

Μεταμόσχευση ηπατοκυττάρων. Μορφολογία: Δυνατότητες και Περιορισμοί

Μ. Δαιμονάκου-Βατοπούλου

Η αναζήτηση νέων θεραπευτικών μεθόδων στην αντιμετώπιση ασθενών με κεραυνοβόλο ηπατίτιδα, η έλλειψη μοσχευμάτων, η προσπάθεια αντιμετώπισης των μεταβολικών νοσημάτων σε συνδυασμό με την αναπτυξη της βιοτεχνολογίας, οδήγησαν στην ιδέα της μεταμόσχευσης ηπατοκυττάρων. Ετσι μια συνεχώς διογκούμενη ερευνητική προσπάθεια κατακλύζει την βιβλιογραφία με πληροφορίες και δημιουργεί ελπίδες για πιο αποτελεσματικές και λιγότερο επεμβατικές θεραπείες. Στην προσπάθεια αυτή η μελέτη της μορφολογίας των μεταμοσχευμένων ηπατοκυττάρων καλείται να απαντήσει σε πολυάριθμα ερωτήματα, τα οποία απαιτούν για να απαντηθούν την χρήση όλων των γνωστών μεθόδων, αλλά και την επινόηση νέων. Στην παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζεται η μέθοδος, τα ερωτήματα που καλούνται να απαντηθούν από την μορφολογική μελέτη, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται καθώς και τα ευρήματα από τις λίγες δημοσιευμένες ιστολογικές μελέτες.

Λέξεις κλειδιά: μεταμόσχευση ηπατοκυττάρων, μορφολογία

1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ

Προσπάθειες για την μεταμόσχευση ιστοτεμαχιδίων ήπατος εμφανίζονται στην βιβλιογραφία το 1934 (Cameron), το 1936 (H Rorper), αλλά μόλις το 1976 (Matas J) υπήρξαν αποτελέσματα όταν μεταμοσχεύθηκαν απομονωμένα ηπατοκύτταρα. Για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων χρησιμοποιούνται αρκετές τεχνικές. Μια από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους είναι η τροποποιημένη μέθοδος Selgen, κατά την οποία τα ηπατοκύτταρα απομονώνονται, καλλιεργούνται και μεταμοσχεύονται στον λήπτη.¹⁻⁴

Απομόνωση

Τα χρησιμοποιούμενα ως δότες ζώα μετά από αναισθησία υφίστανται λαπαροτομή, χορηγείται ηπαρίνη, το ήπαρ διασωληνώνεται και από την πυλαία εγχύεται συνεχώς για 10 min φυσιολογικός ορός 0.9%, με ρυθμό 20ml/min. Ακολουθώντας το ήπαρ κινητοποιείται, τοποθετείται σε αποστειρωμένο τρυβλείο Petri, απολιώνεται η άνω ηπατική φλέβα, και εγχύεται ταχέως από την διασωληνομένη πυλαία διάλυμα κολλαγενάσης. Μετά από επώαση σε 37°C για 45 min, ακολουθεί μάλαξη και διήθηση μέσα από μεταλλικό πλέγμα ώστε να απομακρυνθεί ο συνδετικός ιστός. Το κυτταρικό διήθημα φυγοκεντρείται για 10 min σε 1000 rpm, ξεπλένεται δύο φορές σε διάλυμα Hank's και τοποθετείται σε φυαλίδια για να μετρηθούν τα

κύτταρα και να ελεγχθεί η βιωσιμότητά τους.^{1,4}

Καλλιέργεια

Τα ηπατοκύτταρα τοποθετούνται σε πλαστικά δοχεία τα οποία περιέχουν κορεσμένο διάλυμα Hanks, στο οποίο έχει προστεθεί 10% εμβρυϊκού ορού (FCS) και αντιβιοτικά (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) και επωάζονται για 24 h σε 37 C. Πριν από την μεταμόσχευση φυγοκεντρώνται σε 1000rpm, ώστε να απομακρυνθούν ιστικά υπολλείματα και νεκρά κύτταρα.^{1,4}

Μεταμόσχευση

Το κυτταρικό διήθημα αραιώνεται σε 1ml διαλύματος Hank's και ενίεται στην επιλεγείσα θέση με βελόνη 27 g. Στους λήπτες χορηγείται ανοσοκαταστολή.

