

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Zygmunt w formie cyklu publikacji zaprezentowanego pod tytułem:

„Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy w kierunku otrzymywania mięsa technikami *in vitro*”

Ogólna charakterystyka dysertacji

Przedłożona do recenzji praca doktorska została zrealizowana pod opieką naukową prof. dr hab. Katarzyny Piórkowskiej oraz promotora pomocniczego dr inż. Wojciecha Witarskiego w Instytucie Zootechniki PIB. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawione zostały jako cykl trzech oryginalnych prac opublikowanych w latach 2023-2026 w czasopismach z listy JCR. Łączna wartość wymienionych publikacji wynosi 300 punktów MNiSW, a ich sumaryczny współczynnik IF względem roku wydania - 8,5.

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. Zygmunt K., Otwinowska-Mindur A., Piórkowska K., Witarski W. (2023). Influence of Media Composition on the Level of Bovine Satellite Cell Proliferation. *Animals (Basel)*, 13(11):1855.
Punkty MNiSW = 100, IF = 2,7
2. Zygmunt K., Żukowski K., Piórkowska K., Smołucha G., Wierzbicka A., Witarski W. (2026). Paracrine effect of fibroblasts on the proliferation and differentiation of bovine satellite cells in vitro. *Biochimie*, 241:26-43.
Punkty MNiSW = 100, IF = 3,0
3. Zygmunt K., Piórkowska K., Adamiak J., Witarski W. (2026). Modulation of bovine muscle satellite cells myogenesis by paracrine fibroblast-derived signaling in three-dimensional spinner flask culture system. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 197-198: 106970.
Punkty MNiSW = 100, IF = 2,8

Badania wykonane w ramach dysertacji doktorskiej zostały sfinansowane z funduszy projektów Narodowego Centrum Nauki (Miniatura 5, Preludium 22). Zbiór publikacji stanowi logiczną i spójną całość. We wszystkich doktorantka jest pierwszym autorem jak

również autorem korespondencyjnym, co świadczy o jej dominującej roli w ich przygotowaniu. Z załączonych do dysertacji oświadczeń wynika, że Pani mgr inż. Karolina Zygmunt brała udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy i metodologii, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz statystycznych, zarządzaniu uzyskanymi danymi, wizualizacją wyników, przygotowaniem oryginalnej wersji manuskryptu, a także pozyskaniu funduszy na badania. Prezentacja publikacji naukowych stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora została poprzedzona wykazem skrótów, streszczeniem zarówno w języku polskim jak i angielskim, wstępem, określeniem celów i hipotez badawczych, zwięzłym opisem każdej publikacji, charakterystyką wykorzystanego materiału badawczego i zastosowanych metod, przedstawieniem uzyskanych wyników wraz z dyskusją, wnioskami, ograniczeniami i dalszymi planami badawczymi oraz wykazem literatury. Do rozprawy doktorskiej dołączono oświadczeniami autora i współautorów publikacji dotyczące ich udziału w przygotowaniu poszczególnych publikacji. Opracowanie pracy liczy łącznie 62 strony (bez wliczenia kopii publikacji i oświadczeń) i obejmuje 13 rycin.

Ocena opracowania dysertacji

Tytuł pracy doktorskiej w pełni nie odzwierciedla treści wszystkich publikacji, gdyż w pierwszej z nich nie analizowano wpływu fibroblastów na proces miogenezy komórek satelitarnych, lecz badano oddziaływanie trzech składników pożywki na tempo ich proliferacji. Można jednak ją uznać jako optymalizację warunków hodowli, która posłuży na kolejnych etapach badań, zaprezentowanych w pozostałych dwóch publikacjach.

W odniesieniu do Wykazu skrótów proponowałbym uściślić ich rozwinięcie, gdyż w niektórych przypadkach są podane w języku angielskim i polskim, tylko angielskim bądź wyjaśniają funkcję zastosowanej metody np. „GO - (ang. Gene Ontology) analiza wzbogacenia genów”.

W Streszczeniu w języku polskim, które jest tożsame z napisanym w języku angielskim w syntetyczny sposób opisano założenia i wyniki przeprowadzonych badań.

W początkowej części Wstępu doktorantka umotywowwała zasadność wytwarzania mięsa *in vitro* oraz przedstawiła historię jego produkcji wraz z obecnym stanem rynkowym. Dodatkowo fragment ten wzbogacono ryciną obrazującą proces produkcyjny oraz wady i zalety omawianej technologii. W kolejnych etapach skupiono się na znaczeniu funkcji mięśniowych komórek satelitarnych w procesie miogenezy w aspekcie ich wykorzystania w produkcji mięsa *in vitro*. Podkreślono wysokie koszty jego produkcji, generowane przez pożywki hodowlane i potrzebę poszukiwania alternatywnych rozwiązań, proponując wykorzystanie fibroblastów jako czynników modulujących miogenezę komórek satelitarnych. Ponadto opisano systemy hodowli komórkowych, skupiając się głównie na zaletach hodowli trójwymiarowej (3D). W mojej opinii doktorantka powinna podkreślić również znaczenie hodowli dwuwymiarowej (2D), która została szeroko wykorzystana w drugiej publikacji. Podsumowując uważam, że Wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika

w tematykę podjętych badań, podkreśla ich zasadność oraz jest napisany zrozumiałym i poprawnym językiem naukowym.

Doktorantka w swej rozprawie przedstawiła 4 główne cele badawcze oraz sformułowała 3 hipotezy badawcze, które są jasne i możliwe do weryfikacji. Nadrzędnym celem badań było opracowanie optymalnego składu pożywki do proliferacji mięśniowych komórek satelitarnych oraz ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na przebieg miogenezy tych komórek w warunkach kokultury 2D i 3D.

W kolejnej części bardzo syntetycznie i rzeczowo opisano każdą z publikacji wchodzących w skład dysertacji, podsumowując je jednoznacznymi wnioskami.

Dział Materiał i metody obejmuje 10 stron i został podzielony na 3 części, odpowiadające każdej z publikacji. Doktorantka w przejrzysty sposób opisała wykorzystane metody i trafnie umotywowwała ich wybór. Kluczowym etapem, zapewniającym powodzenie eksperymentu było wyprowadzenie pierwotnych linii bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych i fibroblastów oraz ich hodowla z różnymi komponentami pożywki jak również w warunkach kokultury 2D i 3D. Wpływ składu pożywki badano na etapie proliferacji w 3., 5., 7. i 10. dniu hodowli, a oddziaływanie fibroblastów na etapie proliferacji i różnicowania w 24. i 72. godzinie, co pozwoliło prześledzić towarzyszące im zmiany na poziomie różnych procesów. Obejmowały one między innymi badanie ekspresji genów markerowych oraz transkryptomu (RNAseq), analizy proteomiczne (Western Blot, ELISA), fluometryczną ocenę tempa proliferacji, ilościowe analizy metaboliczne, a także liczne obserwacje mikroskopowe. Wykorzystanie przez doktorantkę tak szerokiego wachlarza nowoczesnych i interdyscyplinarnych technik budzi podziw i uznanie oraz świadczy o wielkich umiejętnościach i zaangażowaniu w realizację podjętych zadań badawczych. Prawidłowo dobrane, zaawansowane analizy statystyczne umożliwiły zaprojektowanie eksperymentu w celu zbadania wpływu różnych składników pożywki oraz ich interakcji na proliferację komórek satelitarnych (DOE) jak również potwierdzenie istotności wyników uzyskanych w kolejnych etapach. Na szczególną uwagę zasługują analizy wyników sekwencjonowania transkryptomu. Opracowanie ogromnej ilości danych, uwzględniające szereg istotnych parametrów, analiza ontologii genów i szlaków KEGG wymagały wykorzystania znajomości wielu narzędzi bioinformatycznych. Umożliwiły one wygenerowanie i usystematyzowanie wyników badań oraz ich przedstawienie w formie tabelarycznej jak i graficznej, zapewniając poprawną interpretację. W odniesieniu do tej części pracy mam jedno zapytanie. Oddziaływanie składników pożywki na proliferację komórek badano w czterech punktach czasowych, w 3., 5., 7. i 10. dniu hodowli, natomiast analizę ekspresji genów markerowych w dwóch punktach, w 3. i 5. dniu hodowli. Skąd wynikał ten wybór i czy uwzględnienie wszystkich czterech nie dałoby lepszego wglądu w aktywność analizowanych genów?

Omówienie wyników wraz z dyskusją stanowi najobszerniejszy dział opracowania dysertacji, obejmujący 17 stron. W jego skład weszło 11 rycin zaczerpniętych z opublikowanych prac, które umożliwiły zwizualizowanie i lepsze zrozumienie uzyskanych wyników badań. Doktorantka w poprawny i przejrzysty sposób przedstawiła najważniejsze

rezultaty przeprowadzonych analiz, jednocześnie odnosząc się do najnowszych danych literaturowych, dzięki czemu czyta się ten fragment z dużym zainteresowaniem. W jednym z podrozdziałów zwrócono uwagę na sprzeczność stosowania surowicy bydlęcej z ideą produkcji mięsa *in vitro* oraz zróżnicowanie jej składu w zależności od partii produktu. Następnie zacytowano badania własne, mające na celu przetestowanie komercyjnie dostępnych pożywek do proliferacji bydlęcych komórek satelitarnych i wyboru najodpowiedniejszej z nich. Przeprowadzone analizy świadczą o należytej i szybkiej reakcji doktorantki na przeszkody i ograniczenia napotykane podczas prowadzenia badań oraz uwzględnianiu w nich aspektów etycznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka precyzyjnie sformułowała 7 wniosków, które odpowiadają na założone wcześniej cele oraz pozwalają w pełni zweryfikować poprawność postawionych hipotez badawczych. Stwierdzono jednoznacznie, że płodowa surowica bydlęca oraz odpowiednie stężenie czynnika mitogennego najsilniej stymulują proliferację bydlęcych komórek satelitarnych. Ponadto dowiedziono, że fibroblasty promują ich proliferację i wczesne różnicowanie miogenne w warunkach kokultury 2D jak i 3D, co kolei może zostać wykorzystane w produkcji mięsa *in vitro* na szeroką skalę.

W dziale Ograniczenia i przyszłe kierunki badań doktorantka zwróciła szczególną uwagę na pewne trudności techniczne wynikające z transferu technologii ze skali laboratoryjnej do wielkoskalowej, aby zapewnić standaryzację i opłacalność produkcji. Jako kontynuację badań zaproponowała wykorzystanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z fibroblastów jako regulatorów miogenezy. Uważam, że jest to trafna kontynuacja podjętych w dysertacji badań i świadczy o bardzo dużej determinacji doktorantki w dążeniu do poznania i zrozumienia procesów biologicznych na wielu poziomach organizacyjnych.

Źródła w Bibliografii zostały rzetelnie dobrane i obejmują 86 aktualnych artykułów naukowych i 2 akty prawne.

W odniesieniu do oświadczeń współautorów uważam, że oświadczenia doktorantki mogły zostać pominięte, gdyż jej udział został przedstawiony wcześniej na stronie 6.

Wymienione przez mnie uwagi i zapytania w żaden sposób nie umniejszają bardzo wysokiej wartości zaprezentowanej dysertacji doktorskiej i mają charakter redaktorski bądź wynikają z możliwości pojęcia dyskusji naukowej. Przedstawioną dysertację oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym jak i jej formy.

Wartość merytoryczna publikacji

Hodowla mięsa w warunkach kultury *in vitro* mogła kiedyś wydawać się wytworem wyobraźni pisarzy science-fiction, jednak stała się niezaprzeczalnym faktem. W obecnych czasach powstaje coraz większa liczba firm i start-upów, które zajmują się opracowaniem nowych technologii i ich wdrażaniem, próbując sprostać złożonym wymaganiom poszczególnych rynków konsumenckich. Produkcja mięsa *in vitro* ma bardzo wiele zalet

takich jak ograniczenie cierpienia zwierząt, zapewnienie bezpieczeństwa produktu i możliwość manipulacji jego składem, a także mniejsze obciążenie środowiska. Z drugiej strony, odtworzenie właściwości organoleptycznych mięsa oraz wykorzystanie w hodowli kosztownych i budzących zastrzeżenia etyczne surowic zwierzęcych może stanowić duże wyzwanie omawianej technologii.

Badania mgr Karoliny Zygmunt wraz z zespołem wpisują się w obszar naukowy próbujący sprostać tym ograniczeniom, obejmując ocenę parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydłych komórek satelitarnych i możliwość ich wykorzystania w produkcji mięsa *in vitro*. Podjęta tematyka jest aktualna i nowatorska gdyż hodowla w kokulturze, lepiej odzwierciedla warunki *in vivo*, a dane literaturowe nie wskazują jednoznacznie w jaki sposób te komórki na siebie oddziałują. Analizy zostały przeprowadzone konsekwentnie oraz kompleksowo i zostały opisane w postaci 3 zrecenzowanych przez specjalistów publikacji z listy JCR. Ich dane bibliometryczne - 300 punktów MNiSW i wskaźnik IF = 8.5 uważam za wysokie i w zupełności wystarczające w postępowaniu o nadanie stopnia doktora. Dodatkowo, liczba cytowań pierwszej publikacji według baz Web of Science i Scopus (stan na 28.08.2026r.) wynosi odpowiednio 7 i 8, co świadczy o dużym zainteresowaniu badaniami doktorantki w środowisku naukowym.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując recenzję stwierdzam, że doktorantka prezentuje bardzo wysoki poziom wiedzy merytorycznej, która przekłada się na umiejętności praktyczne, a dysertacja została napisana bardzo dojrzałym językiem naukowym.

Pragnę również nadmienić, że recenzowana praca doktorska wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny naukowej Zootechnika i rybactwo, w której Pani mgr inż. Karolina Zygmunt wszczęła przewód doktorski.

Niniejszym zaświadczam, że przedłożona praca doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art.187 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) i przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Zygmunt do dalszych etapów przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz istotny aspekt poznawczy i aplikacyjny uzyskanych wyników wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zootechniki wniosek o wyróżnienie dysertacji.

Daniel Polasik