

Recenzja rozprawy doktorskiej

Wydział Medyczny i Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Kaliski im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego

Imię i nazwisko kandydata: Adrianna Gliszczyńska

Tytuł rozprawy doktorskiej: Ocena właściwości ochronnych eksperymentalnej pasty przeciw nadwrażliwości w modelu demineralizacji szkliwa i zębiny in vitro.

Promotor: dr hab. inż. Tomasz Buchwałd, Promotor pomocniczy: dr n. med. Agata Daktera-Micker

Recenzent: prof. dr hab. n. med. Izabela Maciejewska

Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi 117 stronicową monografią o klasycznym układzie rozdziałów i podrozdziałów. Składa się ze wstępu, w którym Kandydatka pokrótce opisała budowę histologiczną zęba (1 strona) w powiązaniu z nadwrażliwością zębiny (1 strona), rolę śliny w ochronie zębów (1/2 strony), próchnicę (1/2 strony), zaburzenia odżywiania (2 strony), zintegrowane mechanizmy działania zawartych w pastach do zębów L-argininy, węgla wapnia i azotanu potasu na nadwrażliwość zębiny (8 stron), zastosowanie metod mikroskopowych i spektroskopowych w badaniu materiałów biologicznych i biomedycznych (4 strony).

Kolejno następują: cel pracy, hipoteza badawcza oraz materiał i metody. Następne rozdziały określono jako: przebieg badań i wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis rycin, spis tabel i piśmiennictwo. Praca zawiera 67 rycin i 6 tabeli wkomponowanych bezpośrednio w tekst. Bibliografia składa się z 85 pozycji piśmiennictwa z czego jedynie 18 opublikowano w ciągu ostatnich 5 lat. 19 pozycji ma do 10 lat, 28 do 15 lat, a 20 pozycji opublikowano więcej niż 20 lat temu, niektóre nawet w latach 60 tych (poz. 11, 28) i 80 ubiegłego wieku. 6 pozycji piśmiennictwa z zakresu stomatologii stanowią podręczniki na poziomie edukacji przed-dyplomowej, poz. 26 pochodzi z artykułu popularno-naukowego Reader's Digest, natomiast 7 pozycji stanowią auto-cytację promotora/ów rozprawy.

Pomimo klasycznego układu rozprawy jest ona niezwykle trudna do analizy. Autorka z niezrozumiałych powodów umieściła w tekście 36 rycin przedstawiających, w postaci prostych wykresów słupkowych, dane średnich wartości składu pierwiastkowego szkliwa i zębiny w poszczególnych badanych grupach, w kolejnych fazach eksperymentu. Wykresy te rozciągnięte są na pół strony formatu A4, co utrudnia analizę porównawczą pozyskanych wyników. Zamiast 36 należało zastosować 2 lub 4 wykresy umożliwiające analizę porównawczą pozyskanych wyników. Ta sama uwaga dotyczy obrazów pozyskanych z mikroskopu elektronowego, a prezentujących powierzchnię

szkliwa i zębiny zębów na kolejnych etapach eksperymentu. Obrazy należało przedstawić w sposób panelowy. Należy również podkreślić, że „przebieg badań” stanowi część dzieła materiału i metody i nie powinna być łączona z wynikami. Autorka pomimo deklaracji podziału pracy na poszczególne rozdziały w opisie miesza informacje rozdziałów wstępu, M&M, wyniki, dyskusji.

Wartość naukowa rozprawy

Kandydatka podjęła próbę zbadania fizykochemicznego oddziaływania eksperymentalnej pasty do zębów na otwarte kanaliki zębinowe z założeniem, iż pasta będzie fizycznie blokować drożność kanałków zębinowych, co w domyśle powinno przekładać się na redukcję objawów nadwrażliwości zębiny. Kandydatka postawiła 3 cele badawcze w stosunku do badanej pasty eksperymentalnej:

- 1) ograniczenie demineralizacji szkliwa i zębiny,
- 2) zamykanie kanałków zębinowych
- 3) ocenę ich reakcji (w domyśle szkliwa i zębiny) na roztwór demineralizujący.

Hipoteza badawcza zakładała, że eksperymentalna pasta hamuje demineralizację szkliwa skuteczniej niż produkty porównawcze oraz, że pasta z 8% L-argininą, węglanem wapnia i azotanem potasu skuteczniej zamyka kanaliki zębinowe i jest bardziej odporna na działanie roztworu demineralizującego niż referencyjne produkty jakkolwiek w badaniu użyto jedynie pojedynczej pasty porównawczej – „sensodyne szybka ulga”, w dodatku o odmiennym składzie substancji aktywnych (octan strontu i fluorek sodowy). Należy podkreślić, iż skład zastosowanej pasty eksperymentalnej został zaczerpnięty z piśmiennictwa (poz. 42) wobec czego nie można zaliczyć jej do tzw. wartości nowatorsko-odkrywczych. Natomiast postawione cele 1 i 3 wydają się być tożsame.

Wyniki pozyskane w trakcie badań i opisane przez Kandydatkę wskazały, że wytrawianie powierzchni zębiny 37% kwasem fosforowym prowadzi do utraty minerału objawiającego się w postaci statystycznie istotnego obniżenia zawartości wapnia i potasu w badanej strukturze (ewaluacja EDS) jak i zaburzeniu struktury krystalicznej szkliwa i zębiny mierzonej metodą mikrospektroskopii Ramana, a polegającą na określeniu współczynnika depolaryzacji. Analiza statystyczna wykonana testem post-hoc Tukey'a wykazała istotność statystyczną pomiędzy wszystkimi porównywanymi grupami. Podobne istotne różnice uzyskano na kolejnych etapach eksperymentu tj. po aplikowaniu pasty eksperymentalnej oraz referencyjnej na powierzchnię zęba (faza 3), a następnie po ponownej demineralizacji badanych powierzchni (faza 4). Z prowadzonych obserwacji wynikało, że zarówno pasta eksperymentalna jak i referencyjna mają zdolność adhezji do powierzchni zębiny, powodując częściową lub całkowitą obliterację kanałków zębinowych jak również uodparniając zębinę na ponowną demineralizację. Wyniki badań zakończono wnioskami, które niejednoznacznie odpowiadają na postawione cele, oraz zawierają spekulacje przynależne raczej elementom dyskusji. Myśl przewodnia sprowadza się do stwierdzenia, że pasta eksperymentalna w sposób mechaniczny zamyka kanaliki zębinowe i podnosi

odporność tkanek zęba na demineralizację, jednak wynik jest gorszy aniżeli pasty referencyjnej (sensodyne).

Wartość naukową rozprawy niewątpliwie stanowiłaby szczegółowa detekcja i określenie składów pierwiastkowych szkliwa i zębiny zębów na kolejnych etapach badań tj. wartości wyjściowe TO oraz kolejnych faz do T4 (po kolejnych modyfikacjach) badanych metodą EDS, a także określenie uporządkowania struktury szkliwa i zębiny w ww. fazach mierzonych metodą mikrospektroskopii Ramana. Z obowiązku recenzenta muszę podkreślić, że przesłana mi do recenzji rozprawa doktorska zawiera **szereg nieprawidłowości i błędów w planowaniu i wykonaniu eksperymentu w zakresie stomatologicznym. Nieprawidłowe zaplanowanie pracy nie pozwala na powtórzenie eksperymentu, a tym samym nie daje możliwości uwiarygodnienia pozyskanych wyników.**

Uwagi krytyczne:

