

Aus dem Transplantationszentrum
Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Viszerale Transplantation
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Xavier Rogiers

**Optimierung der PLLA Matrix basierten heterotopen Hepatozyten-
Transplantation mittels Tissue Engineering, eine Langzeit in vivo
Studie.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Marc Lütgehetmann

aus Dorsten

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1. Abkürzungsverzeichnis	I
2. Arbeitshypothese	1
3. Einleitung	2
3.1. Alternativen zur Organtransplantation	3
3.2. Arten der Zelltransplantation	5
3.3. Probleme der Zelltransplantation	7
4. Material und Methoden	9
4.1. Einteilung der Versuchsgruppen	9
4.2. Versuchstiere	9
4.3. Poly-L-Laktatsäure-Matrix	10
4.4. Hepatozytenisolation	10
In- Situ-Perfusion	13
Zellkulturlabor	14
4.5. Matrixbesiedelung	15
4.6. Zellkulturmedium	15
4.7. Flußkultur	16
4.8. Matriximplantation	17
4.9. Portocavaler Shunt	18
4.10. Matrixexplantation	20
4.11. Quantitative DNA Messung	22
4.12. Histologie	23
HE Färbung	24
PAS Färbung	24
4.13. Immunhistochemie	25
ABC Methode	25
Doppelfärbung 1	26
4.14. Immunfluoreszenz	27
Doppelfärbung 2	27
4.15. Computergestützte Bildanalyse	28
4.16. Statistische Auswertung	29
5. Ergebnis	31
5.1. Hepatozytenisolation	31
Zellzusammensetzung	31

5.2.	Matrixbesiedlung	33
	Bestimmung der DANN	33
	Besiedlungseffizienz	34
	Flusskultur	35
	Histologie der Spherode	37
5.3.	Ergebnisse der OP	41
	PCS- Stimulation	41
	Implantations-OP	41
	Explantations-OP	41
5.4.	Quantitative histologische Auswertung	43
	Matrix	43
	Hepatozytenverteilung in der Matrix	44
	Entzündungsreaktion	45
	Hepatozytenareale	47
5.5.	Quantitative morphometrische Auswertung	54
	Flächenanteil der Hepatozyten	54
	Anzahl der Hepatozytenareale	55
	Größe der Hepatozytenareale	57
	Normalisierte Gesamtzellmenge	58
	Varianzanalyse	60
6.	Diskussion	62
6.1.	Poly-L-Laktatsäure-Matrix	63
6.2.	Zell-Matrix Interaktionen	64
6.3.	Angiogenese	65
6.4.	Vorkultur der Hepatozyten im Fluss-Bio-Reaktor	66
6.5.	Normierte Gesamtzellmenge	69
6.6.	PCS-Stimulus	70
6.7.	Histologie und Aufbau der heterotopen Leberneogewebes	73
7.	Zusammenfassung	76
8.	Anhang	77
9.	Literaturverzeichnis	84
10.	Danksagung	95
11.	Lebenslauf	96
12.	Erklärung	99

Abkürzungsverzeichnis

°C	= Grad Celsius
µl	= Mikroliter
µm ²	= Quadratmikrometer
ABC	= Avidin-Biotin-Complex
ALR	= Augmenter of liver regeneration
AP	= Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	= Aqua destillata
Best. Nr.	= Bestellnummer
CaCl ₂	= Calciumchlorid
Ch	= Charrière (1 Ch = 1/3 mm)
CK	= Cytokeratin
dd H ₂ O	= Aqua bidestillata
DK	= Dänemark
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
ECM	= Extrazellulärmatrix
EDTA	= Ethylene diamine Tetraacetic acid
EGF	= Epidermal Growth Factor
EGTA	= Ethylene Glycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic acid
et al.	= et alii
ETX-	= Transplantation von Spheroiden (im Polymer) ohne PCS
ETX+	= Transplantation von Spheroiden (im Polymer) mit PCS
FITC	= Fluoresceinisothiozyanat
g	= Gramm
HCl	= Salzsäure
HE	= Hämalaun-Eosin-Färbung
HEPES	= (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
HepPar 1	= Hepatocyte paraffin 1
HGF	= Hepatocyte Growth Factor
HSM	= Hormon stimuliertes Medium
i.E.	= Internationale Einheiten
IgG	= Immunglobulin G
IL-6	= Interleukin 6
Kat.-Nr.	= Katalognummer
KCl	= Kaliumchlorid
l	= Liter
mg	= Milligramm
min	= Minuten
ml	= Milliliter
mM	= Millimolar
mm	= Millimeter
mm ²	= Quadratmillimeter
NaCl	= Natriumchlorid

NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O	= Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaOH	= Natronlauge
ng	= Nanogramm
O ₂	= Sauerstoff
OP	= Operation
PAS	= Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	= phosphate buffered saline, pH 7,4
PCNA	= Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCS	= Portokavaler Shunt
PGA	= Polyglycolsäure
PLLA	= Poly-L-Laktatsäure
PVA	= Poly-venyl-Alkohol
SDS	= Natrium-dodecyl-sulfat
STx-	= Transplantation von Einzelzellen (im Polymer) ohne PCS
STx+	= Transplantation von Einzelzellen (im Polymer) mit PCS
TNE	= Tris, NaCl, EDTA
TNF	= Tumornekrose Faktor
Tris	= Tris [Hydroxymethyl]amino-methane
TRITC	= Tetramethylrhodamin Isothiozyanat
USA	= Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF	= Vascular Endothelial Growth Factor

Arbeitshypothese

Die Lebertransplantation ist heute die Therapie der Wahl bei chronischem und akutem Leberversagen. Da dieser Zweig der Chirurgie von einem Mangel an Organen geprägt ist, der auch durch die Einführung der Splitleber- [74] und Leberlebendtransplantation [5] nicht behoben werden konnte, geht die Forschung alternative Wege.

Wir haben uns dem Ansatz der Zelltransplantation zugewandt, mit dem Ziel, die Transplantationseffizienz zu erhöhen. Zwei aus der Literatur bekannte Aspekte wollen wir hierzu hauptsächlich beleuchten. Einerseits ist aus der Tumorforschung, wie auch aus der Zellkultur bekannt, dass kleine dreidimensionale Zellverbände [32] deutlich stressresistenter sind als Einzelzellen. Die Mechanismen sind vielfältig und noch nicht alle verstanden. Wichtig erscheint aber die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten [18], sowie die Schaffung einer Situation für die Zelle, die der physiologischen Nanoumgebung gleicht. Dies geschieht durch Produktion von Extrazellulärmatrix [46] innerhalb des Zellverbandes. Andererseits ist bekannt, dass ein portocavaler Shunt einen Wachstumsstimulus für heterotope Leberzellen darstellt [78]. Gleichzeitig soll er das Problem lösen, das sich aus der akkurat geregelten Lebergröße ergibt. Da wir uns für Untersuchungen an Ratten mit gesunder normalgroßer Leber entschieden haben, ist eine Proliferationsinhibition für die transplantierten Zellen zu befürchten, die durch den portocavalen Shunt verringert werden soll.

Unsere Hypothesen lauten demnach:

- 1) Die Transplantation der Hepatozyten nach Vorkultivierung zu dreidimensionalen Verbänden den Spheroiden führt durch eine verstärkte Stressresistenz zu einer Erhöhung der Gesamtzellzahl nach Transplantation.

- 2) Die Anlage eines portocavalen Shunts steigert die Proliferationsrate der transplantierten Zellen und erhöht die Überlebensrate.

Einleitung

Die Lebertransplantation als orthotope Transplantation einer ganzen Leber ist heutzutage sowohl bei chronischem, wie auch bei akutem Leberversagen die Therapie der ersten Wahl [102]. Erste experimentelle Grundlagen dieser Methode wurden 1953 von Goodrich [23] am Kaninchen geschaffen und so konnte 10 Jahre später T. Starzl in Denver/USA die erste Leber erfolgreich am Menschen transplantieren [88]. 1967 überlebte ein Mädchen mit einem hepatozellulären Karzinom eine, von ihm durchgeführte, Lebertransplantation mehr als ein Jahr. In Deutschland wurde die erste Lebertransplantation 1969 von Gütgemann und Lie an der Universitätsklinik Bonn vorgenommen. Durch den Einsatz neuer Immunsuppressiva, wie dem Cyclosporin A (Erstzulassung BRD 1983), Fortschritte bei den Konservierungslösungen zur Organprotektion (University of Wisconsin) und Dank der Verfeinerung der chirurgischen Technik wurde das Langzeitüberleben von Organ und vor allem Empfänger kontinuierlich verbessert. So stieg die ein-Jahres-Überlebensrate von 30% in den 70er Jahren auf heutzutage mehr als 85% mit einer fünf-Jahres-Überlebensrate von über 60%. Die Erfolge der Therapie führten zu einer Ausweitung der Indikation. In der Pionierzeit, wegen der hohen Komplikationsraten nur als Ultimo ratio in Erwägung gezogen, ist heutzutage prinzipiell jede benigne chronische Lebererkrankung eine Indikation für eine Lebertransplantation. Eines der größten Probleme in der Transplantationschirurgie ist der Organmangel geworden. So wurden zwischen 2000 und 2002 in den USA 4500 Lebertransplantationen durchgeführt, aber während der selben Zeit standen über 16000 Patienten auf Wartelisten. Um die knappen Spenderorgane möglichst effektiv zu nutzen, werden seit einigen Jahren Splitleber-Transplantationen durchgeführt. Dabei wird die Leber in zwei Hälften geteilt und größtenteils der kleinere linke Leberlappen einem kindlichen, der größere rechte einem erwachsenen Empfänger transplantiert. Ein weiterer großer Schritt dahingehend, trotz Organmangels mehr Patienten mittels Transplantation behandeln zu können, war die erstmalige Durchführung der Leberlebenspende bei einem Kind im Jahre 1988 [73] und 1994 bei einem Erwachsenen [28]. Dank dieser Technik ist man heutzutage nicht mehr ausschließlich auf Kadaverorgane angewiesen. Trotz dieser neuen Techniken wächst die Zahl der Patienten, die auf eine Transplantation warten. Nach den Daten von Eurotransplant starben allein im Jahre 2000 279 Patienten, weil sie nicht rechtzeitig ein Spenderorgan erhielten. Dieses

Problem soll mit einem neuen Organallokationssystem angegangen werden. Die Eurotransplant Daten wurden auf dem Deutschen Transplantationskongress 2004 in Kiel noch weiter relativiert. So werden in einigen Zentren Patienten mit einer zu schlechten Prognose nicht auf die Warteliste gesetzt, was die Anzahl der Todesfälle in Erwartung einer Transplantation geringer hält, als sie eigentlich sind. Aufgrund dieser nicht tragbaren Situation sucht die Forschung nach alternativen Wegen.

Alternativen zur Organtransplantation

Experimentell haben sich zwei Hauptrichtungen herauskristallisiert, die hier näher beleuchtet werden sollen, nämlich die extrakorporalen Leberersatzsysteme und die Leberzelltransplantation.

Extrakorporale Leberersatzsysteme

Eine mögliche neue Therapieform für das akute Leberversagen könnten extrakorporale Leberersatzsysteme darstellen. Sie könnten die ausgefallene Leberfunktion ersetzen, bis entweder die eigene Leber sich regeneriert hat, oder ein Spenderorgan verfügbar ist. Ein großes Problem ist, dass zur Zeit noch unklar ist, welche Leberfunktionen ein temporäres System ersetzen muss. Als kritisch für das Überleben des Patienten im akuten Leberversagen wird allgemein die fehlende Detoxifikation der Leber angesehen. Deshalb wurden physikalisch mechanische Systeme erdacht, um diese zu ersetzen. Erste Versuche in den 70er Jahren mit Charcoal-Absorptionssäulen zeigten keine klinische Wirksamkeit [31]. Da viele der Toxine an Albumin gebunden sind und sich nicht frei im Blutplasma befinden, beruhen neue kommerzielle Systeme (Mars[®], Prometheus[®]) auf einer Albumindialyse. Trotz einzelner erfolgreicher Therapieberichte fehlt noch der Wirksamkeitsnachweis in kontrollierten klinischen Studien.

Ein anderer Ansatz ist es, ein **biologisches System** zu entwickeln, welches die Leberfunktionen ersetzen kann. Der Vorteil gegenüber den physikalisch mechanischen Leberersatzsystemen wäre, dass sie nicht nur die Detoxifikation übernehmen, sondern auch Albumin und Gerinnungsfaktoren herstellen könnten. Als Grundlage für ihr Zellkultursystem benutzen viele Arbeitsgruppen die Hohlfaserkartusche der Nierendialyse [82; 9]. Die Hepatozyten werden dabei im extrakapillären Raum angezüchtet und das Patientenplasma durch die Hohlfasern gepumpt. Die Arbeitsgruppe um Gerlach et al. [20]

hat ein komplexes Kultursystem mit vier verschiedenen Hohlfasersystemen geschaffen, mit dem es ihnen möglich war, primäre humane Hepatozyten über mehrere Wochen, vital in Kultur zu halten [20]. Trotz erfolgsversprechender Fallberichte von biologischen extrakorporalen Leberersatzsystemen [8] muss sich auch hier erst der Nutzen in klinischen Studien zeigen.

Leberzelltransplantation

Liegt bei einem Patienten eine chronische Leberinsuffizienz oder eine genetische Erkrankung der Leber vor, so könnte die Leberzelltransplantation eine Therapiealternative zur Lebertransplantation darstellen. Zum Beispiel bei Erkrankungen, wie beim Alpha 1-Antitrypsinmangel, bei Hämophilie durch Faktor 8- oder 9-, Protein S- oder C- Mangel, bei Ornithin-Transcarbamylasemangel, bei hereditärer Fruktoseintoleranz, beim Morbus Wilson, sowie bei Mutationen im Lipoproteinstoffwechsel könnte eine Zelltransplantation die Therapie der Wahl werden [70]. Der Vorteil der Zelltransplantation gegenüber der Organtransplantation ist, dass die Leber des Patienten erhalten bleibt, und nur eine bedarfsgerechte Transplantation von Hepatozyten durchgeführt werden muss. Um einen Stoffwechseldefekt zu heilen, bräuchte man je nach genetischer Krankheit nur ca. 5-10% der Leberzellmasse zu transplantieren [101]. Dadurch könnte es möglich werden, mit einer Spenderleber mehrere Patienten zu behandeln. Des Weiteren können Leberzellen aus Spenderlebern gewonnen werden, die man sonst aufgrund von zirrhotischem Umbau oder geschädigtem Parenchym, z.B. nach einem Verkehrsunfall, nicht für eine Transplantation verwenden würde.

Als neuer Ansatz wäre auch denkbar, im Falle eines Stoffwechseldefektes, die Leberzellen vom Patient selbst zu gewinnen, in vitro eine Gentherapie durchzuführen und die Zellen danach dem Patienten zu retransplantieren [36]. Dadurch wäre man nicht nur unabhängig vom Organangebot, man würde zusätzlich eine lebenslange Immunsuppression, wie sie nach Lebertransplantation nötig ist, vermeiden. Die prinzipielle Durchführbarkeit dieses Therapiekonzeptes wurde von 2 Arbeitsgruppen belegt. Die Gruppe um Fox et al. hat ein Crigler-Najjar-Syndrom Typ 1 erfolgreich behandelt [16], und die Arbeitsgruppe um Grossman et al. hat selbiges an einem Patienten mit familiärer Hypercholersterinämie gezeigt [25]. Eine weitere Möglichkeit, bei der man sogar auf die belastende Leberteileresektion verzichten könnte, wäre, patienteneigene adulte Stammzellen z.B. aus

dem Fettgewebe, Knochenmark oder Blut zu gewinnen, in Kultur zu vermehren, zu Hepatozyten zu differenzieren und sie dann dem Patienten zurück zu transplantieren.

Arten der Zelltransplantation

Injektionsmethode

In der Vergangenheit sind die unterschiedlichsten Injektionslokalisationen ausgetestet worden: die Pfortader [29; 75; 61], die Milz [44; 13], die Pleurahöhle [92], das Peritoneum [80] und die dorsale Faszie [33]. Obwohl bis heute unklar ist, wo der ideale Ort für die Zelltransplantation liegt, wird heutzutage von den meisten Gruppen die Milz als Injektionsort bevorzugt. Es ist ein chirurgisch einfacher und sicherer Weg die Zellen via Pfortadersystem in die Leber zu bringen. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass man den Eingriff mittels minimalinvasiver Methoden durchführen kann, so dass also, im Gegensatz zur Lebertransplantation, keine große belastende Operation mehr notwendig ist. Nachdem die Leberzellen über die Pfortader die Leber erreicht haben, gelangen sie über die kleinen Pfortaderäste in die Lebersinusoiden. Da diese nur einen Durchmesser von 6-8 μm aufweisen, bleiben die Leberzellen pfortadernah in den Sinusoiden stecken und verursachen dadurch einen transienten portalen Hochdruck. Durch den so gesetzten Ischämie-Reperfusionsschaden, sowie durch die Aktivierung von Kupferzellen kommt es zu einer Endothelseparation, welche dazu führt, dass sich die transplantierten Hepatozyten in das Leberparenchym integrieren können [26; 81]. Ein großer Nachteil der Methode ist aber, dass man, bedingt durch die Nebenwirkungen, wie Pfortaderhochdruck, Pfortaderthrombose [4] und Lungenembolie in der Zellmenge stark eingeschränkt ist welche man in einer Sitzung transplantieren kann. Studien haben ergeben, dass ca. $2,4 \times 10^6$ Zellen/ g Leber sicher transplantiert werden können. Bei einer 1500 g schweren Leber eines 70 kg schweren Mannes wären das ca. $3,6 \times 10^9$ Zellen. Da die Gesamtzellzahl der Leber in diesem Fall ca. $2,8 \times 10^{11}$ Zellen beträgt [89], bedeutet dies, dass man pro Injektion maximal 1% der Gesamtzellzahl transplantieren kann. So ist davon auszugehen, dass multiple Injektionen nötig wären, um hereditäre hepatische Stoffwechselerkrankungen zu therapieren [81].

Transplantation der Zellen auf einer Matrix als Träger

Um die limitierte Zellzahl bei der Injektionsmethode zu umgehen haben wir das Konzept des Tissue engineering benutzt. Die Zellen werden bei dieser Technik heterotop auf eine dreidimensionalen Matrix transplantiert [47]. Die Matrix ersetzt hierbei die natürliche Extrazellulärmatrix, von der die Zellen normalerweise in vivo umgeben sind, und welche sowohl für das Überleben als auch für die differenzierte Funktion der Zellen eine Schlüsselrolle spielt. Erste Versuche Leberzellen mit diesem Konzept heterotop zu transplantieren, wurden 1988 von Vacanti et al. gemacht. Es konnte dort ein kurzfristiges Überleben der Zellen gezeigt werden.

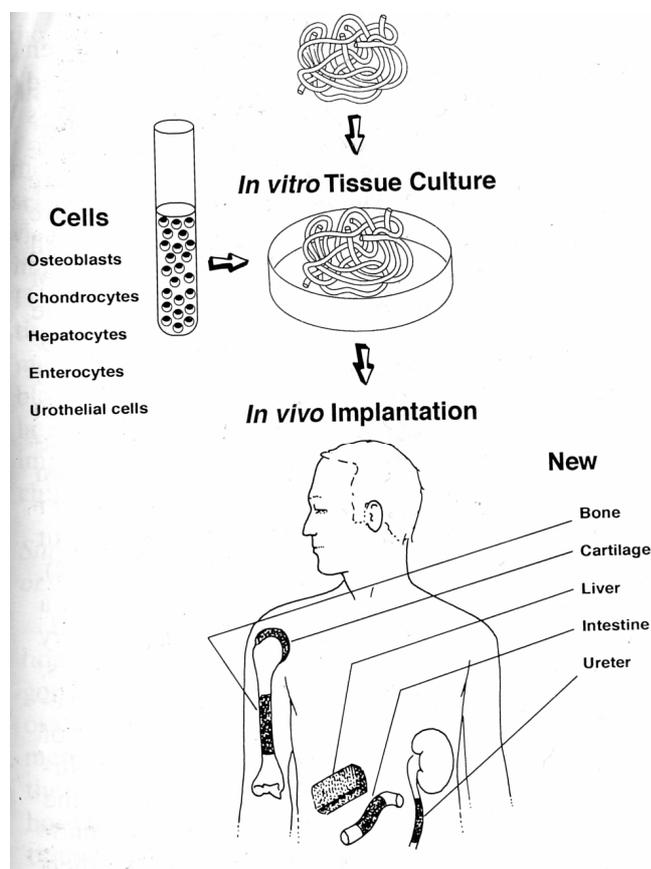


Abbildung 1: Veranschaulicht das Konzept des Tissue engineering vorgestellt von Vacanti et al. [104] bei dem Zellen auf eine Matrix gegeben und in vitro kultiviert werden, um sie dann als Organersatz zu transplantieren. Abbildung entnommen aus [72]

Der Einsatz neuer Materialien, besonders aber die Entwicklung und Verwendung von bioabbaubaren Matrices führte zu einem verbesserten Überleben der transplantierten Zellen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten dann in den folgenden Jahren sowohl eine große proliferative Fähigkeit der heterotopen Leberzellen als auch deren Langzeitüberleben in vivo nachweisen [35; 57; 60; 34; 38; 39]. Den Beweis, dass man sehr große Zellmengen mit dieser Methode transplantieren kann, erbrachten Uyama et al. 1993. Dort zeigte er in einem proof of principle, dass man mit der matrixbasierten Zelltransplantation in eine Ratte eine gesamtleberäquivalente Zellmenge, sicher und komplikationslos transplantieren kann [101]. Die heterotope Zelltransplantation bietet zusätzlich den Vorteil, dass man die Zellen entfernt von dem in der kranken Leber herrschenden pathologischen Milieu transplantiert. Weiterhin ist es möglich, durch Wachstumsfaktoren, welche entweder an die Matrix gebunden sind oder von PLLA- oder Hydrogelkugeln freigesetzt werden, spezifisch diesen Zellen einen Proliferationsvorsprung gegenüber den Hepatozyten in der Leber zu verschaffen [58].

Ein Nachteil der Methode ist, dass die transplantierten Zellen keinen Gefäßanschluss besitzen, und sie so die Zeit mit geringem Sauerstoff- und Nährstoffangebot überleben müssen, bis ein sie versorgendes Blutgefäßsystem vom Empfänger eingewachsen ist. Erste experimentelle Versuche dieses Problem zu lösen kommen von der Arbeitsgruppe um Vacanti. Dort erzeugt man in vitro mithilfe eines Silikonwafers als template ein implantierbares Kapillarnetz, welches dann in vivo die Zellen in den Matriximplantaten mit Sauerstoff und Nährstoffe versorgen könnte [43].

Probleme der Zelltransplantation

Unabhängig von der Methode der Transplantation (Injektion oder matrixbasiert) ist das größte Problem der sehr hohe anfängliche Zellverlust von über 95% der transplantierten Zellen und die damit verbundene sehr schlechte Transplantationseffizienz. Die Ursachen des Zellunterganges sind wahrscheinlich vielfältig und es existieren verschiedene Theorien. Durch die Zellisolation entstehen bei vielen Zellen Schäden an der Zellmembran die konsekutiv zum Zelluntergang führen können. Ein weiterer Grund für den Zelltod könnte die Anoikis, d.h. Einleiten der Apoptose, bedingt durch Verlust der physiologischen Adhäsion, sein. Auch eine Immunreaktion wird von manchen Arbeitsgruppen diskutiert, da beobachtet wurde, dass selbst in syngenem Transplantationsmodellen Empfänger-Makrophagen und -Monozyten anfangen, die transplantierten Zellen zu zerstören. Die

schlechte Transplantationseffektivität ist wahrscheinlich einer der Hauptgründe für die unbefriedigenden Ergebnisse der Zelltransplantation sowohl im Tiermodell als auch in der klinischen Anwendung. Deshalb haben wir unser Augenmerk auf die Verbesserung des Zellüberlebens durch Vorkultivierung gelegt.

Material und Methoden:

Einteilung der Versuchgruppen

Um unsere Hypothesen zu überprüfen haben wir zwei Versuchgruppen und eine Kontrollgruppe gebildet:

Kontrollgruppe	leere Polymere
ETx-	Einzelzellen im Polymer ohne PCS
STx-	Spheroide ohne PCS
ETx+	Einzelzellen im Polymer mit PCS
STx+	Spheroide mit PCS

PCS: zwei Wochen vor Implantation der Zellen angelegter portokavaler Shunt

Spheroide: innerhalb eines Polymers in Flusskultur gezüchtete Hepatozytenkonglomerate

Die Kontrollgruppe besteht aus vier, die Versuchgruppen aus 16 Tieren, die jeweils auf vier Explantationszeitpunkte aufgeteilt wurden. Nach einer Woche, einem Monat, drei und sechs Monaten post implantationem wurden die Polymere explantiert und der histologischen Aufarbeitung zugeführt.

Versuchstiere

(Tierversuchsgenehmigung 29/99). Für alle Versuche verwendeten wir erwachsene, männliche Lewisratten mit einem Gewicht von 200 – 300 g. Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, nach den deutschen Richtlinien der Tierhaltung, mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und einem 12 Stunden Tag/Nacht-Intervall gehalten. Die chirurgischen Eingriffe wurden in Ethernarkose mit einer postoperativen Schmerztherapie mit Metamizol (Novaminsulfontropfen, Ratiopharm) durchgeführt.

Poly-L-Laktatsäure-Matrix

Unsere Matrizes wurden von Prof. Dr. Ma von der Dental School, University of Michigan, nach der salt leaching Technik hergestellt. [51] Die Matrizes haben einen Durchmesser von 18 mm und eine Dicke von 1 mm. Die Porengröße beträgt 200 - 400 µm und die Matrix ist zu 95% porös [71; 96]. Für eine effizientere Zellbesiedlung werden die Matrizes mit einer 1%igen wässrigen Poly-Vinyl-Alkohol-Lösung beschichtet. Nach dem Trocknen werden sie dann mit Ethylen-Oxid sterilisiert und können so gelagert werden.

Hepatozytenisolation

Die Leberzellen werden mit der Zwei-Schritt-Kollagenase-Verdautechnik nach der durch Aiken et al. [2] modifizierten Methode von Seglen et al. [79] isoliert.

Erstellen der Stammlösungen:

10 x Leffert's Stammpuffer:

23,83 g	Hepes (Sigma, Steinheim/D, Kat.: H-0891),
2,24 g	KCl (Merck, Darmstadt/D, Kat.: 1.04936),
75,87 g	NaCl (J.T. Backer, Denventer/ Holland, Kat.: 0278),
1,38 g	NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (Merck, Darmstadt/ D, Kat.: 1.063646)
18,02 g	alpha-D-Glucose (Sigma, Steinheim/D, Kat.: G-7021)

werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wird der pH-Wert mit 1 N HCl (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 1.09057.1000) auf 7,4 eingestellt und der Puffer steril filtriert. (Bottle Top Filtersystem, 45 mm neck size, 500 ml, Corning, New York/ USA, Kat.-Nr.: 430513)

EGTA Lösung:

Zu 100 ml 10 x Leffert's Stammpuffer werden 900 ml Aqua dest. und 1,9 g EGTA (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: E-4378) gegeben. Die Lösung wird wiederum mit 1 N Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt und steril filtriert.

CaCl₂ Lösung:

14 g CaCl₂ (Merck, Darmstadt/D, Kat.-Nr.: 2386) werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und dann die Lösung steril filtriert.

Herstellung der Perfusionslösungen :

Lösung 1: Präperfusionspuffer:

54 ml 10 x Leffert's Stammpuffer und 60 ml 5 mM EGTA Lösung werden mit Aqua dest. auf 600 ml aufgefüllt. Der pH Wert wird anschließend mit 1N Salzsäure auf 7,4 eingestellt.

Lösung 2: 1 x Leffert's Puffer :

50 ml 10 x Leffert's Stammpuffer werden mit Aqua dest. auf 500 ml gebracht und der pH Wert wird mit 1N Salzsäure auf 7,4 eingestellt.

Lösung 3: Kollagenase-Lösung:

50 ml 10 x Leffert's Stammpuffer und 5 ml CaCl₂-Lösung werden mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt sowie der pH Wert mit 1 N Salzsäure auf 7,4 eingestellt. Anschließend werden 500 µl Trypsininhibitor (= 7,5mg; ICN Biochemicals Inc., Aurora/ USA, Kat.-Nr.: 101113) und 125 mg Kollagenase (Collagenase Typ 2, 215U /mg, Worthington, Lakewood / NI, Kat.-Nr.: M9b2743, Lot: 4177) dazugegeben.

Die drei Lösungen werden durch ein Bottle-Top-Filtersystem mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und damit sterilisiert.

Die Perfusionsapparatur besteht aus einer Pumpe (Digi-Saltic, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago/USA, Kat.-Nr.: 7526/05), einem Schlauchsystem (Masterflex Cole-Parmer Instruments Co., Chicago/USA, Kat.-Nr.: 96400-16) und einem Wasserbad mit Heizaggregat (Typ HC 2/8, Julabo, Kat.-Nr.: E07).

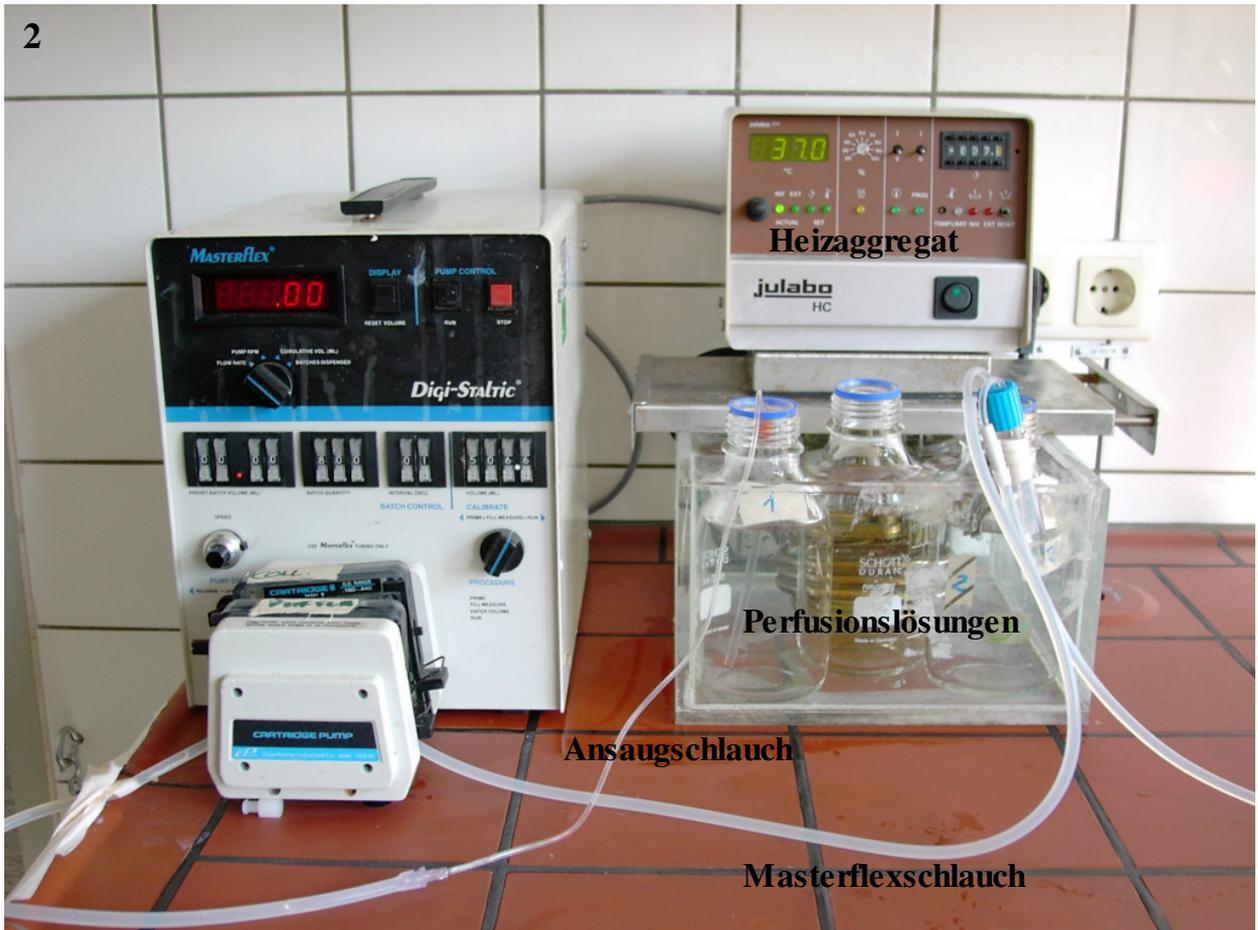


Abbildung 2: Zeigt das zusammengebaute Perfusionssystem.

Das Schlauchsystem besteht aus einem Ansaugschlauch, (Absaugkatheter Ch 16, Length 060, Biogel, Hundsted, Kat.-Nr.: DK-3390) sowie zwei 30 cm langen Masterflexschläuchen und einer Luftfalle. Der Ansaugschlauch ist mit einem 35 cm langen Stück Masterflexschlauch verbunden, der durch die Pumpe geführt wird, und schließlich in einer Luftfalle endet. Von dort führt der zweite Masterflexschlauch zu einer Venenverweilkanüle (Vasofix 17G, Braun, Melsungen/ D, Kat.-Nr.: 04268156). Während der Leberperfusion fließen die Lösungen über die Venenverweilkanüle via V. portam in die Leber.

Die In-Situ-Leberperfusion

Zunächst wird das ganze Schlauchsystem mit 300 ml Aqua dest. gespült. Während dieses Vorgangs wird die Flussrate auf 30 ml/ min. kalibriert. Die Perfusionslösungen werden 30 Minuten vor dem Beginn der Operation in das Wasserbad gestellt und so auf 37°C erwärmt. Das Tier wird mit Ether (Chinosol, Seelze/ D, Kat.-Nr.: 1122-0) narkotisiert und gewogen. Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe beginnt die OP mit dem Rasieren und Desinfizieren (Cutasept F, Bode/D, Kat.-Nr.: 207170) des Bauches. Der Bauchraum wird durch einen V-förmigen Schnitt eröffnet. Dann werden die Darmschlingen zur besseren Darstellung der V. cava inferior und des Leberhilus aus dem Bauchraum luxiert. Mit einer spitzen, gebogenen Pinzette (Dumont forzep large radius, curved shanks, FST, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.: 11271-30) wird nun ein Zugang zwischen der V. lienalis und V. mesenterica inferior sowie ein weiterer zwischen V.portae und A. hepatica geschaffen. Über diese Öffnungen wird ein 3-0 Seidenfaden (Resorba, Nürnberg/D, Kat.-Nr.: G2105) geführt um die V. pylorica zu ligieren. Anschließend werden dem Tier über die V. cava inferior 500 i.E. Heparin-Natrium (Roche, D, Kat.-Nr.: N25000) injiziert. Als nächstes eröffnet man mit einer spitzen, gebogenen Pinzette die Bursa omentalis durch das Omentum minus. Jetzt wird eine Bulldogklemme (Teufel, Liptingen/D, Kat.-Nr.: FB 331) so platziert, dass ihre Branchen gleichzeitig die V. portae, die A. hepatica und den Gallengang ganz proximal am Leberhilus ausklemmen. Nachdem die V. portae durch die Stauung stark angeschwollen ist, wird sie kaudal der V. lienalis mit dem 3-0 Seidenfaden ligiert, um sie dann mit einer Mikroschere (spring scissor, Curved Pan, FST, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.:15061-08) in Höhe der V. pylorica zu inzidieren. Unter Fluss führt man nun die 17 G Venenverweilkanüle ein. Zur Fixation der Kanüle muss der Fluss kurz unterbrochen werden, bis die Bulldogklemme über der Kanüle wieder geschlossen ist. Jetzt eröffnet man die infrahepatische V. cava inferior um einen Abfluss für das Blut und die Perfusionslösungen zu schaffen. Die Leber wird zuerst vier Min. mit Perfusionslösung eins, dann zwei Min. mit Perfusionslösung zwei und am Schluss 10-13 Min. mit der Kollagenaselösung perfundiert. Die Länge der Perfusion mit der Kollagenaselösung ist abhängig von der Lebergröße. Der optimale Zeitpunkt ist erreicht, wenn durch leichten Druck mit einem Wattestäbchen (Wattestäbchen, kleiner Kopf, Karl-BEESE, Barsbüttel/ D; Kat.-Nr.: 1260), auf die Leberkapsel, sich diese blasenwerfend vom Parenchym löst (s. Abbildung 3b). Nach der Perfusion wird die Leber freipräpariert, und in 20 ml Williams`

Medium E (Gibco BRL, Paisley/ GB, Kat.-Nr.: 22551-022) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickison Labware, Le Pont de Claix/ France, Kat.-Nr.: 352070) auf Eis überführt

Zellkulturlabor

Die so gewonnene verdaute Leber wird auf eine 100 mm*15 mm Petrischale (Becton Dickison, New York/USA, Kat.-Nr.: 4-1029/3) gegeben und auf Eis gelegt. Jetzt löst man die Zellen aus dem Digestat, indem man die Probe 5 Minuten lang sanft schüttelt, nachdem die Kapsel mit einer sterilen, stumpfen Pinzette (Graefe forcep, serrated, FST, Heidelberg/D, Kat.-Nr.: 11050-10) entfernt worden war. Die entstandene Zellsuspension wird anschließend durch ein Nylongewebe (Hydro-Bios, Kiel/ D, Kat.-Nr.: NY200 HC) mit 200 µm großen Maschen filtriert, um unverdaute Leberstücke sowie Kapselreste zu entfernen. Um die Anzahl und Vitalität der Hepatozyten zu ermitteln werden 100 µl der Zellsuspension mit 800 µl Williams` Medium E verdünnt und mit 100 µl 0,5%iger Trypan-Blau-Lösung (Merck, Darmstadt/D, Kat.-Nr.: 11732) in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Save-Lock 1,5 ml, Eppendorf- Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg/D, Kat.-Nr.: 0030120086) gemischt. Ein Tropfen dieser Lösung wird in der Neugebauer-Zählkammer (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 631F1110) unter dem Mikroskop ausgezählt. Für die weitere Verwendung der Zellen in Kultur muss bei der Isolation die Vitalität der Zellsuspension über 80% und die Gesamtzellzahl über 10^8 Zellen liegen. Ist dies gegeben, wird die Zellsuspension bei 4 °C und 50 G zwei Minuten lang zentrifugiert (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen/ D). Das Zellpellet wird dann so in Williams' Medium E resuspendiert, dass eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 10^7 Zellen/ ml entsteht. Um die zu verschiedenen Zeitpunkten so isolierten Proben im Nachhinein mittels einer DNA-Messung vergleichen zu können, werden aus der Zellsuspension vier mal 400 µl in Eppendorf-Röhrchen abgenommen und bei 4 °C und 50 G vier Minuten lang zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Sediment bei - 80 °C gelagert.

Matrixbesiedelung

Unter sterilen Kautelen unter der Sterilen-Hood (Werkbank Typ HS 18/2, Heraeus Instruments, Hanau/ D, Kat.-Nr.: 50047467) werden die Matrizes mit Hepatozytensuspension besiedelt. Um eine optimale Verteilung der Zellen in der Matrix zu erreichen, pipetiert man vier mal 100 µl der Suspension auf jeweils verschiedenen Stellen der Matrix (s. Abbildung 3c). Wie oben bereits erwähnt, werden dann die Polymere für die Gruppen ETx- und ETx+ direkt implantiert, wohingegen die Polymere für die Gruppen STx- und STx+ der Voranzüchtung über drei Tage im Flow-Bioreaktor zugeführt werden. Da eine direkte Bestimmung der Zellzahl, welche nach dem Besiedeln im Polymer verbleibt, technisch nicht möglich ist bestimmen wir ihren DNA-Gehalt und vergleichen ihn mit dem der eingesetzten Zelllösung. Aus dem Ergebnis kann man dann berechnen, wie viele Zellen nach der Besiedelung im Polymer verbleiben.

Zellkulturmedium

Die Hepatozyten werden in einem hormonstimulierten Medium (HMS) kultiviert.

500 ml	Williams` Medium E (Gibco, Scotland/ UK, Kat.-Nr.:22551-022)
5,5 ml	N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin (Biochrom K6, Berlin/ D, Kat.-Nr.: K0202)
11 ml	HEPES-Puffer (Biochrom K6, Berlin/ D, Kat.-Nr.: L1613)
5,5 ml	Natriumpyruvat (1 mM, Gibco, Scotland/ UK, Kat.-Nr.: 11360-039)
100 µl	Insulin (4 µg/ ml, aus Rinderpankreas, Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.:I-5500)
50 µl	Dexamethason (5 nM, Serva, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.: 18660)
100 µl	EGF (10 ng/ ml, human, Invitrogen, Paisley/ GB, Kat.-Nr.: 1127679)
5,5 ml	Pen Strep (Penicillin + Streptomycin, Biochrom, Berlin/ D, Kat.-Nr.: A2213)

Dieser Ansatz wird auf zwei Reservoirflaschen aufgeteilt.

Zellkultur

In der reinen Werkbank werden sterile Tücher ausgelegt und auf diesen werden die Kulturkammer, das Flowpathmodul (Zellmax, Cellco Inc, Gemantown/ USA, Kat.-Nr.: 5010006), die Silikonspirale und eine Einmalpinzette (Polystyrol, J. Söllner, Deggendorf/D) abgelegt. Danach werden fünf besiedelte Matrizes mit der Pinzette steril auf die Silikonspirale gesteckt (s. Abbildung 3d) und diese dann so in der Kulturkammer plaziert, dass die Matrizes orthograd zum Vektor des Mediumflusses stehen [71; 96]. Die Kulturkammer wird nun zusammengebaut an die Reservoirflasche und das Flowpathmodul angeschlossen (s. Abbildung 3a und 3e). Das Medium zirkuliert zwischen der Reservoirflasche und der Kulturkammer, angetrieben vom Pumpmodul (Zellmax, Cellco Inc, Gemantown/ USA), welches einen charakteristischen pulsatilen Fluss mit einer Fließgeschwindigkeit von 24 ml/ min erzeugt, wobei das System per diffusionem mit Sauerstoff versorgt wird. Dies ermöglicht ein ca. ein Meter langer aufgerollter dünner Silikonschlauch, welcher einen Teil des Flowpathmoduls bildet. Das ganze System steht in einem Brutschrank (Typ B5060 EC/ CO₂, Heraeus, Hanau/ D) in dem 37° C herrschen und die CO₂ Spannung der Raumluft auf 5% angehoben wird. Nach 3 Tagen ist die Kulturphase abgeschlossen und die Hepatozyten haben Spherioide gebildet. Die Matrizes werden, nachdem das Medium vorsichtig abgepumpt wurde, aus dem System entnommen und können nun implantiert werden. Aus jeder mit fünf Matrizes bestückten Silikonspirale wird eine Matrix per Zufall ausgesucht und unter dem Polarisationsmikroskop (Typ IX50, Olympus Optical Co., Hamburg/ D) die Anzahl der Spherioide und ihre Größe bestimmt. Es werden je Matrix acht Gesichtsfelder bei 25-facher Vergrößerung ausgezählt. In jedem Gesichtsfeld wird zusätzlich mit Hilfe eines Messokulares (Typ WH10X2-H, Olympus Optical Co., Hamburg/ D) der Durchmesser eines zufällig ausgewählten Spheroides bestimmt.

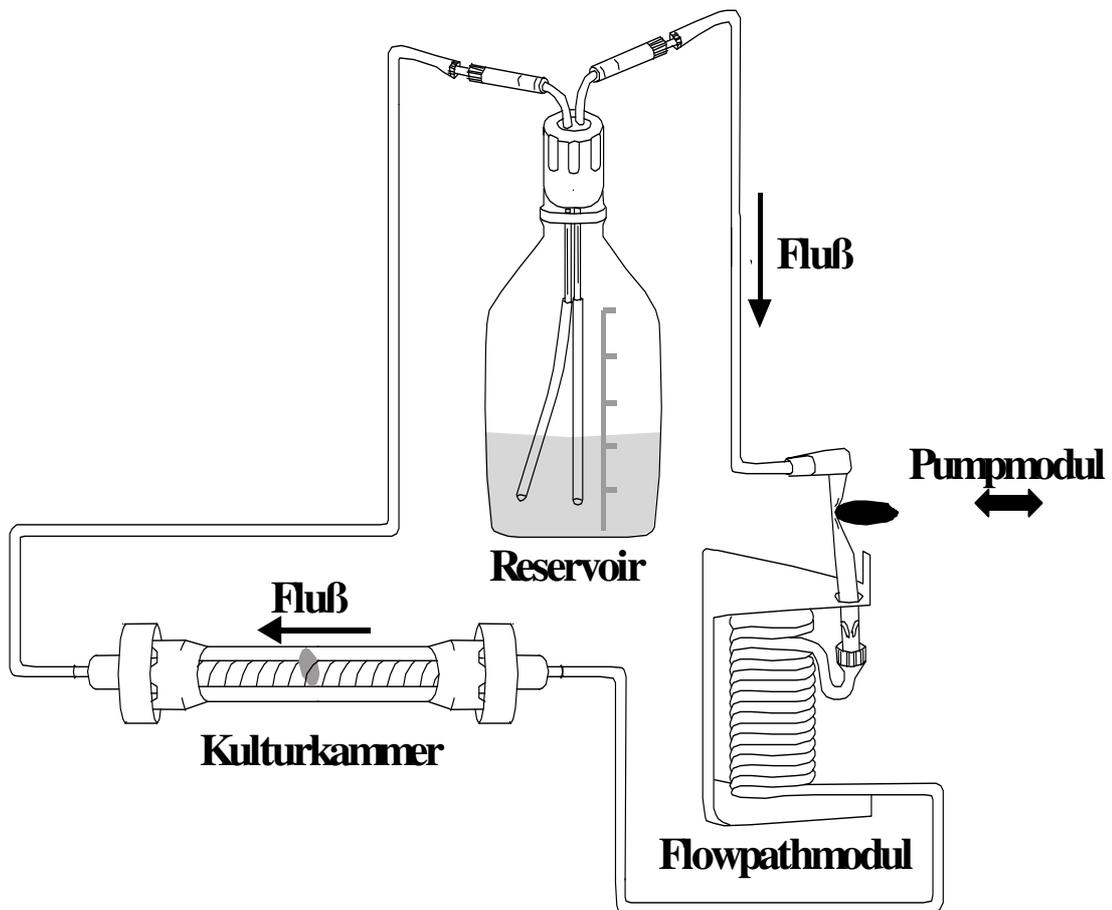


Abbildung 3a: Schemazeichnung eines Aufbaus des Flussbioreaktor-Systems. Innerhalb der zylindrischen Kulturkammer (Flow Modul) des Flussbioreaktors wurden die besiedelten Matrices mittels einer Silikonspirale orthogonal zum Flussvektor gehalten. Die Silikonschläuche, die die Kulturkammer mit dem Mediumreservoir und der Pumpe verbinden, ermöglichen den Gasaustausch. Das gesamte Bioreaktorsystem, einschließlich der Pumpe welche ein pulsatile Flussmuster produziert, befindet sich in einem Zellkulturbrutschrank. Text und Abbildung entnommen aus [70]

Die ausgezählte Matrix wird nach der Messung in ein 1 ml Nunc-Röhrchen (CryoTube, Nalge Nunc Int., Napperville/ USA, Kat.-Nr.: 366656) gegeben, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann für die spätere DNA Messung bei -80 °C gelagert.

Matriximplantation

In Ethernarkose wird die Ratte erst gewogen und dann am rasierten, desinfizierten Bauch eine mediane Laparatomie durchgeführt. Wie bereits von Uyama et al. beschrieben [101]

wird zuerst möglichst atraumatisch, mithilfe von Wattestäbchen die Flexura duodenojejunalis lokalisiert. Danach breitet man das erste Stück des Dünndarmes rosettenförmig aus. Die Matrix wird nun auf eine Hälfte des Mesenteriums gelegt und die andere wird so umgeschlagen, dass eine Tasche entsteht. Diese wird mit einer fortlaufenden 5-0 Naht (Mopylen, 0,75 m, DR 12, 5-0 USP, Resorba, Nürnberg/ D, Kat.-Nr.: 7079) fixiert (s. Abbildung 3f). Auf diese Weise von oral nach aboral vorgehend werden vier Matrices pro Tier implantiert. Am Ende wird durch eine fortlaufende Naht mit einem geflochtenen 3-0 Faden (PGA, 0,7m, HR 17n, 3-0 USP, Resorba, Nürnberg/ D, Kat.-Nr.: PA1026) die Bauchdecke zweischichtig verschlossen [35; 60; 39].

Portokavaler Shunt

Nach der Technik von Lee und Fischer [50] modifiziert nach Kennan et al. [37], wird der portokavale Shunt (PCS) angelegt. Die gesamte Operation wird unter dem Operationsmikroskop durchgeführt (Typ Z61, Olympus Optical Co., Hamburg/ D), welches eine Vergrößerung um den Faktor 2-6 ermöglicht. Zunächst wird die Ratte auch hierbei in Ethernarkose gewogen und das Operationsfeld rasiert. Der Zugang erfolgt über eine mediane Laparatomie. Danach werden die Darmschlingen aus dem Abdomen verlagert, und durch mit 0,9% NaCl (Braun, Melsungen/ D, Kat.-Nr.: 3820084) befeuchteten Kompressen (5*5 cm, Fuhrmann, Kat.-Nr.: 31104) vor dem Austrocknen geschützt. Jetzt kann man das Ligament zwischen dem kleinen unteren Leberlappen und der V. cava mit der Mikroschere durchtrennen und den Leberlappen nach kranial mobilisieren. Als nächstes wird die V. cava proximal der rechten V. renalis durch Entfernung des Peritoneums dargestellt und vorsichtig mit der stumpfen, gebogenen Pinzette (Typ Moria MC31, FST, Hamburg/ D, Kat.-Nr.: 11370-31) untertunnelt. Dann wird mit der gebogenen Mikro-Bulldogklemme (Link, Hamburg/ D, Kat.-Nr.: 10-1278/2), so lebernah wie möglich, eine ca. 3 mm lange schmale Falte aus der V. cava ausgeklemmt. Mit der Mikroschere wird jetzt eine ca. 2 mm lange Öffnung längs in die Falte geschnitten. Nun können die beiden Haltenähte mit 8-0 Polypropylen-Fäden (Mopylen, DR6, 8-0 USP, Resorba, Nürnberg/ D, Kat.-Nr.: 7073) an den beiden Polen der Öffnung mit der Stichrichtung von außen nach innen gelegt und mit Fadenklemmen gesichert werden. Anschließend wird die

V. portae von Bindegewebe befreit und so die V. pylorica und A. hepatica dargestellt. Die V. pylorica wird mit 5-0 Handseide (Resorba, Nürnberg/ D, Kat.-Nr.: REF 7029) proximal und distal ligiert und dann durchtrennt. Jetzt kann die V. portae von der A. hepatica vorsichtig gelöst werden und so proximal bis in den Leberhilus und distal bis zur V. lienalis dargestellt werden. Die V. portae wird nun proximal der V. lienalis mit einer Bulldogklemme ausgeklemmt und möglichst hilusnah mit 3-0 Handseide ligiert. Von jetzt an wird die Zeit gemessen, damit die Dauer der venösen Stauung des Darmes kürzer als 25 Minuten bleibt. Die V. portae wird möglichst hilusnah durchtrennt, das Pfortaderlumen mit einer kleinen Pinzette (100 mm, anatomisch, Waldemar Link, Hamburg/ D, Kat.-Nr.: 10-1200) vorsichtig dargestellt und mittels einer Kanüle (stumpfe Spitze, 0,4 mm, Carl Teufel, Liptingen/ D, Kat.-Nr.: 360040) mit 0,9% NaCl gespült. Anschließend sticht man die obere Haltenaht an der V. cava von innen nach außen in die laterale Seite der V. portae, und sichert sie dann mit einem Knoten. Die untere Haltenaht wird jetzt von innen nach außen in die mediale Seite der V. portae gestochen und mit einer Fadenklemme gesichert. Dadurch haben sich die beiden zu anastomosierenden Öffnungen bereits angenähert. Nun sticht man mit dem Faden der oberen Haltenaht in die V. cava am kranialen Anastomosenpol von außen nach innen und vernäht dann die Hinterwand der Anastomose mit fünf Stichen (Pfortader von innen nach außen, V. cava von außen nach innen). Jetzt sticht man mit dem Faden die Pfortader am unteren Pol der Anastomose von innen nach außen, unterkreuzt den unteren Haltefaden und kann nun die Vorderwand mit fünf bis sieben Stichen nähen (Pfortader von außen nach innen, V. cava von innen nach außen). Am oberen Anastomosenpol wird nun die obere Haltenaht unter Belassen einer 1 mm großen Schlaufe verknotet und danach die untere Haltenaht verknotet. Jetzt werden die Bulldogklemmen geöffnet und eventuell auftretende kleinere Blutungen durch leichte Kompression mit einem kleinen Tupfer gestillt (s. Abbildung 3g). Dann wird der untere Leberlappen auf die V. cava und die Darmschlingen wieder ins Abdomen zurückverlagert. Zum Schluss wird die Bauchdecke in zwei Schichten mit einem 3-0 PGA-Faden verschlossen [35; 60; 39].

Matrixexplantation

Auch hier wird in Ethernarkose am rasierten, desinfizierten Bauch der Ratte eine mediane Laparatomie durchgeführt. Anschließend wird der Darm vom Mesenterium getrennt und die Matrizes mit dem umgebenden Mesenterium entnommen. Die am weitesten oral liegende Matrix wird sofort in ein 1 ml NUNC-Röhrchen gegeben und für die spätere molekularbiologische Analyse in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die nächste Matrix wird 24 Stunden in Bouin'scher Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und dann histologisch untersucht. Die restlichen beiden Matrizes gibt man in, mit Tissue-Tek (Sakura, Zoeterwoude/ Netherlands, Kat.-Nr.: 4583) gefüllte, Peel-away Behälter (Embedding molds S22, Polysciences, Warrington/ USA, Kat.-Nr.: 18646A) und friert sie mit flüssigem Stickstoff ein. Die so eingebetteten Matrizes werden für die qualitative und quantitative Analyse durch die Immunhistochemie benutzt. Die Tiere verstarben durch Überdosierung des Narkosemittels.

Die Bouin'sche Fixierlösung besteht aus

16,2 g	Pikrinsäure (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: 239801)
1350 ml	Ethanol absolut
450 ml	37 %iges Formalin (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: 25254-9) und
90 ml	Essig 100 % (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 100063.1000).

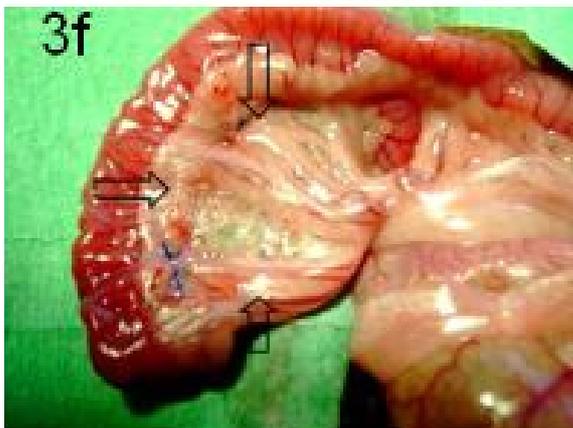
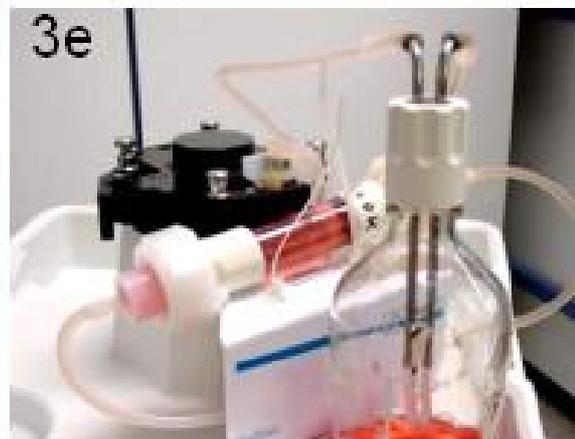
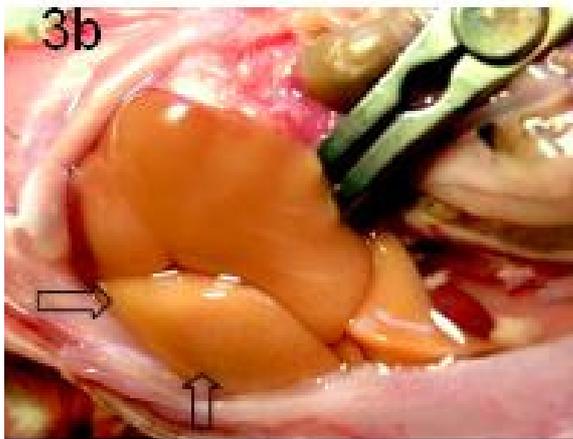


Abbildung 3b: Operationssitus während der Zellisolation. Man erkennt wie im rechten unteren Leberlappen die Wirkung der Kollagenase zu einer deutlichen Schwellung der Leber und Veränderungen im Parenchym geführt hat (s. Pfeile). **Abbildung 3c:** Besiedlung der Matrizes mit je 400 μ l Zellsuspension. **Abbildung 3d:** Die besiedelten Matrizes sind auf eine Silikonspirale, welche als Halterung fungiert, gesteckt worden. **Abbildung 3e:** Zusammengebauter Flussbioreaktor mit 5 Matrizes in der Kulturkanne. **Abbildung 3f:** Operationssitus bei der Matriximplantation. Man erkennt, wie eine Matrix in eine aus dem Jejunum gebildete Dünndarmtasche implantiert wurde (s. Pfeile). **Abbildung 3g:** Operationssitus nach erfolgreich durchgeführter PCS-Operation. Pfeil zeigt die Anastomose von V. portae und V. cava.

Quantitative DNA-Analyse

Für die Quantifizierung der DNA bedienen wir uns der DyNA-Quant-Methode [45]. Hierbei wird die DNA zuerst mit Bisbenzimid (Hoechst 33258), einem fluoreszierendem Stoff, markiert und dann photometrisch mit dem DyNA Quant 200 Fluorometer (Hofer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA) gemessen. Das Meßinstrument emittiert Licht der Wellenlänge von 365 nm \pm 7 nm und misst bei 460 nm \pm 15 nm. Damit gelingt es selbst geringe DNA-Mengen bei hoher Kontamination durch Proteine und RNA zuverlässig zu messen. Für die DNA-Messung benötigen wir folgende Lösungen:

Proteinase K Puffer:

6,055 g Tris- HCl (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: T-3253),
0,372 g EDTA (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: ED2SS) und
11,688 g NaCl (J.T. Backer, Deventer/ Holland, Kat.-Nr.: 0278)
auf 1000 ml aufgefüllt mit HCl eingestellt auf pH 7,5.

10 x TNE Puffer:

12,11 g Tris-HCl,
3,72 g EDTA
116,89 g NaCl werden in 800 ml steriles destilliertes Wasser gelöst,
mit HCl auf pH 7,4 einstellt und auf 1000 ml gebracht.

Proteinase K Lösung: (0,5mg / ml)

0,5 mg Proteinase K (Gibco BRL, Scotland/ UK, Kat.-Nr.: 25530-049) und
0,1 mg SDS (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: I-5750)
werden in 1 ml Proteinase K Puffer gelöst.

Assay- Lösung (für DNA- Konzentrationen zwischen 20- 500 ng/ ml):

1 μ l der 10 mg/ ml H33258 Lösung (Molekular Probes, Eugene/USA, Kat.-Nr.: H-3569) und 10 ml 10 x TNE- Puffer werden in 90 ml sterilem Aqua dest. gelöst.

Kälberthymus DNA- Standard (100 µg/ 1 ml):

100 µl Kälberthymus DNA- Standard (1 mg/ ml) (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: D-0805) und 100 µl des 10 x TNE- Puffer werden in 800 µl sterilem Aqua dest. gelöst.

Am Vortag der Messung werden die Matrizes über Nacht in der Lyophylle getrocknet (Lyovac GT2, Leybold- Heraeus). Danach gibt man zu jeder Probe 1 ml der Proteinase K Lösung und verdaut sie 10 Stunden bei 55-65°C in einem Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel /D, Typ 1083). Während dieser Zeit werden die Proben dreimal gut im Vortex gemischt. (Certomat MV, Braun Biotech Int., Melsungen/ D, Kat.-Nr.: 886202/8). Nun kann man das DyNA Quant 200 Fluorometer mit einer Eichlösung, die 200 ng DNA pro ml enthält, kalibrieren. Dazu werden 2 ml der Assay Lösung und 4 µl des DNA Standards in die Messküvette gegeben und vermessen. Die Quantifizierung von Proben mit unbekanntem DNA Gehalt laufen nach dem folgendem Schema ab: Zuerst füllt man 2 ml der Assay Lösung in die Messküvette und führt damit den Nullabgleich durch. Dann gibt man 10 µl der zu bestimmenden Probe hinzu, mischt gut, startet die Messung und erhält den Messwert in ng DNA/ ml. Der lineare Messbereich liegt laut Hersteller bei diesem Verfahren zwischen 10-500 ng/ ml. Ergibt das Messergebnis einen DNA-Gehalt, der außerhalb des linearen Messbereich liegt, muss die Probenmenge dementsprechend angepasst werden. Nach jeder der Messungen wird die Messküvette zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Die Probe wird dreimal gemessen und daraus der Mittelwert berechnet.

Histologie

Die in Bouin`scher Lösung fixierten Proben werden in Histologie-Kassetten (Tissue-Tek Mega Kassetten, Sakura Finetechnical Co, Tokyo/ Japan, Kat.-Nr.: 4173) gegeben und mithilfe des Autotechnikons (Technicon company, Chauncey/ USA, Model 2A) über Nacht entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Blöcke werden nun auf dem Mikrotom (Typ 335 E, Mikrom, Walldorf/ D, Kat.-Nr.: 502; Mikrotomklingen Feather, Typ N35H, Japan) in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Superfrost Objektträger (Mentzel-Gläser, D, Kat.-Nr.:

041300) gezogen. Nach dem Trocknen über Nacht im Brutschrank (Memmert, D) bei 60 °C werden die Schnitte in Histologiekästen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Hämalaun-Eosin-Färbung

Zum Entparaffinieren werden die Schnitte zwei mal fünf Minuten in Xylol (SDS, Valdonne/ FRANCE, Kat.-Nr.: 0750021) gestellt und dann über eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol abs., Apotheke UKE, Hamburg/D, Kat.-Nr.: 94119100) rehydriert. Anschließend werden sie fünf Minuten in Mayer`s Hämatoxylin (Sigma, St. Louis/ USA, Kat.-Nr.: MHS-32) gefärbt. Zum Bläuen werden die Präparate zehn Minuten unter fließendes Leitungswasser gehalten und die Färbung mit einer zweiminütigen Inkubation in 1%iger, wässriger Eosinlösung (Merk, Darmstadt/D, Kat.-Nr.: 1.159335) abgeschlossen. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte mit Entelan (Merck, Darmstadt/D, Kat.-Nr.: 1.07961.0100) und Deckgläschen (24*46 mm, Marienfeld/ D, Kat.-Nr.: 8500) eingedeckelt.

PAS-Färbung nach McManus 1948

Die wie oben beschrieben fixierten und rehydrierten Schnitte werden zehn Minuten in einer 0,8%igen Perjodsäurelösung (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 524.0100) inkubiert und danach mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend werden sie drei Stunden in eine 5%ige Dimedon- (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 1.06013.0025) Alkohohl-Lösung bei 60 °C gegeben, wodurch alle nichtglykogenasoziierten Dialdehyde geblockt werden (nach Bullmer 1959). Die Präparate werden danach in destilliertem Wasser gewaschen und 30 Minuten in Schiff`schem Reagens (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 1.09033.0500), im Dunkeln, inkubiert. Nun gibt man sie drei mal zwei Minuten in Sulfitwasser. Das Sulfitwasser besteht aus 1 g Natriumdisulfit (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 6528) gelöst in 210 ml Leitungswasser und 10 ml 1N Salzsäure. Anschließend wässert man die Schnitte kurz und führt die Kernfärbung mit Hämatoxylin wie oben beschrieben durch. Es folgt eine aufsteigende Alkoholreihe und das Eindeckeln mit Entelan.

Immunhistochemie

Für alle kommenden Färbungen werden die Schnitte wie folgt angefertigt und vorbehandelt:

mit dem Kryotom (Microm, Walldorf/ D, Typ HM505E) werden 5 µm dicke Schnitte von den in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude/ NE, Kat.-Nr.:4583) eingebetteten, Blöcken angefertigt, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

ABC -Methode [30]

Die Schnitte werden zuerst 45 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend fünf Minuten in -20°C kaltem Aceton (Biesterfeld, Hamburg/ D Kat.-Nr.: 67-64-1) fixiert und in PBS Puffer (Sigma, Steinheim/ USA, Kat.-Nr.: P-3813) rehydriert. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren wird das endogene Biotin durch ein Biotin-Blocking-System (Dako, Carpintera/ CA, Kat.-Nr.: X0590) maskiert. Dazu gibt man zunächst die Averdinslösung auf die Schnitte und inkubiert sie zehn Minuten. Überschüssige Lösung entfernt man durch Spülen mit PBS. Als nächstes wird die Biotinlösung auf die Schnitte pipettiert und wiederum zehn Minuten inkubiert. Nach fünfminütigem Spülen der Schnitte mit PBS folgt ein 30 Minuten langer Primärblock mit 1,5%igem Pferdenormalserum (Vektor Lab, Burlingame/ CA, Kat.-Nr.: S-1000) in PBS. Danach werden die Schnitte drei mal zwei Minuten mit PBS gewaschen (im Folgenden wird dieser Schritt nur noch „waschen“ genannt). Die Präparate werden jetzt mit jeweils 200 µl Primärantikörperlösung überschichtet und damit 45 Minuten lang in der feuchten Kammer inkubiert. Die verschiedenen Primärantikörper werden in 1%igem Pferdenormalserum in PBS wie folgt verdünnt:

Cytokeratin 7 (Mouse anti CK 7, Klon: MAB 3226, Monoklonal, IgG1, Chemikon Int., Temekula/ CA., Kat.-Nr.: MAB3226) **Verdünnung 1/ 500.**

Cytokeratin 19 (Mouse anti CK 4.62, Klon: K 4.62, Monoklonal, IgG1, Sigma, Saint Louis/ USA, Kat.-Nr.: C7159) **Verdünnung1/ 300)**

Cytokeratin 18 (Mouse anti CK 18, Klon: RGE 53, Monoklonal, IgG1, Progen, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.: 10500) **Verdünnung 1/ 50.**

HepPar1 (Mouse anti human, Klon: OCH1E5, Dako, Carpintera/ CA, Kat.-Nr.: M7158) **Verdünnung 1/ 50.**

Vimentin (Mouse anti Vimentin, Sigma, Saint Louis/ USA, Kat.-Nr.: V6630) **Verdünnung 1/ 50**

Nach dem Waschen werden die Schnitte mit jeweils 200 µl des 1/ 200 verdünnten Sekundärantikörpers (Biotinylated horse anti-mouse IgG (H+L), Affinity purified, rat absorbed, Vektor, Burlingame/ CA, Kat.-Nr.: BA-2001) bedeckt und 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen dann 30 Minuten mit dem 1/ 200 in PBS verdünnten averdinmarkierten Enzymkomplex (ABC-AP Reagent, Vektor, Burlingame/ CA, Kat.-Nr.: AK-5002) inkubiert. Vor der dreißigminütigen Inkubation mit dem Substrat der alkalischen Phosphatase (AP Substrat Kit 1, Vektor, Burlingame/ CA, Kat.-Nr.: SK-5100) müssen die Präparate wieder gewaschen werden. Das Substrat wurde nach Anweisung des Herstellers hergestellt, wobei zu je 5 ml Substrat zwei Tropfen Levamisolelösung (Vektor, Burlingame/ CA, Kat.-Nr.: SK-5900) hinzugefügt werden, um die im Gewebe vorhandene, endogene, alkalische Phosphatase zu blocken. Nach dem Waschen können die Präparate drei Minuten in Mayer`s Hämatoxilin gegengefärbt, zehn Minuten unter fließendem Wasser gebläut und in Aquatex (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 1.08562.) eingedeckelt werden.

Doppelfärbung 1(PCNA/ Cytokeratin 18)

Für diese Färbung werden Paraffinschnitte verwendet und wie unter HE Färbung (Seite 29) beschrieben entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in PBS gebracht. Nun werden die Schnitte mit 200 ml Target retrieval Lösung (DAKO, Carpintera/ CA, Kat.-Nr.: S2367) bedeckt und 25 Minuten bei höchster Stufe in der Mikrowelle gekocht (Flüssigkeitsverlust wird mit Aqua dest. ausgeglichen). Als nächstes wird die endogene Peroxidase durch eine dreißigminütige Inkubation mit 0,3%igen Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 107210.0250) in Metanol (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.:

53401-3) geblockt. Dann folgt wie oben beschrieben die Cytokeratin 18 Färbung mit der ABC-Methode. Die PCNA Markierung wird nach Herstellerangaben (PCNA-Kit, Zymed, South Sa. Francisco/ CA, Kat.-Nr.: 93-1143) durchgeführt. Man beginnt mit einem Biotinblock (siehe ABC Färbung) dann folgt eine dreißigminütige Inkubation des Primärblockes mit nachfolgender zehnminütiger Inkubation mit dem biotinierten Primärantikörper gegen PCNA. Dann wird stringent mit PBS gewaschen (zwei mal fünf Minuten auf dem Schüttler) und die Schnitte 30 Minuten mit dem averdinierten Enzymgemisch inkubiert um sie anschließend nochmals zu waschen. Zum Schluss wird das DAB-Substrat nach Herstellerangaben zusammengemischt, für fünf Minuten auf die Schnitte gegeben, die ein letztes Mal mit PBS gewaschen werden. Es folgt die Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxilin und das Eindeckeln mit Aquatex.

Immunfluoreszenz

Die Schnitte werden wie im Abschnitt „Immunhistochemie“ beschrieben vorbehandelt. Alle Inkubationen müssen strikt im Dunkeln durchgeführt werden.

Doppelfärbung 2 (Phalloidin mit Cytokeratin 18 oder HepPar1):

Als Puffer dient 0,1 %iges Triton X 100 (Sigma, Steinheim/ D, Kat.-Nr.: X100) in PBS. Der Puffer wird mit HCl auf einen p.H. Wert von 7,4 eingestellt. Als Primärblock und Antikörperverdünnungslösung dient eine Lösung aus 5%igem fötalem Kalbsserum (ICN Biomedicals, Assel/ Belgium, Kat.-Nr.: 2916149) in PBS. Die Schnitte werden zuerst 30 Min. bei Raumtemperatur aufgetaut, vier Minuten in Aceton fixiert und anschließend zwei mal vier Minuten in Puffer gewaschen. Als nächstes folgt, um unspezifische Hintergrundfärbung zu verringern, der Primärblock. Er besteht aus einer zehnminütigen Inkubation der Schnitte mit der Blocklösung. Anschließend wird die Blocklösung vorsichtig von den Objektträgern geklopft und der Primärantikörper aufgetragen. Man gibt 200 µl des 1/ 50 in Antikörperverdünnungslösung verdünnten Cytokeratin 18 Antikörper auf jeden Schnitt. Nach einstündiger Inkubation in einer feuchten Kammer werden die Schnitte zweimal vier Minuten in Puffer gewaschen. Nun werden die Schnitte dreißig Minuten mit einer Lösung aus 2%igem Phalloidin-TRIC (Molecular Probe, Oregon/ USA, Kat.-Nr.: T-

7471) und 0,25%igem Sekundärantikörper (Goat anti mouse Fab FITC Barligon, CA, Kat.-Nr.: M35001) in Antikörperverdünnungslösung überschichtet. Anschließend wird zweimal vier Minuten mit Puffer gewaschen. Jetzt folgt die Kernfärbung mit Hoechst 33258 (Moleculare Probe, Oregon/ USA, Kat.-Nr.: H3569). Dazu werden die Schnitte eine Minute mit einer 1/ 2000 verdünnten Lösung aus Hoechst 33258 und der Antikörperverdünnungslösung inkubiert. Zum Schluss werden die Schnitte in destilliertem Wasser kurz gewaschen und mit Fluoreszent Mounting Medium (Dako, Glostrup/ DEN, Kat.-Nr.: S3023) eingedeckelt.

Auswertung

Computergestützte Bildanalyse [35; 57; 39]

Mithilfe einer auf einem Mikroskop aufgesetzten Kamera (Lucia M, Version 2.04, Nikon, Düsseldorf, Copyright 1991-1993) und dem Computerprogramm (Lucia M, Version 2.04, Copyright 1991-1993) werden die orthograd angefertigten und Cytokeratin 18 markierten Schnitte digitalisiert. Die Schnitte werden unter einer Gesamtvergrößerung von Faktor 10 betrachtet (4X Objektiv + 2,5X optischer Apparat = 10X). Das Computerprogramm wurde mithilfe des Eichobjektives (Objektiv Mikrometer 0,01 mm, Olympus, Japan) geeicht. Um die einzelnen Proben auszuwerten haben wir jeweils drei Schnitte aus dem Zentrum der Matrix mit einem Abstand von jeweils 400 µm angefertigt. Aus der Literatur entnehmen wir, dass diese Stichprobe repräsentativ für die Situation in der ganzen Matrix ist (1,6). Durch computergestützte Bildanalyse der digitalisierten und Cytokeratin-18- markierten Schnitte kann die Gesamtfläche der Hepatozyten und die Gesamtfläche der Matrix pro Schnitt bestimmt und miteinander ins Verhältnis gesetzt werden. Dadurch erhalten wir die relative Leberzellichte jedes Schnittes. Zusätzlich werden noch von jedem Schnitt die Anzahl der Hepatozytenareale und ihre durchschnittliche Größe durch das Computerprogramm bestimmt.

Berechnung der Gesamtzellmenge

Um die Gesamtzahl der Hepatozyten, die sich innerhalb einer Matrix befinden bestimmen zu können, haben wir ein mathematisches Verfahren angewendet. Das Prinzip ist, dass man aus den Daten der computergestützten Bildanalyse den von den Zellen eingenommenen Raum innerhalb der Matrix als Volumeneinheit berechnen kann. Teilt man diesen Wert durch das durchschnittliche Volumen eines Hepatozyten erhält man die Anzahl der in der Matrix befindlichen Hepatozyten. Für unsere Versuche haben wir Ratten mit einem Alter von 8-12 Wochen verwendet. Aus der Literatur entnehmen wir, dass das Volumen eines Hepatozyten einer 2 Monate alten Ratte $11279 \pm 848 \mu\text{m}^3$ beträgt. Da es in den nächsten Monaten zu keiner signifikanten Größenzunahme kommt und die Hepatozyten einer 6 Monaten alten Ratte $11494 \pm 1241 \mu\text{m}^3$ gross sind [14] sind wir für unsere Berechnung der Zellzahl zu allen Explantationszeitpunkten von einem Volumen von $11500 \mu\text{m}^3$ ausgegangen. Die Gesamtzahl der Hepatozyten berechnet sich nach den Formeln:

$$\text{Vol}_{\text{matrix}} = \text{PI} * 0,9 \text{ cm} * 0,9 \text{ cm} * 0,1 \text{ cm}$$

$$\text{Gesamtzahl der Hepatozyten} = \frac{(\text{Vol}_{\text{Matrix}}) * (\text{relative Leberzelldichte})}{\text{Vol. eines Hepatozyten}}$$

$$\text{Tx}_{\text{effek}} = \text{Gesamtzahl Hepatozyten} / \text{Zellzahl vor Tx}$$

Statistik

Die dabei bestimmten Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 10.0 ausgewertet. Nach ausführlicher Beratung vor und nach der Datenerhebung durch Herrn Prof. Dr. Berger (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie Universität Hamburg) wurden aufgrund der kleinen Versuchsgruppengrößen nichtparametrische Tests verwandt, um die Daten beschreiben und analysieren zu können. Als nichtparametrischer Test für den Mittelwertvergleich von k-unabhängigen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis H-Test gewählt und bei dort gegebener Signifikanz dann der U-Test nach Mann und Whitney als Mittelwertsvergleich für zwei unabhängige Proben durchgeführt. Zur

Varianzanalyse wurde die univariante Varianzanalyse (allgemeines lineares Modell) gewählt, wobei im Vorfeld der Kolmogorow-Smirnov-Test zur Bestimmung der Normalverteilung der Variablen und der Levene-Test zur Testung auf Varianzheterogenität vorgenommen wurde. Bei Feststellung von Varianzheterogenitäten im Levene-Test wird das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,01$ angehoben.

Ergebnis

Hepatozytenisolation

Zur Gewinnung der primären Hepatozyten wurden insgesamt 16 Isolationsprozeduren durchgeführt, wobei in 13 der gewonnenen Suspensionen mindestens 80% der Zellen vital waren und somit eine Transplantation durchgeführt werden konnte (Tabelle 1). Durchschnittlich wurden pro Isolation $4,3 \cdot 10^8 \pm 1,4 \cdot 10^8$ Zellen gewonnen wobei eine Vitalität von $84,6\% \pm 2,7\%$ erzielt werden konnte.

Tabelle 1 Hepatozytenisolationsergebnisse

Isolation	Vitalität in %	Zellzahl in 10^8
I-01	88	2,3
I-02	88	5,8
I-03	86	3,7
I-04	83	2,6
I-05	88	3,7
I-06	86	5,7
I-07	85	1,8
I-08	84	4,8
I-09	80	6,6
I-10	81	4,5
I-11	87	5,9
I-12	83	3,7
I-13	81	4,9
Mittelwert	84,6	4,3
Standartabweichung	2,7	1,4

Zellzusammensetzung

Die gewonnenen Zellsuspensionen bestehen zum größten Teil aus Hepatozyten, die anhand der charakteristischen Morphologie (eosinophiles Zytoplasma, großer runder Zellkern mit ein bis zwei Nukleoli) in der HE-Färbung gut zu identifizieren sind. Ein Anteil von etwa 1-3% der Zellen ist in dieser Färbung nicht eindeutig zuzuordnen und hat uns deshalb zu immunhistochemischen Untersuchungen der Leberzelllösungen geführt.

Eine Markierung mit Antikörpern gegen Zytokeratin 7 und 19 zeigte in allen Schnitten keine Färbereaktion (Abbildung 4) bei positiver Kontrollfärbung (Abbildung 5). Dies weist darauf hin, dass unsere Zellsuspension weder Gallengangsepithelzellen noch Zellen aus dem Heringschen System oder sich daraus ableitende CK-7- und CK-19-positive-Progenitorzellen enthalten. Eine Vimentinfärbung ermöglicht die Abgrenzung der Ito-, Kupfer und sinusidalen Endothelzellen von den Hepatozyten (Abbildung 6). Die Auszählung der so markierten Zellen innerhalb unserer Zellsuspension ergab, dass sie einen Anteil von ca. 2% ausmachen (Abbildung 7).

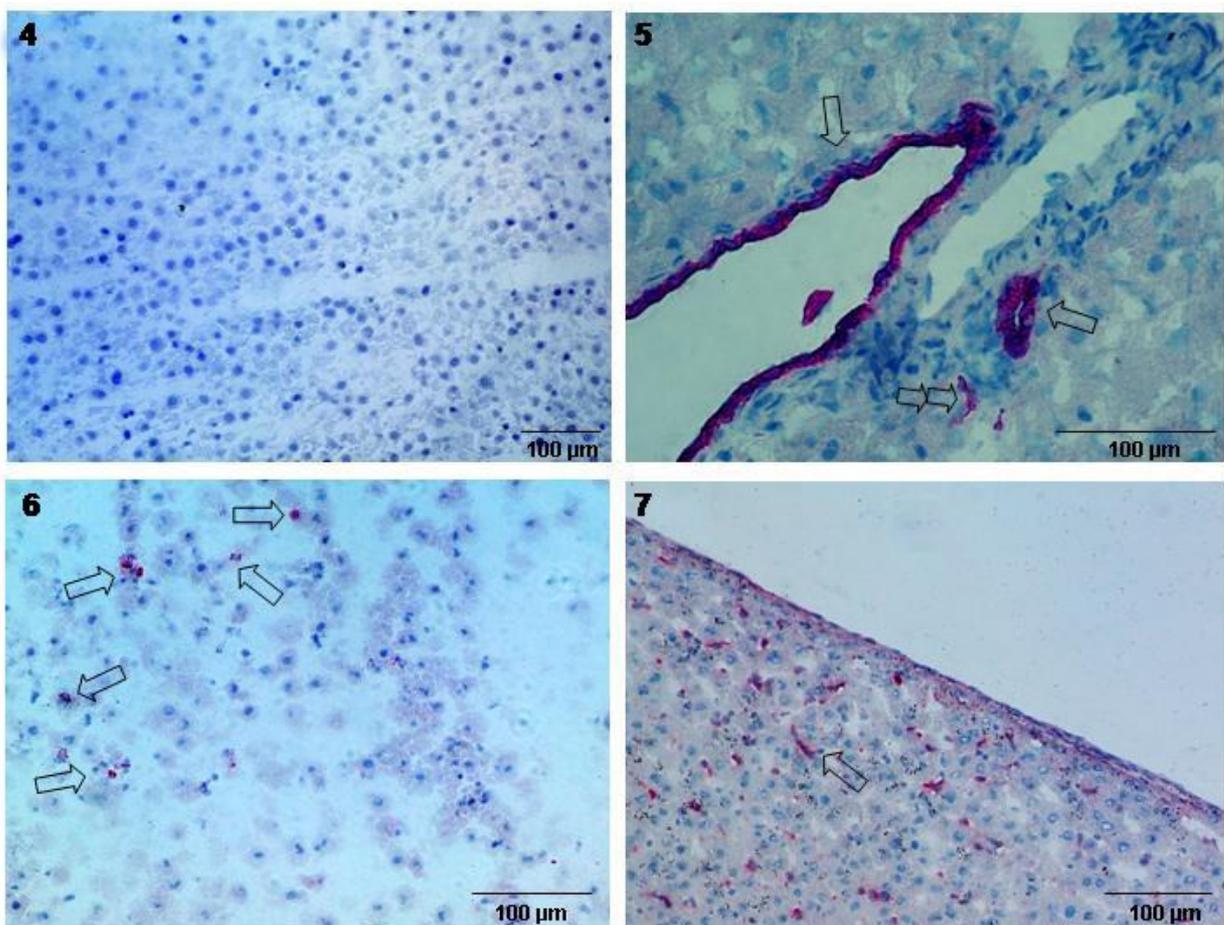


Abbildung 4 zeigt eine CK 19 markierte Zellsuspension. Die fehlende Färbereaktion weist auf die Abwesenheit von Gallengangsepithelien und Zellen aus dem Heringschen System hin. **Abbildung 5** ist die als Positivkontrolle gefärbte Rattenleber. Man erkennt, dass sich die Gallengangszellen (Pfeil) sowie Zellen aus dem Heringschen System (Doppelpfeil) anfärben bei negativen Hepatozyten. **Abbildung 6** stellt die Zellsuspension nach einer Vimentinfärbung dar. Hier sieht man eine kleine positive Zellfraktion (Pfeile) die dem nichtparenchymatösen Zellkreis der Leber (Kupferzellen, Sternzellen und sinusidale Endothelzellen) zuzuordnen ist. Auf **Abbildung 7** ist wiederum eine als Kontrolle gefärbte Rattenleber zu sehen. Der Pfeil zeigt als Beispiel auf eine angefärbte nichtparenchymatöse Zelle.

Matrixbesiedlung

Bestimmung der DNA-Eichkurve

Ein Problem, das sich bei der Bestimmung der Zellzahl auf der Matrix stellt, ist, dass diese dreidimensional besiedelt wurde und somit die Zellen nicht mehr zählbar sind. Deshalb wurde die DNA-Menge gemessen, und daraus Rückschlüsse auf die Zellzahl gezogen. Dazu erstellten wir zunächst eine Eichkurve mit Zellsuspensionen bekannter Zellzahlen. Wir erhielten die folgenden Ergebnisse (Tabelle 2).

Tabelle 2: DNA-Bestimmung von verschiedenen Zellsuspensionen

	Probe	Messung 1 (DNA in µg)	Messung 2 (DNA in µg)	Messung 3 (DNA in µg)	Mittelwert (DNA in µg)
2,5*10 ⁵ Zellen	1	8,2	7,9	8,9	8,3
	2	7,7	7,5	7,7	7,6
	3	7,9	7,3	7,2	7,5
	4	8	7,9	7,5	7,8
	5	6,8	7,6	7,6	7,3
	6	7,4	6,7	7,3	7,1
10*10 ⁵ Zellen	1	28	28,4	29,2	28,5
	2	26,6	26	27,4	26,7
	3	22,6	23,3	23,7	23,2
	4	22,9	24,3	24,6	23,9
	5	23,3	23,2	23,7	23,4
4*10 ⁶ Zellen	1	106,1	96,6	103,6	102,1
	2	73,4	72,6	76,6	74,2
	3	100,4	104	109	104,5
	4	89,6	90	95,2	91,6
	5	97,2	99,2	94,4	96,9
	6	86,6	89,8	89,2	88,5

Die Berechnung aus diesen Werten ergibt die Geradenformel:

$$\text{DNA (}\mu\text{g)} = 2,18 + 0,000023 * \text{Zellzahl}$$

Abbildung 8 Darstellung der Messwerte und Konstruktion der Eichkurve

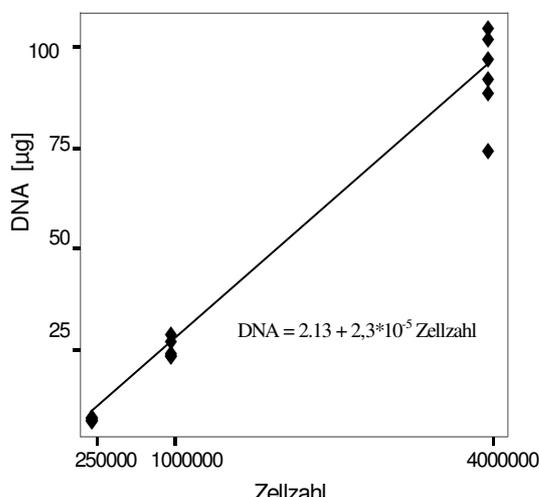


Abbildung 8 zeigt eine graphische Darstellung der DNA Messwerte aus Tabelle 2 mit der Konstruktion einer Eichgeraden, die dann in späteren Versuchen benutzt wird, um von gemessenen DNA-Mengen auf den Zellgehalt dieser Probe zu schließen.

Besiedlungseffizienz

Um die Besiedlungseffizienz zu bestimmen, haben wir die DNA-Menge sowohl von 400 µl Zellsuspension (Tabelle 2) als auch von Matrices nach Besiedelung mit dem selben Volumen Zelllösung, gemessen (Tabelle 3).

Dabei stellten wir fest, dass die Matrices durchschnittlich $27,70 \pm 4,33$ µg DNA enthalten, was $1,1 \cdot 10^6 \pm 9,5 \cdot 10^4$ Zellen entspricht. Vergleicht man diesen Wert mit dem der Zellsuspension (s. Tabelle 2) dann errechnet sich daraus einer Besiedlungseffizienz von $29,80 \pm 4,65$ %.

Tabelle 3: DNA-Messung von Zellsuspension und Matrices nach Besiedelung

	Probe	Messung 1 (DNA in µg)	Messung 2 (DNA in µg)	Messung 3 (DNA in µg)	Mittelwert (DNA in µg)
Matrix	1	19,6	20,9	20	20,2
	2	31,5	30,1	31,1	30,9
	3	32,4	32,2	33,5	32,7
	4	25	26,6	25,9	25,8
	5	24,3	28,4	28,2	27,0
	6	28,1	30,7	30,2	29,7

Flusskultur

Für diese Studie wurden insgesamt 195 Matrizes mit Hepatozyten besiedelt und in 39 Systemen in unserem Flussbioreaktor angezchtet. 160 Matrizes aus 32 Systemen sind für die Implantation verwendet worden. Sieben Systeme wurden verworfen, da es während der Zellkultur zu einem Pilzbefall gekommen war. Betrachtet man die Matrix nach der dreitägigen Flusskultur, so erkennt man, dass die Hepatozyten in den Poren der Matrix Spherioide (s. Pfeile Abbildung 9) gebildet haben. Spherioide sind kugelförmige Gebilde, in denen die Hepatozyten Zell-Zell-Verbindungen ausbilden. Ein Vorgang, der in der Flusskultur bereits nach einem Tag beginnt, wobei die Anzahl der nichtaggregierten Zellen immer mehr abnimmt. Nach drei Tagen in Kultur sind sie nur noch vereinzelt zu erkennen. Die meisten Hepatozyten sind dann in Spheroiden organisiert. Um die verschiedenen Anzüchtungen miteinander vergleichen zu können haben wir je eine Matrix pro System entnommen und die Anzahl der Spherioide pro Gesichtsfeld (Tabelle 4, Abbildung 10a), Durchmesser (Tabelle 5, Abbildung 10b) und DNA Gehalt bestimmt (Tabelle 6, Abbildung 10c).



Abbildung 9 zeigt einen typischen Ausschnitt einer unter dem Polarisationsmikroskop betrachteten und mit zwanzigfacher Vergrößerung fotografierten Matrix, welche mit Hepatozyten besiedelt und dann drei Tage in Kultur gehalten wurde. Die hier dargestellten Spherioide (s. Pfeile) haben einen Durchmesser von 150-180µm.

Die Auszählung in allen 32 Systemen ergab, dass sich durchschnittlich pro Gesichtsfeld $44,7 \pm 13,7$ Spheroide mit einem Durchmesser von $101,1 \mu\text{m} \pm 13,4 \mu\text{m}$ gebildet hatten. Die DNA-Menge als Parameter für den Zellgehalt der Matrix betrug durchschnittlich $7,3 \mu\text{g} \pm 3,4 \mu\text{g}$. Der Vergleich der verschiedenen Anzuchtungen zeigt also, dass der Durchmesser der Spheroide recht konstant ist, wohingegen DNA-Menge und somit auch die Zellzahl pro Matrix große Schwankung aufweist (Abbildung 10a-c).

Abbildung 10a Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld

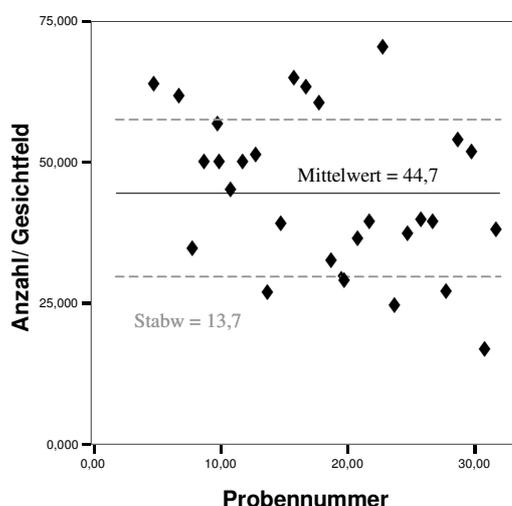


Abbildung 10b Durchmesser der Spheroide.

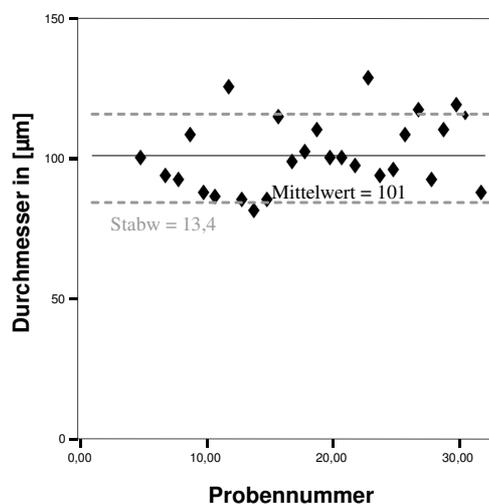


Abbildung 10c DNA- Gehalt pro Matrix

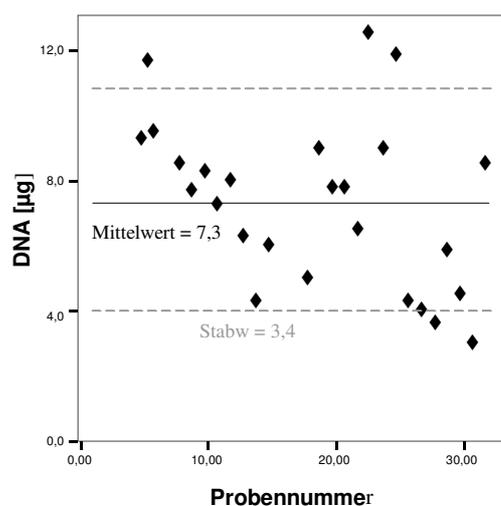


Abbildung 10 a-c zeigt die graphische Darstellung der Werte, welche erhoben wurden, um die verschiedenen für die Studie durchgeführten Kulturen miteinander zu vergleichen. Aus insgesamt 32 Systemen wurde je ein Polymer entnommen und dort die Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld (10 a), der Durchmesser (10 b) und der DNA Gehalt (10 c) bestimmt.

Bestimmung der Zellzahl in der Matrix nach der Flusskultur

Aus der gemessenen DNA-Menge der 32 Matrizes kann man mithilfe der Eichgeraden (s. Seite 34) auf die Anzahl der Zellen schließen. Da der durchschnittliche DNA-Gehalt $7,3 \mu\text{g}$ beträgt, errechnet sich daraus ein Zellgehalt pro Matrix von $2,38 \cdot 10^5 \pm 1,5 \cdot 10^5$ Zellen. Dies bedeutet, dass von den $1,1 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^5$ Zellen, mit denen die Matrix besiedelt wurde, nach der Zellkultur noch 26,3% in der Matrix nachweisbar waren.

Abbildung 11: Zellgehalt der Matrix nach dem Besiedeln und nach der Flusskultur

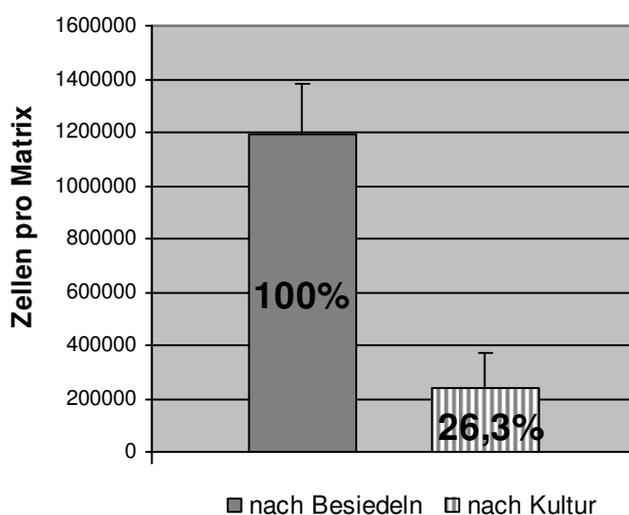


Abbildung 11 veranschaulicht die, über die Bestimmung der DNA-Menge, berechnete Zellzahl pro Matrix vor und nach dreitägiger Flusskultur. Es zeigt sich, dass nach drei Tagen noch 26,3% der Zellen in der Matrix nachweisbar sind.

Histologie der Spheroide

Nachdem wir die Zellzahl und auch die Effizienz der Besiedlung bestimmt hatten, blieb noch ein sehr wichtiger Aspekt offen, nämlich die genauere Charakterisierung der angezüchteten und implantierten Zellen. Diesen Gesichtspunkt bearbeiteten wir durch eine eingehende histologische Untersuchung der Zellen.

HE-Färbung: Die Hepatozyten innerhalb der Spheroide zeigen ein eosinophiles Zytoplasma und haben große runde Zellkerne (Abbildung 12a). Prominente Nukleoli deuten auf eine hohe Stoffwechselaktivität der Zellen hin; auch doppelkernige Zellen sind

zu sehen (Pfeil). Vereinzelt zeigen sich stark eosinophile Zellen mit pyknotischer oder aufgelöster Kern- und abgerundeter Zellform. Hierbei handelt es sich um Einzelzellnekrosen, welche besonders im Zentrum der Spheroiden zu finden sind (schwarzer Pfeil).

PAS-Färbung: Es zeigt sich eine kräftige Färbung der Hepatozyten mit einer homogenen Glykogenverteilung innerhalb des Spheroides (Abbildung 12 b). In der äußersten Schicht der Zellverbände zeigen sich abgeplattete, glykogennegative Zellen (siehe Pfeile) mit länglichen Kernen. Hierbei könnte es sich um nichtparenchymatöse Leberzellen handeln wie z.B. sinusidale Endothelzellen.

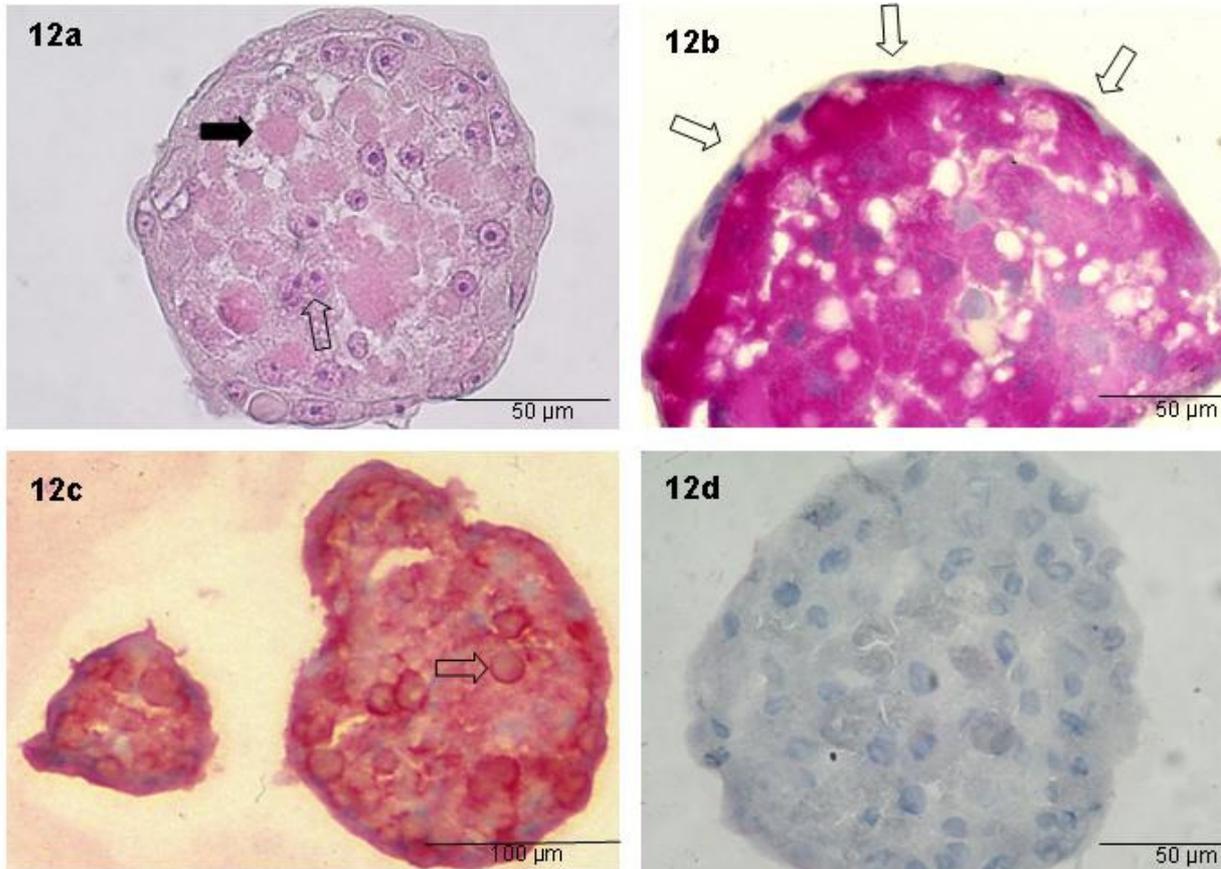
CK18-Färbung: Alle Zellen innerhalb des Spheroides zeigen eine positive Reaktion auf Antikörper gegen CK18, mit einem für Leberzellen typisches Färbemuster (Abbildung 12 c). Einzelzellnekrosen stellen sich deutlich durch ihre runde Zellform, ihr blasses Zytoplasma und die starke membranbetonte Färbung dar (Pfeil).

