

Erişkin ve fetal hepatositlerin “in vivo” ve “in vitro” yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi*

Adnan NARCI, Mevlit KORKMAZ, Tahsin YAKUT, Murat YAĞMURCA, Burcu BİLTEKİN, Barbaros YİĞİT, Evrim ÖZKARACA

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalları, Afyon, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bursa

Özet

Amaç: Çalışmamızda, erişkin ve fetal hepatositlerinin in vitro fizyolojik ve morfolojik özelliklerini ve taşıyıcı polimer üzerinde omentuma implantasyon sonrasında elde edilmiş yeni karaciğer dokusunun yapısını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Karaciğer doku örnekleri erişkin ve 20. gestasyon günündeki fetal Yeni Zelanda tipi tavşanlardan alındı. Dokular kollajenaz ile parçalanarak hepatositler elde edildi. Hücre süspanasyonu kollajenle kaplı flakslara ekildi ve hepatosit besiyeri (H 1777, Sigma) kullanılarak standart kültür şartlarında üretildi. Flaksların yüzeyini dolduran hücrelerin morfolojik özellikleri boyanmadan, ışık mikroskopu kullanılarak değerlendirildi. Hepatositler tripsin-EDTA ile kaldırdı ve hücre çözeltisi sayılarak kollajenle kaplı poliglükto-laktik asit (PLGA) polimerleri üzerine her birine yaklaşık “4x10⁶” hücre olacak şekilde ekildi. Hücre-polimer kompleksi 10 gün boyunca kültüre edildi, erişkin hepatositler otolog, fetal hepatositler homolog omentum içine implante edildi ve non-absorbable suturele tespit edildi. Üç hafta sonra implantlar rezeke edildi ve parafine gömüldü. Bloklardan alınan kesitler hemotoksilen-eozin, PAS ve best carmine boyaları ile boyandı, ışık mikroskopu ile histolojik özellikleri incelendi.

Bulgular: Erişkin ve fetal hepatositler başarılı biçimde izole edilerek üretilmiştir. Üreyen hücrelerin hemen tümünün hegzagonal şekilli, büyük santral yerleşimli nükleuslu olduğu ve büyük kısmının çift nükleus içerdiği görüldü. İmplantın parafin blokta elde edilen kesitlerinde dokunun iyi organize olduğu ve doku içinde vasküler yapıların olduğu gösterilmiştir. Hepatositlerin intakt polimer lifleri arasında kümeler oluşturduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda hepatositlerin uygun taşıyıcı polimer üzerinde taşınarak implante edildikleri doku içinde kitlenmelerine üzere üremelerine devam ettikleri görülmüştür. Fetal ve yetişkin karaciğer hücrelerinin morfolojik incelemesinde fark bulunmama ile birlikte, fetal hücrelerin daha hızlı çoğaldıkları görülmüştür. Kollajen kaplı PLGA polimerlerinin karaciğer hücreleri için iyi bir taşıyıcı iskelet olduğu görülmüştür. Omentumun, implantın adaptasyonu ve vaskülarizasyonu için iyi bir yapı olduğu görülmüştür. Bu modelin, yapay karaciğer dokusu elde ederek ortotopik transplantasyona hazırlamak için uygun olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Hepatosit, hücre kültürü

Summary

In vitro and in vivo functional and structural evaluation of cultivated fetal and adult hepatocytes

Aim: In this study, we aimed to examine the in vitro physiological and morphological characteristics of fetal and adult hepatocytes and in situ tissue masses after implantation into the omentum.

Materials and Methods: Liver tissue samples were obtained from fetuses of twenty-day-gestation age and adult New Zealand rabbits. Hepatocytes were separated by collagenase digestion. Cell suspension was seeded onto collagen coated dishes and cultivation was maintained using hepatocyte medium (H 1777, Sigma) under standard culture condition. Growing cells were examined morphologically using light and electron microscopic images. After reaching confluence, flasks were treated with trypsin-EDTA and cell suspension was seeded onto the collagen coated unwoven poliglükto-lactic acid (PLGA) polymers and cultivated for 10 days. Fetus and adult cell-polymer complexes were implanted (fixed with sutures) into the omentum of rabbits homologously and autologously respectively. After three weeks of implantation, tissue masses were resected and embedded into paraffin. Paraffin sections were stained with hemotoxilen-eosine, PAS, best carmine and examined histologically.

