

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych

Dyscyplina Biotechnologia

Rozprawa doktorska

Mgr inż. Dominik Kołodziejek

**BADANIA NAD ZASTOSOWANIEM SYSTEMÓW *LAB-ON-A-CHIP* DO
ANALIZY REGENERACJI KOMÓREK SERCA**

Promotor:

prof. dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska

WARSZAWA 2025

*Pragnę złożyć szczególne podziękowania **prof. dr hab. inż. Elżbiecie Jastrzębskiej**, mojej Promotorce, za okazaną życzliwość, wsparcie, opiekę naukową, nieocenioną pomoc i wiarę w powodzenie prowadzonych przeze mnie badań, a także za wprowadzenie mnie w fascynujący świat mikrofluidyki.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję do **prof. dr hab. inż. Zbigniewa Brzózki** za ogólne wsparcie, cenne wskazówki i nieustanną gotowość do pomocy.*

*Serdecznie dziękuję **dr inż. Kamilowi Żukowskiemu** za naukę frezowania, wprowadzenie w zagadnienia mikrotechnologii oraz cierpliwe dzielenie się wiedzą i doświadczeniem.*

*Dziękuję pracownikom Katedry Biotechnologii Medycznej – **prof. dr hab. inż. Arturowi Dybko**, **prof. dr hab. inż. Michałowi Chudemu**, oraz **dr inż. Agnieszce Żuchowskiej** – za okazaną pomoc i inspirujące rady.*

*Szczególne podziękowania składam byłym i obecnym doktorantom Katedry Biotechnologii Medycznej – **Kasi, Patrycji, Kasprowi, Bartkowi, Ewelinie, Edycie, Asi, Sandrze, Gabrysi, Pawłowi** – za tworzenie przyjaznej, twórczej atmosfery, wsparcie na każdym etapie badań oraz wspólne poszukiwanie rozwiązań stawianych problemów badawczych.*

*Dziękuję **dr Michałowi Wojasińskiemu** i **dr Marcinowi Drozdowi** za owocną współpracę oraz wzajemną wymianę pomysłów.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję także do **mgr inż. Zuzanny Iwoń** oraz **dr Eweliny Krogulec** za współpracę, pomoc i miłą atmosferę.*

*Szczególnie dziękuję moim dyplomantkom: **mgr inż. Katarzynie Kociszewskiej**, **mgr inż. Urszuli Sierańskiej**, **mgr inż. Oliwii Tadko** oraz **mgr inż. Oli Szlachetce** za zaangażowanie i pomoc w realizacji oraz opracowaniu wyników badań.*

*Dziękuję kochanej **mamie, rodzinie oraz wspaniałej towarzyszce życia, Agacie** za cierpliwość, zrozumienie i stałe wsparcie, dzięki którym moje pomysły mogły stać się rzeczywistością.*

Streszczenie

Choroby układu sercowo-naczyniowego (CVDs) są główną przyczyną zgonów na całym świecie. Obecnie dostępne metody leczenia są niewystarczające, dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych terapii i leków, które pomogą ograniczyć śmiertelność związaną z tymi schorzeniami. Zrealizowanie tego celu wymaga prowadzenia długotrwałych i zaawansowanych badań laboratoryjnych oraz klinicznych, aby uznać lek lub terapię za skuteczną. Wstępne badania laboratoryjne potencjalnych leków wykonywane są zazwyczaj na monowarstwie komórkowej, która słabo odwzorowuje warunki *in vivo*. Te uproszczone modele hodowlane nie odzwierciedlają w pełni złożoności i dynamiki organizmu ludzkiego. Z tego powodu odpowiedź komórkowa na testowane substancje lub terapie może być znacząco inna niż ta, która występuje w organizmie ludzkim. Naukowcy starają się opracować bardziej zaawansowany model tkanki serca, który lepiej odwzorowywałby warunki *in vivo*, co z kolei pozwalałoby na uzyskiwanie wiarygodnych wyników badań. Jednym z nowych podejść jest zastosowanie mikrosystemów typu *Lab-on-a-Chip*, które umożliwiają odwzorowanie wielu kluczowych cech środowiska natywnej tkanki, takich jak trójwymiarowa hodowla, kontakt macierzą zewnątrzkomórkową oraz różne formy stymulacji - mechanicznej, elektrycznej i strukturalnej. W ramach niniejszej pracy przeprowadzono badania nad wytworzeniem modelu tkanki serca w systemach typu *Lab-on-a-Chip* (tzw. *Heart-on-a-chip*). W pierwszym etapie badań wytworzono maty nanowłókniste zawierające w swej strukturze nanocząstki magnetyczne. Opracowane maty nanowłókniste zostały wykorzystane do strukturalnej oraz mechanicznej stymulacji komórek. Zastosowanie pola magnetycznego umożliwiło kontrolowane odkształcanie mat, co miało na celu symulację mechanicznych warunków panujących w sercu. Kolejnym etapem badań było opracowanie mikrosystemu przepływowego, który umożliwiał kontrolę stężenia tlenu w strefie hipoksji mikrosystemu, co pozwalało na symulację stanów chorobowych. Mikrosystem przepływowy odgrywał kluczową rolę w symulacji dynamicznych warunków przepływu oraz zmiennych poziomów tlenu. Pozwoliło to na odtworzenie warunków, w jakich znajdują się komórki serca w stanie chorobowym, co z kolei może prowadzić do dokładnych wyników badań nad nowymi terapiami. W kolejnym etapie opracowano mikrosystem zintegrowany z matami nanowłóknistymi z dodatkiem nanocząstek magnetycznych, gdzie sprawdzano wpływ stymulacji magnetycznej na dojrzewanie kardiomiocytów. W kolejnym etapie sprawdzono, jak dodanie komórek macierzystych oraz ich stymulacja mechaniczna wpływają na kardiomiocyty poddane wcześniej symulacji stanów chorobowych. Komórki macierzyste, ze względu na swoje

właściwości regeneracyjne, mogą odgrywać kluczową rolę w naprawie uszkodzonej tkanki serca. Badania miały na celu ocenę, czy ich obecność oraz dodatkowa stymulacja mechaniczna mogą wspierać procesy regeneracyjne uszkodzonych kardiomiocytach. Na podstawie wyników badań potwierdzono, że uzyskane poliuretanowe podłoża hodowlane pozytywnie wpływają na prowadzenie hodowli komórkowej, zapewniając odpowiednie warunki do wzrostu komórek serca. Ponadto, otrzymane mikrosystemy pozwalają na skuteczną symulację warunków hipoksji, a dodanie komórek macierzystych do hodowli kardiomiocytów poddanych hipoksji wpływać może na rozpoczęcie w nich procesu różnicowania. W ramach pracy wykazano, że opracowany mikrosystem typu *Heart-on-a-Chip*, zintegrowany z matami nanowłóknistymi z dodatkiem nanocząstek magnetycznych, kontrolowaną hipoksję oraz stymulacją mechaniczną, tworzy wiarygodną model badawczy, który może być w przyszłości wykorzystywany przy opracowaniu nowych leków i terapii.

Słowa kluczowe: *Heart-on-a-chip*, komórki serca, mikrosystemy przepływowe, hipoksja, choroby układu sercowo-naczyniowego

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. Currently available treatment methods are insufficient, necessitating the search for new therapies and drugs to reduce mortality associated with these conditions. To achieve this goal, it is essential to conduct long-term and complex laboratory and clinical studies to validate the effectiveness of any drug or therapy. Initial laboratory studies are typically conducted on two-dimensional cell cultures, which poorly replicate *in vivo* conditions. These simplified culture models do not fully reflect the complexity and dynamics of the human organism. As a result, cellular responses to tested substances or therapies can differ significantly from those observed in the human body. Researchers are striving to create a more advanced heart tissue model that better mimics *in vivo* conditions, which would lead to more reliable research outcomes. One innovative approach is the use of *Lab-on-a-Chip* microsystems, which can replicate many key features of the native tissue environment, such as three-dimensional culture, extracellular matrix contact, and various forms of stimulation - mechanical, electrical, and structural. This study presents the results of an attempt to create a heart tissue model that better replicates *in vivo* conditions. In the first stage of the research, special nanofiber mats with magnetic nanoparticles were produced. These innovative substrates were designed to provide structural cell stimulation and mechanical stimulation through the use of a variable magnetic field. This field allowed controlled deformation of the mats at a set frequency, aiming to mimic the mechanical conditions present in the heart. The next stage of the research involved creating a flow microsystem that enabled the generation of hypoxic conditions in part of the microsystem, allowing for the simulation of disease states. The flow microsystem played a crucial role in simulating the dynamic flow conditions and variable oxygen levels characteristic of diseased heart tissue. This approach enabled a more realistic replication of the conditions faced by heart cells during disease, potentially leading to more accurate research results for new therapies. The final stage of the research involved combining these two elements and examining how the addition of stem cells and their mechanical stimulation affected cardiomyocytes previously subjected to disease state simulation. Stem cells, due to their regenerative properties, can play a crucial role in repairing damaged heart tissue. The research aimed to assess whether their presence and additional mechanical stimulation could support regenerative processes in damaged cardiomyocytes. The study's results confirm that the newly developed culture substrates positively influence cell culture maintenance, providing appropriate conditions for the growth and differentiation of

heart cells. Furthermore, the developed microsystem allows for effective simulation of hypoxic conditions, and the addition of stem cells to hypoxia-exposed cardiomyocytes clearly influences the initiation of their differentiation process. The work demonstrated that the developed *Heart-on-a-Chip* microsystem, integrated with nanofiber mats with magnetic nanoparticles, controlled hypoxia and mechanical stimulation, creates a reliable research model that can be used in the development of new drugs and therapies.

Keywords: Heart-on-a-chip, heart cells, flow microsystems, hypoxia, cardiovascular diseases

Wykaz skrótów

- 2D - hodowla dwuwymiarowa (*ang. two-dimensional culture*)
- 3D - hodowla trójwymiarowa (*ang. three-dimensional culture*)
- ACE - inhibitory konwertazy (*ang. Angiotensin-Converting Enzyme inhibitors*)
- ACTN2 - gen kodujący izoformę α -aktyniny
- AI - sztuczna inteligencja (*ang. Artificial Intelligence*)
- ARB - antagoniści receptora angiotensyny II (*ang. Angiotensin II Receptor Blockers*)
- ATP - adenosynotryfosforan
- ATF6 – czynnik transkrypcyjny 6 (*ang. activating transcription factor*)
- BSA - surowicza albumina wołowa (*ang. Bovine Serum Albumin*)
- CAM – kalceina-AM (*ang. calcein-AM*)
- CHD - choroba wieńcowa (*ang. Coronary Heart Disease*)
- COC - cykliczny kopolimer olefinowy (*ang. cyclic olefin copolymer*)
- CT – tomografia komputerowa (*ang. computer tomography*)
- cTnT - troponina sercowa T
- CVD – choroby układu sercowo-naczyniowego (*ang. cardiovascular disease*)
- CHIR99021 – aminopirymidynowa pochodna inhibitora GSK-3 α/β
- CHOP – białko homologiczne do czynnika transkrypcyjnego C/EBP (*ang. transcription factor C/EBP homologous protein*)
- DALY - lata skorygowane niepełnosprawnością (*ang. Disability-Adjusted Life Years*)
- DMEM – pożywka Eagle’a z modyfikacją Dlubecco (*ang. Dulbecco’s modified Eagle medium*)
- DPBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (*ang. Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline*)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. deoxyribonucleic acid*)
- ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (*ang. extracellular matrix*)
- EKG – elektrokardiografia
- FBS - płodowa surowica bydlęca (*ang. Fetal Bovine Serum*)
- GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
- GLUT1 – transporter glukozy 1 (*ang. glucose transporter 1*)
- GRP78 – białko glukozozależne o masie 78kDa (*ang. glucose-regulated protein 78kDa*)
- H9c2 – linia komórkowa szczurzych kardiomioblastów
- HCM - pierwotne ludzkie kardiomiocyty (*ang. Human Cardiomyocytes*)

HEPES - kwas N-2-hydroksyetylo-piperazyno-N'-2-etanosulfonowy

HIF – rodzina czynników transkrypcyjnych indukowanych stanem hipoksji (ang. *hypoxia inducible factors*)

hiPSC/iPSC – (ludzkie) indukowane pluripotentne komórki macierzyste (ang. *(human) induced pluripotent stem cells*)

HoC – „serce na chipie” (ang. *Heart-on-a-Chip*)

iPSC-CM – komórki o cechach kardiomiocytów ludzkich różnicowane z ludzkich indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells – cardiomyocytes*)

ICD- wszczepialny kardiowerter-defibrylator (ang. *Implantable Cardioverter-Defibrillator*)

IRE1 – białko wymagające inozytolu 1 (ang. *inositol-requiring protien 1*)

IWP2 – inhibitor ścieżki WNT

LDL – cholesterol o niskiej gęstości (ang. *low density cholesterol*)

LVAD - wspomaganie lewej komory serca (ang. *Left Ventricular Assist Device*)

LVEF - frakcja wyrzutowa lewej komory (ang. *Left Ventricular Ejection Fraction*)

MAP4K - kinaza MAP 4K (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MEM - podstawowa pożywka do hodowli komórkowych (ang. *Minimum Essential Medium*)

MNPs - nanocząstki magnetyczne (ang. *magnetic nanoparticles*)

MRI – rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*)

MNPs - nanocząstki magnetyczne (ang. *Magnetic Nanoparticles*)

MYL2 - gen kodujący łańcuch lekki miozyny 2

MYH6 - łańcuch ciężki miozyny 6 (ang. *Myosine Heavy Chain 6*)

NEAA – aminokwasy endogenne (ang. *Non-Essential Amino Acids*)

NF - maty nanowłókniste (ang. *nanofibrous mats*)

OoC – organ na chipie (ang. *Organ-on-a-Chip*)

PBS – bufor fosforanowy (ang. *phosphate buffered saline*)

PC – poliwęglan (ang. *polycarbonate*)

PDMS – poli(dimetylosiloksan) (ang. *polydimethylsiloxane*)

PERK – kinaza białkowa retikulum endoplazmatycznego (ang. *protein kinase RNA-like ER kinase*)

PI – jodek propidyny (ang. *propidium iodide*)

PLA – polilaktyd (ang. *Polylactic Acid*)

PMMA – polimetakrylan metylu (ang. *Polymethyl Methacrylate*)

PS – polistyren (ang. *polystyrene*)

PU – poliuretan (ang. *polyurethane*)

PtTFPP – kompleks platyna-tetrakis(pentafluorofenylo)porfiryna

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RPMI 1640 – pożywka Roswell Park Memorial Institute

RT – temperatura pokojowa (ang. *room temperature*)

SBS – proces rozdmuchu roztworu polimeru (ang. *solution blow spinning*)

SCN5A - gen kodujący podjednostkę α kanału sodowego

SERCA2 - pompa wapniowa siateczki SERCA2 (ang. *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 2*)

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor β*)

TNNI3 - gen kodujący sercową troponinę I

TNNT2 - gen kodujący troponinę T typu 2 (ang. *cardiac Troponin T*)

UPR – szlak adaptacyjnej odpowiedzi na stres (ang. *unfolded protein response*)

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular-endothelial growth factor*)

RT-PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (ang. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

Spis treści

Wykaz skrótów	9
PRZEGLĄD LITERATUROWY	17
1. Wstęp.....	17
2. Choroby układu sercowo-naczyniowego	22
2.1 Metody leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego.....	23
2.2 Wyzwania w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego	26
3. Modele komórkowe w badaniach <i>in vitro</i>	28
3.1 Dwuwymiarowe hodowle komórkowe	28
3.2 Hodowle trójwymiarowe (3D)	29
4. Mikrosystemy przepływowe do hodowli komórek tkanki serca.....	32
4.1 Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych do hodowli komórek serca	32
4.2 Mikrosystemy do stymulacji mechanicznej komórek mięśnia serca	36
4.3 Mikrosystemy do symulacji warunków chorobowych.....	41
4.4 Przyszłe kierunki rozwoju	44
5. Podsumowanie	45
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	47
6. Cel pracy	47
7. Materiały, odczynniki i aparatura badawcza	48
7.1 Odczynniki	48
7.1.1 Odczynniki do hodowli i różnicowania komórek:	48
7.1.2 Odczynniki do analizy komórek.....	49
7.2 Materiał biologiczny	50
7.2.1 Pożywki hodowlane	50
7.2.2 Materiały, odczynniki chemiczne i drobny sprzęt laboratoryjny	51
7.2.3 Aparatura badawcza	53
8. Metodyka badań	54

8.1	Wytwarzanie i charakterystyka mat nanowłóknistych	54
8.1.1	Wytwarzanie mat nanowłóknistych.....	54
8.1.2	Charakterystyka mat nanowłóknistych	55
8.1.3	Przygotowanie uchwytów do prowadzenia hodowli na matach nanowłóknistych 57	
8.2	Wytwarzanie mikrosystemów	58
8.2.1	Projekt geometrii wytworzonych mikrosystemów	58
8.2.2	Symulacje numeryczne	59
8.2.3	Wytworzenie mikrosystemu I.....	62
8.2.4	Wytworzenie mikrosystemu II a i II b.....	62
8.2.5	Przygotowanie mikrosystemów przepływowych I, II a i II b	64
8.2.6	Wprowadzanie odczynników do mikrokomór hodowlanych mikrosystemu ...	64
8.2.7	Modyfikacja powierzchni mat nanowłóknistych roztworem polidopaminy	65
8.2.8	Przygotowanie mikrosystemów do hodowli - sterylizacja termiczna	65
8.3	Hodowla komórkowa	65
8.3.1	Prowadzenie hodowli komórkowej	65
8.3.2	Przygotowanie zawiesiny komórkowej do prowadzenia badań.....	67
8.3.3	Wysiewanie komórek	67
8.4	Stymulacja mechaniczna	68
8.4.1	Wytworzenie generatora zmiennego pola magnetycznego	68
8.4.2	Parametry stymulacji mechanicznej	69
8.5	Symulacja niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych.....	69
8.5.1	Kalibracja folii tlenoczułej	69
8.5.2	Wykonanie kartridża do wytwarzania warunków hipoksji w mikrosystemie II b 70	
8.5.3	Przygotowanie zestawu do wytwarzania warunków niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych	71
8.5.4	Ocena warunków niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych.....	72

8.6	Analiza hodowli komórkowych	73
8.6.1	Test Alamar Blue	73
8.6.2	Barwienie różnicowe	74
8.6.3	Badanie poziomu ATP	75
8.6.4	Analiza ułożenia komórek	76
8.6.5	Barwienie immunofluorescencyjne	77
8.6.6	Analiza ekspresji genów	78
8.6.7	Analiza statystyczna	79
9.	Wyniki	80
9.1	Hodowla komórek serca na matach nanowłóknistych	80
9.1.1	Właściwości wytworzonych mat nanowłóknistych	80
9.1.2	Działanie generatora zmiennego pola magnetycznego	85
9.1.3	Stymulacja komórek serca z wykorzystaniem zmiennego pola magnetycznego 89	
9.1.4	Podsumowanie i dyskusja wyników	92
9.2	Mikrosystem do hodowli komórek serca oraz symulacji niedotlenienia	93
9.2.1	Geometria mikrosystemu I	94
9.2.2	Hodowla komórek serca w mikrosystemie I	99
9.2.3	Ocena warunków niedotlenienia w mikrosystemie I	101
9.2.4	Badanie wpływu warunków niedotlenienia na komórki serca hodowane w mikrosystemie I	102
9.2.5	Podsumowanie i dyskusja wyników	103
9.3	Opracowanie mikrosystemu do stymulacji mechanicznej	105
9.3.1	Opracowanie mikrosystemu II a zintegrowanego z matami nanowłóknistymi o właściwościach magnetycznych	105
9.3.2	Dobór warunków hodowli komórek w mikrosystemie II a	108
9.3.3	Hodowla w komórek serca w mikrosystemie II a i stymulacja mechaniczna	111
9.3.4	Podsumowanie i dyskusja wyników	118

9.4	Badanie wpływu niedotlenienia na kardiomiocyty hodowane w mikrosystemie przepływowym II b	119
9.4.1	Geometria mikrosystemu II b.....	119
9.4.2	Hodowla komórek w warunkach niedotlenienia w mikrosystemie II b.....	123
9.4.3	Współhodowla komórek iPSC-CM poddanych hipoksji z komórkami iPSC w mikrosystemie II b.....	124
9.4.4	Podsumowanie i dyskusja wyników	127
10.	Podsumowanie i wnioski.....	129
11.	Bibliografia.....	132
12.	Spis Rycin.....	147
13.	Spis Tabel	152

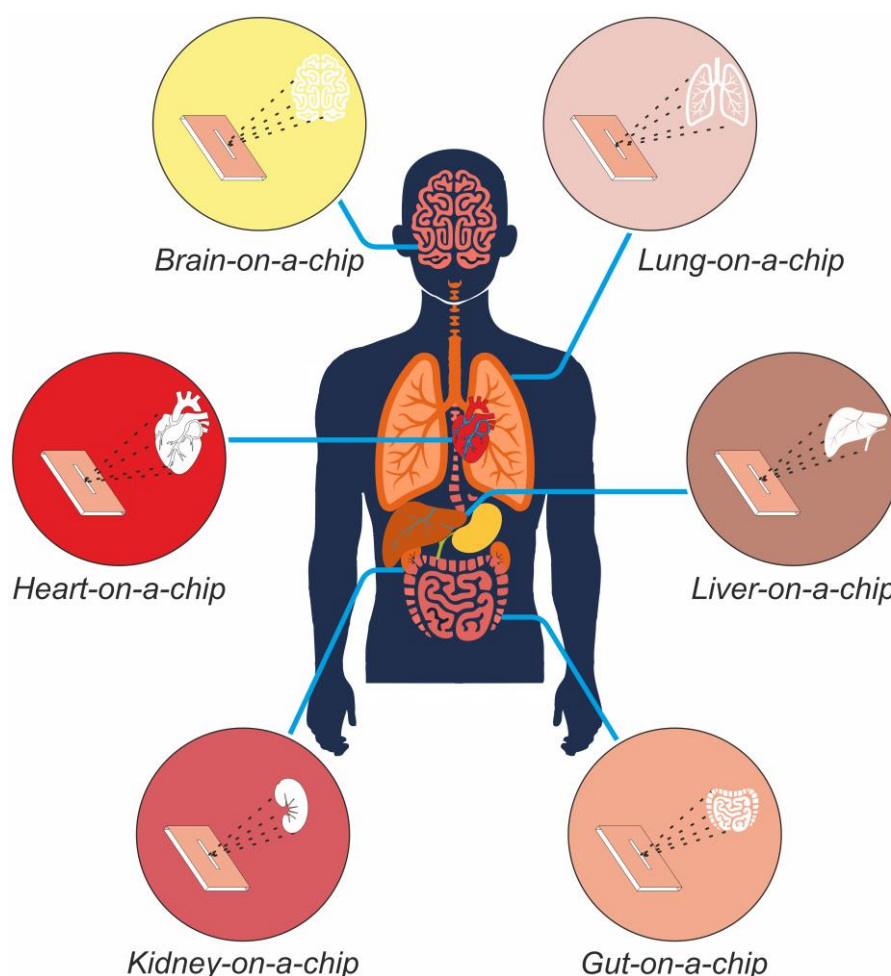
PRZEGLĄD LITERATUROWY

1. Wstęp

Na przestrzeni lat medycyna ciągle się rozwijała, dostosowując się do nowych wyzwań pojawiających się wraz z rozwojem cywilizacji. Początkowo skupiała się głównie na zwalczaniu chorób zakaźnych, które były najczęstszą przyczyną zgonów. W miarę rozwoju nowych technologii i zwiększania dostępności środków medycznych, udało się znacząco ograniczyć liczbę zgonów. Współczesna medycyna, dzięki swoim osiągnięciom, znacznie wydłużyła długość ludzkiego życia, co z kolei przyczynia się do większej zapadalności na choroby przewlekłe, typowe dla osób w wieku dojrzałym, takie jak choroby układu krążenia i choroby układu oddechowego [1]. Choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD ang. *cardiovascular diseases*) stały się najczęstszą przyczyną zgonów na całym świecie. W 2021 roku choroby te były przyczyną ok. 19,4 miliona zgonów, co stanowiło 28,6% wszystkich zgonów na świecie. Wskaźnik DALY (ang. *disability adjusted life-years*), który wyraża lata utracone wskutek uszczerbku na zdrowiu lub przedwczesnej śmierci, dla chorób układu krążenia wynosił w 2021 roku ok. 396 milionów, co przekłada się na 20% wszystkich lat utraconych z powodu chorób. Od 1990 roku wzrasta liczba zgonów i lat utraconych z powodu CVD. Oznacza to, że choroby te stają się coraz poważniejszym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Częstotliwość występowania chorób układu krążenia zależy od wielu czynników, takich jak zażywanie używek (alkohol, papierosy), dieta (wysoki udział tłuszczu, cholesterol, cukrzyca, otyłość), świadomość społeczeństwa dotycząca zdrowego odżywiania, poziom aktywności fizycznej, wpływ środowiska, średnia długość życia oraz zamożność społeczeństwa. Tak szeroki zakres zmiennych w różnym stopniu wpływa na częstość występowania CVD w poszczególnych regionach, powodując, że w różnych częściach świata udział chorób układu sercowo-naczyniowego jest zróżnicowany. Największy problem z tego typu schorzeniami występuje w krajach Europy Wschodniej i Azji Centralnej, gdzie w 2013 roku stanowiły one ok. 56% wszystkich zgonów. W krajach wysokorozwiniętych, takich jak USA, Kanada, Australia oraz krajach Europy Zachodniej, choroby te powodują ok. 38% wszystkich zgonów [3]. W Polsce w latach 1990-2021 nastąpił wyraźny spadek liczby zgonów wywołanych chorobami układu sercowo-naczyniowego, a także zmniejszył się wskaźnik DALY. W 2017 roku, zmarło ok. 169 tysięcy osób, a wskaźnik DALY osiągnął wartość ok. 2,7 miliona. Mimo to, w 2021 roku choroby CVDs stanowiły 32,6 % wszystkich zgonów w Polsce. Choroby układu sercowo-naczyniowego to grupa wielu chorób

o zróżnicowanej etiologii i objawach, które dotyczą serca, tętnic i żył. Do najczęściej występujących CVD należą nadciśnienie tętnicze, niedokrwienność serca, niedoczynność serca, żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, niewydolność żył i żylaki [2]. Obecnie diagnostyka CVD polega na prowadzeniu podstawowych badań układu sercowo-naczyniowego i opiera się głównie na wykrywaniu ogólnych objawów zaburzeń jego funkcjonowania. Do stosowanych badań diagnostycznych należą elektrokardiografia (EKG), echokardiografia, test wysiłkowy, a także tomografia komputerowa (CT), rezonans magnetyczny (MRI), angiografia oraz badania krwi. Precyzyjna diagnostyka jest ważna nie tylko w celu wczesnego wykrycia schorzeń, ale także w celu monitorowania stanu pacjentów i oceny skuteczności leczenia. Z tego powodu prowadzi się badania nad nowymi metodami diagnostycznymi, terapeutycznymi, a także nad poznawaniem czynników ryzyka i etapów choroby na poziomie komórkowym. Dzięki rozwojowi innowacyjnych technologii medycznych, powstały również nowe możliwości dotyczące rozwiązywania problemów związanych z CVD. Zaliczają się do nich między innymi wykorzystanie niekodujących RNA w diagnozie i leczeniu, zastosowanie sztucznej inteligencji oraz uczenia maszynowego do analizy obrazów diagnostycznych, wykorzystanie nanocząsteczek w terapiach oraz koncepcja systemów *Heart-on-a-Chip* [3–7]. Celem tworzenia modeli komórkowych jest odkrywanie i zrozumienie mechanizmów chorobowych oraz opracowywanie nowych metod leczenia. Dzięki temu można skuteczniej łagodzić skutki chorób i jednocześnie obniżać koszty terapii. Modele zwierzęce stanowią podstawę do opracowywania nowych leków, jednak różnice w funkcjonowaniu organów oraz różnice fizjologiczne między organizmem zwierzęcym a ludzkim sprawiają, że terapia opracowywana i testowana na zwierzętach może nie przynieść oczekiwanych rezultatów u ludzi. Dodatkowo, badania na zwierzętach laboratoryjnych wiążą się z wysokimi kosztami, niską efektywnością oraz są czasochłonne i kontrowersyjne ze względów etycznych. Oprócz modeli zwierzęcych rozwijane są komputerowe modele ludzkich organów, wśród których można wyróżnić modele anatomiczne, fizyczne, matematyczne oraz modele sieci neuronowych. Modele anatomiczne tworzone są na podstawie danych medycznych pochodzących z tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego, dzięki którym można odtworzyć trójwymiarowy anatomiczny model organu. Korzyścią płynącą z wykorzystywania takich modeli jest dostarczanie szczegółowych informacji o strukturze narządu, służących do diagnostyki, opracowywania planu operacji chirurgicznych czy edukacji medycznej. Modele fizyczne uwzględniają strukturę anatomiczną narządu, ale także jego właściwości fizyczne, takie jak wytrzymałość mechaniczna i elastyczność. Ten rodzaj modeli komputerowych znajduje zastosowanie w symulacjach chirurgicznych oraz symulacjach

dotyczących skuteczności terapii medycznych na narządach. Matematyczne modele narządów opierają się na równaniach i algorytmach opisujących funkcje biologiczne i mogą dotyczyć zarówno pojedynczej komórki, jak i całego organizmu. Modele matematyczne są wykorzystywane do analizy przepływu krwi, badania wpływu leków lub prognozowania wyników stosowanych terapii [8,9]. Dynamicznie rozwijaną metodą modelowania narządów jest metoda oparta na modelach komórkowych. W tej metodzie wykorzystywane są linie komórkowe pochodzące z różnych organizmów i tkanek. Prowadzone na nich badania dotyczące wzrostu, dojrzewania, różnicowania komórek czy oceny cytotoksyczności mogą stać się podstawą do opracowywania nowych metod leczenia wielu chorób i w pewnym stopniu zredukować liczbę wykorzystywanych zwierząt. W celu wierniejszego odwzorowania organów rozwinięto metody mikroprzepływowe oraz inne techniki biofabrykacji, wśród których wyróżnia się technologia „narządu na chipie” ang. *Organ-on-a-Chip* (OoC) [10–12].



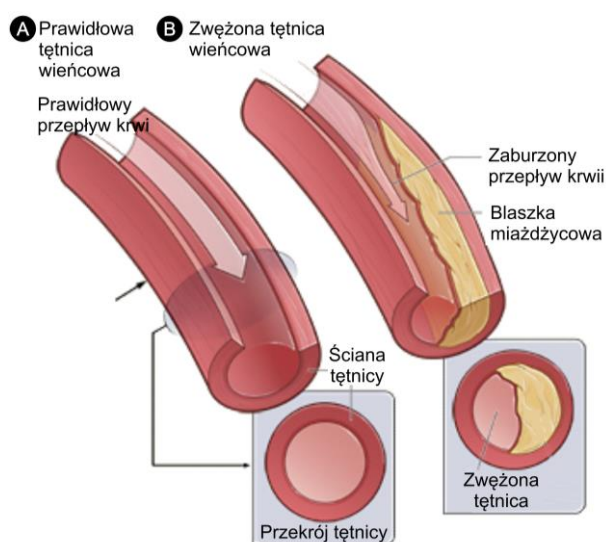
Rycina 1 Przykłady systemów typu *Organ-on-a-Chip*, takich jak *Brain-on-a-Chip*, *Lung-on-a-Chip*, *Heart-on-a-Chip*, *Liver-on-a-Chip*, *Kidney-on-a-Chip* i *Gut-on-a-Chip*, które wykorzystywane są do naśladowania mikrośrodowiska poszczególnych organów. Opracowanie własne (CorelDRAW 2019).

Systemy typu *Organ-on-a-Chip* są nowatorskim rozwiązaniem, w którym biologia łączy się z zaawansowaną mikrotechnologią (Rycina 1). Tego rodzaju mikrouządzenia przepływowe zawierają sieci mikrokanalów służących do wprowadzania małych objętości roztworu. Oprócz mikrokanalów występują mikrokomory przeznaczone do hodowli komórek. Liczba komór, ich rozmieszczenie, kształt i wielkość zależą między innymi od rodzaju badanych komórek, specyfiki prowadzonych eksperymentów oraz obecności dodatkowych elementów, takich jak elektrody czy modyfikowane podłoża do hodowli komórek. Tworzenie modeli komórkowych mających na celu odwzorowywanie funkcji poszczególnych narządów jest technologicznie zaawansowanym zadaniem. Jednym z przykładów systemów typu *Organ-on-a-Chip* są systemy *Heart-on-a-Chip* (HoC), tłumaczone jako „serce na chipie”, w których odwzorowywane jest mikrośrodowisko tkanki serca. Systemy HoC umożliwiają badanie fizjologii i funkcjonowania komórek serca w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Serce jest zbudowane z kilku rodzajów komórek (fibroblasty, kardiomiocyty, komórki mięśni gładkich, komórki endotelialne). Konieczne jest więc uwzględnienie tego w trakcie odwzorowania mikrośrodowiska tkanki serca w mikrosystemach. Ponadto w tkance serca komórki ułożone są równolegle, a układ przewodnictwa elektrycznego reguluje rytmiczną pracę mięśnia sercowego. Mikrosystemy HoC stosowane mogą być do badania interakcji między różnymi komórkami serca, wpływu działania na nie leków i substancji toksycznych oraz symulowania stanów chorobowych. Takie podejście ułatwia zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój schorzeń i wspiera opracowywanie nowych terapii. Ze względu na to, że systemy HoC w pewnym stopniu odwzorowują warunki *in vivo*, mogą przyczynić się one do lepszego poznania procesów biologicznych i patologicznych zachodzących w sercu [7]. W celu jak najwierniejszego odwzorowania warunków *in vivo*, rozwijane są nie tylko systemy HoC, ale także nowe podłoża do hodowli komórek serca. Jednym z takich podłoży są materiały nanowłókniste, które są szeroko wykorzystywane w badaniach opartych na hodowlach komórkowych. Badania prowadzone z użyciem mat nanowłóknistych mogą dotyczyć regeneracji komórek, gdzie włókna pełnią funkcję podłoża dla hodowanych komórek, np. komórek skóry, kości i mięśnia sercowego. Nanowłókna są również istotnym elementem wykorzystywanym w inżynierii tkankowej, ponieważ mogą służyć do tworzenia trójwymiarowych struktur odwzorowujących mikrośrodowisko komórek i tkanek. Dodatkowo, maty nanowłókniste zapewniają odpowiednie cechy fizyczne, takie jak elastyczność czy porowatość, które wpływają na zachowanie i funkcję hodowanych komórek. Maty nanowłókniste mogą być również modyfikowane w celu nadania im nowych właściwości, które mogą mieć wpływ na hodowane komórki. Wprowadzanie nanocząstek magnetycznych (MNPs,

ang. *magnetic nanoparticles*) to jedynie jeden z wielu sposobów modyfikacji, dzięki którym struktury nabierają dodatkowych cech, w tym właściwości magnetycznych. Ze względu na swoją strukturę i właściwości nanowłókna magnetyczne mogą być wykorzystywane do naśladowania macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). Dzięki właściwościom magnetycznym możliwa jest także stymulacja mechaniczna, która stanowi czynnik pobudzający do wzrostu, dojrzewania i różnicowania komórek [10].

2. Choroby układu sercowo-naczyniowego

Choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD – ang. *cardiovascular disease*) są jedną z głównych przyczyn zgonów na całym świecie [13,14]. Najczęstszą chorobą w tej grupie jest choroba niedokrwienna serca, znana również jako choroba wieńcowa (CHD - ang. *Coronary Heart Disease*) [15]. CHD występuje, gdy dopływ krwi do mięśnia sercowego jest ograniczony lub całkowicie zablokowany, co zazwyczaj wynika z odkładania blaszki miażdżycowej w ścianach tętnic (Rycina 2 Miażdżycza to proces polegający na nagromadzeniu cholesterolu i innych lipidów w ścianach naczyń krwionośnych, co prowadzi do ich zwężenia i zmniejszenia drożności, a w konsekwencji może prowadzić do zawału mięśnia sercowego (MI – ang. *myocardial infarction*) [16]. Przebieg miażdżycy można podzielić na dwa etapy: stabilny i ostry. W fazie stabilnej nagromadzenie lipidów w ścianach tętnic zwykle nie wywołuje zauważalnych objawów klinicznych. Natomiast faza ostra wiąże się z aktywacją procesu zapalnego, który może prowadzić do pęknięcia blaszki miażdżycowej, zakrzepicy i w konsekwencji do martwicy mięśnia sercowego (zawału serca), obniżenia wydolności serca oraz arytmii. Miażdżycza nie jest jedyną przyczyną niedotlenienia serca. Stan, w którym mięsień sercowy otrzymuje zbyt małą ilość tlenu i składników odżywczych, może występować również w przypadku wad wrodzonych, które uniemożliwiają zachowanie wystarczającego przepływu krwi, a także w wyniku urazów mechanicznych, np. powstawanie krwiaków uciskających tętnice.



Rycina 2 A) Schemat przedstawiający prawidłową tętnicę wieńcową z normalnym przepływem krwi a także przekrój prawidłowej tętnicy. B) Schemat przedstawiający tętnicę wieńcową wraz ze złoгами cholesterolu (blaszka miażdżycowa). Obecność złożeń cholesterolu powoduje zmniejszenie ilości przepływającej krwi.[17]

2.1 Metody leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego

Leczenie chorób układu sercowo-naczyniowego obejmuje strategie zarówno prewencyjne jak i interwencyjne, mające na celu zatrzymanie postępu choroby, złagodzenie objawów oraz poprawę jakości życia pacjentów. Wśród tych metod wyróżnia się leczenie farmakologiczne, zabiegi inwazyjne oraz zaawansowane terapie regeneracyjne, takie jak wykorzystanie komórek macierzystych. Każda z tych metod ma swoje unikalne zalety, wyzwania oraz zastosowania w zależności od specyfiki i zaawansowania choroby. Podstawą prewencji CVD jest prowadzenie zdrowego trybu życia, który obejmuje zdrową dietę, regularną aktywność fizyczną, unikanie palenia tytoniu oraz ograniczenie spożycia alkoholu.

Zdrowa dieta powinna być bogata w owoce, warzywa, pełnoziarniste produkty zbożowe, białko roślinne i zwierzęce o niskiej zawartości tłuszczu, a jednocześnie uboga w tłuszcze nasycone, cholesterol i sód. Regularna aktywność fizyczna, taka jak spacer, bieganie, pływanie czy jazda na rowerze, pomaga w utrzymaniu prawidłowej masy ciała, poprawie kondycji sercowo-naczyniowej i redukcji stresu. Rzucenie palenia tytoniu jest jednym z najważniejszych kroków w prewencji CVD, ponieważ palenie jest jednym z głównych czynników ryzyka miażdżycy i innych chorób serca. Ograniczenie spożycia alkoholu, a najlepiej jego całkowita eliminacja, również znacząco zmniejsza ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Ważnym elementem prewencji jest także kontrolowanie poziomu stresu oraz dbanie o odpowiednią ilość snu [18,19].

Leczenie farmakologiczne jest podstawową metodą zarządzania CVD, szczególnie w przypadkach, gdy zmiana stylu życia jest niewystarczająca do kontrolowania choroby. Istnieje wiele klas leków stosowanych w leczeniu CVD, które działają na różne mechanizmy patologiczne chorób serca. Statyny są stosowane w celu obniżenia poziomu cholesterolu we krwi. Działają one poprzez hamowanie enzymu HMG-CoA reduktazy, co prowadzi do zmniejszenia syntezy cholesterolu w wątrobie i zwiększenia wychwytu LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości) przez komórki wątroby, co skutkuje obniżeniem poziomu LDL we krwi [20,21]. Inhibitory angiotensyny konwertazy (ACE) pomagają obniżyć ciśnienie krwi i zmniejszać obciążenie serca poprzez blokowanie enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie angiotensyny i w angiotensynę II, substancję zwężającą naczynia krwionośne [22]. Przykłady to enalapryl, lisinopryl i ramipryl. Beta-blokery pomagają w redukcji ciśnienia krwi, zmniejszają tętno i obciążenie serca poprzez blokowanie receptorów beta - adrenergicznych [23]. Beta-blokery, takie jak metoprolol, bisoprolol i atenolol, są często

stosowane w leczeniu nadciśnienia, arytmii i niewydolności serca. Antagoniści receptora angiotensyny II (ARB) podobnie jak inhibitory ACE, pomagają obniżać ciśnienie krwi, ale działają bezpośrednio na receptory angiotensyny II, co zapobiega zwężaniu naczyń krwionośnych [24]. Przykłady ARB to losartan, walsartan i irbesartan. Diuretyki, czyli leki moczopędne, pomagają w redukcji nadciśnienia i obrzęków poprzez zwiększenie wydalania soli i wody z organizmu [25]. Przykłady to hydrochlorotiazyd, furosemid i spironolakton. Antagoniści wapnia pomagają obniżać ciśnienie krwi i zmniejszać obciążenie serca poprzez blokowanie kanałów wapniowych w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, co powoduje ich rozluźnienie. Przykłady to amlodipina, werapamil i diltiazem [26]. Leki przeciw płytkowe i przeciwzakrzepowe są stosowane w celu zapobiegania tworzeniu się skrzepów krwi, które mogą prowadzić do zawału serca lub udaru mózgu. Przykłady to aspiryna, kłopidogrel, warfaryna i nowe doustne antykoagulanty, takie jak apiksaban i dabigatran.

W przypadkach, gdy leczenie farmakologiczne i zmiana stylu życia są niewystarczające, stosowane są różne inwazyjne metody leczenia. Operacja by-pass, czyli chirurgiczne obejście tętnic wieńcowych, polega na wytworzeniu nowych dróg przepływu krwi do mięśnia sercowego, omijając zwężone lub zablokowane odcinki tętnic wieńcowych. Procedura ta jest często wykonywana u pacjentów z wieloma zwężeniami tętnic, które nie mogą być skutecznie leczone za pomocą angioplastyki. W przypadkach chorób zastawek serca, takich jak zwężenie lub niedomykalność zastawki, mogą być konieczne zabiegi naprawcze lub wymiany zastawek. Zabiegi te mogą być wykonywane za pomocą tradycyjnej operacji na otwartym sercu lub mniej inwazyjnych metod, takich jak przeszkońska wymiana zastawki. W leczeniu arytmii serca, takich jak migotanie przedsionków, mogą być stosowane różne techniki ablacyjne. Procedury te polegają na zniszczeniu małych obszarów tkanki serca, które powodują nieprawidłowe impulsy elektryczne, za pomocą energii cieplnej (radiofrekwencji) lub zimna (krioablacja). U pacjentów z zaawansowaną niewydolnością serca, którzy nie odpowiadają na leczenie farmakologiczne, mogą być wszczepiane urządzenia wspomagające pracę serca, takie jak rozruszniki serca, defibrylatory kardiowertery (ICD) oraz mechaniczne urządzenia wspomagające lewą komorę serca (LVAD)[27,28].

Medycyna regeneracyjna i terapia komórkowa stanowią nowoczesne podejścia w leczeniu uszkodzeń mięśnia sercowego. Komórki macierzyste, dzięki swojej zdolności do różnicowania się w różne typy komórek mają potencjał do wykorzystania w regeneracji uszkodzonych tkanek[29–31]. W zależności od pochodzenia i funkcji wyróżnia się kilka typów komórek macierzystych. Są to m.in. mezenchymalne komórki macierzyste ze szpiku kostnego

(BM-MSCs, ang. *bone-marrow-derived mesenchymal stem cells*), komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej (ADSCs, ang. *adipose-derived stem cells*), sercowe komórki progenitorowe (CPCs, ang. *cardiac progenitor cells*), embrionalne komórki macierzyste (ESCs, ang. *embryonic stem cells*) oraz indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSCs, ang. *induced pluripotent stem cells*). Komórki macierzyste ze szpiku kostnego są jednymi z najczęściej badanych w kontekście regeneracji serca. Badania wykazały, że wstrzyknięcie tych komórek do serca myszy poprawia jego czynność po zawale. Jednakże, ich heterogeniczność stanowi wyzwanie, ponieważ zawierają zarówno dojrzałe, jak i niedojrzałe populacje komórek [32]. Komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej wykazują właściwości podobne do komórek ze szpiku kostnego i są łatwiejsze do pozyskania. Badania wykazały, że komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej mogą zmniejszyć negatywne skutki zawału oraz poprawić funkcję mięśnia sercowego [33]. Sercowe komórki macierzyste, które naturalnie występują w sercu, wykazują ograniczone zdolności do regeneracji mięśnia sercowego. Badania kliniczne wykazały, że wstrzyknięcie tych komórek może zwiększyć frakcję wyrzutową (LVEF) o 11%, co wskazuje na znaczną poprawę funkcji serca [34]. Próby związane ze zdolnością do regeneracji serca prowadzone były również dla embrionalnych komórek macierzystych, jednak ich zastosowanie wiąże się z ryzykiem powstawania potworniaków, czyli nowotworów zawierających komórki z wszystkich trzech warstw zarodkowych. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste uzyskiwane są z dojrzałych komórek somatycznych poprzez ich reprogramowanie czynnikami Yamanaki. Dzięki czemu umożliwiają różnicowanie do każdego typu komórek jednocześnie minimalizując kontrowersje etyczne. Wykorzystanie kardiomiocytów pochodzących z iPSCs w modelach chorobowych u gryzoni prowadziło do zmniejszenia obszaru martwicy, poprawy frakcji wyrzutowej i korzystnej przebudowy lewej komory. Wciąż jednak wyzwaniem pozostaje pełne dojrzewanie komórek przed implantacją [35].

Podsumowując, metody leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego obejmują szeroki zakres strategii, od prewencji i zmiany stylu życia, przez leczenie farmakologiczne, aż po zaawansowane zabiegi inwazyjne i terapie regeneracyjne. Każda z tych metod ma swoje miejsce w leczeniu CVD i jest dostosowywana do indywidualnych potrzeb pacjentów. Ważne jest, aby kontynuować badania nad nowymi metodami leczenia oraz doskonalić istniejące terapie, aby poprawić jakość życia pacjentów i zmniejszyć obciążenie chorobami serca na poziomie globalnym.

2.2 Wyzwania w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego

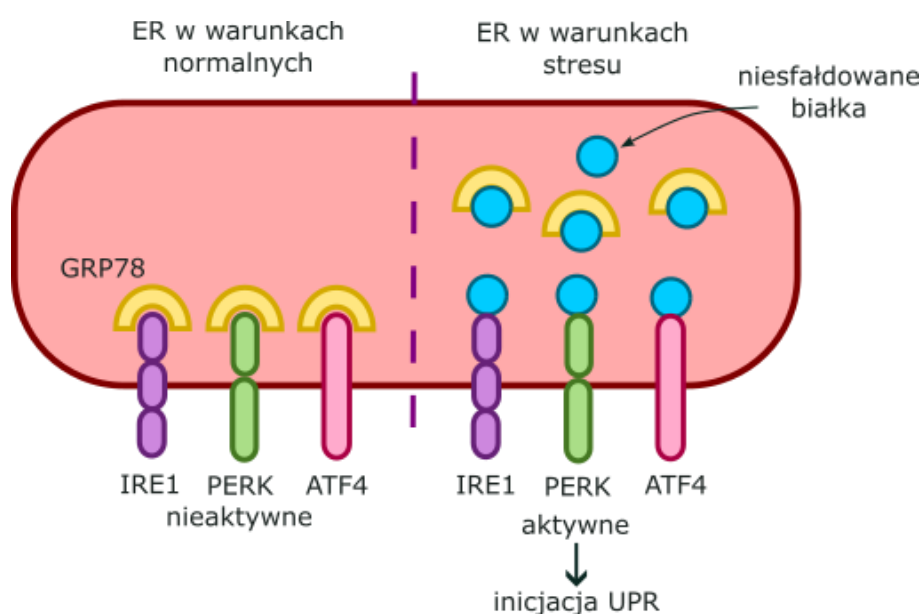
Współczesna terapia CVD coraz częściej sięga po stenty naczyniowe, protezy zastawek czy syntetyczne by-passy, czyli implanty pozostające w stałym kontakcie z krwią. Konstrukcje te – wykonywane ze stopów metali, polimerów lub kompozytów – mają zapewnić mechaniczną stabilizację i przywrócić drożność naczyń, jednak brak pełnej biogodności prowadzi do zwapnień, biofilmowych infekcji oraz przewlekłego stanu zapalnego, co drastycznie skraca ich czas bezpiecznego użytkowania. Z tego powodu większość nowo opracowanych implantów zostaje wycofana już na etapie badań przedklinicznych, gdyż obserwowane powikłania przekreślają potencjał kliniczny tych rozwiązań. Klasyczna transplantacja serca rozwiązuje problem braku biogodności, lecz jest obciążona niedoborem dawców i ryzykiem odrzutu.

Nowoczesne strategie terapeutyczne, takie jak wykorzystanie pluripotencjalnych komórek macierzystych, otwierają nowe możliwości regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego. Wdrożenie tej strategii napotyka jednak poważne bariery: ryzyko nowotworów, trudności w precyzyjnym sterowaniu różnicowaniem oraz potencjalna immunogenność przeszczepianych komórek. Konieczne są dalsze badania nad optymalizacją warunków hodowli i kontrolą ekspresji genów, by bezpiecznie wprowadzić terapie komórkowe do rutynowej praktyki klinicznej.

Dodatkowo, jednym z najpoważniejszych skutków chorób sercowo-naczyniowych jest niedokrwienie mięśnia sercowego, prowadzące do hipoksji. Brak odpowiedniego natlenowania tkanek serca powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu komórek oraz aktywację ścieżek adaptacyjnych, w tym czynników transkrypcyjnych z rodziny HIF (ang. *hypoxia inducible factors*). Aktywacja tych czynników uruchamia ekspresję genów umożliwiających komórkom przetrwanie w warunkach niedoboru tlenu poprzez zmianę profilu metabolicznego na glikolizę, kosztem β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Hipoksja prowadzi również do zaburzenia homeostazy w obrębie siateczki śródplazmatycznej (ER) i aktywacji szlaku odpowiedzi na stres (UPR). Długotrwały stres ER może indukować apoptozę komórki poprzez szlak proapoptotycznego czynnika transkrypcyjnego CHOP, co utrudnia regenerację uszkodzonych tkanek. Warto podkreślić, że hipoksja i mechanizmy adaptacyjne zachodzą nie tylko w sercu, ale także w guzach nowotworowych. HIF-1 α indukuje ekspresję *TGF- β* oraz *VEGF* – czynników kluczowych dla nowotworzenia i angiogenezy. *TGF- β* sprzyja produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej, ułatwiając proliferację komórek nowotworowych, natomiast *VEGF* stymuluje powstawanie nowych naczyń krwionośnych, umożliwiając rozrost

guza [36–38]. Zrozumienie tych procesów jest niezbędne dla opracowania nowych, skuteczniejszych metod leczenia CVD i innych chorób związanych z niedotlenieniem tkanek.

Podsumowując, skuteczne leczenie chorób układu sercowo-naczyniowego wymaga zarówno rozwoju nowoczesnych technologii medycznych, jak i dogłębnego zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw uszkodzeń i regeneracji tkanek. Postęp w dziedzinie bioinżynierii, terapii komórkowych oraz poznanie szlaków adaptacyjnych komórek do hipoksji daje nadzieję na opracowanie bezpieczniejszych i skuteczniejszych metod leczenia. Jednocześnie wciąż istnieje wiele wyzwań, których pokonanie będzie kluczowe dla poprawy jakości życia pacjentów z chorobami serca.



Rycina 3 Mechanizm aktywacji szlaku UPR. [39]

3. Modele komórkowe w badaniach *in vitro*

Badania *in vitro*, przeprowadzane na modelach komórkowych, stanowią fundamentalne narzędzie w biologii komórkowej i biomedycynie. Hodowle komórek umożliwiają naukowcom badanie zachowań komórek, mechanizmów molekularnych oraz testowanie nowych leków w kontrolowanych warunkach. Wyróżnia się dwa typy hodowli komórkowych: hodowle dwuwymiarowe (2D) w postaci monowarstwy oraz trójwymiarowe (3D). Hodowle trójwymiarowe mogą być prowadzone jako samoorganizujące się struktury i te, które wymagają dodatkowych materiałów do tworzenia przestrzennych konstrukcji.

3.1 Dwuwymiarowe hodowle komórkowe

Hodowle dwuwymiarowe (2D), w postaci monowarstwy to najprostsza i najczęściej stosowana hodowla komórkowa w badaniach *in vitro* [40]. W tego typu hodowli komórki rosną w jednej warstwie. Komórki przyklejone są do płaskiej powierzchni naczynia hodowlanego. Pozwala to na łatwy dostęp komórek do pożywki hodowlanej, kontrolowanie warunków wzrostu oraz obserwację mikroskopową. Do głównych zalet hodowli 2D należy prostota hodowli i kontroli nad warunkami eksperymentu. Umożliwiają one łatwe dostarczanie składników odżywczych, usuwanie produktów przemian metabolicznych oraz prowadzenie różnych analiz, takich jak testy cytotoksyczności, obserwacje mikroskopowe i badania proliferacji i żywotności komórek [41–44]. Ze względu na jednorodność warunków hodowli, wyniki uzyskane z hodowli 2D są zwykle powtarzalne i łatwe do interpretacji. Hodowle 2D komórek są szeroko stosowane w badaniach nad aktywnością leków. Mimo wielu zalet, hodowle 2D komórek mają także swoje ograniczenia. Przede wszystkim, nie odzwierciedlają one w pełni złożonego środowiska *in vivo*, w którym komórki funkcjonują w trójwymiarowej strukturze tkankowej. W hodowlach 2D brakuje kluczowych interakcji komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa (ECM), które są istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórek w organizmie. Ponadto, w monowarstwie brakuje gradientu stężeń substancji odżywczych i tlenu, co może wpływać na różnice w odpowiedzi komórek w porównaniu do warunków panujących w tkankach. Ze względu na te ograniczenia, wyniki uzyskane w hodowlach 2D mogą nie zawsze być w pełni przewidywalne dla warunków *in vivo* [45–47]. W odpowiedzi na te wyzwania, coraz większym zainteresowaniem cieszą się techniki hodowli trójwymiarowych, które oferują bardziej złożone modele badawcze.

3.2 Hodowle trójwymiarowe (3D)

Hodowle trójwymiarowe (3D) stanowią zaawansowane modele komórkowe, które lepiej odwzorowują naturalne środowisko tkankowe. W odróżnieniu od hodowli 2D, hodowle 3D pozwalają na tworzenie przestrzennych modeli komórkowych, które mogą być uzyskiwane na różne sposoby, w zależności od ich zdolności do samoorganizacji lub użycia dodatkowych biomateriałów. Jednym z najprostszych sposobów uzyskiwania hodowli 3D jest umożliwienie komórkom samoorganizacji w trójwymiarowe struktury, takie jak agregaty komórkowe czy sferoidy.

Agregaty komórkowe to skupiska komórek powstałe w wyniku losowych oddziaływań między komórkami, często nie wykazujące wyraźnej wielowarstwowości ani ścisłej organizacji. Sferoidy natomiast są bardziej zorganizowanymi, kulistymi strukturami, powstałymi w wyniku aktywnych interakcji komórka-komórka, z charakterystycznym układem warstwowym. W sferoidach komórki zewnętrzne mają kontakt z pożywką i są dobrze dotlenione, komórki położone wewnątrz znajdują się w warunkach ograniczonego dostępu do tlenu i składników odżywczych (co prowadzi do powstawania rdzenia nekrotycznego), a warstwa pośrednia to komórki w fazie spoczynku. Taka wielowarstwowa organizacja umożliwia lepsze modelowanie warunków *in vivo*, np. podczas badań nad nowotworami czy regeneracją tkanek. Kontrolowanie wielkości i kształtu sferoidów stanowi wyzwanie, gdyż wpływa na ich jednorodność i powtarzalność wyników eksperymentów. Niezbędne jest stosowanie precyzyjnych metod, np. mikropłytki o niskiej adhezji lub płytkę z mikrowgłębieniami, by uzyskać sferoidy o określonych rozmiarach [48–52]. Sferoidy są wykorzystywane w onkologii, ale także w kardiologii do badania przebudowy mięśnia sercowego, regeneracji po uszkodzeniach niedokrwienych i oceny toksyczności leków. Przykładem są sferoidy kardiomiocytów tworzone z ludzkich indukowanych komórek pluripotencjalnych (hiPSC-CMs) [53]. Sferoidy komórek wątrobowych (hepatosferoidy) są natomiast szeroko stosowane w badaniach nad metabolizmem leków oraz testach hepatotoksyczności [54].

Innym podejściem jest wykorzystanie biomateriałów jako rusztowań, które wspierają tworzenie struktur 3D. Najczęściej stosuje się tu hydrożele, maty nanowłókniste oraz inne materiały naśladujące naturalną macierz zewnątrzkomórkową (ECM). Hydrożele to wysoko uwodnione polimery o pochodzeniu naturalnym (np. kolagen, żelatyna, fibronektyna, agar, alginian sodu, chitozan) lub syntetycznym (np. poli(akryloamid), poli(etylenoglikol) – PEG,

poliwinyloalkohol – PVA). W praktyce badawczej często wykorzystuje się np. kolagenowe, alginianowe i PEG-owe hydrożele [55–58]. Przygotowanie hodowli komórek w hydrożelu polega na wymieszaniu zawiesiny komórek z płynną formą hydrożelu, który pod wpływem odpowiednich warunków (np. temperatury, pH, obecności jonów wapnia) żeluje się, tworząc sieć przestrzenną. Pozwala to na jednorodne rozmieszczenie komórek oraz wierniejsze naśladowanie struktury i funkcji ECM. Hydrożele są przezroczyste, co umożliwia obserwacje mikroskopowe, a dzięki możliwości modyfikowania ich właściwości mechanicznych i biochemicznych można je dostosować do wymagań różnych typów komórek. Wadą hydrożeli jest konieczność ścisłej kontroli warunków żelowania, porowatości i elastyczności, by zapewnić optymalny rozwój komórek. Przykładem stosowanego hydrożelu jest Matrigel®, który jest szeroko wykorzystywany do hodowli komórek macierzystych, różnicowania organoidów oraz modelowania angiogenezy *in vitro* [59]. Coraz częściej stosuje się także hydrożele hybrydowe, łączące właściwości różnych polimerów – np. alginian-kolagen lub PEG-fibryna – co pozwala lepiej dostosować rusztowanie do specyficznych potrzeb komórek [60]. Dodatkowo, w ostatnich latach następował dynamiczny rozwój zaawansowanych technologii druku 3D, takie jak bioprinting, czyli drukowanie przestrzenne biotuszków komórkowych opartych o hydrożele. Bioprinting umożliwia tworzenie precyzyjnych, wielowarstwowych struktur tkankowych zawierających żywe komórki oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Przykładem zastosowania tej technologii jest drukowanie modeli wątroby, fragmentów serca czy skóry, które znajdują zastosowanie w badaniach toksyczności leków oraz testach farmakologicznych [61].

Kolejną metodą tworzenia hodowli 3D jest zastosowanie podłoży nanowłóknistych. Maty nanowłókniste wytwarzane są najczęściej z poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL), polilaktydu (PLA), poliglikolidu (PGA), poliuretanu (PU), żelatyny, kolagenu czy chitozanu [62]. Najpopularniejsze techniki produkcji to elektroprzędzenie (ES ang. *electrospinning*) oraz rozdmuch roztworu polimeru (SBS ang. *solution blow spinning*). Maty te cechują się bardzo wysokim stosunkiem powierzchni do objętości (SAV ang. *surface area to volume ratio*), wysoką porowatością, elastycznością i wytrzymałością mechaniczną. Dzięki tym właściwościom umożliwiają komórkom tworzenie trójwymiarowych struktur zbliżonych do naturalnych tkanek [63]. Wybór odpowiedniego materiału, kontrola parametrów rusztowania i zapewnienie jego biokompatybilności są kluczowe dla powodzenia hodowli [64–67]. Przykładowo, rusztowania nanowłókniste wykonane z mieszanin PCL/żelatyna lub PLGA/elastyna są z powodzeniem stosowane do wspierania wzrostu komórek nerwowych,

chondrocytów czy keratynocytów, a także w badaniach nad regeneracją skóry i tkanek nerwowych [68,69]. Natomiast nanowłókna chitozanowe są szeroko używane w modelach gojenia ran oraz w rekonstrukcji nerwów [70].

Modele komórkowe, uzyskiwane zarówno w hodowli 2D i 3D , odgrywają kluczową rolę w badaniach *in vitro*. Hodowle 2D komórek, choć proste i łatwe w wykorzystaniu, mają swoje ograniczenia wynikające z braku odwzorowania złożonego środowiska *in vivo*. Z kolei hodowle trójwymiarowe, takie jak samoorganizujące się sferoidy czy struktury tworzone przy użyciu hydrożeli i nanowłókien, oferują bardziej realistyczne modele badawcze, choć wiążą się z większymi wyzwaniami technicznymi. Dzięki ciągłemu rozwojowi technologii hodowli komórek, pojawiając się coraz większe możliwości badania złożonych procesów biologicznych i testowania nowych terapii w warunkach laboratoryjnych, co przyczynia się do postępu w dziedzinie medycyny i biotechnologii.

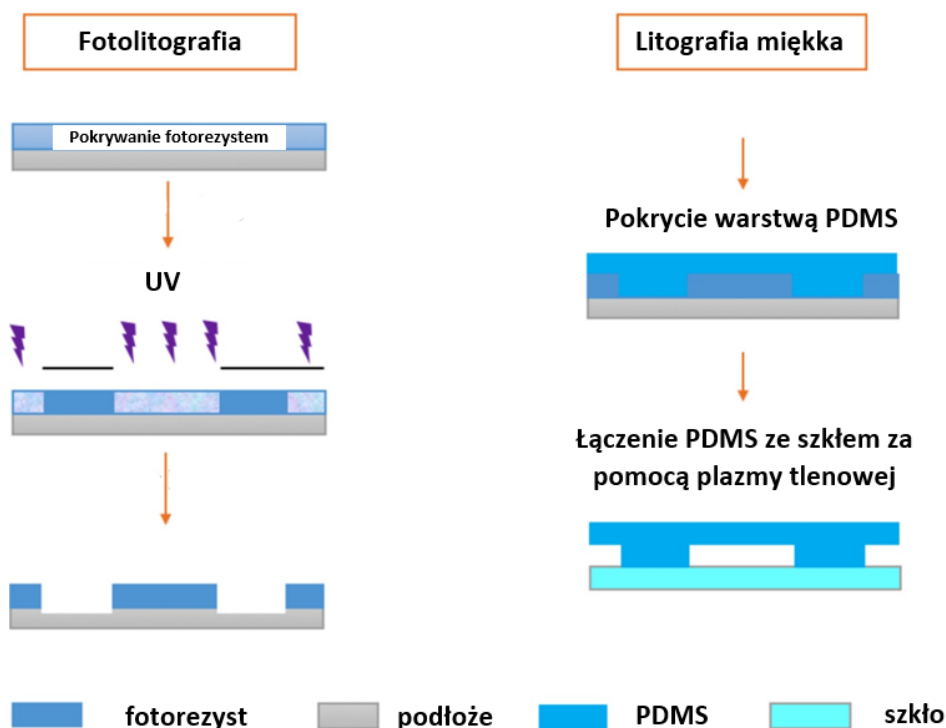
4. Mikrosystemy przepływowe do hodowli komórek tkanki serca

Mikrosystemy przepływowe stanowią innowacyjne narzędzia, które stanowią nowe podejście do badania i hodowli komórek serca. Te miniaturowe systemy umożliwiają precyzyjną kontrolę mikrośrodowiska, co pozwala na odwzorowanie w pewnym stopniu warunków panujących w ludzkim organizmie. Dzięki zdolności do precyzyjnego sterowania przepływem płynów, temperaturą oraz dostarczaniem substancji odżywczych, mikrosystemy oferują możliwość zastosowania ich w badaniu chorób układu sercowo-naczyniowego. Głównym celem wykorzystania mikrosystemów przepływowych w hodowli komórek serca jest uzyskanie warunków, które jak najwierniej naśladują fizjologiczne środowisko pracy serca. Tradycyjne metody hodowli komórek, mimo tego że są szeroko stosowane, nie zapewniają dynamicznych warunków wzrostu komórek oraz gradientów chemicznych i fizycznych, które są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania komórek serca. Mikrosystemy przepływowe mogą z powodzeniem symulować te warunki, umożliwiając bardziej dokładne badania nad funkcjonowaniem, patologią i regeneracją serca. Mikrosystemy przepływowe do hodowli komórek serca wykonywane są z wykorzystaniem takich metod jak fotolitografia, mikrofrezowanie czy druk 3D [71–73]. Materiałami najczęściej stosowanymi do ich wytwarzania są biokompatybilne polimery, takie jak poli(dimetylosiloksan) (PDMS), a także szkło oraz polimery termoplastyczne [74–76].

4.1 Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych do hodowli komórek serca

Mikrosystemy przepływowe, stosowane w hodowli komórek mięśnia serca, to zaawansowane narzędzia umożliwiające kontrolę mikrośrodowiska hodowlanego. Dzięki zastosowaniu odpowiednich materiałów oraz zaawansowanych technik wytwarzania, mikrosystemy te mogą naśladować warunki *in vivo*. Jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów do wytwarzania mikrosystemów przepływowych jest poli(dimetylosiloksan) (PDMS). PDMS jest elastycznym, przezroczystym polimerem, który posiada liczne właściwości czyniące go idealnym do zastosowań biologicznych [77]. Jest biokompatybilny, co oznacza, że nie wywołuje toksycznych reakcji w komórkach hodowlanych. Jego przepuszczalność dla gazów, takich jak tlen i dwutlenek węgla, ułatwia utrzymanie odpowiednich warunków metabolicznych w hodowlach komórkowych. Szkło jest kolejnym materiałem często wykorzystywanym do konstrukcji mikrosystemów przepływowych. Charakteryzuje się doskonałą przejrzystością optyczną, co umożliwia prowadzenie mikroskopowych obserwacji komórek [78]. Jest również odporne na wysokie temperatury i

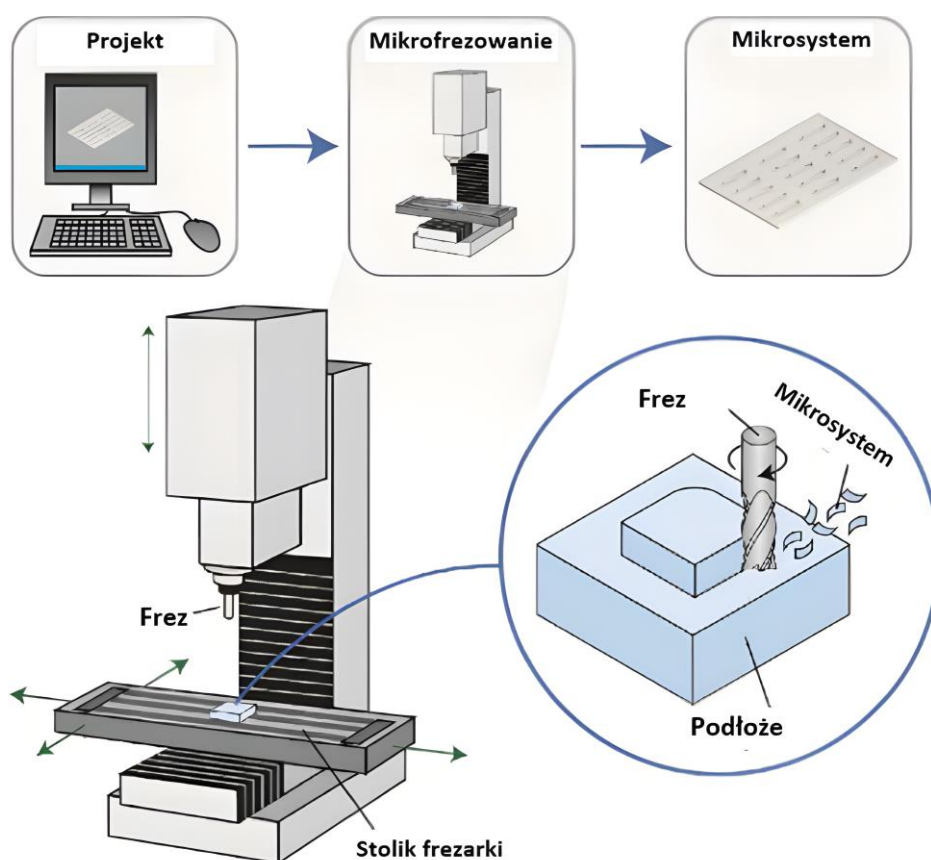
większość substancji chemicznych, co czyni je idealnym do długoterminowych eksperymentów. Jednak jego kruchość może stanowić ograniczenie w pewnych zastosowaniach. Polimery termoplastyczne, takie jak polistyren (PS) [79], poli(metakrylan metylu) (PMMA) [80], poliwęglan (PC) [81] oraz cykliczny kopolimer olefinowy (COC) [82], również znajdują zastosowanie w wytwarzaniu mikrosystemów przepływowych. Te materiały są stosunkowo łatwe do obróbki, co pozwala na formowanie różnych kształtów i mikrostruktur. W zależności od zastosowanego materiału, mogą mieć one różne właściwości mechaniczne, takie jak wytrzymałość na rozciąganie, odpowiednią twardość oraz różną odporność na wysoką temperaturę. Wadą tworzyw termoplastycznych jest ich ograniczona odporność na wysokie temperatury, co może wpływać na ich wytrzymałość i stabilność [83]. Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych wymaga zastosowanie technik, które umożliwią uzyskanie struktur rzędu mikrometrów. Fotolitografia jest jedną z najczęściej stosowanych metod, pozwalającą na precyzyjne tworzenie mikrowzorów na powierzchni podłoża [84]. Metoda ta polega na naświetlaniu materiału światłoczułego (fotorezystu) przez maskę z projektem mikrosystemu. Po naświetleniu i wywołaniu, naświetlone lub nie naświetlone części fotorezystu jest usuwane (w zależności czy jest on pozytywny czy negatywny), odsłaniając materiał podłoża, który następnie jest trawiony, tworząc pożądaną mikrostrukturę (Rycina 4).



Rycina 4 Schematyczne przedstawienie metody fotolitografii fotorezystem negatywowym oraz litografii miękkiej.[85]

Mikrofrezowanie jest kolejną techniką wytwarzania mikrosystemów przepływowych, polegającą na precyzyjnym usuwaniu materiału z podłoża za pomocą frezarki. Technika ta umożliwia tworzenie mikrosystemów o skomplikowanych kształtach i wymiarach, a także struktur o różnych wysokościach (Rycina 5) [71]. Wadą mikrofrezowania jest to, że jest to powolny proces, w porównaniu z innymi metodami, takimi jak np. druk 3D.

Kolejną metodą jest metoda odlewu, jest powszechnie stosowaną techniką wytwarzania mikrosystemów przepływowych, polegającą na formowaniu kanałów i innych elementów mikrosystemu w poli(dimetylosiloksanie). W celu wykonania mikrostruktur wykorzystuje się matrycę (tzw. pieczętkę), na którą nanoszona jest wcześniej przygotowana mieszanina elastomeru i czynnika sieciującego (najczęściej w stosunku wagowym 10:1). Pieczętka wykonywana może być z wykorzystaniem takich technik jak fotolitografia, mikrofrezowanie czy druk 3D. Po usieciowaniu elastomer jest usuwany z matrycy, dzięki czemu uzyskujemy dokładnie odwzorowaną mikrostrukturę.



Rycina 5 Schematyczne przedstawienie procesu mikrofrezowania mikrosystemów przepływowych [71].

Druk 3D, w tym technika biodruku, to jedna z najnowszych metod, które umożliwiają tworzenie trójwymiarowych mikrostruktur przepływowych bezpośrednio z cyfrowego modelu CAD. Druk 3D pozwala na dużą dowolność w projektowaniu i tworzeniu złożonych struktur, które nie są możliwe do uzyskania przy zastosowaniu innych metod. Biodruk, będący z kolei połączeniem mikrotechnologii i druku 3D, umożliwia tworzenie trójwymiarowych mikroukładów i modeli, które naśladują biologiczne tkanki i narządy. W przypadku wytwarzania geometrii mikrostruktur mikrosystemów przepływowych do hodowli komórek serca niezwykle istotne jest, aby podczas projektowania tych układów uwzględnić zarówno charakterystykę tkanki, jak i specyficzne wymagania komórek serca, tak aby jak najlepiej odtworzyć mikrośrodowisko ich wzrostu [86–88].

Jednym z kluczowych parametrów, jakie zapewnia zastosowanie mikrosystemów przepływowych, jest kontrola przepływu medium hodowlanego, który dostarcza niezbędnych składników odżywczych oraz usuwa produkty przemiany materii. Wysoki stosunek powierzchni do objętości (SAV) w takich mikrosystemach, typowo mikrokanały o szerokości 100–400 μm pozwalają na efektywną wymianę gazów i substancji odżywczych [89]. Co istotne, przepływ medium w mikrosystemach przepływowych charakteryzuje się laminarnym profilem (liczba Reynoldsa < 100), co pozwala na zminimalizowanie naprężeń ścinających, które mogą negatywnie wpływać na komórki. Przykładem jest praca, w której wykazano, że utrzymanie laminarnych warunków przepływu (20 $\mu\text{L/h}$) sprzyja długoterminowej przeżywalności kardiomiocytów [90].

Odpowiednie warunki przepływu stanowią jednak tylko jeden z elementów wpływających na tworzenie hodowli kardiomiocytów w mikrosystemach. Równie istotne jest zapewnienie właściwego poziomu tlenu w mikrośrodowisku komórek. Kardiomiocyty są szczególnie wrażliwe na niedotlenienie, które może prowadzić do stresu komórkowego i śmierci komórek. Przykładem jest praca, w której zastosowanie PDMS jako materiału o wysokiej przepuszczalności gazowej umożliwiło kontrolę stężenia tlenu w zakresie 0,01 – 9,9%, przy natężeniu przepływu pożywki od 0,5 do 15 $\mu\text{L/min}$, co pozwoliło na utrzymanie wysokiej przeżywalności kardiomiocytów w trakcie długotrwałej hodowli [91]. Kolejnym aspektem wpływającym na hodowle komórkowe jest wybór materiałów konstrukcyjnych mikrosystemu oraz możliwość prowadzenia mechanicznej stymulacji komórek. Przykładem jest badanie, w którym zastosowanie elastycznego PDMS i cyklicznego rozciągania podłoża (10%, 1 Hz) prowadziło do zwiększenia dojrzałości kardiomiocytów i poprawy ekspresji markerów funkcjonalnych [92]. Równie ważna dla badań nad komórkami

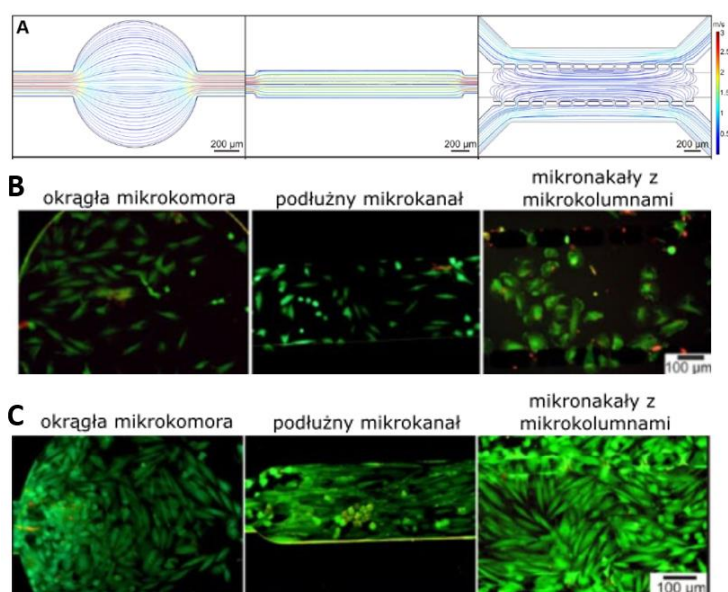
serca jest możliwość prowadzenia obserwacji i pomiarów w czasie rzeczywistym. Przykładowo, konstrukcja mikrosystemu wykorzystująca przezroczyste materiały, takie jak PDMS czy szkło, pozwala na mikroskopowe monitorowanie żywych komórek, a integracja mikroelektrod (np. złotych elektrod o średnicy 30 μm) umożliwia rejestrację aktywności elektrycznej i ocenę funkcji kardiomiocytów podczas eksperymentu [93].

W ostatnich latach, wraz z rozwojem inżynierii tkankowej i technologii *Organ-on-a-Chip*, mikrosystemy przepływowe do hodowli kardiomiocytów stały się narzędziem o szczególnym znaczeniu badawczym. Przykładem zastosowania takiego systemu jest praca, w której *Heart-on-a-Chip* wykorzystano do oceny kardi toksyczności doxorubicyny, gdzie przepływ medium umożliwił dokładniejszą analizę wpływu leku na funkcjonowanie kardiomiocytów [94]. Ten jeden z wielu przykładów pokazuje jak technologia *Lab-on-a-chip* pozwala na testowanie nowych leków oraz badanie wpływu różnych czynników mikrośrodowiska na funkcjonowanie mięśnia sercowego.

4.2 Mikrosystemy do stymulacji mechanicznej komórek mięśnia serca

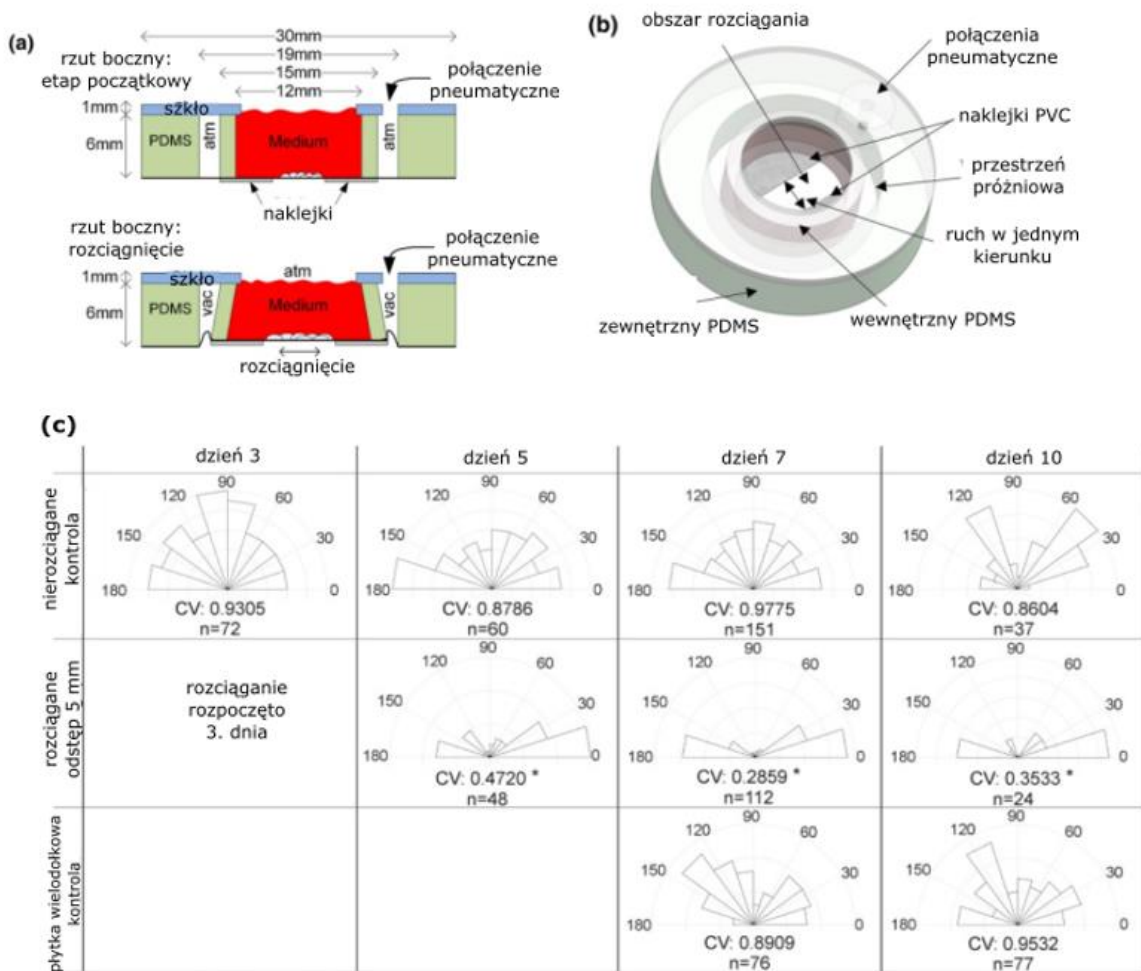
Stymulacja mechaniczna komórek serca jest kluczowym elementem badań nad funkcjonowaniem serca oraz rozwijaniem nowych terapii. Mikrosystemy przepływowe oferują wyjątkowe możliwości w zakresie precyzyjnego kontrolowania mechanicznych stymulacji, którym poddawane mogą być komórki serca. Umożliwia to naśladowanie naturalnych warunków panujących w organizmie. Mikrosystemy o różnej geometrii, z zastosowaniem różnych metod stymulacji wykorzystywane są do badania ich wpływu na funkcjonowanie komórek serca [95]. Jednym z parametrów jest wykonanie mikrosystemów do stymulacji mechanicznej, w których możliwe jest naśladowanie biomechanicznych warunków panujących w tkance serca, takie jak rytmiczne skurcze i rozkurcze. W tym celu, stosowane mogą być materiały elastyczne, które mogą wytrzymać wielokrotne cykle rozciągania i ściskania. Najczęściej stosowanym materiałem jest PDMS. Wynika to z jego właściwości jakim jest wysoka elastyczność i biokompatybilność. Innym sposobem stymulacji mechanicznej komórek jest wykorzystanie przepływu medium hodowlanego w mikrokanałach mikrosystemów. Stosowany może być przepływ pulsacyjny, naśladujący np. natywny przepływ krwi w naczyniach krwionośnych, co wywołuje naprężenia ścinające na komórki. Naprężenia te są jednym z czynników istotnym w prawidłowym funkcjonowaniu kardiomiocytów. Warunki dynamiczne hodowli wpływać mogą na strukturę, metabolizm i zdolność do skurczu komórek. W literaturze przedstawiono wyniki badań potwierdzające, że komórki hodowane w warunkach

dynamicznych (przepływowych) wykazują morfologię zbliżoną do natywnych komórek bardziej niż w statycznej hodowli komórek (Rycina 6) [96].



Rycina 6 A) Symulacja przepływów generowanych w trzech typach mikroukładów: komora okrągła, komora podłużna i mikrokanady z mikrokolumnami; B) Komórki H9c2 w hodowlach statycznych wybarwione CAM (zielony) i PI (czerwony) 4 dnia hodowli; C) komórki H9c2 w hodowlach przepływowych wybarwione CAM (zielony) i PI (czerwony) 40 dnia hodowli.

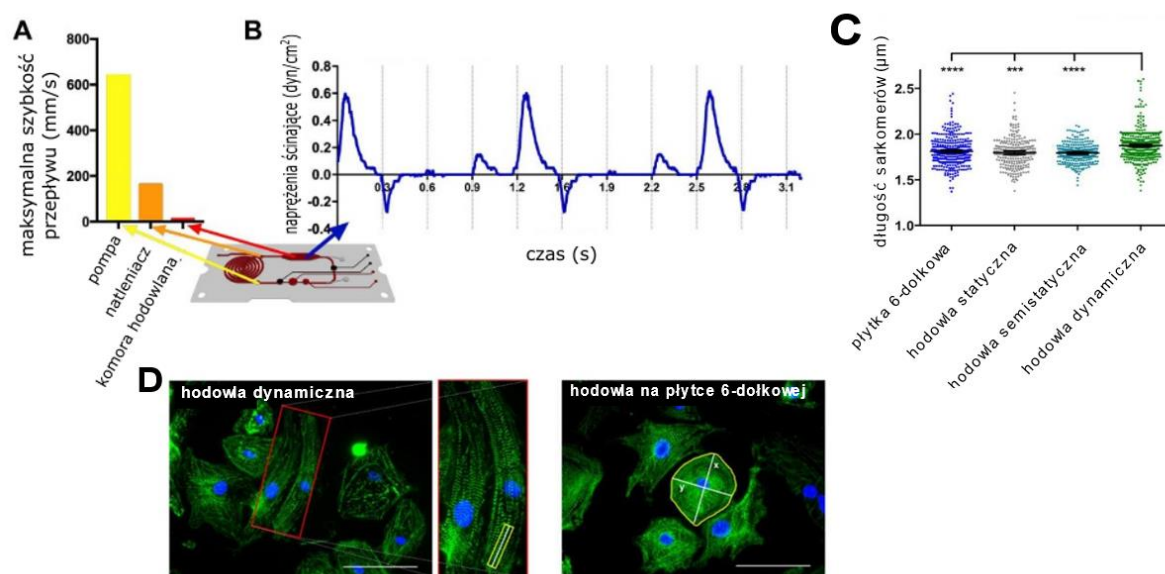
Stymulacja mechaniczna może być również prowadzona z wykorzystaniem elastycznych membran, które są rozciągane i ściskane w kontrolowany sposób. Praca tego typu mikrosystemów może być stosowana poprzez zastosowanie pomp pneumatycznych lub pola elektromagnetyczne, które generują cykliczne ruchy membran, symulując tym samym skurcze serca [97–99]. Możliwe jest badanie w takich mikrosystemach wzrostu komórek po działaniu czynnikami mechanicznymi. W jednym z badań wykorzystano mikrosystem składający się z elastycznej membrany PDMS, cyklicznie rozciąganej i ściskanej (Rycina 7). Komórki serca (hiPSC-CMs) hodowane na tej membranie wykazywały poprawę w organizacji sarkomerów, zwiększoną ekspresję białek kurczliwych oraz lepszą synchronizację skurczów w porównaniu do komórek hodowanych na sztywnym podłożu. Wyniki te podkreślają znaczenie mechanicznej stymulacji dla funkcjonalnej dojrzałości kardiomiocytów [100].



Rycina 7 A,B) Schematy konstrukcji mikrosystemu; C) Ułożenie sarkomerów w komórkach w mikrosystemach nie poddawanych rozciąganiu, poddawanych rozciąganiu i w hodowli na płytce wielodółkowej. CV = wariancja, gdzie 0 to ułożenie jednakowe, a 1 to ułożenie zupełnie losowe. n = liczba badanych komórek, * oznacza $p < 0,001$.

Tak jak wspomniano wcześniej jedną z metod stymulacji mechanicznej jest zastosowanie mikrosystemów z kontrolowanym przepływem medium, które generują naprężenia ścinające podobne do tych występujących w naczyniach krwionośnych. Przepływ ten może być kontrolowany przez różne czynniki, takie jak np. ciśnienie. Przykładem rozwiązania, w którym połączono kilka czynników umożliwiających stymulację jest mikrosystem typu "flow-stretch", w którym do stymulacji komórek zastosowano warunki dynamiczne oraz mechaniczne rozciąganie komórek (Rycina 8). W wytworzonym mikrosystemie komórki hodowano na elastycznej membranie umieszczonej w specjalnie zaprojektowanym mikrokanale. Medium hodowlane przepływało przez mikrokanal, generując naprężenia ścinające, podczas gdy membrana była cyklicznie rozciągana. Takie połączenie czynników mechanicznych stymulowało komórki, naśladując natywne warunki wzrostu

komórek. Wykazano, że kardiomiocyty hodowane w mikrosystemie "flow-stretch" wykazywały zwiększoną wytrzymałość na działanie czynników mechanicznych, lepszą organizację cytoszkieletu oraz wyższą ekspresję genów związanych z funkcją kurczliwą. Ponadto, proponowane rozwiązanie technologiczne może być zastosowane do badania odpowiedzi komórek na różne warunki patologiczne, takie jak nadciśnienie czy niedotlenienie [101].



Rycina 8 A) Wykres przedstawiający maksymalną szybkość przepływu medium komórkowego w różnych miejscach układu. B) Wartości naprężeń ścinających generowanych w komorze hodowlanej przepływem medium. C) Długości sarkomerów po 7 dniach hodowli dla trzech prób kontrolnych (hodowli statycznej na płytce 6-dołkowej, hodowli na chipie bez wprowadzenia przepływu i hodowli na chipie semistatycznej – z indukcją przepływu w interwałach 6 h przez 5 min) oraz dla hodowli z ciągłym przepływem medium. D) Zdjęcie fluorescencyjne wybarwionych prób dla hodowli z przepływem i dla hodowli statycznej (alfa-aktyna – kolor zielony, jądra komórkowe – kolor niebieski).

Stymulacja mechaniczna w mikrosystemach może być również uzyskiwana poprzez zastosowanie mikroelektromechanicznych systemów (MEMS). Rozwiązanie to pozwala na precyzyjne kontrolowanie ruchów mechanicznych na poziomie mikroskali, co umożliwia generowanie złożonych metod stymulacji. Przykładem jest zastosowanie magnetycznych mikroślowników (nikłowe belki $\approx 20 \times 50 \times 5 \mu\text{m}$) zatopionych w elektroprzędzonych włóknach z metakrylanu dekstranu (DexMA). Wykazano, że obrót pola magnetycznego o 90° zgina sieć o kilka mikrometrów i wywołuje lokalne odkształcenia podłoża. Na tak przygotowanej macierzy badano migrację fibroblastów NIH-3T3 [102]. Nowym podejściem

stymulacji mechanicznej jest wykorzystanie druku 3D do tworzenia trójwymiarowych struktur biomimetycznych. Opisano struktury drukowane z kulistych agregatów zawierających 70 % hiPSC-CM, 15 % ludzkich fibroblastów sercowych i 15 % komórek śródbłonka pępowinowego (HUVEC). Powstały model komórkowy ($4 \times 2 \times 1$ mm) zamocowano w elastycznej formie z PDMS i poddano statycznemu rozciąganiu 12,5 % przez 1 – 28 dni. Już po 7 dniach sarkomery wydłużyły się z $1,0 \mu\text{m}$ do $1,5 \mu\text{m}$, a po 4 tygodniach odnotowano dwukrotny wzrost ich długości, ok. 250 pN maksymalnej siły skurczu oraz większą elastyczność całej tkanki, co wskazuje na wyraźne dojrzewanie kardiomiocytów [103].

Oprócz stymulacji mechanicznej, mikrośrodowisko tkanki serca można odwzorować poprzez stymulację strukturalną, czyli zintegrowanie z mikroukładami przepływowymi cienkich, ukierunkowanych mat nanowłóknistych, które ułatwiają dojrzewanie kardiomiocytów. Pierwszym przykładem takiego rozwiązania są elektroprzędzone włókna PMGI/PLGA o średnicy ok. 600 nm, które zostały umieszczone na dnie komory z PDMS. Następnie hodowano na nich noworodkowe kardiomiocyty mysie poddawane ciągłemu przepływowi $50 \mu\text{L/h}$. Po 10 dniach hodowli komórki rosły równolegle względem włókien, miały wydłużone sarkomery z $1,3$ do $1,7 \mu\text{m}$ i miały zwiększoną ekspresję koneksyny-43, co potwierdziło poprawę przewodnictwa elektrycznego [104]. Drugim przykładem jest mikrosystem przepływowy, w którym wzdłuż mikorkanału PDMS umieszczono ukierunkowaną matę nanowłóknistą z poli(ϵ -kaprolaktonu)/żelatyny o średnicy włókien ok. 350 nm. Poddając działaniu stałego przepływu $20 \mu\text{L/min}$. Na takim podłożu hodowano hiPSC-CMs, po 14 dniach hodowli zaobserwowano wydłużanie się sarkomerów do $1,8 \mu\text{m}$ oraz wzrost amplitudy skurczu który był o 35 % większy niż na matach z losowo ukierunkowanymi włóknami. Dowodzi to temu, że stymulacja strukturalna i stymulacja naprężeniem przepływu wpływa na dojrzewanie kardiomiocytów [105].

Podsumowując, mikrotechnologia zapewnia nam możliwość opracowania narzędzi, w których możemy naśladować mikrośrodowisko tkanki serca poprzez zastosowanie stymulacji mechanicznej i strukturalnej. W tym celu, stosowane mogą być biomateriały (np. maty nanowłókniste, biomateriały o specyficznej mikrostrukturze) zintegrowane w mikrosystemach przepływowych, zastosowanie warunków przepływowych oraz dodatkowych membran, biomateriałów umożliwiających rozciąganie komórek na nich rosnących. Dzięki zastosowaniu stymulacji mechanicznej możliwe jest wytworzenie modelu

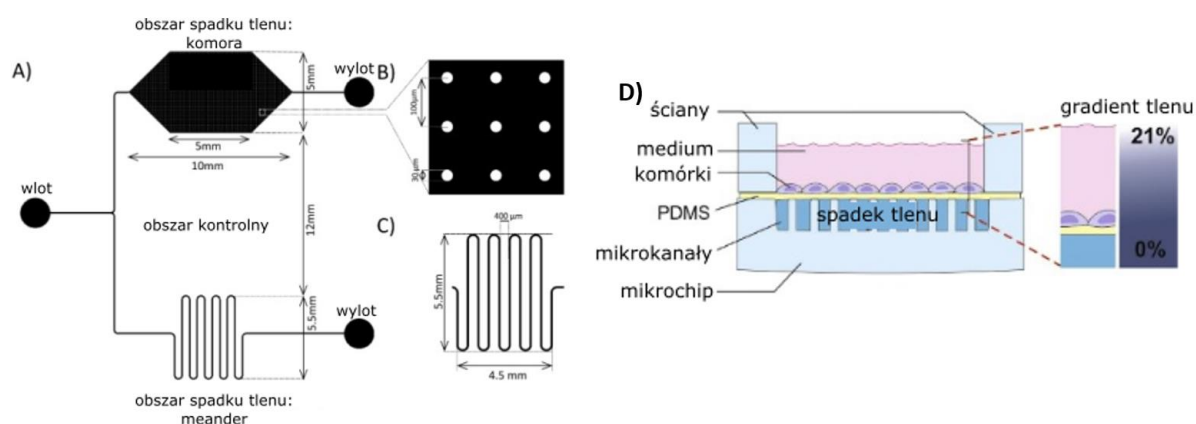
komórek serca do badania ich funkcji w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych, a także rozwijanie nowych terapii i metod diagnostycznych.

4.3 Mikrosystemy do symulacji warunków chorobowych

Symulacja warunków chorobowych w mikrosystemach przepływowych umożliwia badanie mechanizmów patologicznych oraz testowanie nowych terapii w kontrolowanych warunkach. Dzięki możliwości odwzorowania mikrośrodowiska biologicznego, mikrosystemy te pozwalają na modelowanie chorób serca, takich jak np. niedotlenienie (hipoksja). Istnieją różne podejścia symulacji warunków chorobowych. Przykładowo, odpowiednia regulacja poziomu ciśnienia w mikrokanalach pozwala odwzorować nadciśnienie tętnicze, będące istotnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Zastosowanie pulsacyjnego przepływu medium umożliwia analizę jego wpływu na funkcje kardiomiocytów np. zmiany w strukturze cytoszkieletu czy ekspresji białek kurczliwych w odpowiedzi na obciążenie mechaniczne. Innym przykładem są mikrosystemy wyposażone w elektrody umożliwiające badania arytmii serca poprzez generowanie impulsów elektrycznych, które naśladują naturalne sygnały – pozwala to analizować powstawanie arytmii i skuteczność leków antyarytmicznych [106]. Kardiomiopatie są natomiast modelowane przez hodowlę komórek z określonymi mutacjami (np. przerostowymi lub rozstrzeniowymi), co pozwala badać ich wpływ na strukturę i funkcję serca oraz testować nowe strategie terapeutyczne [107,108].

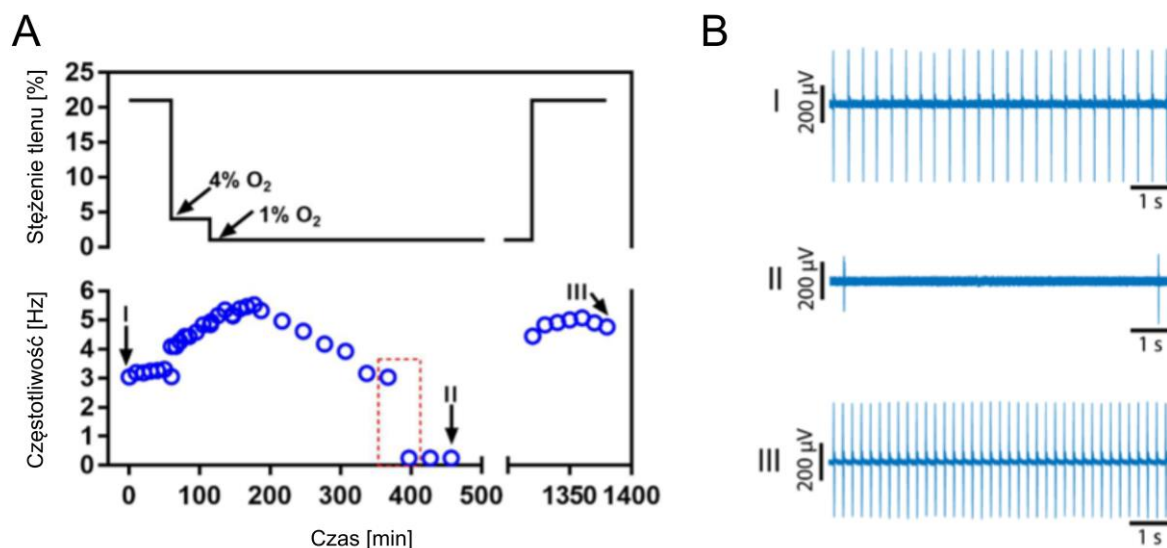
Symulacja niedotlenienia, czyli hipoksji, jest kluczowa dla zrozumienia wielu chorób sercowo-naczyniowych. Niedotlenienie występuje, gdy tkanki nie otrzymują wystarczającej ilości tlenu, co prowadzi do stresu komórkowego i może powodować uszkodzenia mięśnia sercowego. W warunkach *in vitro* w celu symulacji niedotlenienia (hipoksji) stosowane są np. komory beztlenowe lub inkubatory, w których stężenie tlenu utrzymywane jest na poziomie 0 - 1 % [109,110]. W mikroskali, hipoksję można uzyskać na przykład dzięki regulowanemu przepływowi mieszaniny gazów przez mikrokanaly, zastosowaniu materiałów przepuszczalnych dla gazów takich jak PDMS lub nieprzepuszczalnych jak PC, zastosowaniu kanałów reakcyjnych (gdzie tlen jest pochłaniany przez związki chemiczne) lub odtlenowaniu medium hodowlanego wprowadzanego do mikrosystemu [111–113]. Przykładowo, Barmaki i inni opracowali mikrosystem, w którym kardiomiocyty wyizolowane z serca noworodków szczura były hodowane w mikrokanalach z regulowanym przepływem gazów, umożliwiającym tworzenie gradientów tlenu. W takich warunkach komórki wykazywały

zmiany w ekspresji genów i białek odpowiedzialnych za odpowiedź na stres oksydacyjny, w tym wzrost ekspresji HIF-1 α i białek antyoksydacyjnych [114].



Rycina 9 Schemat układu mikroprzepływowego do miejscowej indukcji hipoksji prezentowanego przez Barmaki *et al.* [114]. A, B, C) Schematy poszczególnych elementów mikroukładu. D) Schemat hodowli komórek w mikroukładzie z oznaczonym gradientem stężeń tlenu

Kolejnym przykładem jest mikrosystem w którym, hipoksję uzyskiwano poprzez wymianę medium na medium zawierające 1% O₂, które podawano do mikrokanalów z kardiomiocytami HL-1. W takich warunkach zaobserwowano, że komórki najpierw reagowały przyspieszeniem częstości skurczów (tachykardia z 3,2 do 4,2 Hz), a następnie stopniowo zwalniały rytm aż do wystąpienia arytmii i wydłużenia odstępów między skurczami (do $4,9 \pm 1,5$ s). Wyniki te pokazują, że nagle lub stopniowe niedotlenienie wywołuje charakterystyczną dwufazową odpowiedź elektrofizjologiczną kardiomiocytów w warunkach *in vitro*.



Rycina 10 A) (góra) Schemat podawania medium z wyróżnionymi etapami normoksji, hipoksji oraz regeneracji oraz (dół) częstotliwość skurczów komórek HL-1. Czerwone przerywane pole podkreśla przejście od rytmicznych skurczów do arytmii. B) Przykładowe sygnały z pojedynczego urządzenia zarejestrowane podczas (I) normoksji, (II) hipoksji – w momencie pojawienia się arytmii – oraz (III) regeneracji.

Kolejnym przykładem modelu naśladującego niedotlenienie w warunkach *in vitro* jest mikrosystem przepływowy *Heart-on-a-chip* w którym kardiomiocyty pochodzące z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSC-CMs) hodowano przez 13 dni w mikrosystemach przepływowych z PDMS. Następnie, mikrosystemy umieszczano w szczelnych komorach, do których wprowadzano odpowiednią mieszaninę gazów w celu uzyskania różnych warunków tlenowych. Hipoksję uzyskiwano przez inkubację mikrosystemów przez 24h w atmosferze zawierającej 1% O_2 i 5% CO_2 (pozostała część to N_2). Kontrolę stanowiły mikrosystemy utrzymywane w warunkach normoksji (21% O_2) lub fizjoksji (5% O_2). W odpowiedzi na hipoksję zaobserwowano, że kardiomiocyty wykazywały obniżoną zdolność do kurczenia się, zmiany elektrofizjologiczne oraz wzrost poziomu markerów stresu oksydacyjnego i apoptozy[115].

Takie zaawansowane modele pozwalają na szczegółowe badania mechanizmów i ocenę innowacyjnych terapii w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Mimo postępów w tej dziedzinie, wciąż istnieje potrzeba opracowywania nowych metod, które jeszcze lepiej będą symulować warunki chorobowe *in vitro*. Wraz z dalszym rozwojem technologii mikrosystemy przepływowe mogą odgrywać coraz większą rolę w kardiologii, przyczyniając się do powstawania skuteczniejszych metod leczenia chorób sercowo-naczyniowych.

4.4 Przyszłe kierunki rozwoju

Przyszły rozwój mikrosystemów przepływowych do hodowli komórek serca opiera się na integracji zaawansowanych technologii oraz multidyscyplinarnych podejść. Jednym z najważniejszych kierunków jest wykorzystanie technik inżynierii tkankowej, zwłaszcza trójwymiarowego biodruku. Pozwala on na precyzyjne odwzorowanie architektury tkanki serca oraz drukowanie struktur złożonych z różnych typów komórek, takich jak kardiomiocyty, fibroblasty czy komórki śródbłónka, co umożliwia badanie ich interakcji w warunkach zbliżonych do fizjologicznych [116]. Kolejnym istotnym aspektem jest rozwój mikrosystemów wyposażonych w zaawansowane czujniki i systemy kontroli, które zapewniają monitorowanie i regulację parametrów takich jak temperatura, pH, stężenie tlenu, CO₂ oraz skład medium hodowlanego. Dzięki temu możliwe staje się utrzymanie optymalnych warunków hodowli oraz bieżącego monitorowania mikrośrodowiska komórkowego. Duży potencjał rozwoju mikrosystemów, związany jest z zastosowaniem technologii wielo-omikowych, takich jak genomika, proteomika, metabolomika czy epigenomika [117–120]. Umożliwia to szczegółowe badania molekularne zachodzące w komórkach serca w odpowiedzi na różne warunki środowiskowe i bodźce, np. dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji (NGS) do analizy ekspresji genów na poziomie pojedynczych komórek. Równolegle, coraz większe znaczenie zyskuje zastosowanie sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego do analizy dużych zbiorów danych generowanych przez mikrosystemy. Pozwala to na wykrywanie nowych wzorców, zależności oraz optymalizację warunków hodowli i prognozowanie odpowiedzi komórek na różne stymulacje [121–123]. Zaawansowane mikrosystemy przepływowe rozwijane są również w kierunku integracji platform multi-Organ-on-a-Chip. Takie systemy umożliwiają jednoczesne badania interakcji pomiędzy różnymi narządami, na przykład modelem *in vitro* serca i wątroby, co ma istotne znaczenie dla testowania nowych leków, oceny ich farmakokinetyki i toksykologii [94,124]. Wprowadzenie mikrosystemów przepływowych do medycyny spersonalizowanej umożliwić może hodowlę komórek pacjenta i analizę ich indywidualnych reakcji na terapię. Ponadto rozwój inżynierii materiałowej przyczynia się do stosowania nowych biomateriałów nanostrukturalnych, takich jak nanorurki węglowe czy nanocząstki metalowe, które poprawiają biokompatybilność, właściwości mechaniczne oraz funkcjonalność mikrosystemów [125]. Istotnym kierunkiem jest także wykorzystanie mikrosystemów do badań nad różnicowaniem komórek macierzystych, zwłaszcza iPSC, w kierunku kardiomiocytów oraz do testowania terapii regeneracyjnych.

5. Podsumowanie

Choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD) są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie, a liczba osób dotkniętych tymi schorzeniami stale rośnie. Główną przyczyną tego stanu rzeczy jest rozwój cywilizacyjny, który negatywnie wpływa na zdrowie populacji. W odpowiedzi na to wyzwanie, naukowcy na całym świecie poszukują nowych metod leczenia i diagnostyki, które mogą przeciwdziałać CVD. Inżynieria tkankowa odgrywa istotną rolę w leczeniu CVD, umożliwiając regenerację uszkodzonych tkanek za pomocą komórek macierzystych. Terapie komórkowe, choć wciąż wymagają wielu badań, obiecują wiele w kontekście regeneracji serca. Opracowywanie modeli komórkowych, które jak najwierniej naśladują cechy komórek ludzkich i symulują stany chorobowe, takie jak niedotlenienie i obniżenie zdolności metabolicznych umożliwić może przyspieszenie metod leczenia CVD. Badania komórkowe zazwyczaj prowadzone są jako hodowla dwuwymiarowa (2D), która polega na adhezji komórek do podłoża i wzroście w formie monowarstwy. Minusem tego rozwiązania jest brak odwzorowania warunków *in vivo*. Z kolei hodowla trójwymiarowa (3D), np. z wykorzystaniem hydrożeli czy podłożach nanowłóknistych, lepiej naśladuje naturalne mikrośrodowisko wzrostu komórek serca, umożliwiając przestrzenne ułożenie komórek. Nowym podejściem hodowli komórek serca są systemy typu *Heart-on-a-Chip*. Mikrosystemy te umożliwiają precyzyjną kontrolę stężenia tlenu oraz dostarczanie składników odżywczych. Dzięki zastosowaniu odpowiedniej geometrii mikrosystemów oraz materiałów o specyficznych właściwościach możliwe jest dokładne odwzorowanie warunków *in vivo*. Dodatkowo, w mikrosystemie przepływowym możliwa jest integracja z wspomnianymi wcześniej matami nanowłóknistymi, co umożliwi trójwymiarową hodowlę komórek i lepiej odzwierciedli warunki naturalne, zapewniając interakcje komórka - komórka oraz komórka - macierzą zewnątrzkomórkową.

Podsumowując, mikrosystemy przepływowe typu *Heart-on-a-chip* umożliwiają precyzyjne regulowanie poziomu tlenu w środowisku hodowli komórkowej. Osiąga się to zarówno poprzez odpowiednio zaprojektowaną geometrię kanałów, jak i zastosowanie nowoczesnych materiałów oraz reagentów. Dodatkowo, miniaturyzacja tych systemów sprzyja łatwemu integrowaniu modułów, które mogą kontrolować procesy wzrostu, różnicowania, dojrzewania oraz funkcji komórek, umożliwiając ich współdziałanie w strukturze przypominającej naturalną tkankę serca. Dalszy rozwój tych technologii powinien koncentrować się na symulowaniu warunków chorobowych i badaniu wpływu komórek macierzystych na regenerację

uszkodzonej tkanki serca, co pozwoli skuteczniej opracowywać nowe terapie dla chorób sercowo-naczyniowych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

6. Cel pracy

Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Uszkodzenia mięśnia sercowego, spowodowane na przykład zawałem, prowadzą często do nieodwracalnej utraty funkcji tego organu. Obecne metody leczenia są często niewystarczające, dlatego istnieje potrzeba opracowania nowych strategii terapeutycznych. Badania nad regeneracją komórek serca są zatem niezwykle istotne dla poprawy skuteczności leczenia pacjentów z chorobami CVD. Wykorzystane do tego mogą zostać mikrosystemy typu *Lab-on-a-chip*, które odgrywają kluczową rolę w inżynierii tkankowej i badaniach biomedycznych. Umożliwiają one tworzenie precyzyjnych modeli komórkowych odwzorowujących warunki panujące w organizmie. Dzięki temu możliwe jest prowadzenie bardziej wiarygodnych badań nad regeneracją tkanek, w tym tkanki serca.

Celem pracy było opracowanie mikrosystemów przepływowych typu *Heart-on-a-Chip*, zintegrowanych z matami nanowłóknistymi, umożliwiających wytworzenie modeli komórkowych tkanki serca oraz badanie wpływu niedotlenienia.

Szczegółowe cele badawcze pracy obejmowały:

1. Opracowanie mat nanowłóknistych do hodowli komórek serca.
2. Zaprojektowanie i wykonanie mikrosystemów przepływowych typu *Heart-on-a-Chip*.
3. Przeprowadzenie wielodniowej trójwymiarowej hodowli komórek serca w opracowanych mikrosystemach.
4. Symulowanie stanów chorobowych w mikrosystemie przepływowym.
5. Współhodowle komórek mięśnia serca i komórek macierzystych w mikrosystemie przepływowym.
6. Monitorowanie i analizę zmian fenotypowych oraz funkcjonalnych w komórkach serca.

Sformułowano hipotezę badawczą, że zastosowanie odpowiedniej geometrii mikrostruktur systemu, mat nanowłóknistych, stymulacji mechanicznej oraz warunków przepływowych umożliwi opracowanie, w systemie typu *Heart-on-a-chip*, modelu komórkowego, odwzorowującego mikrośrodowisko tkanki serca, a także uzyskanie warunków niedotlenienia.

7. Materiały, odczynniki i aparatura badawcza

7.1 Odczynniki

7.1.1 Odczynniki do hodowli i różnicowania komórek:

- Alkohol etylowy 96% cz.d.a. (*POCH, nr kat. 396420113*)
- Bufor HEPES (*Gibco, nr kat. 15630-106*)
- Buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco 1x (DPBS ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (*ATCC, nr kat. 30-2200*))
- Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS ang. *Phosphate Buffered Saline*) (*Sigma-Aldrich, nr kat. P54931L; Gibco, nr kat. 10010023*)
- CHIR99021 (*Selleckchem, nr kat. S1263-25 mg; BioKom, nr kat. 13122-5*)
- Inhibitor IWP-2 (*Tocris, nr kat. 3533-10 mg*)
- L-Glutamina 100X 200 mM (*Biowest, nr kat. X0550-100*)
- Matrigel® Basement Membrane Matrix (*Corning, nr kat. 354230, CLS354234-1EA*)
- Medium Essential 8 (E8) do hodowli iPSCs wraz z suplementem E8 (*Life Technologies/Gibco, nr kat. A1517001*)
- Aminokwasy endogenne (MEM NEAA ang. *Non-Essential Amino Acid*) (*Sigma-Aldrich, nr kat. M7145-100ML*)
- Penicylina-Streptomycyna roztwór 100X (*Biowest, nr kat. L0022-100*)
- Płodowa surowica bydlęca (FBS ang. *Fetal Bovine Serum Premium*) (*Biowest, nr kat. S181B-500; Gibco, nr kat. 10270*)
- Podstawowe medium do hodowli komórek (DMEM/F-12, ang. *dulbecco modified eagle medium: nutrient mixture F-1*) (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. 31330038*)
- Podstawowe medium do hodowli komórek RPMI 1640 (*Biowest, nr kat. L0498*)
- Podstawowe medium do hodowli komórek DMEM (*Biowest, nr kat. L0104*)
- Podstawowe medium do hodowli komórek F-12 (*Gibco, nr kat. 11765054*)
- Poli-L-lizyna (*ScienCell nr kat. 0413*)
- ROCK inhibitor (Dihydrochlorek Y-27632) (*Tocris/bio-technie, nr kat. 1254/10*)
- Roztwór Versene 0,48 mM (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. 15040066*)
- Suplement B-27™ bez insuliny (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. A1895601*)
- Suplement B-27™ z insuliną (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. 17504044*)
- Suplement GlutaMAX™ (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. 35050061*)
- Suplementem wzrostu miocytów (*ScienCell nr kat. #6152*)

- TrypLE™ Express Enzyme 10X bez czerwieni fenolowej (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. A1217701*)
- Trypsyna (*Sigma-Aldrich, nr kat. T4049*)

7.1.2 Odczynniki do analizy komórek

- 3 % roztwór surowiczej albuminy wołowej (BSA ang. *bovine serum albumin*) w DPBS (*Thermo Fisher Scientific, B10710*)
- AlamarBlue (*Bio-Rad, nr kat. 170309*)
- Barwnik JC-1 (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. T3168*)
- CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay (*Promega, nr kat. G9241*)
- CellTracker™ Red CMTPX Dye (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. C34552*)
- Chlorowodorek dopaminy ($\geq 99,9\%$) (*Sigma-Aldrich*)
- Dimetylosulfotlenek, DMSO (*Sigma-Aldrich, nr kat. 10192625*)
- Falloidyna sprzężona z Alexa Fluor 568 (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. A12380*)
- Hoechst 33342 (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. H1399; Sigma-Aldrich, nr kat. 94403*)
- Jodek propidyny (PI) (*Sigma-Aldrich, nr kat. P4864*)
- Kalceina-AM (*Sigma-Aldrich, nr kat. 177830*)
- Przeciwciało I-rzędowe królicze monoklonalne przeciwko sercowej troponinie T (*Abcam, nr kat. ab209813*)
- Przeciwciało I-rzędowe mysie monoklonalne skierowane przeciwko HIF-1 α (*Novus Biologicals, nr kat. NB100-105*)
- Przeciwciała II-rzędowe kozie anty-mysie/anty-królicze sprzężone z Alexa Fluor 488 (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. A32723; nr kat. A-11008*)
- Roztwór utrwalający (Fixative Solution): 4% PFA w PBS (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. FB002*)
- Startery dla genów: *TNNT2, SERCA2, SCN5A, Bax, MAP4K, HIF-1 α* (*Sigma – Aldrich*)
- Test kolorymetryczny MTT (*Sigma-Aldrich, nr kat. M2128-10G*)
- Triton™ X-100 (*Sigma-Aldrich, nr kat. T8787*)
- Trizma base ($\geq 99,9\%$) (*Sigma-Aldrich*)
- Zestaw H Minus First Strand cDNA (RevertAid™) (*Thermo Fisher Scientific, nr kat. K1632*)
- Zestaw RNase-Free DNase 250 (*QIAGEN, nr kat. 79256*)

- Zestaw RNeasy Mini 250 (*QIAGEN*, nr kat. 74106)
- Zestaw SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (*Bio-Rad*, nr kat. 1725270)

7.2 Materiał biologiczny

- **Linia komórkowa H9c2** - szczurze kardiomioblasty (*ATCC*, nr kat. CRL-1446) [126,127]
- **Linia komórkowa HCM** - pierwotne ludzkie kardiomiocyty (*Sciencell*, nr kat. #6200)
- **Linia komórkowa iPSC-CM** - ludzkie kardiomiocyty różnicowane z ludzkich indukowanych komórek macierzystych z wykorzystaniem protokołu GiWi opracowanego przez Lian i współl. [128]
- **Linia komórkowa iPSC** - ludzkie indukowane komórki macierzyste (Linia ludzkich komórek IIMCBi001-A) otrzymana przez Laboratorium Neurobiologii Molekularnej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, materiał uzyskany z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie [129].

7.2.1 Pożywki hodowlane

Media do hodowli i wysiewania komórek:

1. Medium do hodowli komórek linii iPSC-CM (RPMI+B-27): *Medium RPMI 1640, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM), 2% (v/v) suplement B-27*
2. Medium do hodowli komórek linii iPSC-CM i iPSC w mikrosystemach (RPMI+HEPES): *Medium RPMI 1640, 20% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM), 0,01% (v/v) HEPES (stężenie końcowe 200 mM)*
3. Medium do wysiewania komórek linii iPSC-CM i iPSC z ROCK inhibitorem w mikrosystemie (RPMI+HEPES+RI): *Medium RPMI 1640, 20% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM), 0,01% (v/v) HEPES (stężenie końcowe 200 mM), 0,1% (v/v) ROCK Inhibitor*
4. Medium do hodowli i wysiewania komórek linii H9c2 (DMEM L0104): *Medium DMEM, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM), 1% (v/v) L – glutamina*
5. Medium do hodowli i wysiewania komórek linii HCM (F-12): *Medium F12, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM),*

1% (v/v) L -glutamina, 1% (v/v) pirogronian sodu, 0,01% (v/v) aminokwasy endogenne i 0,01% (v/v) suplementem wzrostu miocytów serca.

6. Medium do wysiewania komórek linii iPSC na płytkę (E8+RI): *Medium E8, 2% (v/v) suplement E8, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM), 0,01% (v/v) ROCK Inhibitor*

7. Medium do hodowli komórek linii iPSC (E8): *Medium E8, 2% (v/v) suplement E8, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM)*

Media do różnicowania komórek iPSC do iPSC-CM:

1. Medium z CHIR (RPMI/B-27/ins-/CHIR): *Medium RPMI 1640, 2% (v/v) suplement B-27 bez insuliny, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM), CHIR99021 (stężenie końcowe 12 μ M)*

2. Medium bez insuliny (RPMI/B-27/ins-) *Medium RPMI 1640, 2% (v/v) suplement B-27 bez insuliny, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM)*

3. Medium z IWP2 (RPMI/B-27/ins-/IWP2) *Medium RPMI 1640, 2% (v/v) suplement B-27 bez insuliny, 1% (v/v) penicylina/streptomycyna (stężenie końcowe 100 mM), IWP2 (stężenie końcowe 10 μ M)*

7.2.2 Materiały, odczynniki chemiczne i drobny sprzęt laboratoryjny

- 1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropanol (ABCR nr kat. PA-03-4690-K#5G),
- Butelki do hodowli komórkowych Nunc™ EasYFlask™ 75 cm², 25 cm² (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 156499, 156367)
- Butelki hodowlane T75, T25 (Greiner, nr kat. 690170, 658170)
- Czynnik sieciujący 184 Silicone Elastomer Curing Agent (SYLGARD™)
- Filament ABS (ang. acrylonitrile-butadiene-styrene) (Spectrum)
- Filament PLA (ang. poly lactic acid) (Spectrum)
- Folia tlenoczuła SF-RPSu4-L4/W4/OIW (Presens)
- Igły do strzykawek (Becton Dickinson)
- Komory do liczenia komórek (FAST-READ 102, nr kat. BVS100)
- Łopatkki metalowe
- Magnez neodymowe N48
- Maty nanowłókniste z poliuretanu, bez i z nanocząstkami magnetycznymi (PU, ChronoFlex C75D, AdvanSource Biomaterials) uzyskane z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej

- Mikrokontroler STM32 (*Botland*)
- Pęseta
- Pipetor (*Gilson*)
- Pipety automatyczne 10 µl – 1000 µl (*Gilson*)
- Pipety elektroniczne 10 µl – 1000 µl (*Mettler Toledo*)
- Pipety serologiczne 2 ml, 5 ml, 10 ml (*Nest, nr kat. 325001, 326001; Biologix, nr kat. 02/07-5010*)
- Pipety typu Pasteura 3 ml (*Nest, nr kat. 318212*)
- Płytki 24-dółkowe (*Nest Scientific Biotechnology, nr kat. 702001*)
- Płytki 24-dółkowe (*Sarstedt, nr kat. 83.3922.005*)
- Płytki 6-dółkowe (*Nest Scientific Biotechnology, nr kat. 703001*)
- Płytki płaskodenne 96-dółkowe (*Nest, nr kat. 701001*)
- Płytki z poli(metakrylanu metylu) (PMMA) do frezowania grubości 8 i 12 mm
- Płytki z poliwęglanu (PC) do frezowania grubości 5 mm
- Poliuretan (*ChronoFlex, C75D*)
- Prepolimer PDMS 184 Silicone Elastomer Base (*SYLGARD™*)
- Probówki typu Eppendorf 2 ml (*Nest, nr kat. 620011*)
- Probówki typu falcon 15 ml, 50 ml (*Nest, nr kat. 601002, 602002*)
- Solenoidy (*Sparkfun*)
- Sterownik Arduino Uno R3
- Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (II,III) Fe₃O₄ uzyskane z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej i Centrum Zaawansowanym Materiałów i Technologii Politechniki Warszawskiej
- Szkiełka mikroskopowe (*ChemLand, nr kat. 296.202.01*)
- Szkiełka nakrywkowe (*Carl Roth, nr kat. L26.1; Thermo Scientific, nr kat. L464864-15*)
- Skalpel i ostrza skalpela
- Strzykawki 5 ml (*Braun, nr kat. 4606728V; Becton Dickinson*)
- Szalki ze szklanym dnem CELLview™ (*Greiner Bio-One, nr kat. 627870*)
- Tipsy jednorazowe 20 µl, 200 µl, 1000 µl (*Nest, nr kat. 301006, 302106, 303206*)
- Wężyki Tygon LMT – 55 Średnica wewnętrzna 0,19 mm
- Wzmacniacz MOSFET IRF540 (*Kamami*)
- Zaczepy do pompy perystaltycznej
- Zasilacz 12V (300W)

7.2.3 Aparatura badawcza

- Analizator potencjału zeta Zetasizer Nano ZS (*Malvern Panalytical, Malvern*)
- Autoklaw (*RAYPA*)
- Czytnik płytek Cytation3 (*BioTek*)
- Drukarka 3D Printer Hunter (*Flashforge*)
- Drukarka 3D Ender 3 Pro (*Creality*)
- Fluorymetr Qubit 4 (*Thermo Fisher Scientific*)
- Frezarka 12276 (*Minitech Machinery*)
- Generator plazmy tlenowej Atto (*Diener Electronic*)
- Goniometr DSA100 (*Krüss*)
- Inkubator HERAccl 150 (*Thermo Fisher Scientific*)
- Komora laminarna klasy II Lamil 10 (*Karstulan Metall Oy*)
- Kompresor JWA-10 (*Magnum*)
- Kontroler eTRON M (*JUMO*)
- Lampa (*Dymax Corporation ZIP Shutter*)
- Lampa halogenowa (*Olympus TH4-200*)
- Lampa rtęciowa (*Olympus U-RFL-T*)
- Lampa UV (*Blak-Ray B-100*)
- Laserowy mikroskop skaningowy LEXT OLS4000/4100 (*Olympus*)
- Mikroskop konfokalny Fluoview FV10i (*Olympus*)
- Mikroskop fluorescencyjny IX-71 (*Olympus*)
- Mikroskop świetlny CKX41 (*Olympus*)
- Mikroskop świetlny MIC-D (*Olympus*)
- Napylarka (K550 Emitech, Quorum Technologies)
- Ploter laserowy VLS2.30DT (*Universal Laser System*)
- Płyta grzejna RTC B (*IKA*)
- Pompa perystaltyczna (*Ismatec*)
- Rotametr podwójny (*Magnum nr kat. 40285*)
- Skaningowy transmisyjny mikroskop elektronowy (*STEM ang. scanning transmission electron microscope, SU 8230, Hitachi High-Technologies Corporation*)
- Skaningowy mikroskop elektronowy (*SEM, ang. Scanning electron microscope, Phenom GI, Phenom World*)
- Spektrofotometr NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*)

- Spin-coater WS-650SZ-6NPP/LITE (*Laurell*)
- Suszarka laboratoryjna (*Binder*)
- Termocykler do Real-Time PCR CFX Connect Real-Time System (*Bio-Rad*)
- Uniwersalna maszyna wytrzymałościowa Instron 3345 (*Instron*)
- Waga analityczna X205/XS205 (*Mettler Toledo*)
- Waga techniczna THB-600 (*Radwag*)
- Wiertarka 212 Drill Press (*Dremel*)
- Wirówka 320R (*Hettich Universal*)
- Worteks VX100 (*Labnet*)

8. Metodyka badań

8.1 Wytwarzanie i charakterystyka mat nanowłóknistych

8.1.1 Wytwarzanie mat nanowłóknistych

W ramach niniejszej pracy wytworzono maty nanowłókniste wykonane z poliuretanu (PU), bez oraz z dodatkiem superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (II,III) (Fe_3O_4 , MNP- ang. *Magnetic nanoparticle*). Maty te wykonano we współpracy z dr. inż. Marcinem Drozdem z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej i Centrum Zaawansowanym Materiałów i Technologii Politechniki Warszawskiej oraz dr. inż. Michałem Wojasińskim z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Nanocząstki magnetyczne stabilizowane cytrynianem sodu otrzymano metodą współstrącania w środowisku wodnym. Następnie, po dekantacji magnetycznej i powtórnej resuspensji wspomaganej ultradźwiękami, przeniesiono je z fazy wodnej do polarnego rozpuszczalnika organicznego (1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropanolu, ABCR), co pozwoliło uzyskać 0,5 - procentową (w/w) zawiesinę MNP. Następnie, do otrzymanej zawiesiny dodawano poliuretan (ChronoFlex, C75D) w ilości pozwalającej zachować stosunek masowy PU do Fe_3O_4 równy 10:1, przy końcowym stężeniu polimeru wynoszącym 5% (w/w). Uzyskany roztwór poliuretanu i MNP mieszano przez noc w wytrząsarce, a tuż przed dalszą obróbką dodatkowo sonikowano przez co najmniej 10 min. Wytwarzanie mat nanowłóknistych prowadzono metodą rozdmuchu roztworu polimeru (SBS – ang. *solution blow spinning*). Roztwór PU z nanocząstkami umieszczano w strzykawce i podawano za pomocą pompy strzykawkowej do wewnętrznej dyszy w układzie koncentrycznym dysz, utrzymując natężenie przepływu na poziomie 30 ml/h.

Sprężone powietrze o ciśnieniu 1 bar kierowano do dyszy zewnętrznej, co powodowało rozdmuchiwanie roztworu i formowanie nanowłókien. Otrzymane nanowłókna zbierano na szybko obracającym się (15 000 obr./min) cylindrycznym kolektorze, oddalonym o 30 cm od dyszy, co sprzyjało ich orientacji zgodnie z kierunkiem obrotu kolektora. W analogicznej procedurze, lecz bez dodatku MNP, uzyskiwano maty niemagnetyczne z samego PU. Po zakończeniu procesu rozdmuchu maty nanowłókniste zdejmowano z kolektora i docinano je tak, by pasowały do 24-dołkowych płytek hodowlanych lub do komór w mikrosystemach przepływowych I, II a i II b. Proces cięcia prowadzono z użyciem plotera laserowego VLS2.30DT (moc 17%, prędkość 13%, 800 PPI). Tak przygotowane maty nanowłókniste pozwalały na zachowanie kontrolowanego ułożenia włókien w kolejnych etapach badań. Maty nanowłókniste i charakterystyka ich morfologii, rozmiaru oraz właściwości mechanicznych zostały wykonane na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej w ramach współpracy z dr. inż. Michałem Wojasińskim oraz mgr inż. Iwoną Łopianiak.

8.1.2 Charakterystyka mat nanowłóknistych

Analiza morfologii i rozmiaru nanowłókien

Analiza morfologii i rozmiaru nanowłókien przeprowadzona została przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Przed obrazowaniem, prostokątną próbkę maty nanowłóknistej o wymiarach 3×3 mm umieszczano na węglowej taśmie samoprzylepnej, przytwierdzonej do uchwytu próbki, a następnie pokrywano ją warstwą złota. W celu wyznaczenia średniego rozmiaru nanowłókien we wszystkich typach otrzymanych mat nanowłóknistych, dokonano 100 pomiarów dla każdej z badanych próbek, korzystając z obrazów SEM oraz oprogramowania Fiji (ImageJ).

Analiza właściwości fluorescencyjnych

W celu oceny właściwości fluorescencyjnych otrzymanych mat nanowłóknistych zmierzono ich autofluorescencję. W tym celu, maty nanowłókniste zawierające nanocząstki magnetyczne oraz maty nanowłókniste bez nanocząstek magnetycznych umieszczono w 24-dołkowej płytce. Następnie, płytkę z naniesionymi próbkami umieszczono w czytniku płytek BioTek Cytation 3, gdzie rejestrowano widma emisji w zakresie długości fal wzbudzenia 300–660 nm (co 10 nm) oraz emisji 330–700 nm (co 10 nm). W ten sposób zdefiniowano charakterystyki fluorescencyjne (wzbudzenie–emisja) badanych mat nanowłóknistych.

Analiza właściwości mechanicznych mat nanowłóknistych

W celu oceny właściwości mechanicznych badanych mat nanowłóknistych przeprowadzono pomiary naprężeń rozciągających dla materiału, wydłużenia przy zerwaniu oraz modułu sprężystości. W tym celu, z każdej maty nanowłóknistej wycięto prostokątne próbki o wymiarach $2,5 \times 0,5$ cm, przy czym grubość każdej próbki wyznaczono na podstawie obrazów SEM. Pomiary wykonano w dwóch kierunkach: równoległym (PL – ang. *parallel*) oraz prostopadłym (PP – ang. *perpendicular*) do orientacji nanowłókien, zgodnie z normami ASTM D 882-02 i D 638-02a. Do badań zastosowano maszynę do badań wytrzymałościowych Instron 3345 z prędkością posuwu wynoszącą 10 mm/min, w warunkach temperatury pokojowej i kontrolowanej wilgotności. Rejestrowano krzywe obciążenie–odkształcenie, na podstawie których wyznaczano naprężenia rozciągające dla materiału, wydłużenie przy zerwaniu oraz moduł sprężystości.

Pomiary kąta zwilżania

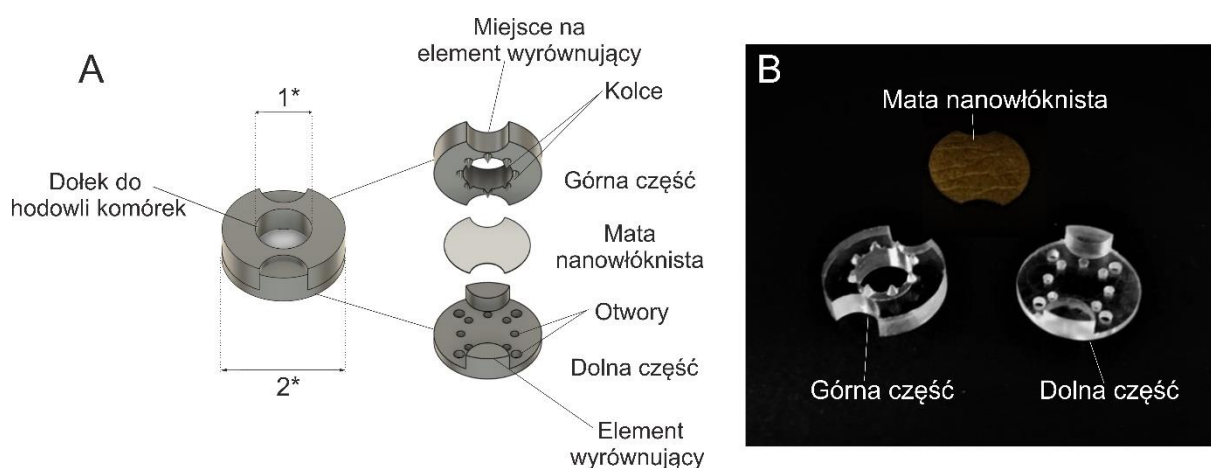
Pomiary kąta zwilżania wodą przeprowadzono za pomocą goniometru DSA100, w celu oceny wpływu dodania nanocząstek magnetycznych do mat nanowłóknistych na ich hydrofilowość. Prostokątne próbki mat nanowłóknistych o wymiarach ok. 10 mm $\times$ 10 mm umieszczono na stole pomiarowym. Następnie, na powierzchnię badanego materiału dozowano krople wody destylowanej o objętości 5 μ l. Wartości kąta zwilżania mierzono za pomocą oprogramowania ADVANCE 1.4.1.2. Analizowano co najmniej pięć kropel dla każdej badanej próbki.

Pomiar potencjału zeta

Powierzchniowy potencjał zeta (SZP – ang. *surface zeta potencial*) wytworzonych mat nanowłóknistych mierzono metodą pośrednią. Wszystkie pomiary przeprowadzono w temperaturze 25 °C po 60 s stabilizacji temperatury przy użyciu aparatu Zetasizer Nano ZS. Podczas pomiarów SZP wykorzystano ogniwa zanurzeniowe wyposażone w elektrody palladowe (Malvern). Fragment maty nanowłóknistej (3 mm $\times$ 3 mm) przymocowano do stołu zamontowanego między elektrodami, a całość zanurzono w 1 ml zawiesiny znacznika anionowego - 300 nm lateksowego wzorca transferowego w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) o pH 7,4. Na podstawie wartości potencjału zeta znacznika zmierzonych w różnych odległościach od powierzchni mat nanowłóknistych (125-750 μ m), określono wartość SZP mat nanowłóknistych. Wszystkie pomiary potencjału zeta przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach.

8.1.3 Przygotowanie uchwytów do prowadzenia hodowli na matach nanowłóknistych

W celu stabilnego umieszczenia mat nanowłóknistych w 24-dołkowej płytce hodowlanej zaprojektowano specjalny uchwyt poliwęglanowy (Rycina 11). Zastosowanie takiego rozwiązania pozwoliło uzyskać powierzchnię hodowlaną o wymiarach odpowiadających dołkowi płytki 96-dołkowej, przy jednoczesnej kompatybilności z płytką 24 - dołkową hodowlaną. Dzięki temu możliwa była zarówno hodowla na matach nanowłóknistych, jak i łatwa ocena kierunkowego ułożenia włókien.



Rycina 11 A) Schemat i B) zdjęcie zaprojektowanego uchwytu poliwęglanowego do umieszczania mat nanowłóknistych magnetycznych i hodowli komórkowej. 1* - średnica dołka w płytce 96-dołkowej, 2* - średnica dołka w płytce 24-dołkowej.

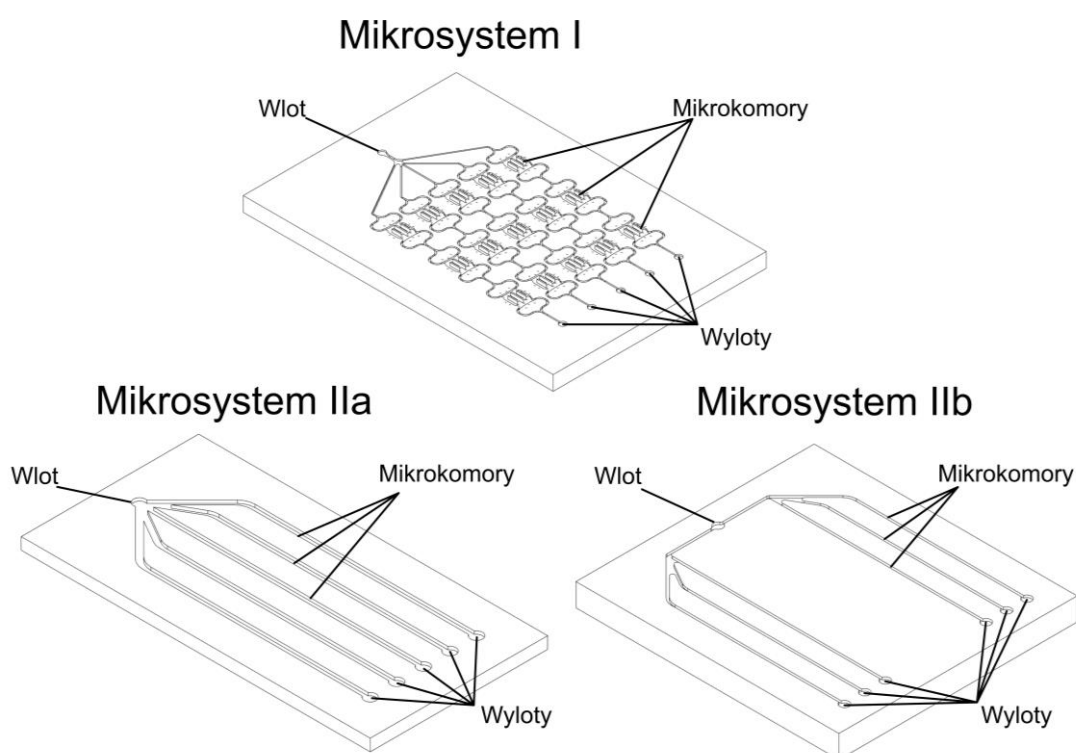
Zewnętrzna i wewnętrzna średnica uchwytu zostały tak dobrane, aby odpowiadały średnicom dołka w płytce 24-dołkowej oraz 96-dołkowej. Każdy uchwyt składał się z dwóch części: górnej i dolnej. Górna część miała formę toroidu o średnicy zewnętrznej 15 mm, średnicy wewnętrznej 6,9 mm i wysokości 3,62 mm. Na jej powierzchni znajdowało się osiem stożkowych kolców (wysokość 1,38 mm, średnica 1,15 mm), przeznaczonych do stabilnego przytrzymywania maty nanowłóknistej. Dodatkowo, górna część uchwytu posiadała symetrycznie usytuowane wycięcia na elementy wyrównujące o promieniu 3 mm, które ułatwiały szybkie i precyzyjne przenoszenie uchwytu do studzienek płytki hodowlanej. Dolna część uchwytu miała kształt dysku i zawierała osiem otworów o średnicy 1,15 mm rozmieszczonych zgodnie z położeniem kolców w części górnej. Ponadto, znajdowały się na niej dwa elementy wyrównujące pasujące do odpowiednich wycięć w górnej części, co umożliwiało precyzyjne złożenie obu elementów. Uchwyty wykonano metodą frezowania z wykorzystaniem maszyny Minitech Machinery Machmill3, używając frezu o średnicy 3 mm, z prędkością posuwu 600 mm/min i zagłębieniem 0,3 mm. Po frezowaniu elementy oczyszczano w benzynie ekstrakcyjnej, izopropanolu oraz wodzie dejonizowanej. Przed

przystąpieniem do hodowli komórek, przygotowane maty nanowłókniste umieszczano pomiędzy górną i dolną częścią uchwytu, po czym całość przenoszono do woreczków i sterylizowano termicznie w autoklawie (121°C, 30 min). Następnie, na wysterylizowane maty nanowłókniste nanoszono 200 µl roztworu poli-L-lizyny (0,01 mg/ml) i inkubowano je przez 24 h (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie, roztwór poli-L-lizyny usuwano, dodawano 100 µl świeżej pożywki hodowlanej. Tak przygotowane uchwyty z matami nanowłóknistymi były gotowe do prowadzenia hodowli komórkowych.

8.2 Wytwarzanie mikrosystemów

8.2.1 Projekt geometrii wytworzonych mikrosystemów

W ramach pracy zaprojektowano i wytworzono mikrosystemy o trzech geometriach (mikrosystem I oraz mikrosystem II a i II b), które przedstawiono na Rycinie 12. Poszczególne elementy mikrosystemów omówiono szczegółowo w części wynikowej niniejszej rozprawy. Geometrie wszystkich wytworzonych mikrosystemów przepływowych zaprojektowano przy użyciu oprogramowania Autodesk Fusion 360. Następnie, na podstawie projektów wykonano płytki z odwzorowanymi geometriami mikrostruktur, w poszczególnych rodzajach materiałów konstrukcyjnych.



Rycina 12 Geometria mikrostruktur zaprojektowanych mikrosystemów I, II a i II b.

8.2.2 Symulacje numeryczne

Symulacja przepływów

W przypadku mikrosystemów przeznaczonych do hodowli komórek, dynamika płynów, obejmująca parametry takie jak rozkład prędkości, ciśnienie i naprężenia ścinające, może mieć decydujący wpływ na powodzenie hodowli. Oprogramowanie ANSYS 2021 R3 zostało wykorzystane do symulacji przepływu płynów w opracowanych mikrosystemach I, II a i II b. Głównym celem symulacji ANSYS było ustalenie jednolitego naprężenia ścinającego w mikrokomorach hodowlanych. Symulacje zakładały laminarne warunki przepływu ($Re < 4$) w mikrosystemie, określone za pomocą równania:

$$Re = (\rho V D_h) / \mu$$

Gdzie,

ρ [kg/m³] oznacza gęstość płynu,

V [m/s] oznacza prędkość płynu,

D_h [m] oznacza średnicę hydrauliczną,

μ [Pa·s] oznacza lepkość dynamiczną.

Dla danych założeń rozwiązane zostały równania ciągłości i Naviera-Stokesa:

Równanie ciągłości:

$$\nabla \cdot V = 0$$

Równanie Naviera-Stokesa:

$$(V \cdot \nabla)V = -\frac{1}{\rho} \nabla P + \nu \nabla^2 V$$

Gdzie:

ν [m²/s] oznacza lepkość kinematyczną płynu, a P [Pa] oznacza ciśnienie.

Równania 2 i 3 zostały rozwiązane w określonych warunkach brzegowych:

Ciśnienie względne na wylocie zdefiniowano jako 0 Pa. Warunki braku poślizgu zostały wymuszone zarówno na ściankach mikrosystemu, jak i na matach nanowłóknistych. W symulacjach przyjęto gęstość płynu (ρ) jako 998,2 kg/m³, a jego lepkość dynamiczna (μ) wynosiła 0,001003 Pa·s. Przyjęto wartość przyspieszenia grawitacyjnego równą 9,81 m/s²,

średnicę komórek równą 15 μm , lepkość komórek, oznaczoną jako μ_c , równą 0,005 Pa·s, gęstość równą 1020 kg/m³ i wartość napięcia powierzchniowego γ równą 0,03 N/m.

Symulacja rozkładu tlenu

W celu określenia stężenia tlenu w komorach hodowlanych mikrosystemu II b przeprowadzono symulacje numeryczne z wykorzystaniem oprogramowania ANSYS 2024R3. Założono brak przepływu pożywki (warunki statyczne) oraz nie uwzględniono konsumpcji tlenu przez komórki. Zmiany stężenia tlenu zachodziły wyłącznie na drodze dyfuzji przez ścianki wykonane z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS) do wnętrza mikrokomór hodowlanych. Rozkład tlenu opisano w trybie stacjonarnym za pomocą równania (1):

$$\nabla \cdot (D \nabla C) = 0$$

gdzie:

- C [mol/m³] oznacza stężenie tlenu,
- D [m²/s] jest współczynnikiem dyfuzji tlenu w materiale PDMS lub w obszarze mikrokomory hodowlanej

Ze względu na to, że w rozważanym układzie nie występuje przepływ pożywki, a zużycie tlenu przez komórki nie zostało uwzględnione, równanie (1) opisuje jedynie dyfuzję molekularną w warunkach ustalonych. Na ścianach mikrosystemu zdefiniowano odpowiednie warunki brzegowe:

- Na zewnętrznej powierzchni PDMS przyjęto wartość stężenia tlenu równą stężeniu w otoczeniu nad części mikrosystemu oznaczonej jako strefa normoksji oraz brak tlenu w części oznaczonej jako strefa hipoksji.

Dyfuzja tlenu w PDMS: $D_{\text{PDMS}} = 3,25 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

Dyfuzja tlenu w pożywce: $D_{\text{Medium}} = 2,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

Z rozkładu rozwiązania równania (1) uzyskano przestrzenny profil stężenia tlenu wewnątrz mikrosystemu, w tym zwłaszcza w mikrokomorach hodowlanych. Pozwoliło to zidentyfikować ewentualne regiony o obniżonym stężeniu tlenu i ustalić, czy sama dyfuzja przez warstwę PDMS jest wystarczająca do wytworzenia warunków hipoksji w hodowli komórkowej.

Symulacja rozkładu pola magnetycznego

W badaniach wykorzystano maty nanowłókniste zawierające nanocząstki magnetyczne, co umożliwiło zastosowanie zewnętrznej stymulacji magnetycznej komórek. W celu zweryfikowania rozkładu pola magnetycznego wokół mat nanowłóknistych oraz w całym obszarze mikrosystemu II b, przeprowadzono symulacje numeryczne z wykorzystaniem oprogramowania ANSYS 2024R3.

Założono podejście, w którym dominującym efektem jest stałe pole magnetyczne pochodzące od zewnętrznych magnesów. Symulacje prowadzono, rozwiązując uproszczone równania pola magnetycznego w postaci:

1. Prawo Gaussa dla magnetyzmu:

$$\nabla \cdot B = 0$$

2. Równanie magnetostatyczne:

$$\nabla \times H = 0$$

gdzie:

- B [T] to wektor indukcji magnetycznej, $B=\mu H$,
- H [A/m] to wektor natężenia pola magnetycznego,
- μ [H/m] to przenikalność magnetyczna materiałów.

Na powierzchni zewnętrznej modelu (np. odległe ścianki ograniczające obszar obliczeniowy) przyjęto warunki brzegowe typu $B \cdot n = 0$. Analiza obejmowała dwa skrajne przypadki położenia magnesów:

1. Maksymalne zbliżenie mikrosystemu do górnej platformy z magnesami.
2. Maksymalne zbliżenie mikrosystemu do dolnej platformy z magnesami.

Na podstawie uzyskanych rozwiązań wyznaczono przestrzenny rozkład indukcji magnetycznej oraz natężenie pola magnetycznego. Pozwoliło to określić efektywną strefę oddziaływania pola magnetycznego na maty nanowłókniste zawierające nanocząstki magnetyczne, a tym samym przewidzieć, w jakim stopniu zewnętrzna stymulacja magnetyczna może wpłynąć na warunki hodowli komórkowej.

8.2.3 Wytworzenie mikrosystemu I

W pierwszym etapie przygotowano dwie płytki z poliwęglanu (PC – ang. *polycarbonate*) – warstwę górną i dolną. Na obu warstwach wyfrezowano mikrostruktury z użyciem mikrofrezarki Minitech Machinery Machmill3. W procesie frezowania zastosowano frezy o średnicach 1 mm, 0,5 mm oraz 0,3 mm przy prędkości wrzeciona 2000 RPM. Zarówno zachodzenie w osi XY (ang. *step-over*), jak i obniżanie w osi Z (ang. *step-down*), ustalono na poziomie 10% średnicy użytego frezu. Po zakończeniu frezowania, obie powierzchnie oczyszczono z wiórów i pyłu, a następnie osuszono sprężonym powietrzem, aby uniknąć zanieczyszczeń. W kolejnym etapie, przygotowano warstwę poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), stanowiącą środkową część mikrosystemu I. W tym celu w specjalnie zaprojektowanej formie umieszczono odgazowaną mieszaninę prepolimeru PDMS i czynnika sieciującego w stosunku wagowym 10:1. Formę wraz z PDMS przeniesiono następnie do cieplarki (75 °C) na 1 h celem pełnego usieciowania materiału. Po tym czasie, usieciowaną warstwę PDMS ostrożnie wyjęto z formy, a jej brzegi przycięto w celu dopasowania do przygotowanych płytek z poliwęglanu. Przed złożeniem mikrosystemu I, w warstwie dolnej PC umieszczono maty nanowłókniste, nanosząc je na wytworzone mikrokolce. Zapewniło to stabilne unieruchomienie mat w trakcie późniejszych pomiarów oraz ich prawidłowe (równoległe) ułożenie względem przepływu płynu w mikrokanalach. Następnie, na dolną płytkę PC nałożono warstwę PDMS i górną warstwę PC z wyfrezowanymi strukturami. Całość skręcono śrubami (M1.6×12) w przygotowanych wcześniej otworach, zwracając uwagę na równomierne dociśnięcie elementów i eliminację powstających nieszczelności.

8.2.4 Wytworzenie mikrosystemu II a i II b

Mikrosystemy II a oraz II b wytworzono z dwóch warstw poli(dimetylosiloksanu). W pierwszym etapie przygotowano oddzielne pieczętki z mikrostrukturami dla każdej z warstw. W tym celu, wykorzystano technikę mikrofrezowania w polimetakrylanie metylu (PMMA). Proces frezowania prowadzono przy użyciu maszyny frezującej Minitech Machinery Machmill3 z następującymi parametrami:

- prędkość wrzeciona: 12 000 RPM,
- średnice frezów: 1 mm, 0,5 mm oraz 0,3 mm,

- zachodzenie w osi XY i obniżanie w osi z ustalono na poziomie 10% średnicy użytego frezu.

Po zakończeniu frezowania, powierzchnie pieczętek z PMMA oczyszczono z wiórów i pyłu, a następnie osuszono sprężonym powietrzem w celu usunięcia wszelkich zanieczyszczeń. W kolejnym etapie, w celu odwzorowania mikrostruktur w PDMS, zastosowano metodę miękkiej litografii, polegającą na naniesieniu i usieciowaniu warstw PDMS na wcześniej wyfrezowanych pieczętkach z PMMA. Do wytworzenia warstw PDMS wykorzystano mieszaninę prepolimeru PDMS i czynnika sieciującego w stosunku wagowym 10:1. Otrzymaną mieszaninę odgazowano przy użyciu pompy próżniowej i eksykatora. Następnie rozprowadzono równomiernie na powierzchni pieczętek PMMA i umieszczono je w cieplarni w temp. 75 °C na 1 h, co umożliwiło pełne usieciowanie polimeru. Po tym czasie, usieciowane warstwy PDMS ostrożnie oddzielono od pieczętki. W celu integracji mikrosystemów z matami nanowłóknistymi (wykonanymi z poliuretanu, zarówno z dodatkiem, jak i bez nanocząstek magnetycznych) zastosowano następującą procedurę. W celu uniknięcia przemieszczania się mat w czasie łączenia warstw PDMS, przygotowano cienką warstwę nieusieciowanego elastomeru PDMS metodą powlekania wirowego (*spin-coating*) na szalce Petriego (3000 rpm, 2 min). Otrzymaną cienką, wciąż nieusieciowaną warstwę elastomeru wykorzystano jako „klej”. W tym celu, fragmenty mat nanowłóknistych (o wymiarach dostosowanych do mikrokomór hodowlanych, 35 mm × 3 mm i grubości 0,3 mm) umieszczano tak, aby jedna strona maty pokryła się nieusieciowanym PDMS. Następnie, przenoszono maty w wyznaczone miejsca na dolnej warstwie PDMS, co umożliwiło stabilne unieruchomienie włókien wewnątrz mikrokomór hodowlanych (w zależności od typu eksperymentu w mikrokomorze hodowlanej umieszczano matę magnetyczną, niemagnetyczną lub pozostawiano ją pustą). W górnej warstwie PDMS wywiercono otwory wlotowe i wylotowe (o średnicy 1,5 mm) w miejscach zgodnych z projektem. W tym celu, odlew zanurzano w ciekłym azocie na 20 s, co tymczasowo zwiększało sztywność PDMS i wywiercano otwory przy użyciu wiertła. Następnie, warstwę tę dokładnie przepłukiwano wodą destylowaną w celu usunięcia wiórów i osuszano sprężonym powietrzem. Tak przygotowane dwie warstwy (dolna z unieruchomionymi matami nanowłóknistymi i górna z otworami wlotowymi/wylotowymi) łączono za pomocą generatora plazmy tlenowej (moc 80%, czas 30 s). W tym celu, warstwy PDMS układano powierzchniami łączenia do góry w komorze generatora plazmy tlenowej, poddawano działaniu plazmy i następnie łączono ze sobą, uzyskując zaprojektowane mikrosystemy przepływowe II a i II b. Dla utrwalenia łączenia, połączone elementy

pozostawiono w cieplarni w temp. 75 °C na 30 min. Na koniec, w wywierconych otworach umieszczono wężyki wlotowe i wylotowe (Tygon LMT-55), zapewniając odpowiednie uszczelnienie i możliwość podłączenia zewnętrznych pomp dozujących. Gotowe mikrosystemy II a oraz II b przechowywano w temperaturze pokojowej do momentu dalszego wykorzystania.

8.2.5 Przygotowanie mikrosystemów przepływowych I, II a i II b

Przed rozpoczęciem hodowli komórkowej wykonane mikrosystemy odpowiednio przygotowano. W pierwszym etapie przygotowano igły służące do szczelnego zamykania wlotów i wylotów mikrosystemu. W tym celu, stępiono igły (0,3mm), a następnie zalano je ciekłym PDMS i umieszczono w cieplarni (75 °C) do pełnego usieciowania elastomeru. W kolejnym etapie, mikrosystemy wypełniano wodą destylowaną, dodatkowo zanurzając je w wodzie. Następnie, odgazowywano je w ekzykatorze, gdzie pięciokrotnie obniżano i podwyższano ciśnienie. Taka procedura umożliwiała skuteczne usunięcie pęcherzyków powietrza zarówno z mikrokanalów, jak i z przestrzeni pomiędzy mat nanowłóknistych. Po zakończeniu tego procesu mikrosystem przepływowy łączono z wężykami wlotowymi, które wcześniej wypełniono wodą destylowaną. Następnie, mikrosystem dodatkowo przepłukiwano niewielką objętością wody destylowanej, po czym w otworach wylotowych umieszczano wężyki wylotowe. Tak przygotowany mikrosystem uszczelniano przygotowanymi igłami z usieciowanym PDMS.

8.2.6 Wprowadzanie odczynników do mikrokomór hodowlanych mikrosystemu

Wprowadzanie odczynników do mikrokomór hodowlanych w wytworzonych mikrosystemach przeprowadzano z wykorzystaniem pompy perystaltycznej. Podczas wprowadzania roztworów do mikrosystemu bez hodowli komórkowych stosowano przepływ 30 µl/min. Czas wprowadzania roztworów do każdej z mikrokomór wynosił 1 min. W przypadku pierwszej mikrokomory, czas ten zwiększano do 1,5 min, aby skompensować objętość martwą wężyka wlotowego. Po upływie wyznaczonego czasu, wężyki wlotowe i wylotowe uszczelniano. Jeżeli w mikrosystemie prowadzono hodowlę komórkową, zmniejszano prędkość przepływu do 15 µl/min i zwiększano czas do 2 min (lub 3 min dla pierwszej komory). Miało to na celu zmniejszenie naprężeń ścinających wywoływanych przepływem, mogących mieć negatywny wpływ na komórki. Z zastosowaniem takiego samego przepływu (15 µl/min) wprowadzano zawiesinę komórkową do mikrosystemu.

8.2.7 Modyfikacja powierzchni mat nanowłóknistych roztworem polidopaminy

Powierzchnię mat nanowłóknistych, znajdujących się wewnątrz mikrokomór hodowlanych mikrosystemu I, II a i II b, pokrywano roztworem polidopaminy w celu poprawy adhezji komórek. W tym celu, przygotowywano roztwór chlorowodoru dopaminy w buforze Tris-HCl (pH 8,5) o stężeniu 2 mg/ml. Roztwór przygotowywano każdorazowo przed wprowadzeniem do mikrosystemu. Następnie, wprowadzano go do mikrosystemu z prędkością 30 μ l/min. Po napełnieniu mikrokomór, wężyk wlotowy odłączano od mikrosystemu i dokładnie przepłukiwano wodą destylowaną, aby uniknąć polimeryzacji polidopaminy wewnątrz wężyków. Po ponownym podłączeniu wężyka wlotowego uszczelniano mikrosystem i pozostawiano go w temp. pokojowej na 24 h. Zapewniało to wytworzenie warstwy polidopaminy na matach nanowłóknistych.

8.2.8 Przygotowanie mikrosystemów do hodowli - sterylizacja termiczna

Mikrosystemy I, II a oraz II b poddawano takiej samej procedurze sterylizacji termicznej w autoklawie (121 °C, 60 min). Przed umieszczeniem mikrosystemu w autoklawie wszystkie wężyki (zarówno wlotowe, jak i wylotowe) były odłączane, a sam mikrosystem zanurzano w słoiku wypełnionym wodą destylowaną. Po zakończeniu procesu sterylizacji termicznej mikrosystemy ostrożnie wyjmowano, zwracając uwagę, aby powietrze nie przedostało się do ich wnętrza. Następnie, wężyki wlotowe i wylotowe ponownie przyłączano do otworów mikrosystemów, uprzednio przepłukując je 70% etanolem i uzupełniając wodą destylowaną. Taka procedura zapewniała zachowanie pełnej sterylności mikrosystemów.

8.3 Hodowla komórkowa

8.3.1 Prowadzenie hodowli komórkowej

W badaniach wykorzystywano cztery typy linii komórkowych. Wszystkie hodowle komórkowe prowadzono w inkubatorach (temp. 37 °C, 5 % CO₂).

Hodowla komórek kardiomiocytów (HCM)

Materiał biologiczny stanowiły ludzkie kardiomiocyty (HCM, ScienCell) wyizolowane z komórek serca od osoby dorosłej. Komórki hodowano w pożywce Dulbecco Modified Eagle Medium: F-12 uzupełnionej 10% (v/v) płodową surowicą bydlęcą, 1% (v/v) L-glutaminą, 1%

(v/v) streptomycyną/penicyliną, 1% (v/v) pirogronianem sodu, 0,01% (v/v) aminokwasami endogennymi i 0,01% (v/v) suplementem wzrostu miocytów serca.

Hodowla komórek kardiomioblastów (H9c2)

Materiał biologiczny stanowiły szczurze kardiomioblasty H9c2. Komórki hodowano w pożywce Dulbecco Modified Eagle Medium: DMEM uzupełnionej 10% (v/v) płodową surowicą bydlęcą, 1% (v/v) L-glutaminą, 1% (v/v) streptomycyną/penicyliną.

Hodowla komórek iPSC

Materiał biologiczny stanowiły ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC). Komórki iPSC hodowano w pożywce E8 (z dodatkiem 2% (v/v) suplementu E8 oraz 1% (v/v) penicyliny/streptomycyny). Przed wysianiem komórek na płytkę 6-dółkową pokrywano ją roztworem Matrigelu. Przygotowywano go, mieszając 250 μ l Matrigelu z 25 ml schłodzonego medium E8, a następnie na każdy dołek nakładano 800 μ l i inkubowano w 37 °C przez co najmniej 30 min. Bezpośrednio przed wysiewem komórek Matrigel usuwano z dołków hodowlanych. Komórki rozmrażano w medium E8, zawierającym ROCK inhibitor. Następnie, kontynuowano hodowlę w medium E8, zmieniając je codziennie. Po osiągnięciu odpowiedniego stopnia wzrostu (zwykle 70–80% konfluencji), w razie potrzeby komórki pasażowano.

Różnicowanie komórek iPSC i hodowla komórek iPSC-CM

Komórki iPSC-CM otrzymywano poprzez różnicowanie komórek iPSC zgodnie z protokołem GiWi opisanym przez Lian i wsp. [128]. Proces rozpoczynano, gdy hodowla komórek iPSC osiągała konfluencję ok. 90%. Zastosowano sekwencyjne stosowanie pożywek RPMI/B-27 bez insuliny, z dodatkami CHIR99021 i IWP2.

- **Dzień 0:** Zmieniano medium z E8 na RPMI/B-27/ins–/CHIR (2 ml/dołek).
- **Dzień 1:** Wymieniano medium na RPMI/B-27/ins– (2 ml/dołek).
- **Dzień 3:** Usuwano 1 ml starego medium z dołka hodowlanego i dodawano 1 ml RPMI/B-27/ins–/IWP2 i mieszano z 1 ml zachowanego w dołku medium.
- **Dzień 5:** Wymieniano medium na świeże RPMI/B-27/ins– (2 ml/dołek).
- **Dzień 7:** Zmieniano medium na RPMI/B-27 (2 ml/dołek) i od tego momentu przeprowadzano wymianę medium co 3 dni.

Około 7 dni po zakończeniu tego 7-dniowego protokołu (czyli ok. 14. dnia od rozpoczęcia różnicowania) komórki rozpoczynały spontaniczne kurczenie, wskazując na uzyskanie fenotypu kardiomiocytów. Ze względu na specyficzny charakter komórek iPSC-CM, komórki te nie były pasażowane ani mrożone, by zachować stabilną ekspresję genów charakterystycznych dla kardiomiocytów. Komórki iPSC-CM hodowano w pożywce RPMI/B-27. Codziennie kontrolowano morfologię komórek za pomocą mikroskopu świetlnego.

8.3.2 Przygotowanie zawiesiny komórkowej do prowadzenia badań

W celu uzyskania zawiesin komórkowych niezbędnych do eksperymentów prowadzonych na matach nanowłóknistych oraz w mikrosystemach przepływowych, przeprowadzano procedurę odklejania komórek (H9c2, HCM, iPSC-CM, iPSC). W tym celu, komórki dwukrotnie przepłukiwano roztworem PBS (bez jonów wapnia i magnezu), po czym dodawano trypsynę i inkubowano przez 5 min (w temp. 37 °C, i 5% CO₂). Następnie, zawiesinę komórkową przenoszono do probówki typu falkon i wirowano przy 1200 RPM przez 5 min. Supernatant ostrożnie usuwano, a otrzymany osad zawieszano w 1 ml świeżej pożywki. Dla oceny gęstości komórek pobierano 10 µl zawiesiny do komory do liczenia komórek (FAST-READ).

Końcowa gęstość zawiesin komórkowych dobierano w zależności od przeprowadzanych eksperymentów:

- W przypadku badań prowadzonych na mata nanowłóknistych : gęstość komórek HCM wynosiła ok. 1×10^5 komórek/ml.
- W przypadku badań prowadzonych w mikrosystemach przepływowych: gęstość komórek H9c2, HCM, iPSC-CM i iPSC wynosiła ok. 1×10^6 komórek/ml.

8.3.3 Wysiewanie komórek

Wysiewanie komórek na matach nanowłóknistych

Po uzyskaniu zawiesin komórek (HCM) o odpowiedniej gęstości pobierano ich wymaganą objętość i nanoszono na powierzchnię mat nanowłóknistych umieszczonych w standardowych płytkach hodowlanych. Następnie, płytki umieszczano w inkubatorze (37 °C, 5% CO₂). Po ok. 2 h, gdy komórki uległy przyklejeniu do powierzchni mat nanowłóknistych, dodawano do każdej płytki pożywkę (do łącznej objętości 500 µl). Hodowlę

komórkową prowadzono przez 10 dni, regularnie (co 2 dni) wymieniając medium hodowlane. Zapewniało to utrzymanie odpowiednich warunków wzrostu komórek.

Wprowadzanie komórek do mikrosystemów przepływowych

Do przygotowanych mikrosystemów, wprowadzano odpowiednie medium hodowlane w przepływie 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ i umieszczano je w inkubatorze (37 °C) na ok. 30 min. Po tym czasie, do mikrokomór hodowlanych wprowadzano zawiesinę komórek z prędkością przepływu równą 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. Do poszczególnych mikrosystemów wprowadzano wybrany typ komórek:

Mikrosystem I: wprowadzano komórki HCM lub H9c2.

Mikrosystem II a: wprowadzano komórki H9c2 lub iPSC-CM.

Mikrosystem II b: wprowadzano komórki iPSC-CM oraz iPSC.

W trakcie wprowadzania zawiesiny komórek, co 20 s delikatnie obracano mikrosystem, aby zapobiec zbyt dużemu osadzaniu się komórek w pobliżu wlotu mikrosystemu oraz w celu zapewnienia równomiernego rozmieszczenia komórek w mikrokomorze hodowlanej, zawierającej maty nanowłokniste. Po wprowadzeniu komórek do mikrosystemów, umieszczano je w inkubatorze (37 °C, 5% CO₂) na 24 h, co umożliwiało komórkom adhezję do podłoża.

