



Ewa Szolańska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Jakubowskiej zatytułowanej  
„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”**

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Pracowni Inżynierii Tkankowej w Zakładzie Mikrobiosystemów Hybrydowych i Analitycznych Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk, pod naukowym kierunkiem prof. dr hab. Doroty Pijanowskiej oraz dr hab. Krzysztofa Pluty, promotora pomocniczego. Rozprawa ma charakter doświadczalny.

Projekt doktorski Pani Małgorzaty Jakubowskiej był związany z opracowaniem biosztucznego systemu wspomaganie wątroby (ang. *Bioartificial Liver Support*, BAL), w szczególności dotyczył opracowania jego części biologicznej. Tematyka badawcza jest konsekwentnie rozwijana w zespole Promotorów rozprawy od wielu lat. Moim zdaniem oceniana rozprawa doktorska prezentuje istotny postęp w tych badaniach.

Systemy wspomaganie wątroby obok transplantacji hepatocytów stanowią najbardziej obiecujące alternatywne rozwiązanie dla transplantacji wątroby. Przeszczep narządu jest dotychczas jedynym skutecznym sposobem leczenia ostrej niewydolności wątroby, która jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na całym świecie. Jednak pomimo rosnącej społecznej świadomości na temat transplantacji i zwiększenia liczby przeszczepień od żyjących dawców, w Polsce coraz więcej osób czeka na przeszczep. Ze względu na długi czas oczekiwania na planowy przeszczep wątroby istnieje potrzeba stosowania terapii pomostowej polegającej na wspomaganie niewydolnego narządu do czasu przeszczepu lub regeneracji wątroby. Pomimo intensywnie prowadzonych od kilku dekad badań w wielu ośrodkach na całym świecie i opracowania zaawansowanych systemów wspomaganie wątroby, dotychczas nie skonstruowano urządzenia skutecznie wspomagającego zaburzone funkcje narządu.

Podczas opracowywania biosztucznego systemu wspomagającego wątrobę kluczową kwestią jest wybór materiału biologicznego. Najbardziej odpowiednim źródłem komórek są ludzkie hepatocyty. Jednak podobnie jak w przypadku narządów do przeszczepu ich dostępność jest ograniczona. Dodatkowo hodowane poza organizmem nie dzielą się i szybko odróżnicowują, tracąc zdolność do pełnienia funkcji wątrobowych. Alternatywą jest wykorzystanie komórek nowotworowych o nieograniczonym potencjale wzrostu i charakteryzujących się stabilnością fenotypową, takich jak komórki C3A, otrzymane pierwotnie jako subklon komórek HepG2 pochodzących z raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma*, HCC). Komórki C3A były wykorzystywane w dotychczas najlepiej przebadanym klinicznie systemie wspomaganie wątroby ELAD. Jednak ich istotną wadą jest нефункциональный cykl mocznikowy, spowodowany bardzo niskim poziomem ekspresji genów arginazy (*ARG1*) oraz transkarbamylazy ornitynowej (*OTC*), kodujących kluczowe enzymy cyklu odpowiedzialnego za przekształcenie amoniaku w nietoksyczny mocznik. Obniżony metabolizm amoniaku jest najbardziej prawdopodobną przyczyną braku oczekiwanego efektu terapeutycznego zastosowania systemów wspomaganie wątroby

wykorzystujących komórki C3A. Mając to na uwadze należy wysoko ocenić trafność i aktualność wyboru tematyki rozprawy Pani Małgorzaty Jakubowskiej.

Głównym celem badań zaprezentowanych w rozprawie było opracowanie modelu systemu dynamicznej hodowli komórek, opartego o bioreaktor z membranami kapilarnymi zasiedlony komórkami ludzkiego raka wątrobowokomórkowego. Realizację ambitnego projektu doktorskiego Pani Małgorzata Jakubowska rozpoczęła od otrzymania nowej genetycznie zmodyfikowanej linii komórek C3A z przywróconym cyklem mocznikowym. Doktorantka wykorzystwała w tym celu samodzielnie skonstruowane wektory lentiwirusowe oparte na genomie HIV-1. Istotną nowością w stosunku do strategii modyfikacji genetycznej stosowanej podczas wcześniejszych badań prowadzonych w Pracowni Inżynierii Tkankowej było użycie plazmidu transferowego niosącego jednocześnie dwa geny (*hARG1* i *hOTC*) pod kontrolą silnego promotora (CMV) oraz zastosowanie selekcji antybiotykowej. Umożliwiło to otrzymanie linii komórek C3A\_AO\_P2A zmodyfikowanych genetycznie w blisko 100%. Ekspresja transgenów *ARG1* i *OTC* na poziomie mRNA była odpowiednio ponad 30-krotnie i 40-krotnie wyższa w nowo otrzymanych komórkach, w porównaniu z obserwowaną w genetycznie zmodyfikowanych komórkach C3A\_AO\_III poprzedniej generacji otrzymanych w Pracowni Inżynierii Tkankowej. Natomiast znacznie słabszy efekt modyfikacji obserwowano na poziomie produkcji obu białek i ich aktywności enzymatycznej. Po wykazaniu, że modyfikacja genetyczna nie wpłynęła negatywnie na morfologię i żywotność komórek Doktorantka scharakteryzowała zdolność komórek C3A\_AO\_P2A do pełnienia specyficznych funkcji metabolicznych i biosyntetycznych, za które są odpowiedzialne ludzkie hepatocyty w warunkach *in vivo*. Pani Jakubowska wykazała, że komórki C3A\_AO\_P2A produkują i wydzielają mocznik wydajniej w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi genetycznie oraz komórkami C3A\_AO\_III. Obie zmodyfikowane genetycznie linie w warunkach stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego wykazywały wyższą żywotność i aktywność metaboliczną w porównaniu z komórkami linii wyjściowej. Jest to bardzo istotny wynik w kontekście potencjalnego zastosowania terapeutycznego, ponieważ komórki zasiedlające system wspomaganą wątroby mogą być ekspozowane na niefizjologiczne stężenia amoniaku w surowicy krwi pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby.

Jednym z najczęściej stosowanych wyznaczników funkcji hepatocytów jest produkcja albuminy, pełniącej ważną rolę w organizmie. Analizując właściwości nowej linii komórkowej podczas hodowli w warunkach statycznych Doktorantka wykazała zdolność komórek C3A\_AO\_P2A do wydzielania albuminy na poziomie podobnym do obserwowanego w przypadku komórek linii wyjściowej. Dodatkowo traktowanie chlorkiem amonu indukowało ekspresję genu kodującego albuminę oraz powodowało wzrost wydzielania białka.

Kolejnym etapem badań przeprowadzonych przez Doktorantkę była ocena funkcjonalności otrzymanej linii komórkowej w warunkach hodowli przepływowej. W tym celu Pani Małgorzata Jakubowska skonstruowała system do hodowli dynamicznej w oparciu o samodzielnie przygotowany bioreaktor z membranami kapilarnymi. Analizę struktury użytych membran polisulfonowych, w celu określenia wielkości porów, Doktorantka przeprowadziła z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Zbadała również właściwości fizyczne oraz potwierdziła biokompatybilność membran. Co istotne wykazała, że system zapewnia wydajny dwukierunkowy transport cząsteczek wielkości poniżej 100 nm. Eksperymentalną optymalizację warunków hodowli przepływowej, polegającą na ustaleniu liczby komórek zasiedlających bioreaktor oraz szybkości przepływu medium hodowlanego, Doktorantka przeprowadziła opierając się na wynikach symulacji matematycznej.

Podczas dwóch niezależnych eksperymentów Doktorantka zaobserwowała kilkakrotny wzrost produkcji albuminy przez wszystkie badane komórki HCC hodowane w bioreaktorze, w porównaniu z hodowlą statyczną. W warunkach hodowli przepływowej najwięcej albuminy wydelały nowo otrzymane komórki C3A\_AO\_P2A. Uzyskane wyniki potwierdziły przewagę hodowli w bioreaktorze z przepływem medium, zapewniającym dostępność składników odżywczych w tym nieograniczony dostęp glukozy, oraz szybką wymianę gazową. Dodatkowo hodowla trójwymiarowa odzwierciedlająca mikrośrodowisko tkanki zapewniała korzystniejsze warunki dla wzrostu komórek w porównaniu z tradycyjną hodowlą 2D.

