UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 9 sierpnia 2021

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI
KIEROWNIK ZAKŁADU
PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Walendzik pt. „Rola czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w modulacji śródskórnych komórek tłuszczowych w skórze myszy w zależności od wieku i diety"

Podstawa formalna przygotowania recenzji:

Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 28 czerwca 2021 roku.

Trudno znaleźć we współczesnej biologii i medycynie temat bardziej przyciągający uwagę zarówno samych naukowców jak i szeroko pojętej opinii publicznej niż medycyna regeneracyjna. Możliwość sterowania procesami regeneracji tkanek i organów w warunkach laboratoryjnych a później klinicznych jest z oczywistych powodów niezwykle atrakcyjnym wyzwanie naukowym i medycznym. Procesy regeneracji, nawet tak skomplikowane jak odrastanie utraconych kończyn mają przecież miejsce również u kręgowców, czego klasycznym przykładem są płazy ogoniaste, jednakże w przypadku ssaków możliwości te zostały ewolucyjnie praktycznie utracone. Nieliczne przykłady procesów regeneracji u ssaków wskazują jednak, że być może nie jest to utrata zupełna i pozostawia nadzieję dla rozwoju medycyny regeneracyjnej. Jakkolwiek ostanie lata obfitują w coraz ciekawsze doniesienia dotyczące biologii komórek macierzystych czy też hodowania i konstruowania trójwymiarowych organów i narządów in vitro, dalecy jesteśmy ciągle od zrozumienia tych bardzo złożonych procesów i wykorzystania tej wiedzy w praktyce. Badania zespołu Pani Profesor Barbary Gawrońskiej-Kozak od wielu lat dotyczą mechanizmów regeneracyjnych, w tym zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw odmiennych sposobów gojenia ran skórnych, naprawczego (z wytworzeniem blizny) i regeneracyjnego (gojenie bezbliznowe). Wieloletnie bardzo ciekawe badania Zespołu oparte były na obserwacji, że czynnikiem odpowiedzialnym za gojenie naprawcze u myszy jest Foxn1. Obserwacja ta pozwoliła na stworzenie bardzo interesującego modelu doświadczalnego

UL. GRONOSTAJOWA 7
30-387 KRAKÓW
TEL. +48 (12) 664 61 42, FAX: +48 (12) 664 62 09
EMAIL:Z.MADEJA@UJ.EDU.PL

umożliwiającego badanie różnic pomiędzy regeneracją skóry a bliznowym gojeniem ran, który to sposób aczkolwiek szybko i bezpiecznie umożliwia odtworzenia podstawowych funkcji ochronnych skóry, jednak nie przywraca jej wszystkich właściwości obserwowanych przed zranieniem.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy jednego z aspektów tych złożonych zjawisk, a mianowicie roli wspomnianego czynnika Foxn1 w modulacji śródskórnych komórek tłuszczowych w skórze myszy i znaczenia tych oddziaływań w procesie gojenia ran w kontekście wieku i diety zwierząt doświadczalnych. Widać zatem, że oceniana praca doktorska została wykonana w Zespole mającym olbrzymie doświadczenie w tego rodzaju badaniach i pod opieką Promotora o bardzo dużych osiągnięciach naukowych w tej dziedzinie.

W szczególności, w przedstawionej do recenzji pracy Pani mgr Katarzyna Walendzik starała się obronić przedstawioną na wstępie hipotezę, że sygnalizacja czynnika Foxn1 reguluje procesy adipogenezy śródskórnych komórek tłuszczowych i również w ten sposób wpływa na procesy gojenia urazów skórnych. Temat pracy wydaje się bardzo interesujący od strony naukowej i jego podjęcie jest jak najbardziej uzasadnione.

Od strony formalnej przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi zbiór 2 opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, uzupełniony bardzo obszernym wprowadzeniem i Komentarzem Autorskim zawierającym: wstęp, omówienie stosowych metod, najważniejsze osiągnięcia, krótką dyskusję, podsumowanie, opis perspektyw kontynuacji badań, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz listę publikacji wchodzących w skład doktoratu, a także oświadczenia współautorów publikacji o ich udziale w przedstawionych publikacjach. Możliwość takiego przedstawienia rozprawy doktorskiej jest zgodna z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce". Z punktu widzenia recenzenta ten sposób przygotowania pracy doktorskiej stwarza w przypadku artykułów wieloautorskich potencjalną trudność w ocenie udziału doktoranta w przedstawionych publikacjach. Jednak w przypadku ocenianej rozprawy wiodąca rola Pani mgr Katarzyny Walendzik w powstawaniu załączonych publikacji nie budzi żadnych wątpliwości. W obu pracach jest pierwszym autorem, co zwykle w tego typu publikacjach jest wyznacznikiem wiodącej roli w przeprowadzaniu badań. Taki stan rzeczy znajduje również pełne potwierdzenie w załączonych oświadczeniach współautorów prac.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi cykl tematycznie mocno związanych prac, w którym kolejna praca jest kontynuacją poprzedniej. Prace te zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych dedykowanych tej tematyce. Pierwsza została opublikowana w Journal of Investigative Dermatology (Współczynnik oddziaływania, IF= 7.143, punkty MNiSW - 140)

a druga w International Journal of Molecular Sciences (IF= 4,556, MNiSW – 140)). Reasumując, przedstawiona do recenzji praca pod względem formalnym nie budzi moich najmniejszych wątpliwości.

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 58 stron maszynopisu Komentarza oraz dwie opublikowane prace doświadczalne. W pierwszej części pracy, którą stanowi Komentarz Autorski, Autorka przedstawia krótki wstęp do przeprowadzonych badań, następnie hipotezy i cele pracy, omawia dość obszernie stosowane metody eksperymentalne i model badawczy aby następnie przejść do podsumowania głównych tez pracy i przedstawić wnioski płynące z przeprowadzonych badań. Wstęp napisany jest przejrzyście i logicznie prowadząc w jasny sposób do przedstawienia celu pracy. Lektura tej części pracy nasunęła mi dwa pytania. Wydaje się, że z punktu widzenia współczesnego człowieka brak aktywnego czynnika Foxn1 w skórze wydawałby się teoretycznie dość atrakcyjną możliwością, ponieważ mógłby z jednej strony prowadzić do bezbliznowego gojenia ran a z drugiej obniżać podatność na indukowaną dietą otyłość. Jakie byłyby jednak konsekwencje braku tego czynnika dla naszego funkcjonowania i czy u człowieka wygląda to podobnie jak umyszy? Drugie pytanie dotyczy pochodzenia śródskórnych komórek tłuszczowych. Wydaje się, że mogą pochodzić od obecnych w skórze komórek macierzystych/progenitorowych adipocytów lub fibroblastów skóry. Czy istnieją jakieś doniesienia, że mogą to być komórki pochodzenia szpikowego lub powstawać w wyniku zmian fenotypowych keratynocytów? Czy odnotowano jakieś uchwytne różnice w fenotypie śródskórnych komórek tłuszczowych w zależności od ich pochodzenia? Osobiście wolę również określenie przejście epitelialno-mezenchymalne niż tranzycja nabłonkowo-mezenchymalna (strona 4), ale to pewnie bardziej kwestia przyzwyczajenia.

W rozdziale „Model badawczy oraz metody eksperymentalne" Autorka zawiera wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych metod doświadczalnych oraz wykorzystanego materiału biologicznego. Na podkreślenie zasługuje tutaj zastosowanie przez Doktorantkę bardzo interesującego modelu badawczego opartego na transgenicznych myszach Foxn1:: EGFP. Opis stosowanych metod jest jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń, a zastosowane w pracy metody doświadczalne są bez wątpienia właściwe do rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. Prosiłbym jedynie o bliższe wyjaśnienie kilku kwestii. Jaki jest powód różnic w wieku myszy od których izolowano keratynocyty (1-4 dni) i fibroblasty (4-5 miesięcy lub 20-21 miesięcy)? W jakiej pożywce hodowane były keratynocyty w modelu kokultury? Jeśli było to medium do keratynocytów to czy możliwy jest wpływ samego odmiennego medium na fibroblasty w kokulturze? Jaki był powód przeprowadzenia analizy migracji jedynie w przypadku fibroblastów? Czy rozważano możliwość zbadana aktywności ruchowej

samych keratynocytów lub śródskórnych komórek tłuszczowych, o ile te ostatnio migrują wystarczająco aktywnie?

