

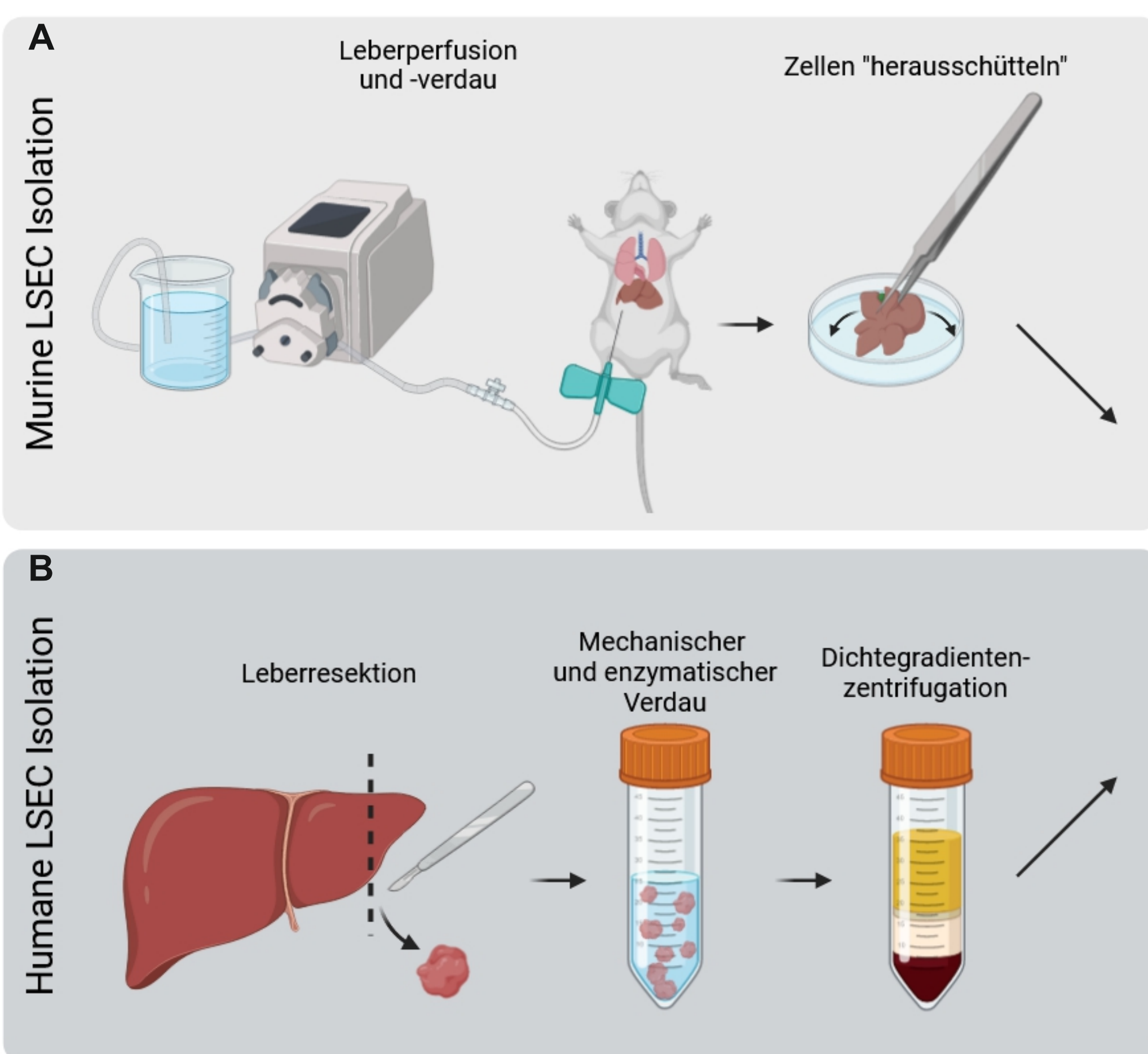
# Schädigung und Regeneration der Leber am Beispiel von Leber-Sinusoidalen Endothelzellen

