

dr hab. inż. Iwona Grabowska
Zakład Biosensorów
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
ul. Tuwima 10
10-748 Olsztyn
tel.: +48 89 523 46 54
fax.: +48 89 524 01 24
e-mail: i.grabowska@pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 21.09.2022 r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Sokołowskiej
pt. „Opracowanie mikrosystemu przepływowego Lab-on-a-chip do tworzenia
i funkcjonalnej analizy modelu wyspy trzustkowej w warunkach fizjologicznych
i cukrzycy typu 2”**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Sokołowskiej zatytułowana „Opracowanie mikrosystemu przepływowego Lab-on-a-chip do tworzenia i funkcjonalnej analizy modelu wyspy trzustkowej w warunkach fizjologicznych i cukrzycy typu 2” wykonana została w Katedrze Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Zbigniewa Brzózki jako Promotora oraz prof. dr hab. Agnieszki Dobrzyń jako Kopromotora.

Praca doktorska poświęcona jest tworzeniu, hodowli oraz analizie trójwymiarowego (3D) modelu wyspy trzustkowej w oparciu o opracowany mikrosystem przepływowy Lab-on-a-chip. Ponadto w celu wykazania potencjału opracowanego systemu jako uniwersalnego narzędzia do szybkiego testowania potencjalnych środków terapeutycznych cukrzycy typu 2, przebadany został wpływ dwóch regioizomerów estru kwasu palmitynowego i kwasu hydroksystearynowego (5-PAHSA oraz 9-PAHSA) na komórki wysp trzustkowych.

Mikrosystemy typu Lab-on-a-chip stały się w ostatnich latach bardzo atrakcyjne do hodowli i analizy komórek 3D w odpowiednich warunkach przepływowych. Hodowla komórek 3D w takich systemach odwzorowuje warunki *in vivo*, umożliwia również jednoczesną ich analizę w czasie rzeczywistym bez potrzeby przenoszenia agregatów na płytki wielodołkowe. W ten sposób minimalizuje się ryzyko uszkodzenia i dezorganizacji tworzonych struktur. Aby stworzyć efektywny model 3D, trzeba zaprojektować system o odpowiedniej geometrii i zastosować właściwe materiały,

które umożliwią tworzenie agregatów komórkowych naśladujących architekturę wysepek. Systemy mikroprzepływowe zostały do tej pory wykorzystane do tworzenia modeli komórek płuc, nerek, serca oraz wątroby. Ponadto zastosowano je do badania wewnątrzkomórkowej sygnalizacji wysepek i wydzielania hormonów.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w opisany powyżej trend badawczy. Jest przykładem prezentowanej po raz pierwszy oryginalnej koncepcji tworzenia modelu komórkowego 3D wysp trzustkowych w oparciu o hodowlę wspólną dwóch rodzajów komórek – INS-1E oraz α -TC1-6 w systemie mikroprzepływym zawierającym mikropilary. Warto podkreślić, że badania na których opiera się praca zostały wykonane w zespole badawczym, który ma duże doświadczenie w projektowaniu geometrii mikrosystemów przepływowych i ich wytwarzaniu oraz odniósł wiele sukcesów na tym polu.

Dodatkowo koncepcja pracy wpisuje się w kolejny niezwykle dynamiczny trend badawczy związany z testowaniem nowych efektywnych i bezpiecznych środków terapeutycznych do leczenia cukrzycy typu 2. Badania przedkliniczne potencjalnych leków prowadzone są zwykle na dwuwymiarowych (2D) kulturach komórkowych *in vitro* lub *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych. Oba podejścia mają ograniczenia. Pierwsze związane jest z brakiem możliwości odzwierciedlenia prawdziwego środowiska komórkowego oraz interakcji komórka-komórka i komórka-środowisko zewnątrzkomórkowe. Natomiast zastosowanie modeli zwierzęcych do takich badań, od wielu lat budzi wiele kontrowersji. W związku z powyższym każda inicjatywa wpisująca się w trend 3R (ang. Replacement, Reduction, Refinement), by zastąpić badania z udziałem zwierząt innymi modelami badawczymi, jest niezwykle cenna.

Poniżej przedstawiam swoje uwagi odnośnie poprawności redakcyjnej rozprawy oraz jej wartości naukowej, merytorycznej i użytkowej.

Strona redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Sokołowskiej napisana została w języku polskim. Składa się z czterech głównych rozdziałów, z których pierwszy stanowi część literaturową, drugi część badawczą, trzeci dyskusję wyników oraz wnioski, zaś ostatni prezentowany jest zbiór cytowanej literatury. W części literaturowej umieszczonych zostało 156 pozycji uwzględniających najnowsze doniesienia naukowe. Praca została również wyposażona w niezwykle użyteczny dla czytelnika „Wykaz używanych skrótów”. Dodatkowo w części końcowej dysertacji Doktorantka

opisała swój dorobek naukowy, w tym publikacje związane z tematyką doktoratu oraz niezwiązane z tą tematyką, przedstawiła patenty, nagrody i ilość wystąpień konferencyjnych. W tym miejscu rozprawy, w mojej ocenie, winna znaleźć się lista konkretnych wystąpień konferencyjnych. Szczególnie, że jak podaje Doktorantka, było ich aż 19 w postaci wystąpień ustnych i posterowych na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Ilość tego typu aktywności jest na tym etapie rozwoju naukowego Doktorantki imponująca.

Układ ocenianej pracy doktorskiej jest typowy dla tego typu publikacji. Szata graficzna została przygotowana w sposób staranny. Jednakże jasność stylu i zastosowane skróty myślowe w kilku miejscach pracy budzą pewne zastrzeżenia, jak na przykład: strona 49 „Opracowanie systemów Lab-on-a-chip...usprawniłoby badania cukrzycy...”, strona 92 „...do dalszych badań wybrano gęstość”, strona 106 „...we wszystkich testowanych stosunkach gęstości komórek”. Zdarzają się również w pracy błędne opisy cytowanych rycin, jak np. na stronie 42 Rycina 1.8 w tekście funkcjonuje jako 1.6 lub też typowe błędy literowe, np. zamiast PAHSA (ang. Palmitic Acid esters of Hydroxy Stearic Acid) pojawia się PASHA (strona 120). Są to drobne błędy redakcyjne, które nie zmniejszają wartości merytorycznej pracy.

Strona merytoryczna rozprawy

W części literaturowej Doktorantka scharakteryzowała trzustkę, wyspy trzustkowe, rolę insuliny i glukagonu w utrzymaniu homeostazy węglowodanowej organizmu oraz rolę jonów wapnia w sekrecji insuliny. Następnie opisała cukrzycę jako chorobę wywołaną zaburzeniami funkcjonowania wysp trzustkowych. Przedstawiła także terapie farmakologiczne oraz estry kwasów tłuszczowych i hydroksykwasów tłuszczowych jako nowe związki stosowane w terapii cukrzycy typu 2. W kolejnym podrozdziale części literaturowej omówiła zastosowanie systemów Lab-on-a-chip do badań biologicznych i wysp trzustkowych. W podsumowaniu tej części Autorka udowodniła potrzebę opracowania uniwersalnego trójwymiarowego modelu komórkowego odwzorowującego morfologię wysp trzustkowych. Ponadto w tej części pracy szeroko opisane zostały potencjalne właściwości przeciwcukrzycowe PAHSA. W związku z tym, że mechanizm ich działania nie został do końca poznany, zaś w literaturze naukowej można znaleźć wyniki badań kwestionujące ich potencjał przeciwcukrzycowy, w ocenianej pracy zabrakło mi dokładniejszego opisu tych badań, aby w pełni uwiarygodnić wybór tych związków do badań. Doktorantka podsumowała

ten aspekt jednozdaniowym komentarzem i odesłała do pozycji literaturowej numer 52. Jednakże biorąc całokształt części literaturowej, należy podsumować, że prezentuje on bardzo dobrą ogólną wiedzę teoretyczną Autorki.

W części badawczej Doktorantka nakreśliła w sposób jasny i klarowny główny cel pracy oraz szczegółowe cele badawcze. W tej części pracy opisała też materiały i metody badań. Wart podkreślenia jest fakt zastosowania wielu metod badawczych z różnych dziedzin, począwszy od metod wytwarzania mikrosystemów, po hodowlę komórek i ich analizy. Autorka na stronie 58 napisała, że geometrie wszystkich wykorzystywanych w badaniach mikrosystemów przepływowych zaprojektowane zostały przy użyciu oprogramowania do projektowania 3D CAD SolidWorks, Dassault Systems. W moim przekonaniu w tym opisie powinny znaleźć się choćby podstawowe informacje dotyczące parametrów, jakie były brane pod uwagę w projektowanych geometriach mikrosystemów. Dlatego zapraszam do komentarza tego aspektu w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Wyniki badań zostały opisane w kolejnym rozdziale. W postawionej na stronie 89 hipotezie badawczej Autorka stwierdziła, że „...na podstawie wyników uzyskanych po przeprowadzeniu badań z wykorzystaniem U-kształtnych płytek wielodołkowych, postawiono hipotezę badawczą, że zastosowanie mikrosystemu IV pozwoli na szybsze uzyskanie sferycznych agregatów odpowiadających wyspom trzustkowym”. W zasadzie nie znalazłam w pracy odpowiedzi na tak sformułowaną hipotezę badawczą. Aczkolwiek w podsumowaniu tej części badań, Autorka bardzo dokładnie opisała warunki agregacji komórek INS-1E, zarówno w warunkach statycznych (płytki U-kształtne), jak i przepływowych (mikrosystem IV) oraz podkreśliła zalety mikrosystemu przepływowego, jednakże tylko w kontekście zwiększenia żywotności komórek w agregatach oraz braku rdzenia złożonego z komórek martwych, wyższego stopnia sferyczności i jednorodnej struktury. W dalszej części opisywanych wyników badań, Doktorantka przedstawiła wpływ izomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA na morfologię pseudowysp, lokalizację komórek w pseudowyspie oraz wpływ tych izomerów na stymulowane glukozą wydzielanie insuliny i glukagonu. W podsumowaniu Autorka stwierdziła, że izomer 5-PAHSA, w szerokim zakresie stężeń, ma bezpośredni pozytywny wpływ na zwiększenie proliferacji komórek wysp trzustkowych hodowanych z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV i jest aktywatorem sekrecji insuliny. Wobec powyższego należało przedstawić doniesienia literaturowe podające powody, że izomery te wykazują różnice w działaniu, o ile takie są dostępne.

Pomimo drobnych nieścisłości, wartość merytoryczną pracy oceniam bardzo wysoko. Opisane wyniki badań stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a wyniki prac zostały opublikowane w wysoko indeksowanych czasopismach naukowych i ocenione wcześniej przez recenzentów powołanych przez edytorów tych czasopism. Praca jest spójna i logiczna. Świadczy o dużej wiedzy Autorki. Wnioski i twierdzenia zawarte w pracy pozwalają przyjąć, że Autorka prezentuje wysoki potencjał naukowy i stać ją na samodzielne prowadzenie badań. Świadczy o tym też Jej udział merytoryczny w tworzeniu koncepcji pracy, wykonywaniu większości badań i analizy wyników oraz przygotowywaniu manuskryptów publikacji naukowych. Warto podkreślić również, iż w wyniku przeprowadzonych badań, opracowany został mikrosystem przepływowy zawierający mikropilary, który umożliwił tworzenie, hodowlę oraz analizę psudowysp trzustkowych złożonych z komórek α i β w warunkach zbliżonych do *in vivo*. Jest to bardzo istotne osiągnięcie, gdyż opracowany system może w przyszłości być wykorzystywany do testowania nowych potencjalnych leków i przyczynić się do opracowywania skutecznych metod leczenia cukrzycy typu 2. Takie podejście z pewnością pozwoli również na zredukowanie wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych do badań podstawowych. Poruszony temat jest bardzo rozwojowy i może być przedmiotem dalszych pogłębianych badań.

Zgodnie z przedłożoną dokumentacją, Pani mgr inż. Patrycja Sokołowska jest współautorką sześciu publikacji naukowych powiązanych z tematyką doktoratu. Dwie z prac ukazały się w prestiżowym i wysoko punktowanym czasopiśmie *Biosensors and Bioelectronics* ($IF_{2020}=10,618$; $IF_{2021}=12,545$). W przypadku pięciu prac jest też pierwszym autorem. A w najnowszej pracy, która ukazała się w czasopiśmie *Biosensors* ($IF_{2021}= 5,743$) w 2022 roku, jest autorem korespondencyjnym. Takie osiągnięcia obrazują dynamiczny rozwój kariery, doświadczenie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, zdobyte w trakcie studiów doktoranckich „Od chemii do bioinnowacji”. Dodatkowo cztery publikacje, które nie są związane z tematyką doktoratu, świadczą o dużym zaangażowaniu i aktywności badawczej Pani mgr inż. Patrycji Sokołowskiej. Dorobek naukowy obejmuje również współautorstwo w złożonym w 2021 roku zgłoszeniu patentowym pt. „Mikrosystem przepływowy do tworzenia, hodowli oraz obrazowania fluorescencyjnego trójwymiarowych agregatów komórek wysp trzustkowych”. Autorka uzyskała również finansowanie na swoje badania w ramach projektu Preludium 17 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. „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”. Otrzymała również nagrodę za najlepszą publikację naukową w 2021 roku oraz finansowanie na wyjazd na konferencję w 2019 roku. Aż 19 razy brała udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych.

Ocena końcowa

Biorąc pod uwagę całokształt przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Sokołowskiej pt. „Opracowanie mikrosystemu przepływowego Lab-on-a-chip do tworzenia i funkcjonalnej analizy modelu wyspy trzustkowej w warunkach fizjologicznych i cukrzycy typu 2” stwierdzam, że spełnia ona wymogi art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie ocenianej rozprawy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie chcę podkreślić, że ze względu na interdyscyplinarny i oryginalny charakter podjętego problemu naukowego, całkowity dorobek naukowy Doktorantki poparty publikacjami o wysokim międzynarodowym zasięgu, współautorstwie w zgłoszeniu patentowym, uzyskane finansowanie na badania, zgłaszam wniosek o zarekomendowanie Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem

