



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
dr hab. Anna M. Grudniak



Warszawa, 16.05.2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Ilony Rowińskiej

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

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Pawła Kowalczyka prof. Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego, PAN. Promotorem pomocniczym rozprawy jest dr n. med. lek. wet. Robert Paślawski, UMK w Toruniu.

Jama ustna jest skolonizowana przez ponad 700 gatunków bakterii. Występują one pod postacią pojedynczych komórek lub tworzą złożone wielogatunkowe biofilmy. Tworzenie biofilmu, jego nieprawidłowy rozrost w połączeniu z zaburzonym funkcjonowaniem mechanizmów obronnych naszego organizmu oraz zaburzeń w składzie ilościowym i jakościowym mikrobioty jamy ustnej może prowadzić do wielu schorzeń w tym: rozwoju próchnicy, zapalenia dziąseł czy parodontozy jak również wielu chorób ogólnoustrojowych. Oddziaływania mikroorganizmów w tej zorganizowanej społeczności odbywają się na różnych poziomach. Skład mikroflory obecnej w jamie ustnej zależy również od diety, a w szczególności od spożywania żywności wysoko przetworzonej. Praca doktorska mgr Ilony Rowińskiej dotyczy wpływu diety na potencjalne procesy chorobowe przebiegające w jamie ustnej. W pracy zbadano wpływ różnych diet na indukcje stanów zapalnych tkanek miękkich, stres oksydacyjny oraz obecność płytki bakteryjnej. Ochotnicy biorący udział w badaniu poddani zostali dietom (W) bogatej w warzywa, (T) bogatej w tłuszcze omega-3, (B) bogatej w białka oraz (F) diecie mieszanej. Dodatkowym ciekawym zagadnieniem było zbadanie wpływu zwierząt domowych i hodowlanych na mikrobiom jamy ustnej ludzi opiekujących się nimi.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Ilony Rowińskiej stanowi spójny jednotematyczny cykl publikacji na który składają się trzy wieloautorskie prace. Wszystkie prace opublikowane zostały w roku 2021. Dwie z nich to artykuły oryginalne, pierwszy opublikowano w „*Materials*” współczynnik oddziaływania (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi IF -3,623 oraz Pkt_{MNISW} –140 drugi artykuł oryginalny opublikowano w „*ECronicon Veterinary Science*” Pkt_{MNISW} 5.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Trzecia praca to obszerny artykuł przeglądowy opublikowany w „*Materials*” (IF -3,623, Pkt_{MNISW} – 140), stanowi on spójną całość z pracami oryginalnymi i jest elementem wprowadzającym do analizowanych zagadnień. Łączny IF publikacji -7,246 oraz Pkt_{MNISW} –345. We wszystkich pracach zgodnie z informacją zamieszczoną w rozprawie, mgr Ilona Rowińska jest pierwszą autorką a jej wkład w powstanie prac jest znaczący i zawiera się w przedziale 51-60%. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma klasyczny, typowy dla rozpraw z dziedziny biologii i medycyny układ, nie zawiera jednak wspomnianych publikacji, oraz wymaganych oświadczeń współautorów, ocenę rozprawy dokonuje więc na podstawie dostarczonej przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne, UMK w Toruniu, rozprawy.

Rozprawa zawiera wszystkie wymagane elementy, tj. streszczenie, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz spis literatury. Cel pracy został sformułowany precyzyjnie. Wstęp pracy jest bardzo obszerny i porusza wszystkie kluczowe zagadnienia analizowane w pracy. Pani mgr Ilona Rowińska bardzo dokładnie scharakteryzowała środowisko jamy ustnej, analizując wszystkie jej funkcje kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania błon śluzowych. Znaczna część wstępu poświęcona została charakterystyce mikroflory bakteryjnej jamy ustnej oraz potencjalnym czynnikom, które wpływają na jej funkcjonowanie i kolonizację przez bakterie patogenne. Głównym elementem wstępu jest charakterystyka płytki bakteryjnej i kamienia nazębnego. Mgr Ilona Rowińska bardzo dokładnie scharakteryzowała wszystkie obecne w jamie ustnej kompleksy, których podział dokonany został pierwotnie przez Socransky’ego, zwracając szczególną uwagę na ich udział w indukcji procesów chorobowych. Kolejna część wstępu poświęcona została stresowi oksydacyjnemu i jego wpływowi na stany zapalne jamy ustnej a w szczególności na schorzenia tkanek przyzębia. Najobszerniejsza część tej części pracy poświęcona została charakterystyce spożywanego pożywienia oraz stosowanym dietom ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w powstawaniu struktur biofilmowych.

