

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Wencel

pt.: **“Analiza wpływu różnych podłoży hodowlanych na ludzkie komórki wątrobowe dla potrzeb biosztucznej wątroby”**

opracowana na zlecenie Dyrektora Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęczu Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

1. Tematyka rozprawy

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy problematyki leczenia pacjentów z chorobami wątroby. Leczenie przewlekłej lub ostrej niewydolności tego kluczowego dla funkcjonowania organizmu narządu, spowodowanych m.in. zatruciem, zakażeniem wirusami WZW typu B i C, nadużywaniem leków i alkoholu, jest nadal ogromnym wyzwaniem dla lekarzy. Jedynym ratunkiem dla pacjenta jest obecnie przeszczep wątroby lub jej fragmentów. Niestety liczba potrzebujących chorych przekracza znacznie liczbę dawców. Na całym świecie, listy osób oczekujących na przeszczep wątroby się wydłużają. Stało się to motywacją do poszukiwania alternatywnych metod leczenia chorób wątroby. Jedną z metod jest stosowaniem tzw. sztucznej lub bionicznej wątroby. Urządzenia te wykorzystują żywe komórki wątrobowe – hepatocyty, do

częściowej realizacji funkcji wątroby poza organizmem człowieka. Takie podtrzymywanie funkcji chorego narządu pozwoliłoby pacjentom z ciężką niewydolnością wątroby dożyć transplantacji. Niestety, w większości przypadków hodowanie hepatocytów na dużą skalę kończyły się niepowodzeniem. Hepatocyty są szczególnie wrażliwe na warunki in vitro, w których są hodowane. Podczas hodowli komórki wątrobowe szybko tracą swoje funkcje. Słabnie ich zdolność do wydzielania albuminy czy metabolizmu mocznika. W literaturze można znaleźć wiele prac dotyczących poprawy warunków hodowli hepatocytów. Okazuje się, że jednym ze skutecznych sposobów utrzymania prawidłowych funkcji komórek wątroby jest ich hodowla w obecności fibroblastów lub innych komórek, które wytwarzają niezbędne białka macierzy pozakomórkowej (np. kolagen) oraz czynniki wzrostu. Ponadto optymalizacja hodowli polega na doborze odpowiedniej pożywki lub stosowanie specjalnych bioreaktorów mikroprzepływowych. Jak wiadomo duży wpływ na zachowania komórek mają stosowane podłoża hodowlane, zarówno ich skład chemiczny, topografia czy sztywność. Badane są różnego rodzaju modyfikacje powierzchni naczynek hodowlanych. Są to głównie nanoszone warstwy polimerów pochodzenia naturalnego lub syntetyczne. Trwają także próby hodowli hepatocytów w rusztowaniach trójwymiarowych, np. poprzez umieszczanie ich w materiałach hydrożelowych, czyli w warunkach odwzorowujących naturalne otoczenie hepatocytów w wątrobie. Mimo szeregu badań nadal brakuje standardów hodowli komórek wątrobowych. Dlatego podjęte przez Panią mgr inż. Agnieszkę Wencel w pracy doktorskiej starania nad opracowaniem nowych podłoży hodowlanych dla hepatocytów zwiększających ich przeżywalność i zdolności metaboliczne in vitro są jak najbardziej zasadne.

Podsumowując tematyka rozprawy jest aktualna i ważna, zarówno z punktu widzenia zdobywania nowej wiedzy na temat hodowli hepatocytów jak i praktycznego zastosowania wyników badań w projektowaniu bio-sztucznych systemów wspomaganie funkcjonowania wątroby.

2. Struktura, cel i zakres pracy

Recenzowana praca doktorska napisana jest w języku polskim. Język i układ pracy są poprawne. Rozprawa jest obszerna i liczy 185 stron. Składa się z 8 głównych rozdziałów, które są podzielone na podrozdziały. Zgodnie z dobrą praktyką pisania prac naukowych pierwszy rozdział wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Kolejne

rozdziały dotyczą badań własnych Autorka i podzielone są na materiały i metody, wyniki, dyskusje oraz podsumowanie i wnioski. Rozprawa zakończona jest bogatą bibliografią, zawierającą 213 pozycji literaturowych. Użycie w pracy tak licznych odniesień do wyników prac już opublikowanych świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Rozprawa jest wzbogacona licznymi ilustracjami (58), co podnosi czytelność przygotowanego opracowania.

Na wstępie Autorka opisuje w sposób syntetyczny budowę i funkcję wątroby. Charakteryzuje podstawowe komórki tego narządu – hepatocyty. Wspomina o trudnościach w izolacji i hodowli tych komórek, w szczególności wspomina o ich odróżnicowywaniu i utracie funkcji fizjologicznych i metabolicznych. Podaje przykłady metod hodowli hepatocytów w 2D i 3D. Wskazuje na przewagę stosowania kokultury komórek parenchymalnych z nieparenchymalnymi. Nie uzasadnia jednak przewagi stosowania i wyboru w pracy kokultury hepatocytów z fibroblastami nad innymi kokulturami, szerzej opisywanymi w literaturze przedmiotu, np. komórkami gwiaździstymi czy śródbłonka. Istotnym elementem hodowli komórek jest podłoże hodowlane. Dlatego Doktorantka opisuje hodowle 3D w hydrożelach, sferoidach, rusztowaniach oraz na podłożach pochodzenia naturalnego i syntetycznych polimerach. Ponieważ praca dotyczy hodowli na podłożach hodowlanych, wydaje się, że zbyt skromnie ten temat został potraktowany w przeglądzie literaturowym. Na przykład brakuje informacji o podłożach na bazie macierzy pozakomórkowych wyprodukowanych przez komórki. Nie było również przykładów zastosowania biodrukowania do wytwarzania trójwymiarowych modeli wątroby. W przeglądzie literaturowym nie zabrakło natomiast analizy wpływu czynników wzrostu na hodowle hepatocytów. W szczególności opisano wpływ podstawowego czynnika wzrostu hepatocytów – HGF. Doktorantka omawia także choroby wątroby i sposoby ich leczenia, z dużym naciskiem na najnowsze zaawansowane pozaustrojowe systemy wspomagające pracę wątroby. Na zakończenie części literaturowej brakuje podsumowania, z którego jasno wynikałaby celowość realizacji recenzowanej pracy doktorskiej.

Mimo tych drobnych uchybień można stwierdzić, że Autorka w sposób właściwy i dojrzały przeanalizowała stan wiedzy w przedmiocie rozprawy, korzystając z wielu źródeł literatury światowej.

W rozdziale drugim Doktorantka przedstawia cel pracy i proponuje cztery hipotezy badawcze, które stanowią o naukowym i nowatorskim charakterze pracy.

Jako cel pracy Autorka stawia opracowanie takich metod hodowli ludzkich komórek wątrobowych, które zwiększają ich zdolności metaboliczne oraz spowalniają proces odróżnicowywania się komórek in vitro.

Cztery hipotezy badawcze są jasno sformułowane. Doktorantka postuluje, że

1. Podłoże z suszonych fibroblastów pozwala zastąpić białka macierzy zewnątrzkomórkowej stosowane tradycyjnie do opłaszczania powierzchni hodowlanych.
2. Podłoże z suszonych fibroblastów, zmodyfikowanych genetycznie poprzez wprowadzenie genu kodującego czynnik wzrostu hepatocytów hHGF, powoduje zwiększenie produkcji albuminy oraz tworzenie większej liczby wakuoli apikalnych w hodowlach komórek linii C3A.
3. Podłoże z polietylenoiminy powoduje równomierne rozmieszczenie komórek wątrobowych na powierzchni hodowlanej bez obniżenia ich żywotności i zdolności biosyntetycznych.
4. Zmiana typu i stężenia kolagenazy zwiększa wydajność izolacji a zastosowanie odpowiedniego podłoża hodowlanego poprawi adhezję komórek wątrobowych.

W kolejnych rozdziałach, na 30 stronach, rozprawy opisywane są użyte w badaniach materiały i metody badawcze.

Materiały do hodowli komórkowych i oceny biologicznej hepatocytów zostały dobrane właściwie. Zastosowane w pracy materiały biologiczne pozyskano od pacjentów, na podstawie wymaganych zgód właściwych komisji. Należy w tym miejscu podkreślić, że praca z komórkami izolowanymi z tkanek pacjentów, podnosi walory naukowe recenzowanej rozprawy.

Zaplanowany i zrealizowany szeroki zakres prac badawczych jest silną stroną recenzowanej rozprawy. Metodyka badań obejmowała: (i) izolacje komórek wątrobowych oraz ich charakteryzację, (ii) modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów wraz z oceną transdukcji, oraz produkcji HGF, (iii) hodowle komórkowe na różnych podłożach, w tym podłożach biologicznych, na suszonych fibroblastach niemodyfikowanych i modyfikowanych genetycznie oraz

polietylenoiminie, (iv) ocenę wpływu warunków hodowli na parametry komórek wątrobowych.

Najobszerniejszy fragment rozprawy stanowi omówienie wyników przeprowadzonych badań. Autorka wykazała się umiejętnościami poprawnego i czytelnego przedstawienia uzyskanych rezultatów. Korzystając z dużej liczby zdjęć i wykresów wzbogaconych w zwięzły komentarz tekstowy prezentuje wyniki eksperymentów przeprowadzonych zgodnie z obraną i opisaną w rozprawie metodyką badań. W większości przypadków swoje stwierdzenia podpira poprawnie przeprowadzoną analizą statystyczną.

Niezmiernie istotnym fragmentem pracy jest rozdział 6 pt. Dyskusja. Autorka przeprowadza w nim merytoryczną dyskusję wyników badań dotyczących: (i) wpływu podłoża drHSF na komórki wątrobowe, (ii) modyfikacji komórek HSF oraz ich wpływu na komórki wątrobowe, (iii) zastosowania polietylenoiminy jako materiału podłoża do hodowli hepatocytów, (iv) problemów z hodowlą pierwotnych hepatocytów, oraz (v) wpływu podłoża na morfologię komórek. Autorka umiejętnie zestawia wyniki swoich badań z danymi literaturowymi, dowodząc ich nowatorstwa i słuszności stawianych hipotez oraz postulowanych wniosków.

„Podsumowanie i wnioski” to przedostatni rozdział recenzowanej dysertacji. Biorąc pod uwagę mnogość przeprowadzonych eksperymentów i wynikających z nich licznych wniosków Autorka w sposób przejrzysty podzieliła wnioski na 4 sekcje odpowiadające postawionym tezom. Tym samym bardzo wyraźnie uwidocznione zostały kluczowe rezultaty rozprawy doktorskiej.

Opracowanie kończy rozdział z propozycją przyszłych badań, które mogłyby uwzględniać hodowle w warunkach dynamiczne - w bioreaktorach hepatocytów z komórkami nadprodukującymi czynniki HGF i EGF. Jest to interesujący i obiecujący kierunek dalszych prac badawczych.

Podsumowując, rozprawa doktorska napisana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami pisania tego typu prac naukowych. Z punktu widzenia struktury pracy jedyna uwaga jaka się nasuwa po przeczytaniu rozprawy dotyczy rozdziału „Metody”. Dodanie w nim rysunków przedstawiających plan eksperymentów z uwzględnieniem rodzajów badanych podłoży oraz użytych komórek zwiększyłby czytelność pracy. Czytanie pracy i analizę wyników ułatwiłaby również tabelka podsumowująca eksperymenty, która

zawierałaby rodzaj podłoża, stosunek C3A/komórek wyizolowanych z wątroby do fibroblastów i gęstość komórek.

3. Ocena merytoryczna i uwagi krytyczne

Jak już wcześniej nadmieniono tematyka rozprawy jest aktualna i ważna. Znakomicie wpisuje się w nowoczesne kierunki badań w obszarach biologii i inżynierii biomedycznej, w szczególności hodowli komórek wątrobowych.

Ambitny program badań został w pełni zrealizowany. Autorka pracy bardzo dobrze dobrała różnorodne testy do oceny wpływu modyfikacji genetycznych komórek HSF oraz różnych warunków hodowli na parametry komórek wątrobowych.