1) wstęp

Już na pierwszej stronie wstępu Autorka podaje informację, iż jakoby *...zębina przewodzi bodźce*... . Jest to niemożliwe, gdyż zębina jest strukturą bezkomórkową i jako taka nie może niczego przewodzić. Owszem, w kanałkach zębinowych znajdują się wypustki odontoblastów tzw. włókna Tomesa, które najogólniej opisując reagują na zmiany ciśnienia płynu kanalikowego przewodząc impulsy do odontoblasta, ale jako takie są to komórki rezydujące w miazdze zęba. Również, zakończenia włókien mielinowych penetrują do kanalików zębinowych, ale są integralną częścią splotów nerwowych w miazdze. Kolejnym niezrozumiałym terminem jest *...substancje międzypryzmatyczne*... (ta sama strona). Substancja międzypryzmatyczna (szkliwa) to pozostałość po organicznym szkielecie biorącym udział w formowaniu szkliwa, którego częścią składową są amelogeniny, enamelina i białka tworzące grupę tzw. non-amelogenin. Z kolei, w opisie zębiny Autorka wymienia obok kolagenu również białka, co daje wrażenie jakoby kolagen nie był białkiem. Należy wyjaśnić, że kolagen to też białko. W kanałkach zębinowych znajduje się płyn kanalikowy, a nie woda. Woda jest nośnikiem wszystkich substancji składowych płynu kanalikowego. Na stronach 7 i 8 znajdują się ryciny pochodzące z publikacji. To samo dotyczy tabeli nr 1 str.19. Czy Autorka uzyskała zgodę na ich wykorzystanie w monografii? (tzw. re-printing), w tekście brakuje takiej informacji.

Kolejną wątpliwość budzi sformułowanie o usuwaniu przez ślinę *...kwasów wewnętrznych i zewnętrznych*... . Co to są kwasy wewnętrzne?

Str. 8 ostatnie zdanie nosi znamiona błędu kardynalnego: *...ponieważ szkliwo zawiera MNIEJ ROZPUSZCZALNEGO MINERALU niż zębina, eroduje wolniej*". To zdanie jest zaprzeczeniem wiedzy dotyczącej budowy histologicznej zęba. Dodatkowo, w pozycji 22 piśmiennictwa, na które powołuje się Autorka nie ma wzmianki o składzie szkliwa, gdyż pozycja ta opisuje fizjologię miazgi zęba.

Kolejno, Autorka opisuje zaburzenia odżywiania anoreksję i bulimię. Pomimo, iż obie jednostki chorobowe docelowo mogą prowadzić do problemów w postaci nadwrażliwości zębiny, niezrozumiałym jest w jakim celu i dlaczego jedynie te zaburzenia zostały ujęte w monografii?

Str. 14 Drugi akapit zakończony jest stwierdzeniem ...*"hydroksyapatytu lub podobnych faz wapniowo-fosforanowych"*... . Uprzejmie proszę o wyjaśnienie co to są fazy wapniowo-fosforanowe?

Ponadto, w wielu miejscach wstępu Autorka powołuje się na wyniki randomizowanych badań klinicznych, ale nie cytuje piśmiennictwa, z którego ta wiedza pochodzi np. str. 11, 20.

2) Materiał i Metody

Autorka podaje, że do eksperymentu użyła 20 zębów przedtrzonowych usuniętych ze wskazań ortodontycznych. Jednak na rycinie 5 str. 26 pokazano jedynie 4 zęby górne pierwsze przedtrzonowe z niezakończonym rozwojem wierzchołka korzenia. Czy zatem należy uznać, że w doświadczeniu użyto jedynie zębów czwartych górnych? Jaki był wiek pacjentów, od których pochodzą zęby? **Jednocześnie należy dopytać czy i gdzie Kandydatka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej na wykorzystanie materiału, ludzkiego do badań? Czy uzyskano zgodę pacjentów oraz/lub ich opiekunów prawnych do użycia tkanek do badań eksperymentalnych?**

Na czym polegała wstępna selekcja zębów z użyciem metody „wizualno-dotykowej”?

