



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

Warszawa, 09.05.2022 r.

dr hab. Małgorzata Gajewska, prof. SGGW
Zakład Biochemii i Dietetyki
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW

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” wykonanej w Zakładzie Biologicznych Funkcji Żywności Instytutu Rozrodu i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Gawrońskiej-Kozak.

Molekularne mechanizmy gojenia urazów skóry stanowią aktualny i ważny temat badawczy. Ich poznanie prowadzi do rozwoju medycyny regeneracyjnej i wprowadzania coraz bardziej nowoczesnych metod leczenia trudno gojących się ran. Skóra jest narządem najbardziej ekspozycjonowanym i narażonym na różnego rodzaju urazy: mechaniczne, termiczne, chemiczne, radiacyjne oraz wynikające z uszkodzenia naczyń krwionośnych. Następstwem każdego urazu jest powstanie rany, którą można zdefiniować jako naruszenie integralności tkanek. Gojenie ran jest procesem dynamicznym, skutkującym odbudową przerwanej ciągłości tkanek oraz przywróceniem utraconych funkcji organizmu. Zwykle można ten proces podzielić na cztery etapy: hemostazy, odpowiedzi zapalnej, proliferacji oraz przebudowy, w których uczestniczą różne komórki: monocyty i makrofagi, neutrofile, limfocyty, fibroblasty, śródskórne komórki tłuszczowe, angioblasty, keratynocyty oraz wydzielane przez te komórki cytokiny i czynniki wzrostu, regulujące przebieg każdego z etapów. Efektem końcowym jest wytworzenie blizny przywracającej ciągłość skóry. Znane jest również bezbliznowe gojenie urazów skóry, polegające na pełnej regeneracji tkanki, jednak u ssaków obserwowane jest jedynie w okresie płodowym, do końca drugiego trymestru ciąży. Badania zespołu prof. dr hab. Barbary Gawrońskiej-Kozak wykazały istotną rolę czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w przebiegu gojenia ran i regeneracji skóry. U myszy pozbawionych genu *Foxn1* obserwowane jest właśnie bezbliznowe gojenie ran skóry, przypominające regenerację u płodów. Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi kontynuację badań z zakresu roli czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w przebiegu procesu gojenia ran skórnych, jak również opisuje wpływ trzech czynników: wieku, płci oraz diety, mających istotne znaczenia dla efektywnej regeneracji skóry. Istnieje wiele czynników mających wpływ na przebieg gojenia ran. Do najistotniejszych zaliczany jest właśnie wiek, płeć i status hormonalny pacjenta, jak również czystość rany - a więc możliwe infekcje bakteryjne, oraz kondycja metaboliczna organizmu, ponieważ otyłość i cukrzyca są czynnikami utrudniającymi proces gojenia ran. W literaturze można znaleźć liczne prace oryginalne i przeglądowe opisujące wpływ danego czynnika na efektywność gojenia ran skóry, jednak w niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy podjęto próbę wykazania jednoczesnej



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

korelacji pomiędzy wiekiem, płcią oraz rodzajem diety (nisko- lub wysokotłuszczowej) w kontekście przebiegu procesu gojenia ran skórnych. To kompleksowe ujęcie tematu powoduje, że zaprezentowane badania są niezwykle wartościowe oraz wnoszą wiele nowych i przydatnych informacji.

Rozprawa doktorska Marty Kopcewicz została przedstawiona do recenzji w postaci jednotematycznego cyklu dwóch oryginalnych artykułów opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych w latach 2017 i 2020. W obydwu publikacjach Pani Marta Kopcewicz jest pierwszym autorem, a jej udział w przygotowaniu artykułów stanowił odpowiednio 60 i 55%. W przygotowanej przez Doktorantkę rozprawie pierwszym artykułem jest publikacja pt.: "Cutaneous wound healing in aged, high fat diet induced obese female or male C57Bl/6 mice" wydana w 2020 r. w czasopiśmie *Aging-US* (*Aging-US* 2020 Apr 15;12(8):7066-7111) o współczynniku wpływu (IF) 5,682 i 140 pkt MEiN. Drugi artykuł w tym cyklu stanowi wcześniejsza publikacja pt.: "Foxn1 and Mmp-9 expression in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57Bl/6 mice" wydana w 2017 r. w czasopiśmie *Wound repair and regeneration* (*Wound Repair Regen.* 2017 Apr;25(2):248-259) o współczynniku wpływu (IF) 3,617 i 100 pkt MEiN. Bardzo dobre parametry czasopism naukowych, w których ukazały się oba artykuły wskazują na wysoką jakość i wartość badań prowadzonych przez Doktorantkę. Wartość merytoryczna wyników przedstawionych w ww. publikacjach została już wcześniej zweryfikowana podczas procesu wydawniczego przez niezależnych recenzentów. Dlatego recenzja niniejszej rozprawy doktorskiej koncentruje się przede wszystkim na ocenie spójności cyklu przedstawionych artykułów naukowych oraz roli Doktorantki w ich przygotowaniu. O wiodącej roli Pani Marty Kopcewicz świadczą oświadczenia pozostałych autorów obydwu publikacji, którzy deklarują 5 lub 10% udział w przygotowaniu publikacji, natomiast udział Pani Promotor, prof. dr hab. Barbary Gawrońskiej-Kozak został oceniony na 15%. Elementem, który wzbogaciłby ten cykl byłby dodatkowy artykuł przeglądowy, który mógłby podsumować otrzymane wyniki badań Doktorantki na tle dostępnej literatury naukowej. Ponieważ istnieje wiele zagranicznych artykułów przeglądowych opisujących najnowsze osiągnięcia z zakresu molekularnych mechanizmów gojenia ran skóry, być może przydatną byłaby publikacja wydana na potrzeby rynku polskiego, w czasopiśmie takim jak np. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. Taka publikacja stanowiłaby cenne źródło informacji dla polskich lekarzy oraz studentów kierunków medycznych i biologicznych. Brak artykułu przeglądowego nie umniejsza jednak wartości zawartych w rozprawie doktorskiej publikacji oryginalnych.

Rozprawa doktorska Pani Marty Kopcewicz stanowi zwięzłe podsumowanie wyników i wniosków uzyskanych na podstawie badań opisanych w wymienionych powyżej artykułach naukowych. Posiada tradycyjny układ dysertacji i zawiera spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, hipotezy i zadania badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo. Na końcu zostały dołączone obydwie publikacje naukowe razem z oświadczeniami pierwszej autorki oraz współautorów o procentowym ich udziale w przygotowaniu publikacji. Rozprawa zawiera również 4 ryciny oraz 5 tabel wkomponowanych w tekst, doskonale uzupełniających treści opisywane w poszczególnych rozdziałach. Praca napisana jest bardzo ładnym językiem, przedstawiając w sposób przystępny zagadnienia będące tematem powyższej rozprawy doktorskiej. Recenzentka pragnie jednak zwrócić uwagę na zbyt długie, prawie dwustronicowe streszczenia. W tych streszczeniach opis metodyki, wyników oraz wniosków jest



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

prawidłowy, jednak wstęp powinien zostać nieco skrócony, ponieważ w wersji polskiej zajmuje całą stronę.

W rozdziale pierwszym, czyli we wstępie, Doktorantka opisuje budowę skóry, przebieg procesu gojenia urazów skórnych, a następnie przechodzi do roli ogólnoustrojowych czynników modyfikujących proces gojenia urazów skóry oraz znaczenia czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w tym procesie. Wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem badań Doktorantki i potwierdza zasadność stawianych potem hipotez badawczych. Samodzielnie przygotowana rycina 1, przedstawiająca schemat budowy skóry u myszy, pomaga w zrozumieniu złożonej budowy tego narządu. Byłoby jednak lepiej, gdyby ten schemat został umieszczony w ramach podrozdziału 1.1., a nie dopiero w podrozdziale 1.2., opisującym etapy gojenia ran skóry. Następnie, w rozdziale drugim zostały przedstawione główne hipotezy oraz wynikające z nich szczegółowe zadania badawcze. Pierwsza hipoteza dotyczyła zmian w przebiegu procesu gojenia ran skórnych u myszy C57BL/6, uwarunkowanych wiekiem i otyłością wywołaną przez dietę wysokotłuszczową; natomiast druga hipoteza dotyczyła związanych z wiekiem zmian w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 i możliwości ich wpływu na proces gojenia ran skórnych u myszy.

