



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Untersuchungen zur Toxizität von Alkohol in humanen
Leberorganoiden**

Autor: Kent-Tjorben Böttcher
Institut / Klinik: II. Medizinische Klinik
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. K. Breitkopf-Heinlein

Der äthyltoxische Leberschaden ist mit 60-80% aller Todesfälle in Folge einer Leberschädigung weiterhin von großer Relevanz für die Medizin. Therapiemöglichkeiten sind limitiert und Organtransplantate nur begrenzt vorhanden. Aktuell fehlt es noch an repräsentativen in vitro Modellen der humanen Leber zur Untersuchung von Metabolisierungsprozessen und bisher fokussierten sich Untersuchungen zu alkoholtoxischen Effekten auf Hepatozyten.

Diese Arbeit beinhaltet daher Analysen der Effekte von Alkohol auf Hepatozyten und weitere Leberzelltypen, nämlich lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC) und mesenchymale Stromazellen (MSC), kultiviert sowohl in 2D-Monolayerkultur als auch im Verbund als 3D Leberorganoid (LO). Neben dem Ansatz nach Ramachandran et al. ("self-assembly LO") wurde ein neuer Ansatz orientiert an den Versuchen mit intestinalen Organoiden nach Betge et al. mit LO in Matrigel angewendet. Dabei sollte die Aussagekraft dieser verschiedenen Kultivierungstechniken miteinander verglichen werden. Für die Versuche wurden differenzierte, adulte Upcyte® Hepatozyten (HC), Upcyte® LSEC und primär humane MSC verwendet. Es wurden Analysen auf RNA Ebene und, immunhistochemische, sowie immunfluoreszenz Färbungen der LO in Matrigel durchgeführt.

In den immunhistochemischen Färbungen konnte nachgewiesen werden, dass die LO in Matrigel alle drei Zelltypen inkludierten. Die HC bildeten Leberzellbälkchen, welche von MSC umfasst wurden und in deren Nachbarschaft sich vereinzelte Zellnester aus LSEC befanden.

Die Untersuchungen auf RNA Ebene zeigten je nach Kultivierungsart unterschiedliche Reaktionen der Zellen auf eine Exposition mit 150 mM Ethanol. MSC in Monolayerkultur reagierten auf eine Ethanol-Exposition mit reduzierter Expression von α SMA und COL1 α 1. LO beider Versuchsansätze zeigten hingegen eine tendenziell höhere Expression dieser beiden MSC Aktivierungsmarker. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die notwendige Metabolisierung des Ethanols durch HC zu Acetaldehyd, welches zur Aktivierung von MSC führt. IL-6 wurde in LO in Matrigel nach Inkubation mit Ethanol signifikant höher exprimiert. Diese erhöhte Expression von IL-6 nach Stimulation mit Ethanol konnte als Trend auch in LSEC in Monolayerkultur nachgewiesen werden. IL-6 spielt als inflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Fibroblasten und erhöhte Werte konnten in Patienten mit einer alkoholtoxischen Hepatopathie nachgewiesen werden. Außerdem konnte ein Trend zur verminderten Expression von LYVE-1 in der Ethanolgruppe der LO in Matrigel beobachtet werden. Dies weist auf eine Kapillarisierung der LSEC hin, die einen wichtigen Schritt bei der Progression des äthyltoxischen Leberschadens darstellt. CYP2E1 wurde in HC in Monolayerkultur und self-assembly LO in der Ethanolgruppe tendenziell höher exprimiert. LO in Matrigel zeigten hingegen eine verminderte Expression von CYP2E1 in der Ethanolgruppe. Mögliche Erklärungsansätze für diese Ergebnisse sind die Einflüsse des Matrigels selbst oder der Mediumkomponenten sowie die kurze Inkubationszeit mit Ethanol von 48h in der Gruppe der LO in Matrigel. Self-assembly LO wiesen in dieser Arbeit die längste Inkubationszeit von 10d auf.

Alle drei Versuchsansätze haben ihre Vor- und Nachteile. Monolayerkultur ermöglicht isolierte Bedingungen unter Ausschaltung einiger Einflussfaktoren, allerdings erzeugt man dabei jedoch eine in vitro Situation, wie sie in vivo nicht zu finden ist. Cellular crosstalk, wie Zell-Zell-Kontakte und Effekte der extrazellulären Matrix werden dabei außer Acht gelassen. Zudem neigen Zellen in Monolayerkultur dazu zu dedifferenzieren und weisen eine veränderte Genexpression auf. Die Kultivierung als 3D-LO versucht diese Probleme zu lösen und somit ein verlässlicheres Modell zur Untersuchung von Metabolisierungsprozessen in der humanen Leber zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf den Ablauf dieser physiologischen Prozesse in humanen LO.