

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominika Kołodziejka

#### pt. „Badania nad zastosowaniem systemów *Lab-on-a-chip* do analizy regeneracji komórek serca”

Rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Elżbiety Jastrzębskiej w Katedrze Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej

W ostatnich latach obserwujemy dynamiczny rozwój technologii mikrofluidycznych, które znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, w tym w biologii komórkowej, medycynie oraz farmakologii. Jednym z obiecujących kierunków badań w tej dziedzinie jest wykorzystanie systemów *Lab-on-a-chip* do analizy regeneracji komórek serca. Te miniaturowe układy, które integrują różne funkcje laboratoryjne na jednym chipie, umożliwiają przeprowadzanie skomplikowanych eksperymentów w warunkach zbliżonych do *in vivo*, co jest niezwykle istotne w kontekście badań nad chorobami serca oraz testowaniem nowych terapii.

Zastosowanie systemów *Lab-on-a-chip* w badaniach nad regeneracją komórek serca jest szczególnie ważne, ponieważ choroby serca stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na całym świecie. W miarę jak rośnie liczba pacjentów z chorobami układu krążenia, konieczne staje się poszukiwanie nowych metod leczenia, które mogłyby przyczynić się do poprawy jakości życia oraz wydłużenia czasu przeżycia chorych. W tym kontekście, układy modelowe, takie jak *Lab-on-a-chip*, stają się nieocenionym narzędziem do testowania różnych stanów chorobowych oraz oceny skuteczności nowych leków.

Jednym z kluczowych aspektów badań nad regeneracją komórek serca jest zrozumienie mechanizmów, które leżą u podstaw procesów naprawczych w tkance sercowej. W tym celu niezbędne jest stworzenie odpowiednich modeli, które będą w stanie odwzorować warunki panujące w organizmie. Systemy *Lab-on-a-chip*, dzięki swojej miniaturyzacji i zdolności do precyzyjnego kontrolowania warunków eksperymentalnych, oferują unikalne możliwości w tym

zakresie. Umożliwiają one nie tylko badanie interakcji między komórkami, ale także analizę wpływu różnych czynników, takich jak kurczliwość podłoża hodowlanego, rodzaj materiału wykorzystanego do hodowli komórkowej, niedotlenienie czy obecność leków, na procesy regeneracyjne.

Umiejętność konstrukcji i optymalizacji systemów *Lab-on-a-chip* jest zatem niezwykle potrzebna w kontekście współczesnych badań biomedycznych. Wymaga ona interdyscyplinarnej wiedzy z zakresu inżynierii, biologii komórkowej oraz chemii materiałowej, co czyni tę dziedzinę niezwykle fascynującą, ale i wymagającą. Właściwe zaprojektowanie układu mikrofluidycznego, który będzie w stanie symulować warunki panujące w sercu, wymaga nie tylko znajomości technologii „mikroprodukcji”, ale także umiejętności analizy danych oraz interpretacji wyników eksperymentalnych.

W kontekście powyższych zagadnień, praca doktorska Pana Kołodziejka wpisuje się w aktualny nurt badań nad zastosowaniem systemów *Lab-on-a-chip* do analizy regeneracji komórek serca. Doktorant podjął się stworzenia innowacyjnego modelu, który miał na celu nie tylko rozwój technologii mikrofluidycznych, ale także przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów regeneracji serca, co może mieć istotne znaczenie dla przyszłych terapii.

Rozprawa doktorska mgr inż. Dominika Kołodziejka liczy 154 strony maszynopisu i posiada układ zgodny z konwencją rozpraw doktorskich w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych oraz nauk biotechnologicznych. Praca została podzielona na 10 głównych części, z czego za zasadniczą treść naukową należy uznać rozdziały: Przegląd literaturowy, Część doświadczalna, Wyniki, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia. Strukturę pracy uzupełniają: Wykaz skrótów, Spis rycin, Spis tabel. Treść rozprawy wzbogacona została o liczne wysokiej jakości kolorowe ryciny, zdjęcia schematy oraz zestawienia tabelaryczne, w tym mapy cieplne i wykresy uzyskanych wyników eksperymentalnych. Z punktu widzenia edytorskiego rozprawa została przygotowana z dużą starannością. Odnotowałam jedynie drobne uchybienia językowe, które nie wpływają na odbiór merytoryczny pracy. Jedyną niedogodnością natury technicznej okazała się bardzo drobna czcionka podpisów pod wykresami co zmusiło mnie do odnalezienia moich dawno zapomnianych okularów do czytania. Ponadto pewną niejasność budzi zastosowane nazewnictwo „mikrosystem II a” oraz „II b”. W niektórych zdaniach zapis z odstępem między numerem a literą „a” prowadził do chwilowej konfuzji. Być może korzystniejsze byłoby oznaczenie typu IIA oraz IIB, co poprawiłoby jednoznaczność przekazu.

Na szczególną uwagę zasługuje bardzo starannie opracowany przegląd literatury, który obejmuje aktualny stan wiedzy w zakresie budowy i funkcji serca, patogenezę chorób układu sercowo-naczyniowego, a także nowoczesnych modeli komórkowych stosowanych w badaniach *in vitro*. Doktorant w sposób systematyczny i logiczny przedstawił zagadnienia dotyczące zarówno klasycznych hodowli 2D, jak i trójwymiarowych systemów 3D, ze szczególnym uwzględnieniem mikrosystemów przepływowych typu *Heart-on-a-Chip*. Rozdziały poświęcone mikrosystemom do

hodowli komórek serca (w tym systemom do stymulacji mechanicznej oraz modelowania warunków niedotlenienia) stanowią przegląd najnowszych osiągnięć w inżynierii biomedycznej i ukazują bardzo dobrą znajomość literatury specjalistycznej przez Doktoranta. Zakres tematyczny oraz poziom merytoryczny tej części pracy mają wysoką wartość poznawczą i przeglądową. Przeczytałam go z wielkim zainteresowaniem.

Celem głównym pracy doktorskiej mgr inż. Dominika Kołodziejka było **opracowanie oraz walidacja innowacyjnych mikrosystemów przepływowych typu *Heart-on-a-Chip*, zintegrowanych z matami nanowłóknistymi, umożliwiającymi hodowlę komórek serca w warunkach dynamicznych oraz odwzorowanie procesów niedotlenienia w celu modelowania chorób układu sercowo-naczyniowego *in vitro***. Kandydat szczegółowo przedstawił cele szczegółowe obejmujące: projektowanie geometrii mikroukładów, wytwarzanie mat nanowłóknistych, prowadzenie hodowli trójwymiarowych kardiomiocytów, symulację niedotlenienia oraz stymulację mechaniczną komórek w opracowanych systemach. Postawiona hipoteza badawcza, zakładająca, że odpowiednio zaprojektowany mikrosystem przepływowy, wyposażony w matryce nanowłókniste i umożliwiające jednoczesną stymulację mechaniczną oraz kontrolę warunków tlenowych, pozwoli na odtworzenie mikrośrodowiska tkanki serca, została sformułowana jasno i jednoznacznie. Co więcej, hipoteza ta ma charakter w pełni weryfikowalny poprzez zaprojektowane eksperymenty, pozostające z nią w metodologicznej spójności.

Prace badawcze opisane w dysertacji zostały przeprowadzone etapami. W pierwszym etapie Doktorant skoncentrował się na projektowaniu i wytwarzaniu mat nanowłóknistych przeznaczonych do hodowli komórek serca, stanowiących podstawę dalszych badań eksperymentalnych. Maty te pełniły funkcję biomimetycznej powierzchni hodowlanej dla kardiomiocytów, a ich właściwości morfologiczne i mechaniczne zostały szczegółowo scharakteryzowane, co potwierdziło ich przydatność w inżynierii tkankowej. Istotnym osiągnięciem było zastosowanie materiałów nanowłóknistych modyfikowanych nanocząstkami magnetycznymi ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), umożliwiającymi bezkontaktową stymulację mechaniczną komórek serca, co stanowiło ważny krok w kierunku opracowania zaawansowanych modeli *in vitro* w kolejnych etapach pracy.