CK19- und CK7-Färbung: Hierbei fehlt eine Färbereaktion bei positiver Kontrolle; ein Hinweis für die Abwesenheit von Gallengangsepithelien und aus dem Heringschen System abgeleitete Progenitorzellen in den Spheroiden.

PCNA-Färbung: In den Spheroiden konnten wir keine positive Färbereaktion nachweisen, ein Umstand, der zeigt, dass es unter diesen Kulturbedingungen zu keiner messbaren Proliferation der Leberzellen gekommen ist. Die Bildung der Spheroiden in unserem Kultursystem ist somit durch eine Zellselbstaggregation und nicht durch Zellteilung bedingt.

Phalloidin-Färbung: Phalloidin färbt spezifisch Aktinfilamente, welche sich in Leberzellen um die Gallekanalikululi anordnen. Auf den Abbildungen 16 b und c ist ein phalloidinmarkierter Leberschnitt aus einer adulten Ratte gezeigt. Exemplarisch ist je ein quer- und ein längsgeschnittener Gallekanalikululus durch einen Pfeil gekennzeichnet. Nach 2 Tagen in Flusskultur erkennt man, dass sich strangförmige phalloidinpositive Strukturen gebildet haben, die die ersten Zeichen sich formierender Gallekanalikululi darstellen. (Pfeile

Abbildungen 13 b/c). Nach 4 Tagen in Flusskultur werden diese Strukturen prominenter (Pfeil Abbildung 14 b/c) und haben sich nach 6 Tagen zu Gallekanalikuli organisiert, welche in Form und Größe leberähnlich sind (Pfeil Abbildung 15 b/c).



Auf den **Abbildungen 12a-d**: sieht man Spheroides mit einem Durchmesser von 100 µm – 200 µm nach 6 Tagen in Flusskultur. **A**) zeigt eine HE Färbung, welche innerhalb des Spheroides sowohl vitale stoffwechselaktive Hepatozyten (weisser Pfeil, wie auch nekrotische Zellen (schwarzer Pfeil,) welche im Zentrum des Spheroides mit zunehmender Kulturdauer zu finden sind, aufweist. **B**) stellt eine PAS Färbung dar. Es ist innerhalb des Spheroides eine homogene Glykogenverteilung festzustellen. Glykogennegative Zellen am Rand (Pfeile) könnten nichtparenchymatöse Leberzellen sein. **C**) ist eine immunhistochemische CK18-Färbung zur Darstellung der Hepatozyten. Vereinzelt kann man Einzellzellnekrosen sehen (Pfeil) welche durch ihre runde Form und starke randbetonte Färbung auffallen. **D**) zeigt eine CK19- Färbung eines Spheroides (eine Färbereaktion fehlt).

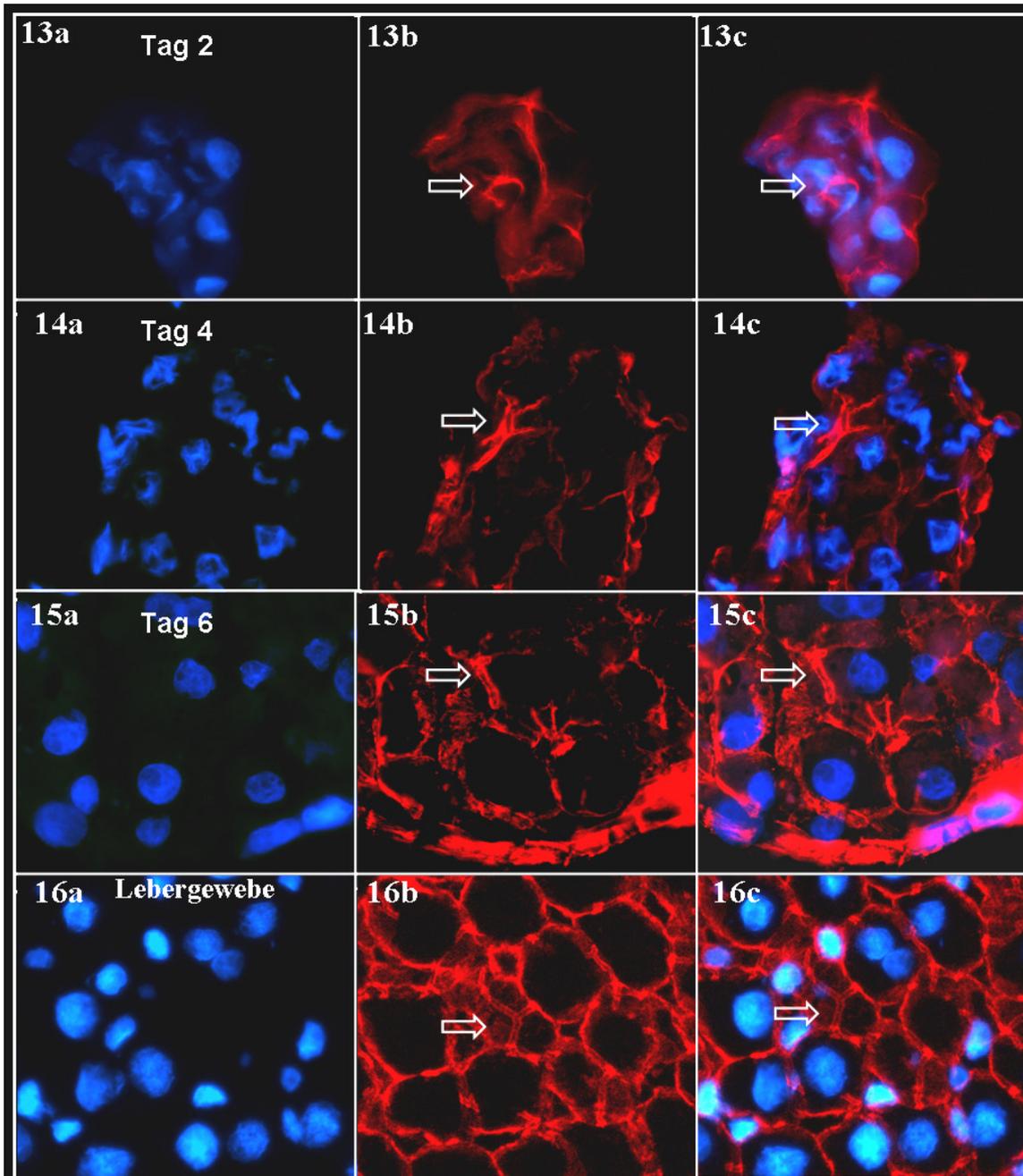


Abbildung 13-15 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung von Sphäroiden nach 2/ 4/ 6 Tagen in Flusskultur. **Abbildung 16** zeigt zum Vergleich normales Lebergewebe einer adulten Ratte. Alle Fotografien wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop unter einer 500-fachen Vergrößerung aufgenommen. **a)** Kernfärbung mit DAPI (blau), **b)** Aktinfärbung mit TRIC-Phalloidin (rot), **c)** per Computersoftware erzeugte Overlay aus den jeweiligen Abbildungen **a** und **b**. **Abbildung 13** zeigt ein ca. 50 μm durchmessendes Sphäroid nach 2 Tagen in Flusskultur. **Abbildung 14** zeigt ein ca. 80 μm durchmessendes Sphäroid nach 4 Tagen in Flusskultur. **Abbildung 15** zeigt einen Ausschnitt aus einem ca. 200-250 μm durchmessenden Sphäroid nach 6 Tagen in Flusskultur. Die Pfeile weisen auf Gallekanalikuli.

Ergebnisse der Operationen

Anlage eines porto-cavalen-shunts

Die anderthalb Stunden dauernde Operation verlief bei allen 32 Tieren reibungslos. Die Ausklemmzeit der V. portae betrug zwischen 17-21 Minuten. Alle Tiere überlebten die Operation und wurden zwei Wochen später der Matriximplantation unterzogen.

Implantation

Unter den 32 Tieren mit PCS-OP zeigen sich bei insgesamt 4 Tieren vereinzelte Verklebungen der Darmschlingen. Sie konnten alle problemlos operativ gelöst und die Implantation der Matrizes wie geplant durchgeführt werden. Insgesamt verliefen alle 72 halbstündigen Implantationsoperationen ohne große Komplikationen. Kleinere Blutungen, die durch Verletzungen von Mesenterialvenen entstanden waren, konnten durch Kompression mit einem Wattetupfer gestillt werden.

Explantation

In der Kontrollgruppe und in allen vier Versuchsgruppen konnten die Tiere nach 24 Wochen ihr OP-Gewicht von 180 g auf ca. 420 g verdoppeln. Von 68 operierten fiel bei 4 Tieren, die am selben Tag operiert worden waren, nach anfänglich unauffälligem Verlauf, nach einem Monat ein starker Gewichtsverlust auf. Wir entschlossen uns, bei diesen Tieren eine explorative Laparotomie durchzuführen, und fanden um die Matrizes Abszesse. Ursächlich war wohl eine unsteril gewordenen Charge Matrizes. Die Tiere wurden daraufhin sofort getötet.

Bei der Explantation zeigte sich in der Hälfte der Fälle starke Verwachsungen der Darmschlingen mit Bildung von Konglomeraten. Sie sind wahrscheinlich durch die Entzündungsreaktion verursacht, die die Matrix im Mesenterium auslöst. Makroskopisch konnte in keiner der Gruppen eine Kapselbildung, Abstoßungsreaktion oder Nekrosen festgestellt werden. Waren die Matrizes bei den ein und vier Wochengruppen noch relativ steif (siehe auch Abbildung 17) und unverändert in ihrer Form, zeigte sich bei den zwölf und 24 Wochengruppen eine merkliche Veränderung. Sie waren von deutlich weicherer Konsistenz und durch Faltungsprozesse in ihrer Form stark alteriert (Abbildung 18 a und

b). Abbildung 17 zeigt den Situs einer Ratte (mediane Laparatomie), der vier Wochen zuvor vier besiedelte Matrizes implantiert worden waren. Die weißen Pfeile kennzeichnen die in das Mesenterium eingewachsenen Matrizes. Man erkennt an der untersten Matrix noch deutlich den blauen Polypropylenfaden, mit dem diese am Mesenterium fixiert worden war.

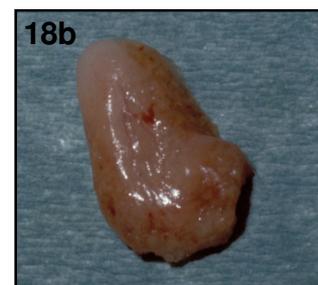
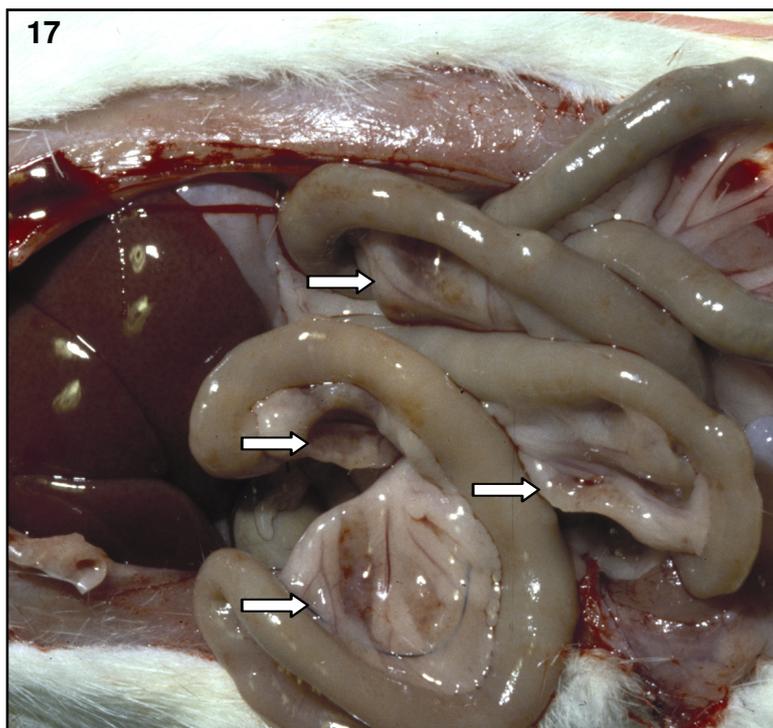


Abbildung 17: zeigt den Explantations situs einer Ratte der 4 Wochen zuvor 4 mit Hepatozyten besiedelte Matrizes implantiert worden waren. Die Pfeile kennzeichnen die in das Mesenterium eingewachsenen Matrizes. **Abbildung 18 a und b** zeigen jeweils eine Matrix welche nach 12 Wochen explantiert wurde. Man erkennt das neugebildete Gewebe welches in die Matrix eingewachsen ist.

Qualitative histologische Auswertung der Matrizes nach Explantation

Matrix

Da wir uns für eine Matrix mit einer Dicke von 1 mm entschieden haben und dazu eine Porengröße von 300-400 μm gewählt haben, ergibt sich, dass drei Lagen Poren übereinander zu liegen kommen. Durch den Herstellungsprozess ist die eine Seite der Matrix dicht verschlossen, was in der Abbildung 19 (Zur besseren Darstellung der Matrixstruktur wurde diese mithilfe einer Bildbearbeitungssoftware schwarz angefärbt) unten zu sehen ist. Auf dieser Seite kommt es nicht zu einem Einwachsen von Bindegewebe.

An der Oberseite der Matrix haben die Poren, deutlich sichtbar, eine offene Verbindung zur Umgebung, wodurch sie vom Gewebe stärker besiedelt werden als die Unterseite.

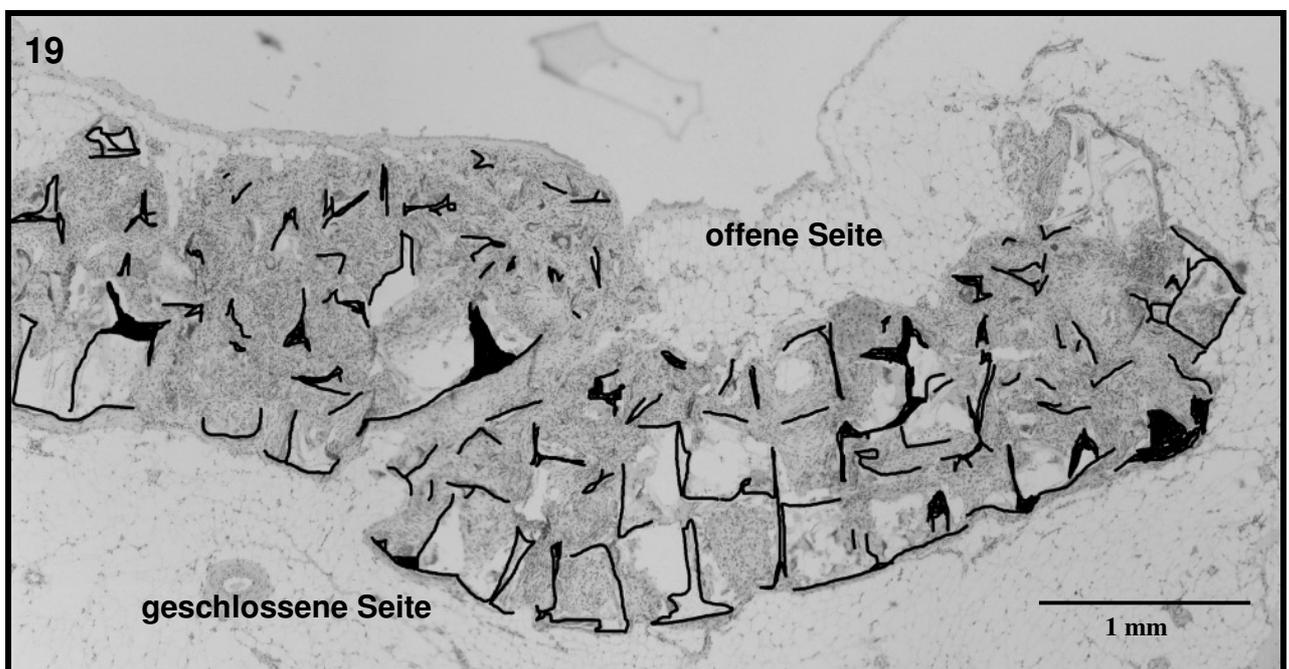


Abbildung 19: PAS gefärbter Paraffinschnitt, Gruppe STx+ nach zwölf Wochen in vivo. Aus acht Einzelbildern, mit 20 facher Vergrößerung aufgenommenen, wurde per Bildbearbeitungssoftware ein Panoramabild erzeugt. Zur besseren Darstellung der Matrixstruktur wurde diese schwarz angefärbt. Man kann auf dem Panoramabild gut die zwei unterschiedlichen Oberflächen der Matrix erkennen. Oben im Bild die offene und unten die verschlossene Matrixseite.

Hepatozytenverteilung in der Matrix

Abbildung 20 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt einer Matrix, welche mit Hepatozyten besiedelt wurde, und nach einer Woche explantiert wurde. Man sieht die quergeschnittene Matrix welche immunhistologisch mit "HepPar1" gefärbt wurde, um die Hepatozyten selektiv darstellen zu können. An der offenen Matrixoberseite kann man vitale Hepatozyten erkennen, welche eine bälkchenförmige Struktur gebildet haben und große Zellkerne besitzen (Abbildung 20 A). Auf der verschlossenen Matrixunterseite hingegen erkennt man nur Areale mit nekrotischen Hepatozyten (Abbildung 20 B), die eine runde Zellform und keine Kernfärbung mehr zeigen. Diese Zellverteilung ist typisch für alle vier Versuchsgruppen und erweist somit den Umstand, dass Hepatozyten nur Poren mit einer offenen Verbindung zur Umgebung besiedeln.

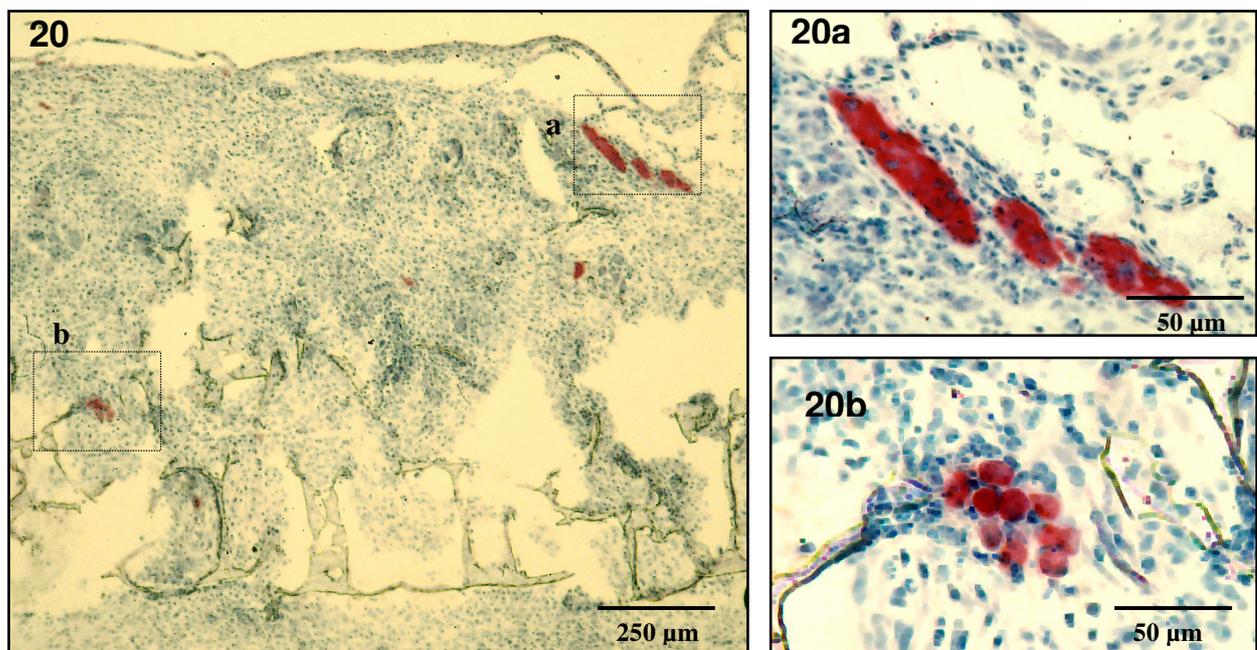


Abbildung 20: Immunhistochemisch mit HepPar1 gefärbter Paraffinschnitt, Gruppe STx- nach einer Woche *in vivo*. Man sieht links die Übersichtsaufnahme (Vergrößerung 20fach) einer quergeschnittenen Matrix. Zwei Ausschnitte (**a + b**) sind rechts zur Verdeutlichung weiter vergrößert dargestellt (Vergrößerung 100fach). Man erkennt die vitalen Hepatozyten (**Ausschnitt a**), welche an der offenen Matrixoberseite zu finden sind, wohingegen an der verschlossenen Matrixunterseite nur nekrotische Hepatozyten zu finden sind (**Ausschnitt b**).

Entzündungsreaktion

Im Vergleich der zu verschiedenen Zeitpunkten explantierten Proben miteinander imponiert die stärkste Entzündungsreaktion nach einer Woche (Abbildung 21). Hier findet man ein lymphozytenreiches Granulationsgewebe. In der vier Wochengruppe sind zum ersten Mal Riesenzellen, überwiegend vom Fremdkörpertyp (Pfeile), zu sehen, welche an den Matrixbälkchen sitzen und diese abbauen.

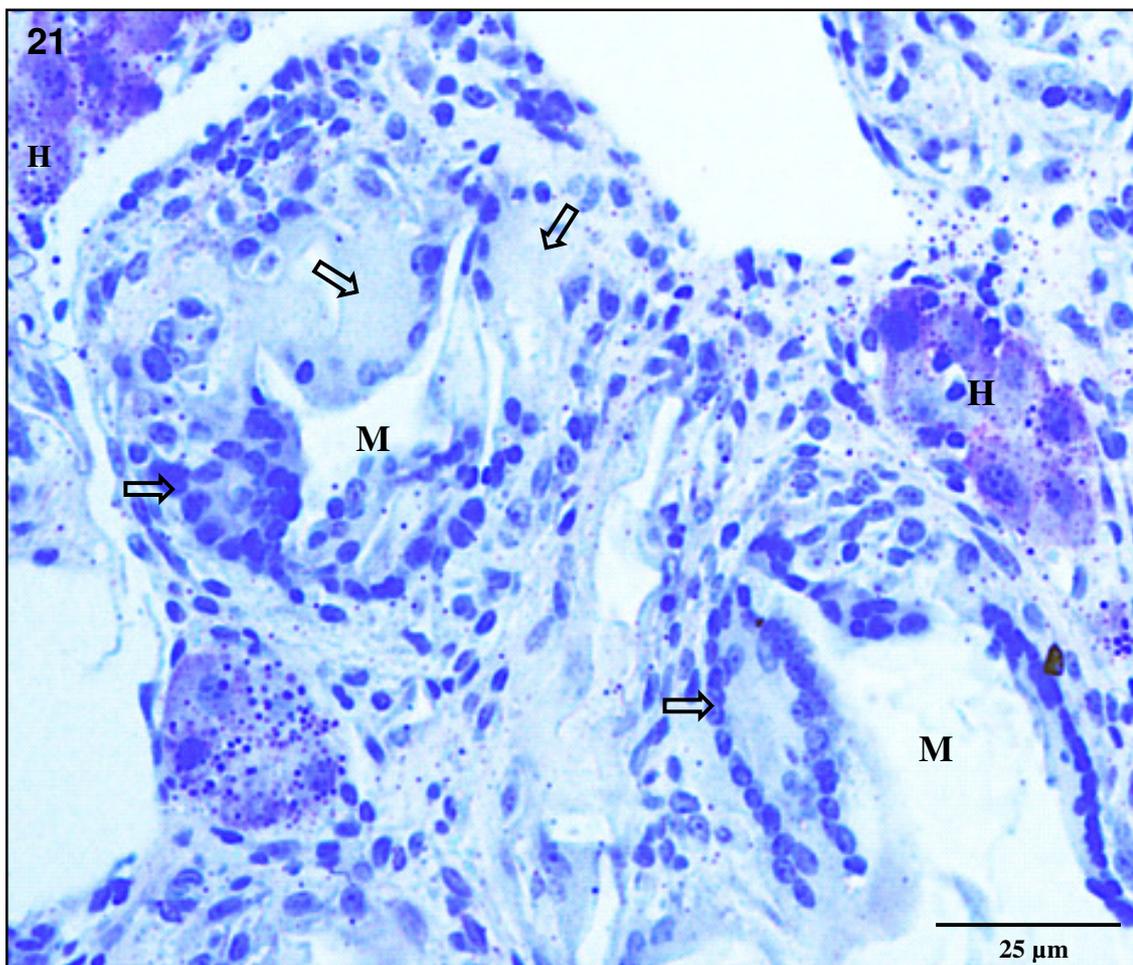


Abbildung 21: PAS gefärbter Paraffinschnitt, Gruppe ETx+ nach vier Wochen in vivo. Die Pfeile zeigen Riesenzellen vom Fremdkörpertyp, welche an den Matrixbälkchen sitzen und beginnen diese abzubauen.

H = Hepatozytenareale; M = Matrixbälkchen,

Die drei und sechs Monatsgruppen zeigen eine deutlich geringere Entzündungsreaktion. Aber auch nach 6 Monaten finden sich noch zahlreiche Riesenzellen vom Fremdkörpertyp. Nach und nach wandelt sich das Granulationsgewebe in Fettgewebe um (Abbildung 22). Wobei beachtlich ist, dass zwischen Mesenterium und Matrix keinerlei Kapsel oder Membran gebildet wird, sondern ein fließender Übergang von mesenterialem Fettgewebe zu Fett- und Bindegewebe innerhalb der Matrix entsteht.

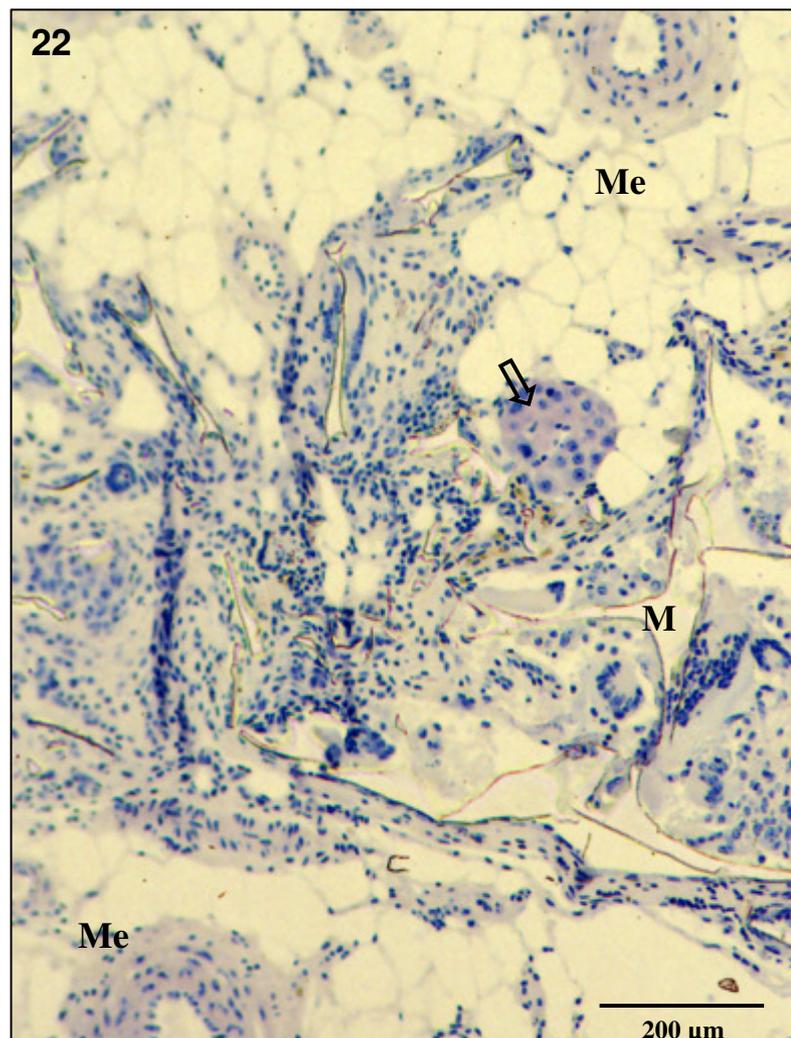


Abbildung 22: PAS gefärbter Paraffinschnitt, Gruppe STx- nach 12 Wochen in vivo. Die Pfeile zeigen ein PAS positives Hepatozytenareal innerhalb der Matrix. Dieses ist umgeben von neu gebildetem Fettgewebe, welches übergangslos mit dem mesenterialen Fettgewebe in Verbindung steht.

Me = mesenteriales Bindegewebe; M = Matrixbälckchen,

Hepatozytenareale

HE-Färbung: Um die heterotopen Hepatozytenareale deren Zellen morphologisch der nativen Leber gleichen (eosinophiles Zytoplasma, einen großen prominenten Zellkern mit vielen Nukleoli, was auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität hindeutet) finden sich ungewöhnlich viele Blutgefäße. Die Areale formieren sich auch bälkchenartig, wobei besonders große Leberzellareale häufig zentral von neugebildeten Gefäßen durchzogen werden. Auch nach 24 Wochen sieht man keine Degenerationszeichen, wie z.B. zytoplasmatische Einschlüsse oder Zeichen einer intra- oder extrazellulären Cholestase (Abbildung 23b).

PAS-Färbung: Hierdurch konnten wir feststellen, dass die Zellen nach einer Woche in vivo noch keine nennenswerten Mengen an Glykogen enthalten, jedoch nach vier Wochen einen lebertypischen Glykogengehalt erreicht haben, welchen sie bis zum Ende der Versuchsreihe beibehalten (s. Abbildung 23c, 24a).

CK18-Färbung: Wir markierten unsere Proben mit Antikörpern gegen CK18 und konnten somit ein Zytoskelett darstellen, welches in Verteilung und Struktur dem einer natürlichen Leber entspricht.

HepPar1-Färbung: Eine Methode, die wir als leberspezifische Markierung in unsere immunhistologischen Untersuchungen aufgenommen haben, um sicher gehen zu können, dass es sich bei den gefundenen Zellen um Hepatozyten handelt und nicht um morphologisch ähnliche Zellen anderer Herkunft. Die positive Färbereaktion bestätigte uns das Vorhandensein der Leberzellen.

Ein weiterer Nebeneffekt bei der Verwendung dieses Antikörpers ist die Tatsache, dass das von ihm erkannte Epitop in der mitochondrialen Membran liegt. Somit zeigte sich uns als weiterer Befund ein leberähnlicher Gehalt an Mitochondrien in den heterotopen Hepatozyten, der sich bis zum Ende der Versuchsreihe hielt.

