Instytut Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk

INSTYTUT FARMAKOLOGII
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Smętna 12
31-343 Kraków
Dyrektor
telefon: (12) 662 32 96
(12) 637 48 93

Centrala
telefon: (12) 662 32 20
(12) 637 40 22
fax: (12) 637 45 00
e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

Kraków, 11.11. 2016

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani mgr Kariny Adamowicz pod tytułem: „Analiza lokalnego i systemowego stanu zapalnego wywołanego infekcją *Porphyromonas gingivalis".*

Chroniczne zapalenie przyzębia (łac. periodontitis), potocznie nazywane paradontozą, paradentozą oraz (niepoprawnie) parodontozą, jest przewlekłą chorobą wywoływaną przez patogenny biofilm tworzący się na powierzchni zębów poniżej linii dziąseł. Jedną z głównych przyczyn periodontopatii jest obecność periodontopatogenów w płytce nazębnej, w tym przede wszystkim gram-ujemnej beztlenowej pałeczki *Porphyromonas gingivalis.* Identyfikacja mechanizmów molekularnych biorących udział w rozwoju lokalnego stanu zapalnego przyzębia wywoływanego przez *Porphyromonas gingivalis,* jak również określenie molekularnych podstaw udziału *Porphyromonas gingivalis* w rozwoju zapalenia stawów, jest warunkiem opracowania skutecznych metod profilaktyki, diagnostyki i leczenia tych chorób i dlatego w pełni zasadny jest wybór tematu rozprawy doktorskiej Pani mgr Kariny Adamowicz „Analiza lokalnego i systemowego stanu zapalnego wywołanego infekcją *Porphyromonas gingivalis".*

Praca doktorska napisana została zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami, składa się na nią 194 stron maszynopisu - podzielonego na rozdziały i podrozdziały, 6 schematów ilustrujących, między innymi, przebieg doświadczenia z użyciem zwierzęcego modelu dotchawiczej infekcji płuc oraz rozwój zapalenia stawów u myszy DBA/1; 32 zdjęcia (w tym zdjęcia żeli agarozowych po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR), 22 ryciny, 7 tabel i bardzo szczegółowy materiał uzupełniający zapisany na jedenastu stronach w rozdziale szóstym nazwanym „Załączniki" zawierającym szczegółowe dane dotyczące analizy mikrobiomu flory jelitowej pochodzącej od myszy DBA/1 KON i DBA/1 SPF.

Cel pracy i wybór zadań badawczych został bardzo dobrze uzasadniony we wstępie. „Wstęp" pracy jest bardzo obszerny i liczy aż 39 stron. W części wprowadzającej Autorka podaje podstawowe definicje zapalenia przyzębia, opisuje epidemiologię oraz etiopatogenezę chorób przyzębia, poświęcając szczególną uwagę mikrobiologii zapalenia przyzębia, wskazując, o czym już wspominałam powyżej, że przyczyną większości przypadków zapalenia przyzębia są bakterie płytki nazębnej i kamienia nazębnego wśród których istotną rolę odgrywa *Porphyromonas gingivalis*. Doktorantka omawia też rolę układu odpornościowego, czynników genetycznych i środowiskowych w rozwoju zapalenia przyzębia. Pani Karina w bardzo przystępny i obrazowy sposób szczegółowo charakteryzuje pałeczki *Porphyromonas gingivalis*, a następnie omawia rolę kinaz białkowych w zapaleniu przyzębia ze szczególnym uwzględnieniem kinazy syntazy glikogenu 3 (glikogen synthase kinase 3, GSK3). Na kolejnych osiemnastu stronach Pani Karina omawia złożoną rolę chorób przyzębia w etiopatogenezie chorób reumatycznych, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów, koncentrując się na roli *Porphyromonas gingivalis* w powstawaniu tej jednostki chorobowej.

