# **TRANG THÔNG TIN LUẬN ÁN**

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu sự hoạt hóa giai đoạn sớm *in vitro* và *in vivo* của tế bào hình sao gan trong mối liên hệ với sự tự thực bào

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số ngành: 9420201

Họ tên nghiên cứu sinh: LÊ VĂN TRÌNH

Khóa đào tạo: K29/2019

Người hướng dẫn khoa học: PGS TS Trương Hải Nhung

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG.HCM

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN**:

Xơ hóa gan là kết quả chung của nhiều bệnh lý tổn thương gan. Trong đó, các tế bào gan bị chết và được thay thế bởi mô sẹo, có bản chất là sự tích tụ của chất nền ngoại bào (ECM) được tiết bởi nguyên bào sợi cơ (MFB). Trong gan tổn thương, 80% nguồn gốc của MFB đã được chứng minh là từ tế bào hình sao gan (HSC), một loại tế bào của gan có chức năng dự trữ vitamin A. Do đó, sự chuyển dạng hay hoạt hóa của HSC thành MFB khi gan tổn thương được xem là bước then chốt trong tiến trình phát triển của bệnh lý xơ gan. Sự hoạt hóa HSC thành MFB được chia thành 2 giai đoạn là khởi đầu và duy trì. Khởi đầu là giai đoạn sớm trong sự hoạt hóa HSC chuyển từ trạng thái im lặng sang trạng thái hoạt hóa. Các đặc trưng của HSC trong giai đoạn này gồm sự chuyển dạng từ hình sao sang MFB, mất giọt lipid chứa vitamin A, biểu hiện các phân tử hoạt hóa như α-sma/collagen, hướng hóa động và tiết yếu tố viêm. Giai đoạn duy trì trạng thái MFB với các đặc tính như tăng sinh mạnh, sản xuất ECM tạo xơ, và di cư. Sự tự thực bào là một con đường sinh lý nội bào mới được phát hiện, giữ nhiều vai trò quan trọng trong tế bào nhân thực, đặc biệt là giúp tế bào đáp ứng với điều kiện môi trường bất lợi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung đánh giá mối liên hệ của sự tự thực bào trong giai đoạn khởi đầu của sự hoạt hóa HSC *in vitro* và *in vivo*.

Nghiên cứu gồm 4 nội dung: (1) Phân lập và nuôi cấy HSC *in vitro*; (2) Đánh giá mối liên hệ và vai trò của sự tự thực bào trong sự hoạt hóa HSC *in vitro* ở giai đoạn sớm; (3) Tạo mô hình chuột tổn thương gan cấp tính và đánh giá trạng thái hoạt hóa ở HSC *in vivo*; (4) Khảo sát ảnh hưởng của tác nhân ức chế sự tự thực lên sự hoạt hóa HSC giai đoạn sớm *in vivo* ở chuột bị tổn thương gan cấp tính.

Các kết quả đã đạt được gồm: Nghiên cứu đã thiết lập được quy trình phân lập HSC sơ cấp từ gan chuột BALB/c và điều kiện nuôi cấy để duy trì kiểu hình im lặng *in vitro* bằng giá thể Fibrin. Nghiên cứu ghi nhận sự tự thực bào được cảm ứng biểu hiện từ giai đoạn sớm khi HSC hoạt hóa HSC *in vitro* bằng tác nhân lipopolysacharide, xử lý HSC với chất ức chế sự tự thực là Chloroquine 5 µM làm giảm sự hoạt hóa. Trên *in vivo*, sử dụng hai mô hình tổn thương gan cấp tính là tiêm 2 ml/kg CCl4 và phẫu thuật thắt ống dẫn mật ở đối tượng chuột BALB/c. Nghiên cứu đã khảo sát được giai đoạn khởi đầu của sự hoạt hóa HSC ở hai mô hình này (sự hoạt hóa *in vivo*) là 2 ngày sau gây tổn thương. Đồng thời, ghi nhận sự tăng biểu hiện của con đường tự thực bào trong HSC hoạt hóa *in vivo*. Tiêm Chloroquine 2 liều 60 mg/kg trước 24 giờ và sau 24 giờ gây mô hình bệnh, giúp giảm tổn thương và xơ hóa gan. Đi kèm với đó là tác động ức chế sự hoạt hóa HSC trong gan tổn thương cấp tính của Chloroquine. Kết luận, sự tự thực bào đi kèm với giai sớm của sự hoạt hóa HSC *in vitro* và *in vivo*, tác động ức chế sự tự thực bào giúp ngăn ngừa sự hoạt hóa HSC, làm giảm xơ hóa gan.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN**:

Các kết quả sau đây của luận án đã được đăng trên 5 bài báo khoa học ở các tạp chí quốc tế thuộc danh mục ISI.

Thiết lập thành công quy trình phân lập HSC từ chuột BALB/c phù hợp điều kiện thực tế.

Thiết lập được mô hình nuôi cấy HSC sơ cấp *in vitro* bằng gel Firbin từ huyết tương đông lạnh, giúp hạn chế hiện tượng tự hoạt hóa của HSC so với nuôi trên đĩa nhựa truyền thống.

Trong giai đoạn khởi đầu của sự hoạt hóa HSC *in vitro* và *in vivo* có đi kèm với sự tăng biểu hiện của con đường tự thực bào. Đồng thời, tác nhân ức chế sự tự thực bào là Chloroquine giúp ngăn ngừa sự hoạt hóa và chuyển dạng HSC *in vitro* ở nồng độ 5 µM trong 24 giờ và trên *in vivo* với 2 liều tiêm 60 mg/kg. Ngoài ra, CQ giúp giảm tổn thương và xơ hóa gan trên hai mô hình chuột tổn thương gan cấp tính.

**3.** **CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU**

HSC là công cụ thiết yếu, quan trọng cho các nghiên cứu về bệnh lý gan nói chung và bệnh lý xơ gan nói riêng. Việc thiết lập thành công quy trình phân lập và điều kiện nuôi cấy, là cơ sở nền tảng cho các nghiên cứu trong lĩnh vực trên mô hình tế bào này.

Mô hình nuôi cấy HSC sơ cấp *in vitro* bằng giá thể Fibrin giúp giải quyết được hạn chế của điều kiện nuôi cấy trên đĩa nhựa là sự tự hoạt hóa. Do đó, mô hình này sẽ giúp các nhà nghiên cứu mô phỏng gần với điều kiện *in vivo*.

Tác nhân ức chế sự tự thực bào giúp ngăn ngừa sự hoạt hóa HSC và hiệu quả giảm xơ hóa gan, mở ra hướng dụng điều trị mới cho các dược chất có tác động trên con đường tín hiệu này.

Một số vấn để tồn tại cần được nghiên cứu xa hơn: hoàn thiện quy trình và tối ưu hóa mô hình nuôi cấy HSC trên giá thể fibrin, chứng minh cơ chế của giá thể trong việc duy trì đặc tính im lặng của HSC. Phát triển hệ dẫn thuốc trúng mục tiêu là HSC hoạt hóa để tối ưu hóa hiệu quả và hạn chế tác dụng phụ của tác nhân ức chế sự tự thực bào trên các tế bào khác của gan.

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**  (Ký tên, họ tên) | **NGHIÊN CỨU SINH**  (Ký tên, họ tên) |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**

**THESIS INFORMATION**

Thesis title: STUDY ON INITIAL ACTIVATION PHASE OF HEPATIC STELLATE CELLS *IN VITRO* AND *IN VIVO* IN RELATION TO AUTOPHAGY

Speciality: Biotechnology

Code: 9420201

Name of PhD Student: LÊ VĂN TRÌNH

Academic year: K29/2019

Supervisor: Associate Professor. Doctor. Trương Hải Nhung

At: VNUHCM - University of Science

**1. SUMMARY**

Liver cirrhosis is the final stage of different liver etiologies. Specifically, the liver was replaced by extracellular matrix (ECM) secreted by myofibroblasts (MFBs). Recent researches indicated that over 80% of MFBs originate from hepatic stellate cells (HSCs), a type of vitamin A storage cell in the liver. Therefore, the activation of HSCs into MFBs was considered a crucial step in fibrosis development. The two phases of HSCs activation are initiation and perpetuation. The initiation is the early phase characterized by the transition of HSCs from quiescence to activation stage. During this phase, HSCs will transform from a starlike shape to MFBs morphology, lose their vitamin A stored in lipid droplets, express activated molecules α-sma/collagen, chemotaxis, and secrete inflammatory cytokines. Following this is the perpetuation or MFBs maintenance phase, which is characterized by robust proliferation, ECM secretion, and migration. Autophagy was currently demonstrated as a novel and essential role in the cell, especially for cell response to stressful. This study evaluated the relationship between autophagy and initiation phase of HSCs activation *in vitro* and *in vivo*.

The study consists of 4 parts: (1) Isolation and culture of HSCs *in vitro*; (2) Evaluation the relation of autophagy and HSCs initiation activation *in vitro*; (3) Establishing the acute liver injury mice model and examination the HSCs activation *in vivo*; (4) Evaluation the effects of autophagy inhibitor in the HSCs activation *in vivo* and liver pathophysiology.

The main findings from the thesis were: successfully established the procedure for isolating HSC from the BALB/c mice and the *in vitro* culture conditions. Specifically, the discovery of the potential of Fibrin gel in maintaining the quiescence phenotype of HSCs culture *in vitro*. *In vitro* induction of autophagy by lipopolysaccharides was found to be accompanied by HSCs activation, and inhibition of autophagy by 5 µM chloroquine inhibited HSCs activation. Using two models of acute liver injury in BALB/c mice, 2 ml/kg CCl4 and bile duct ligation, we determined that the initial phase of HSCs activation occurred on day 2 after injury. Concurrently, autophagy increased expression in activated HSCs *in vivo*. Inhibitor of autophagic flexus by two injections of chloroquine 60 mg/kg, the day before and after, reduced fibrosis and inhibited HSC activation.

**2. NOVELTY OF THESIS**

The results of this thesis have been published in five ISI-indexed journal articles.

We established a successful method for isolating HSCs from BALB/c mice.

Fibrin gel is suitable for maintaining primary HSCs during culture. This model helps to overcome the disadvantages of the traditional culture condition for HSCs, which is autoactivation.

During the initial phase of HSC activation *in vitro* and *in vivo*, increased autophagic flexus expression was observed. Similarly, the autophagy inhibitor chloroquine inhibited HSC activation *in vitro* at 5 µM for 24 hours and *in vivo* with two doses of 60 mg/kg chloroquine.

In addition, chloroquine mitigated liver damage and reduced fibrosis in both models: CCl4 and bile duct ligation.

**3**. **APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTIVE**

The successful establishment of isolation procedures and culture conditions serves as the foundation for future research into this cell model. Fibrin substrate has great potential for use in *in vitro* HSC culture assays, as it helps to overcome the challenge posed by this cell's traditional self-activation culture condition.

The effectiveness of autophagy-inhibiting agents in treating acute liver disease and cirrhosis paves the way for new therapeutic applications for these agents.

After the completion of this study, future necessitous studies will be able to optimize the fibrin substrates model for primary HSC culture and investigate its underlying mechanisms. Development of an HSC-targeting drug delivery system is require to maximize effectiveness and minimize adverse effects of an autophagy inhibitor on other liver cells.

|  |  |
| --- | --- |
| **SUPERVISOR** | **PhD STUDENT** |

**CERTIFICATION**

**UNIVERSITY OF SCIENCE**

**PRESIDENT**