



Politechnika Łódzka

Instytut Biochemii Technicznej

Łódź, dn. 30.11.2018 r.

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach
Instytut Biochemii Technicznej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul Stefanowskiego 4/10
90-924 Łódź

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Folkert

„Wpływ ramnogalakturonanu-I na proces osteointegracji. Badania *in vitro*”

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jej autorka, mgr inż. Justyna Folkert podejmuje zadanie ewaluacji dwóch typów ramnogalakturonanu-I w kierunku ich zastosowania jako warstw modyfikujących powierzchnię wszczepów śródkostnych.

Do głównych czynników mających wpływ na proces osteointegracji, czyli bezpośredniego połączenia strukturalnego i czynnościowego implantu z tkanką kostną, zalicza się przede wszystkim rodzaj warstwy wierzchniej wszczepu. Z tego względu powierzchnie wszczepów poddawane są różnorodnym modyfikacjom zwiększającym trwałość połączenia implant-kość oraz wpływających pozytywnie na sam proces gojenia się tkanek na styku z powierzchnią implantu. Chociaż sukces w leczeniu implantoprotetycznym jest wynikiem wielu opracowanych już procedur, niestety, w niektórych przypadkach proces gojenia nie zachodzi prawidłowo. Co więcej, choć tylko w kilkuprocentowym wymiarze, implantologiczne niepowodzenia mogą nawet prowadzić do usunięcia wszczepu z organizmu. Nową strategią rozwiązania tego problemu może się stać pokrycie implantu biomateriałem stanowiącym dodatkowe rusztowanie, ułatwiające komórkom zasiedlanie i prawidłowe funkcjonowanie.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Justyny Folkert, doskonale wpisuje się w ten nurt badań i jest poświęcona analizom właściwości biologicznych niemodyfikowanego (PU) oraz modyfikowanego (PA) ramnogalakturonanu-I (RG-I) wyizolowanego z ziemniaka. Niemodyfikowany RG-I jest polimerem zbudowanym z naprzemiennie połączonych reszt kwasu D-galakturonowego i L-ramnozy, gdzie w łańcuchu





bocznym ramnozy występują połączone w sposób liniowy lub rozgałęziony reszty L-arabinozy i/lub D-galaktozy. Zastosowana w przedstawionej dysertacji enzymatyczna modyfikacja RG-I miała na celu usunięcie podstawników arabinozylowych, co wpłynęło na zwiększenie dostępności reszt galaktozylowych.

Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Korneliusza Mikscha oraz kopromotora dr Katarzyny Gurzawskiej. Dr Gurzawska od kilku lat prowadzi z sukcesem badania nad osteointegracją w implantologii jamy ustnej oraz modyfikacjami powierzchni tytanowych implantów dentystycznych. Rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Folkert wpisuje się w ten niezwykle interesujący nurt badań. Badania przedstawione w dysertacji były prowadzone wielośrodkowo (na Wydziale Periodontologii Uniwersytetu Medycznego Charite w Berlinie (Niemcy), w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej w Gliwicach oraz w Szkole Stomatologii Uniwersytetu w Birmingham w Wielkiej Brytanii), co należy podkreślić jako niezwykle ważny czynnik dla rozwoju młodej kadry naukowej.

Rozprawa doktorska została napisana w oparciu o cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji, w których Pani mgr inż. Justyna Folkert jest pierwszym autorem. Uwzględniając załączone do recenzowanej pracy oświadczenia współautorów stwierdzam bezsprzecznie, że Doktorantka pełniła w tych badaniach kluczową rolę. Materiał zawarty w oryginalnych publikacjach został opublikowany w anglojęzycznych czasopismach *International Journal of Nanomedicine*, *Starch* i *Engineering of Biomaterials*. Komentarz do rozprawy obejmuje łącznie 48 stron maszynopisu i zawiera przedmowę, streszczenie w języku polskim i angielskim, indeks skrótów, wprowadzenie, wyraźnie zaznaczony cel pracy, materiały i metody, wyniki i ich dyskusję, podsumowanie oraz wykaz stosowanej bibliografii. Na końcu zostały dołączone trzy publikacje, będące podstawą o ubieganie się o stopień doktora, a także dwie publikacje współautorstwa Pani Folkert, będące uzupełnieniem merytorycznym przedstawionego tematu.

Całkowity współczynnik wpływu *Impact Factor* dla cyklu publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora wynosi 6,543 (67 pkt MNiSW), a sumaryczny *IF* wszystkich publikacji, w których Doktorantka jest współautorem to 14,286 (137 pkt MNiSW), co jest wynikiem bardzo dobrym, jak na ten etap kariery naukowej. Uzyskane wyniki zostały otrzymane w oparciu o realizację dwóch projektów finansowanych ze środków Unii





Europejskiej w ramach działań Maria Skłodowska-Curie oraz przez Politechnikę Śląską w Gliwicach.

Zadania badawcze zaplanowane przez Doktorantkę zostały w pełni zrealizowane. Do osiągnięcia założonych celów Doktorantka zastosowała podejście oparte na wykorzystaniu hodowli homórek *in vitro*, analizy mikroskopowe, klasyczne techniki biologii molekularnej t.j. reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją i z analizą pomiaru ilości produktu w czasie rzeczywistym oraz testy funkcjonalne. Jako modele komórkowe Pani Folkert wykorzystala zarówno komórki pierwotne (mysie osteoblasty izolowane z kości czaszki, fibroblasty dziąsła ludzkiego oraz ludzkie polimorfonuklearne leukocyty krwi obwodowej), jak również ustaloną linię komórkową MC3T3-E1 (mysie, prawidłowe osteoblasty). Dobór w/w modeli jest niezwykle trafny biorąc pod uwagę ich udział w procesie osteointegracji. Osteoblasty znajdujące się na zewnętrznej powierzchni blaszek kostnych są odpowiedzialne za syntezę, a następnie mineralizację macierzy kostnej. Z kolei spośród różnych typów komórek, jakie występują w błonie śluzowej dziąsła najliczniej reprezentowane są fibroblasty, ale spotyka się również inne typy komórek, w tym charakterystycznych dla tkanki łącznej komórki tuczne, makrofagi, komórki plazmatyczne czy granulocyty. Część eksperymentalna pracy koncentruje się wokół pięciu głównych zagadnień t.j. 1) określenia wpływu niemodyfikowanego oraz modyfikowanego ramnogalakturonanu-I na aktywność proliferacyjną i metaboliczną modeli komórkowych, 2) obrazowania morfologii komórek za pomocą mikroskopii świetlnej i skaningowego mikroskopu elektronowego, 3) analizy cyklu komórkowego za pomocą sortowania heterogennej mieszaniny komórek aktywowanych fluorescencją (FACS), 4) oceny stopnia mineralizacji oraz 5) ilościowego określenie relatywnej ekspresji wybranych genów. Z niezwykle cennych z mojego punktu widzenia obserwacji wynikających z prowadzonych prac należy wymienić m.in. wykazanie, że w odpowiedzi na obecność niemodyfikowanego (PU), a zwłaszcza modyfikowanego (PA) RG-I komórki wykazują zwiększoną aktywność proliferacyjną i metaboliczną oraz modulują przebudowę mikrośrodowiska na drodze proteolizy składników substancji międzykomórkowej z zaangażowaniem receptorów i cytokin.

W pracy nie znajduję poważniejszych błędów edytorskich czy też istotnych niedociągnięć. Spośród tych pierwszych można zwrócić uwagę na błąd w schemacie





przedstawiającym kolejne etapy badań *in vitro* (pomiar proliferacji BrdV zamiast BrdU oraz nazwy genów mysich pisane wielką literą)

Wymienię natomiast kilka uwag merytorycznych dotyczących treści polskojęzycznego komentarza:

1. Doktorantka konsekwentnie używa sformułowań wskazujących na to, że arabinoza ma strukturę łańcuchową, a nie jest monosacharydem, np. „modyfikowany RG-I o krótszych łańcuchach arabinozy” lub „w łańcuchu bocznym ramnozy mogą występować liniowe lub rozgałęzione reszty D-galaktozy, L-arabinozy lub arabinogalaktany” lub „enzymatycznie modyfikowany RG-I, charakteryzujący się krótszymi łańcuchami bocznymi arabinozy”
2. Pani Folkert używa nazewnictwa „szczep *E. coli*”, nie podając jednak konkretnej nazwy tego szczepu. *E. coli* to nazwa gatunkowa, a nie identyfikacja konkretnego szczepu. W tym punkcie mam też pytanie, czy w ogóle powinna być użyta nazwa „szczep”. W oryginalnym artykule w sekcji Materiały i Metody umieszczona jest informacja „PMN were treated with *E. coli* serotype O26:B6 LPS”. Proszę wobec tego o ustosunkowanie się do tej uwagi.
3. Na str. 11 widnieje wniosek, iż „zastosowanie RG-I może wpływać na stabilność implantów”. W jaki sposób? Poproszę o odpowiedni komentarz

