

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

Direktor (kommissarisch): PD. Dr. med. Lutz Fischer

**Tissue Engineering von humanen Hepatozytensphäroiden auf
biologisch abbaubaren PLLA-Matrices in pulsatiler Flusskultur zur
Transplantation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Stefan Melbeck
aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 11.06.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. J.-M. Pollok

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Petersen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. P. Adamietz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung.....	7
1.1. Lebertransplantation	7
1.1.1. Geschichte der Organtransplantation	8
1.2. Tissue Engineering	9
1.2.1. Was ist Tissue Engineering?	9
1.2.2 Biomaterialien.....	10
1.2.2.1. Abbaubare synthetische Massenpolymerisate.....	10
1.2.2.2. Synthetische Gels	11
1.2.2.3. Natürliche Polymere	11
1.2.2.4. Synthetische Materialien mit zugeschnittenen biologischen Liganden	11
1.2.2.5. Technologien und Strukturen der Matrixgerüste	12
1.2.3. Zellen	12
1.2.4. Angiogenesefaktoren, Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren ..	14
1.2.5. Bioreaktoren	15
1.3. Leberzelltransplantation und Leberzell-Sphäroide.....	15
1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Isolation der Hepatozyten.....	19
2.1.1. Zellmaterialquelle	19
2.1.2. Überführung der Organe in die kalte Ischämie.....	19
2.1.3. Zellisolation	20
2.1.3.1. Benötigte Puffer und Lösungen:	22
2.1.3.2. Benötigte Perfusionslösungen.....	23
2.1.3.3. Perfusionsapparatur	23
2.1.3.4. Perfusion des Leberpräparates	24
2.1.3.5. Gewinnung der Zellen	25
2.1.3.6. Zählen der Zellen und Erreichen der Zielzellkonzentration	25
2.2. Kultur der Hepatozyten.....	26
2.2.1. Das Kultursystem	26
2.2.2. Das Kulturmedium	28
2.2.3. Die Polymere	28
2.2.4. Besiedeln der Polymere.....	29

2.2.5. Mediumwechsel und Mediumprobenentnahme.....	29
2.2.6. Entnahme der Polymere und mikroskopische Auswertung	30
2.3. Messung der Stoffwechselleistung der kultivierten Hepatozyten	31
2.3.1. Messung von Albumin im Kulturmedium	31
2.3.1.1. Zusammensetzung der Puffer und Reaktionslösungen	32
2.3.1.2. Messen und Auswerten des Albumin-Asseys	35
2.3.2. Bestimmung von α -1-Proteinaseinhibitor im Kulturmedium.....	36
2.3.2.1. Vorbereitung der Reagenzien.....	36
2.3.2.2. Durchführung des α -1-Proteinaseinhibitorassays	36
2.3.2.3. Messen und Auswerten des α -1-Proteinaseinhibitorassays.....	37
2.3.3. Messung von Ammoniak und Harnstoff im Kulturmedium.....	37
2.3.3.1. Prinzip der Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff.....	37
2.3.3.2. Durchführung des Tests zur Ammoniak-/Harnstoffbestimmung	38
2.3.3.3. Berechnung der Ammoniak-/Harnstoffkonzentration	39
2.4. Messung des DNA-Gehaltes der besiedelten Polymere	40
2.4.1. Testprinzip der DNA-Bestimmung.....	40
2.4.2. Puffer und Lösungen	40
2.4.3. Vorbereitung der Proben	42
2.4.4. DNA-Assay	42
2.5. Histologische Aufarbeitung.....	43
2.5.1. Anfertigen der Gefrierschnitte	43
2.5.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
2.5.2.1. Durchführung der HE-Färbung	44
2.5.3. Immunhistochemische Färbungen	45
2.5.3.1. Durchführung der ABC-AP-Färbung.....	46
2.5.3.2. Durchführung der PCNA-Färbung	47
2.6. Fotografieren der Zellkultur und der histologischen Schritte unter dem Mikroskop	47
2.7. Northern Blot Analyse für humane Albumin mRNA	48
2.8. Elektronenmikroskopie	48
3. Ergebnisse	50
3.1. Isolation humaner Hepatozyten.....	50
3.2. Kultur von humanen Hepatozyten im geschlossenem Flusskultursystem	51
3.3. Messung der Albuminkonzentration im Kulturmedium.....	57
3.4. Messung der α -1-Antitrypsinkonzentration im Kulturmedium.....	63
3.5. Messung der Ammoniak- und Harnstoffkonzentration im Kulturmedium.....	65
3.6. Northern Blot für humane Albumin mRNA.....	69

3.7. Ergebnisse der DNA-Messung	70
3.8. Ergebnisse Histologie.....	74
3.8.1. Ergebnisse der Histologie mit Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	74
3.8.2. Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbung	77
3.9. Ergebnisse der Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie.....	83
4. Diskussion	88
4.1. Isolation humaner Hepatozyten	91
4.2. Besiedelungseffektivität der PLLA-Polymer-Matrix	92
4.3. PLLA-Polymer-Matrix	93
4.4. Bildung von Sphäroiden aus humanen Hepatozyten in der Flusskultur	94
4.5. Kinetik der Sphäroide hinsichtlich Größe und Anzahl in der Flusskultur	95
4.6. Albuminsynthese der Zellen in Kultur	98
4.7. α -1-Antitrypsinsynthese.....	100
4.8. Harnstoffsynthese	101
4.9. DNA-Messung.....	103
4.10. Histologische Beobachtungen	104
4.10.1 HE-Färbung	105
4.10.2. Immunhistochemische Färbungen der Sphäroide	106
4.11. Elektronenmikroskopie	108
4.12. Zusammenfassung der Diskussion der Ergebnisse:.....	108
5. Allgemeine Zusammenfassung.....	110
Einleitung:	110
Methoden:	110
Ergebnis:	111
Diskussion:	111
6. Literaturverzeichnis.....	112
7. Danksagung	118
8. Lebenslauf.....	119
9. Eidesstattliche Versicherung:.....	120

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ΔE	Extinktionsdifferenz
ϵ	Extinktionskoeffizient
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ABC-AP-	Avidin-/Biotinkomplex-alkalische-Phosphatase-
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
c	Konzentration
ca.	circa
CaCl_2	Calciumchlorid
cm	Centimeter
CK	Cytokeratin
CO_2	Kohlendioxid
D	Deutschland
d	Schichtdicke
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DK	Dänemark
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
E	Extinktion
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic-acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylene-glycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbant assay
et al.	et alii
etc.	et cetera
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
G	Gravitationskonstante
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HCl	Salzsäure

HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSM	Hormonstimuliertes Medium
HTK	Histidine-Tryptophane-Ketoglutarate
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IL-6, IL-8	Interleukin 6, -8
Iso, Isol.	Isolation
Kat.-Nr.	Katalog-Nummer
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NE	Niederlande
ng	Nanogramm
N-SPH	nicht-sphäroidbildender Kulturansatz
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
PAF	Platelet-activating Factor

PEO	Polyethylenoxid
PBS	Phosphat buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pCO ₂	partialer Kohlendioxiddruck
pH	Maß für die Aktivität von Wasserstoff-Ionen in Lösungen
PLLA	Poly-L-Laktatsäure
pO ₂	partialer Sauerstoffdruck
®	registered Trademark
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SPH	sphäroidbildender Kulturansatz
SFF	solid free-form fabrication
Stbw	Standardabweichung
Sys., Syst.	System
TM	Trademark
TNE	Tris, NaCl, EDTA
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(Hydroxymethyl)amino-methane
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Testvolumen
v	Probenvolumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1. Lebertransplantation

Zur definitiven Therapie des akuten und chronisch-fortgeschrittenen Leberversagens stellt die Lebertransplantation das Mittel der Wahl dar. Im Jahre 2005 wurden in Deutschland die Leberspenderorgane von 813 Spendern transplantiert [1]. Es zeigte sich hier, wie in den Jahren zuvor, ein ständiger Mangel an Spenderorganen. Bei Erweiterung der Indikation zur Lebertransplantation ist die Zahl der Patienten in Deutschland, die auf ein Spenderorgan warten, in den letzten 15 Jahren gestiegen, während die Zahl der Transplantationen auf Grund von nicht ausreichend zur Verfügung stehenden Spenderorganen nur leicht gesteigert werden konnte (Abbildung 1).



Abbildung 1: Darstellung der Anzahl der Neuanmeldungen zur Lebertransplantation und der Anzahl der Durchführungen von Lebertransplantationen von 1996 bis 2005 in Deutschland. Dem nur leichten Anstieg bei den durchgeführten Transplantationen steht eine deutliche Steigerung der Neuanmeldungen zu Transplantation gegenüber, die die Zahl der Transplantationen übersteigen [2]. Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation <http://www.dso.de/grafiken/g49.html>

Um in unseren Breiten dem Organmangel zu begegnen, wurde für die Länder Deutschland, Niederlande, Belgien, Luxemburg, Österreich und Slowenien ein Spender-Allokationsverfahren etabliert, um gemeldete Spenderorgane so effizient wie möglich einem passendem Empfänger zu vermitteln. Die zentrale Koordination erfolgt für

Deutschland und dessen Partnerländer über Eurotransplant in Leiden. Des weiteren wurden durch die Einführung von Leber-Lebendspenden [9] und Split-Lebertransplantationen [57] weitere Möglichkeiten erschlossen, um dem Organmangel zu begegnen. Trotzdem konnte der Mangel an Spenderorganen bisher nicht behoben werden. Deswegen wird weiterhin nach Wegen gesucht, diesem Mangel zu begegnen. Neben allgemeinen Präventivmaßnahmen, wie Impfungen gegen Hepatitis B, Verbesserung der Behandlung von zu Leberzirrhose führenden Krankheiten, etwa durch medikamentöse antivirale Therapie, Verbesserung der chirurgischen Techniken und immunsuppressiven Therapie zur Vermeidung der Notwendigkeit von Re-Transplantationen, liegt ein weiterer Ansatz in der Möglichkeit der Leberzelltransplantation, deren Effizienz mit Hilfe der Methoden von Tissue Engineering gesteigert werden könnte [55].

1.1.1. Geschichte der Organtransplantation

(Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation: www.dso.de)

- 1901 Entdeckung des AB0-Blutgruppensystems (Karl Landsteiner)
- 1903 Erste vorübergehend erfolgreiche Nierentransplantation beim Hund (Emerich Ullmann)
- 1945 Nachweis der Folge der Abstoßungsreaktion durch aktive Immunisierung (Peter Madewar)
- 1954 Erste erfolgreiche Nierentransplantation bei eineiigen Brüdern (Joseph Murray)
- 1958 Entdeckung des HLA-Antigensystems (Jean Dausset)
- 1959 Erste erfolgreiche Nierentransplantation nach Lebendspende zweier nicht Genetisch identischer Brüder (Joseph Murray)
- 1960 Erster klinischer Einsatz des Immunsuppressivums Azathioprin
- 1962 Erste Transplantation einer Kadaverniere (Joseph Murray); Erster Langzeiterfolg mit Azathioprin
- 1963 Erste Lungentransplantation (James D. Hardy)
Erste Lebertransplantation (Thomas E. Starzl)
- 1966 Erste erfolgreiche Pankreastransplantation (Richard Lillehei und William D. Kelly)
- 1967 Erste erfolgreiche Herztransplantation (Christiaan Barnard)
- 1983 Einführung von Cyclosporin A als Immunsuppressivum
- 1987 Erste erfolgreiche Dünndarmtransplantation in Deutschland (Eberhard Delz)

1.2. Tissue Engineering

1.2.1. Was ist Tissue Engineering?

Der Begriff "Tissue Engineering" wurde 1988 von Skalak und Fox definiert als "the application of principles and methods of engineering and life sciences to obtain a fundamental understanding of structure-function relationships in novel and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain, or improve (tissue) function" [67]. Aufbauend auf dieser Definition wurde von Langer und Vacanti 1993 die Definition von Tissue Engineering „as an interdisciplinary field that applies the principals of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain or improve tissue function" erweitert [36]. Eine weitere Definition von Galetti, Hellmann und Nerem (1995) bezeichnet Tissue Engineering als "the basic science and development of biological substitutes for implantation into the body or the fostering of tissue remodelling for the purpose of replacing, repairing, regenerating, reconstructing, or enhancing function" [17, 44].

Diese Definitionen spiegeln das neue interdisziplinäre Feld des Tissue Engineering wider, welches sich zum Ziel macht, im Zusammenspiel der verschiedenen Wissenschaftszweige der Ingenieurwissenschaften und der Bio-Wissenschaften Ersatzgewebe zu entwickeln, welche die Funktionen des Originalgewebes in komplexer Weise nachempfinden können. Ursprungsmaterial können hierfür menschliche Gewebe oder Organe (autologes oder allogenes Gewebe), tierische Gewebe oder Organe (transgene Tiere oder Xenotransplantate), prozessierte, selektierte oder expandierte tierische oder menschliche Zellen mit und ohne Biomaterialien (Stamm-/Progenitorzellen, genetische oder somatische zelluläre Therapien) oder völlig synthetische Materialien mit biooberflächensimulierendem Design sein. Hierbei soll sowohl strukturellen und mechanischen als auch metabolischen Anforderungen nachgegangen werden. Eine weitere Anwendung neben der therapeutischen Implantation oder extrakorporalen Anwendung [63] können zellbasierte, durch Tissue Engineering entwickelte Systeme darstellen, die der Entwicklung von prädiktiven Modellen wie etwa zur Toxizitätsuntersuchung, Medikamentenmetabolismus- und Pathogenitätsprüfung dienen.

Die Strategien der meisten Versuche im Bereich des Tissue Engineering kombinieren eine kleine Menge Spenderzellen mit einer Unterstützungsstruktur. Dann werden transplantierbare Gewebe in vitro kultiviert oder es wird die Einheit in vivo in einen Empfängerorganismus implantiert, wo neues Gewebe mit sich ausbildendem Gefäßsystem anwachsen kann [50].

1.2.2 Biomaterialien

Die Anforderungen an Biomaterialien im therapeutischen Bereich sind vielfältig. Eine meist gewünschte wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit zur biologische Abbaubarkeit oder Resorptionsfähigkeit im Organismus. Materialien, die nicht oder nur langsam abgebaut werden, führen fast immer zu einer chronischen Entzündung im Sinne einer Fremdkörperreaktion mit Ausbildung eines narbenähnlichen, funktionell minderwertigen Gewebes an den Grenzflächen zum Fremdkörper [6]. Die Materialien und deren Abbauprodukte dürfen nicht toxisch und nicht immunogen sein, müssen also biokompatibel sein. Zersetzungsprozesse können durch aktive Prozesse (Enzyme) oder chemisch (Hydrolyse) bedingt sein.

Des Weiteren müssen die Materialien den verschiedenen mechanischen und morphologischen Ansprüchen gerecht werden. Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Weiterentwicklung dieser Biomaterialien in Hinblick auf die Anwendung und Integration von Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren.

Grundsätzlich können die Materialien in natürlicher und synthetischer Herkunft eingeteilt werden. Die meisten eingesetzten Materialien leiten sich von Substanzen ab, die aus dem bisherigen Gebrauch von in den Körper eingebrachten Fremdsubstanzen, wie chirurgisches Nahtmaterial, Wundmaterial oder hämostatische Agenzien, bekannt sind. Klinisch gebräuchlich sind synthetische Materialien wie Polylactid-co-glycolid-Polymere (Vicryl-Netz als Bestandteil von Dermagraft™) oder natürliche Materialien wie Collagen (Bestandteil von Appligraf™).

1.2.2.1. Abbaubare synthetische Massenpolymerisate

Synthetische abbaubare Polyester wurden vor über 30 Jahren als Materialien für chirurgische Nähte und Knochenfixation eingeführt [31]. Sie werden von drei den Monomeren Lactid, Glycolid und Caprolacton aufgebaut. Die Abbauzeiten können abhängig von der Zusammensetzung im Bereich von Tagen bis zu Jahren liegen. Die mechanischen Eigenschaften sind häufig durch relativ geringe Flexibilität und durch die Neigung, nach Einsetzen der Abbauprozesse zusammenzubröckeln, eingeschränkt. Dieses führte zur Entwicklung zusätzlicher Polymere, wie Polyhydroxybutyrat (PHB), und Co-Polymere von Hydroxybutyrat mit Hydroxyvalerat [5]. Der saure Abbauprozess der klassischen Polyester führt zu Gewebsreaktionen, besonders bei der Anwendung im Knochengewebe. So wurden neue Polymerfamilien, wie auf Tyrosinkarbonat basierende

Materialien, entwickelt [26]. Es wurden außerdem synthetische Polymere zur Freisetzung von Wirksubstanzen entwickelt.

1.2.2.2. Synthetische Gels

Der Nutzen der synthetischen Gels liegt in der Möglichkeit, Zellen oder Gerüste in situ zu applizieren. Eine weitere Herangehensweise ist die Entwicklung von fotopolymerisierenden Gels mit PEO-basierten Substraten [24] und der Möglichkeit, injizierte Monomere durch Lichtapplikation zu polymerisieren, wie etwa für die minimalinvasive intraartikuläre Injektion von Knorpelgewebe in den Gelenkspalt [13].

1.2.2.3. Natürliche Polymere

Natürliche Polymere enthalten Proteine der extrazellulären Matrix und deren Derivate (z. B. Collagen Typ 1, Laminin) und Materialien von Pflanzen und Seegras (Alginat). Fibrin wurde ebenfalls als Material für Matrices entdeckt. Biologische Matrices werden auch durch Extraktion oder teilweiser Reinigung von natürlichen Geweben hergestellt und finden klinische Anwendung in der Knochenwundheilung (Osteotech/USA, Exactech/USA) und sind Forschungsgegenstand etwa zur Herstellung von Urethern und Blutgefäßen. Neben den proteinbasierten Materialien sind auch Materialien, die auf natürlichen Polysacchariden wie Hyaluronsäure (Clear Solutions/USA, Genzyme/USA, Orquest/USA) basieren, gebräuchlich. Alginat kann eine solide Matrix bilden und wird in der Phase 3 zur Behandlung von urogenitalen Störungen getestet (Curis, Inc/USA). Alginat kann in seiner nativen Form nicht vom Organismus abgebaut werden. Um Zellinteraktionen, Abbaubarkeit und mechanische Eigenschaften zu kontrollieren, werden oligomere Formen mit Peptiden und anderen synthetischen Komponenten kombiniert [58].

1.2.2.4. Synthetische Materialien mit zugeschnittenen biologischen Liganden

Ein weiterer Schwerpunkt in der Erforschung von Matrices für Tissue Engineering liegt in der Entwicklung von Materialien, die Zellverhalten über spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktionen kontrollieren. Der Prototyp für eine Adhäsionssequenz ist die vor ca. 25 Jahren aus Fibronectin entwickelte Arginin-Glycerin-Aspartat-Sequenz [61]. Seit dem wurden viele neue Sequenzen der Extrazellulärmatrix identifiziert, an die weitere Signalmoleküle (Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, abbaubeeinflussende Faktoren, etc.) gekoppelt werden können. Hier ist das Erlangen von weiterem Verständnis

über physikalische und chemische Regeln der Signalwege Gegenstand der derzeitigen Forschung.

1.2.2.5. Technologien und Strukturen der Matrixgerüste

Die allgemeinen Gerüst-Typen können in strukturelle Gerüste mit einer porenartigen Struktur, gelartige Gerüste und von natürlichen Geweben gewonnene Gels (siehe oben), eingeteilt werden. Für die strukturellen Gerüste sind Porengrößen in größeren Dimensionen als die Zellgrößen nötig. Eine Vielzahl von gewobenen und nicht gewobenen faserbasierenden Fabrikaten wurden von chirurgischen Firmen hergestellt (Johnson & Johnson, Davis & Geck, etc.). Langer und Vacanti machten die ersten intensiven Bemühungen auf diesem Gebiet im Bereich Leber und Knorpel. Eine Vielzahl von alternativen Näherungen wurden durch Verfahren wie Gefriertrocknung (freeze-drying), Teil-Auslaugung (particulate leaching), Aufschäumen (foaming), „solid free-form fabrication“ (SFF) und Stereolithographie entwickelt.

1.2.3. Zellen

Für die Entwicklung eines Designs für Tissue-Engineering ist das Verständnis für die Zellbiologie, die Biologie der extrazellulären Matrix, Zellphysiologie sowie auch Immunologie und Endzündungsvorgänge notwendig, um das Verhalten der Zellen voraussagen zu können.

Als Zellmaterial kommen prinzipiell Quellen verschiedenen Ursprungs in Betracht:

- Autologe Zellen (des Empfängers eigene Zellen)
- Allogene Zellen (Zellen von einem Spender gleicher Spezies)
- Xenogene Zellen (Zellen einer anderen Spezies)
- Immortalisierte Zelllinien, allogen oder xenogen
- Stammzellen, allogen (fetal oder adult) oder autolog (adult)

Autologe Zellen scheinen als Material für Tissue Engineering aus immunologischer und funktionaler Sicht am besten geeignet zu sein, da diese vom Empfängerorganismus nicht als fremd erkannt und abgestoßen werden und die Funktion in erwarteter Weise erfüllen sollten.

Die Funktionalität dürfte bei allogenen Zellen ähnlich sein wie bei autologen Zellen, es stellt sich allerdings das Problem der immunologischen Reaktion auf den

Fremdorgansmus dar. Auch ist die Reinheit der Zellpopulation wichtig, da Lymphozyten, endotheliale Zellen, dendritische Zellen und andere in die Kultur verschleppten Zellen die Sensibilisierung gegen Alloantigene steigern können. Es ist bereits klinisch nachweisbar gelungen, die Immunogenität beispielsweise einer allogenen Hautkonstruktion herabzusetzen, ohne dass es zu einer klinischen Abstoßungsreaktion kommt [14]. Es gibt ebenfalls Ansätze, die T-Zellaktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen zu blockieren [37].

Xenogene Zellen rufen ebenfalls eine Immunreaktion im menschlichen Organismus hervor. Ein weiteres Problem ist die Möglichkeit einer Transmission eines tierischen Virus. Ein Einsatzbereich xenogener Zellen besteht beispielsweise in dem Einsatz von Schweineleberzellen in einem isolierten extrakorporalen Leber-Unterstützungssystem [18, 63]. Es werden außerdem Ansätze der Immunisolation zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen durch Einkapselung der xenogenen Zellen in eine permeable Membran verfolgt [53, 73]. Die hier entscheidenden Attribute der Membranen sind Permeabilität für Sauerstoff und Stoffwechselsubstrate und -Produkte, mechanische Eigenschaften, Schutz vor Immunreaktionen und Biokompatibilität. Weitere Bemühungen gehen in die genetische Manipulation von Spendertieren, um die Abstoßungsreaktion zu verhindern oder zu vermeiden [49].

Die prinzipielle Anwendung von immortalisierten Zelllinien oder Zellen neoplastischen Ursprungs wie Hepatomzellen liegt unter anderem in der Versorgung für extrakorporale Leberunterstützungssysteme [75]. Des Weiteren sind Versuche der Einkapselung von Hepatomzellen und immortalisierten Leberzellen in eine semipermeable Membran im Tierversuch mit gemischten Ergebnissen erfolgt [8, 40]. Ein Problem von immortalisierten Zellen ist der zunehmende Verlust von Zell- und Syntheseigenschaften im Vergleich zu den Ursprungszellen.

Stammzellen haben prinzipiell das Potenzial in alle Zelltypen zu differenzieren und könnten unlimitierten Zugang zu Zellmaterial verschaffen. Es liegen aber noch nicht genügend Kenntnisse zur Kontrolle dieser Zellen vor. Des Weiteren ist diese Art von Nutzung von Stammzellen in der ethischen Diskussion.

Alternativ ist hier die Identifikation multipotenter Progenitorzellen in adulten Organen. Die Entdeckung und Beschreibung von unter anderem multipotenten Oligodendrozyten-Precursor-Zellen [29], pluripotenten hämatopoetischen, sich zu Hepatozyten differenzierenden Stammzellen [34] und totipotenten neuralen Stammzellen [10] in

adulten Menschen führte zu weiteren Forschungen in der Zelltherapie und Tissue Engineering.

Es zeigten sich weiterhin Hinweise, dass co-kultivierte Zellen im Beispiel von co-kultivierten nicht-parenchymatösen Leberzellen mit Hepatozyten einen positiven Einfluss auf das Überleben und die Funktion von Hepatozyten haben [21, 41].

1.2.4. Angiogenesefaktoren, Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren

Die Einbeziehung von Angiogenesefaktoren in das Design von Tissue Engineering trägt der Tatsache Rechnung, dass Zellen nur bis zu einer Distanz von 100 bis 200 µm vom versorgenden Blut oder Medium mit ausreichender Menge an Sauerstoff und nötigen Substraten über Diffusion versorgt werden können. Reize zur Expression von Angiogenesefaktoren und deren zellulären Rezeptoren sind Ischämie, Hypoxie und Entzündungen.

Als anerkannte Angiogenesefaktoren gelten unter anderem die Faktoren der FGF- (weniger spezifisch für Angiogenese) und VEGF-Familie (höhere Spezifität für Angiogenese), PDGF, HGF, die Angiopoietine, HIF-1 α IL-6, IL-8, TNF- α , Stickstoffoxid, PAF, Substanz P und Tissue Faktor.

Es wurde unter anderem in in vitro-Versuchen mit FGF und VEGF die Induktion von Kapillarisation beobachtet [47]. In einem anderen Versuch wurde die verstärkte Kapillarisation und Zellwachstum and VEGF-transfektierten Hepatozyten demonstriert, die intraperitoneal in Mäuse auf Collagen-Kugeln transplantiert wurden [4].

Die meisten Angiogenesefaktoren sind relativ unspezifisch und stimulieren auch andere Zelltypen. Um eine genauere Steuerung der Wirkstärke zu erhalten, wurden neben anderen Ansätzen rekombinant produzierte Mutationen von FGF entwickelt, die eine unterschiedliche Stärke des mitotischen Signals vermitteln [76].

Neben Fibrin-basierten Freisetzungssystemen [64] wurden auch Techniken zur Bindung und Freisetzung von Angiogenesefaktoren aus synthetischen Polymeren entwickelt [66].

Es hat sich gezeigt, dass die in den abbaubaren Matrices enthaltenen Moleküle der Lactid- und Glykolid-Familie Makrophagen zum hochregulieren der Synthese von mitoseaktiven Agonisten aktivieren und die Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten induzieren können [19].

Die genauen Interaktionen der einzelnen Wachstumsfaktoren mit Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und Proteinen der extrazellulären Matrix, sowie auch der

Differenzierungsfaktoren für die gezielte Ausreifung von Stammzellen sind weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.2.5. Bioreaktoren

Bioreaktoren werden in vielen Anwendungsbereichen sowohl in der Zelltherapie als auch beim Tissue Engineering eingesetzt, wie etwa zur Zellproduktion und –Transduktion (T-Zellen, hämatopoetische Stammzellen, neurale Stammzellen und Blutzellen, etc.), Gewebeproduktion (Knorpel, Sehnen, künstliche Bio-Haut, etc.), als funktionale extrakorporale oder implantierte künstliche Bio-Organen (Leber, Niere, urologische Gewebe, Pankreas, Blutgefäße, etc.) und als Model-Systeme zur Toxizitäts- und Effektivitätsprüfung (Cornea, Leber, etc.). Sie müssen verschiedenen Anforderungen gerecht werden, wie gleichmäßige Kontrolle der physikalisch-chemischen Umwelt (pO_2 , pCO_2 , pH, Schergeschwindigkeit, Temperatur, etc.), Möglichkeit der aseptischen Substratzufügung und Beschickung, effektive Nutzung von teuren Mediumzusätzen (Wachstumsfaktoren, Hormone, etc.), Ermöglichen von Zellmonitoring, Sicherung einer beständigen Zell- und Gewebsqualität, Kompatibilität mit den Zellen und maximal automatisierter Ablauf [45].

1.3. Leberzelltransplantation und Leberzell-Sphäroide

Als Alternative zur Transplantation von ganzen Leberorganen und zur Schaffung der Möglichkeit von Gentherapien wird die Leberzelltransplantation als möglicher Lösungsansatz gesehen [22]. Um einen Stoffwechseldefekt wie α -1-Antitrypsinmangel, Hämophilie durch Mangel an Gerinnungsfaktoren, Morbus Wilson, Crigler-Najjar-Syndrom Typ 1 oder Lipoproteinstoffwechselstörungen auszugleichen, sind laut Rattenmodell etwa 5-12 % der Leberzellmasse mit defektlosen Zellen ausreichend [7, 74].

Im Tiermodell wurden bereits frühzeitig Versuche zur Hepatozytentransplantation unternommen. 1970 beschrieben Rugstad et al. die subkutane Transplantation von Leberzellen einer Hepatomzelllinie in Bilirubin-Uridin-Diphosphat-Glucuronyltransferase-defizitären Gunn-Ratten und den darauf ansteigenden Wert für konjugiertes Bilirubin in den Ratten [60]. 1976 beschrieben Matas et al. die Leberzelltransplantation von heterozygoten Gunn-Ratten in homozygoten Bilirubin-Uridin-Diphosphat-Glucuronyltransferase-defizitären Gunn-Ratten und beobachteten ebenfalls einen Anstieg des Bilirubinstoffwechsels [42]. Kusano und Mito beschrieben das Überleben bis zu 16

Monaten von syngenem, in die Rattenmilz injizierten Rattenhepatozyten und deren lebermorphologische Strukturausbildungen [32].

Ein großes Problem besteht in dem großen Zellverlust bei der Transplantation von Zellsuspensionen. Durch den Verlust von Zell-zu-Zell-Kontakten werden Apoptosevorgänge eingeleitet [16]. Das Signal zur Apoptose wird durch das Fehlen von Extrazellulärmatrix (Anoikis) ausgelöst. Zellzusammenlagerungen von Leberepithelzellen sind in der Lage, Zell-zu-Zell-Kontakte zu knüpfen und Extrazellulärmatrix auszubilden [35].

Unter bestimmten Kulturbedingungen, wie etwa statische, nicht-adhäsive Kulturen mit positiv geladenen Kulturoberflächen, Einsatz von Proteoglykanen, Albumin und serumfreiem KulturmEDIUM [28, 35] oder Poly-Hydroxyethylmethacrylat [68], werden scharf abgrenzbare Hepatozytenaggregationen beobachtet, die in der Fachliteratur als Sphäroiden bezeichnet werden. Die Kinetiken der Sphäroid-Bildung in statischen Kulturen von Rattenhepatozyten bezüglich der Oberflächeneigenschaften der Kulturfläche, der Zelldichte in der Fläche, Sphäroidgrößenentwicklung, Sphäroidbildung und Syntheseleistungen über die Zeit, wurden von Peshwa et al. beschrieben [52]. In flussdynamischen Kulturen, wie mit Spinner Flask [30] oder durch Flusskuren [54, 70], ist bei Rattenhepatozyten eine schnellere Sphäroidbildung zu beobachten (1 – 2 Tage), als in statischen Kulturen (4 – 6 Tage). Leberzellkulturen mit Sphäroidbildung haben höhere Syntheseleistungen, wie etwa Albuminsynthese, als Leberzellen in Monolayer-Kulturen [28, 43, 52]. Bei in die Milz [62] und in das Peritoneum [23] transplantierte Ratten-Lebersphäroide in Rattenmodellen zeigten die transplantierten Sphäroide im Vergleich zu Zelltransplantationen bessere Syntheseleistungen und eine höhere Überlebensrate der Leberzellen insgesamt.

Es wurde ebenfalls eine erhöhte Resistenz von sphäroidalen Zellzusammenlagerungen gegenüber Stresseinflüssen, wie ionisierende Strahlen, Hyperthermie, photodynamische Therapie oder Topoisomerase-II-Inhibitoren, im Vergleich zu in Monolayern organisierten Zellen beschrieben [51], wofür ebenfalls ein dreidimensionaler „Kontakt-Effekt“ durch Zell-zu-Zell-Kontakte als Grund gesehen wird.

Um den Hepatozyten eine Matrix zu geben, in der sie sich in vitro ansiedeln können, dort vorkultiviert werden können, um dann mit diesem Gerüst implantiert zu werden, wurden Polymergerüste unter anderem auf Basis von Poly-L-Lactat-Säure (PLLA) entwickelt, die von Organismen abgebaut werden können [39, 48].

Sphäroidbildungen von humanen Leberzellen in statischen Kulturen mit dem Nachweis von Leberzelltypischen Syntheseleistungen wie Albumin-, Transferrin- und α -1-Antitrypsinsynthese bis zu über 4 Monate wurden von Tong et al. 1994 beschrieben [69].

1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung

Leberzelltransplantationen könnten eine Alternative zur Transplantation von kompletten Organen darstellen. Ein großes Problem ist der große Verlust an Zellen bei der Transplantation. In Rattenmodellen haben kleinere Leberzellorganisationen mit Ausbildung von Zell-zu-Zellkontakten und Extrazellulärmatrix in Form von Sphäroiden bessere Überlebens- und Syntheseraten gezeigt. Um den Zellen eine Matrix zu bieten, um sie zielgerichteter transplantieren zu können, wurden Polymere entwickelt, die von dem Empfängerorganismus zersetzt werden können.

Unsere Arbeitsgruppe hat in Vorversuchen ein geschlossenes pulsatile Fluss-Bioreaktorsystem erprobt, in dem mit Rattenhepatozyten besiedelte, abbaubare, dreidimensionale PLLA-Polymere eingesetzt wurden, und die Bildung von Sphäroiden nachgewiesen [54, 70-72]. Mit diesem Bioreaktorsystem und den Polymeren wurde die optimale Konzentration der Zellen zur Besiedelung mit Rattenhepatozyten (10×10^6 Zellen/ml) und die optimale Flussgeschwindigkeit des Mediums ermittelt (24 ml/min). In weiteren Versuchen sollten das Verhalten der Rattenlebersphäroiden nach Implantation in das Mesenterium syngener Ratten nach setzen eines Stimulus durch Zweidrittel-Hepatektomie [11] und Anlage eines portokavalen Shunters [38] beobachtet werden.

Gegenstand dieser Arbeit war es, das Kulturmodell mit diesem Flussbioreaktor und diesen PLLA-Polymeren von sphäroidbildenden Rattenhepatozyten auf Humanhepatozyten zu übertragen und auf die Bildung von Sphäroiden zu überprüfen. Es wurden Hepatozyten aus humanem Lebergewebe isoliert und diese analog zu dem Rattenhepatozytenmodell in einer Konzentration von 10×10^6 Zellen /ml mit 4×10^6 Zellen je PLLA-Polymer besiedelt. Die Zellen wurden aus nicht transplantierten Organen oder Organresten sowie aus tumorfreien Operationsresektaten mittels Kollagenaseverdau in Anlehnung an die Methoden zur Rattenhepatozytenisolation nach Seglen [65], modifiziert von Aiken et al. [3] sowie in Anlehnung an die Methoden zur Isolation von humanen Hepatozyten aus kompletten oder Splitleberorganen nach Dorko et al. [12], isoliert. Hierbei wurde auch der Isolationserfolg anhand der Gesamtzahl und Prozentsatz der vitalen Zellen dokumentiert. Es wurde festgestellt, ob sich unter den gleichen

Kulturbedingungen, wie es sich zur Ausbildung von Sphäroiden aus Rattenleberzellen als günstig erwiesen hatte, ebenfalls Sphäroiden aus humanen Hepatozyten bildeten. Die Kinetik der Sphäroidentwicklung bezüglich der Sphäroidanzahl und –größe wurde durch mikroskopische Auszählung und Ausmessung über den Zeitverlauf sowie durch quantitative DNA-Messungen über den Zeitverlauf ermittelt. Es wurden anhand von histologischer Aufarbeitung mittels HE-Färbung morphologische Merkmale erfasst und beschrieben und mit Hilfe immunhistochemischer Detektion leberspezifische Merkmale, wie den Nachweis von Albumin, α -1-Antitrypsin und Cytokeratin 18, nachgewiesen. Die Stoffwechselleistung wurde anhand der Bestimmung leberspezifischer Syntheseprodukte wie Albumin und α -1-Antitrypsin mittels ELISA-Methode sowie Harnstoff photometrisch-enzymkinetisch quantifiziert. Die Albuminsynthese in vitro wurde durch Northern-Blot für Albumin-mRNA nachvollzogen. Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Beschreibung der zellulären Mikroanatomie angefertigt.

2. Material und Methoden

2.1. Isolation der Hepatozyten

2.1.1. Zellmaterialquelle

Die humanen Hepatozyten wurden einerseits aus Operationsresektaten gewonnen, die bei Leberteilresektionen von zentral sitzenden benignen Tumoren und solitären Metastasen entbehrt werden mussten. Die Resektate mussten möglichst weit von der Organkapsel umschlossen sein und möglichst nur eine Schnittfläche mit zur Katheterisierung geeigneten Gefäßanschnitten aufweisen.

Andererseits dienten nicht transplantierte Organe als Zellmaterialquelle, die wegen Kontraindikationen, wie hochgradige Verfettung oder zerstörte Anatomie zur Transplantation nicht geeignet waren, oder das Restmaterial von größenreduzierten Spenderorganen. Auch diese Leberstücke mussten eine möglichst geringe Schnittfläche aufweisen und überwiegend umkapselt sein, um eine Perfusion bis in die kleinsten Stromgebiete zu gewährleisten. Bei Gelegenheit wurde der Lobus caudatus oder der Lobus quadratus präpariert, da diese je ein Lebersegment darstellen. Bei der Auswahl der Organe und Resektate war es wichtig, dass sie sich im guten Zustand befanden und sich keine malignen Zellen im Isolationsgebiet befanden. Auch wurde darauf geachtet, die warme Ischämiezeit so kurz wie möglich zu halten. Diese waren nur ausnahmsweise als Resektat von größenreduzierten Spenderorganen zu erhalten, hier allerdings nur mit über das Maß für Transplantationen hinaus dauernden kalten Ischämiezeiten. Bei den Operationsresektaten musste eine warme Ischämiezeit bis zu zwei Stunden in Kauf genommen werden, bis das Resektat vollständig vom Organ getrennt war.

2.1.2. Überführung der Organe in die kalte Ischämie

Benötigte Materialien:

- Custodiol® HTK (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate)
- Plastikschaale /Durchmesser 25 cm, Tiefe 10 cm)
- Crush-Eis
- Sterile Isolationsbeutel
- Glaspetrischale, sterilisiert
- Perfusorspritze 50 ml
- Katheter (Vasofix® 17 G, B. Braun, Melsungen/D; Kat.-Nr.: 04268156)

- Steriler Kunststoffbecher mit Schraubverschlussdeckel (Durchmesser 6 cm, Tiefe 10 cm)
- Kühlbox

Präparate von Spenderorganen waren, da zur Organspende vorgesehen, bereits vorher in den Zustand der kalten Ischämie überführt worden. Die Spenderorgane waren mit kalter HTK-Lösung in situ perfundiert und in Isolationsbeuteln in HTK-Lösung schwimmend auf Eis gelagert.

Präparate, die als Resektat direkt im Operationssaal gewonnen wurden, mussten erst noch in die kalte Ischämie überführt werden. Um steriles arbeiten und kalte Umgebung zu gewährleisten, wurde eine Plastischale mit Eis gefüllt und von einem sterilen Isolationsbeutel umgeben. Auf das abgeschirmte Eis wurde eine große sterilisierte Glaspetrischale gelegt. Somit war eine gekühlte Präparierfläche hergestellt. Das Leberstück wurde in der Glasschale liegend mit kaltem Custodiol gespült. Hierzu wurden mit einer Perfusorspritze mit aufgesetztem Katheter die größeren Gefäßanschnitte katheterisiert und die Lösung mit leichtem Druck so lange in die Zugänge gespült, bis klare Flüssigkeit aus dem Resektat floss. Dann wurde es in einem sterilen Becher in kalter Spüllösung schwimmend auf Eis in einer geschlossenen Kühlbox gelegt und dort bis zur Weiterverarbeitung belassen.

2.1.3. Zellisolation

Benötigte Materialien Zellisolation:

- Sterile Handschuhe
- Sterile Einmalpinzette, Polystyrol (J. Söllner, Deggendorf/D)
- Sterile Scheren
- Steriles Skalpell (Cutfix, runde Klinge, B. Braun, Melsungen/D; Kat.-Nr.: 5518059)
- Wasserbad (Julabo E 07 Typ HC-2/8)
- Laborflaschen 1 l, sterilisiert mit Deckel, Halsweite 45 mm
- Bleigewichte zum Beschweren der Flaschen
- Schlauch (Masterflex® Cole Parmer Instruments Co., Chicago/USA; Kat.-Nr.: 96400-16)
- Luftfalle (Braun, Melsungen/D)
- Verlängerungsschlauch Perfusor (Braun, Melsungen/D)
- Ansaugschlauch (Bronchialis S Absaugkatheter gerade Ch 16 = 5,3 mm Länge 60 cm, Steridan; Kat.-Nr.: 6886)
- Katheter (Vasofix® 17 G, B. Braun, Melsungen/D; Kat.-Nr.: 04268156)

- Schlauchpumpe (Cole Parmer/USA)
- Schlauchpumpenaufsatz (Cole Parmer/USA)
- Sterile Schale Edelstahl
- Werkbank Laminar Flow (Heraeus Typ HS 18/2 1996)
- Styroporbox
- Steriles Reaktionsgefäß 50 ml (Conical Tube, 50 ml, Falcon; Kat.-Nr.: 352070)
- Eppendorfröhrchen (Safe-Lock 1,5 ml, Eppendorf Netheler-Hinz GmbH Hamburg/D; Kat.-Nr.: 0030120086)
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH)
- Mikroskop Olympus CX41 (Olympus Optical Co. (Europe) GmbH)
- Neubauer Zählkammer (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 631F1110)
- Trypanblau (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 11732)
- Williams Medium E without L-Glutamine (Gibco BRL, Paisley/GB; Kat.-Nr: 22551-022)
- Hepes 100 mM (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: H-3375)
- KCl (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 1.04936)
- NaCl (J.T.Backer, Denventer /NE; Kat.-Nr.: 0278)
- NaH₂PO₄-H₂O (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 1.06346)
- α-D-Glukose (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: G 7021)
- EGTA (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: E-4378)
- HCl 1 N (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 1.09057.1000)
- CaCl (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 2386)
- Steriler Flaschenhalsfilter, 0,2 µm Porengröße (Bottle Top Filtersystem, 500 ml, w/45 mm Neck, Corning Inc. New York/USA; Kat.-Nr.: 430513)
- Kollagenase, Typ 1 (Collagenase, Type 1, Clostridium histolyticum, Code: CLS-1, Lot-Nr.: M6P731; Worthington biochemical corporation, Lakewood, New Jersey/USA)
- Aqua ddest. (Millipore®)

Der Aufbau der Apparatur sowie die Präparation erforderte zwei Personen, von der eine die sterilen Arbeiten mit sterilen Handschuhen durchführte und die andere für alle nötigen Tätigkeiten im unsterilen Bereich verantwortlich war und die der anderen Person zuarbeitete. Zur Isolation wurden die Leberstücke auf eine Größe von weniger als 300 Gramm reduziert und geeignete venöse Gefäße auf den Schnittflächen zur Katheterisierung aufgesucht. Wenn es möglich war, wurden Lebersegmente präpariert, wie der Lobus caudatus oder bei guter Ausprägung der Lobus quadratus. Die Zellisolation erfolgte nach der von Seglen et al. für die Isolation von Rattenhepatozyten eingeführten

und von Aiken et al. modifizierten Zwei-Phasen-Perfusionsmethode mit einem Kollagenaseverdau [3, 65], unter Einbeziehung der von Dorko et al. beschriebenen Besonderheiten bei der Hepatozytenisolation von humanen Hepatozyten aus kompletten oder Split-Leberorganen [12]. Hierzu wurden die Perfusionslösungen vorher in einem 40°C warmen Wasserbad erwärmt. Dieses war nötig, um in dem perfundierten Leberstück eine Temperatur von ca. 37°C zu erreichen, das Optimum für die Aktivität der Kollagenase.

2.1.3.1. Benötigte Puffer und Lösungen:

Leffert's Puffer (10 mal konzentriert), 1000 ml:

- 23,83 g Hepes 100 mM
- 2,24 g KCL
- 75,87 g NaCl
- 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$
- 18,02 g α -D-Glukose
- In 1000 ml Aqua bidest. unter Rühren lösen und in eine sterile Flasche filtrieren
- Bei 4°C lagern

EGTA-Lösung, 1000 ml:

- 1,9 g EGTA
- Auf 100 ml 10 x Leffert's Puffer
- Auf 800 ml Aqua bidest.
- Auf pH 7,4 unter Rühren einstellen
- Mit Aqua bidest. Auf 1000 ml auffüllen und in eine sterile Flasche filtrieren
- Bei Raumtemperatur lagern

CaCl_2 -Lösung, (100 mal konzentriert), 500 ml:

- 14 g CaCl_2
- In 500 ml Aqua bidest. auflösen
- In eine sterile Flasche filtrieren
- Bei Raumtemperatur lagern

2.1.3.2. Benötigte Perfusionslösungen

(am Tag der Hepatozytenisolation anzusetzen, vor Gebrauch auf 40°C im Wasserbad erwärmen):

Prä-Perfusionspuffer, 1200 ml:

- 108 ml 10 x Leffert's Puffer
- 120 ml EGTA-Lösung
- Auf 1000 ml mit Aqua bidest. auffüllen
- Auf pH 7,4 unter Rühren einstellen
- Mit Aqua bidest. auf 1200 ml auffüllen und in eine sterile Flasche filtrieren

Leffert's Puffer, 1 mal konzentriert, 1000 ml:

- 100 ml 10 x Leffert's Puffer
- Auf 800 ml mit Aqua bidest. auffüllen
- Auf pH 7,4 unter Rühren einstellen
- Mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und in eine sterile Flasche filtrieren

Kollagenase-Lösung, 300 mg/l, 1000 ml:

- 100 ml Leffert's Puffer
- 5 ml CaCl₂-Lösung
- Auf 800 ml mit Aqua bidest. auffüllen
- Auf pH 7,4 unter Rühren einstellen
- Kollagenase erst maximal 15 Minuten vor Perfusionsbeginn in die vorgewärmte Lösung geben.
- Mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und in eine sterile Flasche filtrieren
(Porengröße 0,2 µm)

2.1.3.3. Perfusionsapparatur

Die Flaschen mit den Perfusionslösungen wurden in einem Wasserbad stehend mit Bleigewichten oder Klebeband fixiert, damit diese bei sinkendem Füllungsstand nicht auftreiben. Die Wassertemperatur betrug 40°C. Ebenfalls in einem auf 40°C vorgewärmten Wasserbad wurde eine sterilisierte Edelstahlschüssel gestellt, so dass eben gerade die Standfläche im Wasser stand. So entstand eine sterile und vorgewärmte Arbeitsfläche, in der das Leberstück zur Perfusion gelegt wurde.

