



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych  
Zakład Cytoologii  
dr hab. Iwona Grabowska-Kowalik



Warszawa, 01.09.2025

## **Rada Dyscypliny Biotechnologia**

### **Politechnika Warszawska**

#### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Iwoń - Szczawińskiej**

**pt. „Właściwości regeneracyjne komórek macierzystych  
w różnych modelach niedotlenienia kardiomiocytów”.**

**Promotor: prof. dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska,**

**Promotor pomocniczy: dr Ewelina Krogulec**

Podstawą opracowania recenzji jest pismo prof. dr. hab. inż. Michała Chudego przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej z dnia 8 lipca 2025 roku z prośbą o ocenę rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej zatytułowanej „Właściwości regeneracyjne komórek macierzystych w różnych modelach niedotlenienia kardiomiocytów”. Pani mgr inż. Iwoń-Szczawińska realizowała pracę w Katedrze Biotechnologii Medycznej pod opieką promotorską prof. dr hab. inż. Elżbiety Jastrzębskiej oraz dr Eweliny Krogulec.

#### **Ocena układu rozprawy doktorskiej**

Układ dysertacji jest prawidłowy i odpowiada standardom stawianym rozprawom doktorskim w formie pisemnej. Praca liczy 160 stron i została podzielona na dwie główne części: I Część literaturową (26 stron) oraz II Część eksperymentalną (81 stron). Oprócz zasadniczego tekstu, rozprawa zawiera wszystkie formalnie wymagane elementy, takie jak streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis treści, podsumowanie i wnioski, bibliografię,

spis tabel i rycin, a także informacje o dorobku naukowym Autorki. Rozprawa jest obszerna, starannie zredagowana i napisana poprawnym językiem naukowym.

Doktorantka w *Części teoretycznej* podejmuje wszystkie konieczne dla zrozumienia pracy tematy. Rozpoczyna od zwięzłego opracowania stanu wiedzy na temat budowy serca i chorób układu sercowo – naczyniowego oraz badań wpływu hipoksji na ten układ i modelowanie procesów wynikających z niedotlenienia *in vitro*. Następnie opisuje komórki macierzyste, ze szczególnym uwzględnieniem indukowanych komórek pluripotencjalnych i ich zastosowanie w badaniach nad regeneracją mięśnia sercowego. W kolejnym rozdziale doktorantka omawia znane modele do badania mięśnia sercowego poprzecznie prążkowanego i zastosowanie mat nanowłóknistych w tworzeniu przestrzennych modeli tkanek *in vitro*.

Część eksperymentalną rozprawy rozpoczyna opis *Celu pracy*, który został jasno określony i dotyczył „oceny zastosowania różnych mat nanowłóknistych jako podłoża do hodowli i badania komórek serca”. Doktorantka podczas realizacji badań do swojej pracy weryfikowała hipotezę badawczą mówiącą o tym, że zastosowanie mat nanowłóknistych o określonych właściwościach fizykochemicznych pozwoli na utworzenie modelu mięśnia sercowego *in vitro*, który będzie lepiej niż standardowe hodowle 2D odzwierciedlał warunki panujące *in vivo*.

Całość została zilustrowana dobrej jakości rycinami i schematami, które wspierają odbiór merytorycznej treści. Mam jednak kilka uwag. Po pierwsze, tytuł pracy jest bardzo ogólny i pomimo, że „mieszczą się” w nim opisane przez Autorkę badania to jednak nie w pełni oddaje faktyczną zawartość pracy – sugeruje bowiem badania nad potencjałem komórek do regeneracji, podczas gdy istotą przedstawionych badań jest opracowanie metod uzyskiwania modelu mięśnia sercowego *in vitro*.

### **Wskazanie oraz ocena zastosowanych metod badawczych**

Doktorantka zastosowała w swoich badaniach szerokie spektrum technik badawczych. Swoje badania prowadziła z wykorzystaniem różnych linii komórkowych (ludzkie kardiomiocyty i indukowane komórki pluripotencjalne oraz linie komórek szczurzych i mysich) oraz zaawansowanych technik n.p. uzyskiwania mat nanowłóknistych a także hodowli komórek z wykorzystaniem m.in. hipoksji. do analizy modelu, który opracowywała zastosowała szerokie spektrum analiz, takich jak proste techniki określania żywotności, określanie typu śmierci komórkowej, ale również bardzo skomplikowane i trudne techniki jak skaningowa mikroskopia elektronowa, badanie ułożenia komórek w zastosowanym do hodowli przestrzennej materiale lub sekwencyjne różnicowanie komórek iPSC w kardiomiocyty. Na podstawie opisu zastosowanych metod mogę stwierdzić, że Doktorantka posiada wszechstronny warsztat

eksperymentatora i kompetencje do podjęcia trudnych wyzwań analitycznych, do jakich niewątpliwie należy opracowywanie modeli badawczych.

### **Ocena części rozprawy doktorskiej dotyczącej omówienia wyników badań**

Rozdział Wyniki i dyskusja rozpoczyna się bardzo dokładnym opisem rezultatów uzyskanych przez Doktorantkę. Badania rozpoczęto od analizy i charakterystyki nanowłókien z polikaprolaktonu i poliuretanu, które następnie wykorzystano do wytwarzania mat nanowłóknistych o różnych właściwościach strukturalnych (fizykochemicznych) oraz do hodowli kardiomiocytów linii H9C2 (szczurzej), HL-1 (mysiej) i HCM (ludzkiej). Doktorantka określiła żywotność i ułożenie komórek hodowanych na matach nanowłóknistych, a w dalszym etapie badań analizowała obecność białek markerowych świadczących o „dojrzałości” kardiomiocytów, m.in. określonych izoform ciężkich łańcuchów miozyny oraz białek cytoszkieletu. Zaobserwowane różnice, m.in. w ekspresji genów, wskazują, że maty z polikaprolaktonu i poliuretanu w odmienny sposób wpływają na dojrzewanie kardiomiocytów. Wyniki te dowodzą, że hodowla na matach nanowłóknistych wspiera proces różnicowania komórek i lepiej odzwierciedla warunki *in vivo* w porównaniu do standardowych hodowli monolayer.

W kolejnym etapie badań Doktorantka przeanalizowała linie komórek iPSC oraz ich potencjał do różnicowania w kardiomiocyty w różnych warunkach hodowli. Potwierdzono skuteczność zastosowanego protokołu różnicowania, a także przetestowano różne warunki hodowli na matach nanowłóknistych. Pani Iwoń-Szczawińska wybrała wariant, w którym komórki przyjmowały najbardziej wydłużony, wrzecionowaty kształt ( $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ ), i kontynuowała dalsze badania. Określiła lokalizację komórek w hodowli przestrzennej oraz ekspresję genów kodujących białka związane z różnicowaniem i dojrzewaniem kardiomiocytów. Potwierdziła, że kardiomiocyty uzyskane z iPSC wykazują bardziej dojrzały fenotyp, gdy hodowane są na matach nanowłóknistych, zwłaszcza na włóknach z polikaprolaktonu.

W ostatnim etapie badań Doktorantka poddała testom zaprojektowany przez siebie model mięśnia sercowego. Analizie poddano kardiomiocyty z dwóch źródeł – linie komórkowe oraz kardiomiocyty uzyskane z indukowanych komórek pluripotencjalnych. Hodowano je na dwóch typach mat (z polikaprolaktonu i poliuretanu), a następnie hodowano w hipoksji oraz hipoksji z reoksygenacją. Stwierdzono, że hodowla komórek w pożywce o ok. 1% zawartości tlenu indukuje niekorzystne zmiany w cytoszkiecie oraz zwiększa poziom apoptozy, przy czym efekt zależy od typu komórek oraz rodzaju materiału, na którym je hodowano. Do dalszych badań wybrano maty poliuretanowe, ponieważ podczas izolacji RNA z hodowli na matach polikaprolaktonu napotymano trudności techniczne. Następnie Doktorantka zbadała wpływ hipoksji i hipoksji z reoksygenacją na hodowle

mieszane kardiomiocytów uzyskanych z iPSC oraz niezróżnicowanych iPSC. Analizie poddano lokalizację i/lub ekspresję genów związanych z utrzymaniem pluripotencji i różnicowaniem w kardiomiocyty. Wyniki tego etapu nie potwierdziły jednoznacznie postawionej hipotezy. Na uwagę zasługuje wysoka jakość rycin, w tym bardzo dobre fotografie z mikroskopii konfokalnej. Każda część rozdziału Wyniki zakończona jest podsumowaniem i dyskusją, co ułatwia śledzenie przebiegu eksperymentów. Część eksperymentalna pracy kończy się zwięzłym podsumowaniem oraz wnioskami obejmującymi całość rozprawy. Uzyskane przez Autorkę wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Mają istotną wartość poznawczą i aplikacyjną, a w przyszłości mogą przyczynić się do opracowania modelu mięśnia sercowego *in vitro*, lepiej odzwierciedlającego warunki panujące *in vivo*, co pozwoli uzyskać wiarygodne dane m.in. w badaniach nad regeneracją mięśnia sercowego.

### **Zastosowane piśmiennictwo**

Bibliografia obejmuje 172 pozycje, które zostały dobrane w sposób trafny i świadczą o dojrzałości naukowej Autorki. Dobór literatury jest przekrojowy i dobrze osadzony w aktualnym stanie wiedzy – zdecydowana większość cytowanych publikacji pochodzi z lat po 2000, co wskazuje na korzystanie z najnowszych źródeł naukowych, przy jednoczesnym uwzględnieniu klasycznych prac z wcześniejszych dekad, które mają istotne znaczenie historyczne i merytoryczne dla poruszanej problematyki.

Mam jednak drobną uwagę redakcyjną dotyczącą sposobu cytowania w tekście. W mojej ocenie nie jest zasadne umieszczanie każdej z cytowanych prac w osobnym nawiasie – lepszym rozwiązaniem byłoby łączenie kilku pozycji bibliograficznych w jednym nawiasie, co uczyniłoby zapis bardziej przejrzystym i spójnym stylistycznie, a także ułatwiłoby lekturę.

### **Pytania i uwagi do pracy**

Nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem zawartym we Wstępie dotyczącym totipotencji komórek ES. Zarodkowe komórki macierzyste (ESC) nie występują naturalnie w zarodku, lecz są liniami uzyskanymi *in vitro* (po raz pierwszy przez Gail Martin oraz niezależnie Martina Evansa i Matthew Kaufmana) i należy je traktować jako komórki niewystępujące w organizmie. W blastocyście pluripotencjalne są wyłącznie komórki węzła zarodkowego, dopiero po izolacji i stabilizacji w hodowli można je określać mianem ESC. Morula natomiast nie zawiera już komórek totipotencjalnych – totipotencja utrzymuje się jedynie do stadium 2–8 blastomerów, a po kompaktacji dochodzi do wyodrębnienia komórek zewnętrznych o ograniczonej potencjalności oraz wewnętrznych, pluripotencjalnych.

Ponieważ Doktorantka rozpatruje iPSC jako potencjalny model badawczy i ocenia potencjał iPSC do regeneracji mięśnia sercowego, w pracy powinna znaleźć się również dyskusja dotycząca zagrożeń związanych ze stosowaniem komórek macierzystych w przeszczepach, w tym także komórek iPSC.

### ***Wybór i charakterystyka linii komórkowych***

W pracy nie zostało dostatecznie uzasadnione, dlaczego wybrano określone linie komórkowe do przeprowadzonych badań. Brakuje również szerszej charakterystyki tych linii, w szczególności w odniesieniu do ich właściwości biologicznych. Przykładowo, kwestia proliferacji komórek HCM wymaga doprecyzowania – nie jest jasne, z jakiej populacji serca pochodzą komórki zdolne do przejścia aż sześciu pasaży. W opisie linii HL-1 odnotowano także błąd w numerze katalogowym (wskazano SCC05, podczas gdy prawidłowy numer to SCC065).

### ***Warunki hodowli i stosowane pożywki***

W części metodologicznej nie przedstawiono w pełni spójnego uzasadnienia dotyczącego wyboru warunków hodowli oraz stosowanych pożywek. Nie jest jasne, dlaczego w hodowli HCM w warunkach hipoksji wykorzystano pożywkę pozbawioną glukozy. W pracy zabrakło zestawienia stosowanych pożywek w formie tabelarycznej, co ułatwiłoby śledzenie różnic pomiędzy poszczególnymi warunkami eksperymentalnymi. Wątpliwości budzi również stosowanie odmiennych pożywek w hipoksji, normoksji oraz w hodowlach mieszanych, a także brak opisu pożywki E8 Flex, która została wymieniona w części ze spisem materiałów, lecz nie uwzględniono jej w szczegółowych metodach. Należy również doprecyzować hipotezę badawczą towarzyszącą hodowli mieszanej niezróżnicowanych iPSC oraz kardiomiocytów uzyskanych z iPSC. Niejasne pozostaje także, co Doktorantka rozumie pod pojęciem „regeneracja uszkodzonych kardiomiocytów” i jaka mogłaby być rola niezróżnicowanych iPSC w takim procesie naprawczym.

### ***Metodyka badań***

Proszę o rozstrzygnięcie kwestii porównywalności wyników testu Alamar Blue pomiędzy hodowlami 2D i 3D. Brak jest również precyzyjnej informacji, jaki model mikroskopu konfokalnego został wykorzystany w badaniach. Dodatkowo, obrazy uzyskane przy użyciu mikroskopii konfokalnej pozwalają na analizę jakościową, a nie ilościową. Na podstawie poziomu fluorescencji na zdjęciu z mikroskopu konfokalnego nie można wnioskować o ilości białka. Warto również zaznaczyć, że Oct3/4 nie jest idealnym markerem pluripotencji iPSC, a bardziej wiarygodnym markerem jest Nanog i to właśnie Nanog powinien podlegać analizie.

### ***Hipoksja i proliferacja kardiomiocytów***

Proszę o odniesienie się do faktu, że hipoksja może indukować proliferację kardiomiocytów, które w warunkach fizjologicznych charakteryzują się bardzo ograniczoną zdolnością

do podziałów. W literaturze istnieją doniesienia sugerujące, że hipoksja może sprzyjać odtwarzaniu populacji kardiomiocytów. Praca powinna odnieść się do tej kontrowersji i wyjaśnić, jakie konsekwencje dla uzyskanych wyników ma ten aspekt biologii kardiomiocytów.

### ***Hodowle przestrzenne (3D) i gęstość komórek***

Opis hodowli przestrzennych wymaga doprecyzowania. W pracy nie przedstawiono informacji na temat grubości uzyskanych mat nanowłóknistych, co ma istotne znaczenie przy formułowaniu wniosków dotyczących hodowli 3D. Wątpliwości budzi również przyjęta gęstość komórek – wydaje się, że mogła być ona zbyt niska, aby zapewnić odpowiedni kontakt między komórkami, który jest kluczowy dla prawidłowego różnicowania i funkcjonowania kardiomiocytów. Brak kontaktu między komórkami może prowadzić do indukcji apoptozy. Chociaż autorka przeprowadziła testy z wykorzystaniem różnych liczebności komórek, w mojej opinii zabrakło próby z bardzo dużą liczbą komórek, która powinna być uzależniona od grubości zastosowanej maty nanowłóknistej.

### ***Ryciny i ilustracje***

- w rozprawie znajdują się ryciny pochodzące z publikacji, której Doktorantka jest współautorką – dlaczego nie zostało to zaznaczone w podpisach rycin?
- rycina 22 – brak oznaczeń literowych (A, B, C) przy częściach ryciny, mimo że są wymienione w podpisie.
- różnice w rozmiarze komórek na obrazach z mikroskopii skaningowej (5–10  $\mu\text{m}$ ) i konfokalnej (do 100  $\mu\text{m}$ ) sugerują pomyłkę w oznaczeniu skali.

### ***Uwagi do redakcji pracy***

- częste anglicyzmy, np. „przeciwciało anty-królicze”, zamiast poprawnej formy polskiej.
- drobne błędy literowe i składniowe (np. str. 17, w. 5 od dołu).
- literówka: str. 64 – powinno być „ocena statystyczna”, a nie „statyczna”.
- określenie „ROCK inhibitor” to kalka językowa.
- nieprecyzyjne określenia, np. str. 83 „dojrzała fizjologia”

## **Wiedza kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została poświęcona istotnym dla biologii medycznej i ciekawym badaniom nad zastosowaniem różnych metod hodowli kardiomiocytów do modelowania mięśnia sercowego *in vitro* i świadczy o szerokiej i dobrze ugruntowanej wiedzy teoretycznej kandydatki w obszarze biologii komórki oraz inżynierii tkankowej. Autorka wykazuje znajomość zarówno podstawowych procesów biologicznych leżących u podstaw różnicowania i

funkcjonowania kardiomiocytów, jak i nowoczesnych podejść eksperymentalnych stosowanych we współczesnych badaniach biomedycznych. Badania, które przedstawiła Doktorantka w swojej rozprawie obejmują bogaty zakres analiz umiejętnie łącząc wiedzę z zakresu biologii molekularnej, biofizyki i technologii hodowli komórkowych, co wskazuje na interdyscyplinarne przygotowanie Pani Iwoń - Szczawińskiej.

Pod względem umiejętności prowadzenia samodzielnych badań naukowych, rozprawa dostarcza licznych dowodów na kompetencje autorki w planowaniu i realizacji eksperymentów. Kandydatka wykazała się umiejętnością krytycznej analizy i porównania różnych metod hodowli kardiomiocytów, w tym modeli dwuwymiarowych i trójwymiarowych, oraz oceny ich przydatności do odtwarzania złożonej architektury i funkcjonalności mięśnia sercowego *in vitro*. Zastosowane metody badawcze zostały dobrane adekwatnie do postawionej hipotezy, a uzyskane wyniki są interpretowane z dojrzałością naukową.

Rozprawa nie tylko wnosi istotny wkład poznawczy w zakresie modelowania mięśnia sercowego *in vitro*, lecz także potwierdza wysoką zdolność kandydatki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. mgr inż. Zuzanna Iwoń-Szczawińska w pełni spełnia wymogi stawiane przed doktorantem – zarówno w zakresie ogólnej wiedzy teoretycznej w dyscyplinie, jak i w zakresie praktycznych umiejętności badawczych.

### **Ocena końcowa**

**Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Zuzanny Iwoń - Szczawińskiej do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.**

.....  
**data sporządzenia recenzji**

.....  
**podpis recenzenta**