

Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk

Karolina Ewa Zakrzewska

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

Promotor: dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska, prof. IBIB PAN

Promotor pomocniczy: dr Krzysztof D. Pluta

Recenzenci: dr hab. inż. Beata Burzyńska, prof. IBB PAN

dr hab. inż. Tomasz Ciach, prof. PW

prof. dr hab. n. med. Piotr Fiedor

Warszawa, 2016

1. Wstęp

Jedyną w pełni skuteczną formą terapii krańcowej niewydolności wątroby jest jej allogeniczny przeszczep. Niestety, liczba dawców tego narządu jest niewystarczająca. Obecnie rozwijane są inne metody leczenia, w tym przeszczep hepatocytów oraz zewnątrzustrojowe wspomaganie przy użyciu systemów biosztucznych. Ograniczeniami metod alternatywnych są m.in. niska dostępność hepatocytów i szybka utrata typowych dla nich funkcji w warunkach *in vitro*. W badaniach opisujących rozwiązania tych problemów można wyróżnić dwa kierunki – wykorzystanie komórek hepatocytopodobnych, szczególnie tych różnicowanych z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSc, ang. *induced Pluripotent Stem cells*) oraz opracowanie metod długotrwałej hodowli ludzkich izolowanych hepatocytów. W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki dotyczące zarówno udoskonalonej metody pozyskiwania hepatocytów ludzkich jak i hodowli komórek pochodzenia wątrobowego z genetycznie modyfikowanymi komórkami podtrzymującymi.

2. Opracowanie udoskonalonej metody izolacji komórek wątrobowych

Najczęściej stosowaną metodą izolacji komórek z wątrób ludzkich i zwierzęcych jest metoda podwójnej perfuzji (in. metoda Seglena). Polega ona na wykorzystaniu naturalnie występującej siatki naczyń krwionośnych do rozprowadzenia kolagenazy, przez co dochodzi do uwolnienia komórek z macierzy zewnątrzkomórkowej. Metoda maceracji, udoskonalona przez nasz Zespół, różni się głównie sposobem dostarczenia enzymu do tkanki oraz czasem trawienia. Fragmenty wątrób, pocięte na mniejsze kawałki, są zanurzane w roztworze kolagenazy i mieszane do momentu uwolnienia hepatocytów. Porównanie wydajności procesu (liczba komórek na 1 g tkanki) wskazało wyraźnie, że przy użyciu metody maceracji otrzymać można więcej komórek niż stosując podwójną perfuzję. Czas izolacji, wybrany eksperymentalnie, jest krótki, co pozwala na uzyskanie wysokiego odsetka żywych komórek. Oba te czynniki sprawiają, że metoda maceracji jest mniej czaso- i kosztochłonna niż metoda podwójnej perfuzji oraz wpływa pozytywnie na żywotność komórek po izolacji. Tym samym potwierdzona została I teza rozprawy o możliwości opracowania wydajniejszej i mniej szkodliwej dla komórek metodzie izolacji – maceracji w porównaniu do powszechnie stosowanej metody podwójnej perfuzji (metody Seglena). Komórki izolowane przy użyciu maceracji, ze względu na łatwość i szybkość metody, mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce chorób wątroby.

