

Streszczenie

Wątroba jest największym gruczołem człowieka, pełniącym ponad 500 funkcji związanych z utrzymywaniem homeostazy organizmu, metabolizmem tłuszczu, białek i cukrów, detoksykacją ksenobiotyków, przekształcaniem toksycznego amoniaku w mocznik, produkcją białek surowicy krwi i żółci oraz magazynowaniem różnych substancji zapasowych. Część parenchymalna wątroby w 80% składa się z hepatocytów. Ze względu na bardzo wysoką śmiertelność wśród pacjentów cierpiących na przewlekłe schorzenia wątroby, choroby te stanowią jeden z głównych problemów zdrowotnych na świecie. Ostatnie doniesienia na temat wzrastającego zagrożenia chorobami wątroby w Europie wskazują, jako główne jego przyczyny, rosnącą liczbę przypadków zwłóknienia (marskości) i raka narządu. Ostra niewydolność, oraz zaostrzenie przewlekłej choroby wątroby, mogą być również spowodowane infekcjami wirusowymi lub nadmiernym spożyciem alkoholu i niektórych leków. Obecnie, jedynym skutecznym sposobem leczenia skrajnej niewydolności wątroby jest kosztowna transplantacja narządu. Jednakże, najważniejszym ograniczeniem dla tego typu terapii jest niewystarczająca liczba dawców. Wśród proponowanych rozwiązań alternatywnych dla przeszczepu narządu, znajdują się takie eksperymentalne procedury, rozwijane ostatnio w obszarze inżynierii biomedycznej, jak transplantacja hepatocytów i stosowanie biosztucznej wątroby (ang. *bioartificial liver*, BAL). Techniki te, razem z używanymi już wcześniej urządzeniami do pozaustrojowego wspomaganie niewydolnej wątroby, mogą stanowić terapie pomostowe do czasu samoistnej regeneracji lub znalezienia dawcy narządu.

Urządzenia wspomagające niewydolną wątrobę, tzw. sztuczne wątroby, były testowane klinicznie przez ostatnie trzy dekady. Techniki niebiologiczne swoje działanie opierają na usuwaniu toksyn z krwi pacjenta poprzez stosowanie sorbentów, takich jak węgiel aktywny i żywice, hemodializy, hemofiltracji i, bardziej współcześnie, wymiany osocza i dializy albuminowej. Na przykład, najczęściej używane w leczeniu pacjentów urządzenie o nazwie MARS, wykorzystuje połączenie (1) hemodializy osocza wobec albuminowego płynu dializacyjnego i dializy konwencjonalnej oraz (2) kolumny z węglem aktywnym i kolumny z żywicą jonowymienną. Nowszy system, Prometheus, opiera się natomiast na metodzie frakcjonowania osocza i usuwaniu toksyn związanych z endogenną albuminą pacjenta przy użyciu adsorbentów w postaci żywic. Urządzenia te są efektywne jeśli chodzi o usuwanie małych i średniocząsteczkowych toksyn rozpuszczalnych w wodzie, ale stosowane w nich adsorbenty nie są w stanie wydajnie eliminować z krwi pacjenta białek, np. mediatorów zapalenia czy inhibitorów regeneracji narządu. Ponadto niebiologiczne systemy wspomaganie wątroby nie mogą zastąpić biosyntetycznych i metabolicznych funkcji narządu. Wszystko to sprawiło, że MARS i Prometheus nie spełniły pokładanych w nich nadziei w badaniach klinicznych z udziałem losowo dobranych grup pacjentów, gdyż nie miały wpływu na przeżywalność pacjentów ze schyłkową niewydolnością wątroby.

Terapie oparte na stosowaniu komórek pochodzenia wątrobowego, choć obiecujące, wymagają odpowiedniego źródła materiału biologicznego. Izolowane ludzkie hepatocyty byłyby idealnym rozwiązaniem dla tego typu zastosowań, jednakże, podobnie jak

w przypadku przeszczepu narządu, głównym problemem jest tu dostępność ludzkiej tkanki do izolacji komórek. Poza tym, poważną przeszkodą w skutecznym stosowaniu izolowanych ludzkich hepatocytów do terapii schyłkowej niewydolności wątroby jest heterogeniczność dawców, a przede wszystkim fakt, że komórki te poza organizmem nie dzielą się i szybko odróżnicowują, tracąc swoje specyficzne funkcje. Zatem, w ostatnich latach, uwaga badaczy skupia się na poszukiwaniu alternatywnych źródeł komórek, mogących pełnić funkcje hepatocytów. Oprócz dobrze zbadanych hepatocytów świńskich oraz linii komórkowych wyprowadzonych z ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma*, HCC), takich jak: HepaRG, HepG2 i jej pochodna - C3A, testuje się również możliwość wykorzystania wątrobowych komórek progenitorowych, komórek hepatocytopodobnych otrzymanych z komórek macierzystych, a także, indukowanych komórek hepatocytopodobnych (iHep), zróżnicowanych z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSC), które otrzymuje się na drodze tzw. reprogramowania dorosłych komórek somatycznych. Nie mniej jednak, choć z komórkami takimi wiąże się duże nadzieje, nie są one w stanie, jak dotychczas, w pełni zastąpić funkcjonalności i wydajności ludzkich hepatocytów.

Dwa najbardziej zaawansowane systemy BAL, HepatAssist i ELAD, wykorzystują do działania bioreaktory kapilarne zasiedlone, na zewnętrznych powierzchniach kapilar, komórkami pochodzenia wątrobowego. HepatAssist opiera się na hepatocytach izolowanych z wątroby świńskiej a ELAD - na komórkach linii C3A. Użycie komórek zwierzęcych budzi kontrowersje bioetyczne i niesie ze sobą niebezpieczeństwo w postaci odzwierzęcych patogenów. Dodatkowo należy zwrócić uwagę na to, iż nie wszystkie białka produkowane przez te komórki są zgodne z funkcjami ludzkiego organizmu, a kontakt z materiałem zwierzęcym może powodować reakcje immunologiczne. Zatem, do wyboru pozostaje komponent biologiczny BAL w postaci silnie zróżnicowanych komórek pochodzenia nowotworowego. Komórki linii HepG2/C3A zdolne są do pełnienia szeregu funkcji typowych dla hepatocytów ludzkich ale charakteryzują się też wieloma dysfunkcjami metabolicznymi: mają obniżoną aktywność wątrobowych izoenzymów cytochromu P450 i, co równie ważne, nie mają aktywnego cyklu mocznikowego. To ostatnie spowodowane jest brakiem aktywności dwóch enzymów cyklu: arginazy 1 (ARG1) i karbamoiltransferazy ornitynowej (OTC). Zatem, ograniczone zdolności metaboliczne komórek użytych w urządzeniu ELAD, mogą stanowić przyczynę niepowodzeń tego systemu w randomizowanych badaniach klinicznych, prowadzonych z udziałem pacjentów cierpiących na schyłkową niewydolność wątroby.

Monografia przedstawia rezultaty badań, prowadzonych przez Autora i jego zespół w Pracowni Inżynierii Tkankowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz Polskiej Akademii Nauk (IBIB PAN) w Warszawie, które doprowadziły do uzyskania komórek C3A, zdolnych do wydajnego przekształcania amoniaku w mocznik. Ta nowa linia komórkowa, C3A_ARG1_OTC_III, może być użyta, jako ulepszone źródło komórek wątrobowych, w urządzeniu typu BAL. Na uwagę zasługuje fakt, iż prace Autora po raz pierwszy opisują otrzymanie linii komórek C3A za pomocą transdukcji wektorami lentiwirusowymi, trwale nadprodukujących brakujące enzymy cyklu mocznikowego: ARG1 i OTC. Zastosowanie tych wektorów pozwoliło na integrację transgenów ARG1 i OTC do genomów docelowych komórek. W Monografii obszernie opisano metody inżynierii

genetycznej, z uwzględnieniem technologii wektorów lentiwirusowych, podkreślając zabiegi zapewniające bezpieczeństwo tych wektorów genetycznych oraz możliwość ich zastosowań klinicznych. Modyfikowane genetycznie komórki C3A są odporniejsze na wysokie stężenia amoniaku w pożywce i produkują więcej mocznika niż ich niemodyfikowane odpowiedniki. Dodatkowo, komórki C3A_ARG1_OTC_III syntetyzują też większe ilości albuminy, najważniejszego produktu białkowego hepatocytów. Ponadto Autor prezentuje nowe podejście do rozwiązania problemów związanych z niedoskonałością części biologicznej sztucznej wątroby, w postaci zastosowania w urządzeniach typu BAL współhodowli komórek wątrobowych i modyfikowanych genetycznie komórek tzw. warstwy odżywczej, fibroblastów ludzkiej skóry, trwale nadprodukcujących, istotne dla metabolizmu hepatocytów, czynniki wzrostu: epidermalny czynnik wzrostu (EGF) i hepatocytarny czynnik wzrostu (HGF).

Podsumowując, osiągnięcia Autora w obszarze inżynierii biomedycznej dotyczą otrzymania, przy użyciu wektorów lentiwirusowych, linii komórek C3A z przywróconym cyklem mocznikowym oraz ludzkich fibroblastów nadprodukcujących czynniki wzrostu, które hodowane razem w kokulturze z komórkami C3A stymulują, wykazując działanie synergiczne, specyficzne funkcje komórek pochodzenia wątrobowego. Wyprowadzone linie komórkowe, oraz zaproponowane systemy komórkowe, mogą znaleźć zastosowanie w ulepszonej biosztucznej wątrobie.