

Recenzja pracy doktorskiej

Tytuł rozprawy:

„Metody hodowli ludzkich komórek pochodzenia wątrobowego z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie komórek podtrzymujących hodowlę”

Autor rozprawy: **mgr Karolina Zakrzewska**

z Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Maciej Nałęcz
Polskiej Akademii Nauk

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Karoliny Zakrzewskiej podejmuje ważny naukowo temat opracowania metody izolacji i długotrwałej hodowli komórek pochodzenia wątrobowego wykorzystując w tym celu zmodyfikowane genetycznie komórki podtrzymujące hodowlę.

Rozprawa doktorska podejmuje jedno z najtrudniejszych i najważniejszych problemów naukowych w celu wykorzystania wyników w praktyce klinicznej. Problemy naukowe dotyczące izolowania i hodowli komórkowej dla potrzeb klinicznych ludzkich hepatocytów stanowią dzisiaj jeden z priorytetów badawczych i rozwiązywane są w ośrodkach naukowo-badawczych i badawczo-rozwojowych na całym świecie.

Na podstawie przeglądu literatury Doktorantka właściwie formułuje wnioski, cele i założenia pracy badawczej w oparciu o 520 publikacji naukowych o zasięgu światowym. Publikacje naukowe, które cytuje w rozprawie doktorskiej w adekwatny sposób odnoszą się do omawianych wyników własnych badań i dotyczą omówienia aktualnych zagadnień i badań dotyczących podjętej problematyki. W cytowanym piśmiennictwie odnosi się również do wyników badań otrzymanych w krajowej jednostce naukowej i prac opublikowanych w krajowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Dotychczasowy stan wiedzy wskazuje na prowadzenie licznych prac i badań wykorzystując nowoczesne techniki w celu opracowania metody/technologii, która może być wykorzystana w praktyce klinicznej w leczeniu ludzi. Pierwsze próby wykorzystywania izolowanych ludzkich hepatocytów w celu ratowania życia ludzkiego

dotyczyły konstruowania bioreaktorów z hodowanymi izolowanymi ludzkimi czy też zwierzęcymi komórkami wątrobowymi i okazały się niezadawalające jako pomost w oczekiwaniu na przeszczep części lub całego narządu. Aktualnie w klinice wykonywane są eksperymenty lecznicze z wykorzystaniem izolowanych i/lub modyfikowanych ludzkich komórek wątroby co niewątpliwie stanowi przyszłość medycyny.

Tezy rozprawy doktorskiej są jasno sformułowane i dobrze udokumentowane w pracy doświadczalnej w oparciu o badania *in vitro* z wykorzystaniem izolowanych ludzkich hepatocytów.

Doktorantka w rozprawie doktorskiej podjęła się rozwiązania absolutnie podstawowego problemu naukowego jakim jest możliwość opracowania i wykorzystania nowej metody/technologii w hodowli *in vitro* izolowanych ludzkich komórek pluripotentnych/ludzkich hepatocytów z przyszłym przeznaczeniem terapeutycznym. W badaniach wykorzystano linie komórkowe ludzkiej hepatomy (C3A) , ludzkie fibroblasty (HSF), izolowane ludzkie hepatocyty (38 próbek) otrzymane od Pacjentów poddanych operacji częściowej enukleacji, resekcji wątroby w czasie zabiegu operacyjnego i po przebytej chemioterapii (25 próbek). Metodyka oraz materiał kliniczny w oparciu o doświadczenia w innych referencyjnych ośrodkach został dostosowany do krajowych możliwości w oparciu o opracowaną własną , oryginalną i nowatorską metodę otrzymywania materiału biologicznego plazmidu pNL-H2B/mCherry-gtxIRES/EGFP-WPRE/deltaU3 (dr K. Pluta-pracownik IBIB). Jednocześnie zamknięte użycie genetycznie zmodyfikowanych ludzkich linii komórkowych i komórek w celu modyfikacji genetycznych ludzkich hepatocytów oraz komórek podtrzymujących hodowlę z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych okazało się skuteczne w opracowaniu po raz pierwszy metody/technologii, która z powodzeniem może zostać wdrożona do praktyki co stanowi mocną stronę rozprawy doktorskiej. Wykorzystanie tej metody, zmodyfikowanej przez Doktorantkę jest w pełni uzasadnione i zgodne z kierunkami badań w referencyjnych ośrodkach badawczych w świecie.

Jednym z podstawowych problemów w prowadzeniu *in vitro* hodowli komórkowych z izolowanymi ludzkimi hepatocytami to wczesny brak czynności wydzielniczej i funkcji metabolicznej (amoniak-mocznik), utrata aktywności cytochromu P-450 i apoptoza i/lub rozpad komórkowy.

Długotrwałe hodowle wymagają modyfikacji składu medium hodowlanego, zamienników jednak nadal są nieskuteczne. Jedną z obiecujących metod jest prowadzenie hodowli z genetycznie zmodyfikowanymi fibroblastami ludzkimi pełniącymi funkcję podtrzymującą dla hepatocytów co stanowiło cel rozprawy doktorskiej z możliwością wykorzystania w praktyce klinicznej. Doktorantka wykonała badania porównawcze metod izolacji i oceny czynności izolowanych ludzkich hepatocytów.

Uzyskane wyniki badań potwierdzają wcześniejsze tezy i założenia postawione przez Doktorantkę w oparciu o bardzo dobrze opracowane i udokumentowane wyniki w postaci tabel, wykresów, rycin, interpretacji oraz znakomitej jakości dokumentacji graficznej/fotograficznej (PCR, DotBlot, cytometr przepływowy, mikroskopowe analizy immunohistochemiczne itp.). Doktorantka wykazała wpływ wieku i płci na uzyskane wyniki jak również czasu ciepłego i zimnego niedokrwienia (np.: płeć męska <60 r.ż.) dla otrzymania wysokiej jakości izolowanych ludzkich hepatocytów. Badania kokultury komórek C3A z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluoroscencyjne umożliwiło Doktorantce opracowanie narzędzia do obserwacji i analizy zmian zachodzących w hodowli długoterminowej.

Doktorantka wykazała doświadczalnie i opisała oryginalną obserwację korzyści wynikających z kokultury komórek pochodzenia wątrobowego z fibroblastami na ich czynność, jak również wpływ obecności epidermalnego czynnika wzrostu w warunkach in vitro na długotrwałą hodowlę ludzkich hepatocytów.

Oryginalność pracy polega na wykorzystaniu zmodyfikowanych genetycznie ludzkich fibroblastów, które charakteryzują się trwałą nadprodukcją czynnika wzrostu (EGF) w hodowli co w praktyce zmniejsza koszty wynikające z suplementacji medium hodowlanego i prącochłonność laboratoryjną. Ta ważna obserwacja stanowi indywidualne i po raz pierwszy udokumentowane w eksperymencie osiągnięcie Doktorantki, które jest podstawą do wyróżnienia pracy. Na tej podstawie rozprawa doktorska wnosi istotny wkład do nauki z wykorzystaniem nowych technik i metod z użyciem inżynierii genetycznej w prowadzonych hodowlach komórkowych in vitro dla potrzeb klinicznych.

Pomimo niewielkich niezręczności stylistycznych i nielicznych błędów redakcyjnych/edytorskich, które w żadnym aspekcie nie umniejszają wartości pracy, należy stwierdzić, że Doktorantka przedstawiła dojrzały cel naukowy, dobrze przygotowany warsztat badawczy, znakomitą znajomość zagadnienia i literatury, a przede wszystkim dobre przygotowanie merytoryczne i umiejętność rozwiązywania ważnych problemów naukowych, które służą rozwojowi i mają potencjalne znaczenie i zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej.

Rozprawę doktorską mgr Karoliny Zakrzewskiej, którą otrzymałem do recenzji oceniam bardzo wysoko z powodu opracowania nowatorskiej metody/technologii badawczej oraz zaplanowania bardzo trudnego i żmudnego eksperymentu wymagającego ogromu indywidualnej pracy laboratoryjnej w wyniku której Doktorantka wykazała:

- opracowanie skutecznej, oryginalnej i prostej metody izolacji ludzkich hepatocytów
- opracowanie oryginalnej metody diagnostycznej oceniającej stan czynnościowy i funkcjonalny hepatocytów z pobranej biopsji od Pacjenta z użyciem cytometru przepływowego, który to wynik może wykazać tzw. rezerwę regeneracyjną hepatocytów u płci żeńskiej co ma znaczenie prognostyczne w klinice
- po raz pierwszy wykorzystano genetycznie modyfikowane fibroblasty otrzymane ze skóry ludzkiej, które trwale produkują czynnik wzrostu w warunkach in vitro w hodowli z hepatocytami i odpowiadają prawidłową czynnością i funkcją

Nowatorskie opracowanie metod, dobrze udokumentowane w rozprawie doktorskiej mgr Karoliny Zakrzewskiej, oryginalność i wyjątkowość tej pracy, która wnosi nową jakość do nauki uzasadnia dalszą promocję.

Przekazana mi do recenzji rozprawa doktorska w oparciu o zastosowane po raz pierwszy nowatorskiego rozwiązania problemu naukowego w postaci nowych metod/technologii badawczych z potencjalną

możliwością wykorzystania w praktyce upoważniają mnie z pełnym przekonaniem do wyrażenia opinii ,że:

„Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.)”

Jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej w Warszawie o wyróżnienie pracy doktorskiej.

W uzasadnieniu zwracam uwagę na praktyczne znaczenie wyników pracy dotyczące w szczególności opracowania nowej metodologii/technologii z użyciem inżynierii genetycznej. Osiągnięte wyniki i ich powtarzalność w każdych warunkach laboratoryjnych , wskazując na oszczędności poprzez niskie nakłady i stanowią wysokie prawdopodobieństwo wdrożenia do praktyki/terapii co zostało wykazane przez Doktorantkę i dobrze udokumentowane w rozprawie doktorskiej.

Z poważaniem,
Piotr Fiedor
Prof. dr hab. med. Piotr Fiedor
specjalista chirurg
9179186

Prof. dr hab. med. Piotr Fiedor