

Warszawa, 29.03.2016 r.

Dr hab. Inż. Tomasz Ciach Prof. PW
Politechnika Warszawska
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa

RECENZJA

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

(Promotor: dr hab. Dorota G. Pijanowska, Prof. IBIB PAN,

Promotor pomocniczy: dr Krzysztof D. Pluta)

Wprowadzenie

Wraz z rozwojem nauk biologicznych podstawowe cegiełki organizmów, jakimi są komórki, powoli przestają być jedynie obiektem ciekawości istot z nich zbudowanych. Stają się podmiotem badań, modyfikacji czy wręcz inżynierskich manipulacji. Nie potrafimy jeszcze stworzyć całego organizmu, ale potrafimy już manipulować wieloma cechami pojedynczych komórek i pracujemy nad kolejnym krokiem, jakim jest wspólna hodowla różnych komórek w celu zbudowania pierwszych działających systemów - sztucznych organów. Recenzowana praca dobrze wpisuje doskonale się w ten nurt badań naukowych.

Rozprawa doktorska Pani magister Karoliny Ewy Zakrzewskiej pt. „Metody hodowli ludzkich komórek pochodzenia wątrobowego z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie komórek podtrzymujących hodowlę” jest pracą bardzo obszerną, liczącą blisko dwieście stron. Autorka zajęła się w niej izolacją i hodowlą ludzkich hepatocytów. Komórki takie mogą znaleźć

zastosowanie do testowania toksyczności leków czy innych substancji, co jest mniej obciążające moralnie w porównaniu z badaniami na zwierzętach. Jeszcze bardziej ambitnym jest zastosowanie takich komórek przy budowie biologicznej-sztucznej wątroby. Hodowla komórek izolowanych z ludzkiej wątroby nastęrcza wiele kłopotów. Komórki te w ciągu kilku – kilkunastu dni odróżnicowują, co skutkuje zmianami morfologicznymi i funkcjonalnymi. Z kolei unieśmiertelnione lub pochodzące z nowotworów hepatocyty nie nadają się do wielu zastosowań, ponieważ nie wytwarzają wszystkich enzymów, ich fizjologia minimalnie odbiega od komórek naturalnych.

Recenzowana praca poprzedzona jest obszernym wstępem, w którym jej autorka przedstawia metody izolacji komórek wątroby. Dalej szczegółowo opisuje metodykę hodowli komórek i wpływ warunków hodowli i dodatków różnych białkowych czynników wzrostu na różnicowanie komórek. Opisuje również hodowle kokulturowe oraz metody wprowadzania DNA do komórek. Dalej następuje wyczerpujący opis materiałów i stosowanych w pracy metod.

Sama rozprawa jest pracą typowo eksperymentalną. Sama autorka dzieli ją na kolejne trzy etapy. W pierwszej części zajmuje się izolowaniem komórek wątrobowych z materiału pooperacyjnego dostarczanego ze szpitala. Do izolowania komórek stosuje i porównuje dwie metody: perfuzji i maceracji. Wskazuje tu na wyższość tej drugiej techniki ze względu na wyższą wydajność i żywotność komórek. W drugim etapie pracy zajmuje się genetyczną modyfikacją komórek bazowych, ludzkich fibroblastów, w celu otrzymania komórek podtrzymujących w kokulturze hodowlę hepatocytów. W ramach tej części badań opisuje przygotowanie odpowiednich plazmidów i wektorów lentiwirusowych, transdukcję komórek oraz ocenę jej rezultatów. Do fibroblastów wprowadzono geny kodujące białka fluorescencyjne w celu ułatwienia ich śledzenia oraz epidermalny czynnik wzrostu. W trzecim etapie prowadzono hodowlę zmodyfikowanych fibroblastów i komórek wątrobowych pochodzących z linii komórkowej. Następnie oceniano funkcje wydzielnicze, żywotność komórek oraz tworzenie się kanalików żółciowych.

Na podstawie części rozprawy przedstawiającej wyniki i płynące z nich wnioski możemy skonkludować że:

- opracowana metoda izolacji komórek wątroby oparta o macerację enzymatyczną pozwala uzyskać więcej komórek i o lepszej żywotności, produkujące więcej albuminy i chętniej tworzące kanaliki żółciowe,
- modyfikacja genetyczna fibroblastów ludzkich przebiegła skutecznie, komórki wykazywały ekspresję białek fluorescencyjnych,

- zmodyfikowane genetycznie komórki z dodatkową kopią genu kodującego czynnik wzrostu dobrze spełniały rolę warstwy podtrzymującej komórki wątroby w hodowli kokulturowej pozytywnie wpływając na fizjologię komórek linii wątrobowej.

Krytyczna ocena pracy

Oceniana praca jest typową pracą eksperymentalną. Swoją strukturą przypomina trochę raport z projektu badawczego. Teza naukowa pracy postawiona jest wstępnie i trochę mimochodem na stronie 8-ej, we wstępie, a następnie jawnie na stronie 62-giej. Uważam, że tezę naukową doktoratu trzeba stawiać jasno i na początku pracy. Takie postawienie tezy i przeprowadzenie dowodu odróżnia rozprawę od raportu z badań.

Praca jest bardzo dobrze zredagowana a jej tekst dobrze opracowany, niemniej nie udało się uniknąć kilku drobnych błędów (np. tytuł rozdziału str. 86). Generalnie struktura rozdziałów i podrozdziałów jest trochę zbyt głęboko zagnieżdżona, do czterech poziomów. Tworzenie tak dużej liczby drobnych podrozdziałów utrudnia odbiór pracy. Praca jest też bardzo obszerna, co czasami utrudnia jej odbiór. Praca liczy blisko 200 stron, zawiera bardzo obszerny i wyczerpujący wstęp – może trochę zbyt obszerny, dobrze wykonaną analizę literatury – liczącą ponad 500 pozycji i opis części eksperymentalnej.

Autorka nie uległa pokusie podawania wyników z zawyżoną dokładnością, tak typowej w pracach doktorskich eksperymentalnych. Podawanie wyniku pomiaru z dokładnością trzech cyfr znaczących gdy błąd pomiaru sięga 10% wartości mierzonej jest nieuprawnione (str. 106). Na niektórych wykresach zabrakło też oszacowania i uwidocznienia słupków błędów (str. 114, 119, 120, 121, 126, 133). Choć muszę powiedzieć, że praca jest generalnie bardzo dobrze opracowana pod względem analizy wyników pomiarów.

Ocena samego podejścia i zaplanowania eksperymentu jest dla recenzenta bardzo trudna i zawsze pozostawia pewien niedosyt. Zawsze chciało by się aby doktorant zrobił więcej, z drugiej jednak strony kiedyś taką pracę trzeba jednak zakończyć. W tym przypadku chciało by się obserwować wzrost hepatocytów w otoczeniu komórek śródbłonna, komórek Browicza-Kupfera, adipocytów, komórek tworzących przewód żółciowy, i zaobserwować powstawanie całej struktury zrazików wątrobowych. Wydaje się, że w tylko w takim otoczeniu wzrost hepatocytów będzie prawidłowy. W przypadku zastosowanych w pracy technik prowadzenia kokultury możemy obserwować jedynie wydłużenie okresu wzrostu. Szkoda, że choć w pracy opisywane są metody izolacji komórek wątrobowych z wycinków naturalnej ludzkiej wątroby, do hodowli w kokulturach użyto linii komórkowej C3A, a nie komórek prawidłowych.

Podsumowując, muszę stwierdzić, że praca jest dobrze napisana i zredagowana. Zakres pracy został zaplanowany bardzo ambitnie i szeroko. Dla tego pewne niepowodzenia związane z przygotowaniem własnego konstruktu do transfekcji komórek nie umniejszają jej rozmachu i zakresu. Praca udowodniła postawioną tezę naukową. Recenzowaną pracę uważam za znaczny wkład w szeroko prowadzone prace nad wytworzeniem biosztucznej wątroby, za kolejny krok w budowie biosztucznych organów.

Wnioski końcowe

Przedstawiona przez Panią Magister Karolinę Ewę Zakrzewską rozprawa doktorska pt. „Metody hodowli ludzkich komórek pochodzenia wątrobowego z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie komórek podtrzymujących hodowlę” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością prowadzenia samodzielnej pracy badawczej i przejrzystego, analitycznego przedstawiania jej wyników. Zakres przeprowadzonych badań jest szeroki i został przedstawiony również w publikacjach naukowych. Pracę uważam za dobrze napisaną a zamieszczone w recenzji uwagi krytyczne jedynie nieznacznie umniejszają jej odbiór. Stwierdzam, że całkowicie spełnione zostały wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w dziedzinie sztuki (Dz. U. Nr 65 , poz. 595 z późniejszymi zmianami), wobec czego wnoszę, by dopuścić Panią Magister Karolinę Ewę Zakrzewską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na ilość oraz jakość przeprowadzonych badań eksperymentalnych, oraz na opublikowanie ich wyników w trzech artykułach jakie ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym proponuję wyróżnienie pracy.



Tomasz Ciach