

Streszczenie

Wątroba jest jednym z największych narządów w organizmie człowieka. Ze względu na różnorodność pełnionych przez nią funkcji, jej prawidłowy stan fizjologiczny jest kluczowy dla utrzymania homeostazy w organizmie człowieka. Niewydolność tego organu może prowadzić do dysfunkcji wielu narządów, co stanowi bezpośrednie zagrożenie życia pacjenta. Brak dostatecznej wiedzy dotyczącej czynników etiologicznych patologii wątroby, zbyt późna diagnoza, jak i ograniczenia związane z prowadzeniem skutecznej terapii schorzeń tego narządu sprawiają, iż choroby wątroby (stanowiące na świecie przyczynę 2,5% wszystkich zgonów) nadal pozostają wyzwaniem dla hepatologów (Palakkan i in 2013). Obecnie terapia chorób wątroby opiera się głównie na wykorzystaniu trzech strategii: zastosowaniu sztucznych lub biosztucznych systemów wspomagających wątrobę, terapii komórkowej oraz transplantacji narządu, będącą dotychczas jedyną skuteczną metodą leczenia w schyłkowej niewydolności wątroby. Pomimo ciągłego postępu medycyny i technologii wykorzystywanych w tego typu rozwiązaniach, metody te mają jednak pewne ograniczenia. W transplantacji wątroby nadrzędny problem stanowi niewystarczająca liczba dawców tego narządu. Z kolei w przypadku leczenia pacjentów z zastosowaniem dwóch pozostałych terapii, czynnikiem limitującym jest brak wymaganej odpowiednio dużej liczby w pełni funkcjonalnych ludzkich komórek wątrobowych.

Ludzkie parenchymalne komórki wątroby – hepatocyty, stanowiące około 60% całkowitej liczby komórek tego narządu, zaangażowane są w wiele procesów życiowych organizmu. Uczestniczą one nie tylko w syntezie białek, metabolizmie tłuszczu i węglowodanów, ale pełnią także kluczową rolę w przemianie związków toksycznych, takich jak amoniak, alkohol czy leki. Zarówno w badaniach podstawowych dotyczących funkcji fizjologicznych i patologii wątroby, a także w badaniach klinicznych, ludzkie hepatocyty uważane są za tzw. złoty standard. Ze względu jednak na brak stabilności fenotypowej tych komórek w warunkach *ex vivo*, skomplikowaną procedurę ich izolacji, jak również ich małą dostępność, możliwość wykorzystania ludzkich hepatocytów jest w znacznym stopniu ograniczona. W świetle tych faktów podjęto próby poszukiwania alternatywnego źródła dla tego typu komórek. Jednym z proponowanych rozwiązań jest linia komórkowa ludzkiego wątrobiaka – C3A, będąca pochodną linii HepG2 wyizolowanej z tkanki nowotworu wątrobowokomórkowego (HCC). Komórki linii C3A wykazują szereg funkcji fizjologicznych zbliżonych do ludzkich hepatocytów, jak również cechują się nieograniczoną dostępnością, brakiem problemów etycznych związanych z ich pochodzeniem (częsty problem towarzyszący ludzkim embrionalnym komórkom), stosunkowo szybką kinetyką wzrostu, niskimi wymaganiami co do warunków hodowli, niskim ryzykiem immunogenności oraz silną inhibicją kontaktową wzrostu (mimo nowotworowego pochodzenia). Wszystkie wspomniane zalety sprawiły, iż linia C3A stanowi częsty model komórkowy zarówno

w badaniach dotyczących dysfunkcji szlaków metabolicznych wątroby, procesów syntetycznych tego narządu, w badaniach optymalizacji warunków hodowli dla ludzkich hepatocytów, jak również w analizach toksyczności oraz biotransformacji różnych grup leków i ksenobiotyków (Bandeled i in. 2012; Baudoin i in. 2011; Flynn i Ferguson 2008; Liu i in. 2011). Co więcej, jako jedyna spośród linii nowotworowych stanowi źródło komórek wątrobowych w biosztucznych systemach wspomagających wątrobę (ang. *Bioartificial Liver Support*, BAL) poddanych próbom klinicznym z udziałem pacjentów ze zdiagnozowaną niewydolnością wątroby (clinicaltrials.gov NCT00973817). Rozważając użycie linii C3A w terapii chorób wątrobowych należy jednak wspomnieć, iż komórki te, w porównaniu do izolowanych hepatocytów, posiadają obniżoną aktywność szlaków metabolicznych związanych z detoksykacją amoniaku. Za przyczynę zaistniałej sytuacji uważa się brak funkcjonalnego cyklu mocznikowego, stanowiącego główny szlak przemian amoniaku w organizmie człowieka. Dysfunkcja ta spowodowana jest całkowitym brakiem lub niskim poziomem ekspresji genów: arginazy 1 (*hARG1*) oraz karbamoilotransferazy ornitynowej (*hOTC*), kodujących białka ARG1 i OTC zaangażowane w reakcje enzymatyczne tego cyklu (Mavri-Damelin i in. 2008; Wang i in. 1998).

Celem niniejszej rozprawy było uzyskanie trwale zmodyfikowanych genetycznie komórek ludzkiego wątrobiaka C3A ze skompensowanymi dysfunkcjami metabolicznymi związanymi z detoksykacją amoniaku. Do tego celu wykorzystano samodzielnie wyprodukowane wektory lentiwirusowe (LV), należące do systemu drugiej generacji, zawierające cDNA ludzkich genów arginazy 1 (*hARG1*) oraz karbamoilotransferazy ornitynowej (*hOTC*). Zastosowanie tej koncepcji pozwoliło na wprowadzenie na stałe do genomu komórek C3A dodatkowych kopii badanych ludzkich genów, w wyniku czego uzyskano kolekcję linii ludzkiego wątrobiaka: C3A_ARG1_I-III i C3A_OTC_I-III zawierających w genomie kopie pojedynczych genów *hARG1* lub *hOTC*, jak również linie C3A_ARG1_OTC_I-III posiadające jednocześnie dodatkowe kopie obu badanych genów *hARG1* i *hOTC*. Na podstawie oceny wydajności procesu transdukcji komórek C3A prowadzonej, metodą cytometrii przepływowej, poprzez analizę markerowego białka fluorescencyjnego mCherry produkowanego przez komórki genetycznie zmodyfikowane, spośród wszystkich badanych linii komórkowych wybrano linię C3A_ARG1_OTC_III. Ta modyfikowana genetycznie linia ludzkiego wątrobiaka stała się głównym przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej i została poddana szczegółowej analizie morfologicznej oraz fizjologicznej.

W rozprawie wykazano, iż linia komórkowa C3A_ARG1_OTC_III, uzyskana podczas trzykrotnej transdukcji komórek C3A preparatami wirusowymi LV_ARG1_B4 i LV_OTC_C12, charakteryzuje się równie wysoką żywotnością co linia wyjściowa C3A. Ponadto, analiza metodą cytometrii przepływowej dowiodła, iż komórki C3A_ARG1_OTC_III nie wykazują ekspresji

genu *kaspazy-3*, którego aktywacja zachodzi na drodze apoptozy. Dzięki badaniom genomowego DNA, prowadzonym z użyciem techniki PCR oraz starterów specyficznych dla fragmentów plazmidów transferowych wykorzystanych do produkcji wektorów lentiwirusowych, potwierdzono jednoczesną obecność badanych ludzkich genów *hARG1* oraz *hOTC* w genomie komórek C3A_ARG1_OTC_III. Na podstawie analizy ekspresji genów na poziomie białka, przeprowadzonej metodą cytometrii przepływowej, techniką Western Blot oraz testem ELISA zaobserwowano, iż w komórkach C3A modyfikowanych genetycznie dochodzi do nadprodukcji białek zaangażowanych w cykl mocznikowy: arginazy 1 (ARG1) oraz karbamoilotransferazy ornitynowej (OTC), jak również do wzrostu syntezy albuminy (Alb) – jednego z ważniejszych białek produkowanych przez hepatocyty. Wyniki uzyskane podczas badań dotyczących porównania aktywności metabolicznej linii C3A i C3A_ARG1_OTC_III w warunkach stresowych wywołanych różnymi stężeniami roztworu chlorku amonu pozwoliły stwierdzić, iż komórki transdukowane cechują się zwiększonym metabolizmem, a tym samym lepiej tolerują wyższe stężenia chlorku amonu (szczególnie powyżej 30 mM), nawet podczas ich długotrwałej ekspozycji na ten związek. Wyniki te znalazły potwierdzenie w analizie oceny morfologicznej komórek, na podstawie której zaobserwowano, iż we wszystkich badanych warunkach hodowli prowadzonych w środowisku zawierającym roztwór chlorku amonu o stężeniu końcowym od 20 do 100 mM, komórki C3A_ARG1_OTC_III wykazywały mniej zmienioną morfologię, znajdowały się w lepszej kondycji i dłużej przylegały do podłoża hodowlanego w porównaniu z komórkami kontrolnymi - C3A niemodyfikowanymi genetycznie. Jednym z ważniejszych oznaczeń, które wykonano w ramach niniejszej rozprawy, była analiza produkcji mocznika, będącego głównym produktem końcowym cyklu mocznikowego. Wykazano, iż linia komórkowa C3A_ARG1_OTC_III w obecności 40 mM roztworu chlorku amonu produkuje więcej (o około 83%) mocznika w porównaniu ze zwykłymi komórkami C3A (wynik istotny statystycznie). Świadczy to o pomyślnym i skutecznym przebiegu modyfikacji genetycznych linii ludzkiego wątrobiaka prowadzonych z użyciem samodzielnie uzyskanych wektorów lentiwirusowych, a także o prawidłowym funkcjonowaniu nadprodukowanych w komórkach C3A_ARG1_OTC_III białek ARG1 i OTC, uczestniczących w szlaku metabolicznym związanym z przekształcaniem amoniaku do mocznika na drodze cyklu mocznikowego.

Zgodnie z najnowszą wiedzą literaturową, dotychczas nie zaobserwowano próby podjęcia modyfikacji genetycznych komórek C3A, pod kątem istniejących dysfunkcji metabolicznych związanych z detoksykacją amoniaku. Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej genetyczne modyfikacje komórek C3A, wykonane z zastosowaniem samodzielnie wyprodukowanych wektorów lentiwirusowych, pozwoliły na pomyślną integrację do genomu

komórek ludzkiego wątrobiaka dodatkowych kopii ludzkich genów *hARG1* i *hOTC*. Zjawisko to w sposób znaczący zwiększyło aktywność szlaków metabolicznych związanych z przemianą amoniaku w komórkach C3A_ARG1_OTC_III, umożliwiając istotnie statystycznie lepszą tolerancję jonów amonowych obecnych w środowisku hodowlanym w porównaniu z macierzystą linią C3A. Co więcej, integracja do genomu komórek wątrobiaka genów *hARG1* i *hOTC* znacząco statystycznie wpłynęły na zwiększenie syntezy albuminy w modyfikowanych komórkach, co ma szczególne znaczenie ze względu na różnorodność oraz istotność funkcji biologicznych pełnionych przez to białko w organizmie ludzkim. Po raz pierwszy wykazano również, iż obecność jonów amonowych istotnie statystycznie wpływa na wzrost produkcji albuminy w komórkach ludzkiego wątrobiaka, co świadczy o prawdopodobnym zaangażowaniu tego białka w mechanizmy ochronne komórki, uruchamiane w odpowiedzi na obecność w środowisku jonów amonowych.

Otrzymana w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej linia komórkowa C3A_ARG1_OTC_III, wykazująca cechy ludzkich hepatocytów ze szczególnym uwzględnieniem ważniejszych funkcji fizjologicznych wątroby związanych z detoksykacją amoniaku oraz syntezą albuminy, stanowić może lepszy model badawczy ludzkiej wątroby w warunkach *in vitro*, niż dotychczas stosowane komórki C3A. Co więcej, potencjał komórek C3A_ARG1_OTC_III ukazany na podstawie przeprowadzonych analiz w niniejszej rozprawie, pozwala rozważyć ich użycie w kontekście alternatywnego źródła komórek w biosztucznych systemach wspomagających funkcje wątroby (BAL). Zastosowanie w przyszłości komórek C3A_ARG1_OTC_III w terapii chorób wątroby pozwoliłoby na zwiększenie skuteczności wspomagania utraconych funkcji tego narządu w porównaniu do obecnie stosowanych systemów wykorzystujących niemodyfikowane komórki C3A, co mogłoby wpłynąć na poprawę parametrów życiowych pacjentów, a tym samym zwiększyć ich szanse na przeżycie.