Results: Both fetal and adult hepatocytes were successfully isolated and cultivated. Morphologic analyzes have shown that all cell populations expressed typical spheroid shape with centrally located nucleus. Fetal cells reached confluence in two weeks whereas it took three weeks for the adult liver cells. Attached and proliferated hepatocytes on the polymer fibers were detected after 24 hours of seeding onto the scaffolds. Histological examination of artificial tissues harvested from omentum has shown well organized and vascularized liver tissues.

Conclusion: Although fetal liver cells seem proliferating rapidly than adults, there is no difference in histological examination of in situ tissue masses. Collagen coated PLGA polymers may be the preferred vehicle for cell transfer. We think that omentum is the most suitable tissue for adaptation and vascularization of hepatic cells. This model can be used to obtain artificial hepatic tissue and also for orthotopic transplantation.

Key words: Hepatocyte, cell Culture

XXV. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi’inde sunulmuştur, 2007, Çeşme, İzmir

Adres: Dr. Adnan Narci, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Afyon

Yayına kabul tarihi: 21.4.2008

Giriş

Karaciğer hücre izolasyonu çalışmaları 25 yıl önce Howard ve Pesch'in erişkin karaciğerinden kollajenazla canlı fonksiyonel hepatositleri elde etmeleri ile başlamıştır (1). Bu alanda yapılan pek çok çalışmadan sonra, Seglen tarafından tarif edilen iki aşamalı kollajenaz perfüzyon tekniği standart protokol haline gelmiş ve daha sonra Dunn tarafından modifiye edilmiştir (2,3). Hepatositler kültür ortamında karaciğere özel fonksiyonlarını devam ettirmektedirler. Kültüre edilmiş erişkin ve fetal hepatositler, karaciğer difransiasyon ve rejenerasyon mekanizmalarının anlaşılması ve in vitro ilaç toksikasyonu çalışmaları için kullanıldığı gibi, kronik ya da akut karaciğer yetmezliklerinde transplantasyona kadar yaşam desteği sağlamak için yapay karaciğer dokusu olarak da kullanılabilirler.

Bu güne kadar karaciğer hücre kültürü ve hücre transplantasyonu çalışmaları ve yapay karaciğer sistemleri geliştirilmiştir. Fakat parsiyel karaciğer dokusu nakline model olabilecek in vitro yeterli sayıda hepatositin polimer üzerinde kitle oluşturma kapasitesi ve bunların morfolojik özelliklerini incelemeye yönelik çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda biyopsi materyalinden üretilen hem fetal hem de erişkin hepatositlerin özellikleri ve omentum içinde doku oluşturma kapasiteleri değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

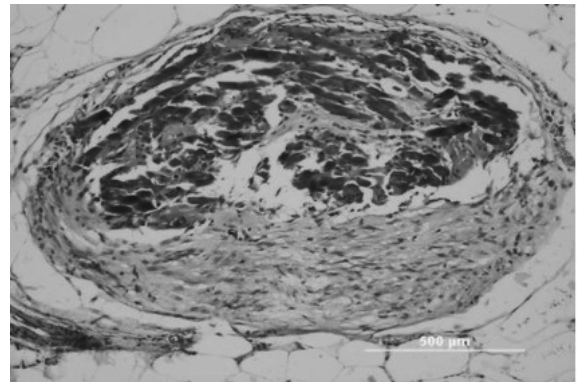
Çalışmamızda Yeni Zelanda tipi tavşanlar kullanılmıştır. Cerrahi işlemler intramüsküler 25 mg/kg Ketamine+5 mg/kg Xylazine anestezisi altında gerçekleştirildi. Karaciğer doku örnekleri, altı adet, on iki aylık, ortalama 2500-2750 gr dişi tavşan ve iki adet on iki aylık, ortalama 3000-3250 gr hamile tavşanın, 20. gestasyonel günündeki altı adet yavrusundan alındı. Her bir doku yaklaşık 2 gr olarak ölçüldü. Dokular RPMI transport besiyeri içinde steril şartlarda laboratuara bir saat içinde ulaştırıldı. Laminer hava akımı altında % 0.075'lik kollajenaz kullanarak çift aşamalı perfüzyon tekniği uygulanarak hepatositler izole edildi. Hücre süspansiyonu kollajenle kaplı flasklara ekildi ve hepatosit besiyeri (H 1777, Sigma) kullanılarak, 37°C, % 95 nemli ve % 5 CO₂'li ortamda üretildi. Hücrelerin yüzeye tutunması için

flasklar üç gün hareketsiz bırakıldı. Üreyen hücrelerin morfolojik özellikleri boyanmadan ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi.

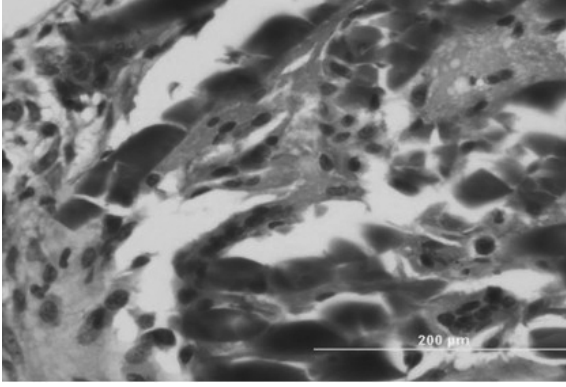
Tüm flask yüzeyini dolduran hepatositler tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve hücre çözeltisi Thoma lamında sayılarak total hücre miktarı belirlendi. Örgülenmemiş poliglisko-laktik asit (PLGA, 90/10) polimeri 2x3 cm boyutlarında kesilerek etilen oksitte steril edildi. Polimerler tip-1 kollajen çözeltisi içinde inkübatörde bir saat bekletildi. Kollajenle kaplı PLGA polimerleri üzerine, her birine yaklaşık "4x10⁶" hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücre-polimer kompleksi 10 gün boyunca kültüre edildi. Polimer üzerinde üreyen hücreler ışık mikroskobunda incelendi. Erişkin hücre polimer kompleksi aynı tavşanın omentumu içine implante edilerek non-absorbable sütürlerle tespit edildi. Fetal hepatositler ise erişkin tavşanların omentumuna implante edilerek tespit edildi. İmplantasyondan üç hafta sonra dokular rezeke edildi, çevre yağ dokuları temizlendi. % 10 formolde tespit edilerek parafine gömüldü. Bloklardan alınan kesitler hemotoksilen-eozin, PAS ve best carmine boyaları ile boyandı, ışık mikroskobu ile histolojik özellikleri incelendi.

Bulgular

Erişkin ve fetal hepatositler başarılı biçimde izole edilerek üretilmiştir. Her iki hücre popülasyonunun morfolojik özellikleri benzer bulundu. Üreyen hücrelerin hemen tümü hegzogonal şekilli ve nükleusu büyük santral yerleşimli olduğu, büyük kısmı çift nükleus içerdiği görüldü. Fetal hücreler iki hafta içinde tüm flask yüzeyini doldururken, erişkin hücreler an-



Resim 1. Omentum içerisinde vaskularize olmuş adacıklar halinde hepatosit kümeleri izlenmekte (H-E X100).



Resim 2. Polihedral şekilli, ökromatik nükleuslu, eozinofilik stoplazmalı hepatositler grup halinde izlenmekte (H-E X400).

cak üç hafta içinde doldurabilmiştir. Polimer kenarındaki liflere tutunarak kümeler oluşturmuş hepatositler ışık mikroskobu ile görüntülendi (Resim 1-2). İmplantın parafin bloktan elde edilen kesitlerinde omental yağ dokusu içinde, hepatositlerin intakt polimer lifleri arasında kümeler oluşturduğu gösterilmiştir. Oluşan yeni karaciğer dokusunun oldukça iyi organize olduğu ve doku içinde vasküler yapıların olduğu gösterilmiştir.

Tartışma

Karaciğer transplantasyonu, bilier atrezi gibi konjenital ya da end-stage karaciğer yetmezliği gibi akkiz hastalıkların tedavisinde kaçınılmaz olabilmektedir. American Liver Foundation verilerine göre her yıl, sadece ABD de 30.000 kişi karaciğer yetmezliğinden ölmekte, yılda yaklaşık 6500 karaciğer transplantasyonu yapılmakta ve yaklaşık 17000 kişi de transplantasyon için beklemektedir. Donör yetersizliği, hücre kültür tekniklerinin gelişmesi ve doku mühendisliğinin interdisipliner bir bilim dalı olarak ortaya çıkması, in vitro hepatosit üretimi ve hücre ya da doku nakli çalışmalarını hızlandırmıştır.

