozycji zostało opublikowanych przed 2000 rokiem) i dobrze dobrane.

Dwa pierwsze rozdziały, obejmujące łącznie 36 stron, tj. „Wstęp” i „Przegląd piśmiennictwa”, wprowadzają w tematykę pracy i podkreślają celowość przeprowadzonych badań. Doktorantka zawarła w nich podstawowe informacje dotyczące morfologii zębów stałych niedojrzałych i etiologii chorób miazgi. Omówiła zagadnienie resorpcji, metody jej leczenia, sposoby postępowania w przypadku nieodwracalnego zapalenia i martwicy miazgi, tj. apeksyfikacji z wykorzystaniem wodorotlenku wapnia lub MTA i metodę rewaskularyzacji, oraz laseroterapię jako metodę wspomagającą leczenie chorób miazgi i tkanek okołokorzeniowych. Scharakteryzowała materiały wykorzystywane w omówionych metodach terapeutycznych. Na podkreślenie zasługuje część prezentująca molekularne podłoże rewaskularyzacji oraz omówienie mechanizmu angiogenezy i czynników biorących w niej udział, które świadczą o wnikliwości Doktorantki i starannym studiowaniu tematu. Doktorantka przedstawiła także zasady diagnostyki urazowych uszkodzeń zębów. Uważam, że wskazane byłoby raczej ogólne omówienie diagnostyki pulpopatii stanowiących wskazania do leczenia metodą apeksyfikacji lub rewaskularyzacji, zwłaszcza że wśród leczonych przez Doktorantkę zębów znalazły się także zęby boczne z pulpopatiami spowodowanymi próchnicą.

Informacje przedstawione w rozdziale „Przegląd piśmiennictwa” podkreślają konieczność standaryzacji i optymalizacji metod leczenia endodontycznego stałych zębów niedojrzałych, zwłaszcza metody rewaskularyzacji, i uzasadniają sformułowane przez Doktorantkę cele pracy, którymi są:

- porównanie dwóch metod leczenia niedojrzałych zębów stałych po nieodwracalnym zapaleniu lub obumarciu miazgi – apeksyfikacji z wykorzystaniem MTA i rewaskularyzacji,
- ocena skuteczności leczenia resorpcji z wykorzystaniem materiału MTA,
- ocena wpływu katelicyny na komórki macierzyste miazgi (DPSC) w aspekcie zwiększenia wydzielania czynników proangiogennych,
- analiza wpływu biostymulacji laserowej na rozwój korzenia oraz stymulację gojenia procesów zapalnych.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka wyodrębniła trzy części: badania kliniczne, badania doświadczalne i analizę statystyczną. W części dotyczącej badań klinicznych podała liczbę dzieci, u których istniała konieczność leczenia endodontycznego zębów, ich wiek i przyczyny pulpopatii oraz kryteria wyboru metody leczenia. Scharakteryzowała stosowane środki lecznicze i dokładnie opisała przebieg poszczególnych procedur terapeutycznych, tj. apeksyfikacji z wykorzystaniem MTA i rewaskularyzacji. Omówiła także zasady stosowania laseroterapii. Nie podała jednak kryteriów kwalifikacyjnych do stosowania tej metody. Przedstawiła częstość kontrolnych badań radiologicznych i klinicznych. Jako elementy badania klinicznego wymieniła ocenę barwy zęba, test Smrekera oraz badanie głębokości szczeliny dziąsłowej. Nie podała jednak kryteriów oceny w poszczególnych testach i kryteriów oceny radiologicznej mimo posługiwania się w opisie wyników skalami stopniowymi, np. reakcja na opukiwanie 3°, wytworzenie mostu zębinowego – 2°, głębokość szczeliny dziąsłowej -2°. Nie omówiła także pozostałych elementów badania przedstawionych w wynikach, tj. oceny ruchomości zęba, bolesności uciskowej wyrostka zębodołowego, szczelności wypełnienia. Część testów została omówiona w rozdziale „Przegląd piśmiennictwa” w podrozdziale „Diagnostyka urazowych uszkodzeń zębów” oraz w rozdziale „Wyniki” w podrozdziale „Podsumowanie wyników badań kontrolnych zębów leczonych metodą rewaskularyzacji i apeksyfikacji raz leczenia resorpcji pourazowych”. Doktorantka dokładnie opisała natomiast materiały (komórki macierzyste miazgi firmy Lonza) i zastosowane metody badań doświadczalnych - test immunocytochemiczny identyfikujący komórki macierzyste miazgi po działaniu katelicyny oraz testy oceniające ich reakcje na stymulację katelicyną, tj. test ELISA zastosowany w celu ilościowej oceny wydzielania czynników proangiogennych (PDGFAA, FGF2, ANG1), test Ilościowej Reakcji Łańcuchowej Polimerazy - w celu potwierdzenia wzrostu wydzielania tych czynników i test Bromodeoksyurydyny - w celu oceny zdolności proliferacyjnych. W

podrozdziale „Analiza Statystyczna” skrupulatnie omówiła metody wykorzystane do określenia siły zależności między wydzielaniem czynników proangiogennych a czasem działania i stężeniem katelicyny na komórki macierzyste miazgi.