Mit einer Schlauchpumpe wurde die Pumpgeschwindigkeit reguliert. Als Leitungen wurden Masterflex®-Schläuche verwendet. Der zuführende Schenkel leitete die Perfusionslösung zur Pumpe. An ihm wurde eine Luftfalle installiert, um Luftembolien zu vermeiden, die eine effiziente Perfusion erschweren würden. Das Ende, welches in die Flaschen mit den Perfusionslösungen gelegt wurde, war mit einem sterilen Absaug-Katheter verbunden, und so war nur dieser sterile Teil des zuführenden Schenkels in Kontakt mit den Lösungen.

Der abführende Schenkel wurde am Ende mit einem sterilen Schlauchadapter und einem Katheter verbunden. Dieser wurde bis zum Gebrauch auf einer sterilen Arbeitsfläche abgelegt.

Die Schläuche wurden vor Gebrauch mit mindestens 300 ml 70 % Ethanol gespült, anschließend mit sterilem Wasser oder Prä-Perfusionspuffer freigespült. Dabei wurde die Pumpgeschwindigkeit kalibriert.

2.1.3.4. Perfusion des Leberpräparates

In einem ersten Perfusionsschritt wurde das Präparat für ca. 4 min mit dem vorgewärmten Prä-Perfusionspuffer mit einer Pumpgeschwindigkeit von 80 oder 100 ml/min gespült. Dazu wurden geeignete Zugänge an der Schnittfläche gewählt, die eine Perfusion bis in das kleinste Stromgebiet gewährleisteten. Optimal waren diese Zugänge, wenn die Perfusionslösung diffus aus mehreren Ausgängen an der Schnittfläche austrat.

In einem zweiten Perfusionsschritt wurde durch umstecken des zuführenden Schenkels in die entsprechende Flasche das Präparat mit vorgewärmtem Leffert's Puffer für ca. 2 min mit einer Pumpgeschwindigkeit von 80 oder 100 ml/min durch die selben Zugänge perfundiert.

In einem dritten Perfusionsschritt wurde die Kollagenaselösung in das Präparat mit initial 80 oder 100 ml/min gespült. Abhängig von der Größe und dem Fortschreiten des Gewebeverdaus wurde die Pumpgeschwindigkeit auf 80 und dann 60 ml/min reduziert. Mit zunehmender Auflösung des Gewebes sank der Widerstand und das Präparat trieb mit dem steigendem Druck immer mehr auf, so dass geringere Flussgeschwindigkeiten nötiger waren. Es wurde 12 bis 18 Minuten mit der Kollagenaselösung perfundiert. Als erstes Zeichen der Gewebsauflösung zeigte sich unter der Organkapsel eine sichtbare, leicht flockige Auflockerung des Gewebes. Später zeigte sich auch eine blasenartige Ablösung der Kapsel als Zeichen der fortgeschrittenen Gewebeauflösung, woraufhin bald die Perfusion gestoppt wurde.

2.1.3.5. Gewinnung der Zellen

Die Gewinnung der Zellen aus dem Kapselsack mit dem verdauten Gewebe fand auf einer Laminar-flow-bench unter sterilen Bedingungen statt. Ebenfalls wurde dafür gesorgt, dass das Zellmaterial direkt nach der Perfusion gekühlt wurde. Das Waschmedium und die Zellsuspensionen wurden auf Eis stehend gekühlt. Die Zentrifuge war auf 4°C vorgekühlt.

Es diente eine sterile Glaspetrischale auf Eis stehend als Präparationsfläche. Der Kapselsack der verdauten Leber wurde mit einem Skalpell eröffnet, das verbliebene Gewebe grob zerkleinert und unter ausstreichen und spülen mit gekühltem Kulturmedium ausgewaschen. Die Zellsuspension in der Präparierschale wurde mit Pipetten aspiriert und in 50 ml-Falcontubes auf Eis lagernd gefüllt. Danach wurde die Zellsuspension in drei Zentrifugationsschritten bei auf 4°C vorgekühlter Zentrifuge mit 50 G aufgereinigt, um Zelltrümmer und nicht-parenchymatöse Zellen aus der Suspension zu reduzieren. Nach den jeweiligen Zentrifugationen wurde der Überstand aspiriert und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt, das Zentrifugat wieder aufgeschüttelt und dann wieder erneut zentrifugiert. Der Überstand erschien danach klar durchsichtig.

2.1.3.6. Zählen der Zellen und Erreichen der Zielzellkonzentration

Der Isolationserfolg wurde neben der Gesamtanzahl vor allem an dem prozentualen Anteil vitaler Hepatozyten gemessen. Als erfolgreich galt eine Isolation bei einem Anteil von mindestens 80% vitaler Hepatozyten.

Um den Isolationserfolg quantitativ zu erfassen wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit einem Zählfeld nach Neubauer gezählt und deren prozentuale Vitalität durch anfärben mit Trypan-blau bestimmt. Zu 800 µl Kulturmedium wurden 100 µl Zellsuspension und 100 µl Trypan-blau-Lösung gefüllt (Verdünnung der Zellsuspension um den Faktor 10). Dieser Ansatz wurde leicht geschüttelt und unter das Deckglas auf der Neubauerzählkammer pipettiert. Die Zellmembranen der vitalen Zellen sind für den blauen Farbstoff nicht durchlässig. Tote oder geschädigte Zellen nehmen den Farbstoff auf und erschienen unter dem Lichtmikroskop deutlich blau angefärbt. Es wurden in vier Zählfeldern die vitalen und nicht-vitalen Zellen ausgezählt, der Durchschnitt errechnet und die prozentuale Vitalität bestimmt.

Die Zielkonzentration betrug 10×10^6 vitaler Zellen pro ml. Nach erneutem zentrifugieren wurde das Volumen durch abpipettieren des Überstandes um die entsprechende errechnete Menge korrigiert.

Formel: $\text{Volumen alt (ml)} \times \text{Konzentration alt} / 10^7 = \text{Volumen neu (ml)}$.

2.2. Kultur der Hepatozyten

Die Hepatozyten wurden auf einem porösen dreidimensionalen Polymer ausgesiedelt und in einem geschlossenen Flusskultursystem bei 37°C kultiviert.

2.2.1. Das Kultursystem

Benötigte Materialien Kultursystem:

- Pumpeinheit (Quad Pumpsystem; Cellmax, Cellco Inc., Germantown/USA)
- Reservoirflaschen 500 ml
- Flaschenaufsatz
- Flowpathmodul (Cellmax, Cellco Inc, Germantown/USA, Kat.-Nr.: 5010006)
- Kulturkammer, Spezialanfertigung (Cellco Inc., Germantown/USA)
- Schlauchspirale, Silikon
- Dreiwegehahnsystem (Dicofix®-3, B. Braun Melsungen/D; Kat.-Nr.: 4095111)
- Adapter mit Injektionsmembran
- Sterile Einmalpinzette, Polystyrol (J. Söllner, Deggendorf/D)
- PLLA-Polymere
- Inkubationsschrank, Typ B5060 EC/CO₂ (Heraeus, Hanau/D)

Das Kultursystem besteht aus einer Pumpeinheit, einer Reservoirflasche, dem Flaschenaufsatz mit zu- und abführendem Schenkel, einem Flowpathmodul und der Kulturkammer (Abbildung 2). Am abführenden Schenkel war ein Dreiwegehahnsystem zwischengeschaltet, an dessen dritten Ausgang eine Membran zum punktieren für die Probenentnahmen angebracht wurde. Es stellte so ein geschlossenes System dar, in dem das Kulturmedium pulsierend in einer Flussrichtung zirkulierte. Die Polymere mit den Zellen wurden in einem spiralig geschnittenem Silikonschlauch mit einer sterilen Pinzette in die Rillen gesteckt und so senkrecht zur Fließrichtung in die Kulturkammer gelegt, bevor das System langsam mit 300 ml gekühltem Kulturmedium gefüllt wurde. Bei gefülltem Kultursystem befanden sich 200 ml in der Reservoirflasche und 100 ml in dem Schlauchsystem und der Kulturkammer. Eine Pumpeinheit erlaubte die Bestückung mit vier Kultursystemen (Abbildung 3). Eine so mit Zellen bestückte Pumpeinheit wurde daraufhin in einen Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert und so langsam erwärmt.

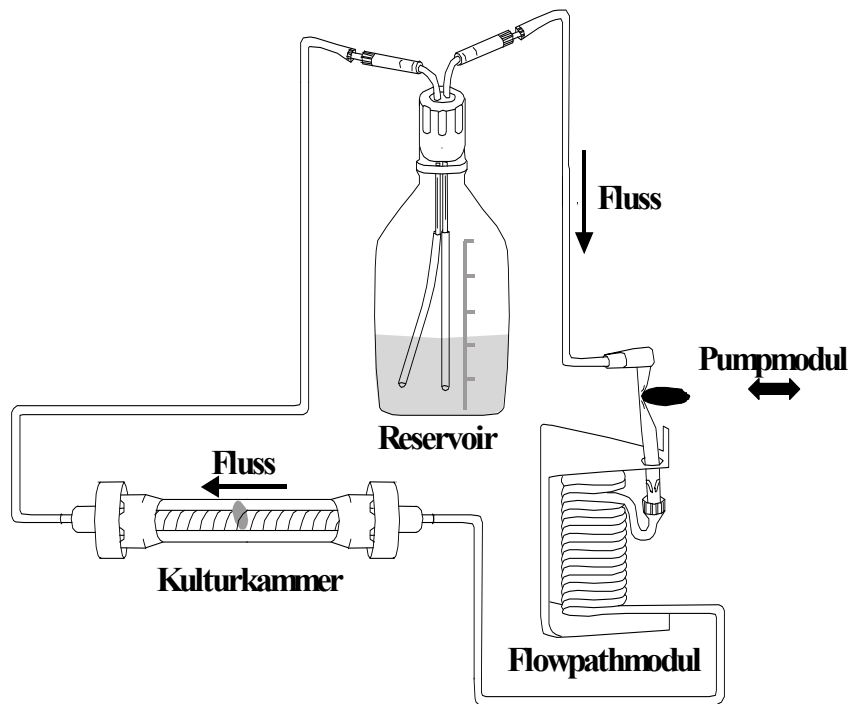


Abbildung 2: Schematische Zeichnung des Aufbaus des Flussbioreaktor-Systems. Innerhalb der zylindrischen Kulturkammer des Flussbioreaktors wurden die besiedelten Polymere mittels einer Silikonspirale orthogonal zum Flussvektor gehalten. Die Silikonschläuche, welche die Kulturkammer mit dem Mediumreservoir und der Pumpe verbinden, ermöglichen den Gasaustausch. Das gesamte Bioreaktorsystem, einschließlich der Pumpe, die ein pulsatile Flussmuster produziert, befindet sich in einem Zellkulturbrutschrank. (Graphik angefertigt von Frau Monika Thiel; Graphikabteilung UKE)



Abbildung 3: Pumpeinheit mit 4 Pumpmodulen. Die Pumpeinheit ist mit einem Kultursystem, bestehend aus dem Flowpathmodul, der Kulturkammer und der Reservoirflasche bestückt. Die Polymere mit den Hepatozyten werden in einem spiralig zugeschnittenen Silikonschlauch steckend in die zylindrische Kulturkammer eingebracht und das System wird mit Kulturmedium befüllt.

2.2.2. Das Kulturmedium

Benötigte Materialien hormonstimuliertes Medium (HSM):

- Williams Medium E without L-glutamine, 500 ml (Gibco BRL, Kat.-Nr.: 22551-022)
- N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine, 50 ml (Biochrom KG; Seromed R; Kat.-Nr.: K0203)
- HEPES – Buffer 1M, 100 ml (Biochrom; Seromed R; Kat.-Nr.: L1613)
- Sodium Pyruvat 1mM, 100 ml (Gibco BRL; Kat.-Nr.: 11360-039)
- Insulin 4 µg/ml aus Rinderpancreas (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: I-5500)
- EGF 10 ng/ml human (Invitrogen, Paisley/UK; Kat.-Nr.: 1127679)
- Dexamethason 5 nM (Serva, Heidelberg/D; Kat.-Nr.: 18660)
- Pen-Strep (Penicillin + Streptomycin, 1%) (Biochrom, Berlin/D; Kat.-Nr.: A2213)

Zur Kultur der Hepatozyten wurde hormonstimuliertes Williams Medium E (HSM) verwendet.

Hormonstimuliertes Williams Medium E:

- 500 ml Williams Medium E without L-glutamine
- 5,5 ml N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine
- 11 ml HEPES – Buffer (1M)
- 5,5 ml Sodium Pyruvat (1mM)
- 100 µl Insulin (4µg/ml)
- 100 µl EGF (10 ng/ml)
- 50 µl Dexamethason (5 nM)
- 5,5 ml Pen-Strep (Penicillin + Streptomycin, 1%)

2.2.3. Die Polymere

Die als Matrix zur Zellaussiedelung verwendeten Polymere wurden von Prof. Dr. Ma von der Dental School, University of Michigan, nach der Salt leaching Methode hergestellt [39]. Sie bestehen aus einer Poly-L-Lactidsäure-(PLLA)-Matrix und können vom Organismus vollständig abgebaut werden. Die Polymere haben einen Durchmesser von 1,8 cm und eine Dicke von 1 mm. Die Porengröße beträgt 200 bis 400 µm und es besteht 95 % Porösität. Die Polymere wurden mit wässriger Poly-Venyl-Alkohollösung 1% beschichtet und mit Ethylenoxid sterilisiert.

2.2.4. Besiedeln der Polymere

Benötigte Materialien Polymerbesiedelung:

- Sterile Werkbank Laminar Flow (Typ HS 18/2, Heraeus Instruments, Hanau/D; Kat.-Nr.: 50047467)
- PLLA-Polymere
- Mikropipette 200 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Mikropipettenspitzen, sterilisiert (Einmalpipetten 200 µl, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Petrischale 100 x 15 mm (Falcon; Kat.-Nr.: 4-1029/3)
- Schale mit zerstoßenem Eis

Die Besiedelung der Polymere fand auf der Laminar-flow-bench unter sterilen Bedingungen statt. Es wurde jedes Polymer mit 4×10^6 Zellen, entsprechend 400 µl der Zellsuspension, in vier Durchgängen zu 100 µl mit einer Pipette besiedelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Hepatozyten zu erreichen (Abbildung 4). Dabei befanden sich die Polymere in einer sterilen Petrischale, die auf Eis stand.