Poza tym lektura załączonych artykułów stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora również nasunęła mi pewne wątpliwości:

A. Artykuł “Nanocoating with plant-derived pectins activates osteoblast response *in vitro*”.

1. Detekcja RG-I na powierzchni płytek do hodowli komórek

“After 21 days of cell culture, the results still showed presence of PU and PA, but with lower amount than before the *in vitro* test” oraz “The proliferation of WT cells at PA was higher than at PU, and proliferation at PU was higher than at the control TCPS surface in each period of time, 12, 24, 48, and 72 hours.”





Czy różnice w ilości PU I PA są znamienne statystycznie, gdyż spadek w stosunku do wartości wyjściowych jest niewielki?

2. W artykule znajdują się sprzeczne informacje dotyczące wpływu RG-I na procesy proliferacji i mineralizacji

Na str 243 znajdujemy informację “RG-I coating did not influence the proliferation of MC3T3-E1 and primary osteoblasts as compared to the uncoated controls after 12, 24, 48, and 72 hours (Figure 3)”. Z kolei na str 247 czytamy “The highest proliferation (BrdU) of MC3T3-E1 and WT cells at different end points was reported on PA-coated surface with high content of galactose” .

Podobne nieścisłości dotyczą pomiaru stopnia mineralizacji (str 243 “The mineralization assay showed no significant increase in matrix deposition for cells cultured on surfaces coated with PU and PA compared to control TCPS for MC3T3-E1 and WT after 3, 7, 14, and 21 days”, a na str 247 “In this study, we proved that high content of galactose, present in PA and PU, promoted osteoblasts to produce mineralized matrix”. Podobna nieścisłość widnieje w opisie wyników dla analizy cyklu komórkowego metodą FACS. Proszę więc o przygotowanie odpowiedniego komentarza.

B. Artykuł „Plant-derived rhamnogalacturonan-I’s modulate proinflammatory cytokine gene expression in neutrophils stimulated by E. coli LPS and P. gingivalis bacteria”

Jako model komórkowy Pani mgr inż. Justyna Folkert zastosowała ludzkie polimorfonuklearne leukocyty krwi obwodowej (ang. polymorphonuclear leukocytes, PMN). W komentarzu polskim Doktorantka używa terminu pierwotne ludzkie neutrofile na określenie tych komórek. Proszę o wyjaśnienie definicji komórek PMN.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji dysertację oceniam bardzo wysoko, a powyższe uwagi mają na celu jedynie korektę pracy. Cele zostały jasno określone, a cykl eksperymentalny dobrze przemyślany. Dlatego stwierdzam, że rozprawa mgr inż. Justyny Folkert spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Z pełnym przekonaniem wnioskuję więc do Rady Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej o





przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Justyny Folkert do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie chciałabym podkreślić, iż dorobek naukowy Pani mgr inż. Justyny Folkert jest wysoki, jak na ten etap rozwoju kariery naukowej. Jest ona współautorem sześciu prac naukowych, w tym czterech opublikowanych w czasopismach ujętych w zbiorach Journal Citation Report (dwie prace w *International Journal of Nanomedicine*, jedna praca w *Starch* oraz jedna w *Journal of Biomedical Materials Research Part A*). Pozostałe dwa artykuły ukazały się w *Engineering of Biomaterials* i *Archives Of Environmental Protection*. Z tego względu oraz z uwagi na znaczący wkład w poszerzenie i weryfikację dotychczasowej wiedzy naukowej, wnioskuję by wyróżnić recenzowaną pracę doktorską, jeżeli oczywiście zostaną spełnione wszystkie kryteria wymagane przez Radę Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej.

Edeyta Gembasewska-Danowska