W kolejnym rozdziale został szczegółowo opisany wykorzystany materiał badawczy, czyli użyte do doświadczeń zwierzęta, zastosowane układy doświadczalne, procedury wykonywania ran skórnych oraz pobierania tkanek do dalszych analiz. W dalszej kolejności zamieszczony jest opis metod i technik stosowanych w toku badań. Rozdział *Materiały i Metody* wzbogacony jest o trzy ryciny przedstawiające schematycznie układ doświadczeń na zwierzętach oraz dołączone są 4 tabele z zebranymi informacjami na temat zastosowanych przeciwciał (tabele 1, 3 i 4) oraz komercyjnych starterów i sond TaqMan użytych do amplifikacji wybranych genów. Opisana metodyka stanowi bardzo rzetelne źródło informacji dla naukowców, którzy chcieliby odtworzyć przebieg doświadczeń i analiz prezentowanych w pracy doktorskiej. W trakcie czytania pracy recenzentka dostrzegła kilka punktów, które wymagają doprecyzowania lub wyjaśnień:

- 1) Na stronie 22, w opisie izolacji fibroblastów skóry właściwej podano informację o użyciu kolagenazy przygotowanej w buforze PBS. Której dokładnie kolagenazy użyto i kto był producentem? Poza tym po zapoznaniu się z pracą oraz obydwoma artykułami recenzentka nie mogła znaleźć zastosowania wyizolowanych fibroblastów. W artykule pierwszym nie stosowano tej techniki, natomiast w artykule drugim jest opisana jedynie izolacja keratynocytów.
- 2) W opisie analizy ekspresji białek metodą Western blot (podrozdział 3.2.5, na str. 27) podano informację na temat „koncentracji próbek - 30 µg zawieszanych w buforze redukującym Laemmli”. To sformułowanie jest nieprawidłowe – koncentracja, czyli stężenie jest miarą ilości substancji w roztworze lub mieszaninie, w związku z tym jeśli takie stężenie jest podawane, należałoby dodać informację o jednostce objętości. W tym przypadku chodziło po prostu o ilość białka zawieszonego w buforze Laemmli i nakładanego na każdy dołek w żelu poliakrylamidowym, przed rozdziałem elektroforetycznym.
- 3) W opisie oznaczania koncentracji (czyli stężenia) białka MCP-1 za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA dobrze byłoby podać, prócz nazwy producenta, numer katalogowy testu (tej informacji nie ma też w artykule nr 1).



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

- 4) W opisie metody oznaczania zawartości hydroksyproliny (podrozdział 3.2.7, str. 28) są pewne błędy wynikające z tłumaczenia metodyki z języka angielskiego. Zdanie dotyczące przygotowania krzywej wzorcowej (krzywej kalibracji) należałoby przeredagować. W pracy brzmi ono: „*Do skonstruowania krzywej standardowej przygotowywano rozcieńczenia roztworu podstawowego hydroksyproliny o stężeniu 20 mg/ml (od 20 µg/ml do 0,162 µg/µl) w roztworze zawierającym bufor PBS i 6N HCl w stosunku 2:1. Na płytkę 96 dołkową nanoszono w duplikatach: po 20 µl prób i po 20 µl każdego punktu krzywej standardowej a następnie dodawano po 50 µl roztworu chloraminy T.*” Propozycja zmian recenzentki: „*W celu wykonania krzywej wzorcowej przygotowano rozcieńczenia roztworu wzorcowego hydroksyproliny o stężeniu 20 mg/ml (od 20 µg/ml do 0,162 µg/µl) w roztworze zawierającym bufor PBS i 6N HCl w stosunku 2:1. Na płytkę 96 dołkową nanoszono w duplikatach: po 20 µl prób badanych i po 20 µl każdego z rozcieńczeń wzorca, a następnie dodawano po 50 µl roztworu chloraminy T.*”

Kolejny rozdział prezentuje wyniki, które zostały szczegółowo opisane w artykułach dołączonych do dysertacji doktorskiej. Zdaniem recenzentki dobrym zabiegiem było nie powielanie w tekście rozprawy rycin oraz tabel znajdujących się w artykułach. Doktorantka w każdym z podrozdziałów opisujących wyniki podała w nawiasie informacje, o publikacji z której pochodzą dane wyniki i o numerze ryciny lub tabeli w której są zawarte. Podając jednak te dane Doktorantka używała sformułowania „figura” zamiast „rycina”, co jest kalką z języka angielskiego i w polskiej wersji pracy nie jest określeniem prawidłowym. Pod względem merytorycznym opisane wyniki są jednak bardzo ciekawe i cenne. Dodatkowo, Doktorantka przyporządkowała uzyskane wyniki do zadań badawczych wyszczególnionych w rozdziale 2. To pozwala czytelnikowi śledzić tok przeprowadzonych badań. Rozsądnym było również omówienie w rozprawie doktorskiej jedynie najważniejszych wyników, bezpośrednio związanych z hipotezami badawczymi. W pierwszym artykule z cyklu są bowiem umieszczone dodatkowe informacje dotyczące masy ciała zwierząt, masy tkanki tłuszczowej i mięśniowej, oraz wyniki testu tolerancji glukozy u myszy młodych oraz starych karmionych dietą nisko- lub wysokotłuszczową. Wyniki te potwierdzają właściwy dobór zastosowanego modelu eksperymentalnego. Jako suplement do pierwszego artykułu dodanych jest również aż 51 tabel, pokazujących szczegółowe wyniki zarówno parametrów zwierząt w czasie doświadczenia żywieniowego, jaki i parametry porównywane pod kątem wpływu wieku, płci i diety.

Wśród omówionych w tekście rozprawy doktorskiej wyników, znalazły się te dotyczące wpływu wieku, płci i rodzaju diety na parametry świadczące o ilości makrofagów rezydujących w skórze i zaangażowanych w proces gojenia ran. Analizowano stężenie białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1) w homogenatach tkanek myszy oraz ekspresję i lokalizację markerów CD68 i Mac-2 w skórze po eksperymentalnym zranieniu. Wykazano wpływ wieku na stężenie białka MCP-1 oraz ekspresję genu *CD68*. W przypadku ekspresji *CD68* na poziomie genu jak i białka wpływ miała również dieta, ponieważ najwyższą ekspresję odnotowano u zwierząt w podeszłym wieku karmionych dietą wysokotłuszczową. W trakcie czytania publikacji recenzentkę zastanowiły różnice w doborze technik – dla tego marker *CD68* analizowano zarówno na poziomie transkryptu metodą qRT-PCR, jak i białka, techniką barwienia immunohistochemicznego, natomiast Mac-2 analizowano jedynie na poziomie białka? Skąd wynikały różnice w dniach po zranieniu, z których pochodzą



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

wyniki? Ekspresję i lokalizację białka Mac-2 wykazywano w tkankach 3 dni po zranieniu, natomiast w przypadku białka CD68 tkanki pochodziły z 7 dnia po zranieniu.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisała wyniki dotyczące zmian ekspresji wybranych metaloproteinaz macierzy (MMP-9 i MMP-13) oraz swoistego inhibitora tkankowego Timp-1 w kontekście gojenia ran skóry u zwierząt w różnym wieku, różnej płci oraz karmionych różnymi dietami. Odnotowano wpływ wieku na ekspresję MMP-9, której poziom był najwyższy u myszy starych. Z kolei ekspresja genu *MMP-13* była zależna od wieku oraz płci, ponieważ wykazano najwyższy poziom transkryptu w grupie młodych samic. W przypadku tych analiz również nasuwa się pytanie, dlaczego jedynie MMP-9 analizowano zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka, natomiast pozostałe dwa parametry: *MMP-13* i *Timp-1* jedynie na poziomie mRNA metodą qRT-PCR?

Następnie, Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące zmian w poziomie białka i mRNA transformujących czynników wzrostu TGF- β 1 oraz TGF- β 3, które są zaangażowane w regulację procesu gojenia urazów skórnych. W przypadku TGF- β 1 najwyższy poziom transkryptu odnotowano w tkankach samic w podeszłym wieku w 3 i 7 dniu od zranienia, u których również dieta wysokotłuszczowa wpływała na ekspresję. W przypadku genu kodującego pro-regeneracyjną cytokinę TGF- β 3 najwyższą ekspresję obserwowano w 7 dniu po zranieniu we wszystkich grupach doświadczalnych, natomiast w 14 dniu po zranieniu podwyższoną ekspresję genu *Tgfb3* wykazano w grupie starych samic karmionych dietą wysokotłuszczową.

Ponieważ biosynteza kolagenu jest jednym z niezbędnych czynników do prawidłowego przebiegu gojenia ran skóry, w pracy przeprowadzono również analizę ekspresji genów dwóch typów kolagenu: *Colla2* i *Col3a1* oraz wykonano analizę zawartości hydroksyproliny w tkankach myszy z poszczególnych grup doświadczalnych, w celu pośredniego wykazania lokalizacji kolagenu w skórze po zranieniu. Otrzymane wyniki również wskazują dwa parametry: wiek i płeć, jako te, które mają wpływ na ekspresję kolagenu w skórze, a przez to również na przebieg procesu gojenia ran.

Na koniec wszystkie uzyskane wyniki poddano zbiorczej analizie statystycznej w celu wykazania interakcji pomiędzy badanymi czynnikami: wiekiem, płcią i rodzajem diety na gojenie ran skóry. Uzyskane zależności zostały zebrane w tabeli 5, która odpowiada tabeli 1 w pierwszym artykule z cyklu i stanowi doskonale podsumowanie wykazanych interakcji.

W dalszej części rozdziału czwartego Doktorantka opisuje wyniki zaprezentowane w drugiej publikacji, dotyczącej ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 oraz metaloproteinazy MMP9 w niezranionej i pourazowej skórze myszy w różnym wieku. Analiza cytometryczna komórek izolowanych ze skóry myszy transgenicznych Foxn1:Egfp, u których ekspresja genu eGFP znajduje się pod kontrolą sekwencji regulatorowej w genie Foxn1, wykazała najwyższy odsetek komórek Foxn1-eGFP⁺ w naskórku pochodzącym od nowonarodzonych myszy, w porównaniu do zwierząt dorosłych i starych. Analizując ekspresję genu *Foxn1* w naskórku myszy transgenicznych wykazano jednak najwyższą ekspresję tego genu u osobników starych. Podobne zależności obserwowano w przypadku genu *MMP-9*, którego ekspresja również była najwyższa u starych myszy Foxn1:Egfp. Wyniki dotyczące zmian w ekspresji genu kodującego *MMP-9* korespondują z wynikami opisanymi w artykule z 2020 roku, ponieważ w tych badaniach również obserwowano istotnie wyższy poziom ekspresji genu *MMP-9* u osobników starych w porównaniu do myszy młodych i dorosłych. Bardzo



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

ciekawe wyniki otrzymano w analizach tkanek pobranych w różnym czasie po eksperymentalnym zranieniu skóry myszy. Wykazano m.in. obecność Foxn1 nie tylko w naskórku, ale również w warstwie brodawkowej skóry właściwej w 7 dniu po urazie. W tym samym czasie obserwowano wzrost odsetka komórek wykazujących koekspresję E-kadheryny i N-kadheryny, co może świadczyć o zaangażowaniu czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w regulację procesu EMT w początkowej fazie gojenia ran skóry. Dodatkowo wykazano kolokalizację Foxn1-eGFP z alfa aktyną mięśni gładkich (α SMA) w 21 i 36 dniu po zranieniu, co sugeruje udział Foxn1 w tworzeniu tkanki bliznowej w późnej fazie gojenia rany.

W rozdziale piątym Doktorantka przeprowadza dyskusję nad otrzymanymi wynikami na tle dostępnej, zwykle najbardziej aktualnej literatury. Dyskusja potwierdza dobre poznanie tematyki badawczej przez Panią Martę Kopcewicz oraz dojrzałą interpretację otrzymanych wyników. W tym rozdziale zabrakło jedynie komentarza Doktorantki odnoszącego się do zastosowanego modelu zwierzęcego w kontekście możliwej ekstrapolacji uzyskanych wyników i wniosków na model gojenia urazów skórnych u ludzi. Recenzentka nie kwestionuje słuszności doboru modelu doświadczalnego, a jedynie prosi o odniesienie się do kwestii różnic w budowie skóry u myszy i ludzi oraz możliwych konsekwencji tych różnic w przebiegu procesu gojenia ran.

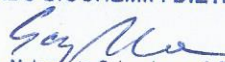
Na końcu dysertacji przedstawiono 9 wniosków, przy czym dwa z nich - wniosek 4 oraz 9 - są raczej podsumowaniem obserwacji, dlatego mogłyby zostać pominięte. Pozostałych siedem wniosków zostało sformułowanych prawidłowo i w sposób syntetyczny pokazują główne osiągnięcia przeprowadzonych badań, wskazując na najważniejsze znaczenie wieku osobniczego na przebieg procesu gojenia urazów skóry i podkreślając również istotne znaczenie płci.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani Marty Kopcewicz ma wysoką wartość merytoryczną. Szeroki zakres przeprowadzonych badań i wykorzystane metody analityczne wymagały dużego nakładu pracy i umiejętności Doktorantki. O dużej wartości naukowej uzyskanych przez Doktorantkę wyników świadczy ich opublikowanie w czasopiśmie o dobrych wskaźnikach bibliometrycznych i światowym zasięgu.

Wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Kopcewicz pt. „Zmienność procesu gojenia urazów skóry w zależności od wieku, otyłości oraz płci w aspekcie modulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1” odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o dopuszczenie mgr Marty Kopcewicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie z uwagi na wysoką ocenę merytoryczną pracy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

**KIEROWNIK
ZAKŁADU BIOCHEMII I DIETETYKI**


/ Dr hab. Małgorzata Gajewska, prof. SGGW /