

Prof. dr hab. Alina Gajewska

Zakład Fizjologii Zwierząt

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego, PAN

Jabłonna k Warszawy

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Jaśminy Bałaban zatytułowanej „**Wpływ tlenku grafenu i wybranych białek na funkcjonalno-morfologiczne cechy komórek mięśniowych. Badania modelowe**”, wykonanej pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Ewy Sawosz-Chwalibóg oraz promotora pomocniczego Pana dr hab. Mariusza Wierzbickiego w Katedrze Nanobiotechnologii Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

I. Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z: (i) trzech publikacji oryginalnych o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) wynoszącym 12,543, które ukazały się w latach 2020-2023 i w których Pani mgr inż. Jaśmina Bałaban jest pierwszym autorem oraz (ii) powstałego na podstawie wyników własnych badań opracowania w języku polskim, zawierającego: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji oryginalnych wchodzących w skład rozprawy, wstęp, opis wykorzystanych materiałów i metod badawczych wraz z wykazem zastosowanej aparatury, omówienie wyników, wnioski, podsumowanie badań oraz bibliografię.

Publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy są:

1. Praca oryginalna: **Jaśmina Bałaban**, Mateusz Wierzbicki., Marlena Zielińska, Jarosław Szczepaniak, Malwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Dominik Cysewski, Piotr Koczoń, Andre Chwalibog, Ewa Sawosz. „*Effects of graphene oxide nanofilm and chicken embryo muscle extract on muscle progenitor cell differentiation and contraction*”. *Molecules* 2020;25(8):1991. IF=4,412. Liczba punktów MEiN 140

2. Praca oryginalna: **Jaśmina Bałaban**, Marlena Zielińska, Mateusz Wierzbicki, Teresa Ostaszewska, Magdalena Fajkowska, Małgorzata Rzepakowska, Karolina Daniluk, Malwina Sosnowska, Andre Chwalibog, Ewa Sawosz. „*Effect of muscle extract and graphene oxide on muscle structure of chicken embryos*”. *Animals* 2021;11(12):3467. IF=3.231. Liczba punktów MEiN 100

3. Praca oryginalna: Jaśmina Bałaban, Marlena Zielińska-Górska, Malwina Sosnowska, Karolina Daniłuk, Sławomir Jaworski, Piotr Koczoń, Dominik Cysewski, Andre Chwalibog, Ewa Sawosz. „*Graphene oxide decreases pro-inflammatory protein production in skeletal muscle cells exposed to SARS-CoV2 spike protein*”. *Nanotechnology. Science and Applications* 2023;16:1-18. IF=4,9. Liczba punktów MEiN 200.

Wszyscy współautorzy dołączyli do każdej publikacji pisemne oświadczenia, w których szczegółowo określili zakres swego indywidualnego wkładu w wykonanie badań i przygotowanie manuskryptów do druku. Pani mgr inż. Jaśmina Bałaban uczestniczyła we wszystkich etapach przygotowania każdej publikacji wchodzącej w skład ocenianej rozprawy. Jej udział dotyczył: opracowania planu i metodyki badań, wykonania doświadczeń oraz analizy statystycznej wraz z interpretacją i opracowaniem uzyskanych wyników, jak też przygotowania tekstów manuskryptów.

Układ ocenianej rozprawy spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim powstałym na podstawie własnych badań eksperymentalnych. Wszechstronne merytoryczne zaangażowanie Pani mgr inż. Jaśminy Bałaban w przygotowanie powyższych publikacji w mojej ocenie w pełni uzasadnia ich łączne przedstawienie jako części Jej rozprawy doktorskiej.

II. Ocena merytoryczna rozprawy

Podejmując badania koncentrujące się wokół wybranych aspektów aktywności tkanki mięśniowej poddanej oddziaływaniu specyficznego nanomateriału w postaci tlenku grafenu, Doktorantka skupiła się na zagadnieniach dotyczących: (i) różnicowania i dojrzewania funkcjonalnego komórek mięśniowych; (ii) modyfikacji procesu rozwoju i kształtowania się struktury mięśnia prążkowanego w fazie embrionalnej oraz (iii) potencjalnego zaangażowania tkanki mięśniowej w indukcję zjawiska burzy cytokinowej. W tym celu przeprowadziła trzy starannie przemyślane doświadczenia dotyczące: (i) udziału tlenku grafenu jako modulatora oddziaływania białek wyizolowanych z mięśni kończyny tylnej 18 dniowego zarodka kurczęcia na aktywność i różnicowanie w warunkach *in vitro* mięśniowych komórek progenitorowych wyizolowanych z mięśni kończyny tylnej 8-dniowych zarodków kurczących; (ii) wpływu tlenku grafenu i jego kompleksu z białkami wyizolowanymi z 18-dniowego zarodka kurczęcia linii Ross 308 na rozwój jego mięśni kończyny tylnej w warunkach *in ovo* w 20 dniu rozwoju, jak też, na aktywność wyizolowanych w 9 dniu rozwoju komórek progenitorowych w hodowli *in vitro*; (iii) identyfikacji receptora angiotensyny 2 (ACE2) w komórkach mięśniowych oraz charakterystyki ekspresji białek prozapalnych indukowanych przez białko S kolca wirusa SARS-COV-2 w ludzkich komórkach mięśniowych (linia HSkM) poddanych działaniu tlenku grafenu.

Ta nowatorska koncepcja pracy powstała pod kierunkiem promotora rozprawy Pani prof. dr hab. Ewy Sawosz-Chwalibóg, specjalistki o międzynarodowej renomie w dziedzinie nanobiotechnologii. Do realizacji zaplanowanych celów badawczych Doktorantka wykorzystwała szeroki wachlarz metod dobranych adekwatnie pod kierunkiem promotora i promotora pomocniczego Pana dr hab. Mariusza Wierzbickiego.

Część analityczna badań obejmowała: charakterystykę tlenku grafenu metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera wraz z oceną jego morfologii na podstawie obrazowania spod transmisyjnego mikroskopu elektronowego, charakterystykę proteomiczną ekstraktów przygotowanych z izolowanych mięśni kończyny tylnej zarodków kurczęcia oraz ekstraktów uzyskanych z komórek ludzkich mioblastów, przeprowadzoną metodą spektrometrii mas, hodowlę pierwotną komórek progenitorowych z mięśnia kończyny tylnej zarodka kurczęcia, hodowlę ludzkich mioblastów (HSkM), analizę morfologii komórek z zastosowaniem mikroskopii świetlnej oraz mikroskopii elektronowej skaningowej, a ich zróżnicowania metodą mikroskopii konfokalnej, analizę cytotoxyczności nanofilmu tlenku grafenu metodą testu dehydrogenazy mleczowej, charakterystykę żywotności komórek progenitorowych w hodowli pierwotnej metodą MTT oraz statusu ich proliferacji metodą kolorymetryczną (test BrdU), test hemolizy krwinek czerwonych, oznaczenia ekspresji genów metodą RT-PCR, analizy histologiczne i immunohistochemiczne, oznaczenie aktywności dysmutazy nadtlenkowej oraz analizę ekspresji czynników prozapalnych. Rozbudowane i nowoczesne instrumentarium metodyczne zastosowane w badaniach dowodzi wysokich umiejętności Doktorantki w wykonywaniu złożonych, wielokierunkowych analiz.

II.1. Część publikacyjna rozprawy

Publikacja 1. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera ujawniła niezależną od postaci (nanofilm lub roztwór) tożsamość strukturalną tlenku grafenu z zachowanymi charakterystycznymi wiązaniami między atomami węgla, tlenu i wodoru oraz obecnością powierzchniowych grup funkcyjnych. Wykonana metodą spektrometrii mas analiza proteomiczna ekstraktu eksperymentalnego (CEME), otrzymanego z wyizolowanych mięśni kończyny tylnej zarodka kurczęcia w 18-tym dniu rozwoju, wykazała obecność 1470-ciu białek, spośród których 249 było charakterystycznych dla tkanki mięśniowej. Zastosowanie narzędzi bioinformatycznych umożliwiło wyodrębnienie z tej puli 59-ciu białek uczestniczących w stymulacji różnicowania i dojrzewania strukturalnego i funkcjonalnego komórek mięśniowych w warunkach *in vitro*. W puli tej 14 białek stanowiło elementy macierzy zewnątrzkomórkowej, 20 było zaangażowanych w budowę struktury komórek oraz ich komunikację, 11 współtworzyło aparat odpowiedzialny za kurczliwość komórek mięśniowych, 6 związanych było z komunikacją

nerwową i nerwowo-mięśniową, natomiast 9 uczestniczyło w regulacji metabolizmu. W układzie *in vitro* 48-mio godzinne oddziaływanie ekstraktu CEME na mięśniowe komórki progenitorowe wyizolowane z kończyny tylnej 8-dniowych zarodków kurczących wywołało zmiany zarówno ich morfologii jak i aktywności. Mikroskopia świetlna i mikroskopia elektronowa skaningowa mięśniowych komórek progenitorowych ujawniły obecność wydłużonych, przekraczających 1000 μm długości i osiagających 10-20 μm szerokości, rozgałęzionych i krzyżujących się pod różnym kątem wielojądrzastych miotub, zlokalizowanych na szczycie gęstych warstw nieodróżnicowanych komórek. Obrazowanie konfokalne potwierdziło występowanie wielojądrowych komórek mięśniowych oraz wykazało charakterystyczne dla mięśni szkieletowych prążkowanie. Obecność ekstraktu CEME znacząco zwiększyła też indeks fuzji komórek i, w konsekwencji, tworzenie struktury wielokomórkowej. Ekstrakt CEME zaaplikowany wraz nanofilmem tlenku grafenu spowodował tworzenie nieodróżnicowanej warstwy komórek z wielojądrzastymi i bardziej uporządkowanymi przestrzennie miotubami zlokalizowanymi szczycie tej warstwy. Dodatek samego nanofilmu do hodowli skutkował silniejszym przyleganiem komórek mięśniowych do podłoża, czemu towarzyszyły zmiany w ich kształcie, w postaci licznych filopodiów i spłaszczonym pokroju. Ekstrakt CEME, podany zarówno bez, jak też w obecności nanofilmu tlenku grafenu, był kluczowym czynnikiem warunkującym wystąpienie rytmicznej kurczliwości komórek mięśniowych z częstotliwością 1,7 skurczu na minutę. Wynik ten wskazuje na to, że podczas miogenezy jedynie białkowe czynniki stymulujące decydują o indukcji fizjologicznej aktywności komórek mięśniowych. Analiza cytotoksyczności nanofilmu tlenku grafenu mierzona testem dehydrogenazy mleczajowej oraz analiza żywotności komórek przeprowadzona testem MTT nie ujawniły istotnego wpływu tej substancji, ani na integralność ich błony komórkowej, ani na zmianę ich żywotności. Zatem tlenek grafenu, okazując się nietoksycznym dla komórek mięśniowych, może być uważany za biozgodną niszę ich wzrostu. Obecność samego nanofilmu tlenku grafenu w hodowli mięśniowych komórek progenitorowych nie wpłynęła na zmiany poziomu ekspresji mRNA genów kodujących białka uczestniczące w metabolizmie komórki (*Atp5b*, *Fgf2*, *Ldh5*, *Pcna*) oraz w procesie różnicowania i dojrzewania (*Myf5*, *MyoD1*, *MyoG*, *Pax3*, *Pax7*). Obecność samego ekstraktu CEME prowadziła natomiast do podwyższenia ekspresji *Atp5b* mRNA i obniżenia poziomu *Fgf2* mRNA i *Ldh5* mRNA. Łączne oddziaływanie ekstraktu CEME i nanofilmu tlenku grafenu zwiększyło ekspresję *Atp5b* mRNA i utrzymało poziomy *Fgf2* mRNA oraz *Ldh5* mRNA na pułapie obserwowanym w obecności samego CEME. Choć po podaniu samego ekstraktu, jak i w obecności samego nanofilmu tlenku grafenu pojawiła się nasiloną transkrypcja genów *Myf5*, *MyoD1*, *MyoG*, *Pax3*, *Pax7*, to jednak intensywność tych

zmian dla każdego z badanych genów była znacząco wyższa w komórkach stymulowanych tylko przez białka ekstraktu CEME.

Publikacja 2. Analizy proteomiczna i bioinformatyczna ekstraktu białkowego uzyskanego z mięśni tylnej 18-dniowego zarodka kurczęcia, umożliwiły wyodrębnienie stu kluczowych białek związanych z: (i) procesami wzrostu różnicowania komórek mięśniowych; (ii) metabolizmem komórkowym; (iii) organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej; (iv) interakcją nerwowo-mięśniową. Zastosowanie testu BrdU w hodowli komórek progenitorowych (uzyskanych z mięśni kończyny tylnej 9-dniowego zarodka kurczęcia linii Ross 308) ujawniło stymulujący wpływ ekstraktu CEME w stężeniach 0.5%, 1%, 2% na poziom proliferacji komórek mięśniowych. Dodatek samego roztworu (100 ng/ml) tlenku grafenu nie wpłynął na ten proces, natomiast 1% i 2% roztwory CEME skompleksowane z tlenkiem grafenu znacząco zwiększyły indeks proliferacji, w porównaniu do poziomu w komórkach stymulowanych analogicznymi stężeniami samego ekstraktu CEME. Test cytotoksyczności CEME w hodowli komórek progenitorowych ujawnił toksyczne działanie samego ekstraktu CEME oraz jego kompleksu z tlenkiem grafenu tylko po ich aplikacji do hodowli komórkowej w stężeniu 10%. Nieco mniejszą toksyczność wykazywał także 5% ekstrakt CEME skompleksowany z tlenkiem grafenu. Ocena biokompatybilności nanomateriału wykonana w krwi kurczęcia metodą testu hemokompatybilności wykazała brak hemolitycznego wpływu używanych w doświadczeniu roztworów ekstraktu CEME i jego kompleksów z tlenkiem grafenu aż do stężenia 10%. Także zawiesina samego tlenku grafenu (100 ng/ml) nie indukowała zjawiska hemolizy krwinek. Wyniki potwierdziły biogodność tlenku grafenu.

W dwudziestym dniu rozwoju zarodkowego kurcząt linii Ross 308, po iniekcjach ekstraktów CEME (w stężeniach 1, 2, 5, 10%), tlenku grafenu (w stężeniu 100 ng/ml), kompleksów tlenku grafenu z ekstraktem CEME (w stężeniach 1, 2, 5, 10%) wykonanych in ovo w pierwszym dniu rozwoju zarodka, nie wystąpiły zmiany w masie jaj, zarodków, ich wątroby i serca w stosunku do odpowiednich wartości w grupie kontrolnej. Również we krwi pobranej od 20-dniowych zarodków nie stwierdzono zmian w aktywności enzymów wątrobowych: transaminazy alaninowej, fosfatazy alkalicznej, transaminazy asparaginowej; w stężeniach albuminy, globuliny, białka całkowitego, glukozy, kreatyniny oraz trójglicerydów. Jednak ocena histologiczna przekroju poprzecznego mięśni szkieletowych kończyny tylnej 20-dniowego zarodka wykazała znaczące różnice w strukturze mięśni między grupami. W grupie kontrolnej obserwowano rozległe perymysium z dużą ilością tkanki łącznej z wyraźnie widocznym endomysium i luźno upakowanymi komórkami mięśniowymi. Po stymulacji ekstraktem CEME w stężeniu 2% i 5% mięśnie były lepiej rozwinięte, komórki gęsto upakowane, z większą liczbą

jąder i mniejszą ilością tkanki łącznej. Po podaniu roztworu tlenku grafenu lub jego kompleksu z 10% ekstraktem CEME komórki mięśniowe były mniej rozwinięte, a endomysium słabiej zaznaczone. W zarodkach poddanych działaniu kompleksu tlenku grafenu z 1%, 2% i 5% ekstraktem CEME komórki mięśniowe były okrągłe i lepiej rozwinięte. Znaczny wzrost liczby komórek wystąpił w po aplikacji 2% i 5% ekstraktu CEME. Ponadto, skutkiem stymulacji przez ekstrakt CEME w stężeniu 2% było zwiększenie liczby jąder komórkowych. We wszystkich badanych grupach współczynnik proliferacji utrzymywał się na poziomie stwierdzonym w grupie kontrolnej. W żadnej z badanych grup nie pojawiły się zmiany w aktywności dysmutazy nadtlenkowej (SOD).

Publikacja 3. Po 24 godzinnej inkubacji ludzkich mioblastów w obecności tlenku grafenu (100 ppm), białka S (5µg/ml) lub ich łącznej aplikacji morfologia tych komórek w obu grupach nie różniła się. Zachowały one swój charakterystyczny wydłużony kształt, w hodowli nie pojawiła się apoptoza ani nekroza, a przylegający do komórek tlenek grafenu nie spowodował deformacji ich struktury. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej nie uwidocznilo morfologicznych zmian w obrazie aktyny, choć w obecności tlenku grafenu, a także tlenku grafenu i białka S zwiększeniu uległa jej ogólna powierzchnia w komórkach. Nie pojawiły się symptomy polimeryzacji aktyny, dezintegracji cytoszkieletu, ani sygnały wskazujące na indukcję procesów cytotoksycznych. We wszystkich czterech analizowanych grupach komórek (kontrola, komórki z tlenkiem grafenu; z białkiem S oraz z tlenkiem grafenu wraz z białkiem S) po zastosowaniu technik immunofluorescencyjnych ujawniła się stała, wysoka ekspresja receptora ACE2 na powierzchni mioblastów. Specyfika warunków eksperymentalnych nie wpłynęła, ani na zmianę całkowitej i średniej powierzchni zajmowanej przez te receptory, ani na morfologię i liczbę jąder komórkowych. Spośród 40-tu badanych białek zaangażowanych w procesy zapalne, po inkubacji ludzkich mioblastów z białkiem S nastąpił wzrost ekspresji białka adhezji międzykomórkowej (ICAM-1), białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1) oraz interleukiny-8 (IL-8). Dodatek tlenku grafenu zniwelował efekt białka S redukując ich ekspresję do poziomu występującego w grupie kontrolnej. Analiza proteomiczna wykazała, że w grupach eksperymentalnych zmiany ekspresji dotyczyły łącznie 667-miu białek, wśród których jedna trzecia należała do białek zaangażowanych w procesy komórkowe, a jedna piąta uczestniczyła w regulacji procesów metabolicznych. Ogólnie, białko S było stymulatorem ekspresji protein natomiast po dodaniu tlenku grafenu do komórek inkubowanych z białkiem S następowało obniżenie poziomu ekspresji. Jednak jej największy, dotyczący wielu białek z tej puli, spadek pojawił się po podaniu samego tlenku grafenu. Trendy zmian (przedstawione na wykresach wulkanowych) uwidocznily specyficzny dla każdego czynnika eksperymentalnego kierunek ich

wpływu na poziom ekspresji białek. Po stymulacji białkiem S ekspresja 13-stu białek wzrosła a innych 13-stu zmalała. W jednoczesnej obecności białka S i tlenku grafenu znacznie podwyższony poziom ekspresji dotyczył pięciu, a obniżony 638-miu białek. Sam tlenek grafenu zwiększył ekspresję pięciu białek redukując ją jednocześnie dla 431 innych. Spośród zbioru wszystkich białek o obniżonej ekspresji, 375 było wspólnych dla grupy z tlenkiem grafenu oraz grupy białkiem S i tlenkiem grafenu. Specyficzne dla każdej grupy badanych komórek były natomiast białka o podwyższonej ekspresji.

Największy, stymulujący wpływ białka S dotyczył pobudzenia ekspresji dziesięciu białek: deacetylazy histonowej (HDAC2), mitochondrialnego białka podobnego do stomatyny-2 (STOML-2), mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2), peroksysomalnego wielofunkcyjnego enzymu typu 2 (HSD17B4), cykloksygenazy-1 (COX-1), glikoproteiny CD59 (CD59), kalponiny-3 (CNN3), białka związanego z kaweolami 4 (CAVIN4), tytyny (TTN) oraz białka rybosomalnego 40S S3 (RPS3). W obecności tlenku grafenu efekt wywołany przez białko S był zniwelowany do poziomu w grupie kontrolnej. Odwrotny, hamujący wpływ białka S dotyczył natomiast ekspresji keratyny typu pierwszego cytoszkieletu 9 (KRT9) oraz białka homeryny (HRNR). Po dodaniu tlenku grafenu, w komórkach mioblastów nastąpił znaczący wzrost ekspresji tych białek.

Lektura publikacji wchodzących w skład ocenianej rozprawy nasunęła mi następujące pytania:

1. Na jakiej podstawie dokonano wyboru zastosowanych w badaniach stężenia tlenku grafenu (100pp) oraz stężenia białka S (5µg/ml): czy zostały one ustalone na podstawie wcześniejszych badań własnych zespołu, czy wybrano je na podstawie danych z piśmiennictwa? Takiej informacji nie znalazłam, ani w załączonych pracach, ani w opracowaniu w języku polskim.
2. Na podstawie wyników swych badań Doktorantka wskazuje na szczególny aplikacyjny potencjał tlenku grafenu w zakresie szeroko pojmowanej inżynierii tkankowej. Czy w dostępnym piśmiennictwie specjalistycznym pojawiły się już informacje o wykorzystywaniu tego nanomateriału w praktyce, na przykład do wspierania procesów regeneracyjnych w organizmie? Proszę o krótki komentarz dotyczący aktualnego stanu wiedzy w tym zakresie.
3. W komórkach progenitorowych mięśni, hodowanych przez 96 godzin w obecności nanofilmu tlenku grafenu, związek ten nie ujawnił właściwości cytotoksycznych. Czy są dane dotyczące retencji tego typu nanomateriałów w organizmie ssaków, jak też oceny ich potencjalnej cytotoksyczności w modelu *in vivo* przy, hipotetycznie, znacznie dłuższym i zróżnicowanym komórkowo kontakcie z nanomateriałem?

4. Część badań Doktorantki skupiała się wokół wpływu specyficznego koktajlu białkowego (CEME) oraz tlenku grafenu na wybrane cechy strukturalne i funkcjonalne komórek macierzystych wyizolowanych z mięśni szkieletowych. Czy są badania o podobnym charakterze, lecz skoncentrowane na właściwościach komórek macierzystych mięśnia sercowego?
5. W tabeli 1 (*Nanotechnology. Science and Applications*, 2023) zawarta jest m.in. informacja o liczbie białek, które w ludzkich mioblastach wykazały nasiloną ekspresję w obecności samego tlenku grafenu (5 białek) oraz tlenku grafenu podanego łącznie z białkiem S (5 białek). Czy wiadomo już jakie to są białka?
6. W jaki sposób uzyskuje się precyzję (specyficzność) substratową korony białkowej tlenku grafenu w zakresie dostarczania bądź usuwania białek z komórek?

II.2. Opracowanie w języku polskim

Tekst opracowania rozpoczyna się **Streszczeniem** w języku polskim i **Abstraktem** w języku angielskim. Oba rozdziały zostały przygotowane zgodnie z kanonem przygotowania tego typu tekstu naukowego i zawierają syntetycznie ujęte informacje o założeniach badawczych, celu badań, materiale badawczym, wynikach oraz wnioskach.

Wstęp. W pięciostronicowym rozdziale Doktorantka syntetycznie zaprezentowała najważniejsze aspekty zagadnień naukowych leżących u podstaw podjętych badań. Rozpoczynając od charakterystyki tlenku grafenu jako nanomateriału węglowego o spodziewanej wysokiej biogodności, wskazuje następnie na jego potencjał do pełnienia funkcji mimicznej macierzy zewnątrzkomórkowej, jak też pełnienia roli nośnika w systemie dwukierunkowego transportu białek w organizmie. Zwięźle przedstawia proces różnicowania mięśniowych komórek progenitorowych w procesie biogenezy, a następnie wskazuje na stymulujące działanie ekstraktów białkowych na proliferację i tempo różnicowania komórek miogennych w warunkach *in vitro*. Zwraca uwagę na potencjał stymulacyjny - dotychczas nie stosowanego w takich badaniach - ekstraktu białkowego z mięśni kończyny tylnej zarodka kury przybliżając tym samym jeden z kluczowych czynników zastosowanych w przeprowadzonych eksperymentach własnych. Cały opis umieszcza w kontekście zastosowań nanomateriałów i czynników wzrostu w inżynierii tkankowej. W kolejnej partii tekstu Doktorantka skupia się na badaniach własnych charakteryzując założenia i cele badawcze jakie zostały przyjęte w doświadczeniu pierwszym i syntetycznie rekapitułuje uzyskane wyniki. Następnie wskazuje na potencjał egzogenego białkowego wspomaganie *in ovo* umożliwiającego dostarczanie do rozwijających się zarodków czynników wspierających proces prawidłowego rozwoju mięśni kury. Wskazuje na fizyczne właściwości tlenku grafenu umożliwiające tworzenie korony białkowej i wykorzystywanie tego

nanomateriału do transportu egzogennych białek do komórek. Kończąc ten fragment tekstu powraca do badań własnych podając cele badawcze i najważniejsze wyniki jakie uzyskała w doświadczeniu drugim. Przechodząc do zjawiska pandemii COVID-19 krótko charakteryzuje typowe dla tej choroby zjawisko burzy cytokinowej, a następnie wskazuje na zidentyfikowaną m.in w komórkach mięśni gładkich, perycytach i komórkach satelitarnych mięśni człowieka ekspresję mRNA transbłonowej proteazy serynowej enzymu konwertującego angiotensynę II. Wyjaśnia, że taki profil ekspresji stwarza biologiczną podstawę do wniknięcia wirusa SARS-COV-2 do organizmu przez receptory ACE2 zlokalizowane także w tkance mięśniowej. Biorąc pod uwagę fakt, że tkanka ta stanowi ponad 50% białek organizmu, może ona, nawet przy niskiej syntezie cytokin w poszczególnych komórkach, zapewnić łącznie wydatną podaż białek prozapalnych i, w konsekwencji, znacząco przyczyniać się do indukcji zjawiska burzy cytokinowej. W dalszej części Doktorantka odnosi się do metod ograniczania tego zjawiska i wskazuje na tlenek grafenu jako supercienki materiał węglowy odznaczający się potencjałem do wiązania na swej powierzchni m.in. białek cytokin indukowanych w przebiegu choroby COVID-19. W końcowym fragmencie rozdziału Doktorantka podaje założenia, cel badań, jak też komentuje najważniejsze wyniki własne uzyskane w doświadczeniu trzecim.

Rozdział „Wstęp” powstał z wykorzystaniem 25 publikacji, z których 11 stanowią prace opublikowane w latach 2020-2022. Choć jest bardzo zwięzłą prezentacją merytorycznego tła rozprawy, to logicznie uzasadnia wybór podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej.

Uwagi.

1. W rozdziale tym Doktorantka komentuje wyniki własne, które przedstawione będą dopiero w rozdziale „Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych”. Tymczasem rozdział „Wstęp” powinien charakteryzować jedynie merytoryczne tło podjętych badań i w logiczny sposób uzasadniać przyjęte założenia badawcze. Antycypowanie wyników w tekście, którego zadaniem jest przekonanie czytelnika co do zasadności zaplanowanych prac doświadczalnych, nie jest właściwe.

2. W rozdziale brak jest sformułowanej hipotezy badawczej będącej z założenia kluczowym zwornikiem koncepcyjnym badań. Dopiero następnym krokiem powinno być określenie celów badawczych służących jej weryfikacji. W mojej ocenie, cele badawcze, które Doktorantka sformułowała w rozdziale Wstęp powinny być, wraz z hipotezą badawczą, wyodrębnione w osobnym rozdziale. Dzięki takiej strukturyzacji cały tekst opracowania w języku polskim zyskałby na przejrzystości.

Materiały. Rozdział liczy dwie strony i zawiera: charakterystykę: (i) tlenku grafenu z uwzględnieniem użytych w doświadczeniach jego form nanofilmu oraz zawiesiny w kompleksie z ekstraktem białkowym; (ii) opis otrzymywania wodnego ekstraktu mięśni kończyny tylnej 18-dniowego zarodka kurczęcia; (iii) opis zastosowanych hodowli komórek progenitorowych izolowanych z 8/9-dniowych zarodków kurczących oraz hodowli nienowotworowych komórek ludzkich mioblastów; (iv) informacje o użytych w badaniach zarodkach kurzych; (v) informacje o formie użytego białku S kolca wirusa SARS-COV-2 (białko o pełnej długości z zachowaną strukturą trzech podjednostek). Dodatkowo, rozdział zawiera schemat trzech wykonanych doświadczeń, z uwzględnieniem wykorzystanych w nich materiałów i modeli badawczych. Tekst dostarcza najważniejszych informacji o wykorzystanych materiałach, a ich bardziej szczegółowy opis zawierają trzy publikacje wchodzące w skład ocenianej rozprawy.

Metody. Rozdział zwięźle przedstawia zastosowane procedury analityczne. Należą do nich: spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera oraz elektronowa mikroskopia transmisyjna zastosowana do charakterystyki tlenku grafenu; spektrometria mas z zastosowaniem platformy Max-Quant 1.6.3.4 wykorzystana do charakterystyki profilu białkowego wodnego ekstraktu z mięśni zarodków kurczących; mikroskopia świetlna, elektronowa, skaningowa i konfokalna oraz metoda immunochemiluminescencyjna wykorzystane do określenia morfologii i ekspresji białek w komórkach progenitorowych i komórkach HSkM; metoda kolorymetryczna do oceny żywotności komórek, test ELSA BrdU do oznaczenia proliferacji komórek; metoda qRT-PCR do oznaczania ekspresji mRNA; metoda immunohistochemiczna służąca identyfikacji jądrowego antygenu komórek proliferujących; test SOD do oznaczania aktywności dysmutazy nadtlenkowej oraz test hemolizy krwinek czerwonych. Rozdział kończy informacja o statystycznej analizie danych. Zaprezentowany tekst jest przekonującą, zgodną z danymi zamieszczonymi w publikacjach oryginalnych, prezentacją zastosowanego warsztatu analitycznego. Dokładny opis metodyki zawierają trzy prace z wynikami oryginalnymi.

Uwagi.

1. Informacja o analizie statystycznej danych nie jest precyzyjna. W pracy 1 (*Molecules*, 2020) i w pracy 2 (*Animals*, 2021) oprócz jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, zastosowany był też test post-hoc Tukey'a.

Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych. Rozdział liczy szesnaście stron i jest najdłuższą częścią opracowania. Struktura tekstu ściśle odzwierciedla podział badań na trzy eksperymenty. Tekst jest wzbogacony o pochodzące z publikacji oryginalnych tabele, ryciny

i zdjęcia spod mikroskopu. Wyczerpująco przedstawia najważniejsze wyniki obejmujące wszystkie aspekty przeprowadzonych analiz.

Uwagi.

1. W mojej opinii, oceniany rozdział nie ma charakteru zapowiadanego w tytule „omówienia wyników”, gdyż opisując rezultaty swych badań Doktorantka nie komentuje ich na tle dostępnego piśmiennictwa.

2. Wzmianka o wynikach innych niż własne pojawia się jedynie we fragmencie dotyczącym prezentacji części danych z doświadczenia trzeciego. Doktorantka podając tu informacje o badaniach na ludziach i myszach (strona 38-39 opracowania) nie podaje źródeł literaturowych, co należy uznać za poważny błąd formalny.

2. Czytelnik może być rozczarowany faktem, że Doktorantka nie podjęła w tym rozdziale nawet próby wprowadzenia narracji integrującej otrzymane wyniki, Wrażenie „tekstu technicznego” potęguje przy tym fakt, że są one referowane pod winietami „Doświadczenie I, II, III”, zamiast pod odpowiednimi tytułami odnoszącymi się do problematyki, jakiej dotyczyły poszczególne eksperymenty.

3. Nie jest zrozumiałe, dlaczego w rozdziale poświęconym wynikom Doktorantka powtarza informacje dotyczące celów badań i zastosowanych schematów doświadczeń.

Wnioski. Rozdział nie został przygotowany odpowiednio do standardu opracowania tego elementu tekstu naukowego, zgodnie z którym powinien on zawierać jedynie zwięźle sformułowane wnioski odnoszące się do przyjętych w badaniach hipotez. Niezrozumiały jest więc powód, dla którego zawarte są w nim także trzy, bez mała jednostronicowe, opisy poszczególnych doświadczeń, w których Doktorantka ponownie wyszczególnia cele badawcze i w formie skróconej przytacza uzyskane wyniki. W rozdziale brak jest końcowych, syntetycznych konkluzji płynących z badań. Wypunktowane stwierdzenia, zamieszczone pod każdym z opisów doświadczeń, w mojej ocenie, nie są wnioskami z badań, lecz stanowią jedynie zrekapitulowane obserwacje badawcze.

Podsumowanie. Ostatni fragment opracowania jest jednostronicową, bez odnośników do danych z piśmiennictwa syntezą najważniejszych obserwacji eksperymentalnych.

Uwagi.

1. Zaskakująca jest kompozycja tekstu, w której podsumowanie badań jest zamieszczone po, a nie przed rozdziałem Wnioski.

2. Wnikliwą analizę swych danych Doktorantka przygotowała jedynie w trzech publikacjach oryginalnych, a w opracowaniu w języku polskim zrezygnowała z przedstawienia skonfrontowanego z danymi z piśmiennictwa komentarza, który umiejętnie podkreślałby aspekty fizjologiczne i aplikacyjne uzyskanych wyników. W mojej opinii brak takiego tekstu utrudnia czytelnikowi uchwycenie zintegrowanego obrazu badań Doktorantki i w konsekwencji obniża naukowy walor opracowania.

Bibliografia. Spis literatury zawiera 28 pozycji, spośród których 12 to prace opublikowane w ostatnich pięciu latach (2018-2022).

Uwagi.

1. Bibliografia nie odzwierciedla rzeczywistej liczby prac zacytowanych w tekście opracowania, gdyż w tekście brak jest następujących, zamieszczonych w spisie prac: Tan et al., 2021 (pozycja 7), Asfour et al., 2018 (pozycja 12), Valdez et al., 2000 (pozycja 13).

III. Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne, logicznie skonstruowane dzieło naukowe, którego powstanie wymagało od Doktorantki nabycia wiedzy w zakresie teoretycznych podstaw swoich badań, umiejętności formułowania celów i zadań badawczych, opanowania nowoczesnych technik analitycznych i dokonania odpowiedniej interpretacji otrzymanych z ich wykorzystaniem danych, a także wykazania się zdolnością do opracowania i przygotowania publikacji do druku.