8.4 Stymulacja mechaniczna

8.4.1 Wytworzenie generatora zmiennego pola magnetycznego

Do przeprowadzenia mechanicznej stymulacji komórek wykorzystano specjalnie zaprojektowany generator zmiennego pola magnetycznego. Urządzenie zostało zaprojektowane w programie Fusion 360 i wykonane z wykorzystaniem technik mikrofrezowania oraz druku 3D. W konstrukcji generatora zastosowano magnesy neodymowe (N48), solenoidy oraz polimerowe elementy ruchome. Zbudowany układ sterujący składał się z zasilacza o mocy 300 W, modułów 4x MOSFET IRF540, STM32, sterownika Arduino Uno R3 oraz przewodów, które umożliwiały zasilanie urządzenia i kontrolowanie częstotliwości zmian pola magnetycznego. Wszystkie komponenty generatora wykonano z polimerów, takich jak akrylonitryl-butadien-styren (ABS), poli(kwas mlekowy) (PLA) i poliwęglan (PC).

8.4.2 Parametry stymulacji mechanicznej

W celu przeprowadzenia stymulacji mechanicznej komórki wysiane na płytce 24-dołkowej na matach nanowłóknistych (zarówno magnetycznych, jak i niemagnetycznych) lub mikrosystemach II a i II b, umieszczano w przestrzeni roboczej generatora zmiennego pola magnetycznego. W przypadku prowadzenia hodowli na matach nanowłóknistych w specjalnie przygotowanych uchwytach stymulację prowadzono przez 10 dni (0,5 Hz, 1 h dziennie). Po każdym cyklu stymulacji próbki przenoszono do inkubatora (37 °C, 5% CO₂), a pożywkę wymieniano co dwa dni. Po zakończeniu 10-dniowego eksperymentu oceniano żywotność komórek, stosując test Alamar Blue oraz barwienie różnicowe kalceiną-AM i jodkiem propidyny. Dodatkowo, przeprowadzano immunobarwienie z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko troponinie T (TnT) oraz łańcuchowi ciężkiemu miozyny 6 (MYH6).

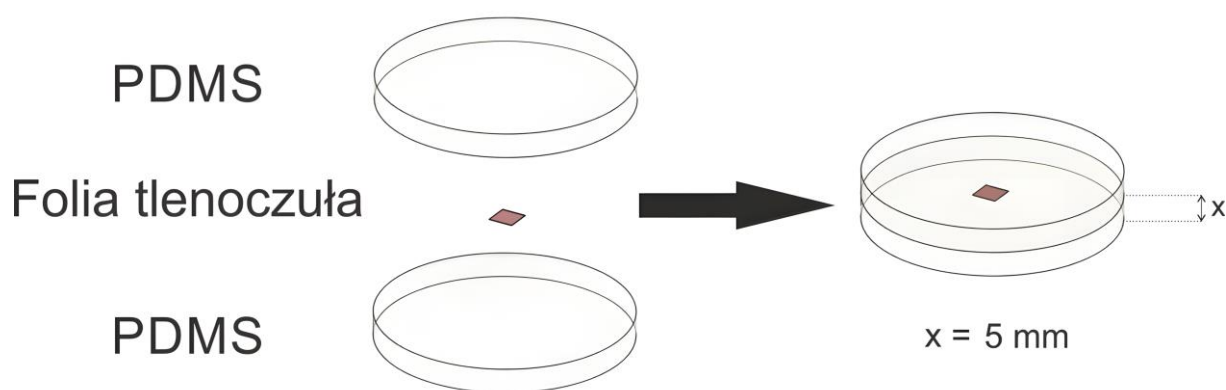
W przypadku stymulacji w mikrosystemach II a i II b stymulację mechaniczną prowadzono przez 5 dni (0,5 Hz, 1 h dziennie). Po każdym cyklu stymulacji mikrosystemy umieszczano w inkubatorze w warunkach 37 °C i 5% CO₂, a medium wymieniano codziennie (15 µl/min). W mikrosystemie II a przeprowadzano barwienie różnicowe kalceiną-AM i jodkiem propidyny oraz immunobarwienie białek Troponiny T i F-aktyny (TnT + F-aktyna), a także MYH6 i F-aktyny (MYH6+F-aktyna). W mikrosystemie II b z kolei wykonywano immunobarwienie z troponiny T. Dodatkowo, komórki iPSC znakowano barwnikiem CellTracker™ Red CMTPX Dye (CMTPX ang. *Chloro-Methyl-Tetra-Methyl-rhodamine Xanthene*) umożliwiającym wielopokoleniową obserwację, w trakcie współhodowli z komórkami iPSC-CM.

8.5 Symulacja niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych

8.5.1 Kalibracja folii tlenoczułej

W pierwszym etapie eksperymentu zastosowano folię tlenoczułą SF-RPSu4-L4/W4/OIW (Presens) z sondą luminescencyjną (PtTFPP) i barwnikiem referencyjnym niewrażliwym na zmiany stężenia O₂. Po wzbudzeniu światłem niebieskim (~ 400 nm) PtTFPP emituje czerwone światło (~ 650 nm). Jego intensywność maleje proporcjonalnie do stężenia tlenu (wygaszanie). Jednocześnie barwnik referencyjny (510 nm) pozostaje niewygaszony, pozwalając na dokładne monitorowanie zmian stężenia tlenu. Do badań wykorzystano krążki z PDMS o grubości 5 mm, między którymi umieszczano fragment folii tlenoczułej (5 × 5 mm) (Rycina 13). Po złączeniu warstw PDMS całość inkubowano przez 24 h w inkubatorze

o zawartości tlenu wynoszącej kolejno 1%, 6%, 11%, 16% i 21%. Następnie, krążki przenoszono do czytnika płytek wielodołkowych (w atmosferze 21% O₂) i rejestrowano intensywność fluorescencji emitowanej przez folię tlenoczułą. W wyniku analizy zebranych danych wykonano wykres zależności względnej intensywności fluorescencji od stężenia tlenu, a następnie wyznaczono równanie krzywej kalibracji. Uzyskane wyniki posłużyły do określania poziomu tlenu w badanych próbkach.



Rycina 13 Schemat przygotowania krążków, które wykorzystano do kalibracji folii tlenoczułej, a następnie sporządzenia równania kalibracji.

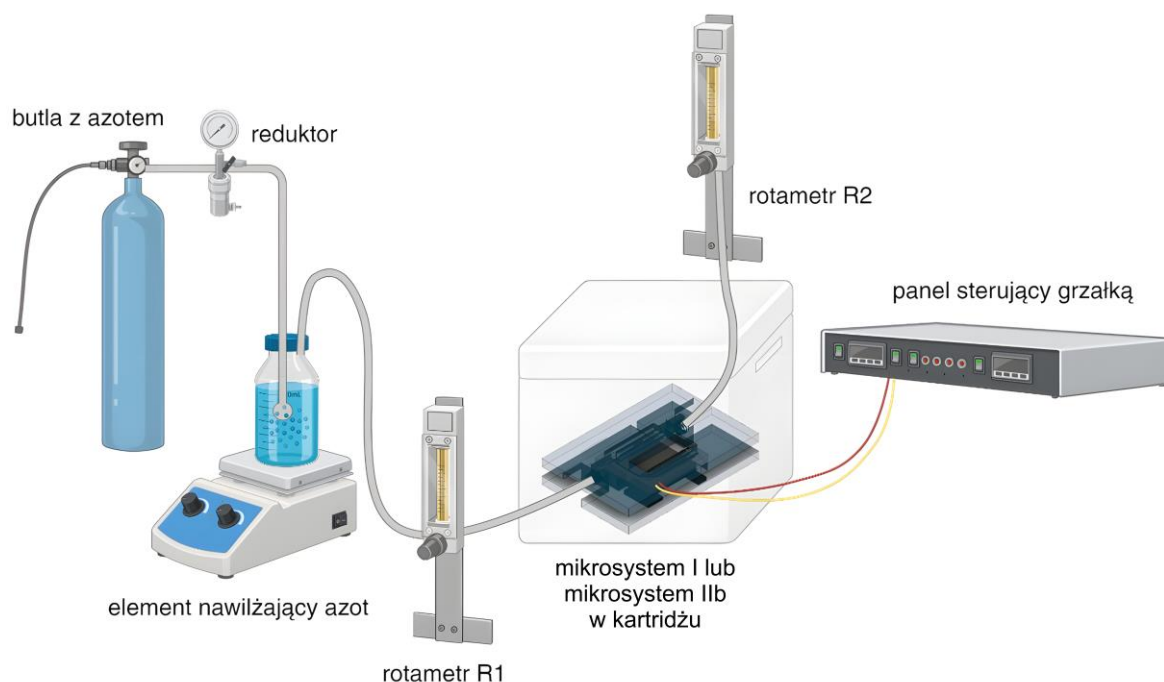
8.5.2 Wykonanie kartridża do wytwarzania warunków hipoksji w mikrosystemie II b

Kartridż służący do wytwarzania warunków niedotlenienia (hipoksji) w mikrosystemie II b zaprojektowano w programie Autodesk Fusion 360. Składał się on z dwóch warstw z polimetakrylanu metylu (PMMA) oraz aluminiowego elementu między którymi możliwe było umieszczenie mikrosystemu II b. Aluminiowy element stanowił warstwę, na której umieszczano komercyjnie dostępną grzałkę z kontrolą temperatury. Dzięki temu możliwe było kontrolowanie temperatury wewnątrz mikrosystemu. Tak zaprojektowany kartridż umożliwiał podłączenie przewodów doprowadzających azot, co umożliwiało uzyskanie warunków niedotlenienia w wybranych strefach mikrosystemu. Do wykonania warstw z PMMA zastosowano technikę mikrofrezowania. W pierwszej fazie używano frezu walcowego płaskiego o średnicy 3,175 mm przy posuwie skrawania ok. 600 mm/min, szerokości skrawania 1,5 mm i maksymalnej głębokości skrawania 0,3 mm. W kolejnych etapach, do wykonania otworów wymagających większej precyzji, stosowano frez walcowy płaski o średnicy 1 mm z posuwem ok. 600 mm/min, szerokością skrawania 0,1 mm i maksymalną głębokością skrawania 0,1 mm. Parametry te zapewniły uzyskanie dokładnej geometrii otworów i kanałów niezbędnych do zamontowania mikrosystemu, elementu aluminiowego oraz przyłączenia wężyków doprowadzających azot. Gotowy kartridż umożliwiał szczelne zamknięcie

mikrosystemu II b i wytworzenie kontrolowanych warunków niedotlenienia dzięki regulowanemu przepływowi azotu w wytworzonych kanałach.

8.5.3 Przygotowanie zestawu do wytwarzania warunków niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych

W celu wytworzenia warunków hipoksji (niedotlenienia) w wybranych strefach mikrosystemów zastosowano metodę fizycznego odcięcia dopływu tlenu. Podstawą aparatury był układ zasilany azotem (butla z azotem), w skład którego wchodziły: wąż doprowadzający azot, nawilżacz powietrza z płytą grzewczą, rotametr kontrolujący przepływ, wąż odprowadzający azot oraz termostat z miejscem na mikrosystemy (Rycina 14). W mikrosystemie I niedotlenienie uzyskiwano poprzez bezpośrednie podłączenie wężyków doprowadzających azot do wybranych obszarów mikrosystemu. Dzięki takiej konstrukcji część mikrokomór hodowlanych pozostawała w warunkach normoksji (z dostępem tlenu), a w pozostałych następowało obniżenie stężenia tlenu do poziomu warunkującego hipoksję. W mikrosystemie II b wykorzystano natomiast specjalnie zaprojektowany kartridż, w którym umieszczano mikrosystem II b. Przewody z azotem podłączano w taki sposób, aby zewnętrzna obudowa kartridża tworzyła zamkniętą przestrzeń wokół wyznaczonych stref mikrosystemu. W tych obszarach przepływał azot, co umożliwiło obniżenie stężenia tlenu zapewniając warunki niedotlenienia.



Rycina 14 Schemat zestawu służącego do wywoływania warunków niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych. W skład aparatury wchodzi butla z azotem wraz z reduktorem, nawilżacz powietrza z płytą grzejącą, rotametry (R1, R2) regulujące przepływ oraz panel sterujący.

8.5.4 Ocena warunków niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych

Przygotowano folię tlenoczułą o wymiarach 5 x 5mm i umieszczano ją w mikrosystemie przepływowym w centralnych miejscach wybranych mikrokomór hodowlanych. Mikrosystem II b dodatkowo umieszczono w przygotowanym kartridżu. Następnie, przez strefę hipoksji przepuszczano strumień azotu ($Q = 50 \text{ l / h}$) przez 0, 30 i 60 min. W kolejnym etapie mierzono intensywność fluorescencji folii tlenoczułej za pomocą czytnika płytek wielodołkowych. Na podstawie uzyskanych wyników przygotowano wykres zmian stężenia tlenu w strefie hipoksji oraz normoksji w zależności od czasu przepuszczania azotu przez wybrane obszary mikrosystemu.

Symulacja hipoksji w hodowlach komórkowych w mikrosystemie I

W mikrosystemie I hodowano komórki HCM, które utrzymywano w warunkach niedotlenienia w przez 3, 5 oraz 7 h (strumień azotu: $Q = 50 \text{ l / h}$). Po tym czasie, przeprowadzano analizę poziomu ATP w komórkach. W tym celu zastosowano test CellTiter-Glo Cell Viability Assay. Reagent wprowadzano do mikrokomór mikrosystemu z prędkością $15 \mu\text{l/min}$ przez 3 min i inkubowano w ciemności przez kolejne 25 min w temperaturze

pokojuj. Dodatkowo, po 3 i 5 h hipoksji pobierano materiał komórkowy do analizy ekspresji wybranych genów (*MAP4K*, *TNNT2*, *SERCA*, *SCN5A* oraz *HIF-1α*).

Symulacja hipoksji w hodowlach komórkowych w mikrosystemie II b

W mikrosystemie II b prowadzono hodowlę kardiomiocytów różnicowanych z komórek macierzystych (iPSC-CM). W tym przypadku, do wyznaczonej strefy mikrosystemu doprowadzano strumień azotu ($Q = 50 \text{ l / h}$) przez 6 h i następnie oceniano zmiany poziomu ATP z wykorzystaniem testu CellTiter-Glo Cell Viability Assay. Dodatkowo, przeprowadzano barwienie różnicowe (kalceiną-AM oraz jodkiem propidyny) oraz test JC-1, pozwalający na ocenę potencjału błon mitochondrialnych. Ponadto, wykonywano immunobarwienie białek troponiny T (TnT). Dodatkowo, w badaniach prowadzonych we współhodowli komórek iPSC-CM i iPSC komórki iPSC wyznakowano barwnikiem CellTracker™ Red CMTPX Dye.

8.6 Analiza hodowli komórkowych

8.6.1 Test Alamar Blue

Test Alamar Blue w na płytkach wielodołkowych

Test Alamar Blue został zastosowany do oceny żywotności komórek HCM hodowanych na matach nanowłóknistych, bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych. W tym celu, przygotowano roztwór AlamarBlue o stężeniu 10 % (obj.) w medium hodowlanym bez FBS stosowanym do hodowli komórek HCM. Następnie, odciągnięto pożywkę hodowlaną z dołków, w których umieszczone były maty nanowłókniste. Dodano do nich po 300 μl przygotowanego roztworu Alamar Blue i inkubowano przez 60 min w temp. 37°C. Po tym czasie, mierzono intensywność fluorescencji za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Cytation 3, przy długości fali wzbudzenia 552 nm oraz emisji 583 nm. Po zakończeniu pomiarów odciągano roztwór Alamar Blue, komórki przemywano 300 μl roztworu PBS, i dodawano 300 μl świeżej pożywki. Następnie, płytkę ponownie umieszczano w inkubatorze. Procedurę powtarzano w 1, 3 i 7 dniu hodowli. Intensywność fluorescencji (FI) w 3 i 7 dniu normalizowano względem dnia 1, stosując wzór:

$$CV = \frac{FI \text{ dnia } X - \text{Fluorescencja tła } FI}{FI \text{ dnia } 1 - \text{Fluorescencja tła } FI} \times 100$$

Fluorescencję tła określono na podstawie dołków zawierających wyłącznie roztwór Alamar Blue.

Test Alamar Blue w mikrosystemie I

W mikrosystemie I analizowano żywotność komórek HCM oraz H9c2. Komórki hodowano w mikrosystemie zgodnie z wcześniej przedstawionym opisem w mikrokomorach hodowlanych lub na matach nanowłóknistych. Sporządzono 10% roztwór odczynnika Alamar Blue w medium hodowlanym F12 dla komórek HCM lub DMEM w przypadku komórek H9c2. Tak przygotowany roztwór wprowadzano do mikrosystemu przez 10 min z prędkością przepływu 15 $\mu\text{l}/\text{min}$, a następnie inkubowano przez kolejne 60 min (w 37°C, 5% CO₂). Następnie, mierzono intensywność fluorescencji za pomocą czytnika Cytation 3 (BioTek) przy długości fali wzbudzenia 552 nm oraz emisji 583 nm. Pomiarów wykonywano dla 1, 3 i 7 dnia hodowli. Intensywność fluorescencji (FI) dla 3 i 7 dnia normalizowano względem dnia 1 zgodnie z wcześniej podanym wzorem. Po przeprowadzeniu pomiarów, mikrosystem przepłukiwano (przez 10 min z prędkością 15 $\mu\text{l}/\text{min}$) kolejno roztworem PBS oraz odpowiednią pożywką hodowlaną i umieszczano w inkubatorze.

8.6.2 Barwienie różnicowe

W celu oceny żywotności i morfologii komórek w różnych warunkach hodowlanych przeprowadzono barwienie kalceiną-AM oraz jodkiem propidyny. Roztwór barwiący zawierał 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kalceiny-AM oraz 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jodku propidyny. W zależności od typu eksperymentu przygotowany roztwór dodawano w określonych objętościach (300 μl - makroskala) lub wprowadzano do mikrosystemów z określoną prędkością (15 $\mu\text{l}/\text{min}$ przez 3 min). Następnie, komórki inkubowano przez 30 min (37°C i , 5% CO₂). Po tym czasie, przeprowadzano obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX-71 wyposażonego w kamerę CCD. Analizę obrazu wykonano przy użyciu oprogramowania CellSens.

Barwienie w makroskali na płytkach wielodołkowych

W celu porównania żywotności i morfologii komórek HCM hodowanych na matach nanowłóknistych oraz matach nanowłóknistych z dodatkiem nanocząstek magnetycznych przeprowadzono barwienie w 1., 3. i 7. dniu hodowli.

Barwienie w mikrosystemie I

Porównywano żywotność i morfologię komórek H9c2 oraz HCM hodowanych w mikrosystemie I z mikrokomorami z oraz bez mat nanowłóknistych. Barwienie komórek wykonano w 1., 3. i 7. dniu hodowli.

Barwienie w mikrosystemie II a

Badano wpływ stymulacji mechanicznej na żywotność i morfologię komórek H9c2 oraz iPSC-CM hodowanych w mikrosystemie zawierającym maty nanowłókniste bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych. Barwienie komórek przeprowadzono w 1. i 5. dniu hodowli.

Barwienie w mikrosystemie II b

Przeprowadzono ocenę żywotności i morfologii komórek iPSC-CMs hodowanych w mikrosystemie zawierającym maty nanowłókniste z dodatkiem nanocząstek magnetycznych po 6 h w warunkach hipoksji (normoksja jako kontrola).

8.6.3 Badanie poziomu ATP

Oznaczanie poziomu ATP w komórkach przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay (Promega). Mechanizm testu opiera się na reakcji wzbudzenia lucyferyny przez enzym lucyferazę w obecności jonów Mg^{2+} , tlenu oraz ATP, w wyniku czego powstaje oksylucyferyna, która po odłączeniu od enzymu powraca do stanu podstawowego, emitując energię w postaci promieniowania w zakresie światła widzialnego. Odczynnik dodatkowo zawiera substancje powodujące lizę komórek, co umożliwia uwolnienie cząsteczek ATP z wnętrza komórek. Intensywność luminescencji jest proporcjonalna do stężenia ATP w badanej próbce. Przed wykonaniem oznaczenia odczynnik CellTiter-Glo® 2.0 został rozcieńczony w medium komórkowym odpowiednim dla badanych linii komórkowych w stosunku objętościowym 1:1. Uzyskany roztwór wprowadzano do mikrokomór hodowlanych mikrosystemu z prędkością 100 μ l/min przez 1 min. Następnie, mikrosystemy inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po tym czasie, wprowadzono kolejną porcję przygotowanego odczynnika i ponownie inkubowano przez 30 min. Każdorazowo wypłukiwany z mikrosystemu roztwór zbierano z mikrokanałów wylotowych do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Uzyskane lizaty komórkowe mieszano przy użyciu pipety automatycznej i przenoszono na płytkę 96-dółkową w objętości 100 μ l na dółek. Następnie, wykonano pomiar luminescencji względem kontroli (roztwór

odczynnika z medium komórkowym zmieszany w stosunku objętościowym 1:1) z wykorzystaniem czytnika płytek Cytation3.

Badanie przeprowadzono w dwóch mikrosystemach:

- Mikrosystem I: Oznaczenie poziomu ATP przeprowadzono dla komórek HCM po 3, 5 oraz 7 h hodowli w warunkach hipoksji oraz normoksji (kontrola).
- Mikrosystem II b: Oznaczenie poziomu ATP przeprowadzono dla komórek iPSC-CMs po 6 h hodowli w warunkach hipoksji oraz normoksji.

8.6.4 Analiza ułożenia komórek

Do oceny ułożenia komórek wykorzystano hodowle komórkowe poddane barwieniu różnicowemu kalceiną-AM oraz jodkiem propidyny. Analiza ta została wykonana dla hodowli komórek H9c2 oraz HCM prowadzonej w płytkach wielodołkowych i mikrosystemie I w 3. i 7. dniu hodowli. Celem badania było porównanie ułożenia komórek hodowanych na matach nanowłóknistych w płytkach wielodołkowych oraz hodowanych na matach nanowłóknistych w mikrosystemie przepływowym.

W mikrosystemie II a prowadzono badania dla hodowli komórek H9c2 oraz iPSC-CM. Celem eksperymentu było porównanie ułożenia komórek hodowanych w mikrosystemach na różnych materiałach, poddawanych w stymulacji magnetycznej. Analiza została wykonana po 5 dniach hodowli. Prowadzono poszczególne typy hodowli komórek w mikrosystemie II a:

- PDMS,
- PDMS + stymulacja magnetyczna,
- maty nanowłókniste,
- maty nanowłókniste + stymulacja magnetyczna,
- maty nanowłókniste magnetyczne,
- maty nanowłókniste magnetyczne + stymulacja magnetyczna.

Analizę ułożenia komórek wykonano za pomocą oprogramowania ImageJ, na podstawie co najmniej trzech obrazów dla każdego typu hodowli. Maty nanowłókniste w komorach mikrosystemów były ułożone równolegle do kierunku przepływu wprowadzanych roztworów. Przyjęto, że jeśli komórka jest ułożona równolegle do nanowłókien tworzących matę nanowłóknistą, jej kąt ułożenia wynosi 0° .

8.6.5 Barwienie immunofluorescencyjne

Wszystkie badania immunofluorescencyjne (makroskala oraz mikrosystemy II a i II b) prowadzono według ogólnie przyjętej metodyki obejmującej następujące etapy: komórki hodowane na określonych podłożach przemywano odpowiednim buforem (Wash Buffer), utrwalano roztworem 4% paraformaldehydu (10 min, RT), a następnie permeabilizowano roztworem 0,5% Triton X-100 (10 min, RT). Po permeabilizacji komórki blokowano roztworem zawierającym BSA (3%) oraz Triton X-100 (0,1%) przez 50 min (RT). Następnie, komórki inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami (24 h, 0 - 4°C). Stosowano następujące przeciwciała pierwszorzędowe:

- Makroskala (komórki HCM): królicze monoklonalne przeciwko skierowane przeciwko troponinie T (Abcam, 1:100 w 2,4 % BSA) oraz MYH6 (Proteintech, 1:100 w 2,4 % BSA).
- Mikrosystem II a (komórki H9c2 oraz iPSC-CM): królicze monoklonalne skierowane przeciwko troponinie T (Abcam, 1:100 w 2,4 % BSA), MYH6 (Proteintech, 1:100 w 2,4 % BSA), falloidyna (1:400 w 2,4 % BSA).
- Mikrosystem II b (komórki iPSC-CM, iPSC-CMs/iPSC po hipoksji): królicze monoklonalne przeciwko skierowane przeciwko troponinie T (Abcam, 1:100 w 2,4 % BSA).

Po inkubacji komórki przemywano roztworem 0,1% Triton X-100 i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromami Alexa Fluor 488 lub Alexa Fluor 568 (1:200 w 2,4 % BSA, 45–50 min, RT). Następnie, barwiono jądra komórkowe z wykorzystaniem Hoechst 33342 przez 30 min (RT). Na zakończenie komórki przemywano 0,1% Triton X-100 i buforem Wash Buffer. Finalnie wszystkie próbki obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV10i.

Warunki hodowli komórek:

- Makroskala: Immunobarwienie wykonano dla hodowli komórek HCM hodowanych przez 10 dni na matach nanowłóknistych bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych, które były poddawane lub nie stymulacji magnetycznej.
- Mikrosystem II a: Immunobarwienie wykonano dla hodowli komórek H9c2 lub iPSC-CM hodowanych przez 5 dni w mikrosystemie (mikrokanały z: PDMS, matami nanowłóknistymi bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych) poddanym lub nie

stymulacji magnetycznej. Wszystkie reagenty wprowadzano z użyciem pompy perystaltycznej (15 μ l/min).

- Mikrosystem II b: Immunobarwienie wykonano dla hodowli komórek iPSC-CM oraz komórek iPSC-CM we współhodowli z iPSC hodowanych przez 6 h w warunkach hipoksji lub normoksji. Wszystkie reagenty wprowadzano z użyciem pompy perystaltycznej (15 μ l/min).

8.6.6 Analiza ekspresji genów

Analiza ekspresji genów po symulacji stanów chorobowych przeprowadzona została w mikrosystemie I, w którym hodowano komórki HCM. RNA izolowano z liczby komórek odpowiadającej całkowitej liczbie wysianych komórek w trzech mikrokomorach. Każda mikrokomora miała powierzchnię równoważną pojedynczemu dołkowi płytki 96-dołkowej. Liczbę komórek użytych do izolacji RNA oszacowano na podstawie początkowej gęstości wysiewania oraz obszaru wzrostu. W celu wyizolowania materiału genetycznego wykonano poniższe etapy. Mikrosystem dokładnie przepłukano roztworem PBS, aby usunąć resztki pożywki hodowlanej. Następnie, do mikrosystemu wprowadzono bufor lizujący RLT z zestawu RNeasy Micro Kit (Qiagen). Po dodaniu buforu lizującego całość inkubowano przez 20 min w temp. -20°C , aby zapewnić całkowitą lizę komórek. Lizaty komórkowe przeniesiono do oddzielnych probówek typu Eppendorf i kontynuowano izolację RNA zgodnie z instrukcją producenta zestawu RNeasy Micro Kit. W celu oceny integralności i czystości wyekstrahowanego RNA wykonano pomiary spektrofotometryczne. Stosunek absorbancji A260/A280 zmierzono dla każdej próbki, przy czym akceptowalne wartości mieściły się w przedziale od 1,8 do 2,0, wskazując minimalne zanieczyszczenie białkowe. Precyzyjne określenie stężenia i wydajności RNA przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Do analizy RT-PCR zastosowano zestaw RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), który umożliwił odwrotną transkrypcję wyizolowanego RNA do cDNA. Reakcje RT-PCR przeprowadzono z użyciem odczynnika SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix na aparacie CFX Connect Real-Time PCR System. Ekspresję wybranych genów związanych ze stanem niedotlenienia (hipoksją), wyszczególnionych w Tabeli 1, badano w warunkach symulujących niedotlenienie trwające 3 h oraz 5 h, wykorzystując komórki HCM hodowane w mikrosystemie na matach nanowłóknistych w warunkach normoksji jako kontrolę. Poziomy ekspresji analizowanych genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego. Obliczenia względnej

ekspresji genów wykonano metodą $\Delta\Delta CT$, gdzie każdy wynik reprezentuje średnią z trzech technicznych powtórzeń, zapewniając wiarygodność statystyczną uzyskanych danych.

Tabela 1 Sekwencje starterów zastosowanych w analizie ekspresji wybranych genów metodą RT-PCR w komórkach HCM hodowanych w mikrosystemie I.

<i>Gen</i>	<i>Starter sensowny</i>	<i>Starter sensowny</i>
<i>HIF-1α</i>	<i>CGGCGAGAACGAGAAGAAAAAAT</i>	<i>AGACTCTTTGCTTCGCCGAG</i>
<i>MAP4K</i>	<i>AGAGATACGCTCTGTGGAAAC</i>	<i>GCAAAGAACACCTTGTCATTACG</i>
<i>TNNT2</i>	<i>GCGGAAGAGTGGGAAGAGACA</i>	<i>CCATAGCTCCTTGGCCTTCT</i>
<i>SERCA2</i>	<i>GCGTGTCATGTGCGTTGTTA</i>	<i>GCTGGGGGCTGTTCTATTTCT</i>
<i>SCN5A</i>	<i>GAAGAAGCTGGGCTCCAAGA</i>	<i>CATCGAAGGCCTGCTTGCTC</i>
<i>GAPDH</i>	<i>GACATGCCGCCTGGAGAAAC</i>	<i>AGCCCAGGATGCCCTTTAGT</i>

8.6.7 Analiza statystyczna

Każdy eksperyment powtarzano co najmniej pięć razy. Wszystkie uzyskane wyniki zostały wyrażone jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji (One-Way ANOVA) lub testu t-studenta. Wartości $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne. Do analizy wykorzystano oprogramowanie Origin 2021b.

9. Wyniki

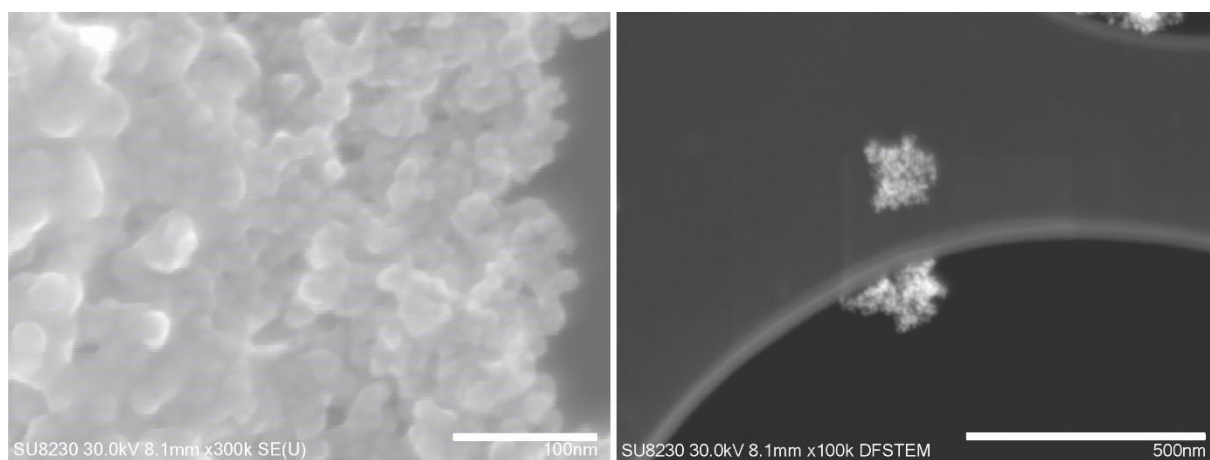
9.1 Hodowla komórek serca na matach nanowłóknistych

Jednym z kluczowych czynników wpływających na prawidłowy rozwój i funkcjonowanie komórek serca (kardiomiocytów) w warunkach *in vitro* jest podłoże, na którym są one hodowane. Odpowiednio zaprojektowany materiał może nie tylko wspierać adhezję, proliferację i dojrzewanie komórek, lecz także zapewniać bodźce mechaniczne i fizykochemiczne zbliżone do tych występujących w warunkach fizjologicznych. W niniejszej pracy założono, że zastosowanie mat nanowłóknistych, dodatkowo modyfikowanych nanocząstkami magnetycznymi, umożliwi uzyskanie biomateriału zdolnego do lepszego odwzorowania naturalnego środowiska komórek mięśnia sercowego. Celem tej części badań było przede wszystkim wytworzenie mat nanowłóknistych o ściśle kontrolowanych parametrach – w tym jednorodności włókien, ich średnicy oraz porowatości, a następnie zmodyfikowanie ich poprzez dodatek nanocząstek magnetycznych (nanocząstek tlenku żelaza (II,III), Fe_3O_4). Pozwalać to miało na mechaniczne oddziaływanie na komórki poprzez zastosowanie zewnętrznego pola magnetycznego. Przeprowadzono analizę właściwości fizycznych i mechanicznych otrzymanych mat nanowłóknistych, w szczególności ocenę ich wytrzymałości na rozciąganie, moduł Younga oraz porowatość. Następnie, przeprowadzono badania biologiczne (żywołność, dojrzewanie komórek), które określić miały wpływ mat nanowłóknistych na funkcjonowanie wybranego typu komórek serca tj. pierwotnych ludzkich kardiomiocytów (HCM). Dodatkowo, analizowano, w jaki sposób stymulacja magnetyczna i towarzysząca jej deformacja włókien wpływa na ekspresję kluczowych markerów dojrzałych komórek mięśnia sercowego, takich jak Troponina T czy łańcuch ciężki miozyny 6 (MYH6).

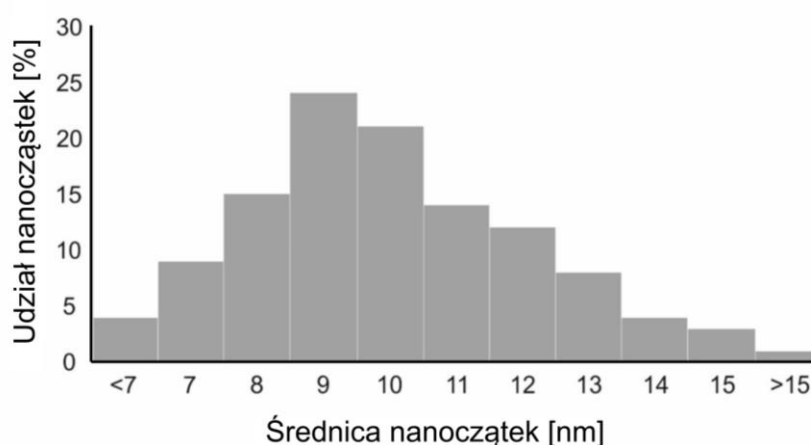
9.1.1 Właściwości wytworzonych mat nanowłóknistych

W ramach tego etapu pracy wytworzono maty nanowłókniste z poliuretanu (PU) metodą rodmuchu roztworu polimeru (SBS ang. *Solution Blow Spinning*). Przygotowano zarówno maty nanowłókniste bez dodatku nanocząstek jak i maty nanowłókniste dodatkowo zawierające nanocząstki magnetyczne tlenku żelaza (Fe_3O_4) (MNP ang. *magnetic nanoparticles*). Zastosowanie nanocząstek magnetycznych miało na celu uzyskanie materiału zdolnego do przekazywania zewnętrznemu wywołanych bodźców mechanicznych. Opracowany materiał miał lepiej odwzorowywać naturalne mikrośrodowisko komórek oraz potencjalnie stymulować dojrzewanie kardiomiocytów. Istotnym elementem tej części pracy był odpowiedni dobór

nanocząstek, tak by ich rozmiar był znacząco mniejszy niż średnica włókien (ok. 250–300 nm) (Rycina 15, Rycina 16). W badaniach zastosowano nanocząstki o wymiarach $9,97 \pm 2,18$ nm (rozmiar wyznaczono na podstawie analiz z wykorzystaniem skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego, STEM, Hitachi SU8230). Dzięki temu nanocząstki pozostawały całkowicie wbudowane w strukturę nanowłókna polimerowego, co umożliwiło zachowanie niezmięnionej morfologii włókien oraz zredukowało ewentualne uwalnianie jonów żelaza do pożywki hodowlanej. Dodatkowo, właściwości magnetyczne zastosowanych nanocząstek tlenku żelaza umożliwiały wywoływanie cyklicznych odkształceń włókien za pomocą pola magnetycznego, co miało istotne znaczenie dla prowadzenia stymulacji komórek.



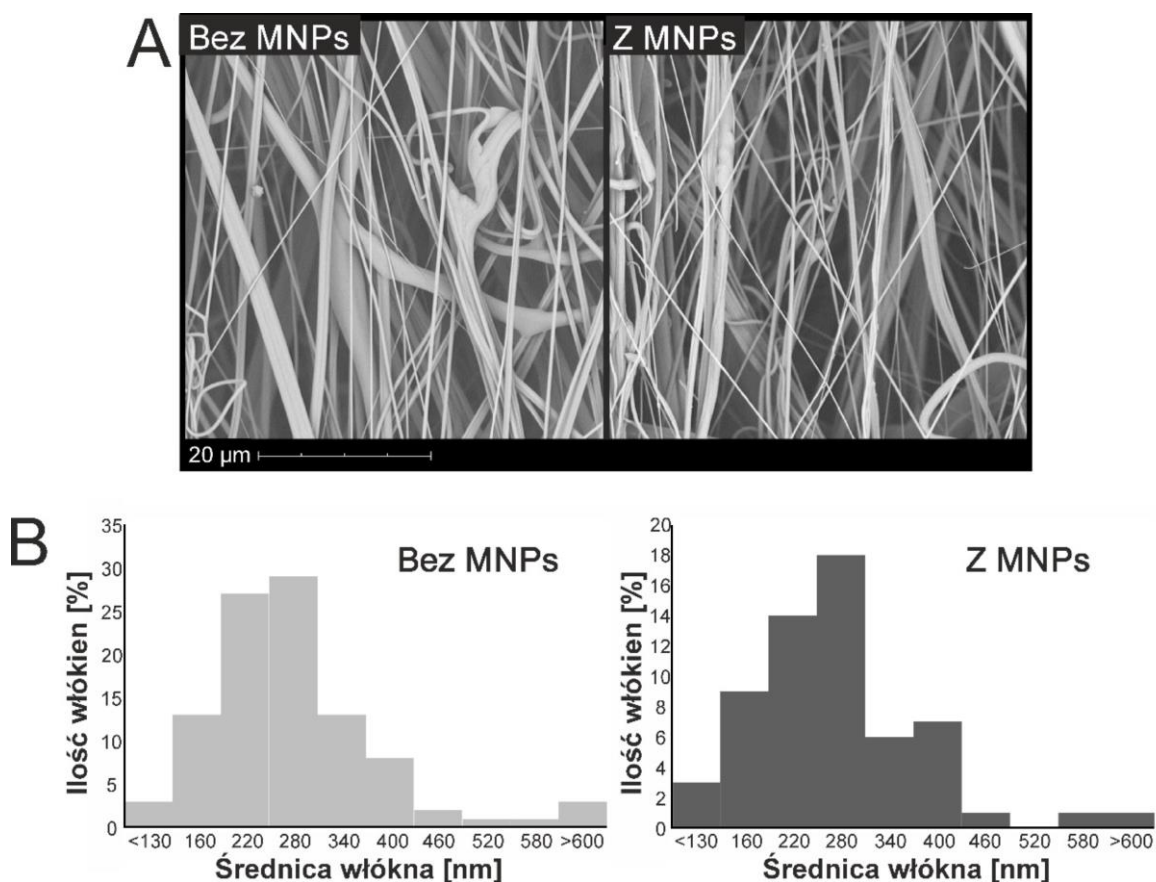
Rycina 15 Zdjęcia nanocząstek magnetycznych wykonane przy użyciu skaningowo transmisyjnego mikroskopu elektronowego Hitachi SU8230.



Rycina 16 Dystrybucja wielkości nanocząstek.

Podczas procesu rozdmuchu roztworu PU zwracano szczególną uwagę na wysoką prędkość obrotową kolektora, ponieważ pozwala ona otrzymać włókna ułożone niemal

równoległe. Zgodnie z danymi literaturowymi, taki rozkład nanowłókien może wspomagać ułożenie komórek mięśniowych i serca wzdłuż włókien, a tym samym sprzyjać ich prawidłowemu wzrostowi [130,131]. Analiza mikroskopowa potwierdziła równoległe ułożenie włókien, brak zmian w strukturze materiału oraz brak wyraźnego pogrubienia włókien w przypadku mat nanowłóknistych z nanocząstkami magnetycznymi (Rycina 17 A). Analiza średnic otrzymanych włókien wskazała bardzo zbliżone wartości dla obu rodzajów mat (278 ± 108 nm dla mat PU oraz 275 ± 105 nm w przypadku mat z nanocząstkami). Oznacza to, że dodatek nanocząstek magnetycznych nie wpłynął negatywnie na sam proces formowania nanowłókien (Rycina 17 B). W kolejnym etapie potwierdzono również właściwości magnetyczne otrzymanych mat (Rycina 18), dzięki czemu możliwe było ich dalsze wykorzystanie w badaniach nad mechaniczną stymulacją kardiomiocytów za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego.



Rycina 17 A) Obrazy ze skaningowego mikroskopu elektronowego: maty nanowłókniste PU bez i z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (MNP). B) Dystrybucja wielkości włókien bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych.



Rycina 18 Zdjęciu potwierdzające właściwości magnetyczne otrzymanych mat nanowłóknistych.

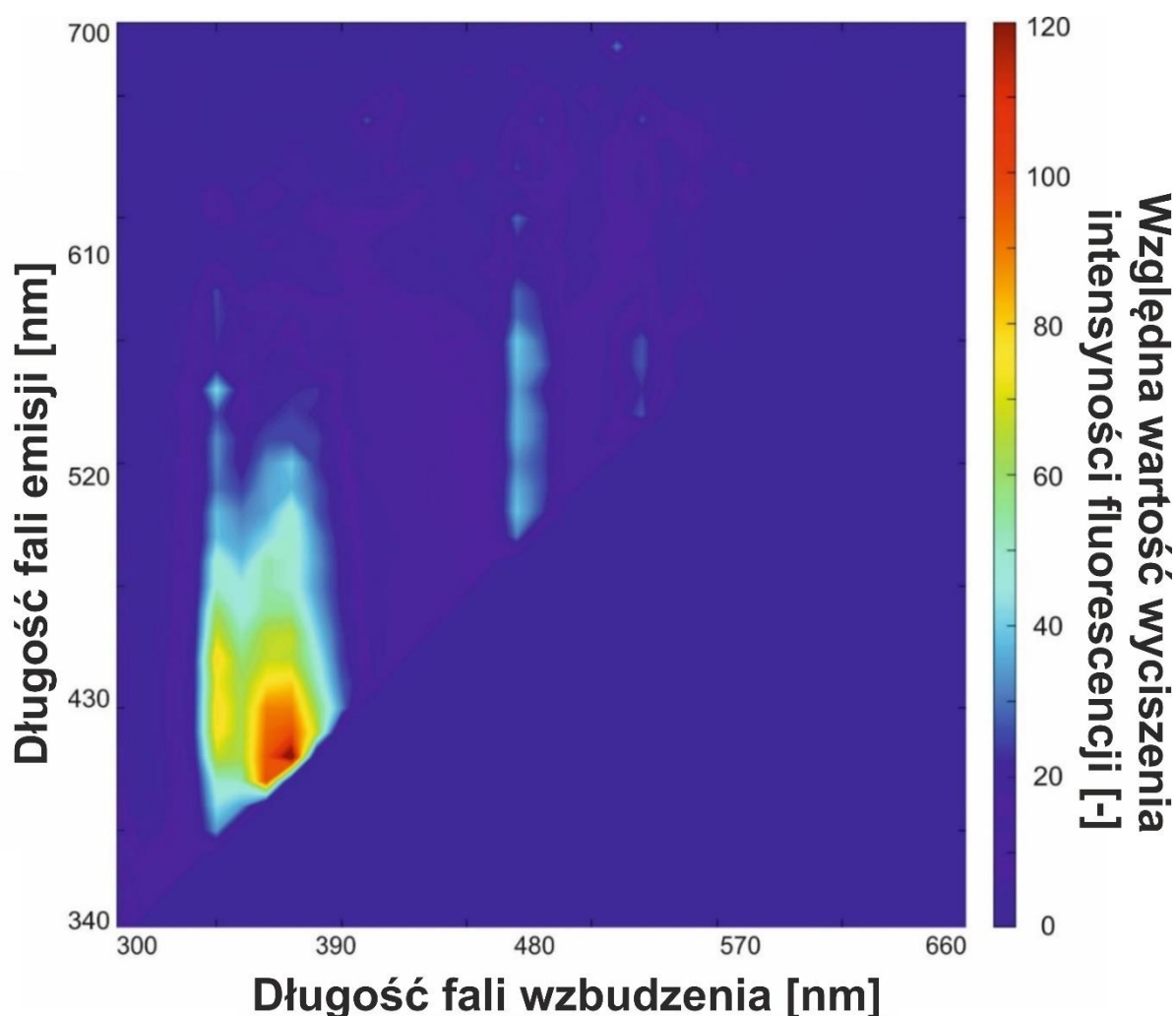
Charakterystyka mat nanowłóknistych

W celu określenia wpływu nanocząstek magnetycznych tlenku żelaza na właściwości mechaniczne wytworzonych mat, zmierzono naprężenia rozciągające dla materiału, wydłużenie przy zerwaniu oraz moduł sprężystości (Tabela 2). Analiza uzyskanych danych wskazała, że dodatek nanocząstek magnetycznych nie powoduje istotnych zmian wartości modułu Younga ani wydłużenia przy zerwaniu. Zauważono jednak istotnie niższe naprężenie rozciągające w kierunku równoległym do ułożenia włókien (PL, *ang. parallel*) w przypadku mat zawierających nanocząstki magnetyczne. Wynik ten można wyjaśnić częściowym zakłóceniem struktury włókien przez obecność nanocząstek magnetycznych, które prawdopodobnie zwiększają podatność materiału na uszkodzenia mechaniczne wzdłuż włókien. Dodatkowo, porównanie pomiarów w kierunku równoległym i prostopadłym (PP *ang. perpendicular*) pokazało znaczące różnice w naprężeniu rozciągającym, wydłużeniu i module Younga. Pomiar porowatości wykazał, że wynosi ona ok. 0,85–0,87 niezależnie od obecności nanocząstek magnetycznych w strukturze mat nanowłóknistych. Brak zmiany wartości modułu Younga i minimalny wpływ dodatku nanocząstek magnetycznych na morfologię włókien wskazują, że iż dodatek nie wpływa negatywnie na właściwości mechaniczne mat nanowłóknistych. Wysoka wydłużalność materiału sugeruje natomiast, że maty te mogą efektywnie przenosić bodźce mechaniczne i być stosowane w dalszych etapach badań nad stymulacją kardiomiocytów.

*Tabela 2 Właściwości mechaniczne mat nanowłóknistych z poliuretanu (PU) bez i z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (MNPs) (maty nanowłókniste badano pod wpływem naprężenia w dwóch kierunkach: równoległym (PL) i prostopadłym (PP) do ułożenia włókien). *a - statystycznie istotne różnice między wartościami mierzonymi równolegle i prostopadle do ułożenia nanowłókien. *b - wykazano statystycznie istotne różnice między naprężeniami rozciągającymi dla materiału porowatego dla nanowłókien z i bez MNPs w kierunku równoległym do ułożenia nanowłókien. ($p < 0,05$).*

Kierunek odkształcenia w odniesieniu do ułożenia nanowłókien		Naprężenie rozciągające dla materiału porowatego [MPa]	Wydłużenie przy zerwaniu [-]	Moduł Younga [MPa]
PU	PL	20.32+1.09 ^{*a,b}	0.20+0.05 ^{*a}	42.55+6.67 ^{*a}
PU	PP	3.75+0.46 ^{*a}	0.75+0.10 ^{*a}	4.81+0.76 ^{*a}
PU + MNPs	PL	14.82+2.38 ^{*a,b}	0.17+0.03 ^{*a}	42.51+15.06 ^{*a}
PU + MNPs	PP	2.69+0.94 ^{*a}	0.55+0.15 ^{*a}	8.55+1.60 ^{*a}

Dodatkowo, w celu oceny wpływu dodatku nanocząstek magnetycznych na właściwości fizyczne mat nanowłóknistych, przeprowadzono pomiary widm wzbudzenia–emisji i sporządzono dwuwymiarową mapę przedstawiającą współczynnik wygaszania intensywności fluorescencji (Rycina 19). Uzyskane wyniki pokazały, że maty nanowłókniste PU wykazują zauważalną autofluorescencję, natomiast wprowadzenie nanocząstek magnetycznych prowadzi do jej wyraźnej redukcji, szczególnie w zakresie długości fal wzbudzenia 350–400 nm (obserwowano tam ponad stukrotne wygaszenie sygnału). Ograniczenie autofluorescencji podłoża jest istotne przy obrazowaniu komórek z zastosowaniem metod fluorescencyjnych, ponieważ zwiększa kontrast i ułatwia analizę sygnału pochodzącego wyłącznie od wyznakowanych struktur komórkowych. Dzięki temu, w dalszych badaniach biologicznych możliwe będzie bardziej precyzyjne określanie parametrów takich jak żywotność czy ekspresja markerów specyficznych kardiomiocytów.

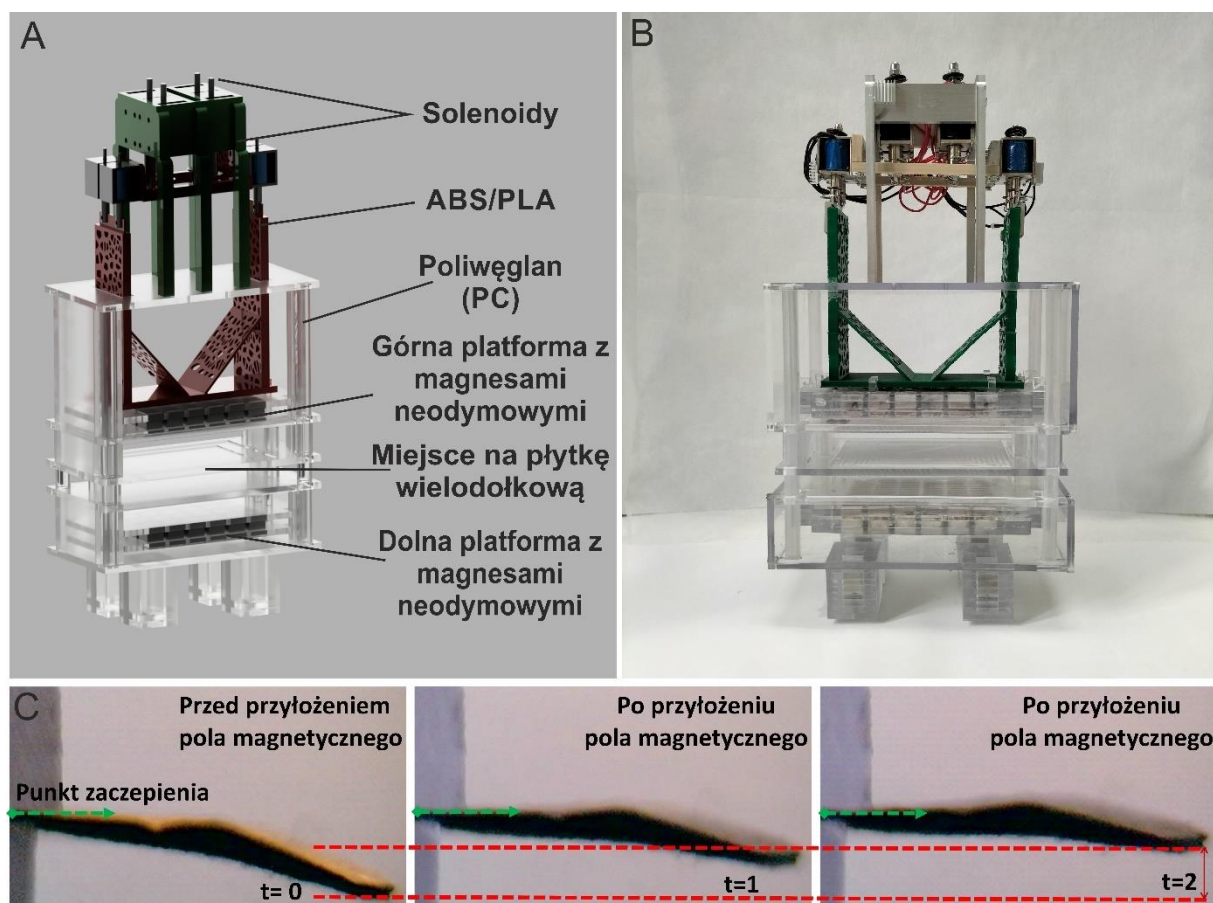


Rycina 19 Mapa 2D współczynnika wygaszenia intensywności fluorescencji dla nanowłókien z nanocząstkami magnetycznymi względem nanowłókien bez dodawania nanocząstek magnetycznych.

9.1.2 Działanie generatora zmiennego pola magnetycznego

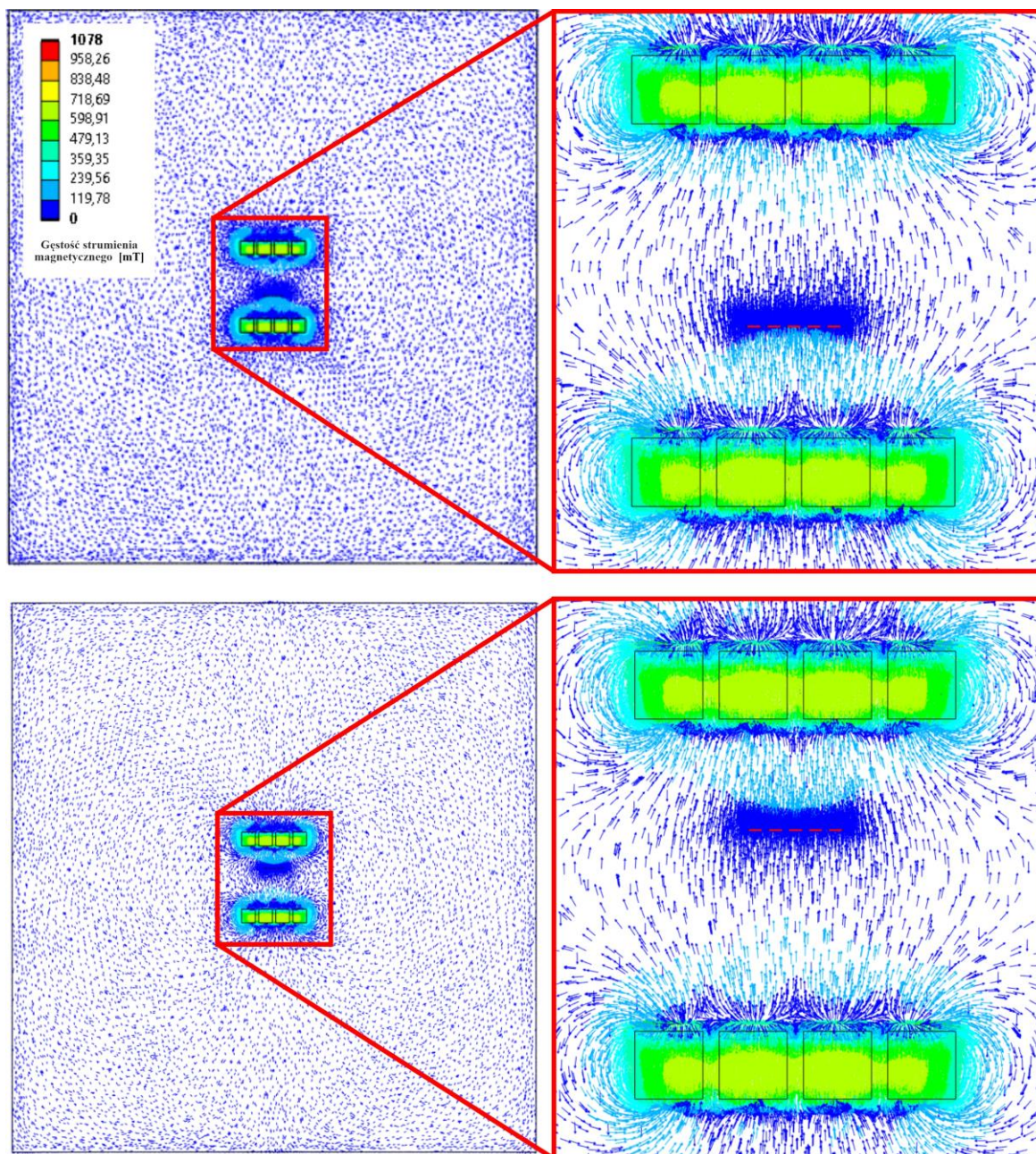
Generator zmiennego pola magnetycznego zaprojektowano w celu wytworzenia zewnętrznego pola mogącego wywoływać deformację magnetycznych mat nanowłóknistych, a tym samym przekazywać bodziec mechaniczny komórkom hodowanym na ich powierzchni. W konstrukcji urządzenia wykorzystano magnesy neodymowe, solenoidy oraz elementy polimerowe (Rycina 20 A, B). Magnesy neodymowe zostały rozmieszczone na dwóch niezależnych platformach w taki sposób, aby ich układ odpowiadał rozmieszczeniu dołków w standardowej płytce 24-dołkowej. Pozwoliło to na uzyskanie zbliżonego natężenia pola we wszystkich dołkach. Generator zaprojektowano w taki sposób, aby możliwe było umieszczenie płytki wielodołkowej lub mikrosystemu przepływowego w specjalnie wyprofilowanej przestrzeni, zaprojektowanej tak, aby znajdowała się między platformami z magnesami w równej odległości od górnej i dolnej platformy. Rozwiązanie to zostało przystosowane do

pracy w zakresie częstotliwości od 0,5 do 2 Hz, a w każdym cyklu stymulacji platformy przesuwały się pionowo o 2 cm. Odchylenia mat nanowłóknistych o właściwościach magnetycznych potwierdzono poprzez umieszczenie ich między dwoma polimerowymi uchwytami oraz rejestrację wychylenia mat nanowłóknistych przy użyciu kamery cyfrowej Olympus MIC-D. Na Rycinie 20 C pokazano kolejne etapy stymulacji polem magnetycznym. W momencie $t=0$ nie przykładano pola magnetycznego i włókna pozostawały w pozycji spoczynkowej, natomiast w $t=1$ i $t=2$ wyraźnie widoczne jest ich odchylenie wywołane działaniem pola magnetycznego. Dzięki uzyskanej regulacji kierunku i częstotliwości zmian pola magnetycznego generator mógł być wykorzystany do stymulacji mechanicznej komórek hodowanych na matach nanowłóknistych umieszczonych w płytkach wielodołkowych lub zintegrowanych z mikrosystemem przepływowym.



Rycina 20 A) Schemat i B) fotografia opracowanego generatora pola magnetycznego, w tym magnesów neodymowych, solenoidów i polimerowych elementów. C) Odchylenie magnetycznych mat nanowłóknistych po działaniu pola magnetycznego.

Dodatkowo zweryfikowano, czy pole magnetyczne jest jednakowe w całej przestrzeni roboczej generatora, zarówno w pobliżu górnych, jak i dolnych magnesów neodymowych. W tym celu, przeprowadzono symulacje numeryczne, których celem było sprawdzenie rozkładu pola magnetycznego wokół mat nanowłóknistych umieszczonych na płytkach hodowlanych bądź zintegrowanych z mikrosystemem przepływowym. Analizę rozkładu pola magnetycznego wykonano z użyciem oprogramowania ANSYS 2024R1. Przeprowadzono je dla dwóch skrajnych pozycji stymulatora magnetycznego: przy maksymalnym zbliżeniu do górnej platformy z magnesami oraz przy maksymalnym zbliżeniu do dolnej platformy. Otrzymane wyniki wskazały, że w miejscach umieszczenia płytki hodowlanej bądź mikrosystemu gęstość strumienia magnetycznego wynosi odpowiednio $116,05 \pm 1,20$ mT oraz $116,00 \pm 1,26$ mT, a natężenie pola magnetycznego osiąga wartości $92,343 \pm 0,979$ kA/m oraz $92,319 \pm 0,972$ kA/m. Wizualizacje wykonane podczas symulacji (Rycina 21) przedstawiają rozkład pola magnetycznego dla obu ekstremalnych ustawień stymulatora i pozwalają stwierdzić, że rozbieżności w gęstości strumienia i natężeniu pola są niewielkie. Taka jednorodność rozkładu gwarantuje stabilną stymulację mechaniczną hodowanych komórek.

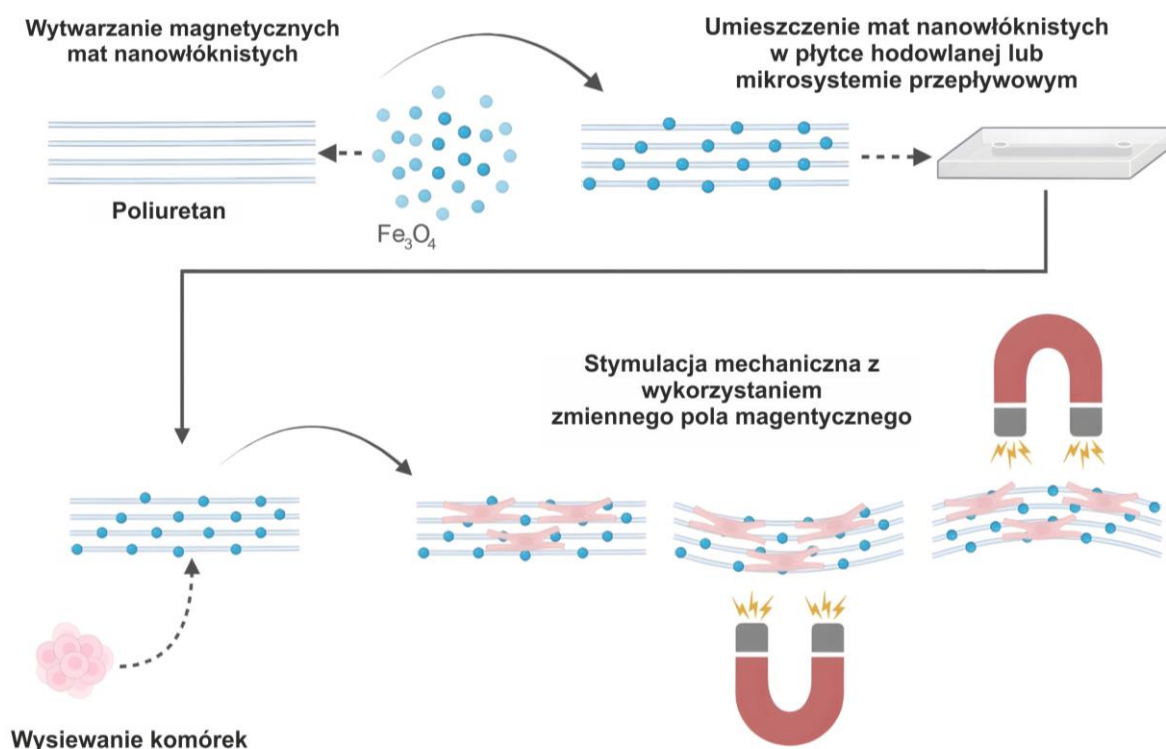


Rycina 21 Gęstość strumienia magnetycznego dla maksymalnych przemieszczeń próbki względem platform z magnesami neodymowymi

9.1.3 Stymulacja komórek serca z wykorzystaniem zmiennego pola magnetycznego

Żywotność kardiomiocytów

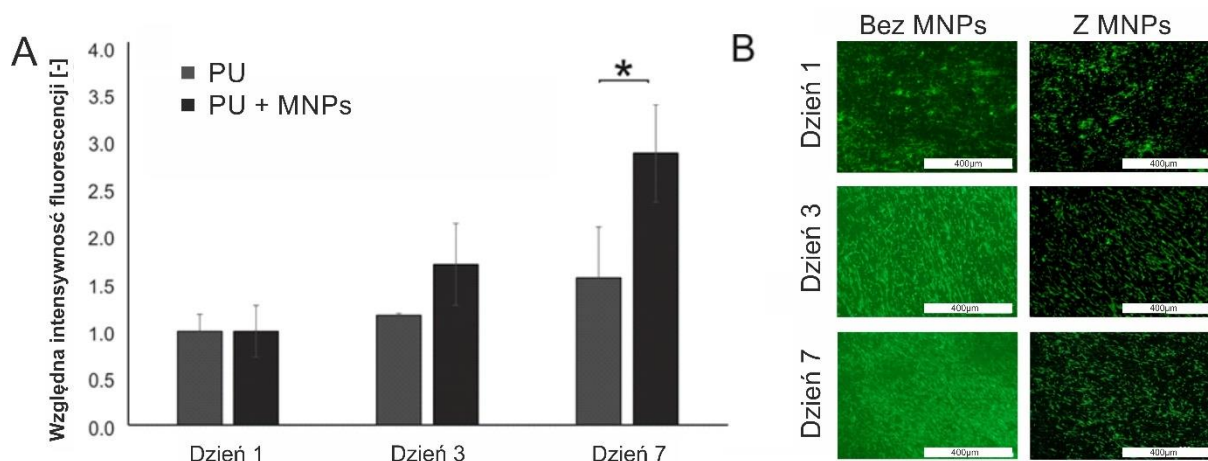
Na Rycinie 21 przedstawiono schemat prowadzenia badań z wykorzystaniem magnetycznych mat nanowłóknistych, obejmujący ich wytworzenie, montaż w płytce wielodołkowej lub mikrosystemie przepływowym (badania opisane w rozdziale 9.3.3), wysiewanie komórek oraz stymulację zmiennym polem magnetycznym.



Rycina 22 Schemat procedury badawczej z wykorzystaniem magnetycznych mat nanowłóknistych: wytworzenie mat z poliuretanu zawierających nanocząstki Fe₃O₄, umieszczenie mat w płytce hodowlanej lub mikrosystemie przepływowym, wysiewanie komórek serca i stymulacja mechaniczna zmiennym polem magnetycznym

W pierwszym etapie zbadano, w jaki sposób dodatek nanocząstek magnetycznych do mat nanowłóknistych wpływa na żywotność komórek serca (HCM). W tym celu, zastosowano test AlamarBlue. Maty nanowłókniste bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych umieszczono w specjalnie zaprojektowanych uchwytach z poliwęglanu. Dzięki temu komórki nie były wypłukiwane podczas hodowli i cyklicznych wymian medium hodowlanego. Zastosowane uchwyty miały też wymiary umożliwiające ich umieszczenie w standardowych dołkach płytki 24-dołkowej, przy czym powierzchnia wzrostu komórek odpowiadała

powierzchni w płytce 96-dółkowej. Pozwoliło to na zachowanie porównywalnych warunków hodowli, a jednocześnie ułatwiło wykonywanie pomiarów. Wyniki testu AlamarBlue wykazały wzrost żywotności kardiomiocytów hodowanych na matach nanowłóknistych z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (Rycina 23 A). Po siedmiu dniach hodowli żywotność komórek HCM wzrosła o ok. 1,1 w porównaniu do mat nanowłóknistych bez nanocząstek. Dodatkowo, barwienie komórek przy użyciu kalceiny-AM (zielone komórki - żywe) i jodku propidyny (czerwone komórki - martwe) potwierdziło zarówno wysoką żywotność komórek (Rycina 23 B). Wykazano więc, że dodatek nanocząstek magnetycznych nie tylko nie działa toksycznie, lecz również sprzyja wzrostowi żywotności kardiomiocytów. Skłoniło to do dalszych analiz właściwości fizykochemicznych wytworzonych mat nanowłóknistych. Pomiar kąta zwilżania (Tabela 3) wykazał, że po dodaniu nanocząstek magnetycznych maty stają się nieznacznie bardziej hydrofobowe, co początkowo mogłoby sugerować mniej korzystne warunki dla adhezji komórkowej. Jednak analiza potencjału zeta wykazała istotnie bardziej ujemny ładunek powierzchni w matach zawierających nanocząstki (44,7 mV) niż bez nanocząstek (40,2 mV). Taka zmiana ładunku może sprzyjać adhezji kardiomiocytów, gdyż komórki lepiej oddziałują z nieco bardziej anionową powierzchnią materiału. Obserwacje mikroskopowe potwierdziły ponadto, że intensywność fluorescencji włókien zawierających nanocząstki jest słabsza niż w przypadku mat kontrolnych. Ostatecznie stwierdzono, że otrzymane wyniki potwierdzają możliwość wykorzystania mat nanowłóknistych w dalszych etapach badań.



Rycina 23 A) Żywotność komórek HCM na poliuretanowych matach nanowłóknistych z nanocząstkami magnetycznymi (MNP) i bez nich, $n \geq 4$, gwiazdki oznaczają $p < 0,05$. B) Obrazy HCM w 1, 3 i 7 dniu hodowli na matach nanowłóknistych bez i z MNP. Różnicowe barwienie HCM za pomocą CAM (żywe komórki – zielone) i PI (martwe komórki – czerwone).

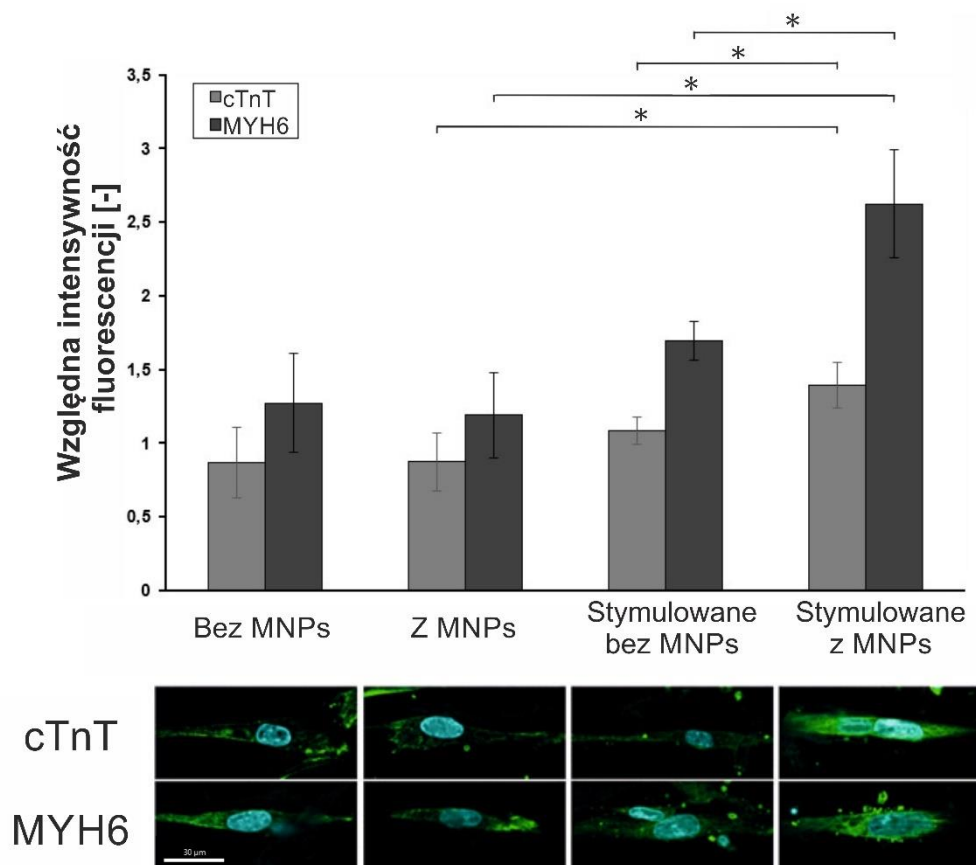
Tabela 3 Wartości powierzchniowego potencjału zeta i kąt zwilżania dla nanowłókien z dodatkiem i bez dodatku nanocząstek magnetycznych. Gwiazdki oznaczają $p < 0,05$.

	Powierzchniowy potencjał zeta [mV]	Kąt zwilżania [°]
PU	40,2±1,6*	128,22±1,17
PU + MNPs	44,7±1,3*	130,86±1,95

Dojrzewanie kardiomiocytów

W kolejnej części badań skupiono się na wpływie dziesięciodniowej stymulacji mechanicznej z wykorzystaniem zmiennego pola magnetycznego na kardiomiocyty (HCM) hodowane na matach nanowłóknistych. Założono, że zastosowanie mat nanowłóknistych z nanocząstkami magnetycznymi w połączeniu ze zmiennym polem magnetycznym wywoła deformację włókien, co w konsekwencji może nasilać proces dojrzewania komórek serca. W tym celu, przygotowano cztery typy hodowli komórek: na matach nanowłóknistych bez MNPs, matach nanowłóknistych bez MNPs poddanych stymulacji magnetycznej, matach nanowłóknistych z dodatkiem nanocząstek magnetycznych oraz matach nanowłóknistych z dodatkiem nanocząstek magnetycznych poddanych stymulacji magnetycznej. Komórki HCM hodowano przez dziesięć dni na wymienionych podłożach w warunkach opisanych wcześniej. Po upływie tego czasu przeprowadzono analizę dojrzewania komórek, ze szczególnym uwzględnieniem analizy białek charakterystycznych dla komórek serca (Troponiny T i MYH6). Uzyskane wyniki wskazały, że dodatek nanocząstek magnetycznych do mat nanowłóknistych nie wpływał w istotny sposób na wzrost poziomu białek, podobnie jak zastosowanie wyłącznie zmiennego pola magnetycznego w przypadku maty bez MNPs. Jednak zastosowanie mat nanowłóknistych z dodatkiem nanocząstek magnetycznych oraz zmiennego pola magnetycznego prowadziło do wyraźnego wzrostu poziomu Troponiny T (2,72 razy wyższa) oraz MYH6 (1,45 razy wyższa) w porównaniu do kontroli (hodowli na matach nanowłóknistych bez dodatku nanocząstek magnetycznych i zmiennego pola magnetycznego). Sugeruje to, że mechaniczna deformacja włókien wywołana stymulacją magnetyczną może przyspieszać dojrzewanie kardiomiocytów. Uzyskane warunki mogą w pewnym stopniu naśladować warunki *in vivo*, stymulując komórki do wzrostu poziomu białek ważnych w procesie formowania dojrzałych komórek serca. Wyniki ilościowe pomiarów przedstawiono na wykresie (Rycina 24), gdzie można zaobserwować zmiany w poziomie Troponiny T i MYH6

(kolor zielony) w komórkach hodowanych na omawianych matach nanowłóknistych w obecności lub braku zmiennego pola magnetycznego. Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, iż wykorzystanie magnetycznych mat nanowłóknistych oraz zmiennego pola magnetycznego może skutecznie indukować mechaniczne bodźce niezbędne do pobudzenia dojrzewania komórek a serca.



Rycina 24 Wyniki zmian poziomu w białek charakterystycznych dla komórek serca po 10-dniowych hodowlach na matach nanowłóknistych bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (MNP) po i bez zastosowania pola magnetycznego, $n \geq 4$, gwiazdki oznaczają $p < 0,05$. Barwienie: troponina T i MYH 6 (sprężone z Alexa Fluor 488 – komórki zielone). Hoechst 33342 – kolor niebieski. (Skala 30 μm).

9.1.4 Podsumowanie i dyskusja wyników

W ramach badań opisanych w powyższym rozdziale wytworzono maty nanowłókniste z poliuretanu (PU) metodą rodmuchu roztworu polimeru bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (Fe_3O_4). Głównym celem tej części rozprawy było uzyskanie materiałów wspierających wzrost kardiomiocytów oraz umożliwiających ich mechaniczną stymulację za pomocą zmiennego pola magnetycznego, co wpływać może na dojrzewanie komórek serca.

Istnieją prace, w których nanowłókna z dodatkiem nanocząstek magnetycznych były wykorzystywane jako podłoże do hodowli, m.in. komórek kostnych [132–134]. Jednak należy zaznaczyć, że większość prac, w których wykorzystywano materiały nanowłókniste była wytwarzana metodą elektroprzędzenia [135–141]. W niniejszych badaniach potwierdzono, że wprowadzenie nanocząstek magnetycznych do mat nanowłóknistych zwiększa żywotność komórek HCM po 7 dniach hodowli. Podobne wyniki uzyskano w hodowli prowadzonej na nanowłóknach, ale z zastosowaniem innych z linii komórkowych [67,142]. Potencjalną przyczyną wzrostu żywotności komórek może być lepsza penetracja białek w strukturę mat nanowłóknistych, indukowana m.in. zmianą wartości potencjału zeta (o 4,5 mV) i większą chropowatością powierzchni [143]. Zwiększona chropowatość powierzchni włókien zapewnia większą liczbę miejsc adhezji oraz adsorpcji białek [144]. To z kolei, sprzyjać może lepszemu adhezji kardiomiocytów do powierzchni mat. Dodatkową zaletą jest wyraźne obniżenie autofluorescencji mat nanowłóknistych po wprowadzeniu nanocząstek do ich struktury, co ułatwia m.in. obserwacje mikroskopowe. Opracowane materiały włókniste umożliwiały zastosowanie zmiennego pola magnetycznego do mechanicznej stymulacji komórek serca hodowanych na matach nanowłóknistych, poprzez odkształcenia mat. Zaobserwowano wzrost poziomu białek charakterystycznych dla serca (m.in., Troponiny T oraz MYH6) w hodowli prowadzonej na matach o właściwościach magnetycznych poddawanych stymulacji. Wskazywać to może na dojrzewanie komórek serca. Podsumowując, wytworzone maty nanowłókniste z dodatkiem nanocząstek magnetycznych stanowią obiecujące podłoże do hodowli i stymulacji kardiomiocytów. Możliwość indukowania cyklicznej deformacji włókien dzięki zastosowaniu zmiennego pola magnetycznego otwiera drogę do dalszych zastosowań opracowanych mat w badaniach nad komórkami serca. Warto podkreślić, że opracowane biomateriały stanowią modele *in vitro* wykorzystywane w badaniach nad nowymi lekami czy terapiami komórkowymi, lepiej naśladując naturalne warunki mikrośrodowiska serca. Wyniki przedstawione w ramach tego etapu badań stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego oraz publikacji naukowej w czasopiśmie Polymer Testing [145].

9.2 Mikrosystem do hodowli komórek serca oraz symulacji niedotlenienia

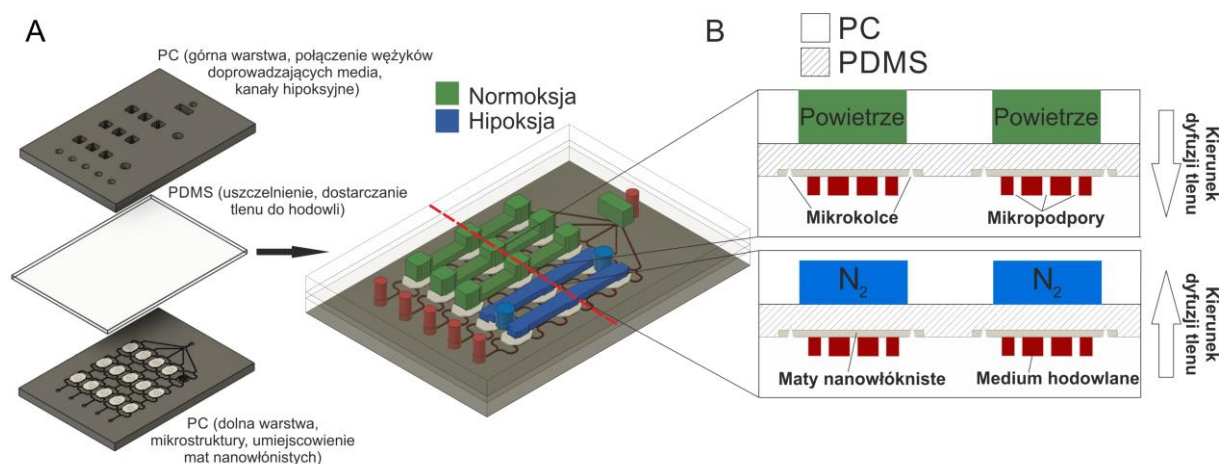
Jednym z kluczowych wyzwań w badaniach nad komórkami serca jest odtworzenie w warunkach *in vitro* natywnego mikrośrodowiska tkanki serca, w którym kardiomiocyty nie tylko otrzymują odpowiednie bodźce mechaniczne i biochemiczne, lecz także mogą być utrzymywane z ograniczonym dostępem tlenu. W poprzednim rozdziale skoncentrowano się na

wytworzeniu i charakteryzowaniu mat nanowłóknistych jako podłoża do hodowli kardiomiocytów. Wykazano, że właściwa topografia włókien, a także możliwość wykorzystania ich do mechanicznej stymulacji, mają istotne znaczenie dla wzrostu i dojrzewania komórek serca. Kolejnym etapem badań było opracowanie metodyki hodowli komórek serca w warunkach niedotlenienia (hipoksji), która odgrywa kluczową rolę w rozwoju wielu schorzeń układu sercowo-naczyniowego. W związku z tym, jako cel tego etapu badań postawiono wytworzenie mikrosystemu przepływowego, zintegrowanego z matami nanowłóknistymi z poliuretanu do hodowli kardiomiocytów i symulacji niedotlenienia. Wytworzono taki mikrosystem i przeprowadzono w nim hodowlę komórek serca w warunkach hipoksji oraz normoksji. W badaniach zastosowano szczurze kardiomioblasty (H9c2) oraz pierwotne ludzkie kardiomiocyty (HCM). Założono, że proponowane rozwiązanie pozwoli nie tylko na ocenę wpływu podłoża nanowłóknistych na komórki serca, lecz także na analizę wzrostu komórek serca w warunkach niedotlenienia. Zastosowanie nie tylko mat nanowłóknistych, ale również warunków przepływowych jako czynników wspomagających naśladowanie mikrośrodowiska tkanki serca, pozwolić może na uzyskanie modeli komórkowych zbliżonych do warunków *in vivo*.

9.2.1 Geometria mikrosystemu I

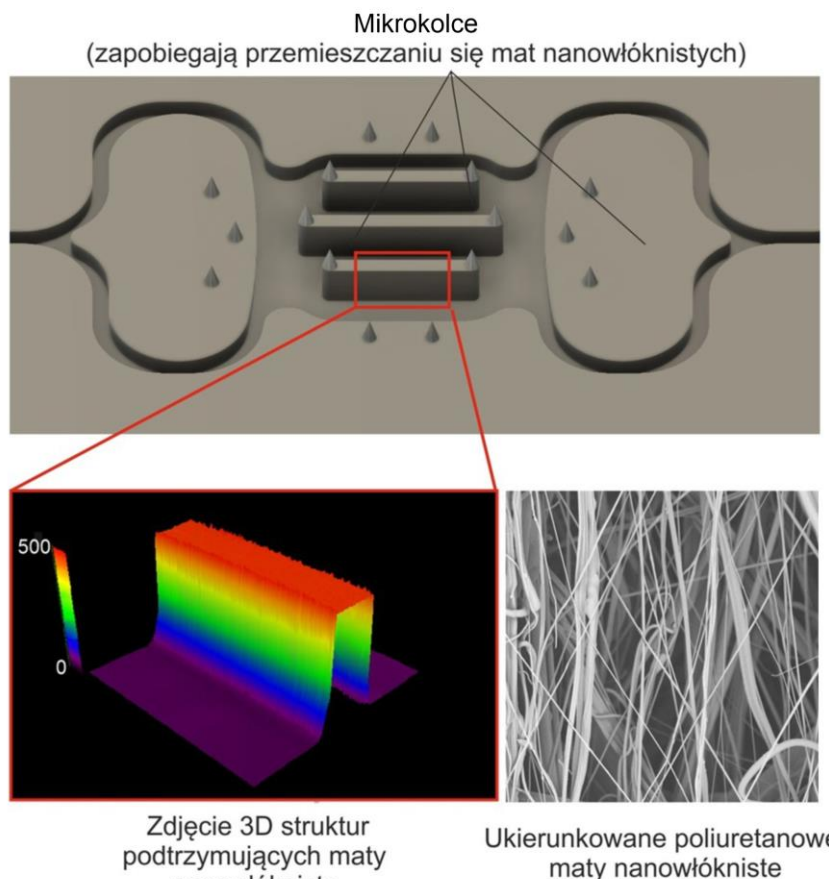
W pierwszym etapie zaprojektowano i wykonano mikrosystem o całkowitych wymiarach 66 mm x 96 mm x 11 mm. Mikrosystem składał się z trzech warstw: dolnej i górnej wykonanych z poliwęglanu (PC) oraz warstwy środkowej z PDMS (Rycina 25 A). Dolna warstwa PC zawiera pięć niezależnych mikrokanałów (każdy o szerokości 300 μm), z których w każdym są trzy mikrokomory hodowlane. W każdej mikrokomorze wykonano mikrokolce (14 sztuk) w kształcie stożków, o wysokości 1,68 mm i średnicy podstawy 1 mm. Umożliwiają one unieruchomienie mat nanowłóknistych i tym samym zapewniają komórkom miejsce do trójwymiarowego wzrostu. Dodatkowo, każda mikrokomora została tak zaprojektowana, aby komórki rozmieszczały się równomiernie na macie nanowłóknistej, czemu sprzyja również obecność trzech struktur (wysokość 500 μm) zapobiegających zapadaniu się mat nanowłóknistych (Rycina 26). Warstwa środkowa wykonana z PDMS, stanowi warstwę uszczelniającą oraz odpowiada za wymianę gazową w mikrosystemie. Górną warstwę z PC wyposażono natomiast w otwory, które w wybranych kolumnach kanałów pozwalają na kontakt z otoczeniem, utrzymując warunki normoksji, a w pozostałych stanowią połączenie dla wkręcanych szybkozłączek pneumatycznych (gwint M6), przez które wprowadzany był azot, wywołujący warunki niedotlenienia. Dzięki temu w jednym układzie możliwe było

jednoczesne prowadzenie hodowli komórek w strefie normoksji oraz w strefie hipoksji (Rycina 25 B). Tak zaprojektowana geometria mikrosystemu umożliwia także wprowadzenie zawiesiny komórkowej oraz pożywki hodowlanej przez niezależne wloty w każdym z pięciu mikrokanalów, a następnie odprowadzanie tych mediów do wspólnego wylotu. Na Rycinie 25 B przedstawiono zdjęcie wykonanego mikrosystemu I.

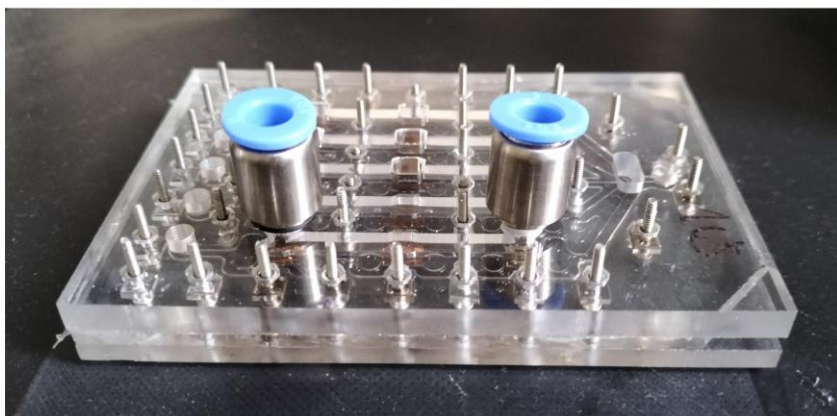


Rycina 25 A) Schemat mikrosystemu i składającego się z 3 warstw poliwęglan(PC), polidimetylosiloksan (PDMS) oraz poliwęglan (PC). B) Schemat mikrosytsemu i ilustrujący strefę hipoksji (niski poziom tlenu) i normoksji (21% - poziom tlenu).

A



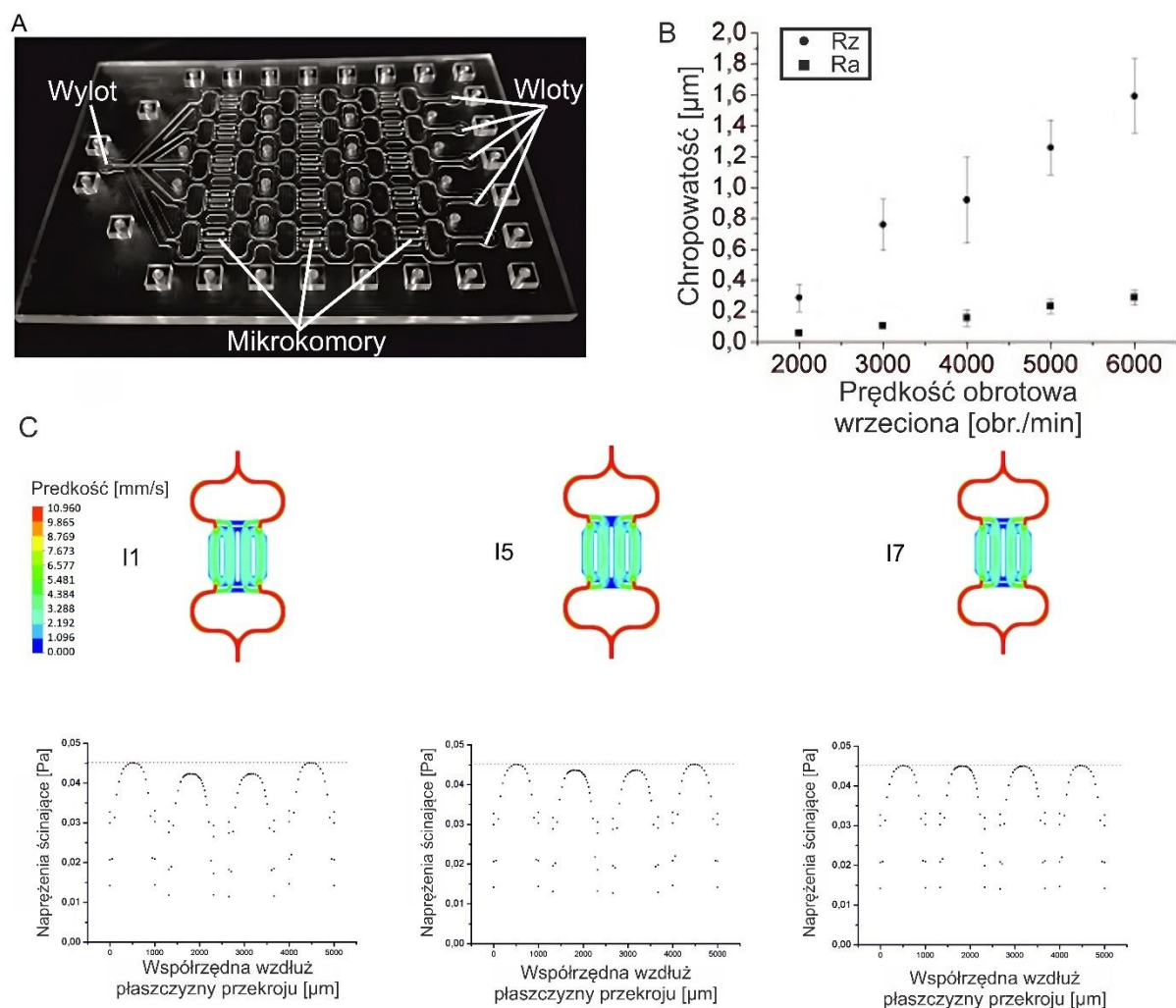
B



Rycina 26 A) Schemat mikrokomory hodowlanej w mikrosystemie I, z elementami takimi jak mikrokolce i struktury do umieszczenia poliuretanowych (PU) mat nanowłóknistych. B) Zdjęcie wykonanego mikrosystemu I.

Podczas opracowywania mikrosystemu zwrócono szczególną uwagę na dobór parametrów frezowania poliwęglanu, tak by ograniczyć chropowatość powierzchni i uzyskać dobrą szczelność całej konstrukcji. Badania w zakresie prędkości obrotowej wrzeciona (2000 – 6000 RPM) wykazały, że wyższe wartości podnoszą chropowatość powierzchni, co mogłoby utrudnić obserwacje mikroskopowe. Wybrano zatem prędkość 2000 RPM, która pozwalała osiągnąć chropowatość na poziomie $0,3 \mu\text{m}$ (Rycina 27 A, B). Gładka powierzchnia warstwy PC ułatwiała obserwację komórek rosnących w komorach hodowlanych oraz

ogranicza ryzyko uszkodzenia hodowli na skutek niepożądanych naprężeń mechanicznych. Ważnym etapem projektowania mikrosystemu było również dostosowanie warunków przepływu w mikrokomorach, tak by zapewnić możliwie równomierny rozkład komórek i naprężeń ścinających. W tym celu, wykonano modelowanie numeryczne z wykorzystaniem oprogramowania ANSYS (Rycina 27 C), które pomogło ustalić geometrię mikrokanałów i mikrokomór hodowlanych. Na podstawie symulacji numerycznej ustalono wymiary mikrokomór zapewniające równomierne rozprowadzenie zawiesiny komórkowej na maty nanowłókniste. Zaprojektowany rozkład mikrokomór jest kompatybilny z rozmieszczeniem dołków w standardowej płytce 96-dołkowej, co umożliwia wykonywanie pomiarów za pomocą czytnika płytek wielodołkowych bezpośrednio w opracowanym mikrosystemie.

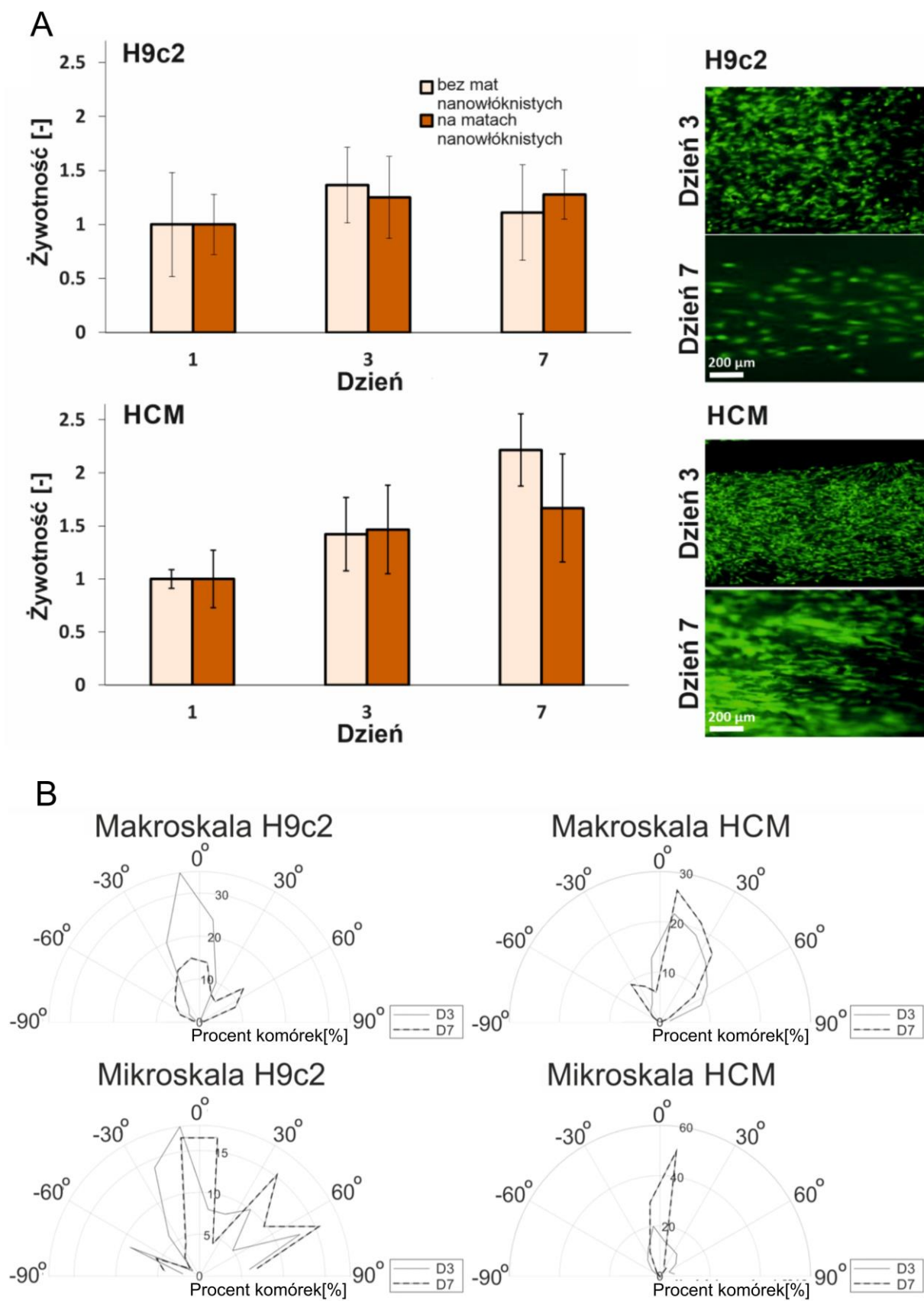


Rycina 27 A) Zdjęcie dolnej warstwy mikrosystemu przepływowego. B) Optymalizacja prędkości obrotowej wrzeciona. Zależność różnych prędkości wrzeciona od chropowatości powierzchni. Rz oznacza średnią pięciu najwyższych szczytów i najniższych dolin mierzonych na określonej długości, odzwierciedlając chropowatość powierzchni, podczas gdy Ra jest średnią arytmetyczną wartości bezwzględnych odchyleń profilu od linii średniej mierzonej na określonej długości, wskazując teksturę powierzchni. C) Numeryczna symulacja prędkości przepływu i naprężenia ścinającego w mikrokomorze hodowlanej (I 1-7- kolejne iteracje symulacji).

Tak wytworzony mikrosystem umożliwił prowadzenie hodowli komórek serca w warunkach niedotlenienia i normoksji. Dodatkowo, wykorzystanie mat nanowłóknistych jako trójwymiarowego podłoża i warunków przepływowych sprzyjać miało lepszemu odwzorowaniu warunków *in vivo*. Jednoczesne wytworzenie strefy normoksji i hipoksji (odpowiednio trzy oraz dwa kanały) w jednej konstrukcji mikrosystemu umożliwić miało porównanie w czasie rzeczywistym wpływu warunków hodowli na żywotność oraz aktywność komórek serca. Kontrolowana wymiana gazowa i precyzyjnie dobrana geometria mikrostruktur zapewniać miały stabilne warunki hodowli, co w dalszych etapach badań było potwierdzone.

9.2.2 Hodowla komórek serca w mikrosystemie I

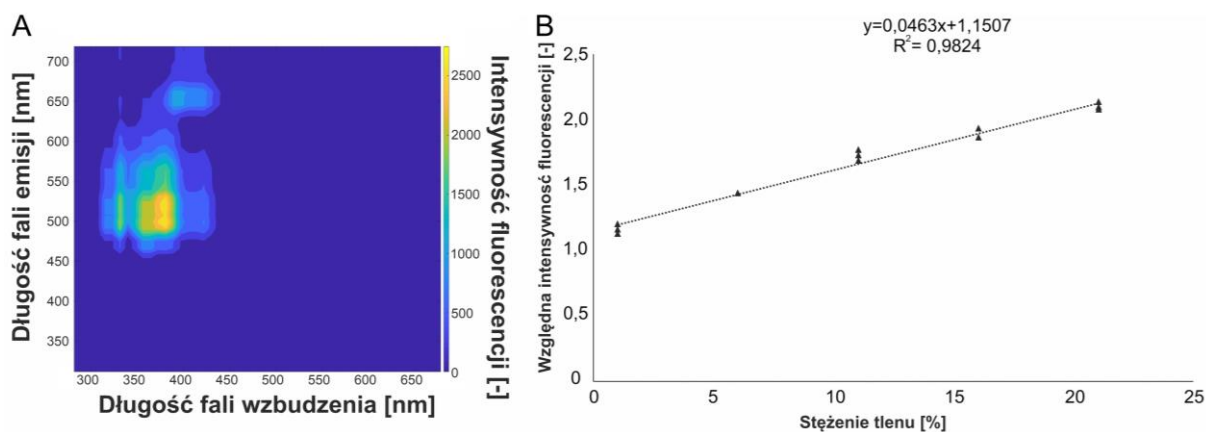
W opracowanym mikrosystemie I przeprowadzono wielodniową hodowlę komórek serca H9c2 oraz HCM. Analizowano żywotność i morfologię komórek hodowanych w mikrosystemie I w mikrokomorach zarówno bez jak i z matami nanowłóknistymi z poliuretanu (PU). Wykazano wysoką żywotność zarówno komórek H9c2, jak i HCM do siódmego dnia hodowli (Rycina 28 A). Dzięki temu potwierdzono, że maty nanowłókniste oraz dynamiczne warunki hodowli nie wywołują negatywnego wpływu na żywotność komórek. Dodatkowo, obserwowano zmianę morfologii komórek hodowanych w mikrokomorach z matami nanowłóknistymi. Komórki miały wydłużony, wrzecionowaty kształt, typowy dla komórek mięśniowych (Rycina 28 A). Ponadto zaobserwowano, że obecność mat nanowłóknistych w połączeniu z przepływowymi warunkami hodowli w mikrosystemie I, w istotny sposób wpłynęła na ułożenie komórek HCM. W mikrokomorach hodowanych z matami nanowłóknistymi komórki rosły równolegle ułożone względem siebie oraz nanowłókien tworzących maty nanowłókniste. Procent komórek ułożonych równolegle (w zakresie -15° do 15°) wzrósł w ciągu 7 dni z ok. 33% do ponad 70% (Rycina 28 B). Taka organizacja komórek jest szczególnie korzystna, ze względu na to, że w tkance serca przestrzenne ułożenie kardiomiocytów warunkuje prawidłową komunikację komórkową i przepływ sygnałów. Tak wyraźny wzrost ukierunkowania nie został zaobserwowany w hodowli prowadzonej w makroskali po 3 oraz 7 dniach, procent komórek ułożonych równolegle wynosił ok. 33%. Z kolei komórki H9c2 nie wykazywały tak wyraźnego uporządkowania. Sugerować to może, że komórki HCM, o dojrzałym fenotypie, chętniej wzrastają w sposób uporządkowany. A warunki hodowli zapewnione w mikrosystemie zintegrowanym z matami nanowłóknistymi temu sprzyjają. Podsumowując, wyniki jednoznacznie wskazują, że mikrosystem zintegrowany z matami nanowłóknistymi z PU zapewnia długotrwałe utrzymanie wysokiej żywotności komórek serca oraz sprzyja bardziej fizjologicznemu ułożeniu kardiomiocytów. W związku z tym, w kolejnych etapach badań wykorzystywano mikrosystem do analizy wpływu hipoksji na komórki serca.



Rycina 28 A) Żywotność komórek H9c2 i HCM hodowanych w mikrosystemie I. Barwienie komórek H9c2 i HCM za pomocą testu CAM/PI. Żywe komórki (kolor zielony), czerwone komórki (kolor czerwony) B) Ułożenie komórek H9c2 i HCM hodowanych w mikrosystemie zintegrowanym z matami nanowłóknistymi. Kierunek wzrostu komórek określono, przyjmując orientację nanowłókien jako 0°.

9.2.3 Ocena warunków niedotlenienia w mikrosystemie I

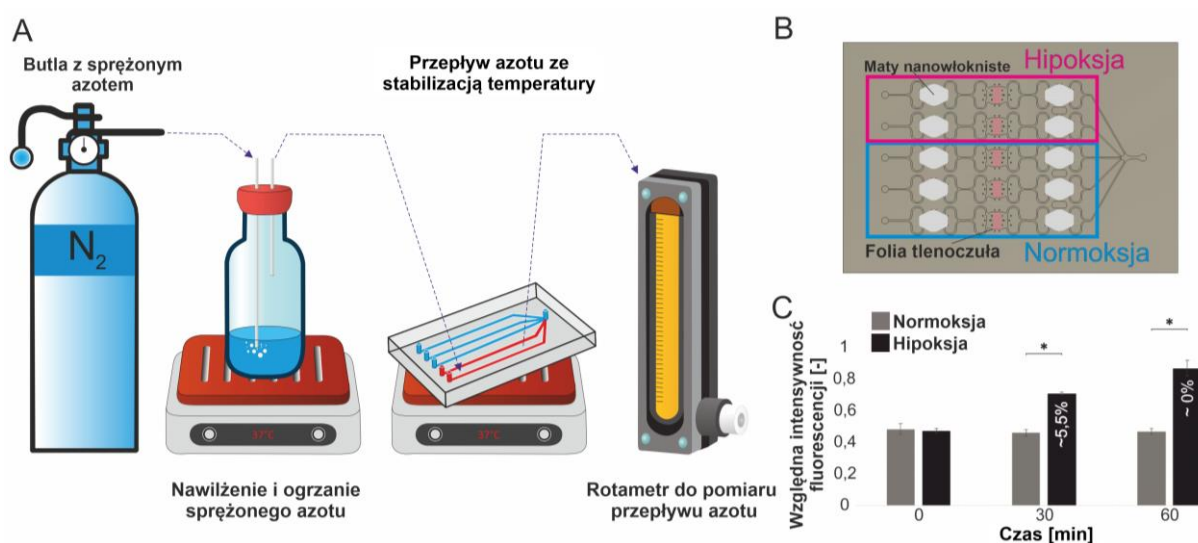
W kolejnym etapie badań, mikrosystem I został wykorzystany do uzyskania w nim warunków hipoksji. W tym celu, wykorzystano folie tlenoczułe (PtTFPP, ang. *platinum(II) meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin*), które umożliwiają monitorowanie dynamiki zmian stężenia tlenu dzięki pomiarowi intensywności fluorescencji. W pierwszym etapie przygotowano dwuwymiarową mapę intensywności fluorescencji, co pozwoliło ustalić maksima fluorescencji i dobrać optymalne długości fal wzbudzenia oraz emisji (Rycina 29 A). Następnie, w oparciu o wyznaczone piki ze wspomnianej mapy 2D, przystąpiono do kalibracji folii tlenoczułych. Tak jak opisano w metodyce pracy, folię umieszczano pomiędzy dwiema warstwami PDMS, każda o grubości 5 mm. Zastosowanie takiej grubości warstwy PDMS zapewniało odpowiednią dyfuzję tlenu, co pozwalało przeprowadzać pomiary do 10 min po wyjęciu próbki z kontrolowanej atmosfery. Tak przygotowane warstwy PDMS, z umieszczonymi pomiędzy nimi w foliami tlenoczułymi, inkubowano w komorze hipoksyjnej przez 24 h w pięciu różnych stężeniach tlenu: 1%, 6%, 11%, 16% oraz 21%. Umożliwiło to uzyskanie krzywej kalibracyjnej, opisującej zależność intensywności fluorescencji od stężenia tlenu ($R^2 = 0,9824$) (Rycina 29 B).



Rycina 29 A) Widmo wzbudzeniowo-emisyjne folii tlenoczułej, z pomiarami przeprowadzonymi w zakresie długości fal wzbudzenia od 300 do 670 nm i długości fal emisji od 330 do 700 nm. B) Krzywa kalibracyjna dla folii tlenoczułej.

Po zakończeniu etapu kalibracji wykonano eksperyment, umożliwiający uzyskanie warunków niedotlenienia w opracowanym mikrosystemie I. Zestaw hipoksyjny składał się z butli ze sprężonym azotem, węża doprowadzającego azot, nawilzacza powietrza z płytą grzejną, płyty grzewczej z umieszczonym na niej mikrosystemem oraz rotametu

kontrolującego przepływ azotu (Rycina 30 A). Tak skonfigurowany zestaw pozwalał na wytworzenie w mikrosystemie strefy hipoksji i normoksji (Rycina 30 B). Przepływ azotu przez wybraną strefę mikrosystemu powodował obniżeniem stężenia tlenu do ok. 5% w ciągu 30 min, a po kolejnych 30 min niemal do 0% (Rycina 30 C). Równocześnie, w strefie normoksji nie dochodziło do zmian zawartości tlenu, co potwierdza możliwość prowadzenia w mikrosystemie I jednoczesnej hodowli w różnych warunkach natlenienia.



Rycina 30 A) Schemat skonstruowanego zestawu do hipoksji, w tym butla z azotem (1), nawilżacz z grzejną płytą (2), grzejna płyta z termostatem (3) oraz rotametr (4). B) Schemat mikrosystemu i oraz metoda umieszczania folii tlenoczułej. C) Wykres pokazujący zmianę stężenia tlenu w mikrosystemie I w funkcji czasu.

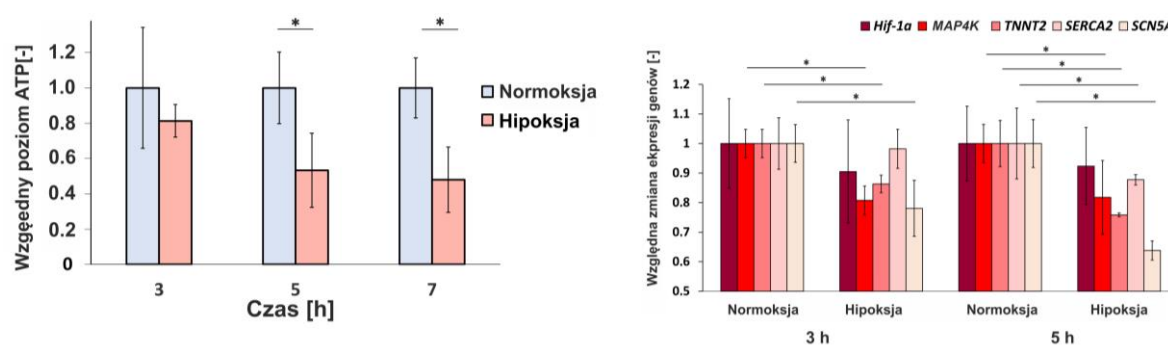
Przeprowadzona kalibracja folii tlenoczułych i zastosowanie kontrolowanego przepływu azotu przez mikrosystem potwierdził możliwość obniżenia stężenia tlenu do wartości niemalże zerowej w wybranych strefach mikrosystemu. Dodatkowo, precyzyjne monitorowanie intensywności fluorescencji daje wiarygodne dane na temat zmian stężenia tlenu w mikrosystemie w czasie. Taka kontrola pozwalała na jednoczesne prowadzenie hodowli w strefie normoksji i hipoksji. W kolejnych etapach badań sprawdzono wpływ warunków hipoksji na komórki serca hodowane w mikroukładzie.

9.2.4 Badanie wpływu warunków niedotlenienia na komórki serca hodowane w mikrosystemie I

Opisany w poprzednim podrozdziale zestaw do hipoksji posłużył do badań z wykorzystaniem materiału komórkowego. W badaniach zastosowano komórki HCM, które

wysiano w mikrosystemie I. Następnie, poddano je hodowli w warunkach niedotlenienia przez 3, 5 oraz 7 h. Analiza poziomu ATP (Rycina 31 A) pokazała, że po 3 h hipoksji nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy w ilości ATP w porównaniu z kontrolą (warunki normoksji). Natomiast po 5 i 7 h hodowli komórek w warunkach niedotlenienia zaobserwowano wyraźny spadek ilości ATP, odpowiednio o 47% i 52% w stosunku do kontroli. Ponieważ ATP jest kluczowe w wielu procesach życiowych m.in. w transporcie jonów, syntezie białek oraz regulacji skurczu, jego spadek może powodować zaburzenia tych funkcji. W przypadku komórek serca może to powodować arytmie czy niewydolność serca. Dlatego też badania, które wyjaśniają wpływ niedotlenienia na komórki serca oraz opracowanie narzędzi wykorzystywanych do tego typu badań, mają istotne znaczenie.

Przeprowadzono również analizę ekspresji wybranych genów tj. *MAP4K*, *TNNT2*, *SERCA* i *SCN5A* (Rycina 31 B). *MAP4K* uczestniczy w regulacji stresu oksydacyjnego, *TNNT2* odpowiada za generowanie siły skurczu mięśnia sercowego, *SERCA* odgrywa kluczową rolę w recyrkulacji i magazynowaniu jonów wapnia, a *SCN5A* reguluje pracę kanałów sodowych w komórkach mięśnia sercowego, wpływając na rytm serca. Zaobserwowano spadek ekspresji tych genów po 5 h hodowli w warunkach niedotlenienia. Obniżenie ekspresji tych genów może wywoływać niepożądane zmiany funkcjonowania kardiomiocytów. Uzyskane wyniki potwierdzają, że opracowany mikrosystem skutecznie odtwarza warunki niedotlenienia, prowadząc zarówno do spadku poziomu ATP, jak i zaburzeń ekspresji genów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania mięśnia sercowego. Tym samym stanowi wartościowy model do badania stanów patologicznych kardiomiocytów *in vitro*.



Rycina 31 A) Zmiany względnego poziomu ATP po 3, 5 i 7 h hodowli komórek w mikrosystemie warunkach niedotlenienia oraz normoksji. B) Zmiana ekspresji genów po 3 i 5 h niedotlenienia $n > 5$, $p < 0,05$.

9.2.5 Podsumowanie i dyskusja wyników

W ramach tego etapu badań z powodzeniem zaprojektowano i wytworzono mikrosystem I, umożliwiający jednoczesną hodowlę komórek serca zarówno w warunkach normoksji jak

i hipoksji. W literaturze wyróżnia się kilka typów hipoksji (m.in. hipoksja hipoksemiczna, anemiczna czy cytotoksyczna), z których każda charakteryzuje się odmiennym wpływem na tkanki – dlatego tak istotne jest precyzyjne odwzorowanie warunków *in vitro* [146,147]. Klasyczne komory hipoksyjne lub modele zwierzęce nie zapewniają możliwości prowadzenia równoległych hodowli w warunkach normoksji i hipoksji przy zachowaniu stabilnych parametrów pH i temperatury [148]. Opracowany mikrosystem przepływowy umożliwia to przy użyciu wyłącznie kontrolowanego przepływu azotu, co znacząco ogranicza rozmiary aparatury względem tradycyjnych rozwiązań [111,149]. Możliwe było równoczesne badanie hodowli komórek w mikrosystemie zintegrowanym z matami nanowłóknistymi. Wykazano że, zastosowanie mat nanowłóknistych z PU, nie tylko zapewnia trójwymiarowy wzrost komórek HCM, ale też znacząco poprawiało ich organizację (równoległe ułożenie względem siebie) [63,150]. Dzięki integracji folii tlenoczułych i zestawowi do kontrolowanego przepływu azotu uzyskano możliwość symulacji warunków niedotlenienia. Stężenie tlenu w obrębie wybranych kanałów spadało niemal do zera w ciągu godziny, pozwalając na równoległe prowadzenie hodowli w warunkach normoksji i hipoksji. Warto podkreślić, że choć w praktyce laboratoryjnej hipoksję często indukuje się chemicznie (np. chlorkiem kobaltu(II) [151]), fizyczna redukcja stężenia tlenu zastosowana w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, lepiej odtwarza realne warunki niedotlenienia mięśnia sercowego [152,153]. Pomiary zmian poziomu ATP, a także ekspresji genów kluczowych dla funkcjonowania kardiomiocytów, potwierdziły, że niedotlenienie wywołuje wyraźne zaburzenia metaboliczne i molekularne, co czyni opracowany mikrosystem cenną platformą badawczą do wczesnego odwzorowania procesów chorobowych mięśnia sercowego. Obserwowane obniżenie ATP koreluje z doniesieniami o dysfunkcji mitochondrialnej kardiomiocytów w warunkach hipoksji [154]. Ponadto, zmiany ekspresji genów *MAP4K*, *TNNT2*, *SERCA* i *SCN5A* potwierdzają zaburzenia w regulacji stresu oksydacyjnego, sile skurczu, gospodarce wapniowej i przewodnictwie elektrycznym. Otrzymane wyniki w dużej mierze potwierdziły wcześniejsze założenia, wskazując przy tym, że możliwość dynamicznej kontroli zarówno warunków przepływowych jak i stężenia tlenu, w połączeniu z wykorzystaniem mat nanowłóknistych, stwarza warunki dobrze odwzorowujące warunki *in vivo*. Jednocześnie nie stwierdzono żadnych niepożądanych efektów hamujących wzrost czy funkcjonowanie kardiomiocytów, co oznacza, że mikrosystem wraz z matami nanowłóknistymi może być z powodzeniem stosowany jako narzędzie do prowadzenia dalszych badań nad modelowaniem schorzeń układu sercowo-naczyniowego czy testowaniem nowych terapii. Wyniki przedstawione w ramach tego etapu badań stały się

przedmiotem zgłoszenia patentowego oraz publikacji naukowej w czasopiśmie *Sensors and Actuators B: Chemical* [155].

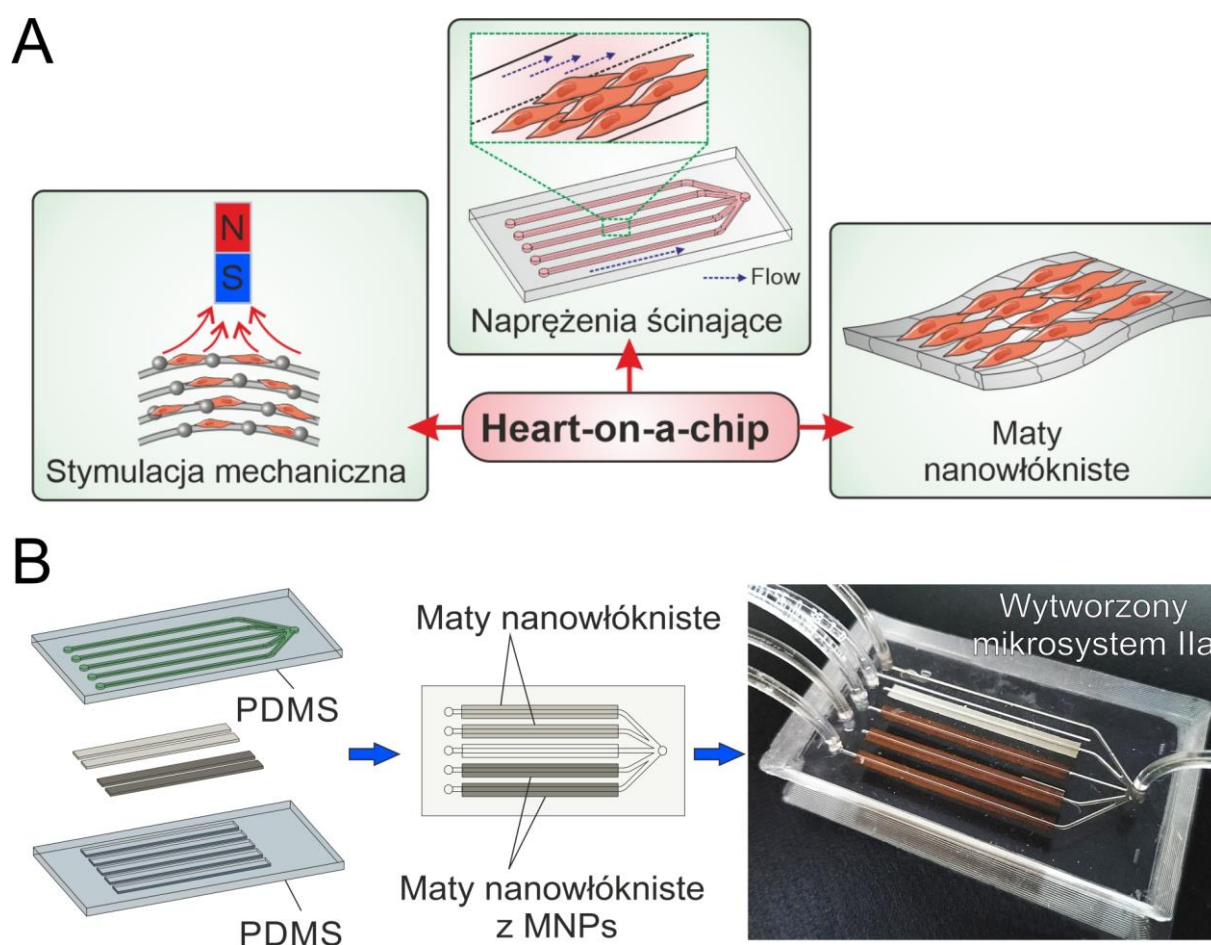
9.3 Opracowanie mikrosystemu do stymulacji mechanicznej

W celu wiernego odwzorowania warunków *in vivo*, konieczne jest uwzględnienie różnych czynników fizykochemicznych. W poprzednich badaniach wykazano między innymi, że stymulacja mechaniczna z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego oraz mat magnetycznych, może istotnie wpływać na żywotność i dojrzewanie komórek serca [145]. Dodatkowo, w badaniach własnych prezentowanych w poprzednim rozdziale, ale również w literaturze wykazano, że warunki przepływowe wpływają na organizację oraz morfologię komórek serca [156]. Dlatego też, celem kolejnego etapu badań było połączenie powyższych czynników w hodowlach komórek serca, tzn. zastosowanie magnetycznych mat oraz warunków dynamicznych hodowli. Założono, że integracja tych dwóch czynników, tzn. mat nanowłóknistych o właściwościach magnetycznych i mikrosystemu, umożliwi uzyskanie bardziej złożonego modelu komórkowego, w którym możliwe będzie prowadzenie stymulacji komórek poprzez zastosowanie w warunkach przepływowych, nie tylko czynnika strukturalnego, ale także mechanicznego. W efekcie przyczynić się to może do pełniejszego odtworzenia fizjologicznego mikrośrodowiska tkanki serca.

9.3.1 Opracowanie mikrosystemu II a zintegrowanego z matami nanowłóknistymi o właściwościach magnetycznych

Opracowany system *Heart-on-a-Chip*, zintegrowany z matami nanowłóknistymi o właściwościach magnetycznych, powstał w odpowiedzi na potrzebę jak najwierniejszego odtworzenia warunków *in vivo* w hodowli kardiomiocytów. Wcześniejsze prace badawcze z wykorzystaniem mat nanowłóknistych wykazały, że równoległy układ nanowłókien sprzyja również równoległemu ułożeniu komórek oraz ich przestrzennej organizacji, co może naśladować macierz zewnątrzkomórkową (ECM). Ponadto, zastosowanie nanocząstek w matach nanowłóknistych pozwala na dodatkową mechaniczną stymulację komórek pod wpływem zewnętrznego, zmiennego pola magnetycznego (Rycina 32 A). Mikrosystem II a składał się z pięciu równoległych mikrokanałów, co umożliwia uzyskanie różnych warunków hodowli w tym samym mikrosystemie. Dzięki takiej geometrii możliwe jest porównanie wpływu różnych czynników i warunków hodowli na dojrzewanie oraz funkcjonowanie kardiomiocytów w jednym mikrosystemie. W kolejnych etapach badań możliwe jest

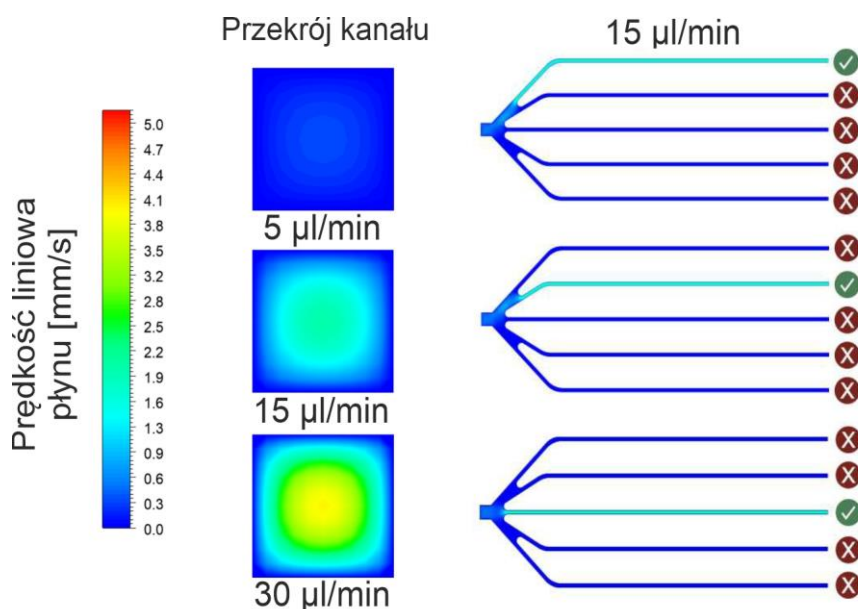
prorowadzenie współhodowli z komórkami macierzystymi. Mikrosystem II a złożony był z dwóch warstw poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), w których mikrostruktury otrzymano z wykorzystaniem metody odlewu, w pieczęcie frezowanej w polimetakrylanie metylu (PMMA). Górna warstwa, o wymiarach 30 mm × 59 mm × 5 mm, zawiera pięć mikrokanalów o wysokości 500 μm i szerokości 500 μm. Mikrokanaly posiadały otwór wlotowy (średnica 1,5 mm) oraz pięć otworów wylotowych (każdy o średnicy 1,5 mm). Dolna warstwa z kolei zawierała pięć prostokątnych mikrokomór do umieszczania mat nanowłóknistych (3 mm × 35 mm) (Rycina 32 B). Założono, iż tak skonstruowany mikrosystem zapewni równomierny przepływ pożywki oraz integrację mat nanowłóknistych z i bez dodatku nanocząstek magnetycznych.



Rycina 32 A) Schemat ukazujący wybrane możliwości symulacji warunków w mikrosystemach przepływowych B) Schemat oraz zdjęcie mikrosystemu II a: górna i dolna warstwa PDMS wraz z matami nanowłóknistymi.

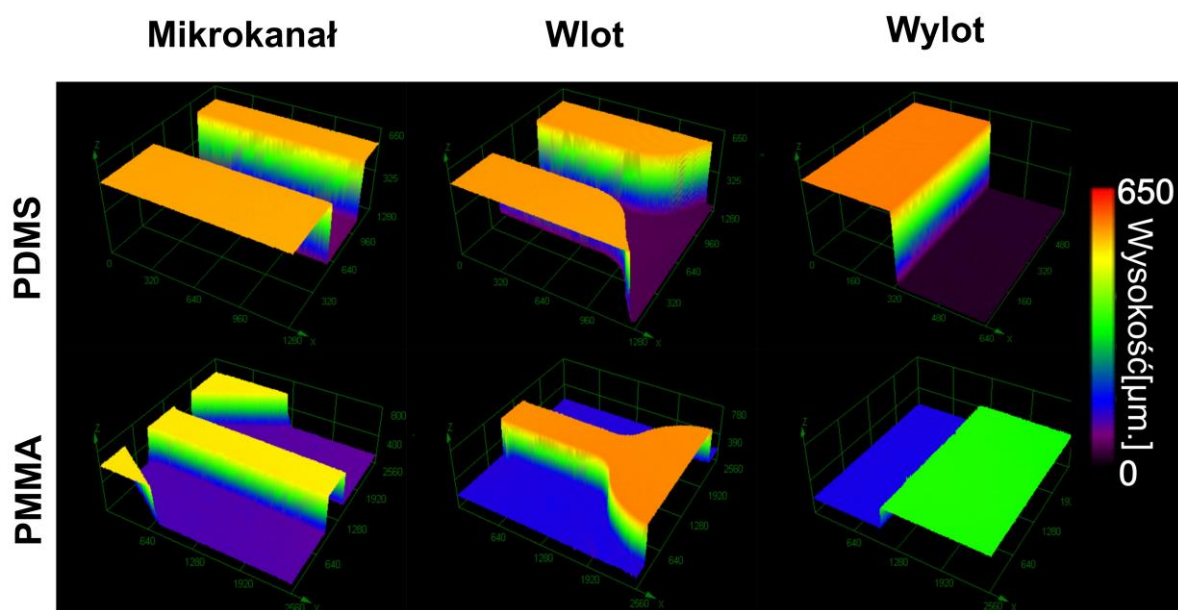
W kolejnym etapie badań, w celu doboru warunków hodowli oraz określenia rozkładu prędkości i naprężeń ścinających w mikrostrukturach systemu, wykonano symulacje komputerowe z wykorzystaniem oprogramowania ANSYS dla wartości przepływu równym

5, 15 i 30 $\mu\text{l/min}$. Naprężenia ścinające wynosiły odpowiednio 0,004 Pa, 0,019 Pa i 0,037 Pa (Rycina 33). Do dalszych badań wybrano prędkość przepływu równą 15 $\mu\text{l/min}$, ponieważ zapewniało to równomierny przepływ medium przez mikrokanały i jednocześnie nie wywoływał wysokiego naprężenia ścinającego, które mogłoby mieć negatywny wpływ na hodowane komórki.



Rycina 33 Symulacje przepływu pokazujące rozkład medium w mikrosystemie II a dla różnych prędkości przepływu (5, 15 i 30 $\mu\text{l/min}$) (po lewej) i rozkład medium w mikrokanalach dla prędkości przepływu 15 $\mu\text{l/min}$ (po prawej).

Następnie, za pomocą laserowej mikroskopii konfokalnej LEXT, zbadano zgodność zaprojektowanych wymiarów i wykonanych mikrostruktur. Mierzono zarówno mikrostruktury (tj. wysokość i szerokość mikrokanalów na wlocie oraz wylocie oraz wysokość i szerokość mikrokomór) w wykonanej pieczęcie PMMA oraz w uzyskanych warstwach PDMS. W każdym przypadku zaobserwowano jedynie niewielkie odchylenia od zaprojektowanych wymiarów mikrostruktur, potwierdzając wysoką dokładność procesu ich wytwarzania. Zaprojektowana wysokość mikrokanalu wynosiła 500 μm , podczas gdy wymiary mikrostruktur w pieczęcie PMMA i warstwy PDMS wyniosły odpowiednio $483 \pm 3 \mu\text{m}$ i $476,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Podobnie, niewielkie zmiany uzyskano w przypadku szerokości mikrokanalu. Wymiary wynosiły odpowiednio 500 μm , $506,4 \pm 3,8 \mu\text{m}$ i $500,1 \pm 2,6 \mu\text{m}$, dla projektu, pieczętki PMMA i warstwy PDMS (Rycina 34). W Tabeli 4 przedstawiono szczegółowe porównanie wymiarów zaprojektowanych mikrostruktur z odwzorowanymi w pieczęcie PMMA i warstwie PDMS. Uzyskane wyniki świadczą o dużej powtarzalności i wysokiej jakości wybranej metody wytwarzania mikrostruktur.



Rycina 34. Zdjęcia (wykonane przy użyciu konfokalnego mikroskopu laserowego LEXT) ilustrujące odwzorowanie mikrostruktur pomiędzy pieczętką PMMA a PDMS

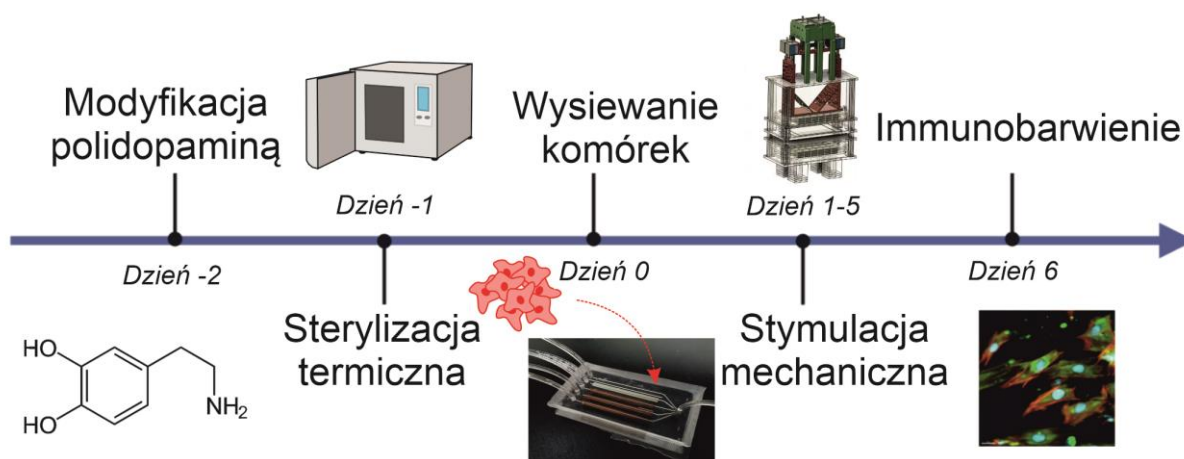
Tabela 4 Wymiary wytworzonych mikrostruktur w pieczętce PMMA i PDMS. $N \geq 5$.

Wymiar	Projekt [μm]	Pieczętka PMMA [μm]	PDMS [μm]
wysokość mikrokanalu – wlot	500	483 ± 3	476.5 ± 0.3
wysokość mikrokanalu – wylot	500	505 ± 2	496 ± 2
szerokość mikrokanalu – wlot	500	506 ± 4	500 ± 3
szerokość mikrokanalu – wylot	500	510 ± 4	500 ± 1
wysokość mikrokomory	300	298 ± 2	294.3 ± 0.8
szerokość mikrokomory	3000	3000 ± 8	2979 ± 8

9.3.2 Dobór warunków hodowli komórek w mikrosystemie II a

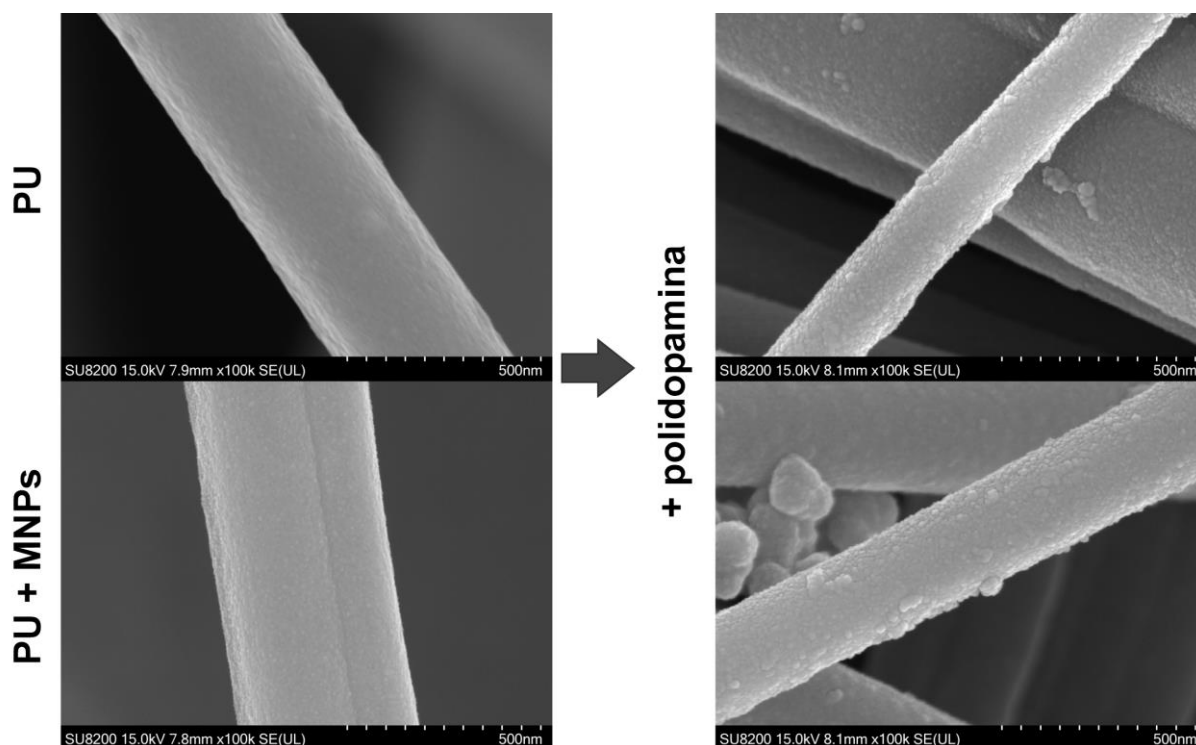
W kolejnym etapie prac przeprowadzono hodowlę komórek w opracowanym mikrosystemie II a. Na Rycina 35 przedstawiono schemat przeprowadzenia eksperymentu mającego na celu analizę wpływu warunków dynamicznych, strukturalnych oraz mechanicznych na wzrost i dojrzewanie kardiomiocytów. W pierwszym etapie przeprowadzono modyfikację mat nanowłóknistych roztworem polidopaminy o stężeniu 2 mg/ml w buforze

Tris-HCl o pH 8,5. Następnie przeprowadzono kolejno sterylizację termiczną, wysiewanie komórek, stymulację mechaniczną oraz finalnie analizę hodowli komórkowej. Badano w jaki sposób modyfikacja roztworem polidopaminy wpływa na właściwości mat nanowłóknistych. Ponadto, dobrano odpowiedni czas wysiewania komórek w mikrosystemie II a.



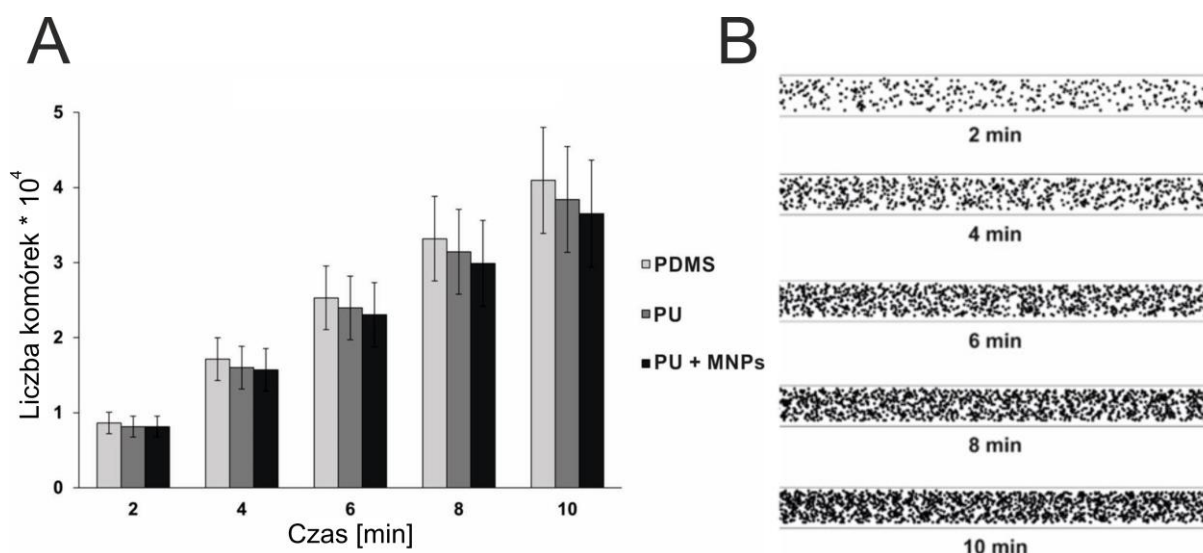
Rycina 35 Schemat przedstawiający kolejne etapy eksperymentów przeprowadzonych w mikrosystemie II a.

Modyfikacja roztworem polidopaminy została wybrana ze względu na właściwości polidopaminy, które zwiększają hydrofilowość powierzchni, dzięki czemu poprawiają adhezję komórek. W celu oceny zmian morfologicznych i fizykochemicznych mat nanowłóknistych po modyfikacji roztworem polidopaminy zastosowano skaningowy transmisyjny mikroskop elektronowy Hitachi SU8230. W tym celu, próbki wysuszono i pokryto 10-nanometrową warstwą Au-Pd, po czym wykonano 8–10 obrazów dla każdej z nich przy przyspieszającym napięciu 15,0 kV i powiększeniu 100 000×. Analiza SEM wykazała wyraźną zmianę struktury powierzchni mat po inkubacji z roztworem polidopaminy. Przeprowadzona modyfikacja wpłynęła na wzrost chropowatości i zmianę właściwości fizykochemicznych mat nanowłóknistych (Rycina 36).



Rycina 36 Zdjęcia z mikroskopu SEM przedstawiające zmiany powierzchni mat nanowłóknistych z i bez dodatku nanocząstek magnetycznych po modyfikacji roztworem polidopaminy.

W kolejnym etapie badań określono czas, niezbędny do wysiania komórek w mikrosystemie II a. Zastosowano gęstość komórkową wysiewania 3×10^5 komórek/ml. W trakcie wprowadzania komórek do mikrosystemu II a kontrolowano liczbę komórek na wylocie z mikrosystemu co 2 min. Miało to na celu ocenę liczby komórek, które pozostały na powierzchni maty nanowłóknistej wewnątrz mikrokanalu. Finalnie wykazano, że w trakcie wprowadzania komórek uzyskiwano w mikrokanale gęstość komórek równą $8,8 \times 10^4$ komórek/cm² po 2 min. (Rycina 37 A). Gęstość ta odpowiada gęstości powierzchniowej w hodowli komórek w klasycznych płytkach wielodołkowych. Ponadto, przeprowadzone symulacje numeryczne w programie ANSYS (Rysunek 36 B) wskazują, iż wprowadzanie komórek przez 4, 6, 8 i 10 min może prowadzić do nadmiernego zagęszczenia komórek, co z kolei może wpływać na ich obumieranie z powodu ograniczonego dostępu składników odżywczych. W ramach tego etapu badań potwierdzono, że modyfikacja mat nanowłóknistych roztworem polidopaminy efektywnie zwiększa ich chropowatość, a dobrany czas wprowadzania komórek zapewnia odpowiednią gęstość powierzchniową komórek. Wyniki te stanowiły istotną podstawę do kolejnych etapów badań, w których analizowano wzrost komórek serca poddawanych działaniu stymulacji mechanicznej w mikrosystemie II a.

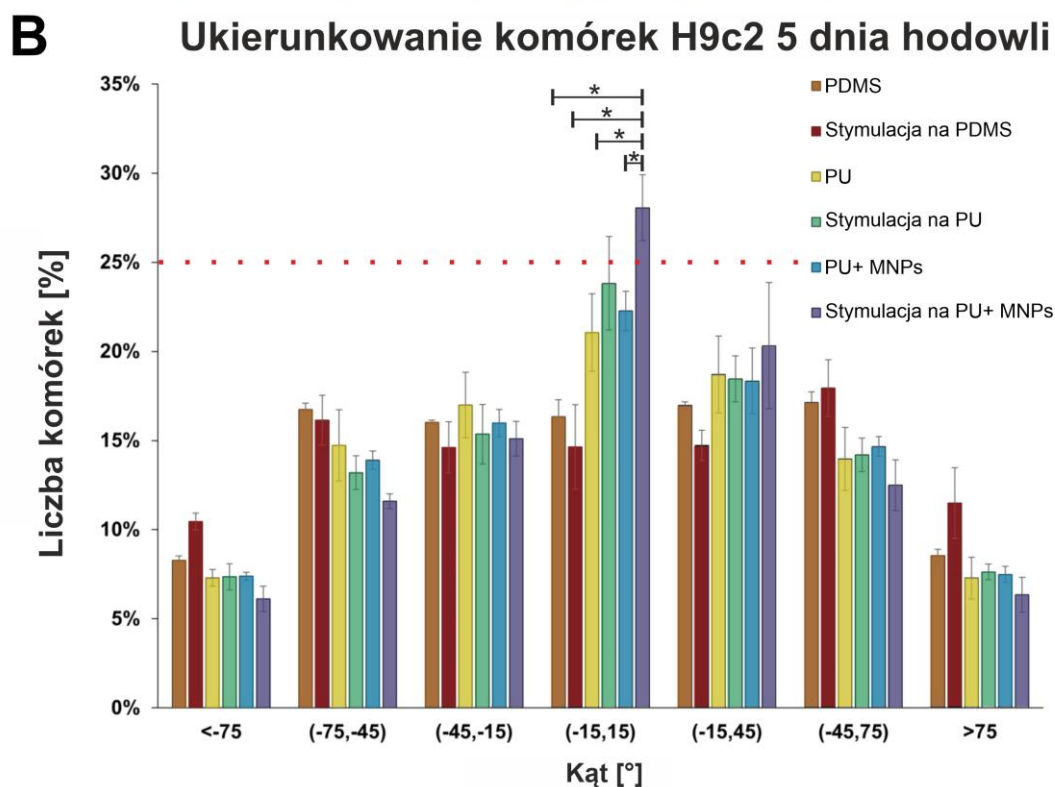
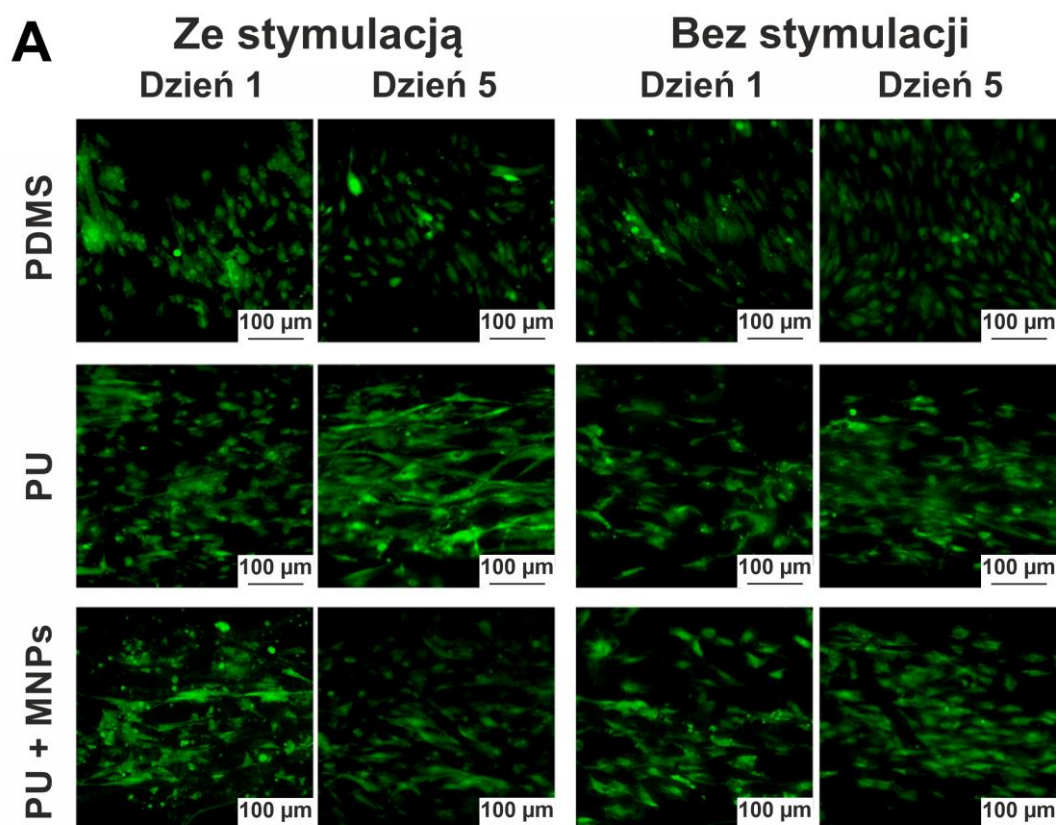


Rycina 37 A) Wykres przedstawiający zmianę liczby komórek w mikrokanale w zależności od czasu wprowadzenia komórek. B) Wyniki symulacji numerycznej (ANSYS) pokazującą rozkład komórek w mikrokanale dla różnych czasów wprowadzania komórek do mikrosystemu.

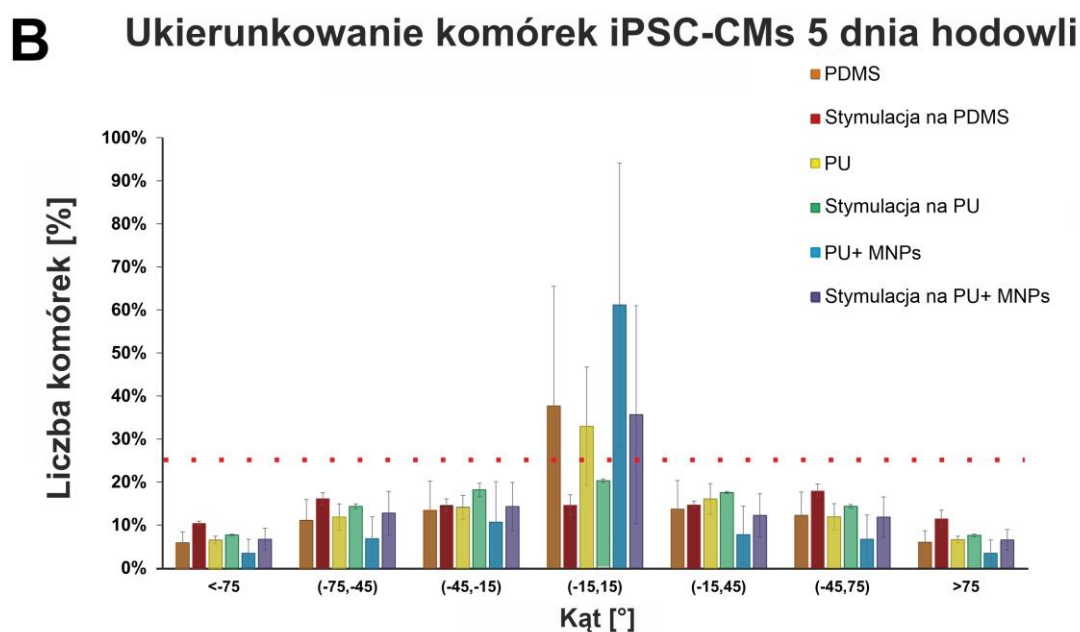
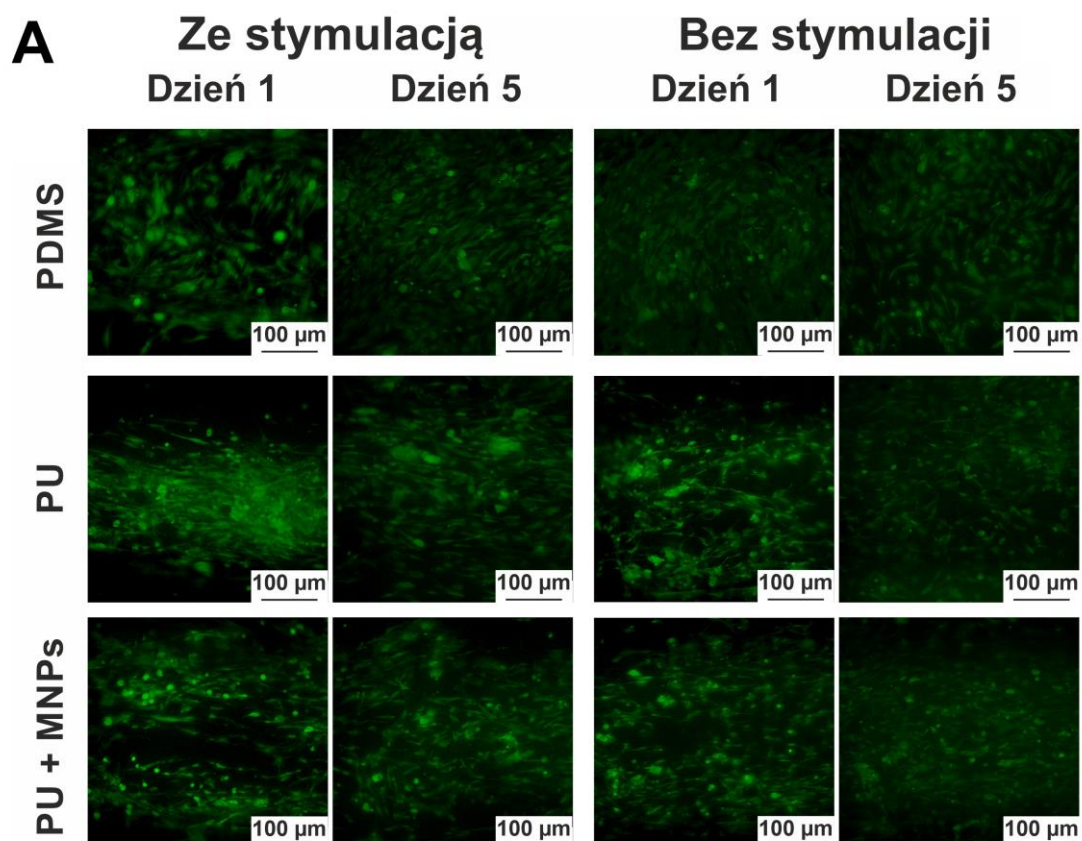
9.3.3 Hodowla w komórek serca w mikrosystemie II a i stymulacja mechaniczna

W opracowanym mikrosystemie prowadzono hodowlę komórek H9c2 oraz iPSC-CM, które poddano stymulacji z wykorzystaniem wcześniej przygotowanego i opisanego w podrozdziale 9.1.2. generatorze zmiennego pola magnetycznego. Komórki hodowano w mikrosystemie, w którym podłoże hodowlane stanowiły: PDMS, maty nanowłókniste bez oraz z nanocząstkami magnetycznymi. Mikrosystem II a dodatkowo poddawany był stymulacji polem magnetycznym. Celem badań było określenie, czy zastosowane podłoża w postaci mat nanowłóknistych oraz stymulacja polem magnetycznym ma wpływ na żywotność oraz ułożenie komórek hodowanych w mikrosystemie przepływowym. Komórki hodowano w mikrosystemie II a przez 5 dni, poddawano codziennie stymulacji magnetycznej przez 1 h z częstotliwością 0,5 Hz (pole magnetyczne o indukcji 1 T). Do oceny żywotności zastosowano barwienie różnicowe Kalceinę-AM (kolor zielony - komórki żywe) i jodkiem propidyny (kolor czerwony - komórki martwe) w 1., 3. oraz 5. dzień hodowli. Wykazano wysoką żywotność komórek dla każdego z badanych podłoży, przez co potwierdzono brak negatywnego wpływu na komórki zarówno zastosowanej modyfikacji mat, jak i stymulacji polem magnetycznym (Rycina 38A). Jednocześnie, przeprowadzono analizę ułożenia komórek w zależności od zastosowanego podłoża. W przypadku komórek H9c2 zauważono różnice w ułożeniu komórek w zależności od rodzaju podłoża, na którym rosły komórki. W mikrokanalach z PDMS komórki układały się w sposób przypadkowy i nieregularny, natomiast w mikrokanalach z matami

nanowłóknistymi (zwłaszcza zawierających nanocząstki magnetyczne i poddane stymulacji polem magnetycznym) zauważono wyraźnie wydłużony, wrzecionowaty kształt komórek. Ok. 28% komórek układało się względem siebie w zakresie -15° do 15° (Rycina 38 B). Najbardziej równolegle ułożone komórki H9c2 uzyskano w mikrosystemach zawierających maty nanowłókniste z nanocząstkami magnetycznymi i dodatkowo stymulowanych polem magnetycznym. W przypadku komórek iPSC-CM, nie obserwowano tak istotnego wpływu stymulacji na ułożenie i morfologię komórek. Zastosowanie wyłącznie warunków przepływowych w hodowli komórek iPSC-CM w mikrokanale z PDMS spowodowało, że ok. 40% komórek wykazywało równoległe ułożenie. Zastosowanie mat nanowłóknistych, zarówno tych bez jak również z dodatkiem nanocząstek magnetycznych, dodatkowo wydłużyło kształt i równoległe ułożenie komórek wzdłuż nanowłókien. Niemniej jednak różnice te nie były znaczące w stosunku do hodowli prowadzonej w mikrokanalach z PDMS (Rycina 39 B). Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno rodzaj podłoża, jak i stymulacja mechaniczna mają istotny wpływ na organizację komórek H9c2, i w mniejszym stopniu na komórki iPSC-CM. Wynikać to może np. z różnic w typie i dojrzałości komórek.

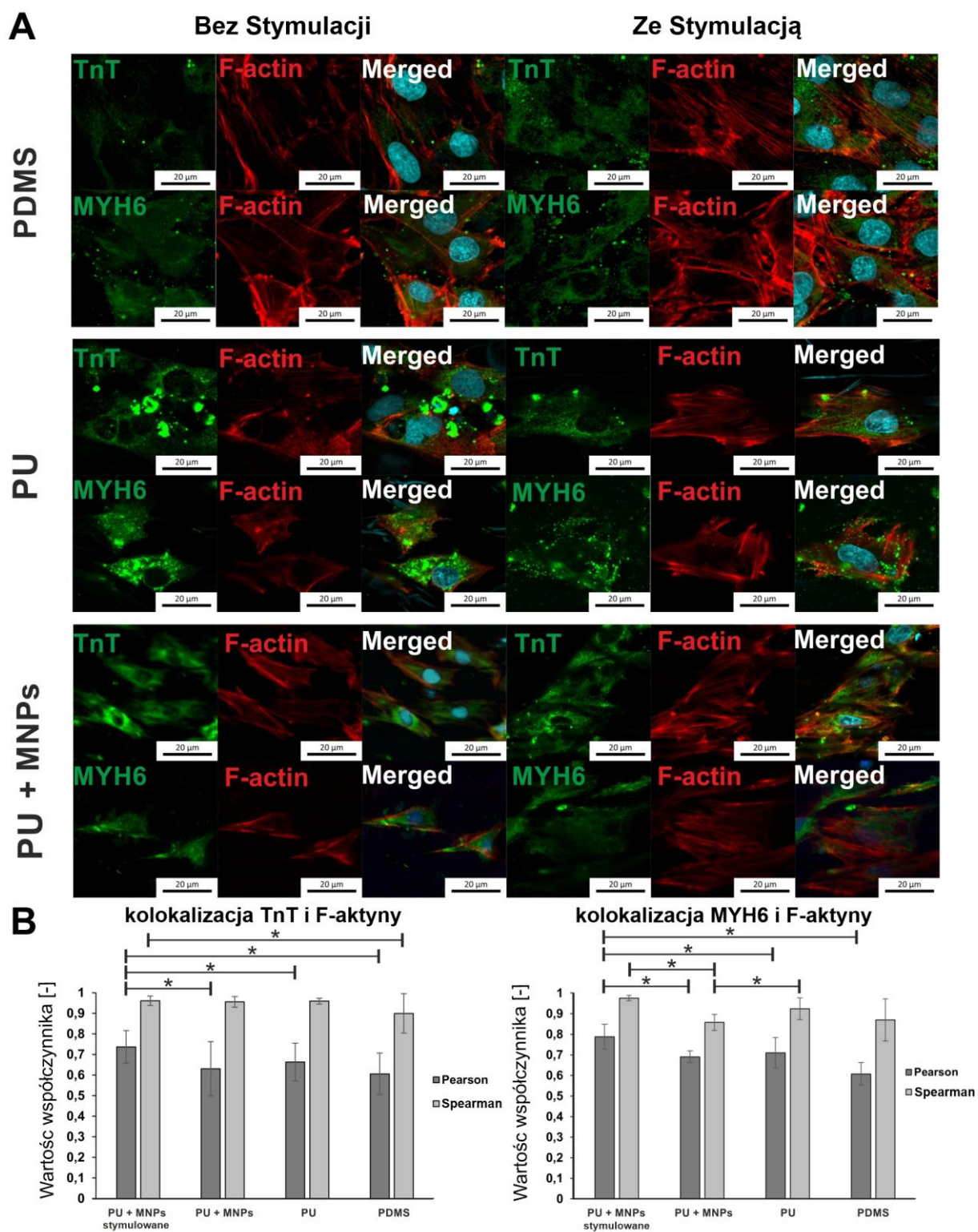


Rycina 38 A) Seria zdjęć przedstawiających komórki H9c2 w różnych dniach hodowli z i bez stymulacji mechanicznej. Barwienie komórek kalceiną-AM (zielone) i jodkiem propidyny (czerwone). B) Ułożenie komórek H9c2 w zależności od zastosowanego podłoża w mikrosystemie II a.

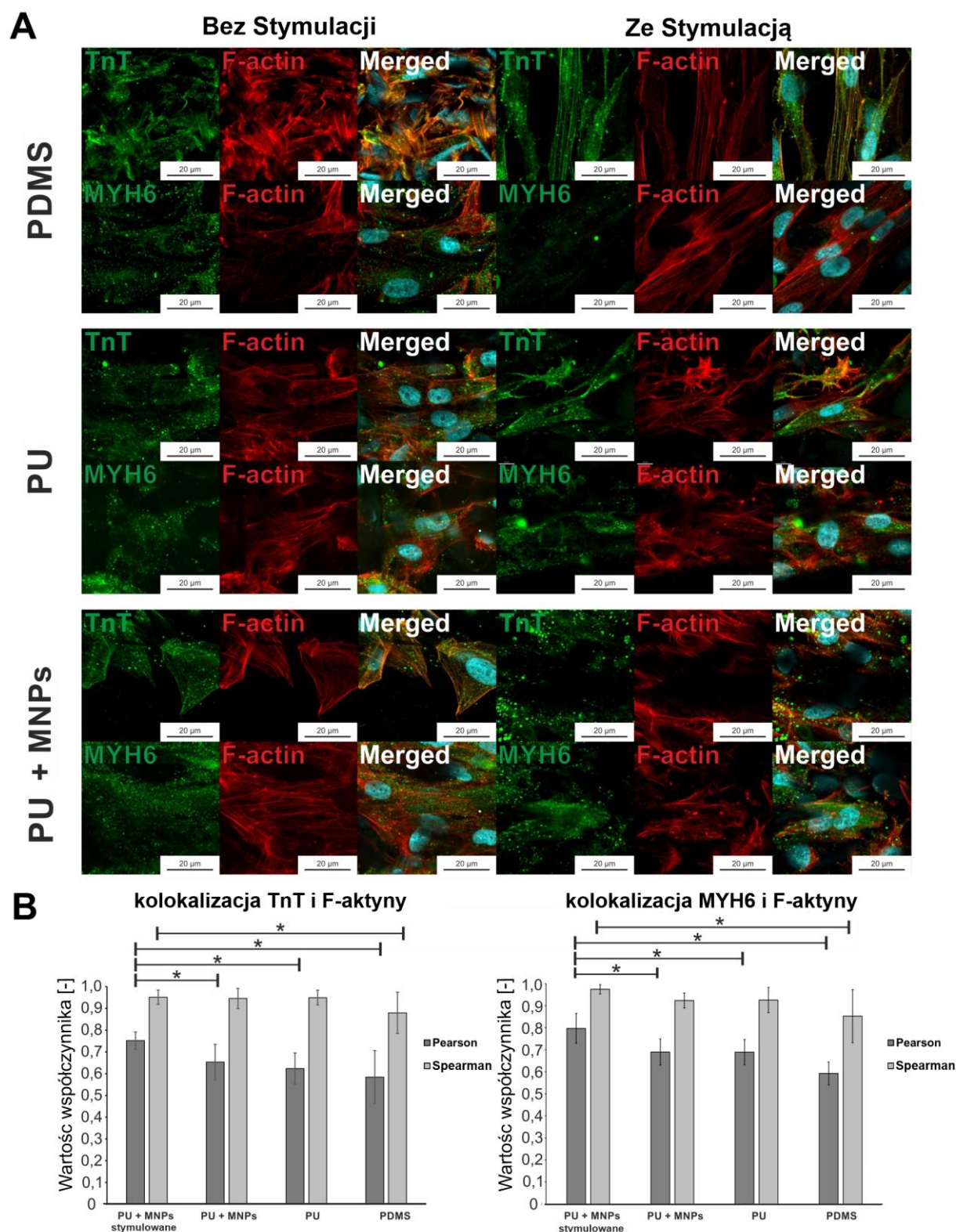


Rycina 39 A) Seria zdjęć przedstawiających komórki iPSC-CMs w różnych dniach hodowli ze stymulacją mechaniczną i bez niej. Barwienie komórek kalceiną-AM (zielone) i jodkiem propidyny (czerwone). B) Ułożenie komórek iPSC-CMs w zależności od zastosowanego podłoża w mikrosystemie II a.