Çift basamaklı enzimatik yöntemle hepatosit izolasyonundan sonra, hücrelerin kültüre edilmeleri ve toksikolojide ya da yapay karaciğer sistemlerinde kullanımını yaygınlaştırmıştır. Hepatositlerin yapısal ve fonksiyonel olarak karmaşık olmaları ve in vivo özelliklerinin kendilerine özgü olması, in vitro izolasyon şartlarını zorlaştırmaktadır. Kültür şartlarında üreyen tek tabakalı hücreler, in vivo şartları incelemek için uygun olmamakta ve bunlar sadece genel deneysel çalışmalar için kullanılmaktadır (4). Hepatositlerin in

vivo şartlardaki özelliklerini yansıtmak için besiyeri, katkı maddeleri, büyüme faktörleri, matris ya da kültür metotlarında iyileşme sağlayan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bizde çalışmamızda, literatürde rastlamadığımız erişkin ve fetal hepatositlerin in vitro ve in vivo üreme özelliklerini inceledik. Fetal hepatositlerin erişkin hepatositlerden daha hızlı proliferasyonunu gözledik. Aynı zamanda, histolojik çalışmalar her iki hücre popülasyonunun in situ doku oluşturma özellikleri arasında fark olmadığını göstermiştir.

Hepatositler karaciğer lobülleri içinde üç boyutlu yapı oluştururlar. Hücreler kendi aralarında, non-parankimal dokular ve ekstrasellüler matris arasında komplike bağlantılar meydana getirir. Hepatositlerin bu özelliklerinin in vitro ortamda sağlanması için çeşitli yöntemler ve materyaller denenmiştir. Bunlar arasında matrisler, hepatositlerin proliferasyon ve fonksiyonların idamesi için en önemli role sahiptir (4-6). Örgülenmemiş PLGA polimerleri in vitro doku kitlesi oluşturmak için iskelet olarak sık kullanılan bir materyaldir. Özellikle 90/10 oranındaki ko-polimer yapının, çok sayıda hücrenin tutunma ve proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Kollajen en sık sekrete edilen ekstrasellüler matris proteindir ve çok sayıda hücrenin temasta olduğu yüzeye tutunmasını kolaylaştırır (7,8). Böylelikle çalışmamızda gösterildiği gibi kollajenle kaplı PLGA polimerleri karaciğer hücre transferi için tercih edilebilir bir taşıyıcı materyaldir.

Deneysel şartlarda oluşturulan dokuların in vivo ortama adaptasyonu için vücudun çeşitli dokuları kullanılmıştır. İmplantın kolay vaskülarize olması ve onarımda kullanılacak organa yakın olması implantasyon yerinin seçiminde aranan önemli özelliklerdendir. Bu amaçla, deri altı dokular, batın ön duvarı, retroperiton ve omentum sıklıkla kullanılmıştır (9). Çalışmamızda omentumun karaciğer hücrelerinin adaptasyon ve vaskülarizasyonu için en uygun doku olduğu görülmüştür. Bu model, oluşturulan yapay karaciğer dokusunun ortotopik transplantasyonu için de kullanılabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda hepatositlerin uygun taşıyıcı polimer üzerinde taşınarak implate edildikleri doku içinde kitle oluşturmak üzere üremelerine devam ettikleri görülmüştür. Fetal ve yetişkin karaciğer

hücrelerinin morfolojik incelemesinde fark bulunmakla birlikte, fetal hücrelerin daha hızlı çoğaldıkları görülmüştür. Kollajen kaplı PLGA polimerlerinin karaciğer hücreleri için iyi bir taşıyıcı iskelet olduğu ve omentum implantın adaptasyonu ve vaskülarizasyonu için iyi bir yapı olduğu görülmüştür. Bu modelin, yapay karaciğer dokusu elde ederek, ortotopik transplantasyona hazırlamak için uygun olduğu düşünülmektedir

Kaynaklar

1. Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA: The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol* 35:675, 1967
2. Seglen PO: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29, 1976
3. Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML: Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* 7:237, 1991
4. Wang YJ, Liu HL, Guo HT, Wen HW, Liu J: Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. *World J Gastroenterol* 10:699, 2004
5. Zeilinger K, Sauer IM, Pless G, et al: Three-dimensional co-culture of primary human liver cells in bioreactors for in vitro drug studies: effects of the initial cell quality on the long-term maintenance of hepatocyte-specific functions. *Altern Lab Anim* 30:525, 2002
6. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, et al: Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions. *J Surg Res* 106:115, 2002
7. Korkmaz M, Güvenç BH, Bilir A, et al: Isolation and culture of adult and fetal rabbit bladder smooth muscle cells and their interaction with biopolymers. *J Pediatr Surg* 38:21, 2003
8. Korkmaz M, Yakut T, Narci A, et al: Esophageal muscle cell interaction with biopolymers. *Med Sci Monit* 13:BR46, 2007
9. Atala A, Freeman MR, Vacanti JP, Shepard J, Retik AB: Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle. *J Urol* 150(2 Pt 2):608, 1993