

Aus der Abteilung für Hepatobiliäre Chirurgie
Chirurgische Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

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

Tissue Engineering von Leberersatzgewebe

-

**Optimierung der in-vitro-Kulturbedingungen für hepatozelluläre
Spheroide auf dreidimensionalen Polymermatrizes vor der
heterotopen Transplantation in einem dynamischen Kulturmodell
durch den Vergleich verschiedener Flussgeschwindigkeiten des
Zellkulturmediums**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Curd Christian Vogel
aus Wipperfürth

Hamburg im Frühjahr 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

05.12.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die /der Vorsitzende/r:

PD Dr. J.-M. Pollok

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

PD Dr. J. Petersen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

PD Dr. P. Adamietz

Für meine Eltern und Tanja

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Erkrankungen der Leber und ihre gesellschaftliche Bedeutung	14
1.2 Die Lebertransplantation - Ein Therapieverfahren mit Nachteilen	15
1.3 Tissue Engineering	17
1.4 Tissue Engineering als Alternative zur Lebertransplantation	18
1.5 Tissue Engineering von Leberersatzgewebe unter Verwendung dynamischer Kulturmodelle mit pulsatilem Fluss des Zellkulturmediums	19
1.6 Versuchsstrategie	20
2. Material und Methoden	
2.1 Gewinnung der Hepatozyten	21
2.1.1 Art und Herkunft der operierten Ratten	21
2.1.2 Durchführung der Operation und Perfusion der Leber	21
2.1.2.1 Aufbau der Perfusionsapparatur	21
2.1.2.2 Durchführung der Operation	22
2.1.2.3 Perfusion der Leber	22
2.1.2.4 Herstellung der verwendeten Grund- und Pufferlösungen	24
2.1.2.4.1 Leffert´s stock buffer	24
2.1.2.4.2 EGTA-Lösung	24
2.1.2.4.3 CaCl ₂ -Lösung	24
2.1.2.4.4 Pufferlösung I	24
2.1.2.4.5 Pufferlösung II	24
2.1.2.4.6 Kollagenase-Lösung	24
2.1.3 Isolation der Hepatozyten	25
2.1.3.1 Herstellung der Zellsuspension	25
2.1.3.2 Bestimmung der Vitalität und Zellkonzentration	25
2.1.4 Aussiedlung der Zellen auf die PLLA-Polymere	26

2.2 Kultivierung der Hepatozyten im Bioreaktor	27
2.2.1 Herstellung und Aufbau der Poly-L-Laktat-Säure (-acid) -(PLLA)-Polymere	27
2.2.2 Aufbau des Bioreaktors	28
2.2.3 Kultivierung im Bioreaktor	29
2.2.3.1 Herstellung des hormonstimulierten Mediums	32
2.2.4 Probenentnahmen	32
2.2.5 Beendigung der Kultivierung	33
2.2.6 Auszählung der Spheroide und deren Durchmesserbestimmung	34
2.3 Statische Kultivierung der Hepatozyten im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor	34
2.3.1 Statische Kultivierung zur Bestimmung des Ammoniakabbaus	35
2.3.2 Statische Kultivierung zur Bestimmung der MEGX (Monoethylglycinylidid)-Bildung	36
2.4 Bestimmung der Albuminkonzentration im Zellkulturmedium	36
2.4.1 Herstellung der verwendeten Reagenzien	38
2.4.1.1 0,05 M Carbonatpuffer	38
2.4.1.2 Waschlösung	38
2.4.1.3 Citrat-Phosphatpuffer	38
2.4.1.4 Natriumfluoridlösung	38
2.5 Quantitative DNA-Messung	38
2.5.1 DNA-Isolierung	38
2.5.2 Durchführung der quantitativen DNA-Bestimmung	39
2.6 Bestimmung der Ammoniakkonzentration im Zellkulturmedium	40
2.7 Bestimmung der MEGX-Konzentration im Zellkulturmedium	41
2.8 Materialien	42
3. Ergebnisse	
3.1 Gewinnung der Hepatozyten	48
3.2 Anzahl und Durchmesser der Spheroide	49
3.3 Albuminkonzentration im Zellkulturmedium	57

	Seite
3.4 Quantitative DNA-Bestimmung	64
3.5 Ammoniakabbau in 4-stündiger statischer Kultur	69
3.6 MEGX (Monoethylglycinylidid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur	77
3.7 Veränderungen des Zellkulturmediums in 6-tägiger Kultur	83
4. Diskussion	90
5. Zusammenfassung	102
6. Literaturverzeichnis	103
7. Danksagung	113
8. Lebenslauf	114
9. Erklärung	116

Tabellen, Diagramme und Abbildungen

I. Tabellen

Tabelle 2.1 Übersicht über die Beendigung der verschiedenen Kulturen und die Probenentnahmen im Verlauf einer 6-tägigen Kultur	33
Tabelle 2.8.1 Reagenzien und Lösungen	42
Tabelle 2.8.2 Gefäße und Zubehör	44

Tabelle 2.8.3	
Geräte	46
Tabelle 3.1	
Hepatozytengewinnung	48
Tabelle 3.2.1	
Anzahl der Spheroide in 20 Gesichtsfeldern bei 25-facher Vergrößerung; Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min	51
Tabelle 3.2.1.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4	52
Tabelle 3.2.2	
Anzahl der Spheroide in 20 Gesichtsfeldern bei 25-facher Vergrößerung; Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min	52
Tabelle 3.2.2.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5	52
Tabelle 3.2.3	
Anzahl der Spheroide in 20 Gesichtsfeldern bei 25-facher Vergrößerung; Flussgeschwindigkeit: 52 ml/min	53
Tabelle 3.2.3.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6	53
Tabelle 3.2.4	
Durchmesser der Spheroide in μm ; Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min	54

Tabelle 3.2.4.1 Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4	54
Tabelle 3.2.5 Durchmesser der Spheroide in μm ; Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min	55
Tabelle 3.2.5.1 Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5	55
Tabelle 3.2.6 Durchmesser der Spheroide in μm ; Flussgeschwindigkeit: 52 ml/min	56
Tabelle 3.2.6.1 Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6	56
Tabelle 3.3.1 Hepatozytenisolationen H-1 und H-4 Mediumalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min	59
Tabelle 3.3.2 Hepatozytenisolationen H-2 und H-5 Mediumalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min	60

Tabelle 3.3.3 Hepatozytenisolationen H-3 und H-6 Mediumalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit: 52 ml/min	61
Tabelle 3.3.4 Hepatozytenisolationen H-1 und H-4 Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min	62
Tabelle 3.3.5 Hepatozytenisolationen H-2 und H-5 Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min	62
Tabelle 3.3.6 Hepatozytenisolationen H-3 und H-6 Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min	63
Tabelle 3.4.1 DNA-Standardkurve; Zellsuspension gelöst in PBS	66
Tabelle 3.4.2 Hepatozytenisolationen H-1 und H-4 DNA-Gehalt in µg/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung; Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min	67

Tabelle 3.4.2.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4	67
Tabelle 3.4.3	
Hepatozytenisolationen H-2 und H-5	
DNA-Gehalt in µg/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;	
Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min	67
Tabelle 3.4.3.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5	68
Tabelle 3.4.4	
Hepatozytenisolationen H-3 und H-6	
DNA-Gehalt in µg/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;	
Flussgeschwindigkeit: 52 ml/min	68
Tabelle 3.4.4.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6	69
Tabelle 3.5.1	
Hepatozytenisolationen H-1 und H-4	
Ammoniak (NH ₃)-Abbau in 4-stündiger statischer Kultur einer	
Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor;	
Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min	72
Tabelle 3.5.1.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4	73

Tabelle 3.5.2	
Hepatozytenisolationen H-2 und H-5	
Ammoniak (NH ₃)-Abbau in 4-stündiger statischer Kultur einer Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min	73
Tabelle 3.5.2.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5	74
Tabelle 3.5.3	
Hepatozytenisolationen H-3 und H-6	
Ammoniak (NH ₃)-Abbau in 4-stündiger statischer Kultur einer Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; Flussgeschwindigkeit: 52 ml/min	74
Tabelle 3.5.3.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6	75
Tabelle 3.5.4	
NH ₃ -Abbau pro Hepatozyt in 4 Stunden (AFR: 7 ml/min)	76
Tabelle 3.5.5	
NH ₃ -Abbau pro Hepatozyt in 4 Stunden (AFR: 24 ml/min)	76
Tabelle 3.5.6	
NH ₃ -Abbau pro Hepatozyt in 4 Stunden (AFR: 52 ml/min)	76

Tabelle 3.6.1	
Hepatozytenisolationen H-1 und H-4	
MEGX (Monoethylglycinxylylidid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur einer Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; MEGX in ng/ml	
Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min	79
Tabelle 3.6.1.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4	80
Tabelle 3.6.2	
Hepatozytenisolationen H-2 und H-5	
MEGX (Monoethylglycinxylylidid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur einer Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; MEGX in ng/ml	
Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min	80
Tabelle 3.6.2.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5	80
Tabelle 3.6.3	
Hepatozytenisolationen H-3 und H-6	
MEGX (Monoethylglycinxylylidid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur einer Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; MEGX in ng/ml	
Flussgeschwindigkeit: 52 ml/min	81
Tabelle 3.6.3.1	
Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6	81

Tabelle 3.6.4

MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur (AFR: 7 ml/min) 81

Tabelle 3.6.5

MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur (AFR: 24 ml/min) 82

Tabelle 3.6.6

MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur (AFR: 52 ml/min) 82

Tabelle 3.7.1

Hepatozytenisolationen H-1 und H-4

Elektrolyte, Lactat, O₂- und CO₂-Partialdruck und pH-Wert in den
4 Bioreaktoren (B1 - B4) im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;

Beendigung der Kulturen an Tag 1 (B1), 2 (B2), 4 (B3) und 6 (B4)

Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min 85

Tabelle 3.7.2

Hepatozytenisolationen H-2 und H-5

Elektrolyte, Lactat, O₂- und CO₂-Partialdruck und pH-Wert in den
4 Bioreaktoren (B1 - B4) im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;

Beendigung der Kulturen an Tag 1 (B1), 2 (B2), 4 (B3) und 6 (B4)

Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min 86

Tabelle 3.7.3

Hepatozytenisolationen H-3 und H-6

Elektrolyte, Lactat, O₂- und CO₂-Partialdruck und pH-Wert in den
4 Bioreaktoren (B1 - B4) im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;

Beendigung der Kulturen an Tag 1 (B1), 2 (B2), 4 (B3) und 6 (B4)

Flussgeschwindigkeit: 52 ml/min 88

II. Diagramme

Diagramm 3.1	
Durchschnittliche Spheroidanzahl pro Gesichtsfeld im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	50
Diagramm 3.2	
Durchschnittlicher Spheroiddurchmesser in μm im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	51
Diagramm 3.3	
Mediumalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	57
Diagramm 3.4	
Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	58
Diagramm 3.5	
DNA-Standardkurve	64
Diagramm 3.6	
DNA-Gehalt der auf den Polymeren ausgesiedelten Hepatozyten im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	66
Diagramm 3.7	
Ammoniakabbau in 4-stündiger statischer Kultur im Anschluss an die Kultur im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	70

Diagramm 3.8 NH ₃ -Abbau pro Hepatozyt in pg in 4 Stunden statischer Kultur im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	71
Diagramm 3.9 MEGX (Monoethylglycinxylylid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur im Anschluss an die Kultur im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	77
Diagramm 3.10 MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur in pg im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	78
Diagramm 3.11 pH-Werte und Laktatkonzentrationen im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	83
Diagramm 3.12 O ₂ - und CO ₂ -Partialdrücke im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit	84
<u>III. Abbildungen</u>	
Abbildung 2.1 Operationssitus	23
Abbildung 2.2 Aussiedlung der Hepatozyten auf die PLLA-Polymere	26

Abbildung 2.3 Schematischer Aufbau eines Bioreaktors	28
Abbildung 2.4 PLLA-Polymer mit ausgesiedelten Hepatozyten in der zylindrischen Zellkulturkammer des Bioreaktors	30
Abbildung 2.5 Vollständig zusammengesetzter Bioreaktor angeschlossen an die in der Grundplatte integrierte Pumpe vor Kulturbeginn	31
Abbildung 3.1 Spheroide Zellaggregate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 150 µm auf dem Polymergerüst nach 6-tägiger Kultur im Bioreaktor. Flussgeschwindigkeit: 24 ml/min	49

1. Einleitung

1.1 Erkrankungen der Leber und ihre gesellschaftliche Bedeutung

Die Leber ist die größte Drüse des menschlichen Organismus und besitzt eine herausragende Bedeutung für den gesamten Stoffwechsel. Sie ist insgesamt an mehr als 500 verschiedenen Stoffwechselfvorgängen beteiligt.¹ Neben ihrer zentralen Bedeutung für den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel finden in der Leber mannigfaltige Reaktionen an körperfremden und körpereigenen Stoffen statt die zusammenfassend als Biotransformation bezeichnet werden und die vor allem eine Entgiftungsfunktion für den Organismus besitzen.² Bereits ein partieller Funktionsverlust des Organs kann schwerwiegende Folgen bis hin zur Notwendigkeit des Organersatzes haben. In der Bundesrepublik Deutschland sind schätzungsweise vier bis fünf Millionen Menschen von Lebererkrankungen betroffen, wovon etwa zwei bis drei Millionen auf übermäßigen Alkoholkonsum zurückzuführen sind.³ Alkohol ist in Deutschland in etwa 80% der Fälle auch die Hauptursache chronischer Lebererkrankungen mit zirrhotischen Veränderungen des Organs, gefolgt von chronischen Verläufen der Hepatitis B und C und anderen Ursachen.⁴ Die Anzahl der Todesfälle durch chronische Lebererkrankungen lag in der Bundesrepublik in den Jahren 1997 bis 2000 relativ konstant bei 18.500 pro Jahr.⁵ Im Vergleich liegt sie damit zum Teil deutlich über den Zahlen, die in anderen westeuropäischen Staaten erreicht werden und reicht fast an die 25 bis 30.000 jährlichen Todesfälle in den Vereinigten Staaten mit einer nahezu viermal größeren Bevölkerung heran.^{4,5,6} Die Behandlung chronischer Lebererkrankungen stellt auch einen enormen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar. Im Jahr 1995 wurden beispielsweise etwa 40.500 Männer und 25.500 Frauen stationär behandelt, was ungefähr 1,1 Millionen Pflegetagen entspricht.⁷ Die mit diesen Erkrankungen assoziierten direkten Kosten betragen jährlich annähernd eine Milliarde Euro, ohne die zusätzlichen Kosten, die durch den Ausfall der Erwerbstätigkeit und die Inanspruchnahme der sozialen Sicherungssysteme entstehen.⁷

Die bisher einzige Möglichkeit, bei akutem Leberversagen, chronischen Lebererkrankungen im Endstadium und bestimmten Erkrankungen bedingt durch metabolische Defekte eine Chance auf Heilung zu bewirken, besteht in der orthotopen Lebertransplantation. Die Liste der Erkrankungen, die durch eine Lebertransplantation behandelt wurden, ist im Laufe der Zeit immer umfangreicher

geworden. Während 1982 etwas mehr als 20 verschiedene Erkrankungen durch eine Transplantation behandelt wurden waren es 1989 bereits mehr als 60 Erkrankungen.⁸ Die häufigsten zugrundeliegenden Diagnosen sind im Erwachsenenalter die Folgezustände chronisch aktiver Hepatitiden, der primären biliären Zirrhose (PBC), der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), sowie weiterhin das akute fulminante Leberversagen, angeborene Stoffwechselerkrankungen, wie beispielsweise der Morbus Wilson, und durch Alkohol bedingte Lebererkrankungen.^{8,9} Im pädiatrischen Bereich sind als Hauptursachen für durchgeführte Transplantationen vor allem die Gallengangsatresie und metabolische Defekte zu nennen.^{8,9} Das entscheidende Hauptproblem für die Durchführung von Lebertransplantationen und anderen Organtransplantationen ist nach wie vor der Mangel an geeigneten Spenderorganen. Nach Angaben der Deutschen Stiftung für Organtransplantationen (DSO) warten in der Bundesrepublik Deutschland zur Zeit etwa 11.500 Patienten auf ein neues Organ.¹⁰ Im Jahr 2004 konnten jedoch insgesamt nur 4061 Transplantationen durchgeführt werden.¹⁰ Ungefähr ein Drittel der Patienten auf der Warteliste verstarb an den zugrundeliegenden Erkrankungen. Insgesamt wurden in Deutschland im Jahr 2004 881 Lebern transplantiert, im Jahr 2003 waren es 855.¹⁰ Die bemerkenswert hohe Regenerationsfähigkeit der Leber führte in den letzten Jahren zur Einführung und Etablierung neuer Transplantationsmethoden. Hierzu zählen die Leberteiltransplantation, die erstmals 1988 erfolgreich durchgeführte Split-Lebertransplantation, sowie die Leber-Lebendspende, deren Anteil jedoch seit 2001 von 12,5% stetig auf 7,3% im Jahr 2004 gesunken ist.^{10,11,12,13,14} Die dargestellten Verfahren konnten zwar die Problematik des Spendermangels verringern, aber sie reichen bei weitem nicht aus, um den Organbedarf zu decken, da die Anzahl an durchgeführten Transplantationen nahezu stagniert während die Zahl an Neuanmeldungen für die Warteliste stetig steigt.

1.2 Die Lebertransplantation – Ein Therapieverfahren mit Nachteilen

Die orthotope Transplantation der Leber, die erstmalig erfolgreich im Jahr 1963 durchgeführt wurde, ist bei vielen schwerwiegenden mit einem Funktionsverlust einhergehenden Erkrankungen des Organs die heute einzig vorhandene kurative Therapieoption für die betroffenen Patienten. Durch die permanente Weiterentwicklung der operativen Techniken und der medikamentösen

Begleittherapie stellt sie heute ein akzeptiertes und für viele Patienten lebensrettendes Therapieverfahren mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von zur Zeit etwa 62% nach erfolgter Primärtransplantation dar.^{10,15} Dennoch gibt es viele gute Gründe alternative Behandlungsverfahren zu erforschen, bzw. zu entwickeln. So ist die Lebertransplantation nach wie vor ein großer chirurgischer Eingriff, der aufgrund des hohen logistischen Aufwandes und der Notwendigkeit des Vorhandenseins entsprechender organisatorischer und medizinischer Erfahrungswerte nur an wenigen Zentren durchgeführt werden kann, und der nach wie vor mit vielen potentiellen Risiken für die operierten Patienten verbunden ist.^{10,16} Die Liste möglicher Komplikationen ist lang und reicht von den üblichen mit einem chirurgischen Eingriff dieser Größenordnung verbundenen Operationsrisiken über die postoperative Dysfunktion des Transplantats bis hin zum primären Transplantatversagen, wobei das Auftreten derartiger Komplikationen signifikant mit der Anzahl der durchgeführten Eingriffe in einem Zentrum pro Jahr korreliert, was in einer groß angelegten amerikanischen Studie von Edwards et al. gezeigt werden konnte.^{8,15,17,18} Die einzige mögliche Therapieform bei einer Dysfunktion des Transplantats besteht in der Retransplantation des Organs, die jedoch mit deutlich gesteigerten Mortalitätsraten und der Abnahme der 5-Jahres-Überlebensrate auf 39% behaftet ist.^{10,18,19} Weiterhin ist der nach einer Organtransplantation notwendige Einsatz immunsuppressiver Medikamente kritisch zu bewerten. Neu eingeführte Immunsuppressiva wie zum Beispiel Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil oder poly- und monoklonale Antikörper wie BT 563, Daclizumab und Basiliximab haben die Prognose der Patienten zwar entschieden verbessert, aber die zum Teil beträchtlichen Nebenwirkungen, sowie die lebenslange Abhängigkeit von diesen Medikamenten verbunden mit engmaschigen klinischen Kontrollen der Patienten dürfen nicht vergessen werden.¹⁶ Ein weiteres grundsätzlich nachteiliges Argument ist die Tatsache, dass die Lebertransplantation eine Einheitstherapie für eine Vielzahl unterschiedlicher zugrundeliegender Krankheiten ist von der die Patienten je nach Grunderkrankung und auch abhängig von anderen Faktoren in nur höchst unterschiedlichem Ausmaß profitieren.¹⁸ Sie kann somit der Heterogenität dieser Erkrankungen nicht gerecht werden. Dies bedeutet, dass ein Patient mit einem hepatischen Enzymdefekt die gleiche Therapie erhält wie ein Patient mit einem schwer alkoholgeschädigten zirrhotischen Organ, und somit einige Patienten unter Umständen über das Maß hinaus therapiert werden, bzw. zur Zeit aufgrund noch

fehlender Behandlungsalternativen therapiert werden müssen. Der hauptlimitierende Faktor der Therapieoption Lebertransplantation ist der bereits angeführte dargestellte Mangel an geeigneten Spenderorganen, der dazu führt, dass ein nicht unerheblicher Teil der Patienten auf der Warteliste nicht behandelt werden kann und an den Folgen der Grunderkrankung verstirbt. Aus diesem Grund sind Alternativen zur Transplantation nicht nur wünschenswert sondern zwingend erforderlich.

1.3 Tissue Engineering

Ein vielversprechender alternativer Behandlungsansatz besteht im Rahmen des Tissue Engineering in der Bildung neuen funktionstüchtigen Organgewebes. Tissue Engineering befasst sich mit der Anwendung von Prinzipien und Methoden sowohl aus der Technik als auch aus den Naturwissenschaften, um ein grundlegendes Verständnis für die Beziehung von Aufbau und Funktion von normalem und pathologischem Gewebe zu bekommen und so an der Entwicklung bei der Wiederherstellung, Erhaltung und der Funktionsverbesserung biologischen Gewebes arbeiten zu können.^{20,21} Beispiele für Tissue Engineering datieren bereits aus den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts und im Verlauf der letzten Jahrzehnte ist hieraus ein großer Wissenschaftszweig mit einer Vielzahl von Beschäftigten und großen Finanzumsätzen entstanden.²² Das Prinzip, verlorene Organfunktionen durch die Schaffung neuen funktionell aktiven Organgewebes unter Verwendung lebender Zellen wiederherzustellen, ist mittlerweile für verschiedene Gewebe ausgiebig erforscht und zum Teil schon erfolgreich klinisch angewendet worden. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang zum Beispiel die Deckung flächenhafter Hautdefekte bei Brandopfern durch in vitro gebildetes, aus patienteneigenen Zellen bestehendes neues Hautgewebe.^{20,22,23} Weitere Beispiele sind Anwendungen von Tissue-Engineering-Techniken zur Gewinnung vitalen Knorpel-, Knochen-, Muskel- oder Nervengewebes und anderen Gewebes.^{20,21,23,24} Grundsätzlich werden für die Herstellung funktionellen Organgewebes drei verschiedene Versuchsstrategien angewendet.^{20,21} Einerseits wird mit disseminierten isolierten Zellen experimentiert, die direkt in den Blutkreislauf oder in vorhandene Gewebestrukturen des Empfängers injiziert werden. Andererseits wird sowohl an der Identifikation und Produktion von Faktoren, die die Entstehung neuen Gewebes fördern können, als auch an Methoden, diese fördernden Faktoren effektiv einzusetzen, gearbeitet. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist die Herstellung

geeigneter Matrices, bestehend aus natürlichen oder synthetischen Materialien, die mit Zellen beladen werden können und die ihnen eine Plattform für ein geordnetes, organisiertes Gewebewachstum bieten. Hierbei werden zum einen geschlossene Systeme, bei denen die Zellen vom Empfängerorganismus zum Beispiel durch eine Membran getrennt werden, und zum anderen offene Systeme, in denen die Zellen in den Empfängerorganismus transplantiert werden und in direktem Kontakt mit dem Gewebe des Empfängers stehen, erforscht.

1.4 Tissue Engineering als Alternative zur Lebertransplantation

Tissue Engineering beinhaltet auch ein großes Potential für die Entwicklung funktionellen Lebergewebes, sowohl für extrakorporale als auch intrakorporale Verfahren. Aufgrund der ungeheuren Komplexität des Organs macht es Sinn, Wege zu suchen, die Grundbausteine der Leber, die Hepatozyten, in geeigneter Form zu organisierter und funktionsfähiger Gewebeneubildung anzuregen. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die heterotope Hepatozytentransplantation auf dreidimensionalen, biologisch abbaubaren, synthetischen Polymermatrices trotz noch vieler zu lösender Schwierigkeiten einen hoffnungsvollen Ansatz hierfür darstellt.^{25,26,27,28} Das erhoffte Endziel hierbei ist es, dass die über die Polymermatrices in den Empfängerorganismus eingebrachten Hepatozyten in vorhandene Gewebestrukturen inkorporiert werden und nach der Auflösung der Polymersubstanz funktionsfähiges und lange überlebensfähiges Lebergewebe an der Transplantationsstelle zurückbleibt, welches in der Lage ist, den Ausfall hepatischer Stoffwechselfunktionen zu kompensieren. Ein bei den bisherigen Bemühungen hauptlimitierender Faktor ist der initiale Verlust eines nicht unerheblichen Teils der transplantierten Zellen bei gleichzeitig vorhandener großer Regenerationsfähigkeit der verbliebenen Zellen. Um dieses Problem zu lösen wird unter anderem an einer verbesserten in-vitro-Kultivierung der zu transplanzierenden Zellen gearbeitet. Unter bestimmten Kulturbedingungen sind funktionell aktive, differenzierte Hepatozyten in der Lage, dreidimensionale Zellaggregate mit hoher Zelldichte und leberähnlicher Morphologie, sogenannte Spheroiden zu bilden. Derartige Zellformationen treten in vitro auch bei anderen Zelllinien auf und dienen unter anderem in der Tumorforschung als Studienobjekte zur Untersuchung der Wirkungsweise ionisierender Strahlung und Chemotherapeutika.²⁹ Hepatozelluläre spheroidale

Zellformationen zeichnen sich durch eine höhere Funktionalität und eine verlängerte in-vitro-Überlebensfähigkeit aus, als zum Beispiel Zellen in Monolayer-Kulturen.³⁰⁻⁴⁰

1.5 Tissue Engineering von Leberersatzgewebe unter Verwendung dynamischer Kulturmodelle mit pulsatilem Fluss des Zellkulturmediums

Aus den dargestellten Gründen resultiert der Versuchsansatz, die potentiellen Vorteile dreidimensionaler Polymermatrizes und die positiven funktionellen Erkenntnisse über spheroidale Zellaggregate miteinander zu kombinieren. Die Zielsetzung ist es, durch eine Verbesserung der in-vitro-Kulturbedingungen spheroidaler Zellaggregate vor der heterotopen Transplantation die Überlebens- und Funktionsfähigkeit der Hepatozyten in vivo zu erhöhen. Die ersten Arbeiten zur Spheroidbildung basierten auf zweidimensionalen statischen Kulturen mit positiv aufgeladenen Kulturschalenoberflächen und im weiteren Verlauf mit Beschichtungen der Kulturschalenoberflächen mit Poly-N-Isopropylacrylamidpolymer, Proteoglykanen und anderen Substanzen.⁴¹⁻⁴⁶ Hiervon sind als Weiterentwicklung dynamische Kulturmodelle abzugrenzen, die, angenähert an die physiologische Situation in vivo, beispielsweise zu einer schnelleren Spheroidbildung führen als die statischen Kulturen.^{30,33} Zu den dynamischen Kulturmodellen zählen Rotationskulturverfahren und in letzter Zeit zunehmend Bioreaktorsysteme mit dreidimensionalen Kulturbedingungen und pulsatilem Fluss des Zellkulturmediums.⁴⁷⁻⁵² Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass in Bioreaktoren mit pulsatilen Flussbedingungen auf dreidimensionalen Polymermatrizes ausgesiedelte Hepatozyten bereits nach einem Tag morphologisch intakte, funktionell aktive und gewebspezifische spheroidale Zellformationen bilden, die ihre hohe organspezifische Funktionalität während des Kulturverlaufes behalten und sogar steigern.^{50,51,52} Bestätigt sich die Annahme, dass die optimierte Vorkultivierung hepatozellulärer Spheroide in dynamischen Kulturmodellen zu einer Erhöhung der Überlebens- und Funktionsfähigkeit der Zellen in vivo führt, wäre dies ein weiterer Fortschritt, heterotope Hepatozytentransplantationen auf dreidimensionalen Polymermatrizes als mögliche Alternativform zur Lebertransplantation zu etablieren.

1.6 Versuchsstrategie

In der vorliegenden Versuchsreihe sollen hepatozelluläre spheroidale Zellaggregate in einem dynamischen Kulturmodell kultiviert werden, und die Auswirkungen unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Spheroidbildung und die Funktionalität der Zellen untersucht werden. Die Hepatozyten werden durch ein Kollagenase-digestionsverfahren aus den Lebern männlicher Lewis-Ratten isoliert. Im Anschluss werden die isolierten Zellen in definierter Konzentration auf schwammartig aufgebaute, dreidimensionale, biologisch abbaubare und synthetisch hergestellte Polymermatrizes bestehend aus Poly-L-Laktat-Säure(-acid) (PLLA) ausgesiedelt und in einem Bioreaktorsystem mit rezirkulierendem ständigem Fluss des Zellkulturmediums über sechs Tage kultiviert. Insgesamt werden die Kulturen mit drei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten des Zellkulturmediums durchgeführt. Ziel der Arbeit ist es, die optimale Flussgeschwindigkeit (Average Flow Rate = AFR) für die Entwicklung und Funktionalität der kultivierten Spheroide zu ermitteln. Zu diesem Zweck werden, zum Teil in an die Kultur in den Bioreaktoren anschließenden weiterführenden statischen Kulturen, die Anzahl der gebildeten spheroidalen Zellaggregate bestimmt, und die Fähigkeit der Hepatozyten zur Albuminsynthese und zur Ammoniakentgiftung untersucht. Weiterhin werden quantitative DNA-Bestimmungen und analytische Untersuchungen des Zellkulturmediums durchgeführt. Als weiteren hepatozellulären Funktionsparameter erfolgt die Untersuchung der Cytochrom P450-abhängigen Metabolisierung von Lidocain zu Monoethylglycinxylylidid (MEGX).⁵³ Weiterführende Arbeiten werden dann zeigen müssen, ob sich eine optimierte in-vitro-Kultivierung hepatozellulärer Spheroide auf dreidimensionalen Matrizes vor der heterotopen Transplantation wie erhofft positiv auf die Überlebensfähigkeit und die Aufrechterhaltung organspezifischer Funktionen in vivo auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Hepatozyten

2.1.1 Art und Herkunft der operierten Ratten

Die für die Kultivierung im Bioreaktor benötigten Hepatozyten wurden aus den Lebern syngener, erwachsener, männlicher Lewis-Ratten mit einem Gewicht zwischen 150 bis 350 g isoliert. Die Tiere wurden von der Firma Charles River aus Sulzfeld in Deutschland geliefert. Bis zum Zeitpunkt der Operation erfolgte die Unterbringung der Tiere in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Während der Haltung wurde ein regelmäßiger Tag- und Nachtrhythmus von jeweils 12 Stunden eingehalten. Weiterhin hatten die Tiere zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.1.2 Durchführung der Operation und Perfusion der Leber

2.1.2.1 Aufbau der Perfusionsapparatur

Die Gewinnung der Hepatozyten erfolgte durch eine mehrstufige Perfusion der Leber zunächst mit zwei verschiedenen Pufferlösungen und anschließend mit einer Kollagenaselösung (modifiziert nach Seglen).⁵⁴ Die hierfür notwendige Perfusionsapparatur bestand aus einem Wasserbad, in dem die Perfusionslösungen zunächst auf 37,0 °C angewärmt wurden, sowie einer Pumpe, über die die Perfusionsgeschwindigkeit der Lösungen in den Schlauchsystemen eingestellt werden konnte. Für die Perfusion mit den verschiedenen Lösungen wurden zwei Schlauchsysteme verwendet, die über einen Y-förmigen Adapter an eine Braunüle angeschlossen waren. Beide Schlauchsysteme enthielten eine Luftfalle, um Gasembolien zu vermeiden. Weiterhin besaß jedes System einen Rückfluss zur jeweiligen Perfusionslösungsflasche. Der Durchfluss der Perfusionslösungen zur Braunüle, und der Rückfluss in die Lösungsflaschen wurde in beiden Schlauchsystemen jeweils über einen Dreiweghahn gesteuert. Nach der Vorwärmung der Perfusionslösungen im Wasserbad und gründlicher Ausspülung der Schlauchsysteme mit destilliertem Wasser (Aqua dest.), wodurch der in den Schläuchen zur Desinfektion enthaltene Alkohol (Ethanol 30%) entfernt wurde, erfolgte der Beginn der Operation. Die Flussgeschwindigkeit der Perfusionslösungen betrug 30 ml pro Minute.

2.1.2.2 Durchführung der Operation

Zur Einleitung der Narkose wurden die Lewis-Ratten zunächst kurz mit Äther sediert. Anschließend wurde ihnen Ketanest[®] 100 und Rompun[®] intramuskulär injiziert. Die Dosierung der Substanzen erfolgte in Abhängigkeit vom Gewicht der Tiere. Bei einem Gewicht von 200 g betrug sie 0,2 ml Ketanest[®] 100 und 0,04 ml Rompun[®]. Pro 50 g zusätzlichem Gewicht wurde sie um 0,05 ml Ketanest[®] 100 und 0,01 ml Rompun[®] erhöht. Nach der Narkotisierung wurden die Lewis-Ratten in Rückenlage auf einem Operationsbrett fixiert. Es folgte die Rasur und gründliche Desinfektion des Bauches. Die Eröffnung des Abdomens erfolgte über einen V-förmigen Schnitt. Im Anschluss wurden die Gedärme nach links verlagert, so dass die Vena cava inferior und der Leberhilus zur Darstellung kamen. Nach der Ligatur der Vena pylorica und der Vena lienalis wurde das Tier über die Vena cava inferior mit 5000 IE Heparin-Natrium heparinisiert und etwa eine Minute abgewartet. Daraufhin wurde die Vena portae mit einer Klemme cranial der Vena pylorica abgeklemmt und caudal der Vena lienalis ligiert. Nach erfolgter Inzision etwa in Höhe der Pylorusvene wurde die Braunüle unter Fluss der ersten Pufferlösung in die Vena portae eingeführt und mit der cranialen Klemme gesichert. Durch die nachfolgende infrahepatische Eröffnung der Vena cava inferior wurde das Tier durch Ausbluten getötet.

2.1.2.3 Perfusion der Leber

Die Leber wurde zunächst wie in Abbildung 2.1 dargestellt mit zwei calciumfreien Pufferlösungen (mit und ohne EGTA) und im Anschluss mit einer Kollagenaselösung perfundiert. Sämtliche Perfusionslösungen wurden am Tag der Operation aus verschiedenen Grundlösungen (Zusammensetzungen siehe Punkt 2.1.2.4) frisch angesetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Vor dem Beginn der Perfusion und nach erneuter Kontrolle des pH-Wertes wurden die Lösungen im Wasserbad der Perfusionsapparatur auf 37 °C angewärmt.

Abbildung 2.1

Operationssitus:

Perfusion der Leber über die in die Vena portae eingeführte Braunüle



Die erste Pufferlösung (Pre-perfusion buffer) perfundierte das Organ für vier Minuten. Es schloss sich die zweiminütige Perfusion mit der zweiten Pufferlösung an. Die Perfusion mit der Kollagenaselösung erfolgte so lange, bis die Läppchenstruktur der Leber an der Oberfläche erkennbar wurde. Bei den in diesem Versuch durchgeführten Operationen lagen die Perfusionszeiten der Kollagenaselösung zwischen sieben und zehn Minuten. Nach Beendigung der Perfusion wurde die Leber zügig aber sehr sorgfältig, um Verletzungen der Leberkapsel zu vermeiden, freipräpariert, am Leberhilus abgetrennt und in ein auf Eis liegendes 50 ml Probengefäß mit 20 ml Williams' Medium E ohne L-Glutamin überführt.

2.1.2.4 Herstellung der verwendeten Grund- und Pufferlösungen

2.1.2.4.1 Leffert´s stock buffer (10x)

23,83 g HEPES 100 mM, 2,24 g KCl, 75,87 g NaCl, 1,38 g NaH₂PO₄-H₂O und 18,02 g D⁺-glucose wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4.

2.1.2.4.2 EGTA-Lösung (5 mM)

Zunächst wurden 1,9 g EGTA in 100 ml Leffert´s stock buffer (10x) gelöst. Nach Zugabe von 800 ml Aqua dest. und 26 Tropfen 5 N NaOH wurde die Lösung umgerührt bis die Trübungen verschwunden waren. Das Volumen wurde mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Abschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 und die sterile Filtration der Lösung.

2.1.2.4.3 CaCl₂-Lösung (2,79%)

14 g CaCl₂ wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst. Daraufhin wurde die Lösung steril filtriert.

2.1.2.4.4 Pufferlösung I (Pre-perfusion buffer; Perfusionszeit: 4 Minuten)

Zu 54 ml Leffert´s stock buffer (10x) wurden 60 ml EGTA-Lösung (5 mM) hinzugegeben. Das Volumen wurde mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte die Auffüllung des Volumens auf 600 ml mit Aqua dest. und die sterile Filtration der Lösung.

2.1.2.4.5 Pufferlösung II (Perfusionszeit: 2 Minuten)

50 ml Leffert´s stock buffer (10x) wurden zu 450 ml Aqua dest. hinzugefügt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung abschließend steril filtriert.

2.1.2.4.6 Kollagenase-Lösung:

50 ml Leffert´s stock buffer (10x) und 5 ml CaCl₂-Lösung (2,79%) wurden mit Aqua dest. auf ein Volumen von 400 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Erst kurz vor Operationsbeginn erfolgte die Zugabe von 500 µl Trypsin-inhibitor und 125 mg Kollagenase. Die Lösung wurde bis zur vollständigen Auflösung

der Kollagenase umgerührt. Die Auffüllung des Volumens auf 500 ml erfolgte mit Aqua dest.. Abschließend wurde die Lösung steril filtriert.

2.1.3 Isolation der Hepatozyten

2.1.3.1 Herstellung der Zellsuspension

Die Isolation der Hepatozyten erfolgte direkt im Anschluss an die unter den Punkten 2.1.2.2 und 2.1.2.3 beschriebene Operation der Tiere und Perfusion der Leber. Zunächst wurde das durch die Kollagenase angedaute Organ aus dem mit Williams´ Medium E ohne L-Glutamin gefüllten Probengefäß entnommen und mit dem Zellkulturmedium in eine auf Eis liegende Petrischale überführt. Nach Abschälung der Organkapsel wurde die Leber vorsichtig mit einer Pinzette ausgeschüttelt und geschwenkt bis nach etwa 4 bis 6 Minuten eine homogen aussehende Zellsuspension entstand. Es folgte die Umfüllung und Filterung der Zellsuspension durch einen Nylonfilter mit einer Maschengröße von 200 µm in ein neues auf Eis stehendes 50 ml Probengefäß. Daraufhin wurde die Petrischale mit 10 ml frischem Williams´ Medium E ohne L-Glutamin ausgespült und dieses ebenfalls durch den Nylonfilter der Zellsuspension zugefügt, so dass das Volumen der Suspension 30 ml betrug.

2.1.3.2 Bestimmung der Vitalität und der Zellkonzentration

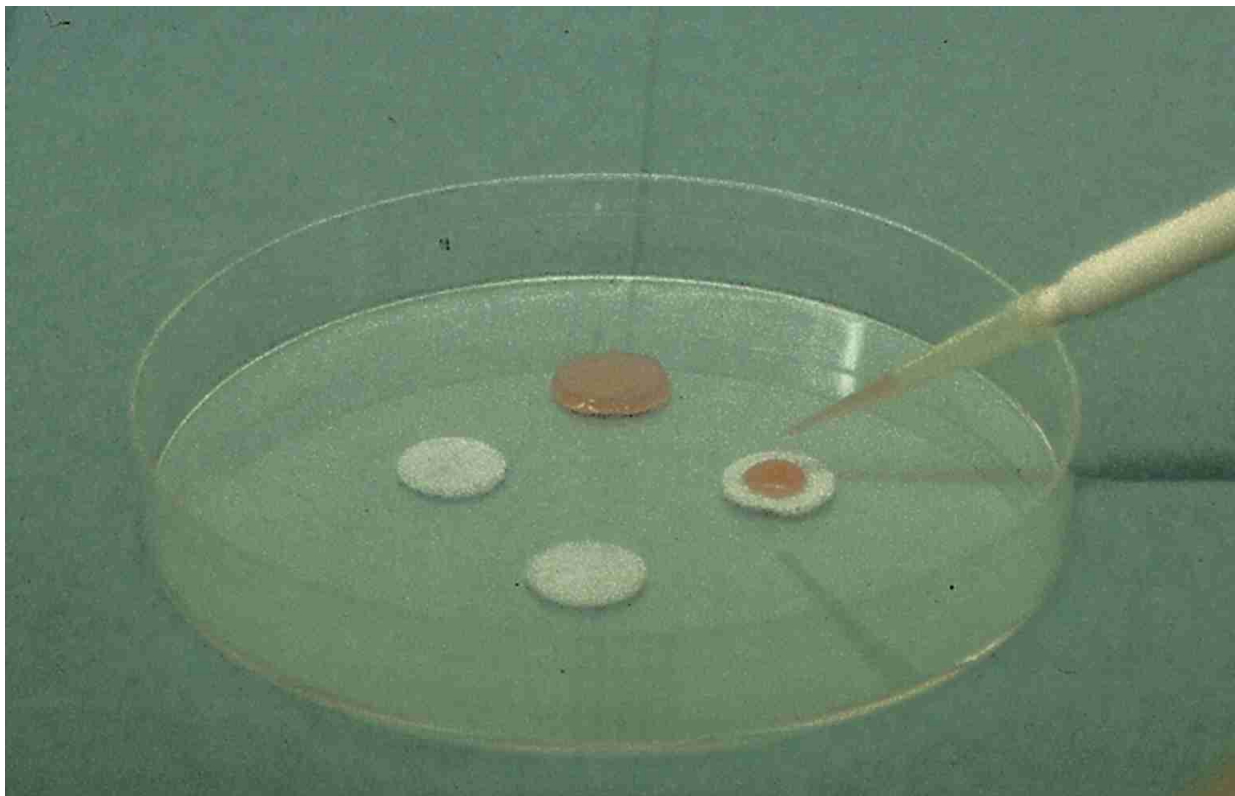
Zur Bestimmung der Vitalität der gewonnenen Hepatozyten und der Zellkonzentration wurden 800 µl frisches Williams´ Medium E ohne L-Glutamin mit 100 µl der Zellsuspension und 100 µl gefilterter Trypanblaulösung (0,5%) in einem 1,5 ml Eppendorf-Probenröhrchen vorsichtig vermischt. Direkt im Anschluss erfolgte die Auszählung der Hepatozyten unter dem Lichtmikroskop in der Neubauer-Zählkammer. Zunächst wurden innerhalb einer Minute in 16 Quadratfeldern der Zählkammer die Anzahl toter Zellen und dann die Gesamtzellzahl bestimmt, so dass der prozentuale Anteil vitaler Zellen bestimmt werden konnte. Die Zugabe von Trypanblaulösung ermöglichte die Unterscheidung von toten und lebenden Hepatozyten, da bei toten Zellen der blaue Farbstoff die Zellmembran passiert und sich diese somit verfärben. Die Hepatozytenkonzentration ergab sich aus der Anzahl vitaler Zellen multipliziert mit 10^5 und dem Volumen der Zellsuspension (30 ml).

2.1.4 Aussiedlung der Hepatozyten auf die PLLA-Polymere

Im Anschluss an die unter den Punkten 2.1.3.1 und 2.1.3.2 beschriebene Herstellung der Zellsuspension und Vitalitätsbestimmung der Hepatozyten wurde die Suspension für 2 Minuten bei 500 Umdrehungen pro Minute und 4 °C zentrifugiert, wobei die Beschleunigung auf die volle Umdrehungszahl und die Abbremsung jeweils langsam erfolgten. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet mit dem entsprechenden Volumen an kaltem Williams' Medium E ohne L-Glutamin überdeckt und re-suspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wurde erneut die Vitalität der Hepatozyten nach oben genanntem Prinzip bestimmt. Um eine ausreichende Menge vitaler Zellen auszusiedeln sollte die Vitalität über 80% liegen. Die Ermittlung des Zellsuspensionsvolumens mit der gewünschten Aussiedlungskonzentration der Hepatozyten von 10×10^6 Zellen/ml erfolgte durch Multiplikation der Ausgangskonzentration in der Suspension mit dem Suspensionsvolumen dividiert durch die gewünschte Aussiedlungskonzentration (10×10^6). Anschließend wurden die Zellen wie in der Abbildung 2.2 dargestellt auf die in einer Petrischale liegenden PLLA-Polymere ausgesiedelt.

Abbildung 2.2

Aussiedlung der Hepatozyten auf die PLLA-Polymere



Die Polymere wurden zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Besiedlung nacheinander an verschiedenen Stellen mit jeweils 100 µl der Suspension bedeckt. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt, so dass jedes Polymer mit 400 µl der Suspension bedeckt wurde, bzw. auf jedes Polymer etwa 4 Millionen Hepatozyten ausgesiedelt wurden. Direkt im Anschluss an die Aussiedlung begann die Kultivierung im Bioreaktor mit Rezirkulation des Kulturmediums.

2.2 Kultivierung der Hepatozyten unter Rezirkulation des Zellkulturmediums im Bioreaktor

2.2.1 Herstellung und Aufbau der Poly-L-Laktat-Säure(-acid) (PLLA)-Polymere

Die für die Kultivierung der Hepatozyten unter Rezirkulation des Zellkulturmediums in den Bioreaktoren als dreidimensionale Gerüststrukturen verwendeten biologisch abbaubaren Poly-L-Laktat-Säure(-acid) (PLLA)-Polymere wurden wie folgt beschrieben produziert.^{23,47} Zunächst wurden gereinigte Kochsalz (NaCl)-Partikel einem Siebverfahren ausgesetzt, so dass NaCl-Kristalle mit einer Größe zwischen 250 und 500 µm gewonnen werden konnten. Im Anschluss wurden die Kristalle in einer Gesamtmenge von 0,5 g in zylindrisch geformte Teflongefäße umgefüllt. Weiterhin wurde PLLA mit einer Viskosität von 1,6 zur Gewinnung einer 5%igen (w/v) Lösung in Chloroform gelöst. 0,24 ml der angefertigten Lösung wurden dann den gepressten NaCl-Kristallen in den Teflongefäßen zugefügt. Nach der Verdampfung des Lösungsmittels wurden die entstandenen PLLA/Salz-Scheiben für 48 Stunden bei 37 °C in Aqua dest. eingelegt. Das Wasser wurde dreimal täglich gewechselt. Im Rahmen dieses Auslaugungsprozesses wurden die Salzpartikel von den Polymeren entfernt. Durch die verwendete Menge an Salzkristallen und einem entsprechenden Volumen an Polymerlösung entstanden PLLA-Scheiben mit einer Porosität von nahezu 95% und einer durchschnittlichen Porengröße von 200 bis 400 µm. Der Durchmesser der Scheiben betrug etwa 18 mm und ihre Dicke etwa 1 mm. Durch die nachfolgende Bedeckung der PLLA-Scheiben mit 1%iger (w/v) Poly-(vinyl alcohol)-Lösung wurde die Hydrophilität erhöht. Vor ihrer Verwendung wurden die Polymere getrocknet und durch eine Gassterilisation mit Ethylenoxid sterilisiert.

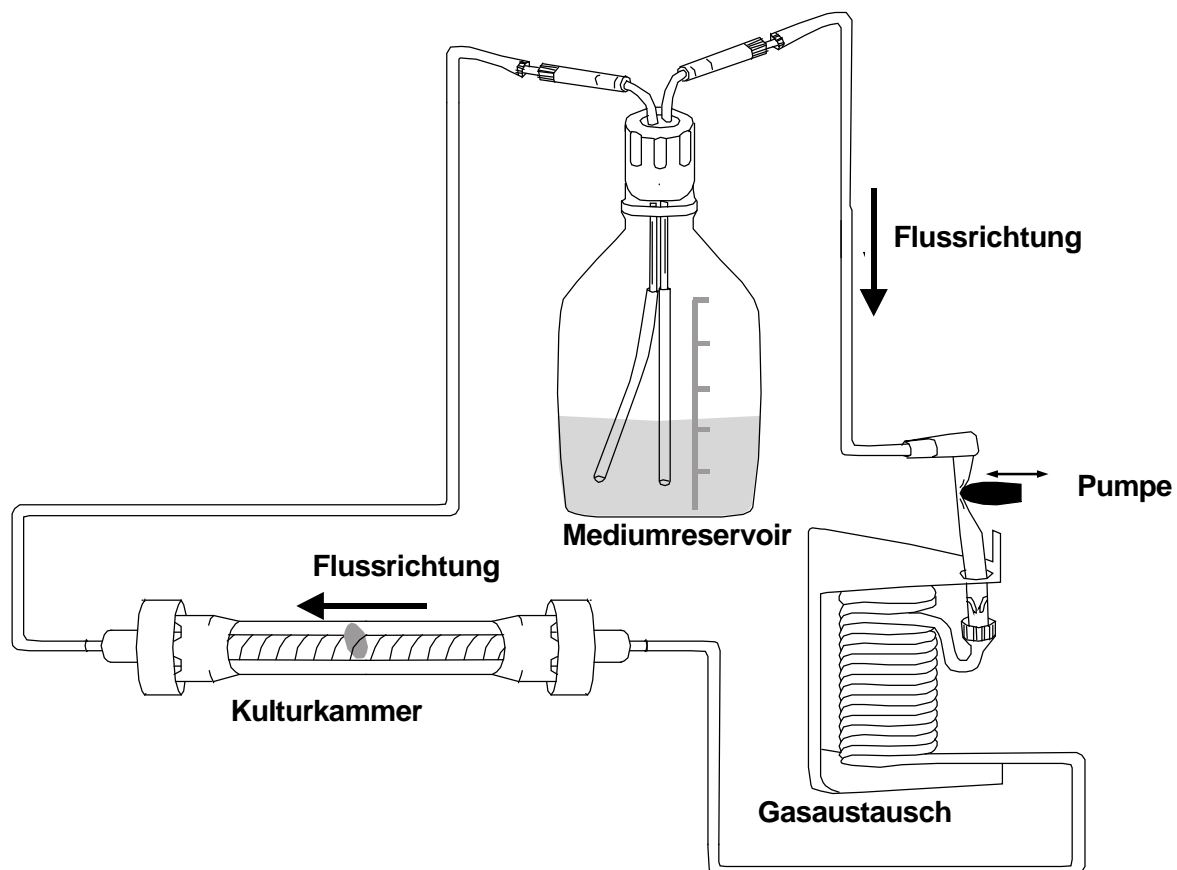
2.2.2 Aufbau des Bioreaktors

Bei den für die Kultivierung der Hepatozyten verwendeten Kultursystemen, bzw. Bioreaktoren (Cellmax[®] Systems) handelte es sich um in sich geschlossene Systeme, in denen das Zellkulturmedium mit Hilfe einer Pumpe mit konstanter Geschwindigkeit in eine Richtung fortbewegt werden konnte. Somit wurden die auf den PLLA-Polymeren ausgesiedelten Zellen während der gesamten Kultivierungsdauer unter Rezirkulation und somit ständigem Fluss des Zellkulturmediums kultiviert. Die Bioreaktoren und die notwendigen Zubehörteile (Pumpe, etc.) wurden von der Firma Cellco, Germantown, Md, USA geliefert.

Ein Bioreaktor setzte sich aus verschiedenen Einzelkomponenten zusammen, die in der Abbildung 2.3 schematisch dargestellt sind.

Abbildung 2.3

Schematischer Aufbau eines Bioreaktors



Eine 500 ml Glasflasche diente als Reservoir für das Zellkulturmedium. Der Verschluss der Reservoirflasche erfolgte über eine spezielle Verschlusskappe, in die zwei metallische Rohre als zu- und abführender Schenkel integriert waren. Zum Boden der Flasche hin wurden die Rohre über Schlauchenden verlängert. Über den

abführenden Schenkel gelangte das Zellkulturmedium aus der Reservoirflasche zum Hauptmodul des Bioreaktors. Das Hauptmodul bestand aus einem Kunststoffgehäuse an dessen Rückseite das Schlauchsystem des Moduls in mehreren Windungen aufgewickelt war. Über ein Schlauchende des Moduls erfolgte die Verbindung zum abführenden Schenkel der Reservoirflasche. Das andere Schlauchende war in einen Dreh-Schraubverschluss integriert, mit dem das Modul an die Zellkulturkammer angeschlossen wurde. Der Anschluss des Moduls an die Pumpe erfolgte an einem speziellen Schlauchabschnitt (Pumpstück). Nach Passage des Schlauchsystems des Hauptmoduls gelangte das Kulturmedium in die zylindrische Zellkulturkammer. Die Kulturkammer wurde beidseitig durch Dreh-Schraubverschlüsse verschlossen. Die Verbindung zum Hauptmodul und zum zuführenden Schenkel der Reservoirflasche erfolgte über in den Verschlüssen integrierte Schlauchverbindungen. Die Schlauchverbindung zwischen Hauptmodul und Kulturkammer erlaubte aufgrund ihrer Zusammensetzung einen Gasaustausch und somit eine Oxygenierung des Kulturmediums. Zur stabilen Positionierung wurden die Polymere in einem spiralförmig eingeschnittenen Halterungsschlauch mit einem kleinen Teil ihrer Fläche vorsichtig befestigt und mit diesem in die Kulturkammer eingesetzt. Nach Durchfluss der Zellkulturkammer gelangte das Medium über den zuführenden Schenkel wieder zur Reservoirflasche. Die Bioreaktoren wurden während der Kultur auf einer Grundplatte mit eingebauter Pumpe angeordnet. Die Pumpleistung der Pumpe konnte über ein elektronisches Kontrollaggregat gesteuert werden. Insgesamt konnten vier Bioreaktoren gleichzeitig in Betrieb genommen werden. Die Verbindung der Reaktoren mit der Pumpe erfolgte über eine Klemmvorrichtung am Pumpstück des Schlauchsystems des Hauptmoduls. Die Pumpwirkung selbst wurde durch magnetisch bewegte Metallstäbe auf die Schläuche der Reaktoren übertragen. Durch Variierung der Art der Metallstäbe und deren Anzahl bestand die Möglichkeit, die Flussgeschwindigkeit des Mediums in den Reaktoren jeweils getrennt einzustellen.

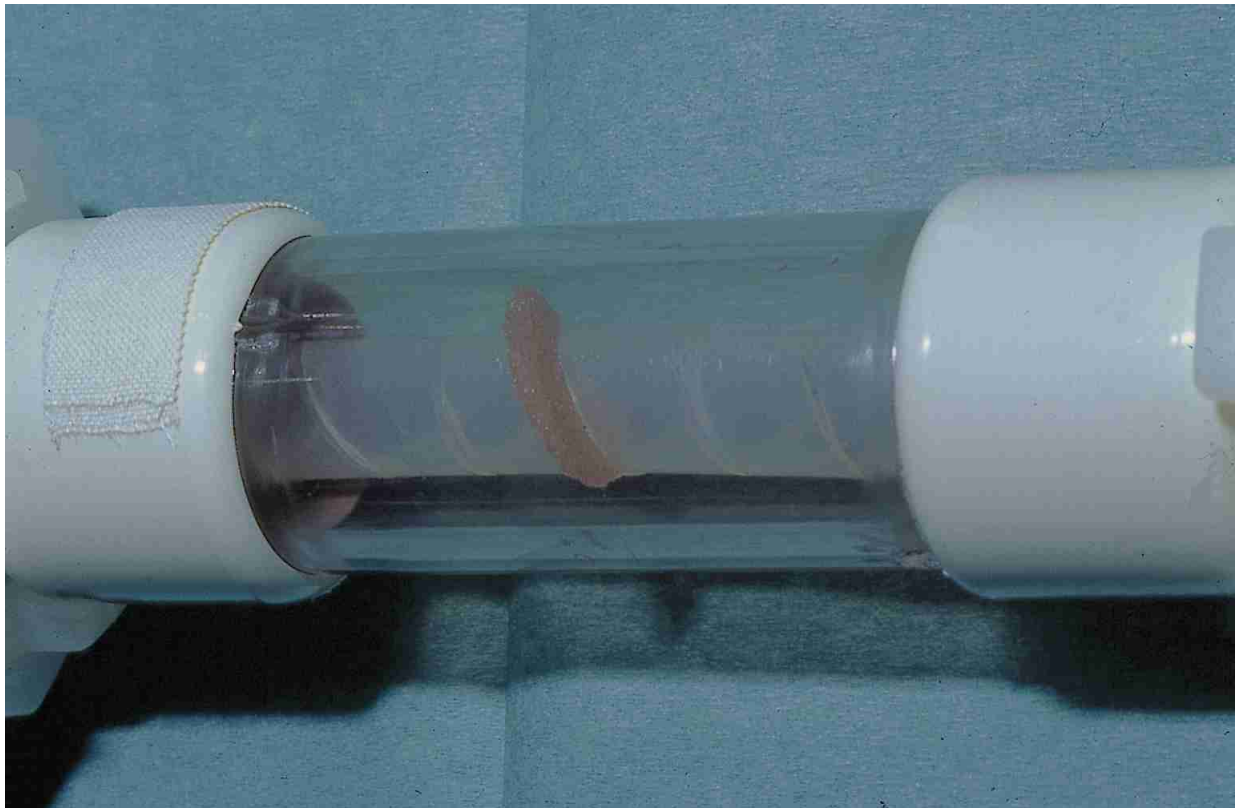
2.2.3 Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierung der isolierten Hepatozyten im Bioreaktor unter Rezirkulation des Zellkulturmediums erfolgte direkt im Anschluss an die zuvor beschriebene Aussiedlung der Zellen auf die PLLA-Polymere. Insgesamt konnten in jeder Kultur vier Bioreaktoren gleichzeitig in Betrieb genommen werden. Die Geschwindigkeit mit der

das Zellkulturmedium durch die geschlossenen Systeme gepumpt wurde war während einer Kultur für alle vier Bioreaktoren identisch. In jedem Bioreaktor wurde ein Polymer mit etwa vier Millionen ausgesiedelten Hepatozyten kultiviert. Die Beendigung der Kultivierung der Polymere (siehe Punkt 2.2.5) in den Reaktoren erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Kultivierung im ersten Reaktor wurde nach einem Tag beendet. Nach zwei, vier und sechs Tagen wurden die nächsten Kulturen beendet. Probenentnahmen des Zellkulturmediums fanden wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben statt. Nach erfolgter Aussiedlung der Zellen wurden die Polymere jeweils vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus der auf Eis liegenden Petrischale in senkrechter Position ihres Durchmessers zur Flussrichtung des Zellkulturmediums in den Halterungsschlauch eingesetzt und wie in Abbildung 2.4 dargestellt in der Kulturkammer des Reaktors plziert.

Abbildung 2.4

PLLA-Polymer mit ausgesiedelten Hepatozyten in der zylindrischen Zellkulturkammer des Bioreaktors



Anschließend wurde die Kammer an das Schlauchsystem des Hauptmoduls des Reaktors angeschlossen. Die Reservoirflasche für das Zellkulturmedium wurde mit etwa 263 ml zuvor frisch angesetzttem hormonstimuliertem Medium (Zusammen-

setzung siehe Punkt 2.2.3.1) gefüllt, mit der Verschlusskappe verschlossen und über den zu- und abführenden Schlauch an das Schlauchsystem des Hauptmoduls, bzw. die Zellkulturkammer angeschlossen. Die Flutung des Schlauchsystems und der Zellkulturkammer des nunmehr komplett zusammengebauten Reaktors mit dem Kulturmedium erfolgte manuell durch Druck auf das Pumpstück am Hauptmodul. Die Füllung des Systems und der Kulturkammer musste völlig blasenfrei erfolgen. Im Anschluss an den Zusammenbau wurden die vier Bioreaktoren auf der Grundplatte angeordnet und an die Pumpe angeschlossen (siehe Abbildung 2.5).

Abbildung 2.5

Vollständig zusammengesetzter Bioreaktor angeschlossen an die in der Grundplatte integrierte Pumpe vor Kulturbeginn im Brutschrank. Insgesamt konnten vier Bioreaktoren parallel in Betrieb genommen werden



Nach erfolgter Kontrolle sämtlicher Reaktoren auf Undichtigkeiten, Lufteinschlüsse, Polymerposition und korrekten Pumpbetrieb begann die Kultivierung unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, gesättigte Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank. Die Reaktoren und die Kulturmedien wurden täglich hinsichtlich der genannten Faktoren und auf sichtbare Hinweise für Kontaminationen der Kulturen überprüft.

2.2.3.1 Herstellung des hormonstimulierten Mediums

5,5 ml N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine, 11,0 ml HEPES-Puffer (1M), 5,5 ml Natrium Pyruvat (1mM), 100 µl Insulin (4 µg/ml), 100 µl Epidermal Growth Factor (10 ng/ml), 50 µl Dexamethason (5nM) und 5,5 ml Penstrep (Penicillin und Streptomycin; 1%) wurden zu 500 ml Williams' Medium E ohne L-Glutamin hinzugefügt. Das frisch angesetzte Kulturmedium wurde bis zum Kulturbeginn am selben Tag im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Probenentnahmen

Die Entnahme von Zellkulturmedium aus den Bioreaktoren zur späteren Bestimmung der Mediumalbuminkonzentration sowie der pH-Wert-, Elektrolyt-, Laktat- und O₂- und CO₂-Partialdruckbestimmung fand zu festgesetzten Zeitpunkten statt (siehe Tabelle 2.1). Sie erfolgte über einen in das Schlauchsystem zwischengeschalteten Dreiweghahn. Aus jedem Reaktor wurden täglich 5 ml Kulturmedium zur Albuminbestimmung entnommen. Das Medium wurde in 1 ml Eppendorf-Tubes pipettiert und bis zur späteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Weiterhin wurden an Tag 1, 2, 4 und 6 aus jedem verbliebenem Reaktor 1 ml Kulturmedium zur Bestimmung des pH-Wertes, der Elektrolyt- und Laktatkonzentrationen und des O₂- und CO₂-Partialdruckes entnommen. Die Vermessung erfolgte unter Verwendung eines Blutgasanalyse-Gerätes direkt im Anschluss an die Entnahme.

Tabelle 2.1

Übersicht über die Beendigung der verschiedenen Kulturen und die Probenentnahmen im Verlauf einer 6-tägigen Kultur

Kulturdauer in Tagen	Bioreaktor 1	Bioreaktor 2	Bioreaktor 3	Bioreaktor 4
1	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂ -beendet-	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂
2	–	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂ -beendet-	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂
3	–	–	Albumin	Albumin
4	–	–	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂ -beendet-	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂
5	–	–	–	Albumin
6	–	–	–	Albumin; pH; Elektrolyte; Laktat; pCO ₂ ; pO ₂ -beendet-

2.2.5 Beendigung der Kultivierung

Die Kultivierung der auf den Polymeren ausgesiedelten Hepatozyten in den Bioreaktoren wurde nach Tag 1, 2, 4 oder 6 beendet. Zur Beendigung wurde der Reaktor zunächst von der Pumpe abgekoppelt. Durch Lösen der Verschlusskappe von der Reservoirflasche und manuellen Druck auf das Pumpstück wurde das Kulturmedium aus dem Schlauchsystem und der Zellkulturkammer in die Flasche zurückgepumpt. Daraufhin wurde die Verbindung zur Zellkulturkammer an einer Seite gelöst, und der Halterungsschlauch mit dem Polymer mit einer sterilen Pinzette aus der

Kammer herausgezogen. Nach vorsichtiger Lösung vom Halterungsschlauch wurde das Polymer in eine Petrischale überführt, mit Zellkulturmedium aus der Reservoirflasche überdeckt und direkt im Anschluss lichtmikroskopisch begutachtet und statisch weiterkultiviert. Die Einzelkomponenten des Bioreaktors wurden anschließend gründlich unter fließendem Wasser gereinigt und nachfolgend der Dampf- und teilweise auch der Gassterilisation mit Ethylenoxid zugeführt.