Wyniki badań klinicznych Doktorantka przedstawiła na 70 stronach w postaci szczegółowych opisów poszczególnych przypadków ilustrowanych zdjęciami klinicznymi i radiologicznymi oraz zbiorczego posumowania wyników badań kontrolnych zębów leczonych ocenianymi przez Nią metodami. Zabiegi apeksyfikacji z wykorzystaniem MTA przeprowadziła w 22 zębach u 19 pacjentów, rewaskularyzacji w 7 zębach u 5 pacjentów, leczenie resorpcji zewnętrznej korzenia w 4 zębach u 2 pacjentów. Zwraca uwagę wysoka skuteczność wszystkich zastosowanych metod. Doktorantka zastosowała laseroterapię u 9 pacjentów, u których zęby leczono metodą apeksyfikacji oraz we wszystkich przypadkach rewaskularyzacji i leczenia resorpcji. Do skuteczności tej metody odnosi się w podrozdziale „Wyniki badań kontrolnych pacjentów poddanych leczeniu resorpcji” podkreślając jej przydatność kliniczną. Zmianie wymaga opis ryciny 37, na której przedstawiono liczby zębów, a nie pacjentów. Przejrzystość danych zapewniłoby także umieszczenie w „Wynikach” tabeli 14 znajdującej się w części ‘Dyskusja’. W tabeli 8 znajduje się zbędne określenie „w modyfikacji własnej” w odniesieniu do skali Halla.

Wyniki badań doświadczalnych, obejmujące 30 stron, Doktorantka przedstawiła w postaci opisu, 3 tabel oraz 27 rycin. Wykazała wpływ stymulacji katelicyną na komórki macierzyste miazgi zęba, tj. wzrost wydzielania czynników angiogennych a także jej wpływ na genom komórek macierzystych. Ujawniła znaczenie czasu ekspozycji komórek na działanie katelicyny oraz jej stężenia na wydzielanie badanych czynników angiogennych. W przypadku FGF2 szczególnie wyraźny wzrost wydzielania nastąpił przy stężeniu 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  w sześciogodzinnej inkubacji oraz przy stężeniu 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  w czasie 48- i 72-godzinnej inkubacji. Dla PDGFAA wyraźny wzrost wydzielania obserwowano po inkubacji 6-godzinnej przy stężeniu 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i 24-godzinne przy stężeniu 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dla ANG1 wartości te wynosiły 3 godziny, 6 godzin i 72 godziny przy stężeniach odpowiednio 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały silne dodatnie zależności między wydzielaniem FGF2 stężeniem katelicyny i wydzielaniem ANG1 a czasem inkubacji, oraz ujemne między wydzielaniem PDGFAA a czasem ekspozycji na katelicynę. Analiza jednoczesnego wpływu stężenia katelicyny i czasu inkubacji wykazała największą zależność wydzielania ANG1 od tych parametrów. Zastosowany przez Doktorantkę test BrdU nie wykazał natomiast wpływu katelicyny na proliferację komórek macierzystych miazgi a test immunocytochemiczny ujawnił niezmienność ich fenotypu w trakcie doświadczenia.

W rozdziale „Dyskusja”, liczącym 24 strony, Doktorantka omówiła wskazania do przeprowadzenia zabiegu rewaskularyzacji podkreślając znaczenie oceny szerokości otworu wierzchołkowego. Przedstawiła opinie innych autorów dotyczące roztworów podchlorynu sodu o różnych stężeniach stosowanych do płukania kanałów oraz składu pasty poliantybiotykowej uzasadniając wybór wykorzystywanych przez Nią środków. Omówiła także nieskuteczne metody odkazania kanału w metodzie rewaskularyzacji z zastosowaniem wodortlenku wapnia i formokrezolu oraz alternatywne metody tworzenia rusztowania dla wędrujących komórek macierzystych, w tym zastosowanie fibryny bogatopłytkowej. Przedstawiła możliwości i ograniczenia stosowania MTA w metodzie apeksyfikacji, rewaskularyzacji i leczeniu resorpcji zewnętrznej korzenia. Zwróciła uwagę na czynniki opóźniające tworzenia mostu zębinowego podkreślając znaczenie stanu zapalnego w tkankach okołowierzchołkowych. Opierając się o doświadczenia własne i innych autorów odniosła się krytycznie do możliwości oceny radiologicznej skuteczności zastosowanych metod leczenia. Doktorantka zwróciła również uwagę na trudności w przeprowadzeniu oceny porównawczej uzyskanych przez Nią wyników leczenia z wynikami innych autorów. Dostępne publikacje prezentują bowiem wyniki obserwacji niewielkich liczebnie grup lub są to opisy przypadków. W części dyskusji dotyczącej badań klinicznych Doktorantka nie ustrzegła się niewielkich powtórzeń z „Przeglądu piśmiennictwa”. W ostatniej części dyskusji w sposób syntetyczny omówiła wyniki badań doświadczalnych porównując je do uzyskanych przez badaczy japońskich. Sposób przeprowadzenia dyskusji świadczy o umiejętności krytycznej oceny wyników badań własnych i innych badaczy oraz znajomości piśmiennictwa dotyczącego tematu pracy.

