

Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: mgr inż. Dominik Kołodziejek

Tytuł: *Badania nad zastosowaniem systemów Lab-on-a-Chip do analizy regeneracji komórek serca*

Dyscyplina: Biotechnologia

Promotor: prof. dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska

Rozprawa doktorska pana mgr inż. Dominika Kołodziejka została zgłoszona do oceny decyzją Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej.

Rozprawa liczy 154 strony i składa się z kilku zasadniczych części: obszernego przeglądu literatury, części doświadczalnej, prezentacji wyników, dyskusji oraz wniosków. Układ pracy jest logiczny i odpowiada typowym standardom w dziedzinie biotechnologii oraz inżynierii biomedycznej.

Autor podjął się realizacji aktualnego i wysoce interdyscyplinarnego problemu badawczego, dotyczącego opracowania modelu *Heart-on-a-Chip*. Jest to system łączący różne podejścia technologiczne: nanowłókniste podłoża z nanocząstkami magnetycznymi umożliwiające stymulację mechaniczną komórek, mikrosystemy przepływowe pozwalające na precyzyjną kontrolę warunków środowiskowych oraz układy do generowania hipoksji, odzwierciedlające warunki patologiczne. Takie zintegrowane podejście stanowi istotny krok naprzód w rozwoju nowoczesnych modeli *in vitro*.

Znaczenie tematu należy podkreślić w szerszym kontekście: badania nad systemami *organ-on-a-chip* należą obecnie do najbardziej dynamicznie rozwijających się obszarów nauk biomedycznych. Łączą one elementy biologii komórki, inżynierii materiałowej, mikrofluidyki i nanotechnologii, tworząc narzędzia o ogromnym potencjale praktycznym. Opracowanie funkcjonalnych modeli tkanek, takich jak tkanka serca, ma kluczowe znaczenie dla rozwoju medycyny regeneracyjnej, oceny bezpieczeństwa i skuteczności leków, a także ograniczenia stosowania zwierząt w badaniach eksperymentalnych.

Rozprawa mgr inż. Dominika Kołodziejka wpisuje się w ten globalny nurt badań, łącząc zaawansowane metody inżynierii biomateriałów z analizą biologiczną kardiomiocytów. Wskazuje to zarówno na wysoki poziom merytoryczny pracy, jak i na potencjał aplikacyjny opracowanego modelu *Heart-on-a-Chip*, który może znaleźć zastosowanie w testach przedklinicznych oraz badaniach podstawowych nad mechanizmami regeneracji mięśnia sercowego.

Ocena układu rozprawy

Praca podzielona jest na 13 rozdziałów, zgrupowanych w dwóch częściach, dzięki czemu jej struktura jest przejrzysta.

Pierwsza część – „Przegląd literaturowy” (rozdziały 1–5) – zawiera obszerne wprowadzenie, a następnie omówienie aktualnego stanu wiedzy o chorobach sercowo-naczyniowych, modelach hodowli komórkowej i systemach mikroprzepływowych.

Druga część – „Część doświadczalna” (rozdziały 6–9) – została jasno podzielona na etapy odpowiadające kolejnym fazom prac konstrukcyjnych zastosowanych urządzeń i układów oraz badań eksperymentalnych. Spójność narracji tej części i logika prezentacji wyników zasługują na wysoką ocenę.

Omówienie treści kolejnych rozdziałów

Rozdział 1. Wstęp

Autor wprowadza czytelnika w problematykę chorób układu sercowo-naczyniowego oraz konieczność poszukiwania nowych modeli badawczych. Jasno formułuje motywację podjęcia badań i wskazuje na rosnące zainteresowanie systemami typu *Organ-on-a-Chip*.

Rozdział 2. Choroby układu sercowo-naczyniowego

Autor omawia skalę problemu CVD na świecie i w Polsce, podając rzetelne dane epidemiologiczne. Zwraca uwagę na ograniczenia obecnych metod leczenia i diagnostyki. Rozdział jest klarowny i stanowi solidne uzasadnienie potrzeby poszukiwania nowych technologii. Pewnym mankamentem jest nadmierna ogólność niektórych fragmentów, które mogłyby zostać skrócone.

