

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Marty Marii Kopcewicz

pt. „*Zmienność procesu gojenia urazów skóry w zależności od wieku, otyłości oraz płci w aspekcie modulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1*”.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologicznych Funkcji Żywności Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pod kierunkiem promotora - prof. dr hab. n.med. Barbary Gawrońskiej-Kozak. Podstawą rozprawy doktorskiej są 2 oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy Journal Citation Reports - JCR: (a) *Aging-US* ($IF_{5-letni}=6,38$) oraz (b) *Wound Repair and Regeneration* ($IF_{5-letni}=4,483$). W pracach tych Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej wkład w te prace, jak wynika z oświadczeń współautorów, jest znaczący (wg załączonych oświadczeń wynosi odpowiednio 55% i 60%) i obejmuje m.in. wykonanie doświadczeń *in vivo*, przeprowadzenie szeregu analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie manuskryptu. Przedstawione prace zostały opatrzone rozbudowanym, 62 stronicowym opracowaniem, na które składają się: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz wybranych skrótów i akronimów, wstęp, hipoteza i cele badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i bibliografia. Wykonane badania zostały sfinansowane ze środków projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki (OPUS3 Nr 2012/05/B/NZ5/01537 i OPUS14 Nr 2017/27/B/NZ5/02610), których kierownikiem była lub ciągle jest Pani prof. dr hab. n.med. Barbara Gawrońska-Kozak oraz ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność” (Nr 05-1/KNOW2/2015), którego członkiem był Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za proces gojenia ran skórnych. Wiadomo, że zraniona skóra dorosłych ssaków goi się w procesie naprawczym (reparacyjnym), którego efektem jest wytworzenie blizny, natomiast skóra płodów goi się w sposób bezbliznowy (regeneracyjny). Zespół, z którego wywodzi się Doktorantka, kierowany przez Panią prof. dr hab. n.med. Barbarę Gawrońską-Kozak, dokonał znaczących odkryć w zakresie poznania mechanizmów odpowiedzialnych za bliznowe i bezbliznowe gojenie skóry ssaków. Wykazano m.in. że jednym z czynników odpowiedzialnych za bliznowe gojenie ran jest czynnik transkrypcyjny Foxn1. Badania te są niezwykle cenne nie tylko z punktu widzenia nauk podstawowych ale także w kontekście możliwości ich wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Można przewidywać, że badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych będą punktem wyjścia do opracowania nowych podejść w

leczeniu trudno gojących się ran czy radzenia sobie z tworzeniem blizn przerostowych ludzi. Badania Doktorantki skupiają się na opisie wpływie wieku, płci i diety na proces gojenia ran skórnych myszy w kontekście ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1. Pomimo istnienia doniesień literaturowych na temat modulacji ekspresji czynnika Foxn1 w trakcie życia osobniczego czy pod wpływem diety, brak jest danych na temat skumulowanego wpływu badanych czynników na proces gojenia ran. Badania przeprowadzono na cennych modelach zwierzęcych - myszach szczepu C57BL/6 (Foxn1 +/+) oraz myszach transgenicznym Foxn1::Egfp (Foxn1 +/-). Podjęty temat badawczy i nakreślony cel badań uważam za ważny i interesujący naukowo.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przystępując do czytania rozprawy doktorskiej, uwagę moją zwrócił tytuł, w którym warto byłoby dodać gatunek, na którym prowadzono badania. Jedynie na podstawie zapisu czynnika transkrypcyjnego można się domyślać, że badania przeprowadzono na gryzoniach. Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia, w języku polskim i angielskim. Bardzo dużo uwagi w tej części poświęcono na wprowadzenie (1 strona) a stosunkowo mniej na temat uzyskanych wyników. Brak też w tej części nawet skrótowych informacji na temat metodologii badań czy konkluzji budzi pewien niedosyt.

W 9-stronnicowym *Wstępie* Doktorantka dokonuje krótkiej charakterystyki budowy skóry, opisuje procesy gojenia urazów skórnych oraz rolę czynnika transkrypcyjnego Foxn1. Odwołuje się do kilkudziesięciu pozycji literaturowych, co świadczy o dobrej znajomości omawianej tematyki. W tej części umieszczono jeden schemat - budowy skóry myszy, w opisie którego warto byłoby podać źródło, na którym się opierało przy jego powstawaniu. W przeglądzie literatury skupiono się tylko na roli czynnika Foxn1 jako głównego regulatora bliznowego/bezbliznowego gojenia urazów skóry. Nasuwa się pytanie czy znane są inne czynniki transkrypcyjne regulujące bezbliznowy proces czy też brak aktywności Foxn1 jest kluczowy do tego procesu. Jakie grupy genów ulegają obniżonej ekspresji przy braku aktywności Foxn1? Myślę, że cennym uzupełnieniem tego rozdziału byłoby przedstawienie w formie tabelarycznej do tej pory zgromadzonych danych na temat molekularnych modulatorów procesu gojenia ran uzyskanych przy użyciu różnych modeli badawczych. Chętnie usłyszę uzupełnienia na ten temat w trakcie obrony pracy doktorskiej. Proszę także o wyjaśnienie czy istnieją na poziomie molekularnym podobieństwa w zakresie regeneracji skóry niższych kręgowców (np. płazów bezogoniastych) czy myszy z rodzaju *Acomys* a modeli mysich z różną aktywnością genu *Foxn1*.

Rozdział *Hipoteza i cele badawcze* zawiera jedną nadrzędną hipotezę badawczą, zakładającą, że podeszły wiek i/lub otyłość oraz towarzyszące zmiany ekspresji czynnika Foxn1 prowadzą do nieprawidłowości w procesie gojenia ran skórnych myszy C57BL/6. Uzupełnieniem tego są 2 poprawnie sformułowane hipotezy szczegółowe. Nie określono głównego celu pracy a wskazano cztery zadania badawcze dotyczące: (1) wykazania wpływu wieku (osobniki młode i stare) i diety (niskotłuszczowa i wysokotłuszczowa) na homeostazę skóry myszy C57BL/6, (2) analizy procesu gojenia ran skórnych samic i samców myszy w kontekście wieku i diety, (3) wykazania zmian w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w skórze osobników młodych, dorosłych i starych myszy C57BL/6, (4) analizy przebiegu procesu gojenia ran skórnych osobników młodych, dorosłych i starych myszy transgenicznych Foxn1::Egfp w aspekcie zmian ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1. Zaplanowane zadania badawcze są rozbudowane i adekwatne w kontekście sformułowanej powyżej hipotezy a podjęty problem naukowy o dużym znaczeniu poznawczym.

Rozdział *Materiały i Metody* składa się z 12 stron maszynopisu, zawiera 3 ryciny i 4 tabele. Doświadczenia *in vivo* na zwierzętach przeprowadzono w Zwierzętarni Instytutu Rozrodu Zwierząt i

Badań Żywność PAN w Olsztynie za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (zgody nr 28/2012 i 22/2015). W badaniach wykorzystano myszy szczepu C57BL/6 oraz myszy transgeniczne *Foxn1::Egfp*, u których transgen eGFP był pod kontrolą sekwencji regulatorowej genu *Foxn1*. Myszy szczepu C57BL/6 są powszechnie wykorzystywane w badaniach biomedycznych, szczególnie w badaniach genetycznych jako kontrola dla myszy genetycznie modyfikowanych, jednakże opisywane są u tych zwierząt predyspozycje do występowania różnego rodzaju zmian skórnych. Czy w związku z tym jest to idealny model do badania procesów związanych z gojeniem się ran skórnych i czy są dostępne dane o ewentualnych różnicach genetycznych tego szczepu, które mogą przyczyniać się do problemów skórnych? Wiadomo, że skóra ludzka jest najbardziej anatomicznie i fizjologicznie podobna do skóry świni – czy istnieją doniesienia na temat użycia tego modelu badawczego w badaniach nad gojeniem ran skórnych i rolą czynnika FOXN1? Chętnie usłyszę coś na ten temat na obronie pracy doktorskiej. Cennym elementem pracy doktorskiej było przeprowadzenie doświadczeń na myszach transgenicznych będących hemizygotami *Foxn1::eGFP*. Przy opisie tego modelu odwołano się do pozycji literaturowej, w której opisano ten szczep myszy – Terszowski i wsp. Science, 2006. Czy mogę prosić w trakcie obrony o przedstawienie różnic w fenotypie myszy *Foxn1+/-* i *Foxn1-/-*.

