



Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 15
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska
Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl



Gdańsk, 03.02.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Pani Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej** jest: „Wpływ indukowanego hipoksją czynnika Hif 1 α oraz czynnika transkrypcyjnego Foxn1 na ukierunkowanie procesu gojenia urazów skóry (regeneracyjny vs reperacyjny)”.

Promotor pracy: **Prof. dr hab. n. med. Barbary Gawrońskiej-Kozak**, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Skóra stanowi powłokę ochronną narażoną na ciągły kontakt z często niezbyt przyjaznym środowiskiem. Przerwanie bariery naskórkowej związane jest z dużym niebezpieczeństwem zarówno ze strony potencjalnych patogenów, czy toksyn, ale również ze względu na potencjalną utratę płynów fizjologicznych (np. krwi). Dlatego też, w skórze istnieją mechanizmy usuwania uszkodzeń oparte na reparacji lub regeneracji. Co istotne, procesom naprawczym towarzyszy również włóknienie tkanki, co prowadzi do powstawania blizn; natomiast w proces regeneracji przebiega bez wytworzenia blizny. Niestety w toku ewolucji procesy regeneracyjne zostały zastąpione przez naprawcze, jednak jak dotąd dokładny mechanizm oraz regulacja tych dwóch procesów nie jest dobrze zbadana. Wydaje się, że czynnik transkrypcyjny Foxn1, poprzez regulację odpowiedzi na niedotlenienie (hipoksję) jest odpowiedzialny za indukcję regeneracji bezbliznowej skóry. Rozprawa doktorska mgr Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół Prof. dr hab. n. med. Barbary Gawrońskiej-Kozak nad rolą czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w procesie gojenia ran i świetnie wpisuje się w nurt najnowszych badań; wychodząc naprzeciw wyzwaniom współczesnej medycyny regeneracyjnej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana zastała w formie monografii, w tak zwanym „trybie przejściowym” (Na podstawie, Art. 179 ust. 6-9 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.). Manuskrypt zawiera, 77 numerowanych stron, w tym, 9 rycin. Dodatkowo, jako załączniki dodano dwie publikacji, które są podstawą

przedstawionego do oceny osiągnięcia oraz odpowiednie oświadczenia współautorów. W obu artykułach doświadczalnych, które ukazały się w renomowanym czasopiśmie *FASEB J*, doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami współautorów publikacji udział mgr Sylwii Machcińskiej-Zielińskiej w powstaniu tych prac, był znaczący (55% w obu pracach) i obejmował wykonanie większości badań, analizy wyników oraz przygotowanie manuskryptów.

b) ocena uzyskanych rezultatów

Rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Machcińskiej-Zielińskiej oparta została o dobrze zaplanowane badania polegające na obserwacji zmian zachodzących w trakcie gojenia się ran, u myszy pozbawionych ekspresji białka Foxn1^{-/-}, w porównaniu do myszy kontrolnych Foxn1^{+/+}. Dodatkowo, doświadczenia przy wykorzystaniu wyizolowanych keratynocytów i fibroblastów z myszy Foxn1^{-/-} oraz Foxn1^{+/+} zbadano wpływ niedotlenienia (1% tlenu) na własności komórek oraz aktywację odpowiedzi na niedotlenienie poprzez czynnik Hif-1α.

Wśród najistotniejszych wniosków wynikających z przedstawionych badań, należy wymienić:

1. Wykazanie, że myszy pozbawione czynnika transkrypcyjnego Foxn1 (Foxn1^{-/-}) charakteryzują się regeneracyjnym gojeniem uszkodzeń skóry. Nadekspresją białka Tgfβ3 oraz kolagenu typu III, oraz charakterystyczna dynamika zmian w poziomach mRNA oraz białek Mmps/Timps prowadzi do szybkiej odbudowy bariery naskórkowej.
2. Efektywna ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 stymuluje procesy naprawcze w naskórku po urazie, w tym migrację i proliferację keratynocytów oraz angiogenezę, co prowadzi powstawania blizn.
3. Foxn1 modulowanie ekspresji czynników indukowanych hipoksją: Hif-1α oraz jego białek towarzyszących: Ep300 oraz Fih-1.
4. Czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 aktywuje białka uczestniczące w odpowiedzi na szok tlenowy, w tym białka układu tioredoksyn (np. tioredoksyny 3, Txnrd3), nie tylko w trakcie gojenia urazów skóry, ale również w skórze nieuszkodzonej.

Podsumowując, przedstawione do oceny badania wskazują, że czynnik transkrypcyjny Foxn1, pełni decydującą rolę w wyborze ścieżki gojenia rany wpływając na ekspresję czynnika Hif-1α, jego regulatorów oraz aktywację odpowiedzi na szok oksydacyjny, ze szczególnym uwzględnieniem układu tioredoksyn. Wydaje się, że uzyskane wyniki mogą mieć olbrzymie znaczenie praktyczne, np. w leczeniu ran przewlekłych, czy w kosmetologii (gojenie bezbliznowe). Szkoda, że autorka nie podkreśliła potencjalnych aspektów aplikacyjnych wynikających z badań przedstawionych w ocenianej rozprawie doktorskiej.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, sposób prezentacji.

