RECENZJA

rozprawy doktorskiej

pani mgr Moniki Joanny Wiśniewskiej

p.t.: "Biofunctionalization of Capillary Bioreactor with the Use of Human Hepatocyte-Derived Proliferating Cells as a Model of Bioartificial Liver"

Przedłożona do oceny Rozprawa ma charakter doświadczalny. Koncentruje się na zagadnieniu pozyskiwania optymalnych komórek do terapii pomostowych dla pacjentów oczekujących na przeszczep wątroby. Terapie, do których odnosi się Doktorantka, zwane w polskiej literaturze – w braku lepszego tłumaczenia z języka angielskiego – hybrydowymi systemami biosztucznego wspomagania wątroby (ang. Bioartificial Liver Support Systems; BALs), polegają na przejmowaniu funkcji narządu *ex vivo* przez aktywne komórki pochodzące z wątroby osadzone w bioreaktorze.

Przedmiot rozprawy jest niezwykle aktualny i ważny – zarówno jako zagadnienie badawcze jak i bardzo istotny i nierozwiązany problem kliniczny. Pani mgr Monika Joanna Wiśniewska charakteryzuje we wstępie pracy znaczenie narządu jakim jest wątroba oraz słusznie podkreśla fakt, że jak dotychczas przeszczep wątroby jest jedynym ratującym życie, dostępnym rozwiązaniem w przypadku zaawansowanego stadium niewydolności narządu. Pomijając wysoką inwazyjność i towarzyszące transplantacji ryzyka oraz konsekwencje stosowania niezbędnego postępowania immunosupresyjnego, główną barierę tego rozwiązania stanowi ograniczona dostępność dawców. Z tej racji wiele ośrodków badawczych na świecie podejmuje prace nad uzyskaniem skutecznego zewnętrznego systemu wspomagania lub zastąpienia funkcji wątroby – jako terapii pomostowej dla pacjentów oczekujących na przeszczep, bądź regenerację narządu. O ile systemy całkowicie sztuczne pozwalają jedynie na uzyskanie efektu detoksykacji, o tyle systemy typu BAL, wzbogacone o obecność w układzie funkcjonalnych komórek, miałyby odtwarzać dodatkowo funkcje wydzielnicze wątroby. Systemy tego typu są przedmiotem niezwykle intensywnych badań prowadzonych w wiodących ośrodkach na świecie, przy czym, jak dotychczas żadne z opracowanych rozwiązań nie zostało wprowadzone do praktyki klinicznej, a podjęte dotychczas badania kliniczne nie zostały zakończone powodzeniem.

Pani mgr Monika Joanna Wiśniewska opisuje te zagadnienia wyczerpująco we Wstępie pracy, przywołując aktualne piśmiennictwo. Za ważne uważam to, iż Doktorantka poświęca w tej części rozprawy uwagę nie tylko zagadnieniom natury podstawowej, ale omawia też stan wiedzy w zakresie obserwacji klinicznych. Aktualnie, poszukiwanie skutecznych systemów typu BAL jest przedmiotem intensywnych prac badawczych na etapie przedklinicznym, zaś jednym z głównych problemów wymagających rozwiązania pozostaje rodzaj i sposób przygotowania zastosowanych komórek. Obecnie stosowane populacje komórkowe nie spełniają oczekiwań, co stanowi nierozwiązany problem, w którym upatruje się głównych przyczyn niepowodzenia dotychczasowych prób klinicznych.

Pani mgr Monika Joanna Wiśniewska stawia sobie za cel uzyskanie populacji komórkowej, która eliminowałaby ograniczenia proponowanych dotychczas form materiału biologicznego w systemach BAL, przy zachowaniu pożądanej funkcjonalności biologicznej. Tym samym, oceniana rozprawa doktorska dotyczy zagadnienia niezwykle aktualnego o bardzo dużym znaczeniu.

Podjęte zagadnienie naukowe i cel rozprawy zostały jasno sformułowane w wyodrębnionej części tekstu zamykającej Wstęp. Teza pracy została sformułowana w dwóch podpunktach, Doktorantka postuluje możliwość takiej modyfikacji warunków hodowli komórek pozyskanych z izolowanej tkanki wątrobowej, która pozwoli na uzyskanie wysokiego indeksu proliferacyjnego komórek przy zachowaniu funkcjonalnego potencjału hepatocytów. Uzyskane w ten sposób komórki mogłyby stanowić nowe źródło materiału biologicznego do systemów typu BAL.

Stosownie do postawionej tezy, Doktorantka posłużyła się w pracy komórkami ludzkimi wyizolowanymi z fragmentów wątroby. Dzięki wieloletniemu doświadczeniu Ośrodka macierzystego Doktorantka mogła zastosować zweryfikowane już metody izolacji, proponując własne modyfikacje w odniesieniu do zastosowanych enzymów. Do badań użyła komórek wyizolowanych z materiału pochodzącego od 30 dawców oraz wcześniej pozyskanych komórek z kolekcji Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN, pochodzących od kolejnych 6 dawców.

Wybór komórek do badań jest ogromnym walorem pracy. Wiele prac badawczych jest realizowanych z użyciem komórek zwierzęcych, bądź ustalonych wyprowadzonych wcześniej linii komórkowych, co bardzo ułatwia prowadzenie badań, jednak istotnie oddala uzyskane warunki od docelowego zastosowania. W rozprawie posłużono się komórkami izolowanymi z fragmentów tkanek pozyskiwanych z kliniki uniwersyteckiej, zgodnie z uzyskaną pozytywną opinią właściwej Komisji Bioetycznej. Doktorantka dobrała też szeroki panel linii referencyjnych, a dokonane wybory

kontrolnego materiału odniesienia są zgodne z powszechnie stosowanymi w odnośnym piśmiennictwie naukowym.

Niezwykle silnym punktem rozprawy jest wielość zastosowanych technik badawczych. Doktorantka analizuje wybrane elementy charakterystyki komórek na poszczególnych etapach eksperymentów, począwszy od populacji pozyskanej bezpośrednio po izolacji, przez wszystkie analizowane warianty hodowli statycznej przy użyciu różnych podłoży, kończąc na materiale z hodowli w warunkach dynamicznych. Wielość zastosowanych technik badawczych jest imponująca. Na różnych etapach charakterystyki komórek Doktorantka posłużyła się: ilościową analizą RT-PCR, cytometrią przepływową, analizą Western Blot, testami ELISA, w tym ilościowym testem typu „sandwich" oraz specyficznymi barwieniami immunohistochemicznymi. Do charakterystyki elementów układu hodowli dynamicznej zastosowała ponadto skaningową mikroskopię elektronową i typowe techniki do oceny jakości i biozgodności użytych materiałów. Część rozprawy poświęcona użytym materiałom i metodom jest przygotowana starannie, zgodnie z obowiązującymi zasadami. Praca zyskałaby jednakże na przejrzystości, gdyby w tej części Rozprawy zostały także zamieszczone proste schematy układów eksperymentalnych zastosowanych na różnych etapach postępowania z komórkami. Uwzględnienie na takich ilustracjach kluczowych informacji określających cel konkretnego układu, schemat czasowy obserwacji, zastosowane komórki i rodzaj analiz, zdecydowanie ułatwiłoby percepcję pracy. Szczególnie, że w różnych obserwacjach Doktorantka zastosowała różne populacje komórkowe – odnosi się to do komórek badanych, pochodzących od różnych dawców a także z różnych pasaży, jak i do komórek referencyjnych, nie zawsze takich samych w poszczególnych częściach pracy. Jednocześnie, zwięzłe sformułowanie celu poszczególnych obserwacji dla potrzeb sugerowanych tu schematów, dodatkowo ułatwiłoby analizę wyników.

Pani mgr Monika Joanna Wiśniewska poświęca w swojej pracy dużo miejsca analizie zależności skuteczności izolacji i charakterystyki uzyskanej populacji komórek od wybranych cech dawców materiału. Z jednej strony jest to bardzo interesujący wątek, z drugiej strony jednakże przeprowadzona analiza ma poważne słabe strony. Grupa dawców jest bardzo heterogenna. Są w tym gronie osoby obu płci, w różnym wieku (średnia wieku w analizowanej grupie wynosiła 57 ± 14), poddane lub nie poddane chemioterapii – żeby wymienić tylko cechy uwzględnione w analizie. Przy czym, z danych zamieszczonych w tabeli 3.12, poświęconej charakterystyce dawców i sposobu izolacji wynika, że były tam także osoby bez rozpoznanego nowotworu, nie ma natomiast informacji co do typów rozpoznanych nowotworów u pacjentów onkologicznych. Co więcej, występuje również zmienna w samym sposobie izolacji komórek - w różnych przypadkach zostały zastosowane różne

kombinacje kolagenazy. Podsumowując ten wątek, przeprowadzona w tej części analiza nie może być traktowana jako udokumentowany wynik. Natomiast zestawienie poczynionych obserwacji może mieć znaczenie praktyczne dla kontynuatorów prac nad tym zagadnieniem. Tego typu analizy wymagają znacznie większej liczby jednorodnych danych, zatem zebrane tu obserwacje mogą być w przyszłości włączone do dalszych zestawień.

W odniesieniu do dalszych części pracy, bezpośrednio związanych z tezą i celem rozprawy, należy stwierdzić, iż eksperymentalna weryfikacja bardzo licznych wariantów hodowli doprowadziła Doktorantkę do rozwiązania sformułowanego w celu pracy problemu.

Kluczowymi analizowanymi strukturami wyjściowymi, dającymi początek dalszych etapów hodowli, były przylegające do podłoża wyspy komórek, tworzące się w materiale pozyskanym z izolacji. Doktorantka odnosi się w dyskusji do charakteru tych struktur opisywanych także przez innych autorów. Na użytek swojej pracy, konsekwentnie używa pojęcia „cell islands", przyjmując, że obecne tam komórki pochodzą zarówno z klonów komórkowych jak i z agregatów komórkowych – w oparciu o dane literaturowe wskazujące na skłonność hepatocytów do spontanicznego tworzenia agregatów. W efekcie zastosowania wielu wariantów hodowli pozyskanych komórek, udało się pani mgr Monice Joannie Wiśniewskiej uzyskać populacje komórkowe zachowujące zdolność do proliferacji nawet w odległych pasażach. Jednocześnie, jak wykazała Doktorantka, ekspozycja tych komórek na dedykowane czynniki wzrostu, skutkowała obecnością wybranych białek charakterystycznych dla hepatocytów. Uzyskane wyniki charakteryzują się zmiennością w czasie, a także różnicami w odniesieniu do materiału pozyskanego od różnych dawców i różnych pasaży komórkowych. Doktorantka zauważa także w krytycznej dyskusji uzyskanych wyników, iż nie udało się potwierdzić ekspresji niektórych białek cyklu mocznikowego, co może mieć znaczenie dla pożądanej funkcjonalności tych komórek. Tym niemniej, ostatecznie Doktorantka wykazała, iż zgodnie z postawioną tezą, możliwe się okazało uzyskanie populacji komórkowych wywodzących się z tkanek wątroby człowieka wykazujących znaczny potencjał proliferacyjny przy zachowaniu zdolności do redyferencjacji w kierunku funkcjonalnych hepatocytów – ze względu na wybrane cechy. O znaczeniu tego wyniku niech świadczy fakt, iż brak dostępności tego typu komórek jest głównym ograniczeniem rozwoju terapii typu BAL. W tym kontekście istotnym wynikiem pracy jest także to, iż badane komórki były zdolne do produkcji albuminy oraz mocznika w warunkach hodowli dynamicznej w bioreaktorze, w stopniu wyraźnie wyższym w porównaniu z referencyjnymi komórkami o immunofenotypie hepatocytarnym. Określenie „wyraźnie wyższy" zostało przeze mnie użyte świadomie, bowiem Doktorantka nie przedstawiła analizy statystycznej, która pozwoliłaby na

potwierdzenie, czy uzyskane obserwacje są istotne statystycznie. Ta uwaga odnosi się do znakomitej większości przedstawionych wyników i jest to zdecydowanie najsłabsza strona rozprawy. Dzięki dostępności komórek wyizolowanych od licznych dawców, Autorka pracy dysponowała bardzo bogatym materiałem wyjściowym do analiz, pozwalającym w szczególności na uniknięcie przypadkowości wynikającej z różnic osobniczych. Dodatkowo, zastosowała bardzo rozbudowany aparat doświadczalny. Oba te czynniki, otwierając możliwości zastosowania wielu wariantów obserwacji, stały się, z drugiej strony, źródłem podstawowego ograniczenia pracy, limitując możliwość zastosowania licznych powtórzeń i uzyskania spójnych wyników o udowodnionej znamienności statystycznej. Chociaż stanowi to poważne ograniczenie, jestem przekonana, iż pomimo tego, praca ma bardzo istotne znaczenie dla rozwoju podjętego kierunku badań. Samo sformułowanie postulatu zastosowania w systemach typu BAL komórek o zachowanym potencjale proliferacyjnym bez utraty krytycznych funkcjonalności typowych dla komórek terminalnie zróżnicowanych, jest odważnym celem i – jak wykazała Doktorantka – możliwym do osiągnięcia. Uzyskane wyniki będą wymagały kolejnych powtórzeń i, ostatecznie, walidacji opracowanej metodologii. Tym niemniej, Doktorantce nie tylko udało się sformułować i udowodnić tezę, która, w moim przekonaniu, zasługuje aby stanowić przedmiot rozprawy doktorskiej. Udało się Jej także zgromadzić niezwykle bogate źródło danych eksperymentalnych, które, nawet jeśli nie zweryfikowane ostatecznie, stanowią doskonały punkt wyjściowy do dalszych badań.

Podsumowując, głównymi walorami przedłożonej do oceny pracy są: waga, znaczenie i aktualność podjętego problemu; zastosowanie w badaniach komórek ludzkich pochodzących z izolacji z tkanek wątroby od licznych dawców; bogaty zestaw zastosowanych nowoczesnych metod eksperymentalnych, świadczący o dobrym przygotowaniu pani mgr Moniki Joanny Wiśniewskiej do dalszej pracy naukowej oraz wykazanie zasadności dalszych prac na rzecz uzyskania optymalnej populacji komórek do terapii typu BAL łączącej przeżywalność i funkcjonalność komórek – w oparciu o wykazane w pracy możliwości. Wskazując słabe strony rozprawy, należy podkreślić przede wszystkim, brak potwierdzenia statystycznej znamienności w przypadku większości uzyskanych wyników, co stanowi koszt bardzo rozbudowanego podejścia do rozwiązywanego problemu.

Pozostałe uwagi, sugestie i uchybienia, które uznałam raczej za skutek redakcyjnych niedoskonałości niż zamierzone błędy, omawiam poniżej.

- W odniesieniu do sformułowania tezy i celu pracy – główny punkt, stanowiący o możliwości takiej modyfikacji warunków hodowli komórek pozyskanych z izolowanej tkanki wątrobowej, która pozwoli na uzyskanie wysokiego indeksu proliferacyjnego komórek przy zachowaniu

funkcjonalnego potencjału hepatocytów, nie rodzi wątpliwości. Co więcej, teza ta została przez Doktorantkę udowodniona. Natomiast dosłowna interpretacja punktu drugiego, sugerowałaby zamiar uzyskania stabilnej linii komórkowej o zadanych cechach. Określenie „stabilna linia komórkowa" odnosi się zasadniczo do komórek modyfikowanych genetycznie o potwierdzonej trwałej ekspresji obcego genu. Zważywszy na to, iż Doktorantka nie odnosi się do komórek modyfikowanych genetycznie, można by to określenie interpretować jako odnoszące się do populacji o stabilnej i powtarzalnej charakterystyce immunofenotypowej. Wydaje się tymczasem, w oparciu o cały opis znajdujący się w pracy, że sformułowaniem oddającym intencje Autorki, byłoby raczej stwierdzenie, iż uzyskane w ten sposób komórki mogłyby stanowić nowe źródło materiału biologicznego do systemów typu BAL. Także w sformułowaniu celu – zasadniczo klarownym i zrozumiałym – doprecyzowania wymagałoby odniesienie do stabilności materiału biologicznego w warunkach hodowli dynamicznej. Ściśle rzecz ujmując, badania stabilności uzyskanego materiału wymagają kolejnych powtórzeń przeprowadzonych eksperymentów i taką potrzebę w ramach przyszłych badań już wskazano w niniejszej recenzji. Będą one możliwe właśnie dzięki wynikom uzyskanym w dysertacji. Wydaje się natomiast, że Autorka miała na myśli potwierdzenie utrzymania przeżywalności i funkcjonalności uzyskanych komórek w hodowli dynamicznej, co też skutecznie w swojej pracy potwierdziła w pojedynczej obserwacji.

- Oryginalność podejścia Doktorantki do podjętego zagadnienia nie budzi wątpliwości. Natomiast wśród opisów wielu zastosowanych układów eksperymentalnych, różnorodności komórek i zastosowanych metod, brakuje wskazania, który konkretnie element w ostatecznie opracowanej metodzie jest kluczowy i jako taki odróżnia postulowaną metodę postępowania z komórkami od innych opisanych protokołów. Może podczas obrony pracy, Doktorantka zechciałaby zaproponować zwięzły protokół opracowanego postępowania, z jasnym podkreśleniem kroków, niestosowanych przez innych autorów.
- Oprócz sugerowanych już wcześniej schematów poszczególnych układów eksperymentalnych, ważnym elementem opisu byłaby tabela, zbierająca wszystkie stosowane w poszczególnych krokach komórki. Doktorantka przyjęła klarowne oznakowanie poszczególnych populacji komórkowych ze wskazaniem numeru dawcy i numeru pasażu. Jednakże, ze względu na to, iż w poszczególnych eksperymentach zastosowano różne komórki, to – oprócz informacji zawartej w bieżącym opisie – zdecydowanie wskazanym byłoby zebranie w jednym miejscu, n.p. w formie tabeli, informacji - jakie oznaczenia przeprowadzono na jakich komórkach badanych i których komórkach referencyjnych. Brak

takiego zestawienia utrudniał lekturę zwłaszcza, choć nie tylko, w części poświęconej analizie białek charakterystycznych dla hepatocytów w uzyskanych przez Doktorantkę populacjach komórkowych.

- W kilku miejscach Doktorantka używa nieprecyzyjnie określenia „specyficzności" wybranych markerów. Przykładem może być nazywanie wimentyny specyficznym markerem fibroblastów. Nie jest to zarzut metodyczny, gdyż wimentyna bywa często używana dla wizualizacji fibroblastów, zwłaszcza pod nieobecność w hodowli innych komórek pochodzenia mezenchymalnego. Także w ocenianej pracy wykorzystana jest zasadnie w tym celu. Jednakże nie jest ona i nie powinna być nazywana specyficznym/swoistym markerem fibroblastów. Podobnie rzecz ma się z niektórymi innymi zastosowanymi w pracy markerami, które są typowe/charakterystyczne dla danego typu lub stanu komórki, ale nie mają cech markera specyficznego dla danego immunofenotypu, tj. ulegającego ekspresji wyłącznie na wskazanych komórkach.
- Kolejna uwaga jest jedynie sugestią interpretacyjną. Analizując nieoczekiwany brak białka Ki67 – powszechnie stosowanego wskaźnika podziałów komórkowych – w intensywnie proliferujących komórkach, Doktorantka rozważa możliwość występowania asynchronicznej proliferacji. Wymagałoby sprawdzenia, czy w czasie przeprowadzania barwienia immunohistochemicznego (inny punkt czasowy niż test proliferacji), nie doszło do zahamowania kontaktowego. Test na Ki67 może być przeprowadzany wyłącznie w hodowli co najwyżej subkonfluentnej. W warunkach konfluencji daje wynik negatywny. Warto zwrócić uwagę, czy nie zachodzi tu taka sytuacja.
- W manuskrypcie, lub manuskryptach zgłoszonych do czasopism celem szerszego ogłoszenia uzyskanych wyników, z pewnością wymaganym elementem będzie podanie w każdym indywidualnym oznaczeniu liczby powtórzeń – zarówno technicznych, jak i niezależnych.
- Ostatnia uwaga redakcyjna odnosi się do stylu w jakim zredagowano rozdział Wnioski. Najczęściej przyjętą formułą tej części pracy, jest precyzyjne, zwięzłe – często w punktach - przedstawienie konkluzji wynikających z uzyskanych wyników i przeprowadzonej dyskusji. Natomiast w ocenianej rozprawie, treści zawarte w tym rozdziale są formą omówienia wyników z elementami dyskusji. Jeśli Doktorantka zdecydowała się na taką formułę, zasadnym byłoby uzupełnienie przedstawionych treści o przedstawienie konkluzji w tradycyjnej formie. Obrona pracy mogłaby być dobrym forum dla zaprezentowania takiego zestawienia.

Powyższe uwagi nie zmieniają mojego przekonania, iż przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Moniki Joanny Wiśniewskiej jest bardzo wartościowa i aktualna. Dodatkowo, otwiera drogę do dalszych nowych badań, z wykorzystaniem zarówno zaprezentowanych pomysłów badawczych jak i uzyskanych wyników. Praca spełnia w mojej ocenie wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w świetle obowiązujących przepisów.

W konkluzji, pozwalam sobie wnioskować do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pani mgr Moniki Joanny Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpisała prof. dr hab. inż. Małgorzata Lewandowska-Szumieł