W kolejnej części rozdziału *Materiały i Metody* Doktorantka opisuje doświadczenia przeprowadzone oddzielnie dla zadań badawczych 1 i 2 oraz 3 i 4. Ta część pracy została wzbogacona 3 rycinami, co ułatwia Czytelnikowi poznanie układu eksperymentalnego. Rycina 2 zaprezentowana w tej części jest odpowiednikiem Ryciny 1 w artykule opublikowanym w *Aging*. Opis ryciny w pracy doktorskiej powinien brzmieć jako „schemat układu eksperymentalnego..” a nie „schemat diety...”. Dostrzegam też pewne nieścisłości między opisem tej części doświadczenia w artykule (str. 14) i pracy doktorskiej - m.in. 16-18mc *versus* 18-19mc dla myszy starych czy też udział tłuszczu w dietach – w pracy doktorskiej podano % tłuszczu a w artykule %kcal z tłuszczu. Wydaje się, że dane podane w pracy doktorskiej są błędne (59% tłuszczu w diecie to bardzo duża dawka). Następnie Doktorantka szczegółowo opisuje metodykę badań, która jest bardzo rozbudowana i dotyczy izolacji komórek skóry, wykorzystania cytometrii przepływowej, analiz histologicznych w oparciu o immunofluorescencję i immunocytochemię, izolację RNA i RT-qPCR, izolację białek oraz ich oznaczanie technikami Western blot, ELISA i spektrofotometryczną. Analiza statystyczna wyników dla zadań badawczych 1 i 2 przeprowadzona została przez firmę Biostat a wyniki zadań badawczych 3 i 4 były analizowane samodzielnie. Do tej części pracy mam następujące pytania: (1) jaka była jakość RNA uzyskanego z naskórka poddawanego wcześniej całonocnemu trawieniu dispazą? (2) przyjmuje się, że w analizie RT-qPCR minimum 2 geny referencyjne powinny być użyte (np. rekomendacje wg Bustin i wsp., Clin Chem. 2009, 55(4):611-22), dlaczego zatem zdecydowano się na użycie tylko jednego genu referencyjnego – *Hprt1*? W części dotyczącej opisu zestawów starterów i sond TaqMan warto byłoby podać producenta. Podsumowując tę część pracy doktorskiej stwierdzam, że zastosowano w pracy rozbudowaną i kompleksową metodykę badań. Opis przedstawionych metod może stanowić cenny materiał źródłowy.

W następnym rozdziale Doktorantka prezentuje *Wyniki*, które zostały podzielone na dwie części – odpowiednio do zadań badawczych 1 i 2 (Publikacja nr 1) oraz 3 i 4 (Publikacja nr 2). Zadania te natomiast odpowiadają publikacjom stanowiącym podstawę pracy doktorskiej tj.:

1. Kopcewicz M, Walendzik K, Bukowska J, Kur-Piotrowska A, Machcinska S, Gimble JM, Gawronska-Kozak B. Cutaneous wound healing in aged, high fat diet-induced obese female or male C57BL/6 mice. *Aging* (Albany NY). 2020 Apr 15;12(8):7066-7111.
2. Kopcewicz MM, Kur-Piotrowska A, Bukowska J, Gimble JM, Gawronska-Kozak B. *Foxn1* and *Mmp-9* expression in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57BL/6 mice. *Wound Repair Regen*. 2017 Apr;25(2):248-259.

Uzyskane wyniki nie zostały przedstawione w kolejności ich opublikowania, jednakże nie ma to wpływu na odbiór omawianych treści. Jest jednak dziwne stwierdzenie w *Dyskusji* pracy (str. 45), że wyniki przedstawione w pracy z 2020r. skłoniły Doktorantkę do przeprowadzenia analiz, które zostały opublikowane w 2017r., tym bardziej, że badania te były prowadzone w ramach dwóch różnych projektów NCN, jak wskazano w artykułach. Wyniki zostały opublikowane w uznanych czasopismach z listy JCR i z pewnością przeszły już wnikliwą ocenę recenzencką. Na uznanie zasługuje kompleksowość przeprowadzonych badań oraz ilość uzyskanych wyników. Odzwierciedleniem tego może być liczba rycin i tabel – odpowiednio w publikacji nr 1 – 7 rycin, 1 tabela oraz 51 tabel w suplemencie oraz w publikacji nr 2 – 7 rycin. Uzyskane wyniki zostały jasno opisane w rozprawie doktorskiej. Tę część pracy należy czytać łącznie z publikacjami, aby śledzić przedstawione na wykresach i mikrofotografiach wyniki. W opracowaniu używa się słowa „figura”, co powinno być zastąpione polskim słowem „rycina”. Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z opisem bardzo wielu pojedynczych wyników i ich interpretacją. Szczególnie cenna wydaje się Tabela 5 w rozprawie doktorskiej (Odpowiednik Tabeli 1 w publikacji nr 1), w której pokazana jest złożoność interakcji pomiędzy wiekiem, dietą i płcią na proces gojenia ran skórnych młodych i starych osobników (samic i samców) myszy karmionych dietami nisko- i wysokotłuszczowymi. Cały rozdział napisany jest rzetelnie i świadczy dużym przygotowaniem merytorycznym Doktorantki w tym zakresie.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

- a. Wykazanie, że rozrost śródskórnej tkanki tłuszczowej będący efektem diety wysokotłuszczowej, rekompensuje utratę grubości warstwy skóry właściwej starych zwierząt.
- b. Opisanie profilu ekspresji szeregu wybranych czynników (m.in., MCP-1, CD68, Mmp-9, Mmp-13, Tgf β -1, Tgf β -3, Col1 α 2, Col3 α 1) biorących udział w procesie gojenia ran młodych i starych osobników (samic i samców) myszy karmionych dietami nisko- i wysokotłuszczowymi.
- c. Dowiedzenie, że spośród analizowanych ogólnoustrojowych czynników tj. wiek, płeć, dieta, to wiek ma największy wpływ na przebieg procesu gojenia ran skórnych myszy.
- d. Opisanie profilu ekspresji i lokalizacji czynnika Foxn1 w odniesieniu do ekspresji metyloproteinazy macierzy Mmp-9 w skórze młodych i starych myszy oraz w trakcie procesu gojenia ran skórnych.
- e. Potwierdzenie wcześniejszych doniesień, że Foxn1 bierze udział w procesie reepitalizacji a także uczestniczy w powstawaniu tkanki bliznowej w procesie gojenia ran skórnych.

Po przeczytaniu tej części pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

1. Różnice w grubości śródskórnej tkanki tłuszczowej stwierdzono porównując zwierzęta będące na diecie wysokotłuszczowej ze zwierzętami będącymi na diecie niskotłuszczowej. W eksperymencie nie zaplanowano zwierząt karmionych dietą standardową (tzw. NFD). Czy można się spodziewać różnic w grubości tej warstwy skóry porównując zwierzęta na diecie NFD i HFD?
2. Analiza wybranych czynników odpowiedzi immunologicznej czy metyloproteinaz macierzy wykazała, że do największych wzrostów ekspresji tych czynników dochodziło najczęściej w 3 dniu po zranieniu, natomiast w kolejnych dniach (tj. 7, 14, 21) dochodziło do spadku ich poziomu. W jakim stopniu profil ekspresji badanych czynników jest konsekwencją gojenia rany o zadanej wielkości tj. 4mm i czy można oczekiwać innego tempa gojenia ran w zależności od wielkości uszkodzenia?
3. Badając poziom transkryptu genu *Foxn1* w naskórku stwierdzono jego podwyższony poziom u osobników starych, natomiast analiza cytometryczna wykazała najwięcej

komórek pozytywnych u myszy nowonarodzonych. Jak można to wytłumaczyć? Czy można porównać ekspresję Foxn1 w dwóch modelach Foxn1+/+ i Foxn1+/-? Czy badano czy dochodzi do powstawania transkryptu z jednego allelu i jeśli tak jak ten poziom się ma do ekspresji biallelicznej?

4. W pracy napisano, że Foxn1 może modulować ekspresję Mmp-9. Jednakże profile ekspresji badanych transkryptów są dość odmienne. Jak jest możliwy mechanizm takiej regulacji?

Rozdział *Dyskusja* jest dość krótki (6,5 strony). Odniesiono się w nim do ok. 40 pozycji literatury światowej. Doktorantka konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi pochodzącymi ze swojego zespołu i dostrzega także prace innych autorów. O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczą rozważania nad możliwością kontynuowania badań. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o opracowanie schematu/ryciny, które podsumowałby najważniejsze wyniki uzyskane w pracy doktorskiej. Rozprawę doktorską kończy 9 poprawnie sformułowanych *Wniosków*, które odpowiadają na wcześniej postawione hipotezy badawcze.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane za pomocą adekwatnych metod badawczych. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem wielu nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej i komórkowej. Badania przeprowadzono na interesujących modelach badawczych i dobrze skonstruowanych układach eksperymentalnych. W pracy uzyskano szereg wartościowych i oryginalnych wyników, które stanowią istotny wkład w badaniach nad poznaniem molekularnych aspektów procesu gojenia ran skórnych.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Zmienność procesu gojenia urazów skóry w zależności od wieku, otyłości oraz płci w aspekcie modulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1*” autorstwa Pani mgr Marty Marii Kopcewicz spełnia wszystkie wymagania formalne określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016 r. poz. 882 z późn. zm.), w związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Marty Marii Kopcewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, dn. 18 maja 2022r.

Izabela Szerbel.