



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FIZJOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

Warszawa, 8 listopada 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne,

mgr Agnieszki Nadel

pt.: „The establishment of human iPSCs -derived chamber-specific Engineered Heart Tissues for deciphering the cardiac development and for pharmacological studies”

uszykowanej pod opieką promotorską

Pana **dr hab. n. med. Tomasza Kolanowskiego, prof. IGC PAN**

w Zakładzie Patologii Molekularnej

Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Pomimo znacznych postępów leczenia, zarówno poprzez interwencje w styl życia jak i z wykorzystaniem wszczepialnych urządzeń i interwencji zabiegowych oraz rozbudowanej farmakoterapii, choroby układu sercowo-naczyniowego, w szczególności choroby serca, są główną przyczyną śmiertelności w skali globalnej oraz w Polsce, a ich leczenie jest dużym obciążeniem dla systemu opieki zdrowotnej. Poszukiwanie nowych metod leczenia chorób sercowo-naczyniowych wymaga modeli doświadczalnych umożliwiających translacyjność uzyskanych wyników do ich zastosowania u ludzi. Jednym z istotnych ograniczeń wielu obecnie używanych modeli eksperymentalnych jest odmienność kardiomiocytów najczęściej używanych zwierząt laboratoryjnych – myszy i szczura - w stosunku do zjawisk elektrofizjologicznych i związanych z obrotem jonów wapniowych zachodzących w sercu ludzkim. Zarazem modele oparte na zwierzętach zawsze związane są z ograniczeniami wynikającymi z odmienności międzygatunkowej i coraz silniej wyrażanych społecznie dylematów etycznych.

Duże nadzieje wiąże się z rozwojem metod hodowli komórkowych, organoidów oraz tkanek zarówno jako perspektywicznego narzędzia badawczego, jak i narzędzia do walidacji nowych substancji jako potencjalnych leków oraz jako metod alternatywnych wobec użycia zwierząt w doświadczeniach

naukowych. Spośród różnych narządów, które próbuje się odwzorowywać w modelach *in vitro*, serce stanowi szczególne wyzwanie ze względu na konieczność nie tylko uzyskania przestrzennej struktury, która powinna przybliżyć geometrię tego narządu, ale również ze względu na potrzebę uzyskania tkanki, w której zjawiska elektryczne, mechaniczne i energetyczne zachodzą w sposób ze sobą skoordynowany i odzwierciedlający w tych aspektach czynność całego narządu. Jednocześnie modele takie mogą opierać się na komórkach ludzkich pochodzących zarówno od osób zdrowych, jak i od całego wachlarza pacjentów z różnymi chorobami sercowo-naczyniowymi o zróżnicowanym podłożu genetycznym lub metabolicznym. Uzyskanie powtarzalnych hodowli metodą inżynierii tkankowej serca może otworzyć nowe możliwości badania podstaw patofizjologicznych chorób serca, poszukiwania nowych mechanizmów i oceny działania leków na elektrofizjologię i czynność mechaniczną serca, a potencjalnie w przyszłości może przyczynić się do pozyskiwania implantów tkankowych dla celów naprawczych.

W tym kontekście praca doktorska Pani mgr Agnieszki Nadel podejmuje istotną tematykę badawczą o ważnym znaczeniu poznawczym, wdrożeniowym i klinicznym. W badaniach będących podstawą recenzowanej pracy, Doktorantka stworzyła tkankowy model serca z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej ze zróżnicowaniem uzyskanych kardiomiocytów do form charakterystycznych dla przedsionków i dla komór oraz sprawdziła w tak uzyskanych modelach działanie szeregu substancji farmakologicznych o zróżnicowanym efekcie czynnościowym względem przedsionków i komór serca. Cel rozprawy ma ważne znaczenie zarówno dla lepszego poznania kluczowych procesów umożliwiających tworzenie funkcjonalnych modeli tkankowych ludzkiego serca, jak również wykazuje duży potencjał dla badania kandydatów na leki działających na serce, co wskazuje na istotne znaczenie kliniczne takich badań.

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Nadel ma typowy układ dysertacji w formie monografii i napisana jest w języku angielskim. W jej skład wchodzi pięć rozdziałów, w tym: *Wstęp (Introduction)*, *Cele pracy (Scientific Aim)*, *Materiały i metody (Materials and methods)*, *Wyniki (Results)*, *Dyskusja (Discussion)*, po której znajdują się *Wnioski (Conclusions)*. Właściwa część pracy poprzedzona jest informacją o źródłach finansowania, spisem skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i w języku angielskim. Spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo i wykaz publikacji Doktorantki zamieszczone zostały na końcu pracy. Praca doktorska ma objętość 163 stron maszynopisu, zawiera 68 rycin, 23 tabele oraz 156 pozycji piśmiennictwa. Zwraca uwagę staranna redakcja pracy, poprawność językowa oraz czytelność rycin, tabel i ich opisów. Poszczególne rozdziały są w logiczny sposób podzielone na odrębne sekcje, co ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z zawartością pracy. Badania będące podstawą dysertacji były finansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2018/31/D/NZ3/01719, którego kierownikiem był Promotor pracy doktorskiej.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać na kilka drobnych uchybień natury edytorskiej. W manuskrypcie pojawiają się czasem niespójności między podmiotem zdania a odpowiednią liczbą czasownika. Formatowanie piśmiennictwa w części pozycji odbiega od przyjętego w pracy stylu, ponadto niektóre pozycje nie mają pełnej informacji bibliograficznej (np. tytułu czasopisma czy zakresu stron). Powtarzalność tych niedociągnięć sugeruje problemy z formatowaniem źródłowych danych w programie do zarządzania cytowaniami. Można wskazać również na inne pojedyncze niedociągnięcia (np. str. 69 – Figure 7 – powinno być Figure 8; str. 70 – zaburzona kolejność numeracji rycin – pojawia się rycina Figure 7.1, która nie znajduje się w spisie i odbiega od kolejności numerowania; str. 71 – nieusunięte polskie komentarze dot. formatowania; str. 129 – zmiana odstępu interlinii) i nieliczne błędy interpunkcyjne. Jednak powyższe moje uwagi nie wpływają na ogólnie wysoki poziom edytorski pracy i nie umniejszają jej merytorycznej zawartości.

We *Wstępie (Introduction)* mgr Agnieszka Nadel opisała w sposób całościowy, a zarazem zwięzły, zagadnienia związane z obciążeniem chorobami sercowo-naczyniowymi współczesnego społeczeństwa, omawia podobieństwa i różnice pomiędzy kardiomiocytami pochodzenia przedsionkowego i komorowego względem ich właściwości elektrofizjologicznych i czynnościowych, a także omawia udział fibroblastów sercowych w rozwoju embrionalnym serca i ich wpływie na determinację fenotypu kardiomiocytów i macierzy zewnątrzkomórkowej oraz właściwości mechanicznych i elektrycznych poszczególnych jam serca. W dalszej części (*Introduction*) Doktorantka wprowadza zagadnienia związane z potencjalnym zastosowaniem modeli tkankowych serca w badaniach podstawowych i wdrożeniowych, z uwzględnieniem ich jako alternatywy dla badań w modelach zwierzęcych, potencjał w rejestracji nowych leków wynikający ze zmian w legislacji wzmacniających rolę modeli komórkowych i tkankowych zamiast zwierzęcych. Istotną częścią *Wstępu (Introduction)* jest też omówienie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs), możliwość indukowania ich do postaci młodych kardiomiocytów oraz ograniczenia związane z brakiem rozróżniania na kardiomiocyty przedsionkowe i komorowe w dotychczas najczęściej stosowanych modelach. W mojej ocenie szczególnie wartościowe jest zwrócenie uwagi na rolę fibroblastów sercowych w warunkowaniu właściwości mechanicznych i czynnościowych kardiomiocytów oraz argumentacja przemawiająca za ich istotną rolę w różnicowaniu się fenotypów kardiomiocytów zależnie od ich położenia w mięśniu serca. Ten fragment *Wstępu (Introduction)* wprowadza istotne mało upowszechnione idee nie tylko w badaniach klinicznych, ale również w obszarze badań podstawowych. Zwraca uwagę na dobre udokumentowanie tej części pracy doktorskiej odniesieniami do publikacji zarówno klinicznych jak i doświadczalnych w modelach zwierzęcych i z wykorzystaniem modeli tkankowych. Całość *Wstępu (Introduction)* świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym i pogłębionej wiedzy Doktorantki dotyczącej problematyki inżynierii tkankowej i układu sercowo-naczyniowego. Stanowi też merytoryczne podłoże dla przedstawienia celów i założeń pracy, do których

Doktorantka zaliczyła: 1) opracowanie przedsionkowo- i komorowo-specyficznego modelu tkankowego serca; 2) potwierdzenie skuteczności tego modelu w oparciu o specyficznego dla przedsionków serca inhibitora kanału potasowego bramkowanego jonami wapnia; 3) zbadanie roli fibroblastów sercowych w różnicowaniu kardiomiocytów. Cele i założenia pracy są sformułowane prawidłowo i wskazują na przemyślaną koncepcję pracy i przygotowany plan badawczy.