Doktorantka sformułowała 4 wnioski, świadczące o realizacji postawionych celów pracy:

1. Rewaskularyzacja jest nowoczesną metodą leczenia umożliwiającą rewitalizację miazgi oraz dalszy rozwój korzenia, powodując pogrubienie jego ścian, co może skutkować większą odpornością na złamanie. Apeksyfikacja z wykorzystaniem MTA jest dobrą metodą leczenia miazgi w przypadkach, w których z uwagi na kwalifikacje pacjenta do zabiegu, nie można wykonać rewaskularyzacji. Nieudana próba rewaskularyzacji nie wyklucza możliwości leczenia metodą apeksyfikacji.
2. MTA jest materiałem z wyboru w przypadkach leczenia zaawansowanej resorpcji zapalnej ze względu na skuteczne zatrzymanie postępu patologicznego procesu.

3. Katelicydyna zwiększa wydzielanie czynników proangiogennych, tym samym można ją wykorzystać jako czynnik stymulujący angiogenezę w procesie rewaskularyzacji miazgi zębów.
4. Biostymulacja laserowa powinna być stosowana jako leczenie wspomagające metody regeneracyjne, apeksyfikację oraz leczenie resorpcji zapalnej, ponieważ przyspiesza proces gojenia, co jest szczególnie ważne w przypadku zaawansowanej resorpcji. Zwiększa szanse na dłuższe utrzymanie zęba w jamie ustnej.

W mojej ocenie we wniosku drugim korzystne byłoby zastąpienie sformułowania MTA jest materiałem z wyboru” np. na „MTA okazał się skuteczny w leczeniu zaawansowanej resorpcji” ponieważ wniosek sformułowany w oparciu o obserwację 4 zębów i nie porównywano skuteczności leczenia z wykorzystaniem różnych materiałów. Podobnie wniosek czwarty ze względu na brak analizy porównawczej skuteczności postępowania leczniczego z i bez zastosowania laseroterapii, w tym także czasu utrzymania zęba w jamie ustnej, wymaga ponownego sformułowania.

W podsumowaniu stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała postawione przed sobą cele pracy. Pragnę także podkreślić, że przedstawione przez mnie wcześniejsze uwagi nie zmniejszają wartości merytorycznej uzyskanych przez Nią wyników badań. Z punktu widzenia klinicysty za niezwykle cenne uważam dobrze udokumentowane przypadki leczenia endodontycznego zębów stałych u dzieci i młodzieży, które mogą stanowić załączek opracowania książkowego. Świadczą one o posiadaniu przez Doktorantkę dużych umiejętności praktycznych i wiedzy teoretycznej z zakresu traumatologii zębów i endodoncji wieku rozwojowego.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania doświadczalne oceniające wpływ działania katelicydyny na komórki macierzyste miazgi zęba wpisują się w nurt badań naukowych aktualnie prowadzonych na świecie, a ich wyniki stanowią istotny wkład w rozwój stomatologii regeneracyjnej. Mają wartość zarówno poznawczą jak i praktyczną. Realizacja badań wymagała dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki, nabycia umiejętności wykonywania kolejnych procedur doświadczalnych, zaangażowania w ich wykonanie i skrupulatności na każdym etapie pracy.

Dlatego zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. dent. Renaty Pazery do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze nowatorski charakter przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, cenne obserwacje kliniczne i inspirujące wyniki badań

doświadczalnych przedkładam wniosek wyróżnienie pracy.

Z wyrazami szacunku

21.08.2017

KIEROWNIK  
ZAKŁADU STOMATOLOGII DZIECIĘCEJ

Prof. dr hab. n. med. Dorota Okczak-Kowalczyk