Rozdział 3. Modele komórkowe w badaniach in vitro

Przedstawiono tu przegląd modeli hodowli komórkowych – od klasycznych 2D po zaawansowane modele 3D. Autor trafnie akcentuje ograniczenia modeli 2D oraz przewagi modeli przestrzennych, co dobrze uzasadnia wybór podejścia *Heart-on-a-Chip*.

Rozdział 4. Mikrosystemy przepływowe do hodowli komórek serca

Autor omawia budowę, zastosowania i kierunki rozwoju mikrosystemów przepływowych, ze szczególnym uwzględnieniem systemów do stymulacji mechanicznej oraz generowania stanów patologicznych, takich jak hipoksja. Został tu przedstawiony aktualny stan badań światowych i wskazane luki badawcze. Tekst jest szczegółowy, dobrze zilustrowany i bardzo wartościowy.

Rozdział 5. Podsumowanie przeglądu literaturowego

Rozdział podsumowujący najważniejsze wnioski z przeglądu i wskazujący lukę badawczą, którą autor zamierza wypełnić. Pełni rolę logicznego pomostu do części doświadczalnej.

Podsumowanie kończy „Przegląd literaturowy” po czym zaczyna się „Część doświadczalna” dysertacji.

Rozdział 6. Cel pracy

Cel został sformułowany jasno: opracowanie modelu *Heart-on-a-Chip*, umożliwiającego badania regeneracji komórek serca poprzez kontrolowaną stymulację mechaniczną oraz symulację warunków patologicznych. Cel jest ambitny, a jednocześnie realistyczny i dobrze powiązany z przeglądem literatury.

Rozdział 7. Materiały, odczynniki i aparatura badawcza

Autor szczegółowo wymienia wszystkie zastosowane materiały, linie komórkowe, odczynniki oraz aparaturę. Opis jest kompletny i zapewnia powtarzalność badań. Rozdział napisany poprawnie, bez zastrzeżeń.

Rozdział 8. Metodyka badań

Najbardziej rozbudowany rozdział części eksperymentalnej. Autor opisuje wytwarzanie mat nanowłóknistych z nanocząstkami magnetycznymi, projektowanie mikrosystemów przepływowych, prowadzenie hodowli komórkowych, procedury indukowania hipoksji i metody analizy biologicznej (m.in. testy żywotności, immunofluorescencja, RT-PCR). Metody przedstawiono precyzyjnie i w sposób umożliwiający odtworzenie eksperymentów. Rozdział świadczy o dużej samodzielności i staranności autora.

Rozdział 9. Wyniki

Najobszerniejszy fragment rozprawy, podzielony na cztery podrozdziały:

- 9.1** Poświęcony hodowli komórek serca na matach nanowłóknistych. przedstawiono właściwości fizykochemiczne podłoży i wykazano ich pozytywny wpływ na organizację komórek serca oraz efekty stymulacji magnetycznej.
- 9.2** Opisujący wyniki uzyskane z **Mikrosystemu I** (do kontrolowania hipoksji). Autor udowodnił, że system umożliwia kontrolowane tworzenie warunków niedotlenienia i analizę reakcji kardiomiocytów.
- 9.3** Poświęcony wynikom z **Mikrosystemu IIa** (do stymulacji mechanicznych). Zaprezentowano to integrację mat z mikrosystemem oraz wyniki wskazujące na wspomaganie dojrzewania kardiomiocytów.
- 9.4** Opisujący wyniki uzyskane przy zastosowaniu **Mikrosystemu IIb** (hipoksja + komórki macierzyste). W tej części autor pokazał, że obecność komórek macierzystych wspiera procesy regeneracyjne kardiomiocytów poddanych hipoksji.

Prezentacja wyników jest czytelna, dobrze zilustrowana rycinami i tabelami, a dyskusja odnosi się do literatury światowej. Rozdział oceniam bardzo wysoko.

Rozdział 10. Podsumowanie i wnioski

Autor trafnie podsumowuje uzyskane wyniki, wskazując, że stworzony system *Heart-on-a-Chip* integruje kilka nowatorskich elementów i może stanowić realistyczny model badawczy serca. Wnioski są logicznie powiązane z wynikami i podkreślają oryginalny wkład pracy.

