



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Klinika Stomatologii Zintegrowanej
Katedra Praktycznej Stomatologii Klinicznej
Kierownik: dr hab n med Elżbieta Paszyńska, prof. UMP

ul. Bukowska 70,
60-812 Poznań,

☎ 0-61 / 8547-7250,

e-mail: paszynska@ump.edu.pl



Poznań, 30.01.2023

OCENA

rozprawy doktorskiej lekarza dentysty Kamila Bijowskiego
pt. „Wpływ suplementacji cynkiem na stan oksydacyjno-redukcyjny tkanki
kostnej żuchwy szczurów narażonych na kadm”

Ocena ogólna

Praca doktorska w dziedzinie nauk medycznych lekarza dentysty Kamila Bijowskiego pt., „Wpływ suplementacji cynkiem na stan oksydacyjno-redukcyjny tkanki kostnej żuchwy szczurów narażonych na kadm” przygotowana pod opieką dr hab. n med. Ewy Dąbrowskiej (promotor) oraz dr n. med. Joanny Rogalskiej (promotor pomocniczy) podejmuje temat o rosnącym znaczeniu z punktu widzenia postępującego zanieczyszczenia środowiska egzystencji współczesnego człowieka, zwłaszcza w rejonach o tzw. wysokim stopniu zaawansowania cywilizacyjnego, w których wytwarzanie dóbr materialnych wymaga technologicznego wykorzystania rzadkich metali ciężkich, takich jak kadm (Cd). Powyższe gałęzie przemysłowe, związane z wykorzystaniem kadmu, autor wymienia już na pierwszej stronie wstępu, wskazując przemysł wydobywczy, elektryczny, a także rolnictwo, budownictwo. Dodatkowym, równie istotnym źródłem kadmu dla człowieka, jest nałogowe palenie tytoniu w mechanizmie wchłaniania dymu do układu oddechowego. Uwalnianie kadmu do powietrza następuje też w wyniku generowania dymów i pyłów poprzez anomalie klimatyczne, pożary lasów, erupcje wulkanów. Zatem ekspozycja na kadm w środowisku życia człowieka jest faktem, wynikającym z przenikalności i skażenia tym pierwiastkiem powietrza, gleb, wód, roślin spożywczych i zwierząt hodowlanych. Mimo usankcjonowanych

przez WHO w 1993 roku limitów bezpieczeństwa dotyczących zawartości Cd w środowisku, na podstawie najnowszych publikacji Satarug i wsp. (2017) oraz Wang i wsp. (2021), prognozy ekspozycji na ten metal wykazują trend wzrastający. Dlatego istotnym wydaje się monitorowanie w czasie terażniejszym stabilności stężenia tego pierwiastka oraz wskazania rejonów najbardziej niebezpiecznych.

Mechanizmy oddziaływania kadmu na organizm człowieka wynikają z bezpośredniej i pośredniej interakcji na poziomie komórkowym, tkankowym i narządowym, zwłaszcza dysfunkcji nerek, wątroby, kości, płuc, mózgu, jąder, układu krwiotwórczego i nerwowego. Według danych cytowanych w pracy wyniki badań innych autorów pokazują niezbicie, jak bardzo kadm odznacza się działaniem toksycznym na zdrowie człowieka, a najbardziej niepokojące wydają się skutki działania odległego genotoksycznego, onkogenego i teratogenego.

Tym bardziej podjęcie tematu szkodliwego oddziaływania kadmu na tkankę kostną zuchwy w modelu zwierzęcym szczurów badającym progresję stresu oksydacyjnego, stopnia uszkodzeń oksydacyjnych makrocząsteczek komórkowych białek, lipidów i kwasów nukleinowych, a jednocześnie możliwości ochrony przed tymi zmianami poprzez kontrolowaną podaż cynku, jest jak najbardziej uzasadnione.

Poniżej pozwolę sobie przedstawić szczegółowe uwagi do poszczególnych części pracy.

