

Streszczenie

Choroby wątroby stanowią obecnie jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Ich śmiertelność szacuje się na 2 miliony zgonów rocznie, w związku z powyższym uznawane są za globalny problem zdrowia publicznego. Choroby wątroby, bez podjęcia odpowiedniego leczenia, mogą prowadzić do niewydolności tego organu. Wówczas, jedyną skuteczną terapią jest przeszczep narządu. Niestety, największym ograniczeniem stosowania tego rodzaju leczenia jest chroniczny niedobór odpowiednich dawców. W rezultacie rocznie umiera około 10% pacjentów oczekujących na transplantację wątroby. Mając to na uwadze, naukowcy rozpoczęli prace nad poszukiwaniem nowych eksperymentalnych metod leczenia lub wspomagania funkcjonowania niewydolnego narządu. Można pośród nich wyróżnić: przeszczep hepatocytów, sztuczne lub biosztuczne systemy wspomagania wątroby oraz wykorzystanie technik opartych na narzędziach inżynierii tkankowej (np. decelularyzowana wątroba, 3D biodruk, organoidy itp.). Niemniej jednak, biosztuczne systemy wspomagania wątroby wydają się być najbardziej obiecujące. Te hybrydowe urządzenia stanowią terapię pomostową dla pacjentów, polegającą na wspomaganii pracy niewydolnego organu do czasu jego przeszczepienia lub regeneracji. Przewagą biosztucznych systemów wspomagania jest obecność komponentu biologicznego, którego zadaniem jest pełnienie metabolicznych, biosyntetycznych i regulacyjnych funkcji wątrobowych, podczas gdy sztuczne systemy są zdolne jedynie do wspomagania procesów detoksykacyjnych.

Najlepsze źródło komórek do zastosowania jako biologiczny komponent w biosztucznych systemach wspomagania stanowią ludzkie hepatocyty. Pomimo tego, że są uznawane za złoty standard, ich wykorzystanie wiąże się jednak z pewnymi ograniczeniami. Hepatocyty, komórki wysoce zróżnicowane i pełniące specyficzne funkcje wątrobowe, w warunkach *ex vivo* szybko ulegają odróżnicowaniu, co skutkuje utratą zdolności do pełnienia tych funkcji. W związku z powyższym, rozpoczęto poszukiwania alternatywnych źródeł komórek, które mogłyby stanowić model ludzkich hepatocytów. Jednym z proponowanych modeli jest linia komórkowa C3A wyprowadzona z ludzkiego raka wątrobowokomórkowego. Badania pokazują, że te nowotworowe komórki wykazują podobny fenotyp i pełnią niektóre funkcje fizjologiczne (np. wydzielanie albuminy) parenchymalnych komórek wątrobowych. Ponadto komórki linii C3A charakteryzują się szybką proliferacją (nieograniczoną dostępnością), dużą stabilnością genetyczną, silną inhibicją kontaktową i małymi wymaganiami hodowlanymi. Co istotne, nie zgłoszono żadnych zastrzeżeń etycznych w związku z ich wykorzystaniem klinicznym. Obecnie, linia komórkowa C3A jest powszechnie

stosowana w badaniach dotyczących oceny toksyczności ksenobiotyków czy opracowywaniu nowych leków. Co więcej, linia komórkowa C3A, jako jedyna linia nowotworowa, została wykorzystana jako biologiczny komponent w systemie ELAD, najbardziej zaawansowanym urządzeniu wśród biosztucznych systemów wspomaganie wątroby, który dotarł do trzeciej fazy badań klinicznych. Komórki linii C3A charakteryzują się jednak pewnymi metabolicznymi dysfunkcjami, z czego najbardziej istotna jest ograniczona zdolność do eliminacji toksycznego amoniaku. Wynika to z niefunkcjonalnego cyklu mocznikowego, co spowodowane jest brakiem lub niską ekspresją genów arginazy 1 (*ARG1*) i transkarbamylazy ornitynowej (*OTC*), kodujących enzymy zaangażowane w ten proces. Biorąc to wszystko pod uwagę, można przypuszczać, iż dysfunkcja cyklu mocznikowego w linii C3A mogła stanowić przyczynę niepowodzenia badań klinicznych z wykorzystaniem systemu ELAD, ponieważ skuteczna detoksykacja amoniaku jest kluczowym elementem w terapiach chorób wątroby.

W związku z powyższym, celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie nowej genetycznie zmodyfikowanej linii komórkowej raka wątrobowokomórkowego z przywróconym cyklem mocznikowym, która mogłaby stanowić lepsze źródło komórek do zastosowania w biosztucznych systemach wspomaganie wątroby. Modyfikację genetyczną przeprowadzono z wykorzystaniem samodzielnie skonstruowanych wektorów lentiwirusowych. Wprowadzone zmiany (plazmid transferowy niosący oba dodatkowe geny pod kontrolą silnego promotora, selekcja antybiotykowa) pozwoliły na otrzymanie nowej linii komórkowej, nazwanej C3A_AO_P2A, składającej się z prawie 100% komórek zmodyfikowanych genetycznie. Skuteczność przeprowadzonej modyfikacji genetycznej potwierdzono zarówno na poziomie DNA (integracja transgenów do genomu komórki), jak i białkowym, stosując techniki PCR, RT-qPCR i Western blot. Badania wykazały znaczącą nadekspresję genów *hARG1* i *hOTC* oraz odpowiadających im białek w komórkach linii C3A_AO_P2A w porównaniu z ich niezmodyfikowanymi genetycznie odpowiednikami. Ponadto nie zaobserwowano negatywnego wpływu przeprowadzonej modyfikacji genetycznej na morfologię i żywotność komórek. Dalszą charakterystykę funkcjonalną nowej linii komórkowej C3A_AO_P2A przeprowadzono w warunkach hodowli płaskich statycznych i dynamicznych 3D, zaś uzyskane rezultaty porównywano z wynikami otrzymanymi dla wyjściowej linii komórkowej C3A i poprzedniej generacji komórek genetycznie zmodyfikowanych – C3A_AO_III, która stanowi mieszaną populację komórek niezmodyfikowanych, komórek wykazujących ekspresję pojedynczego transgenu lub komórek stransdukowanych obydwoma brakującymi genami.

Badania przeprowadzone w hodowli statycznej potwierdziły, że nowo utworzona linia komórkowa C3A_AO_P2A syntetyzuje albuminę, główne białko produkowane przez wątrobę, na poziomie podobnym do swoich niemodyfikowanych genetycznie odpowiedników. Nie potwierdzono jednak wzrostu wydzielania tego białka w takim samym stopniu jak w przypadku komórek linii C3A_AO_III. Dodatkowo, zbadano toksyczny wpływ amoniaku na żywotność komórek i ich aktywność metaboliczną, ponieważ bardzo często w biosztucznych urządzeniach wątrobowych, mających kontakt z surowicą pacjenta, występują нефизjologiczne stężenia tej substancji. W związku z powyższym, sprawdzono odporność komórek na różne stężenia amoniaku. Uzyskane wyniki wykazały, że obie genetycznie zmodyfikowane linie komórkowe charakteryzowały się wyższą żywotnością i aktywnością metaboliczną w porównaniu z komórkami wyjściowej linii C3A, co wskazuje, że są one mniej podatne na stres oksydacyjny/nitrozacyjny indukowany amoniakiem. Najważniejszy wynik niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy oceny funkcjonalności cyklu mocznikowego. Dotychczas, ilość wyprodukowanego mocznika mierzono tylko w lizatach komórkowych. Mając jednak na uwadze, że mocznik jest aktywnie transportowany na zewnątrz komórki, ilość tego metabolitu była również mierzona w pożywce hodowlanej. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że największą zawartością mocznika w pożywce hodowlanej charakteryzowały się komórki linii C3A_AO_P2A. Z kolei, w przypadku lizatów komórkowych, największa ilość mocznika została wykryta w linii C3A_AO_III, co wskazuje, że metabolit ten kumuluje się wewnątrz komórek. Może to być spowodowane zakłóconym procesem aktywnego transportu mocznika. Niemniej jednak, przeprowadzone badania wykazały, że linia komórkowa C3A_AO_P2A produkuje mocznik bardziej efektywnie niż pozostałe linie komórkowe. Zatem, uzyskane wyniki potwierdzają, że przeprowadzona modyfikacja genetyczna komórek linii C3A samodzielnie przygotowanymi wektorami lentiwirusowymi zakończyła się sukcesem i pozwoliła na przywrócenie im funkcjonalnego cyklu mocznikowego.

Ocena funkcjonalności nowej linii komórkowej w warunkach przepływowych została przeprowadzona przy użyciu samodzielnie skonstruowanego systemu do hodowli dynamicznej, na który składa się między innymi samodzielnie przygotowywany bioreaktor z membranami kapilarnymi (moduł hodowlany). Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że wszystkie analizowane linie komórkowe charakteryzowały się zwiększoną sekrecją albuminy w porównaniu z odpowiednią kontrolą statyczną. Uzyskane wyniki potwierdzają, że hodowla dynamiczna 3D stanowi bardziej wydajny typ hodowli i zapewnia lepsze warunki do wzrostu komórek. Stwierdzono również, że nowo opracowana linia komórkowa C3A_AO_P2A charakteryzowała się najlepszą funkcjonalnością w warunkach przepływowych spośród

wszystkich analizowanych linii komórkowych, zwłaszcza w wydzielaniu albuminy, co wskazuje, że można ją uznać za cenne alternatywne źródło komórek do zastosowania w urządzeniach typu biosztuczna wątroba.

Podsumowując, modyfikacja genetyczna komórek linii C3A przeprowadzona przy użyciu samodzielnie przygotowanych wektorów lentiwirusowych zapewniła stabilną integrację dodatkowych kopii genów *hARG1* i *hOTC* do ich genomu i pozwoliła na utworzenie nowej linii komórkowej o nazwie C3A_AO_P2A. Nowo opracowana linia komórkowa charakteryzuje się lepszą funkcjonalnością (np. synteza albuminy) w obydwu analizowanych warunkach hodowlanych, hodowli płaskiej statycznej i 3D w przepływie medium, w porównaniu z wyjściową linią C3A. Komórki linii C3A_AO_P2A wykazują również zwiększoną odporność na wysokie stężenia amoniaku. Niemniej jednak, najważniejszym osiągnięciem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie nowej linii komórkowej o zwiększonej zdolności do produkcji mocznika. Warto podkreślić zasadność przeprowadzonych badań, gdyż moim zdaniem powyższe cechy pozwalają na rozważenie wykorzystania nowo powstałej linii komórkowej C3A_AO_P2A jako komponentu biologicznego w biosztucznych systemach wspomagania wątroby. Jej potencjalne zastosowanie w tego typu urządzeniach może poprawić skuteczność wspomagania pracy niewydolnego narządu, a w efekcie przynieść korzyści pacjentom, zwiększając ich szanse na przeżycie.