

Nr umowy: UMO-2019/35/D/NZ3/01804

Tytuł: Od struktury fenestracji w żywych komórkach śródbłónka zatok wątroby do farmakologii fenestracji śródbłónka in vitro w czasie rzeczywistym

Cel projektu

Wątroba jest narządem bardzo dobrze unaczynionym, przez który przepływa krew bogata w substancje odżywcze z układu pokarmowego w objętości dochodzącej do jednego litra na minutę. Substancje odżywcze, w tym cząsteczki lipoprotein, rozprawdane są siecią drobnych naczyń włosowatych nazywanych sinusoidami wątroby. Pierwszą warstwą komórek w sinusoidach wątroby jest warstwa śródbłónka. Komórki śródbłónka zatok wątroby (LSEC) stanowią pojedynczą warstwę komórek oddzielających światło naczynia krwionośnego od pozostałych komórek wątroby, głównie hepatocytów. W mowie potocznej wątrobę często nazywa się filtrem krwi. Określenie to, jakkolwiek bardzo uogólnione, znajduje uzasadnienie w morfologii komórek LSEC. Komórki te posiadają fenestracje – transkomórkowe pory – które zebrane w grupy stanowią sita dla cząsteczek zawieszonych w osoczu krwi. Fenestracje mają rozmiary od 50-300 nanometrów. Zatem pasywny transport przez fenestracje do wątroby, obejmuje tylko lipoproteiny mniejsze niż wielkość porów. Duże cząstki, takie jak chylomikrony, pozostają w osoczu, gdzie podawane są działaniu odpowiednich enzymów. W związku z tym, fenestracje w komórkach LSEC stanowią aktywną barierę, pozwalającą na kontrolowany (ilość i wielkość) przepływ lipoprotein do i z wątroby. W patologii wątroby, wynikającej m.in. z otyłości, stanu zapalnego czy nadużywania alkoholu, liczba fenestracji spada, a co za tym idzie zakłócona zostaje zdolność filtracyjna tego organu. Prowadzi to do hiperlipoproteinemii i w konsekwencji może prowadzić do miażdżycy i chorób układu krążenia. Podsumowując, zaburzenia w porowatości komórek LSEC mogą mieć konsekwencje w nieprawidłowym działaniu układu pokarmowego i układu krążenia. Pomimo ogromnego znaczenia funkcji pełnionej przez fenestracje w komórkach LSEC, wiedza na temat procesów towarzyszącym zmianom w ilości i wielkości fenestracji pozostaje szczątkowa. Jest to związane z ograniczeniami w technikach badawczych tych struktur. Jako, że fenestracje są mniejsze od długości fali światła widzialnego (400 – 900 nanometrów) nie można ich dostrzec pod mikroskopem optycznym. Do tej pory żeby je badać konieczne było użycie mikroskopii elektronowej. Ta wymaga jednak odpowiedniego preparowania komórek. Uniemożliwia to przeżyciowe badanie dynamicznych zmian tych struktur. W związku z tym przez blisko 50 lat od odkrycia fenestracji, szybkość procesów związanych ze zmianami w ilości i wielkości fenestracji pozostawała w sferze hipotez. Wraz z rozwinięciem mikroskopii sił atomowych (AFM) w badaniu fenestracji pojawiły się nowe, dotychczas będące poza zasięgiem, metody badania porowatości komórek LSEC. W 2017 roku, z wykorzystaniem techniki opartej na mikroskopii (AFM) nasz zespół po raz pierwszy zaprezentował obrazy przedstawiające fenestracje w żywych komórkach. Obecnie metodologia rozwinięta przez autora niniejszego

projektu pozostaje unikalną, umożliwiającą śledzenie dynamicznych zmian fenestracji w czasie.

Obecne wyniki badań literaturowych, w tym nasze z użyciem techniki AFM, wskazują na ogromną rolę cytoszkieletu w budowie fenestracji. **Celem tego projektu jest zrozumienie roli cytoszkieletu w tworzeniu i utrzymaniu fenestracji, a także wpływu naczynioprotekcyjnych mediatorów na porowatość świeżo izolowanych, żywych, pierwotnych, mysich komórek LSEC *in vitro*.** Badania będą prowadzone w trzech modelach defenestracji komórek LSEC. Mikroskopia AFM jest już używana do oceny kondycji komórek śródbłonna z użyciem innego markera – nanomechaniki (elastyczności, sztywności). Jako, że zmiany w nanomechanice związane są również ze zmianami w budowie cytoszkieletu śródbłonna i pozwalają na wykrycie wczesnych zmian w kondycji tych komórek, włączymy badania tego markera w prowadzonych eksperymentach. Obecnie brakuje doniesień literaturowych dotyczących właściwości nanomechanicznych komórek LSEC. Dzięki prowadzonym badaniom dostarczymy danych o zmianach elastyczności i sztywności komórek LSEC w odpowiedzi na różne czynniki. Co więcej, dokonamy pierwszej korelacji zmian zachodzących w porowatości i właściwościach nanomechanicznych komórek LSEC hodowanych na elastycznych podłożach na bazie hydrożelu. Stawiamy hipotezę, że porowatość komórek LSEC jest regulowana przez naczynioprotekcyjne mediatory (m.in. NO, PGI₂, VEGF), działające pośrednio na cytoszkielet komórkowy.

Proponowane w niniejszym projekcie badania mają wyraźnie nowatorski charakter. Przede wszystkim będą to pierwsze badania dynamicznych zmian obu markerów, tj. porowatości i nanomechaniki, w reakcji na leki.

Ponadto potwierdzenie udziału wybranych elementów cytoszkieletu w budowie fenestracji pozwoli na zaprojektowanie terapii umożliwiającej przywrócenie porowatości dysfunkcyjnej wątroby. Jeżeli zmiana właściwości mechanicznych podłoża będzie wystarczająca do zwiększenia porowatości komórek, dostarczy to pionierskich danych o regulacji fenestracji *in vivo*. Co więcej, połączona wiedza o zmianach w porowatości i nanomechanice komórek LSEC i wpływie mediatorów śródbłonna na fenestracje zostanie wykorzystana, jako platforma do badania toksyczności i odwracalności działania leków na wyrafinowanym poziomie w skali nano. Na koniec, badania dostarczą informacji o zmianach cytoszkieletu fenestracji w czasie rzeczywistym. Interakcje zachodzące między elementami stanowiącymi cytoszkielet w żywych komórkach, zarówno nienaruszonych, jak i wystawionych na działanie narzędzi farmakologicznych można przełożyć na inne typy komórek. Pozwoli to na poznanie dynamiki cytoszkieletu LSEC oraz zrozumienie mechanizmów regulujących fenestracje, co ma bezpośrednie znaczenie w leczeniu chorób wątroby.