

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, 19.09.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

Hodowla dynamiczna nowej genetycznie zmodyfikowanej linii komórkowej pochodzenia wątrobowego jako model biosztucznej wątroby

Dynamic culture of a new genetically modified liver-derived cell line as a model of bioartificial liver

Autor rozprawy: mgr inż. Małgorzata Jakubowska

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

Promotor pomocniczy: Dr Krzysztof Pluta

Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Dyrektora Instytutu prof. dr hab. inż. Piotra Ładyżyńskiego, wyrażoną w piśmie SN/431/1.1/2024 z dnia 12 lipca 2024 roku. Przewód doktorski jest prowadzony przez Radę Naukową Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Tematyka i charakter rozprawy doktorskiej

Choroby wątroby związane z wysoką śmiertelnością pacjentów są dużym wyzwaniem dla medycyny regeneracyjnej, transplantologii i inżynierii biomedycznej. Aktualnie jedyną skuteczną metodą leczenia pacjentów jest przeszczep wątroby lub jej fragmentu. Niestety głównym problemem w transplantologii jest niewystarczająca liczba dawców przy wzrastającej liczbie biorców. Pozostają, więc alternatywne rozwiązania dla przeszczepu niewydolnej wątroby, takie jak przeszczep komórkowych linii wątrobowych oraz pozaustrojowe systemy *biosztucznej wątroby*, wspomagające funkcje i regenerację narządu. Niestety powyższe metody leczenia wciąż nie mogą zastąpić przeszczepu organu.

Zastosowanie urządzeń hybrydowych - *bioszucznej wątroby* jest rozwiązaniem, mogącym stanowić 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, poszukać źródeł alternatywnych modeli linii komórkowych hepatocytów, wprowadzić modyfikacje genetyczne w celu ulepszenia hodowli poprzez zwiększenie ich indeksu proliferacyjnego, uzyskanie stabilności genetycznej, przywrócenie funkcji cyklu mocznikowego oraz zwiększenie ich zdolności metabolicznych.

Struktura oraz zawartość rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Jakubowskiej liczy wraz z bibliografią 195 stron. Rozprawa jest napisana w języku angielskim, w postaci tradycyjnej monografii, obejmującej 8 rozdziałów, 63 rysunki oraz 286 pozycji literaturowych. Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

Rozdział 1 jest wprowadzeniem do zagadnień dotyczących budowy, funkcji i dysfunkcji wątroby oraz różnych sposobów leczenia chorób wątroby i technik transplantacyjnych. Przedstawia zastosowanie bioszucznych systemów jako alternatywne sposoby leczenia oraz wspomaganie funkcji wątroby, w tym nowoczesne systemy sztucznych urządzeń zastępczych ze szczególnym uwzględnieniem systemów hybrydowych typu *bioszuczna wątroba*, wykorzystujących w swoim działaniu blok funkcyjny w postaci komórek pochodzenia wątrobowego jako aktywnego metabolicznie źródła komórek. Doktorantka prezentuje metody hodowli ludzkich hepatocytów, techniki hodowlane oraz modyfikacje genetyczne nowotworowych linii komórkowych, mogących wpłynąć na poprawę hodowli hepatocytów *in vitro*.

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 wykorzystaną przez Doktorantkę 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 modyfikacji genetycznych linii komórkowych, prowadzenie hodowli na różnych podłożach oraz ocenę wpływu modyfikacji genetycznych i różnych warunków hodowli na parametry hodowlane oraz funkcjonalne. Osobny podrozdział opisuje zastosowanie autorskiego systemu do hodowli dynamicznej, ze skonstruowanym bioreaktorem z membranami jako modułem hodowlanym.

Rozdział 5 zawiera szczegółowo opisane i bogato zilustrowane wyniki badań. Natomiast w rozdziale 6 została przeprowadzona obszerna dyskusja.

Rozdział 7 zawiera transparentne i cenne podsumowanie przeprowadzonych badań i ich wyników w aspekcie potencjalnego zastosowania klinicznego. Zawarte zostały też w nim najważniejsze osiągnięcia Doktorantki oraz plany badawcze na przyszłość.

Bibliografia omawiana w rozprawie jest poprawnie dobrana, liczy 286 pozycji, w tym współautorskie publikacje. Pozycje zebrano i przedstawiono w rozdziale 8.

Rozprawa jest starannie zredagowana i bogato ilustrowana, podział na rozdziały jest przemyślany i przejrzysty. Tezy zostały jasno sformułowane i dowiedzione w rozdziale 6.

Ocena oryginalności rozprawy doktorskiej

Celem recenzowanej pracy doktorskiej były badania nad alternatywnym źródłem modeli ludzkiej linii komórek hepatocytów, które mogłyby być wykorzystane w warunkach klinicznych do wspomagania w biosztucznych systemach. Obecne modele ludzkich hepatocytów posiadają wiele dysfunkcji, przede wszystkim mają ograniczoną zdolność do eliminacji toksycznego amoniaku oraz niefunkcjonalny cykl mocznikowy. Doktorantka przeprowadziła serię oryginalnych eksperymentów oraz analiz w celu otrzymania prawidłowego źródła komórek ludzkich hepatocytów do zastosowania klinicznego.

Za najważniejsze osiągnięcie Doktorantki uważam otrzymanie nowej genetycznie zmodyfikowanej linii komórkowej o nazwie C3A_AO_P2A z przywróconym cyklem mocznikowym, o potencjalnym zastosowaniu jako źródło komórek w biosztucznych systemach wspomagania pracy wątroby. Autorska linia komórkowa została otrzymana za pomocą samodzielnie przygotowanych wektorów lentiwirusowych. Zaprezentowane przez Doktorantkę eksperymenty wykazały, że zmodyfikowana linia C3A_AO_P2A syntezuje albuminę o stężeniu znacznie wyższym niż linie niemodyfikowane, posiada odporność na wysokie stężenie amoniaku, ma przywrócony funkcjonalny cykl mocznikowy, co charakteryzuje się znaczącą nadekspresją genów hARG1 oraz hOTC. Ponadto nie zaobserwowano negatywnego wpływu modyfikacji genetycznych na morfologię oraz żywotność komórek. Ocena funkcjonalności zmodyfikowanej linii komórkowej w warunkach przepływowych za pomocą autorskiego systemu hodowli dynamicznej, wykazała najlepszą funkcjonalność badanej linii komórkowej C3A_AO_P2A w warunkach przepływowych, zwłaszcza w wydzielaniu albuminy.

Zebrane przez Doktorantkę wyniki posiadają duży potencjał aplikacyjny opracowanego modelu hodowli ludzkich komórek hepatocytów do zastosowania w szczególności w systemach wspomagających funkcjonowanie 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.

Ponadto Doktorantka posiada doskonały dorobek naukowy, 4 publikacje z Listy Filadelfijskiej, w tym jedna za 200 punktów z pierwszym autorstwem oraz indeks Hirscha wynoszący 3.

Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa została poprawnie zredagowana, pojawiły się jednak pewne zagadnienia, które wymagają doprecyzowania.

1. Rozdział 5.2.1, rysunek 33, proszę wyjaśnić odmienną morfologię, ziarnistość, linii C3A_AO_III w porównaniu z morfologią innych badanych linii komórkowych. W jaki sposób ziarnistość może wpływać na obserwowany wzrost produkcji białek?
2. Rozdział 5.2.5, rysunek 37, czy obliczane stężenie albuminy przeliczano na liczbę komórek w analizowanym preparacie?
3. Rozdział 5.2.8, rysunek 40, proszę omówić różnice w liczbie wakuoli pomiędzy badanymi liniami komórkowymi? Jak ich liczba może wpływać na aktywność metaboliczną komórek?
4. Rozdział 5.3.4.2, na rysunku 53 brak oznaczonego błędu pomiarowego.
5. W rozdziale 5.4.2.2, rysunek 59, proszę wyjaśnić zjawisko agregacji linii C3A na membranie polisulfonowej bardziej niż modyfikowanych genetycznie linii. Czy zjawisko agregacji wpływa na interpretację wyników analizy stężenia albuminy?

Chciałabym podkreślić, że zaprezentowane przeze mnie pytania, 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 doskonale 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 artykułe 187 *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawa o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r., poz. 478 z późn. zm.)* oraz odpowiednie *Rozporządzenia Ministra Nauki i*

Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. 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 Nałęcz 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 inż. Małgorzaty Jakubowskiej.



Prof. dr hab. Marta Kopaczyńska