Rozdziały 11–13 (Bibliografia, Spis rycin i tabel)

Spisy rycin i tabel zostały opracowane poprawnie i ułatwiają korzystanie z pracy.

Ocena piśmiennictwa

Bibliografia jest obszerna (188 pozycji), aktualna i obejmuje literaturę międzynarodową. Obejmuje zarówno klasyczne prace z zakresu biotechnologii i inżynierii tkankowej, jak i najnowsze publikacje z lat 2018–2024 dotyczące systemów *organ-on-a-chip*. Autor poprawnie cytuje źródła i korzysta z literatury międzynarodowej (m.in. *Lab on a Chip*, *Nature Biomedical Engineering*). Dobór literatury świadczy o bardzo dobrej orientacji autora w światowym dorobku naukowym.

Cel pracy

Głównym celem rozprawy było opracowanie innowacyjnego modelu *Heart-on-a-Chip*, zdolnego do wiernego odwzorowania warunków fizjologicznych i patologicznych mięśnia sercowego w warunkach *in vitro*. Realizacja tego celu wymagała integracji wielu elementów: wytworzenia i funkcjonalizacji nanowłóknistych podłoży polimerowych z nanocząstkami magnetycznymi, zaprojektowania i zbudowania mikrosystemów przepływowych umożliwiających precyzyjne sterowanie parametrami środowiska hodowlanego, a także stworzenia warunków hipoksji, odpowiadających uszkodzeniom niedokrwiennym serca.

Tak rozumiany cel pracy miał charakter kompleksowy: obejmował zarówno opracowanie nowych narzędzi technologicznych, jak i ich praktyczną weryfikację biologiczną. Dzięki temu rozprawa nie ogranicza się wyłącznie do aspektu konstrukcyjnego (projekt mikrosystemów), ale wnosi także istotny wkład w zrozumienie mechanizmów biologicznych związanych z regeneracją mięśnia sercowego. Cel ten wpisuje się w strategiczne kierunki rozwoju nauki, łącząc inżynierię materiałową, mikrofluidykę i biologię komórki w spójną całość.

Metody badawcze

Metody badawcze zastosowane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Dominika Kołodziejka charakteryzują się dużą różnorodnością i nowoczesnością, co wynika z interdyscyplinarnego charakteru podjętych badań. Nie są one jedynie prostym zestawieniem narzędzi, ale stanowią starannie zaplanowany zestaw technik, których integracja pozwoliła na osiągnięcie ambitnych celów pracy.

Pierwszym etapem było opracowanie nanowłóknistych podłoży polimerowych, wytwarzanych metodą elektroprzędzenia. Proces ten pozwolił uzyskać maty o odpowiedniej strukturze porowatej i właściwościach mechanicznych, które następnie zostały zmodyfikowane poprzez wprowadzenie nanocząstek magnetycznych. Dzięki temu uzyskano materiał nie tylko biokompatybilny, ale także podatny na kontrolowaną stymulację zewnętrznym polem magnetycznym. Sama procedura przygotowania podłoży wymagała licznych prób optymalizacyjnych, zarówno pod kątem składu polimeru, jak i rozmieszczenia nanocząstek.

Kolejnym ważnym elementem metodologicznym było zaprojektowanie i wytworzenie mikrosystemów przepływowych. Zastosowane techniki mikroinżynierskie pozwoliły na budowę układów, w których można było precyzyjnie sterować warunkami środowiskowymi, takimi jak szybkość przepływu, skład medium czy stężenie tlenu. Szczególną wartością tych systemów była ich zdolność do symulacji hipoksji, czyli niedotlenienia – jednego z kluczowych czynników patologicznych w chorobach serca. W tym celu autor wykorzystał kalibrację czujników tlenu oraz systemy generujące kontrolowane spadki stężenia O_2 w medium hodowlanym.

