



**Prof. dr hab. Ewa  
Chabielska**  
**Samodzielna Pracownia Biofarmacji**  
**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**  
**ul. Mickiewicza 2C,**  
**15-222 Białystok**  
**Tel. (85) 748 5607**  
**chabewa@poczta.onet.pl**

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
wykonanej przez mgr Jarosława Lewandowskiego**

**w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej  
Akademii Nauk w Poznaniu**

Praca mgr Jarosława Lewandowskiego pt: **„Wpływ czasu hodowli *in vitro* na stopień dojrzałości kardiomiocytów pozyskanych drogą różnicowania z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych pochodzenia miogennego**”, została wykonana w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Macieja Kurpisza, uznanego autorytetu w zakresie badań nad wykorzystaniem genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej w tym, w terapii niewydolności serca.

Mimo znacznych postępów w zrozumieniu patofizjologii niewydolność serca i wprowadzeniu do leczenia nowoczesnych metod terapeutycznych jest to choroba o bardzo złym rokowaniu, gdyż w jej zaawansowanej postaci (IV klasa wg NYHA) około 50% chorych umiera w ciągu jednego roku.

Poszukiwanie skutecznych strategii terapii niewydolności serca znajduje się obecnie wśród najbardziej palących zadań stojących przed badaczami nauk podstawowych i klinicystami. Technika pozyskiwania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych i różnicowanie autologicznych komórek do kardiomiocytów rodzi nadzieję na skuteczną i bezpieczną terapię uszkodzonego serca. Z uwagi na pamięć epigenetyczną szczególne znaczenie może mieć przystosowanie ludzkich mioblastów, wywodzących się z mięśni szkieletowych, do terapii mięśnia sercowego. Nadal więc doskonałe są techniki mające na celu poprawę strukturalnych i funkcjonalnych właściwości tych komórek. Jednym z problemów, z którym należy się zmierzyć, jest czynnik czasowy wspomagający dojrzewanie komórek mięśniowych w hodowli *in vitro*.

Wobec powyższego aktualność i waga problemu badawczego w pełni uzasadnia podjęcie badań stanowiących zakres rozprawy doktorskiej Pana mgr Jarosława Lewandowskiego.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa napisana jest w układzie typowym, liczącym 202 strony i 11 rozdziałów, w tym 61 rycin i 24 tabele. Piśmiennictwo składa się z 237 pozycji, głównie anglojęzycznych, aktualnych i umiejętnie dobranych do nakreślenia założeń badania, jak i dyskusji otrzymanych wyników.

Jej obszerny wstęp obejmuje zagadnienia dotyczące badań nad regeneracją pozawałowego mięśnia sercowego z wyszczególnieniem kardiomiogenezy, aktualnych metod otrzymywania pluripotentnych komórek, możliwości różnicowania kardialnego w warunkach *in vitro* oraz czynników wpływających na dojrzewanie kardiomiocytów w warunkach *in vitro*. Każdy z wyżej wymienionych rozdziałów mógłby stanowić osobną, cenną i aktualną pracę poglądową.

Celem głównym pracy, jasno zdefiniowanym na stronie 64, było zbadanie wpływu wydłużenia czasu trwania hodowli *in vitro* kardiomiocytów uzyskanych z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych, pochodnych mioblastów mięśni szkieletowych człowieka, na stopień ich dojrzałości.

Metodologia badań jest imponująca, zarówno z racji na jej zakres jak i nowoczesność, i ona także stanowi o dużej wartości rozprawy. Metody zostały prawidłowo wybrane w odniesieniu do zamierzonego celu badania i omówione w sposób nie budzący zastrzeżeń, wsparty licznymi schematami i tabelami. Autor skonstruował wzorcowy warsztat badawczy, który może być podstawą do dalszych badań porównawczych z innymi liniami komórkowymi iPS i zastosowaniem kolejnych czynników stymulujących dojrzały fenotyp. Ten rozdział rozprawy mógłby stanowić użyteczną publikację metodologiczną.

Wyniki badań przedstawione są prawidłowo, przeprowadzona analiza statystyczna jest adekwatna do rodzaju analizowanych zmiennych. Wyniki, zebrane w postaci licznych tabel i rycin zaprezentowane są czytelnie, z dużą dbałością o poziom edytorski pracy. Bardzo cenna jest interpretacja wyników w trakcie ich opisu wyjaśniająca tok postępowania eksperymentatora.

W dyskusji Doktorant interesująco i z dużą swobodą omawia rezultaty badań dobrze wpisując je w kontekst własnych hipotez badawczych i dotychczas opublikowanych prac. Pragnę zwrócić szczególną uwagę na wartość krytycznej analizy otrzymanych wyników i ograniczeń metodologicznych, z którymi się zmierzył, na obecnym etapie badań. Świadczy to o wiedzy merytorycznej Doktoranta i umiejętności spojrzenia na swoją pracę badawczą z należytą rozwagą. Uważam, że w tym rozdziale pracy, cenne byłoby ustosunkowanie się Doktoranta, co do celowości dalszego wydłużania hodowli komórek.

Wyniki badań i ich interpretację usystematyzowano w postaci 6 wniosków.

Autor nie ustrzegł się kilku usterek o charakterze redakcyjnym i niezręczności językowych, o których poinformowałam Pana mgr Jarosława Lewandowskiego ustnie.

W wieloetapowych, z precyzją zaplanowanych eksperymentach Autor dokonał reprogramowania genetycznego mioblastów mięśni szkieletowych i uzyskał, z użyciem konstrukcji

genetycznej oraz wektora opartego na wirusie Sendai, indukowaną pluripotentną linię komórkową 194 z prawidłowym kariotypem, w której potwierdził potencjał pluripotencji w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Zweryfikowaną linię komórkową poddał następnie skutecznemu różnicowaniu w komórki mięśniowe serca. W kolejnym etapie badań Autor znalazł potwierdzenie swojej hipotezy dowodząc, że różnicujące się kardialne komórki mięśniowe w wydłużonej do 40 dni hodowli *in vitro* wykazują większy stopień podobieństwa do dojrzałych komórek serca. Wykazał, że pomimo zachowania pewnych cech stadium płodowego, wydłużenie hodowli kardiomiocytów pochodzących z mioblastopochodnych pluripotentnych komórek iPS zwiększa stopień dojrzewania pod względem morfologii, struktury i funkcjonowania aparatu kurczliwego. Potwierdził w tych komórkach utrzymywanie się kardiospecyficznych markerów białkowych, wyraźniejszą hipertrofię, równomiernie rozmieszczoną regularną sieć mitochondrialną, lepiej wykształcony i uporządkowany aparat kurczliwy, wydajniejszy proces obrotu wewnątrzkomórkowym wapniem w czasie skurczu oraz wzrost częstości skurczu.

Wysoko oceniam przeprowadzone badanie i przedłożoną rozprawę. Podkreślić należy jej nowatorskie elementy, jakimi są użycie ludzkich mioblastów wraz z wydłużeniem czasu trwania hodowli *in vitro*. W mojej opinii praca wnosi istotne wartości poznawcze i jest bardzo dobrym punktem wyjścia do dalszych badań. Należy podkreślić, że doskonalenie warsztatu badawczego, który pozwoliłby na otrzymanie optymalnie przystosowanych do leczenia narządu komórek może stanowić postęp w nowej strategii terapii uszkodzonego serca, dając nadzieję pacjentom na możliwość pełnej rekonstrukcji zniszczonego w wyniku choroby narządu.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Jarosława Lewandowskiego pt.: **„Wpływ czasu hodowli *in vitro* na stopień dojrzałości kardiomiocytów pozyskanych drogą różnicowania z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych pochodzenia miogennego”** stanowi rzetelnie przeprowadzone badanie naukowe, wysoce interesujące z uwagi na poruszaną problematykę i otrzymane wyniki. Z tych właśnie powodów składam przed Radą Naukową Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Jarosława Lewandowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Białystok, 22.06.2017r.