W kolejnym etapie badań sprawdzono, w jaki sposób różne podłoża (PDMS, maty nanowłókniste, maty nanowłókniste z dodatkiem nanocząstek magnetycznych oraz maty nanowłókniste z dodatkiem nanocząstek magnetycznych i stymulacją magnetyczną) wpływają na zmianę kolokalizacji Troponiny T (TnT), ciężkiego łańcucha miozyny 6 (MYH6) i włókien F-aktyny w komórkach H9c2 oraz iPSC-CM. Analizowano czy zastosowanie warunków przepływowych w hodowli oraz stymulacja mechaniczna wspierać będą proces dojrzewania kardiomiocytów. Warto podkreślić, że kolokalizacja F-aktyny i troponiny T może świadczyć o bardziej zaawansowanym uformowaniu aparatu kurczliwego w kardiomiocytach. Troponina T odgrywa kluczową rolę w regulacji skurczu mięśnia sercowego, natomiast F-aktyna tworzy filamenty cienkie, które, we współpracy z filamentami grubymi (zbudowanymi głównie z miozyny, w tym izoformy MYH6), odpowiadają za prawidłowe działanie sarkomerów [157,158]. Zbieżne rozmieszczenie tych białek sugeruje lepszą organizację strukturalną komórki i większy potencjał do efektywnego generowania siły skurczu, co pośrednio może świadczyć o wyższym stopniu dojrzałości funkcjonalnej kardiomiocytów [159,160]. Na Rycinie 40 A i Rycinie 41 A przedstawiono przykładowe obrazy uzyskane z mikroskopu konfokalnego, po barwieniu immunofluorescencyjnym: Troponina T (kolor zielony), MYH6 (kolor zielony) oraz F-aktyna (kolor czerwony) dla hodowli w mikrosystemie II a. Z kolei na Rycinie 40 B i Rycinie 41 B przedstawiono wartości współczynników kolokalizacji Pearsona i Spearmana dla troponiny T i F-aktyny oraz MYH6 i F-aktyny. Analiza jakościowa wykazała, że w każdym typie hodowli, komórki H9c2 i iPSC - CM zachowują prawidłową morfologię oraz poziom białek charakterystycznych dla kardiomiocytów. Ponadto wykazano, że w przypadku komórek hodowanych na matach nanowłóknistych z nanocząstkami magnetycznymi i poddanych stymulacji (PU + MNPs stymulowane) współczynnik Pearsona dla TnT – F-aktyna i MYH6 – F-aktyna osiągał najwyższe wartości spośród wszystkich badanych typów hodowli. Dotyczy to zarówno komórek H9c2, jak również komórek iPSC-CM. Wyraźny wzrost kolokalizacji TnT – F-aktyny i MYH6 – F-aktyny może sugerować intensywną reorganizację cytoszkieletu komórek, a tym samym dojrzewanie kardiomiocytów [161,162]. Uzyskane wyniki potwierdzają więc, że zastosowanie mikrosystemu przepływowego zintegrowanego z matami nanowłóknistymi z dodatkiem nanocząstek magnetycznych, w połączeniu ze stymulacją polem magnetycznym może istotnie wpływać na przestrzenną organizację kluczowych białek kurczliwych, wspierając tym samym dojrzewanie funkcjonalne kardiomiocytów w warunkach *in vitro*.



Rycina 40 A) Zdjęcia komórek H9c2 po immunobarwieniu F-aktyny (kolor czerwony), troponiny T (kolor zielony), MYH6 (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski). B) Określone współczynniki kolokalizacji dla Troponiny T i F-aktyny oraz MYH6 i F-aktyny w komórkach H9c2. $N \geq 5$, $p < 0,05$.



Rycina 41 A) Zdjęcia komórek iPSC-CM po immunobarwieniu: F-aktyną (kolor czerwony), troponiną T (kolor zielony), MYH6 (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski). B) Określone współczynniki kolokalizacji dla Troponiny T i F-aktyny oraz MYH6 i F-aktyny w komórkach iPSC-CMs. $N \geq 5$, $p < 0,05$.

9.3.4 Podsumowanie i dyskusja wyników

W badaniach przeprowadzonych w ramach tego etapu, zaprojektowano i wytworzono mikrosystem II a, umożliwiający odtwarzanie mikrośrodowiska tkanki serca dzięki zastosowaniu mat nanowłóknistych oraz kontrolowanej stymulacji mechanicznej. Równoległe ułożenie włókien w matach nanowłóknistych wspiera ukierunkowany wzrost i organizację kardiomiocytów, naśladując strukturę macierzy pozakomórkowej serca [69,150,163]. Wprowadzenie nanocząstek magnetycznych do mat nanowłóknistych umożliwiała bezkontaktową stymulację mechaniczną przy użyciu zewnętrznego pola magnetycznego [145,164,165], co pozwalało na precyzyjną kontrolę odkształceń włókien. Maty zostały dodatkowo pokryte polidopaminą, zwiększając chropowatość i poprawiając adhezję komórek [166]. Mikrosystem II a wykonano z dwóch warstw PDMS z pięcioma równoległymi mikrokanalami, umożliwiając jednocześnie prowadzenie różnych typów hodowli. W opracowanym mikrosystemie hodowano komórki H9c2 oraz iPSC-CM, prowadząc codzienną stymulację mechaniczną (1 h, 0,5 Hz, ~1 T, 5 dni). Analiza żywotności komórek potwierdziła brak negatywnego wpływu mat i warunków stymulacji na komórki [145,152]. Jednocześnie w szczególności w komórkach H9c2 obserwowano istotny wzrost ukierunkowania i organizacji cytoszkieletu, potwierdzony analizą kolokalizacji białek kurczliwych. Podobną tendencję obserwowano także w komórkach iPSC-CM. Uzyskane wyniki potwierdzają postawioną hipotezę, że architektura podłoża i mechaniczna stymulacja komórek sprzyjają organizacji i dojrzewaniu kardiomiocytów [167,168]. Wytworzony mikrosystem pozwala na jednoczesną kontrolę przepływu, bodźców mechanicznych oraz topografii podłoża, wpisując się w najnowsze trendy rozwoju narzędzi typu *Organ-on-a-Chip* [169–172]. Opracowany mikrosystem może być wykorzystywany nie tylko do badań podstawowych nad mechanotransdukcją czy dojrzewaniem komórek, ale w przyszłości również w modelowaniu patologii serca, testowaniu leków czy współhodowli z komórkami macierzystymi [173,174]. Możliwość dalszych modyfikacji systemu np. przez wprowadzenie stymulacji elektrycznej, dodatkowo zwiększa jego potencjał aplikacyjny. Podsumowując, zaprojektowany mikrosystem II a skutecznie odtwarzał istotne elementy mikrośrodowiska serca *in vitro*, pozwalając na uzyskanie wysokiego poziomu organizacji i przeżywalności kardiomiocytów oraz prowadzenie zaawansowanych badań nad sercem i rozwojem terapii komórkowych. Wyniki badań przedstawione w powyższym rozdziale stały się przedmiotem publikacji naukowej (zgłoszony do recenzji w czasopiśmie *Sensors and Actuators A: Physical*).

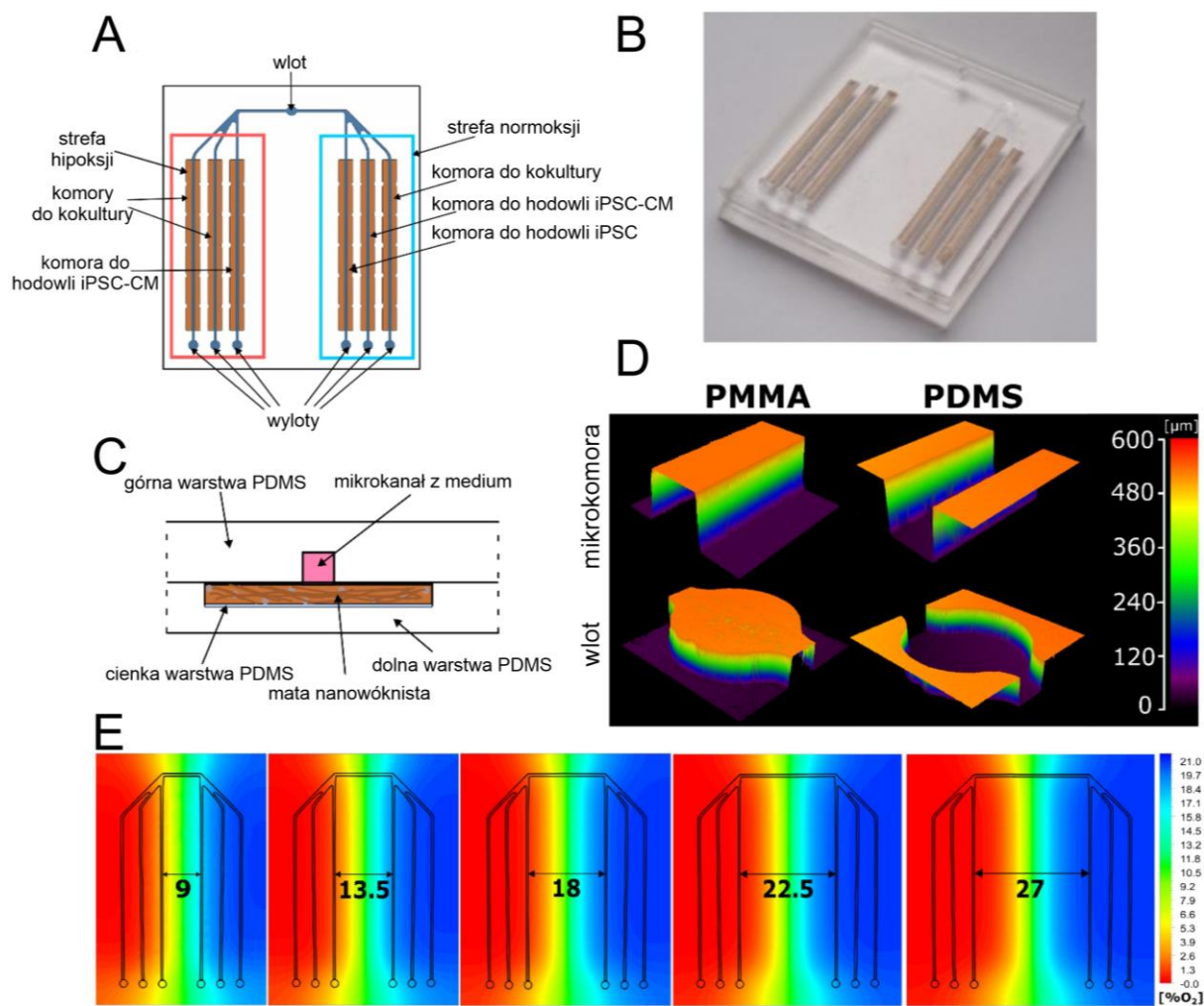
9.4 Badanie wpływu niedotlenienia na kardiomiocyty hodowane w mikrosystemie przepływowym II b

W dotychczas przedstawionych wynikach badań opracowano dwa typy mikrosystemów: mikrosystem I do uzyskania warunków hipoksji w wybranych strefach systemu oraz mikrosystem II a do prowadzenie stymulacji mechanicznej komórek poprzez działanie zmiennym polem magnetycznym. Założono, że jednocześnie uzyskanie warunków niedotlenienia w mikrosystemie oraz zastosowanie w nim mechanicznej stymulacji pozwoli nie tylko na wierniejsze odwzorowanie mikrośrodowiska warunków tkanki serca w warunkach niedotlenienia, ale także umożliwi rozszerzenie możliwości badawczych w zakresie oceny i wzrostu komórek w takich warunkach. W niniejszym podrozdziale przedstawiono badania związane z opracowaniem nowego mikrosystemu do badania warunków hipoksji oraz stymulacji mechanicznej komórek. Celem tych badań było opracowanie rozwiązania, które umożliwi dokładniejsze badanie kardiomiocytów w warunkach niedotlenienia i poddawania ich cyklicznym odkształceniom mechanicznym. Dzięki temu możliwe będzie uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników dotyczących mechanizmów regeneracji oraz opracowania nowych strategii terapeutycznych, szczególnie w przypadku niedokrwienia mięśnia sercowego.

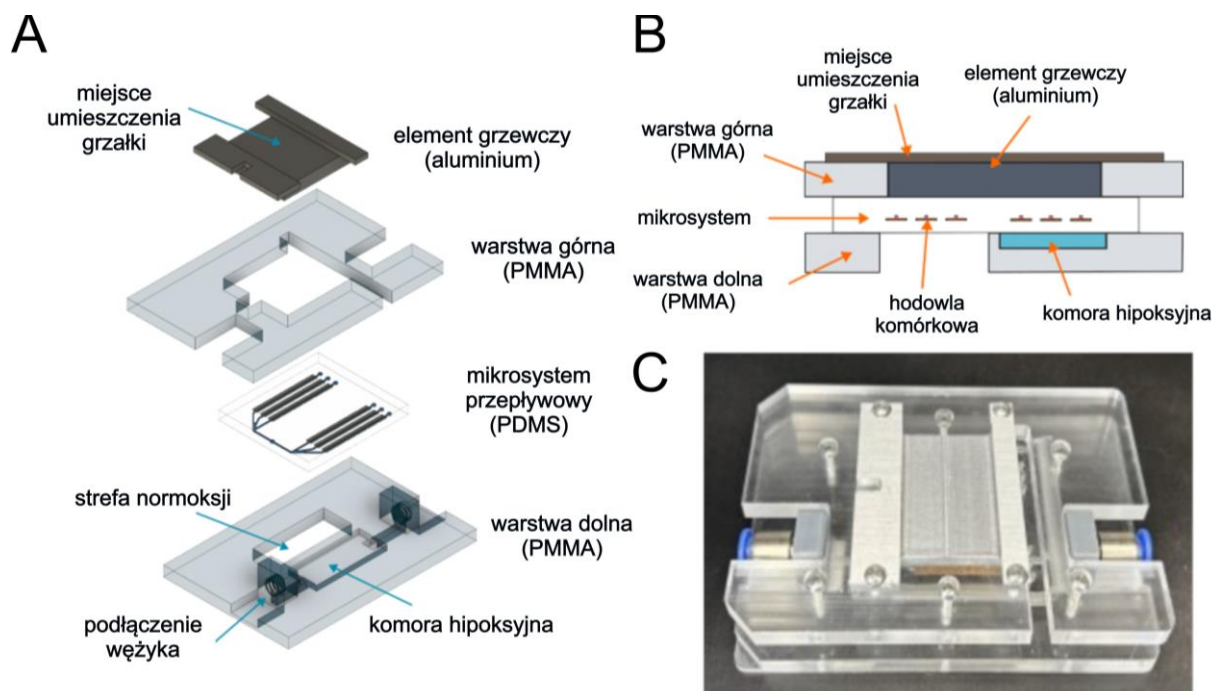
9.4.1 Geometria mikrosystemu II b

W ramach tego etapu badań a opracowano geometrię mikrosystemu II b, w taki sposób, aby możliwe było w prowadzenie hodowli komórek iPSC-CMs oraz iPSC w kontrolowanych warunkach hipoksji i normoksji. W oparciu o mikrosystem II a, zaproponowano geometrię mikrosystemu II b (Rycina 42 A,B,C). Proponowany mikrosystem składał się z dwóch warstw PDMS: dolnej warstwy zawierającej 6 mikrokomór (35 mm x 3 mm x 0,3 mm), zintegrowanych z matami nanowłóknistymi i górnej warstwy zawierającej mikrokanaly (0,5 mm x 0,5 mm) z wlotem i wylotami. W porównaniu do mikrosystemu II a zwiększono liczbę mikrokomór, w których umieszczono maty nanowłókniste o właściwościach magnetycznych. Trzy z mikrokomór hodowlanych stanowiły strefę hipoksji, a trzy strefę normoksji. Głównym materiałem konstrukcyjnym mikrosystemu II b był PDMS, charakteryzujący się stosunkowo wysoką przepuszczalnością dla gazów, dlatego też konieczne było ustalenie odległości między strefami hipoksji i normoksji, co miało zapobiec niekontrolowanemu przenikaniu tlenu pomiędzy tymi strefami. W tym celu, przeprowadzono serię symulacji w programie ANSYS, uwzględniając odstęp między strefami równe 9, 13,5, 18, 22,5 i 27 mm, odpowiadające rozmieszczeniu dołków w standardowej płytce 384-dołkowej (Rycina 42). Wyniki symulacji

wykazały, że średnie stężenie tlenu w strefie hipoksji i normoksji dla odstępów 9 mm wynosiło odpowiednio $1,9\% \pm 1,5\%$ oraz $19,3\% \pm 1,4\%$. Dla kolejnych odstępów uzyskano następujące wartości: dla 13,5 mm – $1,1\% \pm 0,9\%$ i $20,2\% \pm 0,7\%$; dla 18 mm – $0,6\% \pm 0,5\%$ i $20,4\% \pm 0,5\%$; dla 22,5 mm – $0,3\% \pm 0,3\%$ i $20,7\% \pm 0,3\%$; a dla 27 mm – $0,2\% \pm 0,2\%$ i $20,8\% \pm 0,2\%$ (Rycina 41 E). Ostatecznie wybrano odległość równą 22,5 mm, ponieważ zapewniała ona wysoką jednorodność rozkładu tlenu i kompaktową konstrukcję mikrosystemu. Wytworzona warstwa z PDMS oraz pieczętka z PMMA, zostały poddane pomiarom przy użyciu mikroskopu LEXT, w celu weryfikacji wymiarów wytworzonych mikrostruktur (Rycina 42 D). Analiza wykazała jedynie niewielkie różnice pomiędzy wymiarami projektowymi, oraz wymiarami mikrostruktur w pieczętce i gotowego odlewu PDMS. Potwierdziło to wysoką precyzję zastosowanej metody wytwarzania. Przykładowo, szerokość mikrokanалу i mikrokomory w gotowym odlewie PDMS wynosiły odpowiednio $495,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$ i $2930 \pm 6 \mu\text{m}$, podczas gdy w projekcie było to odpowiednio $500 \mu\text{m}$ i $3000 \mu\text{m}$. Tak zaprojektowany i zweryfikowany mikrosystem II b został wykorzystany w dalszych etapach badań.



Rycina 42 A) Schemat mikrosystemu II b w rzucie z góry. B) Zdjęcie wykonanego mikrosystemu II b. C) Schemat przekroju mikrokomory i mikrokanalu przepływowego. D) Obrazy mikrostruktur wykonane w pieczętce z PMMA i warstwie PDMS. E) Symulacje numeryczne stężenia tlenu w mikrosystemie II b w zależności od odległości pomiędzy strefami hipoksji i normoksji.



Rycina 43 A) Schemat warstw kartridża umożliwiającego prowadzenie hodowli w warunkach hipoksji. B) Schemat przekroju poprzecznego kartridża z zaznaczeniem poszczególnych warstw i komory hipoksyjnej. C) Zdjęcie gotowego kartridża z zamontowanym mikrosystemem II b.

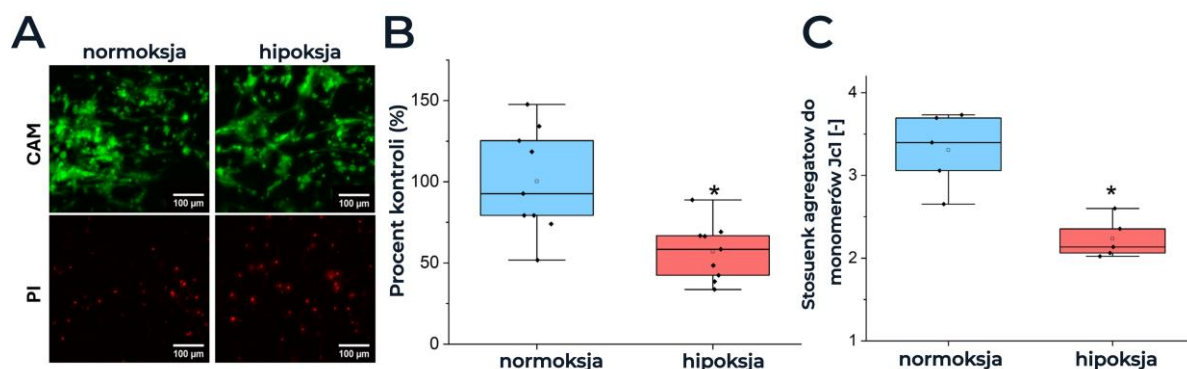
W dalszej części badań zaprojektowano specjalny kartridż umożliwiający uzyskanie kontrolowanych warunków hipoksji w wybranych mikrokomorach mikrosystemu (Rycina 43). Kartridż składa się z dwóch warstw wykonanych z PMMA, pomiędzy które umieszczano mikrosystem oraz z aluminiowej płyty mocowanej czterema śrubami M3 o długości 18 mm. Aluminiowa płyta została zaprojektowana tak by możliwe było umieszczenie w niej elementu grzejnego o wymiarach 71 mm × 20 mm × 3,5 mm, sterowanego za pomocą kontrolera JUMO eTRON M. Całkowite wymiary kartridża z zamontowanym mikrosystemem II b (bez aluminiowej płyty) wynosiły 128 mm × 85 mm × 22 mm. Kluczową funkcją aluminiowej płyty było zapewnienie równomiernego rozprowadzenia ciepła w obrębie całego mikrosystemu. Płyta ta była jednak demontowalna, co umożliwiało prowadzenie pomiarów i obrazowanie hodowli komórkowych bezpośrednio w kartridżu (ze względu na nieprzezroczystość aluminium, która uniemożliwia obserwację komórek podczas inkubacji). Dolna warstwa PMMA posiadała wyfrezowaną komorę z wlotem i wylotem, tworząc przestrzeń przeznaczoną do generowania warunków hipoksji (Rycina 43 A, B). Górna warstwa pełniła funkcję mocowania elementu grzejnego oraz dociskała mikrosystem do dolnej warstwy, zapewniając szczelność komory hipoksyjnej. Dzięki ciągłemu przepływowi azotu (z prędkością 50 Nl/h) przez komorę hipoksyjną, w jej wnętrzu wytwarzano środowisko beztlenowe, umożliwiające wymianę gazową pomiędzy komorą hipoksyjną a mikrokomorami znajdującymi

się w strefie hipoksji mikrosystemu. W rezultacie tlen obecny w mikrokomorach był stopniowo zastępowany azotem, aż do uzyskania stężenia tlenu na poziomie ok. 0%. W celu zweryfikowania skuteczności zaproponowanego rozwiązania, przeprowadzono eksperyment z użyciem folii do pomiaru stężenia tlenu SF-RPSu4-L4/W4/OIW. Zaobserwowano, że już po 1 h przepływu azotu przez komorę hipoksyjną poziom tlenu w strefie hipoksji osiągnął wartość bliską 0% i utrzymywał się na tym poziomie przez kolejne 6 godzin. Z kolei w strefie normoksji poziom tlenu pozostawał stabilny na poziomie ok. 21%. Wyniki te potwierdziły, że zaprojektowany mikrosystem wraz z kartridżem pozwala na skuteczne i stabilne uzyskiwanie warunków hipoksji podczas hodowli komórek.

9.4.2 Hodowla komórek w warunkach niedotlenienia w mikrosystemie II b

Kolejnym etapem badań było potwierdzenie, czy zgodnie z wcześniej przeprowadzonymi symulacjami numerycznymi możliwe jest odtworzenie warunków niedotlenienia w komórkach serca w opracowanym mikrosystemie II b. W tym celu, w badaniach zastosowano komórki iPSC-CM i przeprowadzono barwienie różnicowe, które umożliwiło ocenę żywotności komórek, oraz wykonano pomiary poziomu ATP jako wskaźnika aktywności metabolicznej. Komórki iPSC-CM o gęstości 1×10^6 komórek/ml wprowadzono do mikrokomór hodowlanych i poddano działaniu obniżonego stężenia tlenu przez 6 h. Komórki wykazały wysoką żywotność po tym czasie (Rycina 44 A). Warunki niedotlenienia mogą natomiast powodować osłabienie funkcji kardiomiocytów, np. spowolnienie procesów wewnątrzkomórkowych. Równocześnie potwierdzono spadek poziomu ATP, co wskazuje na obniżenie aktywności metabolicznej komórek w warunkach niedotlenienia. W przypadku komórek iPSC-CM zaobserwowano istotny spadek poziom ATP do ok. 57% względem kontroli po 6 h hipoksji (Rycina 44 B). Ponadto, w celu zbadania aktywności mitochondriów przeprowadzono barwienie JC-1. W aktywnych mitochondriach (o wysokim potencjale błonowym) barwnik ten jest transportowany wewnątrz błony mitochondrialnej w dużych ilościach, osiągając wysokie stężenia i tworząc agregaty, wykazujące czerwoną fluorescencję. W mitochondriach o niskim potencjale błonowym, barwnik ten pozostaje w postaci monomeru, wykazując zieloną fluorescencję. Określono stosunek agregatów do monomerów po 6 h hodowli komórek w warunkach niedotlenienia. Zaobserwowano jego spadek z $3,31 \pm 0,22$ do $2,24 \pm 0,41$, co świadczyć może o spadku potencjału błony mitochondrialnej z powodu stresu wywołanego niedotlenieniem (Rycina 44 C). Uzyskane wyniki potwierdzają, że mikrosystem II b może zostać wykorzystany wraz z opracowanym kartridżem posłużyć mogą do symulacji niedotlenienia. Ponadto, wykazano wysoką żywotność komórek, przy jednoczesnym

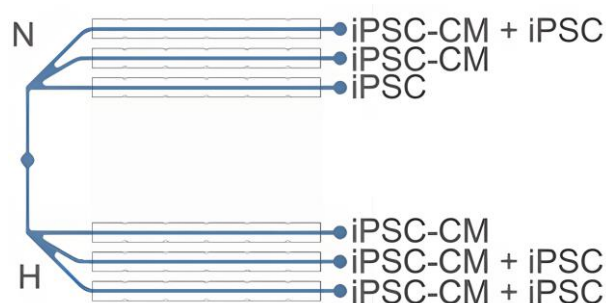
obniżeniem poziomu ATP oraz potencjału mitochondrialnego w komórkach iPSC-CM. W kolejnym etapie badań opracowany mikrosystem II b wykorzystano do oceny wpływu komórek macierzystych na hodowlę kardiomiocytów hodowanych w warunkach niedotlenienia.



Rycina 44 A) Barwienie różnicowe komórek iPSC-CM po 6 h hipoksji. B) Zmiany poziomu ATP w komórkach iPSC-CM po 6h hipoksji. C) Wyniki oznaczania poziomu JC-1. * $p < 0.05$, $n > 5$.

9.4.3 Współhodowla komórek iPSC-CM poddanych hipoksji z komórkami iPSC w mikrosystemie II b

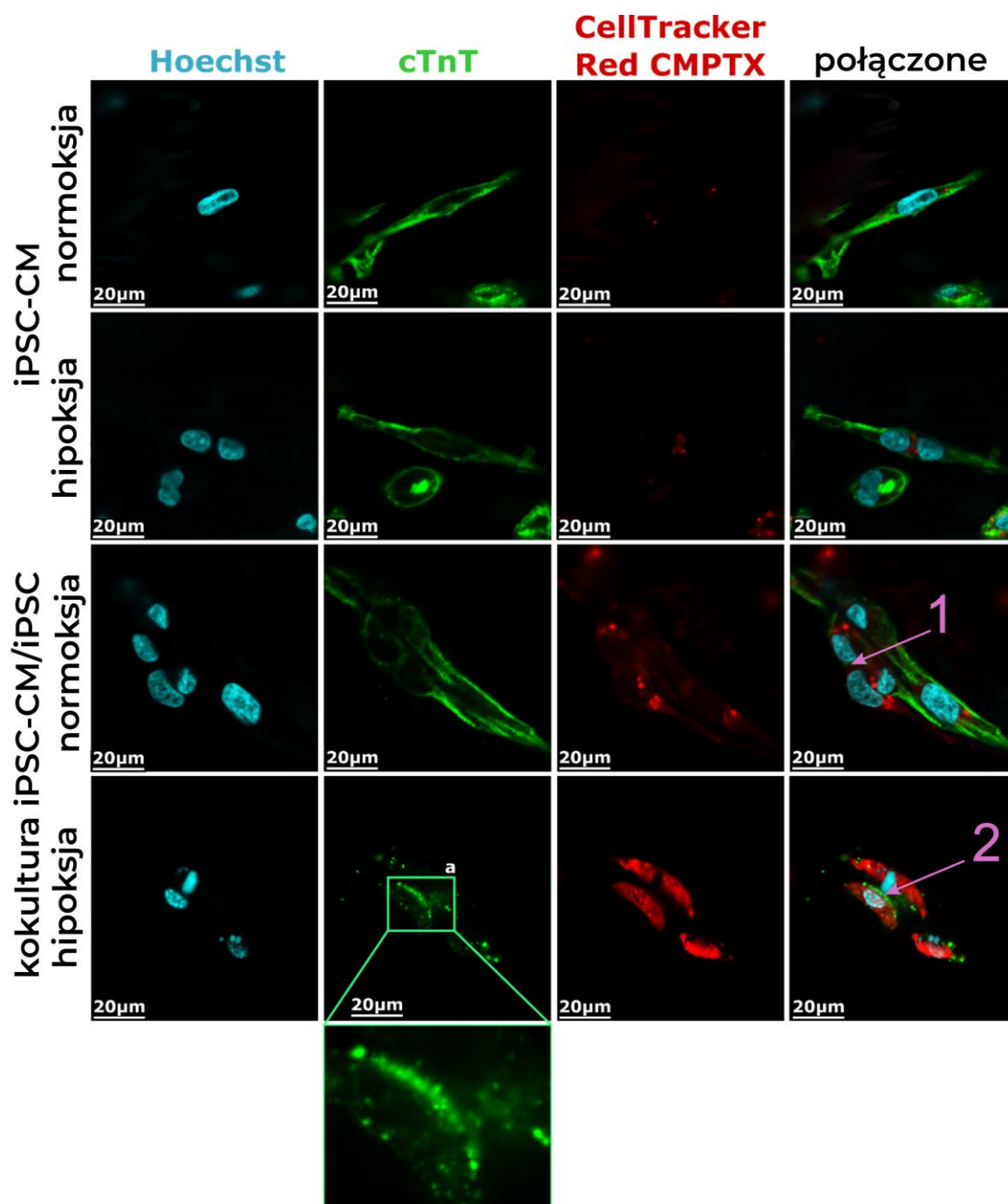
W poprzednich badaniach wykazano, że w opracowanym mikrosystemie II b możliwe jest uzyskanie warunków niedotlenienia w poszczególnych strefach mikrosystemu. W kolejnym etapie badań prowadzono ocenę wpływu komórek macierzystych iPSC na kardiomiocyty poddane hipoksji, hodowane w mikrosystemie przepływowym i poddawane stymulacji mechanicznej. W pierwszym etapie badań, do pięciu mikrokomór hodowlanych wprowadzono komórki iPSC-CM (Rycina 45). Po 24 h mikrosystem umieszczono w specjalnie zaprojektowanym kartridżu, gdzie komórki były poddawane działaniu warunków niedotlenienia przez 6 h, zgodnie z procedurą opisaną w części metodycznej pracy. Po tym czasie, wymieniono medium hodowlane w celu zapewnienia optymalnych warunków wzrostu komórek. Równolegle przygotowano zawiesinę komórek iPSC, znakowanych barwnikiem Cell Tracker Red CMPTX (na czerwono). Znakowane komórki iPSC wprowadzono do czterech mikrokomór hodowlanych (do dwóch mikrokomór w strefie normoksji oraz do dwóch mikrokomór w strefie hipoksji), zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 44.



Rycina 45 Schemat rozmieszczenia poszczególnych mikrokomór hodowlanych oraz typów prowadzonych współhodowli komórkowych w mikrosystemie II b. W pierwszym etapie do mikrokomór wprowadzano komórki iPSC-CM, a następnie do odpowiednich komór wprowadzano zawieszinę komórek iPSC. Obszar oznaczony literą H był oznacza strefę hipoksji, obszar oznaczony literą N oznacza strefę normoksji.

Po upływie 24 h od rozpoczęcia współhodowli niedotlenionych komórek iPSC-CM z komórkami iPSC w mikrosystemie II b rozpoczęto stymulację mechaniczną, którą prowadzono w generatorze pola magnetycznego przez 1 h dziennie, przez kolejne 5 dni. Założono, że stymulacja mechaniczna sprzyjać będzie dojrzewaniu kardiomiocytów i będzie ona korzystna dla regeneracji komórek serca poddanych niedotlenieniu. Po zakończeniu cyklu stymulacji hodowle komórek poddano barwieniu immunofluorescencyjnemu (Rycina 46). Analizowano poziom troponiny T (cTnT). Troponiny to rodzina białek, które odgrywają kluczową rolę w skurczach mięśni. Jest ona stosowana jako marker kardiomiocytów. Obecność cTnT w hodowli, zwłaszcza w komórkach iPSC, sugerowałaby, że komórki macierzyste różnicować się mogą w kierunku kardiomiocytów. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że komórki iPSC-CM hodowane w monokulturze wykazywały obecność troponiny T zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji. W obu przypadkach obserwowano charakterystyczne prążki troponiny T, które są typowe dla struktury dojrzałych komórek serca. Zaobserwowano również, że w niedotlenionej monokulturze komórek iPSC-CM część komórek miała zaokrąglony kształt, co może wskazywać na uszkodzenie komórek kardiomiocytów w wyniku niedotlenienia. W przypadku współhodowli komórek iPSC z kardiomiocytami hodowanymi w warunkach normoksji, komórki macierzyste wyznakowane na czerwono ściśle przylegały do kardiomiocytów. Jednocześnie widoczne były charakterystyczne prążki troponiny T w kardiomiocytach oraz niewielkie zielone obszary w obrębie komórek iPSC (strzałka 1, Rycina 46), co potencjalnie wskazywało na początkową fazę procesu ich różnicowania. Niemniej jednak poziom cTnT w komórkach iPSCs był niski. Z kolei, w przypadku współhodowli komórek iPSC z kardiomiocytami poddanymi hipoksji, obserwowano obecność troponiny T w komórkach macierzystych (strzałka 2, Rycina 46).

Wykazano, że w komórkach iPSC hodowanych w warunkach przepływowych zarówno z kardiomiocytami poddanymi jak i nie warunkom niedotlenienia oraz dodatkowo stymulowanych mechanicznie obserwowane było zainicjowanie ich różnicowania. Niemniej jednak, w celu wyciągnięcia dokładniejszych wniosków konieczne są dalsze badania w tym zakresie.



Rycina 46 Kokultury iPSC-CM oraz iPSC hodowanych w warunkach normoksji i hipoksji po 5 dniach mechanicznej stymulacji w polu magnetycznym. Na zielono wybarwiona troponina T (cTnT), na czerwono komórki macierzyste iPSC (CellTracker Red CMPTX), na niebiesko jądra komórkowe (Hoechst).

9.4.4 Podsumowanie i dyskusja wyników

W ramach tego etapu badań opracowano mikrosystemu II b, który umożliwiał jednocześnie uzyskanie w nim warunków hipoksji i normoksji oraz prowadzenie stymulacji mechanicznej komórek iPSC-CM współhodowanych z komórkami iPSC. Z powodzeniem zaprojektowano i wykonano kartridż, który umożliwiał utworzenie strefy niedotlenienia i normoksji w mikrosystemie II b. W pierwszym etapie opracowano geometrię mikrosystemu II b, składającego się z 6 mikrokomór hodowlanych zintegrowanych z matami nanowłóknistymi o właściwościach magnetycznych. W celu oceny dyfuzji tlenu w mikrosystemie oraz ustalenia ostatecznego rozłożenia mikrokomór w mikrosystemie II b wykonano serię symulacji numerycznych w programie ANSYS. Wykazano, że zastosowanie odległości pomiędzy mikrokomarami w strefie normoksji i hipoksji, wynoszącej 22,5 mm jest optymalne. Następnie, przeprowadzono symulację niedotlenienia (przez 6 h) komórek iPSC-CM, hodowanych w mikrosystemie. Poprzez ocenę żywotności komórek oraz ich aktywności metabolicznej potwierdzono spadek poziomu ATP (do ok. 57% kontroli) przy zachowaniu wysokiej żywotności komórek. Wyniki te są zgodne z doniesieniami literaturowymi, w których wykazano, że hipoksja prowadzi do zaburzeń metabolicznych w kardiomiocytach, głównie poprzez upośledzenie funkcji mitochondrialnych oraz produkcji ATP, co skutkuje deficytem energetycznym bez natychmiastowej śmierci komórkowej [176–180]. W literaturze wykazano również, że warunki niedotlenienia powodują spadek poziomu ATP, pogorszenie kurczliwości kardiomiocytów oraz depolaryzację mitochondriów i zaburzenia metabolizmu energetycznego w komórkach serca [181–184]. Zgodnie z naszymi obserwacjami, krótkotrwała hipoksja wywołuje istotny stres metaboliczny bez natychmiastowej śmierci komórkowej, co w literaturze opisywane jest jako kondycjonowanie niedokrwienne (ang. *ischemic preconditioning*) [185,186]. W kolejnym etapie zbadano wpływ współhodowli komórek iPSC z komórkami serca (iPSC-CM) poddanymi niedotlenieniu oraz stymulacji mechanicznej. Na podstawie analizy mikroskopowej wykazano, że zarówno w przypadku współhodowli komórek iPSC-CM z komórkami iPSC, w komórkach macierzystych obserwowano troponinę T, białko charakterystyczne dla kardiomiocytów. Może to wskazywać na to, że uszkodzone przez hipoksję kardiomiocyty wydzielają czynniki parakrynne, które indukują różnicowanie sąsiadujących komórek iPSC w kierunku kardiomiocytów. Podobne wyniki zaobserwowano w badaniach, gdzie mikrośrodowisko generowane przez uszkodzone kardiomiocyty sprzyjało różnicowaniu komórek macierzystych oraz regeneracji tkanki serca [187,188]. Badania współhodowli komórek iPSC-CM i iPSC mają wstępny charakter i wymagają dalszych

dociekań. Niemniej jednak wskazują na możliwość zastosowania opracowanego mikrosystemu do tego typu badań. Podsumowując, opracowany mikrosystem II b pozwala na jednoczesne prowadzenie hodowli komórek w warunkach normoksji i hipoksji oraz stymulację mechaniczną. Jego zastosowanie daje szerokie możliwości badania stanu kardiomiocytów w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*. Wyniki badań przedstawione w powyższym rozdziale stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego oraz publikacji naukowej, która jest wysłana do recenzji czasopiśmie *Lab-on-a-Chip*.

10. Podsumowanie i wnioski

Choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD) są jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny i stanowią główną przyczynę zgonów na całym świecie – w 2021 roku odpowiadały za ok. 19,4 miliona zgonów, co stanowiło 28,6% wszystkich zgonów. Współczesne badania nad CVD koncentrują się na zrozumieniu mechanizmów tych chorób, opracowywaniu nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych, a także analizie czynników ryzyka. Jednym z najistotniejszych aspektów badań nad sercem jest opracowanie wiarygodnych modeli *in vitro*, umożliwiających badanie funkcjonowania komórek serca i komórek macierzystych w warunkach jak najbardziej zbliżonych do fizjologicznych, z uwzględnieniem zarówno bodźców mechanicznych, jak i ograniczonego dostępu tlenu (hipoksji), będącego kluczowym czynnikiem rozwoju CVD. W ramach niniejszej pracy opracowano mikrosystemy typu *Heart-on-a-chip*, zintegrowane z matami nanowłóknistymi umożliwiające wytworzenie modeli komórkowych tkanki serca oraz badanie wpływu niedotlenienia.

W pierwszym etapie badań opracowano maty nanowłókniste z poliuretanu (PU) metodą rozdmuchu roztworu polimeru, zarówno bez jak i z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (Fe_3O_4). Głównym celem tego etapu było uzyskanie materiałów do hodowli kardiomiocytów oraz umożliwiających ich mechaniczną stymulację. Maty charakteryzowały się równoległym ułożeniem włókien, co sprzyjało organizacji oraz równoległemu ułożeniu komórek serca. Wprowadzenie nanocząstek magnetycznych poprawiało elastyczność mat, zwiększało ich chropowatość oraz potencjał adhezyjny, a także ograniczało autofluorescencję, co ułatwiało obserwacje mikroskopowe. Przeprowadzone badania wykazały, że maty nanowłókniste z dodatkiem nanocząstek magnetycznych zapewniają korzystne mikrośrodowisko do hodowli komórek serca (HCM, H9c2), wpływając na ich wysoką żywotność i dojrzewanie. Dodatkowo, zastosowanie zmiennego pola magnetycznego umożliwiło cykliczną deformację mat oraz mechaniczną stymulację komórek, prowadząc do zwiększenia poziomu białek typowych dla dojrzałych kardiomiocytów (np. troponiny T, MYH6). Wykazano, że wprowadzenie nanocząstek magnetycznych do struktury mat nanowłóknistych umożliwi bezkontaktową stymulację mechaniczną komórek za pomocą zmiennego pola magnetycznego. Co mogłoby naśladować naturalne, cykliczne ruchy występujące w tkance serca.

Kolejnym etapem prac było opracowanie mikrosystemu, zintegrowanego z matami nanowłóknistymi umożliwiającego hodowlę kardiomiocytów w warunkach zarówno normoksji

jak i hipoksji. Pozwoliło to na odwzorowanie w warunkach *in vitro* warunków niedotlenienia tkanki serca. Mikrosystem I, wykonano z poliwęglanu i poli(dimetylosiloksanu), wyposażono w system kontroli przepływu gazów, umożliwiający uzyskanie strefy hipoksji oraz prowadzenie równoległych hodowli w stanie normoksji (kontrola). Badania wykazały, że niedotlenienie prowadzi do istotnych zmian metabolicznych w komórkach serca, takich jak spadek poziomu ATP oraz zaburzenia ekspresji genów związanych z funkcją kardiomiocytów. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, że opracowany mikrosystem stanowi wiarygodny model do badań nad stanami chorobowymi serca, możliwy do testowania w przyszłości terapii CVD. Wykazano, że zaprojektowany mikrosystem I, umożliwiający uzyskanie strefy hipoksji oraz zintegrowany z matami nanowłóknistymi, odwzorowuje procesy zachodzące w niedotlenionej tkance mięśnia sercowego *in vitro*, stanowiąc narzędzie do analiz stanów chorobowych.

W kolejnym etapie prac opracowano mikrosystem II a, umożliwiający prowadzenie hodowli komórek serca na matach nanowłóknistych z dodatkiem nanocząstek magnetycznych, przy jednoczesnej cyklicznej stymulacji mechanicznej za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego. Mikrosystem II a zbudowany był z dwóch warstw PDMS i wyposażony w zestaw mikrokomór hodowlanych, które pozwalały na jednoczesne testowanie różnych typów hodowli komórek. W badaniu wykorzystano komórki H9c2 oraz iPSC-CM. Dodatkowo, wykazano że modyfikacje mat roztworem polidopaminy poprawia adhezję komórek. Przeprowadzone badania wykazały, że cykliczna mechaniczna stymulacja (1 h, 0,5 Hz, 1 T, 5 dni) nie powodowała spadku żywotności kardiomiocytów, sprzyjała ich organizacji, wzrostowi oraz kolokalizacji białek. Wykazano że zaprojektowany mikrosystem II a, zintegrowany z matami nanowłóknistymi umożliwia kontrolowaną stymulację mechaniczną i może być wykorzystywany do uzyskiwania wiarygodnych modeli komórek serca.

Następnie, w oparciu o geometrię mikrosystemu II a, opracowano mikrosystem II b, który umożliwiał mechaniczną stymulację komórek oraz jednoczesne prowadzenie hodowli w warunkach normoksji i hipoksji. Uzyskano to dzięki zaprojektowaniu odpowiedniego kartridża. W mikrosystemie II b prowadzono hodowlę kardiomiocytów (iPSC-CM), oraz ich współhodowlę z komórkami macierzystymi (iPSC), poddając je równocześnie cyklicznej stymulacji mechanicznej oraz niedotlenieniu. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że warunki hipoksji prowadzą do obniżenia poziomu ATP i spadku potencjału błony wewnętrznej mitochondriów ($\Delta\Psi_m$). Jednocześnie wykazano, że w przypadku współhodowli kardiomiocytów z iPSC zaobserwowano obecność troponiny T w komórkach macierzystych, co sugeruje inicjowanie różnicowania w kierunku fenotypu

kardiomiocytarnego. Wykazano, że zintegrowany z matami nanowłóknistymi mikrosystem II b, umożliwia generowanie warunków niedotlenienia oraz współhodowlę kardiomiocytów i komórek macierzystych. Dodatkowo możliwe jest w nim monitorowanie zmian fenotypowych i funkcjonalnych komórek, co pozwoliło na identyfikację charakterystycznych zaburzeń metabolicznych (spadek ATP i potencjału mitochondrialnego) oraz indukowanie różnicowania iPSC. Wskazuje to, iż mikrosystem II b może być wykorzystywany do badań uszkodzeń i regeneracji mięśnia sercowego.

Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój modeli *in vitro* do badań nad komórkami serca, zwiększając stopień odwzorowania warunków *in vivo*. Integracja mat nanowłóknistych z dodatkiem nanocząstek magnetycznych z nowymi mikrosystemami przepływowymi typu *Heart-on-a-Chip* umożliwia precyzyjne odwzorowanie kluczowych elementów mikrośrodowiska tkanki serca, takich jak cykliczne bodźce mechaniczne oraz niedotlenienie. Opracowane rozwiązania zapewniają wysoką żywotność komórek, a także tworzą warunki do prowadzenia zaawansowanych badań nad mechanizmami chorób serca oraz testowania nowych strategii terapeutycznych, w tym terapii komórkowych. Opracowana technologia ma potencjał do dalszego rozwoju i szerokiego wykorzystania zarówno w medycynie regeneracyjnej, jak i farmakologii czy inżynierii biomedycznej.

Przeprowadzone badania potwierdziły postawioną hipotezę badawczą i pozwoliły na pełną realizację wszystkich zakładanych celów pracy. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy stanowią istotny wkład w kierunku tworzenia modeli *in vitro*, które w przyszłości mogą przyczynić się do opracowania skuteczniejszych i mniej inwazyjnych terapii dla pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego.

11. Bibliografia

1. Finch CE. 2010 Evolution of the human lifespan and diseases of aging: Roles of infection, inflammation, and nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 1718–1724. (doi:10.1073/pnas.0909606106)
2. Thiriet M. 2018 Cardiovascular Disease: An Introduction. In *Vasculopathies*, pp. 1–90. Cham: Springer International Publishing. (doi:10.1007/978-3-319-89315-0_1)
3. Le LTT, Nhu CXT. 2023 The Role of Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 13805. (doi:10.3390/ijms241813805)
4. Covas P *et al.* 2022 Artificial Intelligence Advancements in the Cardiovascular Imaging of Coronary Atherosclerosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 839400. (doi:10.3389/fcvm.2022.839400)
5. Zhou J, Du M, Chang S, Chen Z. 2021 Artificial intelligence in echocardiography: detection, functional evaluation, and disease diagnosis. *Cardiovasc. Ultrasound* **19**, 29. (doi:10.1186/s12947-021-00261-2)
6. Yang Q, Xiao Z, Lv X, Zhang T, Liu H. 2021 Fabrication and Biomedical Applications of Heart-on-a-chip. *Int. J. Bioprinting* **7**, 370. (doi:10.18063/ijb.v7i3.370)
7. Criscione J, Rezaei Z, Hernandez Cantu CM, Murphy S, Shin SR, Kim D-H. 2023 Heart-on-a-chip platforms and biosensor integration for disease modeling and phenotypic drug screening. *Biosens. Bioelectron.* **220**, 114840. (doi:10.1016/j.bios.2022.114840)
8. Magni P, Simeoni M, Poggesi I, Rocchetti M, De Nicolao G. 2006 A mathematical model to study the effects of drugs administration on tumor growth dynamics. *Math. Biosci.* **200**, 127–151. (doi:10.1016/j.mbs.2005.12.028)
9. Peirlinck M *et al.* 2021 Precision medicine in human heart modeling: Perspectives, challenges, and opportunities. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **20**, 803–831. (doi:10.1007/s10237-021-01421-z)
10. Leung CM *et al.* 2022 A guide to the organ-on-a-chip. *Nat. Rev. Methods Primer* **2**, 33. (doi:10.1038/s43586-022-00118-6)
11. Ma C, Peng Y, Li H, Chen W. 2021 Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development. *Trends Pharmacol. Sci.* **42**, 119–133. (doi:10.1016/j.tips.2020.11.009)
12. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, Wen W, Gong X. 2020 Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomed. Eng. OnLine* **19**, 9. (doi:10.1186/s12938-020-0752-0)
13. Deaton C, Froelicher ESivaraja, Wu LHa, Ho C, Shishani K, Jaarsma T. 2011 The Global Burden of Cardiovascular Disease. *Eur. J. Cardiovasc. Nurs.* **10**, S5–S13. (doi:10.1016/S1474-5151(11)00111-3)
14. Thomas H *et al.* 2018 Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000–2016: The Path to Prevention and Control. *Glob. Heart* **13**, 143. (doi:10.1016/j.ghheart.2018.09.511)

15. Henderson A. 1996 Coronary heart disease: Overview. *The Lancet* **348**, S1–S4. (doi:10.1016/S0140-6736(96)98001-0)
16. Palasubramaniam J, Wang X, Peter K. 2019 Myocardial Infarction—From Atherosclerosis to Thrombosis: Uncovering New Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**. (doi:10.1161/ATVBAHA.119.312578)
17. 2016 What Is Atherosclerosis? See <https://www.nhlbi.nih.gov/health/atherosclerosis>.
18. Kaminsky LA, German C, Imboden M, Ozemek C, Peterman JE, Brubaker PH. 2022 The importance of healthy lifestyle behaviors in the prevention of cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **70**, 8–15. (doi:10.1016/j.pcad.2021.12.001)
19. Tsai M-C, Lee C-C, Liu S-C, Tseng P-J, Chien K-L. 2020 Combined healthy lifestyle factors are more beneficial in reducing cardiovascular disease in younger adults: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Sci. Rep.* **10**, 18165. (doi:10.1038/s41598-020-75314-z)
20. Morofuji Y, Nakagawa S, Ujifuku K, Fujimoto T, Otsuka K, Niwa M, Tsutsumi K. 2022 Beyond Lipid-Lowering: Effects of Statins on Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases and Cancer. *Pharmaceuticals* **15**, 151. (doi:10.3390/ph15020151)
21. Lu C, Fang L, Zhu Y, Zheng L, Liu D. 2023 The Role of Statins in ASCVD. In *Statins - From Lipid-Lowering Benefits to Pleiotropic Effects* (ed D Liu), IntechOpen. (doi:10.5772/intechopen.1001350)
22. Robinson, M. V. In press. *Angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin ii receptor blockers, and direct renin inhibitors*. 295th edn. Pharmacotherapeutics for advanced practice nurse prescribers.
23. Wernhart S, Papathanasiou M, Rassaf T, Luedike P. 2023 The controversial role of beta-blockers in heart failure with preserved ejection fraction. *Pharmacol. Ther.* **243**, 108356. (doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108356)
24. Wanas Y, Bashir R, Islam N, Furuya-Kanamori L. 2020 Assessing the risk of angiotensin receptor blockers on major cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc. Disord.* **20**, 188. (doi:10.1186/s12872-020-01466-5)
25. Arumugham VB, Shahin MH. 2025 Therapeutic Uses of Diuretic Agents. In *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
26. Elliott WJ, Ram CVS. 2011 Calcium channel blockers. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* **13**, 687–689. (doi:10.1111/j.1751-7176.2011.00513.x)
27. Maron BJ, Estes NAM, Rowin EJ, Maron MS, Reynolds MR. 2023 Development of the Implantable Cardioverter-Defibrillator. *J. Am. Coll. Cardiol.* **82**, 353–373. (doi:10.1016/j.jacc.2023.04.056)
28. Ammannaya GKK. 2020 Implantable cardioverter defibrillators – the past, present and future. *Arch. Med. Sci. – Atheroscler. Dis.* **5**, 163–170. (doi:10.5114/amsad.2020.97103)

29. Nasser MI, Qi X, Zhu S, He Y, Zhao M, Guo H, Zhu P. 2020 Current situation and future of stem cells in cardiovascular medicine. *Biomed. Pharmacother.* **132**, 110813. (doi:10.1016/j.biopha.2020.110813)
30. Jin Y, Li S, Yu Q, Chen T, Liu D. 2023 Application of stem cells in regeneration medicine. *MedComm* **4**, e291. (doi:10.1002/mco2.291)
31. Tatullo M *et al.* 2020 Stem cells and regenerative medicine. In *Translational Systems Medicine and Oral Disease*, pp. 387–407. Elsevier. (doi:10.1016/B978-0-12-813762-8.00017-7)
32. Han W *et al.* 2024 YTHDC1 Mitigates Apoptosis in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Inhibiting *NfκB* and Augmenting Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Cell Transplant.* **33**, 09636897241290910. (doi:10.1177/09636897241290910)
33. Li K *et al.* 2025 Enhanced human adipose-derived stem cells with VEGFA and bFGF mRNA promote stable vascular regeneration and improve cardiac function following myocardial infarction. *Clin. Transl. Med.* **15**, e70250. (doi:10.1002/ctm2.70250)
34. Müller P, Lemcke H, David R. 2018 Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell. Physiol. Biochem.* **48**, 2607–2655. (doi:10.1159/000492704)
35. Guan X *et al.* 2020 Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial function and reverses ventricular remodeling in infarcted rat hearts. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 73. (doi:10.1186/s13287-020-01602-0)
36. Florek K, Mendyka D, Gomulka K. 2024 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in the Cardiovascular System. *Biomedicines* **12**, 1055. (doi:10.3390/biomedicines12051055)
37. Koransky ML, Robbins RC, Blau HM. 2002 VEGF Gene Delivery for Treatment of Ischemic Cardiovascular Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 108–114. (doi:10.1016/S1050-1738(01)00158-X)
38. Johnson T, Zhao L, Manuel G, Taylor H, Liu D. 2019 Approaches to therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease. *J. Mol. Med.* **97**, 141–151. (doi:10.1007/s00109-018-1729-3)
39. Jalil AT, Abdulhadi MA, Alkubaisy SA, Thejeel SH, Essa IM, Merza MS, Zabibah RS, Al-Tamimi R. 2023 The role of endoplasmic reticulum stress in promoting aerobic glycolysis in cancer cells: An overview. *Pathol. - Res. Pract.* **251**, 154905. (doi:10.1016/j.prp.2023.154905)
40. Saji Joseph J, Tebogo Malindisa S, Ntwasa M. 2019 Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery. In *Cell Culture* (ed R Ali Mehanna), IntechOpen. (doi:10.5772/intechopen.81552)
41. Sun M, Liu A, Yang X, Gong J, Yu M, Yao X, Wang H, He Y. 2021 3D Cell Culture—Can It Be As Popular as 2D Cell Culture? *Adv. NanoBiomed Res.* **1**, 2000066. (doi:10.1002/anbr.202000066)

42. Ahmed U, Ahmed R, Masoud MS, Tariq M, Ashfaq UA, Augustine R, Hasan A. 2021 Stem cells based in vitro models: trends and prospects in biomaterials cytotoxicity studies. *Biomed. Mater.* **16**, 042003. (doi:10.1088/1748-605X/abe6d8)
43. De León SE, Pupovac A, McArthur SL. 2020 Three-Dimensional (3D) cell culture monitoring: Opportunities and challenges for impedance spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* **117**, 1230–1240. (doi:10.1002/bit.27270)
44. Jensen C, Teng Y. 2020 Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.* **7**, 33. (doi:10.3389/fmolb.2020.00033)
45. Biju TS, Priya VV, Francis AP. 2023 Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review. *Drug Deliv. Transl. Res.* **13**, 2239–2253. (doi:10.1007/s13346-023-01327-6)
46. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 2021 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12200. (doi:10.3390/ijms222212200)
47. Cardoso BD, Castanheira EMS, Lanceros-Méndez S, Cardoso VF. 2023 Recent Advances on Cell Culture Platforms for In Vitro Drug Screening and Cell Therapies: From Conventional to Microfluidic Strategies. *Adv. Healthc. Mater.* **12**, 2202936. (doi:10.1002/adhm.202202936)
48. Chan Y-H, Lee Y-C, Hung C-Y, Yang P-J, Lai P-C, Feng S-W. 2021 Three-dimensional Spheroid Culture Enhances Multipotent Differentiation and Stemness Capacities of Human Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells by Modulating MAPK and NF-κB Signaling Pathways. *Stem Cell Rev. Rep.* **17**, 1810–1826. (doi:10.1007/s12015-021-10172-4)
49. Gilazieva Z, Ponomarev A, Rutland C, Rizvanov A, Solovyeva V. 2020 Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine. *Cancers* **12**, 2727. (doi:10.3390/cancers12102727)
50. Poggi A, Villa F, Fernandez JLC, Costa D, Zocchi MR, Benelli R. 2021 Three-Dimensional Culture Models to Study Innate Anti-Tumor Immune Response: Advantages and Disadvantages. *Cancers* **13**, 3417. (doi:10.3390/cancers13143417)
51. Henrique RBL, Lima RRM, Monteiro CAP, Oliveira WF, Pereira G, Cabral Filho PE, Fontes A. 2022 Advances in the study of spheroids as versatile models to evaluate biological interactions of inorganic nanoparticles. *Life Sci.* **302**, 120657. (doi:10.1016/j.lfs.2022.120657)
52. Kim S, Kim EM, Yamamoto M, Park H, Shin H. 2020 Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv. Healthc. Mater.* **9**, 2000608. (doi:10.1002/adhm.202000608)
53. Hoang P *et al.* 2021 Engineering spatial-organized cardiac organoids for developmental toxicity testing. *Stem Cell Rep.* **16**, 1228–1244. (doi:10.1016/j.stemcr.2021.03.013)

54. Bell CC *et al.* 2016 Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci. Rep.* **6**, 25187. (doi:10.1038/srep25187)
55. Chamkouri H. 2021 A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. *Am. J. Biomed. Sci. Res.* **11**, 485–493. (doi:10.34297/AJBSR.2021.11.001682)
56. Ho T-C, Chang C-C, Chan H-P, Chung T-W, Shu C-W, Chuang K-P, Duh T-H, Yang M-H, Tyan Y-C. 2022 Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules* **27**, 2902. (doi:10.3390/molecules27092902)
57. Bashir S, Hina M, Iqbal J, Rajpar AH, Mujtaba MA, Alghamdi NA, Wageh S, Ramesh K, Ramesh S. 2020 Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers* **12**, 2702. (doi:10.3390/polym12112702)
58. Ahmad Z, Salman S, Khan SA, Amin A, Rahman ZU, Al-Ghamdi YO, Akhtar K, Bakhsh EM, Khan SB. 2022 Versatility of Hydrogels: From Synthetic Strategies, Classification, and Properties to Biomedical Applications. *Gels* **8**, 167. (doi:10.3390/gels8030167)
59. Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. 2014 Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **79–80**, 3–18. (doi:10.1016/j.addr.2014.06.005)
60. Chimene D, Lennox KK, Kaunas RR, Gaharwar AK. 2016 Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective. *Ann. Biomed. Eng.* **44**, 2090–2102. (doi:10.1007/s10439-016-1638-y)
61. Murphy SV, Atala A. 2014 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 773–785. (doi:10.1038/nbt.2958)
62. Daristotle JL, Behrens AM, Sandler AD, Kofinas P. 2016 A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 34951–34963. (doi:10.1021/acsami.6b12994)
63. Chen Y *et al.* 2015 Three-dimensional poly-(ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds directly promote the cardiomyocyte differentiation of murine-induced pluripotent stem cells through Wnt/ β -catenin signaling. *BMC Cell Biol.* **16**, 22. (doi:10.1186/s12860-015-0067-3)
64. Abu Owida H, Al-Nabulsi JI, Alnaimat F, Al Sharah A, Al-Ayyad M, Turab NM, Abdullah M. 2022 Advancement of Nanofibrous Mats and Common Useful Drug Delivery Applications. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* **2022**, 1–14. (doi:10.1155/2022/9073837)
65. Liu Q, Chen Z, Pei X, Guo C, Teng K, Hu Y, Xu Z, Qian X. 2020 Review: applications, effects and the prospects for electrospun nanofibrous mats in membrane separation. *J. Mater. Sci.* **55**, 893–924. (doi:10.1007/s10853-019-04012-7)
66. Ghaedamini S, Hashemibeni B, Honarvar A, Rabiei A, Karbasi S. 2024 Recent Innovations in Strategies for Breast Cancer Therapy by Electrospun Scaffolds: A Review. *J. Polym. Environ.* **32**, 1001–1027. (doi:10.1007/s10924-023-03022-6)

67. Singh RK, Patel KD, Lee JH, Lee E-J, Kim J-H, Kim T-H, Kim H-W. 2014 Potential of Magnetic Nanofiber Scaffolds with Mechanical and Biological Properties Applicable for Bone Regeneration. *PLoS ONE* **9**, e91584. (doi:10.1371/journal.pone.0091584)
68. Xue J, Xie J, Liu W, Xia Y. 2017 Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. *Acc. Chem. Res.* **50**, 1976–1987. (doi:10.1021/acs.accounts.7b00218)
69. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. 2011 Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **98B**, 379–386. (doi:10.1002/jbm.b.31862)
70. Bhardwaj N, Kundu SC. 2010 Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* **28**, 325–347. (doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004)
71. Guckenberger DJ, De Groot TE, Wan AMD, Beebe DJ, Young EWK. 2015 Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab. Chip* **15**, 2364–2378. (doi:10.1039/C5LC00234F)
72. Ma J, Jiang L, Pan X, Ma H, Lin B, Qin J. 2010 A simple photolithography method for microfluidic device fabrication using sunlight as UV source. *Microfluid. Nanofluidics* **9**, 1247–1252. (doi:10.1007/s10404-010-0630-3)
73. Amin R, Knowlton S, Hart A, Yenilmez B, Ghaderinezhad F, Katebifar S, Messina M, Khademhosseini A, Tasoglu S. 2016 3D-printed microfluidic devices. *Biofabrication* **8**, 022001. (doi:10.1088/1758-5090/8/2/022001)
74. Aralekallu S, Boddula R, Singh V. 2023 Development of glass-based microfluidic devices: A review on its fabrication and biologic applications. *Mater. Des.* **225**, 111517. (doi:10.1016/j.matdes.2022.111517)
75. Liu K, Fan ZH. 2011 Thermoplastic microfluidic devices and their applications in protein and DNA analysis. *The Analyst* **136**, 1288. (doi:10.1039/c0an00969e)
76. Zhou J, Ellis AV, Voelcker NH. 2010 Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *ELECTROPHORESIS* **31**, 2–16. (doi:10.1002/elps.200900475)
77. Miranda I, Souza A, Sousa P, Ribeiro J, Castanheira EMS, Lima R, Minas G. 2021 Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review. *J. Funct. Biomater.* **13**, 2. (doi:10.3390/jfb13010002)
78. Hamed H, Eldiasty M, Seyedi-Sahebari S-M, Abou-Ziki JD. 2023 Applications, materials, and fabrication of micro glass parts and devices: An overview. *Mater. Today* **66**, 194–220. (doi:10.1016/j.mattod.2023.03.005)
79. Johnson AS, Anderson KB, Halpin ST, Kirkpatrick DC, Spence DM, Martin RS. 2013 Integration of multiple components in polystyrene-based microfluidic devices part I: fabrication and characterization. *The Analyst* **138**, 129–136. (doi:10.1039/C2AN36168J)
80. Wan AMD, Devadas D, Young EWK. 2017 Recycled polymethylmethacrylate (PMMA) microfluidic devices. *Sens. Actuators B Chem.* **253**, 738–744. (doi:10.1016/j.snb.2017.07.011)

81. Ogończyk D, Węgrzyn J, Jankowski P, Dąbrowski B, Garstecki P. 2010 Bonding of microfluidic devices fabricated in polycarbonate. *Lab. Chip* **10**, 1324. (doi:10.1039/b924439e)
82. Aghvami SA, Opathalage A, Zhang ZK, Ludwig M, Heymann M, Norton M, Wilkins N, Fraden S. 2017 Rapid prototyping of cyclic olefin copolymer (COC) microfluidic devices. *Sens. Actuators B Chem.* **247**, 940–949. (doi:10.1016/j.snb.2017.03.023)
83. Shakeri A, Khan S, Jarad NA, Didar TF. 2022 The Fabrication and Bonding of Thermoplastic Microfluidics: A Review. *Materials* **15**, 6478. (doi:10.3390/ma15186478)
84. Elvira KS, Gielen F, Tsai SSH, Nightingale AM. 2022 Materials and methods for droplet microfluidic device fabrication. *Lab. Chip* **22**, 859–875. (doi:10.1039/D1LC00836F)
85. Niculescu A-G, Chircov C, Bîrcă AC, Grumezescu AM. 2021 Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2011. (doi:10.3390/ijms22042011)
86. Abudupataer M *et al.* 2020 Bioprinting a 3D vascular construct for engineering a vessel-on-a-chip. *Biomed. Microdevices* **22**, 10. (doi:10.1007/s10544-019-0460-3)
87. Richard C, Neild A, Cadarso VJ. 2020 The emerging role of microfluidics in multi-material 3D bioprinting. *Lab. Chip* **20**, 2044–2056. (doi:10.1039/C9LC01184F)
88. Liu J, Miller K, Ma X, Dewan S, Lawrence N, Whang G, Chung P, McCulloch AD, Chen S. 2020 Direct 3D bioprinting of cardiac micro-tissues mimicking native myocardium. *Biomaterials* **256**, 120204. (doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120204)
89. Sia SK, Whitesides GM. 2003 Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *ELECTROPHORESIS* **24**, 3563–3576. (doi:10.1002/elps.200305584)
90. Mathur A *et al.* 2015 Human iPSC-based Cardiac Microphysiological System For Drug Screening Applications. *Sci. Rep.* **5**, 8883. (doi:10.1038/srep08883)
91. Grist S, Schmok J, Liu M-C, Chrostowski L, Cheung K. 2015 Designing a Microfluidic Device with Integrated Ratiometric Oxygen Sensors for the Long-Term Control and Monitoring of Chronic and Cyclic Hypoxia. *Sensors* **15**, 20030–20052. (doi:10.3390/s150820030)
92. Marsano A, Conficconi C, Lemme M, Occhetta P, Gaudiello E, Votta E, Cerino G, Redaelli A, Rasponi M. 2016 Beating heart on a chip: a novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues. *Lab. Chip* **16**, 599–610. (doi:10.1039/C5LC01356A)
93. Dou W *et al.* 2022 Microengineered platforms for characterizing the contractile function of in vitro cardiac models. *Microsyst. Nanoeng.* **8**, 26. (doi:10.1038/s41378-021-00344-0)
94. Soltantabar P, Calubaquib EL, Mostafavi E, Ghazavi A, Stefan MC. 2021 Heart/liver-on-a-chip as a model for the evaluation of cardiotoxicity induced by chemotherapies. *Organs-on-Chip* **3**, 100008. (doi:10.1016/j.ooc.2021.100008)

95. Stoppel WL, Kaplan DL, Black LD. 2016 Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **96**, 135–155. (doi:10.1016/j.addr.2015.07.009)
96. Kobuszevska A, Tomecka E, Zukowski K, Jastrzebska E, Chudy M, Dybko A, Renaud P, Brzozka Z. 2017 Heart-on-a-Chip: An Investigation of the Influence of Static and Perfusion Conditions on Cardiac (H9C2) Cell Proliferation, Morphology, and Alignment. *SLAS Technol.* **22**, 536–546. (doi:10.1177/2472630317705610)
97. Mohd Said M, Yunas J, Bais B, Hamzah A, Yeop Majlis B. 2017 The Design, Fabrication, and Testing of an Electromagnetic Micropump with a Matrix-Patterned Magnetic Polymer Composite Actuator Membrane. *Micromachines* **9**, 13. (doi:10.3390/mi9010013)
98. Xu F, Jin H, Liu L, Yang Y, Cen J, Wu Y, Chen S, Sun D. 2024 Architecture design and advanced manufacturing of heart-on-a-chip: scaffolds, stimulation and sensors. *Microsyst. Nanoeng.* **10**, 96. (doi:10.1038/s41378-024-00692-7)
99. Lee C-Y, Chen Z-H, Chang H-T, Cheng C-H, Wen C-Y. 2008 Design and Fabrication of a Novel Micro Electromagnetic Actuator. (doi:10.48550/ARXIV.0805.0935)
100. Kreutzer J, Viehrig M, Pölönen R-P, Zhao F, Ojala M, Aalto-Setälä K, Kallio P. 2020 Pneumatic unidirectional cell stretching device for mechanobiological studies of cardiomyocytes. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **19**, 291–303. (doi:10.1007/s10237-019-01211-8)
101. Kolanowski TJ *et al.* 2020 Enhanced structural maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes under a controlled microenvironment in a microfluidic system. *Acta Biomater.* **102**, 273–286. (doi:10.1016/j.actbio.2019.11.044)
102. Uslu FE, Davidson CD, Mailand E, Bouklas N, Baker BM, Sakar MS. 2021 Engineered Extracellular Matrices with Integrated Wireless Microactuators to Study Mechanobiology. *Adv. Mater.* **33**, 2102641. (doi:10.1002/adma.202102641)
103. Lui C, Chin AF, Park S, Yeung E, Kwon C, Tomaselli G, Chen Y, Hibino N. 2021 Mechanical stimulation enhances development of scaffold-free, 3D-printed, engineered heart tissue grafts. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **15**, 503–512. (doi:10.1002/term.3188)
104. López-Canosa A, Perez-Amodio S, Yanac-Huertas E, Ordoño J, Rodriguez-Trujillo R, Samitier J, Castaño O, Engel E. 2021 A microphysiological system combining electrospun fibers and electrical stimulation for the maturation of highly anisotropic cardiac tissue. *Biofabrication* **13**, 035047. (doi:10.1088/1758-5090/abff12)
105. You Y, Xu F, Liu L, Chen S, Ding Z, Sun D. 2024 Construction of Thick Myocardial Tissue through Layered Seeding in Multi-Layer Nanofiber Scaffolds. *Polymers* **16**, 2664. (doi:10.3390/polym16182664)
106. Williams K, Liang T, Massé S, Khan S, Hatkar R, Keller G, Nanthakumar K, Nunes SS. 2021 A 3-D human model of complex cardiac arrhythmias. *Acta Biomater.* **132**, 149–161. (doi:10.1016/j.actbio.2021.03.004)

107. Horton RE, Yadid M, McCain ML, Sheehy SP, Pasqualini FS, Park S-J, Cho A, Campbell P, Parker KK. 2016 Angiotensin II Induced Cardiac Dysfunction on a Chip. *PLOS ONE* **11**, e0146415. (doi:10.1371/journal.pone.0146415)
108. Nunes SS, Feric N, Pahnke A, Miklas JW, Li M, Coles J, Gagliardi M, Keller G, Radisic M. 2017 Human Stem Cell-Derived Cardiac Model of Chronic Drug Exposure. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 1911–1921. (doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00496)
109. Carreau A, Hafny-Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. 2011 Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 1239–1253. (doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x)
110. McKeown SR. 2014 Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *Br. J. Radiol.* **87**, 20130676. (doi:10.1259/bjr.20130676)
111. Funamoto K, Zervantonakis IK, Liu Y, Ochs CJ, Kim C, Kamm RD. 2012 A novel microfluidic platform for high-resolution imaging of a three-dimensional cell culture under a controlled hypoxic environment. *Lab. Chip* **12**, 4855. (doi:10.1039/c2lc40306d)
112. Busek M, Grünzner S, Steege T, Klotzbach U, Sonntag F. 2016 Hypoxia-on-a-chip: Generating hypoxic conditions in microfluidic cell culture systems. *Curr. Dir. Biomed. Eng.* **2**, 71–75. (doi:10.1515/cdbme-2016-0019)
113. Li C, Zhao R, Yang H, Ren L. 2023 Construction of Bone Hypoxic Microenvironment Based on Bone-on-a-Chip Platforms. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6999. (doi:10.3390/ijms24086999)
114. Barmaki S, Jokinen V, Obermaier D, Blokhina D, Korhonen M, Ras RHA, Vuola J, Franssila S, Kankuri E. 2018 A microfluidic oxygen sink to create a targeted cellular hypoxic microenvironment under ambient atmospheric conditions. *Acta Biomater.* **73**, 167–179. (doi:10.1016/j.actbio.2018.04.007)
115. Veldhuizen J, Chavan R, Moghadas B, Park JG, Kodibagkar VD, Migrino RQ, Nikkhah M. 2022 Cardiac ischemia on-a-chip to investigate cellular and molecular response of myocardial tissue under hypoxia. *Biomaterials* **281**, 121336. (doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121336)
116. Noor N, Shapira A, Edri R, Gal I, Wertheim L, Dvir T. 2019 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Adv. Sci.* **6**, 1900344. (doi:10.1002/advs.201900344)
117. Cao J, Chen X, Huang S, Shi W, Fan Q, Gong Y, Peng Y, Wu L, Yang C. 2023 Microfluidics-based single cell analysis: from transcriptomics to spatiotemporal multi-omics. *TrAC Trends Anal. Chem.* **158**, 116868. (doi:10.1016/j.trac.2022.116868)
118. Trinh KTL, Stabler RA, Lee NY. 2020 Fabrication of a foldable all-in-one point-of-care molecular diagnostic microdevice for the facile identification of multiple pathogens. *Sens. Actuators B Chem.* **314**, 128057. (doi:10.1016/j.snb.2020.128057)
119. Wang C, Hu W, Guan L, Yang X, Liang Q. 2022 Single-cell metabolite analysis on a microfluidic chip. *Chin. Chem. Lett.* **33**, 2883–2892. (doi:10.1016/j.cclet.2021.10.006)

120. Xu X, Wang J, Wu L, Guo J, Song Y, Tian T, Wang W, Zhu Z, Yang C. 2020 Microfluidic Single-Cell Omics Analysis. *Small* **16**, 1903905. (doi:10.1002/smll.201903905)
121. Tsai H-F, Podder S, Chen P-Y. 2023 Microsystem Advances through Integration with Artificial Intelligence. *Micromachines* **14**, 826. (doi:10.3390/mi14040826)
122. Ma X, Guo G, Wu X, Wu Q, Liu F, Zhang H, Shi N, Guan Y. 2023 Advances in Integration, Wearable Applications, and Artificial Intelligence of Biomedical Microfluidics Systems. *Micromachines* **14**, 972. (doi:10.3390/mi14050972)
123. Zare Harofte S, Soltani M, Siavashy S, Raahemifar K. 2022 Recent Advances of Utilizing Artificial Intelligence in Lab on a Chip for Diagnosis and Treatment. *Small* **18**, 2203169. (doi:10.1002/smll.202203169)
124. Butler D, Reyes DR. 2024 Heart-on-a-chip systems: disease modeling and drug screening applications. *Lab. Chip* **24**, 1494–1528. (doi:10.1039/D3LC00829K)
125. Ghasemi A, Amiri H, Zare H, Masroor M, Hasanzadeh A, Beyzavi A, Aref AR, Karimi M, Hamblin MR. 2017 Carbon nanotubes in microfluidic lab-on-a-chip technology: current trends and future perspectives. *Microfluid. Nanofluidics* **21**, 151. (doi:10.1007/s10404-017-1989-1)
126. Wang L, Lin F, Miao R, Zhao T, Liu Y, Yang L, Zhang M. 2025 Cardiac protection of wogonin in mice with pulmonary fibrosis by regulating Sirt1/ γ -H2AX pathway. *Front. Pharmacol.* **16**, 1551141. (doi:10.3389/fphar.2025.1551141)
127. Zhou J, Zhou H, Zhu J, Fang S. 2025 Kaempferol inhibits cardiomyocyte pyroptosis via promoting O-GlcNAcylation of GSDME and improved acute myocardial infarction. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **26**, 76. (doi:10.1186/s40360-025-00908-0)
128. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. 2013 Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* **8**, 162–175. (doi:10.1038/nprot.2012.150)
129. Liszewska E, Majchrowicz L, Krogulec E, Kotulska K, Kaczmarek L, Kalita K, Dobrzyń A, Jaworski J. 2021 Establishment of two hiPSC lines (IIMCBi001-A and IIMCBi002-A) from dermal fibroblasts of healthy donors and characterization of their cell cycle. *Stem Cell Res.* **52**, 102225. (doi:10.1016/j.scr.2021.102225)
130. Allen ACB, Barone E, Momtahan N, Crosby CO, Tu C, Deng W, Polansky K, Zoldan J. 2019 Temporal Impact of Substrate Anisotropy on Differentiating Cardiomyocyte Alignment and Functionality. *Tissue Eng. Part A* **25**, 1426–1437. (doi:10.1089/ten.tea.2018.0258)
131. Tsukamoto Y, Akagi T, Akashi M. 2020 Vascularized cardiac tissue construction with orientation by layer-by-layer method and 3D printer. *Sci. Rep.* **10**, 5484. (doi:10.1038/s41598-020-59371-y)
132. Lai W-Y, Feng S-W, Chan Y-H, Chang W-J, Wang H-T, Huang H-M. 2018 In Vivo Investigation into Effectiveness of Fe₃O₄/PLLA Nanofibers for Bone Tissue Engineering Applications. *Polymers* **10**, 804. (doi:10.3390/polym10070804)

133. Xia Y *et al.* 2018 Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials* **183**, 151–170. (doi:10.1016/j.biomaterials.2018.08.040)
134. Peng J, Zhao J, Long Y, Xie Y, Nie J, Chen L. 2019 Magnetic Materials in Promoting Bone Regeneration. *Front. Mater.* **6**, 268. (doi:10.3389/fmats.2019.00268)
135. Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. 2019 Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chem. Rev.* **119**, 5298–5415. (doi:10.1021/acs.chemrev.8b00593)
136. Xie X *et al.* 2020 Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue regeneration. *J. Mater. Sci. Technol.* **59**, 243–261. (doi:10.1016/j.jmst.2020.04.037)
137. Agarwal S, Greiner A, Wendorff JH. 2009 Electrospinning of Manmade and Biopolymer Nanofibers—Progress in Techniques, Materials, and Applications. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 2863–2879. (doi:10.1002/adfm.200900591)
138. Feng C, Khulbe KC, Matsuura T. 2010 Recent progress in the preparation, characterization, and applications of nanofibers and nanofiber membranes via electrospinning/interfacial polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **115**, 756–776. (doi:10.1002/app.31059)
139. Greiner A, Wendorff JH. 2007 Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 5670–5703. (doi:10.1002/anie.200604646)
140. Agarwal S, Jiang S. 2015 Nanofibers and Electrospinning. In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials* (eds S Kobayashi, K Müllen), pp. 1–15. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. (doi:10.1007/978-3-642-36199-9_370-1)
141. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. 2003 A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **63**, 2223–2253. (doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7)
142. Bin S, Wang A, Guo W, Yu L, Feng P. 2020 Micro Magnetic Field Produced by Fe₃O₄ Nanoparticles in Bone Scaffold for Enhancing Cellular Activity. *Polymers* **12**, 2045. (doi:10.3390/polym12092045)
143. Singh RK, Patel KD, Lee JH, Lee E-J, Kim J-H, Kim T-H, Kim H-W. 2014 Potential of Magnetic Nanofiber Scaffolds with Mechanical and Biological Properties Applicable for Bone Regeneration. *PLoS ONE* **9**, e91584. (doi:10.1371/journal.pone.0091584)
144. Chen H *et al.* 2018 Magnetic Cell–Scaffold Interface Constructed by Superparamagnetic IONP Enhanced Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 44279–44289. (doi:10.1021/acsami.8b17427)
145. Kołodziejek D, Łopianiak I, Tadko O, Drozd M, Wojasiński M, Jastrzębska E. 2023 Magnetic polyurethane nanomaterials: A novel approach for in vitro cardiac cell maturation and culture. *Polym. Test.* **127**, 108190. (doi:10.1016/j.polymertesting.2023.108190)
146. Rothbauer M, Zirath H, Ertl P. 2018 Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies. *Lab. Chip* **18**, 249–270. (doi:10.1039/C7LC00815E)

147. Karimi M, Bahrami S, Mirshekari H, Basri SMM, Nik AB, Aref AR, Akbari M, Hamblin MR. 2016 Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering. *Lab. Chip* **16**, 2551–2571. (doi:10.1039/C6LC00489J)
148. Sin ML, Gao J, Liao JC, Wong PK. 2011 System Integration - A Major Step toward Lab on a Chip. *J. Biol. Eng.* **5**, 6. (doi:10.1186/1754-1611-5-6)
149. Agarwal A, Goss JA, Cho A, McCain ML, Parker KK. 2013 Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies. *Lab. Chip* **13**, 3599. (doi:10.1039/c3lc50350j)
150. Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. 2011 Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomaterials* **32**, 5615–5624. (doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.042)
151. Rana NK, Singh P, Koch B. 2019 CoCl₂ simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. *Biol. Res.* **52**, 12. (doi:10.1186/s40659-019-0221-z)
152. Kobuszewska A, Kolodziejek D, Wojasinski M, Jastrzebska E, Ciach T, Brzozka Z. 2021 Lab-on-a-chip system integrated with nanofiber mats used as a potential tool to study cardiovascular diseases (CVDs). *Sens. Actuators B Chem.* **330**, 129291. (doi:10.1016/j.snb.2020.129291)
153. Zhao R-Z, Jiang S, Ru N-Y, Jiao B, Yu Z-B. 2019 Comparison of hypoxic effects induced by chemical and physical hypoxia on cardiomyocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **97**, 980–988. (doi:10.1139/cjpp-2019-0092)
154. Kobuszewska A, Kolodziejek D, Wojasinski M, Ciach T, Brzozka Z, Jastrzebska E. 2021 Study of Stem Cells Influence on Cardiac Cells Cultured with a Cyanide-P-Trifluoromethoxyphenylhydrazine in Organ-on-a-Chip System. *Biosensors* **11**, 131. (doi:10.3390/bios11050131)
155. Kołodziejek D, Sierańska U, Iwoń Z, Łopianiak I, Krogulec E, Wojasiński M, Jastrzębska E. 2024 Cardiac tissue modeling using flow microsystems and nanofiber mats: Evaluating hypoxia-induced cellular and molecular changes. *Sens. Actuators B Chem.* **403**, 135169. (doi:10.1016/j.snb.2023.135169)
156. Cruz-Moreira D, Visone R, Vasques-Nóvoa F, S. Barros A, Leite-Moreira A, Redaelli A, Moretti M, Rasponi M. 2021 Assessing the influence of perfusion on cardiac microtissue maturation: A heart-on-chip platform embedding peristaltic pump capabilities. *Biotechnol. Bioeng.* **118**, 3128–3137. (doi:10.1002/bit.27836)
157. Solís C, Robinson JM. 2020 Cardiac troponin and tropomyosin bind to F-actin cooperatively, as revealed by fluorescence microscopy. *FEBS Open Bio* **10**, 1362–1372. (doi:10.1002/2211-5463.12876)
158. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. 2000 Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiol. Rev.* **80**, 853–924. (doi:10.1152/physrev.2000.80.2.853)

159. Herron TJ, McDonald KS. 2002 Small Amounts of α -Myosin Heavy Chain Isoform Expression Significantly Increase Power Output of Rat Cardiac Myocyte Fragments. *Circ. Res.* **90**, 1150–1152. (doi:10.1161/01.RES.0000022879.57270.11)
160. Chopra A *et al.* 2018 Force Generation via β -Cardiac Myosin, Titin, and α -Actinin Drives Cardiac Sarcomere Assembly from Cell-Matrix Adhesions. *Dev. Cell* **44**, 87-96.e5. (doi:10.1016/j.devcel.2017.12.012)
161. Ahmed RE, Tokuyama T, Anzai T, Chanthra N, Uosaki H. 2022 Sarcomere maturation: function acquisition, molecular mechanism, and interplay with other organelles. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **377**, 20210325. (doi:10.1098/rstb.2021.0325)
162. Li W *et al.* 2025 Comprehensive promotion of iPSC-CM maturation by integrating metabolic medium with nanopatterning and electrostimulation. *Nat. Commun.* **16**, 2785. (doi:10.1038/s41467-025-58044-6)
163. Ghosh LD, Jain A, Sundaresan NR, Chatterjee K. 2018 Elucidating molecular events underlying topography mediated cardiomyogenesis of stem cells on 3D nanofibrous scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **88**, 104–114. (doi:10.1016/j.msec.2018.03.012)
164. Sapir Y, Polyak B, Cohen S. 2014 Cardiac tissue engineering in magnetically actuated scaffolds. *Nanotechnology* **25**, 014009. (doi:10.1088/0957-4484/25/1/014009)
165. Bidan CM *et al.* 2018 Magneto-active substrates for local mechanical stimulation of living cells. *Sci. Rep.* **8**, 1464. (doi:10.1038/s41598-018-19804-1)
166. Kopeć K, Podgórski R, Ciach T, Wojasiński M. 2023 System for Patterning Polydopamine and VAPG Peptide on Polytetrafluoroethylene and Biodegradable Polyesters for Patterned Growth of Smooth Muscle Cells In Vitro. *ACS Omega* **8**, 22055–22066. (doi:10.1021/acsomega.3c02114)
167. Shah N, Morsi Y, Manasseh R. 2014 From mechanical stimulation to biological pathways in the regulation of stem cell fate. *Cell Biochem. Funct.* **32**, 309–325. (doi:10.1002/cbf.3027)
168. Subramony SD, Dargis BR, Castillo M, Azeloglu EU, Tracey MS, Su A, Lu HH. 2013 The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation. *Biomaterials* **34**, 1942–1953. (doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.012)
169. Ingber DE. 2022 Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat. Rev. Genet.* **23**, 467–491. (doi:10.1038/s41576-022-00466-9)
170. Lin X, Sun L, Lu M, Zhao Y. 2023 Biomimetic Gland Models with Engineered Stratagems. *Research* **6**, 0232. (doi:10.34133/research.0232)
171. Jastrzebska E, Tomecka E, Jesion I. 2016 Heart-on-a-chip based on stem cell biology. *Biosens. Bioelectron.* **75**, 67–81. (doi:10.1016/j.bios.2015.08.012)
172. Zhang F *et al.* 2021 Design and fabrication of an integrated heart-on-a-chip platform for construction of cardiac tissue from human iPSC-derived cardiomyocytes and in situ evaluation of physiological function. *Biosens. Bioelectron.* **179**, 113080. (doi:10.1016/j.bios.2021.113080)

173. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. 2007 Stem Cells: A Revolution in Therapeutics—Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **82**, 252–264. (doi:10.1038/sj.clpt.6100301)
174. Däster S *et al.* 2017 Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget* **8**, 1725–1736. (doi:10.18632/oncotarget.13857)
175. Sokolowska P, Jastrzebska E, Dobrzyn A, Brzozka Z. 2022 Investigation of the Therapeutic Potential of New Antidiabetic Compounds Using Islet-on-a-Chip Microfluidic Model. *Biosensors* **12**, 302. (doi:10.3390/bios12050302)
176. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. 2012 Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp. 229–317. Elsevier. (doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7)
177. Tanaka T *et al.* 2009 In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **385**, 497–502. (doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.073)
178. Yu R, Lendahl U, Nistér M, Zhao J. 2020 Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges. *Front. Endocrinol.* **11**, 374. (doi:10.3389/fendo.2020.00374)
179. Sack M. 2006 Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovasc. Res.* **72**, 210–219. (doi:10.1016/j.cardiores.2006.07.010)
180. Zhu H, Bunn HF. 2001 How Do Cells Sense Oxygen? *Science* **292**, 449–451. (doi:10.1126/science.1060849)
181. Neubauer S. 2007 The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1140–1151. (doi:10.1056/NEJMra063052)
182. Murphy E, Steenbergen C. 2008 Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol. Rev.* **88**, 581–609. (doi:10.1152/physrev.00024.2007)
183. Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD, Hansford RG. 1995 Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J. Physiol.* **486**, 1–13. (doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020786)
184. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. 2010 Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1797**, 1171–1177. (doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.011)
185. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. 1993 Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ. Res.* **72**, 1293–1299. (doi:10.1161/01.RES.72.6.1293)

186. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. 1986 Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124–1136. (doi:10.1161/01.CIR.74.5.1124)
187. Sid-Otmane C, Perrault LP, Ly HQ. 2020 Mesenchymal stem cell mediates cardiac repair through autocrine, paracrine and endocrine axes. *J. Transl. Med.* **18**, 336. (doi:10.1186/s12967-020-02504-8)
188. Xu C, Xie Y, Wang B. 2024 Genetically modified mesenchymal stromal cells: a cell-based therapy offering more efficient repair after myocardial infarction. *Stem Cell Res. Ther.* **15**, 323. (doi:10.1186/s13287-024-03942-7)

12. Spis Rycin

Rycina 1 Przykłady systemów typu Organ-on-a-Chip, takich jak Brain-on-a-Chip, Lung-on-a-Chip, Heart-on-a-Chip, Liver-on-a-Chip, Kidney-on-a-Chip i Gut-on-a-Chip. Które wykorzystywane są do naśladowania mikrośrodowiska poszczególnych organów.....	19
Rycina 2 A) Schemat przedstawiający prawidłową tętnicę wieńcową z normalnym przepływem krwi a także przekrój prawidłowej tętnicy. B) Schemat przedstawiający tętnicę wieńcową wraz ze złożami cholesterolu (blaszka miażdżycowa). Obecność złożeń cholesterolu powoduje zmniejszenie ilości przepływającej krwi.[17]	22
Rycina 3 Mechanizm aktywacji szlaku UPR. [34].....	27
Rycina 4 Schematyczne przedstawienie metody fotolitografii oraz litografii miękkiej.[72]...	33
Rycina 5 Schematyczne przedstawienie procesu mikrofrezowania mikrosystemów przepływowych[58].....	34
Rycina 6 A) Symulacja przepływów generowanych w trzech badanych mikroukładach: komora okrągła, komora podłużna i mikrokanały z mikrokolumnami; B) Komórki H9C2 w hodowlach statycznych wybarwione CAM (zielony) i PI (czerwony) ostatniego dnia hodowli; C) komórki H9C2 w hodowlach przepływowych wybarwione CAM (zielony) i PI (czerwony) ostatniego dnia hodowli.	37
Rycina 7 A,B) Schematy konstrukcji mikrosystemu; C) Orientacja sarkomerów w komórkach w mikroukładach nie poddawanych rozciąganiu, poddawanych rozciąganiu i w hodowli na płytce wielodołkowej. CV = wariancja, gdzie 0 to ułożenie jednakowe, a 1 to ułożenie zupełnie losowe. n = liczba badanych komórek, * oznacza $p < 0,001$	38
Rycina 8 A) maksymalna szybkość przepływu medium komórkowego w różnych miejscach układu. B) wartości naprężeń ścinających generowanych w komorze hodowlanej przepływem medium. C) zdjęcie fluorescencyjne wybarwionych prób dla hodowli z przepływem i dla hodowli statycznej. Na zielono wybarwiona jest alfa-aktyna, a na niebiesko jądra komórkowe. D) długości sarkomerów po 7 dniach hodowli dla trzech prób kontrolnych (hodowli statycznej na płytce 6-dołkowej, hodowli na chipie bez wprowadzenia przepływu i hodowli na chipie semistatycznej – z indukcją przepływu w interwałach 6h przez 5 min) oraz dla hodowli z ciągłym przepływem medium	39
Rycina 9 Schemat układu mikroprzepływowego do miejscowej indukcji hipoksji prezentowanego przez Barmaki et al. [79]. A, B, C) Schematy poszczególnych elementów mikroukładu. D) Schemat hodowli komórek w mikroukładzie z oznaczonym gradientem stężeń tlenu	42

Rycina 10 A) Schemat i B) zdjęcie zaprojektowanego uchwytu poliwęglanowego do umieszczania mat nanowłóknistych magnetycznych i hodowli komórkowej. 1* - średnica dołka w płytce 96-dołkowej, 2* - średnica dołka w płytce 24-dołkowej.....	57
Rycina 11 Geometria mikrostruktur zaprojektowanych mikrosystemów I, II a i II b.....	58
Rycina 12 Schemat przygotowania krążków, które wykorzystano do kalibracji folii tlenoczułej, a następnie sporządzenia równania kalibracji.	70
Rycina 13 Schemat zestawu służącego do wywoływania warunków niedotlenienia w mikrosystemach przepływowych. W skład aparatury wchodzi butla z azotem wraz z reduktorem, nawilżacz powietrza z płytą grzejną, rotametry (R1, R2) regulujące przepływ oraz panel sterujący.	72
Rycina 14 Zdjęcia nanocząstek magnetycznych wykonane przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego Hitachi SU8230.	81
Rycina 15 Dystrybucja wielkości nanocząstek.	81
Rycina 16 A) Obrazy ze skaningowego mikroskopu elektronowego: maty nanowłókniste PU bez i z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (MNP). B) Dystrybucja wielkości włókien bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych.....	82
Rycina 17 Zdjęciu potwierdzające właściwości magnetyczne otrzymanych mat nanowłóknistych.....	83
Rycina 18 Mapa 2D współczynnika wyciszenia intensywności fluorescencji dla nanowłókien z nanocząstkami magnetycznymi względem nanowłókien bez dodawania nanocząstek magnetycznych.....	85
Rycina 19 A) Schemat i B) fotografia opracowanego generatora pola magnetycznego, w tym magnesów neodymowych, solenoidów i polimerowych elementów. C) Odchylenie magnetycznych mat nanowłóknistych po działaniu pola magnetycznego.....	86
Rycina 20 Gęstość strumienia magnetycznego dla maksymalnych przemieszczeń próbki względem platform z magnesami neodymowymi.....	88
Rycina 21 Schemat procedury badawczej z wykorzystaniem magnetycznych mat nanowłóknistych: wytworzenie mat z poliuretanu zawierających nanocząstki Fe_3O_4 , umieszczenie mat w mikrosystemie przepływowym, wysiewanie komórek serca i stymulacja mechaniczna zmiennym polem magnetycznym.....	89
Rycina 22 A) Żywotność komórek HCM na poliuretanowych matach nanowłóknistych z nanocząstkami magnetycznymi (MNP) i bez nich, $n \geq 4$, gwiazdki oznaczają $p < 0,05$. B) Obrazy HCM w 1, 3 i 7 dniu hodowli na matach nanowłóknistych bez i z MNP. Różnicowe	

barwienie HCM za pomocą CAM (żywe komórki – zielone) i PI (martwe komórki – czerwone).	90
Rycina 23 Wyniki zmian poziomu w białek charakterystycznych dla komórek serca po 10- dniowych hodowlach na matach nanowłóknistych bez oraz z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (MNP) po i bez zastosowania pola magnetycznego, $n \geq 4$, gwiazdki oznaczają $p < 0,05$. Barwienie: troponina T i MYH 6 (sprężone z Alexa Fluor 488 – komórki zielone). Hoechst 33342 – kolor niebieski. (Skala 30 μm).	92
Rycina 24 A) Schemat mikrosystemu i składającego się z 3 warstw poliwęglan(PC), polidimetylosiloksan (PDMS) oraz poliwęglan (PC). B) Schemat mikrosytsemu i ilustrujący strefę hipoksji (niski poziom tlenu) i normoksji (21% - poziom tlenu).	95
Rycina 25 A) Schemat mikrokomory hodowlanej w mikrosystemie I, z elementami takimi jak mikrokolce i struktury do umieszczenia poliuretanowych (PU) mat nanowłóknistych. B) Zdjęcie wykonanego mikrosystemu I.....	96
Rycina 26 A) Dolna warstwa mikrosystemu przepływowego i B) Optymalizacja prędkości obrotowej wrzeciona. Zależność różnych prędkości wrzeciona od chropowatości powierzchni. Rz oznacza średnią pięciu najwyższych szczytów i najniższych dolin mierzonych na określonej długości, odzwierciedlając chropowatość powierzchni, podczas gdy Ra jest średnią arytmetyczną wartości bezwzględnych odchyłeń profilu od linii średniej mierzonej na określonej długości, wskazując teksturę powierzchni. C) Numeryczna symulacja prędkości przepływu i naprężenia ścinającego w mikrokomorze hodowlanej (I 1-7- kolejne iteracje symulacji).....	98
Rycina 27 A) Żywotność komórek H9c2 i HCM hodowanych w mikrosystemie I. Barwienie komórek H9c2 i HCM za pomocą testu CAM/PI. Żywe komórki (kolor zielony), czerwone komórki (kolor czerwony) B) Ułożenie komórek H9c2 i HCM hodowanych w mikrosystemie zintegrowanym z matami nanowłóknistymi. Kierunek wzrostu komórek określono, przyjmując orientację nanowłókien jako 0°	100
Rycina 28 A) Widmo wzbudzeniowo-emisyjne folii tlenoczułej, z pomiarami przeprowadzonymi w zakresie długości fal wzbudzenia od 300 do 670 nm i długości fal emisji od 330 do 700 nm. B) Schemat przygotowania w warstw poli(dimetylosiloksanu) (PDMS) używanych w procesie kalibracji w folii tlenoczułych C) Krzywa kalibracyjna dla w folii tlenoczułej.	101
Rycina 29 A) Schemat skonstruowanego zestawu do hipoksji, w tym butla z azotem (1), nawilżacz z grzejną płytą 1 (2), grzejna płyta 2 z termostatem (3) oraz rotametr (4). B) Schemat	

mikrosystemu i oraz metoda umieszczania folii wrażliwego na tlen C) Diagram pokazujący zmianę stężenia tlenu w mikrosystemie w funkcji czasu.	102
Rycina 30 A) Zmiany względnego poziomu ATP po 3, 5 i 7 h hodowli komórek w mikrosystemie warunkach niedotlenienia oraz normoksji. B) Zmiana ekspresji genów po 3 i 5 h niedotlenienia $n \geq 5$, $p < 0,05$	103
Rycina 31 A) Schemat ukazujący wybrane możliwości symulacji warunków w mikrosystemach przepływowych B) Schemat oraz zdjęcie mikrosystemu II a: górna i dolna warstwa PDMS wraz z matami nanowłóknistymi.	106
Rycina 32 Symulacje przepływu pokazujące rozkład medium w mikroukładzie przepływowym dla różnych szybkości przepływu (5, 15 i 30 $\mu\text{l/min}$) (po lewej) i rozkład medium w mikrokanalikach dla szybkości przepływu 15 $\mu\text{l/min}$ (po prawej).	107
Rycina 33. Zdjęcia (wykonane przy użyciu konfokalnego mikroskopu laserowego LEXT) ilustrujące odwzorowanie mikrostruktur pomiędzy pieczętką PMMA a PDMS	108
Rycina 34 Schemat przedstawiający kolejne etapy planowanych eksperymentów.	109
Rycina 35 Zdjęcia z mikroskopu SEM przedstawiające zmiany powierzchni mat nanowłóknistych z i bez dodatku nanocząstek magnetycznych po modyfikacji roztworem polidopaminy.	110
Rycina 36 A) Wykres przedstawiający zmianę liczby komórek w mikrokanale w zależności od czasu wprowadzenia komórek. B) Wyniki symulacji numerycznej (ANSYS) pokazującą rozkład komórek w mikrokanale dla różnych czasów wprowadzania komórek do mikrosystemu.	111
Rycina 37 A) Seria zdjęć przedstawiających komórki H9c2 w różnych dniach hodowli z i bez stymulacji mechaniczną. Barwienie kalceiną-AM (zielone) i jodkiem propidyny (czerwone). B) Ułożenie komórek H9c2 w zależności od zastosowanego podłoża w mikrosystemie II a.	113
Rycina 38 A) Seria zdjęć przedstawiających komórki iPSC-CMs w różnych dniach hodowli ze stymulacją mechaniczną i bez niej. Barwienie kalceiną-AM (zielone) i jodkiem propidyny (czerwone). B) Ułożenie komórek iPSC-CMs w zależności od zastosowanego podłoża w mikrosystemie II a.	114
Rycina 39 A) Zdjęcia komórek H9c2 po zimmunobarwieniu a F-aktyny (kolor czerwony), troponina T (kolor zielony), MYH6 (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski). B) Określone współczynniki kolokalizacji dla Troponiny T i F-aktyny oraz MYH6 i F-aktyny w komórkach H9c2. $N \geq 5$, $p < 0,05$	116

Rycina 40 A) Zdjęcia komórek iPSC-CM po immunobarwieniu F-aktyny (kolor czerwony), troponina T (kolor zielony), MYH6 (kolor zielony) i jądra komórkowe (kolor niebieski) . B) Określone współczynniki kolokalizacji dla Troponiny T i F-aktyny oraz MYH6 i F-aktyny w komórkach H9c2. $N \geq 5$, $p < 0,05$	117
Rycina 41 A) Schemat mikrosystemu II b w rzucie z góry. B) Zdjęcie wykonanego mikrosystemu II b. C) Schemat przekroju mikrokomory i mikrokanalu przepływowego. D) Obrazy mikrostruktur wykonane w pieczęcie z PMMA i warstwie PDMS. Symulacje numeryczne stężenia tlenu w mikrosystemie II b w zależności od odległości pomiędzy strefami hipoksji i normoksji.....	121
Rycina 42 A) Schemat warstw kartridża umożliwiającego prowadzenie hodowli w warunkach hipoksji. B) Schemat przekroju poprzecznego kartridża z zaznaczeniem poszczególnych warstw i komory hipoksji. C) Zdjęcie gotowego kartridża z zamontowanym mikrosystemem.	122
Rycina 43 A) Barwienie różnicowe komórek iPSC-CMs po 6 h hipoksji. B) Zmiany poziomu ATP w komórkach iPSC-CM po 6h hipoksji. C) Wyniki oznaczania poziomu JC-1 * $p < 0,05$, $n > 5$	124
Rycina 44 Schemat rozmieszczenia poszczególnych mikrokomór hodowlanych oraz typów prowadzonych współhodowli komórkowych w mikrosystemie II b. W pierwszym etapie do mikrokomór wprowadzano komórki iPSC-CM, a następnie do odpowiednich komór wprowadzano zawiesinę komórek iPSC. Obszar oznaczony literą H był oznacza strefę hipoksji, obszar oznaczony literą N oznacza strefę normoksji.	125
Rycina 45 Kokultury iPSC-CMs oraz iPSC hodowanych w warunkach normoksji i hipoksji po 5 dniach mechanicznej stymulacji w polu magnetycznym. Na zielono wybarwiona troponina T (cTnT), na czerwono komórki macierzyste iPSC (CellTracker Red CMPTX), na niebiesko jądra komórkowe (Hoechst).	126

13. Spis Tabel

Tabela 1 Sekwencje starterów zastosowanych w analizie ekspresji wybranych genów metodą RT-PCR w komórkach HCM hodowanych w mikrosystemie I.	79
Tabela 2 Właściwości mechaniczne mat nanowłóknistych z poliuretanu (PU) bez i z dodatkiem nanocząstek magnetycznych (MNPs) (maty nanowłókniste badano pod wpływem naprężenia w dwóch kierunkach: równoległym (PL) i prostopadłym (PP) do ułożenia włókien). *a - statystycznie istotne różnice między wartościami mierzonymi równolegle i prostopadle do ułożenia nanowłókien. *b - wykazano statystycznie istotne różnice między naprężeniami rozciągającymi dla materiału porowatego dla nanowłókien z i bez MNPs w kierunku równoległym do ułożenia nanowłókien. ($p < 0,05$)	84
Tabela 3 Wartości powierzchniowego potencjału zeta i kąt zwilżania dla nanowłókien z dodatkiem i bez dodatku nanocząstek magnetycznych. Wykazano, że powierzchniowy potencjał zeta nanowłókien znacznie wzrósł w przypadku nanowłókien z dodatkiem magnetycznych nanocząstek. Gwiazdki oznaczają $p < 0,05$	91
Tabela 4 Wymiary wytworzonych mikrostruktur w pieczętce PMMA i PDMS. $N \geq 3$	108

DOROBK NAUKOWY

Publikacje związane z tematyką doktoratu

1. **Kołodziejek D.**, Łopianiak I., Tadko O., Drozd M., Wojasiński M., Jastrzębska E.: Magnetic polyurethane nanomaterials: A novel approach for in vitro cardiac cell maturation and culture, *Polymer Testing*, vol. 127, 2023, Numer artykułu: 108190, s. 1-9, DOI:10.1016/j.polymertesting.2023.108190
2. **Kołodziejek D.**, Sierańska U., Iwoń Z., Łopianiak I., Krogulec E., Wojasiński M., Jastrzębska E.: Cardiac tissue modeling using flow microsystems and nanofiber mats: Evaluating hypoxia-induced cellular and molecular changes, *Sensors and Actuators B - Chemical*, Elsevier S.A., vol. 403, 2024, Numer artykułu: 135169, 135169_1-135169_11, DOI:10.1016/j.snb.2023.135169
3. **Kołodziejek D.**, Tadko O., Iwoń Z., Baranowska P., Drozd M., Wojasiński M., Jastrzębska E. „Heart-on-a-chip: A Novel Microfluidic Approach to Organ Modelling and Cellular Mechanobiology”, *Sensors and Actuators A - Physical*. (w recenzji)
4. **Kołodziejek D.**, Szlachetka A, Iwoń Z, Wojasiński M., Jastrzębska E. “New Insights into Cardiovascular Disease: Hypoxia and Mechanical Stimulation in Heart-on-a-Chip Microfluidic Systems” *Lab-on-a-chip* (w recenzji)

Publikacje niezwiązane z tematyką doktoratu

1. Kobuszevska A., **Kołodziejek D.**, Wojasiński M., Ciach T., Brzózska Z., Jastrzębska E.: Study of stem cells influence on cardiac cells cultured with a cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone in Organ-on-a-Chip system, *Biosensors, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, vol. 11, nr 5, 2021, Numer artykułu: 131, s. 1-14, DOI:10.3390/bios11050131
2. Kobuszevska A., **Kołodziejek D.**, Wojasiński M., Jastrzębska E., Ciach T., Brzózska Z.: Lab-on-a-chip system integrated with nanofiber mats used as a potential tool to study cardiovascular diseases (CVDs), *Sensors and Actuators B - Chemical*, Elsevier S.A., vol. 330, 2021, Numer artykułu: 129291, s. 1-12, DOI:10.1016/j.snb.2020.129291
3. Konopka J., **Kołodziejek D.**, Flont M., Żuchowska A., Jastrzębska E., Brzózska Z.: Exploring Endothelial Expansion on a Chip, *Sensors, Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, vol. 22, 2022, Numer artykułu: s22239414, 9414_1 - 9414_15, DOI:10.3390/s2223941

4. Baranowska P., Kopińska M., Kołodziejek D., Jastrzębska E., i Brzózka Z., „Microfluidic system for generating a three-dimensional (3D) vascularized islet-on-a-chip model”, Sens. Actuators B Chem., t. 418, s. 136302, lis. 2024, doi: 10.1016/j.snb.2024.136302.

Patenty:

1. Mikrosystem przepływowy zintegrowany z matami nanowłóknistymi do hodowli i badania regeneracji komórek „Kobuszeńska Anna, Jastrzębska Elżbieta, **Kołodziejek Dominik**, Wojasiński Michał, Żukowski Kamil, Brzózka Zbigniew, Ciach Tomasz, Wynalazek, Chroniony, Numer zgłoszenia (w pierwszym kraju zgłoszenia powyżej): P.429003, Numer patentu/prawa: **PL 240974**, Data zgłoszenia (w pierwszym kraju zgłoszenia powyżej): 21-02-2019, Data udzielenia prawa: 20-04-2022, Publikacja patentu/wzoru: [WUP 04-07-2022]

Zgłoszenia patentowe:

1. „Materiały nanowłókniste magnetyczne, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie” **Kołodziejek Dominik**, Jastrzębska Elżbieta, Drozd Marcin, Wojasiński Michał, Łopianiak Iwona. Numer zgłoszenia: P.443235
2. „Kartridż do generowania hipoksji w mikrosystemach przepływowych” **Dominik Kołodziejek**, Aleksandra Szlachetka, Elżbieta Jastrzębska, Zgłoszenie numer: P.449636
3. „System mikroprzepływowy do wielonarządowej hodowli komórkowej i jego zastosowanie” Magdalena Flont, **Dominik Kołodziejek**, Elżbieta Jastrzębska, Artur Dybko. Zgłoszenie numer: P.443644

Nagrody:

1. Kierownik grantu MedTech-Athon - Inżynierowie dla medycyny - "Opracowanie przenośnego urządzenia do monitorowania jakości powietrza" Okres realizacji: 15.03.2024-15.03.2025, Kwota finansowania: 199 525,00 zł
2. Kierownik grantu YOUNG PW – „Opracowanie nowego podłoża hodowlanego do badań nad chorobami układu krążenia” Okres realizacji: 01.07.2023-31.12.2024, Kwota finansowania: 145 400,00 zł

Wystąpienia konferencyjne:

21 wystąpień ustnych oraz posterowych na konferencjach międzynarodowych i krajowych.