Sosnowiec, 11.04.2024

Prof. dr hab. n. farm. Joanna Folwarczna
Katedra i Zakład Farmakologii
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Gąsiorek pt. „MCPIP-1 w keratynocytach dziąsłowych jako regulator procesu zapalenia przyzębia i ubytku kości" przygotowanej pod kierunkiem Pani dr hab. Joanny Kozieł, prof. UJ

Pani mgr Anna Gąsiorek przygotowała swoją rozprawę doktorską pt. „MCPIP-1 w keratynocytach dziąsłowych jako regulator procesu zapalenia przyzębia i ubytku kości" pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. Joanny Kozieł, prof. UJ w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa została przedstawiona w formie monografii. Podstawę rozprawy stanowią wyniki badań sfinansowanych i przeprowadzonych w ramach projektu OPUS 15 Narodowego Centrum Nauki pt. „Rola negatywnego regulatora stanu zapalnego - MCPIP-1 w rozwoju paradontozy", przyznanego Pani Promotor (2018/29/B/NZ6/01622).

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy zagadnień związanych z patomechanizmami rozwoju zapalenia przyzębia. Stany zapalne przyzębia mają złożoną etiopatogenezę; szczególną rolę przypisuje się złożonym interakcjom pomiędzy mikroorganizmami i wydzielanymi przez nie czynnikami, a odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Lepsze poznanie mechanizmów wzajemnego oddziaływania drobnoustrojów (komensalnych i patogennych) oraz organizmu gospodarza jest niezbędne do rozwoju nowych możliwości terapii zapaleń przyzębia. Ze względu na stały kontakt mikrobiomu jamy ustnej z komórkami nabłonka dziąseł, określanych w pracy jako „keratynocyty dziąsłowe", słusznie przyjęto, że procesy zachodzące w tych komórkach mogą mieć kluczowe znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Skuteczne leczenie zapalenia przyzębia jest niezbędne nie tylko ze względu na dolegliwości związane z zaburzeniem funkcji narządu żucia, lecz także w celu zapobiegania możliwym powikłaniom ogólnoustrojowym. Stany zapalne przyzębia uważane są m.in. za czynnik zwiększający ryzyko sercowo-naczyniowe. W związku z tym podjęcie przez Doktorantkę szczegółowych badań, które pozwoliły wykazać ważną rolę białka MCPIP-1 (ang.

monocyte chemoattractant protein-induced protein-1), należącego do grupy negatywnych regulatorów zapalenia, we wpływających na stan przyzębia wzajemnych oddziaływaniach bakterii i gospodarza, było w pełni uzasadnione. Jak wcześniej wspomniałam, waga problematyki pracy została doceniona przez Narodowe Centrum Nauki.

Rozprawa doktorska miała następujące cele:

- określenie roli białka MCPIP-1 w nabłonku dziąsła podczas infekcji patogenami przyzębia, szczególnie *Porphyromonas gingivalis* przez zbadanie, czy gingipainy (proteazy cysteinowe *P. gingivalis*) mogą uczestniczyć w modyfikacji potranslacyjnej białka MCPIP-1 oraz określenie skutków tego działania dla funkcjonowania keratynocytów dziąsłowych, zwłaszcza ich wrażliwości na endotoksynę bakteryjną;

- zbadanie, czy konstytutywnie wysoki poziom MCPIP-1 w nabłonku dziąsła odgrywa rolę w utrzymaniu homeostazy nabłonka dziąsła i tkanek sąsiadujących.

Dla zrealizowania tych celów starannie zaplanowano eksperymenty, w których posłużono się wieloma specjalistycznymi metodami z zakresu mikrobiologii, periodontologii, immunologii, biologii molekularnej (w tym inżynierii genetycznej), histologii (z wykorzystaniem różnych technik barwienia oraz cyfrowych technik obrazowania – mikrotomografii komputerowej).

