

Kraków, 06 listopada 2022 roku

Dr hab. n. med. Mariusz Szuta

Katedra Chirurgii Stomatologicznej Instytutu Stomatologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PT.:

**„OCENA WPŁYWU ZESPOLEŃ TYTANOWYCH PODDANYCH  
ANODOWANIU TWARDEMU NA CYTOTOKSYCZNOŚĆ, STRES  
OKSYDACYJNY ORAZ ZJAWISKA KOROZJI W HODOWLACH  
KOMÓRKOWYCH FIBROBLASTÓW LUDZKICH”**

**LEKARZ DENTYSTY IZABELI ZIENIEWSKIEJ-SIEMIEŃCZUK**

Pracę wykonano w Zakładzie Stomatologii Zachowawczej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Anny Zalewskiej będącej promotorem. Powstała ona w ramach projektu pod nazwą „Krajowe Międzysektorowe Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, nr POWR.03.02.00-00-I050/16.

Rozprawa ma formę monografii o typowym układzie z podziałem na rozdziały: wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie i streszczenie w języku angielskim. Dodatkowo autorka zamieściła przed wstępem wykaz stosowanych skrótów, a na końcu spis tabel i spis rycin. Praca liczy 244 strony wraz z piśmiennictwem, zawiera 42 tabele oraz 16 rycin w formie wykresów, schematów, rysunków oraz zdjęć. Na 226 pozycji piśmiennictwa, w większości z ostatnich 10 lat, składa się 220 prac obcojęzycznych oraz 6 w języku polskim, przy czym sumarycznie autorami 26 pozycji są Polacy.

We wstępie doktorantka przedstawiła właściwości fizykochemiczne tytanu oraz jego zastosowanie w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem chirurgii szczękowo-twarzowej i implantologii, opisała zjawisko korozji oraz zawarła szczegółową charakterystykę procesu anodowania z uwzględnieniem parametrów procesu anodowego utleniania tytanu i stosowane w nim elektrolity. Autorka rozprawy wyjaśniła również wpływ temperatury, szybkości mieszania roztworu oraz czasu trwania procedury na anodowanie. We wstępie została przedstawiona także analiza składu chemicznego warstwy pasywnej będącej produktem anodowania oraz znaczenie grubości, porowatości i struktury krystalicznej warstwy anodowej  $TiO_2$  w aspekcie jej biokompatybilności. Autorka dysertacji w końcowej części wstępu omówiła budowę tkanki kostnej, procesy regeneracji kości oraz rolę fibroblastów i ich czynników wzrostowych (FGF), jak również czynników wzrostowych śródbłonna naczyniowego (VEGF-A). Szeroko przedstawiła charakterystykę stresu oksydacyjnego oraz poszczególnych typów rodnikowych i nierodnikowych reaktywnych form tlenu w aspekcie proutleniających właściwości nanocząstek  $TiO_2$  i związanych z nimi procesów peroksydacji lipidów, tudzież potencjalnej modyfikacji oksydacyjnej białek, jak również kwasów nukleinowych. Nie zabrakło również w tych rozważaniach miejsca na omówienie zagadnień związanych z rolą cytoprotekcyjną naturalnych i



syntetycznych antyoksydantów takich jak: glutation, peroksydazy glutationowe, reduktaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa czy katalaza.

Współcześnie złotym standardem w leczeniu złamań kości czaszki twarzowej jest chirurgiczna osteosynteza z wykorzystaniem płytek i śrub tytanowych. Zastosowanie tej formy leczenia pozwala z jednej strony na uzyskanie większej precyzji nastawienia pod kontrolą wzroku odłamów kostnych oraz ich lepszej stabilizacji pierwotnej, a z drugiej skrócenie czasu noszenia uciążliwego dla chorego wyciągu międzyszczykowego oraz szybszego przywrócenia pełnej funkcji układu stomatognatycznego, a co za tym idzie lepszej jakości życia. Pomimo generalnie rzecz biorąc biokompatybilności tytanu i jego stopów powszechną staje się dziś konieczność usuwania tytanowych płytek i śrub ze względu na możliwość wystąpienia w odległym przedziale czasowym działań niepożądanych związanych z długotrwałym pozostawieniem biomateriałów w organizmie człowieka. Metalozą będącą wynikiem odkładania się tytanu uwalnianego z powierzchni implantu na skutek tarcia lub/i jego elektrochemicznej korozji może stanowić przyczynę immunologiczno-zapalnej reakcji organizmu i doprowadzić do obnażenia materiału zespalającego lub przedwczesnej utraty wszczepu zębowego. Cząstki metalu zwiększając ponadto produkcję wolnych rodników mogą doprowadzić do destabilizacji balansu oksydacyjno-redukcyjnego w kierunku procesów utleniania i wyzwolić stres oksydacyjny i nitrozacyjny, a co za tym idzie zwiększoną aktywności reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS) mających działanie cytotoksyczne poprzez peroksydację lipidów oraz oksydacyjne modyfikacje białek i kwasów nukleinowych. Wygenerowane w ten sposób zaburzenia przepuszczalności błon komórkowych oraz dysfunkcja białek strukturalnych i enzymatycznych mogą zaburzać procesy regeneracyjne organizmu i procesy gojenia. Wprowadzenie implantów z pogrubioną warstwą dwutlenku tytanu może zwiększać biozgodność tytanu i minimalizować ryzyko migracji do otaczających tkanek jonów ze stopu, z którego wykonany jest

