

Recenzja dysertacji doktorskiej magistra inżyniera **Kamila Wierzchowskiego** zatytułowanej  
" **Zastosowanie bioreaktora z mieszaniem typu *wave* do intensyfikacji hodowli komórek**"  
na stopień doktora nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna

### 1. Istotność tematyki podjętej w doktoracie

Recenzowana praca dotyczy ważnego aspektu hodowli komórkowych. Spośród różnego typu bioreaktorów: enzymatyczne, mikrobiologiczne, do hodowli komórek, te ostatnie są najmniej rozpoznane, najmniej powszechne, a problem z ich skalowaniem stanowi największe wyzwanie. Jest to związane m.in. z tym, że zapewnienie jednorodnych warunków (np. w odniesieniu do temperatury, składników pożywki, tlenu) jest utrudnione poprzez niemożność zastosowania popularnego z reaktorach mieszania mechanicznego.

Naprzeciw rozwiązaniu tego problemu, pojawiły się bioreaktory z mieszaniem typu *wave*, których wytwarzaniem zainteresowali się najbardziej znani w świecie bioreaktorów producenci. Mała początkowo skala obecnie sięga 500 litrów, a reaktory poszczególnych producentów różnią się przede wszystkim sposobem wymuszania falowania. Ta różnorodność powoduje, że dla każdego takiego bioreaktora wpływ parametrów mechanicznych na uzyskiwaną jednorodność układu musi zostać zbadany indywidualnie. Jednym z kluczowych parametrów jest natlenienie, z uwagi na fakt ciągłego wykorzystania tlenu oraz na fakt, że jego stężenie na danym poziomie jest czynnikiem determinującym prawidłowy przebieg hodowli komórek.

Przedstawiona do oceny praca dotyczy wyznaczenia zależności pomiędzy parametrami zewnętrznymi a współczynnikiem wnikania tlenu w fazie ciekłej wypełniającej bioreaktor ReadytoProcess WAVE 25 firmy GE Healthcare BioSciences AB. Bioreaktor ten został wykorzystany do hodowli linii komórek ludzkich, mysich i bydłych.

## 2. Formalna ocena manuskryptu

Rozprawa doktorska została oparta przede wszystkim o 5 artykułów z IF opublikowanych w latach 2018-2021, gdzie w czterech z nich Doktorant jest pierwszym autorem, a liczba autorów to w większości trzy (cztery artykuły). Wspomniane artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie wysokiej rangi, zwykle o współczynniku IF większym od 3 (cztery artykuły) i liczbie punktów ministerialnych z zakresu 70-140. Dodatkowo w skład dysertacji wchodzi rozdział w książce wydanej w roku 2022 oraz 4 artykuły opublikowane w czasopiśmie nie posiadających IF z lat 2017-2018.

Do artykułów został dołączony przewodnik liczący 77 stron. Bibliografia liczy 153 pozycji (publikacji anglojęzycznych z ostatniego 20-lecia). Przewodnik zredagowany jest w 6 głównych częściach, w sposób klasyczny dla prac naukowych. Rozdział 1 to wstęp do pracy, z którego wynika cel i zakres pracy i postawione tezy naukowe przedstawione w rozdziale 2. W kolejności, w rozdziale 3 dokonano przeglądu literatury poruszającej problem będący przedmiotem badań Doktoranta. Część teoretyczna nie jest zbyt obszerna, zrealizowana na 18 stronach i zawiera niezbędne informacje wprowadzające w sposób zwięzły czytelnika w tematykę pracy i zakończona jest podsumowaniem aktualnego stanu wiedzy. Część badawczo-obliczeniowa zawarta została w dwóch rozdziałach, przy czym każdy z nich zawiera osobno podrozdział materiały i metody oraz wyniki i dyskusja. Cel badawczy Doktorant podzielił na opis wnikania tlenu w testowanym bioreaktorze oraz na wskazanie zastosowania tego bioreaktora w hodowlach komórek ssaczych. Rozdział 6, zwięźle napisany, zawiera podsumowanie i wnioski końcowe. Pozostałe rozdziały pracy to: streszczenia w języku polskim i angielskim, spis symboli i skrótów, bibliografia oraz spisy rysunków i tabel.

Całość przewodnika jest bardzo czytelna, intuicyjna i nie zawiera zbędnych treści.

## 3. Ocena merytoryczna

Recenzowana praca dotyczy wykorzystania bioreaktora typu *wave* do hodowli komórek ssaczych, ze szczególnym uwzględnieniem i opisem matematycznym parametrów wpływających na natlenienie medium hodowlanego.

W pierwszej części badań (opisanych w rozdziale 4 przewodnika oraz artykule 1) Doktorant podjął się wyznaczenia zależności pomiędzy parametrami zewnętrznymi a wartością

współczynnika wnikania tlenu po stronie cieczy w posiadanym bioreaktorze typu *wave* firmy GE Healthcare BioSciences AB. Do wyznaczenia wartości współczynnika Doktorant, po analizie literatury, wybrał metodę *gassing-out*. Podczas publicznej obrony proszę Doktoranta o szersze uzasadnienie wyboru dokładnie tej metody, która jest najprostszą metodą pomiarową. Przy obliczaniu współczynnika Doktorant posłużył się znanym w inżynierii chemicznej równaniem (równ. (1), str. 49). Proszę o informację w jaki sposób pozyskano wartość stężenia tlenu w fazie ciekłej przy powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz. Czy takie przyjęte założenia będą zawsze poprawne, niezależnie od rodzaju polimeru i grubości ścianek polimerowego zbiornika worka stanowiącego bioreaktor? Wyznaczając wartości współczynnika wnikania tlenu w funkcji wielu zmiennych (Rys. 7, str. 53) wskazano brak wpływu objętości cieczy w naczyniu. Czy jest to poprawne, jeżeli w pewnym zakresie wartość współczynnika wnikania tlenu zwiększa się o 50%?

Badania wpływu glicerolu w pożywce wskazały, że od jego zawartości zależy lepkość roztworu, co jest oczywiste. Niemniej jednak bardziej niż lepkość roztworu, na wartość współczynnika wnikania tlenu wpływa rodzaj medium. Jak można wyjaśnić, że np. przy lepkości 1,8-2,0 [Pa·s] wartość współczynnika w wodzie wynosi ponad 0,002 [1/s], zaś w pożywkach wartość ta jest 2-3 razy niższa?

W drugiej części dysertacji (opisane w rozdziale 5 przewodnika) przeprowadzono badania nad zastosowaniem bioreaktora typu *wave* firmy GE Healthcare BioSciences AB do hodowli linii komórek ssaczy. W celu określenia wpływu warunków mieszania w bioreaktorze WAVE 25 wykorzystano biomasę ciągłej linii ludzkich limfocytów promielocytowanej białaczki (badania opisane także w artykule 2 stanowiącym element rozprawy doktorskiej) oraz linię progenitorowych komórek chrząstki bydła.

Pomimo badania bardzo szerokiego zakresu parametrów (Tabela 9) wpływających m.in. na wartość liczby Reynoldsa w medium, zarówno szybkość wzrostu komórek, jak i wartości współczynnika wzrostu komórek na jednostkę masy zużytej glukozy nie przyjmują bardzo zróżnicowanych wartości (mniej niż dwa razy). Czy zatem nie należało przetestować warunki odpowiadające niższym wartościom liczby Reynoldsa?

W kolejnym etapie badań zbadano aplikacyjność bioreaktora WAVE 25 do intensyfikacji hodowli ciągłej linii mysich fibroblastów, które wymagają adhezji do stałej powierzchni jako czynnika warunkującego prawidłową proliferację. Wykorzystano trzy różne mikronośniki w hodowli prowadzonej w naczyniach hodowlanych umieszczonych na kotysce, jak i dla wybranego mikronośnika w bioreaktorze WAVE 25. Wyniki badań opisano szczegółowo w artykule 5 wskazując na optymalne warunki panujące w tymże bioreaktorze.

Badania nad aplikacyjnością testowanego bioreaktora oraz wykorzystanie wyznaczonych w pierwszej części doktoratu zależności współczynnika wnikania tlenu wypadło pozytywnie. Niemniej należy się liczyć z ograniczeniami wyznaczonych zależności. Stąd proszę by Doktorant podczas publicznej obrony omówił te granice, poza którymi badania przeprowadzone w doktoracie nie będą miały już bezpośredniego przedłożenia.

Analizując całość uzyskanych i opisanych osiągnięć Doktoranta, można zauważyć logicznie przeprowadzoną sekwencję badań prowadzących konsekwentnie do otrzymania wyczerpujących odpowiedzi na założenia badawcze pracy.

Przeprowadzone badania i analiza otrzymanych wyników pozwoliła Doktorantowi na sformułowanie 6 osiągnięć naukowych, które korelują z postawionymi na wstępie pracy celami badawczymi.

1. Zidentyfikowano wpływ parametrów operacyjnych bioreaktora WAVE 25 na wartości współczynnika wnikania tlenu.
2. Opracowano bezwymiarową korelację opartą na liczbach kryterialnych pozwalającą na przewidywanie wartości współczynnika wnikania tlenu.
3. Określono wpływ lepkości fazy wodnej na współczynnik wnikania tlenu.
4. Określono wpływ dodatku ciekłego perfluorowanego nośnika tlenu na wartości współczynnika wnikania tlenu.
5. Zwalidowano aplikacyjność bioreaktora WAVE 25 do intensyfikacji propagacji komórek ssaczych (nieadherentnych limfocytów HL-60, adherentnych fibroblastów L929, chondrocytów CP5).
6. Określono wpływ warunków mieszania w bioreaktorze WAVE 25 na proliferację i aktywność metaboliczną komórek ssaczych (limfocytów HL-60, chondrocytów CP5) z wykorzystaniem ziaren mikronośnika Cytodex 3.

Badania zostały zaprojektowane i przeprowadzone w sposób właściwy.

#### **4. Uwagi typu edytorskiego**

Doktorant dokonał bardzo starannej korekty językowej i edytorskiej przewodnika stanowiącego wraz z artykułami podstawę pracy doktorskiej. Przewodnik napisany jest bardzo ład-

nym, naukowym językiem. Całość napisana jest w formie bezosobowej. Wszystkie tabele, rysunki są czytelne i podpisane w sposób właściwy. Wszystkie podawane wartości zawierają właściwe jednostki. Spis oznaczeń i symboli zestawiono na końcu przewodnika, co ułatwia czytelnikowi śledzenie opisu badań i obliczeń.

W pracy występują drobne nieścisłości np. równanie (1) na stronie 49 nazwane zostało zależnością opisującą bilans tlenu, zamiast zależnością na szybkość wnikania tlenu.

Wszystkie artykuły wchodzące w skład dysertacji przeszły recenzję z wydawnictwa i korektę przed publikacją, stąd też ich edycja nie budzi żadnych wątpliwości.

## 5. Ocena końcowa

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest spójnym dziełem złożonym z przewodnika i artykułów naukowych. Porusza ważne zagadnienie z obszaru inżynierii bioprocessowej. Jako recenzent całość osiągnięcia naukowego oceniam bardzo wysoko, ponad przeciętnie, stąd wnioskuję także o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Na wyróżnienie zasługuje także całość aktywności naukowej Doktoranta. Pan Kamil Wierzchowski uczestniczył w realizacji grantów, uzyskał finansowanie na realizację pracy doktorskiej w ramach konkursu Preludium 20, odznacza się bardzo wysoką aktywnością konferencyjną. Jest współautorem w wielu publikacjach nie wchodzących bezpośrednio w pracę doktorską oraz w patencie i zgłoszeniu patentowym.

**Reasumując stwierdzam, że Doktorant wykazał się umiejętnością w zaplanowaniu oraz wnikliwością w przeprowadzeniu i poddaniu poprawnej analizie badań z zakresu inżynierii chemicznej.**

**W mojej ocenie spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)”**

**Stawiam zatem wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pana Kamila Wierzchowskiego do publicznej obrony swojej dysertacji. Dodatkowo stawiam wniosek o wyróżnienie pracy.**

