

lek. Michał Mierzejewski

**Ocena mechanizmów pleurodezy chemicznej ze szczególnym
uwzględnieniem odpowiedzi zapalnej i profibrogennej komórek
międzybłónka w modelu in vitro.**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke

Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

3. Streszczenie w języku polskim

Pleurodeza to zabieg terapeutyczny polegający na wytworzeniu zrostu pomiędzy opłucną ścienną i trzewną. Uzyskanie takiego efektu poprzez doopłucnowe podanie różnych środków chemicznych (np. talku, tetracykliny, jodopowidonu itp.) nosi nazwę pleurodezy chemicznej. Pleurodeza chemiczna znajduje terapeutyczne zastosowanie u chorych z nawracającym płynem w jamie opłucnej i nawracającą odmą opłucnej. Chociaż pierwsze informacje o stosowaniu chemicznej pleurodezy pojawiły się już ponad sto lat temu, szczegółowe dane dotyczące mechanizmów działania środków obliterujących wciąż pozostają niekompletne. Niniejsza praca ma na celu poszerzenie wiedzy na temat odpowiedzi komórek międzybłonna na stosowane środki sklerotyzujące oraz opracowanie modelu *in vitro*, który mógłby zostać wykorzystany w przyszłych badaniach. Praca doktorska prezentowana jest jako cykl artykułów publikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych.

Pierwszy artykuł pt. „*Chemical pleurodesis – a review of mechanisms involved in pleural space obliteration*”, opublikowany w *Respiratory Research*, omawia obecny stan wiedzy na ten temat. Uważa się, że komórki międzybłonna są główną osią strukturalną pleurodezy. W odpowiedzi na działanie czynników obliterujących wydzielają różne mediatory, w tym chemokiny, takie jak interleukina 8 (IL-8) i białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1), a także czynniki wzrostu – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) oraz transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β). Dane sugerują, że odpowiednia pula sprawnych czynnościowo komórek międzybłonna będących źródłem powyżej wymienionych cytokin odgrywa kluczową rolę w inicjacji i utrzymaniu różnych szlaków zapalenia opłucnej i obliteracji jamy opłucnej.

Wydaje się, że proces pleurodezy jest w dużej stopniu nieswoisty dla poszczególnych sklerozantów i ostatecznie obejmuje te same szlaki, w tym aktywację komórek opłucnej, kaskadę krzepnięcia, tworzenie łańcucha fibryny, proliferację fibroblastów oraz produkcję kolagenu i składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Spośród tych procesów, kaskada krzepnięcia ze zmniejszoną aktywnością fibrynolityczną i zwiększoną fibrynogenezą odgrywa prawdopodobnie kluczową rolę, przynajmniej we wczesnej odpowiedzi na podanie środka obliterującego.

Dwa badania oryginalne składające się na rozprawę doktorską zostały przeprowadzone na komórkowym modelu doświadczalnym. Pierwsza, zatytułowana „*Primary human mesothelial cell culture in evaluation of the mechanisms of pleurodesis with different sclerosing agents*” została opublikowana w czasopiśmie *Physiological Reports*. Celem badania była ocena wykonalności wykorzystania pierwotnych ludzkich komórek międzybłónka uzyskanych z biopsji w celu stworzenia hodowli *in vitro* i oceny odpowiedzi komórek międzybłónka opłucnej na różne środki obliterujące. Talk, jodopowidon (PVP-I), doksycyklinę i TGF- β stosowano w różnych dawkach do stymulacji komórek międzybłónka opłucnej. Po 6 i 24 godzinach zmierzono ekspresję mRNA IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF- β , MCP-1, IL-17A i MMP9 w hodowanych komórkach oraz poziom białka IL-1 β , IL-6 i IL-8 zmierzono w supernatancie hodowli. Najbardziej wyraźną odpowiedź zaobserwowano po ekspozycji komórek na talk, co obserwowano jako wzrost ekspresji mRNA IL-1 β i wzrost stężenia IL-1 β w supernatancie hodowli. Hodowle stymulowane niższymi dawkami talku wykazywały znaczący wzrost ekspresji mRNA IL-1 β w porównaniu z kontrolą i istotny wzrost stężenia białka IL-1 β po 24 godzinach ekspozycji w porównaniu z kontrolą. Wyższa dawka talku spowodowała znaczny wzrost wytwarzania IL-1 β po 6 i 24 godzinach.

Odkryliśmy, że możliwe jest hodowanie komórek międzybłónka opłucnej wyizolowanych z próbek z biopsji opłucnej. Odpowiedzi na różne środki sklerotyzujące były bardzo zróżnicowane i nie było spójnych wzorców reakcji międzybłónka ani pod względem zastosowanego środka, ani w czasie stymulacji. Wykazaliśmy, że prozapalna odpowiedź międzybłónka obejmuje wzrost ekspresji mRNA IL-1 β i produkcji białka, co sugeruje rolę IL-1 β w tworzeniu i utrzymywaniu odpowiedzi zapalnej podczas pleurodezy.

Drugie badanie oryginalne było rozwinięciem modelu *in vitro* pochodzącym z poprzedniej publikacji. Artykuł pod tytułem: „*Impact of factors secreted by tumor cells on response of pleural mesothelial cells to different sclerosing agents in an in vitro model.*” został opublikowany w czasopiśmie *Medical Science Monitor*. Pierwszym celem pracy była ocena wpływu czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe na odpowiedź komórek międzybłónka na różne środki obliterujące. Drugim celem była ocena wpływu mediatorów pochodzących z komórek międzybłónka (stymulowanych sklerozantami) na produkcję kolagenu przez fibroblasty płuc. Było to badanie eksperymentalne oparte na hodowlach ludzkich komórek międzybłónka (MC), kulturach ludzkich fibroblastów płuc i kulturach

ludzkich komórek gruczołakoraka (ADC). Badanie przeprowadzono w dwóch fazach. Pierwsza obejmowała ocenę odpowiedzi MC na różne środki obliterujące badane w obecności i przy nieobecności supernatantów z hodowli ADC. Istniały cztery różne podzbiory kultur stymulowanych sklerozantami, w zależności od rodzaju użytej substancji chemicznej. Obejmowały one talk, PVP-I, doksycyklinę i TGF- β . Druga faza badania miała na celu ocenę aktywności profibrotycznej mediatorów wydzielanych przez komórki międzybłonka stymulowanych sklerozantami inkubowanymi z lub bez supernatantu z hodowli komórek gruczołakoraka. Wśród badanych sklerozantów najsilniejszą reakcję zapalną zaobserwowano po stymulacji talkiem, co potwierdza jego rolę jako „złotego standardu” dla pleurodezy. Dodanie supernatantu z hodowli komórek ADC jest związane ze zmianą odpowiedzi zapalnej komórek międzybłonka w porównaniu do tej po podaniu sklerozantu. Zmiany obserwowane w grupie stymulowanej samymi sklerozantami miały niską powtarzalność w grupie stymulowanej sklerozantami i mediatorami wydzielanymi przez ADC. Sugeruje to, że działanie parakryne guza może wpływać na biologiczne szlaki pleurodezy.

Uważam, że przedstawione badania poszerzyły wiedzę na temat komórkowych mechanizmów pleurodezy, a wypracowany model komórkowy wart jest dalszego rozwoju. Dlatego dalsze badania *in vitro* mechanizmów pleurodezy powinny obejmować bardziej złożone modele zawierające dwa lub trzy typy komórek, które mogą lepiej odzwierciedlać naturalne środowisko opłucnej.