materiał do osteosyntezy lub wszczep, a co za tym idzie uchronić chorego przed powikłaniami zapalnymi miejsca operowanego, brakiem zrостu kostnego lub utratą wszczepu.

Dr Izabela Zieniewska-Siemieńczuk bardzo trafnie zatem za cele podjętych przez siebie badań przyjęła:

- porównanie cytotoksyczności tytanowych krążków z warstwą pasywną z II typem anodowania do cytotoksyczności tytanowych krążków bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo, w hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018;
- ocenę wpływu tytanowych krążków z warstwą pasywną z II typem anodowania na całkowity potencjał antyoksydacyjny oraz enzymatyczne i nieenzymatyczne systemy antyoksydacyjne ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w hodowli w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo;
- porównanie oksydacyjnych uszkodzeń i zaburzenia równowagi redox mierzonych stężeniem produktów oksydacyjnych modyfikacji białek i lipidów, a także całkowitym potencjałem oksydacyjnym w komórkach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażonych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania i w komórkach w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo;
- ocenę czynników prooksydacyjnych, tj. aktywności oksydazy NADPH i stężenia nadtlenoazotynu w komórkach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażonych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania poprzez po-



równanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w komórkach w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo;

- porównanie funkcjonowania enzymów łańcucha oddechowego i aktywności markera apoptozy- kaspazy-3 w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania i w komórkach w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo;
- ocenę stężenia czynników wzrostu FGF-2 i VEGF-A w medium pobranym z komórek ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażonych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w medium pobranym z w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo;
- ocenę uwalniania jonów tytanu, glinu i wanadu do medium hodowlanego z powierzchni tytanowych krążków z warstwą pasywną z II typem anodowania poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w medium pobranym z krążków tytanowych z warstwą anodowaną standardowo i z krążków bez warstwy pasywnej w czasie prowadzonej hodowli komórek ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018.

Projekt badawczy uzyskał stosowną zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (uchwała nr APK.002.280.2021). Badania przeprowadzono na hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów (Human Primary Gingival Fibroblasts, ATCC-PCS-201-018) zakupionych w firmie ATCC. W doświadczeniu

zastosowano krążki tytanowe (Ti6Al4V) wykonane na indywidualne zamówienie przez firmę ChM, różniące się rodzajem powłoki: anodowaną na twardo, anodowaną standardowo oraz krążki nie poddane anodowaniu (bez powłoki). W grupie kontrolnej zastosowano natomiast krążki z polistyrenu o takiej samej średnicy i grubości co krążki tytanowe. Komórki hodowano w 12-dółkowych płytkach w środowisku rekomendowanym przez producenta. Po osiągnięciu odpowiedniej konfluencyjności, na płytki naniesiono tytanowe krążki, każdy w 6 powtórzeniach. Po nałożeniu tytanowych krążków, komórki hodowano przez okres 24h, 7, 14 oraz 21 dni. We wskazanych przedziałach czasowych dokonano oceny żywotności komórek za pomocą testu MTT. Po wyizolowaniu mitochondriów oznaczono metodami kolorymetrycznymi stężenie białka całkowitego, aktywność kaspazy-3 (CAS-3) oraz funkcjonowanie łańcucha oddechowego: aktywność kompleksu I i II, oksydazy cytochromu c (COX) oraz syntazy cytrynianowej (CS). Pobrano płyn nad komórkami, w którym metodami kolorymetrycznymi oznaczono stężenia: białka całkowitego (BCA), malonylodialdehydu (MDA), grup disiarczkowych (SS), nadtlendioazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ), 3-Nitrotyrozyny (3-NT) oraz oceniono całkowity status utleniający (TOS) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC); metodami fluorymetrycznymi: zawartość końcowych produktów utleniania białek (AOPP) i końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE); metodami ELISA: stężenie czynnika wzrostu fibroblastów-2 (FGF-2), czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A) oraz adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (addukty 4-HNE). W lizacie komórkowym metodami kolorymetrycznymi oznaczono stężenia: białka całkowitego (BCA), malonylodialdehydu (MDA), grup disiarczkowych (SS), nadtlendioazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ), 3-Nitrotyrozyny (3-NT), zredukowanego glutationu (GSH), aktywność katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR), oksydazy NADPH (NOX) oraz oceniono całkowity status utleniający (TOS) i całkowitą zdolność



antyoksydacyjną (TAC): metodami fluorymetrycznymi: zawartość końcowych produktów utleniania białek (AOPP) i końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE); metodą ELISA: stężenie adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (addukty 4-HNE). Zawartość metali w medium oceniono po 3, 6, 15, i 21 dniach, metodą ICP-MS.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 12.0 przy użyciu testów: ANOVA wraz z testem post-hoc HSD Tukey'a. Analizę korelacji wykonano metodą Pearsona. Za poziom istotności przyjęto  $p < 0,05$ .

W badaniach wykonanych po 24 godzinach doktorantka wykazała jako istotne statystycznie:

- wyższą aktywność GPx w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższy TOS dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów ekspozowanych na stopy V(st) i V(t);
- wyższą aktywność NOX w komórkach dla stopu V w stosunku do kontroli, jak również w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach ekspozowanych na stopy V(st) i V(t);
- wyższe stężenie AOPP w komórkach dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach dla stopu V, w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t);
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t);
- wyższy TOS w medium dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;

- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.

W badaniach wykonanych po 7 dniach autorka rozprawy doktorskiej wykazała jako istotne statystycznie:

- niższe stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V;
- wyższą aktywność GPx w komórkach dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli;
- wyższą aktywność GR dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na stop V;
- wyższe stężenie GSH w komórkach dla stopów V(st), V(t) w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na stop V;
- wyższe stężenie GSH dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st);
- niższy TAC dla stopu V i V(st) w stosunku do kontroli;
- wyższy TOS w komórkach dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V(st) i V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na stop V;
- wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;



- wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t);
- wyższe stężenie MDA dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższe stężenie MDA dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(t);
- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli;
- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(t).
- wyższe stężenie AOPP dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopu V, w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t);
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t);
- niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopu V(t);
- niższą aktywność COX w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie FGF-2 w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;

- niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t);
- niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopu V(st) w porównaniu do stopu V(t);
- wyższe stężenie MDA w medium dla stopu V w porównaniu do kontroli i do stopów V(st) i V(t);
- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli;
- wyższe stężenie AGE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.

W badaniach wykonanych po 14 dniach doktorantka wykazała jako istotne statystycznie:

- wyższą żywotność komórek dla stopu V(t) w stosunku do stopu V;
- wyższą żywotność komórek dla stopu V(st) w stosunku do stopu V;
- niższe stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st);
- wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V;
- wyższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V;
- niższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;



- wyższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopów  $V(st)$ ,  $V(t)$  w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop  $V$ ;
- wyższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu  $V(t)$  w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop  $V(st)$ ;
- niższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopów  $V$ ,  $V(st)$ ,  $V(t)$  w stosunku do kontroli;
- wyższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopów  $V(st)$ ,  $V(t)$  w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop  $V$ ;
- wyższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopu  $V(t)$  w stosunku do stopu  $V(st)$ ;
- niższy TAC w komórkach fibroblastów dla stopów  $V$ ,  $V(st)$ ,  $V(t)$  w stosunku do kontroli;
- wyższy TAC w komórkach fibroblastów dla stopów  $V(st)$ ,  $V(t)$  w stosunku do TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop  $V$ ;
- wyższy TAC w komórkach fibroblastów dla stopu  $V(t)$  w stosunku do stopu  $V(st)$ ;
- wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów  $V$ ,  $V(st)$ ,  $V(t)$  w stosunku do kontroli;
- niższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów  $V(st)$ ,  $V(t)$  w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop  $V$ ;
- wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopu  $V(st)$  w stosunku do stopu  $V(t)$ ;

- wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak również w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t);
- wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli;
- wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(t);
- wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(st);
- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli;
- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(t);
- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(st);
- wyższe stężenie AOPP w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopu V, w stosunku do stopów V(st) i V(t);
- wyższe stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;



- niższe stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) w stosunku do kontroli i stopu V(t);
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t);
- niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t);
- niższą aktywność COX w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność CS w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność CS w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, i V(st), w porównaniu do aktywności CS w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t);
- wyższą aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie FGF-2 w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższe stężenie MDA w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli;
- wyższe stężenie MDA w medium dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t);

- wyższe stężenie 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli;
- wyższe stężenie AGE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.

W badaniach wykonanych po 21 dniach dr Izabela Zieniewska-Siemieńczuk wykazała jako istotne statystycznie:

- wyższą żywotność komórek oceniana po 21 dniach dla stopu V(t) w stosunku do stopu;
- wyższą żywotność komórek dla stopu V(st) w stosunku do stopu V;
- niższe stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V;
- wyższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V;
- niższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli;
- wyższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów ekspozowanych na stop V;
- niższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów ekspozowanych na stopy V(st) i V(t);



- niższe TAC w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na stopy V(st) i V(t);
- wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- niższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V;
- wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopu V(st) w stosunku do stopu V(t);
- wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak również w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t);
- wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t);
- wyższe stężenie AOPP w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopu V, stosunku do stopów V(st) i V(t);
- wyższe stężenie AGE w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższe stężenie ONOO<sup>-</sup> w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- wyższe stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) w stosunku do kontroli;

- wyższe stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do stopu V(t);
- niższe stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) w stosunku do stopu V(t);
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t);
- niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t);
- niższą aktywność COX w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność COX w mitochondriach dla stopów V, i V(st), w porównaniu do aktywności COX w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t);
- niższą aktywność CS w mitochondriach dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższą aktywność CS w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, i V(st), w porównaniu do aktywności CS w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t);
- wyższą aktywność CAS-3 w mitochondriach dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli i w stosunku do aktywności CAS-3 w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem ze stopu V(t);



- niższe stężenie FGF-2 w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli;
- niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t);
- wyższy TOS w medium dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli;
- wyższy TOS w medium dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t);
- wyższy TOS w medium dla stopu V(st) w porównaniu do stopu V(t);
- wyższe stężenie MDA w medium dla stopów V i V(st) w porównaniu do kontroli i do stopu V(t);
- wyższe stężenie MDA w medium dla stopu V w porównaniu do stopu V(st);
- wyższe stężenie adduktów 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli;
- wyższe stężenie AGE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.

Na podstawie uzyskanych wyników i dokonanych analiz doktorantka wyciągnęła następujące wnioski:

1. Stopień cytotoksyczności tytanowych krążków z II typem anodowania zależy od czasu trwania hodowli komórkowej ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018. Od 14 dnia eksperymentu, do czasu jego zakończenia jest niższy w porównaniu do tytanowych krążków bez warstwy pasywnej, przy czym

rodzaj anodowania pozostaje bez wpływu na stopień cytotoksyczności stopu tytanu Ti6Al4V.

2. Zmiany obrony antyoksydacyjnej ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na krążki tytanowe pozbawione warstwy pasywnej odbiegają znacząco od zmian obrony antyoksydacyjnej w/w fibroblastów narażanych na krążki tytanowe poddane anodowaniu, przy czym bardziej niekorzystne zmiany widoczne są w w/w fibroblastach narażanych na krążki anodowane standardowo.
3. Oksydacyjne modyfikacje białek zachodzą we wszystkich grupach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki, przy czym proces ten jest najmniej nasilony w w/w fibroblastach eksponowanych na tytanowe krążki z II typem anodowania. Niewielki i ograniczony do 7 dnia hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 wzrost jednego tylko markera peroksydacji lipidów (MDA) i brak jakichkolwiek zmian stężeń adduktów 4-HNE z białkami vs. grupa kontrolna dowodzi odwracalności procesu peroksydacji lipidów i niewielkie nasilenie stresu oksydacyjnego. Oksydacyjne modyfikacje elementów komórkowych były najbardziej nasilone w grupie w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej. Wytwarzanie RFT było zwiększone we wszystkich grupach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018, przy czym proces ten w grupach fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną rozpoczął się dopiero od 7 dnia eksperymentu. Generowanie RFT było na najwyższym poziomie w grupie w/w fibroblastów narażanych na krążki bez warstwy pasywnej, a II typ anodowania zmniejszył stopień produkcji RFT w porównaniu do anodowania standardowego.



