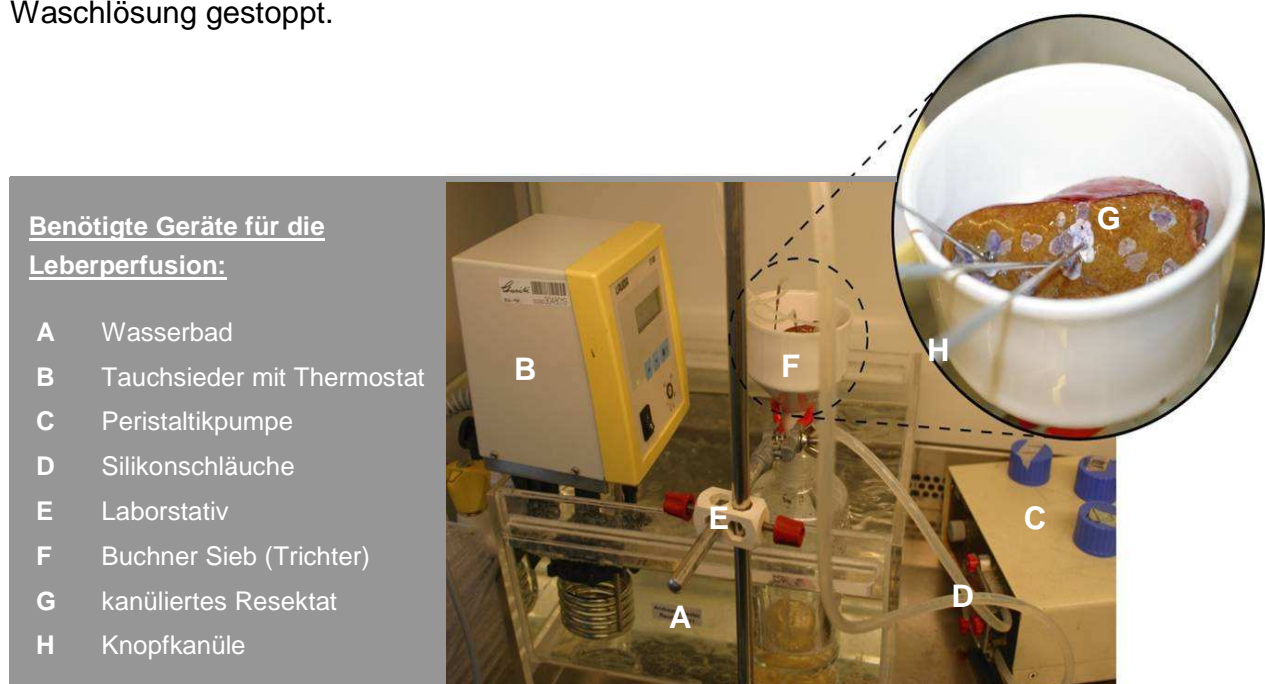


### 3 Methodik, Ergebnisse, Diskussion

Als Zellquelle für sämtliche Experimente dienten Lebersegmente, die bei Leberteilresektionen aufgrund primärer oder sekundärer maligner Tumoren sowie benigner Lebererkrankungen anfielen (Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité-Universitätsmedizin Berlin). Die Nutzung des humanen Gewebes für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt und die Patienten zuvor entsprechend aufgeklärt. Die Leberzellisolierung erfolgte unmittelbar nach der Gewebeentnahme.

Um die Ausbeute primärer humaner Hepatozyten unter Verwendung der vorhandenen Ressourcen (Leberteilresektate) zu optimieren, wurde zunächst das Isolierungsprotokoll dem aktuellen Stand der Wissenschaft angepasst und für den weiteren Gebrauch standardisiert. Es wurde eine 2-Schritt-Kollagenase-Perfusions-Methode angewandt (siehe *Abbildung 1*). In einem ersten Schritt wird das Lebergewebe von verbliebenen Blutbestandteilen gereinigt: 3 Knopfkanülen werden mit Histoacryl-Kleber im Gewebe verankert und das Resektat anschließend mit Hilfe einer Peristaltikpumpe einmalig mit 500 ml einer Waschlösung durchspült. Es folgt die Verdauungsphase: 100 ml einer Kollagenase-Lösung werden für ca. 15 min. in einem geschlossenen System rezirkuliert und der enzymatische Verdau durch die Zugabe einer humanes Albumin enthaltenden Waschlösung gestoppt.



**Abbildung 1:** Aufbau der Perfusions-Anlage sowie Kanülierung des Resektats.

Die durch diese Prozedur gewonnene Zellsuspension wird filtriert, zentrifugiert und das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert. Abschließend erfolgt die Aufreinigung der Zellen mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation unter Verwendung einer 25% Percoll-Lösung. Die auf diesem Weg isolierten PHH wurden zur Auswertung der funktionellen und morphologischen Eigenschaften für 7 Tage in 12- bzw. 96-Loch-Platten kultiviert und an den Tagen 1, 2, 3, 5 und 7 der Überstand und die Zellen für biochemische Analysen gesammelt. Das auf Williams' Medium E basierende Nährmedium wurde hierbei im Abstand von 24 Stunden gewechselt. Die biochemische Analyse der Hepatozyten umfasste folgende Parameter: die Zellvitalität, die Adhärenzfähigkeit („plating efficiency“), den Proteingehalt der Zellen, die Synthese von Albumin und Harnstoff, die Freisetzung von Aspartat-Amino-Transferase (AST) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) sowie die metabolische Aktivität der Phase I- und II-Enzyme. Während der Kulturphase wurde ein Proliferationstest (CellTiter 96® Aqueous One Solution MTS Test) durchgeführt.

Für die Kryokonservierung der humanen Hepatozyten wurde ein standardisiertes Protokoll zum kontinuierlichen, computer-kontrollierten Einfrieren der Zellen verwendet. Die Leberzellen vom jeweils gleichen Lebersegment wurden in standardisiertem Kryo-Medium mit 10% Dimethyl Sulfoxid (DMSO) als Kryoprotektivum (Kontrollgruppe, n = 9) bzw. in Testmedium (Testgruppe, n = 9) eingefroren. Das Testmedium wurde unter Zusatz des Disaccharids Trehalose als weitere kryoprotektive Substanz aus Standardmedium hergestellt. Die für PHH optimale Konzentration der verwendeten Trehalose wurde initial in einer Dosis-Findungs-Studie erarbeitet und betrug 0,2M. Im Kryo-Medium wurden die Zellen jeweils auf  $3 \times 10^6$ / ml verdünnt und in 4 ml Kryo-Röhrchen eingefroren. Der Kryokonservierung folgte die kontinuierliche Lagerung der Kryo-Röhrchen bei -156 °C. Nach einer Lagerung von mindestens einem Monat wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und das DMSO durch eine Verdünnungsserie mit einer Waschpuffer-Lösung entfernt. Im unmittelbaren Anschluss daran wurden die Zellen der Kontroll- und Testgruppe anhand desselben standardisierten Protokolls kultiviert und analysiert, welches bereits im Rahmen der Zellisolierungs-Studie angewandt wurde (siehe oben). Die Kulturen wurden hinsichtlich ihrer Unterschiede in den funktionellen als auch morphologischen Eigenschaften (Lichtmikroskopie) untereinander, sowie mit den primären Zellkulturen (Kontrollkultur vor Kryokonservierung) verglichen.

Im Rahmen der Isolierungs-Studie konnten  $n = 50$  erfolgreiche Zellisolierungen durchgeführt werden. Eine Berechnung der Zellausbeute als Zellzahl pro Gramm Leber (Zellzahl/g Leber) und der Zellvitalität (Prozent der vitalen Zellen) erfolgte sowohl vor als auch nach der Percoll-Aufreinigung durch den Trypanblau-Exklusions-Test. Von den Gewebespendern ( $n = 50$ ) wurden für die weitere Analyse zudem folgende Parameter erhoben: Alter und Geschlecht des Patienten, vorherige Chemotherapie, Ergebnisse der prä-operativen laborchemischen Untersuchungen, Indikation zur Operation (zugrunde liegende Erkrankung) sowie Histologie des entnommenen Lebergewebes.

Die Zellisolierung ergab im Durchschnitt  $18,7 \pm 1,7 \times 10^6$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) vitale Hepatozyten/g Leber. Die durchschnittliche Vitalität der Zellen betrug  $70,3 \pm 1,8\%$  und konnte durch die Percoll-Aufreinigung auf  $82,5 \pm 1,3\%$  gesteigert werden. Aufgrund von Zellverlusten durch den Aufreinigungsprozess standen im Durchschnitt  $13,2 \pm 1,4 \times 10^6$  vitale Hepatozyten/g Leber für Kultur- und Kryokonservierungsversuche zur Verfügung.

Bei der statistischen Auswertung der Spenderdaten konnte kein Zusammenhang des Geschlechts des Gewebespenders oder einer vorherigen Chemotherapie und dem Ergebnis der Zellisolierung ermittelt werden. Auch für die einzelnen prä-operativ erhobenen Parameter der laborchemischen Analyse ergaben sich keine direkten Korrelationen mit der Zellausbeute. Nach Klassifizierung der Spender in Abhängigkeit der Cholestase-Parameter konnte allerdings ein Einfluss nachgewiesen werden. Bei erhöhten Markern für Cholestase resultierte eine Verminderung sowohl der Zellausbeute als auch der initialen Vitalität (vor Zellaufreinigung). Die Zellfunktion zeigte sich ebenfalls durch die Cholestase beeinflusst: Zellen aus Lebergewebe von Spendern mit pathologisch erhöhten prä-operativen  $\gamma$ -GT Spiegel ( $> 60$  U/l) wiesen eine signifikant reduzierte Funktion auf. Im Vergleich zu Zellen von Spendern mit normwertiger  $\gamma$ -GT ( $< 60$  U/l) konnte eine signifikante Reduktion des Proteingehalts, der Albumin-Synthese und der Zellvitalität beobachtet werden. Hingegen ergab sich weder für die metabolische Aktivität der Phase I- und II-Enzyme, noch für die im Überstand gemessenen Marker der Zellschädigung (AST, LDH) ein Unterschied zwischen den Gruppen. Eine pathologische Erhöhung der  $\gamma$ -GT gilt als der sensitivste Indikator für hepatobiliäre Erkrankungen, bei denen es in über 95% zu Aktivitätserhöhungen kommt. Es ist durch eine langfristige Einnahme bestimmter Medikamente sowie durch Alkohol induzierbar. Eine Korrelation mit der funktionellen Kapazität der Hepatozyten *in vitro* ist

durchaus vorstellbar. Diese Beobachtungen sind von besonderer Bedeutung für die spätere Verwendung der isolierten Zellen. Je nach Forschungsanliegen werden bestimmte Eigenschaften der Hepatozyten gefordert. Insbesondere für Zell-basierte Therapien ist der Erhalt einer möglichst umfangreichen Zellfunktion, speziell der Syntheseleistung, von besonderem Interesse. Hingegen kann für pharmakologische Versuche bereits die Aktivität spezifischer metabolischer Enzyme der Leberzellen als ausreichend gelten. Eine Einschätzung der Zellfunktion der Hepatozyten anhand prä-operativ gewonnener Blutwerte ist von großer wissenschaftlicher Bedeutung. Die vorhandene Literatur zu diesem Thema ist äußerst begrenzt, weitere umfangreiche Studien werden dringend benötigt.

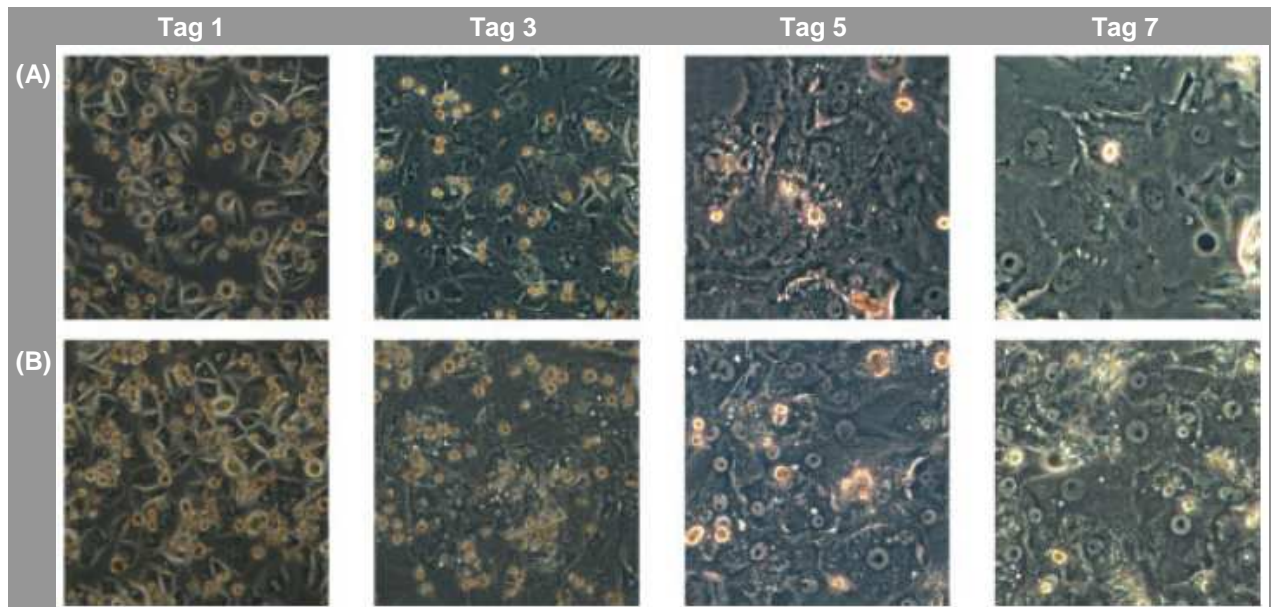
Als weiterhin relevant für das Ergebnis der Zellisolierung erwiesen sich das Alter und die zugrunde liegende Erkrankung der Patienten. Das Alter des Spenders korrelierte signifikant ( $p = 0,006$ ) mit der Zellausbeute: Lebergewebe von Patienten mit einem Alter unter 50 Jahren waren deutlich ergiebiger als Resektate von Spendern über 50 Jahren ( $25,5 \pm 2,8 \times 10^6$  vs.  $16,8 \pm 1,9 \times 10^6$  vitale Hepatozyten/g Leber). Die Zellvitalität ( $69,6 \pm 2,5 \%$  vs.  $70,5 \pm 2,2 \%$ ) sowie die Zellfunktion waren hiervon jedoch nicht betroffen. Eine Erklärung für diese Beobachtungen lässt sich durch die zugrunde liegende Erkrankung und die Verteilung der verschiedenen Erkrankungen auf die beiden Altersgruppen geben. Für Patienten über 50 Jahren bestand die Indikation zur Operation hauptsächlich in primären (41%) und sekundären malignen Tumoren (49%). Patienten unter 50 Jahren hingegen wurden aufgrund benigner Erkrankungen (46%) und sekundärer maligner Tumoren (45%) operiert. Maligne Primärtumoren waren lediglich in etwa 10% der Fälle Anlass zur Operation. Es zeigte sich weiter, dass das Gewebe von Patienten mit Leberteillesektion aufgrund von benignen Erkrankungen die günstigsten Ergebnisse aufwies: im Durchschnitt wurden  $31,2 \pm 4,6 \times 10^6$  vitale Hepatozyten/g Leber isoliert. Bei sekundären und primären malignen Tumoren als OP-Indikation war die Zellausbeute signifikant ( $p = 0,002$ ) niedriger, es resultierten  $18,8 \pm 2,1 \times 10^6$  bzw.  $12,0 \pm 1,1 \times 10^6$  vitale Hepatozyten/g Leber. Auch die Zellfunktion zeigte diesen Trend, allerdings ohne statistische Signifikanz. Die Unterschiede in der Zellausbeute lassen sich durch die Pathogenese der verschiedenen Erkrankungen erklären. Für die Entwicklung benigner Lebererkrankungen wie Hämangiome oder fokale noduläre Hyperplasien werden vaskuläre Malformationen und pluripotente Vorläuferzellen verantwortlich gemacht. Die Läsionen sind zumeist fokal lokalisiert und das umgebende

Leberparenchym bleibt in seiner Struktur und Funktion weitestgehend unberührt. Hingegen werden maligne Lebertumoren häufig im Zusammenhang mit chronischer Entzündung und fortgeschrittener Zirrhose beobachtet. Unter anderem ist ein komplexes Zusammenspiel von stimulierenden Zytokinen und Wachstumsfaktoren involviert. Oft ist das gesamte Leberparenchym durch diese Vorgänge histologisch und funktionell stark beeinträchtigt. Ein Einfluss auf die Wirkung der Verdauungsenzyme, aber auch die Funktion der isolierten Hepatozyten, erscheint durchaus plausibel. Bei der Schlussfolgerung für die praktische Relevanz dieser Erkenntnisse muss man beachten, dass die zugrunde liegenden Erkrankungen in bestimmten Altersgruppen gehäuft auftreten, jedoch nicht einzig vom Alter abhängig sind. Das Alter des Spenders zeigt somit einen Einfluss auf das Ergebnis der Zellisolierung - als Parameter für die Identifikation des potentiell ergiebigsten Lebergewebes ist allerdings nur die zugrunde liegende Erkrankung geeignet.

Erwartungsgemäß konnte auch ein Einfluss histologischer Veränderungen der verwendeten Gewebestücke auf die Zellisolierung beobachtet werden. Beim Vorliegen zirrhotischer Manifestationen, höhergradiger Steatose und/oder intrazellulärer Cholestase zeigte sich die Zellausbeute deutlich vermindert. Bei der Auswertung der Zellfunktion ergab sich keine relevante Korrelation. Allerdings ist der histologische Befund für die praktische Anwendung im Rahmen der Zellisolierung nur von untergeordneter Relevanz: nur ein geringer Anteil der Patienten erhält vor der Operation eine Leberbiopsie und der intraoperative Schnellschnitt ist zeit- und kostenintensiv. Zudem stellt die post-operative histologische Aufarbeitung den akzeptierten Standard dar und steht somit für die Identifikation des potentiell ergiebigsten Lebergewebes nicht rechtzeitig zur Verfügung.

Für die Studie zur Optimierung der Kryokonservierung ergaben sich für die Hepatozyten vor dem Einfrieren eine durchschnittliche Zellvitalität und Adhärenzfähigkeit von  $83,8 \pm 6,1\%$  bzw.  $77,2 \pm 24,6\%$ . Im Vergleich zum Ausgangswert zeigten sich diese Werte nach dem Auftauen deutlich erniedrigt, allerdings konnte durch den Zusatz von Trehalose ein signifikanter ( $p < 0,01$ ) Schutz der Zellen erzielt werden: die Zellvitalität stieg von  $46,9 \pm 11\%$  auf  $62,9 \pm 13\%$ , die Adhärenzfähigkeit von  $17,6 \pm 13\%$  auf  $41,5 \pm 18\%$ . Entsprechend fand sich ein signifikant erhöhter Proteingehalt der Testgruppe über den gesamten Kulturverlauf. Auch für den Proliferationstest, einen Indikator für die Zellvitalität in Kultur, wurden zu jedem Messpunkt höhere Werte für die Testpopulation beobachtet. Die

Zellmorphologie, durch tägliche Lichtmikroskopie erhoben, zeigte keine signifikanten Veränderungen für die Zellen der Versuchsgruppen im Vergleich zu den frisch isolierten Hepatozyten. Einziger Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen war die erhöhte Anzahl adhärenter Zellen in der Trehalose-Gruppe (siehe *Abbildung 2*).



**Abbildung 2:** Vergleich von kryokonservierten humanen Hepatozyten in Kultur. (A) Kontroll-Gruppe konserviert mit 10% DMSO, (B) Test-Gruppe konserviert mit 10% DMSO und 0.2M Trehalose im Kryo-Medium. Vergrößerung: Tage 1 und 3 = Original x 100, Tage 5 und 7 = Original x 200.

Auch die Analyse der Synthese-Parameter fiel zugunsten der unter Zusatz von Trehalose konservierten Leberzellen aus. Bei der Produktion von Harnstoff konnten geringfügig höhere Werte für die Testgruppe beobachtet werden, wobei die Synthese-Leistung der Zellen beider Gruppen über den Verlauf der Kultur langsam abnahm. Für die Synthese von Albumin ergab sich für alle Kulturen ein deutlicher Leistungsabfall nach Tag 1, welcher durch das Auswaschen nicht-adhärenter, funktionsfähiger Zellen beim Mediumwechsel erklärt werden kann. Allerdings zeigten die Zellen der Trehalose-Gruppe für die restliche Kulturphase eine signifikant erhöhte Albumin-Synthese im Vergleich zur Kontrolle. Hierbei verzeichneten sie einen leichten Anstieg in der zweiten Hälfte der Kultur, die Produktivität der Kontrollpopulation nahm hingegen kontinuierlich ab.

Für die metabolische Aktivität der Phase I- und II-Enzyme zeigten die Hepatozyten ähnliche Ergebnisse. Die Phase-I-abhängige Aktivität der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase (ECOD) stieg nach Stimulation mit Phenobarbital gering an. Durch 3-Methyl-Cholantren konnte die Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) deutlich gesteigert

werden: für die Zellen mit Trehalose im Kryo-Medium wurde das 25-fache des Ausgangswertes erreicht, hingegen verzeichnete die Kontrollgruppe nur einen 17-fachen Anstieg. Diese Differenz erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Bei der Analyse der Phase-II-Enzyme zeigten die Zellen beider Gruppen keine Aktivität der Uracil-5-Diphosphat-Glucuronyltransferase (UDP-GT). Der Verlust dieser Funktion wird für kryokonservierte Zellen schon frühzeitig in der Kulturphase beobachtet. Für Versuchszwecke werden daher häufig die frisch aufgetaute Zellsuspension bzw. ein maximaler Kulturzeitraum von 72 Stunden verwendet. In der vorliegenden Studie wurde die Funktion der PHH über einen längeren Zeitraum untersucht. Die Analyse der Phase II erfolgte erst nach 120 Stunden.

Während des Einfrier- bzw. Auftauprozesses kommt es insbesondere durch die Bildung von Eiskristallen und freien Radikalen zu einer Membranschädigung der Zellen, so dass intrazelluläre Enzyme freigesetzt werden. Der Nachweis von AST und LDH im Überstand korreliert hierbei direkt mit dem Ausmaß der Schädigung. Am ersten Tag der Kulturphase kam es für beide Versuchsgruppen zu einem Peak der Schädigungs-Marker. Ab dem zweiten Tag stabilisierten sich die Enzymaktivitäten jedoch auf einem für den restlichen Zeitraum konstanten, niedrigen Niveau. Die Verlaufskurven dieser Parameter ergeben sich wie folgt: zu Beginn der Kultur enthält das Medium noch tote bzw. stark geschädigte Zellen sowie nicht-adhärenente Hepatozyten. Mit dem ersten Mediumwechsel nach 24 Stunden werden diese Zellen und somit der zusätzliche Austritt von Enzymen entfernt. Erneut zeigte sich auch bei dieser Untersuchung ein Vorteil durch die zusätzliche Verwendung von Trehalose. Es wurde eine signifikant reduzierte Freisetzung von AST aus den Zellen beobachtet. Dies spricht für eine signifikante Reduktion von Membranschäden und resultierte im zeitlichen Verlauf in einer verbesserten Leistung dieser Kulturen.

Die Ergebnisse der biochemischen Analyse bestätigen eine zytoprotektive Wirkung von Trehalose für die Kryokonservierung von PHH. Während des Einfrierens wird die Zusammensetzung der Lipidanteile der Zellmembranen und somit der Membranfluidität verändert, es kommt zu einer Denaturierung von Proteinen. Die Wirkung von Trehalose beruht auf der Eigenschaft, Phospholipide und Proteine durch direkte Interaktion von Zucker- und Polar-Gruppen auf extrazellulärer Ebene zu stabilisieren. Die Kombination mit dem intrazellulär wirksamen DMSO scheint in einem synergistischen Effekt zu resultieren.

Die Studie zur Optimierung der Zellisolierung von primären humanen Hepatozyten ist Bestandteil eines vom BMBF geförderten Projekts. Erste Ergebnisse wurden 2005 auf der Jahrestagung der „German Association for the Study of the Liver“ (GASL) in Ulm (F.W.R. Vondran, E. Efimova, X. Gong, R. Schwartlander, X. Cheng, A. Nussler, P. Neuhaus, I.M. Sauer. *Isolation and purification of primary human liver cells - impact of liver pathology on the outcome*) sowie den Jahrestagungen der „European Society for Artificial Organs“ (ESAO) in Umeå 2006 (F.W.R. Vondran, E. Katenz, X. Gong, R. Schwartlander, X. Cheng, P. Neuhaus, I.M. Sauer. *Isolation of Primary Human Hepatocytes - Impact of Donor Liver Characteristics on the Outcome*) und Krems 2007 (F.W.R. Vondran, E. Katenz, R. Schwartlander, M. Morgul, N. Raschzok, X. Gong, X. Cheng, P. Neuhaus, I.M. Sauer. *Impact of Donor Liver Characteristics on the Cell Function of Primary Human Hepatocytes*) vorgestellt. Ein Artikel ist zur Veröffentlichung in *Artificial Organs* (in press) akzeptiert.

Die Optimierung der Kryokonservierung von PHH unter Verwendung von Trehalose wurde 2005 auf der Jahrestagung der ESAO in Bologna (F.W.R. Vondran, E. Katenz, X. Gong, X. Cheng, R. Schwartlander, P. Neuhaus, I.M. Sauer. *Cryopreservation of Primary Human Hepatocytes - Protective Effect of Trehalose*) vorgestellt und 2007 in *Liver Transplantation* (Vondran FWR, Katenz E, Schwartlander R, Pless G, Gong X, Cheng X, Neuhaus P, Sauer IM. *Cryopreservation of primary human hepatocytes: The benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent*. *Liver Transplantation* 2007, 13: 38-45.) veröffentlicht.

Die Ziele unserer Studien wurden gemäß der Planung erreicht. Die zugrunde liegende Erkrankung hat wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis der Zellisolierung und kann als Kriterium für die Identifizierung des Lebergewebes mit der potentiell höchsten Zellausbeute genutzt werden. Gewebestücke von Spendern mit benignen Erkrankungen sind mit dem günstigsten Ergebnis assoziiert und stellen die Resektate der ersten Wahl dar. Auch die Zellfunktion wird durch den Gewebespende beeinflusst. Erste Ergebnisse weisen auf eine signifikant erniedrigte Zellfunktion für Spender mit pathologisch erhöhter Serum- $\gamma$ -GT (> 60 U/l) hin. Weiterhin kann die Verfügbarkeit und Logistik von PHH durch die Methode der Kryokonservierung deutlich verbessert werden. Erstmals konnten wir zeigen, dass die Verwendung des Zuckers Trehalose als zusätzliches Kryoprotektivum einen positiven Einfluss auf die Überlebensrate und die Funktion von primären humanen Hepatozyten hat.