

Prof. dr hab. Krzysztof Zabłocki

Instytut Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

k.zablocki@nencki.edu.pl

Warszawa, 19 czerwca 2021r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Kobuszewskiej zatytułowanej „Mikrosystemy przepływowe typu Lab-on-a-Chip do badania niedotlenienia komórek mięśnia sercowego”, wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierownictwem promotora dr hab. inż. Elżbiety Jastrzębskiej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy zagadnienie ważnego nie tylko z poznawczego ale także klinicznego punktu widzenia. Zawarte w rozprawie wyniki badań mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia biochemicznych podstaw wielu chorób a także, co szczególnie interesujące, mogą mieć znaczenie w rozwoju medycyny regeneracyjnej. Opracowanie nowatorskich modeli badawczych możliwie najwierniej oddających sytuację *in vivo* jest kluczowe w tym kontekście. Cel pracy uważam za właściwy i wart zrealizowania tym bardziej, że Doktorantka koncentruje się na badaniach dotyczących potencjalnego leczenia zmian w mięśniu sercowym. Zaplanowane przez Doktorantkę badania mają niewątpliwą wartość nie tylko poznawczą ale też, a może przede wszystkim, potencjalnie aplikacyjną szczególnie w kontekście niedotlenienia mięśnia sercowego, co ma miejsce np. w przypadkach utonięć, zatruc lub zadławienia lub niedokrwienia w przypadku zatrzymania krążenia. Ze względu na to, że zaburzenia sercowo-naczyniowe są pierwszą przyczyną zgonów w krajach wysokorozwiniętych podejmowanie takich badań jest wysoce pożądane.

Rozprawa jest starannie przygotowana i zgodnie z ogólnymi zasadami jest podzielona na kilka głównych rozdziałów zatytułowanych jak następuje: Wykaz skrótów, Przegląd Literaturowy, Praca badawcza wraz z opisanymi metodami, Podsumowanie i wnioski, Literatura (166 pozycji), Podziękowania i Dorobek Naukowy. Większość tych rozdziałów jest podzielona na podrozdziały dotyczące bardziej szczegółowo zdefiniowanych zagadnień. Całość jest poprzedzona streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Praca doktorska Pani Anny Kobuszewskiej obejmuje dwie dyscypliny, a przez to zawiera dwa istotne i przenikające się wątki. Pierwszy z nich to wątek „chemiczno-inżynierski” dotyczący optymalizacji mikroskalowej hodowli komórek w systemie 3D, a zatem stworzenia warunków możliwie blisko oddających sytuację *in vivo*. Drugi wątek dotyczy badań biochemicznych wykonanych z wykorzystaniem komórek serca w hodowlach prowadzonych w omawianych mikrosystemach i porównywanych do tradycyjnej hodowli 2D stanowiących punkt odniesienia. Ponadto, Doktorantka wprowadziła do swoich badań hodowle niejednorodne zawierające komórki serca i mezenchymalne komórki macierzyste. Celem tych doświadczeń było porównanie odpowiedzi komórek rosnących w różnych systemach hodowlanych na stres spowodowany zaburzeniem oksydacyjnej fosforylacji. A

zatem badania biologiczne były pomyślane jako sposób przetestowania użyteczności stworzonych układów hodowlanych.

Dokładny opis różnych metod otrzymywania stosownych podłoży z wykorzystaniem odpowiednich polimerów oraz omówienie warunków fizycznych jakie muszą być uzyskane by zapewnić łatwość wymiany gazowej oraz szybkość dyfuzji oraz opisy przebiegu doświadczeń typu *Lab-on-a-chip* z wykorzystaniem stworzonych układów świadczą o kompetencji doktorantki. Nie jestem ekspertem w dziedzinie inżynierii chemicznej i chemii polimerów, stąd jestem powściągliwy w ocenie tego aspektu pracy pozostawiając to specjalistom. Dlatego w dalszej części recenzji skupiam się na biologicznym aspekcie rozprawy.

W rozdziale zatytułowanym Przegląd Literaturowy Doktorantka omówiła wszystkie zagadnienia poruszane w części doświadczalnej począwszy od krótkiego opisu chorób sercowo naczyniowych i możliwości ich leczenia, poprzez omówienie modeli komórkowych wykorzystywanych w takich badaniach, zaawansowanych technik hodowlanych z naciskiem na mikrosystemy przepływowe i wreszcie podejść doświadczalnych w celu symulacji zaburzeń charakterystycznych dla niedotlenienia.