2. ΟΙ ΘΕΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ

Δοκιμάζονται πολυάριθμες θέσεις, όπως το **ήπαρ**, ο **σπλήνας**, το **μεσεντερικό λίπος**, ο **νεφρός**, , αλλά και θέσεις όπως το **υποδόριο λίπος**, αλλά και **οι πνεύμονες**. Τα **ηπατοκύτταρα επιβιώνουν στο ήπαρ, το σπλήνα κάτω από την νεφρική κάψα στο μεσεντερικό λίπος** όταν τοποθετούνται σε ειδικά πλέγματα καλυμένα με κολλαγόνο, αλλά και στους **πνεύμονες** όταν ενίονται μέσα στο αγγειακό τους δίκτυο. Αντίθετα δεν επιβιώνουν: α) στους πνεύμονες όταν ενίονται στο παρέγχυμα, β) ενδομυικά γ) στο υποδόριο λίπος αλλά και δ) στον νεφρό και τον σπλήνα μετά από ενδοαρτηριακή έγχυση.

Ο **σπλήνας αποτελεί την προσφιλέστερη θέση** με τα καλύτερα αποτελέσματα. Οι λόγοι για αυτό φαίνεται να είναι πολυάριθμοι. Ένας από τους σημαντικότερους εικάζεται ότι είναι η δομή του ίδιου του οργάνου, η οποία δημιουργεί προϋποθέσεις ανάπτυξης των ηπατοκυττάρων σε περιβάλλον με αρκετές ομοιότητες με το ήπαρ. Επίσης η αιμάτωση του από το σύστημα της πυλαίας παρέχει τους κατάλληλους τροφικούς παράγοντες για την διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό των Μεταμοσχευμένων Ηπατοκυττάρων (ΜΗ). Τέλος η εύκολη διάκριση τους από τα σπληνικά κύτταρα δίνει τη δυνατότητα για παρατήρησή και μελέτη των αλλαγών που υφίστανται. Πληροφορίες για το τι συμβαίνει στα ηπατοκύτταρα αλλά και στο όργανο που τα υποδέχεται έχουμε από μελετές

που αφορούν αποκλειστικά τον σπλήνα.⁵⁻⁸

Το ίδιο το **ήπαρ** του λήπτη αν και αποτελεί το ιδεώδες "σπίτι" για τα νέα ηπατοκύτταρα δεν είναι προσφιλές πειραματικό μοντέλο, γιατί λίγες μέρες μετά από την μεταμόσχευσή τους τα ΜΗ δεν είναι δυνατόν να διακριθούν από τα ηπατοκύτταρα του λήπτη μια και δεν υπάρχουν ακόμα καλά αναπτυγμένοι μέθοδοι. Πρόσφατα με την χρήση διαγονιδιακών ηπατοκυττάρων τα οποία περιείχαν το επιφανειακό αντιγόνο του ΗΒV (HbsAg) κατέστη δυνατή η παρακολούθησή τους.⁹

Ο **νεφρός** και συγκεκριμένα η κάψα του είναι μια θέση που χρησιμοποιήθηκε σε αρκετά πειράματα με καλά αποτελέσματα, αλλά εγκαταλείπεται λόγω της εντόπισης του στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο και του μικρού χώρου που παρέχεται για την ανάπτυξη των ΜΗ στην νεφρική κάψα.⁴

3. ΤΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

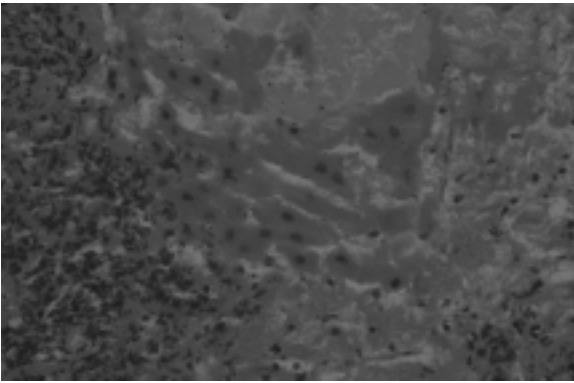
Αν και για την παρακολούθηση των ληπτών χρησιμοποιούνται κυρίως κλινικές και βιοχημικές παράμετροι όπως η βελτίωση της εγκεφαλοπάθειας, η παραγόμενη χολερυθρίνη, η αλβουμίνη κλπ, η τύχη των μεταμοσχευμένων ηπατοκυττάρων αποτελεί συνεχές αντικείμενο μελέτης και η ιστολογική μελέτη των παρασκευασμάτων αυτών αποτελεί μέρος σχεδόν όλων των πειραμάτων. Ερευνάται η **παρουσία τους**, η **εντόπιση**, η **βιωσιμότητά τους**, η παρουσία φαινομένων **απόρριψης**, η **μετανάστευσή τους**, οι **λειτουργικές τους ιδιότητες** η ικανότητα να **πολλαπλασιάζονται** αλλά και η **τύχη τους μετά από την παρέλευση αρκετού χρόνου**. Τέλος **αρχίζει να ερευνάται σε επίπεδο ιστικό** το πως αλληλοεπιδρούν με το όργανο που τα υποδέχεται.

