



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA

Kraków, 9 września 2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Jakubowskiej
pt. *"Dynamic culture of a new genetically modified liver-derived cell
line as a model of bioartificial liver"*

zrealizowanej pod kierunkiem

Promotor prof. dr hab. inż. Doroty G. Pijanowskiej
i Promotora pomocniczego Dr. Krzysztofa D. Pluty

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały
Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej
im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk
oraz zlecenia Dyrektora Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii
Biomedycznej PAN

Prof. dr. hab. inż. Piotra Ładyżyńskiego
z dnia 12 lipca 2024

Niewydolność wątroby, czyli narządu, który pełni wiele ważnych funkcji w naszym organizmie, nie zawsze może być leczona farmakologicznie. Często jedynym rozwiązaniem jest transplantacja wątroby, a gdy nie jest ona możliwa w danym momencie, konieczne są tzw. terapie pomostowe, czyli bazujące na systemach wspomaganie tego niewydolnego narządu. Obecnie duże nadzieje pokłada się w tzw. biosztucznych systemach, zawierających komórki, które nie tylko wspomagają procesy detoksykacyjne np. w kierunku przemiany amoniaku w mocznik ale mogą pełnić inną rolę taką jak np. synteza albuminy.



WIMiC

**Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów**

al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. +48 12 617 44 48, fax. +48 12 617 33 71
e-mail: epamula@agh.edu.pl, www.ceramika.agh.edu.pl
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

W kontekście powyższych przesłanek pani mgr inż. Małgorzata Jakubowska w ramach swojej pracy doktorskiej podjęła się opracowania nowej genetycznie zmodyfikowanej linii komórkowej wywodzącej się z raka pierwotnego wątroby, która w przyszłości mogłaby zostać zastosowana w biosztucznych systemach wspomagania wątroby. Postawiła tezę, że wykorzystując wektory lentiwirusowe komórki takie będą w stanie eliminować toksyczny amoniak, przekształcając go w mocznik, dzięki wprowadzeniu do nich dwóch genów: arginazy 1 (*ARG1*) i transkarbamylazy ornitynowej (*OTC*), które pozwolą na odtworzenie cyklu mocznikowego.

Aby zrealizować postawiony cel Pani mgr inż. Małgorzata Jakubowska zrealizowała szereg badań doświadczalnych, którymi było: (1) przeprowadzenie modyfikacji genetycznej komórek z linii C3A, (2) potwierdzenie, że modyfikacja jest skuteczna, na poziomach DNA, RNA, syntezy białka i aktywności enzymatycznej, oraz (3) wykazanie funkcjonalności opracowanej linii komórkowej w warunkach *in vitro*: statycznych i dynamicznych, przy czym te ostatnie badania wymagały zaprojektowania i wykonania bioreaktora przepływowego.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest trafny, aktualny i bardzo dobrze uzasadniony.

Praca doktorska pani mgr inż. Małgorzaty Jakubowskiej liczy 195 stron i jest zredagowana w języku angielskim. Na początku pracy zamieszczono *Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Przegląd literatury* (30 str.). Kolejne rozdziały to *Cel i tezy pracy* (1 str.), *Materiały* (11 str.), *Metody* (25 str.), *Wyniki* (48 str.), *Dyskusja* (27 str.), *Wnioski* (3 str.). Pracę zamyka *Piśmiennictwo* (aż 286 pozycji). Układ pracy jest więc typowy dla rozpraw doktorskich, a pracę cechuje bardzo dobra proporcja między częścią literaturową a doświadczalną.