Podsumowując Pani Małgorzata Jakubowska osiągnęła zamierzony cel. Otrzymała linię komórkową z przywróconym cyklem mocznikowym i zwiększoną odpornością na wysokie stężenia amoniaku. Nowo otrzymane komórki w warunkach hodowli przepływowych wykazują wyższą aktywnością metaboliczną i biosyntetyczną w porównaniu z wyjściową linią C3A. Przedstawione w rozprawie wyniki wskazują na możliwość wykorzystania komórek C3A\_AO\_P2A w biosztucznych systemach wspomagania wątroby. Co istotne w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych wykorzystana przez Doktorantkę strategia modyfikacji genetycznej z użyciem wektorów lentivirusowych uważana jest za bezpieczną do zastosowań klinicznych.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Jakubowskiej została przygotowana w formie monografii naukowej, jej tytuł odzwierciedla zawartą treść. Napisane w języku angielskim opracowanie liczy 195 stron. Ma poprawny układ i strukturę, na którą składają się: *Spis treści*, *Wykaz stosowanych skrótów*, *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Przegląd literatury*, *Cel i tezy badawcze*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*, *Bibliografia*. Proporcje poszczególnych części rozprawy są prawidłowe.

W liczącym 35 stron *Przeglądzie literatury* Autorka przedstawiła istotne informacje dotyczące budowy, fizjologii oraz patologii wątroby. Część rozdziału jest poświęcona metodom leczenia niewydolności wątroby stosowanym w praktyce klinicznej oraz kompetentnemu przeglądowi literatury dotyczącej strategii eksperymentalnych, z uwzględnieniem wykorzystujących narzędzia inżynierii tkankowej, zyskującej coraz większe znaczenie w praktyce klinicznej. Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat skuteczności sztucznych i biosztucznych systemów wspomagania wątroby weryfikowanej w modelach zwierzęcych oraz podczas badań klinicznych. Rozdział kończy opis komórek będących potencjalną alternatywą dla zastosowania ludzkich hepatocytów w biosztucznych systemach wspomagania wątroby. Autorka tekst rozdziału zilustrowała starannie opracowanymi rycinami, które utworzyła za pomocą programu BioRender. Większość z nich to schematy omawianych systemów wspomagania wątroby, ułatwiające czytelnikowi zrozumienie zasad funkcjonowania tych często skomplikowanych urządzeń. Liczne z cytowanych prac zostały opublikowane w ostatnich latach, co świadczy o śledzeniu przez Autorkę na bieżąco literatury przedmiotu i wskazuje na Jej bardzo dobre przygotowanie merytoryczne w zakresie problematyki badań.

Główny *Cel pracy* oraz cele szczegółowe zostały klarownie sformułowane. Autorka postawiła również tezy badawcze, które zweryfikowała w kolejnych etapach realizacji projektu.

Rozdział *Materiały* zawiera kompletny usystematyzowany wykaz wykorzystanych materiałów opracowany w formie przejrzystych tabel. W kolejnym 26 stronicowym rozdziale *Metody* Autorka w kompetentny sposób opisała wykorzystywane metody. Przygotowanie bioreaktora oraz całego systemu do hodowli przepływowej zilustrowała poglądowymi

zdjęciami, które podobnie jak wspomniane już powyżej schematy bardzo ułatwiają lekturę rozprawy. Zwraca uwagę stosowanie przez Doktorantkę różnych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej, biochemii, biologii komórki, biofizyki, biotechnologii, inżynierii biomedycznej, modelowania matematycznego i statystyki.

Liczący 58 stron maszynopisu rozdział *Wyniki* to starannie skonstruowany opis przeprowadzonych badań. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w postaci 42 starannie opracowanych rycin oraz 2 tabel. Racjonalnie zaprojektowane doświadczenia zostały wykonane z uwzględnieniem niezbędnych kontroli i układają się w logiczny ciąg badań. Zastosowane metody badawcze zostały odpowiednio dobrane do rozwiązywanego problemu, a ich szerokie spektrum świadczy o dużych umiejętnościach praktycznych Doktorantki. Rozdział został starannie opracowany, jedyne niedociągnięcia dotyczą małego rozmiaru mikrofotografii przedstawionych na Rycinach 33 i 40, co utrudnia czytelnikowi ocenę morfologii komórek oraz formowania apikalnych wakuoli. Szkoda, ponieważ są to interesujące analizy. Korekty wymaga podpis Ryciny 38, ponieważ mikrofotografie obrazują zawartość wyznakowanej fluorescencyjnie albuminy w komórkach, a nie sekrecję białka.

Zawarta na 21 stronach *Dyskusja* jest podzielona na sekcje tematyczne, w których Doktorantka szczegółowo i w logiczny sposób analizuje i interpretuje własne wyniki w kontekście danych literaturowych. Należy docenić wnikliwość i krytyczną ocenę uzyskanych danych. Świadczy to o dużej dojrzałości Autorki. Przykładowo, pomimo osiągnięcia zamierzonego celu jakim było otrzymanie linii komórkowej o zwiększonej zdolności do produkcji mocznika, Doktorantka zaproponowała wprowadzenie kolejnych modyfikacji genetycznych w celu osiągnięcia funkcjonalności cyklu mocznikowego na poziomie zbliżonym do wydajności pierwotnych ludzkich hepatocytów.

*Wnioski* z przeprowadzonych badań Pani Małgorzata Jakubowska sformułowała w postaci dwunastu stwierdzeń, które znajdują poparcie w uzyskanych danych. Autorka zamieściła w rozdziale również plany kontynuacji badań.

*Bibliografia* zawiera zestawienie 286 pozycji cytowanych w rozprawie, głównie z ostatnich lat. Dobór prac świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury dotyczącej tematyki projektu doktorskiego, którą Doktorantka wykazała również jako współautorka prac przeglądowych (*Postępy Biochemii*, 2019; *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 2021).

Moim zdaniem przydatne byłoby zamieszczenie w rozprawie sekcji zawierającej informację o publikacjach, których współautorką jest Pani Małgorzata Jakubowska.

Istotna część wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w pracy „Hollow fiber bioreactor with genetically modified hepatic cells as a model of biologically active function block of the bioartificial liver” (*Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 2024). Pani Małgorzata Jakubowska jest jej pierwszą Autorką.

Rozprawa została bardzo starannie przygotowana pod względem merytorycznym i redakcyjnym. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na kilkakrotnie użyte, również w *Streszczeniu*, niezręczne sformułowanie „brakujące geny” („missing genes”). W wyniku modyfikacji genetycznej wprowadzane są do komórek C3A „dodatkowe” kopie genów *ARG1* i *OTC*, a nie brakujące geny. Autorka charakteryzując w *Dyskusji* materiał, z którego wykonano membrany pisze o „good psychological properties” polysulfonu (str. 169). To przypuszczalnie autokorekta edytora tekstu.

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka pytań, poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

- Proszę o wyjaśnienie różnicy w szybkości migracji w żelu poliakrylamidowym białka ARG1 zidentyfikowanego metodą Western blot w ekstraktach białkowych z komórek C3A\_AO\_III oraz C3A\_AO\_P2A przedstawionych na Rycinie 31A.
- Proszę o skomentowanie obserwowanego w przypadku jednego z powtórzeń biologicznych dwukrotnego wzrostu poziomu ARG1 w ekstraktach białkowych z komórek C3A\_AO\_P2A poddanych dodatkowej selekcji antybiotykowej (Rycina 31B), podczas gdy linia komórkowa stanowi populację komórek zmodyfikowanych genetycznie w blisko 100%.
- Komórki C3A\_AO\_III stanowią mieszaną populację, w której liczba komórek wykazujących ekspresję obu transgenów nie przekracza 25%. Czy były podejmowane próby wyselekcjonowania „czystej linii” z ekspresją obu transgenów?
- W rozprawie znajduje się informacja o tym, że procent genetycznie modyfikowanych komórek w populacji C3A\_AO\_III obniża się przy kolejnych pasażach, ale Autorka nie sprecyzowała z jakich pasaży pochodziły komórki wykorzystywane w poszczególnych eksperymentach. Poproszę o wyjaśnienie.

### **Wnioski końcowe**

Recenzowana rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętności praktyczne Doktorantki, świadczące o Jej bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia badań. Pani Małgorzata Jakubowska wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętnościami współpracy. Oceniana rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim z wyraźnym nadmiarem. Prezentowane w rozprawie wyniki stanowią istotny postęp w badaniach nad otrzymaniem komórek raka wątrobowokomórkowego z przywróconym cyklem mocznikowym w celu ich wykorzystania w biosztucznych systemach wspomagania wątroby.

Podsumowując wysoko oceniam wartość naukową recenzowanej rozprawy oraz jej potencjał aplikacyjny i z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Jakubowskiej zatytułowana „Dynamic culture of a new genetically modified liver-derived cell line as a model of bioartificial liver” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) i składam do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Małgorzaty Jakubowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ze względu na wysoki poziom naukowy oraz potencjał aplikacyjny wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Warszawa, dnia 30 września 2024 r.

Dr hab. Ewa Szolajska  
Środowiskowa pracownia Hodowli Komórkowych  
i Produkcji Białek  
Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN

