

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. dent. Piotra Tkaczyńskiego
pt. „Analiza porównawcza aktywności biologicznej i wybranych właściwości
bioaktywnych materiałów odtwórczych. Badania *in vitro*.”**

Stomatologia to dyscyplina medyczna, która w ostatnich latach bardzo prężnie się rozwija. Dotyczy to zarówno urządzeń, jak i materiałów. Dostępne są różnorodne materiały biologicznie aktywne przeznaczone do użytku w różnych jej specjalnościach. Najczęściej materiały te stosowane są w: stomatologii zachowawczej, endodoncji oraz implantologii. Dobór odpowiedniego materiału zależy zarówno od specjalizacji, ale też od oczekiwanych właściwości w konkretnej sytuacji klinicznej. Nie stanowią one jednorodnej grupy. Różnią się zarówno składem, jak i postacią, mechanizmem wiązania czy rodzajem użytego komponentu bioaktywnego. Współczesne techniki leczenia zachowawczego w stomatologii opierają się na jak najbardziej oszczędnej preparacji zębów i stosowaniu materiałów zapewniających szczelność, zabezpieczenie przed nawrotem próchnicy, remineralizację twardych tkanek zęba oraz ochronę i naprawę miazgi. Producenci oferują dentystom różne bioaktywne materiały odtwórcze. Światowa Federacja Dentystyczna (FDI) we wrześniu 2022 roku zdefiniowała bioaktywność jako lokalne, pożądane i zamierzone działanie oparte na mechanizmach biologicznych i chemicznych.

Materiały bioaktywne pomimo różnic powinny prezentować podobne cechy. Nieustannie na rynku pojawiają się nowe preparaty, a dostępne od wielu lat ulegają udoskonaleniom. Badania porównawcze są zatem zagadnieniem aktualnym, szczególnie, że niewiele jest doniesień zarówno w języku polskim, jak i angielskim analizujących określone parametry materiałów bioaktywnych z różnych grup.

Podjęty temat badawczy należy ocenić jako bardzo ważny. Potrzebne są wiarygodne badania naukowe w celu weryfikacji skuteczności tych materiałów.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. dent. Piotra Tkaczyńskiego pt. „Analiza porównawcza aktywności biologicznej i wybranych właściwości bioaktywnych materiałów odtwórczych. Badania *in vitro*.” ma typowy układ dla dysertacji doktorskiej i liczy 171 stron.

Promotorem pracy jest dr hab. n. med. prof. uczelni Elżbieta Bołtacz-Rzepakowska z Zakładu Stomatologii Zachowawczej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Zamieszczony na początku rozprawy „Spis treści” jest dostatecznie szczegółowy i sporządzony w pełni poprawnie. Pierwsza strona to Wykaz skrótów użytych w pracy.

Rozprawę rozpoczyna liczący 3 strony rozdział „**1. Wstęp**”. Kolejnym rozdziałem jest „**2. Przegląd piśmiennictwa**” podzielony na pięć podrozdziałów: **Bioaktywność: historia i definicje, Bioaktywne materiały dentystyczne, Potencjał antybakteryjny, Zmiany pH środowiska oraz Wydzielanie jonów wapnia**, liczący 25 stron. Autor przedstawia w nich, na podstawie piśmiennictwa, szeroki zakres zagadnień związanych z właściwościami oraz zastosowaniem wybranych biomateriałów. Rozdziały te należy ocenić jako bardzo dobre wprowadzenie do rozprawy doktorskiej. Wskazują one, że Doktorant został dobrze przygotowany do prowadzenia badań naukowych.

Rozdział „**3. Cel pracy**” przedstawia założenia pracy.

Celem pracy była analiza porównawcza aktywności biologicznej i wybranych właściwości badanych materiałów poprzez:

1. Ocena chemicznych właściwości bioaktywnych materiałów odtwórczych na podstawie:
 - a) zmiany pH środowiska w wodzie ultraczystej i roztworze SBF,
 - b) wydzielania jonów Ca^{2+} w wodzie ultraczystej i roztworze SBF.
2. Ocena potencjału przeciwdrobnoustrojowego bioaktywnych materiałów odtwórczych na podstawie:
 - a) oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej,
 - b) tworzenia biofilmu na powierzchni materiałów.

Rozdział „**4. Materiał i metodyka**” Doktorant podzielił na :

Materiały i Metody badań. Natomiast Metody badań podzielił na podrozdziały:

Badanie właściwości chemicznych, Badania mikrobiologiczne oraz Analiza statystyczna

W rozdziale tym zawarte są tabele I i II, oraz Ryciny 1-6.

W badaniach doktorant użył sześciu materiałów określanych przez producentów jako bioaktywne: Equia Forte HT, Activa BioACTIVE Restorative, Activa BioACTIVE Liner,

Biodentine, Cention N oraz TheraCal LC. Doktorant przeprowadził doświadczenie w dwóch etapach:

badania właściwości chemicznych oraz badania mikrobiologicznego.

Badanie właściwości chemicznych zostało przeprowadzone w dwóch różnych środowiskach: wodzie ultraczystej oraz symulowanym płynie fizjologicznym. Próbki materiałów w kształcie dysków o wymiarach $d = 15 \text{ mm}$, $h = 1 \text{ mm}$ doktorant umieszczał w polipropylenowych probówkach i zalewał 30 ml roztworu. Następnie probówki umieszczał na kołysce laboratoryjnej w celu delikatnego mieszania roztworu.

Badanie zmian pH lek. dent Piotr Tkaczyński przeprowadził na 3 próbkach umieszczonych w wodzie ultraczystej oraz 3 próbkach umieszczonych w roztworze SBF. Pomiarów dokonywał za pomocą elektrody pH po zanurzeniu próbki, a następnie po 2 h, 24 h, tygodniu, 2, 3 i 4 tygodniach. Zmiany pH doktorant mierzył każdorazowo w tych samych probówkach i wyliczał średnią z dokonanych pomiarów.

Natomiast **Badanie uwalniania jonów wapnia** doktorant przeprowadził na 6 próbkach umieszczonych w wodzie ultraczystej oraz 6 próbkach umieszczonych w roztworze SBF. Ilość uwolnionych jonów wapnia mierzył metodą analizy miareczkowej. Pomiarów dokonywał po zanurzeniu próbki, a następnie po 24 h, tygodniu, 2 i 3 tygodniach.

Badanie mikrobiologiczne doktorant przeprowadził na cylindrycznych próbkach materiałów o wymiarach $d = 10 \text{ mm}$, $h = 2 \text{ mm}$. Użył kolekcyjnego szczepu *Streptococcus mutans* ATCC 35668 oraz mikrobioty jamy ustnej pozyskanej od 3 pacjentów:

Mikrobiota 1. Pacjent bez aktywnej choroby próchnicowej oraz bez stanu zapalnego dziąseł (Gingival Index = 0).

Mikrobiota 2. Pacjent bez aktywnej choroby próchnicowej (brak klinicznie oraz radiologicznie zdiagnozowanych ubytków próchnicowych) ze stwierdzonym klinicznie stanem zapalnym dziąseł (Gingival Index powyżej 0).

Mikrobiota 3. Pacjent z aktywną chorobą próchnicową (klinicznie i/lub radiologicznie stwierdzone ubytki próchnicowe).

Ocena aktywności przeciwbakteryjnej materiałów została przeprowadzona przez doktoranta metodą dyfuzyjną. Bakterie hodowano na agarowej pożywce z wyciągiem mózgowo - sercowym i inkubowano w temp. 37°C w modyfikowanej atmosferze zawierającej 5% CO_2

przez 24 godziny. Krążki przygotowane z materiałów dentystycznych ($d = 10$ mm) lub krążki antybiotyków ($d = 6$ mm): erytromycyny i gentamycyny, umieszczano na płytkach, a następnie inkubowano przez 24 godziny. Mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów, a wyniki podano jako wielkość strefy inhibicji po odjęciu średnicy materiału/krążka.

Tworzenie biofilmu na powierzchni materiałów doktorant oceniał w odniesieniu do krążków medycznego silikonu. Materiały inokulowano w buforze PBS, wprowadzając po 1 ml zawiesiny bakterii znormalizowanej przy użyciu skali McFarland'a. Dodano 4 ml pożywki bulionowej z wyciągiem mózgowo-sercowym. Płytki inkubowano statycznie przez 24 h. Po inkubacji krążki trzykrotnie przepłukano sterylnym buforem PBS, a następnie umieszczano w 10 ml fizjologicznego roztworu soli i poddano działaniu ultradźwięków. Dziesięciokrotnie rozcieńczone zawiesiny bakterii inkubowano przez 48 h stosując pożywkę agarową z wyciągiem mózgowo-sercowym.

Oceniając zastosowane metody statystyczne należy stwierdzić, że ich dobór był właściwy.

Rozdział „5. Wyniki” jest najobszerniejszym rozdziałem w rozprawie doktorskiej, liczącym 27 stron. Wszystkie wyniki badań własnych zostały zawarte w 7 tabelach (III-IX) i 15 rycinach (8-22), omówione w prawidłowo dobranej kolejności.

Zmiany pH w wodzie ultraczystej

Jedynie materiały krzemowo-wapniowe oraz Cention N alkalizowały środowisko, przy czym najwyższa średnia wartość pH po 4 tygodniach została odnotowana w próbce zawierającej Biodentine ($12,366 \pm 0,182$). Po 4 tygodniach badania średnia wartość pH dla wszystkich badanych materiałów glass-jonomerowych mieściła się w zakresie 6 – 7.

Zmiany pH w roztworze SBF

Pod koniec badania najwyższą średnią wartość pH odnotowano dla materiału Biodentine i była ona istotnie wyższa od wartości pH dla wszystkich pozostałych materiałów. Biodentine jako jedyny materiał powodował ciągły wzrost pH roztworu SBF przez cały czas trwania badania.

Zmiany pH niezależnie od środowiska

Analizując zmiany pH wywołane przez materiały niezależnie od medium, w którym były zanurzone doktorant stwierdził, że po 1. oraz 2. tygodniu badania Biodentine alkalizował środowisko osiągając wartości pH istotnie wyższe w porównaniu z innymi materiałami, oprócz

TheraCal LC. Natomiast po 3. oraz 4. tygodniu badania Biodentine osiągnął istotnie statystycznie wyższe wartości w porównaniu ze wszystkimi pozostałymi materiałami.

Uwalnianie jonów wapnia w wodzie ultraczystej

Jedynym materiałem uwalniającym jony wapnia do roztworu przez cały czas trwania badania był Biodentine. Oprócz Biodentine, tylko TheraCal LC uwalniał wapń, jednak zaobserwowano nieregularne pomiary.

Uwalnianie jonów wapnia w roztworze SBF

Najwięcej jonów wapnia podczas trwania eksperymentu uwolnił Biodentine. Na każdym etapie mierzone wartości różniły się od uzyskanych dla pozostałych materiałów w sposób statystycznie istotny.

Uwalnianie jonów wapnia niezależnie od środowiska

Jedynie Biodentine uwalniał jony wapnia osiągając na każdym etapie wartości statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z pozostałymi materiałami.

Ocena aktywności przeciwbakteryjnej

W badaniu z użyciem referencyjnego szczepu *S. mutans* najwyższy średni pomiar strefy zahamowania wzrostu doktorant zauważył dla materiału Activa Liner (5,3 + 0,5 mm) oraz (5,0 + 0,8 mm) dla krążka erytromycyny. Różniły się one w sposób statystycznie istotny od wartości dla Biodentine (3,5 + 0,6 mm). Pozostałe materiały oraz krążek gentamycyny nie wytworzyły strefy zahamowania wzrostu wokół badanych próbek. W badaniu z użyciem mikrobioty pacjenta 1. najwyższe średnie wartości odnotowano dla materiałów Equia Forte oraz Biodentine (odpowiednio 4,8 + 1,0 mm oraz 4,8 + 0,5 mm). Doktorant nie stwierdził strefy zahamowania wzrostu wokół materiałów TheraCal LC, Activa Restorative oraz Activa Liner. W przypadku mikrobioty pacjenta 2. największą strefę inhibicji doktorant zmierzył wokół krążka gentamycyny, a średnia wartość (14,5 + 2,1 mm) była istotnie wyższa od wszystkich pozostałych pomiarów. W badaniu prowadzonym przy użyciu mikrobioty pacjenta 3. największą strefę inhibicji odnotowano dla krążka gentamycyny i średnia wartość pomiaru (10,0 + 0,8 mm) była istotnie wyższa od wszystkich pozostałych pomiarów. W odniesieniu do materiału Cention N nie stwierdzono strefy inhibicji.

Tworzenie biofilmu na powierzchni materiałów

W badaniu przeprowadzonym na referencyjnym szczepie *S. mutans* materiał Activa Liner porastało najmniej bakterii: 6.3×10^4 jednostek tworzących kolonie na powierzchni krążka (jtk/krążek) i była to wartość istotnie niższa od wartości dla pozostałych materiałów. Stosując w badaniu mikrobiotę pacjenta 1. zaobserwowano, że TheraCal LC miał najmniej porośniętą powierzchnię - $5,5 \times 10^4$ jtk/krążek i wartość ta różniła się istotnie od wszystkich pozostałych. Biofilm pod względem największej liczby bakterii porastał krążek materiału Activa Liner ($3,5 \times 10^6$ jtk/krążek). Opisując badanie wykonane przy użyciu mikrobioty pacjenta 2. należy zauważyć, że najmniej bakterii stwierdzono na krążkach materiałów TheraCal LC ($1,4 \times 10^3$ jtk/krążek) oraz Biodentine ($2,2 \times 10^3$ jtk/krążek). W przypadku mikrobioty pacjenta 3. najmniej drobnoustrojów porastało materiał Cention N ($1,2 \times 10^4$ jtk/krążek), a wartość badanego współczynnika była istotnie niższa w porównaniu z pozostałymi materiałami.

Rozdział „**6. Dyskusja**” liczy 16 stron. Dyskusję lek. dent Piotr Tkaczyk przeprowadził umiejętnie i merytorycznie. Sposób prezentacji i analizy świadczy o dojrzałości Doktoranta jako badacza.

Na podstawie uzyskanych wyników w rozdziale „**7. Wnioski**” Doktorant wyciągnął 7 wniosków:

1. Materiały krzemowo-wapniowe oraz Cention N alkalizowały środowisko niezależnie od medium w jakim zostały umieszczone. Największą alkalizację zaobserwowano w przypadku Biodentine.
2. Jedynie materiały krzemowo-wapniowe uwalniały jony wapnia w obydwu środowiskach. Najwięcej wapnia, niezależnie od zastosowanego medium, uwalniał materiał Biodentine.
3. Przeprowadzone badania potwierdziły, że w zakresie właściwości chemicznych tylko materiały krzemowo-wapniowe spełniają wymagania stawiane bioaktywnym materiałom odtwórczym.
4. Potencjał przeciwbakteryjny ocenianych materiałów był wyraźnie zróżnicowany. Biodentine działał hamująco na wzrost wszystkich rodzajów flory bakteryjnej.

5. Narastanie biofilmu i inhibicja wzrostu mikroorganizmów charakteryzowały się dużą rozbieżnością – żaden z materiałów nie był równie skuteczny w odniesieniu do ocenianych rodzajów flory.
6. Otrzymane wyniki nie wykazały korelacji między stopniem alkalizacji środowiska i uwalnianiem jonów wapnia a działaniem przeciwbakteryjnym, co wskazuje na istotny wpływ innych czynników na aktywność przeciwdrobnoustrojową materiałów.
7. Warunki fizjologiczne środowiska jamy ustnej sugerują uzupełnienie badań chemicznych o obserwacje w kwaśnym środowisku.

Rozdział „8. Streszczenie” „9. Abstract” zawierają streszczenie wszystkich rozdziałów.

Rozdział „10. Spis rycin”, zawiera numerację arabską 22 rycin a „11. Spis tabel” numerację rzymską IX tabel

Rozdział „12. Piśmiennictwo” zawiera 196 pozycji piśmiennictwa. Zostały one ułożone według kolejności cytowania. W bibliografii większość pozycji jest z ostatnich 20 lat. Bardzo duża część pozycji piśmiennictwa jest anglojęzyczna.

Do pracy dołączone są też załączniki:

Załącznik nr 1: Informacja o finansowaniu pracy.

Załącznik nr 2: Opinia Komisji Bioetycznej dotycząca przeprowadzonych badań.

Załącznik nr 3: Opracowanie statystyczne wyników badań zmian pH z podziałem na grupy.

Załącznik nr 4: Opracowanie statystyczne wyników badań zmian pH bez podziału na grupy.

Załącznik nr 5: Opracowanie statystyczne wyników badań wyrzutu jonów wapnia z podziałem na grupy.

Załącznik nr 6: Opracowanie statystyczne wyników badań wyrzutu jonów wapnia bez podziału na grupy

Z obowiązku recenzenta jestem zobowiązana zauważyć niewielkie błędy redakcyjne, których nie ustrzegł się Doktorant. Pojedyncze literówki, wyrazy napisane wielką zamiast małą literą, brak lub za dużo spacji.

Wszystkie te uchybienia nie umniejszają w niczym wartości pracy.

Przedstawioną do oceny dysertację lek. dent. Piotra Tkaczyńskiego oceniam bardzo pozytywnie. Dowodzi ona posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medyczne oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz.U.z 2017r. poz.1789 ze zmianami) w związku z art.179 ust 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. dent. Piotra Tkaczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na dużą wartość merytoryczną pracy, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Gdańsk, 12.06.2024r.



dr hab. n. med. Agata Żółtowska