Η εντόπιση και η παρουσία τους

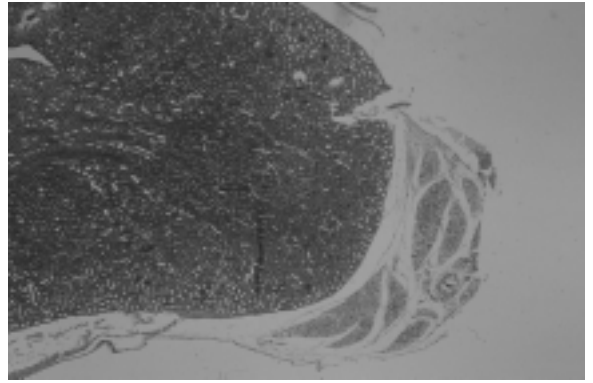
Τα ηπατοκύτταρα όταν μεταμοσχεύονται στον σπλήνα εντοπίζονται στον ερυθρό πολφό μεμονωμένα ή με την μορφή μεγάλων ή μικρών αδροίσεων (Εικ. 1). Διατηρούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και είναι εύκολο να διακρίθουν.

Σχηματίζουν συμπαγείς αδροίσεις και ενίοτε διατάσσονται σε δοκίδες που προσομοιάζουν με τις ηπατικές⁶⁻⁸. (Εικ. 2, 3)

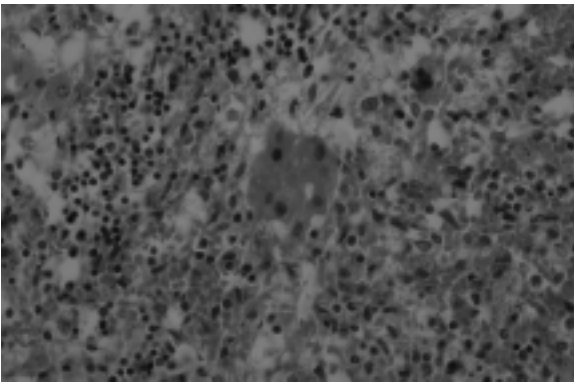
Όταν μεταμοσχεύονται στην νεφρική κάψα, σχηματίζουν συμπαγείς αδροίσεις, και παρου-



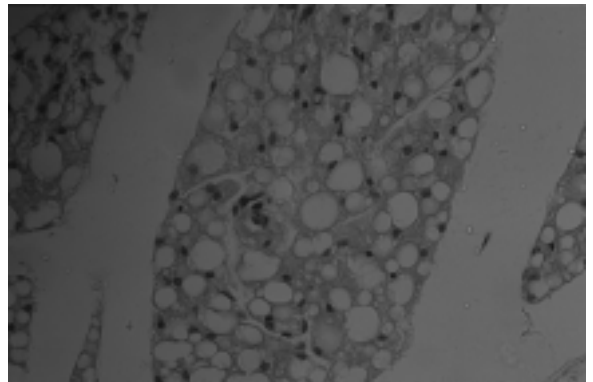
Εικόνα 1. ΗΕx250: ΜΗ στον ερυθρό πολφό του σπληνός: ομάδες.



