



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI

Department of Pharmaceutical Biochemistry  
and Molecular Diagnostics  
with Laboratory of Molecular Diagnostics  
& Pharmacogenomics

Zakład Biochemii Farmaceutycznej  
i Diagnostyki Molekularnej  
z Pracownią Diagnostyki Molekularnej  
i Farmakogenomiki

tel/fax: +48 42 677-91-26

e-mail: [marek.mirowski@umed.lodz.pl](mailto:marek.mirowski@umed.lodz.pl)

**prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski**

Łódź, 28 czerwca 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Marii Baszanowskiej pt.: „Wpływ pozakomórkowej prolidazy na procesy regeneracyjne w eksperymentalnym modelu gojenia ran oraz zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  w fibroblastach skóry ludzkiej” na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**

Przedstawiony cykl publikacji, stanowiący rozprawę, poświęcony jest ocenie wpływu prolidazy zwierzęcej i rekombinowanej ludzkiej na procesy regeneracyjne w dwóch modelach eksperymentalnych (uszkodzonych mechanicznie fibroblastach i indukowanym w fibroblastach przez IL-1 $\beta$  stanem zapalnym). Doktorantka analizuje żywotność, proliferację, migrację komórek, ekspresję wybranych białek szlaków sygnałowych zależnych od EGFR, integryny  $\beta$ 1 i IGF-1R oraz biosyntezę kolagenu.

Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Promotorem rozprawy jest prof. Jerzy Pałka.

Dysertację stanowi cykl 2 publikacji eksperymentalnych, spójnych tematycznie, opublikowanych w ostatnich dwóch latach (2021-2023), w czasopismach z listy MEiN oraz Journal Citation Reports. Jednej opublikowanej w Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 942 o IF wynoszącym 6,208 i punktacji MEiN 140 oraz drugiej Molecules 2023, 28, 851 o IF wynoszącym 4,927 i punktacji MEiN 140. Łączna wartość IF dla prac wynosi IF=11,135 i w punktacji MEiN=280. Do publikacji dołączono również bogaty materiał uzupełniający liczący 16 stron do publikacji I i 21 stron do publikacji II.

Zgodnie z załączonymi do dysertacji oświadczeniami procentowy udział mgr W. Baszanowskiej w przygotowanie tych prac został oszacowany na 70% co zostało potwierdzone pierwszym autorstwem. Współautorzy prof. J. Pałka, prof. W. Milytk, dr hab. I. Ościłowska, dr M. Nizioł (w pierwszej pracy Misiura), dr J. Czyrko-Horczałk wyrazili zgodę na wykorzystanie ww. prac w rozprawie doktorskiej Autorki. Wkład mgr W. Banaszewskiej w przygotowanie prac, zgodnie z oświadczeniem, polegał na opracowaniu metod badawczych, prowadzeniu części eksperymentalnej badań, analizie statystycznej wyników i ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu, a w publikacji drugiej również wyrażał się udziałem w opracowaniu koncepcji pracy. Realizacja dysertacji pod kierunkiem prof. J. Pałki i we współpracy z zespołem doświadczonych naukowców pozwoliła przygotować bardzo ambitną pracę doktorską, wnoszącą elementy nowości naukowej. Co więcej Promotor i

współpracownicy zapewнили Doktorantce finansowanie, dość kosztownych badań, które pochodziło ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr projektu 2017/25/B/N27/02650 - OPUS 12: Prolidaza jako czynnik pobudzający gojenie ran w eksperymentalnych modelach komórek skóry realizowany w Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków.

Przedłożona do recenzji praca doktorska składa się z 15 rozdziałów i liczy 152 strony. Zamieszczony cykl publikacji poprzedza spis treści, wykaz źródeł finansowania, spis artykułów stanowiących podstawę dysertacji. Następnie Doktorantka zamieszcza 15-stronicowe wprowadzenie (str. 7-22), cel pracy (str. 23), zwięzłe, dwustronicowe podsumowanie zastosowanych materiałów i metod, wyselekcjonowane, najbardziej istotne wyniki (str. 26-43), które podsumowuje i dyskutuje (str. 44-50). Tę część zamykają wnioski wynikające z przeprowadzonych badań (str. 51) oraz bogato zacytowane piśmiennictwo liczące 124 pozycje i streszczenia w języku polskim i angielskim. Następnie, zamieszczono artykuły będące podstawą dysertacji, pierwszy:

Baszanowska W, Misiura M, Oscilowska I, Pałka J, Miltyk E.: Extracellular prolidase (PEPD) induces anabolic processes through EGFR,  $\beta$ 1-integrin, and IGF-1R signaling pathways in experimental model of wounded fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 942 wraz z materiałem uzupełniającym

i publikację 2 Baszanowska W, Nizioł M, Oscilowska I, Czyrko-Horczak J, Miltyk W, Pałka J.: Recombinant human prolidase (rhPEDP) induces wound healing in experimental model of inflammation through activation of EGFR signaling in fibroblasts. *Molecules* 2023, 28, 851 również z dostępnym on-line materiałem uzupełniającym.

W pracy załączono opinię Komisji Bioetycznej, oświadczenia Autorki i współautorów prac wchodzących do dysertacji. Prace zamyka wykaz całkowitego dorobku naukowego i innych aktywności naukowych Doktorantki.

We wstępie pracy doktorskiej dokonano analizy złożonych mechanizmów regulacji procesu naprawczego uszkodzonych tkanek w przebiegu zapalenia, które pozwalają na poszukiwanie nowych ścieżek terapii wspomagającej regenerację tkanek. Uwagę sfokuzowano na prolidazie (PEPD) [EC.3.4.13.9] enzymie o podwójnym mechanizmie aktywności biologicznej:

– związanym z proteolizą w cytoplazmie di- i tripeptydów z proliną lub hydroksyproliną w pozycji C-końcowej, formy kluczowej dla prawidłowego metabolizmu w fibroblastach i keratynocytach oraz niezbędnej do syntezy kolagenu  
- działaniem pozakomórkowym jako liganda receptora EGFR i HER2 i modulatora aktywności transkrypcyjnej P53 i ekspresji receptora interferonu  $\alpha/\beta$ , które było w centrum uwagi prowadzonych przez Doktorantkę badań.

Wstęp dobrze wprowadza w realizowane w pracy zagadnienie. Doktorantka krótko opisuje podwójny mechanizm aktywności biologicznej prolidazy, gen kodujący badany enzym i jego organizację oraz budowę białka, możliwe jego modyfikacje potranslacyjne i charakteryzuje reakcje enzymatyczne katalizowane przez PEPD jak również mechanizmy regulujące aktywność prolidazy oparte o aktywację receptora integrynowego  $\beta$ 1, receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R) i receptora transformującego czynnika wzrostu (TGF $\beta$ R). Następnie zwraca uwagę czytelnika na nieenzymatyczną funkcję prolidazy, którą jako pierwszy zaobserwował i opisał Yang i wsp., w 2013r. Autorzy dowiedli, że PEPD jest ligandem ErbB1/EGFR i ErbB2/HER2 i regulatorem aktywności P53 i dojrzewania IFNAR1 co otworzyło nowe ścieżki badań nad rolą PEPD w procesie gojenia ran. Podsumowuje

opublikowane dane dostępne piśmiennictwie poświęcone prolidazie jako ligandowi ErbB2/HER2, regulatorowi P53 i receptora interferonu  $\alpha/\beta$ . Na końcu tego rozdziału formułuję hipotezę mechanizmu aktywacji szlaków sygnałowych indukowanych przez EGFR, integrynę  $\beta 1$  i TGF-1R i precyzuje cel swoich badań, w których skupia się na ocenie wpływu prolidazy zwierzęcej i rekombinowanej ludzkiej na procesy regeneracyjne w dwóch modelach eksperymentalnych (uszkodzonych mechanicznie fibroblastach i indukowanym w fibroblastach przez IL-1 $\beta$  stanem zapalnym). Doktorantka analizuje żywotność, proliferację, migrację komórek, ekspresję wybranych białek szlaków sygnałowych zależnych od EGFR, integryny  $\beta 1$  i IGF-1R oraz biosyntezę kolagenu.

Na podkreślenie zasługują zastosowane w pracy modele eksperymentalne, który zostały wypracowane w kierowanym przez Promotora pracy Zakładzie Chemii Leków i współpracującym Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Był to model *in vitro* oparty o uszkodzone mechanicznie fibroblasty i drugi, zapalny indukowany ludzką rekombinowaną IL-1 $\beta$ . Fibroblasty skóry ludzkiej (CRL-2072) pochodziły ATCC a ich czystość i autentyczność była potwierdzona certyfikatem.

Autorka dysertacji zwróciła uwagę na pozakomórkową prolidazę (PEPD), która jak wykazali Yang i wsp., 2013 okazała się ligandem dla receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (ErbB1/EGFR i ErbB2/Her2), regulatorem aktywności białka P53 i czynnikiem promującym powierzchniową ekspresję receptora IFN-I, IFNAR1. Z kolei jej niedobór powoduje upośledzoną sygnalizację INF-1 (Lubick i wsp., 2015). W dysertacji badania *in vitro* zostały przeprowadzone w modelu mechanicznego uszkodzenia fibroblastów jak i modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  dowiodły, że PEPD z nerek świnii indukuje, w sposób zależny od dawki, proces proliferacji i migracji fibroblastów. Nowym elementem, który Doktorantka wniosła do nauki było zaobserwowanie, że PEPD nasila znacząco wyraźniej proliferację fibroblastów po ich uszkodzeniu mechanicznym w porównaniu do komórek kontrolnych. Pobudzona migracja związana była z sygnalizacją szlaku EGFR a w następstwie szlaków PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/ERK i JAK/STAT. Taki kierunek działania PEPD został potwierdzony poprzez wykorzystanie znanego inhibitora EGFR gefitinibu, który hamował pobudzające działanie PEPD na szlak sygnałowy EGFR – obserwowano obniżoną ekspresję całkowitego białka EGFR. Co więcej dowiedziono, że obniżenie działania PEPD na szlak sygnałowy EGFR spowodowane jest obniżeniem stopnia fosforylacji białek PI3K, Akt i mTOR. Doktorantka analizuje także komunikację pomiędzy EGFR a receptorem integrynowym  $\beta 1$  jak i receptorem insuliniopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R). Zwraca uwagę, że komunikacja pomiędzy tymi receptorami pełni kluczową rolę w procesie gojenia ran ze względu na pobudzanie biosyntezy kolagenu i w pracy wykazuje, że fibroblasty stymulowane PEPD pobudzają syntezę kolagenu za pośrednictwem ww. receptorów (receptora integryny  $\beta 1$  i IGF-1R). W następstwie tych procesów indukcji podlegają szlaki sygnałowe FAK, Grb2 i kinaz ERK1/ERK2 co z kolei pobudza biosyntezę składników ECM w tym również kolagenu. Ważnym wynikiem przedstawionym w dysertacji jest wykazanie obniżenia ekspresji NF- $\kappa$ B w fibroblastach poddanych działaniu PEPD co współgra z danymi piśmiennictwa, udowadniającymi, że czynnik ten jest inhibitorem biosyntezy kolagenu. Wyniki tych badań mgr W. Baszanowska podsumowała w pracy opublikowanej Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 942.

Drugi, zastosowany przez Doktorantkę model eksperymentalny wynikał z faktu, że z mechanicznym uszkodzeniem tkanki związany jest stan zapalny. Dlatego w tym modelu fibroblasty poddano działaniu IL-1 $\beta$ , znanego mediatora stanu zapalnego. Tym razem mgr W.

Baszanowska zastosowała rekombinowaną ludzką prolidazę (rhPEPD), której otrzymanie zostało wdrożone w Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków.

W zastosowanym modelu (model zapalny indukowany przez IL-1 $\beta$ ) Autorka dysertacji wykazała, że PEPD aktywuje sygnalizację EGFR. Mechanizm ten, polegał na fosforylacji EGFR i białek od niego zależnych PI3K/AKT/mTOR. I w tym modelu zastosowanie gefitynibu pozwoliło na obniżenie ekspresji EGFR i białek od niego zależnych. Doktorantka zaobserwowała ponadto, że rhPEPD i IL-1 $\beta$  powodują wzrost ekspresji receptora integrynowego  $\beta$ 1 i białek z jego szlaku sygnałowego (p-FAK, Grb2 i ERK1/2). Zastosowany w tym eksperymencie gefitynib nie wykazał hamującego działania PEPD na wzrost ekspresji receptora  $\beta$ 1-integriny i p-Fak ale obniżał ekspresję Grb2 i ERK1/2 co sugeruje, że stymulacja za pomocą PEPD szlaku integrynowego  $\beta$ 1 jest niezależna od EGFR.

Kolejnym ciekawym spostrzeżeniem Doktorantki jest wykazanie w opisywanym modelu (fibroblasty z indukowanym IL-1 $\beta$  zapaleniem i traktowanych rhPEPD) zwiększonej aktywności metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, co skutkuje wzmożoną degradacją składników ECM i w konsekwencji ułatwia proces migracji komórek do zranionego miejsca. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Molecules* 2023, 28, 851.

Podsumowując uzyskane przez mgr W. Baszanowską wyniki należy podkreślić, że w obu zastosowanych w dysertacji modelach eksperymentalnych po raz pierwszy udowodniła, że PEPD aktywuje EGFR-zależny proces gojenia ran.

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki zostały przez Autorkę dysertacji podsumowane i przedyskutowane z dostępnymi w piśmiennictwie danymi. Ten rozdział dowodzi, że Autorka jest dojrzałym naukowcem potrafiącym krytycznie analizować otrzymane wyniki. Zdaje sobie sprawę z ograniczeń zastosowanych przez Nią modeli *in vitro* i konieczności potwierdzenia swoich obserwacji w badaniach *in vivo* w celu rozważenia możliwości aplikacyjnych opartych o uzyskane wyniki badań.

Praca została podsumowana trzema dobrze wyciągniętymi wnioskami i schematem ilustrującym rolę zewnątrzkomórkowej prolidazy opartym na uzyskanych w dysertacji wynikach dla obu modeli eksperymentalnych *in vitro*.

Tematyka podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w aktualne kierunki badawcze w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Badania zostały przeprowadzone z dużym rozmachem, jednocześnie wymagały dużej determinacji, cierpliwości i skrupulatności. Niewątpliwie, przeprowadzenie interesujących badań opartych o nowe odkrycia związane z prolidazą i jej rolą w procesie gojenia ran, opublikowanie wyników w okresie 2 lat było poparte pracowitością Autorki dysertacji ale także pracą w zespole budowanym przez prof. Jerzego Pałkę Promotora rozprawy. Warto nadmienić, że spośród 124 cytowanych pozycji piśmiennictwa 20 stanowi odwołanie do prac własnych ww. zespołu naukowców.

Praca została przygotowana bardzo starannie i jedyna moja uwaga dotyczy stosowania przez Doktorantkę terminu literatura uważam, że w opracowaniach naukowych powinniśmy odwoływać się do danych z piśmiennictwa.

Ciekaw też jestem czy Doktorantka będzie kontynuowała swoją pracę badawczą ponieważ uzyskane wyniki *in vitro* są bardzo obiecujące i jeżeli tak, to jaki będzie kierunek

dalszych badań? Ze względu na właściwości prolidazy takie jak wiązanie z białkiem P53, oddziaływaniem z czynnikami EGFR, ErbB2/Her2, HIF-1 $\alpha$ , TGF $\beta$  1, NF- $\kappa$ B, MMP-2 i MMP-9 czy Doktorantka uważa, że prolidaza może również być interesująca jako target w chorobach nowotworowych?

Kandydatka oprócz współautorstwa dwóch, zaprezentowanych w dysertacji prac jest współautorem 9 wysokoimpaktowanych prac (IF od 3,396 do 6,208 w punktacji MEiN od 70 do 140 pkt). Jest współautorką 14 doniesień zjazdowych, z których 10 zaprezentowano na konferencja zagranicznych i 4 na konferencjach krajowych.

Podsumowując dane bibliometryczne mgr Weroniki M. Baszanowskiej należy podkreślić wysoką punktacje pozostałego dorobku naukowego (współautor prac o łącznym IF wynoszącym 49,063 i punktacji MNiSW równej 1110). Uwzględniając publikacje stanowiące podstawę pracy doktorskiej łączny IF wynosi 60,198, a punktacja MEiN 1390 pkt. Ponadto, mgr W. Baszanowska była wykonawcą w grantie NCN realizowanym od 2018 do 2022r. i była beneficjentem dwóch projektów statutowych finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, jednego w którym była współwykonawcą realizowanego w okresie 2019-2020 i drugiego, którym kierowała (2019-2020). W 2019r. odbyła staż naukowy w Centrum Neuronauki i Biologii Komórki w Coimbrze w Portugalii.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Weroniki Marii Baszanowskiej pt.: „Wpływ pozakomórkowej prolidazy na procesy regeneracyjne w eksperymentalnym modelu gojenia ran oraz zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  w fibroblastach skóry ludzkiej” spełnia wymagania ustawowe dotyczące rozpraw doktorskich, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r., poz. 574). W związku z powyższym, wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr W.M. Baszanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką punktację MEiN i IF cyklu prac składających się na rozprawę doktorską oraz wysoką wartość naukową, zastosowany warsztat badawczy i wniesienie nowych, oryginalnych danych do nauki wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Marii Baszanowskiej.