



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Karoliny Zygmunt

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

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Zootechniki - Państwowym Instytucie Badawczym (PIB) w Balicach pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Katarzyny Piórkowskiej oraz promotora pomocniczego dra inż. Wojciecha Witarskiego. Podstawą rozprawy doktorskiej są 3 oryginalne prace twórcze opublikowane w uznanych czasopismach z listy Journal Citation Reports – JCR tj.: *Animals* (IF=2,7), *Biochimie* (IF=2,7), *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (IF=2,8). Łączny IF prac wynosi 8,2.

1. Zygmunt K, Otwinowska-Mindur A, Piórkowska K, Witarski W. Influence of Media Composition on the Level of Bovine Satellite Cell Proliferation. *Animals*. 2023; 13(11):1855.
2. Zygmunt K, Żukowski K, Piórkowska K, Smołucha G, Wierzbicka A, Witarski W. Paracrine effect of fibroblasts on the proliferation and differentiation of bovine satellite cells *in vitro*. *Biochimie*. 2026; 241:26-43.
3. Zygmunt K, Piórkowska K, Adamiak J, Witarski W. 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*. 2026. 197-198; 106970.

We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem a Jej wkład w te prace, jak wynika z załączonych oświadczeń był znaczący i obejmował udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, opracowaniu metodologii badań, przeprowadzenie analiz, udział w analizie statystycznej wyników, wizualizacja wyników, znaczący udział w przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptów a w przypadku publikacji w *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* także częściowe pozyskanie funduszy na badania i zarządzanie projektem.

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej realizowane były w ramach

projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki: (1) Miniatura 5, pt. „Wpływ kompozycji komórkowej mięsa, hodowanego w warunkach in-vitro na zawartość składników odżywczych”, którego kierownikiem był promotor pomocniczy dr inż. Wojciech WitarSKI oraz (2) Preludium 22, pt. „Wpływ fibroblastowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na modulację procesów miogenezy bydłych komórek satelitarnych: w kierunku otrzymywania mięsa technikami in-vitro”, kierowany przez mgr inż. Karolinę Zygmunt. Na duże uznanie zasługuje aktywność Doktorantki w pozyskiwaniu środków finansowych na badania i kierowanie własnym projektem naukowym.

Forma rozprawy doktorskiej jest typowa dla tego typu prac, których podstawą są artykuły naukowe. W 62 stronicowym opracowaniu zawarto następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy i hipotezy badawcze, wykaz i streszczenie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, materiały i metody, wyniki i dyskusja, wnioski, ograniczenia i przyszłe kierunki badań oraz bibliografia. Do pracy dołączono kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenia współautorów publikacji.

Praca doktorska dotyczy badania przebiegu miogenezy *in vitro* bydłych komórek satelitarnych w systemie hodowli dwuwymiarowej i trójwymiarowej ze szczególnym uwzględnieniem wpływu ko-hodowli z fibroblastami oraz opracowania składu pożywki hodowlanej wspierającej proliferację komórek mięśniowych, przy jednoczesnym niskim stopniu spontanicznego różnicowania. Podjęta tematyka badawcza jest bardzo interesująca zarówno pod względem poznawczym, gdyż dostarcza nowych danych molekularnych o różnych aspektach zaawansowanych hodowli *in vitro* komórek ssaczych a także bardzo silnie wpisuje się w nurt badań aplikacyjnych dotyczących bioinżynierii tkanki mięśniowej bydła w kontekście wykorzystania tej wiedzy do mocno rozwijanej w ostatnich latach produkcji „mięsa *in vitro*”. Produkcja mięsa z hodowli komórkowej może stanowić odpowiedź na wybrane problemy natury etycznej, środowiskowej i zdrowotnej związane z konwencjonalną produkcją zwierzęcą. Prowadzenie badań w tym nowoczesnym i dynamicznie rozwijającym się obszarze w Instytucie Zootechniki w Balicach należy uznać za bardzo cenne, aktualne i wpisujące się w światowe trendy badawcze. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w rozwój badań nad mięsem wołowym hodowanym *in vitro*.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim, które dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę i zakres pracy doktorskiej. Rozdział *Wstęp* został bardzo starannie i wnikliwie napisany. Zawarto w nim niezbędne informacje o aktualnym stanie wiedzy w tematyce pracy doktorskiej, tj. o zaletach i wadach technologii produkcji „mięsa komórkowego”, typach komórek wykorzystywanych do uzyskania takiego typu mięsa, przedstawiono charakterystykę mięśniowych komórek satelitarnych i przebieg procesu miogenezy, opisano systemy hodowli *in vitro* w kontekście



bioinżynierii tkanki mięśniowej, w tym najczęściej wykorzystywany skład pożywek hodowlanych oraz scharakteryzowano fibroblasty jako potencjalny modulator miogenezy. Dużą wartością tej części pracy doktorskiej jest opracowanie oryginalnych rycin, które istotnie wzbogacają treść pracy.

W kolejnym rozdziale pracy doktorskiej sformułowano hipotezy badawcze i główne cele badań dotyczące opracowania składu pożywki hodowlanej, która stymuluje proliferację mięśniowych komórek satelitarnych bydła, ocenę parakrynnego wpływu fibroblastów na przebieg miogenezy mięśniowych komórek satelitarnych bydła przy wykorzystaniu hodowli typu kokultura w warunkach 2D i 3D oraz analizę transkryptomu i zmian ekspresji wybranych genów i szlaków sygnałowych kluczowych w procesie miogenezy odtworzonej w warunkach *in vitro*, w kokulturze z fibroblastami w warunkach 2D. Przedstawione cele badawcze zostały bardzo dobrze skonstruowane i tworzą spójny ciąg zadań pozwalający na wielopoziomą ocenę badanego zjawiska - począwszy od aspektu metodycznego (optymalizację warunków hodowli mięśniowych komórek satelitarnych), poprzez obserwację efektu biologicznego (ocena wpływu fibroblastów na przebieg miogenezy w coraz bardziej złożonych modelach hodowlanych), aż po próbę wyjaśnienia molekularnego podłoża odpowiedzi komórek mięśniowych na parakrynnie oddziaływanie fibroblastów wykorzystując analizę transkryptomiczną.

Kolejny rozdział pracy doktorskiej to wykaz i streszczenie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, który akurat w tej części pracy nie jest konieczny. Materiał i metody badań opisano oddzielnie dla każdej z publikacji. W pracy zastosowano liczne metody badawcze takie jak: prowadzenie hodowli pierwotnych bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych i fibroblastów, hodowle komórkowe w układzie kokultury, hodowle 2D oraz hodowle przestrzenne z wykorzystaniem bioreaktora typu spinner flask, analizowano tempo proliferacji komórek, wykonano analizy mikroskopowe oraz analizy metaboliczne, proteomiczne, badano względny poziom transkrypcji genów, wykonano analizę transkryptomu i analizy bioinformatyczne oraz statystyczne. Rozdział ten obrazuje jak szeroki zakres zastosowanych technik badawczych musiała opanować Doktorantka, aby zrealizować założone cele badawcze.

Po przeczytaniu tej części pracy nasunęły się następujące pytania i kwestie do wyjaśnienia lub uzupełnienia w trakcie obrony pracy doktorskiej:

1. W pracy i publikacjach nie podano wieku zwierząt, od których pobierany był materiał biologiczny (w publikacji tylko „female calf”). Ponieważ wiek może istotnie wpływać na liczebność komórek satelitarnych oraz ich potencjał proliferacyjny warto te informacje uszczegółowić.
2. W badaniach do oceny proliferacji komórek zastosowano zestaw CellTiter Blue Assay (Promega), który służy do oceny żywotności komórek na podstawie ich aktywności metabolicznej. Można go zastosować do pośredniej oceny proliferacji. Należy jednak mieć

na uwadze ze samo dodanie bFGF może wpływać na metabolizm komórek, dlatego zwiększenie sygnału RFU przy 10 ng/mL bFGF nie pozwala jednoznacznie określić jego wpływu na proliferację. Do oceny poziomu proliferacji komórkowej można było zastosować inne metody oceny proliferacji komórek np. w oparciu o np. EdU/BrdU czy Ki-67.

3. W pracy używa się często sformułowania „line” odnośnie komórek satelitarnych, które sugeruje posiadanie ustalonej i scharakteryzowanej linii komórkowej a w rzeczywistości były to hodowle pierwotne na wczesnym pasażu. Nie jest także jasne czy populacje komórek R1 i R2 pochodziły od dwóch różnych zwierząt, czy stanowiły dwie izolacje z materiału pobranego od jednego cielęcia.
4. Mimo tego, że rodzaj surowicy był decydującym czynnikiem wpływającym na proliferację, użyty odczynnik opisano bardzo ogólnie bez podania pełnej nazwy czy numeru katalogowego, co ogranicza możliwość zdefiniowania warunków doświadczenia. Czy wiedza o szczegółowym składzie mogłaby być użyteczna do opracowania składu suplementu do hodowli, który mógłby zastąpić stosowanie surowicy?
5. W metodzie qPCR używano różnych zestawów genów referencyjnych *RPL27* i *OAZ1* (publikacja 1 i 2) oraz *YWHAZ* i *ACTB* (publikacja 3) – czym to było uzasadnione?
6. Pewne ograniczenie metodyczne stanowi sposób potwierdzenia procesu oczyszczania pierwotnej populacji komórek satelitarnych na podstawie ekspresji markerów fibroblastów i preadipocytów metodą qPCR (publikacja 2). Analiza ta nie pozwala na bezpośrednie określenie udziału poszczególnych typów komórek. W kontekście tych badań można było zastosować także barwienie immunofluorescencyjne.
7. Do indukcji różnicowania miogenicznego stosowano medium zawierające 10% surowicy końskiej. Proszę o uzasadnienie wyboru takiego stężenia oraz wyjaśnienie, czy rozważano zastosowanie niższego stężenia surowicy, często wykorzystywanego do indukcji różnicowania mioblastów. Czy stosunkowo wysokie stężenie tej surowicy mogło wpływać na dynamikę różnicowania?

W rozdziale *Wyniki i dyskusja* Doktorantka opisuje najważniejsze wyniki i poddaje je krótkiej dyskusji oddzielnie dla każdej publikacji. Wybrane ryciny z publikacji zostały w wersji polskiej powtórnie umieszczone w tym rozdziale. W niektórych miejscach na rycinach pozostały nazwy angielskie (np. glucose, absorbance, relative expression). Do oceny wpływu składu pożywki hodowlanej na poziom proliferacji bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych zastosowano bardzo ciekawe podejście do projektowania i optymalizacji doświadczeń - analizę statystyczną DOE (ang. Design of Experiments), które pozwala jednocześnie ocenić wpływ kilku czynników na badaną odpowiedź oraz ich wzajemne interakcje. Wykazano, że najistotniejszym czynnikiem wpływającym na tempo podziałów był rodzaj zastosowanej surowicy, a w dalszej kolejności dodatek zasadowego czynnika wzrostu



fibroblastów (bFGF), natomiast stężenie glukozy nie wpływało istotnie na tempo proliferacji. Dane uzyskane z analizy poziomu transkryptów genów stosowanych do oceny statusu miogenego badanych komórek (*PAX7*, *MYF5*, *MYOD1*, *MYOG* i *MYF6*) czasami są trudne do interpretacji w kontekście obserwacji dotyczących proliferacji i różnicowania. Przykładowo czynnik, który był najbardziej istotny czyli surowica, nie wywołała dużych zmian w poziomie ekspresji genów a dodanie bFGF nie spowodowało żadnych istotnych różnic w ekspresji genów pomiędzy badanymi grupami. Jeżeli celem badania było określenie poziomu proliferacji bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych, to zasadne byłoby zbadanie także ekspresji genów proliferacyjnych. Czy Doktorantka rozważała wybór innych genów markerowych do badania?

W doświadczeniu nad oceną parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych w hodowli dwuwymiarowej zastosowano wielopoziomowe podejście obejmujące analizę zmian na poziomie transkryptomu, z wykorzystaniem RNA-Seq, jak i na poziomie białek, przy zastosowaniu metod Western blot, ELISA oraz immunofluorescencji. Uzyskano wiele ciekawych wyników odnośnie identyfikacji genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs) dla trzech punktów czasowych (prolifерacja, 24h i 72h różnicowanie). Analiza różnicowej ekspresji genów na etapie 24-godzinnego różnicowania wykazała istotną zmianę ekspresji mniejszej liczby genów (397) niż na etapie proliferacji (1133 genów) i czy różnicowania 72-godzinnego (1630 genów). Doktorantka dokonała bardzo wnikliwej analizy najbardziej istotnych genów ulegających podwyższonej i obniżonej ekspresji i umiejętnie odniosła funkcje tych genów dla kluczowych procesów proliferacji i miogenezy. Świadczy to o jej dużym przygotowaniu merytorycznym w zakresie molekularnych mechanizmów regulujących proces miogenezy. Analiza RNA-Seq nie wykazała zmian w ekspresji genów markerowych *PAX7*, *MYF5*, *MYOD*, *MYF6* i *MYOG* i dopiero wykonanie a qPCR wykazało kilka istotnych różnic. Jak można z punktu widzenia metodologicznego wytłumaczyć te rozbieżności pomiędzy RNA-Seq i qPCR? Ciekawym wynikiem jest wzrost ekspresji genów *PAX7*, *MYF5* i *MYOG* w fazie proliferacji, co wskazuje, że kokultura powoduje wcześniejszy program różnicowania, co obserwowano także na poziomie białka poprzez pomiar ilości miozyny szkieletowej (MyHC) w fazie proliferacji. W podsumowaniu napisano, że obserwowano zwiększoną ekspresję genów wczesnego różnicowania, takich jak *EGR1*, *IL6*, *EYA2*, *NR4A1* czy *SOCS3* na etapie proliferacji. Należy jednak mieć na uwadze, że geny te nie stanowią klasycznych markerów kolejnych etapów miogenezy a dodatkowo, gen *SOCS3* słabo zvalidował się w metodzie qPCR ($R^2 < 0,32$).

Kolejnym etapem pracy doktorskiej nad oceną parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych było rozszerzenie badań o zastosowanie modelu hodowli 3D. Takie podejście pozwala na badanie komórek w warunkach lepiej odzwierciedlających ich przestrzenne oddziaływanie. W tej części badań do izolacji i oczyszczania komórek zastosowano metodę FACS, umożliwiającą uzyskanie lepiej zdefiniowanej populacji komórek. Stanowi to

wzmocnienie podejścia metodycznego w porównaniu z wcześniejszym etapem badań, w którym populację komórek satelitarnych wzbogacano na podstawie różnic w ich zdolności adhezji. Dokonano charakterystyki hodowli stosując barwienia przyżyciowe i wykonując analizy metaboliczne przez oznaczenie kluczowych metabolitów: glukozy, kwasu mlekowego, glutamianu oraz glutaminy. Do analizy ekspresji markerów miogenezy wykorzystano 11 genów, z czego 5 (*PAX7*, *MYF5*, *MYOD*, *MYOG* i *EGR1*) wykazywało różnice w ekspresji między monokulturą i kokulturą. Na rycinie 4 w publikacji i ryciną 13 w pracy doktorskiej dla genu *PAX3* słupki na wykresach są pokazane w innej kolejności niż w przypadku pozostałych genów, co trochę może utrudniać analizę. Podawanie dokładnych wartości p również dla porównań nieistotnych statystycznie nie jest błędem, jednak zastosowanie identycznego sposobu graficznego oznaczania wszystkich porównań (w publikacji) utrudnia szybką interpretację wyników. Bardziej czytelne byłoby oznaczenie porównań nieistotnych jako „ns”. Legendy do rycin mogłyby być bardziej precyzyjnie opisane i zawierać kompletne informacje dotyczące analizy statystycznej, w tym przyjęty poziom istotności statystycznej. Uzyskane wyniki potwierdziły jak w przypadku hodowli 2D korzystny wpływ fibroblastów na aktywację programu miogenicznego. W kokulturze obserwowano zwiększoną ekspresję genów kluczowych dla regulatorów aktywacji i wczesnych etapów miogenezy przy braku istotnych zmian ekspresji genów związanych z późniejszymi etapami różnicowania i funkcjonowaniem komórek mięśniowych. Jednakże nie można traktować genów *SOCS3* i *IL6* jako typowych markerów dojrzałego mięśnia szkieletowego, jak napisano w konkluzjach do publikacji 3.

Rozprawę dokorską kończy rozdział *Wnioski*, w którym sformułowano 7 kluczowych wniosków. Wnioski 1 i 2 są tematycznie bardzo zbliżone i częściowo powielają te same informacje dotyczące wpływu rodzaju surowicy oraz dodatku czynnika mitogennego na proliferację komórek. Wydaje się, że zasadne byłoby ich połączenie w jeden, bardziej syntetyczny wniosek. Wniosek 8 wymagałby przeredagowania, gdyż sformułowanie „Wykorzystanie sygnałów parakrynnych” brzmi jakby same sygnały były już gotowym narzędziem technologicznym. Lepsze byłoby sformułowanie „Wiedza na temat roli sygnałów parakrynnych” i bez założenia, że „z sukcesem”. Wartościowym elementem pracy doktorskiej jest umieszczenie krótkiego rozdziału o ograniczeniach i przyszłych kierunkach badań. Warto podkreślić, że nakreślenie nowego kierunku badań nad wpływem fibroblastowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na modulację procesów miogenezy bydłych komórek satelitarnych już się realizuje w postaci grantu kierowanego przez Doktorantkę.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane za pomocą adekwatnych i nowoczesnych metod badawczych. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań i bardzo dobrze poradziła sobie z interpretacją i opisem wielu szczegółowych wyników. Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i stanowi istotny wkład w badania nad poznaniem molekularnych aspektów miogenezy *in vitro* bydła. Uzyskane wyniki są niezwykle ważne ze względów poznawczych i otwierają nowe perspektywy badań w zakresie opracowania nowych metod



produkcji „mięsa komórkowego”. Na uznanie zasługuje także opublikowanie wyników badań w prestiżowych czasopismach naukowych. Warto podkreślić, że dwa z nich są uznanymi czasopismami o profilu biologicznym, co wskazuje na szerszy niż wyłącznie zootechniczny wymiar przeprowadzonych badań. Pokazano, że badania wykorzystujące materiał pochodzący od zwierząt gospodarskich mogą nie tylko odpowiadać na pytania istotne z punktu widzenia nauk zootechnicznych, ale również służyć poznawaniu uniwersalnych mechanizmów biologicznych. Przedstawiona rozprawa doktorska dobrze ilustruje takie podejście, łącząc zagadnienia z zakresu transkryptomiki, biologii komórki, regulacji proliferacji i różnicowania oraz oddziaływań międzykomórkowych z ich potencjalnym zastosowaniem w rozwijającym się obszarze produkcji mięsa hodowanego *in vitro*.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy w kierunku otrzymywania mięsa technikami in vitro*” autorstwa Pani mgr inż. Karoliny Zygmunt spełnia wszystkie wymogi formalne określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki (PIB) w Balicach o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Zygmunt do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę szeroki zakres i wysoki poziom przeprowadzonych badań, duże walory poznawcze uzyskanych wyników oraz fakt ich opublikowania w prestiżowych czasopismach naukowych wnoszę również o wyróżnienie rozprawy.



Signed by /
Podpisano przez:

Izabela Maria
Szczerebal

Date / Data:
2026-09-07 11:29

Poznań, dn. 7 września 2026r.

/~ prof. dr hab. Izabela Szczerebal/