



Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

w Olsztynie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt



ul. M. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn, tel. 89-5233201

Prof. dr hab. Iwona Bogacka
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii UWM
10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 1A

Olsztyn, 31. stycznia 2023 r.



Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej pt. " Wpływ indukowanego hipoksja czynnika *Hif-1α* oraz czynnika transkrypcyjnego *Foxn1* na ukierunkowanie procesu gojenia urazów skóry (regeneracyjny vs reperacyjny)"

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Praca została wykonana pod opieką naukową Pani prof. dr hab. Barbary Gawrońskiej-Kozak w Zakładzie Biologicznych Funkcji Żywności Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Rozprawę doktorską stanowią dwie prace oryginalne – niżej wyszczególnione – opublikowane (w 2021 oraz 2022 roku) w prestiżowym czasopiśmie *The FASEB Journal*, umieszczonym na liście *Journal Citation Reports*. Łączny wskaźnik *IF* obu prac wynosi 11,668, a liczba punktów wyliczona na podstawie listy *MEiN* – 280:

1. **Machcinska S**, Kopcewicz M, Bukowska J, Walendzik K, Gawronska-Kozak B. „Impairment of the Hif-1α regulatory pathway in Foxn1-deficient (Foxn1^{-/-}) mice affects the skin wound healing process.” *The FASEB Journal*. 2021;35:e21289. doi: 10.1096/fj.202001907R. PMID: 33475195 (*IF* – 5,834; *pkt. MEiN* – 140)
2. **Machcinska S**, Walendzik K, Kopcewicz M, Wisniewska J, Rokka A, Pääkkönen M, Slowinska M, Gawronska-Kozak B. „Hypoxia reveals a new function of Foxn1 in the keratinocyte antioxidant defense system.” *The FASEB Journal*. 2022;36:e22436. doi: 10.1096/fj.202200249RR (*IF* – 5,834; *pkt. MEiN* – 140)

Badania przedstawione w powyższych pracach były finansowane w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki OPUS 14 Nr 2017/27/B/NZ5/02610. Publikacje są zespołowe (5-8 autorów) i we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem; autorem korespondencyjnym w obu publikacjach jest Pani Promotor, prof. dr hab. Barbara Gawrońska-Kozak. Udział Doktorantki w realizacji tych badań był znaczący i wynosił 55%, co zostało potwierdzone przez współautorów w załączonych oświadczeniach. Chciałabym jednak zwrócić uwagę na brak spójności pomiędzy oświadczeniem dołączonym do rozprawy a oświadczeniem umieszczonym w pracy oryginalnej nr 2 (w oświadczeniu dołączonym do rozprawy,

Doktorantka wskazuje, że brała udział w opracowaniu koncepcji badań, ale brakuje tej informacji w oświadczeniu umieszczonym w publikacji).

Zbiór publikacji stanowiących rozprawę doktorską poprzedza polskojęzyczne opracowanie (76 stron), w skład którego wchodzi: *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Wykaz skrótów*, zestawienie *publikacji stanowiących rozprawę doktorską*, *Wstęp* przedstawiający ogólne informacje dotyczące budowy i funkcji skóry, procesu gojenia urazów skóry oraz czynników w nim uczestniczących. Cennym uzupełnieniem tej części opracowania są trzy bardzo staranne i przejrzyste ryciny oraz tabela. Kolejne rozdziały obejmują *Hipotezę i cele badawcze*, *Materiał i metody*, *Wyniki*, *Dyskusję*, *Podsumowanie i Wnioski*. Opracowanie zawiera również obszerną *Bibliografię* (ponad 100 pozycji) oraz *oświadczenia współautorów*. Pod względem formalnym oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom.

Ocena merytoryczna rozprawy

Tematyka badawcza ocenianej rozprawy doktorskiej dotyczy wykazania współdziału czynnika transkrypcyjnego Foxn1 oraz hipoksji w regulacji gojenia urazów skóry. Skóra to fascynujący organ ciała – największy, najbardziej zewnętrzny, istotna ochrona organizmu przed działaniem czynników zewnętrznych, ale też organ najczęściej narażony na urazy. Jej integralność zostaje przywrócona poprzez gojenie, które jest procesem złożonym – wymagającym interakcji komórek, mediatorów odpowiedzi immunologicznej oraz czynników wzrostu – zachodzącym na drodze reperfuzji (powstanie blizny) lub regeneracji (brak blizny). Co istotne, gojenie bezbliznowe jest procesem występującym głównie u bezkręgowców i niższych kręgowców, pozostając wyjątkową zdolnością w życiu płodowym u ssaków (do trzeciego trymestru rozwoju płodowego), które rozwijają się w środowisku o obniżonej dostępności tlenu. Pomimo licznych badań, mechanizmy kontrolujące przekierowanie wewnątrzkomórkowych szlaków w gojeniu regeneracyjnym na gojenie naprawcze nie zostały scharakteryzowane, a zatem ich poznanie jest obecnie największym wyzwaniem w tym obszarze badań. Jednym z czynników transkrypcyjnych decydujących o efektywności procesów gojenia urazów skóry jest naskórkowy czynnik Foxn1, którego występowanie w organizmie jest ograniczone do skóry i grasicy. Natomiast, kluczowym elementem środowiskowym, który determinuje proces gojenia się ran jest hipoksja i główny regulator homeostazy tlenowej – czynnik transkrypcyjny Hif-1. Zadania badawcze, które zrealizowała Doktorantka w swojej pracy doktorskiej są kontynuacją niezwykle interesujących badań prowadzonych przez zespół Pani Prof. Barbary Gawrońskiej-Kozak, które po raz pierwszy wskazały na ważną rolę czynnika Foxn1 w złożonym procesie gojenia urazów skórnych. W badaniach tych stwierdzono między innymi, że myszy pozbawione czynnika Foxn1 (Foxn1^{-/-}, myszy nagie), posiadają zdolność do regeneracji wycięć w małżowinie usznej z następującą regeneracją chrząstki oraz do gojenia bezbliznowego urazów skóry. Biorąc pod uwagę możliwe powiązanie aktywności Foxn1 i hipoksji w procesie gojenia urazów skórnych, w kolejnych badaniach, z wykorzystaniem nowoczesnych, wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania nowej generacji (NGS), stwierdzono znaczące różnice w ekspresji genów związanych z hipoksją (m. in. Hif-1α) u myszy Foxn1^{-/-} w porównaniu z osobnikami kontrolnymi Foxn1^{+/+}. Wyniki powyższych badań zespołu stały się inspiracją do kolejnych, będących podstawą analizowanej rozprawy doktorskiej.

Nadrzędna hipoteza badawcza analizowanej rozprawy doktorskiej zakładała, że indukowany hipoksją czynnik Hif-1α przez współdziałanie z czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 przekierowuje proces gojenia regeneracyjnego (bezbliznowego) na gojenie reparacyjne

(bliznowe). Sformułowano także dwie hipotezy szczegółowe: i) proces gojenia się ran skóry regulowany jest poprzez interakcję pomiędzy czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 a indukowaną hipoksją czynnikiem Hif-1 α , ii) czynnik transkrypcyjny Foxn1 oraz hipoksja regulują zmiany fizjologiczne w keratynocytach na poziomie molekularnym i funkcjonalnym. W celu weryfikacji hipotez zrealizowano w sumie siedem zadań badawczych, wykorzystując różne modele i układy doświadczalne. Ich celem było między innymi porównanie procesu gojenia urazów skóry u myszy Foxn1 $^{-/-}$ (model regeneracyjny) i kontrolnych (Foxn1 $^{+/+}$; model reperacyjny) w kontekście ekspresji genów związanych z hipoksją. Istotnym uzupełnieniem rozprawy doktorskiej są także badania *in vitro*, dotyczące wyjaśnienia mechanizmu, w którym hipoksja i czynnik Foxn1 regulują zmiany fizjologiczne keratynocytów, obejmujące: a) określenie profili białkowych keratynocytów transdukowanych wektorem adenowirusowym Ad-Foxn1 lub Ad-GFP, a następnie hodowanych w zmiennych warunkach dostępności tlenu – hipoksja vs. normoksja; b) identyfikację białek zgodnie z pełnioną funkcją przy zastosowaniu ogólnodostępnych baz bioinformatycznych; c) zbadanie udziału Foxn1 w regulacji funkcji antyoksydacyjnej keratynocytów; d) wykazanie regulującego wpływu Foxn1 oraz hipoksji na cechy funkcjonalne keratynocytów w procesach związanych z gojeniem urazów skóry takich jak: proliferacja, migracja, regulacja aktywności szlaków proangiogennych.

Biorąc pod uwagę nieliczne dane literaturowe opisujące związek między hipoksją i aktywnością czynnika Foxn1 w aspekcie niedoboru limfocytów T lub nowotworzenia, oraz wyniki wcześniejszych badań własnych Zespołu Biologii Regeneracyjnej, wybór problematyki badawczej należy uznać za trafny, a podjęte badania za ważne i nowatorskie. Prowadzono je między innymi w warunkach *in vivo*, wykorzystując 4-6 miesięczne myszy pozbawione aktywności czynnika Foxn1 [szczep Balb/cCByCg-Foxn1 $^{-/-}$ (Foxn1 $^{-/-}$)] oraz myszy kontrolne [szczep Balb/c/cmbd (Foxn1 $^{+/+}$)]. Z kolei, w serii doświadczeń *in vitro* wykorzystano skórę pobraną od nowonarodzonych myszy Foxn1 $^{+/+}$ (szczepu C57BL/6; w celu izolacji keratynocytów) oraz skórę pochodzącą od 8-11 tygodniowych myszy Foxn1 $^{-/-}$ (CBy.Cg-Foxn1 $^{-/-}$ /cmbd; w celu izolacji fibroblastów). Za interesujący uważam model kokultury wyizolowanych keratynocytów oraz fibroblastów transdukowanych adenowirusem Ad-Foxn1, hodowanych w warunkach normoksji lub hipoksji.

Należy podkreślić, że analizowane publikacje są tematycznie i metodycznie spójne. Pozytywnie oceniam hipotezę i sformułowane cele/zadania badawcze. Trzeba zaznaczyć, że przeprowadzenie powyższych badań wymagało zastosowania złożonych procedur doświadczalnych oraz dużego nakładu pracy Doktorantki. Cennym ułatwieniem podczas oceny tej części rozprawy jest uwzględnienie bardzo starannych i przemyślanych schematów zastosowanych układów doświadczalnych. Analizy laboratoryjne są różnorodne, nowoczesne i odpowiednio dobrane do założonych celów badawczych. Obejmują one m. in. LC-MS/MS, cytometrię przepływową, real time PCR, Western blot, testy immunoenzymatyczne ELISA, barwienia immunohistochemiczne i immunofluorescencyjne, testy właściwości angiogennych, analizy proliferacji, migracji keratynocytów, analizy aktywności metabolicznej komórek (MTT). Są one również wyczerpująco opisane w pracach i polskojęzycznym opracowaniu rozprawy. Poprawne są także analizy statystyczne wykorzystane przy opracowaniu uzyskanych wyników.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania Pani mgr Sylwii Machcińskiej-Zielińskiej dostarczyły szereg interesujących obserwacji. Wykazano między innymi, że ekspresja kluczowych czynników indukowanych hipoksją (Hif-1 α i Fih-1) jest zależna od aktywności Foxn1. Stwierdzono, że zraniona skóra myszy pozbawionych Foxn1 wykazywała stabilną i niezmienną ekspresję czynników Hif-1 α i Fih-1, podczas gdy u myszy kontrolnych

zanotowano w tkance pourazowej wzrost ekspresji mRNA Hif-1 α przy jednoczesnym spadku Fih-1. Przedstawione dane sugerują, że nieprawidłowości w regulacji ekspresji Hif-1 α spowodowane brakiem Foxn1 mogą uruchamiać proces gojenia bezbliznowego. Wykazano ponadto, że wprowadzenie Foxn1 na drodze transdukcji do keratynocytów pozbawionych endogennego Foxn1 (uzyskane od myszy Foxn1^{-/-}) zahamowało ekspresję mRNA Hif-1 α w warunkach normoksji, ale nie w hipoksji, zaś w przypadku Fih-1 odnotowano zahamowanie ekspresji mRNA wyłącznie w warunkach hipoksji. Należy zaznaczyć, że przedstawione w niniejszej pracy wyniki są pierwszymi wskazującymi na możliwe współdziałanie Foxn1 i Hif-1 α w skórze. Istotnym elementem poznawczym analizowanej rozprawy było również wykazanie nadzorującej funkcji Foxn1 w procesach związanych z odbudową pourazowego naskórka, migracji i proliferacji keratynocytów, oraz w procesie angiogenezy w naprawczym gojeniu urazów skóry. Badania Doktorantki wykazały, że czynnik Foxn1 może być elementem regulującym tempo migracji keratynocytów, w zależności od dostępności tlenu w miejscu zranienia. Podczas obniżonej dostępności tlenu (hipoksja jako pojedyncza zmienna) obserwowano zwiększone tempo migracji keratynocytów, natomiast znaczne spowolnienie tempa migracji stwierdzono po transdukcji Ad-Foxn1 do keratynocytów. Z kolei, nadekspresja Foxn1 w warunkach normoksji przyspieszyła migrację keratynocytów. Podobnie jak w przypadku regulacji migracji keratynocytów, w zależności od warunków dostępności tlenu, Foxn1 nadzoruje proces angiogenezy przeciwstawiając się gwałtownym zmianom środowiskowym. Analiza z zastosowaniem spektrometrii mas białek wykazała m. in. spadek poziomów białka głównego regulatora angiogenezy – czynnika wzrostu śródbłona naczyniowego, VEGF – w keratynocytach transdukowanych Ad-Foxn1 i hodowanych w warunkach hipoksji. Za interesujące uważam również wyniki badań, które po raz pierwszy wykazują istotną funkcję czynnika Foxn1 w regulacji ochrony antyoksydacyjnej w keratynocytach (w warunkach *in vitro*) i w skórze niezranionej, ale również pourazowej (w warunkach *in vivo*), poprzez aktywację systemu tioredoksyn (Txn). Analizując profil białkowy keratynocytów stymulowanych *in vitro* za pomocą adenowirusa Ad-Foxn1 stwierdzono m. in. wzrost ekspresji tioredoksyny Txn2 (istotnej w regulacji potencjału błonowego mitochondriów) i reduktazy tioredoksyny Txnrd3, szczególnie w warunkach hipoksji. Należy podkreślić, że prezentowane wyniki są pierwszymi identyfikującymi obecność aktywnej formy Txnrd3 w keratynocytach, ale także pierwszymi uzyskanymi w badaniach prowadzonych na modelu myszy. Inspiracją do kolejnych badań mogą być przeprowadzone analizy *in silico*, które wskazały możliwe miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w układzie tioredoksyn – Txn1, Txnrd1, Txn2, Txnrd2 i Txnrd3.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań są interesujące i świadczą o złożoności mechanizmów kontrolujących proces gojenia się ran skóry. Stanowią również solidną podstawę do planowania dalszych badań zmierzających do pełniejszego poznania tego niezwykle złożonego procesu. Autorka, pomimo uzyskania tak licznych wyników zaprezentowała je w sposób uporządkowany i przyjazny w odbiorze. Prezentacja graficzna rycin, tabel oraz zdjęć jest przejrzysta i staranna. W dyskusjach zamieszczonych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz w jej polskojęzycznym opracowaniu dokonano wnikliwej analizy i interpretacji uzyskanych wyników. W mojej opinii, sformułowane wnioski jednoznacznie weryfikują postawioną w pracy hipotezę badawczą. Bardzo pozytywnie oceniam także uwzględnienie w dyskusji opracowania polskojęzycznego, ale przede wszystkim w oryginalnych publikacji, schematów podsumowujących uzyskane wyniki oraz obrazujących potencjalną rolę czynnika Foxn1 w procesie gojenia urazów skórnych. Doktorantka cytuje obszerne

piśmiennictwo, co umożliwiło Jej wykazanie się gruntowną znajomością problematyki związanej z tematem przedstawionej rozprawy doktorskiej. Wszystkie te elementy świadczą o zrozumieniu podjętej tematyki badawczej, ale przede wszystkim o dojrzałości naukowej Doktorantki.

W ocenie rozprawy trudno jest sformułować krytyczne uwagi, ponieważ prace naukowe opublikowano w prestiżowym czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych, i z pewnością zostały rzetelnie ocenione przez szerokie grono recenzentów oraz edytorów redakcji. Niemniej jednak podczas analizy prac i polskojęzycznego opracowania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag/pytań, którymi chciałabym się podzielić:

1. Na str. 57-58 Doktorantka dokonuje porównania modelu wycięcia i nacięcia skórniego u myszy. Chciałabym zapytać, co Autorka miała na myśli twierdząc, że uzyskane dane potwierdzają koncepcję, że rodzaj nacięcia skóry odzwierciedla profil gojenia (str. 58, l. 3)?
2. Na jakiej podstawie dokonano wyboru warunków obniżonej dostępności tlenu (hipoksji) do badań *in vitro* na poziomie 1%?
3. Proszę o doprecyzowanie informacji dotyczącej udziału Doktorantki w wykonaniu analiz statystycznych. Proszę zwrócić uwagę na pewne nieścisłości w rozdziale *Analiza statystyczna* (str. 39, pierwsze zdanie tego rozdziału wskazuje, że została ona wykonana przez firmę Biostat) oraz rozdziale *Statistical methods* w poszczególnych publikacjach. Czy Doktorantka brała udział w wykonywaniu analiz bioinformatycznych?
4. Chciałabym zwrócić uwagę na nieistotne z merytorycznego punktu widzenia, ale jednak licznie występujące w polskojęzycznym opracowaniu edytorskie potknięcia, tzw. literówki (np. kolagen typu i), szereg zdań rozpoczynających się z małej litery, brak konsekwencji w stosowaniu skrótów (np. MMPs, TIMPs, TGFβ) lub nieprecyzyjne zdania (np. zdanie na str. 44, zaczynające się od „Choć wzór ekspresji...”; ostatnie zdanie na str. 55).
5. Prosiłabym o krótką odpowiedź na temat udziału czynników transkrypcyjnych PPAR w regulacji procesu gojenia się ran.
6. Jakie widzi Pani możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników badań?
7. Gdyby Pani uzyskała wysokobudżetowy projekt naukowy, to jaki problem badawczy byłby przedmiotem Pani badań w najbliższej przyszłości i dlaczego?
8. Czy może Pani wskazać/polecić potencjalnemu pacjentowi związki naturalnie występujące w przyrodzie, które mogą przyspieszyć proces gojenia się ran?

PODSUMOWANIE

Pragnę z pełnym przekonaniem stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy. Podjęty problem badawczy jest interesujący i aktualny, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki są niezwykle wartościowe pod względem poznawczym, stanowiąc cenne uzupełnienie wiedzy z zakresu regulacji procesu gojenia urazów skóry. Opublikowane dwie oryginalne prace o międzynarodowym zasięgu są rzetelnie przygotowane, zawierają jasno określone cele poparte dobrze przeprowadzonymi doświadczeniami i wynikami oraz wnikliwą i merytoryczną dyskusją. Na podkreślenie zasługuje również szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą oraz umiejętnościami w doborze i posługiwaniu się licznymi i nowoczesnymi metodami biologii molekularnej. Można sądzić, że Doktorantka

zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Na uwagę zasługuje także fakt, że dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki obejmuje dziewięć prac, łącznie z pracami będącymi podstawą rozprawy doktorskiej, opublikowanych w latach 2022-23 w czasopismach umieszczonych na liście JCR (wg bazy Web of Science liczba cytowań wynosi 35 a indeks $h - 4$).

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Wpływ indukowanego hipoksją czynnika Hif-1 α oraz czynnika transkrypcyjnego Foxn1 na ukierunkowanie procesu gojenia urazów skóry (regeneracyjny vs reperacyjny)” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i w pełni spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej oraz dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy zaprezentowanych wyników badań oraz ich twórczy charakter, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy.

Jacek Boppe