Równolegle prowadzono hodowle kardiomiocytów i komórek macierzystych, które stanowiły biologiczny komponent opracowanego modelu *Heart-on-a-Chip*. Autor zastosował standardowe procedury hodowlane, a także metody indukowania różnicowania i warunki pozwalające na analizę reakcji komórek w obecności bodźców mechanicznych i hipoksji. Dużą rolę odegrało tu połączenie technik biologii molekularnej i komórkowej: testy żywotności, oznaczenia poziomu ATP, immunofluorescencja oraz RT-PCR umożliwiły szczegółową ocenę stanu i aktywności komórek.

Istotnym uzupełnieniem części eksperymentalnej były także symulacje numeryczne przepływu w mikrosystemach. Pozwoliły one na przewidywanie rozkładu prędkości i stężeń w komorach hodowlanych oraz weryfikację, czy uzyskane warunki odpowiadają zakładanym parametrom. Dzięki temu autor mógł połączyć wyniki modelowania z obserwacjami eksperymentalnymi, co znacząco zwiększyło wiarygodność uzyskanych rezultatów.

Całość metod badawczych charakteryzuje się więc wysokim stopniem integracji: od inżynierii materiałowej, przez mikrofluidykę, aż po zaawansowane techniki biologiczne i molekularne. Tak kompleksowe podejście pozwoliło nie tylko stworzyć nowy model *Heart-on-a-Chip*, ale również rzetelnie ocenić jego użyteczność w badaniach nad regeneracją mięśnia sercowego.

Wyniki i ich omówienie

Wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Dominika Kołodziejka stanowią spójny i dobrze udokumentowany zestaw danych, które wyraźnie potwierdzają skuteczność opracowanego modelu *Heart-on-a-Chip*. Autor zaprezentował je w sposób uporządkowany, w czterech głównych blokach eksperymentalnych, z których każdy wnosi istotne informacje dotyczące funkcjonowania opracowanego systemu i jego potencjału aplikacyjnego.

Pierwszym etapem była **charakterystyka hodowli komórek na matach nanowłóknistych**. Autor szczegółowo przeanalizował właściwości fizykochemiczne przygotowanych podłoży, takie jak morfologia włókien, ich sprężystość czy rozmieszczenie nanocząstek magnetycznych. Wykazano, że zastosowane modyfikacje materiałowe sprzyjały adhezji i organizacji kardiomiocytów, tworzących bardziej uporządkowane i funkcjonalne struktury niż na podłożach kontrolnych. Dodatkowo pokazano, że obecność nanocząstek umożliwia przekazywanie bodźców mechanicznych do komórek poprzez działanie zmiennego pola magnetycznego, co stanowi oryginalny element tego rozwiązania.

Następnie zaprezentowano **wyniki związane z funkcjonowaniem mikrosystemu przepływowego do indukcji hipoksji (Mikrosystem I)**. Autor udowodnił, że opracowany układ pozwala na precyzyjne kontrolowanie stężeń tlenu w medium hodowlanym, a zastosowana kalibracja czujników tlenu umożliwia wiarygodne monitorowanie warunków eksperymentalnych. Kardiomiocyty eksponowane na niedotlenienie wykazywały charakterystyczne zmiany w metabolizmie oraz w poziomach markerów biologicznych, co wskazuje, że system wiernie odwzorowuje warunki patologiczne obserwowane w uszkodzeniach niedokrwiennych mięśnia sercowego.

Kolejny zestaw wyników dotyczył **mikrosystemu do stymulacji mechanicznej (Mikrosystem IIa)**. Integracja nanowłóknistych mat z mikrosystemem przepływowym pozwoliła na prowadzenie hodowli komórek pod wpływem cyklicznych bodźców mechanicznych. Analiza biologiczna

wykazała, że komórki poddane stymulacji mechanicznej cechowały się wyższym stopniem organizacji cytoszkieletu oraz zwiększoną ekspresją markerów dojrzewania kardiomiocytów. Wyniki te potwierdzają, że mechaniczne oddziaływania odgrywają kluczową rolę w dojrzewaniu i funkcjonalności komórek serca *in vitro*.