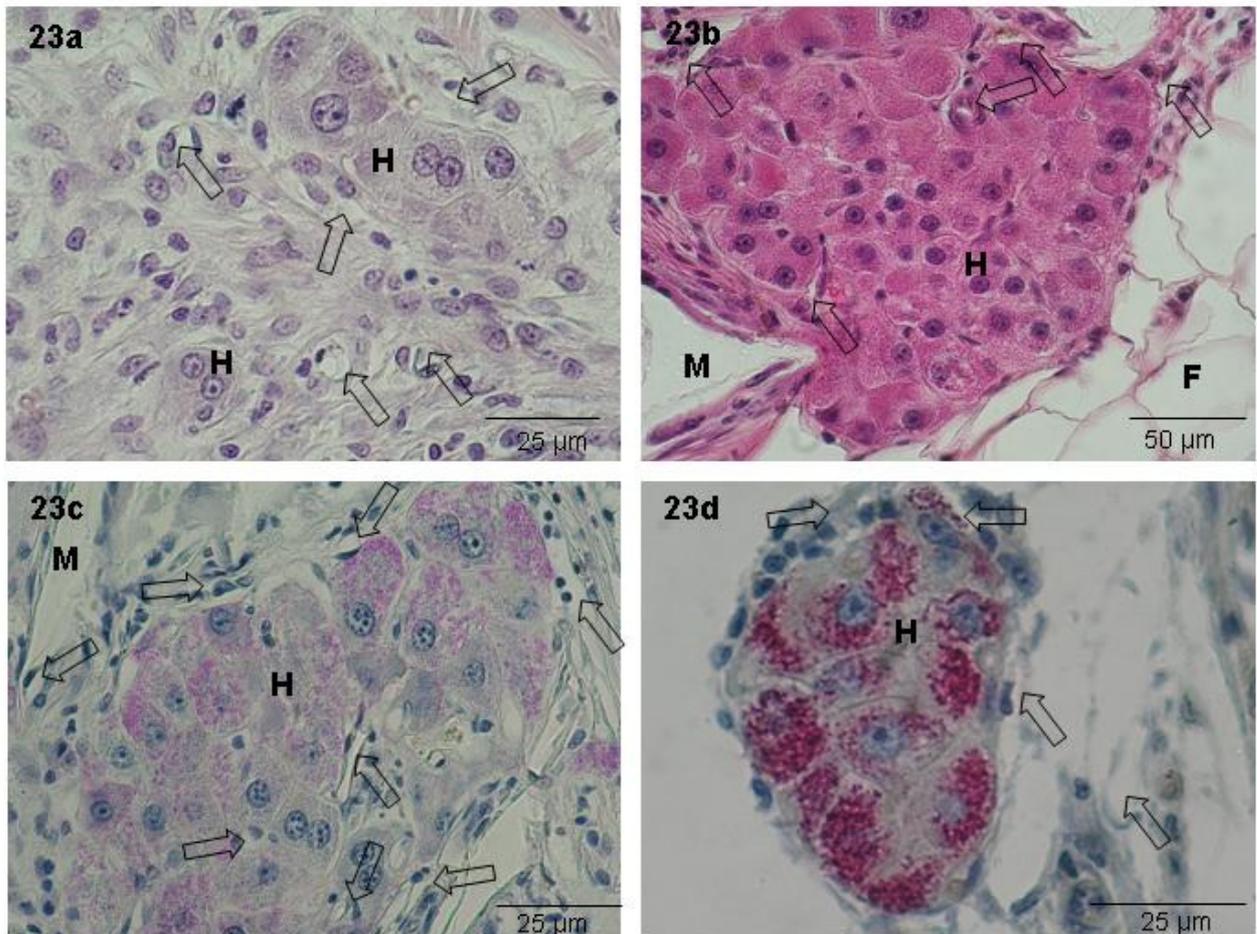


Abbildung 23 a-d: zeigen heterotope Leberzellareale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tx. **a)** HE gefärbtes Areal sieben Tage nach Tx aus Gruppe STx-. Die Pfeile weisen auf neu in die Matrix eingewachsene und die heterotopen Hepatozyten umgebende Gefäße. **b)** HE gefärbtes Areal 24 Wochen nach Tx aus der STx+ Gruppe. Man sieht vitale heterotope überlebende Leberzellen mit prominenten Nukleoli ohne Hinweise auf intrazelluläre Cholestase. Die Pfeile weisen auf zahlreich im Areal vorkommende Gefäße **c)** Zeigt ein PAS gefärbtes Areal 24 Wochen nach Tx aus der Gruppe STx+. Man erkennt eine homogene Glykogenverteilung innerhalb des Areales. Die Pfeile zeigen angeschnittene Gefäße. **d)** Zeigt ein HepPar1 immunhistologisch gefärbtes Areal sieben Tage nach Tx. Der für Leberzellen spezifische Marker detektiert ein mitochondriales Target. Man erkennt eine zytoplasmatische rötliche Färbung welche ein leberähnlichen Gehalt an Mitochondrien anzeigt.

M= Matrix

H= Hepatozytenareal

CK7- und CK19-Färbung: Eine Reaktion mit diesen beiden Antikörpern blieb in unseren Proben unter positiver Kontrolle aus, wodurch wir ein Vorhandensein von Gallengangsepithelien, Progenitorzellen oder transdifferenzierten Zellen aus dem Knochenmark ausschließen können.

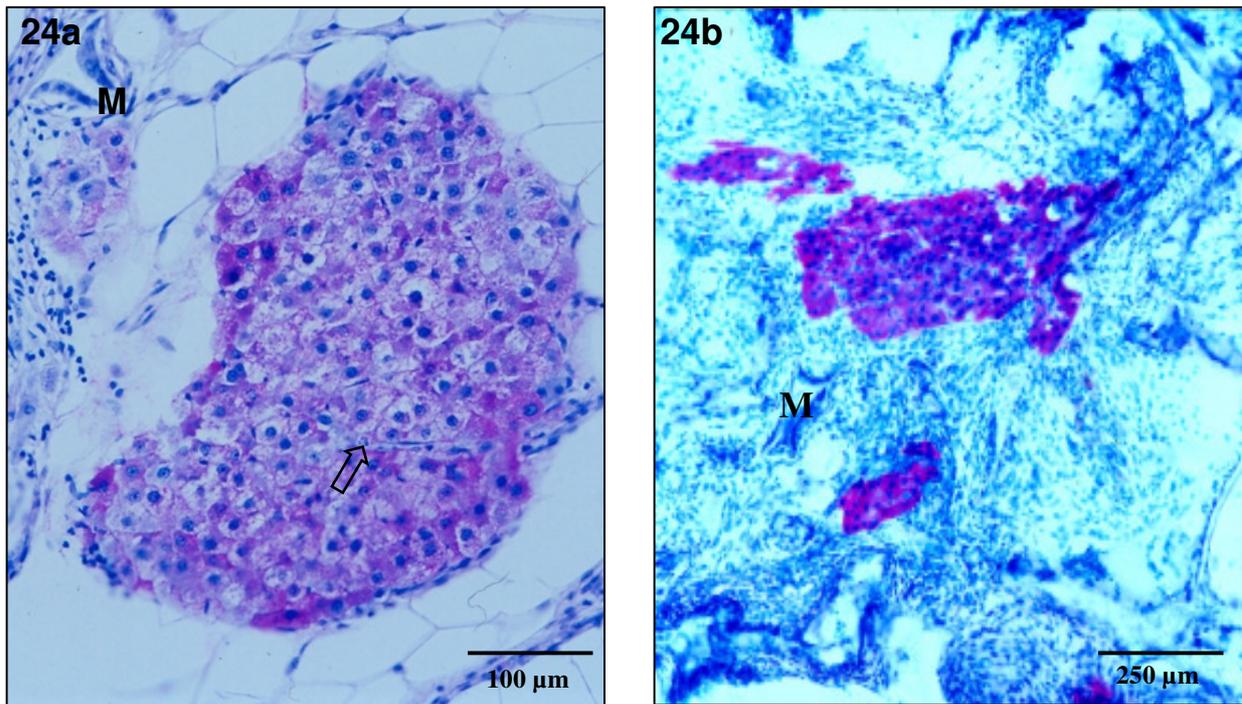


Abbildung 24a: PAS gefärbter Paraffinschnitt, STx+ nach 24 Wochen in vivo. Der Pfeil zeigen ein zentrales Gefäß, welches sich durch das PAS positive Hepatozytenareal erstreckt. **Abbildung 24b:** Immunhistochemisch mit HepPar1 gefärbter Kryoschnitt, ETx+ nach 24 Wochen in vivo. Man erkennt ein sehr großes positives heterotopes Hepatozytenareal innerhalb der Matrix, welches umgeben wird von neu gebildetem Bindegewebe.

M = Matrixbälckchen

PCNA-Färbung: Hierdurch bestimmten wir die Proliferationsrate des heterotopen Lebergewebes. In der ersten Woche konnte noch in keiner Gruppe eine Proliferation nachgewiesen werden. Nach vier Wochen jedoch gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen den stimulierten (ETx+ und STx+) und den nicht stimulierten (ETx- und STx-) Gruppen. Nach Anlage des portocavalen Shunts weisen die Proben bei Explantation nach vier Wochen eine Proliferationsrate von 3-4% auf (Abbildung 25). In den nicht stimulierten

Gruppen sieht man nur einzelne proliferierende Hepatozyten. Der Proliferationsindex liegt dort bei ca. 1 %. Nach 12 und 24 Wochen sind sowohl in den PCS-Gruppen als auch in denen ohne Stimulation nur noch sehr selten proliferierende Hepatozyten nachzuweisen. Der Proliferationsindex liegt zwischen 0,0 - 0,5 % und hat sich damit dem in der Leber physiologisch Proliferationsindex von 0,1 % angeglichen.

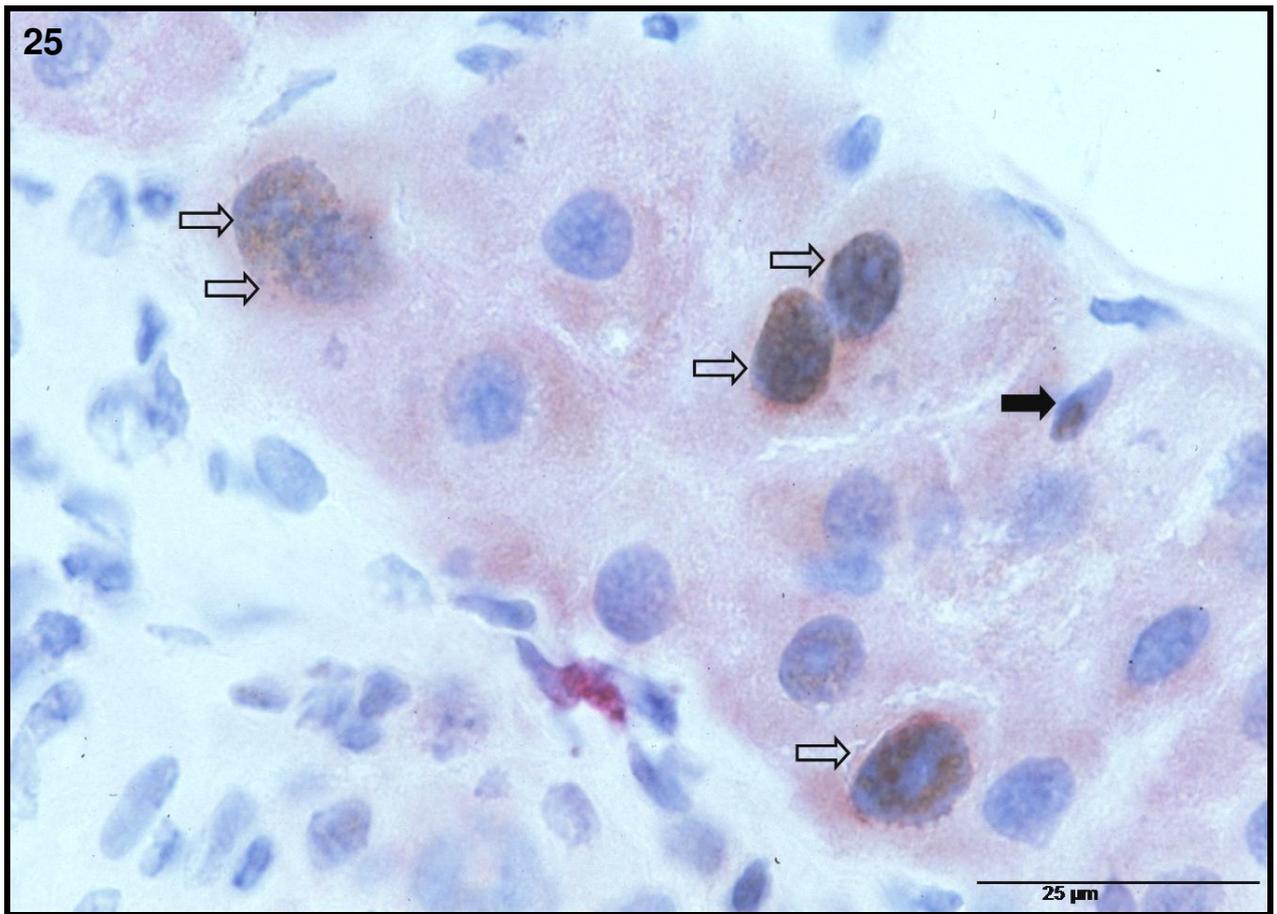


Abbildung 25: Immunhistochemische Doppelfärbung mit PCNA (braun) und Hep par 1 (rot) der ETx+ nach 4 Wochen in vivo. In dem mit Hep par 1 rot markierten heterotopen Leberzellareal sieht man viele PCNA positive braune Zellkerne, was auf eine starke proliferative Aktivität des Gewebes hindeutet. Von den hier 18 dargestellten Hepatozytenzellkernen sind 5 positiv für das PCNA Antigen (helle Pfeile), welches eine gerade vollzogene oder stattfindende Zellteilung anzeigt. Der schwarze Pfeil zeigt einen sich teilenden Fibroblasten.

Phalloidin-Färbung: Hiermit werden spezifisch die Aktinfilamente markiert, welche sich in Leberzellen randständig und um die Gallekanalikululi anordnen (Abbildung 9). Nach einer

Woche unterscheiden sich die Gruppen STx und Etx hinsichtlich der Bildung eines Gallekanalikulinetzwerkes jedoch verschwindet diese Differenz ab der vierten Woche. In den STx zeigt sich schon nach einer Woche ein vernetztes Gallenwegssystem und eine intrazelluläre Aktinverteilung mit Betonung der Zellwände (Abbildung 26 a-c).

Dies entspricht der Aktinverteilung in der adulten Leber (Abbildung 16). Dahingegen vollzieht sich die Formation der Kanalikuli in den ETx-Gruppen deutlich langsamer. Sie schließen erst ab der vierten Woche zu den STx-Gruppen auf und alle behalten die dann erreichte Struktur bis zum Ende der Versuchsreihe bei. Degenerationszeichen, wie z. B. Zysten wurden bis dahin nicht beobachtet.

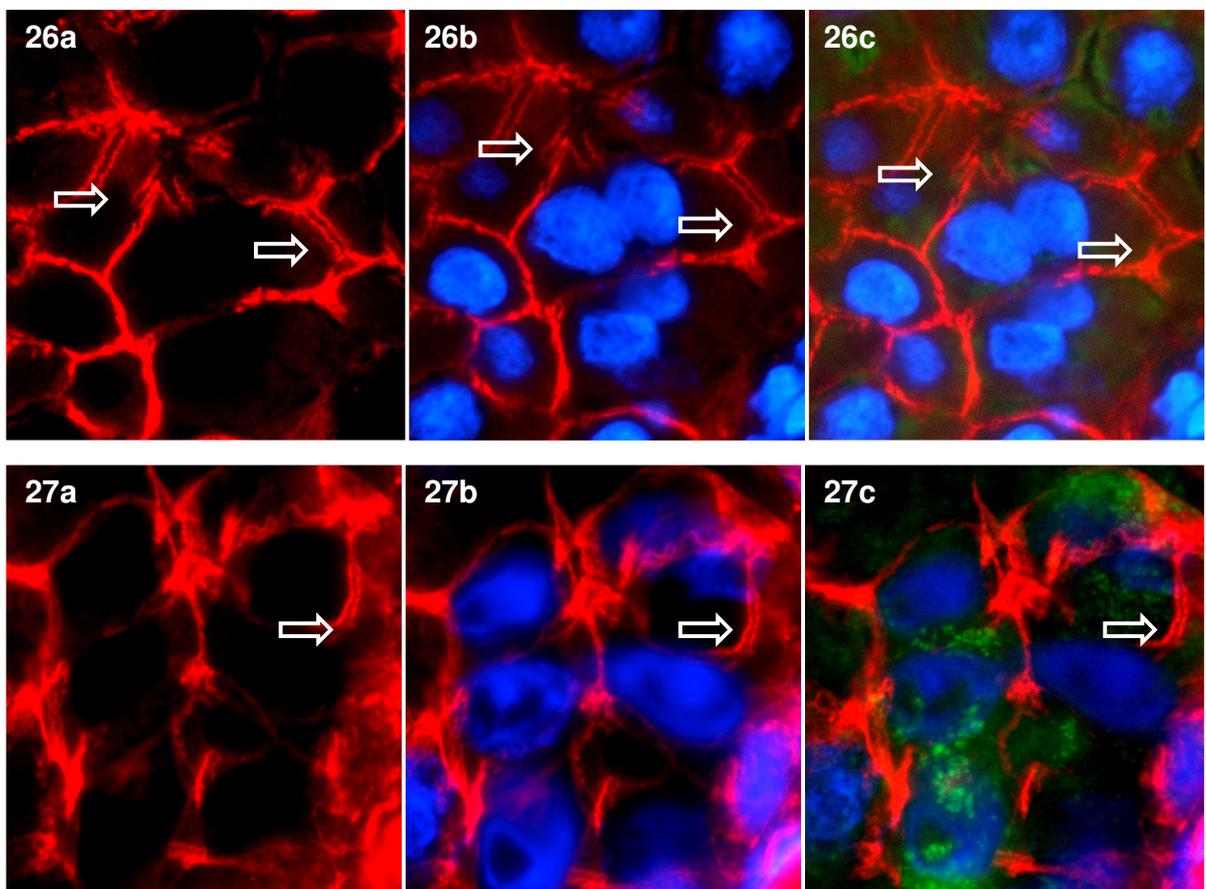


Abbildung 26-27: zeigen eine Immunfluoreszenzfärbung aus Kryoschnitten von STX+ und ETX+ nach einer Woche in vivo. Die Abbildungen 26a/ 27a) zeigen eine Aktinfärbung mit TRIC-Phalloidin (rot). Abbildung 26b) und 27b) sind per Computersoftware erzeugte Overlayer aus der TRIC-Phalloidin (rot) und DAPI Kernfärbung (blau). Abbildung 26c) und 27c) sind per Computersoftware erzeugte Overlayer aus der TRIC-Phalloidin (rot), DAPI Kernfärbung (blau) und HepPar1 (grün).

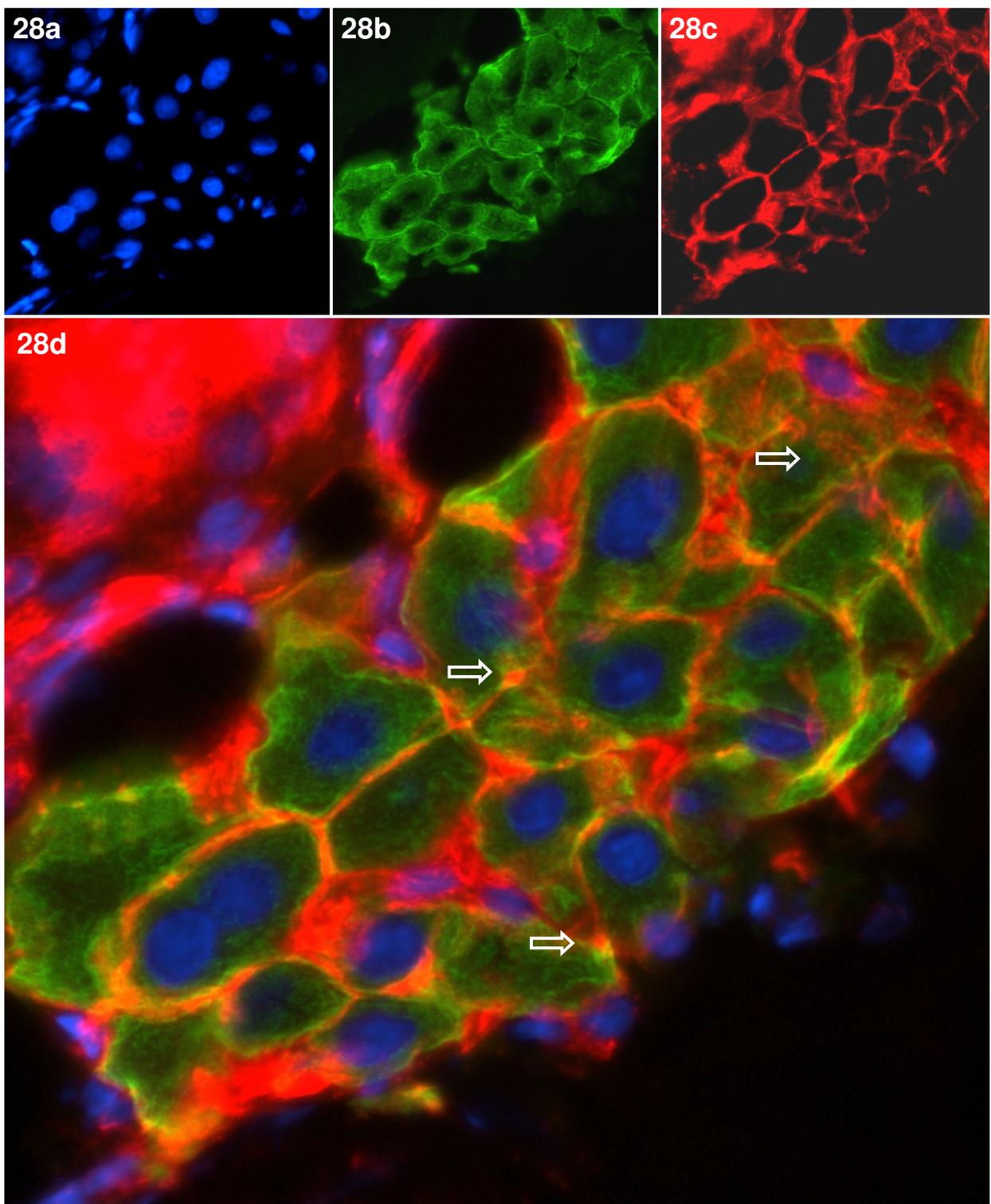


Abbildung 28: Zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung aus Kryoschnitten von STX+ nach 16 Wochen in vivo. **a)** zeigt eine DAPI Kernfärbung (blau), **b)** zeigt eine CK18-Färbung (grün). **c)** zeigt eine Aktinfärbung mit TRIC-Phalloidin (rot). **d)** ist ein per Computersoftware erzeugter Overlay aus den TRIC-Phalloidin, DAPI und CK18-Färbungen.

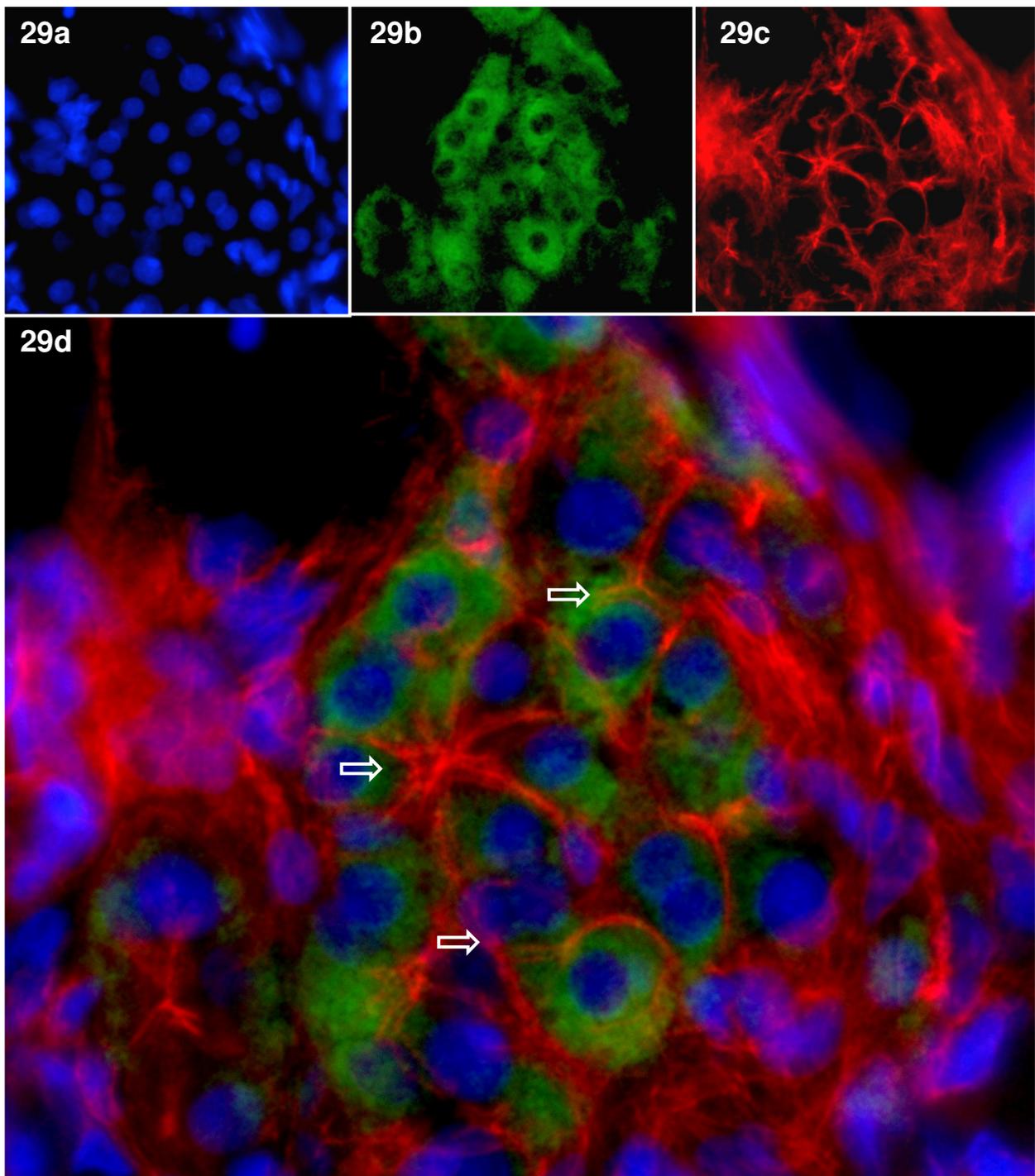


Abbildung 29: zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung aus Kryoschnitten von STX+ nach 24 Wochen in vivo. **a)** zeigt eine DAPI Kernfärbung (blau), **b)** zeigt eine Hep par 1 Färbung **c)** zeigt eine Aktinfärbung mit TRIC-Phalloidin (rot). **Abbildung d)** ist ein per Computersoftware erzeugter Overlay aus der TRIC-Phalloidin, DAPI und HepPar1 Färbungen.

Quantitative morphometrische Auswertung

Flächenanteil der Hepatozyten

Vergleicht man innerhalb der verschiedenen Gruppen die von Hepatozyten bedeckte Fläche, so sieht man in allen Gruppen über den Versuchszeitraum eine deutliche Zunahme (Abbildung 30). Statistisch überprüft wurde diese mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis H-Test als Mittelwertvergleich für k-unabhängige Stichproben. Dieser zeigt, dass für STx-, ETx+ und STx+ mit $p = 0,063$, $p = 0,048$ und $p = 0,023$ ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten besteht. Bei im H-Test gegebener Signifikanz wurde der U-Test nach Mann und Whitney als Mittelwertsvergleich für 2 unabhängige Proben durchgeführt und die errechneten Signifikanzen in die Abbildung 30 eingetragen. In STx- zeigt sich mit $p = 0,021$ und $p = 0,041$ ein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und der 24., und der 4. und der 24. Woche. In ETx+ findet man mit $p = 0,043$ und $p = 0,083$ einen signifikanten Unterschied zwischen der 1. und der 24., sowie der 4. und der 24. Woche. In STx+ findet sich mit $p = 0,034$, $p = 0,034$ und, $p = 0,034$ ein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und der 24., der 4. und der 24. und der 12. und der 24. Woche.

Zusammen mit den histologischen Ergebnissen, welche eine Proliferation nachweisen, zeigen die morphometrischen Ergebnisse eindeutig, dass die heterotopen Hepatozyten in allen Versuchsgruppen während der gesamten Versuchszeit proliferieren, und dadurch ein immer größer werdendes Areal in der Matrix bedecken. Dieser Effekt ist unabhängig vom Vorhandensein eines portocavalen Shunts, da auch STx- ein signifikantes Wachstum zeigen. Der Vergleich der einzelnen Gruppen im Kruskal-Wallis-Test zeigt, aufgrund der hohen Varianz der Einzelwerte, in den einzelnen Gruppen zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied.

Abbildung 30 Flächenanteil der Hepatozyten am heterotopen Neogewebe

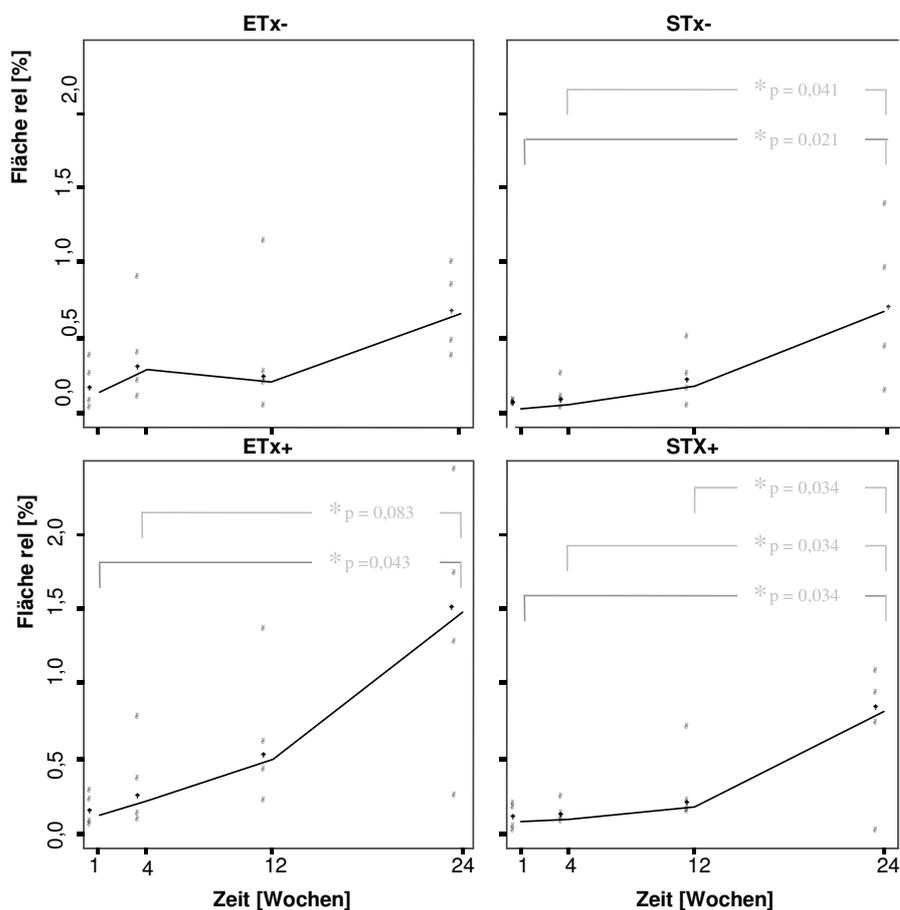


Abbildung 30 zeigt im U Test für ETX: keine signifikanten Unterschiede. Für STX- besteht mit $p = 0,021$ und $p = 0,041$ ein signifikanter Unterschied zwischen der 24. und 1., sowie der 24 und 4 Woche. Für ETX+ besteht mit $p = 0,043$ und $p = 0,083$ ein signifikanter Unterschied zwischen der 24. und 1., sowie der 24. und 4. Woche. Für STX+ besteht mit $p = 0,034$, $p = 0,034$ und $p = 0,034$ ein signifikanter Unterschied zwischen 24. und 1., 24. und 4., sowie 24. und 12. Woche

Anzahl der Hepatozytenareale

Betrachtet man die Anzahl der Hepatozyteneinzelareale über die gesamte Versuchszeit, so sieht man, dass diese bei den verschiedenen Gruppen relativ konstant bleibt (Abbildung 31). Statistisch bestätigt wird dies durch den H Test von Kruskal-Wallis. Dieser verneint mit $p=0,419$, $p=0,642$, $p=0,628$ und $p=0,399$ für alle Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb derselben Gruppe.

Abbildung 31: Anzahl der Hepatozyten Einzelareale

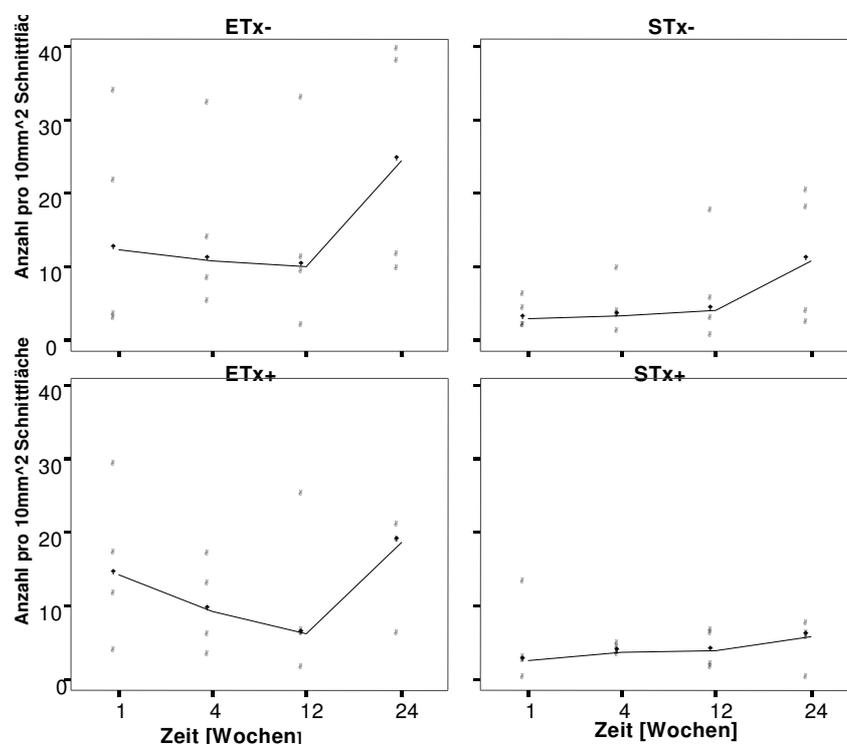


Abbildung 31 zeigt das die Anzahl der Areale in den vier Gruppen zwischen den einzelnen Zeitpunkten relativ konstant bleibt. Statistisch wird dies bestätigt durch den H Test von Kruskal-Wallis. Dieser verneint mit $p=0,419$, $p=0,642$, $p=0,628$ und $p=0,399$ für alle Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied.

Vergleicht man jedoch die verschiedenen Gruppen miteinander und fasst dabei alle Zeitpunkte zusammen zeigt sich im H Test mit $p=0,001$ ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der darauf hin durchgeführte U-Test weist mit $p=0,009$; $p=0,001$; $p=0,018$ und $p=0,003$ einen signifikanten Unterschied zwischen ETX- und STX-; ETX- und STX+; ETX+ und STX- sowie ETX+ und STX+ aus.

Sowohl zwischen ETX- und STX-, als auch zwischen STX- und STX+ besteht kein signifikanter Unterschied. Dies bedeutet, dass es ohne Vorkultur zu mehr Hepatozyteneinzelarealen gekommen ist, als mit Vorkultur. Das Vorhandensein eines portocavalen Shunts beeinflusst die Anzahl der Hepatozyteneinzelareale nicht.

Abbildung 32: Anzahl der Hepatozyten Einzelareale im Vergleich der Gruppen

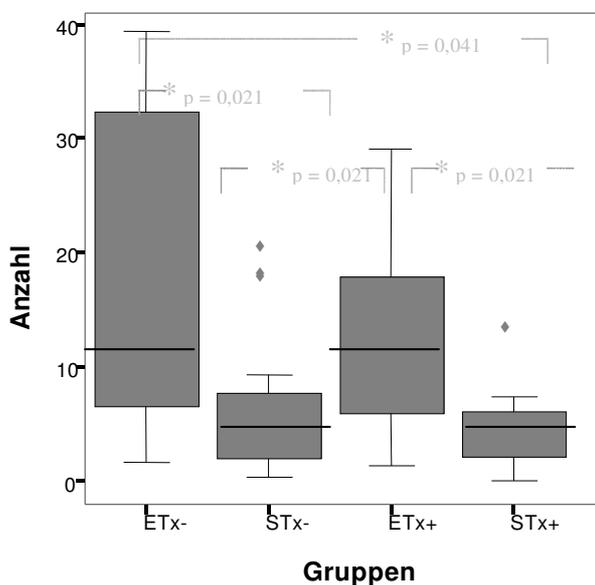


Abbildung 32 zeigt die Anzahl der Hepatozyteneinzelareale im Gruppenvergleich. Es zeigt sich im H Test mit $p=0,001$ ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der daraufhin durchgeführte U-Test weist mit $p=0,009$; $p=0,001$; $p=0,018$ und $p=0,003$ einen signifikanten Unterschied zwischen ETx- und STx-; ETx- und STx+; ETx+ und STx- sowie ETx+ und STx+ auf. Sowohl zwischen ETx- und STx-, als auch zwischen STx- und STx+ besteht kein signifikanter Unterschied.

Größe der Hepatozyteneinzelareale

Die morphometrischen Daten (Abbildung 33) zeigen, dass die Größe der Hepatozyteneinzelareale proportional zur im Tier verbliebenen Zeit zunimmt. Statistisch läßt sich dieses im H Test mit $p=0,014$, $p=0,006$, $p=0,003$ und $p=0,024$ hochsignifikant für alle vier Gruppen zeigen. Der U Test weist in ETx- mit $p=0,021$ und $p=0,021$ auf einen signifikanten Unterschied zwischen der 1. und der 24., und der 4. und der 24. Woche hin. In STx- besteht mit $p=0,021$, $p=0,021$ und $p=0,021$ ein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und der 24., der 4. und der 24. und der 4. und der 12. Woche.

ETx+ erweist mit $p=0,021$, $p=0,021$, $p=0,021$ und $p=0,021$ eine Signifikanz zwischen der 1. und der 24., der 4. und der 24., 12. und der 24. Woche, sowie der 4. und 12. Woche. ETx+ zeigt mit $p=0,034$, $p=0,034$, $p=0,034$ einen signifikanten Unterschied zwischen der 1. und der 24., der 4. und der 24. sowie der 12. und der 24. Woche.

Abbildung 33: Größe der Hepatozyteneinzelareale

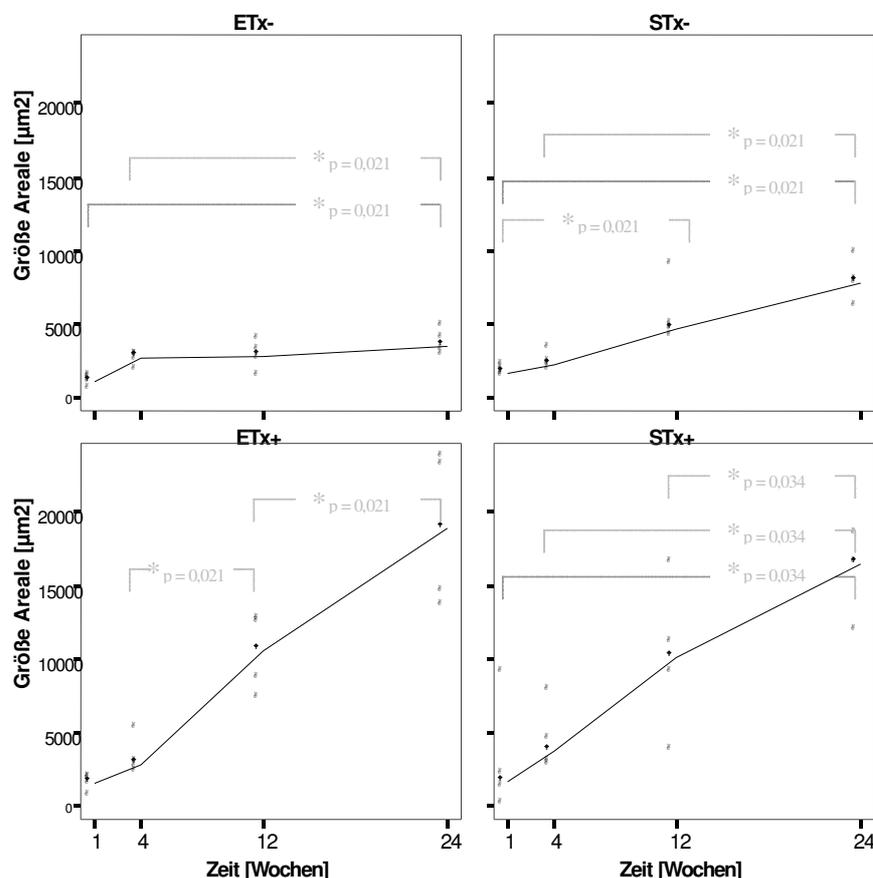


Abbildung 33 zeigt dass die Größe der Hepatozyteneinzelareale in den verschiedenen Gruppen über den gesamten Zeitraum zunimmt. Statistisch ist dies im H Test mit $p=0,014$, $p=0,006$, $p=0,003$ und $p=0,024$ für alle Gruppen hochsignifikant. Der U Test weist in ETX- mit $p=0,021$ und $p=0,021$ auf einen signifikanten Unterschied zwischen der 1. und der 24., und der 4. und der 24. Woche hin. In STX- besteht mit $p=0,021$, $p=0,021$ und $p=0,021$ ein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und der 24., der 4. und der 24. und der 4. und der 12. Woche. ETX+ erweist mit $p=0,021$, $p=0,021$, $p=0,021$ und $p=0,021$ eine Signifikanz zwischen der 1. und der 24., der 4. und der 24., 12. und der 24. Woche, sowie der 4. und 12. Woche. ETX+ zeigt mit $p=0,034$, $p=0,034$, $p=0,034$ einen signifikanten Unterschied zwischen der 1. und der 24., der 4. und der 24. sowie der 12. und der 24. Woche.

Normierte Gesamtzellmenge

Da durch den Zellverlust in Kultur in STx weniger Zellen transplantiert wurden als in ETx, haben wir, um einen Vergleich der Gruppen zu ermöglichen die Gesamtzellmenge bei Explantation pro Matrix berechnet und mit der Anfangszellzahl bei Matriximplantation verglichen (s. Abbildung 11). In allen vier Gruppen steigt die Anzahl der Hepatozyten über

den Versuchszeitraum an und erreicht nach 24 Wochen in ETx- 12% ,in STx- 62% ,in ETX+ 29% und in STX+ 75% der Anfangszellzahl. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zwar in ihren Werten stark, sind aber aufgrund der hohen Standardabweichung und der niedrigen Fallzahl pro Gruppe im H Test nicht signifikant.

Abbildung 34: Normierte Gesamtzellmenge

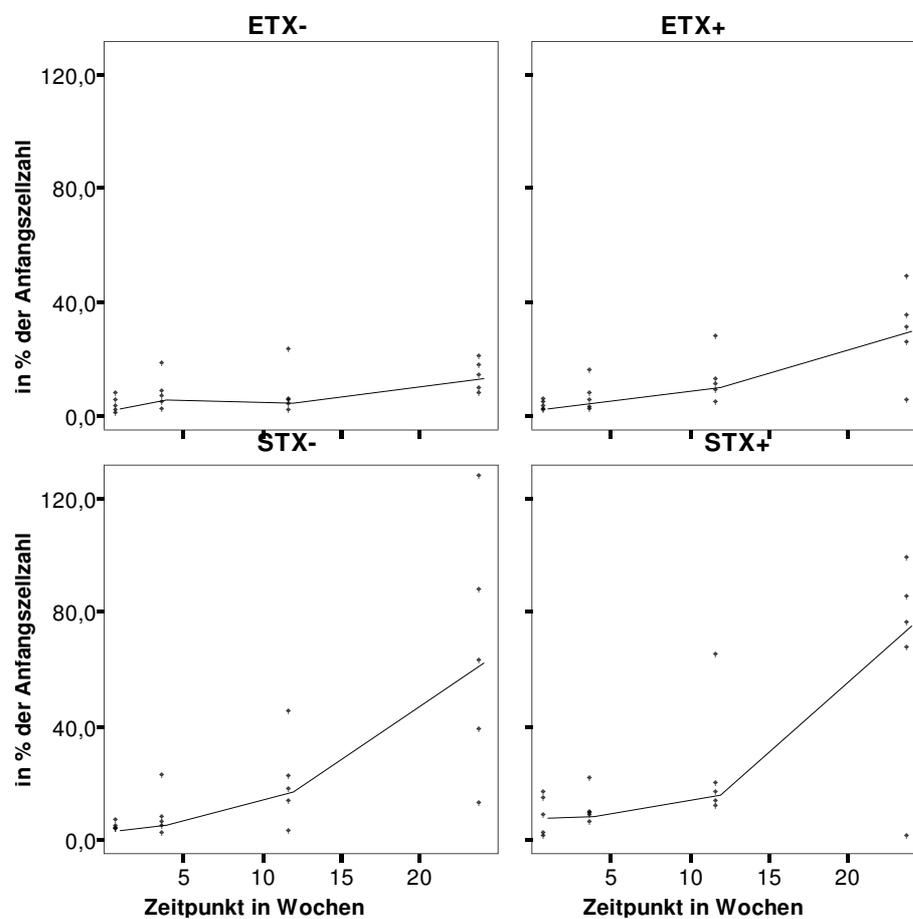


Abbildung 34 zeigt für die jeweiligen Zeitpunkte die Gesamtzellmenge normiert durch die Anfangszellzahl bei Tx. In allen vier Gruppen steigt die Anzahl der Hepatozyten über den Versuchszeitraum an und erreicht nach 24 Wochen in ETx- 12% ,in STx- 62% ,in ETX+ 29% und in STX+ 75% der Anfangszellzahl.

Analyse der Faktoren „Kultur“ und „Stimulation“ auf das Transplantationsergebnis

Zuerst wurde durch den Kolmogorow-Smirnov Test geprüft, ob die Variablen einer Normalverteilung folgen. Nachdem dies der Fall war, konnte eine statistische univariante Faktorenanalyse (allgemeines lineares Modell) durchgeführt werden. Da die Variablen „Hepatozytenfläche“, „Anzahl der Einzelareale“ und „normierte Gesamtzellmenge“ im Levene Test eine Varianzenheterogenität zeigten, wurde um die Analyse dennoch durchführen zu können das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,01$ angehoben.

Die Ergebnisse der Faktorenanalyse für den 24 Wochen Zeitpunkt wurde in Tabelle 8 zusammengefasst und zeigen:

- Die „normierte Gesamtzellmenge“ wird statistisch signifikant ($p= 0,005$) durch den Faktor „Vorkultur“ beeinflusst. So führt eine dreitägige Vorkultur zu einer deutlich größeren Effektivität der Zelltransplantation.
- Die Größe der Areale hingegen wird hauptsächlich durch das Vorhandensein einer Stimulation beeinflusst. Der portocavale Shunt führt so zu einer statistisch signifikanten ($p \leq 0,001$) Vergrößerung der Areale.
- Die Anzahl der Hepatozyteneinzelareale wird signifikant ($p = 0,032$) negativ durch den Faktor „Vorkultur“ beeinflusst. Die Transplantation von vorkultivierten Zellen führt zu einer geringeren Anzahl an Hepatozyteneinzelzellarealen.
- Die Kombination der Faktoren zeigt keinen eigenständigen, statistisch nachweisbaren Effekt.

Tabelle 8: Univariate Faktorenanalyse für die 24 Wochenzeitpunkt

		Faktoren		
		Kultur	Stimulation	Kultur * Stimulation
Variablen	Hepatozytenfläche	P = 0,065	p = 0,080	p = 0,041
	Anzahl der Einzelareale	P = 0,175	P = 0,031*	p = 0,645
	Größe der Einzelareale	P = 0,774	p ≤ 0,001 *	p = 0,052
	Normierte Gesamtzellmenge	P ≤ 0,005 *	p = 0,317	p = 0,943

Da der Levene Test für die Variablen „Hepatozytenfläche“ und „Normierte Gesamtzellmenge“ zeigt, dass eine Varianzgleichheit nicht gegeben ist, wurde die Signifikanzgrenze auf $p=0,01$ angehoben.

Diskussion

Die erste erfolgreiche Lebertransplantation am Menschen wurde 1963 von Starzl [88] durchgeführt. Durch eine verbesserte Operationstechnik, sowie die Einführung neuer medikamentöser Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A, ist sie heutzutage eine sehr sichere und erfolgreiche Therapie geworden [86]. Das Hauptproblem der Transplantationschirurgie ist, dass nicht genügend Organe für alle Patienten zur Verfügung stehen. Trotz neuer Strategien, wie der Leberlebendspende [5] und der Transplantation von Splitlebern [74], steigt die Anzahl der Patienten auf der Warteliste. So konnte im Jahre 2003 in Deutschland bei 855 Patienten eine Lebertransplantation durchgeführt werden, dem gegenüber stehen jedoch 1702 Patienten, die neu auf die Warteliste gekommen sind (Abbildung 35). Das Transplantieren von Leberzellen anstelle von ganzen Lebern könnte eine Therapiealternative darstellen. Da bei dieser Technik die transplantierten Zellen nur die Leber des Patienten unterstützen, also bedarfsadaptiert transplantiert wird, könnte man mit den Zellen einer Spenderleber mehrere Patienten behandeln. Zukünftig wäre es somit möglich, die für die Transplantation nötigen Leberzellen aus adulten mesenchymalen Stammzellen vom Patienten selbst zu gewinnen. Dadurch könnte sowohl der Organmangel entscheidend entschärft, als auch lebenslange Immunsuppression vermieden werden. Wir haben uns für die matrixbasierte Hepatozytentransplantation nach dem Prinzip des Tissue Engineering entschieden, da diese Technik es im Gegensatz zur Injektionsmethode ermöglicht, Zellzahlen bis zu einem Leberäquivalent zu transplantieren [101]. Eines der größten Probleme der Zelltransplantation ist der große Anfangsverlust von über 95% der Zellen direkt nach der Transplantation. Ziel dieser Studie war es die Hypothese zu prüfen, ob eine in vitro Vorkonditionierung der Hepatozyten zu einer erhöhten Gesamtzellmenge nach Transplantation führt. Da die Lebergröße ein in vivo streng regulierter Parameter ist, haben wir zusätzlich das Verhalten der heterotop transplantierten Zellen unter einer Stimulation durch einen portokavalen Shunt untersucht.

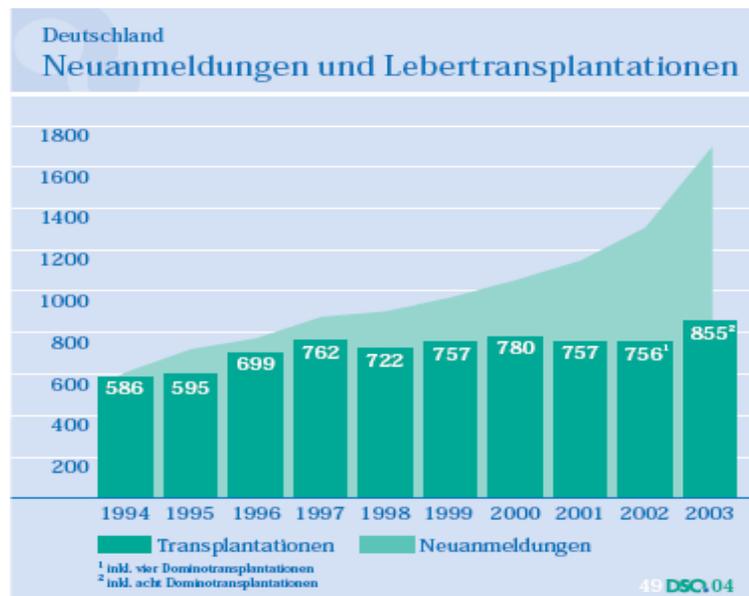


Abbildung 35: Neuanmeldungen und Lebertransplantationen. Während in den letzten Jahren eine Stagnation der Lebertransplantationszahlen festzustellen war, stieg der Wert im Jahr 2003 deutlich an. Im Berichtsjahr liegt der Zahl der Anmeldungen eine neue Datenquelle zugrunde. Sie berücksichtigt auch wiederholte Anmeldungen einer Patientin oder eines Patienten. Deshalb können die Daten nur bedingt mit den Vorjahren verglichen werden. Die Kluft zwischen der Anzahl von angemeldeten Patientinnen und Patienten und der Zahl der durchgeführten Transplantationen bleibt jedoch nach wie vor bestehen. Abbildung und Text sind übernommen von der DSO Homepage unter <http://www.dso.de/grafiken/g49.html>.

Poly-L-Laktatsäure (PLLA) Matrix

Unsere PLLA-Matrix wurde von Prof. Dr. Ma nach der weit verbreiteten „Salt Leaching Technik“ hergestellt [60; 52]. Diese Technik garantiert eine gute Kontrolle der Porengröße [51] und erlaubt die Erzeugung einer Matrix mit einer bis zu 98%igen Porosität [57]. Bei der „Salt Leaching Technik“ wird das PLLA in Lösung gebracht und dann mit Salzpartikeln der gewünschten Porengröße vermischt. Man entfernt das Lösungsmittel und wäscht in einem zweiten Schritt die Salzkristalle mit Wasser aus; zurück bleibt die hoch poröse Matrix. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Porengröße ein entscheidender Faktor für das schnelle Einwachsen fibrovaskulären Gewebes ist [106]. Um möglichst große Poren zu erhalten, haben wir für unsere Matrizes Salzkristalle mit einer Größe von 250-400 µm gewählt. Der große Nachteil dieses Verfahrens ist, dass man die Verbindungsrate der Poren untereinander nicht beeinflussen kann [51] und dadurch einzelne Poren verschlossen bleiben. Selbst in ein und derselben Serie variiert das Verhältnis von verschlossenen zu offenen Poren gelegentlich sehr stark. Diese Varianz

könnte einen Teil der großen Streubreite erklären, die sich in den Ergebnissen, sowohl bei der Zellkultur, als auch in unseren in vivo Versuchen ergibt. Bedingt durch die von uns gewählte Herstellungsmethode sind auf einer Seite der Matrix die Poren nur nach innen geöffnet und nach außen hin komplett verschlossen. In der histologischen Analyse zeigte sich dann, dass nur von der offenen Seite der Matrix her Bindegewebe einwächst und die Hepatozyten auch nur auf dieser Seite überleben können (s. Abbildungen 22A und B). Technische Probleme in der Herstellung von bioabbaubaren Matrices mit guter Interkonnektivität haben bei einigen Arbeitsgruppen dazu geführt, dass sie für ihre Versuche, trotz schlechter Biokompatibilität, nichtabbaubare Matrices bevorzugt haben [63]. In der Zwischenzeit entwickelte Techniken in der Matrixherstellung, wie z.B. das „Rapid Prototyping“ [21; 110], die „Stereo Litography“ [85] oder die Verwendung von Paraffinsphären [51], ermöglichen die dreidimensionale Kontrolle der Porenarchitektur. Die Verwendung derart hergestellter Matrices könnte alleine durch die Tatsache, dass beide Seiten der Matrix offen sind, die Transplantationsergebnisse in allen unseren Versuchsgruppen deutlich verbessern. In Matrices mit definierter Poreninterkonnektivität kommt es zu einem gleichmäßigeren Einwachsen von Gefäßen, wodurch es bei Verwendung derart hergestellter Matrices zu einer weiteren Steigerung der Gesamtzellmenge und damit zu konstanteren Transplantationsergebnissen kommen sollte.

Zell-Matrix Interaktion

Eine wichtige Voraussetzung für eine gute Zell-Matrix-Interaktion ist die Oberflächenbeschaffenheit der Matrix. Unsere PLLA-Matrix ist mit Poly-Vinyl-Alkohol (PVA) beschichtet, welcher das Polymer zwar deutlich hydrophiler macht (der Kontaktwinkel von PLLA-Matrix und Wasser beträgt ohne PVA-Oberfläche $79 \pm 2^\circ$ und wird durch das Beschichten auf $17 \pm 3^\circ$ gesenkt [59]), aber nicht in ausreichendem Maße, so dass die Zelladhäsion noch nicht optimal ist [55]. Ein weiteres Problem, das viele rein synthetische Matrices teilen, ist, dass sie keine biologische, von den Adhäsionsmolekülen auf der Zelle „erkennbare“ Oberfläche besitzen. Dies führt dazu, dass wir weder in vitro unter dem Polarisationsmikroskop, noch in unseren in-vivo-Versuchen bei der

histologischen Aufarbeitung, Hepatozyten mit einem direkten Zell-Matrix Kontakt finden konnten. Einen Teil unserer geringen Besiedlungseffizienz von nur $29,8 \pm 4,6\%$ könnte durch die fehlende Zelladhäsion an der Matrix erklärt werden. Da wir in histologischen Schnitten nur wenig tote oder sterbende Zellen während der dreitägigen Kulturphase sehen konnten, ist der hohe Zellverlust von ca. 73% während der Kultur hauptsächlich dadurch bedingt, dass ein Großteil der Zellen von der Matrix abgeschwemmt wird. Oberflächenmodifikationen der Matrices wie Chitosan-Beschichtung [6], chemisches Koppeln von Peptiden z.B. RDG und YIGSR an Lysinreste in der Matrix [11; 7] oder Niederdruckbeschichtung mit NH_3 Plasma [62] haben sich bei Osteoblasten- [11; 6] und Hepatozytenkulturen [7] als effektiv erwiesen und auf diesen modifizierten Matrices zu einer höheren Zelladhäsionsrate und zu einer größeren Zelldichte in der Matrix geführt. Serumbestandteile werden zu einem gewissen Anteil von jedem synthetischen Material adsorbiert, ein Effekt, der besonders zum Tragen kommt, wenn man die Ultrastruktur der Matrix ändert und somit die Adsorptionsoberfläche vergrößert. Die Arbeitsgruppe von Peter Ma hat gezeigt, dass sich in PLLA-Matrices, die aus Nanofiber hergestellt wurden, die Adsorptionsrate von Proteinen wie Fibronectin und Vitronectin stark erhöht [108], was dann in Kultur zu einer signifikant verbesserten Zelladhäsion und zu einer höheren Zelldifferenzierung führt.

Angiogenese

Eines der größten Probleme in der matrixbasierten Zelltransplantation ist, dass die Zellen keinen sofortigen Gefäßanschluss finden. Da die Sauerstoffversorgung per diffusionem nur 100-150 μm von einem Gefäß entfernt in ausreichender Menge gewährleistet ist [3], bleibt das schnelle Einwachsen von Gefäßen einer der Hauptschlüssel zum Transplantationserfolg [48]. Wir haben als Implantationsort für die besiedelten Matrices das Mesenterium gewählt, da es als gefäßführende Struktur den Darm versorgt und ein chirurgisch einfach zu erreichendes Gewebe mit einer großen Oberfläche ist [101]. In vorangegangenen Studien hat sich das Mesenterium anderen Implantationsorten, wie z.B. der subkutanen Lokalisation, überlegen gezeigt [101]. ein Umstand, der der unterschiedlich schnell voranschreitenden Angiogenese an den verschiedenen

Implantationsorten zu verdanken ist. Betrachtet man die Verteilung der überlebenden Hepatozyten in der Matrix, so zeigen verschiedene Studien [101; 12; 38], dass die Hepatozyten nur an der direkten Grenzfläche zwischen Matrix und Mesenterium überleben können. Ein Lösungsansatz in der Vergangenheit war die Prävascularisation der 4 mm dicken Matrix [101; 35; 39]. Dabei wird zuerst die Matrix ohne Hepatozyten implantiert, nach 3-4 Tagen, wenn Bindegewebe in die Matrix eingewachsen ist, werden die Hepatozyten in die Matrix injiziert. Damit erreicht man, dass relativ mehr Hepatozyten innerhalb der Matrix überleben, erzeugt jedoch gleichzeitig das Problem, dass ein großer Teil der Matrix schon mit Bindegewebe „belegt“ ist, bevor die Hepatozyten transplantiert werden. Da mit dieser Technik weder die Transplantationseffektivität signifikant gesteigert werden kann, noch eine gleichmäßige Besiedlung der Matrix möglich wird, haben wir einen anderen Weg gewählt und uns für eine dünne Matrix mit nur 1 mm Dicke entschieden. Auf eine Prävascularisation haben wir verzichtet. Trotz der dünnen Matrix mussten wir in der histologischen Analyse feststellen, dass die Hepatozyten hauptsächlich im oberen Drittel der Matrix überlebt haben. Eine weitere Reduktion der Matrixdicke ist nicht sinnvoll, weil damit für therapeutische Zwecke keine ausreichende Hepatozytenzahl mehr transplantiert werden kann. Eine neue Strategie ist es, die Angiogenese zu beschleunigen, und so eine höhere Überlebensrate zu erhalten. Man kann z.B. eine Kotransplantation von Hepatozyten und Zellen, welche die Angiogenese fördern [12] z.B. Knochenmarkszellen durchführen. Diese Methode hat den Nachteil, dass direkt nach der Transplantation, eine Konkurrenz um den vorhandenen Sauerstoff zwischen den Hepatozyten und den kotransplantierten Zellen entsteht. Das bedeutet zwangsläufig, dass man die Anzahl der zu transplantierenden Hepatozyten reduzieren muss. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, ist die Verwendung von PLLA- oder Hydrogel-Kugeln, welche angiogenetische Faktoren in die Umgebung abgeben können [63; 48].

Vorkultur der Hepatozyten im Fluss-Bio-Reaktor

Hepatozyten sind dafür bekannt unter geeigneten Kulturbedingungen wie in serumfreiem Medium, mit EGF, Insulin und unter nichtadhäsiven Kulturbedingungen (z.B. durch positiv geladene Kulturschalenoberflächen [77], den Einsatz von Proteoglycan [83; 41; 67; 64]

oder die Beschichtung mit 2-Hydroxyethylmethacrylat [95; 24]) Zell-Zell- sowie Zell-ECM-Verbindungen auszubilden und somit Spheroide zu formen. Durch Anzüchten der Zellen unter dynamischen Bedingungen in Spinner Flasks [42] oder in Flusskultur [71; 103; 15; 96; 97] entstehen schneller Spheroide (1-2 Tage) als unter statischen Bedingungen (4-6 Tage). Die Bildung von Sphroiden verhindert die rasche Entdifferenzierung der Zellen, hepatozytentypische Funktionen wie Albuminproduktion [41; 94; 68; 97] und das P450 System [109; 96] bleiben dementsprechend erhalten. Wie wir in dieser Studie zeigen, haben die Hepatozyten innerhalb der Spheroide eine intakte Aktinverteilung und bilden Gallekanalikuli aus (Abbildungen 12-14). Elektronenmikroskopische Untersuchungen unserer Gruppe an humanen Sphroiden ergaben, dass diese Gallekanalikuli mit der Sphroidoberfläche verbunden sind. Abu-Absi et al. [1] konnten zusätzlich in Sphroiden eine wiederhergestellte lebertypische Verteilung von Membranproteinen in ein apikales und laterobasales Kompartiment demonstrieren. Spheroide wurden in der Vergangenheit hauptsächlich in vitro als Kulturform für Hepatozyten benutzt. Sie wurden bisher lediglich in die Milz [76] und in das Peritoneum [27] transplantiert. Bei splenischer Lokalisation [76] entstand dort mehr Gewebe nach Sphroidtransplantation als nach Einbringen von Einzelzellen. Leider wurde das Ergebnis nicht bezüglich der Anfangszellzahl quantifiziert. Da auch die Zahl der in Richtung Leber abgeschwommen Zellen nicht bestimmt wurde, können keine Aussagen zur Transplantationseffizienz gemacht werden. Auch bei der Transplantation verkapselter Spheroide in das Peritoneum [27] zwecks Behandlung eines akuten Leberversagens zeigt sich ein deutlicher Vorteil der Spheroide gegenüber Einzelzellen. Ratten bei denen die Leber zu 90% reseziert wurde, überlebten den Eingriff bis zu 50%, wenn gleichzeitig Spheroide transplantiert wurden. Hingegen überlebten nur 25% der Ratten, die Einzelzellen transplantiert bekommen hatten. Anzumerken ist, dass bei einem akuten Leberversagen die transplantierten Zellen nur einige Tage funktionieren müssen, bis die eigene Leber sich regeneriert hat. Ein langfristiges Überleben der transplantierten Zellen wurde nicht untersucht. Unsere Arbeitsgruppe hat erstmals die heterotope Transplantation von Sphroiden auf PLLA-Matrizes durchgeführt und mit der herkömmlichen Methode der Transplantation von Einzelzellen verglichen. Es zeigt sich, dass die normalisierte Gesamtzellmenge gemessen nach 24 Wochen von 18% bei der Einzelzelltransplantation auf 75% bei der Transplantation von zu Sphroiden angezüchteten Hepatozyten erhöht wurde. Dieser Unterschied ist mit $p=0,005$ in der

univariante Faktorenanalyse signifikant. Der PCS führt mit $p=0,317$ in unserer Untersuchung zu keiner weiteren Steigerung der Gesamtzellmenge. Da der Proliferationsindex jeweils bei den entsprechenden Gruppen mit oder ohne Vorkultur identisch war, ist der Unterschied in der Effektivität darauf zurückzuführen, dass in den Gruppen mit Vorkultur bezüglich der Anfangszellzahl eine höhere Anzahl an Hepatozyten überlebt hat. Dieser Unterschied ist zwar zu Beginn nicht signifikant, jedoch vergrößert sich der Abstand zwischen den Gruppen durch das kontinuierliche Wachstum der heterotopen Areale und wird nach 24 Wochen hochsignifikant. Grund für die höhere Überlebensrate der Hepatozyten, die in der Vorkultur Spherotide ausgebildet haben ist wahrscheinlich, dass dort die Leberzellen untereinander Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ausbilden konnten. Dies könnte sie bei der Transplantation über $\beta 1$ -Integrin vermittelte Signale [69] vor der sonst auftretenden, durch die Zellisolation ausgelösten, Anoikis schützen [18]. Dieser Mechanismus wird über den FAK Signalweg [93] weitergeleitet, der durch Loslösung der Integrine von der ECM seinen Impetus erhält. Epithelzellen wie auch die Hepatozyten sind besonders von diesem Phänomen betroffen, und Pinkse et al. [69] sowie Smets et al. [84] sehen darin einen der Hauptgründe für das schlechte initiale Überleben der via v. portam transplantierten Hepatozyten. Auch DNA-Schäden, Todesliganden wie FasL und Dr, sowie der Mangel an Wachstumsfaktoren können Auslöser der Apoptose sein (s. Abbildung 36). Da sie alle über den Signalweg der BH3-only-Proteine wirken ist die „Entscheidung“, ob eine Zelle eine Apoptose durchläuft, stark von dem Status der anderen Faktoren abhängig [105]. So könnte das über $\beta 1$ -Integrin vermittelte „Überlebenssignal“ helfen, die Balance zu halten und zu bewirken, dass die Zellen, welche durch die Transplantation unter großem Stress stehen, nicht die Apoptose einleiten. Ein weiterer Grund für die höhere Überlebensrate der vorkultivierten Hepatozyten könnten Unterschiede in der Immunreaktivität der Zellen sein. Olszewski et al. [65] berichten, dass syngene Hepatozyten von Granulozyten und mononukleären Zellen als körperfremd erkannt und konsekutiv zerstört werden. Ursächlich für diese Reaktion ist die Freilegung von Zelladhäsionsmolekülen wie z.B. Cadherinen durch die enzymatische Aktivität der Kollagenase während der Zellisolation [66].

