

Prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz PAN
ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa
E-mail: dpijanowska@ibib.waw.pl

Warszawa 20.09.2022r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Sokołowskiej

Podstawą sporządzenia recenzji rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne jest powołanie na recenzenta przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej w dniu 12 lipca 2022 roku.

Jednostka prowadząca postępowanie: Politechnika Warszawska

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Opracowanie mikrosystemu przepływowego lab-on-a-chip do tworzenia i funkcjonalnej analizy modelu wyspy trzustkowej w warunkach fizjologicznych i cukrzycy typu 2*

Promotor: prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka

Kopromotor: prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń

Mgr inż. Patrycja Sokołowska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej na kierunku biotechnologia. Praca magisterska zatytułowana „Opracowanie metody oznaczania ekspresji specyficznych markerów w komórkach mięśnia sercowego w systemach typu Lab-on-a-chip”, realizowana w Zakładzie Mikrobioanalitiky, Wydział Chemiczny PW pod kierunkiem dr hab. inż., prof. uczelni Elżbiety Jastrzębskiej, została obroniona w roku 2017. Następnie Mgr inż. Patrycja Sokołowska stała się uczestnikiem interdyscyplinarnych studiów doktoranckich w ramach programu TriBioChem. Badania związane z rozprawą doktorską były realizowane w Katedrze Biotechnologii Medycznej pod kierunkiem prof. Zbigniewa Brzózki - promotora rozprawy i Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem prof. Agnieszki Dobrzyń - kopromotor.

TEMATYKA ROZPRAWY

Tematyka rozprawy doktorskiej, w pewnym zakresie, jest związana z interdyscyplinarnym z obszarem nauki inżynierią biomedyczną. Najogólniej ujmując, dotyczy bowiem badań nad opracowaniem trójwymiarowych modeli komórkowych i ich badań w warunkach dynamicznych, w tym z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych należących do grupy przyrządów lab on-a-chip z ukierunkowaniem na tworzenie układów organ-on-a-chip, które służą do tworzenia, hodowli i badań modeli komórkowych i tkankowych. Z drugiej strony, w przypadku

przewlekłych chorób cywilizacyjnych takich jak cukrzyca typu 2, która jest chorobą metaboliczną, istotnym celem jest uzyskanie odpowiedniego leczenia i wspomaganie pacjentów, które zminimalizowałyby skutki uboczne terapii i podwyższyłyby komfort życia pacjentów. Doktorantka podjęła próbę wykorzystania nowoczesnego podejścia stosowanego w badaniach biomedycznych łączących aspekty mikrotechnologii i biotechnologii uzyskując mikroukład przepływowy typu lab-on-a-chip do tworzenia i funkcjonalnej analizy modelu wyspy trzustkowej, których wyniki mogą zostać wykorzystane do opracowania nowych elementów terapii stosowanych w diabetologii.

Podsumowując można stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny interdyscyplinarny nurt badań nad rozwojem metod biomedycznych, w szczególności związanych z rozwojem mikroukładów do hodowli komórek wysp trzustkowych do szybkiego testowania środków terapeutycznych.

STRUKTURA I ZAWARTOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedłożona przez Doktorantkę rozprawa doktorska jest publikacją zwartą, zawiera 142 strony, obejmujące 3 części, podzielonych na rozdziały, których w całej rozprawie jest 7, po 3 i 4 rozdziały odpowiednio w części I i II, streszczenie w języku polskim i wymagane streszczenie w języku angielskim, oraz 36 rysunków i 2 tabele. Rozprawa jest w postaci tradycyjnej monografii składającej się z trzech części: przeglądu literatury i doświadczałnej oraz dyskusji wyników i wniosków. Część pierwsza obejmuje wprowadzenie zawierające rozdziały zawierające opis: (1) fizjologii trzustki, (2) podstaw zaburzeń funkcjonowania wysp trzustkowych w cukrzycy typu 2 i stosowane postępowania terapeutyczne, (3) przegląd modeli komórkowych wykorzystywanych w zaburzeń sekrecji insuliny i glukagonu oraz (4) przegląd systemów lab-on-chip. Część druga - poświęcona części eksperymentalnej, zawiera (1) cel i tezy pracy, (2) szczegółowy opis materiałów i metodyki badawczej oraz (3) wyniki badań. Trzecia część pracy przedstawia: dyskusję wyników, podsumowanie i wnioski. Uzupełnienie stanowi informacja o dorobku naukowym Doktorantki.

Bibliografia, składająca się ze 156, publikacje (wyłączając strony www) z ostatnich 3 lat (2020-2022) stanowią dużą część - 20% (31 pozycji), a z ostatnich 8 lat (2015-2022) - ok. 60% (93 pozycje). Przedstawiony przegląd literatury został dokonany na podstawie właściwie dobranych pozycji piśmiennictwa dotyczącego przedmiotu rozprawy. Elementy pracy są logicznie powiązane, a ich zamieszczenie w tekście pracy jest uzasadnione. Z pewnością w niektórych w niektórych częściach rozprawy zakres cytowanej literatury można byłoby rozszerzyć.

Jak wspomniano wyżej, cel badań został wyraźnie określony na początku Części II rozprawy. W rozprawie nie zostały sformułowane tezy, które nie są formalnie wymagane, natomiast wskazano 4 cele szczegółowe związane z odtworzeniem morfologii wyspy trzustkowej w warunkach standardowych i w układach wytworzonych z wykorzystaniem mikrotechnologii (cel 1 i 3), zaprojektowanie i wykonaniem układu mikroprzepływowego do tworzenia, hodowli i analizy kultur komórkowych (cel 2) oraz ocena użyteczności opracowanego układu (cel 4).

Rozprawa jest napisana w sposób jasny, dobrze zorganizowany oraz z klarownie przedstawionymi i omówionymi wynikami badań.

W części drugiej – doświadczałnej, omówiono stosowaną metodykę badań, włączając w to również opis sposobu wytwarzania układów mikroprzepływowych z polimetylosiloksanu

(PDMS) metodami takimi jak pieczęć-odcisk, odlew, jak również warunki prowadzenia poszczególnych hodowli komórkowych zarówno w warunkach stacjonarnych (96-dołkowe płytki U-kształtne) jak i w mikroukładach przepływowych, stosowane metody badawcze pozwalające na ocenę stanu komórek *in vitro*, w tym ich żywotność (test różnicowy wykorzystujący acetyloksymetylowy ester kalceiny kalceinę-AM – barwienie komórek żywych i jodek propidyny - barwienie komórek martwych lub z uszkodzoną błoną komórkową), morfologię (analiza mikroskopowa), proliferację (test oksydacyjno-redukcyjny AlmarBlue), aktywność metaboliczną i wydzielniczą (sekrecja insuliny i glukagonu - testy ELISA). Bardzo dobrze zostały przedstawione sposoby przygotowania układów do badań i składu pożywek używanych w poszczególnych hodowlach oraz testy wizualizacji przepływu w mikroukładach, w których wykorzystano barwione fluorescencyjnie komórki z użyciem CellTraker™ CMFDA.

Materiałem, z którego wykonany jest mikroukład przepływowy jest PDMS – jest dobrze znany i dobrany. Sądzę, że między innymi ze względu na dostępność i prostotę technologii jego transparentność umożliwiającą obserwacje mikroskopowe, jak również właściwości powierzchni (biokompatybilny, hydrofobowy, przenikalny dla gazów) ograniczający wzrost komórek na powierzchni, co sprzyja agregacji komórek i tworzeniu agregatów komórkowych i sferoidów. Tworzenie sferoidów było również wspomagane dodatkiem niewielkich ilości niejonowego środka powierzchniowoczynnego. Pojawia się jednak pytanie czy był rozważany inny materiał, którego właściwości były lepsze w odniesieniu do tego rodzaju hodowli ale niedostępny technologicznie?

Początkowo w badaniach były używane 4 rodzaje mikroukładów przepływowych o różnej strukturze, 3 z tych układów były wynikiem prac innych członków Zespołu i jeden - zaprojektowany i wytworzony przez Doktorantkę. Korzystając z wcześniejszych rozwiązań, w swoim projekcie układu Doktorantka wyeliminowała część wad lub niedopasowań tworząc mikroukład do określonego zastosowania. Świadczy to dobrym eksperymentalnym ukierunkowaniu Doktorantki, które umożliwiło zbudowanie narzędzia badawczego do zastosowań biomedycznych.

Początkowe badania opisane w rozprawie są związane z ustaleniem pewnych warunków początkowych, w tym: projektu mikroukładu przepływowego, hodowli komórek w monokulturach, doboru proporcji liczby komórek wysiewanych w kokulturach, składu pożywki, w celu uzyskania szerzej zaplanowanego eksperymentu, świadczy to o dojrzałym planowaniu badań przez Doktorantkę. Kolejne badania były już badaniami ściśle związane z celami rozprawy. W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępną mysią linię komórek alfa wysp trzustkowych α -TC1-6 (ATCC) i szczurzą linię komórek beta wysp trzustkowych β -INS-1E, uzyskaną z Uniwersytetu Genewskiego, Szwajcaria.

Doktorantka uzyskała interesujące wyniki badań własnych, wymienię kilka wybranych, moim zdaniem najistotniejszych, które zostały osiągnięte dzięki wykorzystaniu w badaniach samodzielnie opracowanego mikroukładu przepływowego (IV) zawierającego w komorze mikrokolumny w odpowiedniej konfiguracji przestrzennej. Prowadząc badania Doktorantka wykazała:

1. Istnienie istotnych różnic w agregacji, proliferacji i żywotności komórek tworzących modele w postaci struktur przestrzennych (3D), hodowane w warunkach stacjonarnych i przepływowych.
2. Z punktu widzenia poznawczego ciekawą częścią badań była ocena lokalizacji komórek alfa i beta w obrębie powstałych struktur komórkowych tzw. pseudowysp trzustkowych powstała na podstawie wybarwień fluorescencyjnych glukagonu i insuliny. Zostało potwierdzone, że z wykorzystaniem opracowanego przez Doktorantkę mikroukładu możliwe jest uzyskanie sferycznych struktur komórkowych.
3. Określono również zmiany stężenia jonów wapnia w komórkach beta stymulowanych glukozą, zarówno prowadząc monokulturę w warunkach stacjonarnych jak i przepływowych (przepływ ciągły i zatrzymany). Badania były z wykorzystaniem testu fluorescencyjnego, w którym następuje wiązanie Ca^{2+} z Fluoro-4AM. Jest to również ciekawy wynik, zgodny z literaturowymi, ale w pełnym wymiarze uzyskania zależności zmian stężenia jonów wapnia od czasu stymulacji agregatów komórek beta roztworem glukozy możliwy tylko z wykorzystaniem mikroukładu przepływowego zaprojektowanego przez Doktorantkę.
4. Funkcjonalność wysp trzustkowych jest określana na podstawie ilości wydzielanej insuliny i glukagonu, stymulantem w tym badaniu jest dawka glukozy podanej do układu wraz z pożywką. Zwiększone stężenie glukozy (16,5 mM) powodowało większy wyrzut insuliny z 2,75 ng/pseudowyspę w porównaniu z 1,38 ng/pseudowyspę podczas stymulacji pożywką o mniejszym stężeniu glukozy – 2,75 mM. Odwrotną odpowiedź uzyskano w przypadku komórek alfa, u których podczas tych samych stymulacji sekrecja glukagonu wzrastała dla małego stężenia glukozy, i wynosiła odpowiednio 0,21 i 0,47 ng/pseudowyspę. Jest to zgodne z wiedzą z zakresu cytofizjologii komórek wysp trzustkowych, zatem można uznać, że powstałe pseudowyspy były funkcjonalne.
5. Potwierdzono wpływ wybranych substancji aktywnych – dwóch izomerów estru kwasu palmitynowego i hydroksykwasu stearynowego (PAHSA, izomery 5- i 9-) na zwiększenie sekrecji insuliny i glukagonu oraz spadek proliferacji komórek w przypadku zastosowania izomeru 5-PAHSA i zwiększenie agregatów 25-30 μm , jak również zmniejszenie proliferacji komórek po przeprowadzeniu inkubacji w roztworach o wyższym stężeniu 9 PAHSA (>60 μM) i wzrost w przypadku niższego stężenia (< 40 μM) oraz maksymalnym wzrostem wymiaru agregatu 25 μm .
6. Doktorantka stwierdziła, iż związki PAHSA (zwłaszcza 5-PAHSA) mają wpływ na sekrecję insuliny i glukagonu, szczególnie duży wpływ obserwuje się w przypadku insuliny (po 48 h inkubacji w 100 μM roztworze 5-PAHSA, powstaje ponad 10-krotny wzrost w stosunku do chwili początkowej). Zauważono również zwiększenie wydzielania glukagonu (mniejszy w stosunku do zwiększenia sekrecji insuliny) po stymulacji 5-PAHSA o stężeniu 100 μM oraz po stymulacji 9-PAHSA 5, 10, 20 i 100 μM . W związku z tym potwierdzono również potencjał terapeutyczny naturalnej substancji czynnej PAHSA.

Zastrzeżeń nie budzą również wnioski sformułowane na podstawie uzyskanych wyników. Chciałam również podkreślić zawartą w rozprawie dyskusję wyników badań, która jest jednym z ważniejszych kryteriów prac naukowych.

Nadrzędny cel postawiony podczas realizacji rozprawy został osiągnięty. Oryginalną część rozprawy stanowi opracowany mikroukład przepływowy wyposażony w pułapki ułatwiające zasiedlenie komórek i prowadzenie badań funkcjonalnych komórek oraz wyniki badań związanych z oceną funkcjonalną i morfologiczną wytworzonych w układzie pseudowysp trzustkowych składających się z dwóch rodzajów komórek alfa i beta.

Rozprawa jest bardzo i starannie zredagowana, dobrze zrównoważone proporcje opisu metodyki do wyników badań, jednakże pojawiają się w niej pewne drobne nieścisłości jak również niejasności, które skłaniają do pewnych pytań, a ja przedstawię je w uwagach krytycznych i edytorskich.

UWAGI KRYTYCZNE

1. Pierwsza uwaga i zarazem pytanie dotyczy powodu użycia ksenogenicznej kokultury komórek wysp trzustkowych mysich i szczurzych, odpowiednio linii komórek α -TC1-6 i komórek β -INS-1E. Wiadomym jest również, że skład komórkowy wysp trzustkowych jest zależnym od gatunku (tu powołałam się na nieprzywołaną w rozprawie referencję [Kim et al. 2009]) oraz twierdzi się również, że morfologii wysp ma wpływ na komunikację między komórkami [ref.144] (str. 118), czy przyjęty w badaniach eksperymentalnych dobór komórek miał wpływ na wyniki badań?

Zwiększono liczbę szczurzych komórek alfa w stosunku 1:2 do 3 i do 4, medium do hodowli komórek alfa i beta mieszano w stosunku 1:1.

Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., & Hara, M. (2009). *Islet architecture: A comparative study. Islets, 1(2), 129–136.* doi:10.4161/isl.1.2.9480

2. W rozprawie również nie postawiono tez, które nie są wymagane, ale jednak formują naukowe i poznawcze aspekty badań. Zatem uwaga dotyczy prośby o wskazanie propozycji tez rozprawy.
3. Kolejne pytanie jest związane z danymi przedstawianymi na Ryc. II.24, które zostały podsumowane (str. 122) „po inkubacji z większymi stężeniami 9-PAHSA (60 μ M – 100 μ M) odnotowano spadek proliferacji a po inkubacji z niższymi stężeniami (10 μ M – 40 μ M) wzrost stopnia proliferacji.” Nasuwa się zatem pytanie co dzieje się w przedziale 40-60 μ M?

Ze względu na potencjał rozwojowy, który Doktorantka zauważa w podsumowaniu, sugerując wykorzystanie mikroukładu do badań związanych z wydzielaniem hormonów, komunikacji między komórkami i opracowaniu skuteczniejszych metod leczenia oraz aplikacyjny związany z badaniami przesiewowymi leków, badania te powinny być kontynuowane.

Uwagi redakcyjne

W rozprawie pojawiają się niedociągnięcia językowe w postaci skrótów myślowych, używania żargonu lub języka potocznego oraz nieprecyzyjne sformułowania. Poniżej wymieniam niektóre z błędów/pomyłek stylistycznych, np.:

Str. 63 i inne: „prędkość przepływu” jest żargonem terminologicznym; w mechanice płynów mówi o objętościowym natężeniu przepływu w jednostce czasu (ml/min). Prędkość jest wielkością wektorową i wyraża się ją w m/s

Str. 74 i inne: „geometria została szerzej scharakteryzowana” lepiej użyć wzór został dokładniej opisany

Str. 112 i inne: skrót myślowy „z różnymi stężeniami glukozy”, lepiej inkubacja z roztworami o różnym stężeniu glukozy

Str. 116 i inne: skrót myślowy „stymulacja stężeniami”, lepiej roztworami o różnym stężeniu

Str. 118 i inne: „intensywność fluorescencji”, powinno być natężenie promieniowania fluorescencyjnego

Str. 121 inne: żargon „poziom sekrecji”, lepiej ilość wydzielonej insuliny bądź glukagonu

Zamiast przeniesienia wprost z języka angielskiego „mikropilary” lepiej byłoby używać w tekstach polskojęzycznych jako nazwę wytworzonej struktury - mikrokolumny.

Ze względu na format wydawniczy rozprawy niektóre rysunki zrobiły się zbyt małe a ich rozdzielczość, szczególnie tych z obrazowaniem fluorescencyjnym, jest niezadowolająca, pewnie lepiej byłoby je umieścić w konfiguracji jeden pod drugim niż obok siebie (np. Ryciny II.10, II.11, II.18, II.24).

PODSUMOWANIE

Podsumowując, recenzowana rozprawa jest opracowaniem, świadczącym o dużym rzetelnym zaangażowaniu Doktorantki w wykonanie czasochłonnnych badań eksperymentalnych, jak również wejście w dużej mierze nowym dla niej obszarem związanych z inżynierią biomedyczną. Należy również podkreślić, iż Doktorantka podejmując badania laboratoryjne musiała zapoznać się z nowymi metodami badawczymi. Zatem Doktorantka wykazała się umiejętnym wykorzystaniem i łączeniem wiedzy z różnych obszarów (biologii, technologii chemicznej i ww. inżynierii biomedycznej, oraz umiejętnościami umożliwiającymi właściwe przygotowanie mikroukładów przepływowych.

Istotnymi wynikami przedstawionymi w rozprawie są: (1) opracowanie mikroukładu przepływowego z wbudowanymi pułapkami w postaci mikrokolumn ułatwiający zasiedlenie komórek i stanowiącymi jednocześnie przeszkodę powodującą mieszanie pożywki i zmniejszenie naprężeń ścinających działających na komórki podczas przepływu, (2) opis porównawczy zaproponowanych modeli przestrzennych pseudowysp trzustkowych *in vitro* w warunkach stacjonarnych i przepływowych, (3) ocena wpływu substancji czynnej – dwóch izomerów PAHSA, na proliferację i funkcje wydzielnicze komórek α i β wysp trzustkowych, powodujących zwiększenie sekrecji odpowiednio glukagonu i insuliny oraz (4) uzyskanie z wykorzystaniem opracowanego mikroukładu dwóch ciekawych poznawczo wyników (i) ocena lokalizacji komórek alfa i beta w obrębie powstałych struktur komórkowych tzw. pseudowysp trzustkowych i (ii) uzyskanie zależności zmian stężenia jonów wapnia w komórkach beta od czasu stymulacji agregatów komórek beta roztworem glukozy.

OCENA DOROBKU NAUKOWEGO DOKTORANTKI

Dodatkowo wspomnę o dorobku publikacyjnym Doktorantki, który jest bardzo dobry i obejmuje:

- 3 artykuły związane z tematyką rozprawy doktorskiej opublikowane w czasopiśmie recenzowanych indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), w szczególności w czasopiśmie: *Biosensors* (1 artykuł z roku 2022 – IF 5,227), *Biosensors and*

Bioelectronics (2 art. z roku 2020 – IF 10,618 i 2021 – IF 12,545) i 1 artykuł w czasopiśmie spoza bazy JCR *Organoids* z roku 2022, w których Doktorantka jest pierwszym autorem oraz 2 doniesienia opublikowane w materiałach konferencyjnych: *24th Int Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2020* i *Electrochemical Society Meeting, ECS Meeting 2020*;

- Patent PL 239354 (2021) Mikrosystem przepływowy do tworzenia, hodowli oraz obrazowania fluorescencyjnego trójwymiarowych agregatów komórek wysp trzustkowych, Sokołowska Patrycja, Żukowski Kamil, Jastrzębska Elżbieta, Janikiewicz Joanna, Dobrzyń Agnieszka, Brzózka Zbigniew;
- Opracowanie nowego podejścia opartego na zastosowaniu trójwymiarowego modelu wyspy trzustkowej w mikroprzepływowym systemie Lab-on-a-Chip w celu przeprowadzenia wysokowydajnej analizy funkcjonalnej w warunkach fizjologicznych i stanie patologicznym, projekt NCN Preludium, (2020-2023);
- 2 artykuły niezwiązane z tematyką rozprawy doktorskiej opublikowane w czasopismach recenzowanych indeksowanych w bazie JCR, w *Analyst* (1 art. z roku 2020 – IF 4,616), *Biomicrofluidics* (1 art. z roku 2018 – IF 2,521), rozdział w monografii Springer (2022) i doniesienie opublikowane w materiałach konferencyjnych *22nd Int Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2018*;
- Laureatka Tony B. Academic Travel Award (SLAS2020)

WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Sokołowskiej jest z obszaru badań interdyscyplinarnych zawierających elementy inżynierii biomedycznej, wyniki badań mają duże znaczenie dla rozwoju mikronarzędzi i metod bioanalitycznych z potencjałem do zastosowań w diagnostyce medycznej.

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Sokołowskiej spełnia warunki stawiane w Ustawie *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. i wnoszę o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.

Biorąc pod uwagę zakres badań przeprowadzonych przez mgr inż. Patrycję Sokołowską oraz dorobek publikacyjny Doktorantki, którego główną częścią są 4 artykuły opublikowane w czasopismach recenzowanych, prezentujące wyniki badań bezpośrednio związane z rozprawą doktorską, w tym 3 w czasopismach indeksowanych w bazie JCR, o wysokich współczynnikach wpływu, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.