Cel pracy został osiągnięty. A wyniki badań potwierdzają słuszność postawionych hipotez badawczych.

Doktorantka wykazała skuteczność nowej metody hodowli hepatocytów poprzez stosowanie do tego celu podłoży z suszonych fibroblastów. Uzyskała poprawę funkcji metabolicznych komórek. Zwiększyła się produkcja albuminy oraz wakuoli apikalnych w porównaniu do innych podłoży hodowlanych badanych w pracy. Podobny efekt uzyskano stosując pokrycia z PEI. Ponadto zastosowanie tego materiału skutkowało równomiernym rozmieszczeniem komórek wątrobowych na powierzchni hodowlanej. Stwierdzono jednak, że zastosowanie dużej dawki polimeru może być toksyczne dla komórek.

W recenzowanej rozprawie po raz pierwszy zaprezentowano wpływ modyfikowanych genetycznie fibroblastów izolowanych z ludzkiej skóry nadprodukujących czynnik wzrostu hepatocytów HGF na komórki wątrobowe. Powstała linia komórkowa HSF-reHGF produkowała o 20% więcej HGF w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi. Ponownie stwierdzono, że komórki C3A hodowlane w obecności modyfikowanych komórek żywych i wysuszonych zdolne były do wydzielania większej ilości albuminy i tworzenie większej liczby wakuoli apikalnych.

Do oryginalnych osiągnięć należy również zaliczyć opracowanie optymalnej izolacji hepatocytów metodą maceracji z wykorzystaniem kolagenazy II o stężeniu 0,1%. Ponadto wykazano, że komórki najlepiej adherowały do fibronektyny.

Wysoko oceniam poziom naukowy pracy. Autorka uzyskała, często po raz pierwszy na świecie, wiele wartościowych rezultatów, które mogą być użyte do izolacji i hodowli komórek wątrobowych.

Mimo wysokiej jakości przeprowadzonych prac badawczych, czytając rozprawę nasuwają się pewne uwagi i pytania zarówno do przyjętej metodyki jak i uzyskanych wyników:

1. We wszystkich testach polegających na liczeniu komórek martwych, zastanawiające jest, dlaczego nie podano żywotności komórek, czyli udziału procentowego żywych komórek w całej analizowanej próbce? Podawano natomiast liczbę komórek żywych i albo procentowy udział komórek martwych albo liczbę komórek martwych.
2. Jak przygotowywano do liczenia komórki C3A hodowane na podłożach z fibroblastów żywych, jak i wysuszonych? Czy podczas trypsynizacji uwalniano również fibroblasty? Jeśli tak, to jak odróżniano fibroblasty od komórek C3A od HSF w zawieszynie?
3. Jaki był powód ciągłej zmiany gęstości fibroblastów oraz stosunku komórek C3A do HSF pomiędzy różnymi eksperymentami? Proszę o omówienie możliwego wpływu zmiany początkowej gęstości fibroblastów oraz stosunku C3A do HSF na interpretację wyników.
4. Dlaczego polietylenoimina (PEI) została wybrana jako materiał na podłoże, skoro w niektórych pracach wykazano, że jest toksyczna, szczególnie forma rozgałęziona tego polimeru¹? Zresztą apoptozę komórek na PEI wykazano w rozdziale 5.6.5.
5. W rozdział 5.1.2. należałoby dodać rysunek przedstawiający metody pomiaru szerokości komórek na zdjęciach SEM. Wymiary komórek podane są z dokładnością do tysięcznych części mikrometra – jak to możliwe?
6. W metodyce brakuje opisu metod charakteryzowania właściwości stosowanych podłoży. Na przykład nie opisano metodyki pomiaru chropowatości. W pracy nie badano sztywności podłoży, a parametr ten mógł mieć istotny wpływ na uzyskane wyniki.

¹ Vala Kafil and Yadollah Omid. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *Bioimpacts*. 2011; 1(1): 23–30.

7. Autorka pisze o prawdopodobnym toksycznym efekcie czynnika HGF na komórki C3A (Rozdział 5.5.1, str. 105). Dlaczego nie zbadano wpływu stężenia HGF na żywotność/ proliferację komórek C3A, np. poprzez inkubację komórek C3A z serią rozcieńczeń HGF i oceną np. aktywności metabolicznej (test MTT) czy pomiaru stężenia DNA, i nie wybrano optymalnego stężenia przed rozpoczęciem eksperymentu? Czy mierzono stężenie czynnika HGF w pożywce hodowlanej podczas hodowli C3A na podłożach HSF_reHGF oraz dr HSF_reHGF?
8. Wyniki testu MTS (Rozdział 5.5.3, str. 110) wykazują odwrotny trend w porównaniu do liczby żywych komórek (rysunek 35A). Czy Autorka uważa, iż niższa aktywność metaboliczna mogła być wynikiem osiągnięcia stanu konfluencji w hodowlach na podłożu kolagenowym?
9. Doktorantka w kilku miejscach pracy używa skrótu EGF (np. w HSF_reEGF i drHSF_reEGF w podrozdziale 4.12.5 na stronie 71). Początkowo uznałem, iż jest to po prostu błąd i litera E wkradła się zamiast litery H w skrócie HGF (czynnik wzrostu hematytów). Jednak na rysunku 49 skrót EGF pojawia się ponownie (EGF i drEGF), a w opisie rysunku skrót EGF został opisany jako nabłonkowy czynnik wzrostu, czyli Epidermal growth factor. Skrót EGF pojawia się również na stronie 132. Nasuwa się więc pytanie, czy fibroblasty HSF zostały dodatkowo zmodyfikowane genetycznie przez wprowadzenie genu kodującego EGF, co nie zostało opisane w pracy, czy jest to dalsza kontynuacja pomyłki?

Wystąpiły też drobne błędy edytorskie:

- Brakuje tytułów i numerów tabel w rozdz. 3.5, 3.6 i 4.1
- Str. 71 – rozdział 4.12.5. Wers 6: Matrigel to nazwa własna i powinna być pisana z wielkiej litery.
- Str. 50. Przy „Inkubator CO₂” błędnie użyto indeksu górnego, zamiast dolnego.
- Str. 78. – rozdział 5.1. Wers 4: „....., aby nie traciło swoich właściwości” (mowa o podłożu, więc nie „traciły”).
- Str. 79. – rozdział 5.1.2. Wers 2: Wydaje mi się, że w zdaniu „Przypuszcza się, że na zdolność komórek” Brakuje słowa „wpływ”.
- Str. 80. – rozdział 5.1.2. Brakuje jednostek dla wartości Ra.
- Str. 80. – rysunek 12. Nazwa skaningowy mikroskop elektronowy nie jest nazwą własną i należy ją pisać z małych liter.

Należy podkreślić, że powyższe uwagi i usterki nie obniżają wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Wencel. Autorka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i

praktyczną z zakresu badań komórkowych. Wielowątkowość podjętej tematyki badawczej wymagała od Doktorantki wykorzystania szeregu nowoczesnych metod i urządzeń badawczych. W konsekwencji badań, powstała nowa wiedza na temat hodowli hepatocytów na różnych podłożach hodowlanych, w tym na nowych podłożach na bazie wysuszonych fibroblastów.

Podsumowując stwierdzam, że opiniowana rozprawa doktorska posiada wiele aspektów poznawczych i stanowi oryginalny wkład Autorki w rozwój hodowli hepatocytów. Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest opracowanie nowych podłoży hodowlanych dla ludzkich komórek wątrobowych na potrzeby biosztucznej wątroby.

4. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższą opinię, uważam, że rozprawa mgr inż. Agnieszki Wencel zatytułowana: "Analiza wpływu różnych podłoży hodowlanych na ludzkie komórki wątrobowe dla potrzeb biosztucznej wątroby", spełnia z wyraźnym nadmiarem wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki”. Wniosuję więc do Rady Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęczu Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.

Ponadto, ze względu na bardzo duży zakres zrealizowanych badań, ich wysoki poziom naukowy i duże znaczenie dla rozwoju dyscypliny, jak również wyróżniającą aktywność naukową mgr inż. Agnieszki Wencel, które moim zdaniem znacznie przekraczają zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim, wniosuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.

Wojciech Świążkowski