Doktorantka zastosowała w swojej pracy liczne techniki, w tym złożone hodowle komórkowe i tkankowe, sekwencjonowanie RNA i analiza sekretomu, barwienia immunofluorescencyjne i obrazowanie w mikroskopii konfokalnej, czy cytometria przepływowa. Tak szeroki wachlarz użytych metod wskazuje na dużą wszechstronność i biegłość w pracy doświadczalnej w laboratorium. W części pracy dotyczącej *Materiałów i metod (Materials and methods)* zwraca uwagę dokładność opisu i atencja do szczegółów, włącznie z podaniem wykazu użytej aparatury, numerów katalogowych, stężeń i objętości dla wszystkich użytych odczynników, przeciwciał i primerów, a także szczegółowo opisanie pochodzenia linii komórkowych. Dokładne przedstawienie zastosowanych technik nie tylko wskazuje na rzetelność, samodzielność i indywidualnym wkład Doktorantki, ale też jest formą „przepisu” umożliwiającego odtworzenie warunków przeprowadzonych doświadczeń. Badania przeprowadzone przez mgr Agnieszkę Nadel w części z użyciem tkanek ludzkich uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej. Jedynie w opisie zastosowanych metod statystycznych umknęła informacja, czy analizowane dane spełniały kryteria związane z normalnym rozkładem odchyień i wariancji dla analiz parametrycznych. W samej pracy można wyróżnić kilka etapów doświadczenia – stworzenie hodowli zróżnicowanych fenotypowo kardiomiocytów do kardiomiocytów przedsionkowych i komorowych z komorek iPSCs; walidację tych fenotypów w oparciu o profil ekspresji genów oraz porównanie uzyskanych kardiomiocytów z komórkami uzyskanymi z biopsji serc przeznaczonych do przeszczepu oraz czynnościową charakterystykę kardiomiocytów przedsionkowych i komorowych w trójwymiarowej hodowli tkankowej serca – *Engineered Heart Tissue (EHT)*. Na szczególne podkreślenie zasługuje nie tylko uzyskanie zróżnicowanych fenotypowo kardiomiocytów, ale też przemyślany sposób oceny czynności uzyskanych modeli mięśnia przedsionka i mięśnia komory. Doktorantka oceniała odpowiedzi EHT na bodźce farmakologiczne (pobudzenie receptorów beta-adrenergicznych, receptorów muskarynowych, zmiany stężenia jonów wapniowych, blokowanie kanałów jonowych specyficznych dla kardiomiocytów przedsionkowych) oraz czynniki związane z obciążeniem wstępnym i oceną mechanizmu Franka-Starlinga w regulacji siły skurczu. Analizowane parametry w postaci siły i szybkości skurczu oraz częstość skurczów w uzyskanych tkankach sercowych są doskonale dobrane jako kluczowe czynniki determinujące czynność hemodynamiczną serca. W mojej ocenie zaproponowany przez Doktorantkę dobór rejestrowanych i analizowanych parametrów umożliwia przewidywanie odpowiedzi serca w oparciu o obserwacji w modelu tkanki sercowej. Ponadto wskazuje nie tylko na znajomość technik hodowli komórkowych i inżynierii tkanek sercowych, ale też na pogłębioną wiedzę dotyczącą

fizjologii serca. Niewątpliwie opis rozdziału *Materiały i metody* wskazują na wyśmienite przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań, analizy oraz interpretacji uzyskanych wyników.

Wielowymiarowe wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają charakter nowatorski i są opisane w spójny i systematyczny sposób. Ilościowa analiza wyników przedstawiona jest na licznych rycinach, które są czytelne. Należy podkreślić, że pomimo licznych wyników obejmujących bardzo różnorodne techniki eksperymentalne, Doktorantka wywiązała się z trudnego zadanie spójnego i logicznego ich przedstawienia. W mojej ocenie do najważniejszych obserwacji należy stworzenie w oparciu o ludzkie iPSCs tkankowego modelu o zróżnicowanej charakterystyce w zależności o obecności kardiomiocytów o fenotypie przedsionkowym lub komorowym i potwierdzenie tych fenotypów i ich funkcjonalnego podobieństwa do serca ludzkiego z wykorzystaniem testów farmakologicznych i fizjologicznych. Również istotne jest pokazanie udziału fibroblastów w różnicowaniu kardiomiocytów do postaci przedsionkowej lub komorowej. W mojej ocenie szalenie istotne jest też potwierdzenie, że stworzony model wykazuje wysoką zgodność z dojrzałymi kardiomiocytami ludzkimi pozyskanymi z biopsji serc pochodzących od zdrowych dawców w celach transplantacji.

Dyskusja (Discussion) jest poprowadzona przez mgr Agnieszkę Nadel spójnie i zgodnie z kolejnością prezentowanych wyników, co ułatwia lekturę całej pracy o bardzo rozbudowanej i złożonej metodyce. Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane w kontekście dotychczasowych badań z wykorzystaniem podobnych modeli tkankowych serca, w których Doktorantka bardzo sprawnie się porusza. Umieszczone w tej części pracy ryciny ułatwiają czytelnikowi śledzenie argumentacji dotyczącej mechanizmów związanych z udziałem fibroblastów sercowych w różnicowaniu się kardiomiocytów do postaci przedsionkowej. Należy zwrócić uwagę, że ze względu na liczne czynniki uwzględnione w pracy, analiza, interpretacja i dyskusja wyników była wielowymiarowa, jednak Doktorantka dobrze wywiązała się z tego trudnego zadania - *Dyskusja* ma dużą wartość merytoryczną, a wnioski (*Conclusions*) zawarte w pracy mają oparcie w wynikach.

Piśmiennictwo użyte w pracy zostało poprawnie i odpowiednio dobrane do tematyki pracy badawczej i zawiera znakomitą część kluczowych prac w tematyce chemoreceptorów obwodowych. Moja wcześniejsza uwaga dotycząca niespójności edytorskiej cytowań nie umniejsza faktu, że piśmiennictwo jest dobrane prawidłowo, a użyte źródła wskazują na bardzo dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki w obszarze modeli komórkowych i tkankowych serca, a także mechanizmów fizjologicznych biorących udział w regulacji czynności serca.

Moja ocena ogólna przedstawionej pracy doktorskiej przez Panią mgr Agnieszkę Nadel jest pozytywna. Przeprowadzone doświadczenia wniosły istotną nową wiedzę i narzędzia badawcze dotyczącą możliwości tworzenia funkcjonalnych modeli mięśnia przedsionka i mięśnia komory z

ludzkich pluripotencjalnych komórek iPSC i użycia tych modeli do badania rozwoju jam serca oraz oceny wpływu czynników farmakologicznych i fizjologicznych na czynność hemodynamiczną przedsionka i komory serca. Stworzony przez Doktorantkę model jest unikatowy, a uzyskane wyniki są innowacyjne i w istotny sposób uzupełniają wcześniejsze doniesienia z renomowanych ośrodków zagranicznych. Uzyskany model doświadczalny ludzkiego serca i jego dogłębna charakterystyka na poziomie genowym, ekspresji białek, szlaków sygnałowych oraz czynnościowym jest ważnym i unikalnym osiągnięciem w skali Polski i istotnie rozwija ten nowy i bardzo perspektywiczny obszar badań w skali globalnej. Zaplanowanie, przeprowadzenie i interpretacja doświadczeń, a następnie ich dyskusja wymagało ogólnej i pogłębionej wiedzy teoretycznej, dobrze opanowanego warsztatu badawczego oraz dobrej organizacji pracy ze strony Doktorantki. W mojej ocenie całość pracy świadczy o wysokiej samodzielności naukowej mgr Agnieszki Nadel.

Lektura tej ciekawej pracy doktorskiej nasuwa następujące pytania i prośbę o wyrażenie swojej opinii przez Doktorantkę:

1. Czy możliwe jest włączenie do modelu tkankowego serca EHT komórek nerwowych autonomicznego układu nerwowego i czy mogłoby to rozszerzyć jego możliwości?
2. Czy model serca z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej może wnieść istotną nową wiedzę dotyczącą patofizjologii chorób serca?

Podsumowanie:

Stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr Agnieszkę Nadel rozprawa doktorska pt.: „**The establishment of human iPSCs -derived chamber-specific Engineered Heart Tissues for deciphering the cardiac development and for pharmacological studies**” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. *Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* oraz w *Regulaminie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora* w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk (IGC PAN) (Uchwała nr 7/korespon/2023 z dnia 04.08.2023 r.).

Z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Nadel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy ze względu na jej nowatorski charakter i stworzenie i walidację unikalnego modelu doświadczalnego o dużym potencjalnie translacyjnym w kardiologii.

dr hab. n. med. i n. o zdr. Tymoteusz Żera