W serii wnikliwych badań Doktoranta wykazała:

- (i) stymulujące oddziaływanie ekstraktu białkowego CEME na proces miogenezy komórek progenitorowych mięśnia kończyny tylnej zarodka kurczęcia;
- (ii) udział białek ekstraktu CEME (bez oraz w obecności tlenku grafenu) w indukcji samoistnej, rytmicznej kurczliwości komórek mięśniowych z częstotliwością 1,7 skurczu na minutę;
- (iii) użyteczność tlenku grafenu (w formie nanofilmu) w tworzeniu niszy ułatwiającej zasiedlanie komórek progenitorowych w warunkach *in vitro*;
- (iv) niewrażliwość komórek progenitorowych na obecność tlenku grafenu w hodowli *in vitro* w kontekście utrzymania żywotności i zdolności do procesu różnicowania tych komorek;
- (v) biogodność tlenku grafenu podtrzymującego prawidłowy rozwój, masę ciała, parametry biochemiczne krwi i żywotność zarodków kurczących *in ovo*;
- (vi) stymulujące oddziaływanie egzogenego ekstraktu CEME na strukturę mięśni szkieletowych zarodka *in ovo*;

- (vii) obecność receptora konwertazy angiotensyny 2 (ACE2) w nienotworowych komórkach ludzkich mioblastów;
- (viii) prozapalną aktywność białka S kolca wirusa SARS-COV2 w komórkach ludzkich mioblastów *in vitro* przez stymulację syntezy białek ICAM-1, MCP-1 oraz IL-8 uczestniczących w zjawisku burzy cytokinowej;
- (ix) zdolność tlenku grafenu do redukcji poziomu białek prozapalnych indukowanych przez białko S w komórkach ludzkich mioblastów.

Choć całość badań Doktorantki odznacza się wysokim walorem poznawczym, to warto wyróżnić pionierskie obserwacje *in vitro* dotyczące samoistnej aktywności skurczowej prekursorowych komórek mięśniowych wraz z udokumentowaniem prorozwojowej roli tlenku grafenu w formowaniu korzystnej niszy, w której zasiedlone komórki, w obecności specyficznego ekstraktu białkowego, uzyskują swą dojrzałość funkcjonalną. Równie cennym osiągnięciem jest włączenie tkanki mięśniowej do grona biologicznych wrót, sprzyjających wzbudzeniu i intensyfikacji niebezpiecznego dla organizmu zjawiska burzy cytokinowej, jak też uzyskanie po raz pierwszy eksperymentalnych przesłanek wskazujących na potencjał tlenku grafenu w redukcji prozapalnego działania białka S kolca wirusa SARS-COV2 w komórkach ludzkich mioblastów.

Słabszą częścią ocenianej rozprawy jest opracowane w języku polskim. Doktorantka nie ustrzegła się kilkukrotnych powtórzeń dotyczących sformułowanych celów badań i zastosowanych schematów badawczych, co niekorzystnie wpłynęło na klarowność całego opracowania. Zastrzeżenia budzi też jego kompozycja oraz przygotowany niezgodnie ze standardem rozdział Wnioski.

Zgłoszone przeze mnie uwagi krytyczne nie kwestionują żadnego eksperymentalnego aspektu przeprowadzonych badań, lecz dotyczą wyłącznie niedociągnięć opracowania w języku polskim. Uwagi te traktuję jako wskazówki dla Doktorantki do wykorzystania w dalszej pracy naukowej. Nie przeważają one mojej ogólnej wysokiej oceny omawianego dzieła naukowego. Wnioskując na podstawie przekazanej mi do oceny rozprawy doktorskiej oceniam, że Pani mgr inż. Jaśmina Bałaban jest merytorycznie przygotowana do samodzielnej pracy badawczej.

IV. Wniosek końcowy

Uwzględniając wymóg dokonania oceny indywidualnego wkładu Doktorantki w powstaniu publikacji wchodzących w skład przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej, po zapoznaniu się z pisemnymi oświadczeniami złożonymi przez wszystkich współautorów każdej z nich, w których jednoznacznie potwierdzają oni wiodący udział Doktorantki przy planowaniu i wykonaniu pracy eksperymentalnej oraz całościowym

opracowaniu otrzymanych wyników i przygotowaniu publikacji do druku oceniam, że indywidualny, twórczy wkład Pani mgr inż. Jaśminy Bałaban w zakresie wykonanej pracy koncepcyjnej, eksperymentalnej i edytorskiej jest wystarczający do uznania jej za Autorkę przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Reasumując pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana: „*Wpływ tlenku grafenu i wybranych białek na funkcjonalno-morfologiczne cechy komórek mięśniowych. Badania modelowe*” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023 r. poz. 742). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z prośbą o dopuszczenie Pani mgr inż. Jaśminy Bałaban do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Pani mgr inż. Jaśmina Bałaban przedstawiła pionierskie dane, które po raz pierwszy zobrazowały potencjał tlenku grafenu jako substancji ułatwiającej dojrzewanie funkcjonalne mięśniowych komórek progenitorowych w warunkach *in vitro* oraz jako substancji umożliwiającej redukcję poziomu białek prozapalnych w komórkach ludzkich mioblastów zainfekowanych białkiem S kolca wirusa SARS-COV2. Mając na względzie wyróżniającą, wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, które ukazały się w renomowanych czasopismach specjalistycznych, a także ich znaczący potencjał aplikacyjny wnoszę też o wyróżnienia tej rozprawy.



Prof. dr hab. Alina Gajewska

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2024 -04- 12
WYPŁYNEŁO DNIA -5-


RPL/10170/2024 N
Data: 2024-04-12

Pani Marta Szaryńska

Sekretariat Instytutu Biologii SGGW,

02-746 Warszawa

ul. Nowoursynowska 159

PRIO
PRIORITAIRE

