

Warszawa, 25.09.2025

Dr hab. Anna Burdzińska, prof. SGGW
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
Szkół Główniej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej

Zatytułowanej „Właściwości regeneracyjne komórek macierzystych w różnych modelach niedotlenienia kardiomiocytów”

Oceniana rozprawa doktorska została wykonana na Politechnice Warszawskiej w obrębie dyscypliny: Biotechnologia pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Elżbiety Jastrzębskiej oraz promotorki pomocniczej Pani dr Eweliny Krogulec.

Podstawą opracowania recenzji jest pismo prof. dr. hab. inż. Michała Chudy, przewodniczącego Rady Naukowej Biotechnologia Politechniki Warszawskiej z dnia 8 lipca 2025 roku zawiadamiające o powołaniu mnie przez Radę Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej na recenzentkę rozprawy doktorskiej pani mgr. inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej pt. „Właściwości regeneracyjne komórek macierzystych w różnych modelach niedotlenienia kardiomiocytów”. Niniejsza recenzja została wykonana w oparciu o obowiązujące przepisy wynikające z Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.) oraz dostarczony egzemplarz rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma formę monografii naukowej. Wyniki zawarte w pracy zostały w zdecydowanej większości opublikowane w trzech oryginalnych, wieloautorskich artykułach naukowych, w których Doktorantka występuje jako pierwsza autorka. Zgodnie z przyjętym zwyczajem Autorka wskazuje w rozprawie, które elementy pracy zostały wcześniej opublikowane. W niniejszej recenzji oceniam, zgodnie z zapisami Ustawy, wyłącznie przedstawioną monografię.

Ocena wyboru obszaru badań

Doktorantka w swojej pracy podejmuje próby opracowania konstruktów mogących służyć jako modele efektywnego badania fizjologii i patofizjologii mięśnia sercowego. Prowadzi zatem badania w obszarze, który pilnie wymaga nowych rozwiązań. Niedokrwienna choroba mięśnia sercowego stanowi obecnie, w skali globalnej, najczęstszą przyczynę zgonów ludzi. Pomimo intensywnych badań prowadzonych przez liczne zespoły na świecie, wciąż nie udało się opracować modeli miokardium o wysokiej wartości translacyjnej, które byłyby jednocześnie relatywnie niedrogie, co mogłoby sprzyjać ich rozpowszechnieniu i uznaniu za standard. Podstawowe modele *in vitro*, oparte na hodowli linii komórkowych na polistyrenowych powierzchniach (tzw. 2D), są wciąż szeroko stosowane. Obecnie jednak wiadomo, że przeniesienie komórek na trójwymiarowe rusztowania, lepiej odzwierciedlające naturalne mikrośrodowisko niż płaskie podłoża, istotnie wpływa zarówno na podstawowe funkcje życiowe komórek, jak i na ich reakcje na czynniki doświadczone. W tym kontekście podjęcie przez Doktorantkę prac nad opracowaniem trójwymiarowych struktur, będących kombinacją syntetycznych rusztowań i komórek, należy uznać za w pełni zasadne.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska liczy 160 stron formatu zbliżonego do A5. Struktura pracy jest typowa dla dysertacji w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych. Obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis treści, część teoretyczną przedstawiającą aktualny stan wiedzy w obszarze podjętych badań, a następnie część eksperymentalną obejmującą przedstawienie celu pracy, stosowanych materiałów i metod, a także prezentację wyników, połączonych z dyskusją, czyli odniesieniem własnych obserwacji do danych wcześniej publikowanych. Pracę wieńczy podsumowanie zawierające wnioski z przeprowadzonych badań. Całość uzupełniają: spis bibliografii (172 pozycje), spis rycin, spis tabel oraz zestawienie dotychczasowego dorobku naukowego Autorki.

Struktura pracy jest przejrzysta i logiczna, pozwalająca czytelnikowi na płynne śledzenie toku wywodu. Układ odpowiada standardom publikacji naukowych i obejmuje wszystkie niezbędne elementy. Tekst został przygotowany w poprawnym języku naukowym. Styl Autorki jest jednocześnie dość lekki, co ułatwia odbiór również bardziej złożonych treści. Odsyłacze bibliograficzne zostały zastosowane konsekwentnie, a spis literatury jest spójny i zgodny z zasadami cytowania. Autorka właściwie wprowadza skróty do tekstu i konsekwentnie je stosuje, co korzystnie wpływa na czytelność rozprawy. Ryciny i ich opisy w części eksperymentalnej są od strony formalnej przygotowane starannie – fotografie zawsze są opatrzone skalą, osie i jednostki na wykresach są prawidłowo opisane, a odchylenia standardowe konsekwentnie zaznaczone. Problematiczny jest brak oznaczania przez Autorkę

nieistotnych różnic statystycznych. W konsekwencji na wykresach, gdzie oznaczeń tych brakuje, nie wiadomo, czy analizy zostały przeprowadzone (i pomiędzy którymi grupami), lecz nie wykazały istotnych różnic, czy też w ogóle ich nie wykonano. Różnica między tymi sytuacjami jest zasadnicza i powinna być jednoznacznie zaznaczona w rycinach lub ich opisach.

Dodatkowe zastrzeżenie natury formalnej dotyczy materiału graficznego w części teoretycznej. Autorka zamieszcza tam osiem rycin zapożyczonych z różnych publikacji. W większości przypadków zostały one poddane technicznym modyfikacjom, polegającym na przetłumaczeniu na język polski zarówno niektórych oznaczeń na rycinach, jak i opisów pod rycinami. W podpisach umieszczono odniesienia bibliograficzne do źródeł (numer pozycji bibliograficznej). Takie postępowanie mieści się zasadniczo w ramach dozwolonego użytku naukowego i prawa cytatu, a więc jest dopuszczalne w rozprawie doktorskiej. Niemniej jednak brak jednoznacznej informacji, że dana rycina stanowi bezpośrednie zapożyczenie bądź adaptację, może wprowadzać czytelnika w konsternację, zwłaszcza w sytuacji, gdy elementy graficzne są jedynie częściowo zmodyfikowane. W mojej ocenie należałoby konsekwentnie stosować oznaczenia typu „wg [autor, rok]” lub „zmodyfikowano wg [autor, rok]”, co pozwoliłoby uniknąć wątpliwości interpretacyjnych i nadałoby rycinom większą przejrzystość pod względem formalnym i edytorskim.

Ocena merytoryczna pracy

W części teoretycznej Autorka dysertacji wprowadza czytelnika w obszar swoich badań. Przedstawia pokrótce budowę histologiczną serca wskazując na bardzo ograniczoną zdolność mięśnia sercowego do regeneracji. Ta cecha decyduje o występowaniu trwałej niewydolności serca po przebyciu ostrego epizodu niedotlenienia tego narządu (czyli po zawale serca). Ze względu na ogromną zapadalność ludzi na tę chorobę, a także często śmiertelny jej przebieg, poszukiwanie metod umożliwiających coraz lepsze rozumienie patomechanizmów, a także testowanie nowych strategii terapeutycznych jest na wagę złota. Doktorantka przybliży znaczenie macierzy zewnątrzkomórkowej w tkankach i narządach uzasadniając swoją decyzję o tworzeniu struktur trójwymiarowych. Przedstawia techniki wytwarzania mat nanowłóknistych i ich podstawową charakterystykę. Dokonuje przeglądu istniejącej literatury odnoszącej się do wykorzystania mat nanowłóknistych do badań nad kardiogenezą. Odnosi się także do struktur trójwymiarowych wytwarzanych na bazie naturalnego kolagenu porównując je do syntetycznych polimerów takich jak stosowane w przedstawionej pracy: polikaprolaktonu (PCL) i poliuretanu (PU). Przedstawia zalety syntetycznych materiałów, ale także wskazuje ich wady, takie jak hydrofobowość. Przedstawia także cechy poszczególnych typów komórek macierzystych, w tym indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSC), które wykorzystuje w swojej pracy. Opisuje również standardowe mechanizmy uruchamiane w komórkach poddanych niedotlenieniu oparte na stabilizacji białka HIF1 α ,

które staje się elementem czynnika transkrypcyjnego istotnie zmieniającego metabolizm komórki znajdującej się w hipoksji. Wszystkie te elementy dowodzą sprawnego poruszania się Autorki zarówno w obszarach inżynierii materiałowej, jak i w aspektach ściśle biologicznych związanych z funkcjonowaniem komórek i tkanek. Mam jednak kilka drobnych uwag krytycznych. Zastrzeżenia budzi na przykład przedstawiony w części teoretycznej schemat dotyczący hierarchii komórek macierzystych (rycina 4). Po pierwsze, układ graficzny sugeruje, że pluripotentne komórki macierzyste różnicują się jedynie w kierunku MSC i HSC, pomijając inne znane linie rozwojowe. Po drugie, schemat wskazuje, że MSC dają początek komórkom progenitorowym serca i mioblastom, bez zaznaczenia alternatywnych ścieżek oraz bez informacji, iż przedstawienie ma charakter uproszczony. Warto przy tym dodać, że aktualny stan wiedzy nie potwierdza bezpośredniego potencjału miogenego MSC, a takie przedstawienie może wprowadzać czytelnika w błąd.

W niektórych fragmentach Autorce nie udaje się ustrzec od nieścisłości, uproszczeń, czy też niedopowiedzeń. Takim przykładem jest opis potencjału czynnościowego w kardiomiocytach. Autorka przypisuje zbyt dużą rolę kanałom wapniowym w fazie depolaryzacji, podczas gdy ten proces zależy głównie od prądu sodowego. Padają w tym fragmencie sformułowania takie jak "wypompowywanie jonów K^+ z komórki" czy "transportowanie jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki, podczas gdy wspomniane przemieszczanie się jonów odbywa się zgodnie z gradientem elektrochemicznym, a nie w wyniku aktywnego transportu. Opisując potencjał czynnościowy iPSC-CM (za Goversen i wsp. 2018) brakuje komentarza, że przedstawione zmiany na błonie iPSC-CM prawie bliźniaczo odzwierciedlają zmiany potencjałów obserwowane w komórkach rozrusznikowych węzła zatokowo-przedsionkowego. To bardzo ciekawa zbieżność, szczególnie w kontekście prób tworzenia modeli mięśnia sercowego.

W niektórych przypadkach niezrozumiałe są decyzje dotyczące wyboru rycin zapożyczonych do teoretycznego wprowadzenia. Przykładowo, Autorka wykorzystuje w swojej pracy rycinę z publikacji Joshi i wsp. (2018), przedstawiającą obrazy komórek analizowanych metodą immunofluorescencyjną. Jakość zdjęć na tej rycinie budzi poważne wątpliwości – sygnał fluorescencyjny rozprasza się w postaci rozmytej łuny, bez wyraźnego związku z komórkami – są to obrazy, które raczej nie powinny służyć za reprezentatywne ilustracje. Trudno więc ocenić, dlaczego Autorka zdecydowała się na takie zapożyczenie. Umieszczenie omawianej ryciny w pracy doktorskiej wprowadza czytelnika w niepotrzebną konsternację. Mimo wspomnianych drobnych uchybień, uważam, że część teoretyczna jest sprawnie napisana i dobrze przygotowuje czytelnika do spotkania z częścią eksperymentalną.

Na początku części doświadczalnej Autorka formułuje hipotezę badawczą wg której zastosowanie mat nanowłóknistych umożliwi opracowanie modeli odwzorowujących tkankę serca dokładniej niż hodowle dwuwymiarowe, a także, że modele te mogą służyć do badania procesów regeneracyjnych w mięśniu sercowym.

Doktorantka w pierwszej części tego fragmentu dysertacji opisuje wytwarzanie i ocenę wybranych cech mat nanowłóknistych, natomiast w głównej części pracy skupia się na ocenie

zachowania się komórek na matach nanowłóknistych w porównaniu do komórek hodowanych na standardowych płaskich powierzchniach. Doktorantka poddaje badaniu kilka typów komórek: szczurze kardiomioblasty pochodzenia embrionalnego, unieśmiertelnione kardiomiocyty z przedsionka serca dorosłej myszy, pierwotne kardiomiocyty z komory serca dorosłego człowieka, a także komórki uzyskane w wyniku kardiomiogenego różnicowania ludzkich indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSC-CM). Ten wybór zapewniał doktorantce uzyskanie szerokiego przekroju danych. Czasem jednak powodował trudności interpretacyjne. Dlatego pozytywnie oceniam decyzję Doktorantki o stopniowym ograniczaniu typów komórek poddawanych analizom wraz z postępowaniem prac.

Metody, jakie Doktorantka zastosowała do analizy badanych komórek obejmowały przede wszystkim: ocenę orientacji (ułożenie) komórek w hodowli, ocenę żywotności komórek wraz z charakterystyką typu śmierci (apoptoza/nekroza), ocenę ekspresji genów metodą RT-PCR, a także analizę ekspresji białek metodą immunofluorescencyjną (IF). Dobór tych metod uważam za uzasadniony – pozwala on na dokonanie przekrojowej oceny hodowli komórkowej. Doktorantka w dużym stopniu opiera swoje analizy na metodach opartych o mikroskopowe obrazowanie fluorescencyjne znakowanych struktur komórkowych. Metoda IF jest atrakcyjna, ponieważ umożliwia analizę komórek in situ, bez konieczności ich odrywania od podłoża, pozwala też na ocenę lokalizacji badanego białka w określonych przedziałach komórkowych (jądro vs cytoplazma, co ma istotne znaczenie przy badaniu aktywności czynników transkrypcyjnych), a także na analizę organizacji cytoszkieletu, szczególnie przydatną w przypadku komórek tworzących sarkomery. I choć pozytywnie oceniam wybór tej metody, to opis metody obrazowania pozostawia niedosyt. Obrazowanie komórek na trójwymiarowych strukturach włóknistych niesie sporo wyzwań praktycznych. Maty nanowłókniste z pewnością były znacznie grubsze od monowarstwy komórkowej (niestety nie znajduję informacji o grubości zastosowanych mat), a dodatkowo są nieprzezroczyste. Rodzi to istotne trudności techniczne w analizie mikroskopowej, natomiast Autorka nie wspomina o nich wcale. Brakuje informacji czy uwzględniała kontrolę z samych mat w celu oceny ich autofluorescencji. Za poważne niedopatrzenie należy uznać także brak informacji o zakresie prowadzonej analizy mikroskopowej, tj. liczbie ocenianych komórek lub pól widzenia oraz czy i w jaki sposób zapewniono losowy dobór pól do analizy. Niewiadomą pozostaje także, czy przy użyciu mikroskopu konfokalnego rejestrowano sekwencje przekrojów w osi Z, czy ograniczano się do pojedynczego przekroju, a jeśli tak, to według jakiego kryterium wybierano jego wysokość.

Metoda przygotowania komórek na matach nanowłóknistych do analizy za pomocą odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego również rodzi pytania. Można się domyślać, że podczas wysiewania zawiesiny komórek na matę, znaczna część komórek mogła osiadać na dnie naczynia, a nie przyklejać się do włókien. Autorka niestety nie porusza tej kwestii. Nie opisuje, jakiego rodzaju płytki stosowano do hodowli z matami, czy komórki miały możliwość osiedlania się na dnie ani czy ten fakt był weryfikowany. Brak jest także informacji czy maty

przed analizą mikroskopową były przenoszone do nowych dołków, co pozwoliłoby mieć pewność, że analizie poddawano wyłącznie komórki rosnące na matach, a nie kombinację komórek z mat i komórek z podłoża o nieznanym udziale procentowym. Wszystkie te szczegóły uważam za istotne, ponieważ warunkują wiarygodność i interpretację uzyskanych wyników.

W części metodycznej zastrzeżenia budzi też opis analiz statystycznych. W opisie metod podano jedynie, że stosowano test t-Studenta lub ANOVA przy poziomie istotności 0,05, na próbach o liczności $n \geq 3$, bez informacji o sprawdzaniu założeń testów (przede wszystkim dotyczących normalności rozkładu danych w grupach) ani o stosowaniu testów post-hoc w analizach wielogrupowych. Więcej wątpliwości dotyczących oceny istotności obserwowanych zjawisk przedstawię w sekcji omawiającej wyniki rozprawy.

Podsumowując, dobrze oceniam ogólny dobór metod zastosowanych przez Doktorantkę do analizy zachowania się komórek na matach nanowłóknistych. Niemniej, opisy technik uważam za zbyt lakoniczne, co rodzi liczne pytania i utrudnia pełną ocenę wiarygodności przedstawionych wyników.

Sekcja opisująca wyniki jest w mojej ocenie mocnym punktem przedstawionej rozprawy doktorskiej. W części tej ukazuje się cały proces badawczy, przez który przeszła Doktorantka w trakcie tego etapu edukacji akademickiej. Mnogość przeprowadzonych analiz przy jednoczesnym składaniu się ich w jedną spójną całość są godne uznania.

W pierwszej części Autorka ocenia wybrane cechy mat nanowłóknistych z PCL i PU, wykonanych we współpracy z Wydziałem Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW. Doktorantka słusznie podkreśla znaczenie orientacji włókien, wskazując, że równoległy układ sprzyja tworzeniu bardziej fizjologicznej matrycy dla kardiomiocytów niż ich przypadkowe rozmieszczenie. Wątpliwości natomiast budzą oznaczenia istotnych różnic pomiędzy grupami na rycinie 12. Mimo że Autorka wskazuje, iż zastosowała jednokierunkową ANOVA, umieszcza symbol * nad niektórymi słupkami, nie precyzując jednak, pomiędzy którymi grupami występują istotne różnice. Uważam także, że bardzo wartościowe byłoby odniesienie uzyskanych wyników (np. dotyczących porowatości, sztywności) do właściwości naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej mięśnia sercowego. Próby wytworzenia modelu in vitro powinny koncentrować się na ocenie stopnia podobieństwa oraz opisie różnic pomiędzy wytwarzanym modelem a oryginalną strukturą.

W kolejnej części Autorka dodaje do swojego układu badawczego komórki. Bada trzy typy kardiomiocytów o różnym pochodzeniu gatunkowym (mysz, szczur, człowiek), rozwojowym (zarodkowe, dorosłe) i o odmiennej charakterystyce (linie komórkowe i komórki pierwotne). Komórki wysiewano na cztery typy mat nanowłóknistych oraz kontrolne powierzchnie polistyrenowe. Dawało to łącznie 12 grup doświadczalnych (4 typy mat $\times$ 3 typy komórek) i 3 grupy kontrolne (3 typy komórek na polistyrenie). Badane parametry obejmowały żywotność komórek, orientację, morfologię (ocena długości i szerokości) oraz ekspresję genów i białek

związanych z dojrzewaniem kardiomiocytów. Analizy prowadzono na hodowlach krótkoterminowych (24 h) i/lub długoterminowych (10 dni). Efektem tych badań była możliwość szerokiego spojrzenia na zachowanie się kardiomiocytów na rusztowaniach z PCL i PU, a uzyskane dane stanowią z pewnością wartościowy punkt odniesienia dla dalszych badań w tym obszarze.

Jako recenzentka, wskażę również kilka słabszych stron omawianego fragmentu dysertacji. W mojej ocenie Doktorantka w niektórych przypadkach dopuszcza się uproszczonych konkluzji. Przykładowo, na str. 70 pisze: „w ramach powyższego etapu badań POTWIERDZONO, że zastosowanie mat nanowłóknistych powoduje wzrost liczby komórek serca ułożonych równolegle względem siebie w porównaniu do kontroli na płytkach polistyrenowych”. Bliższe przyjrzenie się zaprezentowanym wynikom wskazuje natomiast, że spośród 12 grup doświadczalnych jedynie w pięciu zaobserwowano istotny wzrost odsetka komórek ułożonych w przedziale od $(-)$ 15° do 15°. Podobne uproszczenia zdarzają się w kilku miejscach w dysertacji. Jest zrozumiałe, że ze względu na liczne grupy doświadczalne uzyskane wyniki są rozproszone i trudne w interpretacji, niemniej uważam, że ich omówienie mogłoby być bardziej wyważone.

Innym zastrzeżeniem do tej części pracy jest brak przedstawienia analizy ilościowej sygnału na fotografiach obrazujących komórki poddane barwieniu immunofluorescencyjnemu (Ryc. 15 i 16). Brak ten w praktyce uniemożliwia ocenę zmian ekspresji badanych białek. Ponadto nie jest jasne czy zastosowane przeciwciała były specyficzne dla komórek wszystkich badanych gatunków. Część metodologiczna nie przedstawia szczegółowych danych o zastosowanych przeciwciałach, a część z wynikami nie prezentuje zastosowania odpowiednich kontroli pozytywnych. W konsekwencji, gdy na fotografiach komórek szczurzej linii H9c2 praktycznie nie widać fluorescencji przy oznaczaniu białka MYH7, nie wiadomo, czy jest to efektem braku białka w tych komórkach, czy też braku zgodności przeciwciała z antygenem.

Kolejna uwaga dotyczy zakresu prowadzonych porównań statystycznych. Mimo przeprowadzania równoległych eksperymentów z użyciem różnych mat, Autorka nie decyduje się na wykonanie analiz statystycznych umożliwiających porównanie mat między sobą, a jedynie zestawia każdą z mat z kontrolą 2D. Rozumiem, że głównym celem Doktorantki było porównanie warunków 3D z 2D, niemniej szkoda, że np. wyniki żywotności komórek (ryc. 13.) zostały porównane wyłącznie do kontroli, a nie poddane analizie jednoczynnikowej ANOVA z odpowiednim testem post-hoc, co umożliwiłoby dodatkowo ocenę różnic pomiędzy komórkami wysianymi na różne typy mat.

W kolejnym etapie Doktorantka przedstawia wyniki pracy z indukowanymi pluripotentnymi komórkami macierzystymi (populacja uzyskana z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie). Poddaje je działaniu warunków indukujących różnicowanie w kierunku kardiomiocytów, a powstałe iPSC-CM poddaje analizie identyfikacyjnej, a następnie wysiewa na 2 rodzaje mat i bada ich zachowanie w schemacie zbliżonym do zastosowanego w poprzedniej części pracy. Uważam, że zastosowanie iPSC-CM to bardzo dobra decyzja.

Komórki te uznaje się obecnie za wyjątkowo obiecujący model do badań nad sercem. Technologia uzyskiwania iPSC umożliwia w teorii wyhodowanie kardiomiocytów od konkretnego pacjenta, co czyni je wartościowym narzędziem zarówno w badaniach podstawowych, jak i w testach farmakologicznych czy w tworzeniu układów badawczych odtwarzających przebieg choroby. Autorka stosuje jeden z opisanych w literaturze protokołów różnicowania iPSC. Prezentuje obecność markerów związanych z kardiomiogenezą (Troponina T, α -aktynina) w uzyskanych komórkach metodą IF. Szkoda, że w tym badaniu nie zastosowała jako kontroli niezróżnicowanych iPSC, co zwiększyłoby moc tej obserwacji. Doktorantka dodatkowo próbuje ocenić obecność Troponiny T w wytworzonych komórkach metodą cytometrii przepływowej, ale akurat tę próbę uważam za mało udaną. W przedstawionych wynikach brakuje informacji, na jakiej podstawie ustawiono tzw. bramki (czyli linie odcięcia) w analizie. To kluczowa informacja, szczególnie, że bramki na histogramie ustawiono w miejscach, które nie korespondują z obszarami oddzielającymi komórki o różnych intensywnościach fluorescencji. Autorka nie prezentuje rozkładu komórek niebarwionych lub traktowanych kontrolą izotypową, nie wskazuje też, co oznacza "bramka" P1, a co bramka P2. Doktorantka raportuje pojawienie się spontanicznych skurczy w hodowli iPSC-CM, co niewątpliwie jest cechą charakterystyczną dla struktur mięśniowych. Szkoda, że nie doprecyzowuje, czy były to skurcze pojawiające się sporadycznie, czy też występujące rytmicznie. W części dotyczącej analizy ekspresji genów i białek po 10-dniowej hodowli iPSC-CM na matach PCL i PU względem kontroli zaprezentowane wyniki są niejednoznaczne, natomiast ich interpretacja dość odważna. Przykładowo, Autorka bada ekspresję sześciu genów związanych z dojrzewaniem kardiomiocytów. W przypadku porównania komórek na matach PCL vs 2D, obserwuje istotny wzrost ekspresji dwóch genów, spadek ekspresji jednego genu, a ekspresja trzech pozostałych genów pozostaje bez zmian. Jednocześnie analiza poziomu białka wskazuje na brak zmian w poziomie α -aktyniny i spadek poziomu troponiny T w komórkach hodowanych na matach PCL względem kontroli 2D. Nie jest zrozumiałe, dlaczego Autorka stwierdza, że potwierdzono, że komórki hodowane na matach charakteryzują się dojrzalszym fenotypem. W mojej opinii taka konkluzja jest nieuzasadniona. Niemniej, wytwarzanie i analiza konstruktów opartych na syntetycznych matach nanowłóknistych wzbogacanych czynnikami adhezyjnymi w połączeniu z iPSC-CM jest działaniem o wysokim stopniu zaawansowania i nawet, jeżeli dotychczasowe badania nie pozwalają na nie budzące wątpliwości wnioskowanie, to z pewnością efekty tej pracy stanowią solidną podstawę i warsztat do prowadzenia dalszych badań.

W kolejnym etapie swoich badań Doktorantka wprowadza do swojego modelu doświadczalnego warunki hipoksji. Bada wpływ niedotlenienia (a także sekwencji hipoksja-reoksygenacja) na zachowanie się kardiomiocytów i konsekwentnie porównuje cechy komórek wysiewanych na maty nanowłókniste względem kontroli 2D. Prawdłowo dołącza również kontrolę 2D w hipoksji. Ogranicza badany materiał do dwóch typów komórek ludzkich testując jeden typ maty PCL i jeden PU. Ten zabieg jest bardzo korzystny, ponieważ ułatwia

nieco interpretację wyników. Autorka w tej części wprowadza także porównania pomiędzy dwoma typami mat, co również oceniam bardzo pozytywnie, bo umożliwia to bogatsze wnioskowanie. Doktorantka w tym etapie badań wykorzystuje immunofluorescencję do oceny struktury cytoszkieletu (F-aktyny), a także odpowiedź komórek na hipoksję badając obecność HIF1 α . Obserwowane przez Autorkę zmiany ekspresji HIF1 α w komórkach HCM (kardiomiocyty z komory dorosłego człowieka) wskazują na oczekiwaną stabilizację HIF1 α w hipoksji względem normoksji, a także wskazują, że umieszczenie komórek na matach wywołuje istotnie silniejszą odpowiedź na hipoksję niż w przypadku hodowli 2D.

Dodatkowo, Autorka bada żywotność i typ śmierci komórek. Wskazuje, że w przypadku hodowli na matach istotnie więcej komórek ulega apoptozie w warunkach hipoksji niż w przypadku komórek hodowane w 2D również w hipoksji. Wyniki te wskazują, kardiomiocyty w wytworzonym przez doktorantkę modelu są istotnie bardziej wrażliwe na hipoksję i hipoksję z reoksygenacją niż w standardowej hodowli 2D. Można domniemywać, że ta reakcja jest bliższa zachodzącej *in vivo*, ale taka teza wymagałaby dalszych badań. Wyniki uzyskane w analogicznych doświadczeniach z użyciem komórek iPSC-CM prezentują nieco odmienny obraz. Przede wszystkim, Doktorantka nie odnotowała wzrostu poziomu HIF1 α w iPSC-CM w warunkach hipoksji. Szkoda, że Autorka nie pokusiła się o analizę translokacji HIF1 α do jądra, zwłaszcza że dysponowała zarówno barwieniem HIF1 α , jak i jądrowym barwieniem fluorescencyjnym. Ocena lokalizacji jądrowej byłaby szczególnie wartościowa, ponieważ translokacja HIF1 α do jądra jest kluczowym wskaźnikiem aktywności tego czynnika transkrypcyjnego i uruchomienia odpowiedzi adaptacyjnej na hipoksję. Szkoda również, że nie wykonano bezpośredniego porównania obecności HIF1 α w normoksji/hipoksji (2D) między komórkami HCM a iPSC-CM. Taka analiza również mogłaby dostarczyć ciekawych danych.

Wyniki badań dotyczących wpływu zastosowanego modelu (2D vs 3D) na reakcję ludzkich kardiomiocytów na hipoksję i sekwencję H/R stały się przedmiotem kolejnej (trzeciej) publikacji oryginalnej, w której Doktorantka jest pierwszą autorką. Jest godne uznania, że na tym nie poprzestaje. Monografia zawiera dodatkowy, niepublikowany jeszcze rozdział.

Pomysł Autorki, aby przeprowadzić współhodowlę kardiomiocytów z komórkami macierzystymi jest bardzo ciekawy. W założeniu, obecność komórek macierzystych miałaby wpłynąć ochronnie na kardiomiocyty poddawane hipoksji. Doktorantka badała żywotność współhodowli w hodowli 2D w normoksji, 2D w hipoksji i 3D (na matach poliuretanowych) w hipoksji. Przebieg eksperymentu jest opisany bardzo lakonicznie, co sprawia, że czytelnik nie jest pewien, czy hipoksji były poddawane jedynie iPSC-CM czy też współhodowle. Ostatecznie można się domyślić, że jedynie iPSC-CM, a badane czasy 24h i 10 dni to okresy współhodowli (prowadzone w normoksji), jednak przez sporą część rozdziału nie jest to oczywiste. Nie znalazłam natomiast informacji, ile trwała hipoksja i tylko domyślałam się, że może 6h jak w poprzednich doświadczeniach. Takie niedociągnięcia sprawiają, że odbiór pracy bywa

uciążliwy. Z pewnością pomógłby prosty schemat przedstawiający oś czasu eksperymentu z zaznaczeniem warunków kolejnych etapów. Inne zastrzeżenie do tej części pracy dotyczy analizy obrazu. Doktorantka wykonywała analizy oparte na obrazowaniu znakowanych fluorochromami komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych, a także białek OCT4 (jako markera komórek niezróżnicowanych) i troponiny sercowej 2 (jako markera zróżnicowania kardiomiogenego). Sam plan doświadczenia uważam za niezwykle trafny. Doświadczenie miało na celu ustalić, jak obecność komórek niezróżnicowanych wpływa na przeżycie kardiomiocytów (w tym przypadku raczej niedojrzałych, będących efektem różnicowania iPSC), a także, czy taka współhodowla może wpłynąć na różnicowanie iPSC w kierunku kardiomiocytów. Niestety, zabrakło po raz kolejny opisu metody analizy obrazu. Autorka prezentuje wyniki żywotności w procentach, jednak jest mocno niejasne, w jaki sposób Autorka określiła liczbę komórek w obrazach (jądra nie były znakowane, a hodowla była na tyle gęsta, że komórki zlewały się w jedną plamę co zwykle uniemożliwia określenie liczby obiektów). Ponadto, Autorka wspomina, że martwe komórki mogły być wyplukiwane z hodowli 2D próbując interpretować wyższy odsetek martwych komórek w warunkach 3D. W tej sytuacji korzystnie byłoby porównać liczbę żywych komórek między oboma punktami czasowymi. Takiej analizy w pracy nie przedstawiono, ale w podsumowaniu można znaleźć stwierdzenie, „że w hodowli długoterminowej nie stwierdzono spadku liczby żywych komórek”, co nie ma poparcia w zaprezentowanych wynikach. Z kolei w przypadku immunfluorescencji (białka OCT4, troponina sercowa), Autorka przedstawia wyniki jako intensywność fluorescencji, jednak nie wiadomo, czy jest to średnia intensywność w przeliczeniu na komórkę w badanym obszarze, czy też średnia intensywność w całym polu widzenia. W obu przypadkach czytelnik nie wie również, jak dużą próbę poddano analizie.

Mimo wskazanych niedociągnięć, ostatnia część dysertacji jest w mojej ocenie najdojrzalsza. Wyniki ekspresji genów wskazują, że współhodowla na matach nanowłóknistych istotnie obniża poziom markera pluripotencji Nanog w stosunku do takiej samej hodowli w 2D, co wskazywałoby na wchodzenie komórek na ścieżkę różnicowania. Jednocześnie jednak w hodowlach 3D poziom markerów różnicowania w kardiomiocyty jest istotnie niższy niż w 2D, co może wskazywać, że hodowla na badanych matach może indukować aktywację ścieżek różnicowania innych niż w kardiomiocyty. Wyniki te nie są zgodne z założeniami (a zapewne i oczekiwaniami) Autorki, jednak nie obawia się ona wyartykułować takiej właśnie interpretacji. Jednocześnie przedstawia pomysły na weryfikację i pogłębienie tego wątku. Te fragmenty pracy świadczą o rozwijającej się dojrzałości badawczej doktorantki i bardzo dobrze rokują na przyszłość.

Pytania:

W swojej recenzji formułuję sporo uwag krytycznych. Chciałabym zaznaczyć, że większość ma charakter komentarza i nie wymaga odnoszenia się do nich podczas publicznej obrony. Chciałabym jednak prosić Autorkę o odpowiedzi na następujące pytania:

- Proszę o informację dotyczącą przygotowania komórek na matach nanowłóknistych do analizy mikroskopowej
- Proszę o przybliżenie stosowanych zasad analizy obrazu tj. liczbie ocenianych komórek lub pól widzenia oraz czy i w jaki sposób zapewniono losowy dobór pól do analizy, a także czy analizowano sekwencje obrazów w osi Z
- Proszę o doprecyzowanie, czy przy porównaniach z użyciem ANOVA stosowano testy post-hoc
- Czy mogłaby Pani opisać bliżej charakter obserwowanych spontanicznych skurczy?
- Proszę wskazać, co sama uznaje za najlepiej udokumentowany wniosek ze swoich badań i dlaczego
- Czy zna publikacje ukazujące współhadowle HCM i iPSC-CM, a jeżeli nie to co sama sądzi o takim tandemie jako potencjalnym modelu badań?

Podsumowanie:

W swojej pracy Doktorantka podjęła temat niezwykle aktualny i ważny, związany z poszukiwaniem nowych modeli do badań nad fizjologią i patofizjologią mięśnia sercowego. Zastosowanie trójwymiarowych syntetycznych mat nanowłóknistych w połączeniu z różnymi typami kardiomiocytów, w tym iPSC-CM, jest kierunkiem jak najbardziej uzasadnionym i wpisuje się w światowe trendy.

Rozprawa jest od strony formalnej skonstruowana w klasycznym formacie, który nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka formułuje hipotezy badawcze, które w toku realizowanych zadań weryfikuje. Mocną stroną pracy jest prowadzenie badań w logicznie narastającej sekwencji – każdy etap stanowi podstawę dla kolejnego, a Doktorantka systematycznie wzbogaca model, aż do uzyskania imponującej konstrukcji: współhadowli dwóch typów komórek na trójwymiarowych matach nanowłóknistych z oceną odpowiedzi na hipoksję. Osiągnięcie takiego warsztatu podczas studiów doktoranckich jest godne uznania. Praca, choć bardzo interesująca, nie jest wolna od potknięć i niedociągnięć. Za takie można uznać np. zbyt lakoniczne opisy metod, zbyt uproszczoną analizę statystyczną (zaniechanie wielu porównań, które mogłyby wnieść dodatkową wartość pracy), nieoznaczanie braku istotnych różnic na rycinach, brak szczegółów dotyczących analizy obrazów, czy artykułowanie uproszczonych

stwierdzeń. W części teoretycznej pojawiają się drobne nieścisłości merytoryczne, jednak całość świadczy o dobrym rozeznaniu Autorki zarówno w inżynierii materiałowej, jak i biologii komórki.

Największym atutem pracy jest część eksperymentalna. Doktorantka zrealizowała szeroki program badawczy, testując różne typy mat i komórek, a także warunki normoksji i hipoksji, co zaowocowało interesującymi obserwacjami. Doceniam szczególnie wprowadzenie iPSC-CM, badania nad odpowiedzią komórek na niedotlenienie oraz podjęcie prób współhodowli z komórkami macierzystymi. Choć niektóre wnioski bywają zbyt daleko idące wobec zaprezentowanych wyników, Autorka potrafi też krytycznie spojrzeć na swoje obserwacje i wskazuje możliwe kierunki dalszych badań.

Podsumowując, przedstawiona praca doktorska stanowi wartościowy oryginalny dorobek naukowy i pokazuje rozwijającą się dojrzałość badawczą Doktorantki. Zatem, ostatecznie stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska pani mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej spełnia wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 20 Itpca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie pani mgr. inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie Biotechnologia.