W jaki sposób planowano poziom cięcia zęba i w jakiej osi, a także na jakiej wysokości były one przecinane? W ocenie recenzenta cięcie zęba z użyciem tarczy diamentowej w niestabilnej sytuacji pozycjonowania (użycie igłotrzymacza) nie pozwala na standaryzowanie uzyskanych do oceny powierzchni. Należało zaplanować wykonanie tzw. seryjnych skrawków zanurzonych w żywicy, co poprzez zwiększenie ilości preparatów w każdej próbie pozwoliłoby wiarygodnie ustandaryzować pozyskane obrazy, a tym samym uśrednić wyniki. **Metoda przyjęta przez Kandydatkę w żaden sposób nie zapewnia powtarzalności porównywanych obrazów, gdyż zęby były cięte w sposób przypadkowy, jednorazowo w osi poziomej lub do niej zbliżonej, na różnych wysokościach, a co za tym idzie obserwowane powierzchnie różniły się ilością i wielkością otwartych kanalików zębinowych (rycina 8-11 oraz np. 43d vs 45d lub 30d vs.31d).** Dodatkowo, przy małej (nielicznej) próbie szerokość wyjściowa kanalików zębinowych różniła się w zależności od etapu rozwoju zęba (wiek pacjenta patrz pytanie powyżej) może znacząco zmieniać pozyskane wyniki.

Kolejne wątpliwości nasuwa fakt, iż nie podano w jaki sposób oznaczano badane powierzchnie, aby móc dokonać ponownej analizy po zastosowaniu kolejnych etapów eksperymentu.

Autorka stwierdza, iż w mikroskopie elektronowym dokonywano obserwacji i pomiarów w różnych powiększeniach, ale nie określa precyzyjnie ile pomiarów na jedno/jakie (?) powiększenie.

3) Przebieg badań i wyniki

W tej części dysertacji Kandydatka opisuje pierwotną ocenę powierzchni przeciętych zębów, stwierdzając brak mechaniczno-chemicznych uszkodzeń szkliwa i zębiny oraz potwierdzając, że

„kanaliki zębinowe pozostawały zamknięte”. Jest to kolejne stwierdzenie noszące znamiona błędu kardynalnego. Kanaliki zębinowe po preparacji zęba zawsze są OTWARTE. Jest to fakt wymuszający stosowne postępowanie lecznicze po opracowaniu zarówno ubytków próchnicowych jak i oszlifowaniu zęba pod uzupełnienie protetyczne. Jedyną składową wymagającą usunięcia przed zabezpieczeniem otwartych kanalików jest usunięcie tzw. warstwy mazistej. W przypadku postępowania protetycznego stosuje się metodę IDS (immediate dentin sealing), właśnie w celu zamknięcia kanalików zębinowych i zabezpieczenia miazgi przed mikroprzeciekami. Nie jest zatem możliwe, aby po przecięciu zęba kanaliki zębinowe pozostawały zamknięte szczególnie w młodych zębach z niezakończonym rozwojem.

Kolejno Autorka podaje, że celem otwarcia kanalików zębinowych zanurzano zębinę w 37,5% roztworze kwasu fosforowego przez 30 sekund. Jest to postępowanie poprawne (stosowane klinicznie) jedynie w stosunku do szkliwa. Czas ekspozycji 37% kwasu fosforowego na zębinę nie powinien przekraczać 10 sekund. W innym przypadku prowadzi to do działań jatrogennych. Autorka podaje, że zęby z uszkodzeniami szkliwa potraktowano jako oddzielną grupę badawczą (w domyśle gr I), jednak na str. 33 pisze o kolejnej grupie, w której po wytrawieniu stwierdzono demineralizację szkliwa i potraktowano ją jako oddzielną grupę badawczą. Czy dotyczy to tej samej grupy? Niezrozumiałym jest również fakt, iż po stwierdzeniu obecności wytrawiacza na powierzchni wypłukanych zębów zamiast wydłużyć proces płukania (pozbywania się wytrawiacza) autorka ponowiła wytrawienie tych zębów. W ocenie recenzenta takie postępowanie zaburza założenia i warunki eksperymentu, gdyż wskazuje, iż niektóre zęby były podwójnie trawione.

