

Dr inż. Elżbieta Jastrzębska
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska

Autoreferat PL

***„Badanie funkcji komórkowych z zastosowaniem nowych
systemów Lab-on-a-chip oraz zaawansowanych modeli
hodowli komórek in vitro”***

Załącznik nr 2-PL

1. **Imię i Nazwisko:** Elżbieta Jastrzębska (*de domo* Jędrych)

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- (2003 – 2008) studia magisterskie; praca magisterska pt. „Badania nad wykorzystaniem zintegrowanych systemów mikroanalitycznych w inżynierii komórkowej”, obrona 30 czerwca 2008r., Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

- (2008 –2012) studia doktoranckie; praca doktorska pt.: „Mikrosystemy *Lab-on-a-chip* do oceny skuteczności terapii przeciwnowotworowych”, obrona 8 maja 2012r., Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

- listopad 2010 – czerwiec 2012 – samodzielny chemik, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

- lipiec 2012 – obecnie – adiunkt, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

I. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Jednotematyczny cykl publikacji pt.:

„Badanie funkcji komórkowych z zastosowaniem nowych systemów *Lab-on-a-chip* oraz zaawansowanych modeli hodowli komórek *in vitro*”

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

☒ - jako autor korespondencyjny

[H1] **E. Jastrzebska**[☒], M. Bulka, N. Rybicka, K. Zukowski (2015) *Analysis of the efficiency of photodynamic therapy using a microsystem for mono-, co- and mixed cultures*, Sensors & Actuators: B. Chemical, 221, 1356-1365

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu i wykonaniu mikrosystemu i przeprowadzeniu z jego zastosowaniem części eksperymentów, interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu większości manuskryptu i jego ostatecznej korekcie oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **80%**

IF₂₀₁₅= 4,758; CI=6 (10-Scopus)

[H2] K. Tokarska, M. Bułka, U. Bazylińska, **E. Jastrzębska**, M. Chudy, A. Dybko, K.A. Wilk, Z. Brzózka[✉] (2016) *Evaluation of nanoencapsulated verteporfin's cytotoxicity using a microfluidic system*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 127, 39-48

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy dotyczącej testów prowadzonych w makro- i mikroskali, współudziale w przygotowaniu planu eksperymentu z zastosowaniem opracowanego mikrosystemu, interpretacji wyników otrzymanych w testach biologicznych, przygotowaniu fragmentów manuskryptu.

Mój wkład określam na **40%**

IF₂₀₁₆= 3,255; CI=4 (6-Scopus)

[H3] **E. Jastrzębska**[✉], U. Bazylińska, M. Bułka, K. Tokarska, M. Chudy, A. Dybko, K.A. Wilk, Z. Brzózka (2016) *Microfluidic platform for photodynamic therapy cytotoxicity analysis of nanoencapsulated indocyanine-type photosensitizers*, Biomicrofluidics, 10, 014116

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, współudziale w przygotowaniu planu i wykonaniu części eksperymentów biologicznych w makro i mikroskali, interpretacji tych wyników, przygotowaniu fragmentów manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **55%**

IF₂₀₁₆= 2,535; CI=7 (11-Scopus)

[H4] A. Zuchowska[✉], **E. Jastrzębska**, K. Zukowski, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka (2017) *A549 and MRC-5 cell aggregation in a microfluidic Lab-on-a-chip system*, Biomicrofluidics 11,024110

Mój udział w tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji pracy (praca realizowana w ramach projektu SONATA 5, którego byłam kierownikiem) i przygotowaniu planu eksperymentu z zastosowaniem opracowanego mikrosystemu, interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu fragmentów manuskryptu i jego ostatecznej korekcie.

Mój wkład określam na **50%**

IF₂₀₁₇= 2,571; CI=4 (6-Scopus)

[H5] A. Zuchowska, **E. Jastrzębska**[✉], M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka (2017) *3D lung spheroid cultures for evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures in microfluidic Lab-on-a-Chip system*, Analytica Chimica Acta 990, 110-120

Mój udział w tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i mikrosystemu, współudziale w przygotowaniu planu eksperymentu, interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu części manuskryptu i jego ostatecznej korekcie oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **60%**

IF₂₀₁₇= 5,123; CI=3 (4-Scopus)

[H6] A. Zuchowska, K. Marciniak, U. Bazylinska, **E. Jastrzebska**[✉], K.A. Wilk, Z. Brzozka (2018) *Different action of nanoencapsulated meso-tetraphenylporphyrin in breast spheroid co-culture and monoculture under microfluidic conditions*, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 275, 69-77

Mój udział w tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy dotyczącej badań w mikrosystemie, współdziałanie w przygotowaniu planu eksperymentu, interpretacji wyników otrzymanych w mikrosystemie do hodowli kokultury sferoidów, przygotowaniu części manuskryptu i jego ostatecznej korekcie oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **55%**

IF_{2017/2018}= 5,667; CI=0 (0-Scopus)

[H7] **E. Jastrzebska**[✉], E. Tomecka, I. Jesion, *Heart-on-a-chip based on stem cell biology* (2016) *Biosensors and Bioelectronics*, 75, 67-81

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na utworzeniu koncepcji pracy (praca realizowana w ramach projektu LIDER, którego byłam kierownikiem), przygotowaniu większości manuskryptu i jego ostatecznej korekcie oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **80%**

IF₂₀₁₆= 7,780; CI=10 (17-Scopus)

[H8] M. Bułka, **E. Jastrzebska**[✉] (2018) *Rozdział 8:Heart-on-a-chip systems* w książce *Cardiac Cell Culture Technologies: Microfluidic and On-Chip Systems* pod redakcją **E. Jastrzebska**[✉], Z. Brzozka, Springer, 169-199

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na utworzeniu koncepcji pracy (praca realizowana w ramach projektu LIDER, którego byłam kierownikiem), przygotowaniu większości rozdziału i jego ostatecznej korekcie oraz korespondencji z wydawcą.

Mój wkład określam na **90%**

MNiSW= 5 pkt, CI=0 (0-Scopus)

[H9] A. Kobuszewska, E. Tomecka, K. Zukowski, **E. Jastrzebska**[✉], M. Chudy, A. Dybko, P. Renaud, Z. Brzozka (2017) *Heart-on-a-Chip: An Investigation of the Influence of Static and Perfusion Conditions on Cardiac (H9C2) Cell Proliferation, Morphology, and Alignment*, *Slas Technology*, 22, 536-546 (**Front Cover**)

Mój udział w tej pracy polegał na utworzeniu koncepcji pracy (praca realizowana w ramach projektu LIDER, którego byłam kierownikiem), przygotowaniu planu eksperymentu, współdziałanie w wykonaniu mikrosystemów i przeprowadzeniu z jego zastosowaniem części eksperymentów, interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu części manuskryptu i jego ostatecznej korekcie oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **65%**

IF₂₀₁₇= 2,632; CI=1 (4-Scopus)

[H10] E. Tomecka, K. Zukowski, **E. Jastrzebska**[✉], M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka (2018) *Microsystem with micropillar array for three- (gel-embedded) and two-dimensional cardiac cell culture*, Sensors & Actuators: B. Chemical, 254, 973-983

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji pracy (praca realizowana w ramach projektu LIDER, którego byłam kierownikiem), zaplanowaniu eksperymentów biologicznych prowadzonych na płytkach wielodółkowych i w mikrosystemie, interpretacji otrzymanych wyników, ostatecznej korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **50%**

IF_{2017/2018}= 5,667; CI=0 (4-Scopus)

[H11] E. Tomecka[✉], M. Wojasinski, **E. Jastrzebska**, M. Chudy, T. Ciach, Z. Brzozka (2017) *Poly (L-lactic acid) and polyurethane nanofibers fabricated by solution blow spinning as potential substrates for cardiac cell culture*, Materials Science and Engineering C, 75, 305-316

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji pracy (praca realizowana w ramach projektu LIDER, którego byłam kierownikiem), zaplanowaniu części eksperymentów biologicznych oraz interpretacji otrzymanych wyników, ostatecznej korekcie tekstu manuskryptu.

Mój wkład określam na **40%**

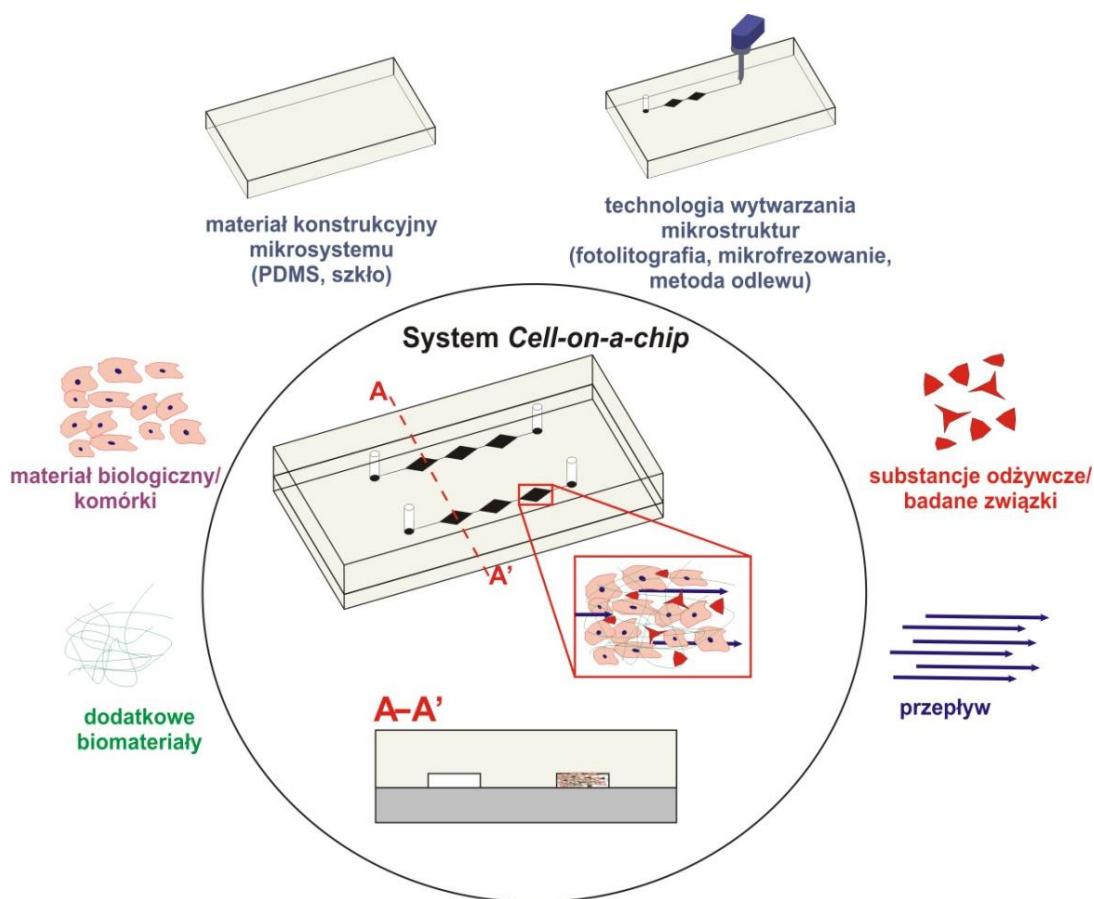
IF₂₀₁₇= 5,080; CI=8 (11-Scopus)

Sumaryczny impact factor jednotematycznego cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej wg listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 45,068. W 8 pracach z tego cyklu jestem autorem korespondencyjnym.

C) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Koncepcja miniaturowych narzędzi, tzw. systemów *Lab-on-a-chip* po raz pierwszy pojawiła się w latach 90-tych i od tego czasu nastąpił ich gwałtowny rozwój w takich obszarach nauki jak chemia, biologia, biotechnologia i medycyna. Systemy *Lab-on-a-chip* definiowane są jako zintegrowane mikrolaboratoria na chipie (na płytce), za pomocą których możliwe jest przeprowadzenie kompleksowej i wieloetapowej analizy z zastosowaniem mikrolitrowych objętości. Rozwój tego typu systemów w naukach biologicznych, a w szczególności inżynierii komórkowej doprowadził do opracowania tzw. systemów *Cell-on-a-chip* [1]. Na **Rysunku 1** przedstawiono schemat tego typu systemu oraz jego kluczowe elementy.



Rysunek 1 Schemat systemu typu *Cell-on-a-chip* oraz jego kluczowe elementy.

Rozwój tego typu narzędzi związany jest z szeregiem zalet, jakie daje możliwość zastosowanie mikrosystemów w naukach biologicznych. Oprócz korzyści wynikających

¹ Andersson H., van den Berg A.B. (2003) *Microfluidic devices for cellomics: a review*, Sens Actuat B 92, 315-325

z samej miniaturyzacji badań, tj. redukcji objętości stosowanych reagentów, oszczędności przestrzeni, skróceniu czasu analizy i tym samym redukcji kosztów, zastosowanie mikrosystemów do hodowli i analizy komórek pozwala na rozwiązanie problemów związanych z uproszczonym mikrośrodowiskiem hodowli *in vitro* [2]. Hodowle komórek *in vitro* odgrywają znaczącą rolę m.in. w analizie podstawowych funkcji komórek i oddziaływań międzykomórkowych. Są one wykorzystywane do badania działania czynników farmakologicznych. Standardowe badania *in vitro* prowadzone w laboratoriach biologicznych stanowią najczęściej hodowle dwuwymiarowe (2D) w postaci monowarstwy. Są one uproszczonym modelem biologicznym, w związku z czym funkcje i odpowiedzi komórek na działanie czynników egzogennych mogą odbiegać od tych obecnych w organizmie żywym. Jednym z rozwiązań, a zarazem udoskonaleniem standardowych badań *in vitro*, są systemy *Lab-on-a-chip*, które w pewnym stopniu umożliwiają wyeliminowanie prowadzenia badań z materiałem biologicznym w wysoko wyspecjalizowanych laboratoriach. Jednak główną korzyścią, jaką może nieść za sobą zastosowanie systemów *Lab-on-a-chip* jest zdolność odwzorowania w nich warunków zbliżonych do *in vivo*, bardziej niż w standardowych hodowlach komórkowych. Duży stosunek powierzchni do objętości, na której rosną komórki (ang. *surface to volume (SAV) ratio*) oraz efektywna objętość hodowli (ang. *effective culture volume, ECV*) są parametrami zdefiniowanymi w mikrosystemach tak, aby umożliwić kontrolowanie mikrośrodowiska w ściśle sprecyzowany sposób [3]. Wartości tych parametrów (wysoki SAV oraz niski ECV) zbliżone są do tych, jakie występują w warunkach *in vivo*. Składniki odżywcze oraz badane substancje w mikrosystemach dostarczane są do komórek w przepływie. Odpowiada to fizykochemicznemu charakterowi naturalnego mikrośrodowiska komórek. Ponadto, mikrostruktury systemów mogą być zaprojektowane w taki sposób, aby odpowiadać unaczynieniu w organizmie. Systemy *Lab-on-a-chip* dedykowane inżynierii komórkowej wykonane są z biokompatybilnych materiałów, umożliwiających wykonanie w nich mikrostruktur oraz wzrost komórek. Najczęściej w tym celu stosowane są: poli(dimetylosiloksan) (PDMS) oraz szkło. Ze względu na to, że te materiały mają różne właściwości, ich zastosowanie determinuje rodzaj hodowli komórkowej (2D lub 3D)

² Halldorsson S., Lucumi E., Gomez-Sjoberg R., Fleming R.M.T. (2015) *Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices*, Biosens Bioelectron 63, 218-231

³ Walker G.M., Zeringue H.C., Beebe D.J. (2004) *Microenvironment design considerations for cellular scale studies*, Lab Chip 4, 91-97

uzyskiwanej w mikrosystemie [4]. W literaturze najczęściej prezentowane są mikrosystemy do hodowli 2D komórek. W tym celu, jako jeden z elementów konstrukcyjnych mikrosystemu stosowane jest hydrofilowe szkło, zapewniające adhezję komórek. W ostatnich latach proponowanych jest coraz więcej systemów *Lab-on-a-chip* do zastosowań w inżynierii komórkowej. Jednak ze względu na mnogość zagadnień badawczych, jakie niesie ze sobą poznanie funkcji komórek w warunkach mikroprzepływowych oraz ich reakcji na działanie czynników o potencjalnym działaniu leczniczym, ważne jest prowadzenie badań w tym zakresie.

Cel naukowy

Celem moich badań, których wyniki zaprezentowałam w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. **„Badanie funkcji komórkowych z zastosowaniem nowych systemów *Lab-on-a-chip* oraz zaawansowanych modeli hodowli komórek *in vitro*”**, było opracowanie zaawansowanych modeli komórkowych oraz nowych metod mikroprzepływowych w systemach typu *Lab-on-a-chip* do badania funkcji komórek (stanu hodowli komórkowej) po działaniu wybranych czynników terapeutycznych.

Opracowywane dotychczas systemy *Lab-on-a-chip*, dedykowane hodowli komórek oraz badaniu ich funkcji w warunkach przepływowych, najczęściej stosowane były do hodowli komórek w monowarstwie (2D). Zastosowanie systemów przepływowych typu *Lab-on-a-chip* do tego typu hodowli daje możliwość uzyskania mikrośrodowiska zbliżonego do warunków *in vivo*. Niemniej jednak, opracowanie bardziej zaawansowanych rozwiązań, takich jak: ocena współhodowli komórek różnego typu, prowadzenie hodowli przestrzennych, pozwala na prowadzenie badań na poziomie komórkowym w hodowlach, które jeszcze bardziej naśladują warunki *in vivo*. **Głównym zagadnieniem badawczym moich prac było zbadanie czy możliwe jest opracowanie w mikroskali nowych, wiarygodnych rozwiązań konstrukcyjnych i metodycznych hodowli komórek *in vitro*, stosowanych między innymi do oceny toksyczności wybranych metod terapeutycznych. Ponadto, badałam czy możliwe jest odwzorowanie i naśladowanie funkcji określonej tkanki.** Proponowane przeze mnie badania są zgodne z zasadą 3R dotyczącej badań toksykologicznych oraz mówiącej o redukcji, zastępowaniu i doskonaleniu metod doświadczalnych prowadzonych na zwierzętach. Biorąc pod uwagę fakt, że badania z wykorzystaniem zwierząt nie mogą być

⁴ Kalinowska D., Tokarska K., Grabowska-Jadach I., Dybko A., Brzozka Z, (2017) *Rozdział 3 Lab-on-a-chip systems for cellomics – materials and technology* w *Cardiac Cell Culture Technologies: Microfluidic and On-Chip Systems* (ed. Jastrzebska E., Brzozka Z.) Springer, 29-66

całkowicie zastąpione w trakcie selekcji związków leczniczych, postawiłam sobie pytanie czy zaawansowane modele komórkowe naśladujące warunki *in vivo*, uzyskane w systemach *Lab-on-a-chip*, stanowiąc mogą rozwiązania/narzędzia, które mogłyby zredukować tego typu testy. Zakładałam opracowanie bardziej zaawansowanych modeli komórkowych od standardowych hodowli *in vitro*, dotychczas stosowanych w laboratoriach biologicznych. Zgodnie ze statystykami Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) choroby układu krążenia oraz nowotwory są najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Trend ten utrzymuje się już od wielu lat. W związku z powyższym, badania które prowadziłam, dotyczyły analizy komórek nowotworowych oraz komórek serca. Prace przedstawione w jednotematycznym cyklu publikacji podzielone są na dwa główne nurty badawcze: (1) opracowanie systemów *Lab-on-a-chip* i zaawansowanych modeli hodowli komórek nowotworowych; (2) opracowanie systemów typu *Heart-on-a-chip*. Pierwsza część pracy dotyczyła opracowania systemów, które umożliwiały hodowlę komórek nowotworowych i prawidłowych w postaci kokultury w modelu dwuwymiarowym oraz w postaci sferoidu, jako trójwymiarowego modelu hodowlanego. Druga część pracy dotyczyła opracowania mikrosystemów przepływowych w taki sposób, aby umożliwiały one hodowlę komórek serca (systemy *Heart-on-a-chip*). W opracowanych mikrosystemach prowadzono dwuwymiarową oraz trójwymiarową (z zastosowaniem hydrożelu oraz nanowłókien) hodowlę komórek serca.

1. Opracowanie systemów *Lab-on-a-chip* i zaawansowanych modeli hodowli komórek nowotworowych [H1-H6]

Miniaturowe systemy analityczne w ostatnich latach badane są pod kątem oceny skuteczności związków leczniczych. Opracowywane są różnego rodzaju platformy do hodowli dwuwymiarowych, w których analizowana jest odpowiedź cytotoksyczna związków stosowanych w chemioterapii. Wychodząc naprzeciw wyzwaniom, jakie stawia zaimplementowanie nowych metod/rozwiązań w badaniach toksyczności związków zaproponowałam badania nad analizą skuteczności terapii fotodynamicznej (PDT) w mikrosystemie [H1-H6]. Zagadnieniem badawczym, które wzbudziło moją ciekawość była analiza skuteczności procedur terapii fotodynamicznej (PDT) w hodowlach komórek bardziej zaawansowanych niż monokultura 2D, uzyskiwanych w systemach typu *Lab-on-a-chip* [H1-H6]. Terapia fotodynamiczna, obok chemioterapii, radioterapii i zabiegów chirurgicznych stosowana jest do zwiększenia skuteczności leczenia chorób nowotworowych. Polega ona na zastosowaniu trzech czynników: (1) związku fotoczułego (fotoczułacza)

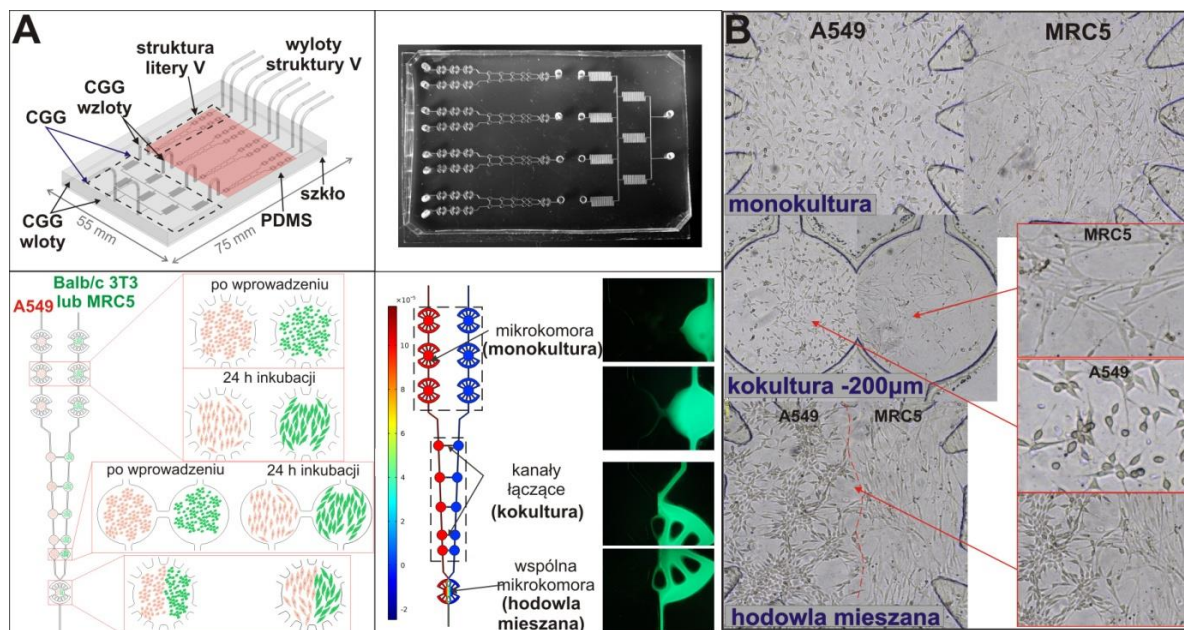
selektywnie akumulującego się w komórkach nowotworowych, (2) światła o odpowiedniej długości fali, umożliwiającego wzbudzenie fotouczulacza oraz (3) tlenu, znajdującego się w środowisku tkankowym. W wyniku jednoczesnego działania tych czynników wytwarzane są reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), które są silnie toksyczne dla komórek. Istotne jest to, aby działanie pojedynczego czynnika (tzn. fotouczulacza lub promieniowania) nie wywoływało toksycznego wpływu na komórki. Dlatego też ważny jest dobór parametrów terapii fotodynamicznej (PDT) tak, aby uzyskać wysoce skuteczny efekt terapeutyczny. Badałam jak mikrosystemy mogą zostać zastosowane do optymalizacji parametrów terapii fotodynamicznej (tj. stężenie związku, czas ekspozycji, dawka promieniowania). **Istnieje tylko kilka grup badawczych na świecie zajmujących się oceną terapii fotodynamicznej w mikrosystemach.** Prace tych zespołów w większości oparte są na hodowli jednego typu komórek w postaci monowarstwy (2D). Niewiele jest doniesień na temat analizy komórek w hodowli 3D. **Publikacje, które prezentuję jako jednotematyczny cykl prac wchodzących w skład niniejszej rozprawy habilitacyjnej należą do pionierskich w tej dziedzinie.**

W trakcie opracowywania modelu hodowli komórek *in vitro* do oceny procedur PDT wzięłam pod uwagę jedną z głównych zalet mikrosystemów jaką jest możliwość precyzyjnego projektowania geometrii mikrostruktur. W związku z tym, w przeciwieństwie do standardowych metod hodowli, możliwe jest zaprojektowanie ściśle sprecyzowanych i kontrolowanych miejsc umieszczenia i hodowli komórek. Biorąc to pod uwagę zaprojektowałam system *Lab-on-a-chip* do jednoczesnej hodowli: monokultury (jeden typ komórek) i kokultury (współhodowla dwóch typów komórek) [H1-H3]. Ideą opracowania tego typu mikroukładu była możliwość badania jak komórki nowotworowe, poddane działaniu procedur terapii fotodynamicznej (PDT) o określonych parametrach, wpływają na żywotność i funkcjonowanie komórek prawidłowych. Miało to na celu odwzorowanie sytuacji, która ma miejsce w warunkach *in vivo*, gdzie w przypadku pojawienia się nowotworu, komórki nowotworowe i prawidłowe znajdują się w sąsiedztwie. W związku z tym, co jest powszechnie znane, działanie wielu terapii przeciwnowotworowych jest nieselektywne i powoduje niszczenie obydwu typów komórek. W celu weryfikacji wyżej omawianego problemu zaproponowałam mikrosystem o geometrii, która składała się z czterech mikrostruktur ułożonych w literę „V” (wymiary mikrostruktur: szerokość 100 μm , wysokość 50 μm) (**Rysunek 2**). Co więcej, każda mikrostruktura „V” zawierała: (1) trzy pary niepołączonych ze sobą mikrokomór hodowlanych (średnica 1 mm, wysokość 50 μm);

(2) pięć par mikrokomór hodowlanych połączonych ze sobą mikrokanalami łączącymi o długości: 1000, 800, 600, 400 i 200 μm ; (3) wspólną mikrokomorę. Taka geometria każdej z mikrostruktur „V” zapewniała uzyskanie w jednym etapie trzech typów hodowli komórkowych 2D: monokultury (w trzech parach mikrokomór); kokultury (w kolejnych pięciu parach mikrokomór), gdzie komórki prawidłowe i nowotworowe oddalone były od siebie w ściśle sprecyzowanej odległości oraz kokultury, nazwanej przeze mnie jako hodowla mieszana, gdzie we wspólnej mikrokomorze uzyskano hodowlę obydwu typów komórek (**Rysunek 2 A**) [H1]. Wykonany mikroukład został opatentowany [5].

W mikrosystemie o takiej geometrii badano komórki nowotworowe płuc (A549) oraz komórki prawidłowe: płuc (MRC-5) lub fibroblasty Balb/c 3T3 (jako komórki modelowe). W celu uzyskania w mikrosystemie hodowli 2D, o ściśle sprecyzowanych miejscach wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych, do otworów wlotowych mikrosystemu wprowadzano jednocześnie za pomocą pompy perystaltycznej zawiesinę komórek. Do jednego otworu wprowadzano komórki nowotworowe (A549) do drugiego natomiast komórki prawidłowe (Balb/c 3T3 lub MRC-5). Komórki umieszczane były w dedykowanych do tego miejscach, natomiast mikrokanały łączące stanowiły obszar migracji komórek oraz dyfuzji czynników wydalanych przez każdą z linii komórkowych. Zgodnie z założeniami uzyskano trzy typy hodowli komórkowych dla każdej z par hodowlanych A549 – Balb/c 3T3 oraz A549 – MRC-5 (**Rysunek 2 B**). W ten sposób uzyskano model komórkowy *in vitro* do oceny wzajemnego oddziaływania komórek przed i po przeprowadzeniu procedur terapii przeciwnowotworowej. Ponadto, w celu automatyzacji i usprawnienia badań każda z czterech mikrostruktur w kształcie litery "V" zintegrowana była z generatorem gradientu stężeń (CGG). Dzięki temu, w jednym etapie analizowano działanie fotouczulacza o czterech różnych stężeniach.

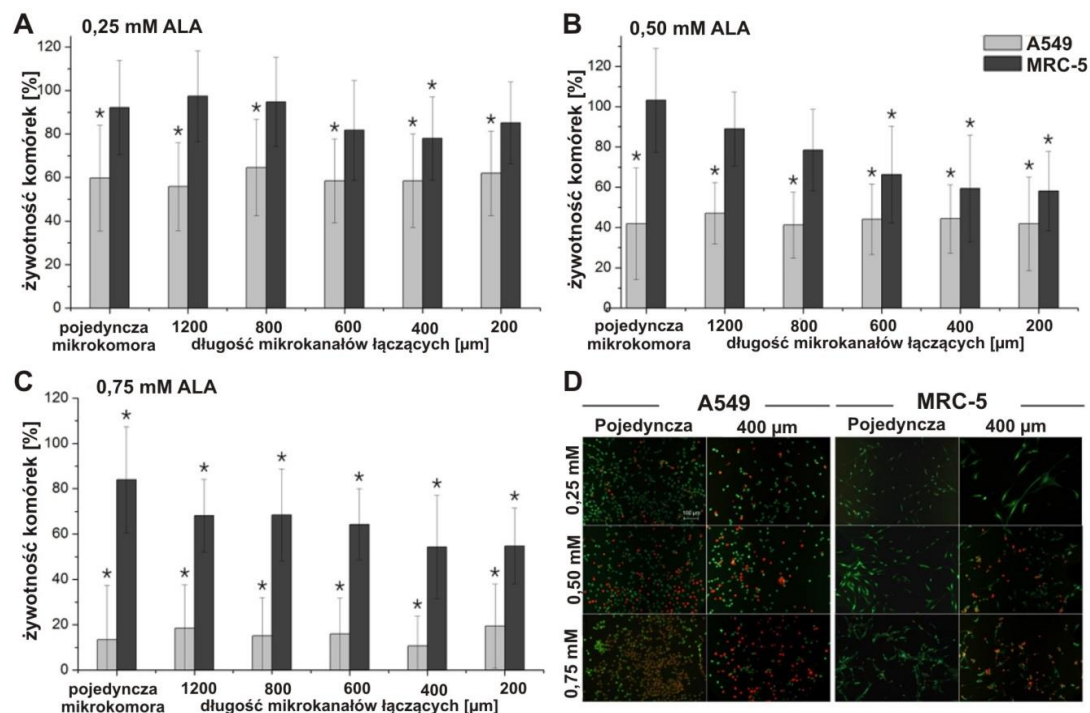
⁵ Jastrzębska E., Rybicka N., Żukowski K. (2016) *Mikrosystem do jednoczesnej analizy migracji komórek i oceny skuteczności procedur terapii fotodynamicznej*, PL 223866, Polska, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej



Rysunek 2 (A) Schemat oraz gotowy mikrosystem stosowany do hodowli mono- i kokultury komórek oraz do analizy skuteczności procedur terapii fotodynamicznej (PDT). Schemat wprowadzania i umieszczania komórek w mikrosystemie oraz symulacja przepływu w mikrosystemie. (B) Mikrokomory hodowlane z komórkami A549 i MRC-5 w hodowli monokultury, kokultury oraz hodowli mieszanej [H1].

Zaproponowany mikrosystem wraz z hodowlą 2D mono- i kokultury komórek nowotworowych i prawidłowych posłużył jako model *in vitro* do oceny cyto- oraz fotocytotoksyczności związków stosowanych w PDT: kwasu 5-aminolewulinowego (ALA), indocyjaniny IR-780 oraz werteporfiryny (VP). IR-780 oraz VP testowane były w formie wolnej oraz enkapsulowanej [H2-H3]. Pierwszym etapem weryfikacji przydatności opracowanego modelu *in vitro* w systemie *Lab-on-a-chip* było zastosowanie kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) jako prekursora protoporfiryny IX (PPIX), selektywnie gromadzącego się w komórkach nowotworowych. Zbadano wpływ PDT, dla różnych stężeń ALA (0÷0,75 mM), na żywotność komórek nowotworowych i prawidłowych rosnących w mono- i kokulturze [H1]. Zaproponowane parametry procedur terapii fotodynamicznej (stężenie fotouczulacza, czas inkubacji, moc i czas naświetlania) wywoływały toksyczny efekt na komórki nowotworowe (A549) w zależności od zastosowanego stężenia ALA. Z kolei komórki prawidłowe (Balb/c 3T3 lub MRC-5) wykazywały wysoką żywotność po przeprowadzeniu procedury terapii PDT. Wskazuje to na selektywne działanie zastosowanej procedury PDT. Niemniej jednak, zaobserwowano interesującą zależność dla wyższych stężeń badanego związku dla hodowli A549 - MRC-5. Widoczny był istotny spadek żywotności komórek prawidłowych MRC-5 wraz ze zmniejszającą się ich odległością

od komórek nowotworowych, poddanych działaniu PDT. Wskazuje to na wzajemny wpływ komórek hodowanych we współhodowli (**Rysunek 3**).



Rysunek 3 Żywotność komórek A549 oraz MRC-5 po przeprowadzeniu procedur PDT dla (A) 0,25 mM, (B) 0,5 mM, (C) 0,75 mM ALA. (D) Mikrokomory hodowlane z komórkami A549 oraz MRC-5 dla monokultury oraz kokultury (mikrokanal łączący 400 μm) [H1].

Zakładam, że czynniki śmierci, które wydalane są z obumierających komórek A549 (np. czynnik TNF-α) dyfundować mogą wzdłuż mikrokanalów łączących do komórek prawidłowych, tym samym wpływając na spadek ich żywotności. Hipotezę, że czynnikiem wpływającym na spadek żywotności komórek prawidłowych są reaktywne formy tlenu (ROS) odrzuciłam ze względu na krótki czas życia ROS. Ich wpływ widoczny mógł być jedynie w mikrokomorze z hodowlą mieszaną, gdzie komórki nowotworowe i prawidłowe rosną bezpośrednio obok siebie. Wykazałam również, że modelowe komórki prawidłowe Balb/c 3T3 są bardziej odporne na działanie czynników, które ewentualnie mogły dyfundować wzdłuż mikrokanalów łączących. Na podstawie wyżej uzyskanych wyników **potwierdziłam, że opracowany model kokultury komórkowej daje możliwość badania wpływu procedur terapii przeciwnowotworowej na dwa typy komórek jednocześnie. Ponadto, co jest istotne z punktu widzenia optymalizacji parametrów procedur terapii fotodynamicznej, proponowany model komórkowy w systemie *Lab-on-a-chip* pozwala na badanie oddziaływań komórek nowotworowych na komórki prawidłowe, znajdujące się w ich sąsiedztwie, w ściśle sprecyzowanej odległości.**

Skuteczność terapii przeciwnowotworowej zależy nie tylko od parametrów stosowanych procedur terapii, ale przede wszystkim od stosowanego leku. W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się opracowaniu nanomateriałów o właściwościach wspomagających leczenie chorób nowotworowych. Nanoosińniki mogą stanowić idealny sposób dostarczania fotouczulaczy selektywnie do komórek nowotworowych. Mnogość opracowywanych nanocząstek z enkapsulowanymi fotouczulaczami, stanowiącymi selektywny sposób dostarczania leków do komórek, wzrasta bardzo dynamicznie. W związku z tym, ważne jest opracowanie nowych metod pozwalających na szybką ocenę przydatności tych związków w terapii przeciwnowotworowej. **Kolejnym etapem badań, z wykorzystaniem opracowanego modelu *in vitro* do hodowli mono- i kokultury komórek nowotworowych i prawidłowych, była analiza nowo opracowanych enkapsulowanych fotouczulaczy [H2-H3]. Prace te stanowiły pionierskie, wcześniej nieopisywane w literaturze zastosowanie mikrosystemów.** Enkapsulowane fotouczulacze, wykorzystywane w eksperymentach, uzyskiwane były w ramach współpracy z zespołem prof. Kazimiery A. Wilk z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Na opracowanym modelu 2D komórkowym, o ściśle sprecyzowanej lokalizacji komórek nowotworowych i prawidłowych, badano właściwości biologiczne (toksyczność, akumulację) nowo opracowanych form fotouczulaczy: inodocyjaniny IR-780 oraz werteporfiryny (VP) (**Tabela 1**). Nanokapsuły polielektrolitu (PE), załadowane fotouczulaczem lub puste, przygotowano metodą warstwa po warstwie (ang. *layer-by-layer*, LbL) zgodnie z procedurami prezentowanymi w literaturze [6].

Tabela 1 Zestawienie nanokapsuł fotouczulacza indocyjaniny IR-780 i werteporfiryny (VP), stosowane w badaniach [H3, H4].

Lp.	Nazwa próbki	Stężenie fotouczulacza [μM]	ζ [mV]	D_H [nm]	EE (%)
1	$C_{12}(\text{TAPAMS})_2/\text{OA}/\text{woda}(\text{PDADMAC}/\text{PSS})_4$	47,3 VP	+54	118	92
2	$C_{12}(\text{TAPAMS})_2/\text{OA}/\text{woda}(\text{PDADMAC}/\text{PSS})_{3,5}$	78,1 IR-780 (nano_1)	-41	106	97
3	$C_{12}(\text{TAPAMS})_2/\text{OA}/\text{woda}(\text{PDADMAC}/\text{PSS})_4$	60,1 IR-780 (nano_2)	+59	111	95

$C_{12}(\text{TAPAMS})_2$ – Metylosiarczan 3-[(trimetyloammonio)-propylo]dodekanamidu, OA – Kwas oleinowy, PDADMAC – Chlorek poli(dwuallilodwumetylo-amoniowy), PSS – Sól sodowa sulfonowanego polistyrenu, ζ – Zeta potencjał, D_H – Średnica hydrodynamiczna, EE – Wydajność enkapsulacji

⁶ Bazylińska U., Frąckowiak R., Brzózka Z., Wilk K.A. (2017) *The effect of anionic dicephalic surfactants on fabrication of varied-core nanocarriers for sustained release of porphyrin photosensitizers*, J Photochem Photobiol B 166, 169-179

Fotouczulacz, możliwy do zastosowania w terapii fotodynamicznej, nie powinien być toksyczny dla komórek, które nie zostały poddane naświetlaniu. Dlatego też, ważny jest dobór bezpiecznego, nietoksycznego stężenia stosowanego w terapii. W ramach swoich badań przeprowadziłam ocenę wpływu enkapsulowanej werteporfiryny (nano VP) na żywotność komórek hodowanych w opracowanym modelu *in vitro* [H2]. Celem badań było wyznaczenie minimalnego stężenia nano VP, które jest nietoksyczne i może być stosowane w terapii fotodynamicznej. W celu weryfikacji przydatności mikrosystemu oraz nanokapsuł VP prowadziłam badania z zastosowaniem wolnej formy związku. Ponadto, wykonywałam badania porównawcze za pomocą standardowych metod hodowli komórek (makroskali). Zbadano, że akumulacja nano VP jest wyższa w komórkach nowotworowych niż w komórkach prawidłowych płuc. Wskazuje to na możliwość selektywnego dostarczania enkapsulowanego fotouczulacza do komórek nowotworowych. W badaniach przeprowadzonych w makroskali, werteporfiryna (VP) o stężeniu 1 μM powodowała niewielki spadek żywotności (ok. 70%-90% żywotności) badanych komórek płuc (A549 i MRC-5). Podobny efekt obserwowano zarówno dla wolnej jak i enkapsulowanej VP. Z kolei w mikrosystemie, dla wolnej VP obserwowano jeszcze mniejszy spadek żywotności komórek w stosunku do wyników uzyskanych w makroskali. Ponadto, zaobserwowano nietoksyczne działanie (wyższa żywotność komórek niż w makroskali) nano VP dla obu linii komórkowych hodowanych w mikrosystemie. Porównywalne wyniki uzyskano we wszystkich typach hodowli komórkowych prowadzonych w opracowanym mikrosystemie (monokulturze, kokulturze i hodowli mieszanej). Na podstawie uzyskanych wyników w mikroskali wnioskować można, że zamknięcie werteporfiryny w nanokapsułach prowadzi do uzyskania zmniejszenia efektu cytotoksycznego, szczególnie w stosunku do komórek prawidłowych. Ważne podkreślenia jest to, że w mikrosystemie na akumulację nano VP oraz uzyskany efekt cytotoksyczny wpływ mają m.in. takie czynniki jak warunki dynamiczne hodowli komórek, wysoki stosunek SAV, czy obecność innych komórek. Ze względu na to, że proponowany mikrosystem do pewnego stopnia umożliwia naśladowanie warunków *in vivo*, podejrzewać można, że uzyskana odpowiedź komórkowa jest bardziej zbliżona do tej, która występuje w tkance nowotworowej.

Kolejnym etapem weryfikacji opracowanego mikrosystemu było badanie rozróżniania stopnia toksyczności nanokapsuł załadowanych takim samym fotouczulaczem (IR-780), ale różniących się liczbą warstw polielektrolitu (PE) [H3]. Badałam cyto- oraz fotocytotoksyczność nanokapsuł załadowanych IR-780 (nano_1 oraz nano_2) (Tabela 1),

które akumulowały się czterokrotnie bardziej na powierzchni membrany w komórkach nowotworowych (A549) niż prawidłowych (MRC-5). Ponadto, zaobserwowałam nieco wyższą akumulację fotouczulacza nano_2 niż nano_1. Wyniki te wskazywały na możliwość uzyskania selektywnego działania terapii względem komórek nowotworowych. W związku z czym, analizowałam działanie różnych parametrów PDT na komórki w opracowanym modelu *in vitro* w systemie *Lab-on-a-chip*. Dla zastosowanych parametrów PDT (stężenie fotouczulacza, czas inkubacji, moc i czas naświetlania) efekt fotocytotoksyczny obserwowany był wyłącznie dla nano_2 (żywołność $\leq 80\%$). Żywołność komórek A549 i MRC-5, dla nano_1 i dla wolnej IR-780 wynosiła kolejno ok. 95% i ok. 85% kontroli. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy wynikami uzyskiwanymi dla mono- i kokultury komórek. W związku z tym, że nawet dla najlepiej działającej formy IR-780 (nano_2) spadek żywołności komórek (70-75% dla A549, 60-65% dla MRC-5) nie umożliwiał uzyskania nie tylko skutecznej, ale i selektywnej terapii, zbadano jak zmiana parametrów procedur PDT wpłynie na efekt terapeutyczny. Zastosowano wyższą moc naświetlania komórek inkubowanych z najwyższym stężeniem badanego fotouczulacza. Przyczyniło się to do nieznacznego spadku żywołności komórek A549 i MRC-5 inkubowanych z nano_1 i wolną IR-780. Z tą różnicą, że większy efekt toksyczny widoczny był dla wolnej IR-780 na komórkach prawidłowych MRC-5, hodowanych w kokulturze z komórkami nowotworowymi. Z kolei komórki poddane działaniu nano_2 charakteryzowały się niską żywołnością (dla monokultury A549 – ok. 30% i MRC-5 ok. 35%). Ponadto, żywołność komórek malała wraz ze zmniejszającą się odległością pomiędzy komórkami prawidłowymi i nowotworowymi. Na podstawie wyników uzyskanych w opracowanym mikrosystemie wnioskuję, że inny stopień akumulacji fotouczulacza w komórkach oraz inna odpowiedź komórek na działanie dwóch typów nanokapsuł, wynikać może z różnicy ładunków powierzchniowych nanokapsuł, co związane jest z typem ostatniej warstwy polielektrolitu. Proponowany enkapsulowany fotouczulacz nano_2 wykazuje potencjał do zastosowania go w PDT. Potrzebna jest jednak optymalizacja parametrów tej terapii. Na podstawie uzyskanych wyników przypuszczam, że zastosowanie mniejszego stężenia fotouczulacza i zwiększenie mocy naświetlania mogłoby zwiększyć selektywność i skuteczność procedur PDT. W ramach powyższych badań dowiedziałam, że nie tylko parametry procedur terapeutycznych, ale także współhodowla komórek prawidłowych i nowotworowych są istotne w optymalizacji terapeutycznego efektu procedur PDT. Tego typu badania z powodzeniem mogą być przeprowadzane w zaproponowanym mikrosystemie.

W ramach wyżej zaprezentowanych badań zaproponowałam mikrosystem z dwuwymiarowym modelem *in vitro*, umożliwiającym jednoczesne prowadzenie mono- i kokultury komórek nowotworowych i prawidłowych. Z powodzeniem posłużyć on może jako zaawansowany model komórkowy do badania cyto- oraz fotocytotoksyczności nowo syntezowanych fotouczulaczy (w formie natywnej i enkapsulowanej) [H1-H3]. W opracowanym systemie *Lab-on-a-chip* komórki wzrastały w mikrośrodowisku zapewniającym wysoki stosunek powierzchni do objętości (SAV). Ponadto, wszystkie roztwory (badane związki, medium hodowlane) dostarczane były do komórek w przepływie (w warunkach dynamicznych). Dzięki temu uzyskiwano hodowlę komórek bardziej zaawansowaną niż hodowle prowadzone w standardowych płytkach czy butelkach hodowlanych. Warte podkreślenia jest, że współhodowla komórek prawidłowych i nowotworowych w ściśle zdefiniowanych obszarach jest utrudniona a nawet niemożliwa do uzyskania w standardowych płytkach wielodołkowych w hodowli prowadzonej w makroskali. W związku z tym, proponowany model hodowli komórek *in vitro* w mikrosystemie jest odpowiedzią na zapotrzebowanie na tego typu rozwiązania. Ułatwić on może optymalizację parametrów stosowanych w terapii fotodynamicznej i opracowanie standardów postępowania terapeutycznego w przypadku zachorowań na różnego typu nowotwory. Tematyka wyżej opisanych badań, została zapoczątkowana i rozwinięta przeze mnie w zespole badawczym, w którym obecnie pracuję. **Proponowane badania procedur terapii fotodynamicznej w mikrosystemie do hodowli kokultury oraz z zastosowaniem enkapsulowanych fotouczulaczy są jednymi z nielicznych prac prezentowanych w literaturze naukowej.**

Hodowla komórek w postaci monowarstwy (2D) jest uproszczoną formą naturalnego wzrostu komórek. W takiej hodowli komórki przylegają do powierzchni materiału wzrostowego, tworząc nienaturalne połączenie białek, uproszczoną macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, *ECM*). Ponadto, szlaki metaboliczne i ekspresja genów komórek w hodowlach 2D odbiegają od tych występujących w tkance. W celu lepszego odwzorowania warunków *in vivo* poza organizmem żywym, poszukuje się rozwiązań, które umożliwiłyby przestrzenne ułożenie i wzrost komórek. Do uzyskania trójwymiarowej (3D) hodowli komórek stosowane mogą być wielokomórkowe sferoidy, hydrożele czy rusztowania (ang. *scaffolds*). W tego rodzaju hodowli, komórki łączą się ze sobą tworząc przestrzenne ułożenia, co pozwala na uzyskanie m.in. 3D macierzy zewnątrzkomórkowej i interakcji pomiędzy komórkami.

Biorąc pod uwagę korzyści wynikające z zastosowania mikrosystemów do hodowli i analizy komórek oraz rezultaty uzyskane przeze mnie dla modeli 2D komórkowych, podjęłam badania umożliwiające opracowanie bardziej zaawansowanych modeli komórkowych w systemach *Lab-on-a-chip*. Głównym nurtem tego etapu pracy było opracowanie tzw. modelu nowotworowego z zastosowaniem wielokomórkowych sferoidów [H4-H6]. Sferoidy są to specyficzne agregaty komórkowe, składające się z trzech części: martwiczego rdzenia (w środku), komórek w stanie spoczynkowym oraz komórek proliferujących (część zewnętrzna). Taka budowa sferoidu determinuje m.in. ściśle interakcje pomiędzy komórkami, obecność macierzy zewnątrzkomórkowej oraz gradienty składników odżywczych, metabolitów i tlenu pomiędzy zewnętrzną a środkową częścią sferoidu. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, sferoidy uznawane są za wczesne stadium beznaczyniowego guza nowotworowego i coraz częściej stosuje się je do badań nad różnego typu nowotworami. Należy jednak zaznaczyć, że sferoidy bez naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz odpowiedniej ilości tkanki łącznej nie są w pełni funkcjonalnym nowotworem, a jedynie trójwymiarowym modelem komórkowym. Ze względu na zalety wynikające z miniaturyzacji, o których pisałam m.in. we wstępie tej rozprawy habilitacyjnej, z roku na rok prowadzonych jest coraz więcej badań z zastosowaniem sferoidów w systemach *Lab-on-a-chip*. Mimo tego, że nowotwory płuc i piersi należą do najczęstszej przyczyny zgonów na świecie, prac związanych z analizą tego typu sferoidów w mikrosystemach jest niewiele. Wychodząc naprzeciw bardzo ważnemu tematowi badawczemu, zaproponowałam 3D modele komórkowe złożone ze sferoidów oraz podjęłam na nich badania związane z optymalizacją procedur terapii fotodynamicznej [H4-H6].

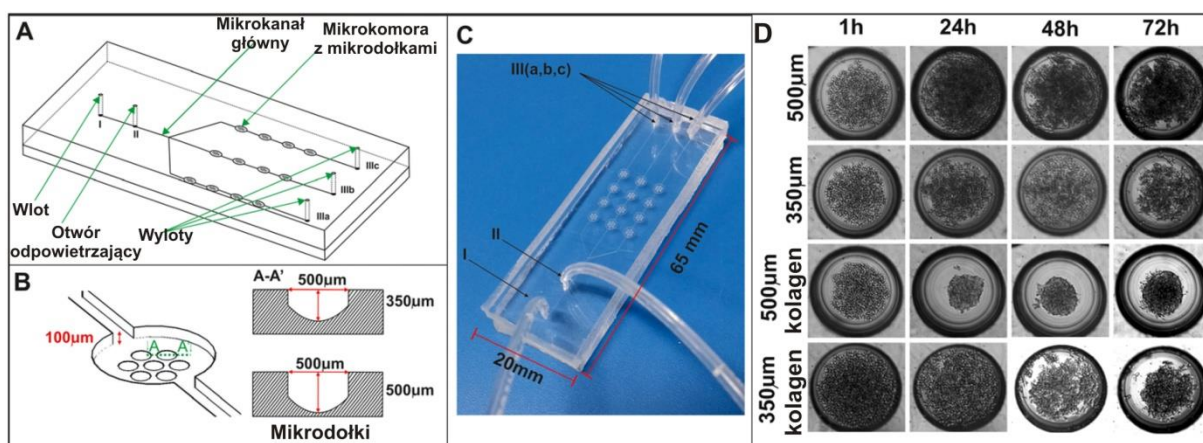
Na formowanie sferoidów w systemach *Lab-on-a-chip* wpływa kilka czynników, np.: materiał konstrukcyjny mikrosystemu, kształt i wielkość mikrodołka hodowlanego, typ komórek. W związku z czym, zbadalam jak zastosowanie różnych parametrów pracy systemów *Lab-on-a-chip*, tzn. różne głębokości mikrodołków hodowlanych, różne prędkości przepływu wprowadzanej zawiesiny komórkowej oraz dodanie kolagenu do zawiesiny komórek, jako białka (kolagenu) wspomagającego agregację komórek, wpływa na hodowlę sferoidów [H4]. W zależności od typu komórek, w błonie komórkowej znajduje się różna liczba i rodzaj białek odpowiedzialnych za adhezję komórek. Ma to m.in. wpływ na stopień ich agregacji. W swoich badaniach analizowałam agregację i formowanie sferoidów dwóch typów komórek płuc: nowotworowych A549 i prawidłowych MRC-5. Opracowałam mikrosystem składający się z sieci mikrokanalów i 3x4 macierzy mikrokomór hodowlanych (**Rysunek 4 A - C**).

W każdej mikrokomorze znajdowało się siedem sferycznych mikrodołków (o wymiarach 350 μm lub 500 μm). Wykonanie takiego kształtu mikrodołka miało na celu zwiększenie agregacji komórek i utworzenie zwartych sferoidów. Zaproponowane rozmieszczenie zarówno mikrokomór jak i mieszczących się w nich mikrodołków hodowlanych umożliwiło równomierne i powtarzalne umieszczenie komórek w mikrosystemie. **Ponadto, w każdym z mikrodołków uzyskiwano pojedynczy sferoid. Jest to bardzo ważne, w kontekście długoterminowego monitorowania tego samego sferoidu i oceny odpowiedzi komórek na działanie danego czynnika terapeutycznego. Długoterminowe monitorowanie tego samego sferoidu w makroskali (za pomocą dotychczas stosowanych metod hodowli) jest praktycznie niemożliwe. Proponowany przeze mnie mikrosystem jest rozwiązaniem tego problemu.**

Ze względu na to, że komórki adherentne chętniej przylegają do hydrofilowych powierzchni, w przypadku opracowywania modeli 2D w mikrosystemach, jako jeden z materiałów konstrukcyjnych stosowane jest szkło [**H1-H3**]. Z kolei w przypadku sferoidu, efektem pożądanym jest brak wzrostu komórek na powierzchni materiału konstrukcyjnego mikrosystemów, a wzmożona adhezja i wzajemna agregacja komórek. Efekt taki wspomagany jest poprzez zastosowanie materiału hydrofobowego tj. PDMS. W celu zwiększenia tego efektu zastosowano „U” kształtne mikrodołki oraz PDMS jako materiał konstrukcyjny systemu *Lab-on-a-chip*. PDMS jest materiałem hydrofobowym, w związku z czym komórki przylegają do niego w niewielkim stopniu. W celu zmiany właściwości PDMS można modyfikować jego powierzchnię. W ramach tej pracy zbadano w jaki sposób można uzyskać bardziej hydrofobową powierzchnię PDMS, co wpływać może na zwiększenia agregacji komórek. W tym celu, powierzchnię PDMS zmodyfikowałam 0,05% poli(alkoholem winylowym) (PVA). Modyfikacja polegała na poddaniu powierzchni PDMS działaniu plazmy tlenowej, a następnie inkubacji takiej powierzchni z PVA. **Badania te były jednym z elementów prac prowadzonych w ramach projektu badawczego SONATA 5 pt. „Badanie wpływu modyfikacji powierzchni poli(dimetylosiloksanu) na jego właściwości fizykochemiczne oraz oddziaływanie z materiałem biologicznym”, którego byłam kierownikiem** (Nr 2013/09/D/ST5/03887, Narodowe Centrum Nauki). Projekt ten dotyczył opracowania metod modyfikacji powierzchni PDMS oraz ich zastosowanie do wykonania mikrosystemów do hodowli i analizy różnego typu komórek. W ramach tego

projektu powstały również dwie dodatkowe prace w czasopiśmie z listy JCR, które nie są elementem jednotematycznego cyklu publikacji niniejszej rozprawy habilitacyjnej [7,8].

W trakcie opracowywania mikrosystemów do przestrzennego wzrostu komórek w postaci sferoidów, jednym z ważnych wymogów była automatyzacja badań oraz możliwość monitorowania pojedynczych sferoidów. W wielu przykładach mikrosystemów opisywanych w literaturze, stosowanych do hodowli i badania funkcji komórek, wzrost i proliferacja komórek oceniana jest wyłącznie na podstawie analizy mikroskopowej. Proponowane przeze mnie mikrosystemy, zostały zaprojektowane i wykonane w taki sposób, że rozmieszczenie mikrokomór hodowlanych w mikrosystemach do hodowli komórek, odpowiada rozmieszczeniu dołków na płycie 384-dołkowej [H4-H6, H10]. Dzięki temu opracowane mikrosystemy były kompatybilne ze standardową aparaturą instrumentalną i świetnie nadawały się do prowadzenia analiz w czytnikach płytek wielodołkowych i uzyskania ilościowych wyników eksperymentu.



Rysunek 4 (A) Schemat mikrosystemu do hodowli sferoidów. (B) Schemat mikrokomory hodowlanej wraz z mikrodołkami. Wymiary wykonanych mikrodołków. (C) Wykonany mikrosystem (I – wlot, II- otwór odpowietrzający, III – wyloty). (D) Mikrodołki (o wymiarach 350 i 500 μm) ze sferoidami komórek A549 w różnym czasie od rozpoczęcia hodowli [H5].

Wykazano, że głębokości mikrodołków oraz typ komórek mają istotne znaczenie w formowaniu się sferoidów (**Rysunek 4 D**). Sferoidy komórek MRC-5 uzyskano wyłącznie w mikrodołkach o głębokości 500 μm . Agregacja tych komórek wzrastała w kolejnych dniach hodowli. Wyznaczono, że powierzchnia przekroju poprzecznego sferoidu zmniejszyła się pięciokrotnie w ciągu 72 h. W przypadku komórek A549 zaobserwowano agregację komórek

⁷ Żuchowska A., Kwiatkowski P., Jastrzębska E., Chudy M., Dybko A., Brzózka Z. (2016) *Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly(dimethylsiloxane) surface modified by proteins*, Electrophoresis, 37, 536-544

⁸ Jastrzębska E., Żuchowska A., Flis S., Sokolowska P., Bulka M., Dybko A., Brzózka Z. (2018) *Biological characterization of the modified poly(dimethylsiloxane) surfaces based on cell attachment and toxicity assays*, Biomicrofluidics, 12, 044105

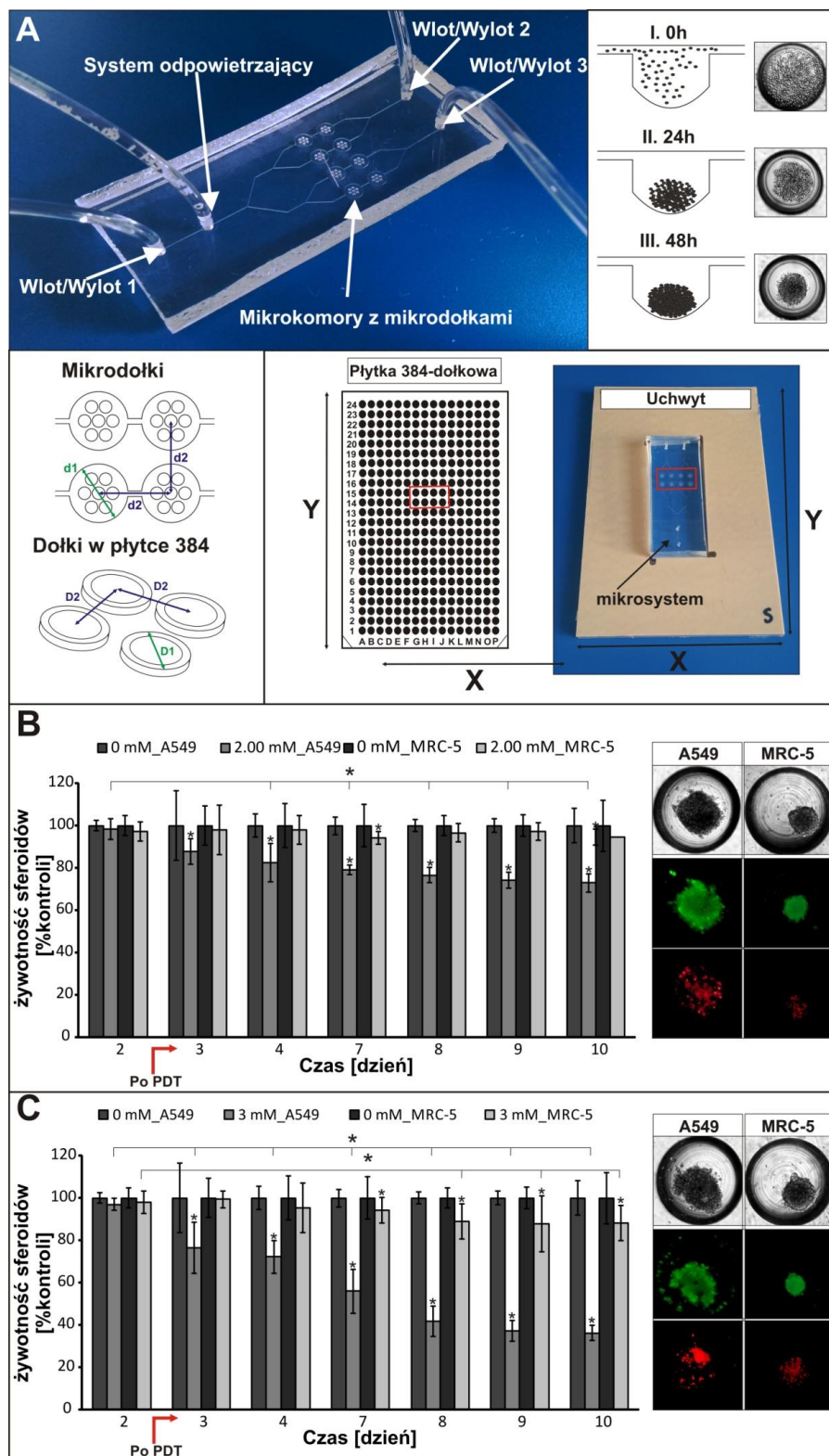
zarówno w mikrodołkach 350 μm jak i 500 μm [H4]. Niemniej jednak w kolejnych godzinach hodowli, komórki A549 nie tworzyły spontanicznie zwartych sferoidów, a były ze sobą luźno połączone. Wynikać to mogło z małej ilości adhezyjnych białek wchodzących w skład membrany tych komórek. Analiza poziomu winkuliny, białka odpowiedzialnego za adhezję komórka-komórka, komórka-macierz pozakomórkowa wykazała, że zawartość tego białka jest wyższa w komórkach MRC-5 niż A549 [H5]. W związku z tym, w celu zwiększenia oddziaływania komórka-komórka w hodowli sferoidów A549, do zawiesiny komórek dodano roztwór kolagenu o stężeniu 0,001%. Zastosowanie dodatkowego składnika umożliwiło tworzenie w pełni zagregowanych sferoidów. Podobnie jak w przypadku komórek prawidłowych, większy stopień agregacji uzyskano w mikrodołkach o głębokości 500 μm . Ponadto, w mikrodołkach o tej głębokości z powodzeniem prowadzono hodowlę długoterminową (10-cio dniową) sferoidów A549 oraz MRC-5. Kolejnym ważnym parametrem, który analizowano w opracowanym systemie był stres hydrodynamiczny. Jest to czynnik, który w zależności od typu komórek wpływać może na nie stymulująco bądź inhibującą [H4, H9]. Wykazano, że komórki prawidłowe MRC-5 są bardziej odporne na działanie stresu hydrodynamicznego niż komórki nowotworowe A549. Może to wynikać m.in. z morfologii komórek. Komórki A549 są komórkami nabłonkowymi, bardziej wrażliwymi na działanie stresu hydrodynamicznego (przepływu). Powyższe wyniki wskazują, że w zaprezentowanym mikrosystemie z powodzeniem mogą być uzyskiwane sferoidy komórek płuc – jako przestrzenny model hodowli *in vitro* do badania wzrostu komórek. Uzyskane sferoidy miały wysoki stopień sferyczności i powtarzalne rozmiary. Ponadto, warto podkreślić, że opracowany 3D model *in vitro* umożliwia obserwację i analizę tego samego, pojedynczego sferoidu w długoterminowej hodowli. Opracowany mikrosystem jest przedmiotem zgłoszenia patentowego [9].

Mimo, iż w literaturze prezentowane są przestrzenne modele komórkowe oparte na sferoidach uzyskiwanych w mikrosystemach, niewiele jest doniesień na temat modeli sferoidów komórek płuc. Proponowany model *in vitro* (sferoidy komórek płuc A549 i MRC-5 hodowane w systemach *Lab-on-a-chip*), jest jednym z osiągnięć badawczych zrealizowanych podczas mojej pracy. Model ten został wykorzystany do analizy cytotoksyczności (terapia PDT) kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) [H5]. Badania te stanowiły kolejny etap oceny procedur terapii fotodynamicznej w mikrosystemach

⁹ Żuchowska A., Żukowski K., Jastrzębska E., Brzózka Z., Dybko A., Chudy M. (2016) *Przepływowy mikroukład do trójwymiarowej hodowli sferoidów zaopatrzonego w system odpowietrzający oraz sposób odpowietrzania trójwymiarowej hodowli sferoidów* - P.416105, Polska, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

Lab-on-a-chip na modelu komórkowym naśladującym warunki *in vivo*. **Prace tego typu nie były dotychczas prezentowane w literaturze naukowej.** Badania przeprowadzono na hodowli sferoidów uzyskanej w mikrosystemie o geometrii przedstawionej na **Rysunku 5 A**. Geometria mikrosystemu prezentowanego w pracy [H4] została nieznacznie zmodyfikowana w taki sposób, aby w jednym mikrosystemie analizować działanie badanego związku oraz próby kontrolnej (medium hodowlanego). W przypadku badań prowadzonych na przestrzennych hodowlach komórek, w celu uzyskania efektu toksycznego zazwyczaj konieczne jest zastosowanie wyższego stężenia związku niż w przypadku hodowli 2D. Dlatego też, w tych badaniach zastosowałam roztwory ALA o wyższym stężeniu (0÷9 mM) niż w przypadku badań prowadzonych na modelu dwuwymiarowym [H1]. Wykazano, że po 24 h od przeprowadzenia procedur PDT, żywotność komórek prawidłowych MRC-5 jest wysoka, podczas gdy żywotność komórek nowotworowych A549 spada wraz ze wzrostem badanego stężenia ALA (do poziomu ok. 60%). Komórki nowotworowe płuc hodowane przestrzennie (sferoidy) były bardziej odporne (o ok. 70% więcej żywych komórek) na działanie zastosowanej terapii, niż w hodowli 2D [H1, H5].

W przypadku klinicznego zastosowania terapii fotodynamicznej (PDT), po przeprowadzeniu terapii (podaniu związku i naświetleniu) lek pozostaje w organizmie człowieka przez dłuższy czas (w zależności od szlaku metabolicznego). Szukając analogii do terapii prowadzonej na pacjentach oraz argumentując, że terapia po pewnym czasie może przynieść korzystne bądź niepożądane efekty, zbadalam jak procedura terapii PDT wpływa na żywotność komórek w hodowli długoterminowej (10-dniowej). Badałam, czy po przeprowadzeniu terapii fotodynamicznej w hodowli sferoidów, zgodnie z wcześniej założonymi procedurami, w kolejnych dniach obserwowany będzie efekt terapeutyczny. W badaniach zastosowano stężenia ALA (2 i 3 mM), dla których zanotowano znaczący spadek żywotności komórek A549 (dla testów przeprowadzanych po 24 h). Efekt fotocytotoksyczny, to znaczy wysoki spadek żywotności komórek nowotworowych i niski prawidłowych, uzyskano dla stężenia 3 mM pięć dni po przeprowadzeniu PDT. Z kolei, dla 2 mM ALA uzyskano wysoką (ok. 80%) żywotność komórek nowotworowych A549 do ostatniego dnia hodowli (**Rysunek 5 B, C**).



Rysunek 5 (A) Zdjęcie opracowanego mikrosystemu. Schemat agregacji komórek i formowania się sferoidów. Schemat mikrodołków i mikrokomór hodowlanych wytworzonych w mikrosystemie. Uchwyt mikrosystemu dostosowany do wymiarów płytki 384-dołkowej (B,C) Żywność sferoidów A549 i MRC-5 po przeprowadzeniu procedur PDT z (B) 2 mM i (C) 3 mM ALA w kolejnych dniach hodowli. (Po prawej stronie) Sferoidy w mikrodołkach hodowlanych w ostatnim dniu hodowli poddane barwieniu różnicowemu jodkiem propidyny (czerwony kolor) i kalceiną AM (zielony kolor) [H5].

Wyższy efekt terapeutyczny po kilku dniach od przeprowadzenia procedur PDT wynikać mógł z budowy sferoidu. Ze względu na ściśle przylegające komórki utrudnione mogło być równomierne wnikanie związku do wszystkich komórek. ALA wnikało głównie do zewnętrznej części sferoidu. Ponadto, część komórek mogła ulegać śmierci na drodze apoptozy, co powodowało spadek żywotności w ciągu kolejnych dni hodowli. Zaobserwowano, że komórki nowotworowe A549 są bardziej wrażliwe na zastosowane parametry procedury PDT niż komórki prawidłowe MRC-5. Głównym powodem różnic w żywotności komórek po przeprowadzeniu procedur PDT może być różnica w aktywności enzymów w cyklu hemowym pomiędzy tymi komórkami. Komórki A549 mają znacznie większą enzymatyczną konwersję ALA do protoporfiryny IX (PpIX), co wpływa na większą akumulację fotouczulacza. To z kolei powoduje wytwarzanie większej liczby reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach A549. Uzyskane wyniki potwierdzają, że proponowany model hodowli komórek może stanowić zawansowane narzędzie do oceny i optymalizacji procedur PDT.

W badaniach prowadzonych w mikrosystemie do hodowli 2D wykazano, że przeprowadzenie procedur PDT na współhodowli (kokulturze) komórek nowotworowych i prawidłowych, wpływać może na spadek żywotności komórek prawidłowych, na które dana terapia nie powinna działać [**H1-H3**]. Biorąc pod uwagę te badania oraz testy związane z opracowaniem hodowli 3D komórek (sferoidów) zaproponowałam przestrzenny model kokultury komórkowej w sferoidach [**H6**]. Mikrosystem przedstawiony na **Rysunku 5 A** wykorzystałam do (1) opracowania nowego modelu hodowli w warunkach przepływowych, opartego na sferoidach złożonych z kokultury komórek nowotworowych i prawidłowych piersi oraz (2) analizy skuteczności procedur terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem enkapsulowanej mezo-tetrafenyloporfiryny na uzyskanej kokulturze sferoidów. Tkanka nowotworowa *in vivo* charakteryzuje się wieloma specyficznymi właściwościami, między innymi trójwymiarowym (3D) ułożeniem komórek oraz występującymi interakcjami pomiędzy komórkami prawidłowymi i nowotworowymi. Ponadto, składa się ona z dwóch warstw tzw. mięszu oraz komórek zrębu. W celu naśladowania takiego mikrośrodowiska, opracowałam trójwymiarową kokulturę komórek piersi w postaci sferoidu. W badaniach zastosowano ludzkie komórki gruczolakoraka piersi (MCF-7) i ludzkie fibroblasty sutka (HMF), które mieszano ze sobą w stosunku objętościowym 1:1. Ze względu na to, że komórki HMF wytwarzają składniki pozakomórkowej macierzy zrębu oraz odgrywają ważną rolę w rozwoju i rozprzestrzenianiu się nowotworu piersi, zostały one zastosowane w badaniach jako komórki zrębu. Z kolei komórki nowotworowe MCF-7 zastosowano jako komórki

miąższu. W opracowanym mikrosystemie w każdym mikrodołku hodowlanym uzyskano pojedynczy sferoid złożony z dwóch typów komórek odpowiadających warstwie miąższu i zrębu. Z powodzeniem przeprowadzono trzy typy hodowli sferoidów: monokulturę komórek HMF i MCF-7, a także kokulturę komórek MCF-7/HMF. Uzyskane wyniki wykazały, że komórki hodowane w kokulturze sferoidu charakteryzują się wyższą proliferacją niż komórki MCF-7 lub HMF hodowane jako monokultura sferoidu. Wynikać to może ze wzajemnego oddziaływania między komórkami hodowanymi we współhodowli. Na podstawie analizy proliferacji komórek, wywnioskować można że zoptymalizowane w mikrosystemie warunki hodowli są odpowiednie do uzyskania trójwymiarowego (w postaci sferoidu) modelu mono- i kokultury komórek.

Model kokultury sferoidu (MCF-7/HMF) zastosowałam do analizy skuteczności procedur terapii fotodynamicznej (PDT), jako model bardziej zbliżony do *in vivo* niż standardowe i mikroprzepływowe hodowle dwuwymiarowe. Testy prowadzono również na monokulturze sferoidów komórek MCF-7 i HMF. W badaniach zastosowano nowo opracowany enkapsulowany fotouczulacz (mezo-tetrafenyloporfiryne, nano-TPP). Enkapsulowany fotouczulacz uzyskano w ramach współpracy z zespołem prof. Kazimierzy A. Wilk z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Podobnie jak wcześniej opisane enkapsulowane fotouczulacze [H2, H3], nano-TPP przygotowano metodą warstwa po warstwie (ang. *layer-by-layer*, LbL) zgodnie z procedurami prezentowanymi w literaturze [10]. Wykazano, że skuteczność procedur PDT jest zależna od stosowanej dawki fotouczuła oraz czasu jaki minął od przeprowadzenia procedur terapii. Na żywotność komórek wpływ miał również typ hodowli sferoidów. Po przeprowadzeniu procedur PDT nie obserwowano znaczącego spadku żywotności komórek prawidłowych HMF hodowanych w postaci sferoidów w monokulturze (z wyjątkiem badań prowadzonych dla stężenie 45 μM i czasu 48 h). Fotocytotoksyczne działanie nano-TPP obserwowano głównie w w mono- i kokulturze sferoidów zawierających komórki nowotworowe MCF-7. Zaobserwowano jednak, że komórki były bardziej odporne na działanie procedur PDT w kokulturze (MCF-7/HMF) niż w monokulturze (MCF-7). Ponadto, efekt fotocytotoksyczny widoczny był później dla hodowli prowadzonej w kokulturze MCF-7/HMF. Wynikać to może z właściwości komórek zrębu (komórek HMF). Stymulują one bowiem wzrost komórek nowotworowych oraz wspierają ich odporność na stosowane terapie. Dodatkowo, rodzaj

¹⁰ Bazylińska U., Frąckowiak R., Brzózka Z., Wilk K.A. (2017) *The effect of anionic dicephalic surfactants on fabrication of varied-core nanocarriers for sustained release of porphyrin photosensitizers*, J Photochem Photobiol B 166 169-179

komórek z jakich zbudowany jest sferoid wpływał na uzyskanie różnego stopnia akumulacji nano-TPP i tym samym generowany był różny poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w obu modelach hodowli sferoidów: w mono- i kokulturze. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wnioskuję, że zastosowany nano-TPP jest fotouczulaczem, który umożliwia uzyskanie nie tylko skutecznej ale i selektywnej terapii fotodynamicznej. **W ramach wyżej opisanych badań przedstawiłam innowacyjne podejście do opracowania 3D modelu nowotworu w mikrosystemie, takiego w którym mogą być uzyskane warunki wzrostu komórek nowotworowych zbliżone do *in vivo*. Wykazałam, że model kokultury komórek w postaci sferoidu może być z powodzeniem stosowany do oceny skuteczności i optymalizacji procedur terapii fotodynamicznej z zastosowaniem enkapsulowanych fotouczulaczy.**

W ramach pierwszego nurtu prac potwierdziłam, że systemy *Lab-on-a-chip* stanowić mogą idealne narzędzia do tworzenia zaawansowanych modeli *in vitro* do hodowli i analizy komórek prawidłowych i nowotworowych. **Wykazałam, że w mikroskali uzyskać można nie tylko dwuwymiarowe monokultury komórek, ale również ich współhodowlę i umieszczenie w określonych obszarach.** Mikrosystemy o precyzyjnie zaprojektowanych mikrostrukturach stosowane mogą być do hodowli 2D komórek prawidłowych i nowotworowych rosnących zarówno w mono- jak i kokulturze (współhodowli). **Poza tym, opracowane mikrosystemy z powodzeniem posłużyły do uzyskania przestrzennego modelu komórek nowotworowych (w postaci mono- i kokultury komórek). Taka hodowla umożliwia jeszcze lepsze odzwierciedlenie warunków *in vivo*.** Wykazałam, że proponowane modele wykorzystywane mogą być w ocenie wzrostu komórek, cytotoksyczności związków, czy efektu terapeutycznego procedur terapii fotodynamicznej. W ramach badań wykazano, różną odpowiedź komórek na działanie czynnika terapeutycznego w proponowanych modelach 2D i 3D, co jeszcze bardziej podkreśla konieczność opracowywania zaawansowanych metod hodowli komórek. **Badania związane z oceną procedur terapii fotodynamicznej (PDT) z zastosowaniem enkapsulowanych fotouczulaczy oraz hodowli 3D sferoidów w kokulturze dotychczas nie były szeroko analizowane. Zaproponowana przeze mnie powyżej tematyka badawcza, stanowiąca element niniejszej rozprawy habilitacyjnej, jest pionierska i jako jedna z pierwszych prezentowanych w literaturze naukowej. W wyżej opisanych badaniach starałam się dowieść, że miniaturyzacja, automatyzacja badań oraz możliwość precyzyjnej kontroli komórek w systemach *Lab-on-a-chip* są istotnymi zaletami jakie przemawiają za tym, że**

proponowane rozwiązania mogą być alternatywą do dotychczas stosowanych w laboratoriach biologicznych metod hodowli i analizy komórek i z powodzeniem wpisują się w zasadę 3R dotyczącą badań toksykologicznych.

2. Opracowanie systemów typu *Heart-on-a-chip* [H7-H11]

W ramach badań podjętych w trakcie pracy habilitacyjnej, zaproponowałam i rozwinęłam również zupełnie nową tematykę badawczą, która jest nie licznie prezentowana w literaturze naukowej i nie była dotychczas prowadzona w zespole badawczym, w którym pracuję. Badania te związane były z opracowaniem mikrosystemów znajdujących zastosowanie w analizie i hodowli komórek sercowych [H7-H11]. Zainteresowanie tą tematyką wynikało przede wszystkim z tego, że choroby układu krążenia corocznie przyczyniają się do największej liczby zgonów. W związku z czym, słuszne wydawało się dla mnie opracowanie modelu komórkowego podobnego do *in vivo*, w którym będzie można badać funkcje komórek serca, opracowywać nowe procedury terapii czy analizować możliwości regeneracyjne komórek macierzystych [H7, H8]. Zastosowanie w tej dziedzinie z powodzeniem znaleźć mogą modele naśladujące działanie *in vivo* (ang. *in vivo-like model*) uzyskiwane w systemach *Lab-on-a-chip*. Rozwiązania te, nazywane systemami *Organ-on-a-chip*, pozwalają na naśladowanie przynajmniej w pewnym stopniu funkcjonowania danej tkanki czy organu i dzięki temu badanie funkcji komórek serca prowadzone jest w warunkach zbliżonych do *in vivo* (tzw. *Heart-on-a-chip*). W literaturze tematyka dotycząca systemów *Organ-on-a-chip* należy do stosunkowo nowych. W związku z czym, mimo pojawiających się doniesień na temat mikrosystemów do hodowli komórek serca, w dalszym ciągu są one w fazie początkowej i wymagają prowadzenia dalszych badań. **Zaproponowane przeze mnie badania realizowałam w ramach projektu badawczego LIDER, którego byłam kierownikiem. Projekt pt. "Mikrosystem *Lab-on-a-chip* do modelowania i badania wzrostu komórek mięśnia sercowego." uzyskał finansowanie ponad 1 mln złotych z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.** Jednym ze wskaźników rezultatów tego projektu była praca doktorska, ściśle związana z tematyką kierowanego przeze mnie projektu i zawierająca część moich koncepcji zawartych w zadaniach badawczych. **Ponadto, na zaproszenie wydawnictwa Springer ukazała się książka: „Cardiac Cell Culture Technologies – Microfluidics and on Chip Systems”, która poświęcona jest tematyce badawczej prowadzonej przeze mnie w ramach pracy**

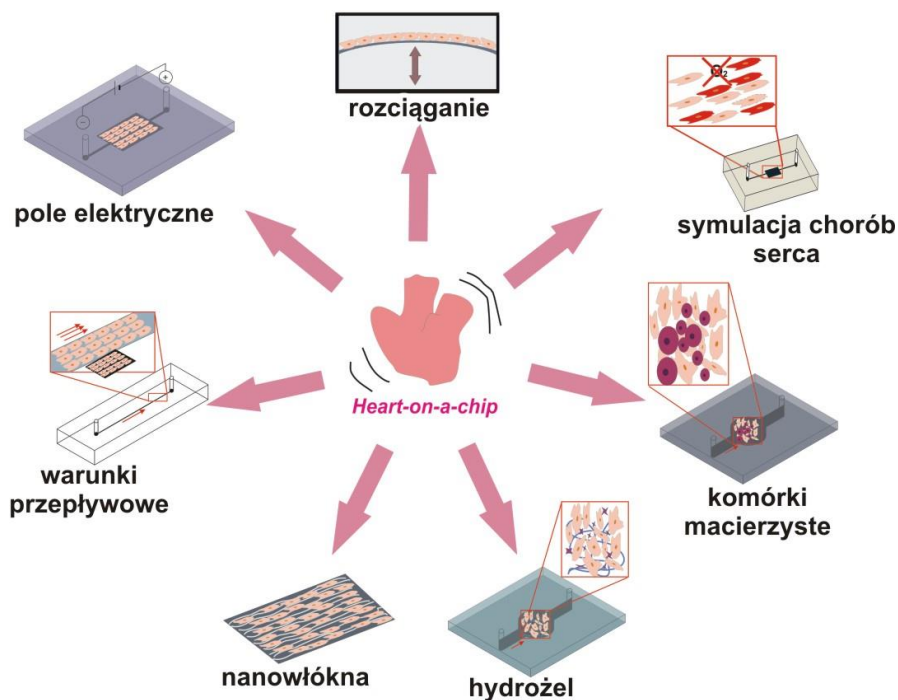
habilitacyjnej [11]. Byłam edytorem korespondencyjnym, głównym pomysłodawcą zawartości merytorycznej książki oraz współautorem pięciu rozdziałów.

W książce, jak również w jednej z prac przeglądowych, opisałam parametry jakie powinny być spełnione i zachowane w systemach *Heart-on-a-chip* [H7, H8]. Scharakteryzowałam również typy mikroukładów, jakie dotychczas są opisywane w literaturze oraz podkreśliłam wymagania i elementy, które zdecydowanie powinny być udoskonalone, aby systemy *Heart-on-a-chip* z powodzeniem mogły znaleźć zastosowanie w diagnostyce i leczeniu chorób układu krążenia. Najważniejszą zaletą systemów *Heart-on-a-chip* jest możliwość naśladowania warunków *in vivo* bardziej niż w standardowych (dwuwymiarowych, 2D) metodach hodowli. Efekt ten uzyskać można między innymi poprzez zaprojektowanie sieci mikrostruktur, odpowiadającym unaczynieniu oraz zapewnieniu warunków dynamicznych, co z kolei może odpowiadać ciągłemu działaniu przepływu krwi na komórki serca. Ponadto, służyć one mogą do monitorowania parametrów stanu komórek (np. stężenie tlenu, wartość pH, stres hydrodynamiczny, pobór wewnątrzkomórkowych jonów wapnia i poziom oksydazy mleczanowej) oraz analizy cytotoksyczności związków o kardiologicznej czy przeciwnowotworowej aktywności terapeutycznej.

W trakcie planowania badań mających na celu opracowanie zaawansowanego modelu do hodowli i analizy komórek serca wzięłam pod uwagę specyficzne właściwości tkanki jaką chciałabym zamodelować w mikroprzepływowym systemie (**Rysunek 6**). Serce jest tkanką, która charakteryzuje się zarówno równoległym ułożeniem komórek jak i złożoną dynamiką elektrochemiczną. Kolejną istotną cechą jest laminarny i pulsacyjny przepływ w systemie naczyniowym. W związku z czym: warunki mechaniczne i dynamiczne, równoległe ułożenie komórek na nanowłóknach lub przestrzenne w hydrożelach, rozciąganie czy pole elektryczne są kluczowymi parametrami sygnalizacyjnymi używanymi do naśladowania funkcjonowania tkanki serca. Dodatkowo, modele komórkowe w mikrosystemach mogą być wykorzystywane do symulowania chorób układu krążenia i badania regeneracji serca za pomocą komórek macierzystych. W swoich badaniach, będących przedmiotem jednotematycznego cyklu prac rozprawy habilitacyjnej, podjęłam próbę optymalizacji w mikrosystemach takich czynników jak: warunki dynamiczne hodowli, zastosowanie nanowłókien i hydrożelu do prowadzenia hodowli komórek serca [H9 - H11]. Hodowla komórek serca w mikrosystemach prowadzona może być w różny sposób: mogą to być hodowle dwuwymiarowe (tj. hodowla pojedynczej

¹¹ Jastrzebska E., Brzozka Z. (2018) edytor, *Cardiac Cell Culture Technologies: Microfluidic and On-Chip Systems*, Springer 233, ISBN 978-3-319-70684-9

komórki, monowarstwa komórek) oraz trójwymiarowe. Do hodowli przestrzennych zalicza się: hodowlę w postaci sferoidów i wielowarstwy komórkowej oraz zastosowanie hydrożeli, nanowłókien i skafoldów. Biorąc pod uwagę analizę różnych parametrów ważnych w trakcie opracowywania modeli komórkowych naśladujących warunki *in vivo*, w swoich pracach podjęłam się zbadania zarówno modeli dwu-jak i trójwymiarowych.

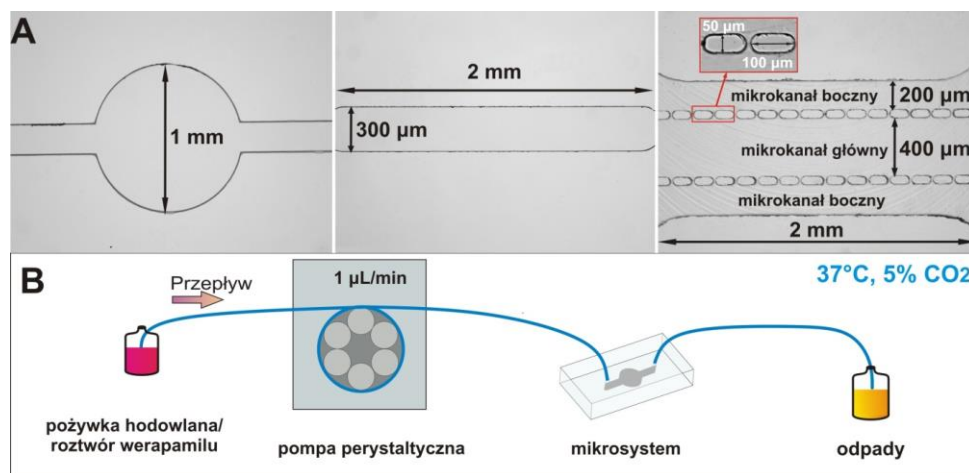


Rysunek 6 Kluczowe czynniki sygnałowe jakie naśladowane mogą być w systemach typu *Heart-on-a-chip* [12].

Warunki dynamiczne są jednym z istotnych czynników obecnych w układzie krwionośnym i sercu w warunkach *in vivo*. W związku z czym, ważne jest badanie tego parametru na modelach komórkowych opracowywanych poza organizmem. Zastosowanie miniaturowych systemów przepływowych w tym celu, wydaje się być naturalnym rozwiązaniem, zdecydowanie dogodniejszym i bardziej precyzyjnym niż standardowe hodowle komórkowe (makroskala). Jednym z proponowanych przeze mnie modeli komórkowych do analizy wzrostu komórek serca były mikrosystemy przepływowe o różnej geometrii, w których prowadzono hodowlę 2D wybranej linii komórek serca [H9]. W celu zapewnienia adhezji komórek do podłoża zastosowano szkło jako materiał konstrukcyjny systemu. PDMS posłużył do wytworzenia w nim zaprojektowanych mikrostruktur. Zbadano wpływ warunków mikrośrodowiska (statyczne i dynamiczne) oraz geometrii mikrokomór hodowlanych na proliferację, morfologię oraz ułożenie kardiomioblastów szczurzych (H9C2). **Mimo, iż**

¹² Jastrzebska E., Brzozka Z. (2018) Rozdział 7: *Microfluidic systems for cardiac cell culture – characterization* w *Cardiac Cell Culture Technologies: Microfluidic and On-Chip Systems* (ed. Jastrzebska E., Brzozka Z.) Springer, 155-167

w literaturze proponowanych jest wiele rozwiązań systemów *Lab-on-a-chip* bardzo często pomijane są badania mające na celu analizę wpływu na komórki takich czynników jak ciągły przepływ składników odżywczych czy kształt mikrostruktur, w których prowadzona jest hodowla komórek. Zaprojektowałam i wykonałam trzy typy mikroukładów o geometrii: okrągłej mikrokomory, podłużnego mikrokanalu, trzech mikrokanalów podłużnych oddzielonych mikroslupkami (**Rysunek 7 A**). W trakcie planowania kształtu mikrokomór kierowałam się między innymi tym, że w tych geometriach uzyskiwane są różne wartości naprężenia ścinającego (największe dla mikrokanalu podłużnego). Okrągła mikrokomora jest najpopularniejszą geometrią stosowaną w systemach *Lab-on-a-chip*, w związku z czym zastosowałam ją do hodowli komórek serca. Z kolei ze względu na to, że komórki mięśnia sercowego, *in vivo* są ułożone względem siebie równolegle, postawiłam hipotezę, że mikrokanal podłużny powinien stymulować komórki do równoległego ułożenia. Geometria tych systemów pozwalała na przepływ medium hodowlanego bezpośrednio nad hodowanymi komórkami. W mikrosystemie z trzema równoległymi mikrokanalami oddzielonymi dwoma rzędami mikroslupków, komórki hodowano w głównym mikrokanale, natomiast medium dostarczane było kanałami bocznymi i dyfundowało pomiędzy mikroslupkami do komórek. Testy przeprowadzane były na modelu dwuwymiarowym hodowli komórek H9C2, zgodnie ze schematem przedstawionym na **Rysunku 7 B**.

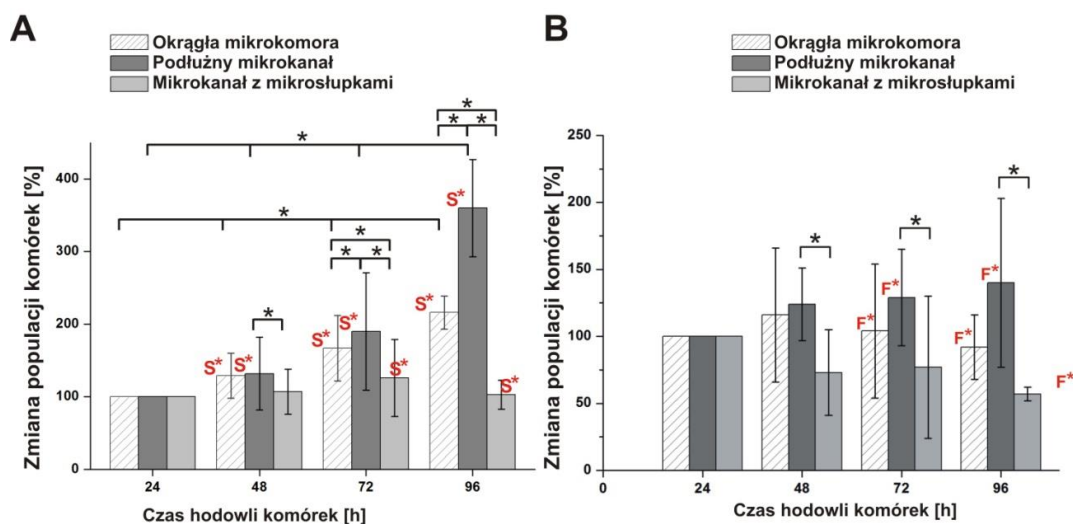


Rysunek 7 (A) Geometrie mikrokomór hodowlanych: okrągła, mikrokanal podłużny, trzy mikrokanaly podłużne oddzielone mikroslupkami. (B) Schemat przeprowadzenia eksperymentu [H9].

Przeprowadzano hodowlę statyczną (zmiana pożywki codziennie przez 10 min., przepływ 1 µl/min) oraz dynamiczną (ciągły przepływ pożywki przez 72 h hodowli, przepływ 1 µl/min), a następnie badano proliferację, morfologię i rozmieszczenie komórek. Ze względu na to, że sznurce kardiomioblasty (H9C2) są jednymi z najczęściej stosowanych

modelowych komórek serca, te komórki zastosowałam w swoich badaniach. Zaobserwowałam, że w hodowli statycznej w mikroskali liczba komórek H9C2 spada w kolejnych dniach, aż do ok. 65% w ostatnim dniu hodowli. Analiza morfologii wskazywała, że komórki przypadkowo przylegały do podłoża tworząc nieregularne kształty. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy stosowanymi mikrokomorami hodowlanymi. W hodowli dynamicznej liczba komórek wzrosła znacznie w kolejnych dniach hodowli i była zależna od zastosowanej geometrii mikrosystemu (**Rysunek 8 A**). Najwyższa proliferacja komórek oraz kierunkowanie się ich zgodnie z przepływem medium hodowlanego zaobserwowano w mikrokanale podłużnym. Porównanie wyników uzyskanych w hodowli statycznej i dynamicznej wykazało, że przepływ stymuluje komórki H9C2 do szybszych podziałów oraz do równoległego ułożenia. Ponadto, naprężenia ścinające (najwyższa wartość dla mikrokanalu podłużnego) oraz trajektoria płynu (regularny przepływ w całej mikrokomorze) są istotne w uzyskaniu wysokiej proliferacji badanych komórek. Wykazano, że odpowiednio dobrane parametry (wartość przepływu składników odżywczych, kształt mikrokomory) w pewnym stopniu naśladują orientację komórek w tkance mięśnia sercowego.

Przeprowadziłam również testy z zastosowaniem chlorowodorku werapamilu, blokera kanału wapniowego typu L (CCB), jako modelowego związku stosowanego w kardioterapii. Testy te miały na celu sprawdzenie, w jaki sposób dynamiczne warunki hodowli i geometria mikrosystemów wpływają na cytotoksyczność związku. Zaobserwowałam, wzrost proliferacji komórek w mikrokomorze okrągłej i mikrokanale podłużnym, podczas gdy w mikrokanale z mikroślupkami obserwowany był nieznaczny spadek żywotności komórek. W porównaniu z proliferacją komórek uzyskaną bez działania werapamilu (przepływ medium hodowlanego) zaobserwowano znaczące różnice w tempie wzrostu komórek. W szczególności różnice te były widoczne w mikrokanale podłużnym (**Rysunek 8 B**). Przypuszczam, że na spadek proliferacji komórek wpływ mogło mieć toksyczne działanie chlorowodorku werapamilu. Ponadto, ze względu na to że związek podawany był w czasie ciągłym przez 72 h, mogła nastąpić jego zbyt duża akumulacja w komórkach. To z kolei powodowało blokowanie kanałów wapniowych typu L, zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i finalnie wstrząs hemodynamiczny i upośledzenie funkcji komórek.



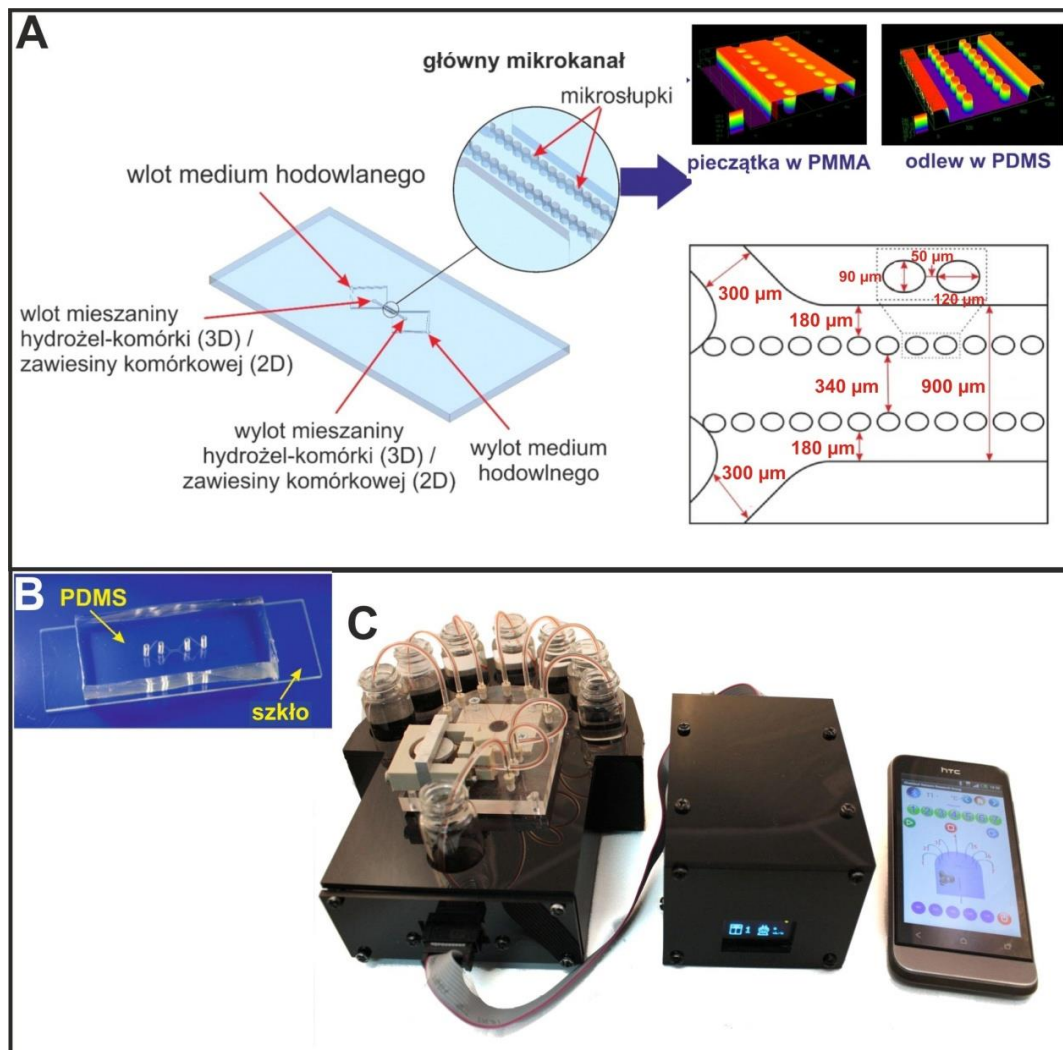
Rysunek 8 (A) Proliferacja komórek H9C2 w mikrokomorach hodowlanych o różnej geometrii w hodowli dynamicznej (S^* - istotność statystyczna w stosunku do hodowli statycznej). (B) Proliferacja komórek H9C2 w mikrokomorach hodowlanych o różnej geometrii po działaniu chlorowodoru werapamilu (F^* - istotność statystyczna w stosunku do hodowli dynamicznej) [H9].

W literaturze opisywane są badania związane z analizą wpływu warunków dynamicznych na ułożenie komórek. Jednak rzadko prowadzone są badania porównawcze w mikrosystemach o różnej geometrii. Ponadto, nie badano dotychczas jak ciągły przepływ chlorowodoru werapamilu, wpływając może na proliferację komórek H9C2. **Przeprowadzone badania wskazują, że mikroprzepływowe systemy posłużyć mogą do optymalizacji parametrów hodowli komórek w taki sposób, aby uzyskać maksymalną proliferację badanych komórek, tym samym tworząc dynamiczny 2D model *in vitro*. Taki model służyć może np. analizie leków kardiologicznych. Część geometrii mikrosystemów stosowanych w wyżej opisanych eksperymentach wykonałam w EPFL (Szwajcaria) w grupie prof. Philippe Renaud, gdzie byłam na stażu naukowym. Wyniki badań dotyczące porównania wpływu statycznych i dynamicznych warunków na hodowlę komórek serca zostały opublikowane w czasopiśmie SLAS Technology. Istotność podejmowanej przeze mnie tematyki została doceniona przez to czasopismo - wyniki wyżej opisanych prac wytypowano do umieszczenia na okładce numeru wydania (ang. *front cover*). Ponadto, w 2018 roku zostałam wyróżniona przez edytorów czasopisma jako jeden z 10 najlepszych naukowców publikujących innowacyjne badania w 2017 r. w tym czasopiśmie (ang. *The People Powering the 2018 SLAS Technology Ten*).**

Kolejnym etapem badań było opracowanie modelu komórkowego zbliżonego do *in vivo*, w którym możliwe było prowadzenie hodowli komórek serca nie tylko dwu-, ale również trójwymiarowej [H10]. W żywych organizmach komórki naturalnie otoczone są macierzą

zewnątrzkomórkową (ECM), która łączy komórki ze sobą i pozwala im na tworzenie trójwymiarowej struktury (tkanki). Jednym ze sposobów uzyskania przestrzennego ułożenia komórek w mikrosystemach jest zastosowanie hydrożeli. Ciekła forma hydrożelu jest żelowana pod wpływem różnych czynników zewnętrznych (promieniowanie ultrafioletowe, temperatura, czynniki chemiczne). W efekcie czego hydrożel tworzy strukturę sieci podobną do macierzy zewnątrzkomórkowej. **Istnieje tylko kilka doniesień na temat zastosowania hydrożeli do badania komórek serca, dlatego też w swoich badaniach podjęłam próbę opracowania modelu przestrzennego w mikroskali** z zastosowaniem komercyjnie dostępnego hydrożelu peptydowego Puramatrix. Mikrosystem (PDMS/szkło) został zaprojektowany i wykonany w taki sposób, aby w wyniku przepływu medium hodowlanego możliwe było uzyskanie przestrzennej struktury żelu (hodowla 3D) oraz prowadzenie wymiany medium hodowlanego i badanych składników w kolejnych dniach hodowli. W celu możliwości porównania jak ułożenie przestrzenne komórek serca wpływa na ich funkcje, mikrosystem został zaprojektowany tak, aby umożliwiać również prowadzenie hodowli 2D. Na podstawie wcześniej prowadzonych badań zmodyfikowano mikrosystem z mikrokanalami oddzielonymi od siebie mikrosłupkami. Z tą różnicą, że na podstawie symulacji COMSOL Multiphysics oraz badań empirycznych zoptymalizowano wymiary mikrostruktur systemu (wysokość mikrokanalów, wielkość mikrosłupków i odległości pomiędzy nimi) (**Rysunek 9 A**). Mikrosystem został zaprojektowany w sposób pozwalający maksymalnie zredukować liczbę wlotów i wylotów. Dzięki temu możliwy był do uzyskania w prosty sposób zaawansowany model komórek *in vitro* w systemie *Lab-on-a-chip* (**Rysunek 9 B**). Kolejną zaletą opracowanego mikrosystemu była jego integracja z czytnikiem płytek wielodołkowych, co pozwoliło na precyzyjne i ilościowe oznaczanie parametrów hodowli. Warte podkreślenia jest również, że zaprojektowany mikrosystem z powodzeniem może być zintegrowany z automatycznym mikrodozownikiem, sterowanym zdalnie za pomocą opracowanej do tego aplikacji. Taki mikrodozownik umożliwia precyzyjne i automatyczne dostarczanie badanych substancji do mikrosystemu, w którym hodowane są komórki (**Rysunek 9 C**). Istotną zaletą mikrodozownika jest możliwość umieszczenia go w inkubatorze i sterowania z wykorzystaniem opracowanej aplikacji w środowisku Android. Opracowanie, wykonanie i testowanie mikrodozownika było jednym z elementów zadania badawczego projektu LIDER, którego byłam kierownikiem. Proponowany mikrosystem do

zaawansowanej hodowli komórek serca oraz mikrodozownik są przedmiotem zgłoszeń patentowych [13, 14].



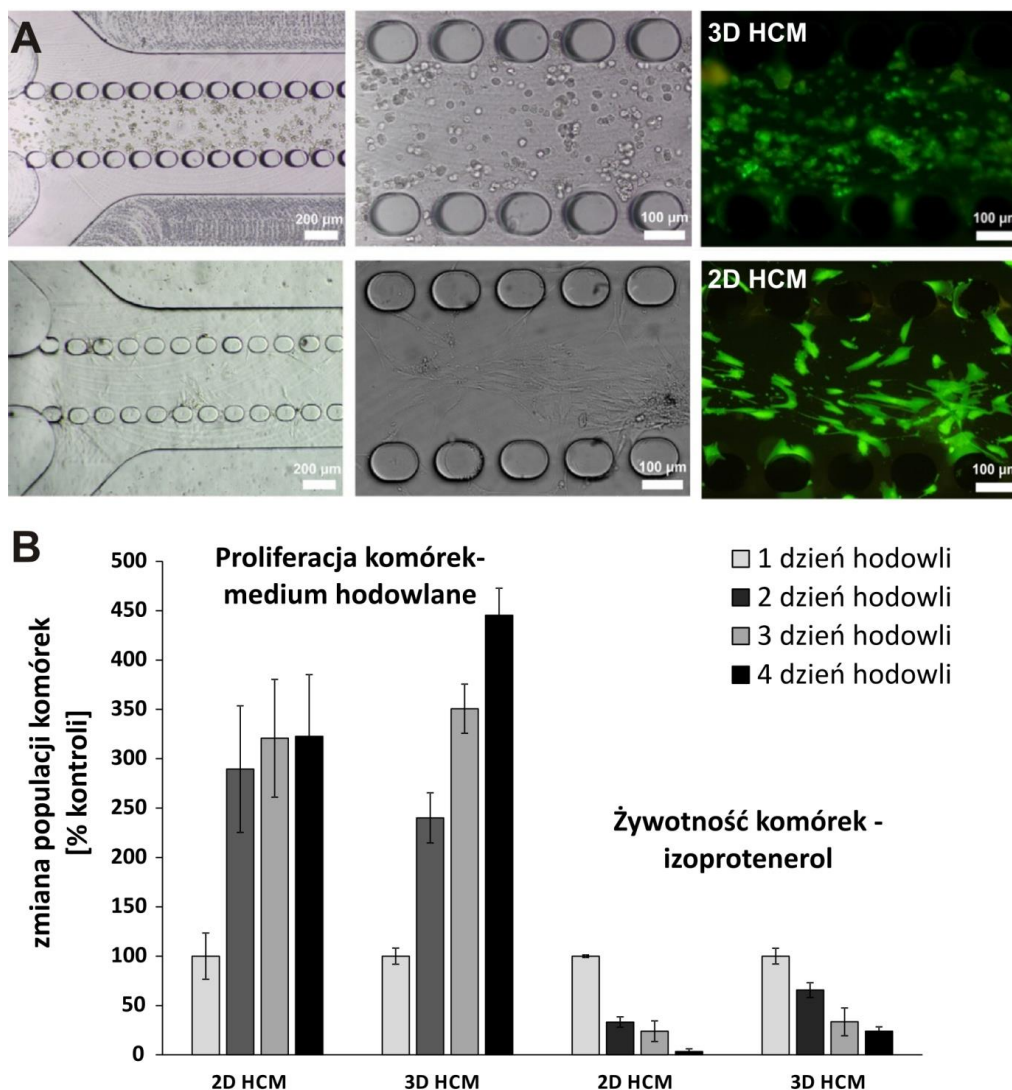
Rysunek 9 (A) Schemat mikrosystemu z mikrosłupkami do hodowli 2D i 3D. (B) Wykonany mikrosystem. (C) Mikrodozownik zdalnie sterowany z poziomu smartfona [H10].

W celu uzyskania modelu komórkowego jak najbardziej odpowiadającego funkcjonowaniu komórek serca człowieka, w badaniach zastosowano ludzkie kardiomiocyty (HCM). **Zaprojektowany mikrosystem z powodzeniem został zastosowany do czterodniowej hodowli 2D i 3D komórek HCM. Wykazałam, że dobrane wymiary mikrosystemu oraz prędkość przepływu komórek i medium hodowlanego, umożliwiają dostarczanie niezbędnych substancji odżywczych zarówno w hodowli 2D jak i 3D. Zaletą**

¹³ Jastrzębska E., Żukowski K., Żuchowska A., Dybko A., Chudy M., Brzózka Z. (2018) *Automatyczny mikrodozownik do oceny skuteczności terapii w przepływie* – P.424410, Polska, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

¹⁴ Jastrzębska E., Tomecka E., Żukowski K. (2015) *Przepływowy mikrosystem do hodowli komórek, zwłaszcza komórek sercowych* – P.412087, Polska, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

opracowanego modelu przestrzennego było to, że hydrożele wykazują podobieństwo w strukturze do macierzy zewnątrzkomórkowej. Poza tym, uzyskano odpowiednią dyfuzję składników odżywczych i jednorodne rozmieszczenie komórek w całej objętości hydrożelu (**Rysunek 10 A**). Wykazano, że komórki rosnące 3D mają wyższą zdolność metaboliczną i proliferują szybciej niż komórki w hodowli 2D. Wynikać to może z większej liczby interakcji komórkowych w hodowli 3D, co z kolei stymuluje komórki do podziałów. Celem powyższych prac było uzyskanie modelu komórkowego zbliżonego do *in vivo*, który posłużyć może do badania aktywności leków. Działanie opracowanego mikrosystemu oraz modelu komórkowego weryfikowano na podstawie testów cytotoksyczności izoprotenerolu - leku stosowanego w kardioterapii. Wykazano, że efekt cytotoksyczny był niższy dla hodowli przestrzennej (**Rysunek 10 B**).



Rysunek 10 (A) Hodowla 3D oraz 2D komórek HCM w mikrosystemie z mikroslupkami. (B) Żywotność komórek HCM bez oraz po działaniu leku – dla hodowli 2D i 3D wykonanej w mikrosystemie [H10].

Analiza proliferacji komórek HCM oraz testy cytotoksyczności przeprowadzane były również w makroskali, z zastosowaniem standardowych metod hodowli. Zaobserwowałam istotne różnice pomiędzy tymi dwoma modelami hodowlanymi. Bez wątplenia wynikać to może z różnicy właściwości mikrośrodowiska w jakim prowadzone są hodowle komórek w makro- i mikroskali. Ze względu na to, że zaawansowane modele przepływowe do przestrzennej hodowli kardiomiocytów w pewnym stopniu odzwierciedlają warunki *in vivo*, odpowiedź komórek w takim modelu może być bardziej zbliżona do rzeczywistej, uzyskiwanej w organizmie.

Komórki mięśniowe, w tym komórki mięśnia sercowego, w warunkach *in vivo* charakteryzują się równoległym ułożeniem względem siebie. W standardowo stosowanych metodach hodowli, kardiomiocyty ułożone są w sposób losowy. W związku z czym, komunikacja i sygnalizacja pomiędzy nimi może być zaburzona. Dlatego też, ważne jest celowe kierunkowanie wzrostu komórek mięśnia sercowego. We wcześniej opisanych modelach dwuwymiarowych dowiodłam, że przepływ (warunki dynamiczne) determinuje ułożenie komórek serca. Poza tym, zastosowanie hydrożelu daje możliwość uzyskania przestrzennego wzrostu komórek. Mimo tego, że hodowle przestrzenne są zaawansowanym modelem hodowlanym, to komórki nie wykazują regularnego równoległego ułożenia względem siebie. Zaproponowaną przeze mnie metodą uzyskiwania równoległego ułożenia komórek było zastosowanie nanowłóknien. Nanowłókna są porowate, mają wysoki stosunek powierzchni do objętości i są strukturalnie podobne do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Dzięki temu uznaje się, że nanowłókna stanowią mogą idealne mikrośrodowisko wzrostu komórek serca.

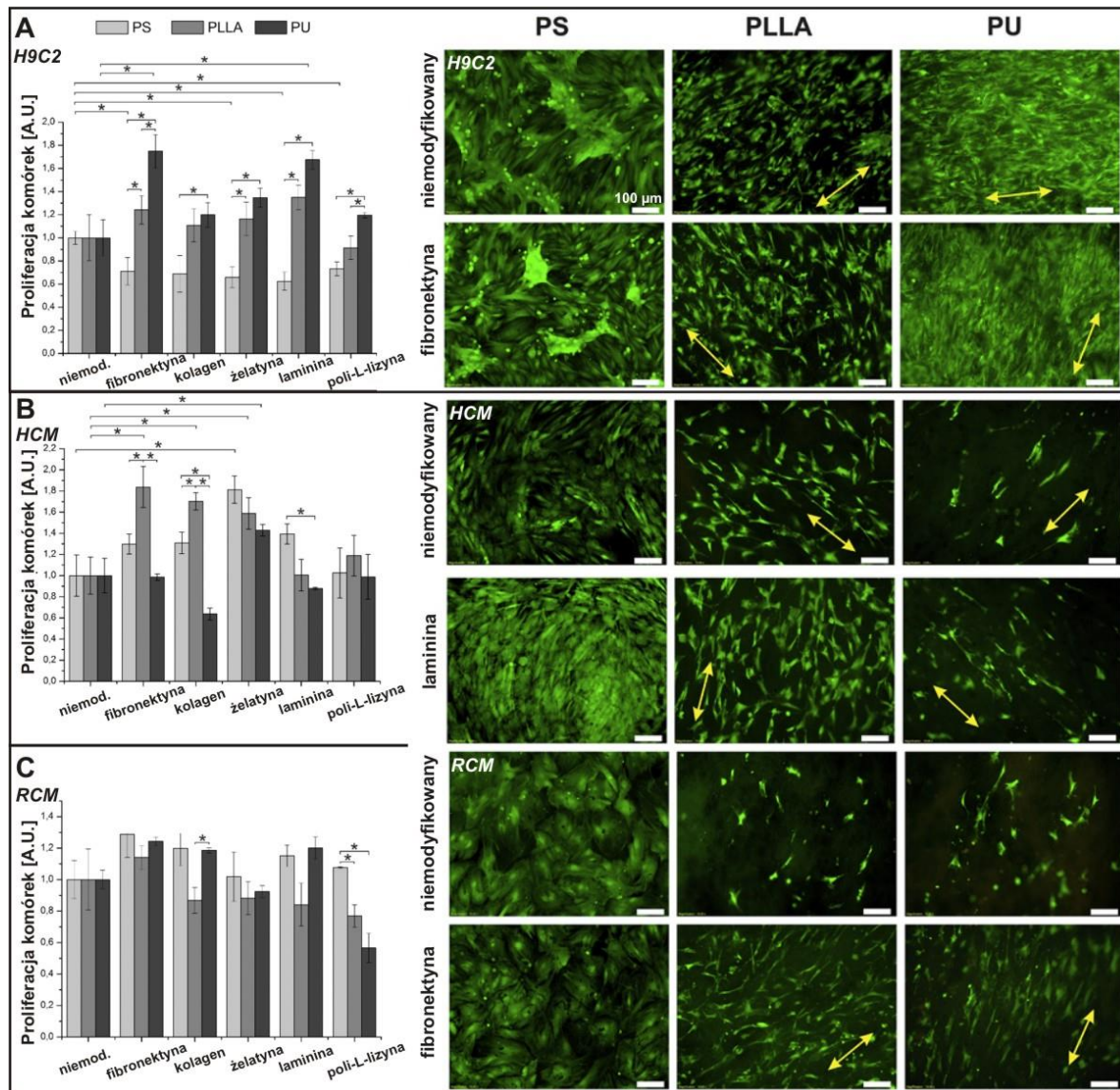
W celu weryfikacji tezy, że możliwe jest uzyskanie równoległej orientacji komórek na nanowłóknach zbadano wzrost komórek sercowych z wykorzystaniem mat nanowłóknien z poli(L-laktydu) (PLLA) i poliuretanu (PU) [H11]. Nanowłókna wykonane zostały za pomocą metody rozdmuchu polimeru (ang. *solution blow spinning*, SBS). Metoda ta jest rzadko stosowana, w porównaniu do metody elektroprzędzenia (ang. *electrospinning*). Do jej zalet należą m.in. uzyskanie nanowłóknien o dużej powtarzalności, niski koszt wytwarzania oraz możliwość adaptacji do produkcji wielkoskalowej. Kolejną zaletą stosowania tej metody jest to, że SBS umożliwia uzyskanie nanowłóknien polimerów biodegradowalnych, co jest niemożliwe w metodzie elektroprzędzenia. Nanowłókna stosowane do badań uzyskałam w ramach współpracy z zespołem prof. Tomasza Ciacha z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Badano dwa typy nanowłóknien różniących się właściwościami. Średnica otrzymanych za pomocą SBS nanowłóknien PLLA była około

dwukrotnie mniejsza niż średnica nanowłókien PU. Różnice te wynikać mogą między innymi z parametrów prowadzonego procesu, np.: zastosowania różnych rozpuszczalników i różnej lepkości roztworów PLLA i PU. Dzięki zastosowaniu metody rozdmuchu polimeru (SBS) uzyskano nanowłókna, które ułożone były względem siebie głównie równolegle. Natywna tkanka serca charakteryzuje się określonym modułem sprężystości, który jest specyficzny dla danego organizmu i jego wieku (np. dla noworodka szczura wynosi on od 4 do 11,4 kPa, podczas gdy dla dorosłych ludzi wynosi od 10-20 kPa (początek rozkurczu) do 200-500 kPa (koniec rozkurczu)). Ze względu na te właściwości, dopasowanie elastyczności mikrośrodowiska *in vitro* ma istotny wpływ na fenotyp i właściwości komórek serca. Dzięki zastosowaniu metody SBS, uzyskano wartości modułu sprężystości zbliżone do wartości modułu sprężystości natywnej tkanki serca. W związku z powyższym, zakładałam że testowane nanowłókna zwiększą proliferację badanych komórek.

W badaniach zastosowano trzy linie komórek sercowych, różniących się wiekiem i pochodzeniem: szczurze kardiomioblasty (H9C2), ludzkie kardiomiocyty (HCM) i szczurze kardiomiocyty (RCM). **Mimo tego, iż w literaturze prezentowanych jest coraz więcej prac poświęconych analizie biologicznych właściwości nanowłókien, według mojej wiedzy niewiele jest doniesień dotyczących oceny wzrostu kardiomiocytów na nanowłóknach wykonanych metodą rozdmuchu polimeru (SBS).** W ramach prowadzonych badań zaobserwowałam, że wszystkie typy badanych komórek hodowanych na nanowłóknach mają morfologię bardziej wydłużoną niż komórki rosnące na płycie z polistyrenu (PS) (zastosowanym jako materiał kontrolny stosowany w standardowych metodach hodowli). Szczególnie widoczne było to w przypadku kardiomiocytów szczurzych (RCM), których morfologia była silnie zmieniona w porównaniu do komórek rosnących na powierzchni polistyrenu. Wyniki 7-dniowej hodowli potwierdziły, że na proliferację komórek wpływały: typ komórek oraz rodzaj nanowłókien. Szczurze kardiomioblasty (H9C2) rosły najlepiej na nanowłóknach z zastosowanego poliuretanu (PU), następnie na nanowłóknach z poli(L-laktydu) (PLLA) i na powierzchni polistyrenu (PS). Z kolei ludzkie kardiomiocyty (HCM) proliferowały najlepiej na nanowłóknach PLLA, podczas gdy nanowłókna PU nie zwiększały proliferacji badanych komórek. W przypadku szczurzych kardiomiocytów (RCM), nie zaobserwowano istotnego wzrostu proliferacji komórek na badanych nanomateriałach.

W celu zwiększenia adhezji komórek oraz uzyskania podobieństwa do ECM powierzchnie nanowłókien PU i PLLA modyfikowano różnymi białkami: fibronektyną, kolagenem,

żelatyną, lamininą i poli-L-lizyną (**Rysunek 11**). Pozwoliło to na uzyskanie w 7-mym dniu hodowli wysokiej proliferacji komórek H9C2 na nanowłóknach PU modyfikowanych fibronektyną i lamininą. Komórki HCM najlepiej proliferowały na nanowłóknach PLLA pokrytych fibronektyną, liminą oraz kolagenem. W przypadku komórek RCM, modyfikacje powierzchni nanowłókien białkami nie powodowały znaczących zmian w ich proliferacji. Potwierdza to, że w zależności od typu oraz pochodzenia komórek mięśnia sercowego uzyskiwana jest różna proliferacja i kierunkowanie komórek na nanowłóknach.



Rysunek 11 Proliferacja i wzrost komórek (A) H9C2, (B) HCM i (C) RCM na różnych materiałach w 7-dniu hodowli, na niemodyfikowanych i modyfikowanych: PS, nanowłóknach PLLA i PU [H11].

Badania przeprowadzone na nanowłóknach wykonanych metodą SBS potwierdzają, że mogą być one odpowiednim materiałem do uzyskiwania modeli hodowli komórek stosowanych do analizy funkcji komórek serca. Przede wszystkim nanowłókna są cennym materiałem

w kontekście badania komórek mięśniowych ze względu na ich właściwości: zwiększony stosunek powierzchni do objętości (SAV), naśladowanie ukierunkowanego wzrostu komórek. Wykazano, że typ nanowłókien oraz sposób modyfikacji z zastosowaniem białek ma ważne znaczenie w proliferacji i orientacji komórek sercowych. Zaprezentowane badania stały się podstawą do opracowania mikroprzepływowego, zaawansowanego modelu hodowli komórek mięśnia sercowego [15]. Ważne podkreślenia jest to, że zastosowanie nanowłókien zarówno w makro- jak i mikroskali może być obiecującą metodą do oceny wpływu różnych leków kardiologicznych.

Zarówno w literaturze naukowej jak również w wielu ośrodkach badawczych firm farmaceutycznych i kosmetycznych uznaje się, że systemy typu *Organ-on-a-chip* posiadają ogromny potencjał w kontekście badania skuteczności i bezpieczeństwa leków, związków chemicznych czy kosmetyków oraz w kontekście zastosowania w medycynie regeneracyjnej. **Proponowane przeze mnie badania nad opracowaniem systemu *Heart-on-a-chip* z powodzeniem wpisują się w ten trend.** W swoich badaniach oceniałam w mikroskali różne czynniki pozwalające na naśladowanie, symulację mikrośrodowiska tkanki serca. **Zastosowanie jednego z proponowanych rozwiązań: dynamicznej hodowli 2D w mikrosystemach, hodowli w hydrożelu w mikrosystemach czy hodowli na nanowłóknach pozwala na uzyskanie bardziej zaawansowanych modeli *in vitro* niż standardowe hodowle komórkowe.** Przedstawione powyżej wyniki świadczą o tym, że zaproponowane przeze mnie modele komórek *in vitro* z powodzeniem mogą zostać zastosowane do analizy i modelowania wzrostu komórek mięśnia sercowego [H9-H11]. Zastosowanie systemów typu *Heart-on-a-chip* jest dobrym rozwiązaniem do szczegółowego badania różnego typu komórek oraz czynników naśladujących tkankę serca. **Uzyskane w ramach moich prac badawczych wyniki stanowią podstawę do opracowania systemów typu *Heart-on-a-chip* stosowanych do analizy jakościowej i ilościowej wzrostu komórek oraz badania oddziaływania na nie czynników zewnętrznych, cytotoksyczności różnych związków, symulacji niedotlenienia komórek czy analizy regeneracji komórek serca z zastosowaniem komórek macierzystych.**

¹⁵ Tomecka E., Wojasinski M., Jastrzebska E., Chudy M., Ciach T., Brzozka Z. *Nanofiber mats fabricated by solution blow spinning as potential substrates for cardiac cell culture*, 5th Global Chemistry Congress, L, 04-06.09.2017 – WYKŁAD ZAPROSZONY

Podsumowanie

Miniaturowe systemy *Lab-on-a-chip* stanowią innowacyjne narzędzia, które mogą być stosowane do analizy i hodowli komórek różnego typu. Rosnące zainteresowanie takimi rozwiązaniami wynika z możliwości miniaturyzacji badań, a co za tym idzie redukcji materiałów, reagentów i kosztów prowadzenia eksperymentów. Niemniej jednak najważniejszym parametrem wyróżniającym systemy *Lab-on-a-chip* jest możliwość uzyskiwania w nich warunków bardziej zbliżonych do *in vivo* niż w standardowych hodowlach komórek w makroskali. Mikrosystemy stanowią nie tylko zautomatyzowane platformy do oceny cytotoksyczności związków, ale również do modelowania oddziaływań międzykomórkowych i naśladowania funkcji różnych tkanek. Dzięki takiemu rozwiązaniu możliwe jest poznawanie funkcji komórek w innych warunkach niż dotychczas stosowane w standardowych laboratoriach.

W niniejszym opracowaniu przedstawiłam syntetyczne omówienie wybranych wyników prac własnych, które wchodzi w skład jednotematycznego cyklu publikacji: **„Badanie funkcji komórkowych z zastosowaniem nowych systemów *Lab-on-a-chip* oraz zaawansowanych modeli hodowli komórek *in vitro*”**. Prace te były wynikiem zapotrzebowania na metody badania funkcji komórek oraz oceny cytotoksyczności związków w warunkach bardziej zaawansowanych niż standardowe metody badań *in vitro*, dotychczas prowadzone w laboratoriach biologicznych. Ponadto, prace te prowadzone były w kontekście zasady 3R mówiącej o redukcji i zastępowaniu metodami alternatywnymi badań przeprowadzonych na zwierzętach. Wykorzystanie w tym celu opracowanych przeze mnie zaawansowanych metod hodowli komórkowych w systemach *Lab-on-a-chip* wpisuje się w nurt tej zasady.

W swojej pracy naukowej podjęłam badania związane z dwoma istotnymi zagadnieniami społecznymi tj. choroby nowotworowe oraz choroby układu krążenia. W ramach prac podjęłam próbę opracowania nowych rozwiązań - metod badań *in vitro*, które mogłyby przyczynić się do usprawnienia optymalizacji parametrów leczenia wyżej wymienionych chorób. **Za swoje najważniejsze osiągnięcia uważam:**

- 1) **Opracowanie w mikroskali dwuwymiarowej (2D) hodowli kokultury komórek prawidłowych i nowotworowych jako modelu komórkowego:**
 - **stosowanego do optymalizacji parametrów procedur terapii fotodynamicznej z zastosowaniem komercyjnie dostępnego prekursora fotouczulacza oraz nowosyntezy nanocząstek fotouczulacza,**

- umożliwiającego badanie oddziaływania komórek nowotworowych na prawidłowe, znajdujące się w ich sąsiedztwie w ściśle sprecyzowanych odległościach [H1-H3].
- 2) Opracowanie mikrosystemów do trójwymiarowej (3D) hodowli komórek nowotworowych i prawidłowych, w postaci mono- i kokultury sferoidów, jako modelu:
- naśladującego warunki *in vivo* bardziej niż metody badań dotychczas stosowane w laboratoriach biologicznych,
 - umożliwiającego długoterminowe monitorowanie tego samego sferoidu po przeprowadzeniu procedur terapii fotodynamicznej,
- oraz wykazanie, różnego działania fotouczulaczy na komórki hodowowane w mono- i kokulturze sferoidów [H4-H6].
- 3) Opracowanie systemów *Heart-on-a-chip* do dwuwymiarowej oraz przestrzennej hodowli oraz analizy funkcji komórek serca. Wykazanie, że parametry takie jak warunki dynamiczne, zastosowanie hydrożelu oraz nanowłókien wpływa na proliferację i kierunkowanie wzrostu komórek serca, w zależności od typu komórek [H9-11].

Wyniki badań przedstawionych w ramach niniejszej pracy habilitacyjnej wnoszą istotną wiedzę w rozwój takich dyscyplin naukowych jak biotechnologia czy inżynieria komórkowa. Zaproponowane przeze mnie nowe systemy *Lab-on-a-chip* do hodowli i analizy komórek (zarówno 2D jak i 3D) stanowią alternatywną bądź uzupełniającą metodę hodowli komórek do badań dotychczas prowadzonych w laboratoriach biologicznych. Badanie nowych związków jest metodą długotrwałą oraz wieloetapową, składającą się między innymi z testów *in vitro*, a następnie *in vivo*. Opracowane w niniejszej rozprawie habilitacyjnej mikroprzepływowe modele hodowlane stanowią mogą pomocną metodę badania funkcji komórek pomiędzy tymi dwoma etapami. W opracowanych mikrosystemach warunki wzrostu komórek są zbliżone do *in vivo*, zatem stanowią one nowe, wiarygodne rozwiązania konstrukcyjne i metodyczne do oceny toksyczności wybranych metod terapeutycznych jak również do naśladowania mikrośrodowiska tkanki serca. Dzięki temu prowadzone mogą być badania za pomocą zaawansowanych modeli hodowli komórek *in vitro*, jednocześnie redukujących liczbę badań na zwierzętach (testy *in vivo*).

W moim przekonaniu kierunek badań, związanych z tą tematyką zmierza w celu opracowania zaawansowanych modeli hodowli komórek, umożliwiających naśladowanie funkcji nie tylko pojedynczych organów, ale połączeń wielu narządów w jednym mikrosystemie (tzw. *Body-on-a-chip*), co w połączeniu z analizą materiału biologicznego pobranego od pacjenta umożliwiłoby prowadzenie badań w obszarze zaawansowanej medycyny spersonalizowanej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza badaniami przedstawionymi w jednotematycznym cyklu publikacji przedstawionymi w pkt. 4 obszar moich zainteresowań naukowych dotyczył między innymi badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), materiału najczęściej stosowanego do wytwarzania systemów *Lab-on-a-chip* dedykowanych inżynierii komórkowej. Ze względu na hydrofobowe właściwości PDMS oraz zdolność adsorpcji cząsteczek chemicznych ważne jest opracowywanie metod modyfikacji powierzchni PDMS oraz ocena pod kątem przydatności do hodowli różnego typu komórek i możliwości zastosowania jako materiał konstrukcyjny mikrosystemów. **Badania te prowadziłam w ramach projektu naukowego, którego byłam kierownikiem. Projekt „Badanie wpływu modyfikacji powierzchni poli(dimetylosiloksanu) na jego właściwości fizykochemiczne oraz oddziaływanie z materiałem biologicznym”** (Nr 2013/09/D/ST5/03887) finansowany był z Narodowego Centrum Nauki. W ramach badań opracowałam metody modyfikacji powierzchni poli(dimetylosiloksanu) (PDMS) (m.in. z wykorzystaniem plazmy tlenowej, promieniowania UV, roztworów białek) oraz zbadałam wpływ tych modyfikacji na właściwości fizykochemiczne PDMS oraz jego oddziaływanie z materiałem biologicznym (tj. komórki HMEC-1, HT-29, A549, MRC-5, Balb/c 3T3). Ponadto, wykonałam mikrosystemy o różnej geometrii mikrostruktur, złożone z warstw PDMS poddanych różnym modyfikacjom. Zaproponowane mikrosystemy posłużyć mogą do przeprowadzenia badań podstawowych - analizy przyczepności dowolnego typu komórek do biomateriałów, mających potencjalne zastosowanie w biotechnologii [16,17]. Uzyskane wyniki pozwoliły na poszerzenie podstawowej wiedzy w zakresie chemii materiałów, biologii, mikrotechnologii.

¹⁶ Żuchowska A., Kwiatkowski P., Jastrzębska E., Chudy M., Dybko A., Brzózka Z. (2016) Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly(dimethylsiloxane) surface modified by proteins. *Electrophoresis*, 37, 536-544

¹⁷ Jastrzębska E., Żuchowska A., Flis S., Sokolowska P., Bulka M., Dybko A., Brzózka Z. (2018) *Biological characterization of the modified poly(dimethylsiloxane) surfaces based on cell attachment and toxicity assays*, *Biomicrofluidics*, 12, 044105

W ramach badań niezawartych w jednotematycznym cyklu publikacji wykonałam również eksperymenty dotyczące możliwości symulacji niedotlenienia komórek w mikrosystemach przepływowych oraz różnicowania komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów z wykorzystaniem czynników biochemicznych i pola elektrycznego [18,19]. Wstępnie uzyskane badania wskazują, że w opracowanym mikrosystemie możliwe jest uzyskanie komórek serca, wykazujących w pewnym stopniu niedotlenienie komórek. Ponadto wykazałam, że zastosowanie mikrosystemów przepływowych korzystnie wpływa na zwiększenia poziomu ekspresji specyficznych markerów sercowych np. Troponiny T, α -aktyniny. Po działaniu pola elektrycznego oraz takich czynników jak 5-azacytydyna czy VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego) uzyskałam różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) w kierunku kardiomiocytów szybciej niż w makroskali. Badania te mogą być podstawą do opracowywania narzędzi pozwalających na optymalizację procedur różnicowania komórek macierzystych i wykorzystywania ich w medycynie regeneracyjnej.



¹⁸ Kobuszewska A., Jastrzębska E., Chudy M., Dybko A., Brzózka Z. (2017) *Cell model of myocardial hypoxia in lab-on-a-chip system*, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science MicroTAS 2017, 816-817

¹⁹ Jastrzębska E., Sokolowska P., Tomecka E., Kobuszewska A., Zukowski K., Jesion I., Szulc-Dabrowska L., Brzózka Z. (2018) *Analysis of heart regeneration based on heart-on-a-chip system*, Biosensors 2018, Miami, 12–15 .06.2018 – prezentacja ustna