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, a niewielkie literówki nie wpływają na bardzo dobry odbiór pracy. Część, z nich zapewne wynika z autokorekty dokonywanej przez edytor tekstu, jak „kolagen typu I”, zamiast „kolagen typ I (pierwszego)”.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł

Praca mgr Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej zawiera ponad 101 dobrze dobranych odnośników literaturowych. Niestety, znaczna część cytowanych prac (83/101) to artykuły lub podręczniki, które ukazały się przed rokiem 2015. Należy dodać, że praca zawiera również rysunki na który przedstawiono: budowę skóry, proces gojenia ran, metodykę badawczą oraz podsumowanie wyników. Rysunki wykonane są bardzo starannie i bardzo dobrze ilustrują omawiane zagadnienia. Mam tylko jedną uwagę, co do schematu skóry myszy (Rys. 1 strona 11). Warstwa jasna raczej nie występuje w skórze owłosione, gdyż jest cechą charakterystyczną dla skóry nieowłosionej; w przypadku myszy będą to na przykład opuszki kończyn.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Podjęta tematyka jest jak najbardziej aktualna, nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również z praktycznego, gdyż zaburzenie gojenia ran jest poważnym problemem klinicznych, natomiast powstające w wyniku naprawy uszkodzeń skóry blizny mogą przyczynić się do stygmatyzacji pacjentów. Dlatego też uważam, że podjęcie próby zbadania mechanizmów decydujących o aktywacji ścieżki regeneracyjnej lub naprawczej są jak najbardziej istotne. Co więcej, zbadanie interakcji między czynnikami transkrypcyjnymi Foxn1 i Hif-1 α jest logiczną kontynuacją badań prowadzonych przez grupę **Pani Prof. Barbary Gawrońskiej-Kozak**. Pierwsza hipoteza badawcza dotyczy właśnie zbadania interakcji między tymi czynnikami na modelu myszy (Foxn1^{-/-} oraz Foxn1^{+/+}). Drugim celem pracy było określenie wpływu Foxn1 na interakcję między fibroblastami oraz keratynocytami, co świadczy o dobrej znajomości procesów zachodzących w trakcie odnowy bariery skórnej po urazie. O ile keratynocyty naskórka są odpowiedzialne za proces reepitalizacji, to fibroblasty wytwarzając duże ilości kolagenu typu I, są odpowiedzialne za powstawanie blizn. Tak więc, uważam zarówno same hipotezy badawcze, jak również wymienione zadania badawcze, stanowią logiczną całość, a uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę czynnika Foxn1 w regulacji odpowiedzi na niedotlenienie poprzez czynnik Hif1 α oraz aktywację odpowiedzi na stres oksydacyjny. Co więcej, doktorantka wykazała, że procesy te w znacznym stopniu wpływają na przebieg procesu gojenia ran (regeneracja, czy naprawa).

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.

Autorka wykorzystwała szeroki wachlarz technik histochemicznych (immuno-histochemicznych, mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływową), biologii molekularnej (qPCR oraz Western Blot) oraz badań funkcjonalnych (prolifracja komórek oraz ich mobilności, indukcja agiogenezy). Należy podkreślić, że do określenia czynników odpowiedzialnych za interakcje między keratynocytami, a fibroblastami wykorzystano badania proteomiczne, dzięki którym udało się zidentyfikować szereg białek uczestniczących

w sygnalizacji między keratynocytami, a fibroblastami. Bardzo cenne wydaje się połączenie badań na zwierzętach z badaniami *in vitro* na keratynocytach. Umożliwiło to połączenie wyników obserwacji procesu gojenia się ran u zwierząt doświadczalnych, z badaniami proteomicznymi oraz funkcjonalnym wykonanymi na kohodowalach keratynocytów i fibroblastów. Uzyskane wyniki wskazującą na kluczową rolę mechanizmów indukowane przez niedotlenienie, które są zależne od Foxn1. Należy dodać, że na przeprowadzenie badań uzyskano odpowiednie zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (zgoda nr 68/2018).

Warto zwrócić uwagę, że wyniki, które są podstawą przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, zostały już poddane skrupulatnej ocenie eksperckiej i opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *FASEB J.* Jednak, uwagi na funkcję recenzenta mam kilka pytań i uwag dotyczących metodologii oraz prezentowania wyników.

- Dlaczego w doświadczeniach wykorzystywano dwa modele mysie - Balb/c/cmdb (Foxn1^{+/+}) oraz C57BL/6 (Foxn1^{+/+}) i czy mogło mieć to wpływ na uzyskane wyniki?
- Jaki był poziom ekspresji (mRNA) oraz poziom białka Foxn1 w badanych szczepach Balb/c/cmdb (Foxn1^{+/+}) oraz C57BL/6 (Foxn1^{+/+}) i dlaczego zastosowano model z nadprodukcją Foxn1 w szczepie dzikim (Foxn1^{+/+})? Warto dodać, że nadprodukcja białka nie zawsze odzwierciedla fizjologiczny poziom białka w komórkach, co może wpływać na jego aktywność, a więc wyniki uzyskane w badaniach (fizjologiczny poziom vs nadprodukcja), nie koniecznie są komplementarne.
- Wydaje się, że badania na fibroblastach (Foxn1^{+/+}), byłby by dodatkową kontrolą.
- Dlaczego wyniki qPCR przedstawiane są w oparciu o obliczenia: gen badany/gen referencyjny*10? Dlaczego nie zastosowano powszechnie stosowanej metody $\Delta\Delta Ct$, polecanej również przez producenta stosowanych odczynników (Biorad).

Mam również dwa bardzo ogólne pytania:

- Czy autorka zastanawiała się, dlaczego u wyższych kręgowców, jak również u człowieka, przeważa proces naprawy uszkodzonej tkanki, z wytworzeniem blizny, a nie regeneracji?
- Czy autorka myślała już o praktycznym wykorzystaniu uzyskanych wyników?

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że **bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Pani mgr Sylwia Bronisława Machcińska-Zielińska**, szczególnie, jeśli chodzi o badania wykonane na zwierzętach.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca ma klasyczny układ, zawiera dokładny spis treści, streszczenie po polsku i angielsku oraz drobiazgowy spis skrótów. Następnie umieszczony jest bardzo przydatny wstęp systematycznie wprowadzający czytelnika w tematykę, poczynając od budowy skóry. Później, omówione są sposoby odbudowy uszkodzeń skóry, a na zakończenie wstępu doktorantka charakteryzowała czynnik transkrypcyjny FOXN1, wprowadziła w tematykę niedotlenienia oraz odpowiedzi na szok tlenowy, ze szczególnym uwzględnieniem roli białek z rodziny tioredoksyn. Praca opiera się na dwóch hipotezach badawczych, oraz szeregu dobrze zdefiniowanych zadań badawczych. Kolejny rozdział opisuje bardzo drobiazgowo materiały i metody, chociaż brakuje w nim informacji dotyczących producentów poszczególnych odczynników. Natomiast rozdział kończy się adnotacją, że dane dotyczące

producentów znajdują się w dołączonych manuskryptach. Następnie umieszczone są rezultaty, w których doktorantka systematycznie i w sposób logiczny omawia uzyskane wyniki. Dyskusja stanowi obszernie omówienie wyników w świetle wcześniejszych dokonań zespołu **Pani Prof. Barbary Gawrońskiej-Kozak**, oraz danych literaturowych. Po podsumowaniu w języku polskim i angielskim umieszczono jeszcze spis literatury. Dodatkowo, manuskrypt zawiera oświadczenia współautorów oraz wydruk dwóch publikacji będących podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wraz z bardzo obszernymi uzupełniającymi danymi.

Autorka w sposób przejrzysty i dokładny opisuje zarówno metodykę oraz wyniki jak również swobodnie prowadzi dyskusję. Jeśli chodzi o formę prezentacji, to należy zwrócić uwagę na obszerność pracy (77 stron maszynopisu), która bardziej odpowiada raczej monografii, niż dysertacji opartej o publikacjach. Zapewne wystarczyłoby wprowadzenie, krótkie omówienie najważniejszych wyników oraz podsumowanie. Z drugiej strony, tekst rozprawy pozbawiony jest całkowicie dokumentacji graficznej wyników, a jedynie odwołuje się do rysunków zamieszczonych w publikacjach, które stanowią załączniki do rozprawy. Mimo tego, że praca jest napisana bardzo przystępnie, to jednak dużo łatwiej czyta się załączone publikacji konfrontując, na bieżąco tekst z rysunkami. Ponieważ nie są to uwagi merytoryczne, nie wpływa to na moją wysoką ocenę pracy. Warto również podkreślić, że zarówno wstęp jak i metody oraz dyskusja zawierają bardzo przydatne schematy umożliwiające zrozumienie omawianej tematyki, prześledzenie protokołu doświadczeń na zwierzętach, czy też podsumowującego wyniki badań.

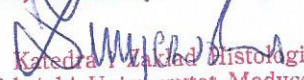
Chciałbym podkreślić, że wszystkie sugestie i uwagi zawarte w przedstawionej recenzji, w żadnej mierze nie umniejszają dokonań doktorantki oraz wartości poznawczej prezentowanych badań.

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, monografia mgr Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej oparta jest o dwóch bardzo istotnych z punktu widzenia rozwoju naszej wiedzy o gojeniu ran publikacjach, które ukazały się w renomowanym czasopiśmie *FASEB J*. Na uwagę zasługuje umiejętność autorki łączenia badań na zwierzętach z pracą na modelach komórkowych oraz mnogość zastosowanych technik, w tym, badań proteomicznych. Nie mam więc wątpliwości, że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.), dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, wniosek o dopuszczenie Pani Sylwii Bronisławy Machcińskiej-Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, dnia 03.02.2023

Prof. dr hab. Michał Żmijewski

prof. dr hab. Michał Żmijewski

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny