



Prof. dr hab. Michał Pikuła
Profesor, Zastępca Dyrektora Pierwszej Szkoły Doktorskiej GUMed
Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Zakład Embriologii, Katedra Anatomii, Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny (GUMed)
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk, bud. CBM
tel. 58 3491368 (bezp.); 58 3491495 (sekretariat)
e-mail: pikula@gumed.edu.pl
www.medreg.gumed.edu.pl

Gdańsk, 12.04.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Gąsiorek pt. „MCPIP-1 w keratynocytach dziąsłowych jako regulator procesu zapalenia przyzębia i ubytku kości” przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Rozprawa doktorska pod tytułem „MCPIP-1 w keratynocytach dziąsłowych jako regulator procesu zapalenia przyzębia i ubytku kości” została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Joanny Kozieł, prof. uczelni. Praca została sfinansowana z funduszy Narodowego Centrum Nauki, grantu OPUS kierowanego przez Panią prof. Joannę Kozieł. Tematyka pracy dotyczy wciąż słabo poznanego białka indukowanego chemotaktycznym białkiem monocytów-1 (MCPIP-1). Udział tego białka w procesach zapalenia przyzębia czy też biologii keratynocytów jest szczególnie mało eksplorowany naukowo. Stąd, uważam że podjęty przez Doktorantkę oraz Panią promotor temat należy uznać za bardzo wartościowy i naukowo uzasadniony.

Praca doktorska stanowi klasyczną monografię liczącą łącznie 186 stron. Praca zawiera wykaz użytych skrótów, streszczenia w języku polskim oraz w języku angielskim, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki (podzielone na trzy części), dyskusję, wnioski końcowe oraz osiągnięcia Doktorantki i spis literatury. Wstęp pracy stanowi bardzo szerokie studium dotyczące budowy i funkcji nabłonka dziąsłowego, procesów przebudowy tkanek przyzębia, zapalenia przyzębia oraz funkcji białka MCPIP-1. Obszerny i jasno napisany wstęp świadczy o dużej wiedzy doktorantki z zakresu podjętej tematyki badawczej. Szczególnie warto podkreślić bardzo dokładne opisy cytokin i komórek układu immunologicznego oraz ich roli w procesie zapalenia przyzębia oraz ubytków kości. Dodatkowo, warty uwagi jest podrozdział



dotyczący białka MCP-1 gdzie Doktorantka opisała szczegółowo m.in. udział tego białka w zapaleniu przyzębia.

Rozdział cele pracy zawiera elementy wprowadzenia, założeń oraz samych celów. Rozdział ten w mojej ocenie mógłby zostać napisany klarowniej np. z wypunktowaniem konkretnych celów pracy. Autorka opisała jednak jakie są główne cele pracy. Polegały one przede wszystkim na określeniu roli proteazy cysteinowej, gingipainy wytwarzanej przez *P. gingivalis* w modyfikacjach potranslacyjnych MCP-1. Jednocześnie Autorka postawiła sobie za cel zbadanie czy ten proces ma wpływ na funkcjonowanie keratynocytów dziąsłowych. Dodatkowo Autorka postanowiła odpowiedzieć na pytanie czy konstytutywnie wysoki poziom MCP-1 w nabłonku dziąsła będzie odgrywał rolę w utrzymaniu homeostazy badanych tkanek. Cele pracy odpowiadają tematowi pracy.

Rozdział materiały i metody stanowi bardzo dokładny opis użytych odczynników i materiałów, w tym linii komórkowych, m.in. ludzkich komórek unieśmiertelnianych keratynocytów dziąsłowych, makrofagów, keratynocytów pierwotnych skórnych oraz dziąsłowych. Tabelki umieszczone w tym rozdziale szczegółowo opisują wszystkie użyte w pracy odczynniki. Opisano również odczynniki wykorzystywane do badań histologicznych, biologii molekularnej, cytometrii przepływową, sprzęt laboratoryjny, sporządzono wykaz użytych programów komputerowych.

W rozdziale metody opisane są techniki stosowane podczas realizacji pracy doktorskiej, w tym m. in. izolacja i hodowla komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, izolacja keratynocytów i fibroblastów, hodowla bakterii, przygotowywanie bakterii do danych eksperymentów, izolacja pęcherzyków, hodowla zwierząt. Przedstawiono również opisy konstrukcji odpowiednich modeli genetycznych, genotypowania myszy, model wywołania chronicznego zapalenia przyzębia, metodykę analizy ubytków kostnych, mikrotomografię komputerową, oznaczanie poziomu przeciwciał, badanie poziomu obecności, oznaczenie stężenia białka oraz reakcje PCR w czasie rzeczywistym i analizę transkryptyczną. Opisano również technikę cytometrii przepływową oraz barwienia histologiczne. Została opisana też analiza statystyczna która nie budzi zastrzeżeń Recenzenta. Wszystkie metody zostały przedstawione i opisane bardzo dokładnie umożliwiając innym Zespołom naukowym



potencjalnie powtórzenie doświadczeń. Szczególnie chciałbym podkreślić wysoki stopień zaawansowania i nowoczesnych metod badawczych. Należy również dodać, iż część stosowanych metod wymagała do Doktorantki ogromnego zaangażowania w pracę laboratoryjną. W tym miejscu należy wymienić m.in. konstrukcję mysiego modelu *Krt14CreZc3h12aflox/flox*, genotypowanie myszy *Mcpip-1*, model wywołania chronicznego zapalenia przyzębia (procedura „*oral gavage*”). Zgodnie z opisem, wszystkie procedury badań na zwierzętach były zgodne z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (2010/63/UE) i zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną w Krakowie (nr pozwolenia 255/2019).

Rozdział wyniki zawiera bardzo czytelne zestawienie wszystkich wyników pracy. Autorka podzieliła ten rozdział na trzy części. W pierwszej części została opisana regulacja aktywności białka MCPIP-1 przez proteazy bakteryjne, w tym przede wszystkim gingipainy. W drugiej części Autorka przedstawiła wyniki prac doświadczalnych dotyczące udziału gingipainy RgpA w modulacji odpowiedzi zapalnej wywołanej lipopolisacharydem (LPS). W trzeciej części została opisana rola MCPIP-1 w homeostazie tkanek przyzębia. Wyniki pracy odpowiadają celom pracy i z pewnością mogły stanowić podstawę do dyskusji i wyciągnięcia odpowiednich wniosków. Wyniki doświadczeń zostały opisane rzetelnie i skrupulatnie. Mają one z pewnością dużą wagę naukową. Szczególnie należy podkreślić cenne analizy dotyczące degradacji białka MCPIP-1 przez gingipainę w modelu zapalenia przyzębia. Autorka wykazała również, że obniżona ekspresja *Mcpip-1* w keratynocytach sprzyja tworzeniu się ubytków kości przyzębia w modelu *in vivo*. Dodatkowo wykazano, że brak MCPIP-1 w nabłonku dziąsła prowadzi do zapalenia z akumulacją neutrofilii. Również bardzo ciekawych wyników dostarczają doświadczenia analizy ekspresji *Il1f6* oraz poziomu IL-36 w nabłonku dziąsłowym myszy *Mcpip-1^{eKO}*. Wykazano, że poziom IL-36alpha wzrasta w tkance przyzębia u zwierząt pozbawionych MCPIP-1. Wszystkie uzyskane wyniki stanowią bardzo ważny wgląd z rolę białka MCPIP-1 w procesie zapalenia przyzębia i ubytków tkanek. Moje jedyna uwaga dotyczy opisów poprzedzających konkretne wyniki. Część z tych informacji moim zdaniem powinna znaleźć się we wstępie lub dyskusji. Graficzne przedstawienie wyników badań nie budzi zastrzeżeń Recenzenta. Warty podkreślenia jest fakt, iż białko MCPIP-1 jest wciąż słabo



poznane, szczególnie w kontekście zapalenia przyzębia. Stąd, niniejsza praca dostarcza zupełnie nowych informacji na temat roli tego białka w biologii i patofizjologii tkanek przyzębia.

Dyskusja stanowi dogłębną analizę uzyskanych wyników wraz z ich porównaniem z dostępną literaturą światową. Dojrzała i rozbudowana dyskusja świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i umiejętności krytycznego spojrzenia na uzyskiwane wyniki. Schematy umieszczone w dyskusji stanowią bardzo dobre podsumowanie wyników badań i umiejscowienie ich w kontekście biologicznym. Na końcu dyskusji pracy Doktorantka podsumowała badania opisując najważniejsze uzyskane wyniki. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka przedstawiła również najważniejsze 5 wniosków pracy. We wnioskach zwrócono szczególną uwagę na to, że białko MCP-1 jest celem proteolitycznej aktywności gingipain i może to wpływać na uwrażliwienie komórek nabłonkowych na działanie LPS i promować stan zapalny. Na podstawie wyników obserwowanych u zwierząt, Autorka wskazała na kluczową rolę keratynocytów dziąsłowych w utrzymaniu homeostazy przyzębia. Jednocześnie wskazano na istotny wpływ napływających neutrofilów na aktywność osteoblastów. Wnioski w mojej opinii zostały przedstawione poprawnie i odpowiadają celom pracy. Warto dodać, że Autorka część wyników badań opublikowała w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Bibliografia liczy aż 400 pozycji literaturowych, z których większość pochodzi z ostatnich 10 lat. Dobór piśmiennictwa nie budzi zastrzeżeń.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Gąsiorek pt. „MCP-1 w keratynocytach dziąsłowych jako regulator procesu zapalenia przyzębia i ubytku kości” spełnia ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Praca stanowi w mojej ocenie oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jednocześnie posiadając cenny wkład w rozwój nauk biologicznych. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Gąsiorek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowej rozprawy doktorskiej oraz uzyskanie cennych wyników badań, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie pracy po spełnieniu odpowiednich wymogów formalnych stawianym pracom doktorskim.

Zakład Embriologii
Pracownia Inżynierii Tkankowej
i Medycyny Regeneracyjnej

prof. dr hab. Michał Pikula
Profesor