

dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. PWr
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, 03.01.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej

Analiza wpływu różnych podłoży hodowlanych na ludzkie komórki wątrobowe dla potrzeb biosztucznej wątroby

Autor rozprawy: mgr inż. Agnieszka Wencel

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

Promotor pomocniczy: Dr Krzysztof Pluta

Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz PAN

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Z-cy Dyrektora Instytutu d.s. Naukowych prof. dr hab. inż. Doroty Pijanowskiej, wyrażoną w piśmie SRN/128/2018 z dnia 5 listopada 2018 roku. Przewód doktorski jest prowadzony przez Radę Naukową Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Tematyka i charakter rozprawy doktorskiej

Dysfunkcje wątroby związane z ostrą czy przewlekłą niewydolnością wątroby są związane z wysoką śmiertelnością pacjentów i są dużym wyzwaniem dla medycyny regeneracyjnej i inżynierii biomedycznej. W chwili obecnej jedyną skuteczną metodą leczenia pacjentów jest przeszczep wątroby lub jej fragmentu. Niestety głównym problemem w transplantologii jest niewystarczająca liczba dawców. Pozostają, więc alternatywne i eksperymentalne metody terapii w oparciu o przeszczep komórkowych linii wątrobowych oraz dynamicznie rozwijające się pozaustrojowe systemy biosztucznej wątroby, wspomagające funkcje i regenerację narządu. Niestety nie są to metody wydajne na tyle, aby zastąpić przeszczep organu. Szczególne trudności związane są z

hodowlą linii komórkowych i to zarówno świńskich jak i ludzkich stosowanych do przeszczepu lub w konstrukcjach pozaustrojowych systemów podtrzymujących funkcje wątroby.

Doktorantka próbowała z sukcesem zmierzyć się z problemami i ograniczeniami trudnej hodowli hepatocytów, optymalizacją warunków hodowli, zastosowaniem biologicznych i polimerowych podłoży hodowlanych oraz z zastosowaniem modyfikacji genetycznych w kokulturach linii komórkowych w celu ulepszenia hodowli poprzez zwiększenie ich indeksu proliferacyjnego, zwiększenie ich zdolności metabolicznych, spowolnienie procesu odróżnicowywania się komórek w warunkach *in vitro* oraz zachowanie komórek albuminopozytywnych w kokulturach.

Struktura oraz zawartość rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Wencel liczy wraz z bibliografią 185 stron. Rozprawa jest napisana w języku polskim, w postaci tradycyjnej monografii, obejmującej 8 rozdziałów, 58 rysunków oraz 213 pozycji literaturowych. Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

Rozdział 1 jest wprowadzeniem do zagadnień dotyczących budowy, funkcji i dysfunkcji wątroby oraz sposobów leczenia chorób wątroby. Przedstawia możliwości i ograniczenia przeszczepów hepatocytów oraz zastosowanie biosztucznych systemów jako alternatywne sposoby leczenia oraz wspomaganie funkcji wątroby. Doktorantka prezentuje metody hodowli hepatocytów, optymalizację oraz modyfikację technik hodowlanych, mogących wpłynąć na poprawę hodowli hepatocytów *in vitro*.

Rozdział 2 zawiera cel oraz tezy pracy.

W rozdziale 3 przedstawiono materiał biologiczny zastosowany w pracy badawczej, w tym linie komórkowe, plazmidy, odczynniki chemiczne i przeciwciała stosowane w technikach eksperymentalnych. Wymieniono również aparaturę badawczą, co stanowi doskonale podkreślenie umiejętności Doktorantki w obsłudze wielu technik badawczych.

Rozdział 4 jest bardzo rozbudowany. Zawiera bogato opisane metody izolacji i przygotowania preparatów komórkowych zastosowane do badań za pomocą odpowiednich technik badawczych. Prezentuje procedury modyfikacji genetycznych linii komórkowych oraz ich optymalizację i ocenę wydajności. Procedury prowadzenia hodowli na różnych podłożach, przechowywanie linii komórkowych oraz ocenę wpływu modyfikacji genetycznych i różnych warunków hodowli na parametry komórek wątrobowych. Osobny podrozdział opisuje obrazowanie komórek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej.

Rozdziale 5 zawiera szczegółowo opisane i zilustrowane wyniki badań. Dyskusja natomiast

została zawarta w osobnym rozdziale nr 6.

Bardzo cenne i rzetelne podsumowanie stanowi Rozdział 7. Ze względu na różnorodność przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, opracowanie konkretnych metod hodowli ludzkich komórek wątrobowych oraz ich optymalizację zwiększającą zdolności metaboliczne komórek hepatocytów wnioski zostały podzielone na 4 podrozdziały z odniesieniem do poszczególnych tez rozprawy doktorskiej. Tak zaprezentowane podsumowanie bardzo ułatwia ocenę recenzentowi.

Dodatek stanowi opis planów na przyszłość, świadczący o dużym potencjalnie zarówno uzyskanych wyników badawczych jak i podkreśla dalszy ważny rozwój badań związanych z zastosowaniem hodowli hepatocytów do celów *in vivo*.

Bibliografia omawiana w rozprawie jest poprawnie dobrana, liczy 213 pozycji, w tym 2 współautorskie publikacje. Pozycje zebrano i przedstawiono w rozdziale 8.

Rozprawa jest bardzo starannie zredagowana i bogato ilustrowana, podział na rozdziały jest przemyślany i przejrzysty. Tezy zostały klarownie sformułowane.

Ocena oryginalności rozprawy doktorskiej

W pracy przeprowadzono badania związane z otrzymaniem i hodowlą ludzkiej linii komórek hepatocytów, która mogłaby być wykorzystana w warunkach *in vivo* do wspomagania hodowli komórek wątrobowych w biosztucznych systemach. Doktorantka opracowała zarówno w oparciu o literaturę światową jak i własne eksperymenty metody hodowli ludzkich komórek wątrobowych zwiększające ich zdolności metaboliczne, zoptymalizowała metody izolacji pierwotnych hepatocytów metodą maceracji, co spowolniło proces odróżnicowywania się komórek. Opracowała podłoże z suszonych fibroblastów, zmodyfikowanych genetycznie poprzez wprowadzenie genu kodującego czynnik wzrostu hepatocytów, co zwiększyło produkcję albuminy w hodowlach komórek linii C3A, a także zastosowała polimerowe podłoże z polietylenoiminy, które zapewniło homogenne rozmieszczenie komórek na powierzchni hodowlanej bez szkodliwego wpływu na ich żywotność i zdolności metaboliczne.

Na wyróżnienie zasługują przeprowadzone przez Doktorantkę bardzo trafne eksperymenty badawcze o dużej nośności informacyjnej. Na przykład ocena modyfikacji genetycznych izolowanych ludzkich fibroblastów w celu nadprodukcji czynnika wzrostu HGF, która była analizowana za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometru przepływowego. Wprowadzany konstrukt został tak zaprojektowany, aby oprócz produkcji HGF widoczna była ekspresja białka zielonej fluorescencji EGFP, co umożliwiło szybką i skuteczną analizę modyfikacji genetycznej (wyniki zaprezentowane na rysunkach 25 i 26).

Za najważniejsze osiągnięcie Doktorantki uważam duży potencjał aplikacyjny opracowanego modelu hodowli ludzkich komórek hepatocytów do zastosowania w testach cytotoksyczności *in vitro*, a w szczególności w pozaustrojowych systemach wspomagających funkcjonowanie wątroby (ang. *Bioartificial Liver Support*, BAL).

Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa została dobrze i przejrzysto zredagowana, pojawiły się jednak pewne niejasności i zagadnienia, które wymagają wyjaśnienia.

1. W rozdziale 5.3.4. (Produkcja albuminy) na stronie zamieszczony jest rysunek 23 dotyczący wytwarzania albuminy po 6 dniach hodowli C3A. Z czego może wynikać tak duży błąd pomiarowy dla komórek C3A wysianych na 2% roztworze żelatyny?
2. W rozdziale 5.4.3. (Ocena skuteczności przeprowadzonej modyfikacji w HSF_reHGF – analiza DNA genomowego) rysunek 28 prezentuje rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym w celu sprawdzenia obecności genu kodującego HGF pod kontrolą promotora CMV w poszczególnych preparatach. Analiza potwierdziła obecność wstawek w genomach modyfikowanych komórek w przypadku HSF_reHGF. Autorka stwierdza, że w liniach komórkowych C3A, HOS oraz nietransdukowanych HSF nie powstał produkt typowy dla komórek HSF_reHGF. Niemniej jednak w przypadku linii C3A obserwuje się słaby prążek. Co może być produktem reakcji w tym przypadku?
3. W rozdziale 5.6.5. (Apoptoza komórek) rysunek 43 prezentuje wpływ polietylenoiminy na apoptozę po 5 dniach hodowli komórek C3A. Doktorantka zaobserwowała w przypadku hodowli PEI 2, że znacząco zwiększył się odsetek wczesnych komórek apoptotycznych w hodowli C3A w porównaniu z kontrolą SP. Zauważyła również, że zwiększyła się liczba komórek w późnej apoptozie w hodowli C3A na PEI 2 w stosunku do kontroli. Nie zaobserwowała jednak różnic w liczbie komórek nekrotycznych. Proszę zinterpretować ten fakt, ponieważ odsetek komórek nekrotycznych we wszystkich wersjach hodowli jest wysoki w stosunku do komórek we wczesnej czy późnej apoptozie.
4. W rozdziale 7.2. (Wnioski dotyczące modyfikowanych genetycznie fibroblastów skóry w celu nadprodukcji HGF i ich zastosowania do hodowli komórek wątrobowych) na stronie 165 w pkt. 4 Doktorantka podsumowuje, że jedynie kokultura C3A i HSF z dodatkiem do pożywki HGF charakteryzuje się większą produkcją albuminy, choć w tym przypadku procent komórek martwych jest wyższy niż w przypadku hodowli z udziałem genetycznie modyfikowanych fibroblastów. Proszę o głębszą interpretację tego wniosku.

Autorka nie ustrzegła się również błędów językowych, literówek i błędów interpunkcyjnych:

na stronie 7 „ko kultury” zamiast „kokultury”, na stronie 19 „składa się w czterech płatów” zamiast „składa się z czterech płatów”, na stronie 50 „inkubator CO² do prowadzenie” zamiast „inkubator CO₂ do prowadzenia”, na stronie 78 „od gęstości wysiana” zamiast „od gęstości wysiania”, strona 127 literówka w legendzie rysunku 45 oraz nieliczne błędy interpunkcyjne.

Bibliografia jest niewyedytowana i niewyjustowana. Sposób cytowania nie jest usystematyzowany, generalnie autorka wstawiała rocznik po nazwiskach autorów, a czasami w innych miejscach np. w pozycji 53, 57, 74 i 138. W pozycji 183 brak jest w ogóle rocznika. Cytowania zawierają dowolne liczby autorów, które czasami są skracane do jednego nazwiska, a czasami do dowolnej innej liczby autorów. Autorka zastosowała również skróty językowe zarówno w języku polskim „i wsp”, a w innych miejscach w języku angielskim „et all”. W tej części chciałabym umieścić również uwagę dotyczącą jakości rysunków. W rozdziale 1.1 (Wątroba – budowa i jej funkcje) rysunek 1 ma bardzo słabą jakość.

Należy podkreślić, że przedstawione przeze mnie pytania, zagadnienia do dyskusji oraz wskazane błędy językowe i edycyjne nie są uwagami krytycznymi i nie wpływają na ogólną ocenę rozprawy.

Wnioski końcowe

Doktorantka udowodniła postawione tezy rozprawy doktorskiej, stosując przy tym rzetelny warsztat badawczy i eksperymentalny, co świadczy o odpowiedniej wiedzy w zakresie inżynierii biomedycznej i umiejętnościach w swobodnym korzystaniu z wielu technik badawczych.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. Nr 65 z dnia 16 kwietnia 2003 r., poz. 595 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 Nałęcza PAN o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na oryginalność otrzymanych wyników, ich wysoki potencjał aplikacyjny oraz odpowiedni dorobek Doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Wencel.

Dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. PWR

