



Dr hab. Beata Burzyńska

Warszawa 02-02-

2016

Zakład Genetyki

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Karoliny Ewy Zakrzewskiej pt.: **„Metody hodowli ludzkich komórek pochodzenia
wątrobowego z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie komórek
podtrzymujących hodowlę”**

Obecnie nie ma skutecznej terapii krańcowej niewydolności wątroby. Pacjenci z ostrą niewydolnością lub zaostrzeniem przewlekłej niewydolności tego wątroby kwalifikowani są do przeszczepu tego narządu. Od wielu lat trwają badania nad opracowaniem metody, która mogłaby posłużyć do detoksykacji pacjentów oczekujących na przeszczep wątroby lub/i umożliwiłaby wytworzenie mechanizmów regeneracji tego narządu. W ciągu ostatnich dziesięcioleci, stosowane były różne techniki pozaustrojowego oczyszczania krwi ze szkodliwych toksyn, które odgrywają rolę w patofizjologii niewydolności wątroby. Jako systemy symulujące funkcje wątroby próbowano zastosować złożone metody detoksykacyjne takie jak np. dializa wątrobowa, frakcjonowanie osocza czy transfuzję wymienną osocza. Niestety, badania prowadzone w wielu ośrodkach nie wykazały poprawy wskaźników śmiertelności pacjentów, u których stosowano leczenie z wykorzystaniem tych urządzeń. Dlatego też, trwają badania nad wytworzeniem systemu określanego biosztuczną wątrobą (BAL, ang. bioartificial liver) o strukturze i funkcji możliwie jak najbardziej zbliżonej do ludzkiej wątroby. Urządzenie to wymaga dużej ilości żywych i wysoce aktywnych



hepatocytów, jednakże poważnym ograniczeniem wydajności tego systemu są trudności w pozyskiwaniu i hodowli komórek.

Przedstawiona do oceny rozprawa dotyczy opracowania metody długotrwałej hodowli komórek pochodzenia wątrobowego, przy użyciu genetycznie modyfikowanych ludzkich fibroblastów, jako komórek podtrzymujących hodowlę. Stanowi kontynuację badań nad skonstruowaniem mikroreaktora do hodowli komórek wątrobowych prowadzonych przez Zespół Promotora i Promotora Pomocniczego recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Doktorantka postawiła przed sobą dwa ambitne cele:

- opracowanie wydajnej metody izolacji komórek z ludzkiej wątroby oraz cytometrycznej analizy służącej do oceny izolatu wątrobowego
- wykorzystanie zmodyfikowanych genetycznie linii fibroblastów, jako swoistego „wspomagania” hodowli hepatocytów i zbadanie wpływu tych komórek na żywotność hepatocytów.

Do swoich badań Doktorantka wykorzystwała fragmenty wątrób uzyskanych od zróżnicowanych dawców (płeć, wiek, przebyta chemioterapia). Dwie metody: powszechnie stosowana metoda podwójnej perfuzji i opracowana przez Zespół w skład którego wchodziła Doktorantka - metoda maceracji zostały wykorzystane do izolacji hepatocytów z pobranych wycinków. Analizy przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały w sposób nie budzący żadnych wątpliwości, że zastosowanie metody maceracji poprawia wydajność izolacji i żywotność komórek. Badania markerów charakteryzujących różne populacje komórek pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że zdecydowanie lepszymi parametrami wykazywały się komórki pobrane od młodych mężczyzn. Ta część badań może mieć znaczenie kliniczne i ciekawe by było poznanie mechanizmów powodujących te różnice.

Badania kokultur komórek wątrobowych z ludzkimi fibroblastami przebiegały dwutorowo. W części pierwszej Doktorantka analizowała funkcjonalność komórek z wprowadzonymi trwale do genomu genami kodującymi białka fluorescencyjne (EGFP i DsRed2), co umożliwiło śledzenie zmian w kokulturze w trakcie prowadzenia hodowli. W drugiej części badań Doktorantka skoncentrowała się nad charakterystyką hodowli z nadekspresją genu kodującego epidermalny czynnik wzrostu i udowodniła, że tak zmodyfikowane komórki mają dodatni wpływ na komórki wątrobowe.



Rozprawa doktorska została przygotowana w formie obszernego manuskryptu w klasycznym układzie, zawierającego streszczenia w języku polskim i angielskim, 5 rozdziałów, podsumowanie, spis literatury oraz 5 suplementów.

Ocena sposobu przedstawienia pracy:

W obszernym wstępie Doktorantka szczegółowo omawia zagadnienia związane z izolacją i hodowlą hepatocytów oraz komórek stosowanych jako substytuty ludzkich komórek wątrobowych. Następnie przedstawia metody transfekcji linii komórkowych i definiuje cele swojej rozprawy doktorskiej. Wprowadzenie zostało napisane ze znajomością tematu w oparciu o obszerne dane literaturowe.

Rozdziały „Materiały” i „Metody” stanowią bardzo szczegółowy opis zastosowanych procedur laboratoryjnych. Dokładność opisu powoduje, że rozdziały te są gotowym skryptem laboratoryjnym, według którego można powtórzyć wykonane przez Doktorantkę eksperymenty. Kolejna część rozprawy poświęcona jest omówieniu wyników otrzymanych przez Doktorantkę. Opisy poszczególnych wyników Autorka ilustruje tabelami, wykresami i imponującymi zdjęciami mikroskopowymi. Konsekwentna i logiczna dyskusja wyników napisana jest w kontekście do aktualnego piśmiennictwa i podobnie jak wstęp świadczy o bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki. „Podsumowanie” zawiera zwięzłe omówienie własnych wyników i zakończone jest pięcioma ważnymi wnioskami, które oprócz wartości naukowych zawierają również zdecydowany aspekt aplikacyjny.

Rozprawa jest wyjątkowo starannie opracowana pod względem edytorskim. Zawiera bardzo niewiele błędów edytorskich, nie mających wpływu na merytoryczną jakość pracy.

Uwagi

Moje uwagi, a właściwie sugestie dotyczą przedstawienia strony metodycznej pracy doktorskiej. Przede wszystkim brakuje mi opisu eksperymentów związanych z konstrukcją wektorów ekspresyjnych. Pomimo otrzymania negatywnych wyników uważam że, opis przeprowadzonych eksperymentów powinien być umieszczony w głównej części doktoratu. Jestem także ciekawa opinii Doktorantki o powodach niepowodzenia tej części eksperymentów. Uważam również, że dodanie choćby krótkiego fragmentu przedstawiającego dane epidemiologiczne i kliniczne dotyczące ostrych i przewlekłych schorzeń wątroby,



wzbogaciłoby rozprawę i przedstawiło bezpośredni dowód na potrzebę badań przeprowadzonych przez Doktorantkę.

Zamieszczone uwagi/sugestie nie umniejszają znaczenia pracy, która jest cennym wkładem w badania mające na celu opracowanie wydajnego bioreaktora działającego jako pomost dla pacjentów czekających na przeszczep lub do regeneracji wątroby. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników przedstawionej do oceny pracy została opublikowana, a Pani mgr Karolina Zakrzewska jest współautorką trzech artykułów, w których opublikowanych w czasopismach PLOS ONE, Acta Biochimica Polonica i Artificial Organs. Należy podkreślić, że w tych publikacjach jest pierwszym autorem.

Podsumowując, uważam że Doktorantka osiągnęła założone cele. Opracowała wydajniejszą metodę izolowania komórek wątroby oraz cytometryczną metodę oceny izolatu wątrobowego. Udowodniła, że wykorzystanie fibroblastów z nadekspresją epidermalnego czynnika wzrostu poprawia parametry hodowli hepatocytów. Oprócz walorów naukowych praca ma bardzo istotny aspekt kliniczny.

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Zakrzewskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, przeto wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN o dopuszczenie jej autorki mgr Karoliny Zakrzewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponieważ praca jest oryginalna, wnosi nową wiedzę zarówno naukową jak i aplikacyjną i wyniki w niej zamieszczone zostały częściowo opublikowane w prestiżowych czasopismach, postuluję o nagrodzenie Autorki pracy stosowną nagrodą.

Beata Buzynska