Napisany przez doktorantkę wstęp może, w mojej ocenie, stanowić podłoże do przygotowania paru prac poglądowych. Warto jeszcze raz podkreślić, iż zastosowana konstrukcja „Wstępu" dobrze wprowadza i jednocześnie uzasadnia wybór celów pracy doktorskiej Pani mgr Kariny Adamowicz, które w mojej ocenie, pod względem merytorycznym nie budzą zastrzeżeń, a raczej podziw.

W realizacji celów pracy Pani Karinie posłużyły dobrze dobrane modele doświadczalne, takie jak zapalenie przyzębia u myszy B6129SF2/J oraz zapalenie stawów u myszy DBA/1, występujące po dotchawiczym podaniu *Porphyromonas gingivalis*, a uzyskane przez nią wyniki mają dużą wartość poznawczą.

W rozdziale „Wyniki" na 32 stronach (poczynając od strony 92, a kończąc na stronie 132) Pani Karina Adamowicz opisała w sposób jasny i szczegółowy uzyskane rezultaty, wzbogacając tą część rozprawy o zdjęcia oraz przystępnie wykonane ryciny i tabele pod którymi znalazły się przydatne informacje dotyczące liczebności grup, zastosowanych porównań statystycznych, jak i wyjaśnienia użytych skrótów, co świadczy o umiejętności prezentowania wyników w sposób przemyślany i konsekwentny.

W zoptymalizowanym przez Doktorantkę modelu zapalenia przyzębia u myszy B6126SF2/F stwierdzono bardzo istotny ubytek kości szczęki, ustalony

morfometrycznie poprzez pomiar odległości między połączeniem szkliwno-cementowym (ang. cement–enamel junction, CEJ) a szczytem kości wyrostka zębodołowego (ang. alveolar bone crest, ABC) zębów trzonowych. Następnie doktorantka stwierdziła, że inhibitor GSK3 o nazwie SB216763, podawany do otrzewnowo, prawie dwukrotnie zmniejsza ubytek kości w szczękach myszy zainfekowanych *Porphyromonas gingivalis,* co może sugerować istotny udział kinazy GSK3 w tym procesie. Ponadto doktorantka wykazała, że podawanie inhibitora GSK3, jak i infekcja *Porphyromonas gingivalis,* nie prowadzi do spadku masy ciała, jak i zmian w zachowaniu i fizjologii zwierząt ocenianych „zaburzeniami" postawy, oddychania, chodu, dbałości o wygląd sierści. Bardzo istotnym (ważnym) odkryciem Pani Kariny było pokazanie, że pojedyncza dawka *Porphyromonas gingivalis* podana do tchawicy myszy DBA/1 może doprowadzić do zapalenia stawów u tych myszy, co może sugerować związek pomiędzy infekcją *Porphyromonas gingivalis*, paradontozą i zapaleniem stawów. Za najciekawsze, z uzyskanych w pracy wyników, uważam wykazanie, że podanie inhibitora SB216763 GSK3 redukuje rozwój zapalenia przyzębia u myszy B6129SF2/J, a na rozwój zmian w stawach, indukowanych *Porphyromonas gingivalis,* mają wpływ warunki przebywania myszy DBA/1 (warunki konwencjonalne lub warunki wolne od określonych patogenów (ang. specific free pathogen, SPF)).

Interpretację uzyskanych wyników, w oparciu o dostępne piśmiennictwo, zawarto w liczącej 22 strony Dyskusji i dwustronicowym rozdziale pod interesującą nazwą „Perspektywy". Dyskusja wyników ma logiczną konstrukcję, a jej treść świadczy o dojrzałości naukowej i dużej wiedzy doktorantki na temat roli infekcji *Porphyromonas gingivalis* w rozwoju lokalnej i systemowej odpowiedzi zapalnej. Bardzo istotna jest uwaga doktorantki (zawarta również w streszczeniu) o konieczności personalizacji doboru właściwej i najbardziej skutecznej metody leczenia paradontozy i chorób z nią powiązanych.

Pracę doktorską rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim, a kończy wykaz 407 pozycji piśmiennictwa (nie ponumerowanych przez autorkę, ale ułożonych w porządku alfabetycznym i zawierających jedną pozycję, w której Pani Karina jest pierwszym autorem).

Z obowiązku wymienię teraz błędy merytoryczne, interpunkcyjne, stylistyczne oraz redakcyjne, które zauważyłam w przedstawionej mi do recenzji rozprawie.

Spis treści. Strony 5 i 6.

Strony 5 i 6 zawierają identyczną treść, natomiast brakuje spisu rozdziałów zamieszczonych na stronach 81 – 109 rozprawy doktorskiej. Dziwna jest również numeracja kolejnychy podrozdziałów rozdziału 4 zawarta na stronie 7.

Streszczenie

Strona 14.

Pierwsze zdanie: „parodontoza" jest nie poprawną nazwą chronicznego zapalenia przyzębia potocznie nazywanego paradontozą.

Drugi akapit. Sformułowanie „mechanizmy odporności immunologicznej" przypomina stwierdzenie „masło maślane". Immunologia to jak wiadomo nauka o odporności i wystarczyło ograniczyć się do stwierdzenia, że w wyniku zakażenia *Porphyromonas gingivalis* dochodzi do aktywacji układu odpornościowego, przejawiającej się wzmożoną syntezą cytokin prozapalnych. Na marginesie chciałam wspomnieć, że preferuję używanie określenia „układ odpornościowy" a nie „immunologiczny" chociaż oczywiście obie nazwy są poprawne i używane „równolegle". (Jeżeli mogę sobie pozwolić w tym miejscu na nie do końca poważną uwagę, to pragnę stwierdzić, że „stara szkoła immunologów krakowskich" (nie „odpornościowców") preferowała nazwę „układ odpornościowy" i ja też już należę do tej „starej szkoły" i namawiam do używania nazwy „układ odpornościowy" na określenie „układu immunologicznego").

Strona 15

Czy badania prowadzono na myszach C57BL/6 czy na myszach C57BL/6J?

Konieczne jest precyzyjne wymienienie w streszczeniu użytych w pracy szczepów myszy i krótkie opisanie zastosowanych modeli doświadczalnych (nie każdy wie na czym polega „klasyczny model paradontozy").

Strona 16, ostatni akapit.

„Znaczenie" nabiera większego „znaczenia".

Wstęp. Strona 20.

Wszystkie nazwiska zacytowanych autorów w jednym nawiasie, tak jak to jest praktykowane we wszystkich znanych mi czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W przedstawionej mi do recenzji wersji pracy doktorskiej czasami są przecinki, czasami nie ma

żadnego znaku interpunkcyjnego pomiędzy nawiasami zawierającymi nazwiska kolejno cytowanych pierwszych autorów prac, na których powołuje się Pani Karina.

Co to są „komórki zapalne"?

Sformułowanie zawarte na stronie 21: „defekt immunologiczny z reguły związany jest z **upośledzonym niedoborem liczby** lub funkcji neutrofili" w sposób nie precyzyjny opisuje cechy charakterystyczne pacjentów z agresywną postacią paradontozy.

Strona 24.

Ostatnie zdanie na stronie 24

Zamiast „ekspresja receptorów IL-2" powinno być „ekspresja receptorów dla IL-2".

Strona 25

Zamiast „brak ekspresji genów chemokiny CXCR2 i IL-17" powinno być „brak ekspresji genów (ew. „dla" lub „kodujących") CXCR2 ((genów) receptora dla chemokiny CXCL2) i IL-17.

Strona 26

Skrót „IL" został już wielokrotnie wyjaśniony na poprzednich stronach i w spisie skrótów na stronie 12, dlatego kolejne jego wyjaśnianie jest zbędne.

Skrót „RANKL" został wyjaśniony na stronie 25 i 27 oraz w spisie skrótów na stronie 13.

Strona 30.

„Stres" to bardzo szerokie pojęcie, o jaki rodzaj „stresu" chodzi w zacytowanych przez Panią Karinę pracach: Genco, 1996 i Knight et al., 2016?