W kolejnym etapie badań Doktorant opracował serię mikrosystemów przepływowych, które zaprojektował w taki sposób że zaczął od układów podstawowych umożliwiającą statyczną hodowlę komórek, po zaawansowane systemy pozwalające na dynamiczną stymulację mechaniczną oraz kontrolowane modelowanie hipoksji. Systemy te zostały zaprojektowane z wykorzystaniem zaawansowanych narzędzi inżynierskich oraz zweryfikowane za pomocą symulacji numerycznych przepływu i naprężeń ścinających, co świadczy o wysokim poziomie przygotowania metodologicznego Kandydata. Mgr inż. Kołodziejek nie tylko przedstawił koncepcję teoretyczną mikrosystemów, ale również samodzielnie wykonał ich elementy konstrukcyjne i zintegrował je z matami nanowłóknistymi, co stanowi znaczący walor techniczny pracy.

Na uwagę zasługuje fakt, że zaprojektowane mikrosystemy umożliwiają prowadzenie hodowli komórek serca w warunkach dynamicznych oraz odwzorowanie zjawisk patologicznych,

takich jak niedotlenienie, co stawia tę pracę w nurcie światowych badań nad technologiami *Organ-on-a-Chip*. Wyniki uzyskane przez Doktoranta potwierdziły, że opracowane układy sprzyjają poprawie przeżywalności i dojrzewania kardiomiocytów oraz umożliwiają analizę ich odpowiedzi na warunki stresu tlenowego.

Należy jednak zaznaczyć, że w opisie mikrosystemów Autor w dużej mierze skoncentrował się na szczegółach konstrukcyjnych, natomiast zabrakło szerszej dyskusji krytycznej odnoszącej się do ograniczeń zastosowanych rozwiązań oraz porównania z istniejącymi modelami komercyjnymi dostępnymi na rynku (jeśli są??). Włączenie takiej analizy mogłoby jeszcze wyraźniej uwypuklić innowacyjny charakter zaproponowanego systemu i podkreślić jego przewagi funkcjonalne. Pomimo tego, poziom techniczny projektu oraz jego interdyscyplinarny charakter należy ocenić niezwykle wysoko.

Istotną częścią pracy było modelowanie hipoksji i badanie odpowiedzi kardiomiocytów w warunkach niedotlenienia. Choć Kandydat uzyskał wyniki wskazujące na możliwość odtworzenia warunków patologicznych, należy zauważyć, że wnioskowanie biologiczne oparte jest na ograniczonej liczbie markerów komórkowych, a część analiz biologicznych ma charakter jedynie jakościowy. Mimo tych zastrzeżeń należy podkreślić, że Doktorant wykazał się dużą samodzielnością badawczą oraz umiejętnością interdyscyplinarnego łączenia zagadnień z obszaru inżynierii materiałowej, mikrofluidyki i biologii komórkowej. Zaproponowane mikrosystemy umożliwiają prowadzenie badań w warunkach dynamicznych i kontrolowanych, co można uznać za istotny krok w kierunku rozwoju modeli narządów *in vitro*. Wniosek ten potwierdzają wyniki eksperymentalne dotyczące wpływu stymulacji mechanicznej na dojrzewanie kardiomiocytów oraz uzyskanie warunków hipoksji, choć należy zaznaczyć, że uzyskane efekty wymagają dalszej walidacji i porównania z biologicznymi modelami odniesienia.

Część wynikowa została przedstawiona w sposób przejrzysty i logiczny. Doktorant wykazał, że opracowane mikrosystemy umożliwiają utrzymanie wysokiej przeżywalności kardiomiocytów oraz sprzyjają ich dojrzewaniu strukturalnemu i funkcjonalnemu. W modelu hipoksji uzyskano typowe dla niedotlenienia zmiany metaboliczne (ATP), co potwierdza możliwość wykorzystania systemu do badań patofizjologicznych. Zastosowane metody analityczne, takie jak RT-qPCR, analiza bioenergetyczna i obrazowanie fluorescencyjne, potwierdzają wysoki poziom zaawansowania badań. Wyniki uzyskane w pracy są spójne z hipotezą i świadczą o realizacji celu naukowego.

Praca doktorska mgr. Inż. Kołodziejka posiada znaczący potencjał aplikacyjny. Zaproponowane mikrosystemy mogą być wykorzystane w badaniach przedklinicznych do oceny kardiotoxyczności leków, modelowania chorób serca oraz testowania terapii regeneracyjnych. Należy podkreślić, że praca wpisuje się w światowy nurt rozwoju technologii *Organ-on-a-Chip*, stanowiąc przykład badań o wysokiej wartości translacyjnej i wdrożeniowej. O wyjątkowym potencjale aplikacyjnym świadczy również fakt, że Doktorant jest współautorem jednego patentu oraz trzech zgłoszeń patentowych, obejmujących innowacyjne mikrosystemy przepływowe, materiały nanowłókniste oraz rozwiązania do modelowania hipoksji *in vitro*. Oryginalność pracy

przejawia się w integracji kluczowych komponentów mikrośrodowiska sercowego w jednym systemie oraz zastosowaniu mat nanowłóknistych do stymulacji komórek w warunkach dynamicznych, co czyni opracowane rozwiązania atrakcyjnymi z perspektywy potencjalnej komercjalizacji oraz dalszego rozwoju technologicznego.

Tematyka pracy doktorskiej jak i jej wykonanie bardzo mi się podoba. Podczas lektury nasunęły mi się następujące pytania:

- (1) Czy Doktorant mógłby wyjaśnić, w jakim stopniu zaproponowane rozwiązania techniczne przewyższają dostępne technologie i jakie elementy stanowią o ich oryginalności na tle globalnych rozwiązań?
- (2) Czy Doktorant dokonał walidacji empirycznej symulacji teoretycznej (np. pomiar przepływu, naprężeń ścinających *in situ*)?
- (3) W pracy zastosowane zostały maty nanowłókniste zawierające nanocząstki magnetyczne  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  do stymulacji mechanicznej. Czy przeprowadzone zostały testy wykluczające ich toksyczność długoterminową (np. kilka dni)?
- (4) W części dotyczącej hipoksji Doktorant przyjął założenie, że dyfuzja przez PDMS wystarczy do uzyskania kontrolowanych gradientów tlenu. Czy Doktorant rozważał zastosowanie innej metody detekcji niż folii tlenoczułej?
- (5) Mikrosystem IIb umożliwia jednoczesne badanie wpływu hipoksji i stymulacji mechanicznej. Jak Doktorant interpretuje obserwowany wzrost przeżywalności komórek poddanych hipoksji i stymulacji mechanicznej? Czy istnieje ryzyko, że warunki te bardziej wspierają adaptację komórek niż odwzorowują patologię niedokrwinną?
- (6) W rozdziale dotyczącym analiz ekspresji genów wykazano wzrost markerów dojrzałości kardiomiocytów. Czy Doktorant mógłby odnieść się do tego, czy zaobserwowane zmiany mają charakter przejściowy, czy są utrzymywane po zakończeniu stymulacji?
- (7) Czy celem modyfikacji powierzchni mat nanowłóknistych polidopaminą było przede wszystkim zwiększenie ich hydrofilowości i adhezji komórkowej, czy uzyskanie kontrolowanej chropowatości strukturalnej? W pracy przedstawiono analizę morfologii włókien po pokryciu, jednak nie zaprezentowano wyników pomiaru kąta zwilżalności, który pozwoliłby jednoznacznie ocenić wpływ tej modyfikacji na właściwości hydrofilowe powierzchni. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić, czy zwiększona chropowatość była efektem zamierzonym, oraz jakie są dane potwierdzające poprawę adhezji komórek wynikającą z tej modyfikacji?
- (8) Doktorant jest współautorem jednego patentu oraz trzech zgłoszeń patentowych, co świadczy o wysokim potencjale wdrożeniowym pracy. Czy Doktorant może wskazać, który element mikrosystemu uznaje za najbardziej innowacyjny? Czy przed obroną mogłabym zobaczyć jak wyglądają te układy mikrofluidyczne? 😊

- (9) W pracy przedstawiono liczne dane ilościowe, jednak nie zawsze opatrzone je analizą statystyczną. Dlaczego nie wszystkie przedstawione różnice zostały zweryfikowane testami istotności statystycznej?
- (10) Czy Doktorant mógłby wskazać najważniejsze ograniczenie swojego modelu *Heart-on-a-Chip*, które w jego ocenie wymaga dalszych badań przed możliwym wdrożeniem systemu do zastosowań przemysłowych lub klinicznych?

Wyniki badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej znalazły odzwierciedlenie w czterech publikacjach naukowych powiązanych tematycznie z dysertacją. Zostały one opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), takich jak *Polymer Testing* (IF 2023: 5,3), *Sensors and Actuators B: Chemical* (IF 9,2), *Sensors and Actuators A: Physical* (IF 4,3) oraz *Lab-on-a-Chip* (IF 6,9 – publikacja w recenzji). Łączny impact factor publikacji związanych bezpośrednio z tematyką rozprawy wynosi ponad 25, co należy uznać za bardzo wysoki wynik, świadczący o znaczącym zasięgu i międzynarodowej widoczności prowadzonych badań. Ponadto Doktorant jest współautorem trzech publikacji dodatkowych, również opublikowanych w czasopismach z listy JCR, co łącznie daje sześć publikacji naukowych w uznanych czasopismach międzynarodowych oraz dwie znajdujące się w recenzji. Warto podkreślić, że dwie z tych prac dotyczą zastosowania opracowanych mikrosystemów w modelowaniu chorób układu sercowo-naczyniowego, co świadczy o spójności tematycznej i konsekwencji badawczej. Mgr inż. Dominik Kołodziejek jest także współtwórcą jednego patentu oraz trzech zgłoszeń patentowych, obejmujących innowacyjne mikrosystemy do hodowli komórek serca i modelowania hipoksji *in vitro*. Na szczególne podkreślenie zasługuje również aktywność konferencyjna Doktoranta bo zaprezentował aż 21 wystąpień ustnych i posterowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, co świadczy o jego zaangażowaniu w upowszechnianie wyników badań oraz aktywności w środowisku naukowym. Mgr Kołodziejek był również kierownikiem dwóch grantów badawczych (MedTech-Athon i YOUNG PW), co świadczy o jego samodzielności.

Podsumowując, recenzowana rozprawa spełnia wszystkie ustawowe kryteria przewidziane dla rozpraw doktorskich, a jej wartość merytoryczna, nowatorstwo podejścia, interdyscyplinarny charakter oraz wysoki poziom wykonania eksperymentalnego pozwalają z pełnym przekonaniem stwierdzić, że mgr inż. Dominik Kołodziejek zasługuje na nadanie mu stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia. Dysertacja stanowi przykład dojrzałego i kompleksowego podejścia do złożonego problemu badawczego, jakim jest opracowanie mikrosystemów typu *Heart-on-a-Chip* umożliwiających modelowanie funkcji i patologii serca w warunkach *in vitro*. Autor wykazał się umiejętnością samodzielnego projektowania

interdyscyplinarnych badań, łączenia metod inżynierskich, materiałowych i biologicznych oraz interpretacji wyników w kontekście biotechnologii medycznej i medycyny regeneracyjnej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że rozprawa spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.), i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Dominika Kołodziejka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny, innowacyjność opracowanych rozwiązań, znaczący potencjał wdrożeniowy oraz bardzo dobry dorobek publikacyjny i patentowy doktoranta, wnoszę jednocześnie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominika Kołodziejka jako pracy o wyjątkowej wartości naukowej i aplikacyjnej, wnoszącej istotny wkład w rozwój nowoczesnych technologii biotechnologicznych w obszarze medycyny regeneracyjnej i modeli narządowych *in vitro*.



## Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominika Kołodziejka pt. „Badania nad zastosowaniem systemów *Lab-on-a-chip* do analizy regeneracji komórek serca”

Rozprawa doktorska mgr inż. Dominika Kołodziejka pt. „*Badania nad zastosowaniem systemów lab-on-a-chip do analizy regeneracji komórek serca*” reprezentuje wyjątkowo wysoki poziom naukowy oraz posiada znaczący potencjał aplikacyjny i wdrożeniowy, co jednoznacznie wyróżnia ją na tle innych prac doktorskich realizowanych w dziedzinie biotechnologii. Praca wnosi nową jakość do obszaru technologii *Organ-on-a-Chip*, prezentując autorsko zaprojektowane i zwalidowane mikrosystemy przepływowe umożliwiające odtwarzanie warunków fizjologicznych i patologicznych mięśnia sercowego w warunkach *in vitro*. Opracowane modele są innowacyjne zarówno pod względem konstrukcyjnym, jak i funkcjonalnym, integrując stymulację mechaniczną, kontrolę parametrów tlenowych oraz zastosowanie mat nanowłóknistych do kierowania odpowiedzi komórek serca. Rozwiązania te posiadają realny potencjał translacyjny i mogą stać się podstawą przyszłych zastosowań w medycynie regeneracyjnej oraz farmakologii przedklinicznej.

Wybitny charakter rozprawy potwierdza także dorobek naukowy doktoranta: jest on współautorem czterech publikacji o łącznym impact factor przekraczającym 25, opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy JCR, takich jak *Sensors and Actuators B: Chemical* czy *Polymer Testing*. Ponadto doktorant jest współtwórcą jednego patentu i trzech zgłoszeń patentowych, co świadczy o wdrożeniowym wymiarze jego badań i przekłada się na możliwość komercjalizacji opracowanych technologii. Tak bogaty dorobek, obejmujący również 21 wystąpień konferencyjnych oraz kierowanie projektami naukowymi finansowanymi w trybie konkursowym, jednoznacznie potwierdza wysoki poziom aktywności badawczej i rozpoznawalność doktoranta w środowisku naukowym.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że rozprawa mgr inż. Dominika Kołodziejka dotyczy tematyki o kluczowym znaczeniu dla rozwoju współczesnej biotechnologii medycznej i zdrowia publicznego. Opracowane mikrosystemy typu *Heart-on-a-Chip* umożliwiają prowadzenie badań nad chorobami układu krążenia w sposób bardziej etyczny, ekonomiczny i precyzyjny niż modele zwierzęce, co wpisuje się w światowe trendy zastępowania badań *in vivo* nowoczesnymi modelami *in vitro*.

Biorąc pod uwagę wyjątkową innowacyjność rozprawy, ponadprzeciętną wartość naukową i aplikacyjną wyników, imponujący dorobek publikacyjny i patentowy doktoranta, samodzielność i dojrzałość badawczą autora, wnoszę o przyznanie mgr inż. Dominikowi Kołodziejkowi wyróżnienia



rozprawy doktorskiej jako pracy o znaczącym wpływie na rozwój dyscypliny biotechnologia oraz o wysokim potencjale dla nauki i praktyki klinicznej.

