



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII,
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

Dr hab. Joanna Koziel

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister inżynier Anny Mieszkowskiej zatytułowanej
„Ocena *in vitro* właściwości przeciwwzapalnych ramnogalakturonanu-I do zastosowania w
modyfikacji powierzchni tytanowych implantów stomatologicznych”**

Przedstawiona do oceny dysertacja została wykonana pod kierunkiem promotora pana prof. dr hab. inż. Korneliusza Mikscha z Politechniki Śląskiej oraz kopromotora pani dr n. med. Katarzyny Gurzawskiej z Uniwersytetu w Birmingham.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa została przedstawiona jako zestaw trzech publikacji doświadczalnych, co jest zgodne ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), która stwierdza, że rozprawa doktorska może mieć formę „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopiśmie naukowych (...)*”. Artykuły te, zostały przedstawione jako załączniki rozprawy, a poprzedzają je: streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wprowadzenie, tezy i cele pracy, materiały i metody, omówienie i dyskusja wyników oraz wnioski końcowe. Ponieważ zgodnie z w/w ustawą, rozprawę doktorską może stanowić „(...) *samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy (...)*”, stąd Doktorantka zebrała oświadczenia od wszystkich współautorów publikacji, w których oszacowano procentowy udział zaangażowania poszczególnych wykonawców. Według przedstawionej dokumentacji udział Doktorantki mieścił się w zakresie 40-60%. Tu prosiłabym o szczegółowe wyjaśnienie podczas publicznej obrony, jaką rolę odgrywała pani Mieszkowska w procesie powstawania poszczególnych publikacji. Do rozprawy dołączone zostały również dwie publikacje doświadczalne stanowiące uzupełnienie wiodącego tematu pracy, których pani Mieszkowska jest współautorem, a w których jej udział procentowy wynosił odpowiednio 5% i 15%.

Ocena merytoryczna pracy

Rozprawa doktorska koncentruje się na badaniach dotyczących zastosowania ramnogalakturonanu-I (RG-I) w modyfikacji powierzchni tytanowych implantów

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6377
email: joanna.koziel@uj.edu.pl

stomatologicznych. Jak podkreśliła Doktorantka, współczesna, prężnie rozwijająca się implantologia praktycznie nie istnieje bez rozbudowanego zaplecza inżynierii biomateriałów, której celem jest uzyskanie związków o wysokiej biogodności, które sprzyjałyby osteointegracji, działały antybakteryjnie, a jednocześnie nie prowadziły do nadmiernej aktywacji układu immunologicznego. Prowadzone badania zdecydowanie wpisują się więc w nurt aktualnych problemów kliniczno-epidemiologicznych, bowiem wzrastającej liczbie pacjentów poddawanych zabiegom implantacji towarzyszy wysoki odsetek odrzutów tych materiałów.

Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie w problematykę rozprawy. Na uwagę zasługuje szczegółowy opis mechanizmu procesu osteointegracji, co zostało okraszone stosownym schematem oraz obecnie stosowanych modyfikacji implantów, w tym wykorzystanie ramnagalakturonanu-I. Autorka opisuje również najczęstsze przyczyny zaburzeń procesu osteointegracji, podkreślając problematykę generacji biofilmu nazębnego, który kumulowany w kieszonkach dziąsłowych prowadzi do dysbiozy flory bakteryjnej, promując rozwój gatunków patogennych. Tezy i cele pracy zostały jasno sprecyzowane i odpowiadają poszczególnym publikacjom badawczym ujętym w niniejszej rozprawie. Opis metodyki jest pobieżny, co nie stanowi zarzutu, gdyż każdorazowo czytelnik rozprawy jest odsyłany do załączonych publikacji. Omówienie uzyskanych wyników i ich dyskusja jest najlepszą częścią tej pracy. Została ona napisana ciekawie, wywód poprowadzono logicznie, a poczynione obserwacje odniesiono do danych literaturowych. Pracę wieńczą wnioski końcowe, które nie zawsze zostały właściwie sformułowane. Przykładowo (wniosek 1), na podstawie wyników prowadzonych badań nie można wnioskować, że zahamowanie stanu zapalnego wpływa na obserwowaną aktywność proliferacyjną, metaboliczną, czy mineralizację. Podobnie w przypadku wniosku nr 2. Związek przyczynowo-skutkowy nie został bowiem wykazany w żadnej z prac, a można jedynie go rozważać jako jeden z hipotetycznych mechanizmów.

W skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wchodzi trzy wieloautorskie publikacje, których Doktorantka jest pierwszym autorem. Prace skonstruowane są według podobnego schematu. Przedstawiają szczegółowo obserwacje zmian patofizjologicznych, jakie zachodzą *in vitro* w komórkach zainfekowanych *Porphyromonas gingivalis* w obecności ramnagalakturonanu-I oraz jego enzymatycznie modyfikowanej formy z krótszymi łańcuchami zawierającymi arabinozę. Uzyskane wyniki stanowią ciekawe obserwacje, jednakże w żadnej z prac nie podjęto próby wyjaśnienia ich mechanizmu molekularnego. Wszystkie publikacje zostały oparte na podobnym szablonie polegającym na ocenie podstawowych parametrów typowych dla funkcji badanych populacji komórek, w tym ostoblastów, fibroblastów i makrofagów. Zaletą tego zabiegu jest kompleksowy obraz wpływu badanych pektyn na różne

rodzaje komórek o istotnej roli w procesie osteointegracji. Nie zastępuje to wprawdzie badań *in vivo*, niemniej jednak przybliży nas do ostatecznego zdefiniowania działania tych związków w żywym organizmie. W mojej opinii zastosowano prawidłową metodologię naukową, typową dla tego typu artykułów. Ponadto biorąc pod uwagę, że zostały one opublikowane w recenzowanych czasopismach (ang. *peer review*) i przyjęte do druku przez niezależnych redaktorów, nie mam większych zastrzeżeń do ich treści.

Pierwsza z publikacji zatytułowana „*Plant-derived pectin nanocoatings to prevent inflammatory cellular response of osteoblasts following Porphyromonas gingivalis infection.*” opublikowana w *International Journal of Nanomedicine* koncentruje się na osteoblastach. Badania prowadzone na komórkach mysich wykazały, że stosowane pektyny wzmagają proces proliferacji, aktywność metaboliczną oraz mineralizację. Jednocześnie wykazano, że zastosowanie szczególnie modyfikowanego ramnogalakturonanu-I redukuje odpowiedź zapalną tych komórek. Druga z prac opublikowana w czasopiśmie *Journal of Biomedical Materials Research Part A* nosi tytuł „*Pectin nanocoating reduces proinflammatory fibroblast response to bacteria.*” i stanowi kontynuację badań nad zastosowaniem badanych pektyn. W niniejszej publikacji wykazano ten sam fenomen, który opisano w pierwszej z prac, ale w tym wypadku posłużono się modelem pierwotnych, ludzkich fibroblastów. Celem trzeciej publikacji pt.: „*Pectin coating of titanium and polystyrene surfaces modulates the macrophage inflammatory response.*”, która ukazała się w *European Journal of Biological Research* była ocena analogicznych jak poprzednio zmian, ale w modelu pierwotnych ludzkich makrofagów różnicowanych z monocytów krwi obwodowej. Uzyskane wyniki korelują z tymi, które otrzymano w toku wcześniejszych prac, bowiem potwierdzają antyzapalną rolę modyfikowanego ramnogalakturonanu-I.

Pytania i uwagi

W związku z lekturą rozprawy Doktorantki mam dwa pytania:

1. Najciekawszym aspektem badań nad antyzapalną rolą pektyn jest poznanie mechanizmu ich działania. Ponieważ nie podjęto próby tego typu analiz w przedstawionej do oceny pracy, to proszę o (1) syntetyczne omówienie, jakie mechanizmy antyzapalne pektyn zostały dotychczas udowodnione, (2) zaprezentowanie na podstawie własnych wyników badań lub analiz, hipotetycznych ścieżek przekazu sygnału komórkowego, w których rzeczony ramnogalakturonan-I i/lub jego pochodne mogłyby brać udział, (3) przedstawienie przykładowego planu badań, który mógłby posłużyć identyfikacji tych mechanizmów.

2. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w publikacji pierwszej i drugiej nie przedstawiono wyników uzyskanych dla komórek niezainfekowanych, a traktowanych pektynami jako kontroli? Ramnogalakturonan-I znacząco wpływa na fizjologię komórek nieinfekowanych *P. gingivalis* (publikacja 4), więc istotnym jest uwzględnienie tego działania w ostatecznej interpretacji wyników uzyskanych dla komórek zainfekowanych.

Nie zgłaszam uwag względem przedstawionej mi do oceny pracy.

Ocena edytorska

Rozprawa pani magister Mieszkowskiej podzielona jest na podrozdziały i składa się ze: streszczeń w języku polskim i angielskim, spisu stosowanych skrótów, wstępu, tezy i celu pracy, materiałów i metod, omówienia i dyskusji wyników, wniosków końcowych oraz spisu literatury. Posiada także załączniki, jakimi są: teksty trzech publikacji doświadczalnych (omówionych powyżej, stanowiących podstawę dysertacji) oraz pozostałych dwóch (również współautorstwa Doktorantki, które tematycznie nawiązują do tematu rozprawy). Wspomniane powyżej oświadczenia współautorów prac nie stanowią integralnej części rozprawy, ale zostały udostępnione Recenzentowi. Praca została złożona z należytą starannością. Zadbano o oprawę graficzną i stosowne schematy, które ułatwiają lekturę tematu.

Podsumowanie

Podsumowując, należy zaznaczyć, że badania prezentowane w publikacjach pani Mieszkowskiej prezentują poprawny warsztat naukowy. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania stanowią logiczny ciąg analiz i są spójne tematycznie. Uzyskane wyniki pogłębiły wiedzę dotyczącą wpływu ramnogalakturonanu-I i jego modyfikowanych form na fizjologię komórek obecnych w przyzębiu (osteoblasty, fibroblasty i makrofagi), zakażonych najczęściej identyfikowanym w tej chorobowo zmienionej tkance gatunkiem bakterii, jakim jest *P. gingivalis*. Pragnę na zakończenie podkreślić znaczącą aktywność naukową Doktorantki, której wymiernym efektem są nie tylko publikacje wchodzące w skład niniejszej dysertacji, ale również pozostałe dwa artykuły, co jest znaczącym dorobkiem naukowym. Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu rozprawom i wnoszę do Rady Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr Anny Mieszkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Joanna Kozieł

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
Zakład Mikrobiologii

