



Prof. dr hab. Gabriela Bugła-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

9.01.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Michał Jerzy Ochnik

Tytuł rozprawy: „*Analiza współzależności stanu zapalnego przyzębia i choroby Alzheimera – rola czynników zakaźnych oraz aktywacji i odpowiedzi obwodowych komórek odpornościowych*”

promotor: dr hab. Egbert Piasecki, prof. PAN

promotor pomocniczy: dr hab. Marta Sochocka

Rozprawa doktorska wykonana w Laboratorium Wirusologii

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk

Podstawa prawna: *niniejszą recenzję sporządzono w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Instytutu, z dnia 10 października 2024 r. dotyczącą powołania na recenzenta rozprawy doktorskiej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr inż. Michała Jerzego Ochnika.*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. W rozprawie Autor wyróżnił: *Streszczenie (Summary), Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski końcowe, Przyszłe kierunki badań, Bibliografię, Spis rysunków, Spis tabel oraz Dodatek.* Rozprawa przygotowana jest bardzo starannie i czytelnie. Podjęty przez Doktoranta temat jest interdyscyplinarny, niezwykle aktualny, ważny naukowo zarówno dla diagnostyki medycznej, medycyny, immunologii, bakteriologii, a także zdrowia publicznego. Podjęte badania i otrzymane wyniki dają podstawę do prowadzenia przyszłych badań. Należy wyróżnić poszukiwanie odpowiedzi na pytania dotyczące przyczyn rozwoju chorób, a w tym przypadku choroby neurodegradacyjnej, na którą nie istnieje skuteczny lek. Należy także docenić stawianie przez Doktoranta nowych hipotez w oparciu o aktualne dane i poszukiwanie odpowiedzi na aktualne problemy badawcze.

Hipotezy dotyczące tego, że infekcje oraz stan zapalny w organizmie mogą być czynnikami wpływającym na rozwój choroby Alzheimera sugerowane były już od dawna, jednak dopiero rozwój biologii molekularnej oraz mikrobiologii molekularnej dostarczyły wiarygodnych dowodów na ich poparcie. W ostatnich latach zaobserwowano znaczące zainteresowanie badaczy tą tematyką. W tym



obszarze badawczym także osadzone są badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Ważnym jest także podkreślenie, iż w ramach pracy doktorskiej prowadzone były badania immunologiczne wyjaśniające rolę obwodowych komórek odpornościowych i obwodowej wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w rozwoju choroby Alzheimera, gdyż jak zaznacza Autor rozprawy, brakuje jednoznacznych wyników i wniosków w tym obszarze.

Głównym celem pracy doktorskiej była analiza współzależności pomiędzy występowaniem choroby Alzheimera, zapalenia przyzębia (paradontozy), a funkcjonowaniem komórek odpornościowych. Założone cele pracy są prawidłowe. Autor rozprawy postawił 5 hipotez badawczych, a podkreślenia wymaga hipoteza 5 (H5) zakładająca, iż współwystępowanie choroby Alzheimera oraz zapalenia przyzębia (paradontozy) będzie wiązać się z dysbiozą jamy ustnej, osłabioną odpowiedzią obwodowych komórek odpornościowych i większym ogólnoustrojowym obciążeniem prozapalnym w chorobie Alzheimera. W oparciu o postawione hipotezy Autor rozprawy sprecyzował szczegółowe cele badawcze, których jest 9. Kluczowe dla prowadzonych badań jest postawione przez Doktoranta pytanie: Czy obwodowe komórki odpornościowe, wystawione na działanie patogenów oraz produktów metabolizmu ich komórek mogą wpływać na procesy zapalne w mózgu, a następnie czy procesy zapalne nasilają postęp choroby Alzheimera?

Wstęp jest opracowaniem teoretycznym wprowadzającym w eksperymentalną część pracy. Autor omawia w nim zagadnienia dotyczące choroby Alzheimera uwzględniając czynniki ryzyka rozwoju choroby, patofizjologię, rolę układu odpornościowego w przebiegu choroby ze szczególnym uwzględnieniem stanu zapalnego mózgu. Autor rozprawy przedstawia także hipotezę infekcyjną rozwoju choroby omawiając patogeny uznawane za czynniki ryzyka rozwoju choroby Alzheimera. Ważnym rozdziałem w pracy jest ten poświęcony wpływowi stanu zapalnego przyzębia (paradontozy) na przebieg i rokowania choroby. Uważam, że *Wstęp* napisany jest interesująco i świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki przez Doktoranta. Analizując ten rozdział rozprawy doktorskiej nasuwa się jednak kilka pytań i komentarzy.

- Autor pisze, cytując: „W 2019 roku zarejestrowano ponad 500 tys. przypadków, a według prognoz, do połowy wieku liczba Polaków z demencją przekroczy milion osób”. Czy Doktorant posiada bardziej aktualne dane w związku z tym, iż mamy rok 2025, a dane do pracy doktorskiej zostały zaczerpnięte z raportu z roku 2022. Czy są już dostępne bardziej aktualne informacje?
- Jaka jest opinia Doktoranta o obecnie prowadzonych badaniach nad przydatnością biomarkerów obecnych w osoczu czy płynie mózgowo-



rdzeniowym w diagnostyce choroby Alzheimera? Autor wspomina, iż z powodu braku specyficznego biomarkera diagnostyka jest utrudniona.

- Uwagi dotyczące nomenklatury i nazewnictwa struktur: *Candida albicans* nie należy do bakterii, *Salmonella* Typhimurium nie jest gatunkiem; lipopolisacharydu raczej nie powinniśmy nazywać substancją produkowaną przez bakterie, a raczej strukturą wytwarzaną przez komórkę bakterii (str. 21 i 35 rozprawy doktorskiej).
- We *Wstępie* umieszczono bardzo czytelne ryciny, czy ich autorem jest Doktorant? Czy powstały one w oparciu o publikacje – brakuje tej informacji w tekście.

Rozdział *Materiały i Metody* opracowany został starannie. Metodyka opisana jest szczegółowo, jednak w tekście nie ma zasadniczo odniesień literaturowych do zastosowanej metodologii. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz metod jakie w swoich badaniach zastosował Doktorant, tj. badań z obszaru diagnostyki laboratoryjnej, biologii molekularnej, immunologii czy mikrobiologii. Doktorant prowadził m.in. eksperymenty z wykorzystaniem linii komórkowych, izolacji leukocytów z krwi obwodowej, oznaczenia stężenia cytokin, izolacji RNA i syntezy komplementarnego DNA, izolacji genomowego DNA, genotypowania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, izolacji bakteryjnego DNA czy przygotowania bibliotek i sekwencjonowania 16S rDNA. Na szczególne wyróżnienie zasługuje bardzo rozbudowana i wyróżniająca się metodyka dotycząca analizy statystycznej. Ta część pracy przedstawiona jest drobiazgowo. Pomocna do analizy wyników jest tabela 14, w której zestawiono wskaźniki siły efektu wraz z interpretacją dla danego testu statystycznego.

- Czy Doktorant wprowadzał do metodyki jakieś modyfikacje własne, czy korzystano tylko z instrukcji producentów gotowych zestawów lub prac opublikowanych wcześniej?

Rozdział *Wyniki* opracowany został w sposób dokładny. Otrzymane wyniki zebrano w czytelnych tabelach i umieszczono na wykresach. W czasie analizy otrzymanych wyników zabrakło mi jednak wiązania ich z postawionymi wcześniej hipotezami i celami szczegółowymi pracy, zabrakło odnośników do szczegółowo spisanych i ponumerowanych celów rozprawy doktorskiej. Takie omawianie uzyskanych wyników znacząco ułatwiłoby analizę tekstu.

Autor dysertacji, dzięki zaawansowanej analizie statystycznej poczynił wiele interesujących obserwacji i wyciągnął na tej podstawie ważne wnioski. W mojej opinii najcenniejsze wyniki dotyczą:

1. wykazania, iż wraz ze stopniem klinicznego zaawansowania choroby Alzheimera pogarsza się stan periodontologiczny pacjentów oraz że właśnie obciążenie stanem zapalnym przyzębia u pacjentów demencyjnych może



istotnie wpływać na pogarszanie funkcji poznawczych i postęp w chorobie Alzheimerera;

2. wykazania, iż u pacjentów z chorobą Alzheimerera obwodowe komórki odpornościowe nie traktowane lipopolisacharydem z *Porphyromonas gingivalis* wytwarzały mniej TNF- α , IL-1 β , IL-10 oraz IL-6 w porównaniu do osób zdrowych;
3. zaobserwowania, iż obecność antygeny LPS-PG prowadzi do gwałtownej odpowiedzi immunologicznej (większy wyrzut mediatorów stanu zapalnego) u pacjentów z chorobą Alzheimerera;
4. wskazanie, iż osoby zdrowe miały bardziej zróżnicowany mikrobiom jamy ustnej niż osoby chore oraz że wraz z rozwojem paradontozy dochodzi do zmniejszenia różnorodności mikrobioty jamy ustnej u osób chorych.

Interesujące badania dotyczyły charakterystyki taksonomicznej mikroorganizmów u osób chorych oraz zdrowych.

- Czy Doktorant ma wytłumaczenie dla uzyskanego wyniku wskazującego na to, iż osoby z chorobą Alzheimerera charakteryzują się wyższą względną obfitością *Bacteroidetes* oraz bakterii z rodzaju *Porphyromonas* w porównaniu z osobami zdrowymi?

Dyskusja poprowadzona jest w sposób prawidłowy i bardzo dojrzały naukowo. Autor rozprawy dokładnie analizuje uzyskane wyniki własne oraz koreluje je z innymi autorami. Szczególnie chciałabym wyróżnić ciekawie poprowadzoną dyskusję wyników dotyczących różnorodności mikrobioty jamy ustnej badanych pacjentów w odniesieniu do wskaźnika higieny.

- Biorąc pod uwagę nie do końca możliwe do wyjaśnienia otrzymane wyniki analiz taksonomicznych bakterii, jaka jest opinia Doktoranta dotycząca faktu, iż na różnorodność mikrobioty jamy ustnej wpływ mogą także wywierać m.in. dieta czy palenie papierosów.
- Drobną uwagę dotyczy opisu budowy LPS (str.123) gdzie prawdopodobnie Doktorant użył skrótów myślowych pisząc o „łańcuchach lipidu A”, „cylindrze z 6 łańcuchów” czy „zawadach sterycznych”.

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki wnoszą nowe dane do dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscypliny nauki biologiczne, gdyż w pracy m. in pokazano, iż może istnieć związek między paradontozą, a chorobą Alzheimerera. Wykazano także że stan zaawansowania choroby Alzheimerera i paradontozy są ze sobą dodatnio skorelowane. W rozprawie doktorskiej Autor



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

umieścić rozdział pt. „ *Wnioski końcowe* ” , które zawierają ważne rekomendacje medyczne oraz społeczne.

Bibliografia wykorzystana w pracy jest bardzo aktualna, Doktorant dokonał analizy 266 prac naukowych.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam iż rozprawa doktorska mgr inż. Michała Jerzego Ochnika pt. „ *Analiza współzależności stanu zapalnego przyzębia i choroby Alzheimera – rola czynników zakaźnych oraz aktywacji i odpowiedzi obwodowych komórek odpornościowych* ” jest ciekawa, porusza aktualne problemy badawcze i została przygotowana starannie, spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.).” Jednocześnie wnoszę do Rady Naukowej Instytutu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na wysoki poziom zaprezentowanych badań naukowych, elementy badań nowatorskich oraz nowoczesną metodykę badawczą.

Zakład Mikrobiologii
KIEROWNIK
Gabriela Bugla-Płoskońska
prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska