



Dr hab. Beata Burzyńska

Warszawa 09-02-2017

Zakład Genetyki

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

tel: 22-592-12-14, e-mail: [atka@ibb.waw.pl](mailto:atka@ibb.waw.pl)

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Anny Samluk pt.: „**Modyfikacje genetyczne komórek linii wątrobiaka dla potrzeb biosztucznej wątroby**”

Zdrowa wątroba jest kluczowym narządem odpowiedzialnym za prawidłowy przebieg wielu funkcji życiowych, w tym za detoksykację organizmu. Ciężka niewydolność wątroby jest chorobą obciążoną wysoką śmiertelnością. Obecnie jedynym efektywnym sposobem leczenia niewydolności wątroby jest ortotopowy przeszczep tego narządu. Z powodu ograniczonej liczby dostępnych organów do przeszczepu, jest bardzo istotne opracowanie alternatywnych dróg czasowego zastąpienia funkcji wątroby do momentu znalezienia odpowiedniego dawcy bądź, dopóki wątroba nie zostanie naturalnie zregenerowana i nie odzyska swoich fizjologicznych funkcji. Jednym z systemów biologicznego wspomaganie wątroby jest bio-sztuczny system wspomagający (ang. *Bioartificial Liver Support*, BAL), którego naczelnym zadaniem jest zastąpienie funkcji metabolicznych niewydolnej wątroby. Hepatocyty pierwotne są preferowanym źródłem komórek do wspomaganie zewnątrzustrojowego, ale ich dostępność jest ograniczona. Poza tym charakteryzują się słabą zdolnością do namnażania a także szybko tracą swoje funkcje w warunkach *in vitro*. Dlatego też wiele Zespołów badawczych pracuje nad liniami komórkowymi, które mogłyby zastąpić

ludzkie hepatocyty. Oprócz komórek hepatoblastoma HepG2 badane są również komórki C3A, które pierwotnie uzyskano jako subklon komórek HepG2. Komórki C3A charakteryzują się większą zdolnością do proliferacji i niższym stopniem zróżnicowania w warunkach hodowli *in vitro*, niż hepatocyty pierwotne. Jednakże, komórki C3A mają obniżoną aktywność metaboliczną, przede wszystkim syntetyzują śladowe ilości albuminy oraz wykazują bardzo obniżony poziom metabolizmu amoniaku. Uważa się, że bardzo niska ekspresja genów: arginazy 1 (hARG1) oraz karbamoilotransferazy ornitynowej (hOTC) jest odpowiedzialna za zaburzenia w cyklu mocznikowym.

Praca eksperymentalna mgr Anny Samluk została wykonana w Pracowni Inżynierii Tkankowej, Zakładu Mikrobiosystemów Hybrydowych i Analitycznych, która to od wielu lat zajmuje się badaniami nad biosztuczną wątrobą. Celem Doktorantki było skonstruowanie zmodyfikowanych genetycznie komórek ludzkiego wątrobiaka C3A z usprawnioną funkcją detoksykacji amoniaku oraz przeprowadzenie analizy funkcjonalnej i morfologicznej otrzymanych linii komórkowych. Wykorzystując własne wektory lentiwirusowe Doktorantka skonstruowała trzy linie komórek C3A zawierające dodatkowe kopie ludzkich genów *ARG1* i *OTC*: linię C3A\_ARG1\_I-III, linię C3A\_OTC\_I-III oraz linię C3A\_ARG1\_OTC\_I-III posiadającą kopie obu ludzkich genów (*ARG1* i *OTC*). Ocena cytometryczna i fluorescencyjna utworzonych linii wykazała, że linia C3A\_ARG1\_OTC\_I-III charakteryzuje się wyższą wydajnością transdukcji i linia ta została użyta w dalszych badaniach. Przeprowadzone przez Doktorantkę analizy dowiodły, że otrzymana zmodyfikowana genetycznie linia charakteryzuje się taką samą żywotnością co linia wyjściowa C3A. Badania poziomu białek w transdukowanej linii wykazały zwiększony poziom ekspresji białek ARG1 i OTC, ale i również zwiększoną produkcję albuminy w stosunku do linii wyjściowej. Bardzo istotne były badania metabolizmu i morfologii skonstruowanych linii komórkowych. Doktorantka udowodniła, że utworzone przez nią linie charakteryzują się podwyższonym metabolizmem oraz że traktowanie chlorkiem amoniaku nie ma wpływu na morfologię komórek, natomiast indukuje ekspresję genu kodującego albuminę. Bardzo ważnym wynikiem, z punktu potencjalnego znaczenia aplikacyjnego przeprowadzonych badań jest uzyskanie aż o ponad 80% większej produkcji mocznika w porównaniu z niemodyfikowanymi komórkami C3A.

Rozprawa doktorska liczy 186 stron i ma typowy układ dla rozpraw na stopień doktora. Zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz 9 rozdziałów. We Wstępie Doktorantka omawia budowę i funkcje wątroby, procesy patofizjologiczne dotyczące tego narządu oraz istniejące systemy wspomagające, wykorzystywane w leczeniu wątroby. Ponadto, we wstępie znajduje się charakterystyka komórek mogących zastąpić ludzkie hepatocyty; szczególną uwagę



Autorka skupia na linii C3A, która została wykorzystana w badaniach. Wstęp w interesujący sposób wprowadza w tematykę związaną z patofizjologią chorób wątroby oraz w aktualne kierunki badań. W kolejnym rozdziale Cele i tezy badawcze, Autorka w trochę nietypowy sposób, przedstawia główny cel, który przyświecał jej badaniom oraz stawia trzy tezy badawcze, które weryfikowała w trakcie swoich eksperymentów. W rozdziałach Materiał i następnie Metody, Doktorantka szczegółowo opisuje procedury wykorzystane w trakcie badań. Rozdziały te świadczą, że Autorka swobodnie posługuje się różnorodnymi metodami i technikami molekularnymi takimi jak transformacja i transdukcja, izolacja DNA, konstrukcja wektorów, klonowanie, Western Blot, cytometria przepływowa, metody hodowli komórek i linii komórkowych oraz techniki mikroskopowe. Metodyka jest bardzo starannie napisana, co zapewne umożliwi powtórzenie zastosowanych metod.

Drobne uwagi:

- Na tle starannego opisu metod razi lakoniczność opisu zastosowanych metod statystycznych (Rozdział 4.2.8). W bardzo krótkim rozdziale zostały wymienione testy statystyczne, którymi Autorka posługiwała się w opracowaniu wyników. Być może należałoby wyszczególnić do jakich analiz zostały one wykorzystane.

- Nie potrzebne jest utworzenie bardzo krótkich osobnych podrozdziałów, w których opisywany jest sposób przechowywania preparatów

- Spis użytych starterów powinien zostać umieszczony w osobnej tabeli, z zaznaczeniem do jakiego celu zostały wykorzystane. Część starterów opisana jest w tekście a część w tabeli.

Rozdział Wyniki opisuje rezultaty starannie przeprowadzonych eksperymentów, poczynając od konstrukcji wektorów a kończąc na badaniach morfologicznych i funkcjonalnych utworzonych przez Autorkę linii. Na szczególne uznanie zasługują zdjęcia z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego, na których zostały pokazane modyfikowane komórki i oceniona wydajność transdukcji poszczególnymi konstruktami oraz zdjęcia z mikroskopu świetlnego pokazujące różnice morfologiczne w komórkach zmodyfikowanych.

Zastrzeżenie budzi sposób napisania tego rozdziału. Autorka niepotrzebnie powtarza opisy zamieszczone już w Metodach, tym bardziej że powołuje się na konkretne metody już opisane w poprzednim rozdziale. I tak np. w rozdziale 5.2.6, przedstawiono jak było izolowane plazmidowe DNA i na jakim aparacie było mierzone jego stężenie. Na pewno nie jest to wynik przeprowadzonego eksperymentu.

Dyskusja jest poprowadzona wnikliwie i świadczy o dogłębnej znajomości podjętego tematu. Autorka prawidłowo dyskutuje otrzymane wyniki w kontekście danych literaturowych. Rozdział Podsumowanie i wnioski zawiera oprócz 10 podsumowujących konkluzji wynikających z przeprowadzonych badań, także wskazania co do dalszych prac związanych z tematem.

Chociaż praca zredagowana jest bardzo staranie, nie brakuje w niej fragmentów zawierających literówki. Na przykład w bardzo krótkim rozdziale 4.27.2.1 jest kilka błędów literowych. Moim zdaniem, nie umniejsza to wartość ocenianej pracy.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca stanowi istotny wkład w badania nad utworzeniem stabilnych genetycznie linii komórek ludzkiego wątrobiaka C3A, u których została zaktywowana aktywność szlaków metabolicznych związanych z detoksykacją amoniaku. Z merytorycznego punktu widzenia oceniam pracę bardzo wysoko. Badania wykonane przez Doktorantkę są bardzo wartościowe i mają ogromny potencjał aplikacyjny.

Stwierdzam, zatem, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym i przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Samluk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej oraz ze względu na opublikowanie wyników zawartych w rozprawie w dobrych czasopiśmie, wnoszę o jej wyróżnienie.

*B. Bury*