Politechnika Wrocławska

Prof. dr hab. Marta Kopaczyńska
Katedra Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wrocławska
50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27
tel.71-370-4617
marta.kopaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 04.09.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej

Biofunkcjonalizowany bioreaktor kapilarny wykorzystujący nową linię proliferujących komórek hepatocytarnych pochodzenia ludzkiego jako model biosztucznej wątroby

Biofunctionalization of capillary bioreactor with the use of human Hepatocyte-derived proliferating cells as a model of bioartificial liver

Autor rozprawy doktorskiej: mgr Monika Joanna Wiśniewska

Promotor: Prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska
Promotor pomocniczy: Dr Krzysztof Pluta

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Dyrektora Instytutu prof. dr hab. inż. Piotra Ładyżyńskiego, wyrażoną w piśmie SN.431.5.4.2025 z dnia 29 czerwca 2026 roku. Przewód doktorski jest prowadzony przez Radę Naukową Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Podstawa prawna recenzji rozprawy doktorskiej mgr Moniki Wiśniewskiej pt. „ *Biofunkcjonalizowany bioreaktor kapilarny wykorzystujący nową linię proliferujących komórek hepatocytarnych pochodzenia ludzkiego jako model biosztucznej wątroby*” jest określona w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) oraz w pkt. 3 „Regulaminu przeprowadzenia postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w IBIB PAN”, w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria biomedyczna.

Tematyka i charakter rozprawy doktorskiej

Choroby wątroby i śmiertelność z nimi związana są dużym wyzwaniem dla metod terapeutycznych, medycyny regeneracyjnej, transplantologii i inżynierii biomedycznej. Wciąż jedyną i skuteczną metodą leczenia pacjentów jest przeszczep wątroby lub jej fragmentu. Niestety głównym

problemem transplantologii, nie tylko w Polsce, ale i na świecie, jest niewystarczająca liczba dawców przy ciągle wzrastającej liczbie biorców. Pozostają, więc alternatywne rozwiązania dla przeszczepu niewydolnej wątroby, a współczesne kierunki rozwoju w leczeniu schorzeń wątroby przechodzą rewolucję technologiczną. Uwaga skupiona jest na przejściu od prostych systemów oczyszczania krwi (systemów acellularnych, takich jak MARS) do zaawansowanych systemów biohybrydowych (biosztucznej wątroby – BAL) oraz medycyny i inżynierii regeneracyjnej. Największym przełomem jest odejście od komórek nowotworowych oraz świńskich na rzecz ludzkich hepatocytów pochodzących z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSC oraz CiPS). Komórki te charakteryzują się pełnym profilem metabolicznym oraz wysokim bezpieczeństwem onkologicznym. Równolegle tradycyjne hodowle jednowarstwowe w bioreaktorach zastępuje się trójwymiarowymi organoidami wątrobowymi. Modele 3D znacznie lepiej naśladują naturalną strukturę tkanki i usprawniają klirens toksyn. Wszystkie te innowacje dążą do poprawy przeżywalności komórek i pełnej biointegracji aparatury z organizmem biorcy.

Zastosowanie pozaustrojowych systemów hybrydowych - *biosztucznej wątroby* jest rozwiązaniem czasowym, mogącym stanowić jedynie terapie pomostowe do czasu samoistnej regeneracji utraconych funkcji wątroby lub pozwalające na przeżycie do czasu znalezienia dawcy narządu do przeszczepu.

Doktorantka podjęła próbę zmierzenia się z problemami i ograniczeniami trudnej hodowli hepatocytów dla systemu biosztucznej watroby, poszukać źródeł alternatywnych ludzkich modeli linii komórkowych hepatocytów, wprowadzić optymalizacje w celu ulepszenia hodowli poprzez zwiększenie ich indeksu proliferacyjnego, uzyskanie stabilności genetycznej oraz zwiększenie właściwości metabolicznych w warunkach dynamicznych w modelu bioreaktora typu *hollow fiber*.

Obecnie, aby biosztuczna wątroba mogła przetaczać pełną krew pacjenta bez wywoływania ostrej reakcji odpornościowej jest niezmiernie wymagającym wyzwaniem. Ponadto proces certyfikacji systemów biosztucznej wątroby (BAL) przez amerykańską Agencją Żywności i Leków (FDA) jest niezwykle skomplikowany, ponieważ systemy BAL traktowane są jako produkty medyczne wysokiego ryzyka (klasy III). W świetle tych trudności, Doktorantka podjęła trudne zadanie naukowe.

Struktura oraz zawartość rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Moniki Wiśniewskiej liczy wraz z bibliografią 313 stron. Rozprawa jest napisana w języku angielskim, w postaci tradycyjnej monografii, obejmującej 8 rozdziałów, 100 rysunków, wliczając rysunki z części suplementu oraz 355 pozycji literaturowych. Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

Rozdział 1 jest wprowadzeniem do zagadnień dotyczących budowy, funkcji i chorób wątroby

oraz różnych sposobów leczenia chorób wątroby, w tym technik transplantacyjnych. Regeneracja wątroby, w tym różnicowanie komórek podczas regeneracji wątroby oraz proces częściowego przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT). Opracowanie metod izolacji komórek wątroby, w tym dwuetapowa metoda perfuzji kolagenazą oraz metoda mechanicznej defragmentacji i trawienia enzymatycznego tkanki. Terapie pomostowe zastępujące lub wspomagające czynność wątroby u pacjentów z niewydolnością wątroby, w tym system wspomagania czynności wątroby (LSS) oraz alternatywne terapie pomostowe modelami hepatocytów. Na koniec rozdziału Doktorantka prezentuje linia proliferujących komórek hepatocytów pochodzenia ludzkiego jako potencjalnie nowe źródło komórek wątrobowych, mogących mieć zastosowanie w hybrydowych systemach biosztucznej wątroby. Podrozdział pomostowy pomiędzy 1 a 2 zawiera cel i dwie tezy rozprawy doktorskiej oraz syntetyczny autorski wkład Doktorantki w badania. Rozdział 2 zawiera cel oraz trzy tezy rozprawy doktorskiej.

W rozdziale 3 przedstawiono materiał biologiczny zastosowany w pracy badawczej, w tym linie komórkowe, plazmidy, enzymy, odczynniki chemiczne i przeciwciała stosowane w technikach laboratoryjnych. Wymieniono również wykorzystane przez Doktorantkę techniki laboratoryjne, aparaturę badawczą oraz programy komputerowe użyte do analizy danych oraz statystyki.

Rozdział 4 zawiera szczegółowo opisane metody izolacji i przygotowania preparatów komórkowych oraz zastosowane techniki eksperymentalne. Prezentuje procedury izolacji linii komórkowych, prowadzenie hodowli na różnych podłożach oraz ocenę wpływu modyfikacji i rożnych warunków hodowli na parametry hodowlane oraz funkcjonalne. Osobny podrozdział opisuje zastosowanie autorskiego systemu do hodowli dynamicznej, ze skonstruowanym bioreaktorem typu *hollow fiber*. Rozdział 5 zawiera szczegółową i ilustrowaną dyskusję. Rozdział 6 prezentuje cenne podsumowanie przeprowadzonych badań i ich wyników w aspekcie potencjalnego zastosowania klinicznego. W rozdziale 7 została umieszczona bibliografia. Ponadto umieszczono spis tabel, rysunków oraz najważniejsze osiągnięcia Doktorantki, wraz z jej dorobkiem naukowym. Rozdział 8 stanowi źródło uzupełniających materiałów z badań.

Rozprawa jest starannie zredagowana i bogato ilustrowana, podział na rozdziały jest przemyślany i przejrzysty. Tezy zostały dowiedzione w rozdziale „*Final Thought*s".

Ocena oryginalności rozprawy doktorskiej

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było uzyskanie nowego materiału biologicznego do zastosowania w hybrydowych systemach biosztucznego wspomagania wątroby typu BAL. Źródło materiału biologicznego pochodziło z resekowanych fragmentów ludzkiej wątroby, charakteryzującego się zwiększoną dostępnością wynikającą z nabytej zdolności do proliferacji oraz

stabilnością w warunkach hodowli dynamicznej w modelu bioreaktorów typu *hollow fiber*.