Powiększenia obrazów 14b i 15b różnią się od 12b i 13b, co nie pozwala na analizę porównawczą.

4) Wyniki

Analiza porównawcza wyników pozyskanych z rycin 16-24; 33-40; 46-51; 58-65 nasuwa szereg wątpliwości dotyczących zawartości wapnia i fosforu w poszczególnych próbach, które nie zostały wyjaśnione w pracy:

Szkliwo:

- z jakiego powodu (jak to możliwe) ilość wapnia w grupach I-IV wzrosła po wytrawieniu (gr I i II znacząco)?

Jak to jest możliwe, że w grupie kontrolnej IV ilość wapnia T0 była znacząco niższa niż T4, czyli po wytrawieniu pierwotnym i ponownej demineralizacji?,

Dlaczego jedynie w grupie kontrolnej ilość fosforu zmalała po wytrawieniu pierwotnym, a we wszystkich pozostałych grupach wzrosła? Wydaje się, że wynik dotyczący szkliwa z grupy kontrolnej IV w ostatniej fazie był lepszy aniżeli w pozostałych grupach pomimo stosowania past zabezpieczających.

Wyjaśnienia wymagają również wyniki z tabeli 3 i 4. Dlaczego średnia depolaryzacji powierzchni szkliwa w grupach II, III i IV różniła się znacząco od grupy I w drugiej fazie eksperymentu vs. odwróconym relacjom w 4 fazie eksperymentu?

Zębina:

Czym Kandydatka tłumaczy skrajnie różne wyniki uzyskane po wytrawieniu zębiny pomiędzy grupą kontrolną, a pozostałymi grupami?

Dlaczego ilość wapnia w kolejnych etapach (3 i 4) wzrastała w grupie I w stosunku do grup II i III, skoro we wszystkich stosowano pasty?

Skąd brak różnic w zębinie w grupie I na etapie 2 i 3 eksperymentu i dlaczego wyniki grupy I są prawie identyczne z grupą kontrolną w 4 fazie eksperymentu?

Uwagi ogólne:

Obraz z ryc. 14 nie jest tym samym co ryc. 31 pomimo, że opisano je jako obraz grupy III na kolejnym etapie eksperymentu.

Str. 66 Kandydatka stwierdza, że *...”pasta eksperymentalna przenika do kanalików zębinowych”...* . Na jakiej podstawie wyciągnięto taki wniosek? Jaka była głębokość detekcji lub czy wykonywane były przekroje podłużne kanalików?

5) Dyskusja

Dyskusja dysertacji jest niezwykle skromna i ogranicza się do ponownego opisu uzyskanych wyników. Niestety, Kandydatka nie skupiła się na wynikach (patrz pytania powyżej) odbiegających od „spodziewanej” normy. Brakuje uwag krytycznych do wykonanego eksperymentu, wykazania ograniczeń metody, a tym samym tzw. konstruktywnej krytyki pozyskanych danych.

Ocena końcowa

Dogłębna analiza recenzowanej rozprawy doktorskiej wykazała szereg poważnych nieprawidłowości mogących prowadzić do pozyskania znacząco mylnych wyników, a tym samym wniosków. Dodatkowo, fakt niemożności wiernego powtórzenia opisanego eksperymentu, stanowi naruszenie zasad postępowania w pracy naukowej. Wobec powyższych zarzutów, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **lek. dent Adrianny Gliszczyńskiej nie spełnia warunków** określonych w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medycznej i Nauki o Zdrowiu Uniwersytetu Kaliskiego im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego o oddalenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, dn. 03.03.2026r..

817 86 00 prof. dr hab. n. med. *[Podpis]* *[Podpis]*
spec. prot. i endykologicznej
80-171 Gdansk, ul. Nobla 8 e