

Streszczenie

Za główną przyczynę chorób wątroby uznaje się nadużywanie leków, infekcje wirusami WZW typu B i C, spożywanie dużych ilości alkoholu, a także syndrom metaboliczny. Leczenie pacjentów z ostrą czy przewlekłą niewydolnością wątroby jest nadal ogromnym wyzwaniem dla lekarzy i naukowców, ponieważ z powodu obrzęku mózgu, zespołu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej i niewydolności wielonarządowej śmiertelność tych pacjentów przekracza 80%. Jediną skuteczną metodą leczenia takich pacjentów jest przeszczep wątroby lub jej fragmentu, ale głównym problemem w transplantacji jest niewystarczająca liczba dawców. Alternatywnym sposobem leczenia jest przeszczep hepatocytów oraz biosztuczne systemy wspomagające stosowane w celu podtrzymania funkcjonowania narządu w oczekiwaniu na przeszczep lub jego regenerację. Jednakże metody izolacji, kriokonserwacji i hodowli pierwotnych hepatocytów mają wiele ograniczeń. Hodowla hepatocytów jest trudna z powodu utraty przez komórki polarności, zdolności do wydzielania albuminy, aktywności transportowej czy metabolizmu mocznika. Optymalizacja warunków hodowli hepatocytów obejmuje stosowanie różnorodnych pożywek i suplementów, pokrywanie powierzchni hodowlanych komponentami macierzy pozakomórkowej lub syntetycznymi polimerami. Metody ulepszenia hodowli obejmują także trójwymiarowe rusztowania, decelularyzowane tkanki oraz kokultury z innymi rodzajami komórek. Dlatego też celem mojej rozprawy było opracowanie takich metod hodowli ludzkich komórek wątrobowych, które zwiększą ich zdolności metaboliczne oraz spowolnią proces odróżnicowywania się komórek *in vitro*. Zarówno w długo- jak i krótkoterminowej hodowli hepatocytów bardzo ważne jest przytwierdzenie komórek do dna naczynia hodowlanego. Dlatego też stosowane są różnego rodzaju substancje wywołujące ten efekt *in vitro*. Chodzi tu głównie o macierz zewnątrzkomórkową - ECM, czyli mieszaninę białek i cukrów wydzielaną przez komórki współtowarzyszące. Macierz zewnątrzkomórkowa zapewnia komórkom odpowiednie środowisko pozwalające na komunikację międzykomórkową, która wpływa na ich funkcje. Najlepiej poznanym składnikiem ECM stosowanym do hodowli komórkowej jest kolagen typu I. Zdolność komórek do przyczepienia się do podłoża hodowlanego można zwiększyć stosując także syntetyczne substancje takie jak polilizyna czy poliornityna.

Hepatocyty *in vitro* są użytecznym modelem w długo- i krótkoterminowych badaniach farmakotoksyczności różnych substancji aktywnych lub leczeniu chorób wątroby. Ponieważ hepatocyty w monokulturze prowadzonej dłużej niż tydzień tracą swoje specyficzne cechy, w tym zdolność biotransformacji ksenobiotyków, to rozpoczęto badania nad opracowaniem metod i procedur hodowli hepatocytów z uwzględnieniem modyfikacji struktury i powierzchni rusztowań 2D i 3D, wprowadzenia mikroprzepływowych układów wymiany/podawania medium (warunki dynamiczne) oraz różnego rodzaju kokultur. Metody te mają wiele zalet, jednakże dotychczas nie wprowadzono standardów hodowli pierwotnych hepatocytów. Dlatego też chętnie stosowane są alternatywne źródła komórek podobnych do hepatocytów, takich jak: linia komórkowa HepG2 - wywodząca się z raka wątrobowokomórkowego i linia C3A - pochodna HepG2, które są bardzo stabilne w hodowli *in vitro*.

Ze względu na złożoność i wielość funkcji wątroby, monokultura hepatocytów w systemach wspomagających pracę wątroby jest niewystarczająca. Dlatego też, coraz częściej do systemów

wspomagających wprowadza się oprócz komórek parenchymalnych także komórki współtowarzyszące np. komórki Kupffera czy komórki śródbłonka naczyń. Z tego powodu do dalszych badań wybrano hepatocytarny czynnik wzrostu, którego udział HGF-u w wielu procesach zachodzących w organizmie m.in. regeneracji, organogenezie i morfogenezie, a także przebudowie tkanki wątrobowej oraz wydłużaniu przeżywalności hepatocytów jest już potwierdzony. Natomiast jako komórki nieparenchymalne wybrano fibroblasty izolowane z ludzkiej skóry. Wiadomym jest, że fibroblasty pozytywnie wpływają na komórki wątroby in vitro poprzez oddziaływanie komórka-komórka, a także wpływ wydzielanych przez nie substancji (głównie kolagenu i lamininy a także innych białek macierzy zewnątrzkomórkowej) do medium hodowlanego. Dlatego też w ramach niniejszej rozprawy podjęto badania dotyczące oceny wpływu na hodowlę C3A różnych warunków hodowli, w tym nowo opracowanego podłoża z suszonych ludzkich fibroblastów skóry (drHSF) oraz połączenia dwóch sposobów wspomagania hodowli komórek wątrobowych tj. kokulturę z fibroblastami oraz suplementację czynnikiem wzrostu hepatocytów - HGF. W badaniach użyto samodzielnie zmodyfikowane HSF nadprodukujące białko HGF jako komórki ko kultury, bądź po wysuszeniu jako podłoża do hodowli hepatocytów. W rozprawie przedstawiono pierwszą skuteczną modyfikację genetyczną komórek HSF, w wyniku której powstała linia komórkowa HSF_reHGF o stabilnej nadekspresji genu hHGF. Modyfikację przeprowadzono metodą transferu genów za pośrednictwem lentiwirusa, co prowadziło do skutecznej integracji transgenów do genomu komórki docelowej. Potwierdzono, że genetycznie zmodyfikowane komórki wydzielają więcej HGF niż kontrolne komórki HSF oraz, że modyfikacja nie wpłynęła negatywnie na ich aktywność metaboliczną. Drugą tezę rozprawy potwierdzono, stwierdzając zwiększoną produkcję albuminy w komórkach C3A na podłożu z suszonych fibroblastów nadprodukujących HGF. Należy dodać, że mimo konieczności prowadzenia dalszych badań fizjologicznych możliwości nowej linii komórkowej, to na podstawie uzyskanych obecnych wyników można stwierdzić, że komórki nowej linii HSF_reHGF skutecznie wydzielają zwiększone ilości HGF do medium hodowlanego. Zatem linia ta może być uważana za ulepszone źródło komórek warstwy odżywczej dla biosztucznych systemów wspomagających wątrobę. Wzbogacenie biologicznej części tych systemów w komórki nieparenchymalne, dodatkowo wydzielające czynnik wzrostu hepatocytów, mogą poprawić właściwości metaboliczne komórek parenchymalnych, a nawet umożliwić zastosowanie hepatocytów ludzkich w ww. systemach. Inną możliwością zastosowania powstałej linii jest produkcja medium pohodowlanego wzbogaconego o czynnik wzrostu hepatocytów.

Wykazano skuteczność stosowania podłoża z fibroblastów w formie suszonej, co jest prostą i ekonomiczną formą wspierania hodowli komórek wątrobowych (teza pierwsza). Fibroblasty w takiej formie zachowują na swojej powierzchni białka takie jak kolagen, czynnik wzrostu hepatocytów czy endotelialny czynnik wzrostu. Na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem podłoża z polietylenoiminy (PEI), na których komórki C3A równomiernie rozmieściły się na powierzchni hodowlanej, stwierdzono poprawę parametrów charakterystycznych dla komórek wątrobowych, tym samym potwierdzając tezę trzecią.

Dodatkowym zadaniem będącym częścią dysertacji było ustalenie przyczyny niezadowolających wyników hodowli ludzkich hepatocytów izolowanych metodą maceracji, wcześniej opracowaną w naszej pracowni (Pracownia Inżynierii Tkankowej IBIB PAN). Stwierdzono zatem, że

najprawdopodobniej przyczyną było użycie niewłaściwej kolagenazy w procesie izolacji komórek, które powodowało odtrawianie albo blokowanie białka powierzchniowego - β 1-integryny, odpowiedzialnego za adhezję komórek do podłoża. Po zastosowaniu kolagenazy II i kolagenazy D, uzyskano liczne zgrupowania charakterystycznych, wielościennych komórek hepatocytopodobnych, potwierdziło to tezę 4.

Za najistotniejszy wynik moich badań uważam zarówno opracowanie podłoża do hodowli komórek wątrobowych - fibroblastów nadprodukujących HGF, jak również ustalenie przyczyny problemów z hodowlą hepatocytów izolowanych metodą maceracji. Wyniki te mogą przyczynić się do ulepszenia biosztucznej wątroby, a także ze względu na poprawę hodowli hepatocytów *in vitro*, co wpływa na możliwości prowadzenia badań hepatotoksyczności, do rozwoju terapii spersonalizowanej.