W Rozdziale 1 doktorantka pokrótce opisała zagadnienia dotyczące anatomii i fizjologii wątroby, kładąc szczególny nacisk na jej budowę oraz funkcje metaboliczne, w tym m.in. syntezę albumin i eliminację amoniaku. Następnie wymieniła choroby tego narządu, odnosząc się do danych statystycznych. Dalej wykazała, że transplantacja tego narządu, pomimo swojej skuteczności ma też pewne ograniczenia z uwagi na niewystarczającą liczbę dawców tego narządu, w porównaniu do rosnącej liczby pacjentów na liście oczekujących, cytując dane dla Stanów Zjednoczonych. Chciałabym poprosić – aby doktorantka już w czasie publicznej obrony – wspomniała jak kształtują się dane statystyczne w tym względzie w Polsce (<http://www.poltransplant.org.pl>). Następnie autorka bardzo dobrze zreferowała strategię wspomagania pracy wątroby, gdy jest ona niewydolna, wymieniając transplantację hepatocytów oraz techniki inżynierii tkankowej. W tym ostatnim podejściu omówiła najnowsze osiągnięcia zarówno w zakresie deceluraryzacji tkanki wątrobowej a następnie zasiedlania jej komórkami pacjenta, jednak dotąd uzyskiwane wyniki nie są spektakularne. Podobnie stosowanie metod przyrostowych z wykorzystaniem biotuszy zawierających zawieszony w nich hepatocyty, sprawdza się, ale tylko w zakresie modeli tkankowych, stosowanych najczęściej w celu wstępnego *in vitro* screeningu bezpieczeństwa i skuteczności nowych potencjalnych leków. Doktorantka skierowała więc swoje zainteresowania na sztuczne i biosztuczne systemy wspomagania pracy wątroby, czyli urządzenia stanowiące terapię pomostową, polegającą na wsparciu jej funkcji do czasu przeszczepu lub regeneracji. Opisała kilkanaście sztucznych systemów opierając się na najnowszej literaturze przedmiotu a potem omówiła biosztuczne systemy, nazywane biosztuczną wątrobą (z ang. *bioartificial liver*, BAL) zawierające komórki, które są w stanie pełnić nie tylko rolę detoksykacyjną ale i metaboliczną. Jednym z takich rozwiązań jest pozaustrojowe urządzenie wspomagające wątrobę (Extracorporeal Liver Assist Device, ELAD), zawierające komórki z linii C3A, które dotarło do III fazy badań klinicznych. Dalej omówiła rodzaje komórek stosowanych

w tych urządzeniach, a więc hepatocyty ludzkie, hepatocyty pochodzenia świńskiego, komórki wywodzące się z komórek nowotworowych albo powstałe z komórek macierzystych, np. indukowanych pluripotencjalnych (iPSCs) albo embrionalnych (ESCs). Chciałabym podkreślić, że rozdział ten został przygotowany bardzo skrupulatnie, w oparciu o odpowiednią, najnowszą literaturę, został wzbogacony w bardzo ładne ilustracje, które doskonale obrazują najważniejsze elementy składowe i ideę każdego z omawianych rozwiązań. Świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu autorki w referowanej tematyce. Tu chciałabym zachęcić doktorantkę do przygotowania artykułu przeglądowego na temat systemów wspomagania pracy niewydolnej wątroby, bo uważam, że takie opracowanie spotka się z dużym zainteresowaniem środowiska naukowego. Uważam więc, że *Przegląd literatury* został właściwie zredagowany a omawiane w nim zagadnienia są w pełni uzasadnione tematyką doktoratu.

W Rozdziale 2 doktorantka przedstawiła cel swojej rozprawy, postawiła tezę główną i dwie tezy poboczne, które w mojej opinii zostały właściwie sformułowane.

W Rozdziale 3 autorka opisała materiały wykorzystane do modyfikacji genetycznej komórek, stosowane linie komórkowe, pożywki, przeciwciała, odczynniki, a także zestawy i odczynniki niezbędne do przeprowadzenia badań potwierdzających skuteczność uzyskanych modyfikacji. Wymieniono również aparaturę, która została wykorzystana a ponadto materiały zużywalne i wykorzystywane programy komputerowe.

W Rozdziale 4 opisano metody i sposób prowadzenia badań w zakresie kultur komórkowych, izolacji DNA, metod analitycznych, biochemicznych, immunoenzymatycznych, mikroskopii fluorescencyjnej, cytometrii przepływowej. Opisano proces modyfikacji genetycznej komórek C3A i wyprowadzenie nowej linii komórkowej C3A_AO_P2A, a następnie ocenę morfologii, żywotności i właściwości uzyskanych komórek. W dalszej części opisano jak

skonstruowano prototyp bioreaktora kapilarnego do hodowli uzyskanych komórek, a następnie jak prowadzono optymalizację procesu hodowli komórek i na końcu jak oceniano ich żywotność i aktywność metaboliczną. Oba rozdziały 3 i 4 stanowią wzorowy przykład tego jak należy opisywać przeprowadzone eksperymenty w pracach naukowych i również nie mam do tej części dysertacji żadnych zastrzeżeń.

W Rozdziale 4 opisano wyniki badań, najpierw dotyczące genetycznej modyfikacji komórek z linii C3A za pomocą wektora lentiwirusowego niosącego geny arginazy 1 (*hARG1*) i transkarbamyazy ornitynowej (*hOTC*) pod kontrolą silnego promotora z wykorzystaniem selekcji antybiotykowej. Badania wykazały, że niemal 100% komórek nowej linii C3A_AP_P2A jest zmodyfikowanych. Skuteczność modyfikacji potwierdzono na poziomie DNA wykorzystując metodę PCR, która potwierdziła integrację wprowadzanych genów z genomem komórek. Podobnie, za pomocą techniki RT-qPCR wykazano ponad 30-krotnie większą syntezę mRNA *hARG1* i ponad 40-krotnie większą syntezę mRNA *hOTC* w porównaniu z niemodyfikowanymi komórkami. Badania za pomocą Western blot wykazały, że ekspresja tych genów, a więc synteza białek, nie była już jednak tak spektakularna. Czy doktorantka – w czasie publicznej obrony – mogłaby skomentować jakie mogą być tego przyczyny? Zastanawia mnie również odmienne zachowanie się obu linii jeśli chodzi o żywotność w funkcji czasu hodowli (str. 117). Doktorantka oprócz powyższych testów, przeprowadziła również badania aktywności enzymatycznej *hARG1*, które wykazały, że zmodyfikowane przez nią komórki produkują znacznie więcej tego enzymu i jest on aktywny. W przypadku *hOTC*, niestety poziom jej aktywności był poniżej oznaczalności zastosowanej metody analitycznej. Doktorantka zbadała jednak skuteczność jej linii komórkowej w kierunku syntezy mocznika, która była statystycznie większa niż w przypadku niemodyfikowanej linii komórkowej. Oceniała też wpływ stresu oksydacyjnego i nitrozycyjnego na żywotność komórek, ich aktywność metaboliczną i syntezę albuminy. Badania wykazały wyższą odporność komórek na stres i intensywniejszą syntezę albuminy. Oprócz powyższych badań

prorowadzonych w warunkach hodowli statycznej *in vitro*, doktorantka skonstruowała bioreaktor membranowy, scharakteryzowała mikrostrukturę i zwilżalność membrany polisulfonowej, wykazała, że powierzchnia membrany nie jest cytotoksyczna ale wspiera adhezję i wzrost hepatocytów a także ich funkcje sekrecyjne, objawiające się zwiększoną produkcją albumin. Następnie dokonała optymalizacji procesu hodowli komórek w warunkach dynamicznych, dowodząc, że hodowla dynamiczna jest bardziej efektywna. Rozdział ten został przygotowany równie starannie jak poprzednie, rysunki są czytelne a wyniki właściwie przedyskutowane.

W Rozdziale 6 kandydatka do stopnia doktora poddała dogłębnej dyskusji wszystkie przedstawione przez nią w dysertacji wyniki, odnosząc się do danych literaturowych i jednocześnie podkreślając nowatorskość jej podejścia. Rozdział został bardzo dobrze zredagowany i nie mam do niego zastrzeżeń ani merytorycznych ani edytorskich. Na podkreślenie zasługuje, że większość przedstawionych w rozprawie wyników została opublikowana w artykule: *Jakubowska, M. et al. (2024) Hollow fiber bioreactor with genetically modified hepatic cells as a model of biologically active function block of the bioartificial liver', Biocybernetics and Biomedical Engineering, 44(1), pp. 9–19. dostępny pod linkiem: <https://doi.org/10.1016/J.BBE.2023.11.003>. Oznacza to, że praca ta przeszła już bardzo wnikliwy proces recenzji. Jestem przekonana, że z uwagi na jej jakość naukową w krótkim czasie zostanie ona zauważona przez środowisko naukowe, co objawi się cytowaniami.*

W Rozdziale 7 doktorantka podsumowała swoją pracę doktorską, przedstawiła najważniejsze wnioski i nakreśliła dalsze plany badawcze. Wykazała tym samym, że założone cele pracy zostały zrealizowane a postawiona teza została zweryfikowana eksperymentalnie. Jestem pod wrażeniem całego planu badawczego, który został doskonale przemyślany, zakresu przeprowadzonych badań, przedstawienia i dyskusji uzyskanych wyników, a także wymiernych efektów, nie tylko naukowych ale i aplikacyjnych.

Pytania jakie stawiam w recenzji są zaproszeniem doktorantki do dyskusji naukowej w czasie obrony.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że praca doktorska mgr inż. Małgorzaty Jakubowskiej pt. *“Dynamic culture of a new genetically modified liver-derived cell line as a model of bioartificial liver”* spełnia z nadmiarem wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria biomedyczna określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478).

Wnoszę więc o przyjęcie recenzowanej rozprawy oraz dopuszczenie pani mgr inż. Małgorzaty Jakubowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Permut', is located in the lower right quadrant of the page.