

Poznań 08.10.2025



**INSTITUTE
OF HUMAN GENETICS**
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Strzeszyńska 32
60-479 Poznań, Poland

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Prof. IGC dr hab. Tomasz Kolanowski
Kierownik SGB Zaawansowanych Modeli Tkankowych
Zakład Patologii Molekularnej, IGC PAN
e-mail: tomasz.kolanowski@igcz.poznan.pl

**Rada Naukowa Dyscypliny Biotechnologia
Politechniki Warszawskiej**

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominika Kołodziejka

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

Przedstawiona mi do oceny rozprawa Pana Mgr Inż. Dominika Kołodziejka zatytułowana „*Badania nad zastosowaniem systemów Lab-on-a-Chip do analizy regeneracji komórek serca*” została napisana pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Elżbiety Jastrzębskiej. Rozprawa doktorska dotyczy projektowania oraz walidacji mikrosystemów przepływowych typu *Heart-on-a-Chip* integrowanych z matami włóknistymi zawierającymi nanocząstki magnetyczne, z naciskiem na kontrolę stanu utleniania i stymulację mechaniczną w hodowlach komórek serca, kardiomiocytów.

Systemy *Heart-on-a-Chip* (HoC) przeszły w ostatnich latach od prostych układów z monowarstwą kardiomiocytów do zaawansowanych, mikroprzepływowych „microphysiological systems” (MPS) integrujących kontrolę przepływu, bodźce mechaniczne i elektryczne, precyzyjnie kształtowane podłoża/ECM oraz wielokomórkowe kokultury (iPSC-CM, fibroblasty, śródbłonek). Pozwala to wierniej odtwarzać hemodynamikę, przewodnictwo i remodeling, a także testować leki i modelować choroby w warunkach bliskich fizjologii. Najnowsze przeglądy i prace pokazują architektury umożliwiające dojrzewanie iPSC-CM, odtwarzanie funkcji skurczowej, wielo-modalne odczyty (MEAs, impedancja, obrazowanie Ca^{2+} /kurczliwości) oraz wzorce odpowiedzi farmakologicznej i patologicznej w tym hipoksji/ischemii.

Kluczowym postępowaniem jest kontrola stężenia tlenu i sił hemodynamicznych: wykazano, że mikroprzepływowe układy z recyrkulacją medium i wymiennikami gazowymi stabilnie utrzymują niski O_2 oraz indukują hipoksję, co potwierdzają odczyty markerów biologicznych i zmiany parametrów kurczliwości kardiomiocytów; równolegle hemodynamiczne obciążenie pulsacyjne i topografia podłoża sprzyjają wydłużeniu sarkomerów, uporządkowaniu komórek i przebudowie mitochondriów. Z kolei modele trójskładnikowe (iPSC-CM+fibroblasty+śródbłonek) umożliwiają badanie interakcji miocyt-stroma-śródbłonek w przepływie i wiarygodniejsze testy toksykologiczne.

Adopcja przemysłowa przyspiesza dzięki inicjatywom regulacyjnym dla MPS (np. akceptacja przez FDA zgłoszeń Organ-on-a-Chip w ramach programu IStand i ujęcie OoC/MPS w drogowej mapie ograniczania testów na zwierzętach), co tworzy ścieżkę kwalifikacji narzędzi do oceny bezpieczeństwa/efektywności – choć dotychczasowe kwalifikacje dotyczą głównie układów wątrobowych.

Najważniejsze wyzwania techniczne obejmują standaryzację metryk „dojrzałości” iPSC-CM, skalowalność/HTS oraz materiały: porowaty PDMS absorbuje lipofilne cząsteczki i zniekształca profile farmakokinetyczne; rośnie więc wykorzystanie powłok barierowych i alternatywnych technologii powierzchni.