Ostatnia część badań koncentrowała się na **mikrosystemie łączącym hipoksję z obecnością komórek macierzystych (Mikrosystem IIb)**. Eksperymenty wykazały, że ko-hodowla kardiomiocytów z komórkami macierzystymi wspiera procesy regeneracyjne i poprawia przeżywalność komórek poddanych warunkom niedotlenienia. Autor przedstawił dane wskazujące na zwiększoną ekspresję markerów regeneracji oraz wyższe wartości wskaźników żywotności, co dowodzi, że zaproponowany model może służyć do badania interakcji pomiędzy różnymi typami komórek w warunkach patologicznych.

Wszystkie wyniki zostały zilustrowane licznymi rycinami i tabelami, które są czytelne i dobrze opisane, a dyskusja w każdym podrozdziale została powiązana z literaturą światową. Autor nie ograniczył się jedynie do prezentacji danych, ale także podjął próbę interpretacji mechanizmów biologicznych leżących u podstaw obserwowanych zjawisk. Dzięki temu uzyskane wyniki zyskują większą wartość poznawczą i praktyczną.

Podsumowując, wyniki rozprawy dowodzą, że opracowany model *Heart-on-a-Chip* jest w stanie zarówno wiernie odwzorować fizjologiczne i patologiczne warunki pracy mięśnia sercowego, jak i stanowić funkcjonalne narzędzie do badań nad regeneracją tkanki serca. Uzyskane dane nie tylko potwierdzają trafność przyjętej koncepcji, ale także otwierają nowe perspektywy dla zastosowania systemów organ-on-a-chip w badaniach biomedycznych i farmakologicznych.

Zastosowanie praktyczne

Praktyczne znaczenie rozprawy należy podkreślić szczególnie mocno. Stworzony model *Heart-on-a-Chip* może być wykorzystany do testowania nowych leków kardiologicznych w warunkach laboratoryjnych, co pozwoli na wcześniejsze i dokładniejsze przewidywanie ich skuteczności oraz bezpieczeństwa. System daje również możliwość badania procesów regeneracyjnych mięśnia sercowego w kontrolowanych warunkach, co stanowi niezwykle cenne narzędzie w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Ponadto, zastosowanie takich modeli może istotnie przyczynić się do ograniczenia badań na zwierzętach, co ma zarówno wymiar etyczny, jak i praktyczny, obniżając koszty i przyspieszając procesy badawcze. Opracowany model stanowi więc krok w kierunku tworzenia spersonalizowanych platform diagnostycznych i terapeutycznych, a jego potencjał wdrożeniowy w przyszłości może być istotny zarówno dla nauki, jak i przemysłu farmaceutycznego.

Uwagi krytyczne

- W części poświęconej stymulacji mechanicznej komórek serca na magnetycznych matach nanowłóknistych zabrakło pełniejszej charakterystyki uzyskanych odkształceń. Autor opisuje budowę mat i działanie generatora pola magnetycznego, jednak nie przedstawia ilościowej analizy deformacji: amplitudy odkształceń, rodzaju sił działających na podłoże i komórki ani oszacowania wartości tych odkształceń. Brakuje także dyskusji, w jakim stopniu odpowiadają one warunkom mechanicznym pracy serca. Szczególnie wyraźnie

widać to w przypadku układu przedstawionego na Ryc. 20c, gdzie mata zaczepiona w jednym punkcie podlega głównie rotacji względem miejsca mocowania. Taki sposób stymulacji powoduje, że komórki osadzone na jej powierzchni doświadczają głównie zmiany orientacji, a nie cyklicznego rozciągania i ściskania, co jest kluczowym mechanizmem biomechanicznym w sercu. Uwzględnienie ilościowej charakterystyki odkształceń oraz ich porównania do wartości fizjologicznych istotnie wzmocniłoby wnioski dotyczące roli mechanotransdukcji.

- W niektórych rozdziałach (np. „Wstęp”) zauważalny jest brak wyraźnego podziału na akapity. Długie, zwarte fragmenty tekstu utrudniają odbiór i obniżają przejrzystość narracji.
- W „Przeglądzie literaturowym” pojawiają się fragmenty o zbyt szerokim zakresie, niezwiązane ściśle z głównym celem rozprawy – np. obszerne rozważania o chorobach ogólnoustrojowych czy prewencji CVD. Choć wskazanie szerszego kontekstu (*big picture*) jest cenne, w tym przypadku fragmenty te mogłyby zostać skrócone i bardziej skupione na zagadnieniach bliżej związanych z problematyką pracy.

Uwagi te mają charakter drugorzędny i nie umniejszają wartości pracy.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska mgr inż. Dominika Kołodziejka spełnia wszystkie wymagania określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce oraz w regulacjach Politechniki Warszawskiej. Praca charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym i znaczącą wartością poznawczą, a także oryginalnością rozwiązań technologicznych. Autor podjął się ambitnego i interdyscyplinarnego zadania, w którym z powodzeniem połączył wiedzę z zakresu inżynierii materiałowej, mikrofluidyki, biologii komórki oraz medycyny regeneracyjnej.

Najważniejsze atuty rozprawy to:

- stworzenie innowacyjnego modelu *Heart-on-a-Chip*, integrującego elementy stymulacji mechanicznej, kontroli warunków przepływu i odwzorowania hipoksji,
- opracowanie i zastosowanie nanowłóknistych podłoży z nanocząstkami magnetycznymi, wspierających adhezję i dojrzewanie kardiomiocytów,
- demonstracja możliwości wykorzystania modelu do badania regeneracji mięśnia sercowego, w tym w warunkach ko-hodowli z komórkami macierzystymi,
- wskazanie potencjału aplikacyjnego opracowanego systemu w testowaniu nowych leków, ograniczeniu badań na zwierzętach i rozwoju spersonalizowanej medycyny.

Rozprawa posiada również znaczenie praktyczne, ponieważ proponowany model może w przyszłości stać się ważnym narzędziem badawczym dla laboratoriów akademickich oraz jednostek przemysłu farmaceutycznego i biomedycznego. Jego zastosowania mogą obejmować m.in. badania nad mechanizmami chorób serca, ocenę skuteczności terapii regeneracyjnych, a także tworzenie platform do badań toksykologicznych i farmakologicznych.

Na szczególne podkreślenie zasługuje również dorobek naukowy doktoranta towarzyszący realizacji rozprawy. Oryginalne wyniki uzyskane w trakcie przygotowywania tej dysertacji zostały

opublikowane w dwóch artykułach w renomowanych czasopismach naukowych, a dwa kolejne artykuły są w trakcie recenzji. Oprócz tego autor jest współautorem 4 innych publikacji mniej związanych z samą tematyką dysertacji, również opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych. Uczestniczył w licznych międzynarodowych konferencjach, gdzie prezentował wyniki badań, a także aktywnie współpracował w ramach projektów badawczych w tym dwóch jako kierownik. Dorobek obejmuje również jeden przyznany patent i zgłoszenia patentowe oraz nagrody i wyróżnienia przyznane za działalność naukową i innowacyjną, co dodatkowo potwierdza jego potencjał badawczy i wdrożeniowy.

Docenić należy także samodzielność i konsekwencję autora w realizacji projektu, a także umiejętność interdyscyplinarnej integracji wiedzy. Pomimo wskazanych uwag krytycznych, które mają charakter uzupełniający, rozprawa stanowi wartościowe osiągnięcie naukowe.

Podsumowując, rozprawa mgr inż. Dominika Kołodziejka jest pracą oryginalną, nowatorską i kompletną, a uzyskane wyniki mogą mieć realny wpływ na rozwój badań w obszarze biotechnologii i medycyny regeneracyjnej. Autor wykazał się: rozległą wiedzą teoretyczną, umiejętnością prowadzenia eksperymentów na wysokim poziomie, zdolnością do krytycznej analizy i interpretacji wyników, istotnym dorobkiem naukowym potwierdzonym publikacjami, patentami i nagrodami.

Z uwagi na pozytywną ocenę przedstawionej do oceny pracy doktorskiej z pełnym przekonaniem rekomenduję dopuszczenie mgr inż. Dominika Kołodziejka do publicznej obrony rozprawy doktorskiej oraz nadanie mu stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie Biotechnologia.

Biorąc pod uwagę znaczenie i jakość uzyskanych wyników oraz imponujący dorobek naukowy doktoranta, uważam, że praca ta **zasługuje także na rozważenie wyróżnienia.**

P. M. Korczyński