Uwagi szczegółowe

Układ pracy

Opracowanie jako praca doktorska ma tradycyjną formę monografii, o prawidłowym układzie i strukturze podziału treści – według wymogów przewidzianych dla tego typu publikacji. Na 108 stronach zamieszczono 13 rozdziałów według przyjętego schematu dla publikacji naukowych wraz z dokumentacją w postaci wykazu 5 tabel, 19 rycin i listą cytowanego piśmiennictwa zawierającego imponującą ilość 177 pozycji bibliograficznych. Tekst został wzbogacony o kolorowe zdjęcia i schematy, ułatwiające czytanie ze zrozumieniem, zwłaszcza w przypadku potencjalnych osób, które nie uzyskały edukacji z biotechnologii i toksykologii medycznej.

Wprowadzenie

Jako recenzent rozprawy doktorskiej z ciekawością przeczytałam wstęp, który wprowadza czytelnika w zagadnienie problemu, a jednocześnie w sposób klarowny podsumowuje

zagadnienia związane z tematem badawczym. Podrozdziały 2.1-2.4 wskazują na liczne niekorzystne skutki działania toksycznego i skutki zdrowotnego narażenia ustroju człowieka na działanie kadmu. Osobnym rozdziałem został objęty wpływ kadmu na układ kostny i zęby. Następne podrozdziały wstępu omawiają rolę cynku w organizmie człowieka, jego znaczenie w przeciwdziałaniu szkodliwym procesom kadmu z uwzględnieniem zapobiegania chorobom jamy ustnej. Ostatnia część *Wstępu* podsumowuje homeostazę i mechanizmy oksydacyjno-redukcyjne w jamie ustnej.

Cel i założenia pracy

Zmiany związane z zagadnieniem toksyczności kadmu były już eksplorowane w badaniach o wysokiej rzetelności naukowej. Jednakże ocena wpływu kadmu i suplementacji cynku na kość narządu żucia w układzie zwierzęcym nie były analizowane jednocześnie, co podnosi potencjał naukowy wykonanej pracy. Na podstawie przeglądu literatury naukowej, uważam, że wyznaczone kierunki badań, przez lekarza dentystę Kamila Bijowskiego, były uzasadnione, a hipoteza badawcza, oparta na ocenie czterech kierunków badań, została prawidłowo zaprojektowana;

- 1/ wpływu cynku na kumulację kadmu
- 2/ narażenia na kadm na stan oksydacyjno-redukcyjny oraz degradację oksydacyjną kwasów nukleinowych, białek i lipidów
- 3/ analizy długotrwałej suplementacji cynkiem na stan oksydacyjno-redukcyjny
- 4/ odpowiedzi na pytanie, czy zwiększona podaż wybranego powyżej biopierwiastka podczas umiarkowanego i względnie wysokiego narażenia na kadm można rozpatrywać protekcyjnie w aspekcie badanych procesów redoks.

Dobór grupy badanej i układ doświadczalny

Analiza miała charakter eksploracyjny. Badania przeprowadzono na 72 dorosłych szczurach, samcach szczepu Wistar, po 12 miesiącach ekspozycji w 9 grupach po 8 osobników w układzie doświadczalnym dostarczania wodnego roztworu cynku w stężeniu 30 i 60 mg Zn/dm³, co pozwoliło zwiększyć dobowe spożycie tego biopierwiastka odpowiednio o 71% i 146%. Kadm był podawany w wodnym roztworze odzwierciedlającym umiarkowane (5 mg Cd/dm³) i względnie wysokie (50 mg Cd/dm³) narażenie na ksenobiotyk.

Dokonano diagnostyki stanu antyoksydacyjnego (peroksydazy glutationowej GPx, dysmutazy ponadtlenkowej SOD, katalazy CAT, reduktazy glutationowej GR i całkowitego statusu

przeciwutleniającego TAS) i stanu oksydacyjnego (nadtlenku wodoru H_2O_2) oraz stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego (OSI) w tkance kostnej żuchwy, jak również biomarkerów uszkodzeń oksydacyjnych lipidów (LPO), białek (PC) i kwasów nukleinowych (DNA/RNA) oraz stężenia Cd i Zn w tym narządzie.

W ten sposób Doktorant uzyskał wyselekcjonowany materiał homogeniczny, co pozwoliło na przeprowadzenie analizy porównawczej w zakresie tych samych parametrów będących przedmiotem oceny we wszystkich podgrupach badanych. Po przygotowaniu homogenatu, supernatant był mrożony, jednak należałoby dodać informację, jak długo ten materiał był przechowywany w niskiej temperaturze, ponieważ mogłoby mieć to wpływ na wyniki oznaczeń laboratoryjnych?

Niemniej jednak dobór grup, umiejętność wykorzystania doświadczalnego modelu, zastosowanie nowoczesnych metod detekcji i narzędzi badawczych - ten aspekt opracowania stanowi – w moim przekonaniu – jeden z walorów dysertacji, jako dzieła logicznie zwartej o treści merytorycznie w pełni uzasadnionej

Wyniki

Rozdział *Wyniki* rozpoczyna się od przedstawienia danych, a następnie analizy korelacji pomiędzy nimi. Uzyskane rezultaty mają wymiar wielokierunkowy i odzwierciedlają podjęty temat oraz hipotezy badawcze. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zarówno umiarkowana (5 mg Cd/dm^3), jak i względnie wysoka (50 mg Cd/dm^3), 12-miesięczna endogenna konsumpcja kadmu w roztworze wodnym doprowadziła do osłabienia enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej, wzrostu stężenia prooksydantów, a w rezultacie rozwoju stresu oksydacyjnego i modyfikacji oksydacyjnych lipidów, białek i DNA/RNA w tkance kostnej żuchwy.

Kluczowym wynikiem okazało się obronne działanie cynku przy spożyciu zwiększonym o 71% i o 146% podczas ekspozycji na kadm. Cynk w znamienny sposób chronił przed nadmierną kumulacją H_2O_2 , obniżeniem aktywności GPx, SOD i CAT oraz oksydacyjnymi uszkodzeniami białek, lipidów i kwasów nukleinowych kości narządu żucia.

Dyskusja

Autor w sposób dojrzały i uporządkowany odwołuje się do uzyskanych wyników, a także do wcześniej publikowanych rezultatów i interpretacji naukowych innych badaczy. Uzyskane dane Doktorant skonfrontował z dostępnymi źródłami literaturowymi, jednak słusznie

podkreślił, że w dalszym ciągu jest zbyt mała liczba opublikowanych eksperymentów *in vitro/in vivo* dotyczących szkodliwości kadmu na organizm ludzki, zwłaszcza dotyczących narządu żucia. Pomimo to uzyskał on merytoryczne podstawy do formułowania wniosków końcowych. Moim zastrzeżeniem jest brak w tej części dysertacji omówienia ograniczeń przeprowadzonych doświadczeń. Ten dyskurs konieczny jest dla rozwinięcia propozycji dalszych analiz, które Autor zawarł jedynie w ostatnim zdaniu *Dyskusji* jako, cyt. „przesłanki do podjęcia badań mających na celu wykorzystanie preparatów cynkowych w profilaktyce zagrożeń u osób narażonych na kadm”. Wydaje się, że Autor na podstawie wyników własnych, mógłby poszerzyć i rozbudować dyskusję o kolejne hipotezy do dalszej eksploracji.

Wnioski

We wnioskach Autor odnosi się do hipotez badawczych, ale są one niepotrzebnie rozbudowane, przez co są one powtórzeniem wyników. Podstawowym wnioskiem dotyczącym kadmu jest pierwszy jako potwierdzający indukcję stresu oksydacyjnego w tkance kostnej żuchwy przez kadm, który jest zależny od poziomu narażenia na ten ksenobiotyk. Dodanie stwierdzenia końcowego, iż kość żuchwy jest istotnym elementem narządu żucia w obiegu i kumulacji kadmu w organizmie człowieka, podniosłaby wartość *Wniosków* z pracy. Z kolei ostatni wniosek dotyczący podawania cynku podczas ekspozycji na kadm dla zapobiegania rozwojowi stresu oksydacyjnego i toksycznych skutków w tkance kostnej żuchwy uważam za najważniejszy z punktu widzenia dobrostanu człowieka. Pozostałe wnioski powinny być połączone, np. nr 2 i nr 3, od nr 4 do nr 8.

Na końcu Autor nie odniósł się bezpośrednio do postawionej hipotezy badawczej w *Celach i założeniach pracy* ze str. 34-35, a przecież dokonał zbadania postawionej hipotezy, stąd też należałoby potwierdzić lub odrzucić przyjętą hipotezę.

Uwagi, poprawność formalno-językowa i stylistyczna.

Przedłożona do recenzji dysertacja jest napisana prawidłowym językiem polskim, pomimo że Autor opracowania nie wykazał się należyłą starannością edycyjną. Niektóre sformułowania, mając na uwadze obowiązujące normy poprawności językowej, wymagają wyjaśnienia lub sprostowania.

1/ Wykaz skrótów (str. 5-7) nie zawiera wyjaśnień w języku polskim w przypadku wskaźnika filtracji kłębuszkowej GFR, metaloproteinazy MMP, białka transportującego metale MTP1,

1/ Wykaz skrótów (str. 5-7) nie zawiera wyjaśnień w języku polskim w przypadku wskaźnika filtracji kłębuszkowej GFR, metaloproteiny MMP, białka transportującego metale MTP1, Światowej Organizacji Zdrowia WHO. Natomiast na liście skrótów brakuje rozwinięcia wielu nazw skrótowych, np. NF- κ B, NRF2, XPA, MTF-1, ZNT2.

2/ str. 28 i str. 32 zawierają określenia niemieszczące się w granicach języka akademickiego ani zawodowego lekarza dentysty, a wręcz je przekraczają i nie są dopuszczalne, są to sformułowania takie jak „cuchnący oddech”, „zepsute zęby”

3/ liczne błędy w transkrypcji danych liczbowych z pisowni anglosaskiej do polskiej zarówno w *Wynikach*, jak i w tabelach I-V. W języku polskim separatorem/znakiem dziesiętnym używanym do oddzielenia części całkowitej od części ułamkowej w zapisie liczby jest przecinek.

4/ powyższe błędy w zapisach liczb są połączone z nieprawidłowym zapisem jednostek, przykłady poniżej.

Zamiast:

- bufor fosforanowy 50 mM o pH = 7,4 przygotowany z diwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4 ; POCh, Gliwice, Polska) i wodorofosforanu dipotasu (K_2HPO_4 ; POCh, Gliwice, Polska)
- bufor fosforanowy 0,2 M o pH = 7,0 przygotowany z diwodorofosforanu sodu (NaH_2PO_4 ; POCh, Gliwice, Polska) i wodorofosforanu disodu (Na_2HPO_4 ; POCh, Gliwice, Polska)

Powinno być:

- bufor fosforanowy 50 mmol/l o pH = 7,4 przygotowany z diwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4 ; POCh, Gliwice, Polska) i wodorofosforanu dipotasu (K_2HPO_4 ; POCh, Gliwice, Polska)
- bufor fosforanowy 0,2 mol/l o pH = 7,0 przygotowany z diwodorofosforanu sodu (NaH_2PO_4 ; POCh, Gliwice, Polska) i wodorofosforanu disodu (Na_2HPO_4 ; POCh, Gliwice, Polska)

Zamiast:

Dobowe spożycie cynku w grupach, którym podawano ten biopierwiastek w stężeniu 30 i 60 mg Zn/dm³ osobno, jak i podczas narażenia na kadm było na tym samym poziomie i mieściło się w zakresie 0,980 - 3.980 mg/kg m.c. oraz 2.020 - 7.710 mg/kg m.c i wynosiło

średnio (średnia \pm błąd standardowy (SE)) odpowiednio $1,904 \pm 0,123$ mg/kg m.c. i $3,699 \pm 0,213$ mg/kg m.c. [16].

Powinno być:

Dobowe spożycie cynku w grupach, którym podawano ten biopierwiastek w stężeniu 30 i 60 mg Zn/dm³ osobno, jak i podczas narażenia na kadm było na tym samym poziomie i mieściło się w zakresie 0,980 – 3,980 mg/kg m.c. oraz 2,020 – 7,710 mg/kg m.c. i wynosiło średnio (średnia \pm błąd standardowy (SE)) odpowiednio $1,904 \pm 0,123$ mg/kg m.c. i $3,699 \pm 0,213$ mg/kg m.c. [16].

Zamiast:

Dobowe spożycie kadmu u szczurów, którym podawano 5 i 50 mg Cd/dm³ wody pitnej (osobno i łącznie z cynkiem) mieściło się w zakresie odpowiednio 0,163 - 0,753 mg/kg m.c. i 1,740 - 4,440 mg/kg m.c. i wynosiło średnio (średnia \pm SE) $0,340 \pm 0,026$ mg/kg m.c. i $2,498 \pm 0,093$ mg/kg m.c. [16].

Powinno być:

Dobowe spożycie kadmu u szczurów, którym podawano 5 i 50 mg Cd/dm³ wody pitnej (osobno i łącznie z cynkiem) mieściło się w zakresie odpowiednio 0,163 - 0,753 mg/kg m.c. i 1,740 – 4,440 mg/kg m.c. i wynosiło średnio (średnia \pm SE) $0,340 \pm 0,026$ mg/kg m.c. i $2,498 \pm 0,093$ mg/kg m.c. [16].

Zamiast

$$\text{GPx mU/ml} = (\Delta\text{Abs/min} / 0,00622) \times 16$$

gdzie:

- 0,00622 - molowy współczynnik ekstynkcji (ϵ) dla NADPH

Powinno być

$$\text{GPx mU/ml} = (\Delta\text{Abs/min} / 0,00622) \times 16$$

gdzie:

- 0,00622 - molowy współczynnik ekstynkcji (ϵ) dla NADPH

Zamiast:

- buforu do oznaczeń (50 mM Tris-HCl, pH = 8.0 zawierający 0,1 mM DTPA i 0,1 mM hipoksantynę), który przed użyciem rozcieńczono 10 krotnie wodą ultra czystą

Powinno być:

- ❑ buforu do oznaczeń (50 mmol/l Tris-HCl, pH = 8.0 zawierający 0,1 mmol/l DTPA i 0,1 mmol/l hipoksantynę), który przed użyciem rozcieńczono 10 krotnie wodą ultra czystą

Zamiast:

- ❑ detektora rodników (0,25 cm³ soli tetrazoliowej), który przed użyciem rozcieńczono dodając do 0,05 cm³ soli 19,95 cm³ rozcieńczonego buforu do oznaczeń
- ❑ oksydazy ksantynowej (0,15 cm³ r-ru oksydazy ksantynowej), którą przed użyciem rozcieńczono przez dodanie do 0,05 cm³ oksydazy ksantynowej 1,95 cm³ rozcieńczonego buforu do prób

Powinno być:

- ❑ detektora rodników (0,25 cm³ soli tetrazoliowej), który przed użyciem rozcieńczono dodając do 0,05 cm³ soli 19,95 cm³ rozcieńczonego buforu do oznaczeń
- ❑ oksydazy ksantynowej (0,15 cm³ r-ru oksydazy ksantynowej), którą przed użyciem rozcieńczono przez dodanie do 0,05 cm³ oksydazy ksantynowej 1,95 cm³ rozcieńczonego buforu do prób

Podsumowanie końcowe

Podjęty przez Autora temat jest bardzo ważny, a uzyskane wyniki wydają się interesujące. Wnioskując, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca odpowiada pod względem formalnym i merytorycznym kryteriom stawianym dysertacji doktorskiej. Moja ocena jest pozytywna i składam wniosek do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. dent. Kamila Bijowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony pracy.

Podstawa prawna: art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.)

Z wyrazami szacunku



dr hab. Elżbieta Paszyńska, prof. UMP