Rozprawa doktorska liczy 186 stron i ma układ właściwy dla tego rodzaju opracowań. Obszerny, liczący 28 stron wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do zagadnień, będących przedmiotem badań Doktorantki. Na pochwałę zasługuje bardzo czytelny opis budowy i funkcji nabłonka dziąsłowego, zęba i przyzębia, a także zmian patologicznych przyzębia. Doktorantka skrótowo przedstawiła problematykę osteoimmunologii, gwałtownie rozwijającej się dziedziny nauki zajmującej się powiązaniami między układem immunologicznym a układem kostnym. Zagadnienia te są bardzo złożone, wielka liczba publikacji na te tematy dostarcza niekoniecznie spójnych wyników. Rozdziały wstępu poświęcone patogenezie zapalenia przyzębia (rozdział 4.3), a także roli białka MCPIP-1 w regulacji procesu zapalnego (rozdział 4.4) moim zdaniem powinny zostać wykorzystane przez Doktorantkę jako podstawa wartościowych prac poglądowych. O zawartości wstępu do rozprawy świadczy liczba cytowanych w nim pozycji literaturowych – 216.

Część metodyczna, przedstawiona na 40 stronach, szczegółowo opisuje zastosowane materiały i metody. Rozprawa doktorska obejmuje badania przeprowadzone *in vitro* i *in vivo.* Badania te wymagały m.in. prowadzenia hodowli komórkowych (linia komórkowa ludzkich unieśmiertelnionych keratynocytów dziąsłowych, ludzkie komórki jednojądrzaste z krwi

obwodowej, pierwotne keratynocyty i fibroblasty z dziąsła i skóry myszy); hodowli bakterii; infekcji bakteriami hodowanych komórek; badań *in vivo* na myszach laboratoryjnych, w tym wywołania przewlekłego zapalenia przyzębia u myszy typu dzikiego oraz pozyskania i genotypowania myszy pozbawionych ekspresji białka MCPIP-1 w keratynocytach (myszy *Krt14*^{Cre}*Zc3h12a*$^{flox/flox}$). Badania pozyskanego materiału obejmowały m.in. przeprowadzenie izolacji i badania ekspresji RNA (z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji, a następnie reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz analizy transkryptomicznej AmpliSeq); zbadanie ekspresji białek (analiza Western blot, cytometria przepływowa, testy immunoenzymatyczne) oraz aktywności enzymatycznej. *In vivo*, u myszy z eksperymentalnie wywołanym zapaleniem przyzębia oraz u myszy zmodyfikowanych genetycznie, pozbawionych ekspresji białka MCPIP-1 w keratynocytach, przeprowadzono badania mikrotomograficzne kości w obrębie kości przyzębia (pomiar odległości od połączenia szkliwno-cementowego do szczytu kości wyrostka zębodołowego) oraz kości udowej. Ponadto dokonano wizualizacji kości przyzębia za pomocą barwienia błękitem metylenowym, a także wykonano preparaty histologiczne z odwapnionej kości, które poddano odpowiednim technikom barwienia w celu uwidocznienia komórek kostnych: osteoblastów i osteoklastów. Przeprowadzono także barwienia immnofluorescencyjne tkanki przyzębia. U myszy z eksperymentalnie wywołanym zapaleniem przyzębia sprawdzono, czy bakterie *P. gingivalis* przenikały do narządów wewnętrznych. U myszy z deplecją białka MCPIP-1 w keratynocytach zbadano też skład mikrobiomu jamy ustnej, a także wpływ diety (twarda/miękka) na rozwój zmian przyzębia.

Odpowiednio dobrane metody badawcze pozwoliły na kompleksowe zbadanie roli białka MCPIP-1 w przebiegu zapalenia przyzębia, w którym główne znaczenie przypisywane jest bakterii *P. gingivalis*, oraz rozwijających się podczas zapalenia zmian w ilości i strukturze kości wyrostka zębodołowego. Uwaga krytyczna – tylko w niektórych przypadkach Doktorantka cytuje piśmiennictwo do zastosowanych metod badawczych; moim zdaniem, nawet jeśli jakaś metoda została opracowana i jest rutynowo wykorzystywana w Zakładzie Mikrobiologii, można było podać jako źródło wcześniejszą publikację na to wskazującą. Dotyczy to m.in. metody pomiaru aktywności gingipain (rozdz. 6.2.4.3), w opisie której należało podać przynajmniej źródło, na podstawie którego dobrano zastosowane substraty enzymów. Liczba dodatkowych publikacji zacytowanych w części metodycznej to 8.

Wszystkie badania przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach, wyniki przedstawiano jako średnią ± SD lub SEM (proszę o wyjaśnienie, dlaczego w rozprawie zastosowano dwa sposoby przedstawiania rozrzutu). Liczba powtórzeń dla badań

biochemicznych jest wystarczająca. Badania *in vivo* prowadzi się na ogół tylko raz, dlatego kluczowe jest, by liczba zwierząt w grupach badanych (liczba n) była wystarczająco duża. W części metodycznej pracy brakuje informacji na temat liczebności grup, pojawia się ona dopiero przy opisie wyników (konkretnie w podpisach pod rycinami), jednak nie w sposób konsekwentny – czasami czytelnik musi sam policzyć liczbę n (pod częścią rycin jest informacja „Liczba punktów na wykresie odzwierciedla liczbę analizowanych osobników", czasem liczba n jest podana). W przyszłości radzę przedstawiać informację o liczebności zwierząt, kluczową dla oceny jakości badań, w sposób czytelny i jednoznaczny.

Moja kolejna uwaga krytyczna dotyczy terminologii. W całej pracy, także w tytule, Doktorantka używa określeń „ubytek" i „ubytki" w odniesieniu do badanych przez Nią zmian w obrębie kości wyrostka zębodołowego. Sformułowanie „ubytek kości" w liczbie pojedynczej można uznać za akceptowalne tłumaczenie angielskiego terminu „bone loss", chociaż w pierwszej kolejności nasuwa się skojarzenie z fizycznym ubytkiem kości w określonym miejscu, np. powstałym w wyniku urazu, miejscowego stanu zapalnego, a w przypadku zębów – zmian próchnicowych. „Ubytki kostne" jednoznacznie sugerują występowanie konkretnych (policzalnych) zmian w określonych lokalizacjach. Moim zdaniem właściwsze w odniesieniu do przedmiotu badań Doktorantki byłoby używanie także niezbyt fortunnego, jednak powszechnie stosowanego określenia „utrata kości".

Rozdział dotyczący wyników pracy podzielono na trzy części, poświęcone kolejno: regulacji białka MCPIP-1 przez proteazy bakteryjne patogenów przyzębia, roli gingipainy RgpA w modulacji odpowiedzi zapalnej wywołanej lipopolisacharydem oraz roli białka MCPIP-1 w komórkach nabłonkowych dziąsła w utrzymywaniu homeostazy tkanek przyzębia. Zgodnie z informacją ze str. 107 rozprawy (zakończenie części II wyników), wyniki opisane w dwóch pierwszych częściach zostały już opublikowane jako praca zbiorowa w czasopiśmie *mBio* w 2021 r. Na str. 132 (zakończenie części III) Doktorantka poinformowała o przygotowaniu do druku kolejnej publikacji, obejmującej badania opisane w części trzeciej rozdziału poświęconego wynikom pracy. Recenzowana praca jest pracą interdyscyplinarną. Można się domyślać, że większość badań mikrobiologicznych i z zakresu biologii molekularnej Doktorantka przeprowadziła samodzielnie. Uzyskanie genetycznie modyfikowanych myszy, także np. badania mikrotomograficzne wymagają dodatkowych umiejętności i doświadczenia. Doktorantka w niektórych przypadkach przedstawiła informacje o udziale dodatkowych osób w badaniach (np. na str. 64) lub o przeprowadzeniu badań przez inne osoby (część badań histologicznych – str. 83). Ze względu na pierwsze miejsce Doktorantki we wspomnianych

artykułach, Jej kluczowy udział w badaniach przedstawionych w opublikowanym artykule oraz w recenzowanej rozprawie, a także w przeprowadzeniu interpretacji wszystkich uzyskanych wyników, nie budzi wątpliwości. Chciałabym podkreślić, że rozprawa obejmuje olbrzymią liczbę wyników uzyskanych za pomocą licznych metod w wielu badaniach; moim zdaniem przedstawione wyniki mogłyby stanowić podstawę więcej niż jednego doktoratu (np. rozprawa doktorska mogłaby dotyczyć tylko części III wyników).

Rozdział poświęcony wynikom pracy liczy 47 stron; wyniki przedstawiono na 30 w większości złożonych rycinach (16 rycin ukazujących wyniki części I i II, 14 rycin przedstawiających wyniki części III pracy). Ryciny są bardzo czytelne, starannie przygotowane i doskonale opisane, zgodnie z zasadą, że każda rycina musi być samowyjaśniająca (jedyne moje zastrzeżenie dotyczy wspomnianego wcześniej wymagania od czytelnika liczenia punktów na wykresie w celu poznania liczby badanych zwierząt). W rozdziale „Wyniki" Autorka oprowadza czytelnika po przeprowadzonych badaniach, czasami zaczynając od przypomnienia informacji, które już się znalazły lub powinny się były znaleźć we wstępie pracy (przykład – rozdział 7.1.1), często przedstawiając także opis zastosowanej metody, który powinien w całości znaleźć się w rozdziale temu poświęconym (przykład – rozdział 7.1.3), a także łącząc omówienie wyników z elementami dyskusji. Doktorantka zacytowała w rozdziale dotyczącym wyników kolejne 53 pozycje literaturowe. Taki opis ułatwia wprawdzie śledzenie toku badań i zrozumienie wyników, ale jednocześnie może sprawiać wrażenie niepanowania nad całością tekstu rozprawy. Zastosowany sposób opisu wyników jest właściwy dla artykułów w czasopismach, w których wymagane jest najpierw przedstawienie wyników, czasem w połączeniu z dyskusją, a dopiero na końcu zastosowanych metod (zwięźle, ponieważ najczęściej są to metody znane, w których zmienne są tylko warunki doświadczenia). W przypadku recenzowanej rozprawy część metodyczna jest jednak bardzo szczegółowa i przedstawiona przed wynikami.

Dyskusję uzyskanych wyników przeprowadzono na 24 stronach tekstu. Dyskusja jest bardzo interesująca, podkreśla wagę dokonań Doktorantki na tle danych literaturowych. Ponownie, co tym razem było zasadne, Doktorantka przedstawiła tok badań, który pozwolił na wykazanie zaobserwowanych zmian i ich mechanizmów. Całość rozprawy zamyka 5 wniosków końcowych. Rozprawę uzupełnia spis literatury (obejmujący 400 pozycji) oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że białko MCPIP-1 jest celem aktywności proteaz cysteinowych będących czynnikami zjadliwości bakterii gatunku *P.*

gingivalis – gingipain. Wewnątrzkomórkowa degradacja MCPIP-1 przez gingipainę RgpA w keratynocytach dziąsłowych uwrażliwia je na działanie lipopolisacharydu i prowadzi do nasilenia produkcji cytokin zapalnych. Wykazany przez Doktorantkę mechanizm może dotyczyć różnych patogenów czerpiących korzyści z zwiększonego stanu zapalnego (inflamofilnych). Doktorantka wykazała, że u myszy pozbawionych ekspresji MCPIP-1 w keratynocytach, w tym dziąsłowych, dochodzi do utraty kości wyrostka zębodołowego, natomiast nie stwierdzono zmian w kości udowej, co wskazuje, że MCPIP-1 wykazuje regulacyjne działanie wyłącznie lokalnie. Całość wyników świadczy o znaczącej roli keratynocytów dziąsłowych oraz MCPIP-1 w utrzymaniu homeostazy przyzębia.

