



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Recenzja rozprawy doktorskiej magister inżynier Justyny Folkert zatytułowanej:

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

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

Formalny opis rozprawy

Rozprawa została przedstawiona jako zestaw trzech wieloautorskich 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 czasopismach naukowych (...)*”. Artykuły te, zostały przedstawione jako załączniki rozprawy, a poprzedzają je merytoryczne części takie jak: streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wprowadzenie, tezy i cele pracy, materiały i metody, omówienie i dyskusja wyników oraz wnioski końcowe. Dodatkowo w tej pracy doktorskiej zamieszczono także dwa artykuły, w których, mgr inż. Folkart jest współautorem a przedstawione w nich wyniki stanowią uzupełnienie do dyskutowanych w rozprawie wyników. Prace te nie są jednak wliczane w bezpośredni dorobek naukowy będący podstawą pracy doktorskiej. 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 (...)*”, Doktorantka załączyła oświadczenia, że jej wkład w każda z 3 publikacji, których jest pierwszym autorem obejmował (i) współudział w planowaniu badań; (ii) przeprowadzenie badań; (iii) zebranie danych, analizę statystyczną

i przygotowanie wyników badań do analizy; (iv) interpretację i dyskusję wyników; oraz (v) zebranie piśmiennictwa.

Tu prosiłabym o szczegółowe wyjaśnienie podczas publicznej obrony, jaką rolę w uzyskaniu wyników i przygotowania publikacji odegrali pozostali współautorzy prac. Chciałbym się również dowiedzieć jak Doktorantka ocenia swój udział w dwóch publikacjach doświadczalnych stanowiące uzupełnienie wiodącego tematu pracy, w których jest współautorem.

Ocena edytorska i merytoryczna pracy

Celem tej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu ramnogalakturonanu-I (RG-I) w formie niemodyfikowanej (PU) oraz modyfikowanej enzymatycznie (PA) przez skrócenie arabinozowych łańcuchów bocznych pektyn jako biomateriału do powlekania powierzchni tytanowych implantów śródkostnych w celu ich lepszej osteointegracji. W swojej pracy Doktorantka porównała wpływ modyfikacji powierzchni polistyrenowych i dysków tytanowych PU lub PA na trzy typy komórek: osteoblasty mysie, ludzkie fibroblasty dziąsłowe oraz ludzkie neutrofile, które odgrywają kluczową rolę w przebudowie tkanki kostnej, a przez to są bardzo istotne procesie osteointegracji. W przypadku osteoblastów i fibroblastów Doktorantka wykazała pozytywny wpływ opłaszczenia powierzchni polistyrenowych pektyną na proliferację, mineralizację macierzy kostnej i wzmożoną ekspresję genów istotnych w procesie kościotworzenia. W przypadku neutrofilii modyfikacja powierzchni tytanowej RG-I hamowała prozapalną odpowiedź tych komórek immunologicznych na LPS z *E. coli* i infekcję *P. gingivalis*. W każdym przypadku modyfikowana pektyna RG-I (PA) wykazywała silniejszy pozytywny efekt od niemodyfikowanej pektyny (PU). Z przedstawionych w pracy wyników jednoznacznie wynika, że ramnogalakturonanu-I cechuje się bardzo dobrą biogodnością i może znaleźć zastosowanie do modyfikacji warstwy wierzchniej implantów stomatologicznych. Biorąc pod uwagę logarytmicznie wzrastającą liczbę pacjentów poddawanych zabiegom implantacji, wyniki opisane w tej pracy doktorskiej mogą się przyczynić do polepszenia osteointegracji implantów stomatologicznych i stanowią więc istotny wkład w inżynierię biomateriałów.

Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie w problematykę rozprawy. Na uwagę zasługuje szczegółowy opis mechanizmu procesu osteointegracji zilustrowany bardzo czytelnym schematem. Autorka pracy opisuje również metody stosowane w modyfikacji implantów z szczególnym uwzględnieniem modyfikacji powierzchni pektynami, w tym przede wszystkim ramnogalakturonanu-I. Omówiona jest struktura chemiczna RG-I i metody modyfikacji tej pektyny. Na koniec przedstawione są metody biologicznej oceny biozgodności biomateriałów. Podsumowując, ta część jest bardzo dobrze napisana, przeczytałem ją z zaciekawieniem i wiele się dowiedziałem.

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 bezwzględnie najlepszą częścią rozprawy. Na pochwałę zasługuje szczególnie bardzo klarowne i logicznie przedstawienie swoich wyników w odniesieniu do danych literaturowych. Ostatnią częścią pracy jest podsumowanie, które w punkt po punkcie przedstawia pozytywne wpływy modyfikacji powierzchni pektyną na odpowiedź komórek odgrywających rolę w osteointegracji.

W skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wchodzi trzy wieloautorskie publikacje, których Doktorantka jest pierwszym autorem. Prace skonstruowane są według podobnego schematu. W każdej z nich porównano wpływ modyfikacji powierzchni modyfikowaną (PA) i niemodyfikowaną (PU) pektyną na parametry typowe dla funkcji badanych populacji komórek. W pierwszej publikacji są to osteoblasty, w drugiej fibroblasty, a w trzeciej neutrofile. Zaletą takiego zaprojektowania badań było udowodnienie biozgodności RG-I i bezpośrednie porównanie potencjału osteointegracyjnego modyfikowanej i niemodyfikowanej pektyny. Uzyskane wyniki są ciekawe, jednakże w żadnej z prac nie podjęto próby wyjaśnienia mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za różnice odpowiedzi komórkowych na interakcję z pektyną. Ta uwaga nie jest krytyczna, bo dla tego typu artykułów zastosowano prawidłową metodologię naukową. Ponadto biorąc pod uwagę, że zostały one opublikowane w recenzowanych czasopismach (dwa z nich z Listy Filadelfijskiej z wysokim współczynnikiem oddziaływania) na podstawie oceny przez

ekspertów w dziedzinie biomateriałów i przyjęte do druku przez niezależnych redaktorów, nie mam żadnych zastrzeżeń co merytorycznej zawartości prac.

Pierwsza z publikacji zatytułowana: *Nanocoating with plant-derived pectins activate osteoblast response in vitro* opublikowana w *International Journal of Nanomedicine* (Dovepress, 5-cio letni IF= 5.154) koncentruje się na porównaniu wpływu modyfikacji powierzchni polistyrenowych RG-I na osteoblasty. Badania prowadzone na pierwotnych osteoblastach mysich oraz mysiej linii komórkowej wykazały, że stosowane pektyny wzmagają proces proliferacji, aktywność metaboliczną oraz mineralizację. Druga z prac opublikowana w czasopiśmie *Starch* (Wiley, IF>2) pod tytułem: *Surface nanocoating with plant-derived pectins improves fibroblast response in vivo* stanowi kontynuację badań nad zastosowaniem badanych pektyn w kontekście odpowiedzi ludzkich dziąsłowych fibroblastów na modyfikację powierzchni pektyną. W tej publikacji przeanalizowano dokładnie parametry fizykochemiczne zmodyfikowanych pektyną powierzchni. Celem trzeciej publikacji pt.: *Plant-derived ramnogalakturonanu-I's modulate proinflammatory cytokine gene expression in neutrophils stimulated by E. coli LPS and P. gingivalis bacteria*, która ukazała się w *Engineering of Biomaterials* była ocena wpływu modyfikacji powierzchni tytanowej pektyna na ekspresję cytokin. Uzyskane wyniki korelują z tymi, które otrzymano w toku wcześniejszych prac, bowiem potwierdziły antyzapalną rolę pektyny, a zwłaszcza modyfikowanego ramnogalakturonanu-I.

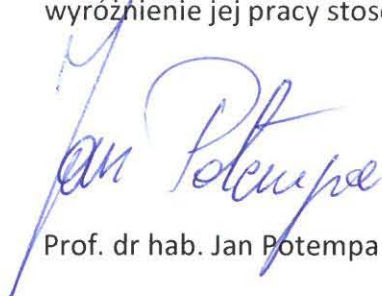
Pytania i uwagi

Lektura tej rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka pytań.

- 1) Badania z użyciem osteoblastów i fibroblastów zostały przeprowadzone na powierzchniach polistyrenowych modyfikowanych pektyną. Czy wyniki tych badań można ekstrapolować na inne powierzchnie, np. tytanowe powlekanie pektyną?
- 2) Wpływ pektyny na aktywność komórek mierzona wzmożoną proliferacją, ekspresją określonych genów, wzmożoną mineralizacją jest bardzo ciekawy i byłbym wdzięczny gdyby Doktorantka mogła nam coś powiedzieć o potencjalnych mechanizmach molekularnych odpowiedzialnych za takie zachowanie komórek.

3) Pozytywny wpływ pektyn na osteoblasty i makrofagi jest znany od co najmniej 10 lat. Co stoi na przeszkodzie zastosowanie pektyn w implantologii stomatologicznej?

Podsumowując, chciałem zaznaczyć, że badania zaprezentowane w publikacjach pani Folkert zostały przeprowadzone prawidłowo i uzyskane rezultaty są wynikiem logicznego ciągu dobrze zaplanowanych i rzetelnie przeprowadzonych badań. Warta jest podkreślenia spójność tematyczna publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Nie ulega dla mnie wątpliwości, że prezentowane wyniki pogłębiły wiedzę o biogodności ramnogalakturonanu-I i potencjalnym zastosowaniem tej pektyny do modyfikacji warstwy powierzchniowej implantów stomatologicznych. Po lekturze pracy wierzę, że te badania przyczynią się do poprawy osteointegracji implantów zwiększając ich stabilność i funkcjonalność. Z tego względu, biorąc również pod uwagę znaczny dorobek publikacyjny Doktorantki stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracą doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Inżynierii i Energetyki Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr Justyny Folkert do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie jej pracy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Jan Potempa