Dysertacja ma układ klasyczny i obejmuje m.in. szczegółowe rozdziały dotyczące wytwarzania mikrouządzeń, parametrów stymulacji oraz implementacji hipoksji i jej kalibracji na foliach tlenoczułych (PtTFPP) w systemach PDMS/PMMA. Autor opisuje procedury kalibracji (punkty 1–21% O_2), a także eksperymentalne uzyskiwanie stref o niskim O_2 w chipie (do wartości zbliżonych do 0% w określonych przedziałach czasowych), co potwierdzają krzywe kalibracyjne i wykresy narastania efektu hipoksji w czasie.

Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia formalne wymagania stawiane tego typu pracom – liczy ok. 152 strony i obejmuje komplet standardowych elementów: Streszczenia w języku polskim i angielskim Wykaz skrótów, Spis treści, a następnie logicznie uporządkowane rozdziały: Przegląd Literaturowy (1. Wstęp; 2. Choroby Układu Sercowo-Naczyniowego; 3. Modele Komórkowe w Badaniach In Vitro; 4. Mikrosystemy Przepływowe do Hodowli Komórek Tkanki Serca; 5. Podsumowanie) oraz Część Doświadczalna (6. Cel Pracy; 7. Materiały, Odczynniki i Aparatura; 8. Metodyka Badań; 9. Wyniki; 10. Podsumowanie i Wnioski). Całość zamykają Bibliografia (188 pozycji) oraz Spis Rycin (46 pozycji) i Spis Tabel (4 pozycje).

Jak zazwyczaj w tego typu opracowaniach, można zauważyć pewne uchybienia natury edytorskiej: (A) W skrótach np. „ACE - inhibitory konwertazy (ang. Angiotensin-Converting Enzyme inhibitors)” – pełna nazwa to inhibitory konwertazy angiotensyny; czy AFT6 tłumaczyłbym raczej jako „aktywujący czynnik transkrypcyjny 6” , a nie jedynie „czynnik transkrypcyjny 6”; (B) interpunkcja/składnia w podpisach rycin - sformułowania typu „dla w folii tlenoczułej” w opisie krzywej kalibracyjnej (Ryc. 29) sugerują literówkę/stylistykę do korekty; (C) literówka: „pozwałał” zamiast „pozwałał” (opis zestawu hipoksyjnego/ryc. 30); (D) jednostki i symbole: zdarza się niespójność zapisu jednostek ($\mu\text{l}/\text{min}$, %, $^{\circ}\text{C}$) i nazw własnych (np. nazwy barwników, producentów) w tabelach i podpisach (kilka miejsc wymaga ujednolicenia). Dodatkowo, praca zyskałaby, gdyby w jednym miejscu zebrać parametry czasów ekspozycji, przepływów, częstotliwości stymulacji, itp. (obecnie rozproszone po rozdziałach 8.4–8.6 i 9.x). Podsumowując ten element - praca napisana jest dobrze, a powyższe błędy są niewielkie i nie mają wpływu na jakość lektury jako takiej.

Na poziomie konstrukcji i metod praca jest spójna i nowatorska: szczególnie cenna jest integracja mat nanowłóknistych z nanocząstkami magnetycznymi oraz zaprojektowanie układu do powtarzalnej stymulacji pola, w tym opis generatora zmiennego pola magnetycznego i parametrów stymulacji (0,5 Hz; 1 h/dzień; 5–10 dni, w zależności od wariantu). Ważnym aspektem jest też sposób modelowania układów odzwierciedlających standardowe rozmiary elementów jednorazowych wykorzystywanych w badaniach biologicznych oraz modułowość opracowanych kartridży, co znacząco zwiększa potencjał aplikacyjny i wdrożeniowy opracowanych mikrosystemów.

Wśród najważniejszych elementów, można wyróżnić:

1. **Inżynieria mikrosystemów:** zaprojektowano i wytworzono wielowarstwowe układy (PDMS/PMMA) z sekcjami przepływowymi i modułami stymulacyjnymi; przeprowadzono symulacje rozkładu przepływu i pola magnetycznego oraz dostarczono analizy potwierdzające jednorodność warunków w przestrzeni roboczej.
2. **Kontrola utlenowania:** opracowano procedurę kalibracji folii tlenoczułych (PtTFPP) i pokazano, że w zaprojektowanym układzie można generować i monitorować strefy normoksji/hipoksji w jednym mikrosystemie oraz dynamicznie modyfikować O_2 .
3. **Interdyscyplinarne łączenie technik:** połączono kontrolę O_2 i stymulację mechaniczną z analizą żywotności (AlamarBlue, Calcein-AM/PI) i immunofluorescencją (m.in. cTnT/TNNT2, MYH6, F-aktyna).

Z punktu widzenia dziedziny *Organ-/Heart-on-a-Chip* praca odpowiada na realne potrzeby modelowania patofizjologii serca i testowania oddziaływania bodźców środowiskowych (hemodynamika/hipoksja) na kardiomiocyty.

Opis materiałów i metod jest na ogół wyczerpujący (chemia, geometrie, przepływy, barwienia, RT-PCR, statystyka), z wyszczególnieniem badanych genów (m.in. HIF-1 α , TNNT2, SERCA2, SCN5A; normalizacja do genu referencyjnego GAPDH; $\Delta\Delta Ct$). Parametry stymulacji pola magnetycznego i harmonogramy ekspozycji są podane precyzyjnie (0,5 Hz; 1 h/dzień; 5–10 dni), co zwiększa szanse na reprodukcję eksperymentów.

Przechodząc do natury merytorycznej przedstawionej pracy, recenzent ma kilka uwag, które mogłyby zwiększyć już i tak znaczącą wartość dysertacji:

1. Głębokość i definicja hipoksji (< 1% O_2)

W kalibracji zastosowano punkty 1–21% O_2 , co pozwala na wyznaczenie krzywej zależności, jednak w samym chipie stabilne utrzymanie ściśle definiowanej hipoksji głębokiej (ok. 1%) wymaga szczególnej ostrożności ze względu na nieszczelności gazowe i źródła tlenu (pompy, membrany, mieszanie medium). Autor ma świadomość charakterystyki przepuszczalności tlenu przez materiały z którymi pracuje, co udowadnia testując odległości pomiędzy kanałami dla warunków hipoksji i normoksji dla mikrosystemu IIb. Tym niemniej, jeśli dobrze rozumiem przedstawiony opis, w niniejszej dysertacji referencją do pomiaru tlenu nie były kwalifikowane urządzenia pomiarowe, a tlenoczułe folie przetrzymywane przez 24h w inkubatorze o odpowiednim stężeniu tlenu. Dodatkowo pomiar fluorescencji odbywał się po przeniesieniu folii do warunków atmosferycznego stężenia tlenu. Ten sposób kalibracji może budzić wątpliwości co do dokładności wykonanych pomiarów, odczytów. To szczególnie niebezpieczne, gdy w wielu miejscach dysertacji autor odwołuje się do stężenia tlenu „bliskiemu zero”, co odbiega od warunków standaryzacji krzywej. Jednocześnie przedstawiono skąpe dowody molekularnej aktywacji komórek, kardiomiocytów przy tak niskim stężeniu tlenu. Wydaje się zasadne zwrócenie uwagi na precyzyjniejszy pomiar stężenia

tłenu w układzie oraz na lepszą walidację biologiczną osiągniętych efektów (np. wykorzystanie dodatkowych markerów hipoksji (np. EGLN1/PHD2, EGLN2/PHD1). Dodatkowo, wyniki ATP i ekspresji po 3–7 h hipoksji są cenne; warto jednak rozważyć dłuższe ekspozycje (≥ 24 –48 h) z równoległą walidacją funkcjonalną (beating rate, prędkość relaksacji, przemieszczenie), co w podobnych układach wykazywało charakterystyczne zmiany i lepiej różnicowało stan komórek.

Pytanie do Autora: czy zastosowany zestaw doprowadzania gazu i elementy napędowe układu zostały zweryfikowane pod kątem „wycieku” O_2 , tak aby zapewnić rzeczywistą i stabilną ekspozycję $\approx 1\% O_2$ przez dłuższy czas?

2. Sposób raportowania żywotności i normalizacja danych

W pracy stosowano AlamarBlue oraz barwienia Calcein-AM/PI. Sama amplituda fluorescencji AlamarBlue może odzwierciedlać zarówno zmiany metaboliczne, jak i liczbę komórek, co utrudnia jednoznaczną interpretację („% żywych” vs. wzrost populacji). Zazwyczaj tego typu wyniki podaje się jako odsetek żywych komórek. Alternatywnie można próbować normalizować intensywności metaboliczne do liczby jąder (np. Hoechst-positive nuclei; barwienie Hoechst wykonano – można je wykorzystać do zliczania) lub do zawartości DNA.

3. Czas i reżim stymulacji mechanicznej

Autor wybrał protokół stymulacji mechanicznej 1 h/dzień przez 5–10 dni (0,5 Hz). Wiele zjawisk dojrzewania kardiomiocytów wymaga dłuższej ekspozycji (quasi-ciągłej lub o większym *duty-cycle*) na bodziec mechaniczny/napływ hemodynamiczny. Recenzent chętnie zapoznałby się z uzasadnieniem doboru reżimu, a przede wszystkim z odpowiedzią na pytanie czy prezentowany układ jest zdolny do wydłużonego protokołu stymulacji (np. 8–24 h/dobę) lub czy planowane są doświadczenia z porównaniem tych zmiennych, raportując metryki funkcjonalne (częstość, skurcz/relaksacja, przemieszczenie) oraz markery dojrzewania.

4. Charakterystyka biologiczna hodowanych kardiomiocytów

System mikroprzepływowy jest zaprojektowany i wykonany bardzo dobrze; natomiast wydaje się, że pogłębienie charakterystyki fenotypowej kardiomiocytów mogłoby dostarczyć wielu danych na temat funkcjonowania systemu. Pytanie do autora: Zakładając wystarczające środki i czas na wykonanie eksperymentów – jakie markery i właściwości kardiomiocytów planowałby zbadać i jakich rezultatów by się spodziewał przeprowadzając hodowle na zaprezentowanych systemach?

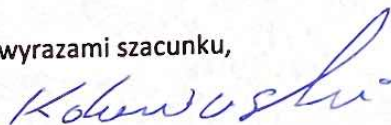
Przedstawiona praca, mimo kilku uwag, ma niewątpliwie wysoką wartość merytoryczną. Warto podkreślić również dorobek autora – większość wyników zostało wykorzystanych do zgłoszeń patentowych i/lub opublikowanych w wartościowych czasopiśmie. Pan Kołodziejek jest autorem jednego patentu, trzech wniosków patentowych oraz sześciu publikacji (w tym dwóch dotyczących tematyki doktoratu) o łącznych IF przekraczającym 35. Dorobek Pana Kołodziejka, choć nie jest częścią oceny niniejszej pracy, wpływa na jego pozytywną ocenę jako naukowca.

Podsumowanie

Rozprawa przedstawia wartościowy i oryginalny wkład w rozwój platform *Heart-on-a-Chip* z kontrolą hipoksji i stymulacją mechaniczną. Konstrukcja układów, logika eksperymentów i ich spójność są na wysokim poziomie naukowym, a uzyskane rezultaty posiadają znaczenie aplikacyjne dla przedklinicznych badań kardiologicznych. Zastrzeżenia mają charakter merytorycznych uzupełnień, które mogłyby wzmocnić część biologiczną, jednak nie odbierają pracy jakości i wartości, która jest znacząca.

Stwierdzam, że przedstawiona przez Pana mgr inż. Dominika Kołodziejka rozprawa doktorska pt.: *„Badania nad zastosowaniem systemów Lab-on-a-Chip do analizy regeneracji komórek serca”* spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.) oraz Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie Pana mgr inż. Dominika Kołodziejka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,



Dr hab. n. med. i n. o zdr. Tomasz Kolanowski