



**Pomorski Uniwersytet Medyczny
w Szczecinie**

Kancelarz
Kolegium Nauk Medycznych

Prof. dr hab. Marek Ruchała

Szczecin, 21 września 2023r.

dr hab. n. med. Alicja Nowicka
Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. stom. Anny Krahel

Biomarkery śliny odpowiedzi immunologicznej i stresowej u dzieci

Promotorzy: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Paszyńska

prof. dr hab. n. med. Monika Dmitrzak-Węglarz

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. stom. Anny Krahel pt. „*Biomarkery śliny odpowiedzi immunologicznej i stresowej u dzieci*” została wykonana pod kierunkiem Promotorów Pani prof. dr hab. n. med. Elżbiety Paszyńskiej i Pani prof. dr hab. n. med. Moniki Dmitrzak-Węglarz w Klinice Stomatologii Zintegrowanej Katedry Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji, w Klinice Psychiatrii Dzieci i Młodzieży oraz w Zakładzie Genetyki w Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Ślina jest niezwykle ważnym elementem w utrzymaniu zdrowia jamy ustnej i całego organizmu, a z uwagi na dostępność, łatwy i nieinwazyjny sposób pobierania bez naruszenia ciągłości tkanek i bez indukcji stresu, stanowi bardzo dobry, komfortowy dla pacjenta materiał do badań diagnostycznych szczególnie u dzieci i pacjentów z niesprawnościami. Różnorodność składników mogących znaleźć się w ślinie, w tym obecność cząstek aktywnych biologicznie przenikających do śliny z krwi, daje szerokie możliwości badań biochemicznych. Pomimo tych wielu zalet nie jest materiałem w pełni zbadanym i wykorzystanym w diagnostyce laboratoryjnej. Doktorantkę szczególnie zainteresowały biomarkery śliny związane z odpowiedzią immunologiczną i stresową u dzieci sprzężone z osią podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową i autonomicznym układem nerwowym. Zastosowanie tych łatwo dostępnych biomarkerów do przesiewowej oceny stanu zdrowia

dzieci i młodzieży jest niezwykle istotne, stąd wybór podjętej przez Doktorantkę tematyki badań uważam za słuszny i aktualny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie w formie monografii, na podstawie cyklu powiązanych tematycznie czterech pełnotekstowych publikacji: dwóch oryginalnych i dwóch poglądowych, opublikowanych w czasopismach znajdujących się w czasie publikacji na Liście Filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 14,81$. Publikacje te uzyskały 420 punktów według wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych ogłoszonych przez Ministerstwo Edukacji i Nauki (MEiN). Cykl publikacji składający się na osiągnięcie powstał jako jeden z efektów realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Nr. 2016/21/B/NZ5/00492):

1. Krahel Anna, Hernik Amadeusz, Dmitrzak-Węglarz Monika, Paszyńska Elżbieta. Saliva as Diagnostic Material and Current Methods of Collection from Oral Cavity. Clin. Lab. 2022: Vol. 68, nr 10, s. 2072-2080, DOI: 10.7754/Clin.Lab.2022.211224 (**IF: 1.053**; MEiN: 40.000).

2. Krahel Anna, Paszyńska Elżbieta, Otulakowska-Skrzyńska Justyna, Rzątownski Szymon, Hernik Amadeusz, Słopeń Agnieszka, Hanć Tomasz, Szcześniewska Paula, Bryl Ewa, Boucher Yves, Tyszkiewicz-Nwafor Marta, Gawriołek Maria, Dmitrzak-Węglarz Monika. Salivary Biomarkers (Opiorphin, Cortisol, Amylase, and IgA) Related to Age, Sex, and Stress Perception in a Prospective Cohort of Healthy Schoolchildren. Med. Inflamm. 2021 ID 3639441 [s. 1-14] DOI: 10.1155/2021/3639441 (**IF: 4.529**; MEiN: 100.000).

3. Krahel Anna, Paszyńska Elżbieta, Słopeń Agnieszka, Gawriołek Maria, Otulakowska-Skrzyńska Justyna, Rzątownski Szymon, Hernik Amadeusz, Hanć Tomasz, Bryl Ewa, Szcześniewska Paula, Bilska Karolina, Duda Joanna, Tyszkiewicz-Nwafor Marta, Dmitrzak-Węglarz Monika. Stress/Immune Biomarkers in Saliva among Children with ADHD Status. IJERPH 2021: Vol. 18, nr 2, art. 769 [s. 1-11], id. art. 769 DOI: 10.3390/ijerph18020769 (**IF: 4.614**; MEiN: 140.000).

4. Paszyńska Elżbieta, Krahel Anna, Pawińska Małgorzata, Dmitrzak-Węglarz Monika, Perczak Aleksandra, Słopeń Agnieszka, Gawriołek Maria. Management for Caries Prevention in ADHD Children IJERPH 2022: vol. 19, nr 12, art. 7455 [s. 1-7], id. art. 7455 DOI: 10.3390/ijerph19127455 (**IF: 4.614**; MEiN: 140.000).

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem trzech prac, w tym dwóch oryginalnych i jednej poglądowej, co potwierdza fakt, że jest osobą umiejącą prawidłowo zaplanować, przeprowadzić i publikować prace badawcze. Wartość naukowa powyższych publikacji została już potwierdzona pozytywnymi ocenami recenzentów odpowiednich czasopism. Rozprawa doktorska obejmuje 14 rozdziałów na 106 stronach wydruku komputerowego. Dużym ułatwieniem dla recenzenta i czytelnika jest zamieszczony w pierwszym rozdziale wykaz najważniejszych skrótów. Na podkreślenie zasługuje szeroka aktywność naukowa i kliniczna Doktorantki zaprezentowana

w rozdziale 3. Kolejne rozdziały obejmują wprowadzenie do przedmiotu badań, założenia badawcze, materiał i metody, komentarze do publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wnioski i listę 148 pozycji cytowanego piśmiennictwa oraz streszczenie dysertacji w języku polskim i angielskim. W kolejnym rozdziale Doktorantka zamieściła kopie publikacji wchodzących w skład dysertacji i oświadczenia współautorów publikacji oraz opinię Komisji Bioetycznej. Rozprawa doktorska została skonstruowana w sposób prawidłowy z użyciem właściwej terminologii według wymogów przewidzianych dla tego typu publikacji.

We wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła zagadnienia obejmujące funkcje, proces wydzielania i znaczenie śliny jako materiału diagnostycznego, w tym czynniki wpływające na jej poziom ilościowy i jakościowy, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania tego materiału w diagnostyce zaburzeń układu nerwowego człowieka. W dalszej części wprowadzenia podniosła problem wpływu stresu na rozwój człowieka z uwzględnieniem zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) oraz omówiła biomarkery śliny związane z odpowiedzią immunologiczną i stresową u dzieci takie jak, opiorfina, kortyzol, amylaza ślinowa, IgA, IgM i IgG. Ta część pracy stanowi dla czytelnika kompendium wiedzy z poddanych badaniom zagadnień.

Głównym celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja wybranych składników śliny jako biomarkerów odzwierciedlających odpowiedź immunologiczną i stresową organizmu u dzieci zdrowych oraz dzieci z diagnozą ADHD, z wykorzystaniem nieinwazyjnych metod diagnostycznych i testów immunoenzymatycznych. Lek. stom. Anna Krahel określiła również cele szczegółowe, które obejmowały: Przegląd i porównanie metod pobierania śliny oraz możliwości zastosowania w populacji dzieci i młodzieży; Oznaczenie stężeń biomarkerów odpowiedzi immunologicznej i stresowej w ślinie dzieci zdrowych oraz dzieci z zaburzeniami ADHD w wieku wczesnoszkolnym (opiorfina (OPI), wolny kortyzol, alfa - amylaza (sAA), immunoglobulina wydzielnicza (sIgA), immunoglobuliny M i G); Analizę korelacji i porównanie wybranych biomarkerów odpowiedzi immunologicznej i stresowej w ślinie u dzieci zdrowych z uwzględnieniem wieku, płci i percepcji wydarzeń stresowych w przeszłości; Ocenę wpływu zaburzeń ADHD na rozwój i przebieg próchnicy zębów u dzieci.

Ponadto Doktorantka sformułowała pięć hipotez badawczych:

1. Ślina jest materiałem biologicznym o potencjale diagnostycznym szczególnie istotnym w grupie dzieci w wieku wczesnoszkolnym.
2. Różne metody pobierania śliny pozwalają na szeroki wachlarz oznaczeń biomarkerów w praktyce klinicznej w populacji dzieci niezależnie od stanu ich zdrowia.
3. Wybrane biomarkery odpowiedzi immunologicznej i stresowej w ślinie odzwierciedlają doświadczenie stresu u dzieci zdrowych.
4. Zmiany stężeń wybranych biomarkerów odpowiedzi immunologicznej i stresowej w ślinie są specyficznym związane z występowaniem zaburzeń ADHD.

5. Dzieci z rozpoznaniem ADHD mają specyficzne stomatologiczne potrzeby profilaktyczne i lecznicze.

Lek. stom. Anna Krahel do badania włączyła 503 dzieci zdrowych i 60 dzieci z zaburzeniami ADHD między 6 a 12 rokiem życia zgodnie z ustalonymi kryteriami włączenia i wyłączenia z badania. Udział w badaniu był całkowicie dobrowolny, zgodny z zasadami dobrej praktyki klinicznej (Good Clinical Practice, GCP) (WHO, 2000) i zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 898/20 z dnia 10 grudnia 2020). U wszystkich dzieci została przeprowadzona ocena rozwoju dziecka i wykonano pomiary antropometryczne. W grupie kontrolnej do wykluczenia zaburzeń psychicznych i neurorozwojowych wykorzystano autorski, ustrukturyzowany kwestionariusz wypełniony przez specjalistów, natomiast do oceny doświadczenia stresu przez dziecko w ciągu ostatnich 6 miesięcy wykorzystano Przesiewowy Inwentarz Zdarzeń Traumatycznych (TESI). Badanie stomatologiczne obejmowało ocenę występowania płytki bakteryjnej, choroby próchnicowej, starcia zębów i ocenę stanu dziąseł. Stan jamy ustnej oceniano zgodnie z kryteriami Światowej Organizacji Zdrowia (Oral health surveys: basic methods) (WHO, 1997; 2013) z zastosowaniem wskaźników: PCR, wskaźnika kontroli płytki nazębnej; PUWZ- zębowego wskaźnika próchnicy; BEWE – podstawowego wskaźnika badania erozji oraz BOP - wskaźnika krwawienia podczas zgłębnikowania kieszonki przyzębnej. Dodatkowo podczas badania stomatologicznego pobierano próbki śliny całkowitej, którą użyto do oceny biomarkerów w Zakładzie Genetyki Psychiatrii, Katedry Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Do pomiaru stężeń biomarkerów zastosowano testy immunoenzymatyczne ELISA do diagnostyki in vitro dla kortyzolu i alfa - amylazy oraz naukowe (RUO, research use only) dla pozostałych biomarkerów. Do oceny statystycznej wykorzystano średnią z dwóch pomiarów. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej.

Pierwsza praca w cyklu publikacji pt. „Saliva as diagnostic material and current methods of collection from oral cavity” (PMID: 36250842) jest pracą poglądową, która stanowi kompendium aktualnej wiedzy na temat składu śliny w zależności od aktywności gruczołów ślinowych i bodźców wydzielniczych oraz wskazuje na niewykorzystany potencjał diagnostyczny śliny z zastosowaniem pomiaru biomarkerów w zaburzeniach funkcjonowania układu nerwowego i konieczność prowadzenia dalszych badań.

Druga praca pt. „Salivary biomarkers (opiorphin, cortisol, amylase, and IgA) related to age, sex, and stress perception in a prospective cohort of healthy schoolchildren” (PMID: 35110971) jest pracą oryginalną, w której dokonano oceny stanu zdrowia 503 zdrowych dzieci w wieku 6-12 lat poddając analizie poziomy biomarkerów w ślinie. Badanie wykazało korelacje między biomarkerami immunologicznymi śliny sIgA, sAA, wiekiem, płcią i parametrami stanu rozwojowego, co umożliwi monitorowanie różnic wiekowo-płciowych, zwłaszcza w przedhormonalnym okresie życia. U dzieci zgłaszających wcześniejsze doświadczanie wydarzeń

stresowych stwierdzono statystycznie wyższe stężenia opiorfiny, natomiast u dzieci otyłych interakcję między BMI i wydzielaniem kortyzolu w ślinie.

Trzecia praca pt. "Stress/immune biomarkers in saliva among children with ADHD Status" (PMID: 33477503) jest także pracą badawczą poddającą ocenie biomarkery odpowiedzi immunologicznej i stresowej w próbkach śliny 60 dzieci z ADHD w porównaniu z 72 dziećmi zdrowymi bez objawów ADHD w wieku 6 - 12 lat według powyższej przedstawionej metodyki. Badanie ujawniło, że poranne wartości sAA i immunoglobulin w ślinie u dzieci z ADHD mogą wskazywać na dysregulację układów osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej i autonomicznego układu nerwowego. Badanie wykazało, że ślina stanowi obiecujący materiał diagnostyczny do nieinwazyjnego monitorowania zaburzeń ADHD.

Czwarta praca „Management for caries prevention in ADHD children” (PMID: 35742701) jest pracą poglądową i kompendium wiedzy w zakresie zapobiegania chorobie próchnicowej u dzieci z zespołem nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi. Analiza badań klinicznych u dzieci z zaburzeniami ADHD wykazała, że skuteczna profilaktyka choroby próchnicowej może zależeć od poziomu ryzyka próchnicy, współpracy pacjenta i postępowania terapeutycznego. Autorzy zalecają wczesne strategie dla indywidualnych przypadków pacjentów z ADHD, kompleksowe działania profilaktyczne, wybór odpowiednich produktów do remineralizacji oraz dłuższe okresy obserwacji.

Cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. stom. Anny Krahel charakteryzuje trafność podjętej tematyki badawczej, oryginalność i wysoki poziom merytoryczny. Doktorantka umiejętnie korzysta z literatury i prawidłowo cytuje szeroki wachlarz starannie dobranego, aktualnego piśmiennictwa, głównie anglojęzycznego. Metodologia badań i użyte narzędzia statystyczne są właściwe. Wyniki badań zostały przedstawione i zilustrowane w prawidłowy sposób.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników lek. stom. Anna Krahel wysunęła wnioski, które są zgodne z celem pracy. Doktorantka wykazała, że ślina jest materiałem biologicznym o dużym potencjale diagnostycznym, szczególnie istotnym w grupie dzieci w wieku wczesnoszkolnym, ponieważ pozwala na pomiary szerokiego wachlarza biomarkerów pomocnych w ocenie stanu ich zdrowia oraz że aktualne metody pobierania śliny pozwalają na wykorzystanie jej jako materiału diagnostycznego do oznaczeń biomarkerów odpowiedzi immunologicznej i stresowej, szczególnie sIgA i sAA mogą być wykorzystywane do oceny rozwoju biologicznego dzieci w przedhormonalnym okresie ich życia. Badania kohortowe dzieci zdrowych potwierdziły, że biomarkery odpowiedzi immunologicznej i stresowej w ślinie mogą odzwierciedlać doświadczenie stresu. Spośród badanych biomarkerów wyższe stężenia opiorfiny były istotnie skorelowane z ekspozycją na stres. Uzyskany wynik wskazuje na użyteczność pomiaru stężeń opiorfiny u dzieci obciążonych wydarzeniami stresowymi już przed okresem pokwitania. Przeprowadzone analizy zmiany stężeń wybranych biomarkerów odpowiedzi immunologicznej i stresowej w ślinie potwierdziły ich specyficzny związek z występowaniem zaburzeń ADHD, a pomiar stężeń sAA oraz immunoglobulin sIgA i IgM w ślinie może zostać wykorzystany do monitorowania osi stresu i aktywności współczulnego



układu nerwowego. Rozpoznanie u dziecka zaburzeń ADHD powinno mieć wpływ na zalecenia dotyczące profilaktyki oraz planowania leczenia chorób jamy ustnej, w tym próchnicy zębów. W postępowaniu stomatologicznym należy uwzględnić indywidualny stopień ryzyka próchnicy, współpracę pacjenta i prowadzoną terapię choroby podstawowej.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na istotne znaczenie oceny ryzyka choroby próchnicowej, które Doktorantka może uwzględnić podczas prowadzenia dalszych badań. Rozszerzenie metodyki badania o ocenę ryzyka choroby próchnicowej pozwoli w wystandardyzowany sposób zaplanować działania profilaktyczne i ewentualne leczenie zarówno u dzieci zdrowych jak i u dzieci z zaburzeniami ADHD.

PODSUMOWANIE

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. stom. Anny Krahel pt. „Biomarkery śliny odpowiedzi immunologicznej i stresowej u dzieci” stanowiąca spójny cykl czterech publikacji jest napisana w sposób prawidłowy pod względem poprawności formułowania założeń, zastosowanych metod i narzędzi badawczych, jak również doboru i wykorzystania piśmiennictwa. Rozprawa spełnia wszelkie formalne i merytoryczne kryteria stawiane pracom doktorskim. Doktorantka wywiązała się z w pełni z postawionego celu pracy i wniosła nowe informacje na temat możliwości wykorzystania śliny dzieci zdrowych i z zespołem nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi w diagnostyce i terapii.

Rozprawa doktorska lek. stom. Anny Krahel spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2021 z późniejszymi zmianami, jak również Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30.01.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Medycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie lek. stom. Anny Krahel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wysoki merytoryczny poziom dysertacji, wybór skomplikowanego i istotnego w praktyce klinicznej zagadnienia oraz praktyczne zastosowanie wyników badania, jak również wysoki poziom naukowy publikacji wchodzących w skład dysertacji, zwracam się z prośbą o wyróżnienie poddanej recenzji rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem
dr hab. n. med. Alicja Nowicka

1324567
dr hab. n. med. Alicja Nowicka
specjalista II° stomatologii zachowawczej
tel. 607-220-672