Obecne modele ludzkich hepatocytów posiadają wiele dysfunkcji. Doktorantka przeprowadziła serię oryginalnych eksperymentów oraz analiz w celu otrzymania prawidłowego źródła komórek ludzkich hepatocytów do zastosowania klinicznego.

Doktorantka postawiła dwie tezy rozprawy doktorskiej:

1. Możliwe jest zoptymalizowanie warunków hodowli hepatocytów wyizolowanych z fragmentów ludzkiej wątroby w celu uzyskania komórek wykazujących zdolność do proliferacji przy jednoczesnym zachowaniu kluczowych funkcji hepatocytów.
2. Uzyskana stabilna linia proliferujących komórek pochodzących z ludzkich hepatocytów (ang. *human Hepatocyte-Derived Proliferating Cells*, hHDPC) stanowi nowe źródło funkcjonalnego materiału biologicznego do zastosowania w biosztucznej wątrobie.

Mgr Monika Wiśniewska uzyskała autorskie, nowe źródło proliferujących komórek hepatocytarnych pochodzenia ludzkiego, optymalizując metodę izolacji komórek wątrobowych z małych fragmentów tkanki. Uzyskane komórki zachowały szereg parametrów, wykazujących ich potencjalną użyteczność do zastosowania jako model biosztucznej wątroby, między innymi nabyły zdolność do podziałów i zwiększyły właściwości metaboliczne w hodowli w warunkach dynamicznych w modelu bioreaktora typu *hollow fiber*. Ponadto zachowały wybrane cechy hepatocytów, takie jak produkcja albuminy, HNF4alfa, HNF1alfa i CK18, zachowały również niski poziom ekspresji AFP oraz brak ekspresji CK19. Brak tego ostatniego białka świadczy, że nie osiągają one stanu odróżnicowania typowego dla komórek progenitorowych. Linia hHDPCs stanowi odrębny pośredni stan fizjologiczny, nie wykazuje cech dojrzałych hepatpocytów, ani komórek progenitorowych.

Doktorantka wykazała również w otrzymanej linii hHDPCs niski poziom ekspresji markera Ki67 oraz obecność markera komórek mezenchymalnych VIM (wimetyna), która stymuluje proces przebudowy cytoszkieletu i proces częściowego przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT). Mgr Monika Wiśniewska wykazała również wysoki poziom proliferacji, po12 pasażach przyrost komórek był 50-krotny, chociaż podziałom ulegały nie tylko komórki wyspy, ale też komórki nie będące częścią wyspy.

Doktorantka zwróciła uwagę również na wady uzyskanej linii hHDPCs, a mianowicie wykazała niską ekspresję P450 i CYP3A4 oraz brak białek cyklu mocznikowego CPS1 i ARG1. Linia ta traci również zdolność do tworzenia wakuoli apikalnych.

Autorska linia hHDPCs posiada nie tylko potencjalne zastosowanie jako źródło komórek w biosztucznych systemach wspomagania pracy wątroby, ale również komórki te mogą zostać

zastosowane do testów hepatotoksyczności w kierunku testów nowej generacji leków oraz w badaniach nad regeneracją wątroby.

Doktorantka prezentuje interdyscyplinarną wiedzę oraz badania w dyscyplinie inżynieria biomedyczna, na tle najnowszych oraz najważniejszych osiągnięć w obszarze rozwoju alternatywnych rozwiązań dla przeszczepu niewydolnej wątroby. Wynika z tego również znajomość szerokiego spektrum technik inżynierii genetycznej, inżynierii tkankowej, biologii molekularnej i komórkowej, a także umiejętność zastosowania metod cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjnej oraz technik związanych z analizą biochemiczną.

Tematyka podjęta przez mgr Monikę Wiśniewską wykazuje rosnącą liczbę artykułów naukowych (tylko w tym roku pojawiło się parędziesiąt artykułów w tematyce BAL), opisujących systemy hybrydowe biosztucznej wątroby, a także systemy zintegrowane, łączące inżynierię reaktorową i biomedyczną z medycyną eksperymentalną. Rośnie również liczba artykułów opisujących systemy zintegrowane, które łączą biosztuczną wątrobę z układami sztucznej nerki (systemy ciągłej terapii nerkozastępczej – CRRT) oraz modułami immunomodulacyjnymi (wygaszającymi burzę cytokinową, platformą *UTOpiA*). Badania takie wyznaczają nowy trend publikacyjny w traktowaniu systemu BAL jako element walki z niewydolnością nie tylko mono- ale i wielonarządową. Rozprawa doktorska mgr Moniki Wiśniewskiej, dotycząca pozyskania ludzkich komórek hHDPC do hybrydowych systemów wspomagania wątroby, stanowi więc istotny wkład w rozwój badań nad biosztucznymi narządami.

Ponadto Doktorantka posiada doskonały dorobek naukowy, 5 publikacji opublikowanych w recenzowanych czasopismach z listy JCR, w tym jedna za 200 punktów z pierwszym autorstwem, sumaryczny IF = 28,8, sumarycznie 680 punktów ministerialnych oraz indeks Hirscha wynoszący 1 we dług bazy Scopus.

Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa została poprawnie zredagowana, bogata w rysunki i analizy. W kontekście badań i eksperymentów chciałabym zadać Doktorantce pewne zagadnienia do rozważenia:

1. Uzyskanie stabilnej linii hHDPC wymagało izolacji komórek z resekowanych fragmentów ludzkiej wątroby, które charakteryzują się ogromną zmiennością osobniczą i patologiczną. Jakie konkretne kryteria jakościowe musiał spełnić wyjściowy izolat tkankowy, aby uzyskanie 50-krotnego wzrostu liczby komórek zakończył się sukcesem? Ile izolacji zakończyło się niepowodzeniem z powodu niskiej jakości materiału biologicznego?

2. Jakie konkretne parametry hydrodynamiczne (siły ścinające – shear stress, szybkość perfuzji pożywki) okazały się kluczowe dla stymulacji metabolizmu hHDPC i jak zapobiegała Pani zjawisku zatykania (cloggingu) porów membran kapilarnych przez proliferujące komórki?

3. W jaki sposób zamierza Pani kontrolować potencjalne ryzyko transformacji nowotworowej uzyskanych komórek hHDPC, jeśli system BAL uległby rozszczelnieniu podczas procedury klinicznej?

4. Czas hodowli komórek wynosił około 12 dni. Czy taki czas jest wystarczający z punktu widzenia pacjenta czekającego na transplantację wątroby i zabezpiecza okno terapeutyczne?

5. Załóżmy, że Pani następnym etapem badawczym jest walidacja systemu BAL z komórkami hHDPC w modelu *in vivo*. Jakie zwierzę laboratoryjne wybrałaby Pani do odtworzenia ostrej niewydolności wątroby (ALF) i jak rozwiązałaby Pani problem skali aparatury?

Chciałabym podkreślić, że zaprezentowane przeze mnie zagadnienia do dyskusji nie są uwagami krytycznymi i nie wpływają na ogólną ocenę rozprawy.

Wnioski końcowe

Doktorantka udowodniła postawione tezy rozprawy doktorskiej, stosując przy tym bogaty warsztat badawczy i eksperymentalny, co stanowi doskonałe podkreślenie umiejętności Doktorantki w zakresie inżynierii biomedycznej i samodzielnym korzystaniu z wielu technik badawczych.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187 *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawa o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.)* oraz w pkt. 3 „Regulaminu przeprowadzenia postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w IBIB PAN", w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria biomedyczna. Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki, dorobek naukowy Doktorantki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na oryginalność otrzymanych wyników, ich wysoki potencjał aplikacyjny oraz dorobek Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Moniki Wiśniewskiej.

Prof. dr hab. Marta Kopaczyńska

podpisano elektronicznie