

***In vitro* functional assessment of bioartificial liver system using immobilized porcine hepatocyte spheroids**

Ji-Hyun Lee¹, Doo-Hoon Lee², Hee-Hoon Yoon², Doo-Hee Jung², Jung-Keug Park²,
Sung-Koo Kim³, Kwang-Woong Lee⁴, Suk-Koo Lee⁴

¹Samsung Biomedical Research Institute, ²Dongguk University, ³Pukyong National University,

⁴Samsung Medical Center

TEL: +82-2-3410-3679, FAX: +82-2-3410-3669

To treat fulminant hepatic failure (FHF) patients, various extracorporeal bioartificial liver (BAL) systems have been developed. Several requirements should be met for the development of BAL systems: hepatocytes should be cultured in a sufficiently high density; their metabolic functions should be of a sufficiently high level and duration; and the BAL systems module should permit scaling-up and aseptic handling. Several investigators have found that freshly isolated primary hepatocytes can be cultured into three dimensional, tightly packed, freely suspended, multicellular aggregates, or spheroids. These specialized cell structures exhibited enhanced liver specific functions and a prolonged differentiated state compared to cells maintained in a monolayer culture. Cells in spheroids appear to mimic the morphology and ultrastructure of the *in vivo* liver lobule. The ability of hepatocytes to organize into three-dimensional structures was hypothesized to contribute to their enhanced liver-specific activities. In this study, the ammonia removal rate and urea secretion rate of pig hepatocytes spheroids encapsulated in Ca-alginate bead were determined. A packed-bed bioreactor with encapsulated pig hepatocytes was devised as BAL support system. The efficacy of the system was evaluated *in vitro*.

서 론

간세포 배양장치와 체외순환시스템으로 구성된 인공간은 간부전 환자의 간이식까지의 대기기간 중 간기능을 보조하기 위해 개발되고 있다. 인공간 개발에서 중요한 점은 간세포가 높은 간기능을 오래도록 유지하도록 하는 것이다. 간세포를 효과적으로 배양하는 기술로는 현재 배양 배지에 성장인자 및 호르몬을 첨가하는 방법과 각종 세포의 기질성분을 이용하는 방법, 세포간 상호작용을 최대화하여 배양하는 구상체 배양, 간의 비실질 세포와 혼합 배양하는 방법, 3차원 구조의 matrix나 gel에 간세포를 포집하여 배양하는 방법 등이 있다. 본 연구에서는 일차 간세포를 교반용기를

이용하여 구상체 배양을 실시하였으며 인공간 반응기에 적용하고자 칼슘 알지네이트로 캡슐화하였다. 캡슐화된 간세포 구상체를 반응기에 충전 후 인공간 시스템을 *in vitro* 상에서 운전하여 간세포의 간기능 활성 및 시스템의 성능을 평가하였다.

재료 및 방법

약 10 Kg 돼지를 사용하여 변형된 Seglen의 방법인 two-step collagenase perfusion 방법으로 간세포를 분리 한다. 간세포의 수와 생존율을 Trypan blue dye exclusion법으로 측정하고 생존율이 85 % 이상인 경우에 실험을 진행한다. 간세포를 37°C incubator에서 spinner flask에 5×10^5 cells/ml 의 농도로 접종한 후 24시간동안 교반 배양하여 구상체를 형성한다. 형성된 간세포 구상체를 칼슘-일지네이트 비드로 캡슐화한 후 반응기에 충전하고 인공간 시스템에서 1mM 암모니아가 포함된 배지를 이용하여 암모니아 제거율을 통한 간세포 활성을 확인한다.

결 과

1.25×10^9 cells의 간세포 구상체를 캡슐화한 후 반응기에 충전 하였다. 3시간동안 1mM 암모니아를 함유한 배지 700mL을 시스템을 이용하여 순환하며 간세포의 암모니아 제거율을 측정한 결과, $29.6 \mu\text{g}/\ell/\text{min}$ 의 활성을 나타내었으며 이후 3시간동안 5 ml/min의 유속으로 1mM 암모니아 배지를 연속적으로 feeding 한 결과 높은 암모니아 제거 활성을 유지하였다.

결 론

돼지 간세포를 분리하고 교반용기를 이용하여 구상체를 형성하였으며 캡슐화한 후 반응기에 충전하여 인공간 시스템의 성능을 평가하였다. batch 및 continuous로 암모니아 배지를 feeding 하였을 때 높은 암모니아 제거활성을 나타내어 간세포 구상체를 이용한 인공간 시스템의 효능을 확인할 수 있었다.

References

1. T. Hui, J. Rozga and A. A. Demetriou (2001), "Bioartificial liver support", *J. Hepatobiliary Pancreat Surg.* **8**, 1-15.
2. J. Washizu, F. Berthiaume, C. Chan, R. G. Tompkins, M. Toner, M. L. Yarmush (2000), "Optimization of rat hepatocyte culture in citrated human plasma", *J. Surg. Res.* **93**, 237-246.
3. S. K. Kim, S. H. Yu, J. H. Lee, J. Y. Lee, A. Rademacher, D. H. Lee, J. K. Park (2001), "Effect of collagen concentration on the viability and metabolic function of encapsulated hepatocytes", *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 423-427.