Annika Kiel, Lauren Patricia Helweg, Angela Kralemann-Köhler, Jan Schulte am Esch  
Arbeitsgruppe Allgemein- und Viszeralchirurgie - Leber- und Tumorbologie  
Universitätsklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie

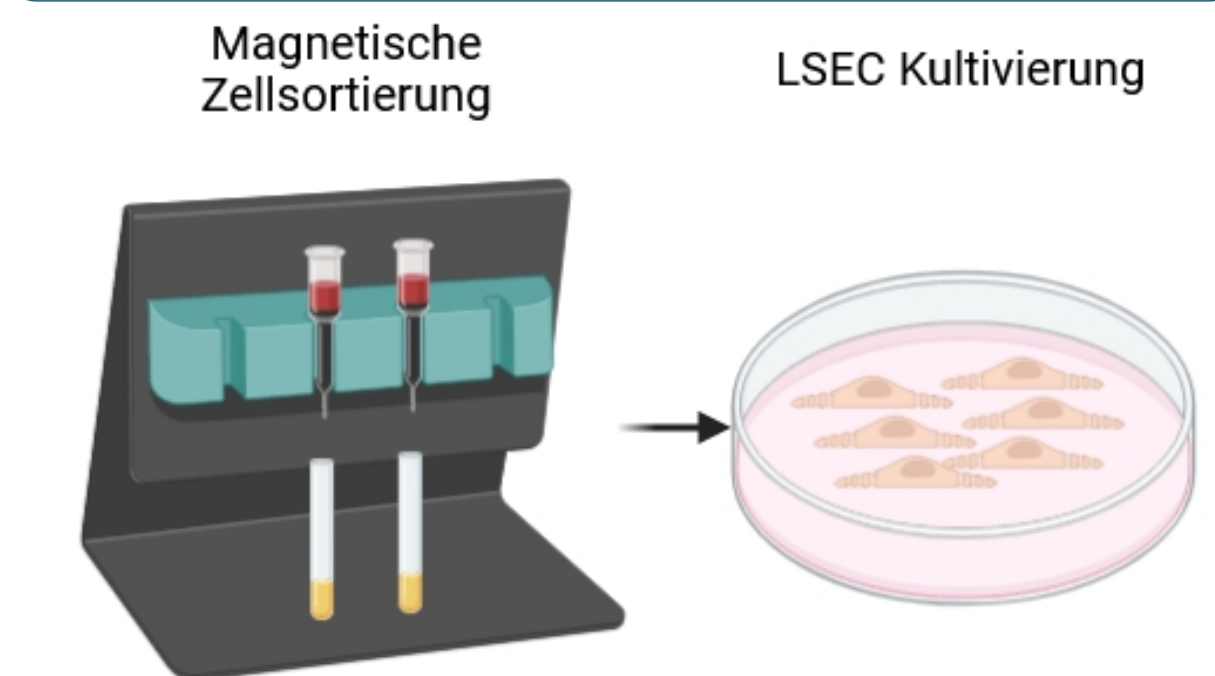
In enger Kooperation mit: Jasmin Schürstedt, Wolfgang Hübner, Thomas Huser  
Arbeitsgruppe Biomolekulare Photonik

Die Leber ist das Stoffwechselzentrum des menschlichen Körpers und ein integraler Bestandteil unseres Gefäßsystems. Ein abundanter Zelltyp innerhalb der Leber sind die Leber-Sinusoidalen Endothelzellen (LSECs). LSECs sind mit kleinen transzellulären Poren (Fenestrierungen) durchsetzt, die den Durchgang von Biomolekülen und Arzneimitteln für das Prozessieren in den Hepatozyten ermöglichen und einen Aufschluss über die Funktionalität der LSECs geben. Aufgrund der Größe der Fenestrierungen können diese jedoch nur durch Superauflöschungstechniken wie der 3D fluoreszenten strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (SIM) visualisiert werden. Hierbei bietet das ‚Live Cell Imaging‘ die Möglichkeit, die Dynamiken der Fenestrierungen während Behandlungen fest zu halten. Jedoch führt die Phototoxizität des Lichts zum Schließen der Fenestrierungen. Ein Grund dafür könnte die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Bestrahlung sein. Diese führen zu intrazellulären Stress gefolgt vom Schließen der Fenestrierungen. Um ROS entgegenzuwirken wurden murine LSECs mit dem Antioxidant N-Acetylcystein (NAC) und Oxyrase™ behandelt und aufgenommen. Angesichts der Rolle der Fenestrierungen in der Physiologie und Homöostase wollen wir ein besseres Verständnis der Regulation dieser Strukturen erlangen, welches dazu beiträgt, therapeutische Ansätze im Kontext von Leberschädigung zu entwickeln.

