

ORGANOIZI HEPATICI - O SCURTĂ PREZENTARE GENERALĂ

LIVER ORGANOIDS - A BRIEF OVERVIEW

Gabriele Codotto^{1,2*}, Benedetta Blarasin^{1,3*}, Mihaela Badea^{4,5}, Cristina Bellarosa¹

¹Liver-Brain Unit, Italian Liver Foundation, Trieste, Italy

²University of Ferrara, Department of Life Sciences and Biotechnology, Ferrara, Italy

³University of Trieste, Department of Life Sciences, Trieste, Italy

⁴Universitatea Transilvania din Braşov, Facultatea de Medicină, Braşov, Romania

⁵Institutul de Cercetare-Dezvoltare al Universităţii Transilvania din Braşov, Centrul de cercetare fundamentală și strategii preventive în medicină, Braşov, Romania

Autor corespondent: Mihaela Badea, email mihaela.badea@unitbv.ro

**are equal contributors to this work and designated as co-first authors*

Abstract

Introduction. Research of hepatic diseases needs a suitable model that mimics the function and structure of the liver. Organoids have the special ability to self-organize in a 3D structure that recreates the physiological conditions of the organ of origin. Organoids can be derived from pluripotent stem cells or adult differentiated primary cells. Protocols to obtain organoids from pluripotent stem cells recapitulate the main stages of embryonic liver development, while the ones starting from adult hepatocytes (Hep-Orgs) recreate the environment occurring during partial hepatectomy, where hepatocytes are the parenchymal cells mainly involved in tissue regeneration.

Objective/Aims: The work correlated information on methods of obtaining and characteristics of organoids derived from pluripotent stem cells or adult differentiated primary cells.

Materials and Methods: Studies from the specialized literature that presented information about methods of obtaining and characteristics of organoids derived from pluripotent stem cells or adult differentiated primary cells were considered. Literature searches were performed using PubMed, Elsevier, Scopus and Web of Science using keyword combinations - organoids, hepatocytes and pluripotent stem cells.

Results: The main advantage of organoids obtained from pluripotent stem cells is the possibility of being cultured with other cell types, offering a multiple-cell type organoid model. A multiple-cell organoid model is more suitable for studying complex diseases such as fibrosis and cancer since it mimics the *in vivo* condition of cell heterogeneity. As a disadvantage, it could be mentioned that they do not reach a completely mature phenotype, presenting a mixed fetal/adult feature. Hep-Orgs mimic the physiological conditions of the mature liver, including genetic stability and functional activities and they show a long-term expansion in culture, but because of their lack of cell heterogeneity, are useful, in principle, to study mainly monogenic diseases.

Conclusion: Considering the advantages and disadvantages of organoids, researchers must select the organoid model that best matches the characteristics of the disease under investigation.

Rezumat

Introducere: Studiarea afecţiunilor hepatice are nevoie de un model adecvat care să imite funcţia și structura ficatului. Organoizii au capacitatea specială de a se autoorganiza într-o structură 3D care recrează condițiile fiziologice ale organului de origine. Organoizii pot fi derivați din celule stem pluripotente sau din celule primare diferențiate adulte, iar protocoalele de obținere a acestora respectă principalele etape ale dezvoltării ficatului embrionar, în timp ce cele care pornesc de la hepatocite adulte (Hep-Orgs) recrează mediul care apare în timpul hepatectomiei parțiale, unde hepatocitele sunt celulele parenchimotoase implicate, în principal, în regenerarea tisulară.

Obiectivul principal al studiului: Lucrarea își propune să coreleze informații privind metode de obținere și caracteristici ale organoizilor derivați din celule stem pluripotente sau din celule primare diferențiate adulte.

Material și metodă: Analiza studiilor din literatura de specialitate publicate în PubMed, Elsevier, Scopus referitor la metodele de obținere și caracteristicile organoizilor derivați din celule stem pluripotente sau celule primare diferențiate adulte s-a realizat prin selecția articolelor identificate pe baza combinațiilor de cuvinte cheie - organoizi, hepatocite și celule stem pluripotente.

Rezultate: Principalul avantaj al organoizilor obținuți din celule stem pluripotente este posibilitatea de a fi cultivate cu alte tipuri de celule, oferind un model de organoid de tip multicelular. Un model organoid cu mai multe celule este mai potrivit pentru a studia boli complexe, cum ar fi fibroza și cancerul, deoarece imită starea *in vivo* a eterogenității celulelor. Ca dezavantaj, se poate menționa că nu ating un fenotip complet matur,

prezentând o caracteristică mixtă fetală/adultă. Hep-Orgs imită condițiile fiziologice ale ficatului matur, inclusiv stabilitatea genetică și activitățile funcționale și prezintă o expansiune pe termen lung în cultură, dar le lipsește heterogenitatea celulară, fiind utile, în principal, pentru studiul bolilor monogenice