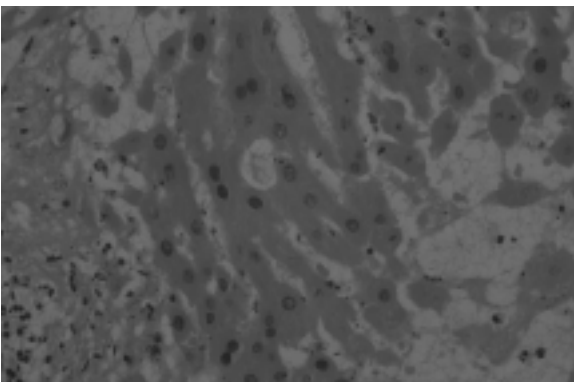
Εικόνα 4. ΗΕx25: ΜΗ στη νεφρική κάψα.



Εικόνα 2. ΗΕx250: ΜΗ στον ερυθρό πολφό του σπληνός: μικρές αδροίσεις.



Εικόνα 5. ΗΕx250: ΜΗ στη νεφρική κάψα, λιπώδης μετατροπή.



Εικόνα 3. ΗΕx400: ΜΗ στον σπλήνα σχηματίζουν δοκίδες.

υπερμικροσκοπική δομή τους και των αλλαγών του σπληνός έχει δώσει ενδιαφέρουσες πληροφορίες. Τα ΜΗ επιβιώνουν για μακρύ χρονικό διάστημα και η μόνη αλλοίωση που παρατηρούνται στα κυτταρικά οργανίδια, είναι υπερπλασία του ομαλού ενδοπλασματικού δικτύου και η ελάτωση του παραγομένου γλυκογόνου. Αντίθετα με την πάροδο του χρόνου σχηματίζουν ηπατικές δοκίδες ενώ η κυτταρική τους μεμβράνη παρουσιάζει όλες τις διαφοροποιήσεις τόσο στην κολποειδική επιφάνεια όσο και στην περιοχή του τοιχώματος του χοληφόρου τριχοειδούς. Τέλος εμφανίζονται ενδοθηλιακά και αστεροειδή κύτταρα αλλά δεν ανιχνεύονται κύτταρα Kupffer.

Στον σπλήνα όπως ήδη αναφέρθηκε εγκαθίστανται στον ερυθρό πολφό τα κύτταρα του οποίου απομακρύνονται ή νεκρώνονται. Αντίθετα ο λευκός πολφός παραμένει ανέπαφος⁸. Όπως ήδη αναφέρθηκε η χρήση “σεσημασμένων” ηπατοκυττάρων η οποία κατέστησε δυνα-

σιάζουν λιπώδη μετατροπή. (Εικ. 4, 5)¹

Η μελέτη της τύχης των ηπατοκυττάρων στον σπλήνα των μεταβολών που υφίστανται στην

τή την παρακολούθησή τους, απεκάλυψε ότι τα ΜΗ απο τον σπλήνα μεταναστεύουν στο ήπαρ και μόνο το 20% παραμένει στον σπλήνα μετά την πάροδο αρκετών μηνών. Τα ΜΗ ανιχνεύονται στον σπλήνα για όλη την ζωή των πειραματοζώων.

Η βιωσιμότητα και η λειτουργικότητά τους

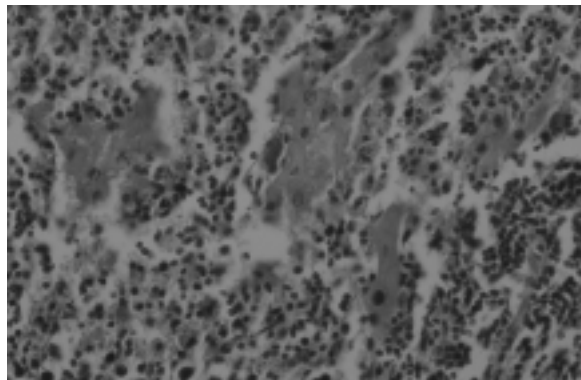
Κύριο κριτήριο για την μελέτη της βιωσιμότητας των ΜΗ αποτελεί η συνέχεια της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία ελέγχεται με την χρώση των κυττάρων με Trypan-Blue. Τα κατεστραμένα κύτταρα προσροφούν την χρωστική ενώ τα υγιή δεν χρώνονται.

Η λειτουργικότητά τους ελέγχεται με την αναζήτηση προϊόντων που παράγονται από αυτά όπως το γλυκογόνο (Χρώση PAS) η αλβουμίνη (Χρώση PAP), με την διερεύνηση της δυνατότητάς τους να πολλαπλασιαστούν. (Αναζήτηση δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, PCNA, K167) (Εικ. 6)^{9,10} ή με την αναζήτηση δεικτών εξιδείκευσης πχ ανίχνευση του κυττόχρωματος P-450 (μέθοδος APAP).