2.2.6 Auszählung der Spheroide und deren Durchmesserbestimmung

Direkt im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor erfolgte die Begutachtung der Polymere unter dem Phasenkontrast-Mikroskop. Neben der Gewinnung eines Gesamteindrucks bezüglich der Besiedlungsdichte, der Verteilung zwischen losen Zellverbänden und Spheroide und des Polymerzustandes sollte vor allem eine Aussage über die Spheroidbildung unter rezirkulierenden Kulturbedingungen gemacht werden. Hierzu wurde die Anzahl an Spheroide bei 25-facher Vergrößerung in 20 verschiedenen Gesichtsfeldern von zwei Untersuchern jeweils unabhängig voneinander ausgezählt. Gewertet wurden nur scharf begrenzte spheroidale Zellformationen. Weiterhin wurden mit Hilfe einer Messskala im Okular des Mikroskops die Spheroiddurchmesser von 20, bzw. einmalig 10 Spheroide in verschiedenen Bereichen des Polymers in μm ermittelt.

2.3 Statische Kultivierung der Hepatozyten im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor

Nach Beendigung der Kultivierung im Bioreaktor und erfolgter Zählung und Durchmesserbestimmung der Spheroide unter dem Phasen-Kontrastmikroskop wurden die Polymere unter statischen Bedingungen weiterkultiviert. In statischer Kultur sollten die Fähigkeit der Hepatozyten zur Ammoniakentgiftung und zur Bildung des Lidocain-Stoffwechselmetaboliten MEGX (Monoethylglycinxylylid) untersucht werden. Unter Berücksichtigung der Besiedlungsdichte wurden die Polymere mit einem sterilen Skalpell halbiert, und die Hälften anschließend den entsprechenden statischen Kulturen zugeführt. Nach Beendigung der Kulturen wurden die Polymerhälften mit den darauf enthaltenen Hepatozyten jeweils in 1,5 ml Nunc-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.3.1 Statische Kultivierung zur Bestimmung des Ammoniakabbaus

Für die statische Kultivierung der Hepatozyten zur Bestimmung des Ammoniakabbaus wurde zunächst ein mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl) versetztes Zellkulturmedium frisch angesetzt. Durch Lösung von 5,349 g NH_4Cl in 100 ml hormonstimuliertem Medium (Zusammensetzung siehe Punkt 2.2.3.1) wurde eine 1M NH_4Cl -Stammlösung hergestellt, die in 2 ml Eppendorf-Tubes bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt wurde. Vor Kulturbeginn wurden 50 μl der aufgetauten Stammlösung mit 99,95 ml hormonstimuliertem Medium vermischt (Verdünnung: 1:2000), so dass eine 0,5 mM NH_4Cl -Lösung entstand, deren Ammoniakkonzentration im Messbereich des unter Punkt 2.6 beschriebenen zur Ammoniakmessung verwendeten Test-Kits lag. Die Polymerhälfte wurde mit 10 ml des zuvor angewärmten Zellkulturmediums in einer kleinen Petrischale überdeckt und für vier Stunden unter Standardbedingungen ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , gesättigte Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle dienten 10 ml des Zellkulturmediums, die in einer separaten Petrischale ebenfalls für vier Stunden im Brutschrank inkubiert wurden.

Durch die Harnstoffsynthese der Hepatozyten verringerte sich der Ammoniakgehalt des Kulturmediums während der vierstündigen Kultivierung. Zur Überprüfung, ob die Konzentrationsminderung wirklich auf die aktive Stoffwechselleistung der Zellen zurückzuführen war, wurden zu den Probenentnahmezeitpunkten jeweils zwei Proben entnommen. Eine der beiden Proben wurde jeweils unverändert vermessen, während die andere Probe vor der späteren Ammoniakmessung jeweils mit 5 μl Urease versetzt wurde. Durch die Ureasewirkung wurde der entstandene Harnstoff gespalten, und die Ammoniakkonzentration sollte wieder in den Bereich der Ausgangskonzentration ansteigen.

Zu Beginn der Kultivierung wurden Proben aus der 0,5 mM NH_4Cl -Lösung zur Ausgangswertbestimmung entnommen. Nach zweistündiger Kultivierung wurden aus beiden Schalen jeweils zweimal 1050 μl des Kulturmediums abpipettiert. Nach vier Stunden wurde die Kultur beendet. Das restliche Zellkulturmedium wurde aus den Schalen entnommen und wie bei den vorhergehenden Proben in 1,5 ml Eppendorf-Tubes pipettiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.2 Statische Kultivierung zur Bestimmung der MEGX (Monoethylglycinxylylid)-Bildung

Die Fähigkeit der Hepatozyten zur Bildung des Lidocain-Stoffwechselmetaboliten MEGX (Monoethylglycinxylylid) wurde im Rahmen einer 30-minütigen statischen Kultur im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor untersucht. Hierzu wurden zunächst 72 mg Lidocain in 3 ml Ethanol absolut (96-100%) gelöst. Durch Zugabe von 27 ml hormonstimulierten Mediums erfolgte eine zehnfache Verdünnung der Lösung. Die Polymerhälfte wurde mit 3 ml des zuvor angewärmten Kulturmediums in einer kleinen Probenschale überdeckt und für 30 Minuten unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, gesättigte Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurden 3 ml des Kulturmediums in einer gesonderten Schale ebenfalls unter gleichen Bedingungen mitkultiviert. Zu Beginn der Kultur wurden Proben des hergestellten Kulturmediums zur Ausgangswertbestimmung entnommen. Nach Beendigung der Kultivierung wurde das Kulturmedium aus beiden Schalen abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung in 1,5 ml Eppendorf-Tubes bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Bestimmung der Albuminkonzentration im Zellkulturmedium

Die Konzentration des von den Hepatozyten in das Zellkulturmedium sezernierten Albumins wurde durch ein ELISA (enzyme-linked immunoadsorbent assay)-Sandwich-Verfahren ermittelt. Hierbei wurden vom Schaf stammende unkonjugierte und an Peroxidase gebundene konjugierte IgG-Antikörper gegen Rattenalbumin verwendet. Es wurden ferner 96-well-Immunoplaten für 12 Probenreihen mit jeweils 8 wells und einem Volumen von 400 µl pro well benutzt. Die ersten 3 Reihen wurden mit der Waschlösung (Zusammensetzung siehe Punkt 2.4.1.2) als Leerwert und 2 Albuminstandardreihen belegt, so dass pro Platte die Albuminkonzentration in 9 Proben bestimmt werden konnte. Die Proben wurden vor der Vermessung 1:30 verdünnt, indem 100 µl der aufgetauten Probe zu 2900 µl Waschpuffer hinzupipettiert wurden. Zunächst wurden die Platten mit den unkonjugierten IgG-Antikörpern in einer Konzentration von 10 µg/ml in einem 0,05 M Carbonatpuffer (Zusammensetzung siehe Punkt 2.4.1.1) mit jeweils 100 µl pro well beschichtet, mit sealing tape verschlossen und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Während der Inkubation konnten die Antikörper an die Oberfläche der wells gebunden werden. Im Anschluss wurden die wells mit der Waschlösung dreimal hintereinander gewaschen. Es folgte die Beschichtung der wells mit jeweils 300 µl einer gelatinehaltigen

Blocklösung, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Platten nach Verwerfung der Blocklösung erneut mit der Waschlösung dreimal gewaschen.

Nun schloss sich die Belegung der Platten mit den Proben an. Zuerst wurden alle wells bis auf das jeweils oberste einer Probenreihe mit 100 µl der Waschlösung gefüllt. Die obersten wells der Probenreihen wurden mit 200 µl Waschlösung als Leerwert, 2 Albuminstandards (Konzentration: 50 ng/ml) und den zu messenden Proben beschichtet. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl aus den obersten wells in die wells der zweiten Reihe pipettiert. Nach kurzer Durchmischung wurden dann 100 µl aus den wells der zweiten in die wells der dritten Reihe pipettiert. Dieser Schritt wiederholte sich bis zu den wells der achten Reihe, wonach die letzten 100 µl verworfen wurden, so dass die Proben pro Pipettierschritt im Verhältnis 1:2 verdünnt wurden, bzw. abschließend eine Probenverdünnung von 1:128 vorlag. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank und dreimaligem Waschen erfolgte die Beschichtung der wells mit den in Waschlösung verdünnten, an Peroxidase gebundenen konjugierten IgG-Antikörpern gegen Rattenalbumin (100 µl/well), die sich an den Komplex bestehend aus Albumin und den unkonjugierten Antikörpern banden. Die Platten wurden für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank mit den konjugierten Antikörpern inkubiert und im Anschluss erneut dreimal mit der Waschlösung gewaschen. Den Abschluss des Verfahrens bildete die Belegung der Platten mit ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) tablets) als Substrat, durch welches ein grüner Farbumschlag bewirkt wurde, dessen Intensität von der Konzentration des in den Proben enthaltenen Albumins abhängig war. Hierbei wurden 10 mg ABTS in 20 ml Citrat-Phosphatpuffer (Zusammensetzung siehe Punkt 2.4.1.3) und 6,6 µl 30%igem H₂O₂ gelöst. Die wells wurden mit jeweils 100 µl Substratlösung beschichtet und für 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl 0,32%iger Natriumfluoridlösung (Zusammensetzung siehe Punkt 2.4.1.4) wurde die Farbreaktion unterbrochen und es schloss sich die photometrische Vermessung der Platten bei einer Wellenlänge von 405 nm an. Die Berechnung der Albuminkonzentration in ng/ml aus den gemessenen Extinktionswerten erfolgte mit Hilfe von Regressionsgeraden am Computer unter Verwendung des Programms Microsoft® Excel 97.

2.4.1 Herstellung der verwendeten Reagenzien

2.4.1.1 0,05 M Carbonatpuffer

1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 und 0,2 g Natrium Azid wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Abschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 9,6.

2.4.1.2 Waschlösung

8 g NaCl , 0,2 g NaH_2PO_4 , 1,41 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KCl und 0,5 ml Tween 20 (0,05%) wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Im Anschluss wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

2.4.1.3 Citrat-Phosphatpuffer

12,8 g Citrat und 10,9 g Na_2HPO_4 wurden in 1000 ml Aqua. dest. gelöst. Es folgte die Einstellung des pH-Wertes auf 5,0. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und bei 4 °C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.1.4 Natriumfluoridlösung (0,32%)

3,2 g Natriumfluorid wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

2.5 Quantitative DNA-Messung

2.5.1 DNA-Isolierung

Um den DNA-Gehalt der auf den Polymeren kultivierten Hepatozyten zu bestimmen, musste die DNA unter Verwendung eines Test-Kits zuerst aus den Zellen isoliert werden. Zunächst wurden die bei -80 °C aufbewahrten Polymere mit den darauf enthaltenen Zellen im tiefgefrorenen Zustand vorsichtig aber zügig mit einem sterilen Skalpell in einer Petrischale in kleine Stücke zerteilt. Zur Lyse des Zellmaterials wurden diese dann zusammen mit 180 µl Tissue Lysis Buffer in ein 2 ml Probenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurde der Röhrcheninhalt kurz durchmischt, und es folgte die Inkubation bei 56 °C in einem Thermo-Inkubator mit Rüttelvorrichtung für etwa 12 Stunden. Im Anschluss an die Inkubation wurden 200 µl eines weiteren Lyse-Puffers hinzupipettiert, woraufhin die Probe nach kurzer Durchmischung für weitere 10 Minuten bei 70 °C inkubiert wurde. Zur Ausfällung der DNA wurden schließlich 200 µl Ethanol absolut (96–100%)

hinzugegeben. Um einen Materialverlust durch Tropfenbildung an der Innenwand der Probenröhrchen zu vermeiden, erfolgte jeweils zwischen den oben genannten Schritten eine einminütige Zentrifugation mit 8000 Umdrehungen pro Minute. Das entstandene Lysat mit der freigesetzten DNA wurde nun aus den Probenröhrchen in spezielle Zentrifugationsröhrchen des Kits überführt, die wiederum in 2 ml Probengefäße eingesetzt werden konnten, in denen das bei jedem Zentrifugationsschritt anfallende Filtrat aufgefangen und verworfen werden konnte. Auf den Polymerstücken konnte in der anschließend durchgeführten lichtmikroskopischen Kontrolle kein zelluläres Material mehr nachgewiesen werden. Es schloss sich eine einminütige Zentrifugation bei 8000 Umdrehungen pro Minute an. Während eines Zentrifugationsschrittes wurde das Lysat durch eine DNA absorbierende Gel-Membran filtriert. Proteine und andere Kontaminanten wurden nicht an die Membran gebunden. Zur Entfernung restlicher Verunreinigungen der an die Membran gebundenen DNA wurden nacheinander 500 µl zweier verschiedener Waschpuffer hinzugefügt, wonach sich eine einminütige Zentrifugation bei 8000 Umdrehungen pro Minute, bzw. eine dreiminütige Zentrifugation mit 14000 Umdrehungen pro Minute anschlossen. Um die DNA aus der Membran herauszuwaschen wurden im Anschluss 200 µl eines Lösungspuffers hinzupipettiert. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte abschließend eine einminütige Zentrifugation mit 8000 Umdrehungen pro Minute. Zur Gewinnung von Restmengen an DNA wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Die Aufbewahrung der gewonnenen DNA erfolgte im Lösungspuffer des Kits bei -20 °C.

2.5.2 Durchführung der quantitativen DNA-Bestimmung

Die quantitative Messung der aus den Hepatozyten isolierten DNA erfolgte fluorometrisch unter Verwendung eines Fluoreszenz-Photometers. Das Prinzip dieser Methode ist die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften einer Indikatorsubstanz in Gegenwart von DNA. Als Indikatorsubstanz wurde Bisbenzimid (Hoechst 33258) verwendet, welches ein Lichtabsorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 356 nm und ein Lichtemissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 492 nm hat. Wenn sich die Substanz an DNA bindet verändert sich das Absorptions- und Emissionsmaximum. Sie liegen dann bei 365, bzw. bei 458 nm. Durch Anregung mit kurzweiligem Licht mit einer Wellenlänge unter 400 nm emittierte der DNA-Indikatorsubstanz-Komplex Licht mit einer Wellenlänge von 458 nm, so dass über die

gemessene Fluoreszenz die DNA-Konzentration bestimmt werden konnte. Vor der Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben musste zunächst eine Standardkurve erstellt werden. Hierzu wurde ein DNA-Standard mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet, dessen DNA aus Kälber-Thymuszellen gewonnen wurde. Durch Zugabe von 800 µl gefiltertem Aqua dest. und 100 µl TNE-Puffers (Zusammensetzung siehe unten) zu 100 µl des Standards wurde dieser 1:10 verdünnt (Konzentration: 100 µg/ml). Weiterhin wurde eine Assay-Lösung bestehend aus 10 ml TNE-Puffer, 90 ml gefiltertem Aqua dest. und 10 µl Hoechst 33258 (Bisbenzimid)-Grundlösung (Konzentration: 1 mg/ml) frisch angesetzt. Nach erfolgter Kalibrierung des Photometers durch Messung von 2 µl DNA-Standard in 2 ml Assay-Lösung (Referenzwert: 100 ng/ml) wurden verschiedene Volumina des verdünnten Standards (0, 2, 4, 6, 8 und 10 µl) in 2 ml Assay-Lösung in einer Glasküvette vermessen, und somit eine Standardkurve mit einem Messbereich von 0 bis 500 ng/ml erstellt. Zur DNA-Bestimmung der Proben wurden 10 µl der Probe zu 2 ml Assay-Lösung hinzupipettiert und vermessen. Der erhaltene Messwert in ng/ml wurde durch 5 dividiert, um das Verhältnis zum verwendeten DNA-Standardvolumen (Kalibrierung: 2 µl in 2 ml Assay-Lösung, s. o.) wiederherzustellen. Der DNA-Gehalt der Probe wurde nun durch Multiplikation mit 1000 (Verdünnung der Probe in der Assay-Lösung: 1:1000) und anschließender Umrechnung in µg/ml berechnet. Für die Herstellung des oben beschriebenen TNE-Puffers wurden 12,11g Tris, 3,72g EDTA und 116,89 g Natrium Chlorid in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde die Lösung abschließend steril filtriert.

2.6 Bestimmung der Ammoniakkonzentration im Zellkulturmedium

Die Verringerung der Ammoniakkonzentration im Zellkulturmedium während der vierstündigen statischen Kultivierung der Hepatozyten direkt im Anschluss an die Kultivierung im rezirkulierenden Flusssystem (siehe Punkt 2.3.1) wurde photometrisch bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Test-Kit verwendet, mit dem jeweils 20 Proben vermessen werden konnten. Zunächst wurden die zu messenden Proben im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und 25 Probenröhrchen mit den Probennamen, den 4 Standardkonzentrationen und dem Leerwert beschriftet. Zu den unter Punkt 2.3.1 genannten Proben wurden 5 µl Urease hinzupipettiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch entsprechende Verdünnungen der Ammoniak-Standardlösung des Kits (Konzentration:

400 µg/dl) wurden Standardkonzentrationen von 100, 200, 300 und 400 µg/dl zur späteren Bildung einer Standardkurve hergestellt. Anschließend wurden 4 ml einer enzyminaktivierenden Reagenzlösung in die Röhren pipettiert, durch welche Inhibitoren des Farbumschlages entfernt und eine Ammoniakbildung während der Testprozedur verhindert wurde. Das Röhren für den Leerwert wurde mit 2 ml der Lösung gefüllt. Es folgte die Beschickung der Röhren mit je 1 ml der aufgetauten Proben und der Standardlösungen. Nach gründlicher Durchmischung schloss sich ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt mit 2500 Umdrehungen pro Minute an.

Anschließend wurden aus jedem Röhren vorsichtig jeweils 2 ml in neue beschriftete 50 ml-Probenröhren umgefüllt. Nun wurden in jedes Röhren nacheinander drei verschiedene Farblösungen pipettiert (Farblösung A: 2,0 ml, Farblösung B: 1,0 ml, Farblösung C: 2,0 ml). Nach Zugabe jeder Farblösung erfolgte eine gründliche Durchmischung des Röhreninhalts. Durch Indophenolbildung entstand ein blauer Farbumschlag, dessen Intensität von der Ammoniakkonzentration der Probe abhing. Im Anschluss wurden die Röhren für 20 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und nachfolgend unter fließendem Wasser für drei Minuten abgekühlt. Die abschließende photometrische Vermessung der Standards und der Proben gegen den Leerwert erfolgte bei einer Wellenlänge von 630 nm. Mit Hilfe der erstellten Standardkurve konnte der Ammoniakgehalt der Proben in µg/dl bestimmt werden.

2.7 Bestimmung der MEGX-Konzentration im Zellkulturmedium

Die Bestimmung der MEGX (Monoethylglycinxylylid)-Konzentration im Zellkulturmedium nach 30-minütiger statischer Kultur (siehe Punkt 2.3.2) erfolgte durch ein Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay-Verfahren unter Verwendung eines Autoanalyzers. Pro Messung konnten maximal 20 Proben vermessen werden. Vor Beginn jeder Messreihe wurden zur Überprüfung des Autoanalyzers verschiedene Funktionstests durchgeführt. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit 6 verschiedenen Kalibratoren und 3 verschiedenen Kontrollen, die jeweils eine definierte Menge an MEGX enthielten. Weiterhin wurde im Rahmen des Kalibrationsvorganges eine Probe in einer Verdünnungsreihe im Lösungspuffer des Assays verdünnt. Die optimale Verdünnung der Proben für die anschließende Vermessung lag im linearen Bereich der Messwerte der Verdünnungsreihe. Anhand dieser Messkurve wurden bei

den in diesem Versuch durchgeführten Bestimmungen jeweils 12 µl der aufgetauten Proben in 88 µl Lösungspuffer verdünnt und daraufhin im Autoanalyzer vermessen.

2.8 Materialien

Tabelle 2.8.1

Reagenzien und Lösungen

Artikel	Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
ABTS	ABTS (2,2-Azino-bis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid); 50 Stk.	Sigma	A 9941
Äther	Äther zur Narkose	Riedel-de Haën	32703
Albumin (Ratte)	Albumin, Rat (purified antigen lyophilized); 25 mg	MP Biomedicals Inc.	55952
Ammoniumchlorid	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl), reinst	Merck	159041
Anästhetikum	Ketanest [®] 100, 5 ml Ampullen	Pfizer GmbH	-
Anästhetikum	Rompun [®] 2%, 25 ml Injektionslösung	Bayer Vital GmbH	-
Antibiotische Lösung	Penicillin/Streptomycin 10000 U/10000 µg/ml ; 100 ml	Biochrom KG	A 2213
Aqua dest.	Aqua dest.	Apotheke Eppendorf	44616
Calciumchlorid	Calciumchlorid (Ca ₂ Cl), reinst	Merck	102379
Calciumchlorid-Dihydrat	Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ ·2H ₂ O), reinst	Merck	142000
Desinfektionsmittel	Cutasept G, Hautdesinfiziens, gefärbt, 1000 ml	Bode Chemie	No. 10380
Dexamethason	Dexamethasone-Water soluble	Sigma	D 2915
Di-Natriumhydrogenphosphat	Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), reinst	Merck	106585
DNA-Standard	Calf Thymus DNA-Standard; 5 units	Sigma	D 0805
EGF	Epidermal Growth Factor (EGF); Human; Rekombinant; 100 µg	Gibco	13247-051
EGTA	EGTA (Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)	Sigma	E 4378
Ethanol	Ethanol absolut (96-100%); 5 l	Apotheke Eppendorf	19591
Gelantine	Gelatin bovine skin; Type B, 75 Bloom	Sigma	G 6650
Glucose	Glucose (α-D-(+)-Glucose), Corn sugar Dextrose Anhydrous; 1 kg	Sigma	G 7021

Artikel	Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
H 33258 (Bisbenzimid)	Hoechst (H 33258) Fluorescent Dye	Sigma	B 2883
Heparin	Liquemin® N 25000 ; 5 ml	Hoffmann- LaRoche AG	-
Hepes	Hepes; 100 g	Sigma	H 3375
Hepes-Puffer	Hepes buffer (1 M); 100 ml	Biochrom KG	L 1613
Insulin	Insulin from bovine pancreas	Sigma	I 1882
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid (KCl), reinst	Merck	104935
Kochsalzlösung	Isotone Natriumchlorid- lösung 0,9%; 100 ml	Braun	9161A95
Kollagenase zur Hepatozytenisolation	Collagenase Type 2	Worthington Biochemicals	LS 04177
Lidocain	Lidocaine; 25 g	Sigma	L 7757
MEGX (Monoethylglycinxyloidid)- Kalibratoren	X-Systems™ TD _x FL _x ®D _x ® ; In vitro test; MEGX-Calibrators	Abbott Diagnostika GmbH	9552-01
MEGX (Monoethylglycinxyloidid)- Kontrollen	X-Systems™ TD _x FL _x ®D _x ® ; In vitro test; MEGX-Controls	Abbott Diagnostika GmbH	9552-10
MEGX (Monoethylglycinxyloidid)- Reagenzien	X-Systems™ TD _x FL _x ®D _x ® ; In vitro test; MEGX-Reagent Pack	Abbott Diagnostika GmbH	9552-60
N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin	N-acetyl-L-alanyl-L- glutamine; 50 ml	Biochrom KG	K 0202
Natriumcarbonat	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), reinst	Merck	106398
Natriumchlorid	Natriumchlorid (NaCl), reinst	Merck	106400
Natriumcitrat	Sodium citrate tribasic dihydrate	Sigma	S 4641
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O), reinst	Merck	106349
Natriumfluorid	Natriumfluorid (NaF), reinst	Merck	130441
Natriumhydrogencarbonat	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), reinst	Merck	106323
Natronlauge	Natronlauge (NaOH), 1 N	Merck	109136
PBS-Puffer	PBS-Dulbecco (1x)	Seromed	L 1825
Polyklonaler Anti-Albumin Antikörper	Albumin, Rat; polyclonal antibody anti-rat; host: sheep; 5 ml	MP Biomedicals Inc.	55729
Polyklonaler, an Peroxidase konjugierter Anti-Albumin Antikörper	Albumin, Rat; polyclonal antibody anti-rat; host: sheep; HRP-conjugated; 2 ml	MP Biomedicals Inc.	55776
Salzsäure	Salzsäure (HCl), 2 N	Merck	109063
Sodium Azid	Sodium Azid (N ₃ Na)	Sigma	S 8032
Sodium-Pyruvat	Sodium Pyruvat 100 mM; 100 ml	Gibco	11360-039
Test-Kit zur Bestimmung der Ammoniakkonzentration	Ammonia Test-Kit; 20 tests	WAKO Chemicals GmbH	922-14409
Test-Kit zur DNA-Isolierung	QiAmp DNA Mini-Kit; 50 tests	Qiagen GmbH	51304

Artikel	Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Trypanblau	Trypanblau	Merck	K 17825632
Trypsin-Inhibitor	Trypsin-Inhibitor	MP Biomedicals Inc.	101113
Tween	Tween 20	Merck	817072
Urease	Urease 1000 U/ml	Merck	116493
Verdünnungspuffer MEGX-Assay	Verdünnungspuffer-X-Systems™ TD _x FL _x ®D _x ®; 1000 ml	Abbott Diagnostika GmbH	9519-02
Wasserstoffperoxid	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck	107210
Zellkulturmedium	Williams' Medium E without L-glutamine; 500 ml	Gibco	22551-022

Tabelle 2.8.2

Gefäße und Zubehör

Artikel	Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Abdeckungen für ELISA-Platten	Deckel (abgeschnittene Enden u. Kondensationsringe) für 96-well-Platten; 100 Stk.	Nunc GmbH	263339
Abklebefolie für ELISA-Platten	Mylar sealing tape	Sigma	T 2162
Ansaugschlauch	Bronchialis S Absaugkatheter gerade Ch 16 = 5,3 mm; Length 060	Steridan	6886
Braunüle	Vasofix® 17G	B. Braun	04268156
Dreiwegehahn	Discofix®-3, Dreiwegehähne, Farbe: blau; 200 Stk.	B. Braun	4095111
ELISA-Platten	Nunc-Immuno-Platten Maxi Sorp; 96 wells; 400 µl/well; 60 Stk.	Nunc GmbH	439454
Einmalküvetten	Einmalküvetten 2,5 ml Makro, Plastibrand; 100 Stk.	Brand	759005
Einmalskalpell	Cutfix, runde Klinge	B. Braun	5518059
Einmalspritze	Einmalspritze 2ml	B. Braun	4606027
Einmalspritze	Einmalspritze 5 ml	B. Braun	4606051
Einmalspritze	Einmalspritze 10 ml	B. Braun	4606108
Glasküvette	Glasfloumetrieküvette	Amersham Pharmacia Biotech	80622744
Handschuhe, steril	Biogel; 7 ½; Powder-Free Surgical Gloves	Regent	82275
Injektionskanülen	Sterican® Einmal-Kanülen; Insulin-Farbcode: braun, G.: 26x1/2; 100 Stk.	B. Braun	4665457
Kompressen	ES Kompressen; 10 x 10 cm; 25 Stk.	Hartmann	401725/4

Artikel	Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Mikropipettenspitzen, 200 µl	Pipettenspitzen; 250 Stk.	Sarstedt	1280/7031011
Mikropipettenspitzen, 1000 µl	Pipettenspitzen, 500 Stk.	Sarstedt	0327/7177011
Mikropipettenspitzen	Eppendorf Einmalpipetten, 10 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.000.811
Mikropipettenspitzen	Eppendorf Einmalpipetten, 20 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.000.854
Mikropipettenspitzen	Eppendorf Einmalpipetten, 200 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.000.870
Mikropipettenspitzen	Eppendorf Einmalpipetten, 1000 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.000.919
Mikropipettenspitzen	Eppendorf Einmalpipetten, 5000 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.000.978
Nahtmaterial	Seide „E“ geflochten; schwarz; steril; 5/0; 1 metric; 10 x 0,50 m	Resorba	G 2105
Nylonfilter	Nylonfilter, Maschenweite NY200HC	Hydro-Bios	162
Operationsbesteck	Diverse Instrumente	Aesculap	-
OP-Maske	Surgical Mask; 100 Stk.	3 M Health Care	1810 F
Parafilm	Parafilm; 4 Inx250 FF Rdl	American National Can	-
Pipettenspitzen, 5 ml	Serologische Pipette, 5 ml	Falcon	356543
Pipettenspitzen, 10 ml	Serologische Pipette, 10 ml	Falcon	356551
Pipettenspitzen, 25 ml	Serologische Pipette, 25 ml	Falcon	356525
PLLA-Polymer	PLLA-Polymer	The University of Michigan; Biologic & Material Sciences	Maßanfertigung
Probeneinsätze für MEGX-Assay	Probeneinsätze für X-Systems™ TD _x FL _x ®D _x ®	Abbott Diagnostika GmbH	9618-05
Probenröhrchen	Nunc Cryo-Tube vials 1,0 ml	Nunc GmbH	366656
Probenröhrchen, 15 ml	Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Nunc GmbH	366036
Probenröhrchen, 50 ml	Conical Tube, 50 ml	Falcon	352070
Reaktionsgefäß	Eppendorf Safe Lock Tubes, 0,5 ml	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.121.023
Reaktionsgefäß	Eppendorf Safe Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.120.086

Artikel	Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Reaktionsgefäß	Eppendorf Safe Lock Tubes, 2,0 ml	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH	0030.120.094
Sterile Filter	Corning 430513, 500 ml Bottle Top Filter w/45 mm Neck	Corning Incorporated	30502013
Spritzenvorsatzfilter	Spritzenvorsatzfilter; einzeln steril verpackt; 0,22 µm; CM-Membran	Qualilab	5122110
Trichter	Trichter	Melgine	NC916-2074
Watteträger	Wattestäbchen, kleiner Kopf; 100 Stk.	Beese	1260
Zellkulturschalen	Nunclon Zellkulturschalen (40 x 12 mm)	Nunc GmbH	153066
Zellkulturschalen	Nunclon Zellkulturschalen (92 x 17 mm)	Nunc GmbH	150350
Zellkulturschalen	Nunclon™-Multischalen (6 wells), Polystyrol mit Deckel; 85 Stk.	Nunc GmbH	150229

Tabelle 2.8.3

Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoanalyser	X-Systems™ TD _x FL _x ® D _x ®	Abbott Diagnostika GmbH
Autoklav	Autoklav	Medizin und Labortechnik KG, Fritz Gössner, GmbH & Co.
Bioreaktor	CM Quad Cellmax® Quad Artificial Capillary Cell Culture System	Cellco Inc.
Blutgasanalysegerät	Radiometer ABL System 615	ABL
Brutschrank	Heraeus Function Line, Typ BB 16	Heraeus Instruments GmbH
ELISA-Platten-Waschvorrichtung	Nunc Immuno Washer 12 Autoclavable	Nunc GmbH
Kamera	Olympus SC 35	Olympus Optical Co. (Europe) GmbH
Fluorometer	Dyna Quant 200	Amersham Pharmacia Biotech
Neubauer-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer O, 100 mm Tiefe; 0,0025 mm ²	Assistent
Mehrfach -(8-fach) Pipettierhilfe	Finnpipette Biocontrol 300 µl	Labsystems
Mikropipette	2,5 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Mikropipette	10 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Mikropipette	20 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Mikropipette	50 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Mikropipette	100 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Mikropipette	200 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Mikropipette	1000 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Mikropipette	5000 µl	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Mikroskop	Olympus IX 50-S8F2 Inverted System Microscope	Olympus Optical Co. (Europe) GmbH
Mikroskop-Beleuchtung	Halogen Lamp Power Supply Unit TH3	Olympus Optical Co. (Europe) GmbH
Pipettierhilfe	Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte
Photometer	Shimadzu UV 160 A recording Spectrophotometer	Shimadzu Europa GmbH
Photometer für ELISA-Platten	Dynatech MR 5000	Dynatech
Pumpe	Digi-Saltic No. 7526/05	Cole-Parmer Instrument Co.
Schüttler	Certomat MV	B. Braun Biotech International GmbH
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Trockenschrank	Sanyo Sterilizer	Sanyo
Wasserbad	GFL-Wasserbad mit Rüttelvorrichtung	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
Wasserbad	Julabo E 07 Typ HC-2/8	Julabo
Werkbank/Bench	Heraeus Typ HS 18/2 1996	Heraeus Instruments GmbH
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH
Zentrifuge	Heraeus Minifuge T	Kendro Laboratory Products

3. Ergebnisse

3.1 Gewinnung der Hepatozyten

Für die Gewinnung der Hepatozyten zur Kultivierung in den Bioreaktoren wurden insgesamt 6 Hepatozytenisolationen durchgeführt. Die Zellen wurden in den jeweiligen Kulturen mit 3 verschiedenen Flussgeschwindigkeiten des Zellkulturmediums kultiviert. Pro Flussgeschwindigkeit fanden 2 Kultivierungen über 6 Tage mit je 4 Bioreaktoren statt. Die ausgewählten Geschwindigkeiten (Average Flow Rate = AFR) betragen 7, 24 und 52 ml pro Minute (ml/min). Als Zellspender dienten syngene, erwachsene, männliche Lewis-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von etwa 250 g. Wie unter Punkt 2.1.2.3 beschrieben wurden die Zellen durch eine im Mittel 9-minütige Perfusion der Leber mit einer Kollagenaselösung gewonnen. Die wie unter Punkt 2.1.3.1 beschrieben hergestellten Zellsuspensionen enthielten im Durchschnitt $3,35 \times 10^8 \pm 0,84 \times 10^8$ Hepatozyten pro Isolation. Durch die Anwendung der Trypanblau-Methode konnten tote von vitalen Zellen abgegrenzt werden. Bezogen auf die Gesamtzahl isolierter Zellen fanden sich durchschnittlich $87,1 \pm 4,99\%$ vitale Zellen, die in einer Aussiedlungskonzentration von 10×10^6 Zellen pro ml Zellsuspension auf die PLLA-Polymere zur Kultivierung in den Bioreaktoren ausgesiedelt wurden. Jedes Polymer wurde mit 400 μ l Zellsuspension bedeckt, so dass pro Polymer 4×10^6 Zellen ausgesiedelt wurden. Eine Übersicht über die beschriebenen Ergebnisse bei der Hepatozytengewinnung zeigt die Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1

Hepatozytengewinnung

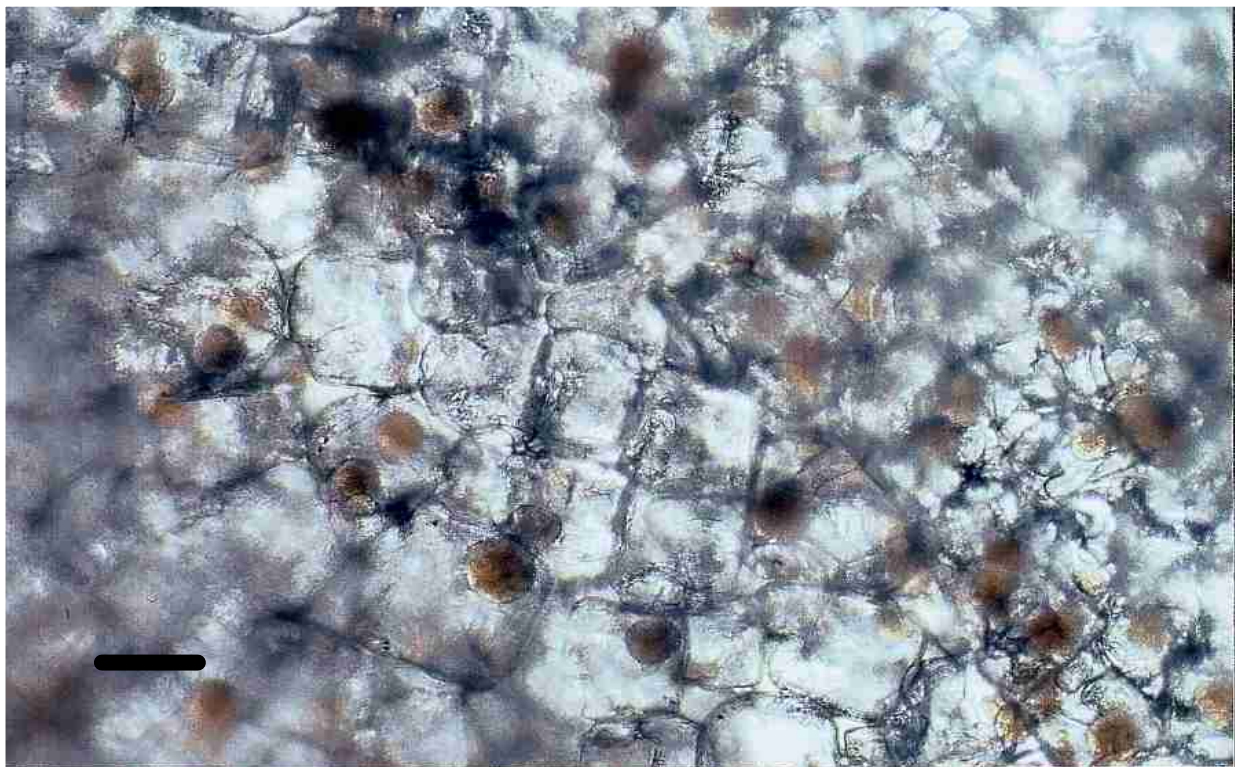
Hepatozyten-isolation	AFR in ml/min	Gewicht des Tieres in g	Perfusionszeit d. Kollagenase	Anzahl der Hepatozyten	Vitalität in %
H-1	7	352	10, 20 Min.	$2,64 \times 10^8$	80,00
H-2	24	176	9, 50 Min.	$3,39 \times 10^8$	94,96
H-3	52	199	6, 50 Min.	$4,05 \times 10^8$	91,22
H-4	7	225	10, 15 Min.	$2,40 \times 10^8$	84,21
H-5	24	326	9, 15 Min.	$2,85 \times 10^8$	84,40
H-6	52	225	8, 45 Min.	$4,79 \times 10^8$	87,88
Mittelwert	-	250,5	9, 13 Min.	$3,35 \times 10^8$	87,11
St.-Abw.	-	65,2	1,26	$0,84 \times 10^8$	4,99

3.2 Anzahl und Durchmesser der Spheroide

Direkt im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor unter Rezirkulation des Zellkulturmediums erfolgte wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben die Begutachtung des Polymers und der kultivierten Hepatozyten unter dem Phasenkontrastmikroskop (siehe Abbildung 3.1). Es wurden von 2 Untersuchern jeweils die Anzahl gebildeter Spheroide auf dem Polymer in 20 Gesichtsfeldern bei 25-facher Vergrößerung und die Durchmesser von einmalig 10 (Hepatozytenisolation H-1), ansonsten von 20 Spheroide in unterschiedlichen Bereichen des Polymers in μm bestimmt.

Abbildung 3.1

Spheroide Zellaggregate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa $150\ \mu\text{m}$ auf dem Polymergerüst nach 6-tägiger Kultur im Bioreaktor. Flussgeschwindigkeit: $24\ \text{ml/min}$; 25-fache Vergrößerung, Balkenlänge: $200\ \mu\text{m}$

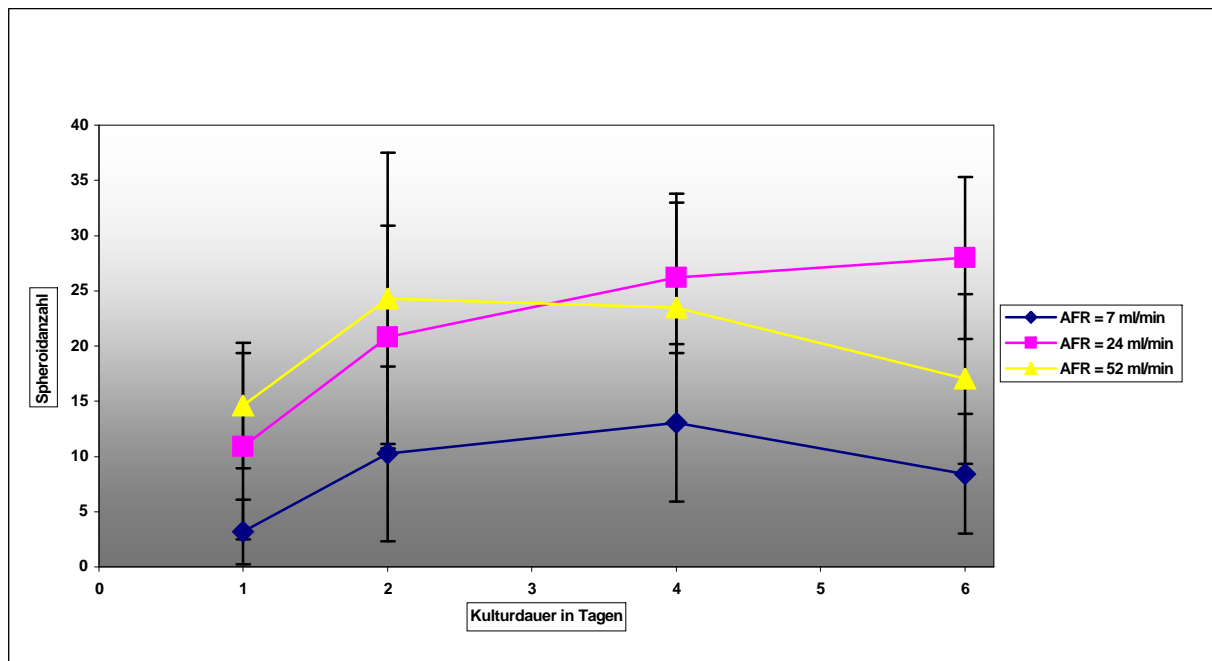


Das Diagramm 3.1 zeigt, dass die Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld im Verlauf der Kulturen von Tag 1 auf Tag 2 zunächst bei allen drei Flussgeschwindigkeiten im Mittel deutlich anstieg. Zum Teil verdoppelte (AFR: $24\ \text{ml/min}$), bzw. verdreifachte sie sich (AFR: $7\ \text{ml/min}$). Während die Spheroidanzahl bei der Flussgeschwindigkeit $24\ \text{ml/min}$ bis zum sechsten Tag durchschnittlich stetig, wenn auch weniger stark zunahm, verringerte sich ihre Anzahl in den Kulturen mit den Flussgeschwindigkeiten

7 und 52 ml/min ab dem vierten, bzw. zweiten Tag wieder. Die durchweg geringste Spheroiddichte wiesen die Kulturen mit der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min mit einer mittleren Spheroidanzahl von $3,18 \pm 2,94$ am ersten Tag und $8,43 \pm 5,44$ an Tag 6 auf (siehe Tabellen 3.2.1 und 3.2.1.1). Die höchste Anzahl an Spheroiden pro Gesichtsfeld wurde in den Kulturen mit der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min beobachtet, die mit $10,93 \pm 8,44$ an Tag 1 und $27,98 \pm 7,33$ am sechsten Tag deutlich höher lag (siehe Tabellen 3.2.2 und 3.2.2.1). Bei allen untersuchten Flussgeschwindigkeiten lag in den ersten zwei bis drei Kulturtagen auch eine parallele Besiedlung der Polymere mit nicht aggregierten Zellen vor. Das Ausmaß dieser Besiedlung war schwankend und unabhängig von der Flussgeschwindigkeit. Ab dem dritten Kulturtag konnten nicht aggregierte Zellen so gut wie nicht mehr nachgewiesen werden. Am stärksten trat dieses Phänomen bei der Isolation H-5 (AFR: 24 ml/min) auf.

Diagramm 3.1

Durchschnittliche Spheroidanzahl pro Gesichtsfeld im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)



Wie in Diagramm 3.2 dargestellt stiegen die Durchmesser der spheroidalen Zellformationen bei allen drei Flussgeschwindigkeiten im Verlauf von Tag 1 auf Tag 6 im Mittel zwischen 43% und 84% an. Die größten mittleren Durchmesser mit $112,25 \pm 35,18 \mu\text{m}$ an Tag 1 und $160,5 \pm 59,54 \mu\text{m}$ an Tag 6 wiesen die Spheroide auf, die mit

der Geschwindigkeit 52 ml/min kultiviert wurden (siehe Tabellen 3.2.6 und 3.2.6.1). Die geringsten Durchmesser fanden sich mit $68,75 \pm 20,25 \mu\text{m}$ an Tag 1 und $126,75 \pm 42,2 \mu\text{m}$ an Tag 6 bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min (siehe Tabellen 3.2.4 und 3.2.4.1). Bei allen untersuchten Flussgeschwindigkeiten traten mit zunehmender Kulturdauer gehäuft Spherode mit einem Durchmesser von $200 \mu\text{m}$ und mehr auf. Die Tendenz zur Bildung größerer Spherode nahm mit der Erhöhung der Flussgeschwindigkeit zu.

Diagramm 3.2

Durchschnittlicher Spheroiddurchmesser in μm im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)

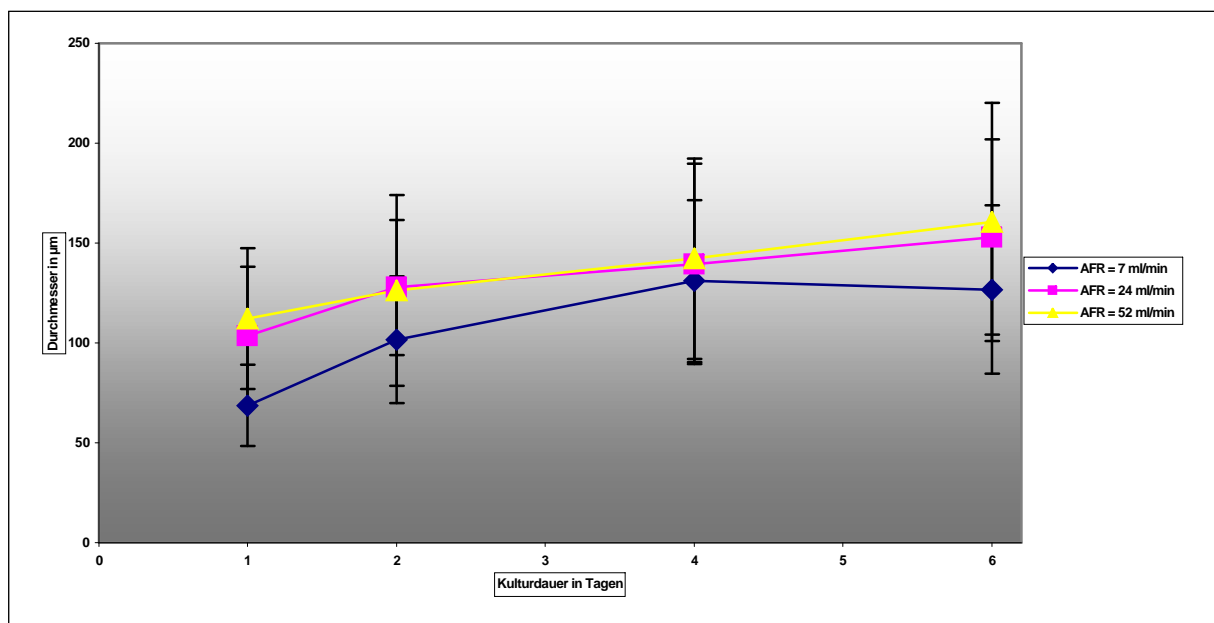


Tabelle 3.2.1

Anzahl der Spherode in 20 Gesichtsfeldern bei 25-facher Vergrößerung;
Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Hepatozyten-isolation	Kulturdauer in Tagen	AFR in ml/min	Spheroid-anzahl	Mittelwert
H-1	1	7	25	1,25
H-1	2	7	77	3,85
H-1	4	7	270	13,5
H-1	6	7	135	6,75
H-4	1	7	102	5,1

Hepatozyten- isolation	Kulturdauer in Tagen	AFR in ml/min	Spheroid- anzahl	Mittelwert
H-4	2	7	333	16,65
H-4	4	7	251	12,55
H-4	6	7	202	10,1

Tabelle 3.2.1.1

Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4 (AFR: 7 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	Mittelwert H-1	Mittelwert H-4	Mittelwert H-1 u. H-4	Standard- abweichung
1	1,25	5,1	3,18	2,94
2	3,85	16,65	10,25	7,92
4	13,5	12,55	13,03	7,13
6	6,75	10,1	8,43	5,44

Tabelle 3.2.2

Anzahl der Spheroide in 20 Gesichtsfeldern bei 25-facher Vergrößerung;
Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Hepatozyten- isolation	Kulturdauer in Tagen	AFR in ml/min	Spheroid- anzahl	Mittelwert
H-2	1	24	362	18,1
H-2	2	24	552	27,6
H-2	4	24	527	26,35
H-2	6	24	519	25,95
H-5	1	24	75	3,75
H-5	2	24	280	14
H-5	4	24	521	26,05
H-5	6	24	600	30

Tabelle 3.2.2.1

Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5 (AFR: 24 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	Mittelwert H-2	Mittelwert H-5	Mittelwert H-2 u. H-5	Standard- abweichung
1	18,1	3,75	10,93	8,44
2	27,6	14	20,8	10,09
4	26,35	26,05	26,2	6,81
6	25,95	30	27,98	7,33

Tabelle 3.2.3

Anzahl der Spheroide in 20 Gesichtsfeldern bei 25-facher Vergrößerung;

Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Hepatozyten- isolation	Kulturdauer in Tagen	AFR in ml/min	Spheroid- anzahl	Mittelwert
H-3	1	52	266	13,3
H-3	2	52	295	14,75
H-3	4	52	417	20,85
H-3	6	52	281	14,05
H-6	1	52	318	15,9
H-6	2	52	677	33,85
H-6	4	52	523	26,15
H-6	6	52	400	20

Tabelle 3.2.3.1

Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6 (AFR: 52 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	Mittelwert H-3	Mittelwert H-6	Mittelwert H-3 u. H-6	Standard- Abweichung
1	13,3	15,9	14,6	5,69
2	14,75	33,85	24,3	13,19
4	20,85	26,15	23,5	10,29
6	14,05	20	17,03	7,69

Tabelle 3.2.4

Durchmesser der Spheroide in μm ;

Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Hepatozyten- isolation	Kulturdauer in Tagen	AFR in ml/min	Durchmesser in μm	Mittelwert in μm
H-1	1	7	50,100,120,50,50,50,50,60, 50,80	66
H-1	2	7	120,110,80,60,140,110,110,70, 100, 90	99
H-1	4	7	150,120,140,100,180,120,170,80, 100,100	126
H-1	6	7	80,150,120,120,130,110,120,70, 200,120	122
H-4	1	7	50,90,50,70,50,80,100,70,50,50, 70,70,80,100,50,60,80,90,100,70	71,5
H-4	2	7	70,110,120,70,110,130,170,130,160 160,110,70,50,90,120,100,70,70,5	104
H-4	4	7	150,100,150,220,110,60,140,90,200,170, 100,110,200,130,100,120,140,110,220,160	139
H-4	6	7	90,110,150,220,110,60,120,170,140,70,120, 90,210,120,210,140,110,130,180,80	131,5

Tabelle 3.2.4.1

Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4 (AFR: 7 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	Mittelwert H-1	Mittelwert H-4	Mittelwert H-1 u. H-4	Standard- Abweichung
1	66	71,5	68,75	20,25
2	99	104	101,5	31,7
4	126	139	131	40,56
6	122	131,5	126,75	42,2

Tabelle 3.2.5

Durchmesser der Spheroide in μm ;

Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Hepatozyten- isolation	Kulturdauer in Tagen	AFR in ml/min	Durchmesser in μm	Mittelwert In μm
H-2	1	24	80,160,160,110,120,90,110,130,150,110,120, 70,110,110,200,190,150,120,80,120	124,5
H-2	2	24	90,150,170,140,100,120,100,100,120,80, 120,110,150,160,180,120,110,170,100,130	126
H-2	4	24	160,100,230,90,110,140,120,170,80,250, 110,220,140,170,110,70,130,260,140,270	153,5
H-2	6	24	130,140,70,170,240,180,140,250,160,80, 70,160,160,70,80,150,190,210,140,120	145,5
H-5	1	24	70,60,80,70,90,50,100,70,90,90,100 100,130,100,50,80,80,80,90,70	82,5
H-5	2	24	100,90,150,100,80,130,150,230,50,150, 150,110,90,140,180,150,120,150,130,140	129,5
H-5	4	24	150,130,130,120,180,130,150,100,120,130, 150,50,80,150,70,150,100,120,130,170	125,5
H-5	6	24	170,150,90,130,190,220,140,200,200,100,90, 80,150,130,250,210,140,110,180,180	160

Tabelle 3.2.5.1

Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5 (AFR: 24 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	Mittelwert H-2	Mittelwert H-5	Mittelwert H-2 u. H-5	Standard- abweichung
1	124,5	82,5	103,5	34,54
2	126	129,5	127,75	33,8
4	153,5	125,5	139,5	50,1
6	145,5	160	152,75	48,9

Tabelle 3.2.6

Durchmesser der Spheroide in μm ;

Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Hepatozyten-isolation	Kulturdauer in Tagen	AFR in ml/min	Durchmesser in μm	Mittelwert in μm
H-3	1	52	120,110,70,150,220,90,90,110,70,120,130,110,70,170,120,100,110,90,170,150	118,5
H-3	2	52	150,170,160,120,80,140,130,120,130,130,100,100,100,50,200,70,70,200,120,50	119,5
H-3	4	52	100,140,120,190,140,80,150,120,170,170,70,190,80,150,160,110,100,250,90,50	131,5
H-3	6	52	190,280,100,170,150,140,80,80,220,150,110,280,130,130,140,120,70,110,210,110	148,5
H-6	1	52	110,70,150,100,70,170,130,80,150,110,150,90,80,100,120,50,80,80,100,130	106
H-6	2	52	270,180,130,180,170,90,120,70,130,170,70,190,90,100,110,110,90,120,70,200	133
H-6	4	52	190,170,140,140,130,200,120,180,100,170,180,100,100,150,120,90,90,,200,190,300	153
H-6	6	52	200,170,190,180,150,350,200,140,100,110,170,170,130,150,290,180,160,100,160,150	172,5

Tabelle 3.2.6.1

Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6 (AFR: 52 ml/min)

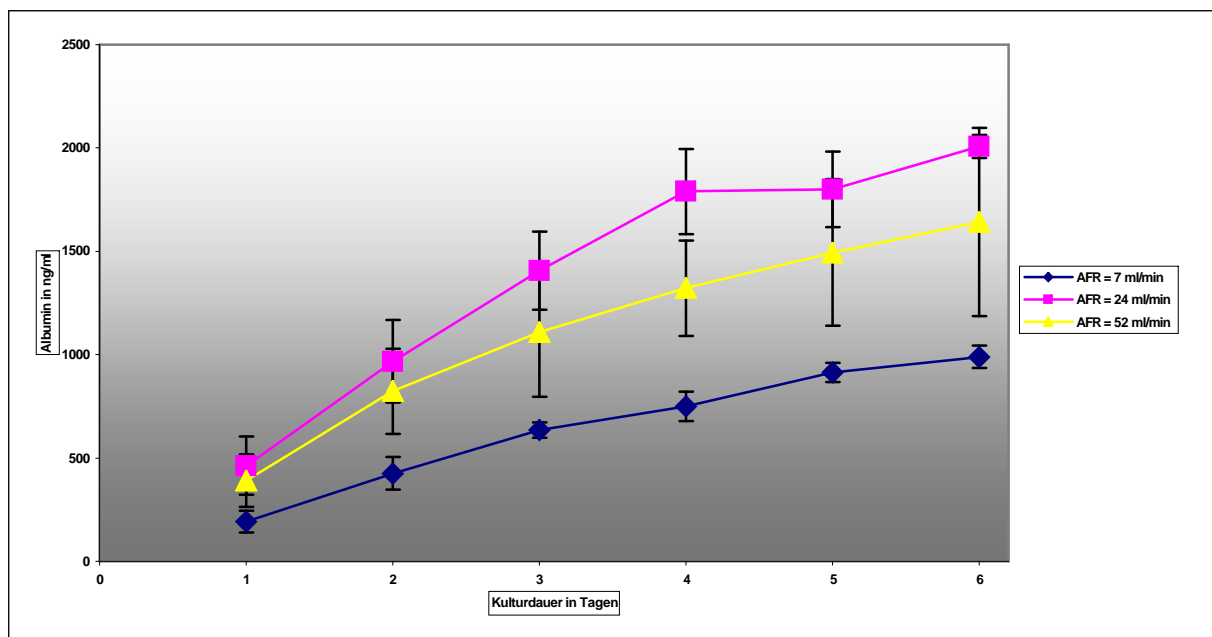
Kulturdauer in Tagen	Mittelwert H-3	Mittelwert H-6	Mittelwert H-3 u. H-6	Standardabweichung
1	118,5	106	112,25	35,18
2	119,5	133	126,25	47,84
4	131,5	153	142,25	50,12
6	148,5	172,5	160,5	59,54

3.3 Albuminkonzentration im Zellkulturmedium

Zur Bestimmung des von den kultivierten Hepatozyten produzierten Albumins wurden im Verlauf einer 6-tägigen Kultur aus jedem Bioreaktor täglich 5 ml Medium entnommen. Der Albumingehalt der Mediumproben wurde, wie unter Punkt 2.4 und 2.4.1 ausführlich dargestellt, unter Verwendung eines ELISA-Sandwich-Verfahrens ermittelt. Das nachfolgende Diagramm 3.3 stellt die Gesamtkonzentration des von den Hepatozyten sezernierten Albumins im Kulturmedium dar und zeigt, dass die Fähigkeit der Zellen zur Albuminproduktion über die gesamte Kulturdauer erhalten blieb.

Diagramm 3.3

Mediumalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)

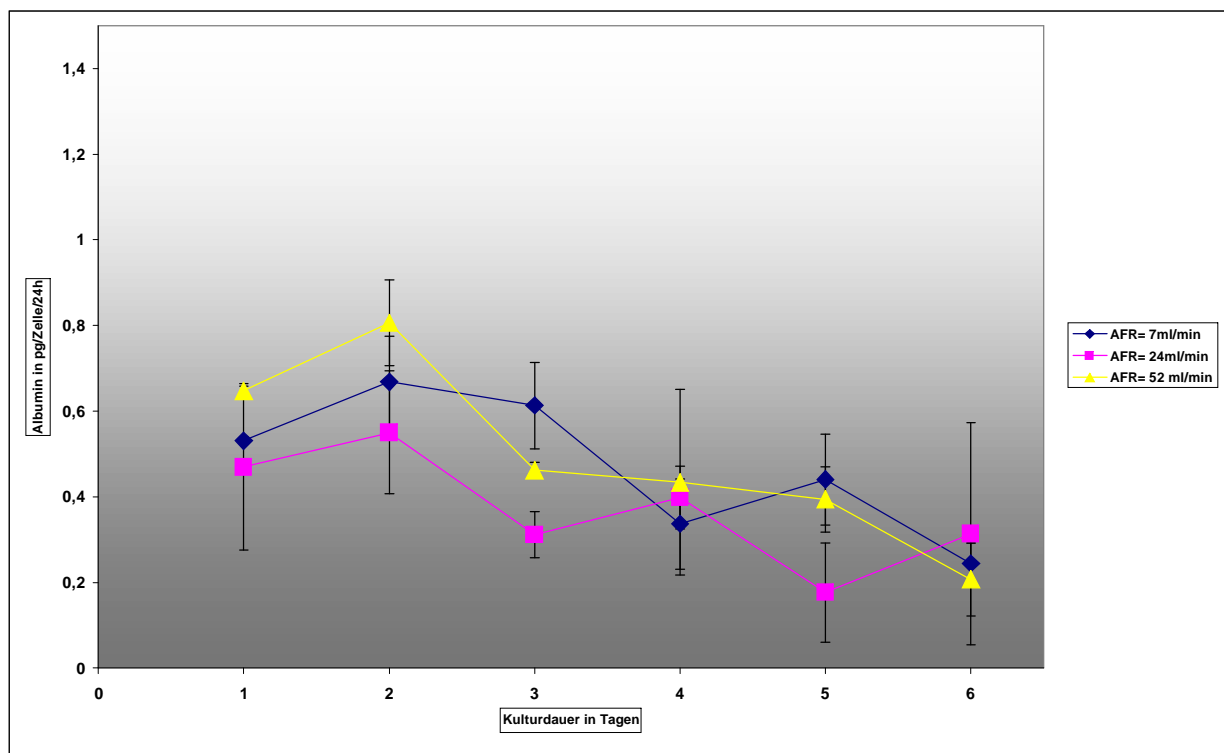


Die Albuminkonzentration im Zellkulturmedium stieg bei allen drei untersuchten Flussgeschwindigkeiten im Verlauf der 6-tägigen Kultur im Mittel um das Vier- bis Fünffache bezogen auf die Konzentrationen nach Tag 1 deutlich an. Der Konzentrationsanstieg pro Tag betrug bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min im Mittel $164,96 \pm 54,86$ ng/ml (siehe Tabelle 3.3.1). Die Zellen, die mit den Flussgeschwindigkeiten 24, bzw. 52 ml/min kultiviert wurden, wiesen einen täglichen Konzentrationsanstieg von durchschnittlich $334,51 \pm 173,07$ ng/ml, bzw. $273,63 \pm 107,28$ ng/ml auf (siehe Tabellen 3.3.2 und 3.3.3). Um eine genauere Aussage über die Syntheseleistungen

der Zellen zu treffen, wurde aus diesen Messwerten die Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg berechnet. Das Diagramm 3.4 zeigt das Ergebnis über den gesamten Kulturverlauf in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit. Die hierfür notwendige Ermittlung der Zellzahl auf den Polymeren erfolgte über die unter Punkt 3.4 dargestellte quantitative DNA-Messung. Als Referenzwert fungierte der im Rahmen der DNA-Standardkurve (Diagramm 3.5 und Tabelle 3.4.1) ermittelte Messwert für die Zellzahl 100.000. Weiterhin wurden für Berechnung die gemessenen Konzentrationsangaben in ng/ml durch 5 dividiert, um die absolute Albuminkonzentration in den Proben (Volumen: 200 µl) zu ermitteln. Die Daten für die Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit sind den Tabellen 3.3.4 bis 3.3.6 zu entnehmen.

Diagramm 3.4

Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit



Die Syntheseleistung der einzelnen Zellen stieg bei allen Flussgeschwindigkeiten an den ersten beiden Kulturtagen an und erreichte ein Maximum am zweiten Kulturtag mit Werten zwischen $0,47 \pm 0,2$ pg/Zelle/24h bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min und $0,65 \pm 0,01$ pg/Zelle/24h bei der Flussgeschwindigkeit 52 ml/min. Ab diesem Tag

war bei allen Geschwindigkeiten ein Abfall der Syntheseleistung zu beobachten. Am sechsten Kulturtag lagen die Werte zwischen $0,21 \pm 0,09$ pg/Zelle/24h bei der Flussgeschwindigkeit 52 ml/min und $0,31 \pm 0,26$ pg/Zelle/24h bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min und somit zwischen 30 und 65% niedriger als am zweiten Kulturtag. Die nahezu durchweg geringste Syntheseleistung wiesen die Zellen auf, die mit der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min kultiviert wurden. Hierbei gilt es jedoch die, wie unter Punkt 3.4 dargestellt, deutlich verstärkte Besiedlung des Polymers mit einzelnen Zellen bei der Kultur H-5 zu berücksichtigen, die bei den anderen Kulturen in dieser ausgeprägten Form nicht auftrat. Wenn nur die Kultur H-2 berücksichtigt wird, lagen die Syntheseleistungen deutlich näher an denen der anderen Flussgeschwindigkeiten. Die Syntheseraten verliefen bei diesen ab dem zweiten Kulturtag ähnlich, jedoch mit in der Regel höheren Werten bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min.

Tabelle 3.3.1

Hepatozytenisolationen H-1 und H-4

Medialalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Tag	1	2	3	4	5	6
AFR in ml/min	7	7	7	7	7	7
B 1	217,55	–	–	–	–	–
B 2	243,43	322,6	–	–	–	–
B 3	190,63	575,65	585,45	810,74	–	–
B 4	65,15	387,98	654,82	748,91	866,84	935,96
Mittelwert H-1	179,19	428,74	620,14	779,82	866,84	935,96
B 1	224,61	–	–	–	–	–
B 2	232,14	448,82	–	–	–	–
B 3	188,02	381,68	619,13	633,35	–	–
B 4	177,52	436,11	685,40	806,79	961,08	1043,59
Mittelwert H-4	205,57	422,20	652,26	720,07	961,08	1043,59

Mittelwert H-1 u. H-4	192,38	425,47	636,20	749,94	913,96	989,77
St.-Abw.	52,78	78,66	37,53	71,63	47,12	53,82
Täglicher Anstieg	192,38	233,09	210,73	113,74	164,01	75,81
Mittelwert Tag 1 - 6	164,96 ± 54,86		–	–	–	–

Tabelle 3.3.2

Hepatozytenisolationen H-2 und H-5

Mediumalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Tag	1	2	3	4	5	6
AFR in ml/min	24	24	24	24	24	24
B 1	298,58	–	–	–	–	–
B 2	436,05	917,26	–	–	–	–
B 3	678,55	1234,37	1552,04	1700,11	–	–
B 4	566,89	1039,83	1244,06	1536,77	1575,3	1938,91
Mittelwert H-2	495,02	1063,82	1398,05	1618,44	1575,3	1938,91
B 1	608,24	–	–	–	–	–
B 2	283,41	534,53	–	–	–	–
B 3	554,49	1062,08	1672,33	2163,13	–	–
B 4	277,02	1020,45	1159,79	1756,79	2025,25	2075,16
Mittelwert H-5	430,79	872,35	1416,06	1959,96	2025,25	2075,16
Mittelwert H-2 u. H-5	462,90	968,09	1407,05	1789,20	1800,27	2007,04
St.-Abw.	141,94	199,35	189,26	206,17	183,69	55,62
Täglicher Anstieg	462,90	505,18	438,97	382,15	11,07	206,77
Mittelwert Tag 1 - 6	334,51 ± 173,07		–	–	–	–

Tabelle 3.3.3

Hepatozytenisolationen H-3 und H-6

Mediumalbuminkonzentration in ng/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Tag	1	2	3	4	5	6
AFR in ml/min	52	52	52	52	52	52
B 1	264,61	–	–	–	–	–
B 2	258,84	646,26	–	–	–	–
B 3	390,24	853,08	1092,98	1308,9	–	–
B 4	212,76	457,09	617,24	956,87	1139,61	1187,01
Mittelwert H-3	281,61	652,15	855,11	1132,88	1139,61	1187,01
B 1	573,13	–	–	–	–	–
B 2	400,55	969,71	–	–	–	–
B 3	503,14	1019,04	1257,05	1440,17	–	–
B 4	521,71	993,75	1472,28	1580,45	1849,35	2096,56
Mittelwert H-6	499,63	994,17	1364,66	1510,31	1849,35	2096,56
Mittelwert H-3 u. H-6	390,62	823,16	1109,89	1321,6	1494,48	1641,79
St.-Abw.	126,56	206,21	314,63	231,44	354,87	454,78
Täglicher Anstieg	390,62	432,53	286,73	211,71	172,88	147,31
Mittelwert Tag 1 - 6	273,63 ± 107,28		–	–	–	–

Tabelle 3.3.4

Hepatozytenisolationen H-1 und H-4

Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Tag	1	2	3	4	5	6
AFR in ml/min	7	7	7	7	7	7
B 1	0,36	–	–	–	–	–
B 2	1,09	0,35	–	–	–	–
B 3	0,52	1,06	0,27	0,62	–	–
B 4	0,19	0,92	0,76	0,27	0,33	0,2
Mittelwert H-1	0,54	0,78	0,51	0,44	0,33	0,2
B 1	0,68	–	–	–	–	–
B 2	0,35	0,32	–	–	–	–
B 3	0,43	0,45	0,55	0,03	–	–
B 4	0,63	0,92	0,88	0,43	0,55	0,29
Mittelwert H-4	0,52	0,56	0,71	0,23	0,55	0,29
Mittelwert H-1 u. H-4	0,53	0,67	0,61	0,34	0,44	0,24
St.-Abw.	0,01	0,11	0,10	0,11	0,11	0,05

Tabelle 3.3.5

Hepatozytenisolationen H-2 und H-5

Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Tag	1	2	3	4	5	6
AFR in ml/min	24	24	24	24	24	24
B 1	0,33	–	–	–	–	–
B 2	0,56	0,62	–	–	–	–
B 3	0,87	0,72	0,41	0,19	–	–
B 4	0,89	0,74	0,32	0,46	0,06	0,57

Mittelwert H-2	0,66	0,693	0,365	0,326	0,061	0,572
B 1	0,35	–	–	–	–	–
B 2	0,12	0,11	–	–	–	–
B 3	0,33	0,30	0,36	0,29	–	–
B 4	0,30	0,81	0,15	0,65	0,29	0,05
Mittelwert H-5	0,28	0,41	0,26	0,47	0,29	0,05
Mittelwert H-2 u. H-5	0,47	0,55	0,31	0,4	0,18	0,31
St.-Abw.	0,2	0,14	0,05	0,07	0,12	0,26

Tabelle 3.3.6

Hepatozytenisolationen H-3 und H-6

Albuminproduktion pro Hepatozyt und Tag in pg im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung in den Bioreaktoren (B 1 – B 4); Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Tag	1	2	3	4	5	6
AFR in ml/min	52	52	52	52	52	52
B 1	0,44	–	–	–	–	–
B 2	0,79	1,18	–	–	–	–
B 3	0,77	0,92	0,48	0,43	–	–
B 4	0,55	0,63	0,41	0,88	0,47	0,12
Mittelwert H-3	0,64	0,91	0,44	0,65	0,47	0,12
B 1	0,69	–	–	–	–	–
B 2	0,49	0,70	–	–	–	–
B 3	0,84	0,86	0,4	0,31	–	–
B 4	0,62	0,56	0,57	0,13	0,32	0,29
Mittelwert H-6	0,66	0,71	0,48	0,22	0,32	0,29
Mittelwert H-3 u. H-6	0,65	0,81	0,46	0,43	0,39	0,21
St.-Abw.	0,01	0,1	0,02	0,22	0,08	0,09

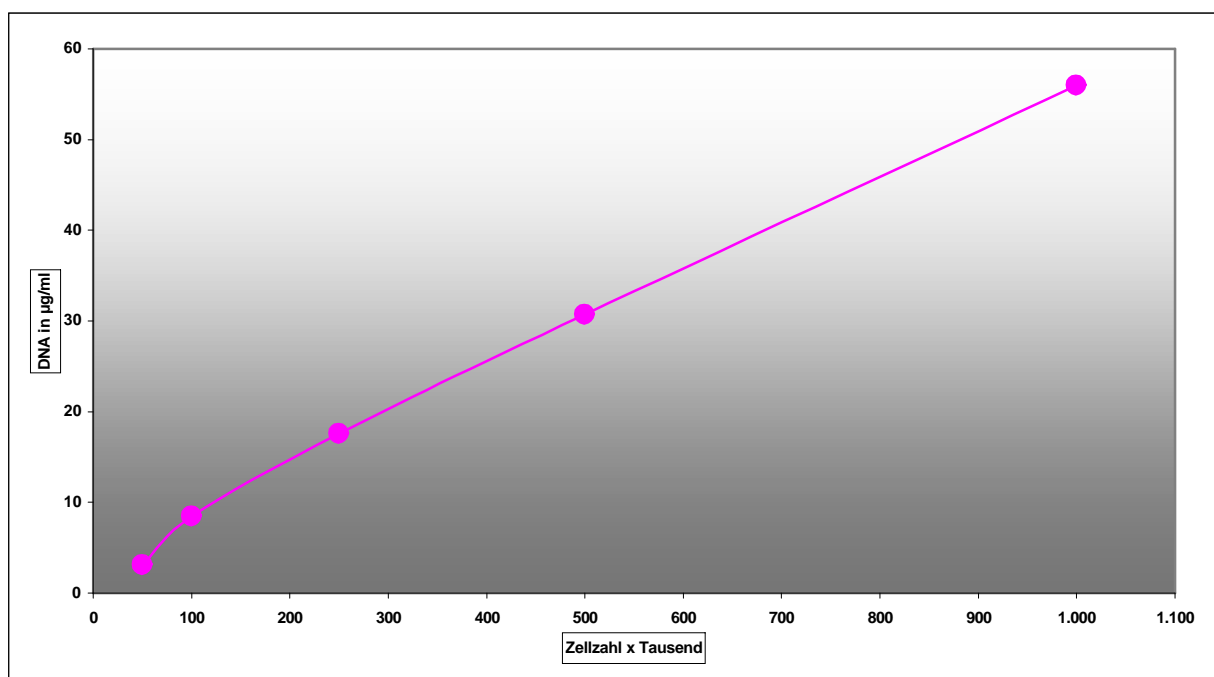
3.4 Quantitative DNA-Bestimmung

Zur quantitativen DNA-Bestimmung der auf den PLLA-Polymeren kultivierten Hepatozyten wurde die zelluläre DNA zunächst wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben isoliert. Das unter Punkt 2.5.2 dargestellte Fluoreszenzphotometrische Verfahren erlaubte im Anschluss die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen in $\mu\text{g/ml}$. Die Polymere wurden im Anschluss an die Kultivierung in den Bioreaktoren halbiert und den entsprechenden statischen Kulturen zur Bestimmung des Ammoniakabbaus und der MEGX-Bildung zugeführt. Im Rahmen der DNA-Isolierung wurde der letzte Schritt des Isolationsverfahrens, die Herauslösung der DNA aus der Membran des Zentrifugationsröhrchens, zweimal durchgeführt. In den weiter unten aufgeführten Tabellen beziehen sich die Bezeichnungen „A“ für Ammoniak und „M“ für MEGX daher auf die entsprechenden Polymerhälften, und die Ziffern „1“ und „2“ auf die beiden Lösungsschritte.

Um den gemessenen DNA-Gehalt der Hepatozyten auf den Polymeren mit einer Zellanzahl in Verbindung zu bringen, wurde der DNA-Gehalt verschiedener Zellsuspensionsvolumina mit bekannten Hepatozytenkonzentrationen zur Erstellung der im folgenden Diagramm 3.5 dargestellten DNA-Standardkurve ermittelt.

Diagramm 3.5

DNA-Standardkurve



Unter Berücksichtigung dieser Standardkurve zeigte sich, dass sich bei allen Flussgeschwindigkeiten von den ursprünglich vier Millionen ausgesiedelten Zellen bereits nach Tag 1 der Großteil der Zellen von den Polymeren gelöst hatte. Nach Tag 1 fanden sich nur noch etwa 100.000 bis 400.000 Zellen auf den Polymeren. Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der Zellen bereits bei der Überführung der frisch besiedelten Polymere aus den Petrischalen in die Bioreaktoren durch ausfließende Zellsuspension in den Petrischalen zurückblieb. Weiterhin wurde bei Kulturbeginn ein weiterer Teil der Zellen durch die Strömung des Zellkulturmediums aus den Polymeren abgeschwemmt. Diese Annahme konnte durch mikroskopische Untersuchungen des Zellkulturmediums aus den Bioreaktoren in dem viele einzelne Zellen und auch sehr vereinzelt abgelöste spheroidale Zellformationen nachgewiesen wurden, bestätigt werden.

Dem Diagramm 3.6 ist zu entnehmen, dass sich der durchschnittlich höchste DNA-Gehalt und somit die höchsten Zellkonzentrationen auf den Polymeren fanden, die mit der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min kultiviert wurden (siehe Tabellen 3.4.3 und 3.4.3.1). Die deutlich erhöhten Werte bei der Isolation H-5 lassen sich durch eine zeitweilige vor allem zu Kulturbeginn aufgetretene Besiedlung des Polymers mit einzelnen Zellen erklären, die bei den anderen Isolationen auch aber bei weitem nicht in dieser ausgeprägten Form auftrat. Der Abfall des DNA-Gehaltes von Tag 2 auf Tag 6 dürfte darauf zurückzuführen sein, dass sich die einzelnen Zellen durch die ständige Rezirkulation des Kulturmediums im Verlauf der Kultur in großer Zahl leichter von der Polymerstruktur lösten als die Spheroide. Bei den beiden anderen untersuchten Flussgeschwindigkeiten zeigte der DNA-Gehalt dementsprechend weniger starke Schwankungen (siehe Tabellen 3.4.2, 3.4.2.1, 3.4.4 und 3.4.4.1). Doch auch hier trat ein leichter Abfall der Werte am sechsten Tag bezogen auf die Werte von Tag 1 auf. Die durchschnittlich geringsten DNA-Konzentrationen fanden sich bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min.

Diagramm 3.6

DNA-Gehalt der auf den Polymeren ausgesiedelten Hepatozyten im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)

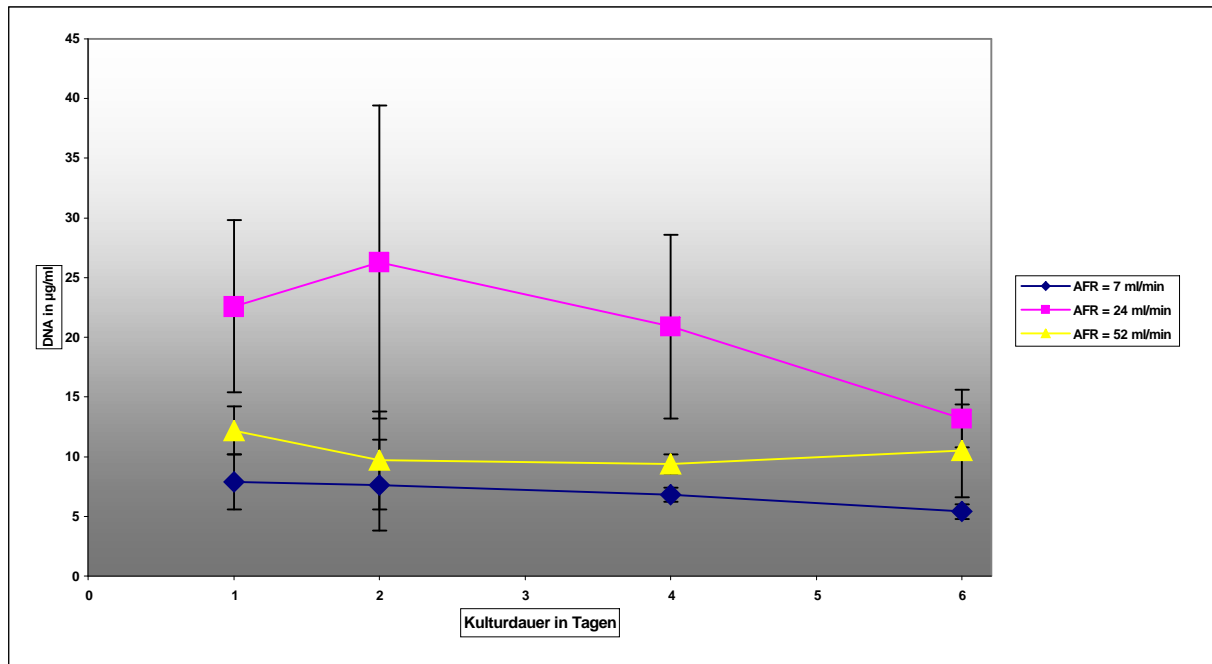


Tabelle 3.4.1

DNA-Standardkurve; Zellsuspension gelöst in PBS

Zellsuspension in µl	PBS in µl	Zellzahl	Messreihe 1	Messreihe 2	DNA Mittelwert in ng/ml	DNA Mittelwert in µg/ml
5	200	50.000	24	7	15,5	3,1
10	200	100.000	65	20	42,5	8,5
25	175	250.000	114	62	88	17,6
50	170	500.000	246	61	153,5	30,7
100	150	1.000.000	380	180	280	56
200	115	2.000.000	357	329	343	68,6

Tabelle 3.4.2

Hepatozytenisolationen H-1 und H-4

DNA-Gehalt in µg/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;

Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Isolation	Kulturtag	A 1	A 2	M 1	M 2	DNA in ng/ml	DNA in µg/ml
H-1	1	20	5	22	4	51	10,2
H-1	2	7	2	8	2	19	3,8
H-1	4	12	2	14	3	31	6,2
H-1	6	9	2	11	8	30	6,0
H-4	1	11	2	8	7	28	5,6
H-4	2	20	1	33	3	57	11,4
H-4	4	15	2	17	3	37	7,4
H-4	6	11	2	9	2	24	4,8

Tabelle 3.4.2.1

Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4 (AFR: 7 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-1 DNA in µg/ml	H-4 DNA in µg/ml	Mittelwert H-1 u. H-4	Standard- abweichung
1	10,2	5,6	7,9	2,3
2	3,8	11,4	7,6	3,8
4	6,2	7,4	6,8	0,6
6	6,0	4,8	5,4	0,6

Tabelle 3.4.3

Hepatozytenisolationen H-2 und H-5

DNA-Gehalt in µg/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;

Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Isolation	Kulturtag	A 1	A 2	M 1	M 2	DNA in ng/ml	DNA in µg/ml
H-2	1	42	5	25	5	77	15,4
H-2	2	42	5	15	4	66	13,2
H-2	4	26	5	25	10	66	13,2
H-2	6	19	5	25	5	54	10,8

Isolation	Kulturtag	A 1	A 2	M 1	M 2	DNA in ng/ml	DNA in µg/ml
H-5	1	64	10	67	8	149	29,8
H-5	2	54	13	115	15	197	39,4
H-5	4	39	10	60	34	143	28,6
H-5	6	35	8	29	6	78	15,6

Tabelle 3.4.3.1

Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5 (AFR: 24 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-2 DNA in µg/ml	H-5 DNA in µg/ml	Mittelwert H-2 u. H-5	Standard- abweichung
1	15,4	29,8	22,6	7,2
2	13,2	39,4	26,3	13,1
4	13,2	28,6	20,9	7,7
6	10,8	15,6	13,2	2,4

Tabelle 3.4.4

Hepatozytenisolationen H-3 und H-6

DNA-Gehalt in µg/ml im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung;

Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Isolation	Kulturtag	A 1	A 2	M 1	M 2	DNA in ng/ml	DNA in µg/ml
H-3	1	24	3	14	10	51	10,2
H-3	2	13	3	11	1	28	5,6
H-3	4	10	7	19	7	43	8,6
H-3	6	11	2	15	5	33	6,6
H-6	1	23	5	36	7	71	14,2
H-6	2	23	6	34	6	69	13,8
H-6	4	14	5	24	8	51	10,2
H-6	6	29	10	22	11	72	14,4

Tabelle 3.4.4.1

Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6 (AFR: 52 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-3 DNA in µg/ml	H-6 DNA in µg/ml	Mittelwert H-3 u. H-6	Standard- abweichung
1	10,2	14,2	12,2	2
2	5,6	13,8	9,7	4,1
4	8,6	10,2	9,4	0,8
6	6,6	14,4	10,5	3,9

3.5 Ammoniakabbau in 4-stündiger statischer Kultur

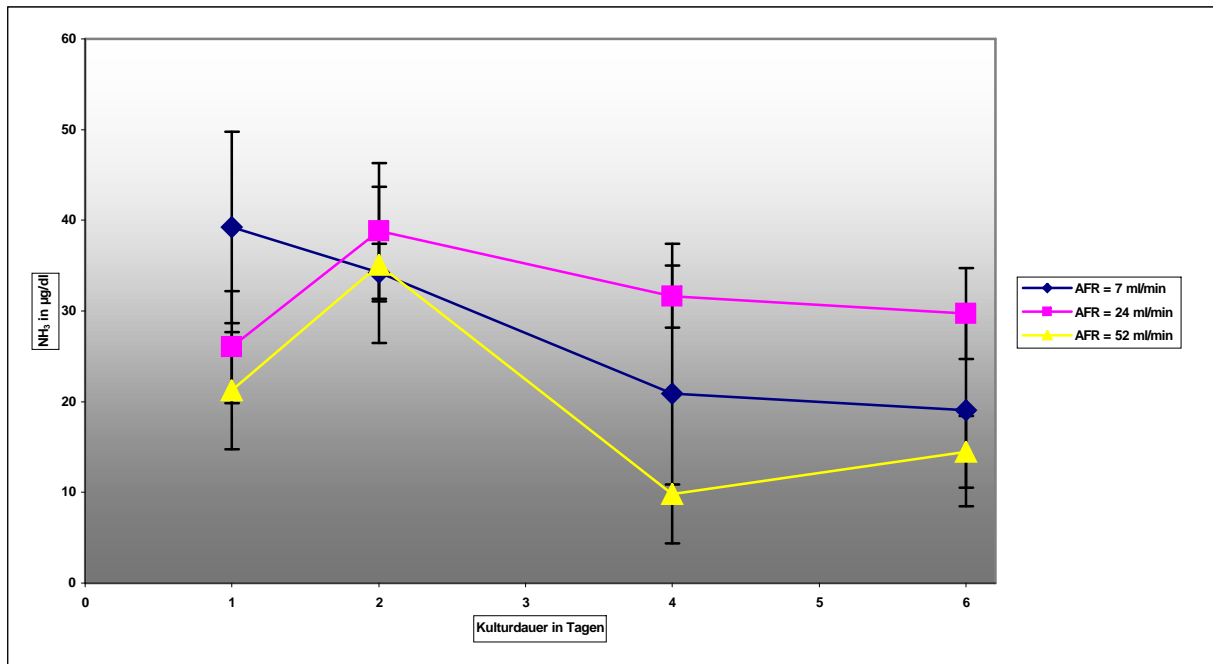
Wie unter den Punkten 2.3, 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben wurden die Polymere im Anschluss an die Kultivierung in den Bioreaktoren zunächst unter Berücksichtigung ihrer Besiedlungsdichte halbiert, und die Polymerhälften dann zur Bestimmung der Fähigkeit der Hepatozyten zum Ammoniakabbau, bzw. der Harnstoff-Bildung und zur Bildung des Lidocain-Stoffwechselmetaboliten MEGX für vier Stunden, bzw. 30 Minuten statisch weiterkultiviert. Der Ammoniakgehalt der entnommenen Proben wurde mit Hilfe des unter Punkt 2.6 dargestellten Testverfahrens ermittelt.

Im Verlauf der vierstündigen statischen Kulturen verringerten sich die Ammoniakkonzentrationen im Kulturmedium durch die Stoffwechselleistung der Hepatozyten. Durch die Zugabe des Harnstoff spaltenden Enzyms Urease stiegen sie wieder in den Bereich der Ausgangskonzentrationen an. So konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Ammoniakkonzentrationen auf der aktiven Harnstoffbildung der Zellen beruhte.

Das Diagramm 3.7 zeigt die Konzentrationsminderungen im Zellkulturmedium in den vierstündigen statischen Kulturen in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit. Ihm ist zu entnehmen, dass die Fähigkeit der kultivierten Zellen Ammoniak aus dem Kulturmedium abzubauen und in Harnstoff umzuwandeln bei allen Flussgeschwindigkeiten über den gesamten Zeitraum der Kulturdauer in den Bioreaktoren erhalten blieb (siehe auch Tabellen 3.5.1 bis 3.5.3.1).

Diagramm 3.7

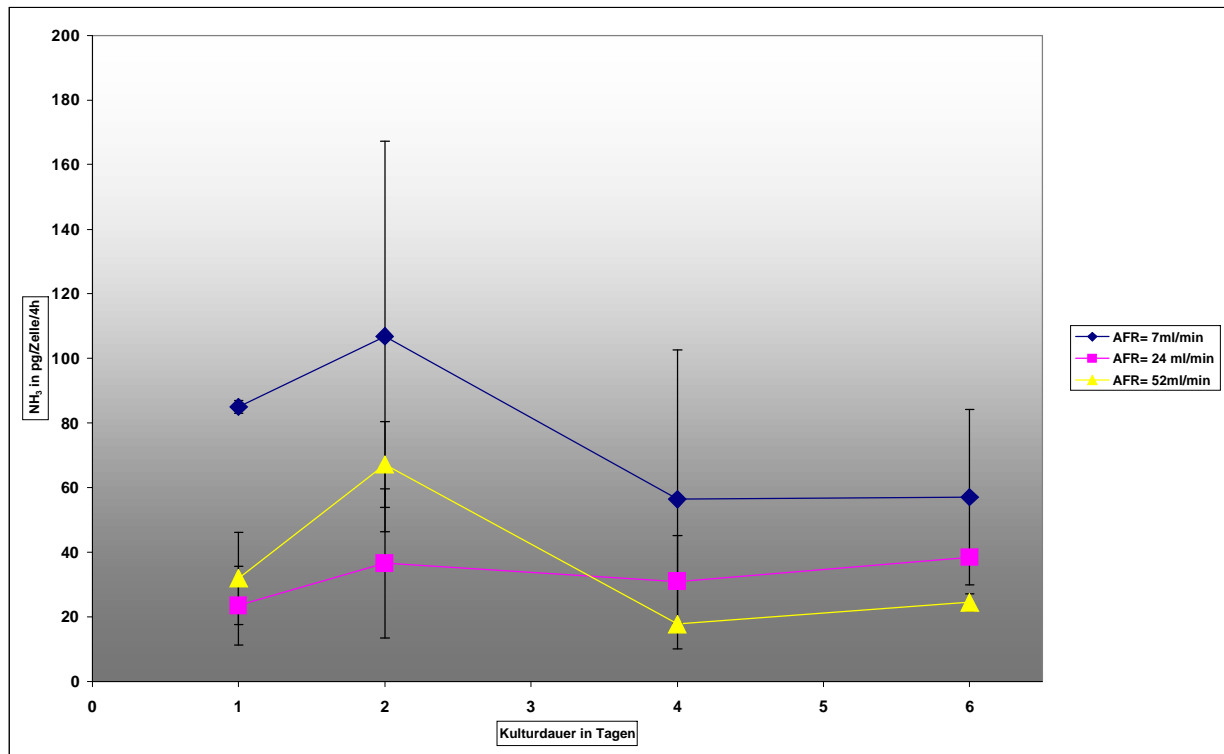
NH₃-Konzentrationsabnahme in 4-stündiger statischer Kultur im Anschluss an die Kultur im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)



Zur genaueren Beurteilung der zellulären Stoffwechsellleistung wurde die NH₃-Abbaurrate pro Hepatozyt in 4 Stunden in pg in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit bestimmt. Wie bereits unter Punkt 3.3 beschrieben erfolgte die Berechnung mit Hilfe der erstellten DNA-Standardkurve. Die gemessenen Konzentrationsminderungen in µg/dl wurden durch 10 dividiert (Probenvolumen: 10 ml), um den absoluten Wert in der Probe zu bestimmen, und mit 2 multipliziert, um die Werte auf das gesamte Polymer hochzurechnen. Die Ergebnisse sind im nachfolgenden Diagramm 3.8 sowie in den Tabellen 3.5.4 bis 3.5.6 dargestellt.

Diagramm 3.8

NH₃-Abbau pro Hepatozyt in pg in 4 Stunden statischer Kultur im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit



Ähnlich wie bei der Albuminsynthese zeigte sich bei der Ammoniakabbaurate pro Hepatozyt bei den verschiedenen Flussgeschwindigkeiten ein Maximum am zweiten Kulturtag. Hier lagen die mittleren Abbauraten bei $106,82 \pm 60,5$ pg NH₃/Zelle/4h bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min und $36,57 \pm 23,03$ pg NH₃/Zelle/4h bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min und sanken am sechsten Kulturtag auf Werte zwischen $57,03 \pm 27,13$ pg NH₃/Zelle/4h bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min und $24,48 \pm 2,7$ pg NH₃/Zelle/4h bei der Flussgeschwindigkeit 52 ml/min ab. Die mit Abstand höchsten NH₃-Abbauraten pro Hepatozyt in vier Stunden wiesen über den gesamten Kulturverlauf die Zellen auf, die mit der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min in den Bioreaktoren kultiviert wurden. Die durchschnittlichen Abbauraten bei der Geschwindigkeit 24 ml/min wiesen über den Kulturverlauf weniger starke Schwankungen auf und lagen ab dem vierten Kulturtag über den Raten der Flussgeschwindigkeit 52 ml/min.

Tabelle 3.5.1

Hepatozytenisolationen H-1 und H-4

Ammoniak (NH₃)-Abbau in 4-stündiger statischer Kultur einer Polymerhälfte

im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; NH₃ in µg/dl

Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Isolation	Kultur in Tagen	Zeit in Stunden	Probe	Probe + Urease	Kontrolle	Kontrolle + Urease
H-1	1	0	365,66	368,43	365,66	368,43
H-1	1	2	365,66	369,82	367,97	364,76
H-1	1	4	315,80	407,21	370,65	366,29
H-1	2	0	367,05	373,97	367,05	373,97
H-1	2	2	340,73	362,89	361,51	361,51
H-1	2	4	329,65	367,05	369,82	382,28
H-1	4	0	352,70	346,02	352,70	346,02
H-1	4	2	336,67	352,81	352,19	348,69
H-1	4	4	315,29	354,04	347,36	343,35
H-1	6	0	376,22	371,98	376,22	371,98
H-1	6	2	366,32	362,08	356,42	349,35
H-1	6	4	346,52	367,74	360,66	362,08
H-4	1	0	375,42	366,92	375,42	366,92
H-4	1	2	356,51	370,91	378,02	373,69
H-4	1	4	346,79	377,33	363,45	363,45
H-4	2	0	366,74	366,92	366,74	366,92
H-4	2	2	353,21	377,33	374,55	370,39
H-4	2	4	335,68	360,67	359,80	356,51
H-4	4	0	367,69	359,59	367,69	359,59
H-4	4	2	363,12	366,46	373,85	366,81
H-4	4	4	363,29	382,47	361,36	363,29
H-4	6	0	361,18	366,81	361,18	366,81
H-4	6	2	368,22	366,81	369,80	368,22
H-4	6	4	352,74	361,18	359,77	373,85

Tabelle 3.5.1.1

Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4 (AFR: 7 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-1 NH ₃ in µg/dl	H-4 NH ₃ in µg/dl	Mittelwert H-1 u. H-4	Standard- abweichung
1	49,80	28,63	39,22	10,59
2	37,40	31,06	34,23	3,17
4	37,41	4,40	20,91	16,51
6	29,70	8,44	19,07	10,63

Tabelle 3.5.2

Hepatozytenisolationen H-2 und H-5

Ammoniak (NH₃)-Abbau in 4-stündiger statischer Kultur einer Polymerhälfteim Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; NH₃ in µg/dl

Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Isolation	Kultur in Tagen	Zeit in Stunden	Probe	Probe + Urease	Kontrolle	Kontrolle + Urease
H-2	1	0	384,89	384,89	384,89	384,89
H-2	1	2	368,09	382,09	380,69	377,89
H-2	1	4	352,69	389,09	382,09	375,09
H-2	2	0	379,16	372,59	379,16	372,59
H-2	2	2	352,40	385,39	392,12	385,05
H-2	2	4	332,88	390,60	383,03	390,77
H-2	4	0	355,22	355,39	355,22	355,39
H-2	4	2	340,96	347,84	368,28	354,71
H-2	4	4	320,18	354,71	368,28	344,40
H-2	6	0	362,27	347,15	362,27	347,15
H-2	6	2	345,09	346,29	357,97	354,36
H-2	6	4	337,53	354,71	347,84	354,71
H-5	1	0	360,98	355,05	360,98	355,05
H-5	1	2	351,39	363,59	361,85	356,62
H-5	1	4	341,11	360,11	363,59	356,97
H-5	2	0	358,36	355,57	358,36	355,57
H-5	2	2	346,16	370,56	361,85	368,82
H-5	2	4	326,99	370,56	356,62	356,62

Isolation	Kultur in Tagen	Zeit in Stunden	Probe	Probe + Urease	Kontrolle	Kontrolle + Urease
H-5	4	0	366,39	361,18	366,39	361,18
H-5	4	2	354,23	371,61	382,04	376,47
H-5	4	4	338,24	365,56	369,87	370,91
H-5	6	0	368,13	368,13	368,13	368,13
H-5	6	2	354,23	373,35	371,61	361,18
H-5	6	4	333,37	376,82	369,87	374,74

Tabelle 3.5.2.1

Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5 (AFR: 24 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-2 NH ₃ in µg/dl	H-5 NH ₃ in µg/dl	Mittelwert H-2 u. H-5	Standardabweichung
1	32,20	19,87	26,04	6,17
2	46,28	31,37	38,83	7,46
4	35,04	28,15	31,6	3,45
6	24,74	34,76	29,75	5,01

Tabelle 3.5.3

Hepatozytenisolationen H-3 und H-6

Ammoniak (NH₃)-Abbau in 4-stündiger statischer Kultur einer Polymerhälfte

im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; NH₃ in µg/dl

Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Isolation	Kultur in Tagen	Zeit in Stunden	Probe	Probe + Urease	Kontrolle	Kontrolle + Urease
H-3	1	0	366,56	367,42	366,56	367,42
H-3	1	2	352,71	373,48	373,48	373,48
H-3	1	4	338,87	373,48	371,23	368,81
H-3	2	0	377,12	370,02	377,12	370,02
H-3	2	2	352,54	371,75	373,48	370,02
H-3	2	4	350,64	369,85	364,83	367,94
H-3	4	0	378,14	374,63	378,14	374,63
H-3	4	2	378,14	389,05	389,05	377,97
H-3	4	4	369,35	383,42	371,11	370,93

Isolation	Kultur in Tagen	Zeit in Stunden	Probe	Probe + Urease	Kontrolle	Kontrolle + Urease
H-3	6	0	378,14	391,69	378,14	391,69
H-3	6	2	369,35	383,07	382,19	381,66
H-3	6	4	367,59	378,14	375,86	383,24
H-6	1	0	355,60	351,33	355,60	351,33
H-6	1	2	344,27	362,17	363,82	361,19
H-6	1	4	340,82	366,61	357,25	349,85
H-6	2	0	362,01	359,71	362,01	359,71
H-6	2	2	354,45	366,94	354,62	362,34
H-6	2	4	318,31	369,08	353,96	356,42
H-6	4	0	382,73	384,76	382,73	384,76
H-6	4	2	378,67	393,98	392,13	388,63
H-6	4	4	371,84	386,60	386,78	382,73
H-6	6	0	386,60	386,60	386,60	386,60
H-6	6	2	386,60	392,13	392,13	386,42
H-6	6	4	368,15	384,76	384,57	385,49

Tabelle 3.5.3.1

Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6 (AFR: 52 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-3 NH₃ in µg/dl	H-6 NH₃ in µg/dl	Mittelwert H-3 u. H-6	Standard- abweichung
1	27,69	14,78	21,24	6,46
2	26,48	43,70	35,09	8,61
4	8,79	10,84	9,82	1,03
6	10,55	18,45	14,5	3,95

Tabelle 3.5.4

NH₃-Abbau pro Hepatozyt in 4 Stunden (AFR: 7 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-1 NH₃ in pg	H-4 NH₃ in pg	Mittelwert H-1 u. H-4	Standard- abweichung
1	83	86,91	84,96	1,96
2	167,32	46,32	106,82	60,5
4	102,58	10,11	56,35	46,24
6	84,15	29,9	57,03	27,13

Tabelle 3.5.5

NH₃-Abbau pro Hepatozyt in 4 Stunden (AFR: 24 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-2 NH₃ in pg	H-5 NH₃ in pg	Mittelwert H-2 u. H-5	Standard- abweichung
1	35,55	11,34	23,45	12,11
2	59,6	13,54	36,57	23,03
4	45,13	16,73	30,93	14,2
6	38,94	37,88	38,41	0,53

Tabelle 3.5.6

NH₃-Abbau pro Hepatozyt in 4 Stunden (AFR: 52 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-3 NH₃ in pg	H-6 NH₃ in pg	Mittelwert H-3 u. H-6	Standard- abweichung
1	46,15	17,69	31,92	14,23
2	80,39	53,83	67,11	13,28
4	17,39	18,07	17,73	0,34
6	27,17	21,78	24,48	2,7

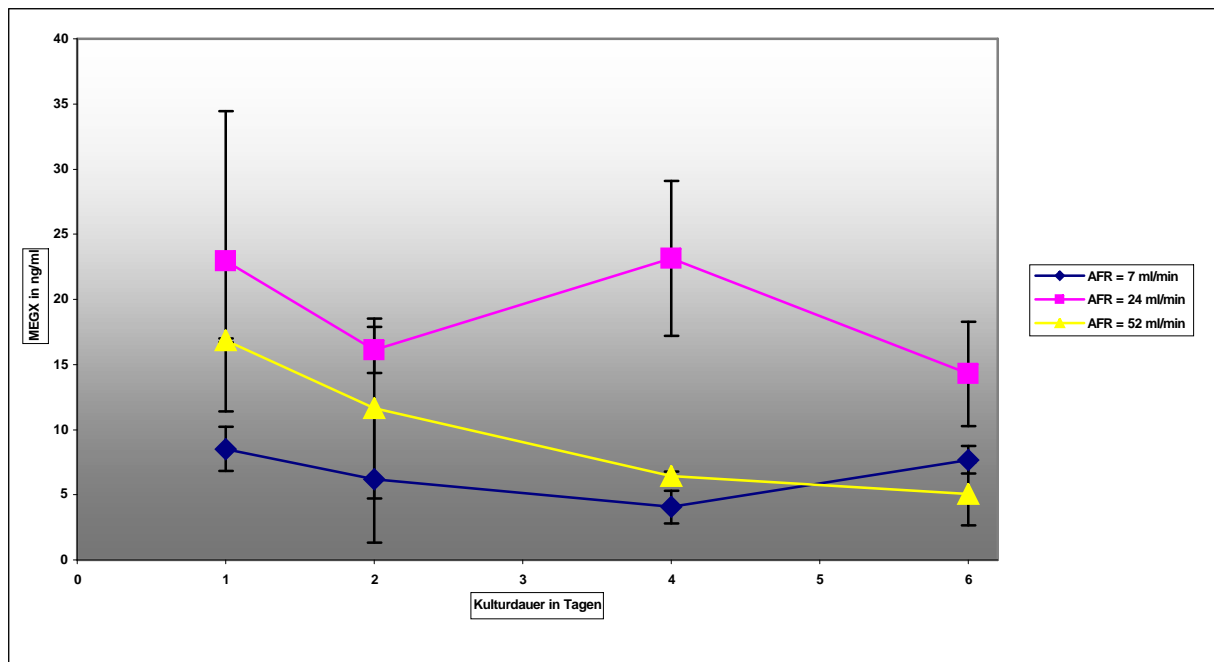
3.6 MEGX (Monoethylglycinylidid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur

Im Anschluss an die Kultivierung der PLLA-Polymere in den Bioreaktoren wurden diese wie bereits erwähnt entsprechend der zellulären Besiedlungsdichte halbiert, und die Hälften statisch weiterkultiviert. Wie unter Punkt 2.3.2 beschrieben wurde eine der beiden Polymerhälften zur Bestimmung des vom Cytochrom-P450-Enzymsystem abhängigen Lidocain-Stoffwechselmetaboliten MEGX (Monoethylglycinylidid) in einem entsprechend präparierten Zellkulturmedium 30 Minuten kultiviert. Die Vermessung der Proben erfolgte wie unter Punkt 2.7 dargestellt.

Das nachfolgende Diagramm 3.9 gibt einen Gesamtüberblick über die gemessenen MEGX-Konzentrationen im Kulturmedium nach 30-minütiger statischer Kultur. Es zeigt, dass neben der Fähigkeit der kultivierten Hepatozyten zur Ammoniakverstoffwechslung auch deren Fähigkeit zur MEGX-Bildung über die 6-tägige Kulturdauer in den Bioreaktoren bei allen untersuchten Flussgeschwindigkeiten erhalten blieb. Die dazugehörigen Daten sind den Tabellen 3.6.1 bis 3.6.3.1 zu entnehmen.

Diagramm 3.9

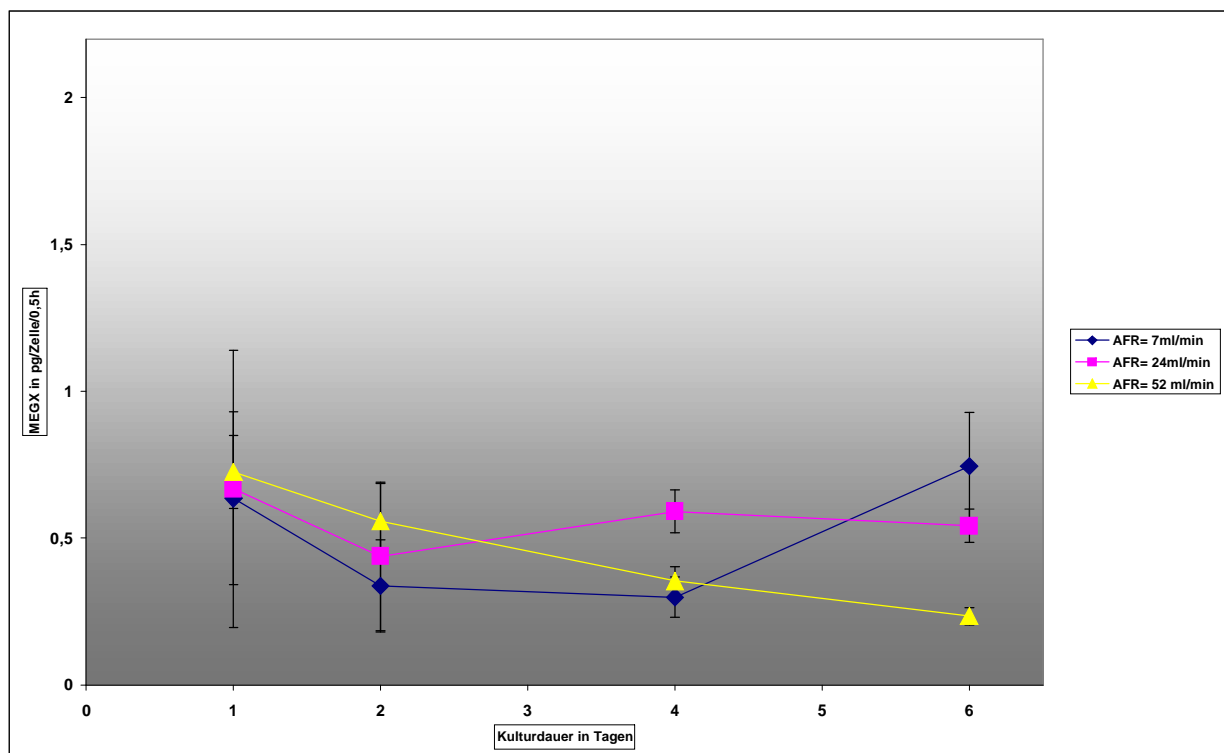
MEGX-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur im Anschluss an die Kultur im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)



Um auch bezüglich der MEGX-Bildungsrate eine genauere Aussage über die zelluläre Stoffwechsellistung treffen zu können, wurde die MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur in pg berechnet. Dies geschah wie bereits beschrieben wieder mit Hilfe der ermittelten DNA-Standardkurve. Weiterhin wurden für die Berechnung die gemessenen MEGX-Werte in ng/ml mit 3 multipliziert, um die absolute MEGX-Konzentration in den Proben (Volumen: 3 ml) zu bestimmen, und anschließend mit 2 multipliziert, um die Werte auf das gesamte Polymer hochzurechnen. Die MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit ist im nachfolgenden Diagramm 3.10 graphisch dargestellt. Die entsprechenden Daten sind den Tabellen 3.6.4 bis 3.6.6 zu entnehmen.

Diagramm 3.10

MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur in pg im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit



Die MEGX-Bildungsraten pro Hepatozyt wiesen weniger starke Schwankungen zwischen den verschiedenen Flussgeschwindigkeiten auf, als dies bei der Albuminsynthese und der Ammoniakverstoffwechslung der Fall gewesen ist. Es war auch kein eindeutiges Maximum der zellulären Stoffwechsellistungen am zweiten

Kulturtag wie bei den anderen beiden Parametern zu beobachten. Vielmehr bewegten sich diese auf einem konstanterem Niveau über den gesamten 6-tägigen Kulturverlauf, wobei vor allem die MEGX-Bildungsraten bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min auf konstant hohem Niveau blieben. Nur bei der Flussgeschwindigkeit 52 ml/min war mit durchschnittlichen Bildungsraten von $0,73 \pm 0,13$ pg MEGX/Zelle/0,5h an Kulturtag 1 und $0,24 \pm 0,03$ pg MEGX/Zelle/0,5h an Tag 6 ein konstanter Abfall der Bildungsraten zu verzeichnen. Die mittleren Werte für die Flussgeschwindigkeiten 7 und 24 ml/min an Tag 6 lagen mit $0,75 \pm 0,18$, bzw. $0,54 \pm 0,06$ pg MEGX/Zelle/0,5h deutlich höher und wiesen keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zu den Bildungsraten am ersten Kulturtag auf.

Tabelle 3.6.1

Hepatozytenisolationen H-1 und H-4

MEGX (Monoethylglycinxylylid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur einer Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; MEGX in ng/ml
Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Isolation	Kulturdauer in Tagen	Kontrolle Zeitpunkt 0 Minuten	Probe Zeitpunkt 30 Minuten	Kontrolle Zeitpunkt 30 Minuten
H-1	1	82,33	89,14	84,01
H-1	2	69,26	70,60	69,78
H-1	4	74,32	77,11	75,67
H-1	6	64,38	71,01	65,88
H-4	1	88,14	98,35	88,13
H-4	2	89,73	100,78	97,70
H-4	4	88,45	93,78	90,91
H-4	6	87,02	95,75	84,63

Tabelle 3.6.1.1

Zusammenfassung der Isolationen H-1 und H-4 (AFR: 7 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-1 MEGX in ng/ml	H-4 MEGX in ng/ml	Mittelwert H-1 u. H-4	Standard- abweichung
1	6,81	10,21	8,51	1,7
2	1,34	11,05	6,2	4,86
4	2,79	5,33	4,06	1,27
6	6,63	8,73	7,68	1,05

Tabelle 3.6.2

Hepatozytenisolationen H-2 und H-5

MEGX (Monoethylglycinxylylid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur einer Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; MEGX in ng/ml
Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Isolation	Kulturdauer in Tagen	Kontrolle Zeitpunkt 0 Minuten	Probe Zeitpunkt 30 Minuten	Kontrolle Zeitpunkt 30 Minuten
H-2	1	84,01	118,46	79,70
H-2	2	75,58	93,48	81,28
H-2	4	72,04	89,22	76,25
H-2	6	74,64	84,91	81,40
H-5	1	91,15	102,55	93,10
H-5	2	89,91	104,24	93,32
H-5	4	85,16	114,23	96,45
H-5	6	102,45	120,75	108,23

Tabelle 3.6.2.1

Zusammenfassung der Isolationen H-2 und H-5 (AFR: 24 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-2 MEGX in ng/ml	H-5 MEGX in ng/ml	Mittelwert H-2 u. H-5	Standard- abweichung
1	34,45	11,4	22,93	11,53
2	17,90	14,33	16,12	1,79
4	17,18	29,07	23,13	5,95
6	10,27	18,30	14,29	4,02

Tabelle 3.6.3

Hepatozytenisolationen H-3 und H-6

MEGX (Monoethylglycinxylylid)-Bildung in 30-minütiger statischer Kultur einer

Polymerhälfte im Anschluss an die Kultivierung im Bioreaktor; MEGX in ng/ml

Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Isolation	Kulturdauer in Tagen	Kontrolle Zeitpunkt 0 Minuten	Probe Zeitpunkt 30 Minuten	Kontrolle Zeitpunkt 30 Minuten
H-3	1	74,47	91,47	80,09
H-3	2	75,94	80,66	75,42
H-3	4	73,72	80,51	69,93
H-3	6	75,89	78,55	70,77
H-6	1	94,86	111,58	97,10
H-6	2	98,37	116,91	101,45
H-6	4	105,96	112,07	101,90
H-6	6	95,07	102,53	99,53

Tabelle 3.6.3.1

Zusammenfassung der Isolationen H-3 und H-6 (AFR: 52 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-3 MEGX in ng/ml	H-6 MEGX in ng/ml	Mittelwert H-3 u. H-6	Standardabweichung
1	17,00	16,72	16,86	0,14
2	4,72	18,54	11,63	6,91
4	6,79	6,11	6,45	0,34
6	2,66	7,46	5,06	2,4

Tabelle 3.6.4

MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur (AFR: 7 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-1 MEGX in pg	H-4 MEGX in ng/ml	Mittelwert H-1 u. H-4	Standardabweichung
1	0,34	0,93	0,64	0,3
2	0,18	0,49	0,34	0,16
4	0,23	0,37	0,3	0,07
6	0,56	0,93	0,75	0,18

Tabelle 3.6.5

MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur (AFR: 24 ml/min)

Kulturdauer in Tagen	H-2 MEGX in pg	H-5 MEGX in pg	Mittelwert H-2 u. H-5	Standard- abweichung
1	1,14	0,2	0,67	0,47
2	0,69	0,19	0,44	0,25
4	0,66	0,52	0,59	0,07
6	0,49	0,6	0,54	0,06

Tabelle 3.6.6

MEGX-Bildung pro Hepatozyt in 30 Minuten statischer Kultur (AFR: 52 ml/min)

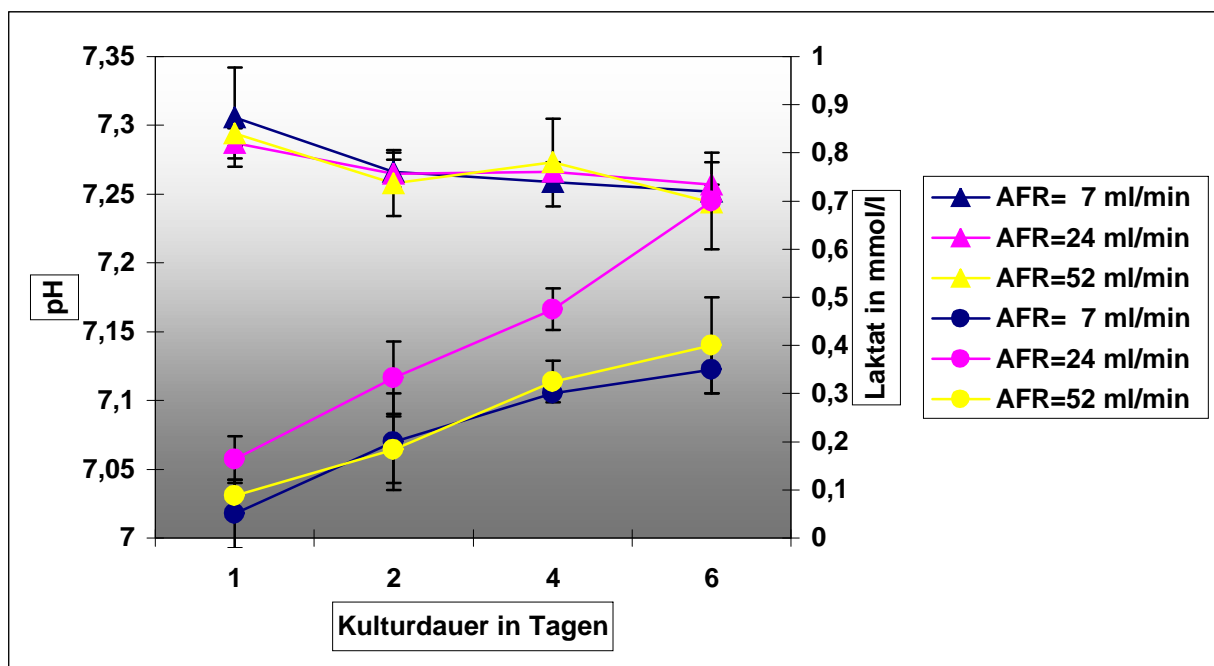
Kulturdauer in Tagen	H-3 MEGX in pg	H-6 MEGX in pg	Mittelwert H-3 u. H-6	Standard- abweichung
1	0,85	0,60	0,73	0,13
2	0,43	0,69	0,56	0,13
4	0,40	0,31	0,35	0,05
6	0,21	0,26	0,24	0,03

3.7 Veränderungen des Zellkulturmediums in 6-tägiger Kultur

Wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben wurden im Verlauf einer Kultur an den Kulturtagen 1, 2, 4 und 6 aus jedem verbliebenen Bioreaktor unter anderem 1 ml Kulturmedium zur Bestimmung des pH-Wertes, der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke, sowie der Elektrolyt- und Laktatkonzentrationen entnommen, um Aussagen über die Veränderungen des Kulturmediums während der Kulturdauer treffen zu können. Die Bestimmungen erfolgten unter Anwendung eines Blutgasanalysegerätes direkt im Anschluss an die Entnahme des Mediums aus den Reaktoren. Das Diagramm 3.11 zeigt die Entwicklung der pH-Werte und der Laktatkonzentrationen in den Kulturmedien.

Diagramm 3.11

pH-Werte (Dreiecke) und Laktatkonzentrationen (Punkte) im Kulturmedium im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)

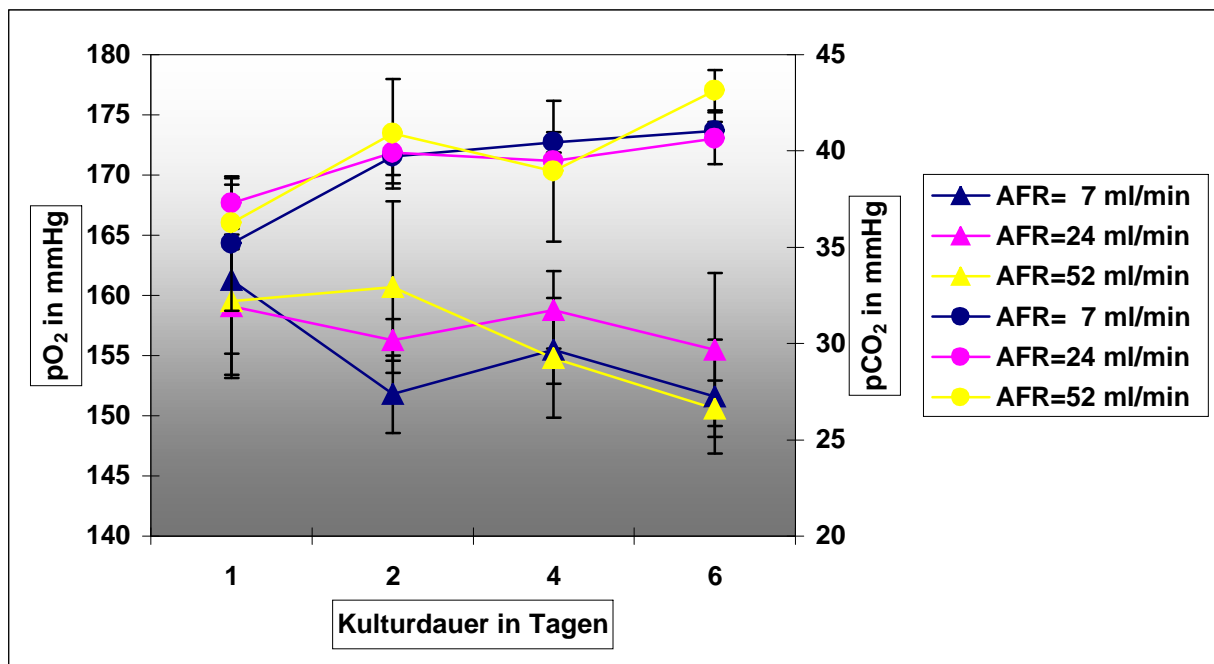


Die pH-Werte der frisch angesetzten Kulturmedien lagen im Schnitt zwischen 7,05 und 7,10. Bei allen untersuchten Flussgeschwindigkeiten stiegen sie an Tag 1 auf durchschnittliche Werte von $7,31 \pm 0,04$ (AFR: 7 ml/min), $7,29 \pm 0,01$ (AFR: 24 ml/min) und $7,29 \pm 0,01$ (AFR: 52 ml/min) deutlich an. Im weiteren Kulturverlauf war bei allen Geschwindigkeiten ein Absinken des pH-Wertes auf durchschnittliche Werte von etwa 7,25 an Tag 6 zu beobachten. Die Laktatkonzentrationen stiegen im Verlauf der sechstägigen Kultivierung bei allen Geschwindigkeiten an, wobei die höchsten

Anstiege bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min mit einer mittleren Laktatkonzentration von bis zu $0,7 \pm 0,1$ mmol/l an Tag 6 auftraten. Die Konzentrationen bei den anderen beiden Flussgeschwindigkeiten lagen an sämtlichen Kulturtagen jeweils deutlich unter den Konzentrationen, die bei der Geschwindigkeit 24 ml/min gemessen wurden. Bezüglich der Elektrolytkonzentrationen (K^+ , Na^+ und Ca^{2+}) und der Glucosekonzentrationen kam es bei allen Flussgeschwindigkeiten im Verlauf der Kultur kaum zu nennenswerten Schwankungen.

Diagramm 3.12

O_2 - (Dreiecke) und CO_2 (Punkte)-Partialdrücke im Kulturmedium im Verlauf der 6-tägigen Kultur in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit (AFR)



Das Diagramm 3.12 zeigt, dass der Sauerstoffgehalt der Kulturmedien, gemessen in Form des Sauerstoffpartialdruckes, bei allen Flussgeschwindigkeiten im Kulturverlauf leicht abfiel. Er sank von Werten um durchschnittlich 160 mmHg an Tag 1 auf Werte von etwa 150 mmHg (AFR: 7 und 52 ml/min) an Tag 6 ab. Bei der Geschwindigkeit 24 ml/min nahm der Sauerstoffgehalt des Kulturmediums von Tag 1 auf Tag 6 weniger stark ab und lag mit durchschnittlichen Partialdrücken von $158,8 \pm 3,22$ mmHg an Tag 4 und $155,5 \pm 6,25$ mmHg an Tag 6 über denen der anderen Flussgeschwindigkeiten. Neben der Abnahme des Sauerstoffgehaltes kam es bei allen Flussgeschwindigkeiten im Kulturverlauf zu einer kontinuierlichen Zunahme der

Kohlendioxid (CO₂)- Konzentrationen in den Kulturmedien. Die CO₂-Partialdrücke stiegen von Werten zwischen 35 und 37 mmHg an Tag 1 auf Werte von bis zu 43,15 ± 1,05 mmHg (AFR: 52 ml/min) an Tag 6 an, wobei der durchschnittliche CO₂-Gehalt des Kulturmediums an Tag 6 bei der Geschwindigkeit 24 ml/min im Vergleich zu den anderen Flussgeschwindigkeiten am geringsten war. Einen genauen Überblick über die gewonnenen Daten bieten die nachfolgenden Tabellen 3.7.1 bis 3.7.3.

Tabelle 3.7.1

Hepatozytenisolationen H-1 und H-4

Elektrolyt- und Laktatkonzentration, pO₂, pCO₂ und pH-Wert in den 4 Bioreaktoren (B1 - B4) im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung; Beendigung der Kulturen an Tag 1 (B1), 2 (B2), 4 (B3) und 6 (B4)

Flussgeschwindigkeit (AFR): 7 ml/min

Isolation	Kultur in Tagen	Bio-reaktor	pH	pCO ₂ in mmHg	pO ₂ in mmHg	K ⁺ in mmol/l	Na ⁺ in mmol/l	Ca ²⁺ in mmol/l	Glucose in ng/dl	Laktat in mmol/l
H-1	0	-	7,13	58,5	176,7	4,8	141	1,43	176	0,0
H-1	1	B-1	7,31	34,8	173,9	4,8	142	1,44	177	0,0
H-1	1	B-2	7,31	35,0	167,7	4,8	142	1,44	177	0,0
H-1	1	B-3	7,33	33,0	166,0	4,8	142	1,44	176	0,0
H-1	1	B-4	7,39	27,3	167,6	4,8	142	1,44	177	0,0
H-4	0	-	7,07	67,1	224,6	4,6	138	1,38	178	0,0
H-4	1	B-1	7,29	36,9	151,5	4,6	137	1,36	172	0,1
H-4	1	B-2	7,27	38,4	153,8	4,6	136	1,38	175	0,2
H-4	1	B-3	7,28	38,4	153,0	4,7	137	1,32	173	0,1
H-4	1	B-4	7,28	37,7	157,1	4,7	137	1,37	173	0,0
Mittelwert H-1+H-4	-	-	7,31	35,19	161,3	4,73	139,4	1,4	175,0	0,05
St.-Abw.	-	-	0,04	3,48	7,91	0,08	2,64	0,04	1,94	0,07
H-1	2	B-2	7,27	40,0	154,5	4,8	142	1,46	177	0,1
H-1	2	B-3	7,29	37,0	155,8	4,8	142	1,45	177	0,2
H-1	2	B-4	7,28	39,0	153,3	4,8	142	1,45	177	0,1
H-4	2	B-2	7,25	40,9	149,5	4,6	136	1,38	175	0,2
H-4	2	B-3	7,25	41,1	146,2	4,6	136	1,38	180	0,4
H-4	2	B-4	7,26	40,3	151,6	4,6	137	1,38	178	0,2

Isolation	Kultur in Tagen	Bio-reaktor	PH	pCO ₂ in mmHg	pO ₂ in mmHg	K ⁺ in mmol/l	Na ⁺ in mmol/l	Ca ²⁺ in mmol/l	Glucose in ng/dl	Laktat in mmol/l
Mittelwert H-1+H-4	-	-	7,27	39,72	151,8	4,7	139,2	1,42	177,3	0,20
St.-Abw.	-	-	0,01	1,39	3,22	0,1	2,85	0,04	1,49	0,1
H-1	4	B-3	7,27	39,8	158,3	4,8	143	1,46	177	0,3
H-1	4	B-4	7,26	41,3	157,9	4,8	143	1,46	177	0,3
H-4	4	B-3	7,26	40,4	151,4	4,8	141	1,42	173	0,3
H-4	4	B-4	7,26	40,3	154,2	4,7	141	1,42	171	0,3
Mittelwert H-1+H-4	-	-	7,26	40,45	155,5	4,78	142	1,44	174,5	0,3
St.-Abw.	-	-	4 × 10 ⁻³	0,54	2,83	0,04	1	0,02	2,6	0
H-1	6	B-4	7,26	40,6	156,3	4,9	144	1,46	177	0,3
H-4	6	B-4	7,25	41,5	146,8	4,8	142	1,43	173	0,4
Mittelwert H-1+H-4	-	-	7,26	41,05	151,6	4,85	143	1,45	175	0,35
St.-Abw.	-	-	0,01	0,45	4,75	0,05	1	0,02	2	0,05

Tabelle 3.7.2

Hepatozytenisolationen H-2 und H-5

Elektrolyt- und Laktatkonzentration, pO₂, pCO₂ und pH-Wert in den 4 Bioreaktoren (B1 - B4) im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung; Beendigung der Kulturen an Tag 1 (B1), 2 (B2), 4 (B3) und 6 (B4)

Flussgeschwindigkeit (AFR): 24 ml/min

Isolation	Kultur in Tagen	Bio-reaktor	pH	pCO ₂ in mmHg	pO ₂ in mmHg	K ⁺ in mmol/l	Na ⁺ in mmol/l	Ca ²⁺ in mmol/l	Glucose in ng/dl	Laktat in mmol/l
H-2	0	-	7,09	63,8	226,5	4,6	140	1,39	179	0,0
H-2	1	B-1	7,28	37,3	152,1	4,7	140	1,41	172	0,1
H-2	1	B-2	7,29	36,2	167,9	4,7	140	1,40	173	0,1
H-2	1	B-3	7,28	38,6	162,7	4,8	142	1,44	177	0,2
H-2	1	B-4	7,29	37,8	162,0	4,8	142	1,44	179	0,2
H-5	0	-	7,08	67,2	249,8	4,6	139	1,39	173	0,0
H-5	1	B-1	7,31	34,6	147,6	4,7	140	1,37	175	0,2
H-5	1	B-2	7,29	36,7	160,6	4,7	140	1,36	174	0,1
H-5	1	B-3	7,28	38,3	160,0	4,7	140	1,38	175	0,2

Isolation	Kultur in Tagen	Bio-reaktor	PH	pCO ₂ in mmHg	pO ₂ in mmHg	K ⁺ in mmol/l	Na ⁺ in mmol/l	Ca ²⁺ in mmol/l	Glucose in ng/dl	Laktat in mmol/l
H-5	1	B-4	7,27	38,7	159,8	4,7	140	1,38	175	0,2
Mittelwert H-2+H-5	-	-	7,29	37,28	159,1	4,73	140,5	1,4	175	0,16
St.-Abw.	-	-	0,01	1,31	5,95	0,04	0,87	0,03	2,06	0,05
H-2	2	B-2	7,28	37,5	157,3	4,7	140	1,42	173	0,3
H-2	2	B-3	7,27	40,3	156,1	4,8	143	1,45	182	0,4
H-2	2	B-4	7,27	40,1	157,9	4,8	144	1,45	183	0,4
H-5	2	B-2	7,25	41,0	153,2	4,7	140	1,40	180	0,2
H-5	2	B-3	7,27	39,8	155,3	4,7	140	1,40	179	0,3
H-5	2	B-4	7,26	40,8	158,2	4,7	140	1,40	181	0,4
Mittelwert H-2+H-5	-	-	7,27	39,92	156,3	4,73	141,2	1,42	179,7	0,33
St.-Abw.	-	-	0,01	1,15	1,72	0,05	1,68	0,02	3,25	0,08
H-2	4	B-3	7,27	40,1	162,6	4,9	142	1,45	181	0,5
H-2	4	B-4	7,28	39,5	161,2	4,8	143	1,44	178	0,4
H-5	4	B-3	7,26	38,9	154,8	4,6	141	1,40	177	0,5
H-5	4	B-4	7,26	39,4	156,5	4,6	141	1,39	177	0,5
Mittelwert H-2+H-5	-	-	7,27	39,48	158,8	4,73	141,8	1,42	178,3	0,48
St.-Abw.	-	-	0,01	0,43	3,22	0,13	0,83	0,03	1,64	0,04
H-2	6	B-4	7,27	39,3	161,7	4,9	144	1,45	181	0,6
H-5	6	B-4	7,24	42,0	149,2	4,8	142	1,41	175	0,8
Mittelwert H-2+H-5	-	-	7,26	40,65	155,5	4,85	143	1,43	178	0,7
St.-Abw.	-	-	0,02	1,35	6,25	0,05	1	0,02	3	0,1

Tabelle 3.7.3

Hepatozytenisolationen H-3 und H-6

Elektrolyt- und Laktatkonzentration, pO₂, pCO₂ und pH-Wert in den 4 Bioreaktoren (B1 - B4) im Verlauf der 6-tägigen Kultivierung; Beendigung der Kulturen an Tag 1 (B1), 2 (B2), 4 (B3) und 6 (B4)

Flussgeschwindigkeit (AFR): 52 ml/min

Isolation	Kultur in Tagen	Bio-reaktor	pH	pCO ₂ in mmHg	pO ₂ in mmHg	K ⁺ in mmol/l	Na ⁺ in mmol/l	Ca ²⁺ in mmol/l	Glucose in ng/dl	Laktat in mmol/l
H-3	0	-	7,25	41,5	257,1	4,7	139	1,40	175	0,0
H-3	1	B-1	7,29	37,4	160,4	4,8	142	1,45	178	0,1
H-3	1	B-2	7,28	38,4	162,8	4,8	142	1,45	178	0,1
H-3	1	B-3	7,31	33,5	153,6	4,7	140	1,41	174	0,1
H-3	1	B-4	7,29	36,6	168,5	4,7	140	1,41	172	0,0
H-6	0	-	7,07	67,1	236,6	4,7	138	1,41	176	0,0
H-6	1	B-1	7,29	35,9	155,3	4,6	139	1,40	175	0,1
H-6	1	B-2	7,3	35,5	158,9	4,7	139	1,39	175	0,1
H-6	1	B-3	7,29	36,6	157,1	4,7	139	1,42	178	0,1
H-6	1	B-4	7,29	36,2	159,5	4,7	139	1,40	178	0,1
Mittelwert H-3+H-6	-	-	7,29	36,26	159,5	4,71	140	1,42	176	0,09
St.-Abw.	-	-	0,01	1,34	4,35	0,06	1,23	0,02	2,18	0,03
H-3	2	B-2	7,27	40,6	156,1	4,8	143	1,45	183	0,1
H-3	2	B-3	7,3	36,2	159,8	4,7	140	1,42	173	0,2
H-3	2	B-4	7,28	38,3	163,9	4,7	140	1,41	173	0,1
H-6	2	B-2	7,24	43,4	155,4	4,7	140	1,41	175	0,2
H-6	2	B-3	7,24	43,4	154,2	4,8	140	1,43	177	0,2
H-6	2	B-4	7,24	43,5	174,9	4,8	140	1,42	180	0,3
Mittelwert H-3+H-6	-	-	7,26	40,9	160,7	4,75	140,5	1,42	176,8	0,18
St.-Abw.	-	-	0,02	2,83	7,12	0,05	1,12	0,01	3,67	0,07
H-3	4	B-3	7,32	33,7	162,5	4,8	141	1,42	174	0,4
H-3	4	B-4	7,28	37,4	155,7	4,7	141	1,41	175	0,3
H-6	4	B-3	7,24	42,7	149,5	4,7	141	1,42	177	0,3
H-6	4	B-4	7,25	42,0	151,6	4,8	141	1,40	177	0,3

Isolation	Kultur in Tagen	Bio- reaktor	PH	pCO ₂ in mmHg	pO ₂ in mmHg	K ⁺ in mmol/l	Na ⁺ in mmol/l	Ca ²⁺ in mmol/l	Glucose in ng/dl	Laktat in mmol/l
Mittel- wert H-3+H-6	-	-	7,27	38,95	154,8	4,75	141	1,41	175,8	0,33
St.-Abw.	-	-	0,03	3,65	4,96	0,05	0	0,01	1,3	0,04
H-3	6	B-4	7,24	42,1	152,9	4,8	141	1,42	173	0,3
H-6	6	B-4	7,24	44,2	148,2	4,8	141	1,43	174	0,5
Mittel- wert H-3+H-6	-	-	7,24	43,15	150,6	4,8	141	1,43	173,5	0,4
St.-Abw.	-	-	1×10^{-3}	1,05	2,35	0	0	5×10^{-3}	0,5	0,1

4. Diskussion

Die bereits in der Einleitung dargestellten Nachteile der orthotopen Lebertransplantation und vor allem der Mangel an geeigneten Spenderorganen machen es dringend erforderlich, alternative Therapieansätze zur Behandlung von schwerwiegenden Lebererkrankungen zu entwickeln. Die Erforschung alternativer Behandlungsverfahren stellt die Wissenschaft aufgrund der Komplexität der hepatischen Funktionen vor enorme Herausforderungen und befindet sich noch im Stadium der Grundlagenforschung. In diesen Kontext ist auch die vorliegende Arbeit einzuordnen. Es geht in der Zukunft nicht nur darum, durch entsprechende Verfahren den Zeitraum bis zur Organtransplantation überbrücken zu können, sondern für die Patienten schonendere, individueller und selektiver gestaltete Therapieformen zu entwickeln die bei bestimmten Erkrankungen der Leber die Einheitstherapie Lebertransplantation vielleicht sogar ersetzen könnten. Im Rahmen des Tissue Engineering wird intensiv an diesen Fragestellungen geforscht. Einerseits wird unter Verwendung isolierter Hepatozyten an der Entwicklung blutperfundierter extrakorporaler Leberunterstützungssysteme gearbeitet, die jedoch nicht für die dauerhafte Therapie geeignet sind sondern eher in Akutsituationen wie dem fulminanten Leberversagen als Überbrückungsinstrument bis zur weiteren Behandlung zum Einsatz kommen dürften.^{55,56} Andererseits werden intensiv verschiedene intrakorporale Verfahren erforscht, bei denen Hepatozyten heterotop in einen Empfängerorganismus transplantiert werden um dort dauerhaft ausgefallene hepatische Stoffwechselfunktionen zu kompensieren.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Optimierung der in-vitro-Kulturbedingungen hepatozellulärer Spheroide vor der heterotopen Transplantation auf biologisch abbaubaren dreidimensionalen Polymermatrizes bestehend aus Poly-L-Laktat-Säure(-acid) (PLLA) in einem Bioreaktorsystem mit rezirkulierendem Fluss des Zellkulturmediums. Sie beschäftigt sich somit mit der Entwicklung eines implantierbaren Leberersatzsystems. Wenn es gelingen würde, ein solches System technisch zu etablieren, hätte dies einige Vorteile gegenüber der orthotopen Lebertransplantation.^{20,21,57} So könnte es grundsätzlich frühzeitig und somit elektiv und präventiv, bevor eine Lebererkrankung in das Endstadium übertritt, zum Einsatz kommen. Die Leber müsste bis zum Nachweis der Funktionalität der transplantierten Zellen, bzw. unter Umständen gar nicht entfernt werden, wodurch der Eingriff für den

Patienten weniger belastend und sicherer würde. Weiterhin könnten die zu transplantierenden Hepatozyten vor der Transplantation in vitro durch beispielsweise genetische Veränderungen und Veränderungen der zellulären Oberflächeneigenschaften dem Transplantationszweck angepasst werden, wodurch Patienten wesentlich individueller, bzw. krankheitsspezifischer behandelt werden könnten und die Immunogenität der Zellen herabgesetzt werden könnte, was eine Reduktion des Einsatzes immunsuppressiver Medikamente zur Folge hätte. Vor allem Lebererkrankungen die wie der Alpha-1-Antitrypsin-Mangel durch einen singulären Enzymdefekt und daraus resultierenden langfristig leberschädigenden metabolischen Folgen gekennzeichnet sind, könnten in diesem Sinne von einer erfolgreichen Hepatozytentransplantation profitieren, da die Transplantation einer Hepatozytenmenge, die etwa 10% der Gesamtlebermasse des Empfängers entspricht, bereits bestimmte Enzymdefekte auszugleichen vermag, wie beispielsweise Asonuma et al. zeigen konnten.⁵⁸ Weiterhin träte das fundamentale Problem des Organmangels nicht auf, da die Quellen zellulären Materials äußerst vielfältig sind. So könnten potentiell gesunde patienteneigene, aber auch allogene und xenogene Hepatozyten zum Einsatz kommen.^{20,21,22,59,60} Darüberhinaus gibt es vielversprechende Ansätze geeignetes Zellmaterial aus adulten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark oder fetalen Stammzellen zu gewinnen.^{61,62} In Zellbanken könnten für Transplantationszwecke vorgesehene Hepatozyten zum Beispiel unter Verwendung kryokonservativer Verfahren aufbewahrt werden und jederzeit für diese zur Verfügung gestellt werden.^{63,64} In den letzten Jahren sind verschiedene Formen der heterotopen Hepatozytentransplantation mit zum Teil erfolgversprechenden Ergebnissen bei der Behandlung der homozygoten familiären Hypercholesterinämie oder des Crigler-Najjar-Syndroms erforscht worden. Bei diesen Versuchen wurde vor allem mit Leberzellsuspensionen gearbeitet, die in Organstrukturen wie die Milz, die Nierenkapsel oder in die Pfortader injiziert wurden.^{65,66} Bei diesen Methoden gibt es jedoch enorme Schwierigkeiten eine für die dauerhafte Organfunktion ausreichende Zellmenge bereitzustellen, da die Injektion zu großer Zellmengen zu massiven Komplikationen wie dem Auftreten einer portalen Hypertonie, einer Pfortaderthrombose oder einer Lungenembolie führen kann.^{21,65-69} Ein elementarer Vorteil des in dieser Arbeit untersuchten Systems gegenüber derartigen Verfahren liegt in der Verwendung der dreidimensionalen PLLA-Polymermatrizes. Sie schaffen aus verschiedenen Gründen wesentlich besser

kontrollierbare Transplantationsbedingungen und ermöglichen eine deutlich bessere lokale Einflussnahme auf die transplantierten Zellen am Transplantationsort. So können sie große Zellmengen bis hin zu einer organäquivalenten Zellzahl aufnehmen und halten diese ähnlich wie in einem Netz am Transplantationsort fest.⁷⁰ Den transplantierten Zellen bieten sie durch ihre dreidimensionale Leitstruktur die Möglichkeit, sich in einer der ursprünglichen Organarchitektur ähnlichen Form zu organisieren was für die Regulation und Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen von zentraler Bedeutung ist und weisen eine mechanische Schutzfunktion für das entstehende Gewebe auf.^{22,68,71} Durch ihren porösen Aufbau kommt es nach erfolgter Implantation zur schnellen Einsprossung fibrovaskulären Gewebes, so dass die Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und Stoffwechselprodukte abtransportiert werden können. Weiterhin kann mit ihrer Hilfe durch Variationen der Form, Größe und Zusammensetzung die Entstehung des Gewebes und somit das Wachstum, die Zellproliferation und -differenzierung in vivo direkt beeinflusst werden, indem sie zum Beispiel mit Wachstums- und Angiogenesefaktoren oder mit Molekülen der Extrazellulärmatrix versehen werden.^{21,57,68,69,72} In vielen verschiedenen Arbeiten konnten die genannten Vorteile dreidimensionaler Polymermatrizes bei der heterotopen Hepatozytentransplantation demonstriert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die auf derartigen Matrizes in Form von Zellsuspensionen heterotop beispielsweise in das intestinale Mesenterium transplantierten Hepatozyten unter suffizienter hepatotropher Stimulation in der Lage sind, lange zu überleben, zu proliferieren und zellspezifische Funktionen aufrechtzuerhalten.^{69,73-76} Allerdings kam es bei diesen Versuchen immer wieder zum initialen Absterben eines nicht unerheblichen Teils der transplantierten Zellen bei gleichzeitig vorhandener großer Regenerationsfähigkeit der verbliebenen Zellen. Aus diesem Grund wird seit längerem an optimierten Kultivierungsverfahren für hepatozelluläre Spheroide geforscht, die morphologisch und ultrastrukturell deutliche Ähnlichkeiten mit Lebergewebe in vivo aufweisen.^{30-34,77,78} Die strukturellen Gemeinsamkeiten wirken sich in vitro im Vergleich zu nicht aggregierten Hepatozyten positiv auf die Überlebensfähigkeit und die Funktionalität der Hepatozyten aus. Dies konnten Yuasa et al., Niwa et al. und andere Forschergruppen durch Untersuchungen der zellulären StoffwechsellLeistungen in vitro nachweisen.³⁰⁻⁴⁰ Hieraus ergibt sich die Hoffnung, dass die Transplantation hepatozellulärer Spheroide zu einer Steigerung der Überlebensfähigkeit der Hepatozyten und einer

Erhöhung ihrer zellspezifischen Funktionalität in vivo führen könnte. Das in dieser Arbeit untersuchte implantierbare Leberersatzsystem kombiniert somit die Vorteile dreidimensionaler Polymermatrizes und spheroidaler Zellaggregate miteinander und stellt ein potentiell vielversprechendes Modell dar, den Zellen in vivo einen Startvorteil zu ermöglichen. In den verwendeten Flussbioreaktoren kommt es auf den Polymermatrizes bereits nach einem Tag zur Ausbildung funktionell aktiver spheroidaler Zellformationen und somit zur Ausbildung morphologisch leberähnlichen Gewebes. Ein weiterer Vorteil dieses Kulturverfahrens ist die sehr einfache Transplantationshandhabung, indem die vorkultivierten Spheroide direkt aus dem Kultursystem heraus auf den Matrizes in einen Empfängerorganismus implantiert werden können, wodurch Zellschädigungen und -verluste bei der heterotopen Transplantation vermieden werden. In vorangegangenen Versuchen untersuchten Pollok et al. und Török et al. unter anderem die Spheroidbildung in den Flussbioreaktoren in Abhängigkeit von der Aussiedelungskonzentration der Hepatozyten auf den Polymermatrizes und der Flussgeschwindigkeit des Kulturmediums.^{50,51,52} Als Marker für die Bestimmung der optimalen Parameterkonstellation diente die Spheroiddichte innerhalb der Polymermatrix. Die höchste Spheroiddichte ergab sich bei einer Aussiedelungskonzentration von 10×10^6 Zellen/ml und einer Flussgeschwindigkeit von 24 ml/min. Das Ziel dieser Arbeit war es nun herauszufinden, ob sich unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten des Zellkulturmediums in den Bioreaktoren neben der Spheroidbildung auch auf die zellulären Funktionen auswirken, und sich eine Flussgeschwindigkeit diesbezüglich im Sinne einer optimierten in-vitro-Kultur für hepatozelluläre Spheroide auf Polymermatrizes bestehend aus Poly-L-Laktat-Säure(-acid) (PLLA) als vorteilhaft erweist.

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführte Arbeit erbrachte folgende Ergebnisse:

Die für die Kultur im Bioreaktor benötigten Hepatozyten wurden durch eine in unserem Labor aus Vorversuchen etablierte Kollagenasedigestionstechnik aus den Lebern männlicher Lewis-Ratten gut reproduzierbar isoliert. Pro Kultur konnten durchschnittlich $3,35 \times 10^8$ Hepatozyten mit einer durchschnittlichen Vitalität von 87,1% gewonnen werden. Die Anzahl der isolierten Zellen sowie deren Vitalität entsprachen den in der Literatur von anderen Forschungsgruppen angegebenen

Isolationsergebnissen.^{58,79,80} Jeweils vier Millionen Hepatozyten wurden nach einem ebenfalls aus Vorversuchen etablierten Verfahren auf dreidimensionale Polymerscheiben bestehend aus Poly-L-Laktatsäure(-acid) (PLLA) ausgesiedelt und in den Bioreaktorsystemen unter ständigem Fluss des Zellkulturmediums über sechs Tage kultiviert, wobei insgesamt die drei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten 7, 24 und 52 ml/min und deren Auswirkungen auf die Spheroidbildung und die organspezifischen Funktionen der kultivierten Zellen untersucht wurden. Sämtliche durchgeführten Kulturen verliefen von der technischen Seite her störungsfrei. Die regelmäßig erfolgten Kontrollen des Kulturablaufs zeigten keine sichtbaren Auffälligkeiten der Kulturmedien. Stichprobenartig durchgeführte mikrobiologische Untersuchungen der Kulturmedien ergaben keinen Hinweis auf eine bakterielle Kontamination.

Zunächst bleibt festzuhalten, dass die Bildung spheroidaler Zellaggregate sowie die Durchmesser der gebildeten Spheroide eine ganz klare Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit des Zellkulturmediums in den Bioreaktoren aufwiesen. Bereits nach einem Tag konnte bei allen untersuchten Flussgeschwindigkeiten eine gleichmäßige Besiedlung des Polymergerüsts mit spheroidalen Zellaggregaten mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 70 bis 115 µm nachgewiesen werden. Die Durchmesser der Spheroide stiegen bei allen Flussgeschwindigkeiten stetig im Verlauf der Kultivierung und erreichten am Kulturende in Abhängigkeit von der jeweiligen Flussgeschwindigkeit durchschnittliche Werte von etwa in 125 bis 160 µm. Die durchweg geringsten durchschnittlichen Durchmesser über den gesamten Kulturverlauf mit Werten zwischen $68,75 \pm 20,25$ µm an Tag 1 und $126,75 \pm 42,2$ µm an Tag 6 wiesen die Zellen auf, die mit der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min kultiviert wurden. Die Spheroiddurchmesser lagen damit deutlich unter den Werten an Tag 6 der anderen beiden Flussgeschwindigkeiten mit $152,75 \pm 48,9$ µm (24 ml/min) und $160,5 \pm 59,54$ µm (52 ml/min). Mit Zunahme der Kulturdauer traten bei allen Flussgeschwindigkeiten auch vermehrt spheroidale Zellaggregate mit einem kritischen Durchmesser von über 200 µm auf, bei denen die Gefahr einer zentralen Nekrotisierung und somit ein Abfall der Aufrechterhaltung organspezifischer Funktionen besteht.⁸¹ Die Tendenz zur Bildung derart großer Spheroide nahm mit Erhöhung der Flussgeschwindigkeit jeweils zu. Im Kulturverlauf nahm die Zahl loser Zellverbände und unscharf begrenzter Spheroidformationen von Tag zu Tag ab, so dass am sechsten Kulturtag bei allen Flussgeschwindigkeiten jeweils überwiegend

scharf begrenzte Spheroiden beobachtet werden konnten. Die durchschnittlich dichteste Spheroidbesiedlung innerhalb der Polymermatrix an den Kulturtagen 4 mit $26,2 \pm 6,81$ Spheroiden pro Gesichtsfeld und 6 mit $27,98 \pm 7,33$ Spheroiden pro Gesichtsfeld wurde bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min beobachtet. Diese Beobachtung deckt sich mit den bereits zuvor genannten Ergebnissen von Pollok et al. und Török et al.^{50,51,52} Die über den gesamten Kulturverlauf durchschnittlich geringste Spheroiddichte mit $3,18 \pm 2,94$ Spheroiden pro Gesichtsfeld an Tag 1 und $8,43 \pm 5,44$ Spheroiden pro Gesichtsfeld an Tag 6 wiesen die mit der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min kultivierten Zellen auf. Somit scheint die Flussgeschwindigkeit 24 ml/min bezüglich der Anzahl der gebildeten Spheroiden unter diesen Kulturbedingungen vorteilhaft zu sein. Ein mögliches Erklärungsmodell für die genannte unterschiedlich stark ausgeprägte Spheroidbildung auf den Polymermatrizes ergibt sich aus den besonderen Kulturbedingungen. Bei der Flusskultur im Bioreaktor handelt es sich um ein durch den kontinuierlichen Fluss des Zellkulturmediums hochdynamisches und in sich geschlossenes Kultursystem. In diesem System herrschen für die Zellen grundsätzlich non-adhärenente Bedingungen, die einerseits durch die Verwendung serumfreien Kulturmediums und andererseits durch die aus non-adhärenenten Materialien hergestellten Einzelkomponenten der Bioreaktoren bedingt sind. Auch die für die Herstellung der verwendeten Polymermatrizes genutzte Poly-L-Laktat-Säure(-acid) (PLLA) fördert an und für sich nicht die Anheftung zellulären Materials. Allerdings stellen die Polymermatrizes mit ihrer dreidimensionalen, waben-, bzw. schwammartigen Gerüststruktur den wahrscheinlich einzigen Ort innerhalb des dynamischen Flusskultursystems dar, an dem die kultivierten Zellen festgehalten und über längere Zeit verweilen können. Die Zellen, die nicht am Polymergerüst haften, schwimmen im Strom des Zellkulturmediums und zirkulieren mit diesem im Bioreaktor. Wenn das Polymer nach der Aussiedlung der Zellen in das Reaktorsystem eingesetzt und die Kultur gestartet wird, verbleibt ein Teil der Zellen im Polymergerüst während andere Zellen zunächst bedingt durch die Strömung des Zellkulturmediums abgeschwemmt werden. Die Spheroidbildung, das heißt die Aggregation der initial einzeln vorliegenden Hepatozyten könnte dadurch zustande kommen, dass die im Polymergerüst haftenden Zellen durch den Fluss des Kulturmediums innerhalb der Polymerporen und über Verbindungsstellen auch zwischen den Poren ständig in Bewegung gehalten werden, so dass sich ein Teil der Zellen aufeinander zu bewegen kann und

auf diese Weise Zell-zu-Zell-Interaktionen gefördert werden. Weiterhin werden die im Medium schwimmenden Hepatozyten ständig an das Polymer herangespült. Diese verfangen sich zum Teil in den Poren des Polymergerüsts und können dort neue spheroidale Zellaggregate bilden oder sich bereits bestehenden Spheroide von außen anlagern wodurch sich deren Durchmesser vergrößert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der letztgenannte Effekt eher sekundär ist und dass sich die Spheroide primär aus Teilen der Zellen, die in der Polymermatrix festgehalten werden, bilden. Bei einer niedrigen Flussgeschwindigkeit des Zellkulturmediums sind die Zellbewegungen innerhalb der Polymermatrix im Vergleich zu einer höheren Geschwindigkeit geringer und die im Medium zirkulierenden Zellen haben pro Zeiteinheit weniger Kontakt mit dem Polymer. Dies würde die insgesamt vergleichsweise geringe Spheroiddichte sowie die geringeren Durchmesser der gebildeten Spheroide erklären. Höhere Flussgeschwindigkeiten wirken sich dementsprechend umgekehrt auf die Spheroidbildung aus, wobei die Gefahr, dass die Zellen, bzw. zum Teil auch Spheroide durch die hohe Strömung aus dem Polymer wieder weggeschwemmt werden mit zunehmender Geschwindigkeit steigt. Das beschriebene dynamische Kultursystem, das zu einer gewünschten schnellen Spheroidbildung auf den Polymermatrizes führt, hat jedoch den Nachteil, dass es unter diesen Kulturbedingungen zu nur sehr schwer zu beeinflussenden Schwankungen der Zellmengen auf den Polymeren kommt und somit die Besiedlung der Polymere im Kulturverlauf nicht konstant ist. Diese Schwankungen beziehen sich vor allem auf die initiale Besiedlung der Polymere mit einzelnen, nicht aggregierten Zellen, die zum Beispiel bei der durchgeführten Isolation H-5 mit der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min deutlich höher war als bei den anderen Isolationen. Somit scheint dieses Phänomen unabhängig von der gewählten Flussgeschwindigkeit zu sein, da man eigentlich erwarten würde, dass vor allem bei der geringsten Flussgeschwindigkeit zunächst vermehrt nicht aggregierte Zellen auf dem Polymer zurückbleiben. Ein Hauptgrund hierfür dürfte die produktionsbedingt unterschiedliche Struktur der in diesen Versuchen verwendeten Polymermatrizes sein. Zwar wiesen die in einem „Salt-Leaching“-Verfahren hergestellten Polymere durch die Verwendung von Salzkristallen mit definiertem Durchmesser eine identische Porengröße auf, jedoch differierten selbst in einer Produktionsreihe die Anordnung der Poren zueinander und die Interkonnektivität, das heißt die Verbindungen der Poren untereinander. Dieses Problem könnte durch die

Etablierung neuer Produktionsverfahren, zum Beispiel der dreidimensionalen Drucktechnik, gelöst werden.⁸² Trotz noch vorhandener technischer Limitierungen können mit Hilfe dieser Verfahren mittlerweile Polymermatrizes mit einer beliebigen dreidimensionalen und jeweils identischen Architektur hergestellt werden, die in naher Zukunft auch für die heterotope Hepatozytentransplantation eingesetzt werden könnten.^{83,84} Die in dieser Versuchsreihe durchgeführten DNA-Messungen haben gezeigt, dass sich von den ursprünglich vier Millionen ausgesiedelten Zellen nach der Kultivierung nur noch etwa 100.000 bis 400.000 Zellen auf den Polymeren befanden, was somit bis zu 10% der ursprünglich eingesetzten Zellmenge entspricht. Weiterführende publizierte Untersuchungen in unserem Labor haben dieses Ergebnis mittlerweile bestätigt und konnten zeigen, dass sich bereits nach der Herausnahme der frisch mit Zellsuspension besiedelten Polymermatrizes aus den Petrischalen nur noch etwa 30% der ursprünglichen Zellzahl bei Kulturbeginn auf den Matrizes befindet und der Rest durch das Herauslaufen der Zellsuspension aus den Polymerporen in den Petrischalen zurückbleibt und weitere 20% während der Kultur von der Matrix verloren gehen.⁸⁵ Der trotz der im Kulturverlauf in diesen Versuchen zu beobachtenden Zunahme der Spheroiddichte zunächst widersprüchlich erscheinende Abfall der DNA-Menge während der Kultur könnte in erster Linie auf der strömungsbedingten Abschwemmung der nicht aggregierten Zellen beruhen, die sich leichter von der Polymermatrix lösen können als die Spheroide und was sich quantitativ stärker bemerkbar macht, als die Spheroidbildung durch den Rest der Zellen auf dem Polymer. Gestützt wird diese Annahme durch den deutlich verstärkten Abfall der DNA-Menge im Kulturverlauf bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min mit der genannten Isolation H-5 und ihrer initial höheren Besiedlung im Vergleich zu den anderen Isolationen, bei denen die Abfälle nicht so ausgeprägt waren. Am sechsten Kulturtag näherte sich die DNA-Menge auf den Polymeren den Werten der anderen Flussgeschwindigkeiten wieder an, lag jedoch etwas höher, da sich auch mehr Spheroide auf den Polymeren befanden. Zur Beantwortung der Frage, ob sich die unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten des Zellkulturmediums auch auf die Funktionalität der Zellen auswirkt, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Stoffwechselfparameter untersucht. Im Einzelnen wurden die Albuminproduktion der Zellen sowie deren Fähigkeit zur Ammoniakverstoffwechslung und zur Metabolisierung des Lidocain-Stoffwechselmetaboliten MEGX analysiert. Die Albuminbestimmungen erfolgten mit Hilfe eines etablierten und

in anderen Arbeiten beschriebenen ELISA-Testverfahrens aus dem Kulturmedium.^{37,39,75} Es stellte somit das einzige in dieser Versuchsreihe angewandte Verfahren mit potentiell, methodisch nicht genau zu klärendem Einfluss der im Medium zirkulierenden Zellen dar und bezog sich nicht nur auf die auf dem Polymerträger lokalisierten Zellen, was als methodischer Nachteil zu werten ist. Die Fähigkeit der Hepatozyten zur Ammoniakverstoffwechslung und der MEGX-Metabolisierung wurde mit ebenfalls in der Literatur beschriebenen Verfahren in direkt an den Flusskulturen anschließenden statischen Kulturen untersucht, in denen die Einflüsse der im Medium zirkulierenden Zellen somit ausgeschaltet waren, da die Polymere aus dem Bioreaktorsystem entfernt und mit frischem, speziell präparierten Kulturmedium kultiviert wurden.^{37,53,75} Bei der nachfolgenden retrospektiven Beurteilung der funktionellen Parameter müssen jedoch die genannten unter diesen Kulturbedingungen nicht zu vermeidenden Zellschwankungen berücksichtigt werden, da sie zu Einschränkungen in der Vergleichbarkeit der Auswirkungen der verschiedenen Flussgeschwindigkeiten auf die Funktionalität der kultivierten Spheroiden führen. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass es im Rahmen der gewählten Methoden nicht genau geklärt werden kann, welchen Anteil die nicht aggregierten Zellen vor allem in den ersten zwei Kulturtagen an den Stoffwechselleistungen hatten da bei der Bestimmung der Stoffwechselfparameter eine Trennung der spheroidalen Zellaggregate von den nicht aggregierten Zellen auf den Polymeren technisch nicht möglich war. Allerdings nahm die Zahl loser, nicht aggregierter Zellen und somit auch ihr Einfluss auf die Stoffwechselfparameter im Kulturverlauf wie beschrieben kontinuierlich ab, so dass sich ab dem zweiten bis dritten Kulturtag überwiegend spheroidale Zellformationen auf den Polymermatrizes befanden, und die bestimmten Stoffwechselleistungen damit überwiegend auf die in Spheroiden angeordneten Hepatozyten zurückzuführen sind. Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Untersuchungen der zellulären Stoffwechselfunktionen gezeigt werden, dass sich in den Flussbioreaktoren bei allen Flussgeschwindigkeiten spheroidale Zellaggregate mit hoher organspezifischer Funktionalität gebildet hatten, die diese auch über den gesamten Kulturverlauf behielten. Von der Tendenz her war bei allen Flussgeschwindigkeiten vor allem bei der Albuminsynthese und der Ammoniakverstoffwechslung ein Maximum der Syntheseleistungen am zweiten Kulturtag zu beobachten, während die MEGX-Bildungsraten über den Kulturverlauf kontinuierlicher verliefen und kein eindeutiges Maximum aufwiesen. Ob, und wenn in

welchem Ausmaß, die parallele Abschwemmung der nicht aggregierten Zellen hiermit zusammenhängt, kann wie beschrieben nicht eindeutig geklärt werden. Ein weiterer möglicher Grund für diese Beobachtung könnte der nicht stattgefundene Mediumwechsel in den Kulturen sein, wodurch sich das Kulturmilieu durch fallende pH- und pO_2 -Werte auf der einen und ansteigende Laktat- und pCO_2 -Werte auf der anderen Seite verschlechterte. Um die Syntheseleistungen der Hepatozyten genauer zu evaluieren, wurde mit Hilfe der gemessenen DNA-Standardkurve jeweils die Stoffwechselleistung pro Hepatozyt bestimmt. Hier zeigte sich, dass die durchweg höchsten Ammoniakabbauraten pro Hepatozyt mit Werten von $84,96 \pm 1,96$ $pgNH_3/Zelle/4h$ an Kulturtag 1 und $57,03 \pm 27,13$ $pgNH_3/Zelle/4h$ an Tag 6 bei den Zellen auftraten, die mit der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min kultiviert wurden. Auch bezüglich der Albuminsynthese zeigten sich bei dieser Flussgeschwindigkeit durchweg gute Syntheseraten pro Hepatozyt auf hohem Niveau, die an den Kulturtagen 3 und 5 die Syntheseraten der anderen Geschwindigkeiten übertrafen. Nur bei den MEGX-Bildungsraten wiesen die Zellen, die mit der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min kultiviert wurden, eine kontinuierlichere und an den ersten vier Kulturtagen auch höhere MEGX-Bildungsrate pro Hepatozyt auf, wobei jedoch die Bildungsraten am sechsten Kulturtag wieder bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min am höchsten waren. Somit könnte man abschließend mit Einschränkungen durch die kulturbedingten methodischen Nachteile sagen, dass bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min zwar die höchste Spheroiddichte beobachtet werden konnte, aber die zum Teil höchste leberspezifische Funktionalität der Zellen bei der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min zu verzeichnen war und somit bei dieser gemäßigten Flussgeschwindigkeit zwar quantitativ weniger, dafür aber qualitativ hochwertige Spheroiden mit optimaler Größe in der Flusskultur entstanden. Bei den höheren Flussgeschwindigkeiten 24 und 52 ml/min bildete sich durch die beschriebenen Mechanismen eine größere Anzahl an Spheroiden, die aber durch ihren vergrößerten Durchmesser unter Umständen durch zum Beispiel zentral auftretende Nekrosen in ihrer organspezifischen Funktionalität wie es in der Literatur beschrieben wird herabgesetzt wurden, wobei jedoch die Flussgeschwindigkeit 24 ml/min der höheren Flussgeschwindigkeit sowohl bezüglich der Spheroidbildung als auch der Stoffwechselfunktionen vor allem gegen Kulturende überlegen zu sein scheint.⁸¹ Wenn sich in weiterführenden Untersuchungen die genannten Ergebnisse bestätigen sollten, werden in vivo Versuche klären müssen, ob es sich als vorteilhaft erweist,

entweder quantitativ weniger, aber funktionell höherwertigere Spheroide, oder aber eine größere Anzahl an Spheroide mit eventuell vorhandenen funktionellen Einbußen auf den Polymermatrizes zu transplantieren.

Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass unter den untersuchten Kulturbedingungen bereits nach einem Tag hepatozelluläre Spheroide entstehen, die eine hohe organspezifische Funktionalität aufweisen und diese über den Kulturverlauf auch behalten. Weiterhin konnte die Abhängigkeit der Spheroidbildung und, wenn auch mit Einschränkungen, der Funktionalität der Zellen von der Flussgeschwindigkeit des Zellkulturmediums demonstriert werden. Um jedoch eine fundiertere Aussage über die Abhängigkeit der Funktionalität der Zellen von der Flussgeschwindigkeit treffen zu können, ist es zwingend erforderlich, durch weitere Versuche, bzw. Änderungen der Methoden in Zukunft vergleichbarere Bedingungen zu schaffen. Ideal wäre es, eine identische Anzahl an Spheroide auf den Polymermatrizes, die mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten kultiviert wurden, miteinander bezüglich ihrer funktionellen Leistungen zu vergleichen. Dies dürfte unter den geschilderten besonderen Bedingungen in den Flussbioreaktoren aber kaum zu erreichen sein. Die möglichen Störeinflüsse der nicht aggregierten Zellen auf den Polymermatrizes müssen so gering wie möglich gehalten werden. Um die Vergleichbarkeit in dieser Hinsicht zumindest zu verbessern wären aber verschiedene Ansatzpunkte denkbar. So wird es zum einen unentbehrlich sein strukturell identische Polymermatrizes zu verwenden, sobald diese zur Verfügung stehen. Weiterhin wäre es auch möglich, diese Polymere in Ihrer Zusammensetzung zu verändern, um auf diesem Wege möglicherweise kontrollierbarer auf die Interaktionen zwischen der Polymermatrix und den ausgesiedelten Zellen einwirken zu können. In diesem Zusammenhang wäre es auch zu überlegen, die Polymere mit einer initial kleineren Zellmenge zu besiedeln, die von den Matrizes auch komplett aufgenommen werden kann, und sie zunächst statisch zu kultivieren, um so das anfänglich durch die Dynamik der Flusskultur bedingte Maß an Zellschwankungen zu reduzieren. Grundsätzlich wäre es denkbar, die Kultur in den Bioreaktoren zu verlängern, weil nach sechs Kulturtagen so gut wie keine nicht aggregierten Zellen mehr auf den Polymeren zu beobachten waren. So könnte dann bei den

Untersuchungen der Stoffwechselfunktionen davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Stoffwechselfparameter wirklich nur auf die auf den Matrizes lokalisierten Spheroide zurückzuführen wären. Dies würde natürlich veränderte Kulturbedingungen mit beispielsweise regelmäßig durchzuführenden Kulturmedienwechseln voraussetzen um die Zellen vital zu halten. Letztendlich wäre es in weiterführenden Arbeiten auch sinnvoll, die Spheroide mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer Verfahren genauer zu analysieren, um funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Flussgeschwindigkeiten weiter zu evaluieren und bildgebende Verfahren wie zum Beispiel die Elektronenmikroskopie anzuwenden, um strukturelle Unterschiede der Spheroide genauer zu untersuchen.

Die Rekonstruktion funktionellen Lebergewebes durch Tissue Engineering wird die Forschung noch lange Zeit vor immense Herausforderungen stellen. Bis es eines Tages gelingen wird heterotope Hepatozytentransplantationen als echte Alternativtherapie zur Lebertransplantation zu etablieren, sind noch viele bisher ungelöste Probleme zu überwinden. Das in dieser Arbeit untersuchte implantierbare Leberersatzsystem zeigt aus den dargelegten Gründen viele hoffnungsvolle Ansätze. Nachfolgende Arbeiten werden, unter anderem basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit, weitere Nachforschungen unternehmen müssen, um die Kultur hepatozellulärer Spheroide weiter zu optimieren. Wenn sich die heterotope Transplantation optimiert vorkultivierter Spheroide auf dreidimensionalen Polymermatrizes dann in weiterführenden in-vivo-Versuchen wie erhofft als vorteilhaft herausstellen sollte, wäre dies ein weiterer kleiner Schritt nach vorne, um Patienten mit bestimmten Lebererkrankungen möglicherweise in der Zukunft eines Tages ohne Lebertransplantation behandeln zu können.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Durch den Mangel an geeigneten Spenderorganen können viele Patienten mit ernsten Lebererkrankungen nicht der notwendigen Organtransplantation zugeführt werden. Die heterotope Transplantation hepatozellulärer Spheroide auf dreidimensionalen Polymermatrizes stellt im Rahmen des Tissue Engineering einen vielversprechenden alternativen Behandlungsansatz dar. Um das initiale Überleben der Zellen in vivo zu erhöhen wird an verbesserten in-vitro-Kulturbedingungen für spheroidale Zellaggregate geforscht. Ziel dieser Arbeit war es die Kulturbedingungen für hepatozelluläre Spheroide auf dreidimensionalen Polymermatrizes in einem dynamischen Kulturmodell unter Verwendung eines Flussbioreaktorsystems durch den Vergleich verschiedener Flussgeschwindigkeiten des Zellkulturmediums weiter zu optimieren.

Methoden: Es wurden Hepatozyten durch ein Kollagenasedigestionsverfahren aus Rattenlebern isoliert, im Anschluss auf biologisch abbaubare dreidimensionale PLLA-Polymere ausgesiedelt und über 6 Tage in den Flussbioreaktorsystemen mit 3 verschiedenen Flussgeschwindigkeiten (7, 24 und 52 ml/min) des Zellkulturmediums kultiviert. Zur Beurteilung der verschiedenen Kulturbedingungen wurden einerseits die Spheroiddichte und deren Durchmesser auf der Polymermatrix und andererseits, zum Teil in anschließenden statischen Kulturen, die Funktionalität der Zellen durch Messungen der Albuminsynthese, der Ammoniakverstoffwechslung, der Lidocainverstoffwechslung sowie des DNA-Gehaltes auf den Polymeren untersucht.

Ergebnisse: Bei allen Flussgeschwindigkeiten entstanden bereits nach einem Tag hochfunktionelle Spheroide. Bei der Flussgeschwindigkeit 24 ml/min trat die über den Kulturverlauf dichteste Spheroidbesiedlung auf. Die zum Teil höchste organspezifische Funktionalität wiesen die Zellen auf, die mit der Flussgeschwindigkeit 7 ml/min kultiviert wurden. Problematisch bei der funktionellen Beurteilung sind vor allem kulturbedingte Zellschwankungen auf den Polymermatrizes.

Schlussfolgerung: In Zukunft sind weitere Optimierungen der Methodik notwendig, um die Auswirkungen verschiedener Flussgeschwindigkeiten auf die Funktionalität der Spheroide unter diesen Kulturbedingungen weiter zu evaluieren. Grundsätzlich stellt das untersuchte System ein effektives Modell dar, spezifisch stoffwechselaktives Leberersatzgewebe mit der potentiellen Möglichkeit zur Kompensation ausgefallener Leberfunktionen zu entwickeln und zu transplantieren.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Benner, K.-U., Hillenbrand, S. M. (1996) Der Körper des Menschen. Weltbild Verlag, Augsburg, p 161
2. Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994) Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. neubearbeitete Auflage - Stuttgart, New York: Thieme 1994, pp 492 - 496
3. Deutsche Hauptstelle gegen die Suchtgefahren (DHS), Westring 2, 59065 Hamm, www.dhs.de
4. Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherung, 53108 Bonn, Gesundheitsberichterstattung des Bundes für Deutschland 1998, Kapitel 5.22: „Chronische Leberkrankheit und –zirrhose“, www.gbe-bund.de
5. Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Gustav-Stresemann-Ring 11, 65189 Wiesbaden, www.destatis.de
6. UNOS Scientific Registry Data, www.unos.org; 2000.
7. Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherung, 53108 Bonn, Gesundheitsberichterstattung des Bundes für Deutschland 1998, Kapitel 8.6: „Kosten nach Krankheitsarten“, www.gbe-bund.de
8. Starzl, T. E., Demetris, A. J., Van Thiel, D. (1989) Medical Progress-Liver transplantation. The New England Journal Of Medicine, Oct. 12, 1989, pp 1014 - 1022
9. Schettler, G., Greten, H. (1998) Innere Medizin. 9. komplett überarbeitete und neu gestaltete Auflage - Stuttgart, New York: Thieme 1998, pp 922 - 924
10. Deutsche Stiftung für Organtransplantationen (DSO), Emil von Behring Passage, 63263 Neu-Isenburg, www.dso.de

11. Broelsch, C. E., Whittington, P. F., Emond, J. C., Heffron, T. G., Thistlethwaite, J. R., Stevens, R., Piper, J., Whittington, S. H., Lichtor, J. L. (1991): Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results. *Ann Surg* 214(4), pp 428 - 437
12. Gundlach, M., Topp, S., Broring, D., Rogiers, X. (2000): Split liver transplantation. *Ann Transplant* 5(1), pp 38 - 42
13. Pichlmayr, R., Ringe, B., Gubernatis, G., Hauss, J., Bunzendahl, H. (1998): Transplantation einer Spenderleber auf zwei Empfänger (Splittingtransplantation) – Eine neue Methode in der Weiterentwicklung der Lebersegmenttransplantation. *Langenbecks Arch Chir* 373, pp 127 - 130
14. Strong, R. W., Lynch, S. V., Ong, T. H., Matsunami, H., Koido, Y., Balderson, G. A. (1990): Successful liver transplantation from a living donor to her son. *N Engl J Med* 322(21), pp 1505 - 1507
15. Müller, M. et al. (2000) *Chirurgie für Studium und Praxis 2000/01*. 5. Auflage-Breisach/Rh.: Med. Verl.- und Informationsdienste, 2000, pp 215 - 216
16. Kohlhaw, K., Schwarz, R., Lübke, P., Hartwig, Th., Berr, F., Hauss, J. (2000) Klinische Studien in der Lebertransplantation. *Chirurg* (2000) 71; pp 667 – 675
17. Edwards, E. B., Roberts, J. P., McBride, M. A., Schulak, J. A., Hunsicker, L. G. (1999) The effect of the volume of procedures at transplantation centers on mortality after liver transplantation. *N Engl J Med* 1999; 341: pp 2049 - 2053
18. Jain, A., Reyes, J., Kashyap, R., and others (2000) Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. *Annals Of Surgery*, Vol. 232, No. 4, pp 490 - 500
19. Adam, R., Cailliez, V., Majno, P., Karam, V., McMaster, P., and others (2000) Normalised intrinsic mortality risk in liver transplantation: European Liver Transplant Registry study. *Lancet* 2000; 356: pp 621 - 627

20. Langer, R., Vacanti, J. P. (1993) Tissue Engineering. Science, 14 May 1993, Volume 260, pp 920 - 926
21. Pollok, J. M., Vacanti, J. P., (1996) Tissue Engineering. Seminars in Pediatric Surgery, Vol. 5, No. 3 (August), 1996, pp 191 - 196
22. Vacanti, J. P., Langer, R. (1999) Tissue Engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Molecular medicine, 354, pp 32 - 34
23. Mofid, M., Vacanti, J. P. (1994) Composite Tissue Engineering. Problems in General Surgery- Vol. 11, No. 2, pp 227 - 240
24. Ma, P. X., Zhang, R., Xiao, G, Franceschi, R. (2001) Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly (α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. J Biomed Mater Res 54, pp 284 - 293
25. Cima, L. G., Langer, R., Vacanti, J. P. (1991) Polymers for Tissue and Organ Culture. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, Vol. 6- July 1991, pp 232 - 239
26. Mooney, D. J., Kaufmann, P. M., Sano, K., McNamara, K. M., Vacanti, J. P., Langer, R. (1994) Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges, Transplantation Proceedings. Vol. 26, No. 6 (December), 1994, pp 3425 - 3426
27. Mooney, D. J., Park, S., Kaufmann, P. M., Sano, K., McNamara, K. M., Vacanti, J. P., Langer, R. (1995) Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 29, pp 959 - 965
28. Mooney, D. J., Cima, L. G., Langer, R., Johnson, L., Hansen, L. K., Ingber, D. E., Vacanti, J. P. (1992) Principles of tissue Engineering and reconstruction using polymer-cell constructs. Materials Research Society Symp. Proc., Vol. 252, pp 345 - 351

29. Olive, P. L., Durand, R. E. (1994) Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer and Metastasis Reviews* 13, pp 121 - 138
30. Yamada; K., Kamihira, M., Hamamoto, R., Iijima, S. (1998) Efficient induction of hepatocyte spheroids in a suspension culture using a water-soluble synthetic polymer as an artificial matrix. *J. Biochem.* Vol. 123, No. 6, pp 1017 - 1023
31. Peshwa, M. V., Wu, F. J., Sharp, H. L., Cerra, F. B., Hu, W.-S. (1996) Mechanistics of formation and ultrastructural evaluation of hepatocyte spheroids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 32, pp 197 - 203
32. Yuasa, C., Tomita, Y., Shono, M., Ishimura, K., Ichihara, A. (1993) Importance of cell aggregation for expression of liver functions and regeneration demonstrated with primary cultured hepatocytes. *Journal Of Cellular Physiology* 156, pp 522 - 530
33. Wu, F. J., Friend, J. R., Hsiao, C. C., Zilliox, M. J., Ko, W.-J., Cerra, F. B., Hu, W.-S. (1996) Efficient assembly of rat hepatocyte spheroids for tissue Engineering applications. *Biotechnology and BioEngineering*, Vol. 50, pp 404 - 415
34. Lazar, A., Peshwa, M. V., Wu, F. J., Chi, C.-M., Cerra, F. B., Hu, W.-S. (1995) Formation of porcine hepatocyte spheroids for use in a bioartificial liver. *Cell Transplantation*, Vol. 4, No. 3, pp 259 - 268
35. Niwa, T., Koide, N., Tsuji, T., Imaoka, S., Ishibashi, F., Funae, Y., Katagiri, M. (1996) Cytochrome P450S of isolated rat hepatocytes in spheroid and monolayer cultures. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, Vol. 91, No. 3, March 1996, pp 372 - 378
36. Lin, K. L., Maeda, S., Saito, T. (1995) Long-term maintenance of liver-specific functions in three-dimensional culture of adult rat hepatocytes with a porous gelatin sponge support. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21, pp 19 - 27

37. Kamihira, M., Yamada, K., Hamamoto, R., Iijima, S. (1997) Spheroid formation of hepatocytes using synthetic polymer. *Annals New York Academy of Sciences* 831, pp 398 - 407
38. Tong, J. Z., De Lagausie, P., Furlan, V., Cresteil, T., Bernard, O., Alvarez, F. (1992) Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Experimental Cell Research* 200, pp 326 - 332
39. Peshwa, M. V., Wu, F. J., Follstad, B. D., Cerra, F. B., Hu, W.-S. (1994) Kinetics of hepatocyte spheroid formation, *Biotechnol. Prog.* 1994, 10, pp 460 - 466
40. Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R., Marceau, N. (1985) Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 101, September 1985, pp 914 - 923
41. Koide, N., Sakaguchi, K., Koide, Y., Asano, K., Kawaguchi, M., Matsushima, H., Takenami, T., Shinji, T., Mori, M., Tsuji, T. (1990): Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and other nonadherent environments. *Exp Cell Res* 186, pp 227 - 235
42. Sakaguchi, K., Koide, N., Asano, K., Takabatake, H., Matsushima, H., Takenami, T., Ono, R., Sasaki, S., Mori, M., Koide, Y., Tsuji, T. (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, pp 351 - 356
43. Yuasa, C., Tomita, Y., Shono, M., Ishimura, K., Ichihara, A. (1993): Importance of cell aggregation for expression of liver functions and regeneration demonstrated with primary cultured hepatocytes. *J Cell Physiol* 156, pp 522 - 530
44. Ueno, K., Miyashita, A., Endoh, K. I., Takezawa, T., Yamazaki, M., Mori, Y., Satoh, T.: Formation of multicellular Spheroids composed of rat hepatocytes (1992): *Res Comm Chem Path Pharmacol* 77, pp 107 - 120

45. Kawaguchi, M., Koide, N., Sakaguchi, K., Shinji, T., Tsuji, T. (1992): Combination of epidermal growth factor and insulin is required for multicellular spheroid formation of rat hepatocytes in primary culture. *Acta Med Okayama* 46, pp 195 - 201
46. Niwa, T., Koide, N., Tsuji, T., Imaoka, S., Ishibashi, F., Funae, Y., Katagiri, M. (1996): Cytochrome P450s of isolated rat hepatocytes in spheroid and monolayer cultures. *Res Comm Mol Path Pharm* 91, pp 372 - 378
47. Gerlach, J. C., Schnoy, N. , Encke, J., Smith, M. D., Müller, C., Neuhaus, P. (1995): Improved Hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: Electron microscopy studies. *Hepatology* 22, pp 546 - 552
48. Kan, P., Miyoshi, H., Yanagi, K., Ohshima, N. (1998): Effects of shear stress on metabolic function of the co-culture system of hepatocyte/nonparenchymal cells for a bioartificial liver. *ASAIO J* 44: pp 441 - 444
49. Kim, S. S., Utsunomija, H., Koski, J. A., Wu, B. M., Cima, M. J., Sohn, J., Mukai, K., Griffith, L. G., Vacanti, J. P. (1998): Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels. *Ann Surg* 228, pp 8 - 13
50. Török, É., Pollok, J. M., Ma, P. X., Vogel, C., Dandri, M., Petersen, J., Burda, M. R., Kaufmann, P. M., Kluth, D., Rogiers, X. (2001): Hepatic tissue engineering on 3-dimensional biodegradable polymers within a pulsatile flow bioreactor. *Digest Surg* 18, pp 196 - 203
51. Török, E., Pollok, J. M., Ma, P. X., Kaufmann, P. M., Dandri, M., Petersen, J., Burda, M.-R., Kluth, D., Perner, F. 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* 2001, 169, pp 34 - 41

52. Pollok, J. M., Kluth, D., Cusick, R. A., Lee, H., Utsunomiya, H., Ma, P. X., Langer, R., Broelsch, C. E., Vacanti, J. P. (1998) Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions. *Eur J Pediatr Surg* 8 (1998), pp 195 - 199

53. Ercolani, G., Grazi, G.L., Calliva, R., Pierangeli, F., Cescon, M., Cavallai, A. (2000) The lidocaine (MEGX) test as an index of hepatic function: Its clinical usefulness in liver surgery. *Surgery Volume* 127, Number 4, pp 464 - 471

54. Seglen, P. O. (1976) Preparation of rat liver cells, *Methods Cell. Biol.* 13, pp 29 - 83

55. Gerlach, J., Encke, J., Müller, Ch., Neuhaus, P. (1994) Zellkulturmodell für die Hepatozytenkultur in Bioreaktoren zur Nutzung ihres Metabolismus in hybriden Leberunterstützungssystemen. *Zentralblatt f. Chirurgie* 119 (1994), pp 334 - 340

56. Nyberg, S. L., Shirabe, K., Peshwa, M. V., Sielaff, T. D., et al. (1993) Extracorporeal application of a gel-entrapment, bioartificial liver: demonstration of drug metabolism and other biochemical functions. *Cell Transplantation*, Vol. 2, pp 441 - 452

57. Cima, L. G., Vacanti, J. P., Vacanti, C., Ingber, D., Mooney, D., Langer, R. (1991) Tissue Engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *Journal of Biochemical Engineering*, May 1991, Vol. 113, pp 143 - 151

58. Asonuma, K., Gilbert, J.G., Stein, J. E., Takeda, T., Vacanti, J. P. (1992) Quantification of transplanted hepatic mass necessary to cure the Gunn rat model of hyperbilirubinemia. *J. Pediatr. Surg.* 27, pp 298 - 301

59. Nagata, H., Ito, M., Cai, J., Edge, A.S., Platt, J.L., Fox, I.J. (2003) Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology*, February 2003, Vol. 124, No. 2, pp 422 - 431

60. Sundback, C.A., Vacanti, J.P. (2000) Alternatives to liver transplantation: from hepatocyte transplantation to tissue-engineered organs. *Gastroenterology*, February 2000, Vol. 118, No. 2, pp 438 - 442
61. Fiegel, H.C., Lioznov, M.V., Cortes-Dericks, L., Lange, C., Kluth, D., Fehse, B., Zander, A.R. (2003) Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21; pp 98 - 104
62. Kakinuma, S., Tanaka, Y., Chinzei, R., Watanabe, M., Shimizu-Saito, K., and others (2003) Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21; pp 217 - 227
63. Jamal, H.Z., Weglarz, T.C., Sandgren, E.P. (2000) Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology* 2000; 118; pp 390 - 394
64. Fautrel, A., Joly, C., Guyomard, C., Guillouzo, A. (1997) Long-term maintenance of drug metabolizing enzyme activities in rat hepatocytes after cryopreservation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 147, pp 110 - 114
65. Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufmann, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V., Strom, S.C. (1998) Treatment of Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338; pp 1422 - 1426
66. Grossman, M., Raper, S.E., Stein, E.A., Engelhardt, J.F., Müller, D.W., Lupien, P.J., Wilson, J.M. (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to the liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat Genet* 1994; 6, pp 335 - 341
67. Asonuma, K., Vacanti, J. P. (1992) Cell transplantation as replacement therapy for the future. *Pediatric Transplantation* Volume 4, Number 2, June 1992, pp 249 - 254

68. Hansen, L. K., Vacanti, J. P. (1993) Hepatocyte transplantation using artificial biodegradable polymers (Chapter 8). Hoffman Med Current Controversies in Biliary Atresia, R. G. Landes, Austin, Tx.
69. Kneser, U., Kaufmann, P. M., Fiegel, H. C., Pollok, J. M., Kluth, D., Herbst, H., Rogiers, X. (1999) Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *Biomed Mater Res*, 47, pp 494 - 503
70. Uyama, S., Kaufmann, P. M., Takeda, T., Vacanti, J. P. (1993) Delivery of whole liverequivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation. *Transplantation* 1993; 55 (4), pp 932 - 935
71. Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., Langer, R. (1991) Hepatocyte culture on biodegradable polymeric substrates. *Biotechnology and BioEngineering*, Vol. 38, pp 145 - 158
72. Mooney, D., Hansen, L., Vacanti, J.P., Langer, R., Farmer, S., Ingber, D. (1992) Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *Journal Of Cellular Physiology* 151, pp 497 - 505
73. Kneser, U., Kaufmann, P.M., Fiegel, H. C., Pollok, J. M., Kluth, D., Herbst, H., Rogiers, X. (1999) Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islet cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric evaluation. *Pediatr. Surg. Int.* (1999) 15: pp 168 - 174
74. Kneser, U., Kaufmann, P. M., Fiegel, H. C., Pollok, J. M., Rogiers, X., Kluth, D., Herbst, H. (1999) Interaction of hepatocytes and pancreatic islets cotransplanted in polymeric matrices. *Virchows Arch* (1999) 435, pp 125 - 132
75. Kaufmann, P.M., Fiegel, H.C., Kneser, U., Pollok, J.M., Kluth, D., Rogiers, X. (1999) Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Engineering*, Vol. 5, No. 6, 1999, pp 583 - 596

76. Johnson, L. B., Aiken, J., Mooney, D., et al. (1994) The mesentery as a laminated vascular bed for hepatocyte transplantation. *Cell Transplantation* 3, pp 273 - 281
77. Tong, J. Z., Bernard, O., Alvarez, F. (1990) Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. *Experimental Cell Research* 189, pp 87 - 92
78. Kawaguchi, M., Koide, N., Sakaguchi, K., Shinjii, T., Tsuji, T. (1992) Combination of epidermal growth factor and insulin is required for multicellular spheroid formation of rat hepatocytes in primary culture. *Acta Med Okayama* 46 (3), pp 195 - 201
81. Folkman, J., Hochberg, M. (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal Of Experimental Medicine*, Volume 138, 1973, pp 745 - 753
82. Giordano, R.A., Wu, B.M., Borland, S.W., Cima, L.G., Sachs, E.M. and Cima, M.J. (1996) Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J Biomater Sci Polym Ed* 8, pp 63 - 75
83. Ma, P.X. and Choi, J.W. (2001) Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng* 7: pp 23 - 33
84. Yang, S., Leong, K.F., Du, Z. and Chua, C.K. (2002) The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng* 8: pp 1 - 11
85. Cordes, C. (2004) Heterotopie Transplantation von mittels Tissue Engineering erzeugten Hepatozytensphäroiden in zweidrittelhepatektomierte Ratten, www.sub.uni-hamburg.de/opus/volltexte/2004/2177/, pp 70 - 74

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Jörg-Matthias Pollok für die Überlassung des Themas sowie Frau Dr. med. Èva Török bedanken. Sie haben mich stets unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Frau Dr. med. Èva Török möchte ich vor allem für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Operationen danken.

Professor Dr. med. Dr. h. c. Xavier Rogiers danke ich für seine freundliche Unterstützung sowie für die Bereitstellung der erforderlichen Räumlichkeiten und benötigten Apparaturen in seiner Abteilung.

Weiterer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung Frau Silke Brillhof, Frau Franziska Stern, Frau Jessika Schulz und Frau Karsta Lipke. Der Dank gilt nicht nur für ihre Hilfestellungen, sondern vor allem für manche aufmunternde Worte. Herrn Dr. med. Dr. vet. Klaus Niehaus, leitender Oberarzt der I. Chirurgischen Abteilung des AK Barmbek, danke ich für so manchen guten Rat und die Bereitstellung von Literatur.

Ausdrücklich möchte ich Herrn Philipp Kölln danken, mit dem ich viele schöne Momente im Labor verlebt habe und mit dem ich manche Probleme - und von denen gab es nicht wenige - ausgiebigst besprechen konnte. Ohne Philipp hätte wirklich etwas gefehlt. Frau Dr. med. Margret Lorenzen danke ich für ihre Orientierungshilfe.

Zum Abschluss möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und meiner Lebensgefährtin Frau Tanja Ollmann bedanken, die mich immer wieder motiviert haben und deren Nerven ich mit dem Thema Doktorarbeit häufig strapaziert, wenn nicht überstrapaziert habe. Vor allem Tanja danke ich für ihr unendliches Verständnis. Letztendlich hoffe ich, dass etwas Anständiges dabei herausgekommen ist und sich all die Arbeit gelohnt hat.

Danke!!!

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Vogel
Vorname: Curd Christian
Geburtsdatum: 25.11.1974
Geburtsort: Wipperfürth; Oberbergischer Kreis, NRW
Wohnort: Veilchenweg 9, 21493 Schwarzenbek
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1981 – 1985: Grundschule-Ost in Halver;
Märkischer Kreis, NRW
1985 – 1994: Zeppelin-Gymnasium in
Lüdenscheid; Märkischer Kreis, NRW
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Durchschnittsnote: 1,5

Wehrdienst:

10/1994 – 10/1995: 4. Panzerbataillon 203 in Hemer;
Märkischer Kreis, NRW

Hochschulausbildung:

1995 – 2002: Universität Hamburg: Studiengang
Humanmedizin
09/1997: Ärztliche Vorprüfung,
Note: 2,00
09/1998: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
Note: 2,00
03/2001: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
Note: 1,66
06/2002: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
Endnote: 1,83

Praktisches Jahr:

04/2001 – 08/2001: Innere Medizin, AK Barmbek, Hamburg
08/2001 – 12/2001: Gynäkologie und Geburtshilfe,
Frauenklinik Barmbek-Finkenau, Hamburg
12/2001 – 03/2002: Chirurgie, AK Barmbek, Hamburg

Weiterbildung:

04/1999 – 06/2000: Chirurgische Forschung, Abteilung für
Hepatobiliäre Chirurgie,
Universitätskrankenhaus Hamburg-
Eppendorf
07/2002 – 12/2003: Arzt im Praktikum in der Gynäkologie und
Geburtshilfe, Frauenklinik Barmbek-
Finkenau, Hamburg
Seit 01.01.2004: Assistenzarzt in der Gynäkologie und
Geburtshilfe, Ev. Amalie Sieveking
Krankenhaus, Hamburg

9. 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.