## Isolation von Leber-Sinusoidalen Endothelzellen (LSECs) aus muriner und humaner Leber

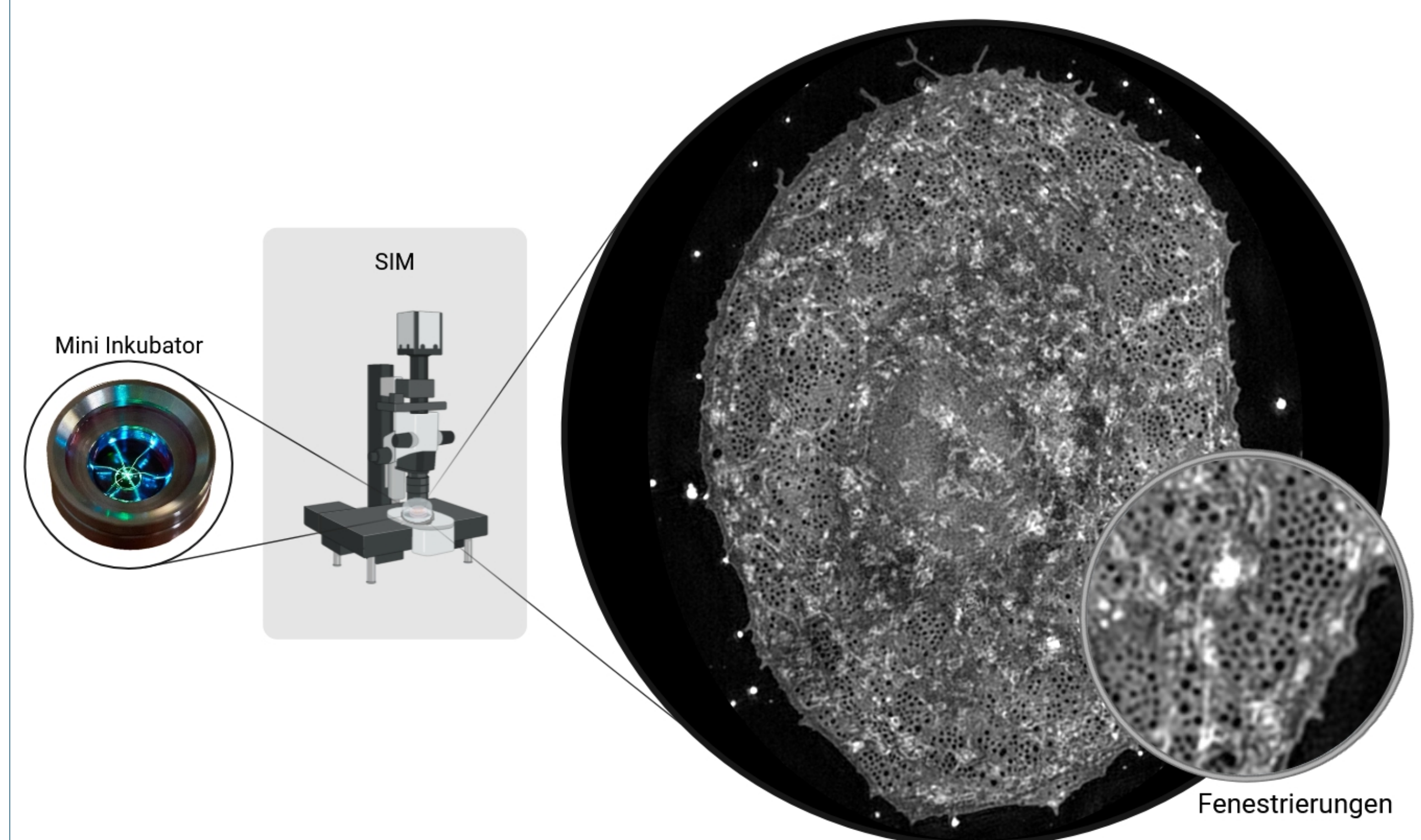


**A:** Die Isolation von murinen LSECs erfolgt durch eine Perfusion der Mausleber mit anschließendem enzymatischem Verdau innerhalb des Organs. Nach der Entnahme der Leber wird das Gewebe durch Schütteln dissoziiert und die LSECs über magnetische Zellsortierung selektiert und kultiviert.