Ocena merytoryczna wyników rozprawy

W ramach przeprowadzonych badań mgr Ilona Rowińska skupiła się na realizacji czterech głównych zadań badawczych. Pierwszym z nich było oszacowanie wpływu różnych typów diet na indukcję stanów zapalnych tkanek miękkich w jamie ustnej w obecności zalegającej płytki bakteryjnej oraz przy braku zalegającej płytki bakteryjnej nad i poddziąsłowej. Drugi cel obejmował dodatkową analizę powyższych parametrów z uwzględnieniem faktu posiadania lub nie zwierząt domowych lub gospodarskich. Analiza objęła właścicieli psów oraz osoby opiekujące się zwierzętami hodowlanymi (świniami). Kluczowym celem pracy była analiza wpływu stosowanych diet na mikrobiom jamy ustnej oraz porównanie jego składu pomiędzy ludźmi a zwierzętami biorącymi udział w badaniu. W badaniu wzięła udział grupa 60 ochotników oraz 40 zwierząt (20 psów oraz 20 świń). Osoby poddane badaniu podzielono na trzy grupy po 20 osób. Pierwszą grupę stanowiły osoby nie posiadające zwierząt, drugą osoby posiadające psy. W ramach tych grup wydzielono dodatkowe 5-osobowe podgrupy

które stosowały różne diety: warzywną, tłuszczową (bogatą w tłuszcze omega 3), białkową oraz mieszaną. Trzecią grupę osób biorących udział w badaniu stanowiły osoby hodujące zwierzęta gospodarskie, w tej grupie nie stosowano żadnych diet. Materiał biologiczny do badań pobierano w następującym schemacie 3 dni diety - pobranie materiału do badań – zabieg czyszczenia zębów z usunięciem kamienia nazębnego nad i poddziąsłowego - kolejne 3 dni diety - powtórne pobranie materiału biologicznego do badań. W celu określenia obecności i lokalizacji płytki bakteryjnej i kamienia nazębnego w jamie ustnej wykorzystano standardowe techniki stomatologiczne w tym: wskaźnik Fuksynowy, wskaźnik API (Aproximal Plaque Index), wskaźnik P.I (Plaque Indeks), wskaźnik OHI (Oral Hygiene Index), wskaźnik PBI (Papilla Bleeding Index) oraz CPITN (Community Periodontal Index for Treatment Needs). Analizy biofilmu powstałego na powierzchniach zębowych przeprowadzono metodami klasycznymi i biomedycznymi, które obejmowały hodowlę bakterii oraz analizy sekwencyjne. Wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały opracowane statystycznie z wykorzystaniem oprogramowania Statistica (wersja 12).

Temat badań podjęty przez Doktorantkę jest aktualny i ważny. Coraz większa ilość przetworzonej i łatwo dostępnej żywności ma bowiem zgubny wpływ na funkcjonowanie całego organizmu w tym przede wszystkim mikrobiomu jamy ustnej i jelit. Do badań została włączona duża grupa 60 ochotników, 40 osób w trakcie badania stosowało jedną z czterech wspomnianych diet. Z przeprowadzonych badań, na podstawie analiz wszystkich wskaźników stomatologicznych w postaci współczynnika fuksynowego, PII, OHI oraz API wykazano, że osoby uczestniczące w badaniu stosowały higienę jamy ustnej na poziomie dostatecznym. U wszystkich badanych odnotowano obecność płytki nazębnej miękkiej oraz twardej. Obecność zalegającej na zębach płytki bakteryjnej nad- i poddziąsłowej jest czynnikiem indukującym powstanie stanu zapalnego i może mieć wpływ na powstawanie struktury biofilmowej. Analiza biofilmu powstałego na powierzchni zębów przeprowadzona została dwukrotnie. Pierwsze próby pobierano po trzech dniach diety następne, po oczyszczeniu zębów i kolejnych trzech dniach diety. Biofilm do analiz pobierano z zębów oraz ze szczeliny dziąsłowej. Interesującą obserwacją jest fakt, iż nie zaobserwowano istotnych różnic w składzie gatunkowym biofilmu mimo, iż próby do badań pobierane były w warunkach istniejącej płytki nazębnej oraz po jej oczyszczeniu. Co mogło mieć wpływ na taki wynik? Próby pobrane do analiz po oczyszczeniu zębów i trzydniowej diecie nie są zapewne dojrzałą strukturą biofilmową. Płytko nazębna potrzebuje bowiem kilku tygodni, żeby dojrzała, czyli ustaliła się w niej równowaga gatunkowa. Bardzo istotnym wnioskiem jest analiza dotycząca stosowanych diet. Wynika z niej iż najkorzystniejszy wpływ na stan przyzębia ma dieta warzywna. Jej stosowanie wpływało korzystnie na stan przyzębia i ograniczenie stanu zapalnego dziąseł, nawet przy obecnej płytce nazębnej. Pozostałe ze stosowanych diet dawały różne efekty i miały na nie wpływ stan uzębienia pacjenta. Ciekawą obserwacją wynikającą z badań jest fakt iż posiadanie psa wpływa na stan jamy ustnej bez względu na stosowaną dietę. W tym miejscu pozwolę sobie zadać Doktorantce pytanie o

prawdopodobny mechanizm tego procesu? Różnice pomiędzy osobami posiadającymi psy i ich nieposiadającymi były największe u osób spożywających dietę mieszaną, tłuszczową i białkową a najmniejsze u osób stosujących dietę warzywną. Dieta warzywna lub kończenie posiłku spożyciem warzywa odpowiada za znaczną poprawę stanu jamy ustnej, u większości osób biorących udział w badaniu, wskaźniki stomatologiczne u osób ją stosujących uległy znacznej poprawie wskazując na „przyzębie klinicznie zdrowe”. Stosowanie diety tłuszczowej i białkowej nie dawało pożądanych efektów polepszenia stanu klinicznego jamy ustnej, przy ich stosowaniu odnotowywano umiarkowane zapalenie dziąseł. Przy stosowaniu diety mieszanej odnotowywano łagodne stany zapalne wymagające poprawy higieny jamy ustnej. Wśród wniosków z przeprowadzonych analiz bardzo istotna jest obserwacja dotycząca wpływu diety na stopień stresu oksydacyjnego w jamie ustnej. Najsilniejszy stres oksydacyjny zaobserwowano w przy stosowaniu diety mieszanej, dieta białkowa i tłuszczowa powodują nieco mniejszy poziom stresu oksydacyjnego a tym samym zmniejszenie stanu zapalnego w obrębie jamy ustnej. Dieta warzywna ponownie dawała najlepsze efekty obniżając stres oksydacyjny oraz wpływając korzystnie na stan zdrowia tkanek miękkich nawet przy zalegającej płytce nazębnej, wpływała ona na zmniejszenie stanu zapalnego. Analizy sekwencyjne materiału biofilmowego pobranego z jamy ustnej ludzi i zwierząt, zaskakująco wykazały brak znaczących różnic w składzie bakteryjnym. W analizowanym materiale biologicznym pobranym od świń i psów zidentyfikowano istnienie 6 podstawowych kompleksów bakteryjnych w kolejności od najliczniej reprezentowanego: pomarańczowy, czerwony, żółty, zielony, niebieski i fioletowy. Zaobserwowane różnice były głównie jakościowe, u psów dominowały kompleksy pomarańczowy i żółty u świń natomiast czerwony i fioletowy. Doktorantka zarówno w dziele materiały i metody jak również w pracy sugerowała, że do analiz sekwencjonowania biofilmów wykorzystywano tylko wyrosłe kolonie. Do ich izolacji zastosowano dwa podłoża BBE (*Bacteroides bile esculin*) oraz Columbia agar. Podłoża te nie umożliwiają wyhodowania wszystkich organizmów obecnych w biofilmie a jedynie te, które są zdolne do wzrostu na danym podłożu. Istotne są również warunki hodowli, czy do izolacji zastosowano również warunki beztlenowe? W przeciwnym razie analizy biofilmowe ograniczone zostały do mikroorganizmów tlenowych. Wydaje się, że izolacja metagenomu pobranego bezpośrednio z płytki i biofilmu i jego analiza sekwencyjna umożliwiłaby identyfikację większej ilości bakterii a tym samym lepszą analizę i porównanie powstałej struktury biofilmowej. Z przeprowadzonych analiz Doktorantka wysunęła wniosek sugerujący wpływ zwierząt domowych (psy) oraz gospodarkich (świnie) na mikroflorę jamy ustnej ludzi. Szczególnie istotny jest zaobserwowany fakt, iż wpływ ten może mieć potencjalnie patogenny charakter, gdyż u osób opiekujących się zwierzętami zaczynają dominować kompleksy: żółty, pomarańczowy i czerwony co może przyczyniać się do powstawania chorób zapalnych przyzębia i indukować dodatkowy stres oksydacyjnym w obrębie jamy ustnej ludzi opiekujących się zwierzętami.

Wykorzystując przywilej recenzenta pozwolę sobie na kilka dodatkowych komentarzy/uwag, jakie pojawiły się po przeczytaniu tej rozprawy:

- W metodach opisano sposób pobrania materiału biofilmowego i jego wysiewu na specyficzne podłoża jako metodę posiewu redukcyjnego. Posiew redukcyjny to metoda izolacji czystych kultur bakteryjnych, przy pobraniu materiału biofilmowego mamy do czynienia ze społecznością wielogatunkową więc do wysiewu takiego materiału dedykowane są inne metody.
- Mam do Doktorantki pytanie dotyczące oceny stanu uzębienia osób włączonych do badania. Czy była dokonywana analiza wstępna przed rozpoczęciem stosowania diety oceniająca stan płytki nazębnej, stanów zapalnych dziąseł czy ubytków uzębienia. Dane te mogły mieć istotny wpływ na analizy biofilmów przeprowadzone w pracy.
- Na stronie 69 (Ryc 14) Doktorantka umieściła schemat sugerujący, iż do analiz Sangera izolowała ona plazmidy i na ich podstawie klasyfikowała bakterie do gatunku, czy nie jest to przeoczenie analizy sekwencyjne obejmują zazwyczaj amplifikacje genu 16S rRNA (np. jego regionów V₆ i V₇) ale jego matrycą jest genomowe DNA, może chodziło tu o stworzenie bibliotek w odpowiednich wektorach?

Po przeczytaniu przesłanej rozprawy oraz przesłanych e-mailowo artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego mgr I. Rowińskiej mogę stwierdzić, że wyniki przedstawione w tych pracach w pełni realizują założenia rozprawy. Doktorantka przedstawiła liczne oryginalne i wartościowe dane dokumentujące różnicowanie strukturalne i funkcjonalne do którego dochodzi w jamie ustnej przy stosowaniu konkretnej diety. Za każdym razem uzyskane wyniki były obiektywnie dyskutowane. Po lekturze tych pracy jestem w pełni przekonana, że Doktorantka jest dojrzałym badaczem, zdolnym nie tylko do przeprowadzania eksperymentów ale także do prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników, jak również ich prezentacji w świetle aktualnego stanu wiedzy.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi w pełni oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę mgr Ilony Rowińskiej oraz Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Wartość naukowa rozprawy doktorskiej Pani mgr Ilony Rowińskiej przyczyniła się do znacznego wzbogacenia wiedzy na temat mikrobiomu jamy ustnej w zależności od zastosowanej diety. Recenzowana rozprawa pt. „Wpływ diety na choroby i zmiany w obrębie tkanek przyzębia indukowane przez mikrobiom bakteryjny w stanach zapalnych jamy ustnej ludzi i zwierząt”, wykonana pod kierunkiem promotora dr hab. Pawła Kowalczyka prof. Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego PAN, oraz promotora pomocniczego dr n. med. lek. wet. Roberta Paślawskiego **spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim**, zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu o **przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Ilony Rowińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

A handwritten signature in blue ink, reading "Anna M. Grudniak". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping tail on the final letter.

Dr hab. Anna M. Grudniak