4. Wzrost aktywności oksydazy NADPH (NOX) był zależny od czasu trwania hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018, była najniższa w w/w fibroblastach narażanych na tytanowe krążki poddane anodowaniu (vs. fibroblasty narażone na krążki tytanowe bez warstwy pasywnej), przy czym rodzaj anodowania pozostawał bez wpływu na aktywność tego enzymu. Stężenie ONOO- istotnie wzrastało w ostatniej dobie eksperymentu (vs. kontrola). Wzrost ten wydaje się być niezależny od obecności warstwy pasywnej, czy też rodzaju anodowania.
5. Aktywność kompleksu I przez cały czas trwania eksperymentu we wszystkich grupach badanych była istotnie obniżona (vs. kontrola), przy czym obecność warstwy pasywnej zdaje się mieć działanie ochronne. Rodzaj anodowania nie wpływa na aktywność tego enzymu. Typ II anodowania zapobiega natomiast zmianom aktywności kompleksu II (vs. kontrola). Zmiany aktywności CS zależą od czasu trwania hodowli, redukcję aktywności tego enzymu zaobserwować można od 14 dnia hodowli we wszystkich grupach badanych (vs. kontrola). Najmniejszy stopień inhibicji tego enzymu występuje w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 eksponowanych na tytanowe krążki z II typem anodowania (w porównaniu do dwóch pozostałych grup badanych). Aktywność COX od 7 do ostatniego dnia hodowli była istotnie obniżona w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki (vs kontrola). W ostatniej fazie hodowli obecność II typu anodowania zmniejsza stopień inhibicji tego enzymu w porównaniu do pozostałych grup badanych. Stopień apoptozy w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 zależy od

czasu trwania hodowli. W ostatniej fazie hodowli obecność II typu anodowania zapobiega apoptozie w mitochondriach w/w fibroblastów.

6. Stężenie FGF-2 w medium pochodzącym ze wszystkich badanych grup ulega redukcji od 7 dnia hodowli i utrzymuje się na istotnie niższym poziomie vs. kontrola do końca eksperymentu. Wartość tej redukcji nie była uwarunkowana obecnością warstwy pasywnej, czy też rodzajem anodowania. Zmiany stężeń VEGF-A zależą od czasu trwania hodowli i rodzaju tytanowych krążków, przy czym w 21 dobie obecność warstwy pasywnej z II typem anodowania zapobiega zaburzeniom sekrecji tego czynnika przez fibroblasty (vs. kontrola).
7. Przez cały okres trwania eksperymentu uwalnianie jonów tytanu, glinu i wanadu z tytanowych krążków z warstwą pasywną anodowaną na twardo było wyższe niż z pozostałych krążków tytanowych. Stopień uwalniania jonów z powierzchni wszystkich badanych krążków tytanowych zmniejszał się wraz z upływem czasu.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska lekarz dentysty Izabeli Zieniewskiej-Siemieńczuk posiada klasyczny układ monografii i jest napisana poprawną polszczyzną. Szata graficzna i strona edytorska jest staranna. Kolorowe wykresy, ryciny, schematy i fotografie wzbogacają niewątpliwie znacznie jej walory poznawcze, a spis rycin i tabel ułatwia czytelnikowi odszukiwanie w tekście wybiórczych informacji.

Doktorantka bardzo rozbudowała objętość całej dysertacji, ale było to podyktowane olbrzymią liczbą wyników i korelacji, które przeprowadziła, nie uznawałbym tego zatem za zarzut, bo zachowała adekwatne proporcje poszczególnych jej części. W pracy autorka umiejętnie dobrała metody badawcze celem uzyskania obiektywizacji wyników i wykazała się dobrą



znajomością warsztatu naukowego, uzyskując rozwiązanie wszystkich licznych problemów badawczych. Wnioski w mojej skromnej ocenie odpowiadają postawionym celom. Dodatkową wartością przedstawionych wyników badań *in vitro* jest ich użyteczny charakter dający potencjalną możliwość implementacji w medycynie. Wyniki badań są nowatorskie w wielu aspektach, mają potencjalne zastosowanie praktyczne, a ich wdrożenie w postępowaniu klinicznym prowadzić może niewątpliwie do poprawy wyników leczenia chirurgicznego i implantologicznego pacjentów z zastosowaniem materiałów tytanowych.

Moja ogólna i merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej lekarz dentysty Izabeli Zieniewskiej-Siemieńczuk pt.: „Ocena wpływu zespoleń tytanowych poddanych anodowaniu twardecy na cytotoksyczność, stres oksydacyjny oraz zjawiska korozji w hodowlach komórkowych fibroblastów ludzkich” zrealizowanej pod opieką prof. dr hab. n. med. Anny Zalewskiej jest pozytywna. Praca spełnia formalne kryteria stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych określone w Ustawie o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2022r. poz.574).

Zwracam się zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. dent. Izabeli Zieniewskiej-Siemieńczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Dr hab. n. med. Mariusz Szuta

**Dr hab. n. med. Mariusz SZUTA**  
specjalista chirurgii szczękowo-twarzowej  
otolaryngolog  
1477700