Utrata kości wyrostka zębodołowego u myszy pozbawionych MCPIP-1 w keratynocytach wiązała się ze zmniejszoną liczbą i aktywnością osteoblastów (zmniejszenie ekspresji genów regulujących ich prawidłowe różnicowanie oraz kolagenu typu I), nie stwierdzono natomiast wpływu braku MCPIP-1 na liczbę (barwienie na obecność kwaśnej fosfatazy opornej na winian – TRAP) i aktywność (badanie ekspresji genu *Trap* w kości) osteoklastów. Doktorantka wykazała, że obserwowana utrata kości przyzębia u myszy z deplecją MCPIP-1 wiąże się i jest prawdopodobnie wywołana przez zwiększony spontaniczny stan zapalny w obrębie warstwy nabłonkowej, z nasiloną produkcją cytokin zapalnych i chemoatraktantów. Dochodzi do nacieku neutrofili, lokujących się w bezpośrednim sąsiedztwie kości przyzębia i zmieniających funkcjonowanie osteoblastów. W tym miejscu zaproponowałabym rozważenie nieco innej interpretacji uzyskanych wyników dotyczących zmian kostnych. Moim zdaniem, na podstawie badań przedstawionych w rozprawie nie można wykluczyć pobudzającego wpływu procesu zapalnego na liczbę i aktywność osteoklastów. Brak pobudzającego wpływu na resorpcję kości stwierdzono na podstawie badań histologicznych, przeprowadzonych na niewielkiej liczbie próbek (liczba osteoklastów nie zwiększyła się). Cytokiny, których ekspresja w stanie zapalnym ulega zwiększeniu, przede wszystkim nasilają resorpcję kości (chociaż także mogą hamować kościotworzenie, na co Doktorantka przytoczyła dane literaturowe w dyskusji pracy). W przypadku szczurzego modelu osteoporozy pomenopauzalnej, w której dochodzi do utraty kości w wyniku znaczącego nasilenia resorpcji kości, aktywność TRAP w surowicy ulega zmniejszeniu, bo w czasie eksperymentu, po kilku tygodniach niedoboru estrogenów, zmniejszenie masy kości powoduje też zmniejszenie liczby osteoklastów i związane z tym zmniejszenie wydzielania TRAP. Mam wrażenie, że celowe byłoby uzupełnienie panelu badań o ilościowe pomiary kości wyrostka zębodołowego w preparatach histologicznych oraz o zbadanie ekspresji innych niż TRAP

markerów resorpcji kości.

Chciałabym podkreślić wyjątkowo staranną redakcję rozprawy doktorskiej pod względem korektorskim. Tekst, chociaż bardzo długi, został napisany w sposób zrozumiały, Doktorantka przygotowała bardzo dobre ilustracje i czytelne schematy. Poza wcześniej wspomnianymi, przedstawię tylko kilka uwag dotyczących spraw redakcyjnych:

- w wykazie skrótów rozwinięcie akronimu RANKL nie jest prawidłowe,

- nazwy leków, w tym związków narzędziowych, należy przedstawiać po polsku, np. tiorydazyna (nie „thioridazine"),

- należy precyzyjnie określać wiek zwierząt (myszy w 3. miesiącu życia mają 60-90 dni, myszy trzymiesięczne – ukończyły 90 dni życia),

- liczba błędów literowych jest znikoma (np. powinno być test „t-Studenta", nie „t-studenta", str. 84; barwienie „trichromem Massona" a nie „Trichromem-Massona").

Przedstawione uwagi krytyczne nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Gąsiorek. Badania w niej przeprowadzone pozwoliły na pogłębienie poznania mechanizmów związanych z rozwojem zapalenia przyzębia i jego następstw w postaci miejscowego zaburzenia metabolizmu kości przyzębia w modelu mysim.

Podsumowując, w pracy doktorskiej Pani mgr Anna Gąsiorek wykazała się olbrzymią ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz właściwego przedstawiania i interpretowania wyników. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dotyczącego roli białka MCPIP-1 w modulowaniu procesu zapalenia przyzębia i utraty kości. Spełnione wobec tego zostały warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym mam zaszczyt przedstawić Pani Przewodniczącej i Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

WNIOSEK

o dopuszczenie Pani mgr Anny Gąsiorek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej, składam **wniosek do Rady Dyscypliny o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Gąsiorek.**

PODPIS ZAUFANY
JOANNA
FOLWARCZNA
15.04.2024 19:30:18 [GMT+2]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym