



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Zakład Stomatologii Zachowawczej Przedklinicznej i Endodoncji Przedklinicznej
kierownik: prof. dr hab. n. med. Mariusz Lipski

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lekarza dentysty **Piotra Tkaczyńskiego**
pt.: „**Analiza porównawcza aktywności biologicznej i wybranych właściwości
bioaktywnych materiałów odtwórczych. Badania in vitro**”

Materiałem źródłowym do opracowania niniejszej recenzji jest wydrukowany i odpowiednio opracowany manuskrypt dysertacji doktorskiej pt.: „ Analiza porównawcza aktywności biologicznej i wybranych właściwości bioaktywnych materiałów odtwórczych. Badania in vitro”. Praca została napisana zgodnie z wymaganiami odnośnie prac doktorskich i składa się z 13 rozdziałów. Poza tekstem praca zawiera 9 tabel, 22 ryciny zawarte w tekście, 196 pozycji piśmiennictwa oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, a także wykaz skrótów (na początku pracy), spis tabel, spis rycin oraz załączniki. Zajmuje 126 stron.

Promotorem rozprawy jest p. dr hab. n. med. Elżbieta Bołtacz-Rzepkowska, prof. nadzw.

Praca doktorska lek. dent. Piotra Tkaczyńskiego ma na celu porównanie aktywności biologicznej oraz wybranych właściwości badanych materiałów

poprzez: 1. Ocenę chemicznych właściwości bioaktywnych materiałów odtwórczych na podstawie: a) zmiany pH środowiska w wodzie ultraczystej i roztworze SBF, b) wydzielania jonów wapniowych w wodzie ultraczystej i roztworze SBF. 2. Ocenę potencjału przeciwdrobnoustrojowego bioaktywnych materiałów odtwórczych na podstawie: a) oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej, b) tworzenia biofilmu na powierzchni materiałów.

Temat rozprawy uważam za bardzo aktualny. Bioaktywność, w tym bioaktywność materiałów dentystycznych jest obecnie w kręgu zainteresowania wielu badaczy. Osobiście sam zajmuję się bioaktywnością hydraulicznych cementów krzemowo-wapniowych, które ocenie poddał również Doktorant. Dzięki pojawieniu się bioaktywnych materiałów stomatologicznych leczenie wielu schorzeń, w tym i powikłań leczenia stomatologicznego stało się bardziej przewidywalne. Materiały te zrewolucjonizowały leczenie odtwórcze i endodontyczne; dzięki nim opracowano nowe metody leczenia (np. rewitalizację, czy tzw. apeksyfikację jednowizytową).

We wstępie Doktorant omówił historię i definicję bioaktywności, szczegółowo opisał bioaktywne materiały dentystyczne, w tym wodorotlenek wapnia, materiały szkło-jonomerowe i ich modyfikacje, cementy krzemowo-wapniowe, cementy krzemowo-wapniowe oparte na cemencie portlandzkim – MTA i jego pochodne, cementy krzemowo-wapniowe wzbogacone o fosforany, cementy krzemowo-wapniowe oparte na krzemianie trójwapniowym, cementy krzemowo-wapniowe modyfikowane żywicą światłoutwardzalną, fosforany wapnia, cement glinowo-wapniowy oraz alkazyty. Dodatkowo przybliżył potencjalnemu czytelnikowi wyniki badań dotyczące potencjału antybakteryjnego, zmian pH środowiska oraz wydzielania jonów wapnia przez materiały dentystyczne.

Cel pracy sprecyzowany właściwie. Jak już wcześniej zazaczyłem podjął próbę porównania aktywności biologicznej oraz wybranych właściwości zakwalifikowanych do badania bioaktywnych materiałów.

