

Warszawa 30 marca 2021 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Kobuszewskiej

„Mikrosystemy przepływowe typu Lab-on-a-Chip do badania niedotlenienia mięśnia sercowego”,
wykonanej pod opieką dr hab. inż. Elżbiety Jastrzębskiej na Wydziale Chemicznym Politechniki
Warszawskiej.

Pani mgr inż. Anna Kobuszewska jest absolwentką jednego z najlepszych liceów w Polsce – 5 STO w Milanówku. Pani Kobuszewska ukończyła studia I i II stopnia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 2015 roku jest studentką studiów doktoranckich na tym samym wydziale. Pani Kobuszewska jest współautorką trzech publikacji z listy JCR oraz jednego zgłoszenia patentowego. Uwagę zwraca aktywny udział doktorantki w konferencjach naukowych, udział w projekcie badawczym oraz odbycie stażu w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, a także w szpitalu w Grodzisku Mazowieckim – tego typu doświadczenia pomagają uzyskać szerszy kontekst naukowy i praktyczny dla pracy naukowej w obszarze zastosowania technik Lab-on-Chip. Pani mgr inż. Anna Kobuszewska była też wielokrotnie wyróżniona za wyniki w nauce oraz za osiągnięcia badawcze, w tym przez amerykańską organizację Society of Laboratory Automation and Screening za najbardziej innowacyjne osiągnięcie badawcze opublikowane w czasopiśmie SLAS Technology w 2017 roku.

Przedłożona praca ma dość ogólny tytuł dotyczący zastosowania systemów Lab-on-Chip do badania niedotlenienia mięśnia sercowego. Systemy Lab-on-Chip są od lat stosowane w hodowlach komórkowych, jak również hodowlach tkankowych. Praca powstała w ośrodku akademickim o bardzo dużym doświadczeniu i bogatym dorobku w zakresie zastosowania systemów Lab-on-Chip w hodowlach komórkowych. Zastosowanie systemów Lab-on-Chip w tym obszarze jest ciekawe ze względu na możliwość prowadzenia jednocześnie szeregu interwencji – związanych np. z precyzyjną kontrolą przestrzenną i czasową zmiennego środowiska chemicznego, możliwością tworzenia interakcji przestrzennych w mikrokomorach lub sekcjach kanałów mikroprzepływowych, zarówno w dwóch, dwóch i pół, jak i w trzech wymiarach, oraz precyzyjnej i wysokorozdzielczej w czasie i przestrzeni obserwacji zjawisk biologicznych zachodzących zarówno na poziomie populacji komórek czy tkanek, jak i na poziomie pojedynczych komórek, czy wreszcie na poziomie wewnątrzkomórkowym. Tytuł pracy nie przedstawia żadnej konkretnej tezy dotyczącej np. wyjątkowych zalet zastosowania systemów Lab-on-Chip dla oceny wpływu niedotlenienia na biologię tkanki mięśnia sercowego, czy też odkrytego dzięki tym zaletom zjawiska.

Praca doktorska zbudowana jest wobec bardzo ambitnego celu – rozwoju metod Lab-on-Chip do wykorzystania w procesie przygotowywania implantów komórkowych do rekonstrukcji uszkodzonej tkanki mięśnia sercowego. Autorka stawia sobie za cel opracowanie systemów Lab-on-Chip, które umożliwią sprawdzenie funkcjonowania zespołu komórek w różnych warunkach niedotlenienia, zarówno dla komórek hodowanych w monowarstwie, jak i w trójwymiarowej strukturze warstwowej na rusztowaniu wykonanym z nanowłókny. Autorka stworzyła trzy systemy mikroprzepływowe oraz przeprowadziła doświadczenia z wykorzystaniem komórek mięśnia sercowego, a także komórek macierzystych, odkrywając ich rolę w regeneracji niedotlenionych komórek mięśniowych.

Praca zbudowana jest na klasycznej strukturze rozprawy doktorskiej, przedstawiając abstrakt, przegląd literaturowy obejmujący 161 pozycji oraz opis wyników własnych doktorantki, w podziale na opis metodyki oraz opis trzech wariantów systemów mikroprzepływowych służących do symulacji niedotlenienia komórek sercowych hodowlanych w postaci monowarstwy, mikrosystemów wykorzystujących maty nonowłókniste oraz systemów służących do badania mięśnia sercowego. Pracę konkludują dyskusja wyników, wnioski i podsumowanie.

Część pierwsza pracy doktorskiej „Przegląd literaturowy” w sposób bardzo systematyczny wprowadza czytelnika we wszystkie istotne dziedziny wiedzy wykorzystane w badaniach Doktorantki, w tym w problematykę chorób układu sercowo-naczyniowego oraz metody leczenia i medycynę regeneracyjną. Dalej Autorka opisuje tło literaturowe dla modeli tkankowych oraz wykorzystania w tym obszarze technik Lab-on-Chip oraz skupia się na wykorzystaniu tych technik w badaniach nad niedotlenieniem komórek i hodowli komórkowych.

W części drugiej Autorka opisuje metodykę badań oraz optymalizację warunków niedotleniania, aby przejść do trzech rozdziałów (czwarty, piąty oraz szósty) opisujących trzy generacje układów stworzonych w ramach pracy doktorskiej.

Pierwsza generacja układów (rozdział czwarty) poświęcona jest najprostszemu celowi w pracy – tzn. opracowaniu układu umożliwiającego zasiedlenie podłogi mikrokanatu komórkami ludzkimi i/lub szczurzymi oraz ekspozycji tych komórek na płynne medium o kontrolowanej zawartości czynników bioaktywnych. W drugiej generacji układów Autorka stworzyła bardzo ciekawą możliwość hodowli komórek na kwazi trójwymiarowych rusztowaniach nanowłóknistych osadzonych w podłodze mikrokomór przepływowych oraz wykazała możliwość obserwacji wzrostu komórek, ich morfologii oraz zastosowanie szeregu metod bioanalitycznych do oceny przeżywalności oraz poziomu stężenia ATP w komórkach poddanych stresowi niedoboru tlenu. Wreszcie w trzeciej generacji układów Autorka umożliwiła równoczesne prowadzenie czterech hodowli komórkowych na matach nanowłóknistych w czterech różnych zestawach warunków chemicznych. W doświadczeniach wykorzystwała dwie linie ludzkich komórek mięśnia sercowego (H9C2 oraz HCM) oraz ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste. W układzie trzeciej generacji ciekawym rozwiązaniem technicznym było rozlokowanie mikrokomór hodowlanych na siatce odpowiadającej rozmieszczeniu dołków na płycie wielodołkowej oraz wykorzystanie spektrofotometrycznego czytnika płytek w pomiarach metodami bioanalitycznymi monitorującymi wzrost oraz poziom ATP w komórkach. Autorka na podstawie wyników przeprowadzonych doświadczeń na hodowlach komórek mięśnia sercowego rosnących w monokulturze oraz w kokulturze z komórkami macierzystymi wnioskuje o pozytywnym wpływie komórek macierzystych na metabolizm komórek mięśnia sercowego poddanych stresowi obniżonej dostępności tlenu.

Praca urzeka bogactwem zastosowanych technik oraz komplementarnością wykorzystanych metod badawczych. Autorka w ramach swojej pracy wykazała się iście interdyscyplinarnym podejściem. W toku pracy projektowała układy mikroprzepływowe, w tym mikroukłady składające się z różnych materiałów, opracowała nową technikę mikrofabrykacji, prowadziła symulacje przepływu cieczy przez złożone geometrycznie mikroukłady, używała szeregu metod bioanalitycznych, chemicznych czynników bioaktywnych, hodowała komórki eukariotyczne, prowadziła doświadczenia z żywymi komórkami w mikroukładach, badała procesy biochemiczne zachodzące w żywych komórkach, dokonywała obserwacji dotyczących wzrostu oraz morfologii komórek, wyciągała wnioski na temat procesu wzrostu w zróżnicowanych warunkach fizycznych i chemicznych. Jest to imponujący zestaw technik i obszarów wiedzy, świadczący moim zdaniem o dużym zaangażowaniu i płynności w prowadzeniu interdyscyplinarnych badań na poziomie światowym.

Jednocześnie praca pozostawia niedosyt w dwóch warstwach. Pierwsza to warstwa metodologiczna. W wielu aspektach pracy badawczej Autorka przemyka nad zagadnieniami, nie utrzymując dyscypliny poprawnego logicznego wnioskowania. Poniżej, w szczegółowych uwagach, podaję kilka przykładów dotyczących np. porównywania wielkości. Nie można pisać o tym, że coś jest lepsze, bo jest mniejsze, i kropka. Porównywać trzeba zawsze jedną wielkość z drugą. Nie można być większym lub mniejszym w ogóle, w oderwaniu od kontekstu. To prosta zasada, a niestosowanie jej z żelazną dyscypliną może prowadzić do bardzo istotnych uchybień – zarówno w poprawności wnioskowania, jak i w efektywności

przewodzenia badań. Czysto hipotetycznie – dla uzyskania jednorodnego stężenia czynników bioaktywnych w kanale (nad hodowlą komórkową) być może wystarczyłby prosty kanał, czego Autorka chyba nie sprawdziła. Gdyby utrzymała dyscyplinę wypisania wymagań odnośnie układu (np. poziom jednorodności stężenia w kanale, czas wymiany poziomu stężenia, itp.) mogłaby porównać kilka różnych układów zaspokajających te wymagania. Podobnie, np. w doborze prędkości przepływu, Autorka nigdzie nie odnosi się do wielkości naprężeń ścinających faktycznie tolerowanych przez hodowane komórki, nie przeszkodziło to jednak Autorce wybrać mniejszą z dwóch zbadanych wielkości – bez uwzględnienia wymagań stawianych przez komórki. Drugim niedosytem, pośrednio wynikającym z pierwszego, jest płytkość ostatecznych wniosków z pracy. Parafrazując pracę do jednego zdania, mówi ona – wykazałam eksperymentalnie, że możliwa jest hodowla komórek w mikroukładach oraz ocena wpływu różnych warunków, w tym chemicznych, fizycznych oraz biologicznych na ich żywotność. Szkoda, że Autorka nie wykazała głębiej efektów, które można by wykryć z wykorzystaniem opracowanych, innowacyjnych układów mikroprzepływowych.

Pomimo wspomnianych powyżej deficytów, jestem zdania, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stoi na wystarczająco wysokim poziomie. Bogactwo zastosowanych technik świadczy o dużym zaangażowaniu oraz szerokiej wiedzy zarówno teoretycznej, jak i praktycznej Autorki. Uważam, że rozprawa ta spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) w związku z art. 178 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Kobuszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwagi:

- W tekście rozprawy Autorka stosuje bezosobową formę narracji – np. „W tej pracy doktorskiej zdecydowano się na wykorzystanie ...” czy „(...) w badaniach wykorzystano (...)”. Tekst byłby żywszy i odważniej oddawałby rolę Autorki, gdyby zdecydowała się na użycie formy osobowej „W mojej pracy (...) zdecydowałam się na wykorzystanie”, czy „w badaniach wykorzystałam (...)”. Recenzent sugeruje użycie formy osobowej, strony czynnej, tak by brać pełną odpowiedzialność za swoje dzieło i przedstawiać je żywym, angażującym opisem.
- Autorka pozwala sobie w tekście na skróty myślowe, czasami niezręczne, czasami utrudniające zrozumienie. Dla przykładu „(...) agregaty emitujące pomarańczową/czerwoną fluorescencję (...)”. Słowo fluorescencja oznacza zjawisko emisji światła w wyniku wcześniejszego wzbudzenia cząsteczek chemicznych światłem o wyższej energii. Tak więc agregaty mogą emitować światło fluorescencyjne, nie mogą jednak emitować zjawiska emisji. Podobnie Autorka pisze skrótowo „w celu optymalizacji hodowli ...” pomijając słowo „warunków” oraz nie pisząc, pod jakim kątem warunki hodowli były optymalizowane. W kolejnym przykładzie „(...) stwierdzono (...) znaczny spadek stosunku agregatów do monomerów”, zamiast – jak się można domyślać – „zmniejszenie liczebności agregatów w stosunku do liczebności monomerów.” Recenzent sugeruje w dalszej pracy naukowej konstruowanie opisów naukowych w zdyscyplinowany precyzyjny sposób, ponieważ nie tylko czyni to tekst łatwiejszym do zrozumienia, ale często ułatwia również Autorowi głębsze zrozumienie opisywanych obserwacji.
- Rozdział 3 części drugiej pozostawia sporo do życzenia w warstwie logiki wywodu. Autorka próbuje dowieść, iż proponowany przez nią biochemiczny stres ekspozycji komórek na działanie środka FCCP jest dobrym modelem stresu niedotlenienia. Autorka pokazuje eksperymentalnie, iż podobnie jak stres niedotlenienia, ekspozycja na FCCP powoduje inicjacje

apoptozy w podobnym czasie oraz zwiększenie stężenia jonów wapnia wewnątrz komórek. Odkryte dwie korelacje nie przekonują jednak, że w eksperymentach prowadzonych przez Autorkę FCCP faktycznie powoduje obniżenie stężenia ATP w komórkach. Autorka używa tutaj nieuprawnionych skrótów myślowych – np. na str. 67 pisze: „Na podstawie wyników zaprezentowanych w tej części rozprawy doktorskiej stwierdzono, że hodowla w warunkach niedotlenienia powoduje wzrost stężenia jonów wapnia w komórkach sercowych”. Jest to zapętlenie dowodu - Autorka wcześniej używa obserwacji wzrostu stężenia jonów wapnia jako dowodu, iż istotnie ekspozycja na FCCP powoduje apoptozę, co więcej, zakładając milcząco, iż apoptoza wywołana jest niedotlenieniem indukowanym czynnikiem FCCP. Parafrazując stary żart – jeśli założymy, że utrata słuchu powoduje, iż myszy nie uciekają w wyniku stresu akustycznego, nie możemy dowodzić, iż pozbawienie myszy kończyn dobrze symuluje utratę słuchu, mimo iż obserwujemy podobny efekt eksperymentalny. O ile nie ulega wątpliwości, iż niedotlenienie powoduje apoptozę oraz że ekspozycja na FCCP powoduje apoptozę, proszę o wytłumaczenie logiki dowodu eksperymentalnego, iż ekspozycja komórek na FCCP faktycznie powoduje stres hypo-oksydacyjny, tj. obniżenie stężenia ATP w komórkach. Eksperymenty badające pośrednio stężenie ATP co prawda zawarte są w dalszych częściach rozprawy, jednak w tym miejscu Autorka w ogóle się do nich nie odwołuje – proszę o wyjaśnienie logiki rozumowania przedstawionej w tym rozdziale.

- Strona 71 – Rozdział 4 części drugiej rozprawy. Autorka dyskutuje wartość naprężeń ścinających dla dwóch prędkości przepływu medium przez układ mikroprzepływowy. Z dwóch wartości wybiera mniejszą, motywując to ogólnikowym stwierdzeniem, iż „zbyt wysoka wartość naprężeń ścinających może negatywnie wpływać na morfologię i żywotność komórek.” Dalej Autorka pisze:

przedstawiono na wykresach na Rys. II.6.C-D. Dla przepływu 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ stwierdzono, że wartość naprężeń ścinających występujących w mikrokomorze hodowlanej była równa ok. 0,008 Pa (Rys. II.6.C), natomiast dla przepływu 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ wynosiła ok. 0,048 Pa (Rys. II.6.D). Naprężenia ścinające występujące dla przepływu 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ były 6 razy większe niż dla przepływu 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. W związku z tym, na podstawie symulacji przepływu oraz wartości otrzymanych dla symulacji naprężeń ścinających w dalszych badaniach postanowiono wykorzystać przepływ 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Tego typu postępowanie uważam za jeden z najczęstszych i najbardziej zdradliwych błędów w rozumowaniu. Podawanie konkretnych wartości sugeruje ekspertyzę techniczną i rzetelność, a użycie struktury „W związku z tym, na podstawie postanowiono ...” sugeruje logiczne rozumowanie, podczas gdy go tu de facto nie ma. W powyższym tekście moglibyśmy zmienić jednostki z Pascali na mega Pascale, i nie zmieniłoby to wartości logicznej zdania, podczas gdy w jednej sytuacji komórki miałyby szansę przeżyć, a w drugim żadnej. Jest tak dlatego, że powyższe rozumowanie nie odnosi się wcale! do żadnej wartości liczbowej określającej wytrzymałość komórek na naprężenia ścinające. Odwołując się do analogii, to trochę tak, jakby napisać „Ponieważ ziarnko grochu jest zdecydowanie bardziej kaloryczne (2 kcal/ziarnko) od ziarnka maku (0.1 kcal/ziarnko), a dzieci w wieku dorastania wymagają wyjątkowo bogatej diety, w dalszych badaniach zdecydowania się na dietę jedno ziarnko grochu dziennie dla każdego badanego”.

Bardzo proszę o przedstawienie, z badań literatury lub własnych eksperymentów, wartości liczbowych naprężeń ścinających tolerowanych przez komórki hodowane w ramach pracy doktorskiej oraz o uzasadnienie wybranych w toku pracy wielkości prędkości przepływu cieczy przez układ mikroprzepływowy.

- Czy wykonano proste eksperymenty kontrolne w prostym kanale o szerokości takiej samej, jak szerokość kanału pomiędzy strukturami kolumnowymi, do którego dochodziłyby dwa kanały

włotowe – jeden dla komórek, a drugi dla medium? Byłby to zdecydowanie prostszy układ mikroprzepływowy, który prawdopodobnie oferowałby te same funkcjonalności co układ I prezentowany w pracy – tzn. możliwość dostarczania medium oraz zmiany stężenia substancji chemicznych w kanale w czasie ok. 60 sekund, bez nadmiernego narażenia komórek na naprężenia ścinające. Jeżeli taki układ nie był testowany, proszę o dyskusję takiego rozwiązania – często w badaniach naukowych pozwalamy sobie na projektowanie skomplikowanych układów, podczas gdy proste rozwiązania byłyby znacznie bardziej ekonomiczne w uzyskaniu podobnych efektów. Zawsze warto zadać sobie pytanie – co jest istotą wymagań w tym eksperymencie? Oraz – jaki jest najprostszy sposób na spełnienie tych wymagań?

- W rozdziale 4 Autorka nie wykorzystała możliwości szybkiej zmiany stężenia FCCP (w skali pojedynczych minut) i konkludowała, iż czas ekspozycji nie ma znaczenia, a kluczową rolę odgrywa stężenie FCCP. Nie rozumiem zatem uzasadnienia dla konkluzji o przewadze układu mikroprzepływowego nad hodowlą w dołkach. W dołkach możliwa jest zmiana stężenia FCCP w czasie ok. minuty, po dodaniu odpowiedniego odczynnika i delikatnym zamieszaniu. Proszę o uzasadnienie wniosku o przewadze funkcjonalnej prezentowanego układu mikroprzepływowego nad tradycyjnymi metodami na podstawie prezentowanych w pracy wyników eksperymentów.
- Jestem pod wrażeniem opracowanej przez Autorkę metody wykorzystania mat nanowłókniny oraz integracji tych mat z polidimetylosiloksanowymi układami mikroprzepływowymi. Autorka opracowała złożoną metodę mikrofabrykacji oraz scharakteryzowała wytwarzane struktury odpowiednio dobierając warunki procesów wytwarzania.
- Na stronie 88 Autorka ponownie argumentuje, iż optymalnie dobiera wartości naprężeń ścinających, nie odwołując się do żadnych danych – ani literaturowych, ani eksperymentalnych – dotyczących wytrzymałości komórek na naprężenia ścinające.
- Jestem pod wrażeniem przeprowadzonych doświadczeń na układzie II z wykorzystaniem komórek – to żmudne eksperymenty wymagające dobrego zaprojektowania i szerokiej wiedzy w zakresie hodowli i wykorzystania metod obrazowania.
Na stronie 93 Autorka pisze, iż „test ten udowodnił, że zarówno ukierunkowanie nanowłókna, jak i przepływ medium wpływają na równoległe ułożenie komórek (...)”. Proszę o wyjaśnienie eksperymentów kontrolnych, tzn. z nanowłóknami oraz bez nanowłókien, krzyżowo przy różnych wartościach przepływu oraz bez przepływu, aby uzasadnić ten wniosek. W szczególności, czy przepływ w układzie bez nanowłókien również wywołuje równoległe ułożenie komórek?
- Na stronie 98 Autorka podaje wartości procentowe spadku zawartości ATP w komórkach po ekspozycji na FCCP. De facto mierzone jest natężenie światła emitowanego w procesie utleniania lucyferyny. Czy jakieś inne czynniki niż stężenie ATP mogły mieć wpływ na obserwowane natężenie światła? Czy obserwacja, że po 30 minutach inkubacji w FCCP stężenie ATP spada o 28% koreluje dobrze z sugestią, iż jest to również początek apoptozy stresowanych komórek?

Piotr Garstecki

