



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Agnieszka Jaźwa-Kusior, prof. UJ
Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
email: agnieszka.jazwa@uj.edu.pl

Kraków, 22.09.2025

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej pt. „Właściwości regeneracyjne komórek macierzystych w różnych modelach niedotlenienia kardiomiocytów”

Badania nad biomateriałami do hodowli kardiomiocytów, a w szczególności kardiomiocytów pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC-CM), koncentrują się dziś na dwóch równoległych celach: uzyskaniu jak najbardziej fizjologicznie dojrzałych komórek oraz stworzeniu systemów *in vitro*, które wiernie odzwierciedlają mikrośrodowisko tkanki serca (mechaniczne, elektryczne i biochemiczne). Kluczowe trendy obejmują projektowanie hydrożeli o właściwościach podobnych do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), użycie specjalnych materiałów do poprawy przewodzenia elektrycznego, oraz zastosowanie trójwymiarowych rusztowań, które umożliwiają anizotropowe ułożenie włókien i lepsze wyrównanie sarkomerów.

Pomimo istotnych postępów w tej dziedzinie nadal istnieje wiele wyzwań do przezwyciężenia. Po pierwsze, iPSC-CM nadal wykazują cechy „młodociane” — heterogeniczność fenotypowa, niedojrzałość metaboliczna (preferencja glikolizy zamiast utleniania kwasów tłuszczowych), oraz niedostateczne parametry przewodzenia i siły skurczu w porównaniu z kardiomiocytami dorosłego serca. Po drugie, odzwierciedlenie złożonej sieci naczyniowej i zapewnienie stałej dystrybucji tlenu i składników odżywczych w większych konstrukcjach pozostaje trudne. Aktualnie prowadzone badania próbują adresować te ograniczenia poprzez zastosowanie m.in. biodegradowalnych rusztowań wspierających neowaskularyzację, podłoży zmieniających swoje właściwości pod wpływem sił

mechanicznych (np. w kurczącym się mięśniu sercowym) oraz układy mikrofluidyczne „heart-on-chip” umożliwiające kontrolowane modelowanie hipoksji i reperfuzji.

Praca doktorska Pani mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej jest zgodna z obecnymi trendami badawczymi w tej dziedzinie, co podkreśla jej aktualność i znaczenie. Głównym celem przedstawionych w rozprawie badań było zastosowanie mat nanowłóknistych, jako podłoża do hodowli i badania kardiomiocytów. Przyjęto hipotezę, że zastosowanie mat nanowłóknistych o określonych właściwościach fizykochemicznych umożliwi opracowanie trójwymiarowego modelu komórkowego, który pozwoli na lepsze odwzorowanie mikrośrodowiska tkanki serca niż standardowe hodowle dwuwymiarowe.

Praca ma układ klasyczny, obejmujący przegląd literatury, część materiałowo-metodologiczną, prezentację wyników wraz z dyskusją oraz podsumowanie i wnioski. Całość jest dobrze skomponowana i logicznie uporządkowana. Wstęp w sposób klarowny i wyczerpujący wprowadza czytelnika w problematykę badawczą, podkreślając aktualny stan wiedzy oraz znaczenie podjętego tematu. Autorka omawia m.in. choroby układu sercowo-naczyniowego, ze szczególnym uwzględnieniem roli niedotlenienia w ich patogenezie, opisuje cechy komórek macierzystych ze szczególnym naciskiem na ludzkie iPSC oraz metody ich różnicowania do kardiomiocytów. Szczególną uwagę w tej części rozprawy Autorka poświęca matom nanowłóknistym, ich wytwarzaniu i wykorzystaniu w hodowlach komórkowych, a także innym technikom umożliwiającym tworzenie trójwymiarowych modeli tkanki sercowej. Całość zamyka podsumowanie, które stanowi logiczne uzasadnienie dla podjęcia własnych badań.

Metodyka została dobrana w sposób przemyślany oraz adekwatny do głównego celu pracy. W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępne linie komórkowe: H9c2 - szczurze kardiomioblasty, HL-1 - unieśmiertelnione mysie kardiomiocyty oraz HCM - pierwotne ludzkie kardiomiocyty. Do doświadczeń wykorzystano również linię ludzkich komórek iPSC (IIMCBI001-A). Charakterystykę tej linii iPSC przedstawiono wcześniej w pracy Liszewska *et al.*, *Stem Cell Research*, 2021, co stanowi podstawę do jej wykorzystania w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie. Komórki iPSC różnicowano do kardiomiocytów (iPSC-CM), które również były wykorzystywane w badaniach. Komórki hodowano na standardowych płytkach polistyrenowych (2D) oraz na matach nanowłóknistych z polikaprolaktonu (PCL) i poliuretanu (PU), o różnej średnicy nanowłókien (ok. 250 nm i ok. 500 nm), ułożonych równolegle względem siebie. Komórki hodowano w warunkach normoksji, hipoksji (1% O₂ przez 6h) i reoksygenacji (21% O₂ przez kolejne 24h). Analizowano ich morfologię, ekspresję wybranych genów i poziom ich produktów białkowych oraz typ śmierci

komórkowej (apoptoza/nekroza). Zastosowane maty nanowłókniste odwzorowują strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej, więc mogą być traktowane nie jako płaska powierzchnia do hodowli (2D), ale jako środowisko przestrzenne (3D) sprzyjające bardziej fizjologicznemu wzrostowi i zachowaniu komórek. Chciałabym w tym miejscu podkreślić, że zastosowane przez Doktorantkę techniki świadczą o wysokim stopniu interdyscyplinarności i znajomości nowoczesnych metod biologii komórki oraz inżynierii biomateriałów.

Część poświęcona wynikom została opracowana w sposób przejrzysty i logiczny, obejmując cztery podrozdziały: *Charakterystykę nanowłókien*, *Hodowlę komórek serca na matach nanowłóknistych*, *Badanie niedotlenienia komórek serca hodowanych na matach nanowłóknistych* oraz *Badanie wpływu mat nanowłóknistych na regenerację ludzkich kardiomiocytów po hipoksji z wykorzystaniem komórek macierzystych*. W tej części pracy pewne wątpliwości budzi interpretacja zmian ekspresji genów np. *TNNI3*, *ACTN2*, *SERCA2*, *SCN5A*. Niektóre różnice na Ryc. 17, Ryc. 29 i Ryc. 30, opisane przez Doktorantkę w pracy jako wzrost lub spadek ekspresji genu, nie zostały oznaczone jako istotne statystycznie, co w klasycznej interpretacji należałoby traktować jako brak wyraźnego efektu. Jednocześnie należy podkreślić, że wyniki te zostały już opublikowane, dlatego w kontekście oceny dysertacji nie stanowią zarzutu merytorycznego, a raczej wskazują obszar, w którym interpretacja mogłaby zostać nieco bardziej ostrożnie sformułowana. Każdy z podrozdziałów zamyka podsumowanie i dyskusja uzyskanych wyników, co nadaje rozprawie spójności i pozwala czytelnikowi na bieżąco śledzić tok rozważań. Znaczna część dysertacji opiera się na trzech artykułach opublikowanych przez Doktorantkę w ubiegłym roku (Iwoń Z et al., *Biomed Mater*, 2024; Iwoń Z et al., *Sci Rep*, 2024; Iwoń Z et al., *J Biol Eng*, 2024), co potwierdza zarówno wartość naukową uzyskanych wyników, jak i dojrzałość badawczą Doktorantki. Bibliografia została dobrana starannie i obejmuje aktualne źródła, a uwzględnienie własnego dorobku (wspomniane wyżej trzy publikacje jako pierwszy autor oraz jedna współautorska) świadczy o samodzielności i istotnym wkładzie Autorki w rozwój badań w tej dziedzinie.

W toku przeprowadzonych prac udało się Doktorantce m.in. wykazać, że 1) zastosowanie mat nanowłóknistych stymuluje dojrzewanie komórek serca w porównaniu do standardowej hodowli prowadzonej na płytkach polistyrenowych; 2) kardiomiocyty hodowane na matach nanowłóknistych uruchamiają inne mechanizmy adaptacyjne do warunków hipoksji i reoksygenacji, niż te same komórki hodowane na płytkach polistyrenowych; 3) współhodowla iPSC-CM z iPSC sprzyja dalszemu różnicowaniu i dojrzewaniu kardiomiocytów na płytkach polistyrenowych oraz stymuluje mechanizmy naprawcze w kardiomiocytach w odpowiedzi na hipoksję. Muszę jednak stwierdzić, że ta ostatnia część rozprawy dotycząca współhodowli jest

przedstawiona w sposób mniej klarowny niż wcześniejsze fragmenty. Przede wszystkim trudno się zorientować, jaki był cel poznawczy tych badań. iPSC w stanie nieodróżnionym nie występują fizjologicznie w sercu, a ich potencjalne podanie *in vivo* wiązałoby się z ryzykiem transformacji nowotworowej. Z tego względu celowość takiego modelu wymaga dodatkowego uzasadnienia.

W pracy dostrzegam również inne nieścisłości i uchybienia, które – z obowiązku recenzenta – pragnę wskazać:

- 1) Mam pewne zastrzeżenia do tytułu rozprawy, który sugeruje analizę właściwości regeneracyjnych komórek macierzystych w różnych modelach niedotlenienia kardiomiocytów. Tymczasem zasadnicza część pracy dotyczy badań prowadzonych w jednym modelu hipoksji, a doświadczenia z wykorzystaniem komórek macierzystych (iPSC) pojawiają się w ostatniej części pracy i nie są powiązane z regeneracją mięśnia sercowego/ nie odnoszą się do właściwości regeneracyjnych sensu stricto. Wydaje się więc, że tytuł nie w pełni odzwierciedla treść i wyniki przedstawione w dysertacji.
- 2) Str. 81: W części wynikowej interpretacja zmian ekspresji genu troponiny T w komórkach H9c2 i HCM może budzić wątpliwości. Wzrost ekspresji tego genu w H9c2 jest zgodny z dojrzewaniem komórek pochodzenia embrionalnego, natomiast spadek ekspresji w HCM (komórki dorosłe) wymaga doprecyzowania, ponieważ interpretacja w tym przypadku jest mniej jednoznaczna. Dlaczego przeciwne zmiany ekspresji genu troponiny T (wzrost w H9c2 i spadek w HCM) w obu typach komórek są interpretowane w podobny sposób, jako dojrzewanie komórek? Podobnie na str. 90: „Spadek poziomu cTnT2 może być związany z dojrzewaniem ludzkich kardiomiocytów na nanowłóknach (...)”. W trakcie obrony prosiłabym o usystematyzowanie informacji dotyczących ekspresji troponiny T w kontekście dojrzewania poszczególnych typów badanych kardiomiocytów.
- 3) Na str. 92 Autorka pisze: „Podsumowując, oba rodzaje materiałów nanowłóknistych stymulowały dojrzewanie komórek mięśnia sercowego, ale prawdopodobnie w różny sposób.” Sformułowanie to jest w mojej ocenie zbyt ogólne i wymaga doprecyzowania. Dlaczego w przypadku jednego materiału obserwowano głównie efekt morfologiczny, a w przypadku drugiego – zmiany ekspresji genów, skoro obydwa procesy powinny być ze sobą powiązane? Czy istotniejszy jest w tym wypadku bardziej dojrzały morfologicznie fenotyp komórek (wydłużony kształt), czy zmiany w ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w funkcję skurczową i elektrofizjologiczną? Kwestia

ta wydaje się o tyle istotna, że późniejsze badania w warunkach hipoksji i H/R oraz współhodowle prowadzono na matach nanowłóknistych z PU.

- 4) Str. 107: Jakie były przyczyny tego, że z hodowli prowadzonej na matach nanowłóknistych z PCL izolowano śladowe ilości materiału genetycznego?
- 5) Na str. 114 Autorka pisze: „Założono, że maty nanowłókniste stanowić mogą czynnik strukturalny wpływający stymulująco na regenerację ludzkich kardiomiocytów w hodowli z komórkami macierzystymi.” Podobne określenie znalazło się w ostatnim zdaniu rozprawy na str. 132. Jednak „regeneracja” w ścisłym sensie biologicznym najczęściej odnosi się do tkanki lub narządu (np. regeneracja mięśnia sercowego po zawale) i terminu tego nie używa się na poziomie komórkowym.
- 6) Str. 132: W ostatnim akapicie rozprawy Autorka dokonuje końcowego podsumowania wyników swoich badań oraz wskazuje na potencjalne przyszłe zastosowania opracowanych modeli. Moim zdaniem zabrakło tu wyraźnego wskazania, czy Doktorantka dostrzega możliwość wykorzystania przedstawionych biomateriałów do tworzenia współhodowli kardiomiocytów z innymi komórkami obecnymi w sercu, takimi jak komórki śródbłonna, fibroblasty czy makrofagi, a także do konstruowania układów mikrofluidycznych. Prosiłabym o odniesienie się do tego zagadnienia w trakcie obrony.

Chciałabym także zwrócić uwagę na to, że w całej pracy nazwy genów zapisano wielkimi literami, niezależnie od gatunku. Warto jednak pamiętać, że obowiązują określone zasady nomenklatury: w przypadku genów gryzoni stosuje się zapis kursywą z wielką literą na początku (np. *Tnnt2*), natomiast w przypadku genów ludzkich zapisuje się je dużymi literami (np. *TNNT2*). Ujednolicenie zapisu zgodnie z przyjętymi standardami zwiększyłoby precyzję i czytelność rozprawy.

W pracy pojawiły się ponadto pewne błędy składniowe, stylistyczne oraz terminologiczne, np. zapis komórka „apoptyczna” zamiast „apoptotyczna”. Błędy te nie wpływają jednak w istotny sposób na zrozumiałość treści.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Badania mają charakter interdyscyplinarny, łącząc inżynierię materiałową, biotechnologię komórkową i medycynę regeneracyjną. Zastosowany w pracy nowoczesny i wieloaspektowy warsztat badawczy

pozwolił na pełną i prawidłową realizację postawionych celów. Uzyskane wyniki otwierają perspektywę ich praktycznego wykorzystania.

Niniejszym stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani 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. 2024 poz. 1571 z póź. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Zuzanny Iwoń-Szczawińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, ze względu na interdyscyplinarny charakter rozprawy oraz fakt, że znaczna część przedstawionych w niej wyników została w ubiegłym roku opublikowana, wnoszę o jej wyróżnienie

Z wyrazami szacunku,



Agnieszka Jaźwa-Kusior