Aby zrealizować cel zaplanował badania właściwości chemicznych oraz badania mikrobiologiczne. Do badań użył sześciu materiałów określanych przez producentów jako bioaktywne: Equia Forte HT, Activa BioACTIVE Restorative, Activa BioACTIVE Liner, Biodentine, Cention N oraz TheraCal LC. Badanie właściwości chemicznych przeprowadził w dwóch różnych środowiskach: wodzie ultraczystej oraz symulowanym płynie fizjologicznym (SBF). Próbki materiałów zalewał 30 ml roztworu. W sumie wykonał badanie zmian pH na 3 próbkach umieszczonych w wodzie ultraczystej oraz 3 próbkach umieszczonych w roztworze SBF. Pomiarów dokonał za pomocą elektrody pH po zanurzeniu próbki, a następnie po 2 godzinach, dobie, 1, 2, 3 i 4 tygodniach. Zmiany pH mierzył każdorazowo w tych samych próbkach. Z kolei badanie uwalniania jonów wapnia 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 dobie, 1, 2, 3 i 4 tygodniach. Miareczkowanie przeprowadzał na 5 ml eluatu pobieranego z kolejnych próbek do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniał wodą ultraczystą do kreski miarowej, a następnie przenosił do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Po dodaniu 10 ml NaOH o stężeniu 1 mol/l i szczypty mureksydu w przypadku braku różowego zabarwienia przed rozpoczęciem miareczkowania założył brak jonów wapnia w roztworze. Każdy pomiar wykonywał trzykrotnie wyliczając średnią. Badanie mikrobiologiczne przeprowadził na cylindrycznych próbkach materiałów używając kolekcyjnego szczepu *Streptococcus mutans* oraz mikrobioty jamy ustnej pozyskanej od 3 pacjentów. Oceny aktywności przeciwbakteryjnej

materiałów dokonał metodą dyfuzyjną. Bakterie hodował na agarowej pożywce z wyciągiem mózgowo-sercowym. Z hodowli na pożywce agarowej przygotował zawiesinę bakterii, którą wysiał na agarowej pożywce. Krążki przygotowane z materiałów dentystycznych lub krążki antybiotyków: erytromycyny i gentamycyny, umieścił na płytkach, a następnie inkubował dobę. Mierzył średnicę strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów, a wyniki podał jako wielkość strefy inhibicji. Tworzenie biofilmu na powierzchni materiałów ocenił w odniesieniu do krążków medycznego silikonu. Materiały inokulował w buforze PBS, wprowadzając po 1 ml zawiesiny bakterii znormalizowanej przy użyciu skali McFarland'a. Płytki inkubował dobę; po inkubacji krążki umieścił w 10 ml fizjologicznego roztworu soli i poddał działaniu ultradźwięków.

Dziesięciokrotnie rozcieńczone zawiesiny bakterii inkubowano przez 2 doby stosując pożywkę agarową z wyciągiem mózgowo-sercowym. Po zliczeniu kolonii wynik podał jako jednostki tworzące kolonie na powierzchnię krążka. Celem zobrazowania uzyskanych wyników próbki materiałów barwił fioletem krystalicznym. Otrzymane wyniki poddał analizie statystycznej za pomocą odpowiednich testów.

Kolejny rozdział stanowią wyniki. Analiza zmian pH ultraczystej wody wykazała jej alkalizowanie przez materiały krzemowo-wapniowe oraz Cention N, przy czym najwyższa średnia wartość pH po 4 tygodniach została odnotowana w probówce zawierającej Biodentine. Po 4 tygodniach badania średnia wartość pH dla wszystkich badanych materiałów glass-jonomerowych wahała się od 6 do 7. Natomiast w przypadku SBF najwyższą średnią wartość pH zarejestrowano dla materiału Biodentine i była ona istotnie wyższa od wartości pH dla wszystkich pozostałych materiałów. Biodentine jako jedyny materiał gwarantował ciągły wzrost pH roztworu SBF przez całe badanie. Analizując zmiany pH wywołane

przez materiały niezależnie od medium, w którym były Biodentine alkalizował środowisko w 1 i 2. tygodniu osiągając wartości pH istotnie wyższe w porównaniu z innymi materiałami z wyjątkiem materiału TheraCal LC. Natomiast po 3. oraz 4. tygodniu badania Biodentine osiągnął istotnie statystycznie wyższe wartości w porównaniu ze wszystkimi pozostałymi materiałami. Jedynym materiałem uwalniającym jony wapnia do ultraczystej wody przez cały czas trwania badania był Biodentine, choć TheraCal LC uwalniał również wapń, jednak zarejestrowano nieregularne pomiary. Pod koniec badania stężenie dla Biodentine było istotnie wyższe niż dla TheraCal. Ocena uwalniania jonów wapnia SBF wykazała, że również Biodentine uwalniał najwięcej jonów wapniowych.

Analizując aktywność przeciwbakteryjną z użyciem referencyjnego szczepu *S. mutans* najwyższy średni pomiar strefy zahamowania wzrostu zarejestrowano w przypadku Activa Liner oraz erytromycyny. 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. Nie zarejestrowano strefy zahamowania wzrostu wokół materiałów TheraCal LC, Activa Restorative oraz Activa Liner. W przypadku mikrobioty pacjenta 2. największą strefę inhibicji zmierzono wokół krążka gentamycyny, a średnia wartość była istotnie wyższa od wszystkich pozostałych pomiarów. Oceniając Cention N nie stwierdzono strefy inhibicji. Natomiast w badaniu przeprowadzonym na referencyjnym szczepie *S. mutans* materiał Activa Liner porastało najmniej bakterii 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 i wartość ta różniła się istotnie od wszystkich pozostałych. Biofilm pod względem największej liczby bakterii porastał próbkę Activa Line.

Analizując wyniki badania wykonane przy użyciu mikrobioty pacjenta 2. najmniej bakterii stwierdzono na krążkach materiałów TheraCal LC oraz Biodentine.

Dokładny opis wyników wzbogaca 7 przejrzystych tabel i 14 estetycznych rycin.

Kolejny rozdział to dyskusja, która została przeprowadzona prawidłowo i obejmuje wszystkie aspekty badań. Szerokie omówienie wyników własnych i ich konfrontacja z danymi z piśmiennictwa pozwala wysoko ocenić dojrzałość naukową lekarza dentysty Piotra Tkaczyńskiego.

Na podstawie wykonanych badań Doktorant sformułował siedem 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.

Wnioski te są zgodne z celem pracy.

Piśmiennictwo starannie dobrane, liczy 196 pozycji, głównie anglojęzycznych.

Na zakończenie mam kilka drobnych uwag redakcyjnych, które jednak nie umniejszają jakości pracy i które pozwalam sobie zamieścić, by w przyszłości Doktorant miał je na uwadze podczas tworzenia prac.

1. Nie należy używać kropek po tytułach np. po tytule rozprawy, tytule tabeli,
2. W tabeli 1 napisano, że Biodentine zawiera trójkrzemian wapniowy – oczywiście zawiera krzemian trójwapniowy (czeski błąd),
3. Fizjologiczny roztwór soli zamiast roztwór soli fizjologicznej,
4. Niekiedy brakowało mi cytowania w tekście,
5. Josette Camilleri to kobieta, więc wykazała, a nie wykazał.

Podsumowując stwierdzam, że mimo kilku mało istotnych redakcyjnych uchybień praca została dość starannie przygotowana. Zauważalna jest też

szeroka wiedza, pracowitość i dojrzałość naukowa Doktoranta mające swoje odbicie w treści pracy.

Rozprawa doktorska lekarza dentysty Piotra Tkaczyńskiego pt.: „Analiza porównawcza aktywności biologicznej i wybranych właściwości bioaktywnych materiałów odtwórczych. Badania in vitro” spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w świetle obowiązującej obecnie Ustawy o Stopniach i Tytułach RP. Jest pracą oryginalną i samodzielną, zaplanowaną w przemyślany sposób i dobrze wykonaną. Pragnę zatem zwrócić się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. dent. Piotra Tkaczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie w związku z dużymi wartościami poznawczymi i klinicznymi wyników rozprawy wnoszę o wyróżnienie rozprawy cum laude.

prof. dr hab. Mariusz Lipski



specjalista stomatologii zachowawczej

Szczecin, dnia 9 czerwca 2024 r.