Concluzii: Considerând avantajele și dezavantajele organoizilor, cercetătorii trebuie să selecteze modelul organoid care se potrivește cel mai bine caracteristicilor bolii investigate

Key-words: *organoids, hepatocytes, pluripotent stem cells*

Cuvinte cheie: *organoizi, hepatocite, celule stem pluripotente.*

Introducere

Definiția organoizilor a fost introdusă de Lancaster și Knoblich în studiul lor publicat în anul 2014. Aceștia au descris organoizii ca modele de studii, indicând potențialele aplicații ale acestui instrument biologic. Lancaster și Knoblich au definit organoizii ca „*derivați din celule stem pluripotente sau izolați din progenitori de organe care se diferențiază pentru a forma un țesut asemănător unui organ care prezintă mai multe tipuri de celule care se auto-organizează pentru a forma o structură care nu este diferită de organul in vivo*” (Lancaster & Knoblich, 2014).

Pornind de la definiția lui Lancaster (2021), un grup de peste 60 de experți în domeniul biologiei celulelor stem, reprezentând 16 țări, s-au reunit pentru a propune o nouă definiție a organoidului. Ei au definit un organoid ca: „*o structură tridimensională derivată din celule stem (pluripotente), progenitoare și/sau celule diferențiate care se auto-organizează prin interacțiuni celulă-celulă și celulă-matrice pentru a respecta aspecte ale arhitecturii și funcțiilor țesutului nativ in vitro*” (Marsee et al., 2021).

Organoizii pot fi derivați din celule stem pluripotente (ex. celule stem embrionare - ESC, celule stem pluripotente induse - iPSC și celule stem pluripotente adulte -PSC) sau din celule primare diferențiate adulte. Interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice sunt cruciale pentru a reproduce mediul corect în care celulele cresc. Organoizii arată capacitatea deosebită de a se auto-organiza într-o structură 3D care recrează condițiile fiziologice ale organului de origine. Comunicarea cu celulele vecine, interacțiunile mecanice și căile de semnalizare care sunt active în mediul matricei extracelulare (ECM) au determinat ca organoizii să fie un model foarte fiabil pentru a studia diferite boli, pentru a efectua testări ale medicamentelor și pentru a fi utilizați pentru multe alte aplicații (Prior et al., 2019).

Organoizi hepatici. Istoric

Metodologia de cultură a organoizilor este recentă, dar fundamentarea tehnicilor relevante pentru obținerea organoizilor a început în primii ani ai secolului XX. Eforturile de dezvoltare ale metodelor de biologie celulară și moleculară, procedurile de cultură de celule stem și metodele de studiu ale semnalizării celulare au condus la obținerea și aplicarea cunoștințelor fundamentale pentru cultivarea organoizilor.

Pași importanți în dezvoltarea culturilor de organoizi au fost realizați de Pierce și Verney în 1961. Acești cercetători au contribuit la stabilirea corpurilor embrioide (EB), care sunt grupuri de celule stem pluripotente (PSC) care pot forma agregate 3D. Sistemele EB dețin un rol important deoarece sunt considerate precursori ai organoizilor (Lancaster & Knoblich, 2014).

Baza culturii de organoizi hepatici a început în 1985, când Landry și colaboratorii săi au pus bazele unor experimente pentru a induce culturi 3D de organoizi hepatici, pornind de la hepatocite izolate din ficatul de șobolan nou-născut. (Landry et al., 1985).

Primele studii care au inclus culturi de organoizi au subliniat importanța fundamentală a unei matrice 3D pentru susținerea creșterii organoizilor. Matricea de tip hidrogel seamănă cu matricele extracelulare (ECM), deoarece sunt îmbogățite în laminină, colagen IV, proteine adezive, entactină și proteoglicani cu sulfat de heparină (Caiazza et al., 2021).

Matrigelul a fost mai întâi izolat din celulele de sarcom de șoarece Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Aceste celule canceroase murine pot produce și secreta un hidrogel care seamănă cu ECM, deoarece este îmbogățit în toate proteinele ECM. Importanța proteinelor ECM este justificată de interacțiunile celulă-matrice, care sunt prezente în situațiile fiziologice, dar nu și în modelele de culturi 2D. Compoziția matricei asigură creșterea 3D a organoizilor (Corrò et al., 2020). Deși matrigelul este considerat standardul de aur în domeniul

matricelor utilizate, există multe dezavantaje datorate variației de la lot la lot și datorită reactivității imunogene (Nuciforo & Heim, 2021).

S-au realizat multe studii pentru a produce matrice diferite, deoarece producția de matrigel este profund dependentă de animale. Hidrogelul de polietilenglicol (PEG) este o matrice alternativă care este îmbogățită cu laminină, collagen IV și fibronectină și evită utilizarea produselor de origine animală. Această matrice permite o bună eficiență pentru generarea organoizilor. Mai mult, matrigelul și PEG au fost comparate indicându-se o expansiune similară a organoizilor, atât în ceea ce privește morfologia, cât și expresia genelor (Caiazza et al., 2021). În ciuda dezavantajelor, matrigelul este considerat cea mai potrivită matrice pentru cultura de organoizi.

Îmbunătățiri ulterioare au fost realizate de Landry și colaboratorii săi, odată cu descoperirea unor celule progenitoare mici, capabile să dea naștere agregatelor sferoidale hepatice (Landry et al., 1985). Una dintre cele mai importante repere în biologia celulelor stem a fost dezvoltarea de modele de iPSC-uri din fibroblastele pacienților de către grupul Yamanaka. Aceste descoperiri au deschis noi orizonturi pentru multe domenii ale biologiei celulelor stem (Takahashi et al., 2007).

Sato și colaboratorii săi au demonstrat că celulele stem intestinale adulte, care exprimă receptorul Lgr-5 (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) ar putea da naștere la organoizi intestinali 3D (Sato et al., 2009). Lgr-5

este un receptor al agoniștilor Wnt, care leagă R-spondina 1 și stimulează activarea căilor de semnalizare Wnt (grup de căi de transducție a semnalului care încep cu proteine care transmit semnale într-o celulă prin receptorii de suprafață celulară). Prezența acestui receptor pe suprafața celulei se corelează cu o cale de semnalizare Wnt foarte activă și cu potențialul proliferativ al celulelor progenitoare bipotente (Huch et al., 2015).

Descoperirea celulelor progenitoare bipotente intestinale i-a determinat pe Huch și colaboratorii săi să identifice celule progenitoare bipotente Lgr5+ și în ficat (Huch et al., 2013, 2015). Celulele progenitoare bipotente se află în apropierea canalului biliar și studiile de urmărire a descendenței au demonstrat că aceste celule se pot diferenția atât în componentele parenchima-toase, cât și în hepatocite și celule ductale. Cercetările ulterioare au determinat posibilitatea de a obține organoizi epiteliali derivați din celule progenitoare bipotente. Atât celulele ductale, cât și hepatocitele formează agregate și dau naștere la organoizi proliferativi (Broutier et al., 2016).

Un nou model de organoid a fost dezvoltat de grupurile Nusse și Clevers în 2018. Deoarece hepatocitele au un mare potențial de regenerare în urma hepatectomiei parțiale, Peng și colab. au imitat aceleași condiții de regenerare in vitro pentru a obține organoizi derivați din hepatocite adulte. (Hu et al., 2018; Peng et al., 2018).

O prezentare generală a istoricului de obținere a organoizilor este indicată în Figura 1.

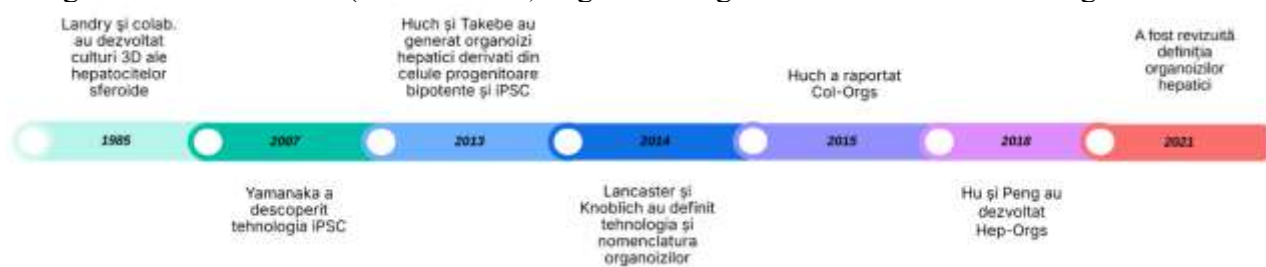


Fig. 1. Scurt istoric al organoizilor hepatici

iPSC - celule stem pluripotente induse; Hep-Orgs – organoizi derivați de la hepatocite adulte; Col-Orgs – organoizi derivați de la colabgicite

Material și metodă

Analiza studiilor din literatura de specialitate publicate în PubMed, Elsevier, Scopus referitor la metodele de obținere și caracteristicile organoizilor derivați din celule stem pluripotente sau celule primare diferențiate adulte s-a realizat prin selecția articolelor identificate pe baza combinațiilor de cuvinte cheie - organoizi, hepatocite și celule stem pluripotente.

Rezultate și discuții

Design studii. Tipuri de organoizi hepatici

Inițierea culturilor de organoizi necesită izolarea atât a celulelor celule stem pluripotente, cât și a celulelor stem/progenitoare rezidente în țesut izolate din stadii embrionare sau țesuturi adulte. Protocoale mai recente au pornit de la hepatocite adulte diferențiate pentru a obține culturi de organoizi hepatici.

Organoizi derivați din celule stem pluripotente induse

În stadiile timpurii de dezvoltare, zigotul poate da naștere țesuturilor embrionare și extra-embriionare, iar apoi celulele descendente se pot diferenția, conducând la caracteristici specifice liniei. În timpul dezvoltării, blastocistul suferă o diviziune care determină formarea a două structuri: celulele exterioare sunt angajate în direcțiile extraembriionare, iar masa celulară interioară este caracterizată de pluripotență (Fig. 2).

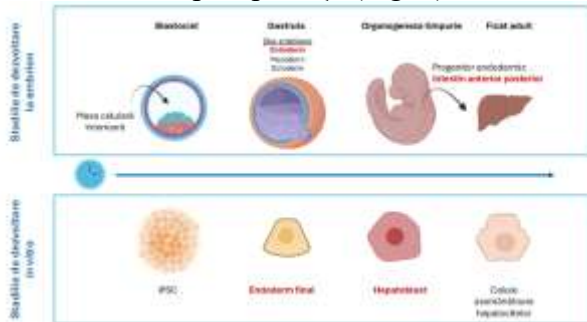


Fig. 2. Corespondența dintre etapele de dezvoltare ale organogenezei și diferențierea iPSC la celule asemănătoare hepatocitelor

Studii de specialitate au raportat diferite protocoale pentru diferențierea iPSC-urilor în celule asemănătoare hepatocitelor prin urmărirea principalelor etape ale dezvoltării ficatului embrionar. Multe protocoale se bazează pe trei etape (Fig. 2), pornind de la generarea și angajarea iPSC-urilor față de descendența endodermică, trecând la o a doua etapă, în care celulele cu caracteristicile endodermului definitiv sunt diferențiate în continuare în hepatoblaste, finalizând cu ultima etapă, care corespunde maturării celulelor asemănătoare hepatocitelor (HLC).

iPSC-urile mențin unele dintre caracteristicile celulelor stem embrionare în funcție de expresia genelor și potențialul de proliferare (Zhu et al., 2021). Un avantaj al acestui model este accesibilitatea obținerii probelor de la pacienți, deoarece materialul inițial poate fi urină, sânge sau piele. În ceea ce privește procedurile invazive (biopsiile), reprezintă o limitare a disponibilității probelor, potențialul de a obține mostre de la pacienți într-o manieră neinvazivă fiind o provocare a studiilor pentru generarea de organoizi iPSC.

Acest model deschide noi frontiere în medicina personalizată, deoarece permite pornirea de la celulele pacientului cu genotipul original. iPSC-urile pot fi utilizate pentru a modela boli genetice într-o manieră specifică

organelor sau pentru a obține fenotipul dorit (prin inginerie genetică) pentru un model specific al bolii (Harrison et al., 2021).

iPSC-urile au fost cultivate și cu alte tipuri de celule, indicând avantajul de a oferi diferite modele de organoizi. Un model de organoizi cu mai multe tipuri de celule este mai potrivit pentru studierea bolilor complexe, cum ar fi boala hepatică steatotică asociată disfuncției metabolice (MASLD), fibroza și cancerul, deoarece imită starea *in vivo* a eterogenității celulare (Harrison et al., 2021).

Alături de avantajele menționate, există și unele dezavantaje care sunt în mare parte legate de caracteristicile genetice ale organoizilor derivați din iPSC. Caracteristicile mixte fetale/adulte sunt o limitare actuală deoarece celulele diferențiate inițiale prezintă caracteristici genetice și funcționale diferite de cele obținute. Pentru a modela boala genetică este importantă menținerea genotipului original. S-a observat că în etapele de reprogramare pentru a obține organoide derivate din iPSC-uri conduc la celule care prezintă anomalii genetice (Cheng et al., 2012).

Etapele dezvoltării reprogramării iPSC-urilor necesită factori de creștere recombinanți care să fie rentabili, din acest motiv, această abordare este prohibitivă pentru a fi dezvoltată pe scară largă.

Un rezumat al avantajelor și dezavantajelor organoizilor derivați din iPSC este sistematizat în Tabelul 1.

| Avantaje | Dezavantaje |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Ușor accesibil, neinvaziv, la probele pacienților Se pot folosi iPSC derivate de la un donator cu un anumit genotip sau prin inginerie genetică Mai multe celule | <ul style="list-style-type: none"> Caracteristici mixte fetale / adulte Organoizii derivați de la celulele stem pluripotente induse (iPSC) au funcționalitate de scurtă durată, comparativ cu organoizii derivați de la hepatocite acute Organoizii derivați de la iPSC adesea poartă anomalii genetice determinate de reprogramare Factorii de creștere necesari pentru a imita căile de dezvoltare sunt foarte scumpe și determină ca această abordare să fie costisitoare pe scară largă |

Tabelul 1. Avantajele și dezavantajele organoizilor derivați din iPSC

Organoizi derivați din celule stem adulte

Celulele stem adulte din țesut sunt celule ovale și sunt caracterizate prin nuclei ovali, citoplasmă

mică și marker Lgr5 expus pe suprafața celulei. Celulele progenitoare bipotente sunt rezidente în ramura terminală a arborelui căilor biliare (Canal Hering) și au potențialul de a suferi o reacție ductală (la primat) (Caiazza et al., 2021).

Înainte de descoperirea celulelor ovale, celulele stem intestinale Lgr5 pozitive au fost izolate pentru prima dată de Sato și colaboratorii săi din intestinalele de șoarece. Aceste celule au fost capabile să prolifereze și să se auto-organizeze *in vitro* (Sato et al., 2009). De atunci, celulele stem Lgr5-pozitive au fost izolate din diferite organe, inclusiv ficat, stomac și pancreas, subliniind rolul esențial al semnalizării Wnt (Nuciforo & Heim, 2021).

Huch și colab. au dezvoltat culturi de organoizi pornind de la celule stem hepatice Lgr5+. Pentru a permite o creștere robustă, mediul de cultură pentru organoizi a fost completat cu factor de creștere epidermică (EGF), R-spondin1 (Rspo1), factor de creștere a fibroblastelor (FGF), factor de creștere a hepatocitelor (HGF) și nicotinamidă (Huch et al., 2015). Toți acești factori sunt necesari pentru a imita aceleași condiții ale hepatocitelor pericentrale. Caracteristica principală a hepatocitelor pericentrale este capacitatea de a menține o cale de semnalizare Wnt foarte activă. Suplimentar, dezvoltarea acestor celule hepatice a fost prelungită până la douăsprezece luni și a

prezentat cariotip normal și markeri de hepatocite mature.

Organoizii au fost utilizați cu succes pentru a realiza grefarea la șoareci cu deficiență de fumarilacetoacetat hidrolază (Fah-). Acest model de șoarece arată în mod normal o acumulare anormală de metaboliți care provoacă leziuni hepatice, dar după transplant, afectarea ficatului a fost redusă constant (Huch et al., 2015).

Un alt model a fost dezvoltat de Huch și colab. prin inducerea unor condiții de dezvoltare a organoizilor derivați din colangiocite (Col-Orgs). Folosind un mediu de cultură definit, Col-Orgs au fost diferențiate în continuare în HLC care mențin activități funcționale, inclusiv secreția de albumine, stocarea glicogenului și metabolismul amoniacului. Chiar dacă prezintă marker de hepatocite adulte, HLC-urile prezintă o expresie reziduală a markerilor ductali; o dovadă a stării de maturare incompletă (Huch et al., 2015).

Organoizi derivați din celule primare adulte (Hep-Org)

După hepatectomie parțială (PHx), hepatocitele sunt celulele parenchimotoase implicate în principal în regenerarea tisulară. Hepatocitele primare (PH) reprezintă 80% din componenta parenchimotoasă a masei hepatice și sunt potrivite pentru a fi dezvoltate *in vitro* și pot genera culturi de organoizi (Zhu et al., 2021).

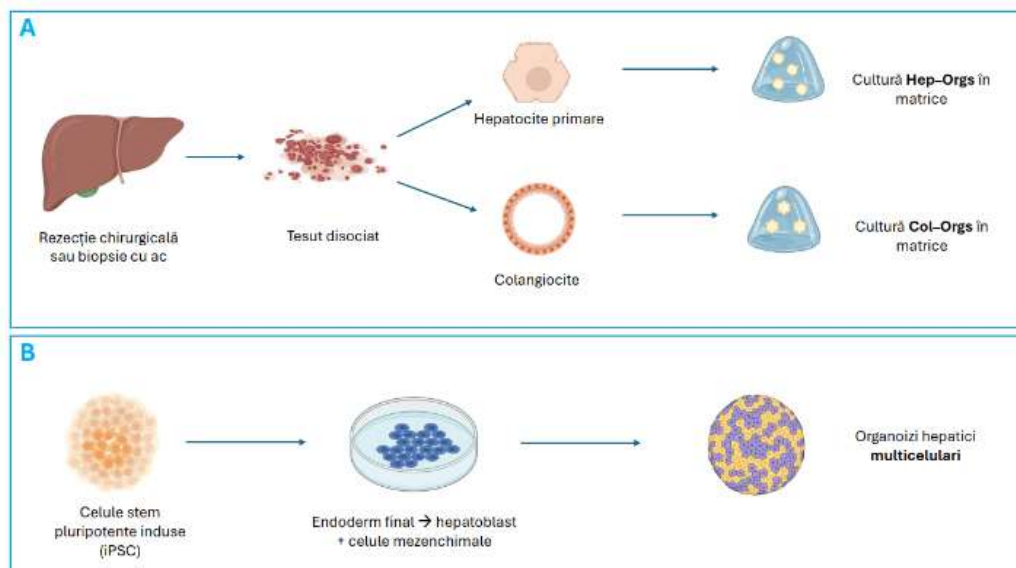


Fig. 3. Principalele etape de diferențiere pentru obținerea Hep – Orgs și Col – Orgs din rezeecție chirurgicală hepatică sau biopsie cu ac (A) și organoizilor hepatici multicelulari din celule stem pluripotente (B). În protocolul A, dezvoltarea organoidului începe de la ficatul adult pentru a obține țesut disociat.

Atât hepatocitele primare, cât și colangiocitele pot fi cultivate pentru a obține Hep–Orgs sau Col–Orgs folosind o compoziție diferită a mediului. În protocolul B, celulele stem pluripotente trec prin toate etapele dezvoltării embrionare pentru a obține organoizi hepatici multicelulari

În 2018, două grupuri de cercetare diferite conduse de Clevers și Nusse au reprodus

condițiile PHx pentru a obține organoizi derivați din celule primare adulte (Hep-Org). Ambele modele au nevoie de activarea semnalizării mitogene de către factorul de creștere epidermală (EGF), factorul de creștere a hepatocitelor (HGF), factorul de creștere a fibroblastelor (FGF) și potențarea căii de semnalizare Wnt pentru a asigura dezvoltarea *in vitro* pe termen lung (Fig. 3A) (Hu et al., 2018; Peng et al., 2018).

Principala diferență dintre cele două modele Hep-Orgs s-a bazat pe prezența factorului de necroză tumorală α (TNF- α) în mediul de cultură. PH-urile au fost înșămânțate în prezența EGF, HGF și TNF- α . După două săptămâni s-a observat formarea organoidului, iar mediul de cultură îmbogățit cu TNF- α a asigurat o cultură pe termen lung care poate fi prelungită mai mult de 6 luni (Peng et al., 2018). Deoarece TNF- α este implicat în regenerarea ficatului după leziuni, Peng și colab. (2021) au presupus că ar putea induce expansiunea Hep-Orgs. Mediul de cultură a fost optimizat cu TNF- α , EGF, HGF, CHIR99021, A83-01 și Y27632. Acest mediu îmbogățit a indus o proliferare robustă a PH-urilor murine.

S-a constatat că aproximativ 15% din hepatocitele din cultură au contribuit la obținerea de organoizi și, după câteva zile de cultură, au început să formeze structuri asemănătoare strugurilor. Mai mult, Hep-Orgs au atins dimensiuni de 100 μ m până când au format structuri asemănătoare unei rozete (Peng et al., 2021). Factorul TNF- α a fost descris ca o citokină inflamatorie implicată în expansiunea organoidelor hepatice și, pe de altă parte, un potențial de regenerare. S-a constatat că TNF- α este relevant pentru cultura Hep-Org încât, dacă administrarea de TNF- α în mediu este oprită, organoizii nu mai pot crește, în plus, observându-se o deteriorare a culturii.

Studii de specialitate au evaluat dacă interleukina-6 (IL-6) are efecte similare asupra creșterii organoizilor, dar fără rezultate consistente. În timp ce EGF nu poate induce proliferarea hepatocitelor, acțiunea sinergică EGF și TNF- α a fost validată și a indicat un potențial în proliferarea Hep-Orgs de până la 35%. Mai mult, TNF- α previne apoptoza și promovează supraviețuirea celulară prin amplificatorul lanțului ușor K al factorului nuclear al celulelor B activate (NF- κ B). Concluzionând, TNF- α este cea mai promițătoare citokină care poate susține creșterea hepato-

citelor și formarea de Hep-Org (Peng et al., 2021).

Organoizii exprimă caracteristici stabile, cum ar fi expresia albuminelor, care a fost 2-4 ori mai mică în comparație cu cea a PH-urilor. Hep-Orgs prezintă maturitate funcțională, o caracteristică de dorit pentru o directă modelare a bolii pornind de la hepatocitele specifice pacientului. Mai mult, capacitatea de a crește hepatocite specifice pacientului asigură un model potrivit pentru medicina personalizată. Deoarece s-a observat că sunt prezente diferențe genetice individuale, modelul organoid ar trebui să mențină în mod ideal aceste diferențe. De exemplu, citocromul p450 (CYP450s) are o funcționalitate foarte variabilă de la individ la individ și poate fi studiat pornind de la celule cu fenotipul pacientului.

Sistemele Hep-Org prezintă stabilitate genomică atât la nivel de secvență, cât și la nivel de cromozom. Din acest motiv, cele mai potrivite aplicații pentru Hep-Org sunt afecțiunile monogenice. Deficitul de alfa-1-antitripsină (A1AT) și sindromul Alagille (ALGS) sunt afecțiuni monogenice care au fost deja studiate cu utilizarea Hep-Orgs (Harrison et al., 2021).

Posibilitatea de a menține Hep-Orgs în cultură pentru o perioadă lungă de timp este un avantaj major în raport cu alte modele organoide, cum ar fi modelele derivate din iPSC (Jalan-Sakrikar et al., 2023).

În comparație cu iPSC-urile, Hep-Orgs indică o direcție de funcționalitate mai lungă în care poate fi efectuată testarea. Deși probele pentru obținerea PH implică proceduri invazive, care este unul dintre principalele dezavantaje, celulele cu fenotipul dorit pot fi obținute direct de la pacient. Acest lucru are un impact mare în reducerea sau înlocuirea modelelor animale. Fiind cunoscute prezențele diferențelor cheie fiziologice dintre specii, este recomandat să se aleagă un model care are backgroundul genetic dorit. Lipsa heterogenității celulare limitează acest model în posibilele aplicații, pentru boli complexe precum fibroza, MASLD sau cancerul, care nu pot fi modelate din cauza absenței altor componente celulare și a mediului.

Avantajele și dezavantajele majore ale organoizilor derivați din hepatocite adulte sunt prezentate în Tabelul 2.

| Avantaje | Dezavantaje |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> Hepatocitele primare cu maturitate funcțională pot fi crescute pe termen lung Stabilitatea genomică Posibilitatea de a crește hepatocite mature specifice pacientului Probele inițiale pot fi obținute cu fenotipul dorit, determinând reducerea sau înlocuirea modelelor animale în prezent | <ul style="list-style-type: none"> Accesul la țesuturile primare Lipsa heterogenității în populația inițială |

Tabelul 2. Avantajele și dezavantajele majore ale organoizilor derivați din hepatocite adulte

Co-cultura de celule de diferite tipuri

Heterogenitatea celulară este o caracteristică foarte importantă a unui model organoid care ar trebui să imite funcțiile organotipice ale țesutului de origine. Multe funcții sunt asigurate de interacțiunea și căile de semnalizare între diferite tipuri de celule care sunt cocultivate în același mediu, o limitare a culturii de organoizi de tip unic este datorată lipsei de semnalizare între diferite tipuri de celule. Pentru a studia boli precum MASLD sau cancerul hepatic, cultura de organoizi de tip unic nu este suficientă din cauza lipsei de heterogenitate, care este o caracteristică critică a condițiilor de micromediu (Thompson & Takebe, 2021).

Takebe și colab. au propus un model de Co-Cultură a celulelor de mai multe tipuri care ia în considerare caracteristicile menționate anterior (Zhu et al., 2021). În studiile experimentale realizate s-au cocultat celule endodermice hepatice derivate din iPSC (iPSCs-HE) cu celule stem mezenchimale (MSC) și celule endoteliale derivate din cordonul ombilical (HUVEC). Deși este dificil pentru organoizii hepatici să creeze rețea vasculară *in vitro*, modelul lui Takebe pare a fi eficient deoarece organoizii au fost transplantați în rețeaua vasculară a primitorului și, după 48 de ore, au prezentat rețele funcționale și maturizare. Mai mult, albuminele au fost detectate în sânge la 10 zile după transplant (Zhu et al., 2021). S-a demonstrat că formarea “mugurilor” a fost determinată de MSC, iar rigiditatea a avut un impact important asupra formării. În ciuda formării țesutului parenchimos funcțional vascularizat, modelul dezvoltat de Takebe are multe limitări organotipice, cum ar fi lipsa unui omolog biliar. Absența colangiocitelor și a structurilor biliare este o limitare care provine din diferențierea monostrat a iPSCs-HE care

conduce toate celulele la aceeași direcție, evitând direcția biliară. (Harrison et al., 2021). Modelul lui Takebe imită ontogenia ficatului datorită prezenței multiplelor tipuri de celule; în plus, acest model organoid poate suplina insuficiența hepatică *in vivo* după grefare (He et al., 2023).

Ulterior, în 2019, grupul coordonat de către Takebe a dezvoltat un model organoid derivat din iPSC, compus din celule asemănătoare hepatocitelor și celule mezenchimale, inclusiv celule Kupffer și celule stelate hepatice. iPSC a fost diferențiat în endoderm final printr-un mediu definit îmbogățit cu activin A, FGF4, BMP4, oncostatina M (Ouchi et al., 2019). Acest model a arătat caracteristici structurale și funcționale ale celulelor hepatice și a fost capabil să reproducă steatoza și fibroza hepatică după inducerea cu acid oleic, indicând un nou sistem de modelare a bolilor complexe, cum ar fi MASLD și fibroza hepatică.

Concluzii

În prezent, unii experți susțin ideea că probele de ficat sunt încă cel mai bun model pentru studiul caracteristicilor acestuia, în timp ce alți cercetători susțin că hepatocitele primare (PH) sunt modelul autentic pentru multe aplicații, deoarece nu sunt supuse manipulării.

Organoidul optim ar trebui să aibă următoarele caracteristici: prezența atât a celulelor parenchimotoase, cât și a celor neparenchimotoase, a interacțiunilor celulă-celulă și stromale și caracteristici structurale și arhitecturale care să asigure mediul potrivit în țesut.

Deoarece lipsa de heterogenitate este o mare limitare în modelul Hep-Orgs, cercetările viitoare ar trebui să vizeze îmbunătățirea mai multor modele de organoizi. Astfel, modelul care ar prezenta heterogenitatea celulelor și caracteristicile structurale ar putea fi folosit pentru a studia boli complexe, cum ar fi MASLD și cancerul hepatic.

Sunt necesare studii suplimentare pentru a îmbunătăți condițiile în etapele de cultură și pentru a asigura un grad mai ridicat de maturitate pentru celule asemănătoare hepatocitelor (HLC). Deoarece principalul beneficiu al acestui model de organoid este disponibilitatea ușoară a celulelor de la pacient, o îmbunătățire a acestui model ar fi de mare impact în cercetări aplicative în medicină personalizată

Bibliografie

- [1] Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature Protocols*, 2016, 11(9), 1724–1743. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.097>
- [2] Caiazza C, Parisi S, Caiazza M. Liver Organoids: Updates on Disease Modeling and Biomedical Applications. *Biology*, 2021, 10(9), 835. <https://doi.org/10.3390/biology10090835>
- [3] Cheng L, Hansen NF, Zhao L, et al. Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(3), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.005>
- [4] Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2022, 319(1), C151–C165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
- [5] Harrison SP, Baumgarten SF, Verma R, et al. Liver Organoids: Recent Developments, Limitations and Potential. *Frontiers in Medicine*, 8, 2021, 574047. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.574047>
- [6] He C, Lu D, Lin Z, et al. Liver Organoids, Novel and Promising Modalities for Exploring and Repairing Liver Injury. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2023, 19(2), 345–357. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10456-3>
- [7] Hu H, Gehart H, Artegiani B et al. Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. *Cell*, 2018, 175(6), 1591–1606.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.013>
- [8] Huch M, Dorrell C, Boj SF, et al. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, 2013, 494(7436), 247–250. <https://doi.org/10.1038/nature11826>
- [9] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, 2015, 160(1–2), 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.050>
- [10] Jalan-Sakrikar N, Brevini T, Huebert RC et al Organoids and regenerative hepatology. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2023, 77(1), 305–322. <https://doi.org/10.1002/hep.32583>
- [11] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science (New York, N.Y.)*, 2014, 345(6194), 1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- [12] Landry J, Bernier D, Ouellet C et al, Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *The Journal of Cell Biology*, 1985, 101(3), 914–923. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.914>
- [13] Marsee A, Roos FJM, Verstegen MMA et al. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.005>
- [14] Nuciforo S, Heim MH, Organoids to model liver disease. *JHEP Reports: Innovation in Hepatology*, 2021, 3(1), 100198. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100198>
- [15] Ouchi R, Togo S, Kimura M, et al Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metabolism*, 2019, 30(2), 374–384.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.007>
- [16] Peng WC, Kraaier LJ, Kluiver TA. Hepatocyte organoids and cell transplantation: What the future holds. *Experimental & Molecular Medicine*, 2021, 53(10), 1512–1528. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00579-x>
- [17] Peng WC, Logan CY, Fish M et al Inflammatory Cytokine TNF α Promotes the Long-Term Expansion of Primary Hepatocytes in 3D Culture. *Cell*, 2018, 175(6), 1607–1619.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.012>
- [18] Prior N, Inacio P, Huch M. Liver organoids: From basic research to therapeutic applications. *Gut*, 2019, 68(12), 2228–2237. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319256>
- [19] Sato T, Vries RG, Snippert HJ et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459 (7244), 2009 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- [20] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- [21] Thompson WL, Takebe T. Human liver model systems in a dish. *Development, Growth & Differentiation*, 2021, 63(1), 47–58. <https://doi.org/10.1111/dgd.12708>
- [22] Zhu X, Zhang B, He Y, et al Liver Organoids: Formation Strategies and Biomedical Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2021, 18(4), 573–585. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00357-w>

Contribuția autorilor: conceptualizare GC, BB, CB; designul cercetării: GC, BB, CB, validarea metodologiei: GC, BB, CB; culegerea datelor: GC, BB, CB, analiza datelor și / sau interpretarea datelor: GC, BB, CB; scriere-pregătirea textului inițial GC, BB, revizuire și editare: GC, BB, CB, MB.

Surse de finanțare: Activitățile autorilor BB, CT, CB au fost finanțate printr-un grant intern al Italian Liver Foundation (Trieste, Italia), iar a autorului GC fost finanțată de University of Ferrara (Ferrara, Italia). MB a desfășurat activități de cercetare în cadrul Italian Liver Foundation (Trieste, Italia) cu sprijinul Ministerului Educației, prin Agenția de Credite și Burse de Studii

Conflicte de interese: autorii nu au conflicte de interese relevante pentru acest articol.

Mulțumiri -