Główne obserwacje eksperymentalne przedstawione w pracy doktorskiej zostały jak wspomniano wcześniej zawarte w 2 pracach doświadczalnych oraz syntetycznie omówione w rozdziale „Wyniki" w Komentarzu Autorskim. Do najważniejszych wyników przeprowadzonych prac można zaliczyć:

1. Obserwację, że częściowa inaktywacja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 obniża podatność na indukowaną dietą otyłość.

2. Stwierdzenie, że ekspresja czynnika Foxn1 w skórze ulega obniżeniu wraz z wiekiem osobniczym.

3. Wykazanie, że częściowa inaktywacja czynnika Foxn1 zaburza procesy różnicowania śródskórnych komórek tłuszczowych

4. Udowodnienie, że fibroblasty skóry właściwej wykazują zdolność różnicowania się do komórek tłuszczowych i co ciekawe, ich różnicowanie odbywa się z podobną wydajnością jak komórek SVF i EMSC.

5. Wykazanie, że wiek oraz dieta w większym stopniu niż naskórkowa sygnalizacja Foxn1 kształtują potencjał DFs do różnicowania w kierunku komórek tłuszczowych.

6. Odkrycie jako klamry spinające wcześniej omawiane obserwacje, że czynnik Foxn1 odgrywa nadrzędną rolę w stymulacji szlaków sygnalizacyjnych BMP2 oraz IGF2 uczestniczących w procesie różnicowania się fibroblastów do komórek tłuszczowych.

Otrzymane wyniki zostały przez Autorkę dokładnie omówione w 6 stronicowym rozdziale „Dyskusja". Doktorantka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych. Dodatkowo wyniki zostały przedyskutowane w 2 pracach będących podstawą rozprawy. Sposób napisania tej części pracy doktorskiej świadczy o dogłębnym zrozumieniu tematyki i świetnej znajomości literatury. W Komentarzu Autorskim Doktorantka powołuje się na 99 bardzo dobrze dobranych pozycji literaturowych.

Podsumowując, otrzymane przez Doktorantkę wyniki przyczyniają się według mnie do lepszego zrozumienia udziału czynnika Foxn1 w regulacji aktywności śródskórnych komórek tłuszczowych oraz roli w tych procesach takich czynników jak wiek i dieta. Badania te również rzucają nowe światło na mechanizmy procesów regeneracji i gojenia urazów skórnych naskórka wskazując na

możliwość istnienia w tym procesie wielu różnego rodzaju oddziaływań pomiędzy różnymi typami komórek rezydujących w okolicach miejsca zranienia. Ze względu na ścisłe powiązanie tematyki pracy z medycyną regeneracyjną można się spodziewać, że uzyskane wyniki przyczynią się również do rozwoju praktycznych zastosowań opisanych tu odkryć.

W podsumowaniu pracy Autorka nakreśla również możliwe dalsze kierunki badań. Ciekawi mnie czy nie brała pod uwagę również sprawdzenia czy aktywność czynnika Foxn1 może mieć jakiś wpływ na zdolność keratynocytów i fibroblastów do reakcji na naturalnie występujące w obrębie zranienia endogenne pola elektryczne, które mogą indukować kierunkową migrację tych komórek do wnętrza rany i w ten sposób stymulować proces jej gojenia?

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Nie budzi to większego zdziwienia ponieważ przedstawione wyniki zostały już opublikowane i od tej strony sprawdzone przez recenzentów i redakcje czasopism. Również Komentarz Autorski został pod względem edytorskim przygotowany bardzo starannie.

Wszystkie przedstawione tutaj pytania i uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Warto również podkreślić, że oprócz wyników przedstawionych w pracy doktorskiej Pani Katarzyna Walendzik jest autorką 11 innych opublikowanych prac naukowych. Sumarycznie wszystkie jej prace (13 artykułów) było już 37 razy cytowane w literaturze światowej.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską Pana mgr Katarzyny Walendzik oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu Autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej i może stanowić podstawę do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Walendzik przez Radę Naukową Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na bardzo wysoką wartość naukową pracy doktorskiej, wnoszę o rozważenie przez Wysoką Radę możliwości jej wyróżnienia.

Elektronicznie podpisany przez Zbigniew Madeja
Data: 2021.08.09 12:55:42 +02'00'

(Zbigniew Madeja)