

Instytut Informatyki

Politechniki Śląskiej

## Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: Mgr Anna Samluk

Tytuł: Modyfikacje genetyczne komórek linii wątrobiaka dla potrzeb biosztucznej wątroby

Genetic modifications of hepatoma cells for bioartificial liver

Promotor: Prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska

### **Charakterystyka rozprawy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze 186 stron tekstu, obejmuje streszczenie po polsku oraz po angielsku, tabelę stosowanych skrótów, 7 rozdziałów, listę publikacji doktorantki, a także obszerną bibliografię składającą się z 215 pozycji i spis źródeł internetowych.

Praca ma charakter eksperymentalny. Jest poświęcona rozwijaniu technik modyfikacji genetycznych linii komórkowych wywodzących się z nowotworów wątroby, tak aby zmodyfikowane genetycznie komórki uzyskały lub odzyskały funkcje fizjologiczne związane głównie z metabolizmem amoniaku. Dla uzyskania modyfikacji genetycznych wykorzystywane są wektory lentiwirusowe.

Wyprowadzone nowe linie zmodyfikowanych genetycznie komórek mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie dla rozwijania biosztucznych systemów wspomagających pracę wątroby. Stanowią one także interesujący przedmiot badań naukowych dotyczących technik i efektów transdukcji wektorami lentiwirusowymi linii komórkowych.

W świetle powyższych uwag wybór tematyki rozprawy należy uznać za bardzo interesujący.

Praca rozpoczyna się długim rozdziałem wstępnym poświęconym organowi ciała ludzkiego, który jest obiektem zainteresowania, tzn. wątrobie. anatomii i funkcjom wątroby,

a także zmianom patologicznym wątroby oraz systemom ich terapii. Wśród metod leczenia i wspomagania funkcji wątroby wymienia i opisuje sztuczne oraz biosztuczne systemy wspomagające wątrobę. Te ostatnie stanowią ważne odniesienie do badań prowadzonych w ramach pracy, dlatego że do ich funkcjonowania konieczne są linie żywych komórek wątrobowych. W ich aspekcie omówiona jest linia ludzkiego wątrobiaka C3A, który potencjalnie mógłby źródłem komórek dla biosztucznych systemów wspomagających wątrobę.

W kolejnym rozdziale przedstawione są cele i tezy pracy. Praca zawiera trzy oryginalne tezy badawcze dotyczące przebadanych konsekwencji wprowadzenia, z użyciem wektorów lentiwirusowych, modyfikacji genetycznych do linii komórkowej ludzkiego wątrobiaka. Pierwsze dwie tezy dotyczą, kolejno, ekspresji specyficznych cech wątrobowych w transdukowanych komórkach oraz możliwości przywrócenia utraconych funkcji fizjologicznych związanych z metabolizmem amoniaku. Trzecia teza dotyczy ogólnie rozumianych zastosowań naukowych i praktycznych uzyskanych modyfikacji genetycznych.

W rozdziale trzecim wymienione są stosowane w eksperymentach materiały. Obejmują one szczepy bakteryjne, DNA, linie komórkowe, podłoża, roztwory, bufory, odczynniki, stosowane antybiotyki, białka i enzymy. Wymienia się także sekwencje starterów, a także wykorzystywane w przygotowaniu eksperymentów i analizie danych oprogramowanie.

Rozdziały czwarty i piąty są zasadniczymi rozdziałami w pracy. Rozdział czwarty, metody, przedstawia wszystkie przeprowadzone eksperymenty, a rozdział piąty, wyniki tych eksperymentów. Zakres prac eksperymentalnych był bardzo szeroki. Obejmował, między innymi przygotowanie i prowadzenie hodowli bakteryjnych, izolacje plazmidowego DNA bakterii oraz ludzkiego, genomowego DNA linii komórkowych, prowadzenie linii C3A oraz fibroblastów, namnażanie plazmidowego DNA oraz wektorów lentowirusowych, transdukcje, klonowanie cDNA.

Przedstawione wyniki obejmują ocenę wydajności przeprowadzonych procesów transdukcji linii komórkowych ludzkiego wątrobiaka C3A, badanie możliwego cytotoksycznego efektu białek fluorescencyjnych, ocenę jakości uzyskanych plazmidów i wektorów, analizy wyników przeprowadzonych badań sekwencjonowania DNA, oceny wydajności procesów transdukcji komórek C3A, porównania produkcji białek w komórkach C3A, oceny żywotności komórek, wpływ stężenia chlorku amonu na morfologię i fizjologię komórek C3A, badanie aktywności metabolicznej komórek.

Wyniki przeprowadzonych prac potwierdzają słuszność postawionych w pracy tez badawczych.

Rozdział szósty jest dyskusją uzyskanych wyników. Autorka dyskutuje oryginalność przeprowadzonych prac w aspekcie źródeł literaturowych. Omawia kilka publikacji o tematyce zbliżonej do tematyki przeprowadzonych badań oraz koncentruje się na różnicach

w metodach i wynikach pomiędzy tymi pracami oraz swoimi badaniami. Ocenia skuteczność transfekowania linii C3A i HSF preparatami wirusowymi i dyskutuje różnice pomiędzy skutecznością dla różnych preparatów lentiwirusowych. Wreszcie dyskutuje różne dalsze potencjalne możliwości rozszerzania przeprowadzonych badań oraz możliwości ich różnych zastosowań.

### **Ocena rozprawy, najważniejsze osiągnięcia i elementy oryginalne rozprawy**

Na bazie przedstawionej powyżej charakterystyki najważniejszych elementów rozprawy stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa stanowi oryginalne dzieło naukowe. Tezy rozprawy są oryginalne i zostały wykazane na bazie szeroko zaplanowanych i bardzo starannie przeprowadzonych i udokumentowanych badań eksperymentalnych.

Przeprowadzone badania wnoszą nową wiedzę w zakresie metod transfekowania linii komórkowych ludzkiego wątrobiaka różnymi preparatami lentiwirusowymi, skuteczności procesów transfekowania, własności transgenicznych komórek.

Potwierdzeniem rangi naukowej przeprowadzonych prac jest lista oryginalnych publikacji naukowych, których współautorką jest doktorantka, obejmująca 6 prac w renomowanych czasopismach naukowych, w których doktorantka jest trzy razy pierwszym autorem, oraz liczne doniesienia konferencyjne.

Należy także zwrócić uwagę na staranność edycji pracy oraz na systematyczny i staranny system udokumentowania przeprowadzonych badań eksperymentalnych.

### **Uwagi krytyczne i dyskusyjne**

Podstawową, wielokrotnie stosowaną metodą analizy wyników eksperymentów była jedno lub wieloczynnikowa statystyczna analiza wariancji (ANOVA). Do analiz post hoc autorka zawsze stosuje test Duncana.

Pewne wątpliwości budzi kompletność a czasem sposób opisu prowadzenia testów statystycznych ANOVA. We wszystkich przeprowadzonych testach brak jest udokumentowania p-wartości samego testu ANOVA. Podawane są tylko, w postaci graficznej notacji „gwiazdkowej”, wyniki testów post hoc. Z praktycznego punktu widzenia taki system dokumentacji można najprawdopodobniej uznać za wystarczający.

Jednak dokumentowanie samego kroku analiz post-hoc budzi już pewne wątpliwości także od strony ich praktycznego zastosowania. W wieloczynnikowej analizie wariancji testy post-hoc obejmują analizy efektów głównych oraz efektów interakcji czynników. Przy analizie dwuczynnikowej są to trzy typy efektów. Przy planowaniu testów (wykonywanych w środowisku „Statistica”) autorka musiała podejmować decyzje o rodzaju analiz post hoc.

Jednak podjęte decyzje nie są nigdzie przedstawione. Nie wiadomo czym kierowano się przy podejmowaniu tych decyzji.

Na przykład na ryc. 34 przedstawiono graficznie wyniki analiz post-hoc testu dwuczynnikowego ANOVA, gdzie pierwszym czynnikiem jest stężenie chlorku amonu, a drugim czynnikiem jest różnica pomiędzy kontrolą a komórkami poddanymi trzykrotnej transdukcji. Jak widać udokumentowano jedynie efekty głównej różnicy pomiędzy kontrolą a komórkami poddanymi trzykrotnej transdukcji. Z rysunku widać jednak, że występuje także statystycznie znamienne drugi efekt główny (różnice pomiędzy różnymi stężeniami), a także, najprawdopodobniej efekt interakcji. Powinno się to dokładniej przedyskutować.

Podobne zastrzeżenia można sformułować także dla innych analiz, np. dla wyników przedstawionych na ryc. 36.

### **Konkluzja**

Mimo uwag krytycznych, osiągnięcia i oryginalne elementy rozprawy są na pewno wystarczające do jej ogólnej bardzo pozytywnej oceny. Stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki odpowiedniej Ustawy i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę oryginalność naukową pracy, a także poważny dorobek naukowy doktorantki powinno się w mojej opinii rozważyć przyznanie rozprawie wyróżnienia. W przypadku jeśli Komisja Doktorska będzie taką propozycję rozważała będę ją popierał. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że praca ma charakter prawie czysto eksperymentalny, a ja koncentrowałem się raczej na jej stronie biostatystycznej, nie czuję się kompetentny aby wystąpić w mojej recenzji z formalnym wnioskiem o wyróżnienie.

