

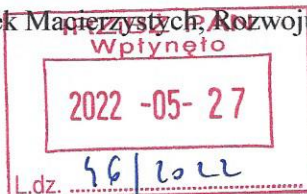


UNIVERSITY
OF WARSAW

CeNT CENTRE
OF NEW
TECHNOLOGIES

Warszawa, 22.05.2022

dr hab. Krzysztof Kobiela, Prof. uczelni
Kierownik, Laboratorium Komórek Macierzystych, Rozwoju i Regeneracji Tkanek
Centrum Nowych Technologii,
Uniwersytet Warszawski



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Marty Marii Kopcewicz

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

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Marty Marii Kopcewicz została wykonana w Zakładzie Biologicznych Funkcji Żywności, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Barbary Gawrońskiej-Kozak.

Przedstawione w rozprawie wyniki zostały już opublikowane w dwóch oryginalnych pracach, które ukazały się w czasopismach indeksowanych przez ISI Web of Science o wysokim współczynniku oddziaływania (IF): Wound Repair Regen. 2017 (IF 3,61; punktacja MEiN 100) i Aging-US 2020 (IF 5,68; punktacja MEiN 140), w których Pani mgr. Kopcewicz jest pierwszym autorem, co podnosi wartość rozprawy doktorskiej. W związku z powyższym, zarówno tematyka podjętych badań, jak również otrzymane wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów tych publikacji.

Głównym celem badań zaprezentowanych w ramach rozprawy doktorskiej było wykazanie potencjalnego, skumulowanego wpływu podeszłego wieku, płci i diety oraz towarzyszących zmian ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 na proces gojenia ran skórnych u myszy C57BL/6. Podjęta tematyka badawcza dotyczy bardzo ważnego z punktu widzenia medycyny praktycznej procesu gojenia ran skórnych wykorzystując model myszy w tym myszy modyfikowanych genetycznie Foxn1-eGFP. Utrzymanie nieprzerwanych powłok skórnych i ich integralność, w której proces gojenia się ran w tym pourazowych skóry przebiega prawidłowo jest niezbędnym elementem dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Prawidłowy przebieg procesu gojenia jest regulowany poprzez czynniki lokalne oraz ogólnoustrojowe, których zaburzenia mogą skutkować zakażeniem rany z powstaniem trudno gojących się ran przewlekłych lub też może prowadzić do wytworzenia blizn przerostowych. Dotychczas opisano wpływ poszczególnych czynników ogólnoustrojowych takich jak wiek, płeć lub otyłość na proces gojenia ran skórnych, ale ich łączny, skumulowany efekt oraz zależności pomiędzy tymi parametrami nie zostały do tej pory zbadane. Dlatego przedstawiona praca podejmuje tę bardzo istotną tematykę, opisując w czytelny sposób zaplanowane i przeprowadzone doświadczenia. Ponadto Pani mgr. Kopcewicz syntetycznie dokumentuje obszerną ilość wyników z przeprowadzonych badań, które w znaczący sposób przyczyniają się do lepszego zrozumienia w jakim stopniu efekt skumulowania czynników ogólnoustrojowych takich jak wiek, płeć lub otyłość wpływa na proces gojenia ran skórnych. Proces gojenia ran prowadzi do ich zamknięcia i najczęściej przebiega z wytworzeniem blizny jako proces reparacyjny, natomiast bardzo rzadko spotykane jest gojenie bezbliznowe tzw. regeneracyjne, w którym zostaje odtworzona pierwotna budowa i funkcja uszkodzonego narządu. Regeneracja bezbliznowa jest obserwowana w pierwszych dwóch trymestrach rozwoju płodowego skóry oraz w

modelu myszy modyfikowanych genetycznie po wyłączeniu genu *Foxn1* tzw. myszach nagich (ang. nude; *Foxn1*^{-/-}). Obydwa te modele łączy absencja czynnika transkrypcyjnego *Foxn1* (ang. forkhead box N1), który prawidłowo występuje w skórze i grasicy, odpowiadając za indukowanie pierwszych etapów różnicowania się keratynocytów i etap reepitelializacji oraz przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*) w początkowych dniach naprawy urazów skórnych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Kopcewicz składa się z właściwie postawionych hipotez i zadań badawczych. W hipotezie badawczej I, Doktorantka przeanalizowała jak postępujący wiek oraz wywołana wysokotłuszczową dietą otyłość modulują proces gojenia ran skórnych u myszy C57BL/6. Aby wykazać wpływ wieku Doktorantka przygotowała starannie dobrane wiekowo grupy osobników mysich (młodych i starych), które utrzymywała na odpowiedniej diecie niskotłuszczowej (kontrola) oraz wysokotłuszczowej (eksperyment) badając homeostazę skóry u myszy. Eksperymenty te były bardzo dobrze zaplanowane, pozwalały kontrolować przybieranie na wadze i monitorować akumulację tkanki tłuszczowej u osobników w doświadczeniu. Zawartości tkanki tłuszczowej i beztłuszczowej monitorowano przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. nuclear magnetic resonance) oraz przeprowadzano pomiar tolerancji glukozy we krwi (GTT, ang. glucose tolerance test). Wyniki tych badań pozwoliły zaobserwować, że płeć myszy doświadczalnych ma znaczenie w przybieraniu na wadze i w akumulacji tkanki tłuszczowej pomiędzy samcami a samicami. To skłoniło Doktorantkę do rozszerzenia tej hipotezy o kolejne zadanie badawcze (#2) mające na celu przeanalizować proces gojenia ran skórnych u samic i samców myszy szczepu C57BL/6 w kontekście wieku i diety.

Natomiast w hipotezie badawczej II, Pani mgr Kopcewicz analizowała jak związane z wiekiem zmiany w ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Foxn1* w skórze modyfikują proces gojenia urazów skórnych myszy C57BL/6. Pierwszym zadaniem badawczym (#3) był wykazanie potencjalnych zmian w ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Foxn1* w niezranionej skórze: młodych, dorosłych oraz starych osobników myszy szczepu C57BL/6. Ta hipoteza została rozszerzona o drugie zadanie badawcze (#4) o analizę przebiegu procesu gojenia ran skórnych u młodych, dorosłych oraz starych myszy transgenicznych *Foxn1*-eGFP w aspekcie zmian ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Foxn1*. Dzięki użyciu tych myszy transgenicznych, u których transgen eGFP (wzmocnione białko zielonej fluorescencji, ang. *enhanced green fluorescent protein*) znajduje się pod kontrolą sekwencji regulatorowej genu *Foxn1*, umożliwiło to śledzenie ekspresji *Foxn1* *in vivo* badając obecności białka eGFP. Obie hipotezy i przypisane im zadania badawcze zostały bardzo dobrze sformułowane i rozszerzone przez Doktorantkę odzwierciedlając aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie.

Realizując powyższe zadania badawcze Doktorantka uzyskała bardzo interesujące wyniki, które pozwoliły na wyciągnięcie ciekawych wniosków, które stanowią jej istotny wkład naukowy w zrozumienie procesów gojenia ran skórnych i przyczyniają się do dalszego rozwoju tej dziedziny. Do najważniejsze osiągnięć rozprawy doktorskiej w mojej opinii należy uznać:

- 1) Na diecie wysokotłuszczowej (HFD) skóra właściwa staje się grubsza, niezależnie od wieku. Z wiekiem następuje redukcja grubości warstwy bogatej w fibroblasty obejmującej warstwę brodawkową i siateczkową (bez śródskórnej tkanki tłuszczowej – dWAT), ale dieta wysokotłuszczowa powoduje rozrost dWAT i rekompensowała tę utratę. To powoduje, że cała warstwa skóry właściwej jest znacznie grubsza u starych myszy HFD w porównaniu z myszami karmionymi dietą niskotłuszczową (LFD) i jest porównywalna z grubością skóry młodych zwierząt karmionych LFD.
- 2) Wzrost ekspresji białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1, ang. monocyte chemoattractant protein 1) jako odpowiedzi immunologicznej w miejscu urazu w dniu 3 po zranieniu obserwowano we

wszystkich grupach zwierząt, ale najwyższą koncentrację wykryto u starych myszy, niezależnie od zastosowanej diety.

3) Wyraźny wzrost ekspresji genu *CD68* obecnego na monocytach i makrofagach aktywnie fagocytyzujących w dniu 3 po zranieniu we wszystkich grupach zwierząt. Szczegółowa analiza statystyczna wskazała, że największy wpływ na ekspresję genu *CD68* we wszystkich pourazowych dniach wywierają wiek oraz dieta. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku akumulacji komórek wykazujących ekspresję Mac-2. Obie były największe u zwierząt w podeszłym wieku karmionych dietą wysokotłuszczową.

4) Najszybsze tempo reepitelializacji obserwowano u myszy młodych, karmionych dietą niskotłuszczową za pomocą badania ekspresji keratyny 16 obecnej w migrujących keratynocytach (100% pokrycia rany nowym naskórkiem, w dniu 7-mym po urazie).

5) Najwyższa ekspresja Metaloproteinazy macierzy 9 (*Mmp-9*, ang. matrix metalloproteinase 9) była w dniu 3 po urazie i najwyższa u zwierząt w podeszłym wieku, interesująco podobny profil zmian we wszystkich grupach zwierząt wykazał inhibitor metaloproteinaz *Timp-1* (ang. tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1).

6) Wzrost poziomów ekspresji *Mmp-13* związanej z migracją keratynocytów, aktywnością miofibroblastów oraz angiogenezą zaobserwowano w 3 i 7 dniu po zranieniu we wszystkich analizowanych grupach zwierząt, jednakże gwałtowne, kilkukrotnie wyższe niż w pozostałych grupach poziomy ekspresji genu *Mmp-13* odnotowano w grupie młodych samic, niezależnie od diety.

7) Transformujący czynnik wzrostu β -1 (*Tgfb-1*, ang. transforming growth factor β -1) uznawany jest za cytokinę promującą powstawanie blizny pokazał wyraźny wzrost w 3 i 7 dniu po zranieniu, przy czym w dniu 3, 7 i 14 ekspresja genu *Tgfb-1* była wyższa u starych samic żywionych HFD niż u samców

8) *Tgfb-3* jest uznawana za cytokinę „pro-regeneracyjną” zmniejszającej bliznę wykazała wzrost poziomu ekspresji w 7 dniu po zranieniu u samców w podeszłym wieku oraz u wszystkich samic, bez względu na dietę i wiek. W 14 dniu po zranieniu podwyższony poziom mRNA *Tgfb-3* zaobserwowano jedynie w grupie starych samic karmionych dietą wysokotłuszczową

9) Analiza ekspresji genu *Col1a2* i *Col3a1* dla kolagenu 1 i 3 wykazała wysoce istotne różnice pomiędzy badanymi grupami zwierząt. Ekstremalnie wysokie poziomy mRNA *Col1a2* i *Col3a1* wykazano w skórze niezranionej oraz w tkankach po zranieniu pobranych od młodych samców,

10) Najwyższy odsetek komórek *Foxn1-eGFP+* zaobserwowano w naskórku pochodzącym od nowonarodzonych myszy w porównaniu do niższej w naskórku zwierząt dorosłych i starych, co nie korespondowało z ekspresją mRNA genu *Foxn1* w niezranionym naskórku, który wykazał porównywalne poziomy mRNA *Foxn1* w skórze młodych i dorosłych myszy oraz istotnie wyższy poziom mRNA *Foxn1* w skórze myszy starych. Podobnie wyższe poziomy w niezranionym naskórku obserwowano mRNA *Mmp-9* w tkankach pobranych od osobników starych niż w tkankach zwierząt młodych i dorosłych.

11) Najwyższy odsetek komórek wykazujących ekspresję *Foxn1-eGFP* zaobserwowano w 21 dniu po zranieniu, w porównaniu do skóry niezranionej i do skóry w dniu 7. Natomiast ekspresją mRNA genu *Foxn1* obserwowana była od dnia 5 i osiągała najwyższy poziom w dniu 14 po urazie skóry młodych, dorosłych i starych myszy (z najwyższym poziomem ekspresji u myszy młodych)

12) Bardzo interesujące była obserwacja kilkukrotnie wyższa procentowa zawartość komórek pozytywnych na E-kadheryny i N-kadheryny (*E-kad+/N-kad+*) w dniu 7 po urazie w porównaniu do skóry niezranionej, czy też skóry w dniu 21 po urazie, wykazujących ich koekspresję w *Foxn1-eGFP* pozytywnych komórkach.

13) Analiza histochemiczna wykazała reakcję pozytywną na obecność ekspresji *eGFP* (przeciwciała anty-*eGFP*) nie tylko w naskórku, lecz również w warstwie brodawkowej skóry właściwej w 7 dniu po urazie u myszy *Foxn1-eGFP*. Jest to o tyle interesujące, że może to sugerować, że *Foxn1* bierze udział w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego w początkowej fazie procesu gojenia ran skóry.

15) Po raz pierwszy pokazano kolokalizację Foxn1-eGFP z aktyną mięśni gładkich (α SMA, ang. smooth muscle actin a), co może sugerować, że komórki wykazujące ekspresję Foxn1-eGFP mogą być zaangażowane w EMT również w późnej fazie gojenia ran, co świadczyłoby o udziale Foxn1 w powstawaniu tkanki bliznowej.

Obecność komórek Foxn1- pozytywnych, wykazujących koekspresję E-kadheryny wraz z N-kadheryną, jest bardzo interesującą obserwacją Doktorantki i może sugerować zaangażowanie Foxn1 w procesie EMT w początkowych etapach procesu gojenia ran. Współwystępowanie Foxn1 wraz z aktyną mięśni gładkich (α SMA, ang. smooth muscle actin a) w komórkach warstwy brodawkowej skóry może świadczyć o udziale Foxn1 w procesie powstawania tkanki bliznowej w późnej fazie gojenia ran. Dlatego w czasie lektury rozprawy szczególnie części wynikowej i dyskusji nasunęło mi kilka pytań do Doktorantki (proszę o udzielenie odpowiedzi w czasie obrony pracy):

- Jak wytłumaczyć i jak wpływa obserwowany wzrost ekspresji Foxn1 i Mmp-9 u starszych osobników na gojenie ran?
- W jaki sposób Foxn1 może regulować ekspresję Mmp-9 w początkowej fazie procesu gojenia ran skóry? .
- Jaki był wiek myszy Foxn1-eGFP wspomnianych w pracy Wound Repair Regen. 2017 prezentowanych na rycinie 4 D i jak to korelowało z ekspresji mRNA Foxn1 w czasie gojenia ran obserwowanej u myszy młodych, dorosłych czy starych (na rycinie 4 A-C)? Na ile ekspresja eGFP pod promotorem Foxn1 odzwierciedla szybkie zmiany w ekspresji mRNA Foxn1?
- Jak możemy to wytłumaczyć i zinterpretować, że 7 dnia po urazie u myszy Foxn1-eGFP mamy najwyższą wartość komórek z Foxn1-eGFP koekspresję E-kadheryny i N-kadheryny?
- Jak można by doświadczalnie odpowiedzieć na pytanie, czy mamy do czynienia z rzeczywistym przejściem EMT tych komórek, czy z niespecyficzną aktywacją promotora Foxn1 i ekspresją eGFP w komórkach warstwy brodawkowej skóry w czasie gojenia?
- W jaki sposób można by sprawdzić, czy komórki pochodzenia epidermalnego są w stanie przejść EMT i aktywnie uczestniczyć w warstwie brodawkowej skóry w początkowej fazie gojenia rany?
- Jak wyjaśnić dualizm roli Foxn1, z jednej strony stymulujący różnicowanie keratynocytów, w z drugiej strony uczestniczenie w zmianie fenotypu komórek nabłonkowych do mezenchymalnych?

Interesujące wydaje się również odpowiedź na szersze pytanie w kontekście gojenia regeneracyjnego, mianowicie:

- - Jak zinterpretować i jakie możemy wyciągnąć wnioski na podstawie opisanej lokalizacji komórek Foxn1-eGFP i ich zaangażowania podczas procesu gojenia ran skórnych w odniesieniu do bezbliznowego gojenia ran obserwowanego u nagich myszy?

W podsumowaniu wyników Doktorantka posłużyła się również szczegółową analizą statystyczną badającą indywidualny wpływ wieku, diety i płci w doświadczeniach *in vivo*. To pozwoliło jej sformułować bardzo precyzyjnie wnioski końcowe wykazując, że najistotniejszy wpływ na przebieg procesu gojenia urazów skóry wywiera postępujący wiek, który jako pojedyncza zmienna, modyfikuje ekspresję białka MCP-1, Tgf β -1, Mmp-9 i Mmp-13 oraz zawartość hydroksyproliny. Dwa najistotniejsze, kumulujące się parametry to wiek i płeć, to skutkowało znacznie podwyższoną u młodych samców ekspresją genów Col1a2 i Col3a1, niezależnie od diety. Natomiast wspólny efekt wieku i diety wykazano w aspekcie odbudowy naskórka oraz ekspresji CD68. Zbiorczy wpływ wieku,

diety i płci zaobserwowano jedynie w kontekście wysokiej ekspresji Timp-1. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 podlega modulacji w przebiegu procesu gojenia urazów skóry, wskazując na jego udział we wczesnej i późnej fazie procesu gojenia ran skórnych.

Dla podsumowania wyników bardzo eleganckie byłoby przedstawienie ich w formie schematu, aby podkreślić powyższe odkrycia Doktorantki. Większość przedstawionych w ocenianej rozprawie wyników jest interesująca i posiada element nowości, co jest bardzo istotne dla pokreślenia wartości naukowej rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Kopcewicz, którą oceniam bardzo wysoko.

Część przedstawionej rozprawy doktorskiej została napisana w języku polskim, natomiast streszczenie i załączone publikacje oryginalne są w języku angielskim. Praca ta liczy 63 stron i obejmuje 6 rozdziałów. Rozprawa doktorska przygotowana jest zgodnie ze sztuką pisania prac doktorskich, posiada w kolejności: „Finansowanie badań” „Streszczenie”, „Summary”, „Wykaz wybranych skrótów i akronimów”, „Publikacje stanowiące rozprawę dokorską”, „Wstęp”, „Hipoteza i cele badawcze”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski” „Bibliografia” „Publikacja nr 1”, „Publikacja nr 2”, wraz z „Oświadczeniami współautorów”.

Rozdział zatytułowany „Wstęp” stanowi bardzo dobre przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat gojenia ran i ogólnoustrojowych czynników modyfikujących proces gojenia urazów skóry wraz wprowadzeniem do anatomii skóry, regeneracji w gojeniu bezbliznowym i czynnika transkrypcyjnego Foxn1. Doktorantka w bardzo przejrzysty, logiczny i spójny sposób przedstawia problemy badawcze, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania hipotez i celów badawczych. Wprowadzenie czytelnika w tematykę pracy byłoby jeszcze łatwiejsze, gdyby we wstępie pojawiły się schemat lub rycina dotycząca procesu gojenia rany wraz z jej fazami. Wstęp w logiczny sposób prowadzi do kolejnej części rozprawy, czyli hipotez i celów badawczych właściwie postawionych przez Doktorantkę (o czym szczegółowo wspomniałem powyżej). Kolejny rozdział: „Materiały i metody”, w szczegółowy sposób opisuje metodykę i jest bardzo dobrze ilustrowany schematami, dzięki którym bardzo dobrze wprowadza czytelnika w część wynikową rozprawy. Część wynikowa została przeze mnie już omówiona szczegółowo powyżej wraz z omówieniem wyników i wniosków łącznie z „Publikacją nr 1” i „Publikacją nr 2”, które stanowią załączniki do rozprawy doktorskiej.

„Dyskusja” zawiera podsumowanie uzyskanych wyników w odniesieniu do danych literaturowych. Dyskusja jest wszechstronna i wskazuje niewątpliwie, iż Doktorantka posiada umiejętność krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych, a także biegle porusza się w dostępnej w swoim obszarze badań literaturze. Zacytowana w pracy bibliografia liczy 138 pozycji obejmujących wszystkie aktualne pozycje bibliograficzne z obszaru wykonywanych badań. Opracowanie pracy jest staranne, aczkolwiek zdarzają się pojedyncze błędy jak np.: brak cytacji pracy [20] drobne literówki np.: lorykryna (zamiast lorikryna), brak skrótu do Tgfβ przy pierwszym użyciu w tekście. Tak jak wspomniałem dla wygody czytającego dobrze byłoby dodać schemat gojenia ran we wstępie rozprawy. Drobne uchybienia nie wpływają jednak na moją wysoką ocenę pracy.

Podsumowanie:

Stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca mgr Marty Marii Kopcewicz zatytułowana „Zmienność procesu gojenia urazów skóry w zależności od wieku, otyłości oraz płci w aspekcie modulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1” spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z p6:zn. zm.). Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego zdefiniowanego przez Doktorantkę i przedstawionego w celach badawczych pracy. Użycie wielu metod badawczych, w tym zaawansowanej analizy statystycznej z wykorzystaniem programu GraphPad Prism

wskazuje na bardzo duże umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i umiejętnością analizy i interpretacji otrzymanych danych eksperymentalnych.

Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, PAN w Olsztynie o dopuszczenie mgr Marty Marii Kopcewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej ze względu na wysoką rangę przedstawionych wyników i ich poznawczy i nowy charakter, którego część może w przyszłości posłużyć na opracowanie metod bezbliznowatego leczenia ran skórnych u ludzi, ponadto wyniki rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w formie dwóch publikacji w rozpoznawalnych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania dla tej dyscypliny.

Z poważaniem



Krzysztof Kobiela