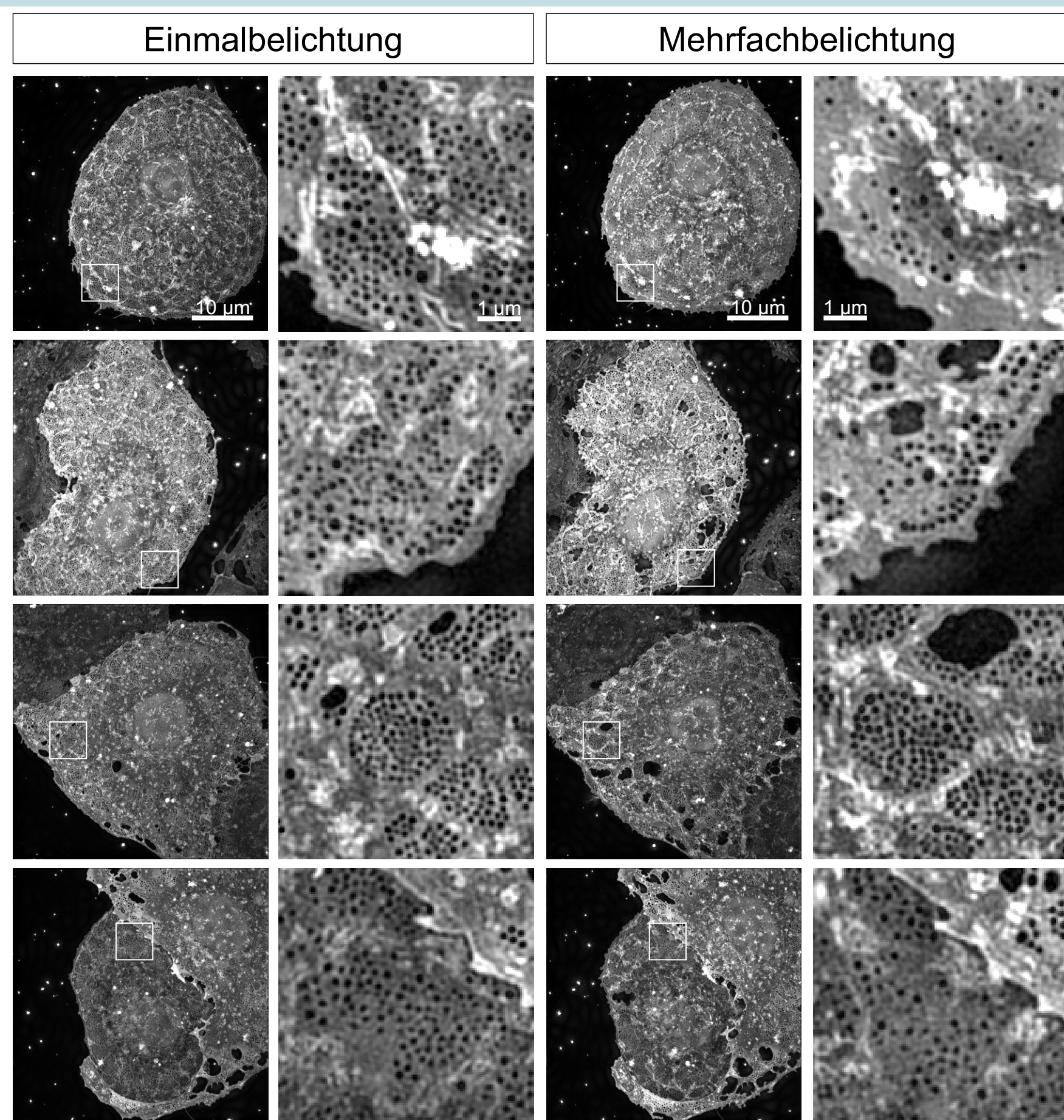
**B:** Für die Isolation humaner LSECs wird Lebergewebe, welches durch operative Leberresektion gewonnen wird, mechanisch zerkleinert und anschließend enzymatisch verdaut. Über eine Dichtegradientenzentrifugation und magnetische Zellsortierung werden LSECs selektiert und anschließend in Kultur gebracht.

## Superauflösende 3D fluoreszente strukturierte Beleuchtungsmikroskopie von lebenden Zellen



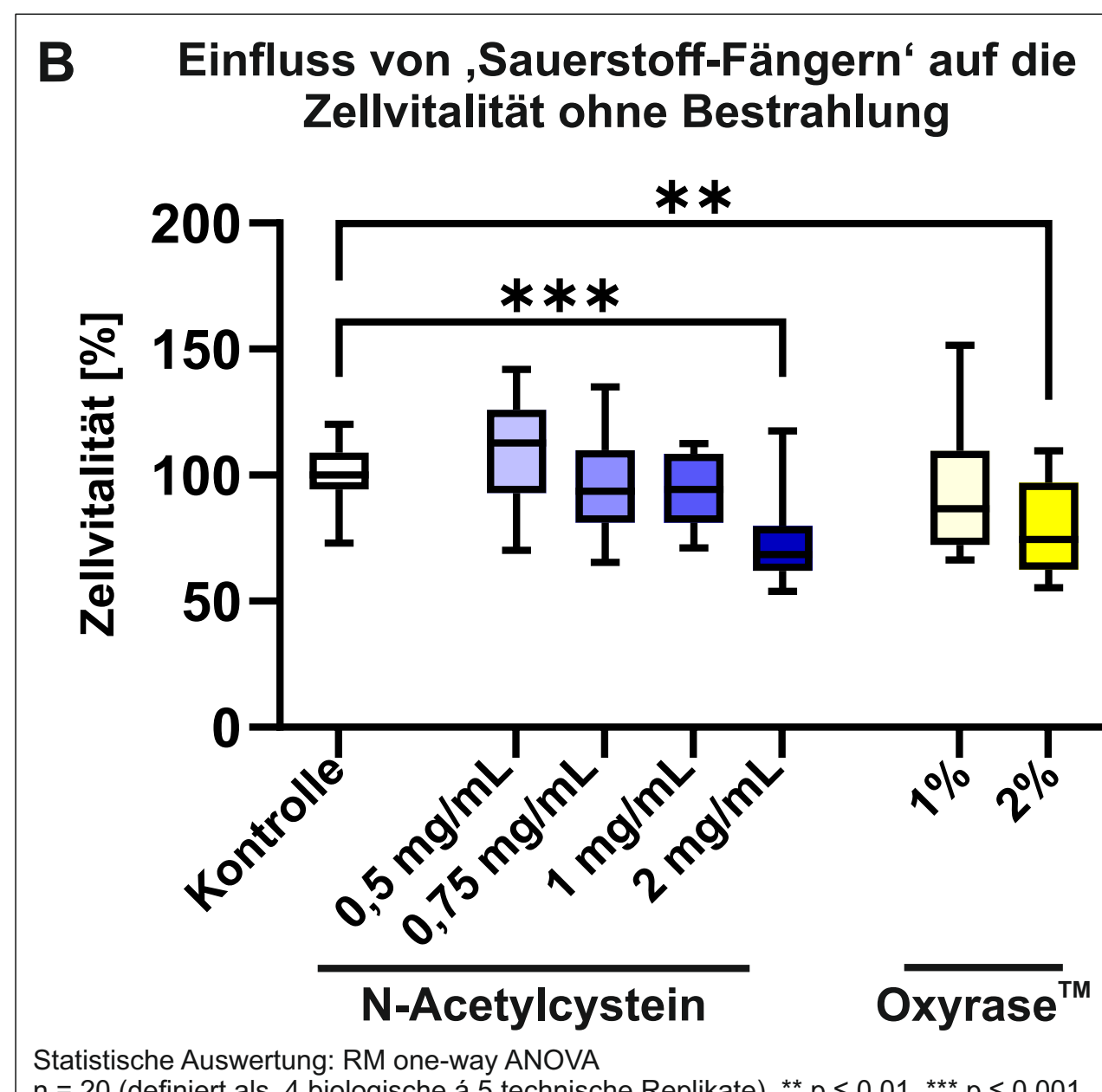
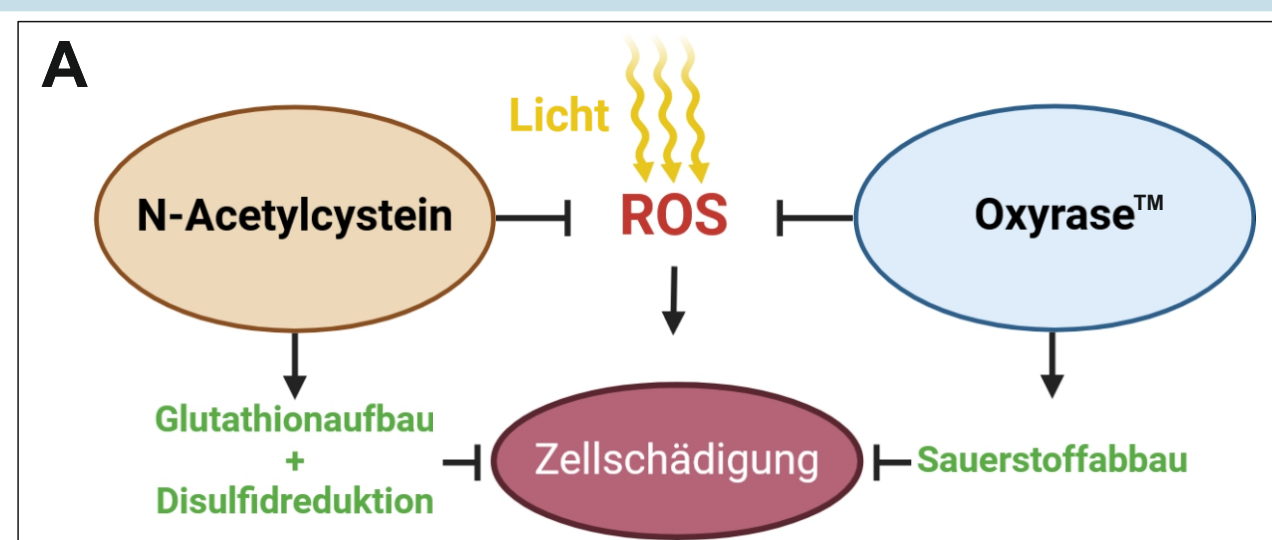
Superauflösende 3D fluoreszente strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM) ermöglicht die Visualisierung der kleinen Fenestrierungen (~100nm) in lebenden LSECs durch den Einsatz eines kleinen Inkubators. Die Doppellipidschichten der Zellen werden durch einen lebend kompatiblen Farbstoff angefärbt.

## Morphologische Zellveränderung durch Phototoxizität beim ‚Live Cell Imaging‘

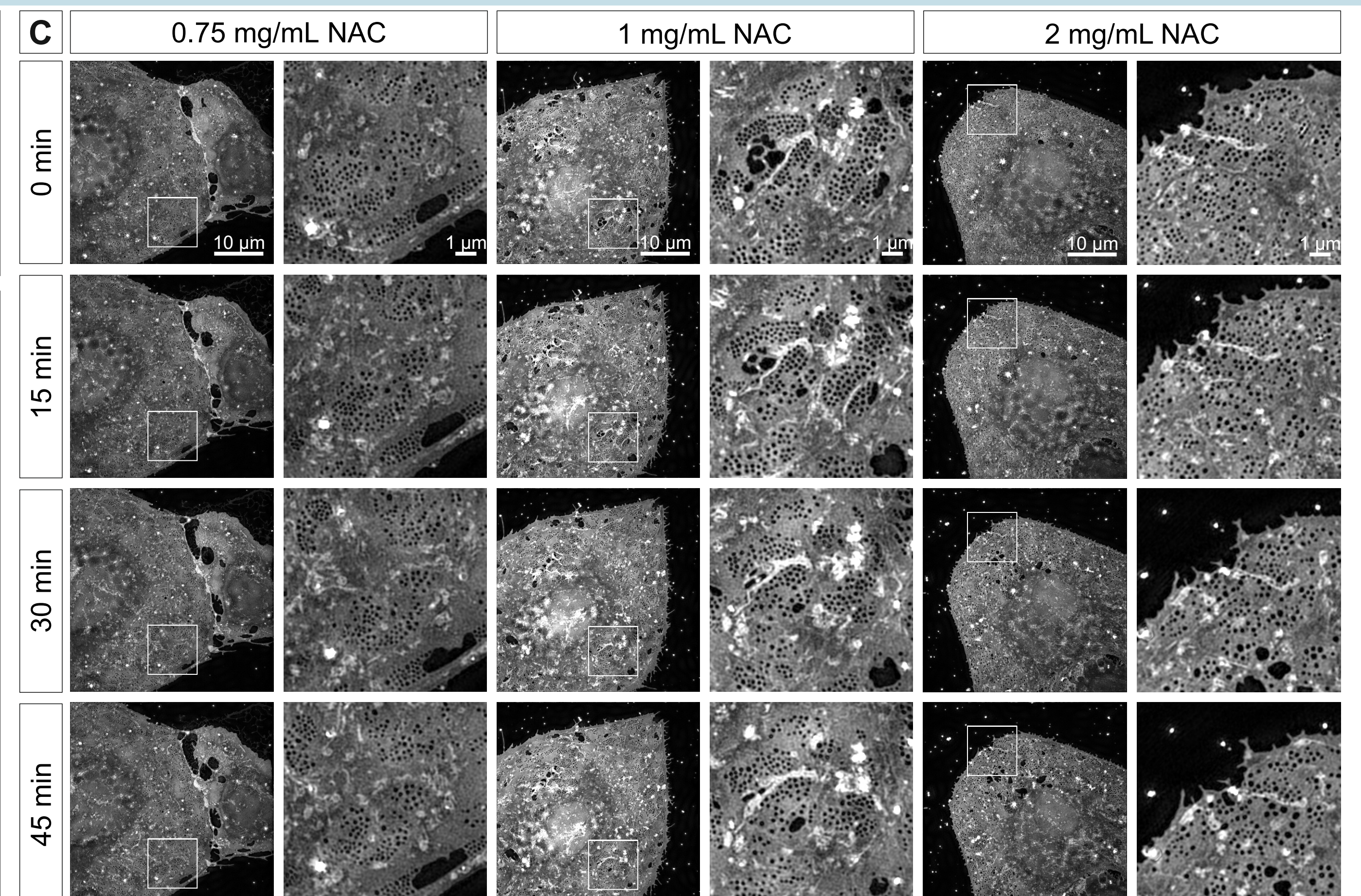


Aufnahmen der murinen LSECs mittels SIM zeigen einen phototoxischen Effekt durch Mehrfachbelichtung. Die Zellen wurden alle 3 min über einen Zeitraum von 45 min mit Licht angeregt, welches außerhalb des Anregungsspektrums des Fluorophors liegt. Der Fluorophor wurde zu Anfang und Ende der Messung angeregt um die LSECs abzubilden. Zu Beginn (Einmalbelichtung) zeigen die LSECs viele Fenestrierungen und eine vitale Morphologie. Bei Mehrfachbelichtung können sowohl Schließungen der Fenestrierungen sowie auch Aufreißen der gesamten Zelle beobachtet werden, welches bei unbelichteten Zellen nicht zu erkennen war (nicht gezeigt).

## Reduzierung der Phototoxizität beim ‚Live Cell Imaging‘ durch den Einsatz von ‚Sauerstoff Fängern‘



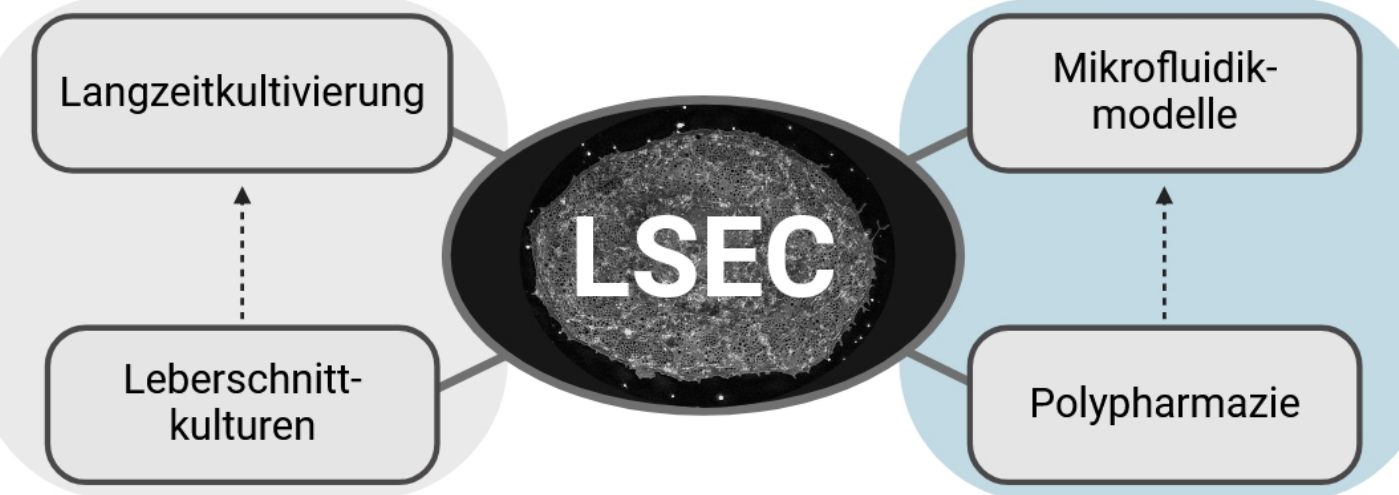
Statistische Auswertung: RM one-way ANOVA n = 20 (definiert als 4 biologische & 5 technische Replikate). \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001



Eine mögliche Ursache für den beobachteten phototoxischen Effekt könnte die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sein. Um ROS entgegen zu wirken, können unterschiedliche Substanzen wie die ‚Sauerstoff Fänger‘ N-Acetylcystein (NAC) oder Oxyrase™ eingesetzt werden (A). In A ist die Wirkungsweise der ‚Sauerstoff Fänger‘ schematisch dargestellt. Um einen toxischen Effekt der Substanzen auszuschließen, wurde der Einfluss der ‚Sauerstoff Fänger‘ auf die Vitalität von kultivierten Zellen anhand der ATP Menge innerhalb der Zellen ermittelt (B). Während niedrige Konzentrationen die Zellvitalität nicht negativ beeinflussen, war diese bei 2 mg/mL NAC sowie bei 2% Oxyrase™ signifikant geringer. Ein positiver Effekt der NAC Konzentrationen 0,75 und 1 mg/mL konnte ebenfalls beim ‚Live Cell Imaging‘ beobachtet werden, wo die Mehrfachbelichtung über 45 min nur leichte morphologische Veränderungen verursachte (C). Bei 2 mg/mL zeigten die Zellen die eindeutigsten morphologischen Veränderungen.

## Ausblick

In Zukunft werden in der Arbeitsgruppe folgende Themen untersucht:



- Optimierung des ‚Live Cell Imaging‘
- Langzeitkultivierung der LSECs sowie lebend Leberschnittkulturen
- Etablierung eines Mikrofluidiksystems zur Kultivierung der LSECs unter Flussbedingungen
- Untersuchung des Effektes von Polypharmazie auf LSECs und Leberschnittkulturen (auch unter Flussbedingungen)
- Untersuchung der Tumor Metastasierung entlang des Endothels

## Danksagung

Wir danken dem Team der Allgemein- und Viszeralchirurgie am Evangelischem Klinikum Bethel, sowie dem Team der Zentralen Tierhaltung der Universität Bielefeld für die exzellente Zusammenarbeit.