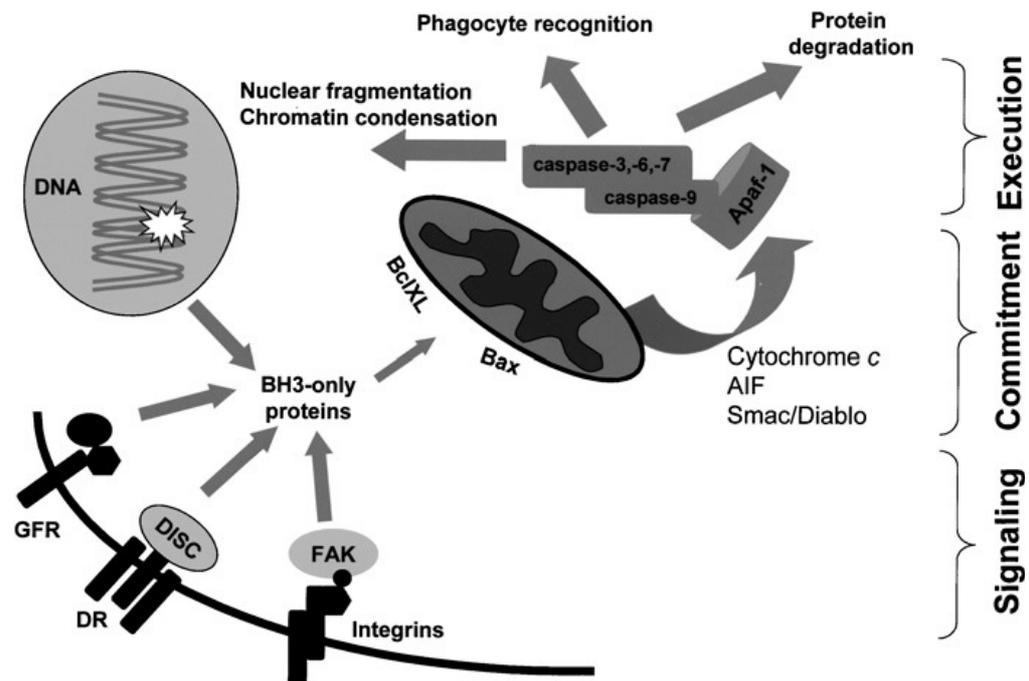


Abbildung 36: Apoptose: multiple Überlebens- und Todessignale können die Reaktion der Zelle hinsichtlich Einleitung der Apoptose beeinflussen. DNA-Schäden, Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Todeskliganden und Integrine beeinflussen die Expression von BH3 only- Proteinen. Diese fungieren als Sensoren welche die Signale dann zu multidomänen Proteinen wie Bax und Bcl-XI, weiterleiten. Dort werden die Signale verarbeitet und die exekutive Phase der Apoptose eingeleitet. Graphik übernommen aus [105]

Durch die Vorkultur wird den Hepatozyten Zeit gegeben, Spheroide zu bilden und sich mit ECM zu umgeben. Die freien Zelladhäsionsmoleküle werden so durch Ausbildung von Zell-ECM- und Zell-Zell-Verbindungen reduziert und sie schützen so die Hepatozyten vor den Makrophagen.

Normierte Gesamtzellmenge

Sucht man in der Literatur nach Daten bezüglich der Gesamtzellmenge nach Transplantation so findet man zwei Studien: Mooney et al. [60] und Sano et al. [78]. Vergleicht man diese Studien mit unseren Ergebnissen, so sieht man, dass in allen Gruppen eine Woche post transplantationem nur noch 2-4% der eingesetzten Zellen vital aufgefunden werden (s. Abbildung 37). Nach 120 Tagen in vivo ist die normierte Gesamtzellmenge bei Mooney 19% und bei Sano 10%. Unsere Ergebnisse in der

Einzelzelltransplantation liegen mit 12% nach 90 Tagen im gleichen Bereich. Nach 180 Tagen verzeichnet Mooney einen Abfall seiner normierten Gesamtzellmenge auf 10%, wohingegen Sano wie auch wir einen weiteren Zuwachs auf 15% bzw. 18% nachweisen. Fasst man die Daten der drei Studien zusammen, so ist mit der konventionellen Methode der Zelltransplantation eine normierte Gesamtzellmenge von 10 - 20% nach 180 Tagen zu erzielen. Zu diesem Zeitpunkt erreichten wir eine normierte Gesamtzellmenge von 75% in den Spheroidgruppen. Somit stellt die Transplantation von vorkultivierten Hepatozyten eine bedeutende Verbesserung der matrixbasierten Hepatozytentransplantation dar.

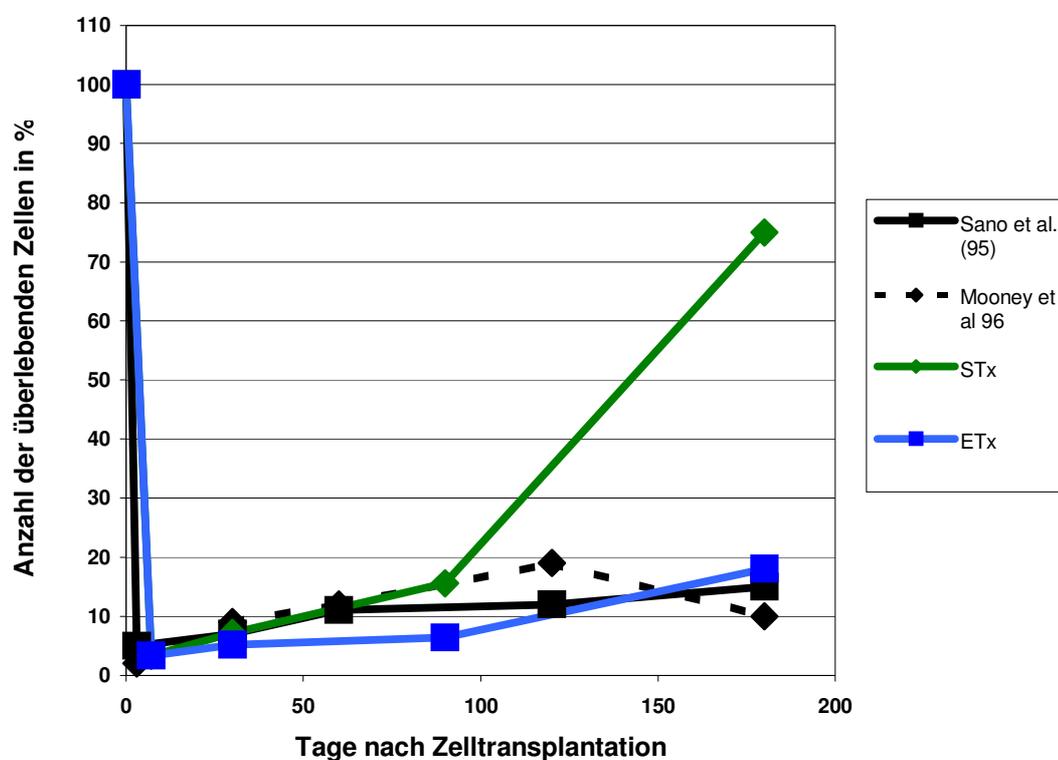


Abbildung 37: Zeigt im Vergleich die normierte Gesamtzellmenge im Langzeitverlauf sowohl von unseren Versuchsgruppen STx und ETx als auch die Daten aus zwei publizierten Studien Mooney et al.[60] und Sano et al.[78]

PCS-Stimulus

Um die Auswirkung einer langfristigen Stimulation der heterotopen Hepatozyten studieren zu können, haben wir bei der Hälfte der Tiere einen portocavalen Shunt (PCS) angelegt.

Aus Zellkulturstudien ist bekannt, dass viele Faktoren wie Insulin, $\text{TNF}\alpha$, EGF, ALR und Glukagon, welche sich im porto-venösen Blut befinden, einen hepatotropen Effekt [87; 17; 19] haben. Die Anlage eines PCS bewirkt durch die Umgehung des Firstpass-Effektes, dass diese Faktoren vermehrt systemisch wirksam werden [60; 39; 49] und führt so zu einer dauerhaften Stimulation der heterotopen Hepatozyten [35; 60; 39; 49]. Der Effekt des PCS zeigt sich in unserer Untersuchung unabhängig von der Vorkultur sowohl in ETx+ als auch STx+ durch statistisch signifikant größere Hepatozyteneinzelareale ($p= 0,001$) gegenüber den Gruppen ohne PCS (ETx- und STx-). Da aber im Gegenzug die Anzahl der Hepatozyteneinzelareale im Vergleich zu den Gruppen ohne PCS (ETx- und STx-) leicht erniedrigt war ($p=0,031$ statistisch nicht signifikant in der univarianten Faktorenanalyse (da keine Varianzgleichheit) ist die Gesamtfläche der heterotopen Hepatozyten gegenüber den nicht stimulierten Gruppen nicht signifikant erhöht ($p= 0,080$). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von dem, das die Arbeitsgruppe um Mooney erhoben hat, welche in ihrer Studie einen großen Effekt der PCS Stimulation zeigte [60]. Bei ihren Experimenten konnte nur die Gruppe mit PCS einen Zuwachs des von heterotopen Hepatozyten bedeckten Areals verzeichnen. Daraus leitet Mooney die Theorie ab, dass bei der Hepatozytentransplantation in ein Tier mit normaler Leberfunktion eine Stimulation notwendig ist, da sonst die heterotop transplantierten Hepatozyten in ihrem Wachstum gehemmt werden [60]. In unserer Studie ergibt sich auch in den Gruppen ohne Stimulus ein Anstieg der Fläche der heterotopen Hepatozyten. Für ETx- zeigt sich mit $p=0,063$ ein Anstieg und für STx- mit $p= 0,043$ eine signifikante Flächenzunahme. Unsere Ergebnisse werden von andere Studien bestätigt [39; 40; 49] wobei interessanterweise bei den heterotopen Hepatozyten auch ohne Stimulus eine, verglichen mit der in der normalen Rattenleber, erhöhte Proliferationsrate gefunden wurde [40]. Eine mögliche Erklärung für die vermehrte Proliferation könnte eine Entzündungsreaktion innerhalb der Matrix sein, da die dadurch freigesetzten Mediatoren wie z.B. $\text{TNF}\alpha$ [19] und Il-6 [53] einen hepatotropen Effekt besitzen. Die Entzündung innerhalb der Matrix wird durch verschiedene Faktoren verursacht z.B. durch den chirurgischen Eingriff, die Art der transplantierten Zellen und durch die Fremdkörperreaktion, die selbst eine bioabbaubare Matrix hervorruft [2]. Eine weitere Erklärung für das Wachstum der heterotopen Hepatozyten ist die Stimulation durch nichtparenchymatöse Zellen, welche in unterschiedlichem Anteil in der Hepatozytensuspension enthalten sind und so mittransplantiert werden. Je nach Protokoll

schwankt ihr Anteil in der Zelllösung zwischen 1% und 5%. Bei der von uns verwendeten Methode wird die Zellsuspension, um sie von Erythrozyten und toten Zellen zu reinigen, dreimal bei 50 G zentrifugiert. Dadurch erhalten wir eine Hepatozytenlösung mit ca. 2-5% nichtparenchymatösen Zellen. Mooney et al. sowie weitere Arbeitsgruppen haben, um eine reinere Zellsuspension zu erhalten, noch zusätzlich eine Percoll-Gradientenzentrifugation durchgeführt. Dadurch enthält ihre Zelllösung deutlich weniger als 1% nichtparenchymatöse Hepatozyten. Diese spielen in vivo eine große Rolle sowohl in der Proliferationsförderung wie auch in der Wachstumshemmung der Leberzellen. Die äußerst komplexe Regulation geschieht durch Zell-Zell-Kontakte, EZM-Modifikation und durch parakrine Ausschüttung von hepatotropen Faktoren wie HGF, TGF- β , IL-6 und TNF- α [53]. Das am besten untersuchte in vivo Modell der Leberwachstumsregulation ist die partielle Hepatektomie. Abbildung 38 zeigt einen Teil der von Malik et al [53] postulierten wachstumsstimulierenden Signale während der Leberregeneration nach einem solchen Eingriff. Aus zahlreichen in vitro Studien ist weiterhin bekannt, dass nichtparenchymatöse Zellen sowohl das Überleben wie auch die Funktion der Hepatozyten entscheidend fördern [54; 56]. Da aber die nichtparenchymatösen Zellen auch ursächlich an der Ausbildung von Leberpathologien wie z.B. der Leberzirrhose beteiligt sind, ist die Transplantation von einem hohen nichtparenchymatösen Leberzellanteil in der Zellsuspension nicht ohne Gefahren. Ein optimales Verhältnis muss somit erst durch zukünftige Studien bestimmt werden.

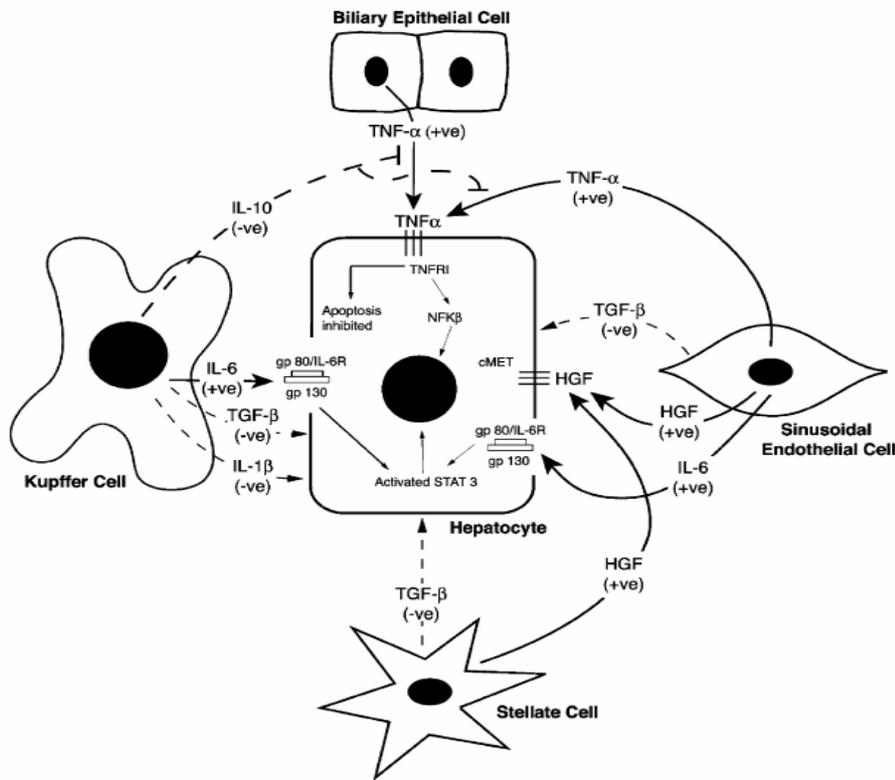


Abbildung 38: Zeigt die bekannten Signalwege zwischen nicht parenchymatösen Leberzellen und Hepatozyten während der Leberregeneration welche die DNA-Synthese der Hepatozyten beeinflussen. Abbildung und Text wurde entnommen aus [53].

Histologie und Aufbau des heterotopen Leberneogewebes

Betrachtet man das neu entstandene Gewebe innerhalb der Matrix, so kann man zu allen Zeitpunkten in allen Gruppen vitale Hepatozyten nachweisen. Diese werden von einem entzündlichen fibrovaskulären Bindegewebe umgeben, welches innerhalb der ersten sieben Tage nach der Transplantation einwächst. Die sich ausbildende Fremdkörperreaktion gegen die PLLA-Matrix zeigt sich histologisch in zahlreichen Riesenzellen vom Langhanstyp, führte aber in keinem Fall zu einer Kapselbildung. Nach und nach wird das fibrovaskuläre Bindegewebe in Fettgewebe umgewandelt. Besonders häufig sieht man Leberzellen mit direktem Kontakt zu Fettzellen. Die Arbeitsgruppe um Lee [49] machte in ihrer Versuchsreihe eine ähnliche Beobachtung und stellte die Theorie auf, dass eine positive Beeinflussung der Hepatozyten durch Adipozyten existieren könnte. Aus Zellkulturen ist bekannt, dass fettspeichernde Ito-Zellen das Überleben von Hepatozyten verlängern können [99]. In den HE Färbungen sieht man um die und in den

heterotopen Hepatozytenarealen viele Blutgefäße. Eine Erklärung für diesen ungewöhnlichen Gefäßreichtum könnte eine Stimulierung der Angiogenese durch die transplantierten Hepatozyten sein, z.B. durch VEGF-Sekretion, wie sie typischerweise nach Hepatektomien in der regenerierenden Leber nachweisbar ist [91]. Auch das sich langsam durch Hydrolyse zu Laktat zerlegende Polymer könnte die Angiogenese stimulieren, außerdem ist es ein bedeutender Faktor in der Wundheilung und wirkt hauptsächlich über eine Herabregulierung der ADP-Ribosylation [22]. Ein Umstand, der die Angiogenese durch vermehrte VEGF-Produktion in Makrophagen [98] steigert und zu einer vermehrten Kollagensynthese in Fibroblasten [10] führt. Die heterotopen Leberzellareale sind eine Woche nach der Transplantation noch sehr klein und umfassen ca. 2-10 Zellen. Nach sechs Monaten enthalten sie bis zu 200 Zellen. Histologisch konnten wir die Proliferation durch die immunhistologische Färbung mit PCNA nachweisen. Dabei zeigte sich die größte proliferative Aktivität in den stimulierten Gruppen vier Wochen post transplantationem. Um die heterotopen Hepatozyten genauer zu charakterisieren haben wir mittels Antikörper gegen Zytokeratin 18 und Aktin das Zytoskelett untersucht. Dabei zeigte sich, dass dies in Verteilung und Struktur normalen Leberzellen der Ratte entspricht. Als funktionellen Parameter haben wir per PAS Färbung die Fähigkeit zur Glykogenspeicherung und -abgabe untersucht. Dabei ist es uns erstmalig gelungen, nachzuweisen, dass die heterotopen Hepatozyten fähig sind, in vivo den natürlichen Gehalt an Glykogen wieder herzustellen und über den gesamten Versuchszeitraum beizubehalten. Weitere leberzellspezifische Funktionen der heterotopen Hepatozyten wie Albuminsynthese [39], Generierung von Ascorbinsäure [100], Korrektur einer Hyperurikämie [90] und einer Histidinämie [80] konnten in verschiedenen Studien von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der differenzierten Leberfunktion ist ein wichtiger Aspekt in den bisherigen Untersuchungen außen vor geblieben, nämlich das Galledrainagesystem. Dies besteht in der Leber aus zwei Anteilen: den von Gallengangsepithelzellen gebildeten Gallengängen und den von den Leberzellen gebildeten Gallekanalikuli. Das von den Hepatozyten produzierte Gallensekret wird in die, untereinander in Verbindung stehenden, Gallekanalikuli sezerniert und wird dort aktiv durch die Kontraktion der Aktinfilamente in Richtung Portalfeld transportiert [107]. Dort befinden sich die Heringschen Kanälchen, welche die Verbindung zwischen Gallekanalikuli und Gallengängen herstellen. Durch CK7/19-Färbung konnten wir zeigen,

dass wir weder Gallengangsepithelien transplantiert haben, noch welche durch Differenzierung von eventuell mittransplantierten Leberstammzellen, oder durch Transdifferenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark entstanden sind. Durch die fluoreszenzimmunhistologische Darstellung des Aktingerüstes können wir Gallekanalikuli nachweisen, welche als tubuläre Strukturen zwischen den einzelnen Hepatozyten liegen und ein Netzwerk ausbilden (Abbildungen 26-29). Damit ist uns der erste Nachweis gelungen, dass die matrixbasierte heterotope Transplantation von Hepatozyten ein Leberneogewebe erzeugt, in dem Gallekanalikuli ausgebildet werden. Vergleicht man die verschiedenen Versuchsgruppen, so sieht man, dass durch Vorkultur das Aktingerüst schon zum ersten Zeitpunkt dem der nativen Leber gleicht. Hingegen zeigen Hepatozyten der Gruppen ohne Vorkultur zwar schon einzelne Gallekanalikuli, aber das Aktingerüst ist noch nicht so klar definiert wie in der normalen Leber (Abbildung 27) Nach vier Wochen ist zwischen den Gruppen kein Unterschied mehr auszumachen, und während den nächsten zwanzig Wochen zeigt sich das Gallekanalikulinetzwerk unverändert, ohne degenerative Zeichen wie z.B. die Formation von Zysten zu zeigen (s. Abbildung 29). Da wir in den HE-gefärbten Schnitten keine Anzeichen einer intrazellulären oder extrazellulären Cholestase gesehen haben, nehmen wir an, dass eventuell durch Resorptionsvorgänge innerhalb des Peritoneums ein Abtransport des Gallensekretes über das Lymphsystem stattfindet. Weitere Studien sind nötig, um z.B. mit fluoreszenzmarkierten Stoffen, die von den Hepatozyten in die Gallekanalikuli sezerniert werden, den genauen Mechanismus zu untersuchen und unsere These zu beweisen.

Zusammenfassung

Einleitung: Eines der größten Probleme der Zelltransplantation ist der hohe Anfangsverlust von über 95% der Zellen. Ziel dieser Studie war es, zu prüfen, ob eine in vitro Konditionierung der Hepatozyten zu Spheroïden in der matrixbasierten heterotopen Zelltransplantation über die Schaffung einer der physiologischen Nanoumgebung ähnlicheren Situation zu einer erhöhten Transplantationseffizienz führt. Um eine Suppression der transplantierten Zellen zu umgehen, untersuchten wir außerdem eine Stimulation der heterotopen Hepatozyten durch einen portocavalen Shunt.

Methoden: Eingeteilt in vier Gruppen erhielten die Tiere (Lewisratten) Hepatozyten, die zuvor mithilfe einer Kollagenaseverdautechnik isoliert worden waren. Diese wurden als Einzelzellen implantiert oder vorher zu Spheroïden auf PLLA-Matrizes angezüchtet (3-tägige Flusskultur). Bei zwei der Gruppen wurde eine portocavaler Shunt angelegt. Um den zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, explantierten wir nach 1, 4, 12 und 24 Wochen und führten morphometrische und morphologische Analysen durch.

Ergebnis: Insgesamt wurden 272 Matrizes aus 68 Versuchstieren explantiert. Dabei zeigte sich in der histologischen Aufarbeitung, dass in allen Gruppen zu allen Zeitpunkten vitales heterotopes Lebergewebe gebildet wurde, welches eine über die gesamte Versuchszeit immunhistochemisch nachweisbare Proliferationsaktivität zeigte. Die Vorkultur der Hepatozyten führte zu einem hochsignifikanten Anstieg der normalisierten Gesamtzellmenge auf bis zu 75% gemessen nach 24 Wochen gegenüber 25% in der Einzelzelltransplantation. Wohingegen der portocavale Shunt keine weitere Steigerung der normalisierten Gesamtzellmenge brachte aber die Hepatozyteneinzelareale signifikant vergrößerte. Wir konnten in den heterotopen Hepatozyten immunhistochemisch ein leberähnliches Zytoskelett und histologisch eine intakte Glykogenspeicherung demonstrieren. Darüber hinaus ist uns der erste Nachweis eines sich formierenden Gallekanalikulissystems in den mesenterial implantierten Matrizes gelungen.

Diskussion: Anhand dieser Daten konnten wir zeigen, dass eine Vorkultur die normalisierte Gesamtzellmenge nach Transplantation deutlich verbessert und deshalb Eingang in die Standards der Zelltransplantation finden sollte.

Anhang

Tabelle 4 Anzahl der Spherioide pro Gesichtsfeld

Probe	Spherioide/ Gesichtsfeld								Mittelwert
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	64	73	69	62	55	72	59	57	64
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	73	58	53	61	53	56	58	83	62
28	38	41	23	37	23	45	36	35	35
29	29	44	61	70	58	53	40	45	50
30	52	64	40	70	48	70	63	48	57
31	65	59	38	66	33	25	25	51	45
32	42	38	55	65	48	53	61	39	50
33	43	66	71	38	44	24	54	71	51
34	18	17	28	34	41	12	30	36	27
35	27	42	22	60	30	35	28	70	39
36	55	48	86	80	73	68	43	66	65
85	57	64	59	57	78	43	82	68	64
86	49	60	49	34	75	71	68	79	61
87	33	44	28	28	15	38	50	26	33
88	44	37	27	32	19	35	12	26	29
89	21	46	42	27	21	53	58	24	37
90	36	31	29	50	31	45	46	47	39
91	80	74	66	71	61	71	65	76	71
92	11	19	22	18	32	25	46	24	25
93	30	25	39	34	36	47	49	38	37
94	38	44	45	51	22	35	54	30	40
95	29	43	25	59	36	40	39	45	40
96	20	13	26	17	56	25	26	35	27
97	69	67	59	48	56	46	49	39	54
98	58	56	38	57	49	62	38	57	52
99	24	18	9	4	3	36	24	17	17
100	25	28	42	41	44	47	31	47	38
Mittelwert	45	43	47	42	46	46	47	45	45

Tabelle 5 Durchmesser der Spheroide:

Probe	Durchmesser [μm]								Mittelwert
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	
21									
22									
23									
24									
25	100	110	80	120	80	60	120	130	100
26									
27	80	90	100	100	90	110	90	90	94
28	100	80	80	100	110	80	90	100	93
29	120	100	130	80	80	150	100	110	109
30	60	100	80	110	60	110	80	100	88
31	50	80	80	70	90	110	100	110	86
32	130	150	150	80	150	120	110	110	125
33	80	50	100	90	100	80	80	100	85
34	49	36	80	80	100	80	110	60	74
35	80	70	70	120	70	90	80	100	85
36	100	130	110	130	110	120	100	120	115
85	100	110	110	100	100	80	100	90	99
86	120	130	100	90	110	100	90	80	103
87	110	120	100	110	90	100	110	140	110
88	120	100	90	120	90	70	100	110	100
89	100	100	110	90	100	90	110	100	100
90	100	80	90	130	110	70	80	120	98
91	100	130	140	120	160	130	120	130	129
92	100	110	80	110	80	90	100	80	94
93	100	80	100	90	70	90	120	120	96
94	120	130	120	80	100	110	100	110	109
95	140	110	120	110	110	100	110	140	118
96	100	100	60	120	80	80	100	100	93
97	140	110	90	80	120	110	100	130	110
98	130	160	100	100	110	150	110	90	119
99	160	110	130	100	80	0	210	120	114
100	90	110	100	70	60	80	90	100	88
Mittelwert	103	100	100	97	95	104	107	103	101

Tabelle 6 DNA-Messung der Matrices nach der Vorkultur:

Probe	Messung 1 (DNA in µg)	Messung 2 (DNA in µg)	Messung 3 (DNA in µg)	Mittelwert (DNA in µg)
21				
22				
23				
24				
25	8,0	10,1	9,8	9,3
26	11,6	8,3	8,6	9,5
27	13,8	11,9	9,5	11,7
28	6,5	9,4	9,6	8,5
29	7,6	7,2	8,4	7,7
30	9,1	8,6	7,3	8,3
31	7,8	7,8	6,4	7,3
32	11,2	8,0	4,9	8,0
33	4,6	7,1	7,3	6,3
34	3,5	3,8	5,5	4,3
35	5,7	6,4	6,0	6,0
36				
84				
85	4,7	5,4	5	5,0
86	9	9	9	9,0
87	7,6	7,9	8	7,8
89	8,2	7,6	7,7	7,8
90	7,5	3	9	6,5
91	13	14	11	12,7
92	9,3	9,3	8,5	9,0
93	12,7	11,7	11,8	12,0
94	4,2	4,4	4,3	4,3
95	5,1	3,5	3,5	4,0
96	4,1	3,5	3,3	3,6
97	6,1	5,8	5,7	5,9
98	4,2	5,3	4,1	4,5
99	3,6	2,8	2,5	3,0
100	8,5	7,6	9,5	8,5
Mittelwert				7,3

Tabelle 8: Morphometrische Daten von ETx-

Zeitraum [Wochen]	Probe	Schnitt	Fläche der Hep. [cm ²]	Anzahl der Hep.	Größe der Areale [cm ²]	Fläche der Matrix [cm ²]
1	5	1	0,042040	38,0	0,001106	8,85
		2	0,038780	35,0	0,001108	8,85
		3	0,014620	28,0	0,000522	8,85
1	6	1	0,002349	5,0	0,000470	11,08
		2	0,001850	2,0	0,000925	11,08
		3	0,000112	1,0	0,000112	11,08
1	7	1	0,006200	3,0	0,002067	10,28
		2	0,002070	3,0	0,000690	10,28
		3	0,005360	4,0	0,001340	10,28
1	8	1	0,026600	23,0	0,001157	11,62
		2	0,035810	24,0	0,001492	11,62
		3	0,016520	17,0	0,000972	11,62
4	9	1	0,038160	13,0	0,002935	12,38
		2	0,017260	7,0	0,002466	12,38
		3	0,011250	4,0	0,002813	12,38
4	10	1	0,067500	28,0	0,002411	10,06
		2	0,099200	36,0	0,002756	10,06
		3	0,099200	32,0	0,003100	10,06
4	11	1	0,062160	21,0	0,002960	9,66
		2	0,026800	10,0	0,002680	9,66
		3	0,018000	10,0	0,001800	9,66
4	12	1	0,008200	4,0	0,002050	10,46
		2	0,005940	5,0	0,001188	10,46
		3	0,011100	6,0	0,001850	10,46
12	13	1	0,019160	8,0	0,002395	16,42
		2	0,020565	10,0	0,002057	16,42
		3	0,045960	15,0	0,003064	16,42
12	14	1	0,002990	2,0	0,001495	10,32
		2	0,000000	0,0	0,000000	10,32
		3	0,003700	3,0	0,001233	10,32
12	15	1	0,021800	9,0	0,002422	11,74
		2	0,037800	10,0	0,003780	11,74
		3	0,025600	8,0	0,003200	11,74
12	16	1	0,110950	28,0	0,003963	11,26
		2	0,137040	33,0	0,004153	11,26
		3	0,128000	37,0	0,003459	11,26
24	17	1	0,021805	6,0	0,003634	12,99
		2	0,071577	15,0	0,004772	12,99
		3	0,040428	7,0	0,005775	12,99
24	18	1	0,017940	12,0	0,001495	9,24
		2	0,047988	8,0	0,005999	9,24
		3	0,058224	14,0	0,004159	9,24
24	19	1	0,129276	39,0	0,003315	12,93
		2	0,111030	37,0	0,003001	12,93
		3	0,082065	42,0	0,001954	12,93
24	20	1	0,109645	40,0	0,002741	11,85
		2	0,115220	34,0	0,003389	11,85
		3	0,123690	39,0	0,003172	11,85

Tabelle 9: Morphometrische Daten von STx-

Zeitraum [Wochen]	Probe	Schnitt	Fläche der Hep. [cm²]	Anzahl der Hep.	Größe der Areale [cm²]	Fläche der Matrix [cm²]
1	21	1	0,005239	5,0	0,001048	15,54
		2	0,008024	6,0	0,001337	15,54
		3	0,014090	7,0	0,002013	15,54
1	22	1	0,004331	3,0	0,001444	11,93
		2	0,005231	3,0	0,001744	11,93
		3	0,005690	6,0	0,000948	11,93
1	23	1	0,003465	1,0	0,003465	10,60
		2	0,000766	2,0	0,000383	10,60
		3	0,004549	2,0	0,002274	10,60
1	24	1	0,001216	2,0	0,000608	7,88
		2	0,003828	1,0	0,003828	7,88
		3	0,001914	2,0	0,000957	7,88
4	25	1	0,007371	6,0	0,001229	9,75
		2	0,012558	4,0	0,003139	9,75
		3	0,002417	1,0	0,002417	9,75
4	26	1	0,002859	2,0	0,001430	12,14
		2	0,002042	1,0	0,002042	12,14
		3	0,000000	0,0	0,000000	12,14
4	27	1	0,008632	6,0	0,001439	13,32
		2	0,002560	1,0	0,002560	13,32
		3	0,004195	2,0	0,002098	13,32
4	28	1	0,039720	13,0	0,003055	12,40
		2	0,015720	4,0	0,003930	12,40
		3	0,030820	11,0	0,002802	12,40
12	29	1	0,039152	5,0	0,007830	10,64
		2	0,008098	3,0	0,002699	10,64
		3	0,024635	8,0	0,003079	10,64
12	30	1	0,015600	5,0	0,003120	7,20
		2	0,005200	1,0	0,005200	7,20
		3	0,008020	2,0	0,004010	7,20
12	31	1	0,059100	14,0	0,004221	17,70
		2	0,092400	20,0	0,004620	17,70
		3	0,102040	18,0	0,005669	17,70
12	32	1	0,008895	1,0	0,008895	13,09
		2	0,000000	0,0	0,000000	13,09
		3	0,000000	0,0	0,000000	13,09
24	33	1	0,128928	11,0	0,011721	8,54
		2	0,101621	15,0	0,006775	8,54
		3	0,119040	27,0	0,004409	8,54
24	34	1	0,175840	20,0	0,008792	13,27
		2	0,105588	21,0	0,005028	13,27
		3	0,089823	19,0	0,004728	13,27
24	35	1	0,023156	4,0	0,005789	8,61
		2	0,047169	4,0	0,011792	8,61
		3	0,035160	3,0	0,011720	8,61
24	36	1	0,022005	3,0	0,007335	11,52
		2	0,011477	1,0	0,011477	11,52
		3	0,009803	2,0	0,004902	11,52

Tabelle 10: Morphometrische Daten von ETx+

Zeitraum [Wochen]	Probe	Schnitt	Fläche der Hep. [cm²]	Anzahl der Hep.	Größe der Areale [cm²]	Fläche der Matrix [cm²]
1	69	1	0,004083	6,0	0,000681	13,21
		2	0,006550	13,0	0,000504	13,21
		3	0,010869	15,0	0,000725	13,21
1	70	1	0,040616	28,0	0,001451	15,26
		2	0,041854	23,0	0,001820	15,26
		3	0,036480	36,0	0,001013	15,26
1	71	1	0,030205	15,0	0,002014	14,12
		2	0,036780	26,0	0,001415	14,12
		3	0,018443	10,0	0,001844	14,12
1	72	1	0,006441	3,0	0,002147	16,51
		2	0,006124	7,0	0,000875	16,51
		3	0,002066	1,0	0,002066	16,51
4	73	1	0,006328	3,0	0,002109	12,94
		2	0,016101	4,0	0,004025	12,94
		3	0,002950	2,0	0,001475	12,94
4	101	1	0,015695	7,0	0,002242	11,98
		2	0,018981	8,0	0,002373	11,98
		3	0,003941	2,0	0,001970	11,98
4	102	1	0,048595	16,0	0,003037	14,47
		2	0,050201	17,0	0,002953	14,47
		3	0,047979	17,0	0,002822	14,47
4	103	1	0,039250	10,0	0,003925	9,14
		2	0,066204	13,0	0,005093	9,14
		3	0,100690	15,0	0,006713	9,14
12	82	1	0,076280	7,0	0,010897	12,67
		2	0,073470	5,0	0,014694	12,67
		3	0,074874	6,0	0,012479	12,67
12	83	1	0,009180	1,0	0,009180	9,50
		2	0,012393	1,0	0,012393	9,50
		3	0,031443	2,0	0,015722	9,50
12	84	1	0,224156	17,0	0,013186	14,74
		2	0,194488	31,0	0,006274	14,74
		3	0,167864	27,0	0,006217	14,74
12	104	1	0,084080	8,0	0,010510	12,18
		2	0,045681	8,0	0,005710	12,18
		3	0,015770	3,0	0,005257	12,18
24	74	1	0,390720	28,0	0,013954	17,44
		2	0,349184	24,0	0,014549	17,44
		3	0,150640	10,0	0,015064	17,44
24	75	1	0,163391	7,0	0,023342	9,75
		2	0,108290	3,0	0,036097	9,75
		3	0,093300	8,0	0,011663	9,75
24	76	1	0,225828	19,0	0,011886	10,28
		2	0,214500	13,0	0,016500	10,28
		3	0,296436	24,0	0,012352	10,28
24	80	1	0,011417	3,0	0,003806	10,55
		2	0,058968	1,0	0,058968	10,55
		3	0,000000	0,0	0,000000	10,55

Tabelle 11: Morphometrische Daten von STx+

Zeitraum [Wochen]	Probe	Schnitt	Fläche der Hep. [cm²]	Anzahl der Hep.	Größe der Areale [cm²]	Fläche der Matrix [cm²]
1	85	1	0,008301	5,0	0,001660	13,13
	85	2	0,046688	2,0	0,023344	13,13
	85	3	0,002154	1,0	0,002154	13,13
1	86	1	0,001531	1,0	0,001531	13,13
	86	2	0,001745	4,0	0,000436	13,13
	86	3	0,002934	2,0	0,001467	13,13
1	87	1	0,024372	13,0	0,001875	13,62
	87	2	0,025632	8,0	0,003204	13,62
	87	3	0,018623	18,0	0,001035	13,62
1	90	1	0,000000	0,0	0,000000	0,00
	90	2	0,000000	0,0	0,000000	0,00
	90	3	0,000000	0,0	0,000000	0,00
4	88	1	0,012513	2,0	0,006256	11,71
	88	2	0,002612	2,0	0,001306	11,71
	88	3	0,012813	10,0	0,001281	11,71
4	89	1	0,009870	4,0	0,002468	11,51
	89	2	0,006793	3,0	0,002264	11,51
	89	3	0,016700	2,0	0,008350	11,51
4	91	1	0,034430	3,0	0,011477	11,41
	91	2	0,023170	7,0	0,003310	11,41
	91	3	0,017046	2,0	0,008523	11,41
4	92	1	0,006936	2,0	0,003468	14,97
	92	2	0,007255	3,0	0,002418	14,97
	92	3	0,010531	5,0	0,002106	14,97
12	93	1	0,018885	2,0	0,009443	10,06
	93	2	0,005397	1,0	0,005397	10,06
	93	3	0,036472	2,0	0,018236	10,06
12	94	1	0,026586	8,0	0,003323	17,75
	94	2	0,011522	4,0	0,002881	17,75
	94	3	0,033770	7,0	0,004824	17,75
12	96	1	0,004564	1,0	0,004564	12,66
	96	2	0,032336	2,0	0,016168	12,66
	96	3	0,006360	1,0	0,006360	12,66
12	100	1	0,088356	7,0	0,012622	13,92
	100	2	0,109536	5,0	0,021907	13,92
	100	3	0,088144	6,0	0,014691	13,92
24	95	1	0,056340	4,0	0,014085	11,17
	95	2	0,034664	3,0	0,011555	11,17
	95	3	0,148148	15,0	0,009877	11,17
24	97	1	0,000000	0,0	0,000000!	10,31
	97	2	0,000000	0,0	0,000000	10,31
	97	3	0,000000	0,0	0,000000	10,31
24	98	1	0,070550	5,0	0,014110	9,25
	98	2	0,125548	3,0	0,041849	9,25
	98	3	0,096724	8,0	0,012091	9,25
24	99	1	0,081808	7,0	0,011687	11,00
	99	2	0,155624	7,0	0,022232	11,00
	99	3	0,061887	4,0	0,015472	11,00

Literaturverzeichnis

1. Abu-Absi SF, Friend JR, Hansen LK and Hu WS, (2002). Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res* 274: 56-67.
2. Aiken J, Cima L, Schloo B, Mooney D, Johnson L, Langer R and Vacanti JP, (1990). Studies in rat liver perfusion for optimal harvest of hepatocytes. *J Pediatr Surg* 25: 140-144; discussion 144-145.
3. Awwad HK, el Naggat M, Mocktar N and Barsoum M, (1986). Intercapillary distance measurement as an indicator of hypoxia in carcinoma of the cervix uteri. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1329-1333.
4. Benedetti E, Kirby JP, Asolati M, Blanchard J, Ward MG, Williams R, Hewett TA, Fontaine M and Pollak R, (1997). Intrasplenic hepatocyte allotransplantation in dalmation dogs with and without cyclosporine immunosuppression. *Transplantation* 63: 1206-1209.
5. Broelsch CE, Whittington PF, Emond JC, Heffron TG, Thistlethwaite JR, Stevens L, Piper J, Whittington SH and Lichtor JL, (1991). Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results. *Ann Surg* 214: 428-437; discussion 437-429.
6. Cai K, Liu W, Li F, Yao K, Yang Z, Li X and Xie H, (2002). Modulation of osteoblast function using poly(D,L-lactic acid) surfaces modified with alkylation derivative of chitosan. *J Biomater Sci Polym Ed* 13: 53-66.
7. Carlisle ES, Mariappan MR, Nelson KD, Thomes BE, Timmons RB, Constantinescu A, Eberhart RC and Bankey PE, (2000). Enhancing hepatocyte adhesion by pulsed plasma deposition and polyethylene glycol coupling. *Tissue Eng* 6: 45-52.
8. Chen SC, Hewitt WR, Watanabe FD, Eguchi S, Kahaku E, Middleton Y, Rozga J and Demetriou AA, (1996). Clinical experience with a porcine hepatocyte-based liver support system. *Int J Artif Organs* 19: 664-669.
9. Chen SC, Mullon C, Kahaku E, Watanabe F, Hewitt W, Eguchi S, Middleton Y, Arkadopoulos N, Rozga J, Solomon B and Demetriou AA, (1997). Treatment of severe liver failure with a bioartificial liver. *Ann N Y Acad Sci* 831: 350-360.

10. Constant JS, Feng JJ, Zabel DD, Yuan H, Suh DY, Scheuenstuhl H, Hunt TK and Hussain MZ, (2000). Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair Regen* 8: 353-360.
11. Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM and Langer R, (1997). Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res* 35: 513-523.
12. Cusick RA, Lee H, Sano K, Pollok JM, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R and Vacanti JP, (1997). The effect of donor and recipient age on engraftment of tissue-engineered liver. *J Pediatr Surg* 32: 357-360.
13. Dandri M, Burda MR, Gocht A, Torok E, Pollok JM, Rogler CE, Will H and Petersen J, (2001). Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* 34: 824-833.
14. David H, (1979). Veränderung des Volumens und der Oberfläche von Leberzellen männlicher Ratten während der postnatalen Entwicklung. *Acta biol. med. germ.* 38: 935-952.
15. Enosawa S, Miyashita T, Suzuki S, Li XK, Tsunoda M, Amemiya H, Yamanaka M, Hiramatsu S, Tanimura N, Omasa T, Suga K and Matsumura T, (2000). Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for development of a bioartificial liver. *Cell Transplant* 9: 711-715.
16. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV and Strom SC, (1998). Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338: 1422-1426.
17. Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I and Starzl TE, (1994). Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 20: 747-757.
18. Frisch SM and Francis H, (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124: 619-626.

19. Gandhi CR, Murase N, Subbotin VM, Uemura T, Nalesnik M, Demetris AJ, Fung JJ and Starzl TE, (2002). Portacaval shunt causes apoptosis and liver atrophy in rats despite increases in endogenous levels of major hepatic growth factors. *J Hepatol* 37: 340-348.
20. Gerlach JC, Encke J, Hole O, Muller C, Ryan CJ and Neuhaus P, (1994). Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion. *Transplantation* 58: 984-988.
21. Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM and Cima MJ, (1996). Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J Biomater Sci Polym Ed* 8: 63-75.
22. Gladden LB, (2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 558: 5-30.
23. Goodrich EO, Jr., Welch HF, Nelson JA, Beecher TS and Welch CS, (1956). Homotransplantation of the canine liver. *Surgery* 39: 244-251.
24. Gosnell JE, Wong CB, Kumwenda ZL, Welch WJ and Harris HW, (2000). Extracellular matrix regulates the hepatocellular heat shock response. *J Surg Res* 91: 43-49.
25. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ and Wilson JM, (1994). Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6: 335-341.
26. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A and Novikoff PM, (1999). Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 29: 509-519.
27. Hamazaki K, Doi Y and Koide N, (2002). Microencapsulated multicellular spheroid of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 49: 1514-1516.
28. Hashikura Y, Makuuchi M, Kawasaki S, Matsunami H, Ikegami T, Nakazawa Y, Kiyosawa K and Ichida T, (1994). Successful living-related partial liver transplantation to an adult patient. *Lancet* 343: 1233-1234.

29. Holzman MD, Rozga J, Neuzil DF, Griffin D, Moscioni AD and Demetriou AA, (1993). Selective intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic and Gunn rats. *Transplantation* 55: 1213-1219.
30. Hsu SM RL, Fanger H., (1981). The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981: 816-821.
31. Hughes RD and Williams R, (1993). Use of sorbent columns and haemofiltration in fulminant hepatic failure. *Blood Purif* 11: 163-169.
32. Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Gawron A and Kandefer-Szerszen M, (2002). The effect of heat shock, cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp27 expression in human normal and tumour cells. *Folia Histochem Cytobiol* 40: 31-35.
33. Jirtle RL, Biles C and Michalopoulos G, (1980). Morphologic and histochemical analysis of hepatocytes transplanted into syngeneic hosts. *Am J Pathol* 101: 115-126.
34. Kaufmann PM, Kneser U, Fiegel HC, Kluth D, Herbst H and Rogiers X, (1999). Long-term hepatocyte transplantation using three-dimensional matrices. *Transplant Proc* 31: 1928-1929.
35. Kaufmann PM, Sano K, Uyama S, Schloo B and Vacanti JP, (1994). Heterotopic hepatocyte transplantation using three-dimensional polymers: evaluation of the stimulatory effects by portacaval shunt or islet cell cotransplantation. *Transplant Proc* 26: 3343-3345.
36. Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder KP, Liu T, Finegold M, Darlington G and Pokorny W, (1992). Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 89-93.
37. Kennan, (1965). Modifications of the portocaval shunt in the rat. *J Appl Physiol* 20: 1357-1358.

38. Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H and Rogiers X, (1999). Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islet cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric evaluation. *Pediatr Surg Int* 15: 168-174.
39. Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H and Rogiers X, (1999). Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *J Biomed Mater Res* 47: 494-503.
40. Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Rogiers X, Kluth D and Herbst H, (1999). Interaction of hepatocytes and pancreatic islets cotransplanted in polymeric matrices. *Virchows Arch* 435: 125-132.
41. Koide N, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Shinji T, Mori M and Tsuji T, (1990). Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Exp Cell Res* 186: 227-235.
42. Kosaka T, Tsuboi S, Fukaya K, Pu H, Ohno T, Tsuji T, Miyazaki M and Namba M, (1996). Spheroid cultures of human hepatoblastoma cells (HuH-6 line) and their application for cytotoxicity assay of alcohols. *Acta Med Okayama* 50: 61-66.
43. Kulig KM and Vacanti JP, (2004). Hepatic tissue engineering. *Transpl Immunol* 12: 303-310.
44. Kusano M and Mito M, (1982). Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 82: 616-628.
45. Labaraca C and Paigen K, (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay. *Anal. Biochem.* 102: 344-352.
46. Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R and Marceau N, (1985). Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 101: 914-923.

47. Langer R and Vacanti JP, (1993). Tissue engineering. *Science* 260: 920-926.
48. Lee H, Cusick RA, Browne F, Ho Kim T, Ma PX, Utsunomiya H, Langer R and Vacanti JP, (2002). Local delivery of basic fibroblast growth factor increases both angiogenesis and engraftment of hepatocytes in tissue-engineered polymer devices. *Transplantation* 73: 1589-1593.
49. Lee H, Cusick RA, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R and Vacanti JP, (2003). Effect of implantation site on hepatocytes heterotopically transplanted on biodegradable polymer scaffolds. *Tissue Eng* 9: 1227-1232.
50. Lee S and Fischer B, (1961). Portocaval shunt in the rat. *Surgery* 668-672.
51. Ma PX and Choi JW, (2001). Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng* 7: 23-33.
52. Ma PX, Zhang R, Xiao G and Franceschi R, (2001). Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 54: 284-293.
53. Malik R, Selden C and Hodgson H, (2002). The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 13: 425-431.
54. Michalopoulos GK, Bowen WC, Zajac VF, Beer-Stolz D, Watkins S, Kostrubsky V and Strom SC, (1999). Morphogenetic events in mixed cultures of rat hepatocytes and nonparenchymal cells maintained in biological matrices in the presence of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Hepatology* 29: 90-100.
55. Mikos AG, Lyman MD, Freed LE and Langer R, (1994). Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 15: 55-58.
56. Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T and Mochizuki Y, (1999). Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 29: 111-125.

57. Mooney DJ, Kaufmann PM, Sano K, McNamara KM, Vacanti JP and Langer R, (1994). Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges. *Transplant Proc* 26: 3425-3426.
58. Mooney DJ, Kaufmann PM, Sano K, Schwendeman SP, Majahod K, Schloo B, Vacanti JP and Langer R, (1996). Localized delivery of epidermal growth factor improves the survival of transplanted hepatocytes. *Biotechnol Bioeng* 50: 422-429.
59. Mooney DJ, Park S, Kaufmann PM, Sano K, McNamara K, Vacanti JP and Langer R, (1995). Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. *J Biomed Mater Res* 29: 959-965.
60. Mooney DJ, Sano K, Kaufmann PM, Majahod K, Schloo B, Vacanti JP and Langer R, (1997). Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges. *J Biomed Mater Res* 37: 413-420.
61. Moscioni AD, Rozga J, Chen S, Naim A, Scott HS and Demetriou AA, (1996). Long-term correction of albumin levels in the Nagase analbuminemic rat: repopulation of the liver by transplanted normal hepatocytes under a regeneration response. *Cell Transplant* 5: 499-503.
62. Nitschke M, Schmack G, Janke A, Simon F, Pleul D and Werner C, (2002). Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res* 59: 632-638.
63. Ogawa K, Asonuma K, Inomata Y, Kim I, Ikada Y, Tabata Y and Tanaka K, (2001). The efficacy of prevascularization by basic FGF for hepatocyte transplantation using polymer devices in rats. *Cell Transplant* 10: 723-729.
64. Okada Y, Saito S, Fujisawa K, Yagi T and Tanaka N, (2000). Does adenovirus-mediated viral IL-10 gene transfer prolong survival of xenogeneic spheroidal aggregate-cultured hepatocytes? *Transplant Proc* 32: 1021-1023.
65. Olszewski WL, (2003). Clinical and experimental transplantation of isolated organ or tissue cells indications problems from the Polish perspective. *Transplant Proc* 35: 2355-2357.

66. Olszewski WL, Hiwot H, Interewicz B, Rudowska A, Szyper E and Mecner B, (1999). Hepatocyte transplantation--in vitro cytotoxic reaction of autologous granulocytes and mononuclears to isolated hepatocytes. *Ann Transplant* 4: 11-16.
67. Ota K, Saito S, Hamasaki K, Tanaka N and Orita K, (1996). Transplantation of xenogeneic hepatocytes: three-dimensionally cultured hepatocyte (spheroid) transplantation into the spleen. *Transplant Proc* 28: 1430-1432.
68. Peshwa MV, Wu FJ, Sharp HL, Cerra FB and Hu WS, (1996). Mechanistics of formation and ultrastructural evaluation of hepatocyte spheroids. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 197-203.
69. Pinkse GG, Voorhoeve MP, Noteborn M, Terpstra OT, Bruijn JA and De Heer E, (2004). Hepatocyte survival depends on beta1-integrin-mediated attachment of hepatocytes to hepatic extracellular matrix. *Liver Int* 24: 218-226.
70. Pollok J-M (2003). *Tissue Engineering von Lebergewebe in einem dynamischen Flußkultur-Bioreaktor zur Transplantation*. Med. Habilitation. Universität Hamburg.
71. Pollok JM, Kluth D, Cusick RA, Lee H, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R, Broelsch CE and Vacanti JP, (1998). Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions. *Eur J Pediatr Surg* 8: 195-199.
72. Pollok JM and Vacanti JP, (1996). Tissue engineering. *Semin Pediatr Surg* 5: 191-196.
73. Raia S, Nery JR and Mies S, (1989). Liver transplantation from live donors. *Lancet* 2: 497.
74. Rogiers X, Malago M, Gawad K, Jauch KW, Olausson M, Knoefel WT, Gundlach M, Bassas A, Fischer L, Sterneck M, Burdelski M and Broelsch CE, (1996). In situ splitting of cadaveric livers. The ultimate expansion of a limited donor pool. *Ann Surg* 224: 331-339; discussion 339-341.

75. Rozga J, Holzman M, Moscioni AD, Fujioka H, Morsiani E and Demetriou AA, (1995). Repeated intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic rats. *Cell Transplant* 4: 237-243.
76. Saito S, Sakagami K, Matsuno T, Tanakaya K, Takaishi Y and Orita K, (1992). Long-term survival and proliferation of spheroidal aggregate cultured hepatocytes transplanted into the rat spleen. *Transplant Proc* 24: 1520-1521.
77. Sakaguchi K, Koide N, Asano K, Takabatake H, Matsushima H, Takenami T, Ono R, Sasaki S, Mori M and Koide Y, (1991). Promotion of spheroid assembly of adult rat hepatocytes by some factor(s) present in the initial 6-hour conditioned medium of the primary culture. *Pathobiology* 59: 351-356.
78. Sano K, Cusick RA, Lee H, Pollok JM, Kaufmann PM, Uyama S, Mooney D, Langer R and Vacanti JP, (1996). Regenerative signals for heterotopic hepatocyte transplantation. *Transplant P* 28: 1857-1858.
79. Seglen OP, (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 29-83.
80. Selden C, Calnan D, Morgan N, Wilcox H, Carr E and Hodgson HJ, (1995). Histidinemia in mice: a metabolic defect treated using a novel approach to hepatocellular transplantation. *Hepatology* 21: 1405-1412.
81. Selden C and Hodgson H, (2004). Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol* 12: 273-288.
82. Shatford RA, Nyberg SL, Meier SJ, White JG, Payne WD, Hu WS and Cerra FB, (1992). Hepatocyte function in a hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver. *J Surg Res* 53: 549-557.
83. Shinji T, Koide N and Tsuji T, (1988). Glycosaminoglycans partially substitute for proteoglycans in spheroid formation of adult rat hepatocytes in primary culture. *Cell Struct Funct* 13: 179-188.
84. Smets FN, Chen Y, Wang LJ and Soriano HE, (2002). Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Mol Genet Metab* 75: 344-352.

85. Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T and Hetzer R, (2002). Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *Asaio J* 48: 12-16.
86. Starzl TE, Demetris AJ and Van Thiel D, (1989). Liver transplantation (1). *N Engl J Med* 321: 1014-1022.
87. Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH and Putnam CW, (1973). The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 137: 179-199.
88. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS and Waddell WR, (1963). Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surg Gynecol Obstet* 117: 659-676.
89. Sussman NL and Kelly JH, (1993). Artificial liver: a forthcoming attraction. *Hepatology* 17: 1163-1164.
90. Takeda T, Kim TH, Lee SK, Langer R and Vacanti JP, (1995). Hepatocyte transplantation in biodegradable polymer scaffolds using the Dalmatian dog model of hyperuricosuria. *Transplant Proc* 27: 635-636.
91. Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K and Sata M, (2001). Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem* 49: 121-130.
92. Then P, Sandbichler P, Erhart R, Dietze O, Klima G, Vogel W and Margreiter R, (1991). Hepatocyte transplantation into the lung for treatment of acute hepatic failure in the rat. *Transplant Proc* 23: 892-893.
93. Thornberry NA and Lazebnik Y, (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
94. Tong JZ, Bernard O and Alvarez F, (1990). Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. *Exp Cell Res* 189: 87-92.

95. Tong JZ, De Lagausie P, Furlan V, Cresteil T, Bernard O and Alvarez F, (1992). Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res* 200: 326-332.
96. Torok E, Pollok JM, Ma PX, Kaufmann PM, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Kluth D, Perner F and Rogiers X, (2001). Optimization of hepatocyte spheroid formation for hepatic tissue engineering on three-dimensional biodegradable polymer within a flow bioreactor prior to implantation. *Cells Tissues Organs* 169: 34-41.
97. Torok E, Pollok JM, Ma PX, Vogel C, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Kaufmann PM, Kluth D and Rogiers X, (2001). Hepatic tissue engineering on 3-dimensional biodegradable polymers within a pulsatile flow bioreactor. *Dig Surg* 18: 196-203.
98. Trabold O, Wagner S, Wicke C, Scheuenstuhl H, Hussain MZ, Rosen N, Seremetiev A, Becker HD and Hunt TK, (2003). Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. *Wound Repair Regen* 11: 504-509.
99. Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Imuro Y and Yamaoka Y, (2002). Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. *J Hepatol* 36: 590-599.
100. Uyama S, Kaufmann PM, Kneser U, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Vacanti JP and Rogiers X, (2001). Hepatocyte transplantation using biodegradable matrices in ascorbic acid-deficient rats: comparison with heterotopically transplanted liver grafts. *Transplantation* 71: 1226-1231.
101. Uyama S, Kaufmann PM, Takeda T and Vacanti JP, (1993). Delivery of whole liver-equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation. *Transplantation* 55: 932-935.
102. Vacanti JP, (1988). Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture. *Arch Surg* 123: 545-549.
103. Vacanti JP and Langer R, (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354 Suppl 1: S132-34.

104. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A and Langer R, (1988). Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 23: 3-9.
105. Valentijn AJ, Zouq N and Gilmore AP, (2004). Anoikis. *Biochem Soc Trans* 32: 421-425.
106. Wake MC, Patrick CW, Jr. and Mikos AG, (1994). Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. *Cell Transplant* 3: 339-343.
107. Watanabe N, Tsukada N, Smith CR and Phillips MJ, (1991). Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol* 113: 1069-1080.
108. Woo KM, Chen VJ and Ma PX, (2003). Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res* 67A: 531-537.
109. Wu FJ, Friend JR, Rimmel RP, Cerra FB and Hu WS, (1999). Enhanced cytochrome P450 IA1 activity of self-assembled rat hepatocyte spheroids. *Cell Transplant* 8: 233-246.
110. Yang S, Leong KF, Du Z and Chua CK, (2002). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng* 8: 1-11.

Danksagung

Ganz herzlichen Dank möchte ich in erster Linie meinem Doktorvater PD Dr. Dr. med. Jörg-Matthias Pollok für die wunderbare Betreuung, die Hilfe und nicht zuletzt für die Überlassung des Themas sagen. Er hat mir nicht nur Grundlagen der Chirurgie und Mikrochirurgie vermittelt, sondern auch gezielt mein wissenschaftliches Denken und meine persönliche Entwicklung gefördert. So konnte ich mit seiner Unterstützung meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen präsentieren. Ein Höhepunkt, den ich durch ihn erleben durfte, war die gemeinsame Kongressreise nach Orlando zum Treffen der International Tissue Engineering Society.

Außerdem ermöglichte er mir dankenswerterweise Forschungsaufenthalte bei Peter X. Ma in Ann Arbor und Peter Nagy in Budapest.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei seiner Ehefrau und meiner Betreuerin Dr. med. Eva Török, die mich in die Geheimnisse der Leberzellisolation eingeweiht hat, immer ein offenes Ohr für die kleinen Probleme im Labor hatte, und mir somit während der gesamten Zeit eine große Hilfe war.

Auch Ulrike Markus, Inga Horstmann und Stefan Melbeck, meinen Kollegen und Mitarbeitern im Labor, möchte ich für die nette und kollegiale Stimmung danken. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Kollegen Christian Cordes, der mir ein zuverlässiger und guter Partner war, und mit dem ich gemeinsam unzählige Stunden im Tieroperationsraum verbracht habe.

Meiner Schwester Astrid Lütgehetmann, meiner Freundin Beate und ihrer Mutter Margot Schmidt möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit ganz herzlich danken.

Der Schlussdank soll besonders herzlich an meine Eltern Renate und Heinz-Otto Lütgehetmann gehen. Sie haben nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern haben auch durch ihre Geduld und ihre moralische Unterstützung mich auf meinem Weg durch diese Arbeit begleitet.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geb. am 27.06.1975 in Dorsten,
ledig

Schule und Zivildienst

22/06/1995 Abitur am Melanchthongymnasium Bretten,
09/1995 - 09/1996 Zivildienst beim DRK Pforzheim, Ausbildung zum
Rettungshelfer, Einsatz als Rettungswagenfahrer

Studium

04/1997 -05/2004 Studium der Medizin an der Universität Hamburg,
09/1999 Physikum,
09/2000 1. Staatsexamen
04/2003 2. Staatsexamen
05/2004 3. Staatsexamen,

Praktisches Jahr

04/2003 - 08/2003 Abteilung für Innere Medizin, AK St. Georg,
08/2003 - 12/2003 Urologische Klinik und Polyklinik, UKE
12/2003 - 3/2004 Klinik und Polyklinik für Chirurgie, UKE

Forschungsaufenthalte im Rahmen der Doktorarbeit

06/2004, Budapest Siebentägiger Aufenthalt an der Semmelweisuniversität in Budapest in dem 1. Institut für Pathologie und experimentale Tumorforschung, bei PD Dr. med. P. Nagy.

07- 09/2004, Ann Arbor Forschungsaufenthalt an der Universität von Michigan, Department of Materials Sciences and Biochemical Engineering, bei Prof. Peter X. Ma, Ziel des Aufenthaltes ist die Erarbeitung und Durchführung von Oberflächenmodifikationen zur Optimierung der heterotopen Hepatozytenzelltransplantation.

Beruf

Seit 11/2004 Angestellt als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Jörg Petersen, Medizinische Klinik 1, am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

Publikationen

Originalarbeiten

M. Dandri, T K. Volz, M. Lütgehetmann, & J. Petersen
Animal Models of Hepadnavirus Infection
Accepted in Viral Hepatology

Publizierte Abstracts

Pollok JM, Török É, Ma PX, Lütgehetmann M, Cordes C, Melbeck S, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Düllmann J, Will H, Rogiers X.
Engineered hepatic tissue.
Wound Repair and Regeneration 2003;11(5):A26.

Lütgehetmann M, Pollok JM, Cordes C, Török, É, Ma PX, Dandri M, Petersen J, Van de Sand C, Heussler V, Rogiers X.
In Flusskultur gehaltene Hepatozyten bilden innerhalb von 2 Tagen Leberneogewebe mit Ausbildung von reifen Gallenkanalikuli.
Transplantationsmedizin 2003 (Supplement): 49 - 50.

Cordes C, Lütgehetmann M, Török E, Ma PX, Dandri M, Petersen J, Rogiers X, Pollok JM.
Pre-cultivation of hepatocytes on a PLLA-polymer in a flow bioreactor increases the newly formed liver mass after transplantation.
Cytotherapy 2004;6(3):273.

Lütgehetmann M, Török E, Ma PX, Cordes C, Vogel C, Dandri M, Petersen J, Van de Sand C, Heussler V, Rogiers X, Pollok JM.
Heterotopically transplanted hepatocytes produce liver neo-tissue with proliferative activity and expression of a mature bile canaliculi network.
Transplantation 2004; 78(2) (Supplement): 636 (P1218).

Pollok JM, Lütgehetmann M, Vogel C, Török E, Ma PX, Cordes C, Dandri M, Petersen J, Van de Sand C, Heussler V, Rogiers X.
Determination of the optimal flow-culture period for hepatocyte spheroids for transplantation purpose.
Transplantation 2004; 78(2) (Supplement): 437 (P675).

Pollok JM, Lütgehetmann M, Paku S, Török E, Ma PX, Dandri M, Petersen J, Nagy P, Rogiers X.
Konfokalmikroskopische Analyse von in vivo gebildeten heterotopen Leberneogewebe nach Matrix basierter Leberzelltransplantation.
Transplantationsmedizin 2004 (Supplement): 31 - 32.

Pollok JM, Lütgehetmann M, Török É, Ma PX, Cordes C, Dandri M, Petersen J, Rogiers X.
Hepatocyte transplantation as spheroids on biodegradable polymer matrix.
Folia Hepatologica 2005, 9 (Supplement 1): 16.

Preise

Travel grant (Young investigators)

11th European Society for Organ Transplantation (ESOT) September 21-24, 2003, Venedig, Italien.

Posterpreis

12. Jahrestagung der DTG, 2.-4. Oktober 2003, Münster

ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....