UNIWERSYTET MEDYCZNY
w Białymstoku
KLINIKA ROZRODCZOŚCI
I ENDOKRYNOLOGII GINEKOLOGICZNEJ
15-276 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 34a
tel. 085 746 83 43, tel./fax 085 746 88 18

Prof. dr hab. n. med. Sławomir Wołczyński
Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 29.08.2022 r.

Recenzja pracy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Macikowskiej *„Mikrobiom jamy ustnej u kobiet o różnym statusie hormonalnym"*, wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Jolanty Pytko - Polończyk z Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum, Wydział Lekarski

Termin „mikrobiom" został zaproponowany w 2001 r. przez Joshua Lederberga dla określenia zespołu wszystkich mikroorganizmów człowieka, zarówno komensalnych, symbiotycznych jak i patogennych, które dzielą z nami naszą przestrzeń życiową. Nasz organizm jest środowiskiem życia dla bilionów drobnoustrojów, które wchodzą w skład ludzkiej mikrobioty nazywanej także często mikrobiomem. Termin „MIKROBIOM" określa zbiór genomów drobnoustrojów natomiast termin „MIKROBIOTA" stosowany jest do określenia ogółu mikroorganizmów zamieszkujących dane środowisko np. skórę, żołądek czy jelita, choć oba określenia często są używane zamiennie. Największa liczba bakterii (10^13 komórek bakteryjnych) oraz największa ich różnorodność występuje w jelicie grubym człowieka. Mikrobiota w organizmie człowieka lokalizują się w określonych miejscach np. skóra, jama ustna i górne drogi oddechowe, układ rozrodczy oraz układ pokarmowy. Szacuje się, że liczebność komórek mikrobiomu przewyższa 10-krotnie liczbę komórek budujących organizm zdrowego człowieka, a jego masa wynosi ok. 2 kg. Najliczniejszy oraz najbardziej zróżnicowany jest mikrobiom przewodu pokarmowego i to on jest najczęściej przedmiotem badań. Mikrobiom odgrywa zasadniczą rolę w zdrowiu i chorobie wpływając na wszystkie

funkcje naszego organizmu. W wielu chorobach równowaga między różnymi drobnoustrojami zostaje zachwiana. Szybkie postępy w technologiach sekwencjonowania, molekularnych technikach mikrobiologicznych generowania i analizy danych umożliwiły nam zbadanie ludzkiego mikrobiomu na niespotykanym dotąd poziomie rozdzielczości. Badania nad ludzkim mikrobiomem przekształciły się obecnie z dziedziny badania mikroflory opartej głównie na hodowli i mikroskopii na badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej. O analizie mikroorganizmów tylko na podstawie hodowli należałoby mówić jako o mikroflorze. Uważam, że Doktorantka nieprawidłowo użyła w tytule słowo mikrobiom i powinna użyć słowa mikroflora. Pod podpisami niektórych rycin pojawia się nazwa mikroflora. Oczywiście mam świadomość, że użycie metod biologii molekularnej i dokonanie analiz informatycznych to ogromne koszty finansowe niemożliwe do wydania przy realizacji pracy doktorskiej

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska **Katarzyny Macikowskiej** ***„Mikrobiom jamy ustnej u kobiet o różnym statusie hormonalnym"*** ma typową strukturę dla prac doktorskich. Praca liczy 114 stron, cytuje 96 prac piśmiennictwa.

We wstępie Doktorantka przedstawia wiedzę o roli mikrobiomu i potwierdza, że skład mikrobiomu, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, zależy nie tylko od warunków egzogennych, ale również endogennych, między innymi takich jak zmiany metaboliczne czy hormonalne. W przeglądzie piśmiennictwa Autorka szczególną uwagę zwraca na fizjologiczne zmiany hormonalne towarzyszące w życiu kobiety lub zaburzenia hormonalne.

Celem pracy była ocena stanu klinicznego i mikrobiologicznego jamy ustnej u kobiet o różnym statusie hormonalnym oraz wykazanie korelacji pomiędzy zmianami endokrynologicznymi zachodzącymi w ustroju a

mikroflorą jamy ustnej, w tym patogenną, odpowiedzialną za rozwój stanów zapalnych dziąseł i przyzębia. Doktorantka podjęła próbę znalezienia związku pomiędzy drobnoustrojami zasiedlającymi jamę ustną i drogi rodne i czy schorzenia endokrynologiczne, takie jak niedoczynność tarczycy, zespół policystycznych jajników (PCOS) predysponują do rozwoju określonych szczepów bakteryjnych lub grzybiczych.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

1. Badanie związku pomiędzy składem jakościowym i ilościowym mikroflory (mikrobiomu) jamy ustnej a stężeniem hormonów płciowych.
2. Ustalenie, czy istnieje związek pomiędzy składem jakościowym i ilościowym mikroflory (mikrobiomu) jamy ustnej a stężeniami hormonów tarczycy.
3. Zbadanie, czy zmiany mikroflory (mikrobiomu) jamy ustnej, zarówno pod względem jakościowym jak i ilościowym, wpływają na stan kliniczny jamy ustnej badanych pacjentek.
4. Zbadanie, czy skład mikroflory (mikrobiomu) jamy ustnej koreluje w istotny sposób z kolonizacją dróg rodnych przez określone mikroorganizmy.
5. Zbadanie, czy u pacjentek obciążonych schorzeniami o podłożu hormonalnym, takimi jak PCOS i niedoczynność tarczycy istnieje skłonność do zasiedlania jamy ustnej przez określone drobnoustroje.

Badania Doktorantka przeprowadziła w grupie 112 kobiet, w wieku od 23 do 58 lat. Pacjentki zostały zbadane według ogólnie przyjętych zasad. Przeprowadzony został wywiad ogólny, w którym poza danymi osobowymi, informacjami na temat schorzeń ogólnych i przewlekle przyjmowanych leków, ujęto również dane dotyczące nawyków higienicznych w odniesieniu do jamy ustnej. Uzyskane informacje zostały zebrane w formularzu (załącznik 1), wypełnianym przez każdą z pacjentek, z odnotowaniem ewentualnych dolegliwości ze strony jamy ustnej, schorzeń ginekologicznych oraz zaburzeń hormonalnych. Biorąc

pod uwagę cel pracy, pytania zawarte w kwestionariuszu pozwoliły uzyskać dane od włączonych do badania pacjentek na temat takich schorzeń endokrynologicznych jak zespół policystycznych jajników (PCOS) oraz niedoczynność tarczycy.

- grupa I - kobiety zdrowe w wieku rozrodczym
- grupa II - pacjentki ciężarne
- grupa III - pacjentki przyjmujące doustną antykoncepcję hormonalną
- grupa IV - pacjentki w wieku okołomenopauzalnym.

Jako recenzent proponuję grupę I nazwać grupą kobiet z naturalnym cyklem płciowym, bo na podstawie pracy można sądzić, że grupa przyjmująca antykoncepcję nie jest zdrowa. W badanych grupach Doktorantka nie wyróżniła grupy z niedoczynnością tarczycy i grupy z zespołem PCOS.

Materiał do badania bakteriologicznego i mikrobiologicznego został pobrany pod postacią wymazu z błony śluzowej policzka prawego oraz z okolicy podjęzykowej po stronie prawej, jak również z błony śluzowej tylnego sklepienia pochwy. Oznaczano stężenie hormonów takich jak: TSH, FT3, FT4, LH, FSH, estradiol, progesteron, testosteron, prolaktyna, androstendion, dehydroepiandrosteron, zaś u kobiet ciężarnych dodatkowo ludzką gonadotropinę kosmówkową (beta-hCG). Uważam, że korzystniej byłoby oznaczać w grupie ciężarnych progesteron lub estriol i nie rozumiem, po co oznaczano beta-hCG.

W celu identyfikacji szczepów bakteryjnych wysiewano materiał biologiczny, z wymazów z jamy ustnej i pochwy, na płytki zawierające stałe podłoże agarowe. W analizie zostały zastosowane takie podłoża jak: Columbia agar wzbogacone krwią baranią w stężeniu 5%, MRS agar, agar czekoladowy, podłoże MacConkey i podłoże Schaedlera (firma BioMerieux). Celem identyfikacji wyhodowanych szczepów posłużono się testami API 20 Strep oraz testami ID 32 E i ID 32 GN, opartymi na ocenie

właściwości biochemicznych badanych drobnoustrojów. Celem identyfikacji mikroorganizmów grzybiczych materiał uzyskany z jamy ustnej i pochwy wysiewano na stałe podłoże agarowe z dodatkiem chloramfenikolu- agar Sabourauda, które następnie poddawano inkubacji w temperaturze 35 stopni Celsjusza. W dalszym ciągu wyhodowane szczepy grzybicze identyfikowano poprzez zastosowanie testów API 20C.

Wyniki badań Doktorantka przeanalizowała statystycznie przy użyciu programu R. Dla zmiennych ilościowych wyliczono średnią, odchylenie standardowe, medianę oraz kwartyle. Analizę zmiennych jakościowych przeprowadzono poprzez wyliczenie liczby i procentu wystąpień każdej z wartości. Zależność oceny ilościowej wzrostu drobnoustrojów od poziomu hormonów przedstawiła za pomocą współczynnika korelacji Spearmana.

Wyniki doktorantka przedstawiła na 14 rycinach i w 32 tabelach. W posiewach uzyskanych z jamy ustnej badanych pacjentek wykazano obecność różnych drobnoustrojów, a istotne statystycznie zależności potwierdzono w przypadku siedmiu gatunków bakterii, a mianowicie *Streptococcus salivarius, Streptococcus mitis, Streptococcus vestibularis, Rothia mucilaginosa, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus parainfluenze* i *Neisseria macae* oraz jednego gatunku flory grzybiczej należącego do rodzaju *Candida - Candida dubliniensis.* Wymienione mikroorganizmy należą do normalnej, fizjologicznej mikroflory jamy ustnej, są to drobnoustroje komensalne, których obecność w odpowiednich przedziałach ilościowych warunkuje utrzymanie homeostazy mikrobiologicznej, zapobiegając inwazji szczepów chorobotwórczych.

Wyniki badań własnych Doktorantka przedyskutowała z dotychczasowymi danymi literaturowymi. Według Doktorantki uzyskane wyniki przedstawiają istotną zależność między zmianami hormonalnymi a mikroflorą jamy ustnej, a ta ma wpływ na stan jamy ustnej a szczególnie próchnicy, ale również na ogólny stan zdrowia. Zmiany stężenia estradiolu

powodują zmiany w kolonizacji jamy ustnej przez *Streptococcus salivarius,* co według Doktorantki pozwala wskazać kolejny, może kluczowy czynnik odpowiedzialny za nasilenie choroby próchnicowej u kobiet ciężarnych. Według Doktorantki mniejsza liczebność tych dobroczynnych bakterii obserwowana w obecności podwyższonych stężeń estradiolu predysponuje do zasiedlenia jamy ustnej przez drobnoustroje próchnicotwórcze takie jak *Streptococcus mutans.* Doktorantka sugeruje, że podawanie probiotyków zawierających szczepy *Streptococcus salivarius* może przywrócić korzystne proporcje tego drobnoustroju w jamie ustnej. Niewątpliwie praca w sposób oryginalny podejmuje problem zmian mikroflory jamy ustnej w zależności od zmian hormonalnych u kobiet. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę, aby w języku polskim nie używać nazewnictwa poziom a stężenie, zawartość; steroidy a nie sterydy; w przypadku prolaktyny a podwyższone stężenia prolaktyny; dodatnia korelacja z prolaktyną a korelacja ze stężeniem; substancje dokrewne a hormony. Pracę kończy 6 wniosków. Według recenzenta, przy przygotowywaniu pracy do druku muszą być przeredagowane tak, aby były wnioskami a nie powtórzeniem wyników.

Podsumowując stwierdzam, że lek. dent. Katarzyna Macikowska przeprowadziła interesujące i potrzebne badania. Dlatego uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest oryginalnym osiągnięciem Autorki oraz spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym (Dz.U nr 65. Pozycja 595 z późn. zm. oraz art. 179 ust 1 z dnia 3 lipca 2018 roku). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lek. dent. Katarzyny Macikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

29 08 2022

KIEROWNIK
KLINIKI ROZRODCZOŚCI
I ENDOKRYNOLOGII GINEKOLOGICZNEJ

prof. dr hab. n. med. Sławomir Wołczyński