

V. Zusammenfassung

Bei der Entwicklung von Tierversuchsalternativen nehmen Leber-Kulturen eine gewisse Vorreiterrolle ein, da dieses Organ vielfältige lebenswichtige Aufgaben ausübt, welche nur durch die funktionelle und strukturelle Integrität des Organs erfüllt werden können. Die Erfüllung dieser vielseitigen Funktionen wird nicht nur durch die Hepatozyten bewerkstelligt, sondern durch deren komplexe Verflechtung mit weiteren Zelltypen, insbesondere den sog. "littoral-cells", und der Wechselwirkungen mit der Extrazellulärmatrix.

Die zur Zeit existierenden *in vitro* Systeme basieren auf Kulturen die aus Einzelzellsuspensionen etabliert wurden, d.h. losgelöst aus diesem essentiellen Organverband. Eine neue Technik ermöglicht es, Präzisionsorganschnitte anzufertigen, welche aus etwa 15 Zellschichten bestehen und in Kultur eine passive Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen zulassen. Die Studien mit diesem neuen System beschränkten sich bisher auf pharmakologische Kurzzeitversuche, welche mit allgemeinen zellulären Viabilitätskriterien beschrieben wurden. Obwohl dieses System die Nachteile der fast vergessenen Organkultur überwinden konnte, ist es aufgrund der mangelhaften leberspezifischen Validierung nicht zu einer weiteren Verbreitung gekommen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auf eine geeignete Validierung dieses Systems für Langzeitversuche und auf die Ausarbeitung von Bedingungen, welche einen Transfer auf den Schlachthof und in die Nähe zu chirurgisch entfernten Organfragmenten ermöglichen. Anders als bei bisherigen Systemen wurde anstatt der Vielfalt an zellphysiologischen Validierungskriterien von *in vitro* Systemen (Kalium-, ATP-, Kalzium-Gehalt oder LDH-Verlust) die Regulation der Genexpression als komplexeres Viabilitätskriterium ausgewählt.

Im Gegensatz zu den restlichen Parametern, beinhaltet die Regulation der Genexpression von Zellen in Gewebe-/Organverband eine Kaskade verschiedener räumlich und zeitlich koordinierter Prozesse, welche die gesamte Kompetenz der Zelle und deren Umgebung voraussetzen. Mit der Entwicklung eines wirtschaftlichen, einfach zu handhabenden und antibiotikafreien Systems konnten die Ziele dieser Arbeit verwirklicht werden. Die

Kontrolle der leberspezifischen Genexpression wurde anhand der Induktion bzw. Repression der Induktion von zwei zytosolischen Enzymen (TAT, NOS-II) durch Dexamethason bzw. LPS nachgewiesen. Die Produktion des Serpins PAI-1 konnte durch mehrere Induktoren induziert werden (LPS, cAMP und Dexamethason). Gleichzeitig wurde eine in vitro bedingte Veränderung der Genexpression anhand von PAI-1 entdeckt, was bzgl. der vielen neuen Rollen dieser Antiprotease bei verschiedenen Krankheitsprozessen von besonderem Interesse erscheint. Die Erforschung von Leberfunktionen und ihrer Bedeutung in einigen Erkrankungen dürfte mit diesem System auch erfolgreich dazu beitragen, Tierversuche zu reduzieren.

VI. Summary

Karim Sultan

Development of an organ culture system for the study of differentiated liver functions in vitro.

It has been generally accepted that cell and tissue culture systems should be developed as an alternative for animal experiments. Because of its multitude of vital functions and the significance of the liver for overcoming the action of environmental influences, the establishment of in vitro systems of this organ has been a primary goal of many laboratories. However, the reproduction of liver functions in vitro has been limited so far. It is becoming to be accepted that the metabolic competence of the hepatocytes is largely dependent on their rather complex interaction with non-hepatocyte liver cells ("littoral cells") and on the influences of the liver-specific extracellular matrix. Today's commonly used in vitro systems are almost exclusively based on the culture of single cell suspensions obtained by the enzymatic or mechanic disruption of the organ structure. With the new technique that produces precision-cut organ slices representing a thin liver fragment of 15 cell layers, passive diffusion of oxygen and nutrients can take place. However, experiments using this system have been restricted to short-term pharmacological studies and using general cellular viability parameters (K^+ and Na^+ changes, ATP or calcium content or release, etc). These results have shown that this new system has overcome some of the main disadvantages of the nearly forgotten organ culture systems, but it has not resulted in a general adoption because of its lack of liver-specific characteristics.

The aim of this work thus was to develop adequate conditions that could validate this system for long term, liver-specific studies and for the application to organ material derived from the slaughterhouse or surgical operations. For the liver-specific, long-term validation the regulation of liver-specific gene expression parameters was chosen as viability criteria, instead of the commonly used general cell physiology parameters (potassium-, ATP, calcium-content or LDH release).

In contrast to those popular parameters, gene expression of cells from an organ or tissue includes a cascade of differentially coordinated processes which depend on the total competence of the cell and its environment, including the general cell physiology parameters.

After the development of an economical, easy-to-handle and antibiotic-free system, the primary goals of this work were achieved. The control of liver-specific gene expression was demonstrated by the hormone- and endotoxin-mediated induction and repression of two cytosolic enzymes (TAT, NOS-II) by dexamethasone and LPS. It was also found that the serpin PAI-I is induced by LPS, cAMP and dexamethasone. A somehow unexpected discovery were the culture-induced changes in the gene expression of PAI-I, which are of special interest in connection with the growing number of diseases in which PAI-I is involved.

The use of the SSOCS system for the study of liver function should not only contribute to determine the role of PAI-I in certain diseases, but should also contribute to significantly reduce animal experiments. Thus, the primary goal of this work has been accomplished, with some unexpected results with possible long-term perspectives.