W kolejnym podrozdziale Przeglądu Literaturowego Doktorantka koncentruje się na omówieniu stosowanych dotychczas podejściach metodycznych w badaniach prowadzonych na komórkach w warunkach niedotlenienia. Uważam, że opis ten jest wystarczająco szczegółowy by wprowadzić czytelnika w tematykę pracy. Na końcu tej części rozprawy znajduje się jej krótkie podsumowanie wskazujące na najważniejsze zagadnienie omówione w tym rozdziale.

Kolejny duży rozdział to Praca Badawcza. Rozpoczyna się podrozdziałem dotyczącym celu podjętych badań. Jest on napisany klarownie i cel pracy jakim jest zbadania przydatności mikroprzepływowego układu hodowlanego w badaniach metabolizmu komórek serca jest przedstawiony wyraźnie, chociaż Doktorantka ma tendencję do powtarzania niektórych informacji, które pojawiły się wcześniej w Przeglądzie Literaturowym. Następnie opisane są zastosowane metody badawcze, w tym wytwarzanie mikroukładów przepływowych, prowadzenie hodowli komórkowych, analiza żywotności i aktywności metabolicznej komórek i analiza statystyczna. Ta część pracy nie budzi moich zastrzeżeń, może poza drobnymi uwagami np. używamy terminu pożywka a nie medium hodowlane, raczej próbówka typu falkon a nie sam falkon (slang). Przy opisie oceniania zawartości ATP w komórkach wyrażenie „pomiar cząsteczek” czy „liczby cząsteczek” nie jest fortunny, bo przecież nikt ich nie liczy. Nie jest dla mnie oczywiste jak Doktorantka definiuje „żywotność komórek” wyznaczaną z wykorzystaniem testu Alamar Blue i chciałbym, żeby uściśliła to w czasie obrony pracy. Następnie Doktorantka przechodzi do przedstawienia wyników swoich badań, po raz kolejny przekonując w pierwszym zdaniu, że choroba niedokrwienna jest główną przyczyną zgonów wśród pacjentów cierpiących na choroby sercowo-naczyniowe i przypominając o konieczności tworzenia nowych modeli doświadczalnych. To niepotrzebne powielanie tych samych informacji. W tym punkcie chcę także zwrócić uwagę, że istnieje różnica między skutkami hipoksji (np. w skutek utonięcia) i niedokrwienia czyli ischemii (np. wskutek zatrzymania akcji serca). Doktorantka wskazuje na FCCP jako substancję wybraną w tej pracy do wywoływania zaburzenia metabolizmu mitochondriów i wyjaśnia (dość

nieśmiało i nie bardzo precyzyjnie) mechanizm działania tego protonofora. Rzecz jasna, jest to tylko jeden z modeli doświadczalnych jaki można było zastosować w pracy, ale w istocie rzeczy celem doktorantki nie było prowadzenie badań ściśle bioenergetycznych i szczegółowe analizowanie procesów biochemicznych zachodzących w mitochondriach po podaniu substancji o działaniu protonoforycznym, bo to nie byłoby w żadnym stopniu odkrywczym, a jedynie wskazanie, że proponowane układy modelowe mogą być przydatne w badaniach nad metabolizmem komórek. Dlatego pojawiające się w pracy pewne uchybienia często terminologiczne lub nie zawsze precyzyjny opis obserwowanych zjawisk mogące zwracać uwagę biochemika, w kontekście tej pracy nie są na tyle istotne by zmniejszać jej wartość i sens. Nawiasem mówiąc już sam tytuł pracy nieco mylący sugeruje, że badania prowadzono w warunkach obniżonego stężenia tlenu, co nie miało miejsca.

W podrozdziale poświęconym badaniu potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej pojawiło się kilka nieścisłości, na które jako recenzent zwracam uwagę. Np. stwierdzenie, że sonda JC-1 „gromadzi się w komórkach żywych o wysokim potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej...” nie wskazuje wprost, że znacznik ten gromadzi się w mitochondriach. Jako niefortunny skrót myślowy uznałbym też stwierdzenie, że w procesie glikolizy energia jest „wytwarzana”. Cały czas mamy bowiem do czynienia jedynie z przekształcaniem energii.

Potencjał błony mitochondrialnej obniżano przy pomocy FCCP. Doktorantka słusznie zauważa, że wybrane przez Nią stężenia FCCP są bardzo wysokie. Zgodnie z zasadami sztuki, czynnik ten powinien być miareczkowany od stężeń najniższych do takich, kiedy jego działanie jest maksymalne. To pozwala na uniknięcie niespecyficznych efektów ubocznych. W tak wysokich stężeniach poza działaniem protonoforycznym FCCP hamuje transport elektronów w łańcuchu oddechowym, co w przypadku doświadczeń skoncentrowanych na zjawiskach komórkowych byłoby efektem niepożądanym. Następnym krokiem w badaniach w makroskali było wykazanie, że rozprzęgnięciu oksydacyjnej fosforylacji towarzyszy nadmierny napływ Ca^{2+} do komórek. Rozważania na temat niedoboru ATP jako przyczyny tego zaburzenia jest są do końca uzasadnione w tym miejscu, ponieważ Doktorantka do tego momentu nie mierzyła stężenia ATP w komórkach, a rola mitochondriów w kontekście homeostazy wapniowej nie sprowadza się jedynie do fosforylacji ADP.

Kolejnym rozdziałem jest dyskusja i podsumowanie wyników opisanych do tego miejsca rozprawy, w istocie potwierdzających znane obserwacje stanowiące oczywistą podstawę rozważań bioenergetycznych. Nie jestem przekonany, czy konieczne było ich dyskutowanie w tym miejscu. Może należało wcześniej przedstawić wyniki doświadczeń wykonanych w innym układzie (mikroskala), bo dopiero porównanie tych dwóch sytuacji eksperymentalnych (makro – i mikroskala z modyfikacjami) wnosi element nowości i stanowi istotę rozprawy. Nawiasem mówiąc zgodnie ze słownikiem terminów biochemicznych prof. Bańkowskiego (Elsevier, 2011) oraz zaleceniem Polskiego Tow. Biochemicznego należy stosować termin cytosol a nie cytozol (choć ta forma jest często używana).

Kolejne podrozdziały dotyczą doświadczeń w mikrosystemie przepływowym. Odnoszę wrażenie, że znaczna część informacji tutaj zawartych mogłaby znaleźć się w opisie metod lub w dyskusji. Natomiast ważne jest to, że indukowane podaniem FCCP zmiany fluorescencji JC-1 a także intensywność odpowiedzi wapniowej kardiomiocytów szczura i człowieka mierzone w takich samych warunkach hodowli wykazują znaczne różnice;

komórki człowieka wydają się odpowiadać silniej. A zatem mikrosystem przepływowy, a nie statyczny pozwala na uchwycenie różnic między dwoma rodzajami komórek w kontekście ich wrażliwości na substancje rozprzegajającą. Jest to istotna i nowa obserwacja podkreślająca odrębność obu systemów doświadczalnych i wskazująca na zasadność stosowania układu mikroperfuzyjnego. Ten aspekt jest dobrze przedyskutowany w podrozdziale dyskusja, chociaż niepotrzebnie umieszczono w tej części pracy informacje, która powinny znaleźć się wcześniej, w podrozdziale poświęconym wynikom. Ponadto należy unikać stwierdzeń, które niczego nie wnoszą a porażają swoją oczywistością („Organizm szczurzy różni się od organizmu ludzkiego” str. 76).

W kolejnych podrozdziałach Doktorantka koncentruje się na omawianiu i dyskutowaniu cech fizyko-chemicznych różnych rodzajów podłoży oraz optymalizacji ich tworzenia, posługując się zarówno modelowaniem komputerowym jak i wynikami uzyskanymi doświadczalnie. Następnie skupia się na opisie mikrosystemu hodowlanego, w którym wykorzystano maty nanowłókniste narzucające uporządkowany układ komórek w hodowli. Doktorantka wykonała szereg doświadczeń potwierdzających, że nowostworzone podłoże jest zasiedlane przez stosowane komórki rosnące w sposób uporządkowany przypominający sytuację w tkance. Co więcej, układ stworzony przez Doktorantkę umożliwił jednoczesne prowadzenie niezależnych hodowli komórkowych oraz zakładanie hodowli mieszanych. Wykazano, że komórki serca rosnące wraz z komórkami mezenhymalnymi wykazują większy stopień uporządkowania niż w monokulturze. Podobnie jak poprzednio komórki potraktowano FCCP w dwóch różnych stężeniach, a za miarę skuteczności działania tego protonofora przyjęto zmniejszenie się zawartości ATP w komórkach. Ustalono, że warunki mikroprzepływu zwiększają skuteczność FCCP. Szkoda, że nie przedstawiono tego na jednym rysunku. Zestawianie wpływu FCCP w dwóch bardzo wysokich stężeniach dla jednego sposobu hodowli nie pokazuje tego co było celem pracy: porównanie dwóch systemów hodowlanych.

Na końcu tego podrozdziału znajduje się dyskusja zawartych w nim wyników oraz wnioski. Jest to bardzo interesujący fragment, w którym Doktorantka omawia wprowadzone przez siebie modyfikacje systemu mikroprzepływowego polegające na udoskonalaniu metody integracji z nim mat nanowłóknistych. Zalety i wady różnych kombinacji zostały dokładnie omówione, z podkreśleniem sposobu ułożenia komórek względem włókien maty oraz ich wrażliwości na czynnik rozprzegajający. Ten drugi test podkreśla przydatność systemu w badaniach metabolicznych i funkcjonalnych komórek.

Celem kolejnej serii badań było sprawdzenie, czy współhodowla komórek serca traktowanych FCCP oraz niezmiennych komórek mezenhymalnych wpływa na stan kardiomiocytów. Wstępne doświadczenia przeprowadzono w makroskali, a po ustaleniu warunków powtórzono w skali mikro w stosowanym poprzednio i nieznacznie zmodyfikowanym systemie przepływowym. Tak jak wcześniej badania poprzedzono symulacjami komputerowymi, ustalając i ujednolicając szybkości przepływu pożywki we wszystkich układach doświadczalnych. Po odpowiednich czasach inkubacji z FCCP zbadano żywotność komórek testem Alamar Blue, a po 96 godzinach także poziom ATP. Wyniki uzyskane dla współhodowli kardiomiocytów z komórkami macierzystymi sugerują ochronne działanie tych drugich, ale ciekaw jestem jak odróżniono odpowiedź kardiomiocytów od odpowiedzi komórek macierzystych. Jak zrozumiałem komórki macierzyste nie były

traktowane FCCP, a czynnik ten był podawany tylko na początku. Podrozdział ten kończy się dyskusją dotyczącą ostatnich doświadczeń, wnioskami i podsumowaniem.

Na końcu rozprawy znajduje się rozdział Podsumowanie i Wnioski obejmujący całość osiągnięcia przedstawionego w dysertacji. Doktorantka wskazuje to, co jest najważniejszym osiągnięciem Jej pracy. Jest nim niewątpliwie stworzenie nowych systemów do hodowli komórek serca w warunkach *in vitro* maksymalnie przypominających sytuację *in vivo*. Badania o charakterze biologicznym, chociaż istotne, bo potwierdzające wrażliwość komórek utrzymywanych w nowych warunkach hodowli na znane czynniki zaburzające funkcje mitochondriów, nie stanowią w tej pracy wątku wiodącego i w istocie nie prowadziły do żadnych odkryć. To co stanowi o nowatorstwie pracy to stworzenie nowego systemu hodowli kardiomiocytów i wykazanie, że zachowanie się komórek w tych warunkach nieco różni się od obserwowanego w tradycyjnych hodowlach statycznych ale nadal jest zgodne z powszechnie akceptowanym stanem wiedzy. Należy docenić, że prowadzenie badań naukowych obejmujących dwie znacznie oddalone od siebie dyscypliny jest trudne i nie sposób ustrzec się niedoskonałości, z których niektóre wskazałem w recenzji. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem w 3 pracach doświadczalnych związanych z tematyką doktoratu, opublikowanych w dobrych czasopismach. To podkreśla znaczenie prowadzonych badań.

Podsumowując uważam, że tematyka przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej jest bardzo interesująca, a poczynione obserwacje są wartościowe i mają charakter nowatorski. Stwierdzam też, że rozprawa została w znaczącym stopniu poprawiona w stosunku do wersji pierwotnej. Przede wszystkim uniknięto błędów merytorycznych związanych z wnioskowaniem na temat zaburzeń metabolicznymi indukowanych przez FCCP oraz zrezygnowano z nieuprawnionych odniesień do apoptozy. Chociaż wyniki uzyskane przez doktorantkę z punktu widzenia biochemii i bioenergetyki nie wniosły nowych informacji nie to było celem podjętych badań. Natomiast pozwoliły na ocenę nowych układów hodowlanych pod kątem ich wartości aplikacyjnej. Uważam, że Doktorantka osiągnęła wyznaczony cel prowadzonych badań i stwierdzam, że przedstawiana mi do recenzji praca rozprawa zatytułowana „Mikrosystemy przepływowe typu Lab-on-a-Chip do badania niedotlenienia komórek mięśnia sercowego” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymogami określonymi w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Kobuszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