3. Analiza cytometryczna komórek izolowanych z ludzkiej wątroby

Analiza cytometryczna służy do oceny wielu parametrów komórkowych – wielkości, ziarnistości, występowania markerów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych oraz względnej produkcji białek na podstawie mediany natężenia fluorescencji (MFI, ang. *Median Fluorescence Intensity*). W przypadku ludzkich hepatocytów jest stosowana rzadko i zazwyczaj jako metoda potwierdzająca fenotyp właściwy tym komórkom. Zastosowanie cytometru przepływowego do oceny izolatu wątrobowego pozwoliło na wyciągnięcie wielu interesujących wniosków. Na podstawie zależności opisujących wielkość komórek względem ich ziarnistości, wyodrębnione zostały populacje komórek występujące w izolacie wątrobowym (populacja P1). Poza hepatocytami, obecnymi w populacji P2, zawsze występowała populacja komórek nieparenchymalnych, określona jako populacja P3. Zarówno wielkość tych populacji, jak i ich wzajemny stosunek procentowy był zależny od wieku u kobiet poddanych chemioterapii. U pacjentek do 60 roku życia odsetek P2 względem wszystkich zdarzeń uznanych za komórki (P1) był wyższy niż u pacjentek powyżej 60 roku życia. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku populacji P3, czyli niższy odsetek populacji P3 zanotowano u pacjentek przed 60 rokiem życia, a wyższy u pacjentek po 60 roku życia. Ponadto wnioskując na podstawie wiązania się komórek z przeciwciałem skierowanym przeciwko albuminie (ALB), stwierdzono, że populacja P2 w próbkach pochodzących od kobiet charakteryzowała się mniejszym odsetkiem komórek ALB-pozytywnych niż w próbkach pochodzących od mężczyzn z wyłączeniem dawców, których wątroby odrzucono ze względu na niską jakość. Różnica w produkcji albuminy w zależności od płci jest jeszcze bardziej widoczna w izolatach pochodzących od młodych kobiet i mężczyzn, a nie występuje u osób po 60 roku życia. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że kobiety charakteryzują się mniejszą tzw. rezerwą regeneracyjną hepatocytów, co może wynikać z właściwości samych komórek lub powstawać na skutek poddania pacjentek podczas leczenia niedostosowanymi dawkami chemioterapeutyków. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga jednak zebrania znacznie większej próby statystycznej niż ta opisana w rozprawie oraz szczegółowych danych na temat przebiegu leczenia pacjentów. Na podkreślenie zasługuje oryginalne zastosowanie cytometrii przepływowej do analizy izolatu ludzkich komórek wątrobowych jako wstępu do opracowania metody diagnostycznej. Wyniki badań dotyczących analizy cytometrycznej komórek izolowanych z ludzkiej wątroby zostały dotychczas przedstawione w 4 doniesieniach konferencyjnych [Zakrzewska, 2015; Kowalska, 2015; Zakrzewska, 2015; Samluk, 2015].

4. Kokultura ludzkich komórek pochodzenia wątrobowego z genetycznie modyfikowanymi fibroblastami ludzkimi

Jednym z obecnie rozwijanych kierunków badawczych, dotyczących sposobów hodowli hepatocytów ludzkich, jest odtworzenie, możliwie jak najdokładniejsze, warunków panujących *in vivo*. Do tego celu służą hodowle zawierające wiele różnych typów komórek występujących w wątrobie, hodowle w warunkach dynamicznych – w przepływie, hodowle przestrzenne m.in. na biosztucznym rusztowaniu 3D czy też hodowle w decelularyzowanej wątrobie – biorusztowanie. Rozwiązaniem stosowanym przez nasz Zespół jest hodowla z komórkami ją podtrzymującymi (ang. *feeder layer cells*). Jednym z typów komórek wykorzystywanych do tego rodzaju kokultur są fibroblasty, ze względu m.in. na zdolność do produkcji dużej ilości białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wydzielanie wielu czynników wzrostu i cytokin.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują, że zastosowanie komórek podtrzymujących bardzo dobrze wpływa na funkcjonowanie komórek pochodzenia wątrobowego. Fibroblasty izolowane z ludzkiej skóry (HSF, ang. *Human Skin Fibroblasts*), jako *feeder layer cells*, w kokulturze z komórkami linii C3A (model hepatocytów) pozytywnie oddziałują zarówno na ich morfologię (polaryzacja) jak i zdolności biosyntetyczne (produkcja białek – albuminy i α -1-antytrypsyny). Wspólny wzrost fibroblastów i komórek linii C3A powodował formowanie się struktur w postaci zespołu komórek C3A przypominających wyspy otoczone i rozgraniczone przez fibroblasty. W zależności od proporcji komórek fibroblasty/C3A w dniu wysiania powstawały wyspy różnej wielkości, co może pozwolić na regulację oddziaływań homo- i heterotypowych. Analiza liczby i powierzchni wysp była znacznie ułatwiona, dzięki użyciu „kolorowych” linii C3A i HSF, produkujących trwale białka fluorescencyjne EGFP i DsRed2. Linie powstałe w wyniku transdukcji wektorami lentiwirusowymi, zostały zbadane, a następnie wykorzystane wyniki badań zostały przedstawione w 3 publikacjach współautorskich [Samluk, 2013; Zakrzewska, 2014; Zakrzewska, 2015].

6. Uzyskanie ludzkich fibroblastów skóry charakteryzujących się nadprodukcją epidermalnego czynnika wzrostu

Wprowadzenie do fibroblastów dodatkowej kopii genu *EGF* i nadprodukcja epidermalnego czynnika wzrostu (EGF, ang. *Epidermal Growth Factor*) miała, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, wpłynąć pozytywnie na komórki pochodzenia wątrobowego.

Trudności napotkane z samodzielnym przygotowaniem wektorów lentiwirusowych zawierających *EGF* dotyczyły zarówno procesu klonowania wstawki do plazmidu wektorowego, jak i produkcji wektorów LV. Po przeprowadzeniu kilkuset prób, zastosowaniu różnych podejść i testowaniu kilku szczepów bakterii kompetentnych, w tym specjalnie dedykowanych do wektorów lentiwirusowych *E. coli* STBL3 nie udało się wprowadzić do plazmidu wektorowego wstawki o wielkości ok. 6 kbp. W związku z niepowodzeniem w uzyskaniu własnego konstrukt, zdecydowano się na użycie zsynchronizowanego plazmidu zawierającego *EGF* i jako białko znacznikowe – mCherry, firmy Genecopoeia. Kolejnym problemem była produkcja wektorów o odpowiednim mianie. Niestety, procedura opracowana na podstawie plazmidów zawierających gen kodujący białko EGFP i DsRed2 okazała się niewłaściwa i mimo kilkudziesięciu prób nie otrzymano wektorów o mianie wystarczającym do transdukcji HSF. Z tego powodu zdecydowano się na użycie LP2000, która jest znacznie droższa, ale charakteryzuje się większą skutecznością w porównaniu z metodą wykorzystującą PEI. W końcowym rozwiązaniu, w którym wykorzystano zsynchronizowany plazmid zawierający *EGF* i białko znacznikowe – mCherry oraz metodę LP2000, uzyskano zmodyfikowane ludzkie fibroblasty skóry charakteryzujące się nadprodukcją epidermalnego czynnika wzrostu.

7. Kokultura ludzkich komórek pochodzenia wątrobowego z fibroblastami ludzkimi nadprodukcją epidermalny czynnik wzrostu

Kokultura komórek C3A z fibroblastami izolowanymi z ludzkiej skóry nadprodukcją EGF po raz pierwszy została opisana w niniejszej rozprawie. Linia HSF-E3 została wybrana na podstawie badań i charakteryzuje się wzrostem produkcji czynnika wzrostu o ok. 25% w porównaniu do fibroblastów niemodyfikowanych (dane na podstawie testu ELISA). Wpływ HSF-E3 na komórki C3A dotyczył zarówno ich morfologii wyrażone poprzez zwiększenie częstości występowania struktur *bile canaliculi*, jak i fizjologii – zwiększenie produkcji albuminy. W budowie skrajnie zróżnicowanych hepatocytów można wyróżnić dwa bieguny: naczyniowy i żółciowy, a stopień ich polaryzacji jest jednym z parametrów określających jakość hodowli. Częstość powstawania *bile canaliculi* w komórkach C3A w kokulturze z HSF-E3 została podwyższona o prawie 40% w porównaniu do monokultury C3A. Zarówno suplementacja EGF (10 ng/ml), jak i kokultura z niemodyfikowanymi fibroblastami, nie przyniosły tak dużego wzrostu, odpowiednio było to ok. 19% i 30%. Przebieg produkcji albuminy podczas 18-dniowej hodowli w komórkach C3A

w kokulturach z fibroblastami modyfikowanymi i niemodyfikowanymi był zupełnie inny niż w monokulturach. Od dnia 15. w monokulturach stężenie wydzielanej do medium albuminy spada w przeciwieństwie do kokultur, gdzie stężenie ALB stale rośnie. Należy dodać, że największą produkcję uzyskano w kokulturze C3A z HSF-E3. W ostatnim, 18. dniu hodowli, stężenie albuminy w medium w kokulturze C3A+HSF-E3 było o ponad 70% wyższe niż w monokulturze C3A. Biorąc pod uwagę hodowle długotrwałe, utrzymanie wysokiej i wzrostowej tendencji w produkcji albuminy jest bardzo znaczącym, a w ocenie autorki – najważniejszym, uzyskanym wynikiem badań. Przewaga kokultury z HSF-E3 nad kokulturą z niemodyfikowanymi fibroblastami lub kokulturą z niemodyfikowanymi fibroblastami suplementowaną EGF może wynikać z lepszej dostępności czynnika wzrostu dla komórek hepatomy. Być może EGF wydzielany przez HSF-E3 znajduje się pośród białek macierzy zewnątrzkomórkowej i przez to jest bardziej dostępny dla komórek C3A. Dodatek 10 ng EGF na 1 ml medium hodowlanego jest rekomendowany przez producentów odczynników, które są stosowane w hodowlach hepatocytów, jednakże nie wpłynął on pozytywnie na komórki C3A, w takim stopniu jak kokultura z HSF-E3. Zatem, można stwierdzić, że ten typ hodowli – kokultura C3A/HSF-E3, wpłynął najlepiej spośród badanych na funkcjonowanie komórek C3A. Tym samym potwierdzona została II teza rozprawy o pozytywnym wpływie kokultury z genetycznie zmodyfikowanymi fibroblastami ludzkimi na parametry komórek wątrobowych.

8. Podsumowanie

Wyniki przedstawione w rozprawie wskazują, iż wprowadzony przez autorkę nowy układ hodowli komórek pochodzenia wątrobowego z fibroblastami nadprodukującymi czynnik wzrostu (EGF) jest korzystny ze względu na utrzymanie wysokiej i wzrostowej tendencji w produkcji albuminy. Linia HSF-E3 może być ulepszona przez zastosowanie sortowania komórek po transdukcji w celu uzyskania populacji o czystości przynajmniej 90%. Pozwoli to na otrzymanie komórek podtrzymujących hodowlę o korzystniejszych parametrach i zwielenokrotnienie efektu stymulacji komórek wątrobowych.

Proponowany kierunek dalszych badań obejmuje próbę skonstruowania całego panelu wektorów lentiwirusowych do modyfikacji izolowanych ludzkich fibroblastów, np. *HGF*, *HNF4* oraz zastosowanie regulacji ich ekspresji do pożądanego poziomu. Ponadto wykorzystanie innych układów hodowlanych, np. hodowla w przepływie, może wspomóc osiągnięcie długotrwałej hodowli hepatocytów izolowanych z fragmentów ludzkich wątrób.

9. Spis publikacji wymienionych w autoreferacie

Część A – izolacja i analiza cytometryczna komórek izolowanych z ludzkiej wątroby

- 1) Zakrzewska KE, Samluk A, Dudek K, Kowalska A, Pijanowska DG, Pluta KD "Factors affecting status of isolated human hepatocytes", Central European Conference on Regenerative Medicine, Bydgoszcz, 2015 (prezentacja ustna).
- 2) Kowalska A, Zakrzewska KE, Samluk A, Dudek K, Pijanowska DG, Pluta KD „Jak wybrać najlepsze hepatocyty? Selekcja hepatocytów do zastosowań biomedycznych”, IV Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne “Symbioza”, Warszawa, 2015 (plakat).
- 3) Zakrzewska KE, Samluk A, Dudek K, Kowalska A, Pijanowska DG, Pluta KD „Cytometryczna ocena komórek izolowanych z ludzkiej wątroby”, IV Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne “Symbioza”, Warszawa, 2015 (prezentacja plakatu).
- 4) Samluk A, Zakrzewska KE, Dudek K, Kowalska A, Pijanowska DG, Pluta KD „Wiek, płeć, chemioterapia – to wszystko ma znaczenie. Analiza cytometryczna izolatu ludzkich komórek wątrobowych na potrzeby biomedyczne”, XIX Krajowa Konferencja Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, Warszawa, 2015 (plakat).

Część B – kokultura ludzkich komórek pochodzenia wątrobowego z modyfikowanymi genetycznie fibroblastami ludzkimi

- 1) Samluk A, Zakrzewska KE, Pluta KD, “Generation of Fluorescently Labeled Cell Lines, C3A Hepatoma Cells and Human Adult Skin Fibroblasts, to Study Coculture Models”, Artificial Organs, 2013 Jul;37(7):E123-30. Epub 2013 Apr 15.
- 2) Zakrzewska KE, Samluk A, Pluta KD, Pijanowska DG “Evaluation of the Effects of Antibiotics on Cytotoxicity of EGFP and DsRed2 Fluorescent Proteins Used for Stable Cell Labeling”, Acta Biochimica Polonica, 2014;61(4):809-13. Epub 2014 Nov 7.
- 3) Zakrzewska KE, Samluk A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E, Chwalibog A, Pijanowska DG, Pluta KD “Analysis of cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines”, PLOS ONE, 2015 Mar 27; 10(3):e0122579.