

# In Flusskultur gehaltene Hepatozyten bilden innerhalb von 2 Tagen Leberneogewebe mit Ausbildung von reifen Gallenkanalikuli

M. Lütgehetmann<sup>1</sup>, J.-M. Pollok<sup>1,3</sup>, É. Török<sup>1,3</sup>, C. Cordes<sup>1</sup>, P.X. Ma<sup>5</sup>, J. Petersen<sup>2,3</sup>, M. Dandri<sup>3</sup>, C. Van de Sand<sup>4</sup>, V. Heussler<sup>4</sup>, X. Rogiers<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hepatobiliäre Chirurgie, <sup>2</sup>Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; <sup>3</sup>Heinrich-Pette-Institut; <sup>4</sup>Bernhard-Nocht-Institut; <sup>5</sup>Dental School, The University of Michigan, Ann Arbor, USA

## Einleitung

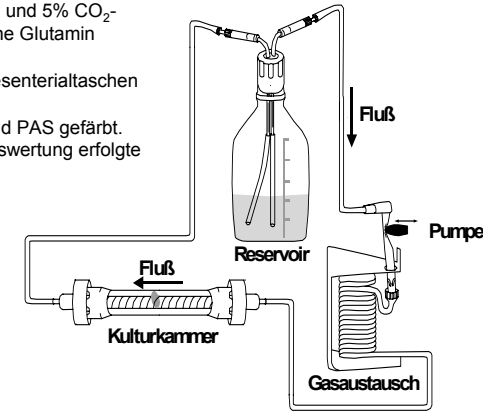
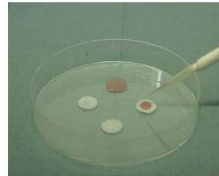
Um die Matrix basierende Hepatozytentransplantation zu optimieren, haben wir eine Flusskultur mit Hepatozyten auf biologisch abbaubaren Polymeren durchgeführt. Wir beobachteten die Ausbildung von Spheroïden und waren speziell an ihrer differenzierten Funktion im Hinblick auf die Ausbildung von Gallenkanalikuli sowohl in vitro als auch in vivo nach Transplantation in das Empfängertier interessiert.

## Material und Methoden

**Zellisolation und Anzüchtung:** Primäre Hepatozyten wurden aus männlichen Lewis Ratten mittels einer Zweischritt-Kollagenase-Verdautechnik isoliert. PLLA Polymere (Durchmesser 18mm, Dicke 1mm) wurden mit  $4 \times 10^6$  Hepatozyten besiedelt und in Flusskultur bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung mit einer Mediumflußrate von 24ml/min kultiviert. Als Kulturmedium wurde hormonstimuliertes Williams Medium E ohne Glutamin verwendet.

**Versuchsgruppen:** Die Hepatozyten wurden entweder 1, 2, 4 und 6 Tage kultiviert oder 3 Tage kultiviert und samt Polymer in Mesenterialtaschen der Ratte transplantiert und nach 1, 4, 12 und 24 Wochen explantiert.

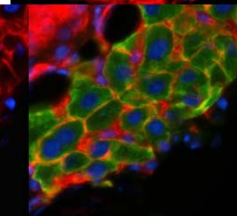
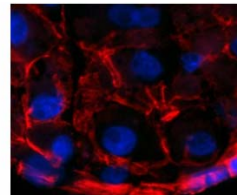
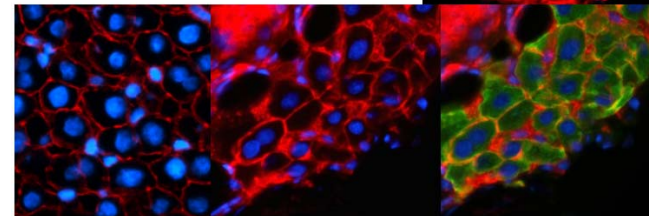
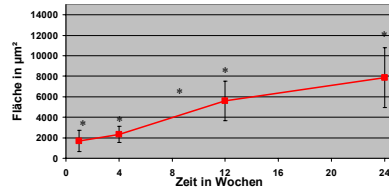
**Probenauswertung:** Es wurden Cryoschnitte und Paraffinschnitte angefertigt. Die Proben wurden dann histologisch mit H&E und PAS gefärbt. Immunhistologisch und mittels Immunfluoreszenz wurden CK 18, PCNA, Phalloidin und Hepar 1 untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test, wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurde.



## Ergebnisse

In der Flusskultur bildeten die Hepatozyten ab dem ersten Tag in den Poren des Polymers Spheroïde. Nach der Implantation in die Empfängertiere fand sich zu allen Zeitpunkten heterotropes Leberneogewebe. Dieses war positiv für PAS, Hepar 1 und Cytokeratin 18. Die Phalloidin Immunfluoreszenz-Analyse zeigte ein neu gebildetes Netzwerk aus Gallenkanalikuli, sowohl vom zweiten Tag an in vitro, als auch im neugeformten Lebergewebe in den Empfängertieren. Auch nach 6 Monaten in vivo zeigte das heterotrope Lebergewebe weder in H&E gefärbten Präparaten Zeichen einer intrazelluläre Cholestase noch waren Zysten oder andere degenerative Zeichen des Gallengangesystems nachzuweisen. Es konnte sowohl eine Proliferation der Hepatozyten durch PCNA-Färbung nachgewiesen, als auch morphometrisch eine Größenzunahme der einzelnen Hepatozytenareale gemessen werden. Es zeigte sich das mit  $p=0,000$  für die Monte-Karlo-Signifikanz und  $p=0,006$  für die Asymptotische Signifikanz ein signifikanter Größenunterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkte mit über der Zeit ansteigender Rangreihenfolge besteht.

### Größe der Hepatozytenezelareale



## Schlußfolgerungen

Hepatozyten auf biologisch abbaubaren PLLA-Polymermatrizes bilden unter Flusskulturbedingungen Spheroïde mit hepatozytenspezifischer funktioneller Aktivität und bilden schon nach 2 Tagen ein Netzwerk aus Gallenkanalikuli in vitro. Dieses Netzwerk reift in den Empfängertieren nach Transplantation der Spheroïde für 6 Monate. Da auch nach 6 Monaten weder das heterotrope Lebergewebe noch die Gallenkanalikuli Zeichen einer Cholestase zeigten, muss bei differenzierter Funktion des Gewebes ein Abtransport der Galleflüssigkeit angenommen werden. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass das heterotrop gebildete Lebergewebe bei erhaltener differenzierter Morphologie in vivo proliferative Fähigkeit besaß und über 6 Monate zunehmend an Größe gewann.