Η απόρριψη

Συχνά ένας μεγάλος αριθμός από ΜΗ νεκρώνεται. Η νέκρωσή τους είναι το αποτέλεσμα πολυαριθμών παραγόντων όπως δυσκολίες προσαρμογής, η επιμόλυνση των καλλιεργειών από μικροοργανισμούς αλλά και η απόρριψη από τον δέκτη.

Τα ηπατοκύτταρα εμφανίζουν ατροφικό κυτταρόπλασμα, συρικνωμένους η καθόλου πυρήνες, ενώ εμφανίζονται και γιγαντοκύτταρα τύπου ξένων σωμάτων. Το φλεγμονώδες διήθημα



Εικόνα 6. APAPx250: PcNA δετικά ΜΗ στον σπλήνα.

είναι ελάχιστο και κυρίως αποτελείται από πολυμορφοπύρρηνα. (Εικ. 7).

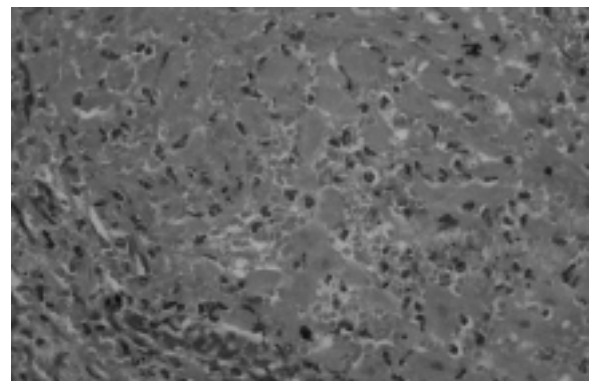
Οι αλλοιώσεις αυτές εμφανίζονται στα πειραματόζωα, την 4η-5η μεταμοσχευτική ημέρα.

Αν και οι παθογενετικοί μηχανισμοί είναι άγνωστοι εικάζεται ότι εμπλέκεται κυρίως ο μηχανισμός της χυμικής ανοσίας. Ο κύριος τύπος δε κυτταρικού θανάτου είναι η απόπτωση.^{13,14}

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι τα ΜΗ επιβιώνουν καλύτερα όταν είναι κρυσταλλωμένα.¹⁵ Τα τελευταία παρουσιάζουν αλλαγές στην αντιγονικότητά τους όπως η ελαττωμένη έκφραση των HLA-I, των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης ICAM-I¹⁶ αλλά και του υποδοχέα FAS.^{17,18}

4. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η μεταμόσχευση κυττάρων φαίνεται ότι από το πειραματικό στάδιο μεταφέρεται πια στην καθ' ημέραν κλινική πράξη. Εκτός από τα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων δοκιμάζονται με αρκετή επιτυχία για την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη. Η σύντομη ανασκόπηση που προηγήθηκε είχε σαν μόνο σκοπό να δίξει το δέμα από την σκοπιά του μορφολόγου που κλήθηκε να απαντήσει σε αρχικά απλά ερωτήματα τα οποία όμως συνεχώς οδηγούν σε άλλα πιο πολύπλοκα που οι γνώσεις μας προς το παρόν δεν μας επιτρέπουν ούτε να τα απαντήσουμε αλλά ούτε καν να τα φανταστούμε. Αν δε αναλογισθεί κανείς ότι τα ηπατοκύτταρα αρχίζουν να επιλέγονται σαν τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για τις γονιδιακές θεραπείες, λόγω της ικανότητός τους να εκφράζουν το σύνολο σχε-



Εικόνα 7. HEx400: ερυθρός πολφός σπληνός/ απόρριψη ΜΗ.

δόν των γονιδίων, το μέλλον εμφανίζεται συναρπαστικό και οι μορφολόγοι του 21ου αιώνα, που ήδη διανύουμε, θα αναγνωρίζουν ξένα κύτταρα σε ιστούς, τα οποία δεν θα αντιπρο-

σωπεύουν εμβρυϊκά υπολλείμματα ή μεταστάσεις αλλά το αποτέλεσμα θεραπευτικών παρεμβάσεων.

SUMMARY

Hepatocyte transplantation. Morphology: Capabilities and Limitations *Demonakou-Vatopoulou M.*

Pathology Department Sismanoglion G H Marousi Athens Greece

Interest in hepatocyte transplantation has increased widely in recent years. Transplanting hepatocytes could be useful both for supporting acute liver failure and for correcting genetic disorders. Morphology of ectopically localized hepatocytes is the subject of continuing study. The fate of intrasplenically transplanted hepatocytes has been studied more extensively but experience for the fate in various other sites is limited. Structural changes were well described, but there are limitations to indefinite survival, appropriate function and rejection.

Key words: *hepatocyte, transplantation, morphology*

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gupta S, Chowdhury R: Hepatocyte Transplantation: Back to the Future. *Hepatology* 15: 6-162, 1992.
- Demetriou A et al: Hepatocyte Transplantation A Potential Treatment of Liver Disease. *Digestive Disease and Sciences* 36: 1320-1326, 1991.
- Raper S, Wilson M: Cell transplantation in liver-directed gene therapy. *Cell Transplant* 2: 381-400, 1993.
- Ferry N, Heard M: Liver-directed gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 20: 1975-81, 1998.
- Chen L, Davis J, Crabb W, Lumeng L: Intrasplenic Transplantation of isolated periportal and perivenous hepatocytes as a long-term system for study of liver-specific gene expression. *Hepatology* 19: 989-98, 1994.
- Darby H, S Gupta, R Johnstone et al: Observations on rat spleen reticulum during the development of syngeneic hepatocellular implants. *Br J Exp Path* 67: 329-339, 1986.
- Nordlinger B, Wang S, Bouna M, et al: Can Hepatocytes Proliferate when transplanted into the Spleen? *Eur Surg Res* 19: 381-387, 1987.
- Lupp A, Hessler F, Philipp T, Danz M, Klinger W: Influence of different transplantation methods on liver survival in spleens of rats. *Exp Toxicol Pathol* 50: 1-8, 1998.
- Kusano M, Mito M: Observations on the Fine Structure of Long-Survived Isolated Hepatocytes Inoculated into Rat Spleen. *Gastroenterology* 82: 616-28, 1982.
- Nakazawa F, et al: Functional assessment of proliferating hepatocytes stimulated by hepatic stimulatory substance in ascorbic acid biosynthetic enzyme-deficient rats. *Hepatology* 26: 437-43, 1997.
- Nishikawa Y, Ohta T, Ogawa K, Nagasec S: Reversion of altered phenotype in primary cultured rat hepatocytes after intrahepatic and intrasplenic transplantation. *Lab Invest* 70 925-32, 1994.
- Ebata H, Oikawa I, Mito M: Rejection of allogeneic hepatocytes and fetal hepatic tissue transplanted into the rat spleen. *Transplantation* 39: 221-222, 1995.
- Olszewski L, Poreda E, Jasklowska-Engliska-Englisz M, Interewicz B: Hepatocyte transplantation-granulocytes and mononuclear cells recognize the surface of isolated autologous hepatocytes as non-self and destroy them. *Transpl Int* 11 Suppl 1: S367-71, 1998.
- Krams S, Martinez O: Apoptosis as a Mechanism of Tissue Injury in Liver Allograft Rejection. *Seminars in Liver Disease* 18: 153-167, 1998.
- Ostrowaka A, Karrer M, Bilir M: Histological identification of purified and cryopreserved allogeneic hepatocytes following transplantation in a murine model without host immunosuppression. *Transpl Int* 12: 188-94, 1999.
- Krams M, Fox K, Beatty R, et al: Human hepatocytes produce an isoform of FAS that inhib-

- its apoptosis. *Transplantation* 15: 713-21, 1998.
17. Yokoyama I, et al: Decreased Fas Antigen Expression of Cultured Hepatocytes with FK 506. *Transplantation Proceedings* 28: 3189-3190, 1996.
 18. Kawahara I et al: Allogeneic hepatocyte transplantation: contribution of Fas-Fas ligant interaction to allogeneic hepatocyte rejection. *J Gastroenterol Hepatol* 13 Suppl: S119-23, 1998.
 19. Bumgarder L, Heinger M, Ferguson M, Orosz G: In vivo Immunogenicity of purified allogeneic hepatocytes in a murine hepatocyte transplant model. *Transplantation* 15: 47-52. 1998.