Cel pracy. Strona 60.

„Dogłębne poznanie molekularnych mechanizmów patologicznych zapalenia....." – według mnie mechanizmy nie mogą być patologiczne.

Metody

Strona 74 i kolejne. Jak już wspominałam powyżej konieczne jest podanie szczegółowych informacji dotyczących myszy, na których prowadzono badania (szczep, wiek, płeć, dostawca zwierząt lub hodowla własna, sposób przetrzymywania zwierząt przed doświadczeniem (np. po ile zwierząt w jednej klatce) itd).

Strona 75.

Opis grup doświadczalnych zawiera mylne informacje: na przykład autorka stwierdza, że w grupie trzeciej inhibitor SB216763 był podawany tak samo jak w grupie doświadczalnej 4 i 5, podczas gdy inhibitor był podawany tylko w grupie doświadczalnej 5. Można również poprawić opis grup przedstawionych na rycinie 11 i 15 zamieszczonych odpowiednio na stronach 98 i 104. Czy grupy doświadczalne otrzymujące *Porphyromonas gingivalis* otrzymywały również DMSO i celulozę? Z ryciny to nie wynika.

Konieczne jest wyjaśnienie ile razy myszy B6126SF2/F otrzymały inhibitor GSK3 o nazwie SB216763 i w jakiej dawce: 10 mg/kg (stron 75) czy 30 mg/kg (strona 96). Na stronie 75 jest napisane: „Inhibitor podano dzień przed infekcją *Porphyromonas gingivalis* a następnie co drugi dzień, aż do zakończenia doświadczenia. Inhibitor podawano dootrzenowo w dawce 10 mg/kg. Czy rzeczywiście inhibitor podano 23-krotnie?

Strona 77. Opis do ryciny 5 przedstawiający schemat doświadczenia.

Wspominano w nim, że doświadczenie przeprowadzono na myszach B6129SF2/J. Prosiłabym o szczegółową charakterystykę tych myszy? Myszy B6129SF2/J nie zostały wymienione w streszczeniu pracy, jak już wspomniałam powyżej.

Strona 79.

Autorka pisze, że oznaczono poziom IL-1. Proszę wyjaśnić czy to oznacza, że oznaczono poziom IL-1α i IL-1β, czy tylko IL-1 β? Podobna uwaga dotyczy TNF, czy chodziło o TNF- α?

Strona 39; 103, 104, 138.

IL-12p40 nie jest cytokiną, tylko podjednostką cytokin IL-12 i IL-23 (heterodimeryczne cytokiny o wspólnej podjednostce IL-12p40).

Rozważania na temat podjednostki IL-12p40 zawarłam w niektórych moich pracach, na przykład: Kubera M, Grygier B, Wrona D. i współ.: Stimulatory effect of antidepressant drug pretreatment on progression of B16F10 melanoma in high-active male and female C57BL/6J mice.J Neuroimmunol. 2011, 240-241:34-44; Kubera M, Curzytek K, Majewska-Szczepanik M. i współ.: Inhibitory effect of antidepressant drugs on contact hypersensitivity reaction. Pharmacol Rep. 2012; 64(3):714-22.; Curzytek K, Kubera M, Majewska-Szczepanik M i współ.: Inhibition of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity reaction by antidepressant drugs. Pharmacol Rep. 2013; 65(5):1237-46.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Kariny Adamowicz jest bardzo wartościowa i wnosi nowe spojrzenie na nie badany dotychczas wpływ infekcji *Porphyromonas gingivalis* na rozwój zapalenia stawów u

myszy. Autorka zastosowała również szereg bardzo nowoczesnych metod badawczych.

Rozprawę doktorską Pani mgr Kariny Adamowicz oceniam bardzo wysoko. Wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Kariny Adamowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego, ponieważ uważam, że oceniana rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.

Marta Kubera

Prof. dr hab. n. med. Marta Kubera