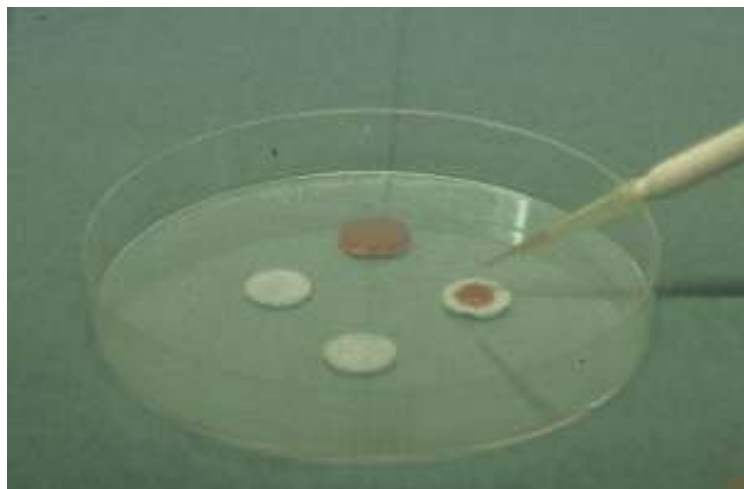


Abbildung 4: Die Hepatozyten wurden in hormonstimuliertem Williams Medium E suspendiert. Mit einer Pipette, wurden vier mal 100 µl dieser Zellsuspension homogen auf die hoch porösen PLLA-Scheiben aufgetragen. Hier ist die Besiedelung der Polymere zur Demonstration ohne die Lagerung auf Eis dargestellt.

2.2.5. Mediumwechsel und Mediumprobenentnahme

Benötigte Materialien:

- Wasserbad 37°C
- Hormonstimuliertes Williams Medium E (HSM)

- Einmalpritze 5 ml, steril (B. Braun, Melsungen/D; Kat.-Nr.: 4606051)
- Kanüle, steril (Sterican® Einmalkanülen, Insulin-Farbcode: braun, G.: 26 x ½, B. Braun, Melsungen/D; Kat.-Nr.: 4665457)
- Eppendorfröhrchen (Safe-Lock 1,5 ml, Eppendorf Netheler-Hinz GmbH Hamburg/D; Kat.-Nr.: 0030120086)

Während der Kulturdauer wurde alle zwei Tage in ein partieller Mediumaustausch vorgenommen, um einerseits für eine Abfuhr von Stoffwechselprodukten und andererseits für frisches Substrat und neuen hormonellen Stimulus zu sorgen. Da sich ein Drittel des Mediums in den Schläuchen und der Kulturkammer befand, und die Zellen bei Austausch des Mediums nicht unnötig belastet werden sollten, wurde nur das Medium in der Reservoirflasche ausgetauscht, welches zwei Drittel des gesamten Mediums entsprach. Das neue Medium wurde zuvor in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Es wurden durch Punktion des Membranstückes an dem Dreiwegehahn mit einer Kanüle mit aufgesetzter Spritze Mediumproben entnommen, um die Stoffwechselleistung über den Zeitverlauf zu prüfen. Jeden Tag wurden 3 mal 1 ml Medium entnommen. Am Tag des partiellen Mediumwechsels wurden 5 mal 1 ml Proben entnommen. Anschließend wurde mindestens eine halbe Stunde nach dem Austausch mit der Entnahme der erneuten Nullprobe (3 mal 1 ml) gewartet um eine Mischung des frischen Mediums mit dem in den Schläuchen und der Kammer verbliebenen Rest abzuwarten. Die Mediumproben wurden in autoklavierte Eppendorfröhrchen gefüllt und bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt.

2.2.6. Entnahme der Polymere und mikroskopische Auswertung

Benötigte Materialien:

- Sterile Werkbank Laminar flow
- Sterile Einmalpinzette, Polystyrol (J. Söllner, Deggendorf/D)
- Sterile Petrischale 100 x 15 mm (Falcon; Kat.-Nr.: 4-1029/3)
- Hormonstimuliertes Williams Medium E (HSM)
- Sterile Pipetten 10 ml (Serologische Pipette 10 ml, Falcon; Kat.-Nr.: 356551)
- Pipettierhilfe (Pipetus Akku, Hirschmann Laborgeräte)
- Messokular (Typ WH10X2-H, Olympus Optical Co., Hamburg/D)
- Phasenkontrastmikroskop (Typ IX50, Olympus Optical Co., Hamburg/D)
- Kryo-Röhrchen (CryoTube, Nalge Nunc Int., Napperville/USA; Kat.-Nr.: 366656)
- Tissuetek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude /NE, Kat.-Nr.: 4583)
- Kryo-Wells

Die Polymere wurden nach einer vorher definierten Zeit entnommen. Dazu wurde das Medium unter der Laminar-flow-bench langsam durch öffnen der Kulturkammer abgelassen. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Polymere aus der Kammer geholt und in eine Petrischale gelegt. Die Polymere wurden mit 10 bis 12 ml warmen HSM bedeckt. Unter einem Phasenkontrastmikroskop wurde dann beurteilt, ob sich die Hepatozyten zu Sphäroiden organisiert haben. Diese wurden dann gegebenenfalls gezählt. Als Zählfeldeinheit wurde das Blickfeld bei einer zehnfachen Vergrößerung definiert. Das Polymer wurde in zwei senkrecht zueinander stehenden Linien durchsucht. Dabei wurde jede Tiefenebene mit dem Feintrieb des Mikroskop abgesucht. Es wurde dann der Durchschnitt aus allen Zählfeldern gebildet. Als Sphäroid galt eine Zusammenlagerung von Zellen, welche sich in einer scharfen runden Phasenkontrastlinie einheitlich zum flüssigen Medium abgegrenzt haben. Von zehn willkürlich ausgewählten Sphäroiden wurden mit einem Messokular die Durchmesser bestimmt. Die Sphäroide wurden durch das Mikroskop exemplarisch fotografiert.

Die Polymere wurden direkt in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert oder in Tissuetek[®] eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Präparate wurden bis zur histologischen Aufarbeitung bei -30°C gelagert.

2.3. Messung der Stoffwechselleistung der kultivierten Hepatozyten

Um eine Aussage über die Funktion der Hepatozyten während der Kulturzeit zu erhalten, wurden für Hepatozyten spezifische Stoffwechselleistungen überprüft. Dazu wurden die Syntheseprodukte Albumin, α -1-Proteinaseinhibitor und Harnstoff quantitativ aus dem Kulturmedium bestimmt.

2.3.1. Messung von Albumin im Kulturmedium

Die quantitative Bestimmung von Albumin im Kulturmedium wird durch ELISA-Technik (Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay) bestimmt. Das Prinzip dieser Technik besteht darin, dass eine mit Antikörper gegen Humanalbumin beschichtete Mikrotiterplatte das in dem Medium befindliche Albumin bindet, welches in einem weiteren Schritt mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper markiert wird. Die Peroxidase setzt ein Substrat um, dessen Produkt fotometrisch gemessen und zu einer Standardreihe bezogen werden kann.

2.3.1.1. Zusammensetzung der Puffer und Reaktionslösungen

Benötigte Materialien:

- Na_2CO_3 (Merck, Kat.-Nr.: 6395.0050)
- NaHCO_3 (Merck, Kat.-Nr.: 6329.500)
- Sodium Azid (Sigma, Kat.-Nr.: S 8032)
- NaCl (Merck, Kat.-Nr.: 1.0 6404.0500)
- NaH_2PO_4 (Aldrich, Kat.-Nr.: 33,198-8)
- Na_2HPO_4 (Merck, Kat.-Nr.: 1.06586.0500)
- KCl (Merck, Kat.-Nr.: 1.04933.0500)
- Tween-20 (Merck, Kat.-Nr.: 1.09280.0100)
- Na-Citrat (Sigma, Kat.-Nr.: S 4641)
- NaF (Merck, Kat.-Nr.: 1.06450.0100)
- Gelatine, Typ B, 75 Bloom (Sigma, Kat.-Nr.: G 6650)
- Goat IgG Fraction to human Albumin (ICN Cappel Research, Kat.-Nr.: 55109; 2 ml)
- Purified human Albumin (ICN Cappel Research, Kat.-Nr.: 55912; 50 mg)
- Peroxidase conjugated goat IgG fraction to human Albumin (ICN Cappel Research, Kat.-Nr.: 55235; 2 ml)
- ABTS (Sigma, Kat.-Nr.: A 9941)
- H_2O_2 30% (Merck, Kat.-Nr.: 1.08597.1000)
- Steriler Flaschenhalsfilter, 0,2 μm Porengröße (Bottle Top Filtersystem, 500 ml, w/45 mm Neck, Corning Inc. New York/USA; Kat.-Nr.: 430513)
- Mikrotiterplatten (96-Well-Platten, Nunc Maxi-Sorb; Nunc, Kat.-Nr.: 439454)
- Deckel für 96-Well-Platten (Nunc, Kat.-Nr.: 263339)
- Mylar Sealing Tape (Sigma, Kat.-Nr.: T 2162)
- Multikanalpipettierhilfe, 8 Kanäle (Finnpipette Biokontrol 300 μl , Labsystems)
- Brutschrank 37°C, 5 % CO_2 (Typ B5060 EC/ CO_2 , Heraeus, Hanau/D)
- Fotometer (Dynatech, MR 5000)

Pufferlösungen:

Beschichtungspuffer (0,05 M Karbonat):

- 1,59 g Na_2CO_3 (15 mM)
- 2,93 g NaHCO_3 (35 mM)
- 0,2 g Sodium Azid

- in 1000 ml Aqua dest. lösen und auf pH 9,6 einstellen
- Kann bei 4°C aufbewahrt werden

Waschpuffer (PBS-Tween 0,5%):

- 8,00 g NaCl (137 mM)
- 0,20 g NaH₂PO₄ (1.5 mM)
- 1,41 g Na₂HPO₄ (8,1 mM)
- 0,20 g KCl (2,7 mM)
- 5 ml Tween-20 (0,5%)
- in 1000 ml Aqua dest. lösen auf pH 7,4 einstellen
- Frisch anzusetzen

Substratpuffer (Citrat-Phosphat):

- 12,80 g Na-Citrat (61 mM)
- 19,90 g Na₂HPO₄ (77 mM)
- in 1000 ml Aqua dest. lösen und auf pH 5,0 einstellen
- in sterilisierte Flasche filtrieren
- Kann bei 4°C aufbewahrt werden

Stopplösung (0,32% Natriumfluorid):

- 3,20 g NaF
- in 1000 ml Aqua dest. lösen
- Kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden
- Lösung muss gesondert entsorgt werden

Blocklösung, Stock (10 % Gelatine):

- 10 g Gelatine, Typ B, 75 Bloom
- in 100 ml Aqua dest. lösen
- Aliquots zu 10 ml
- Kann bei 4°C aufbewahrt werden

Reagenzien und Arbeitsverdünnungen (frisch anzusetzen):

Beschichtungs-Antikörper-Lösung (10 µg/ml in 0,05 M in Karbonatpuffer):

Goat IgG Fraction to human Albumin (unkonjugierter Antikörper)

- gelöst in 2 ml Aqua dest.; Aliquots zu 50 µl (-20°C).

Für eine Platte werden 10 ml Antikörperlösung benötigt. Die Antikörperkonzentration im 50 µl-Aliquot beträgt 8 mg/ml.

- Verdünnung: 1:20 $\Rightarrow$ 25 µl Antikörperlösung aus Aliquot zu 475 µl Carbonatpuffer geben (für zwei Platten) oder 950 µl Carbonatpuffer zum Aliquot geben (für vier Platten)
- Weitere Verdünnung: 1:40 $\Rightarrow$ Je Platte 1 x 250 µl der 1:20-Verdünnung zu 9,75 ml Carbonatpuffer geben.

Blocklösung (1 % Gelatine in Waschpuffer)

Für eine Platte werden 40 ml Blocklösung benötigt

- Stocklösung in Wasserbad (37° C) schmelzen
- 4 ml 10%-ige Stocklösung mit 36 ml Waschpuffer verdünnen

Albumin Standard (50 ng/ml in Waschpuffer), purified human Albumin

Die Albuminkonzentration im 100 µl-Aliquot beträgt 15,1 mg/ml

- Verdünnung: 1:15 $\Rightarrow$ 50 µl vom Aliquot in 700 µl Waschpuffer verdünnen
- 1:100 $\Rightarrow$ 100 µl aus 1:15 Verdünnung in 10 ml Waschpuffer verdünnen
- 1:200 $\Rightarrow$ 100 µl aus 1:100 Verdünnung in 20 ml Waschpuffer verdünnen

Sekundärantikörperlösung (1:1000 in Waschpuffer)

Peroxidase conjugated goat IgG fraction to human Albumin

- gelöst in 2 ml Aqua dest.; Aliquots zu 50 µl (-20°C)

Für eine Platte werden 11 ml verdünnte Peroxidase-konjugierte-Antikörper-Lösung benötigt

- Verdünnung: 1:20 $\Rightarrow$ 950 µl Waschpuffer zum Aliquot (für 4 Platten) oder in 450 µl Waschpuffer 25 µl Antikörper-Aliquot pipettieren (für 2 Platten)
- 1:25 $\Rightarrow$ Je Platte 225 µl aus 1:20 Verdünnung in 11 ml Waschpuffer geben

Substratlösung (0,5 mg/ml ABTS und 0,01% H₂O₂ in Substratpuffer)

Für eine Platte werden 10 ml Substratlösung benötigt

- Eine 10 mg Tablette ABTS in 20 ml Substratpuffer lösen.
- Lösung vor Licht schützen.
- Die Tablette für mindestens eine halbe Stunde unter gelegentlichem Schütteln auflösen lassen.
- 6,6 µl H₂O₂ 30% kurz vor Gebrauch hinzu pipettieren.

Die Mikrotiterplatten mussten mit 100 µl je Well der Beschichtungs-Antikörper-Lösung mit einer Multikanalpipette befüllt werden und dann unter Versiegelung mit Mylar Sealing Tape über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden die Platten drei mal gewaschen. Danach konnten sie direkt weiterverwendet werden oder sie wurden gefüllt mit Waschpuffer eine Woche lang versiegelt bei 4°C gelagert.

Die Platten wurden ausgeschlagen und mit 300 µl Blocklösung je Well pipettiert und abgedeckt für 30 Minuten bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert und danach gewaschen.

In die Platten wurden 100 µl Waschpuffer in alle Wells pipettiert. In vorher bestimmten Wells wurde paarig die Albuminstandardreihe zu 100 µl pipettiert, angefangen mit einer Konzentration von 50 ng/ml, dann eine Reihe in 1:2-Verdünnungen bis zu einer Verdünnung der Ausgangskonzentration von 1:64. In ein paariges Well wurde 100 µl Waschpuffer als Leerwert pipettiert. Die übrigen Wells wurden paarig mit den eventuell vorverdünnten Mediumproben versehen. Die Platte wurden abgedeckt, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach gewaschen.

In alle Wells wurden 100 µl der Sekundärantikörperlösung pipettiert, die Platte wurde abgedeckt, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach gewaschen.

Die Platte wurde mit je 100 µl Substratlösung bestückt, abgedeckt und für 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde in jedes Well 100 µl der Stoplösung pipettiert. Bei der Standardreihe und den Albuminhaltigen Proben hatte eine Farbreaktion stattgefunden. Nun mussten die Proben rasch gemessen werden.

Allgemeines zum Waschvorgang:

Platte mit 250 µl Waschpuffer beschichten (8-Kanal-Pipette). Dann Platte über Waschbecken forciert umstürzen. Platte umgedreht lassen und auf Fleecepapier ausklopfen. Insgesamt drei mal wiederholen.

2.3.1.2. Messen und Auswerten des Albumin-Asseys

Die Mikrotiterplatten wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm und Referenzwellenlänge von 492 nm fotometrisch gemessen. Von den Rohextinktionswerten wurde der mittlere Leerwert abgezogen und die mittleren Extinktionen der Proben in Bezug zur mittleren Standardkurve gesetzt. Die Auswertung der Messung erfolgte durch ein Computerprogramm (Microwin2000). Die Standardkurve wurde durch eine Regressionsgerade ermittelt.

Die Messung der einzelnen Proben galt bei positiver Farbreaktion der Standardreihe mit einer Extinktion von mindestens 1,000 für den höchsten Wert in der Reihe als gültig.

Außerdem musste die Standardgerade einen Korrelationskoeffizient von mindestens 0,98 aufweisen. In der Doppelbestimmung der Werte wurde ein Variationskoeffizient von 5 toleriert. Die Proben durften keine höhere Extinktion als die des höchsten Wertes der Standardreihe aufweisen und auch nicht mit dem Leerwert gleichwertig sein.

2.3.2. Bestimmung von α -1-Proteinaseinhibitor im Kulturmedium

Das Testprinzip entsprach dem des Albumin-Assays und wurde mit der ELISA-Technik durchgeführt. Verwendet wurde hier ein komplettes Kitsystem zur quantitativen Bestimmung von α -1-Antitrypsin im Kulturmedium. Die Mikrotiterplatte war bereits mit einem Primärantikörper beschichtet. Zusätzlich wurde eine im Kit enthaltene Positivkontrolle mitgemessen. Die Proben sowie die Kontrollen und Standards wurden in Doppelbestimmung gemessen.

Benötigte Materialien

- α -1-Antitrypsin ELISA-Kit (Immundiagnostik AG, D-64625 Bernsheim; Kat.-Nr.: K6750)
- Fotometer (Dynatech, MR 5000)

2.3.2.1. Vorbereitung der Reagenzien

Das Waschpufferkonzentrat wurde vor Gebrauch 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt. Die lyophilisierten Standards und Kontrollen wurden mit 1000 μ l destilliertem Wasser rekonstruiert und mindestens zehn Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen in Lösung gebracht. Der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper wurde 1:100 in Waschpuffer verdünnt (100 μ l Antikörperkonzentrat zu 10 ml Waschpuffer)

2.3.2.2. Durchführung des α -1-Proteinaseinhibitorassays

Vor Gebrauch war die Mikrotiterplatte zu waschen.

Danach wurden paarig 100 μ l der eventuell vorverdünnten Proben sowie der Standards und Kontrollen in die Wells pipettiert. Eine Doppelvertiefung wurde zur Leerwertbestimmung mit Waschpuffer gefüllt. Die Platte wurde eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und gewaschen.

Danach wurde die Platte je Vertiefung mit 100 μ l der Sekundärantikörperlösung pipettiert, 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und gewaschen.

In jede Vertiefung wurden 100 µl von der TMB-Substratlösung (Tetramethylbenzidin) pipettiert. Es entstand in Inkubation bei Raumtemperatur eine blaue Farbreaktion. Nach 10 bis 20 Minuten, entsprechend der Farbreaktion, wurde 50 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettiert. Es folgte sofort ein Farbumschlag von blau zu gelb. Die Proben mussten sofort fotometrisch gemessen werden.

2.3.2.3. Messen und Auswerten des α -1-Proteinaseinhibitorassays

Die Mikrotiterplatten wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm und Referenzwellenlänge von 690 nm fotometrisch gemessen. Von den Rohextinktionswerten wurden der mittlere Leerwert abgezogen und die mittleren Extinktionen der Proben in Bezug zur mittleren Standardkurve gesetzt. Die Auswertung der Messung erfolgte durch ein Computerprogramm (Microwin2000). Die Standardkurve wurde mit der Four-Parameter-Funktion ermittelt.

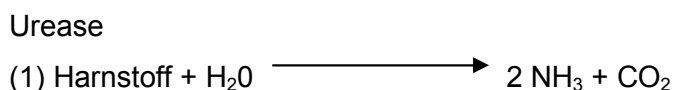
Die Messung der einzelnen Proben galt bei positiver Farbreaktion der Standardreihe als gültig. In der Doppelbestimmung der Werte wurde ein Variationskoeffizient von 5 toleriert. Die Proben durften keine höhere Extinktion als die des höchsten Wertes der Standardreihe aufweisen und auch nicht mit dem Leerwert gleichwertig sein. Die Positivkontrolle musste sich in dem vom Hersteller angegebenen Toleranzbereich befinden.

2.3.3. Messung von Ammoniak und Harnstoff im Kulturmedium

Zur Messung von Ammoniak und Harnstoff wurde ein Testkit verwendet, in dem eine Anleitung zur Durchführung und die entsprechenden Reagenzien in den gebrauchsfertigen Konzentrationen und Mengen vorlagen.

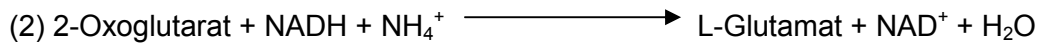
2.3.3.1. Prinzip der Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff

Das Testprinzip beruht auf der fotometrischen Messung von NADH vor und nach enzymatischer Umsetzung, wobei Ammoniak als zusätzliches Substrat dient. Ammoniak wird bei der Spaltung von Harnstoff durch Urease frei. Je Molekül Harnstoff entstehen zwei Moleküle Ammoniak. Die Testreaktionen werden mit folgenden Reaktionsgleichungen veranschaulicht:



In einem zweiten Reaktionsschritt setzt Ammoniak 2-Oxoglutarat mit Hilfe von Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) und reduziertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) als Ko-Enzym zu L-Glutamat und NAD^+ um.

GIDH



Die in der Reaktion verbrauchte Menge NADH ist äquivalent der Ammoniakmenge oder der halben Harnstoffmenge. Sämtliche Substrate sind im Überschuss vorhanden, um zu gewährleisten, dass sämtliches Ammoniak umgesetzt wird. NADH ist die Messgröße, die fotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt wird.

Da in dem Kulturmedium neben Harnstoff auch Ammoniak in wesentlichen Mengen vorlag, wurde Ammoniak zusätzlich separat ohne vorhergehende Ureasespaltung (Reaktion (1)) bestimmt. Dieser Ammoniak-Anteil wurde dann bei der Harnstoffbestimmung herausgerechnet.

2.3.3.2. Durchführung des Tests zur Ammoniak-/Harnstoffbestimmung

Benötigte Materialien:

- UV-Test zur Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak (Boehringer Mannheim/R-Biopharm; Kat.-Nr.: 0542946)
- Küvetten (Einmalküvetten 2,5 ml Makro, Plastibrand, Brand; Kat.-Nr.: 759005)
- Wasserbad 80°C
- Rührspatel
- Zentrifuge (Heraeus Minifuge T; Kendro Laboratory Products)
- Aqua bidest. (Millipore®)
- Fotometer (Shimadzu UV 160 A recording Spectrophotometer ; Shimadzu Europa GmbH)
- Pipette 1000 µl, 200 µl und 20 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg/D)

Für jede zu bestimmende Probe wurde in einer Küvette eine Tablette NADH (Inhalt: ca. 0,4 mg NADH) in 1 ml Triethanolaminpuffer (pH ca. 8,0; Inhalt: 220 mg 2-Oxoglutarat) gelöst. Dazu wurde die Mediumprobe mit einem Volumen von 0,1 ml bis 2 ml gegeben. Vorher wurden die tiefgefrorenen Proben für 15 Minuten in einem Wasserbad bei 80°C gebadet, um eventuell vorhandene Enzyme zu denaturieren. Danach wurden die Proben

bei 5000 Umdrehungen pro Minute für drei Minuten zentrifugiert. Die Küvette wurde mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt. Eine Leerwertbestimmung musste bei jedem Messansatz mitgeführt und ohne Gabe von Mediumprobe angesetzt werden. Wenn die Harnstoffmenge bestimmt werden sollte, wurden 20 µl der Ureaselösung (Inhalt: ca. 80 U Urease in 0,7 ml) in die Küvette hinzupipettiert und der Reaktion fünf Minuten Zeit gelassen. Ansonsten werden die Proben mit einem Rührspatel vorsichtig gemischt, die Küvettenwände von Luftblasen befreit und die erste Extinktion (E1) fotometrisch gemessen.

Danach wurde in jede Küvette 20 µl der GIDH-Lösung (Inhalt: ca. 1000 U GIDH in 1,2 ml) pipettiert. Unter gelegentlichem Mischen mit dem Rührspatel wurde bis zum Stillstand der Reaktion 20 Minuten gewartet und die zweite Extinktion bestimmt (E2).

2.3.3.3. Berechnung der Ammoniak-/Harnstoffkonzentration

Für die Proben und den Leerwert wurden die jeweiligen Extinktionsdifferenzen (E1 – E2) berechnet und die Extinktionsdifferenz des Leerwertes abgezogen (ΔE).

$$(3) \Delta E = (E1 - E2)_{\text{Probe}} - (E1 - E2)_{\text{Leerwert}}$$

Es gilt die allgemeine Berechnungsformel für die fotometrische Bestimmung der Konzentration:

$$(4) c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]
 v = Probevolumen [ml]
 MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]
 d = Schichtdicke [cm]
 ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm = 6,3 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Für die Berechnung von Harnstoff für 0,1 ml Probenvolumen gilt entsprechend:

$$(6) c = \frac{3,040 \times 60,06}{6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 2 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Harnstoff}}$$

Für die Berechnung von Ammoniak für 0,1 ml Probenvolumen gilt entsprechend:

$$(7) \ c = \frac{3,020 \times 17,03}{6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Ammoniak}}$$

Bei einem anderen Probenvolumen als $v = 0,1$ ml musste dieses entsprechend in der Formel berücksichtigt werden. Abschließend wurde das Ergebnis um die Anzahl der im Kultursystem mit Hepatozyten besiedelten Polymere korrigiert, um eine direkte Vergleichbarkeit herzustellen.

2.4. Messung des DNA-Gehaltes der besiedelten Polymere

Die Messung des DNA-Gehaltes der besiedelten Polymere sollte zum einen überprüfen, ob die Polymere konstant mit der gleichen Zellmenge erfolgreich besiedelt wurden, und zum anderen aufzeigen, ob im Verlauf eine Zunahme der Zellmenge durch Zellteilung aufgezeigt werden kann.

2.4.1. Testprinzip der DNA-Bestimmung

Der DNA-Gehalt wurde mit der DyNA-Quant-Methode quantifiziert [33]. Die DNA wird mit Bisbenzimid (Hoechst 33258), einem fluoreszierendem Stoff, markiert und dann photometrisch mit dem DyNA Quant 200 Fluorometer gemessen. Es emittiert Licht der Wellenlänge von $365 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ und misst bei $460 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$. Damit werden selbst geringe DNA-Mengen bei hoher Kontamination durch Proteine und RNA gemessen.

2.4.2. Puffer und Lösungen

Benötigte Materialien:

- DyNA Quant 200 Fluorometer (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA)
- Glasfluometriküvette (Amersham Pharmacia Biotech; Kat.-Nr.: 80622744)
- Bisbenzimid, Hoechst dye H33258 (molekular Probes, Eugene/USA; Kat.-Nr.: H3969)
- EDTA (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: ED2SS)

- NaCl (J.T. Baker, Deventer/Holland; Kat.-Nr.: 0278)
- Tris-HCl (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: T-3253)
- Proteinase K (Gibco BRL, Scotland/UK; Kat.-Nr.: 25530-049)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: I-5750)
- Kälberthymus-DNA-Standard (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: D-0805)
- Aqua bidest. (Millipore®)
- Lyophyllisator (Lyovac GT2, Leybold-Heraeus)
- Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel/D, Typ 1083)
- Vortex-Mixer (Certomat MV, Braun Biotech Int., Melsungen/D; Kat.-Nr.: 88602/8)
- Parafilm (American National Can)
- Steriler Flaschenhalsfilter, 0,2 µm Porengröße (Bottle Top Filtersystem, 500 ml, w/45 mm Neck, Corning Inc. New York/USA; Kat.-Nr.: 430513)

H33258 Dye Lösung:

- 10 mg H33258 (Hoechst dye H33258)
- 10 ml destilliertes gefiltertes Wasser

TNE-Puffer (10 × konzentriert):

- 12,11 g Tris ($C_4H_{11}NO_3$)
- 3,72 g EDTA
- 116,89 g NaCl
- 800 ml bidestilliertes Wasser
- pH 7,4
- mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
- Steril filtern

Calf-Thymus DNA-Standard (100 µg/ml):

- 100 µl Calf-Thymus DNA-Standard, 1 mg/ml
- 100 µl 10 × TNE-Puffer
- 800 µl destilliertes gefiltertes Wasser

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

- 10 µl der H33258 Dye Lösung
- 10 ml 10 × TNE-Puffer
- 90 ml destilliertes gefiltertes Wasser

Proteinase K Verdaulösung:

- 0,5 mg/ml Proteinase K
- 0,1 mg/ml SDS
- in einem Puffer aus:
 - 50 mM Tris-HCl
 - 1 mM EDTA
 - 0,2 M NaCl
 - pH 7,5

2.4.3. Vorbereitung der Proben

Die Polymere wurden bei -80°C in 1,5 ml Nunc-Röhrchen gelagert. Vor dem eigentlichen DNA-Verdau wurden die Polymere gefriergetrocknet (lyophilisiert). Die Deckel wurden von den Kryoröhrchen abgeschraubt, die Öffnung mit Parafilm überspannt und dieses perforiert. Dabei durften die Polymere nicht auftauen. Über Nacht wurden die Proben im Lyophilisator gefriergetrocknet. Danach wurden die Röhrchen wieder mit Deckeln verschlossen und bei -80°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

Es wurde zu jedem Polymer ein Milliliter der Proteinase K Lösung gegeben. Die verschlossenen Röhrchen wurden für mindestens 10 Stunden bei $55-60^{\circ}\text{C}$ schüttelnd inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Proben mindestens drei mal geschüttelt.

2.4.4. DNA-Assay

Das Fluorometer (DyNa-Quant 200 Fluorometer) wurde mindestens 15 Minuten vor der ersten Messung eingeschaltet. Vor jeder Messung wurde das Gerät auf einen Nullwert kalibriert. Zwei Milliliter der Assay-Lösung wurden in die Messküvette pipettiert und diese als Nullwert gemessen.

Vor den Messungen der Proben wurde das Gerät auf eine DNA-Konzentration von 200 ng/ml kalibriert. Vier Mikroliter der Calf-Thymus DNA-Standard Lösung wurden in die zwei Milliliter der Assay-Lösung pipettiert und das Gerät daraufhin kalibriert. Der lineare Messbereich liegt laut Herstellerangaben im Bereich 10 bis 500 ng/ml. Der erhaltene Messwert wurde in der Einheit DNA-ng/ml gemessen.

Nach jedem Messvorgang wurde die Glasküvette zwei mal mit destilliertem Wasser gespült. Die Probenmenge wurde so gewählt, dass das Ergebnis zwischen 20 und 500

ng/ml lag. Das gewählte Probenvolumen wurde dann bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt.

2.5. Histologische Aufarbeitung

Um eine Vorstellung von der Morphologie und Charakteristik der kultivierten Hepatozyten zu erhalten, wurden exemplarisch von den kultivierten Hepatozyten feingewebliche Gefrierschnitte angefertigt, und diese mit verschiedenen Methoden und unter unterschiedlichen Aspekten gefärbt.

Für den Überblick über die Morphologie wurden die Gefrierschnitte mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dargestellt. Um Charaktereigenschaften der Hepatozyten nachzuweisen wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt, mit denen ein bestimmtes, den Hepatozyten eigenes Antigen qualitativ nachgewiesen wurde. Als Gegenkontrolle wurde Vimentin, das Markerantigen für Gewebe mesenchymalen Ursprungs, verwendet, um festzustellen, ob in den Sphäroiden Gewebe nichtepithelialen Ursprungs vertreten war. Um eine möglicherweise vorhandene Zellteilungsaktivität festzustellen, wurde auch auf das Antigen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) untersucht.

2.5.1. Anfertigen der Gefrierschnitte

Benötigte Materialien:

- Kryotom (Microm, Walldorf/ D, Typ HM505E)
- Kryotom-Klingen (Microtome Blades, C35 Type, Feather, Japan)
- Superfrost® Objektträger (Mentzel-Gläser, D, Kat.-Nr.: 041300)

Die Gewebe und die kultivierten Polymere wurden in Tissue-Tek® in Kryowells eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und daraufhin bei mindestens –20°C gelagert. Die Gefrierblöcke wurden dann mit einem Kryotom mit auswechselbarer Klinge bei –20 bis –26°C auf eine Schichtdicke von 5 µm geschnitten und auf einen Glasobjektträger kurz angetaut. Die angefertigten Schnitte wurden bis zur Weiterverwendung in Aufbewahrungsboxen bei mindestens –20°C gelagert.

2.5.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt die Standardfärbung in der Histologie dar und eignet sich zur Darstellung der Morphologie von Gewebe im Dünnschnitt sowohl für Paraffin- als auch Kryopräparate. Zellkerne stellen sich bläulich dar, während sich der zytoplasmatische Anteil der Zelle rötlich färbt.

Benötigte Materialien:

- Azeton (Biesterfeld, Hamburg/ D; Kat.-Nr.: 67-64-1)
- Aqua dest.
- Mayer's Häkalaun (Sigma, St. Louis/ USA; Kat.-Nr.: MHS-32)
- Wässrige Eosinlösung 0,1 % (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 1.159335)
- 100% Ethanol (Ethanol abs., Apotheke UKE, Hamburg/D; Kat.-Nr.: 94119100)
- Rotihistol® (SDS, Valdonne/ F, Kat.-Nr.: 0750021)
- Entellan® (Merck, Darmstadt/D; Kat.-Nr.: 1.07961.0100)
- Deckglas (24 × 60 mm, No. 1, Marienfeld, D; Kat.-Nr.: 8500)

2.5.2.1. Durchführung der HE-Färbung

- Die tiefgefrorenen Gewebeschnitte über Nacht bei Raumtemperatur auftauen und trocknen
- Fixierung für 2 Minuten in Aceton
- In Aqua dest. kurz spülen
- Bad in unverdünntem Häkalaun für 6 – 8 Minuten
- In Aqua dest. kurz spülen
- Bad in fließendem Leitungswasser für mindestens 10 Minuten (Bläuen)
- Bad in Eosinlösung für 5 Minuten
- Bad in 80 % Ethanol für 2 Minuten
- Zweimalig Bad in 96% Ethanol für 2 Minuten
- Zweimalig Bad in 100% Ethanol für 2 Minuten
- Zweimalig Bad in Rotihistol® für 2 Minuten
- Blasenfrei eindecken mit Entellan® und Deckglas
- Einen Tag trocknen lassen und Lagerung unter Lichtabschluss

2.5.3. Immunhistochemische Färbungen

Die kryokonservierten Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch mit der Avidin/Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode) gefärbt, bei der an einem mit Biotin markiertem Primär- oder Sekundär-Antikörper mit Hilfe von Avidin ein Enzym angelagert wird. Es wurden Peroxidase und alkalische Phosphatase (AP) benutzt. Diese Enzyme setzen ein Substrat um, welches in einer Farbreaktion das zu bestimmende Antigen anzeigt. Die optimale Vorverdünnungen der Primärantikörper waren vom Hersteller vorgegeben, in Form von Fertiglösungen (Ready to use) bereits vorverdünnt oder mussten in Vorversuchen durch Titration des besten Signal-Hintergrundfärbungs-Verhältnisses ermittelt werden.

Benötigte Materialien:

- PBS-Puffer (Phosphate buffered Saline, pH 7,4, 0,01 M, ad 1000 ml Aqua dest.; Sigma; Kat.-Nr.: P-3813)
- Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector, Kat.-Nr.: SP-2001)
- ABC-AP Kit (Vectastain® ABC Kit, Alkaline Phosphatase Mouse IgG; Vector; Kat.-Nr.: AK-5002)
- Anti-Albumin-Antikörper (Monoclonal anti human Albumin, Clone HSA-11; Sigma, Kat.-Nr.: A 6684)
- Anti- α -1-Antitrypsin-Antikörper (α -1-Antitrypsin, human, Ms/Clone n/a, IgG 2b, prediluted, 5 ml, Biotrend Chemikalien GmbH, Kat.-Nr.: 9 0640 5456)
- Anti-Zytokeratin-Antikörper (Cytokeratin 18 (DC 10), Mouse monoclonal IgG 1, 200 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology; Kat.-Nr.: sc-6259)
- Anti-Vimentin-Antikörper (Mouse anti Vimentin V9, ready to use; Dako; Kat.-Nr.: N 1521)
- Substrat Kit (Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; Vector; Kat.-Nr.: SK-5100)
- Tris-HCl-Puffer (Histoprime® 100mM Tris-HCl-Puffer pH 8,2, 200 ml; Linaris Biologische Produkte, Kat.-Nr.: ESA5104)
- Levamisol (Levamisole Solution, 18 ml; Vector; Kat.-Nr.: SP 5000)
- Mayer's Hämalun (Sigma, St. Louis/ USA; Kat.-Nr.: MHS-32)
- Aquatex (Merck, Darmstadt/D, Kat.-Nr.: 1.08562)
- Deckglas (24 × 60 mm, No. 1, Marienfeld, D; Kat.-Nr.: 8500)

Zusätzlich benötigte Materialien PCNA-Färbung:

- Methanol (Sigma, Steinheim/D; Kat.-Nr.: 53401-3)
- PBS-Puffer (Phosphate buffered Saline, pH 7,4, 0,01 M, ad 1000 ml Aqua dest.; Sigma; Kat.-Nr.: P-3813)

- H₂O₂ 30% (Merck, Kat.-Nr.: 1.08597.1000)
- Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector, Kat.-Nr.: SP-2001)
- PCNA Kit (Zymed® PCNA Staining Kit; Zymed® Laboratories Inc, San Francisco, USA; Kat.-Nr.: 93-1143)
- Aquatex (Merck, Darmstadt/D, Kat.-Nr.: 1.08562)
- Deckglas (24 × 60 mm, No. 1, Marienfeld, D; Kat.-Nr.: 8500)

2.5.3.1. Durchführung der ABC-AP-Färbung

Die Schnitte wurden mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Sie wurden für eine Minute in Aceton bei Raumtemperatur fixiert und danach direkt in PBS-Puffer überführt. Es folgte die Blockierung des lebereigenen Biotins durch eine jeweils 15-minütige Inkubation mit Avidin und Biotin mit PBS-Spülungen zwischen den Schritten. Zur weiteren Bearbeitung wurde ein Avidin-/Biotinkomplex-alkalische-Phosphatase Kitsystem (ABC-AP Kit) verwendet. Die Schnitte wurden 20 Minuten mit einer Normalserumlösung gegen unspezifische Antikörperbindung blockiert und der Überschuss nur abgeklopft. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 Minuten mit anschließendem fünfminütigem Waschschrift in PBS.

Die Antikörperkonzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt, um das günstigste Signal-Hintergrundfärbungsverhältnis zu erhalten. Als Negativkontrollgewebe wurde Biopsiematerial humanen Muskelgewebes verwendet.

Verwendete Verdünnungen der Primärantikörper:

Anti-Albumin-Antikörper, Verdünnung: 1:5000

Anti-α-1-Antitrypsin-Antikörper, Verdünnung: direkt

Anti-Zytokeratin 18-Antikörper, Verdünnung: 1:500 – 1:1000

Anti-Vimentin-Antikörper, Verdünnung: direkt.

Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde 30 Minuten inkubiert und anschließend für fünf Minuten in PBS gewaschen. Während dieser Inkubation wurde das ABC-AP-Reagenz angemischt und mindestens für eine halbe Stunde ruhen gelassen. Das ABC-AP-Reagenz wird für 30 Minuten inkubiert mit nachfolgendem fünfminütigen Waschschrift in PBS. Das Substratgemisch wurde kurz vor Gebrauch angesetzt und vor Licht geschützt. Verwendet wurde ein alkalische-Phosphatase-Substrat Kit, deren Zusätze in 5 ml Tris-Puffer verdünnt werden. Dem Substratgemisch wurden 2 Tropfen Levamisol zugefügt, um

die lebereigene alkalische Phosphatase zu blockieren. Nach 20 bis 30-minütiger lichtgeschützter Inkubation mit der Substratlösung wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte für sechs bis acht Minuten in Mayers Hämalaunlösung. Es wurde anschließend für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und die fertig gefärbten Präparate bis zur Eindeckung mit Aquatex® und Deckgläschen in destilliertem Wasser belassen.

2.5.3.2. Durchführung der PCNA-Färbung

Die Schnitte wurden mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Sie wurden für eine Minute in Aceton bei Raumtemperatur fixiert und danach direkt in PBS-Puffer überführt. Die lebereigene Peroxidase wurde durch ein zehnminütiges Bad in ein bis drei prozentiger H_2O_2 -Lösung in Methanol blockiert. Mit zwischenzeitlichen Waschschritten von fünf Minuten in PBS wurde das lebereigene Biotin durch je 15-minütige Inkubation mit Avidin und Biotin blockiert. Zur Färbung wurde ein Kitsystem verwendet. Nach dem Blockierungsschritt gegen unspezifische Antikörperbindungen von 10 Minuten folgte die Inkubation für 30 Minuten mit dem biotinyliertem Primärantikörper. Die Schnitte wurden gewaschen und für zehn Minuten mit der Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Es wurde erneut gewaschen und die Schnitte für zwei bis fünf Minuten mit der DAB-Lösung inkubiert, die nach Kit-Anleitung hergestellt wird. Danach wurde die Lösung für 30 Sekunden in PBS getaucht, bis die Schnitte sich blau färbten und dann in destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für ein bis zwei Minuten mit der Kit-eigenen Hämatoxylinlösung. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser gewaschen und für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und gegen Austrocknung bis zur Eindeckung mit Aquatex® und Deckgläschen in destilliertem Wasser verwahrt.

2.6. Fotografieren der Zellkultur und der histologischen Schritte unter dem Mikroskop

Benötigte Materialien:

- Mikroskop: Olympus CX41
- Objektive: 10 x, 40 x
- Okular: 20 x
- Kamera: Olympus Camedia, Digital Camera, C – 5050 Zoom

Es wurden exemplarisch Präparate mikroskopiert und durch das Mikroskop digital fotografiert.

2.7. Northern Blot Analyse für humane Albumin mRNA

Dankenswerterweise durchgeführt von M.-R. Burda, Heinrich-Pette-Institut, Universität Hamburg.

Am Ende der Flußkultur Phase waren die Hepatozyten-Polymere aus der Flusskulturkammer des Bioreaktors entnommen und in Kryoröhrchen (Nunc) bei -80°C aufbewahrt worden. Die Gesamt-RNA wurde aus den Hepatozytensphäroiden aus dem Polymer unter Verwendung eines TriPure-Isolationsreagenz (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers extrahiert. 10 μg Gesamt-RNA wurden auf jede Bahn eines Formaldehyd-1%-Agarose-Gels aufgetragen und unter Anwesenheit von 0.5 μg Ethidiumbromid mittels Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend fand ein Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N Amersham, Little Chalfont, UK) durch Standard Upstream-Methode statt und die RNA wurde mit ultraviolettem Licht auf der Membran fixiert. Die Membran wurde in einem Hybridisationsglaszylinder überführt und mit einer DIG Easy Hyp (Boehringer Mannheim) für 60 Minuten bei 42°C prähybridisiert. Für die Detektion von Albumin mRNA wurde die Membran 14 Stunden lang bei 42°C mit einer vorbereiteten Lösung aus Readiprime (Amersham) und ^{32}P -markiertem dCTP (Hartmann, Braunschweig) und 50 bis 100 ng cDNA (hergestellt von M.-R. Burda, Heinrich-Pette Institut, Universität Hamburg) hybridisiert. Anschließend wurde die Membran aus dem Hybridisationszylinder entnommen und 3 mal mit 0.1 x SSC (standard saline citrate) Puffer und 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate) bei 68°C gewaschen und dann auf einem Phosphorimager exponiert (Fujix BAS 2000 TR Fuji, Japan).

2.8. Elektronenmikroskopie

Dankenswerterweise durchgeführt von K. Siebert, Pathologisches Institut, Universität Hamburg.

Für sowohl Raster- als auch Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Polymer-Hepatozytensphäroid-Proben bei 4°C in 3% Glutaraldehyd in 0.1 M Phosphatpuffer fixiert. Die Proben wurden dann mit 0.1 M Phosphatsaccharose über Nacht gewaschen und mit 1% Osmiumtetroxid (OsO_4) in 0.1 M Phosphatsaccharose postfixiert. Die Proben wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (35% bis 100% Äthanol) dehydriert.

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Proben mittels eines Kritischen-Punkt-Trockners getrocknet und auf Probenhalter aufgebracht. Die Proben wurden mit Gold auf einen Sputter Coater beschichtet (BioRat, SEM Quoting System, Richmond, California, USA). Die beschichteten Proben wurden in einem Desikkator bis zum Zeitpunkt der Betrachtung unter Rasterelektronenmikroskopie aufbewahrt. Zur Elektronenmikroskopie wurde ein Zeiss DSM 940 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie mussten die Hepatozytensphäroide aus der Polymer-Matrix herausgelöst werden. Dazu wurde folgende Technik angewandt: Die vorbereiteten Proben wurden 2 mal für 10 Minuten in Propylenoxyd bei 4°C inkubiert. Es schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 U/min an. Der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde für eine Stunde in 1:1 (v/v) Mischung aus Epon (Serva, Heidelberg, Deutschland) und Propylenoxyd inkubiert und dann zentrifugiert. Diese Prozedur wurde mit einer Inkubation in 1:3 (v/v) Epon/Propylenoxyd und dann in 100% Epon wiederholt. Anschließend fand eine Polymerisation bei 60°C für 24 Stunden statt. Die polymerisierte Probe wurde mittels Ultra-Dünnschnitt-Technik mit einem Ultra-Cut E (Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland) geschnitten und mit Uranylacetat und Bleiacetat gefärbt. Die Proben wurden dann mittels Transmissionselektronenmikroskopie (Philips CM 100, Kassel, Deutschland) betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation humaner Hepatozyten

Es wurden 16 Versuche der Isolation von humanen Hepatozyten unternommen. Als Quelle für die Zellen dienten acht Reste größenreduzierter Transplantatorgane, vier wegen Kontraindikationen wie Organverfettung oder zerstörter Anatomie abgelehnte Spenderorgane und vier Operationsresektate bei Tumoroperationen (Tabelle 3.1.).

Die Isolationsergebnisse reichten von einer Zahl isolierter vitaler Zellen von weniger als 100000 Zellen bis $9,9 \times 10^{12}$ Zellen und es zeigte sich somit ein recht unterschiedlicher Isolationserfolg. Die Vitalität der isolierten Zellen lag im Mittel bei 74% bei Werten zwischen 60 und 89%.

Es war nur bei zehn Isolationen möglich, die Vitalitätsgrenze von 80 % für eine weitere Zellkultur zu erreichen. Für die weiteren Kulturen wurden teilweise aus Mangel an benötigten Materialien, vornehmlich PLLA-Polymeren, geeignete Zellsuspensionen nicht in die Zellkultur gebracht. In einem Falle wurde eine Vitalität von 76% bei gutem Isolationserfolg zur Vorbedingung für eine weitere Zellkultur toleriert (Tabelle 3.1.).

Tabelle 3.1. Übersicht über die Isolationsergebnisse von humanen Hepatozyten mit Angabe des Zellursprungs, der Zahl der isolierten vitalen Zellen, der prozentualen Vitalität und anschließender Durchführung einer Zellkultur.

Isolation	Ursprung	Zahl vitaler Zellen	Vitalität	Systeme/Polymere/Kulturdauer
17.06.2000	Transplantat größenreduziert	670000000	80%	8 Syst./4 Pol./6 Tage
17.01.2001	OP-Resektat Rectum-Ca	180000000	87%	4 Syst./4 Pol./8 Tage
29.01.2001	Transplantat Nierentumor Spender	>100000	60%	keine Kultur
03.04.2001	OP-Resektat Hämangiom	216000000	88%	4 Syst./4 Pol./8 Tage
24.04.2001	Transplantat Fettleber	150000000	81%	8 Syst./4 Pol./8 Tage
14.05.2001	Transplantat Fettleber	75000000		Keine Kultur
11.07.2001	OP-Resektat Rectum-Ca	250000000	83%	8 Syst./2 Pol./14 Tage
10.09.2001	Transplantat größenreduziert Gallengang verletzt	12000000	76%	5 Syst./3 Pol./8 Tage
08.11.2001	Transplantat Fettleber	170000000	82%	8 Syst./4 Pol./8 Tage Vital. 82%
06.02.2002	Transplantat größenreduziert	324000000	82%	6 Syst./2 Pol./12 Tage
29.04.2002	Transplantat größenreduziert	9900000000000	62%	Keine Kultur
12.06.2002	Transplantat größenreduziert	10000000000	86%	4 Syst./2 Pol./8 Tage
15.06.2002	Transplantat größenreduziert Kind	4000000000	89%	4 Syst./2 Pol./8 Tage
27.06.2002	Transplantat größenreduziert	250000000	65%	Keine Kultur
19.12.2004	Transplantat größenreduziert	52000000	72%	Keine Kultur
01.02.2005	OP-Resektat Hepatogenes Adeno-Ca	150000000	81%	Keine Kultur
Mittelwert:			74%	
Standardabweichung:			0,1932	

3.2. Kultur von humanen Hepatozyten im geschlossenem Flusskultursystem

Es wurden die Hepatozyten aus zehn Isolationen direkt nach Isolation im geschlossenem Flusskultursystem inkubiert. Die Ausgangsvitalität dieser Isolationen lag zwischen 76 % und 89%, im Mittel bei 83 % (Tabelle 3.2.). Es folgte alle zwei Tage die Polymerentnahme aus einem System, um unter dem Phasenkontrastmikroskop zu sehen, ob sich die

Hepatozyten zu Sphäroiden zusammengelagert haben. Die Sphäroide zeigten sich als einheitlich scharf abgegrenzte, kugelförmige Aggregate von Hepatozyten (Abbildung 5).

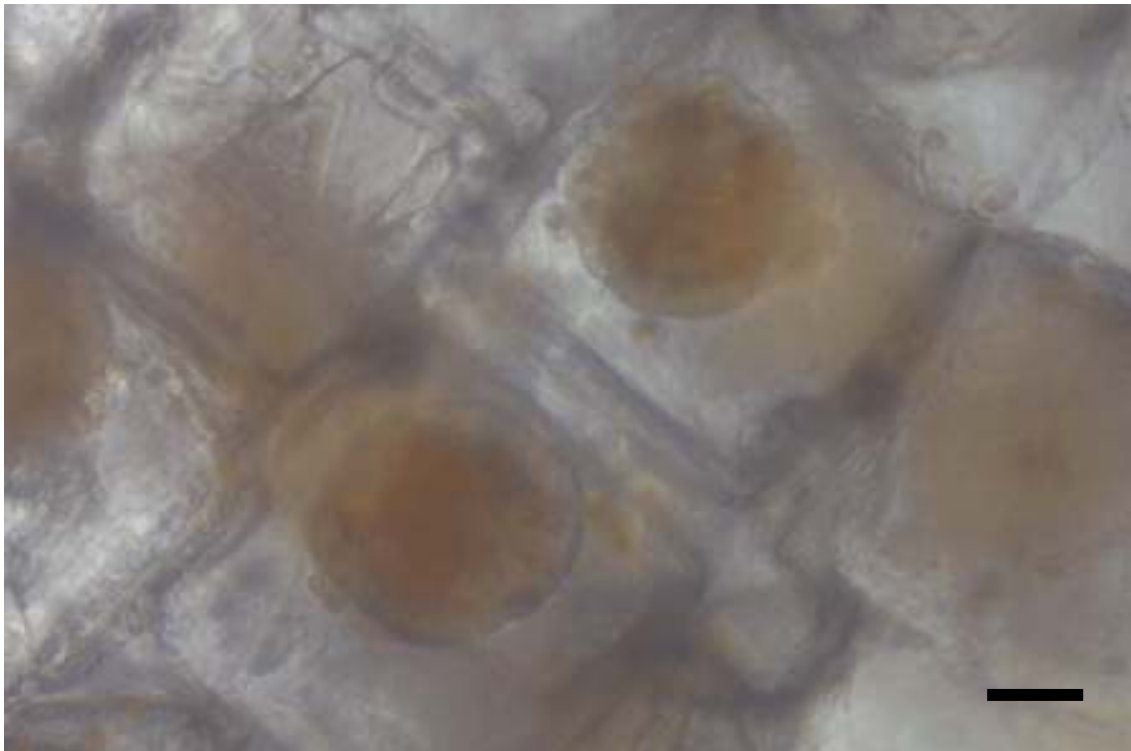


Abbildung 5: Phasenkontrastmikroskopie von humanen Hepatozyten auf PLLA-Scheiben nach 6 Tagen in Flusskultur. Die Hepatozyten haben Sphäroide innerhalb der Poren des Polymers ausgebildet. Originalvergrößerung 50 x. Der Meßbalken zeigt 50 µm an.

Tabelle 3.2. Übersicht über die Bildung von Sphäroiden in der Flusskultur

Isolation	Bildung von Sphäroiden	Vitalität	Systeme/Polymere/Kulturdauer
17.06.2000	ja	80%	8 Syst./4 Pol./6 Tage
17.01.2001	ja	87%	4 Syst./4 Pol./8 Tage
03.04.2001	ja	88%	4 Syst./4 Pol./8 Tage
24.04.2001	nein	81%	8 Syst./4 Pol.
11.07.2001	ja	83%	8 Syst./2 Pol./14 Tage
10.09.2001	nein	76%	5 Syst./3 Pol./8 Tage
08.11.2001	ja	82%	8 Syst./4 Pol./8 Tage
06.02.2002	ja	82%	6 Syst./2 Pol./12 Tage
12.06.2002	nein	86%	4 Syst./2 Pol./8 Tage
15.06.2002	nein	89%	4 Syst./2 Pol./8 Tage
Mittelwert:		83%	
Standardabweichung:		0,0406	

Es zeigten sich in sechs von zehn Kulturansätzen allesamt ab dem vierten Tag in der Flusskultur Sphäroidbildungen, die bis zum achten Tag unverändert bleiben (Tabelle 3.2.). Am zweiten Tag zeigten sich Zusammenlagerungen der Hepatozyten, die noch keine

einheitliche Abgrenzungen zum Kulturmedium zeigten. Ab dem zehnten Tage zeigten sich in den beiden Ansätzen, die über acht Tage hinaus in Kultur gehalten wurden, in der Phasenkontrastmikroskopie Konfluenzen der einzelnen Sphäroide und deutliche Auflösungserscheinungen der Sphäroidstruktur, so dass sich der Phasenwechsel zwischen Zellkulturmedium und der Zellzusammenlagerung als Ganzes nicht mehr abgrenzen ließ, sondern sich die Umrisse der einzelnen Zellen in loser Zusammenlagerung zeigten. Diese Verbände wurden nicht in der Zählung der Sphäroide aufgeführt. Es ist denkbar, dass sich der Sphäroidverband ab dem zehnten Tag in Flusskultur wieder aufzulösen beginnt. In den danach folgenden Tagen finden sich in den Waben des Polymers vermehrt lose Zusammenlagerungen.

Zum Vergleich der Besiedelungseffektivität und der Effektivität der Sphäroidbildung wurden die Sphäroide der einzelnen Polymere in zwei Querdiametern gezählt (Tabelle 3.3).

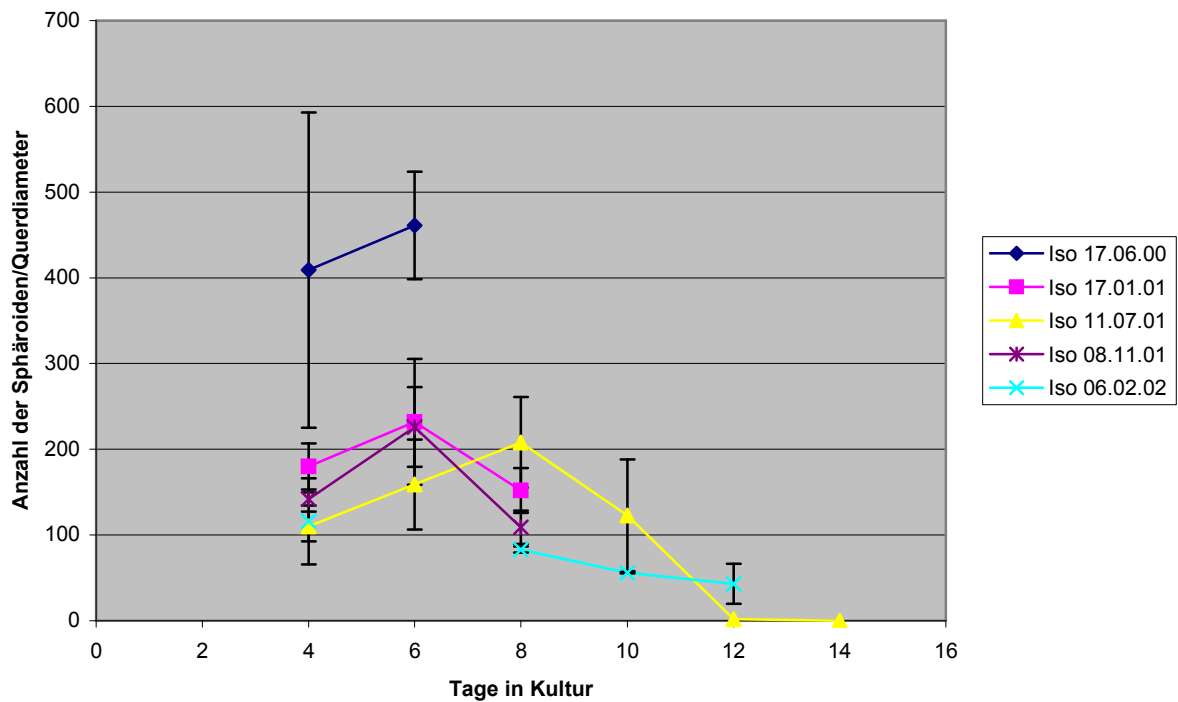
Wie die graphische Darstellung der Anzahl der Sphäroide der einzelnen Kulturansätze veranschaulicht (Diagramm 3.1.), ist ein Maximum der erkennbaren Sphäroidenzahl am sechsten bis zum 8. Tage mit danach deutlich abfallender Tendenz zu erkennen.

Tabelle 3.3. Übersicht über die Anzahl der Sphäroide in zwei Querdiametern je Polymer der einzelnen Kulturansätze

		Isol. 17.06.00 (Sphäroide/ 8 Sichtfelder)	Isol. 17.01.01 (Sphäroide/ 8 Sichtfelder)	Isol. 03.04.01 (Sphäroide/ 8 Sichtfelder)	Isol. 11.07.01 (Sphäroide/ 8 Sichtfelder)	Isol. 08.11.01 (Sphäroide/ 8 Sichtfelder)	Isol. 06.02.02 (Sphäroide/ 8 Sichtfelder)
Tag 4	längs	612	145	keine	127	145	81
	quer	567	210	Zählung	113	136	152
	längs	243	187		86	136	
	quer	167	181		115	152	
	längs	321					
	quer	270					
	längs	646					
	quer	446					
	MW	409	180,75		110,25	142,25	116,5
Tag 6	Stbw	183,962729	26,91		17,31	7,76	50,20
	längs	384	316	keine	187	161	Keine
	quer	484		Zählung	214	240	Zählung,
	längs	415	205		140	234	da zu wenig
	quer	380	177		95	271	Zellen
	längs	499					ausgesiedelt
	quer	459					
	längs	529					
	quer	540					
Tag 8	MW	461,25	232,67		159	226,5	
	Stbw	62,6184592	73,51		52,49	46,58	
	längs		116	keine	172	106	45
	quer		152	Zählung	170	123	40
	längs		168		283	126	
	quer		174		208	84	
	MW		152,5		208,25	109,75	42,5
	Stbw		26,04		52,80	19,29	3,54
Tag 10	längs				85		56
	quer				55		57
	längs				197		
	quer				158		
	MW				123,75		56,5
	Stbw				65,23		0,71
Tag 12	längs				0		27
	quer				0		60
	längs				2		
	quer				9		
	MW				2,75		43,5
	Stbw				4,27		23,33
Tag 14	längs				0		
	quer				0		
	längs				0		
	quer				0		

Abkürzungen: MW= Mittelwert, Stbw=Standardabweichung, Isol.=Isolation. Anmerkung: Für den Kulturansatz vom 03.04.2001 wurde keine Zählung durchgeführt. Die Polymere, die am Tag 6 nach der Isolation am 06.02.2002 entnommen wurden, waren fehlerhaft mit Hepatozyten besiedelt worden und hatten zu wenig Zellen erhalten.

Diagramm 3.1. Übersicht über die Anzahl der Sphäroide in zwei Querdiametern je Polymer der einzelnen Kulturansätze in graphischer Darstellung



Zu der Fragestellung, ob sich die Größe der Sphäroide über die Kulturzeit im Sinne eines Wachstums oder einer Schrumpfung ändert, wurden die Durchmesser von zehn zufällig ausgewählten Sphäroiden gemessen. Wie die Tabelle 3.4. und 3.5. zeigen, variieren die Durchmesser der einzelnen Isolationen und innerhalb der einzelnen Polymere sehr stark miteinander. Die graphische Darstellung im Diagramm 3.2. veranschaulicht deutlich, dass kein eindeutiger Trend in Richtung Wachstum oder Schrumpfung auszumachen ist.

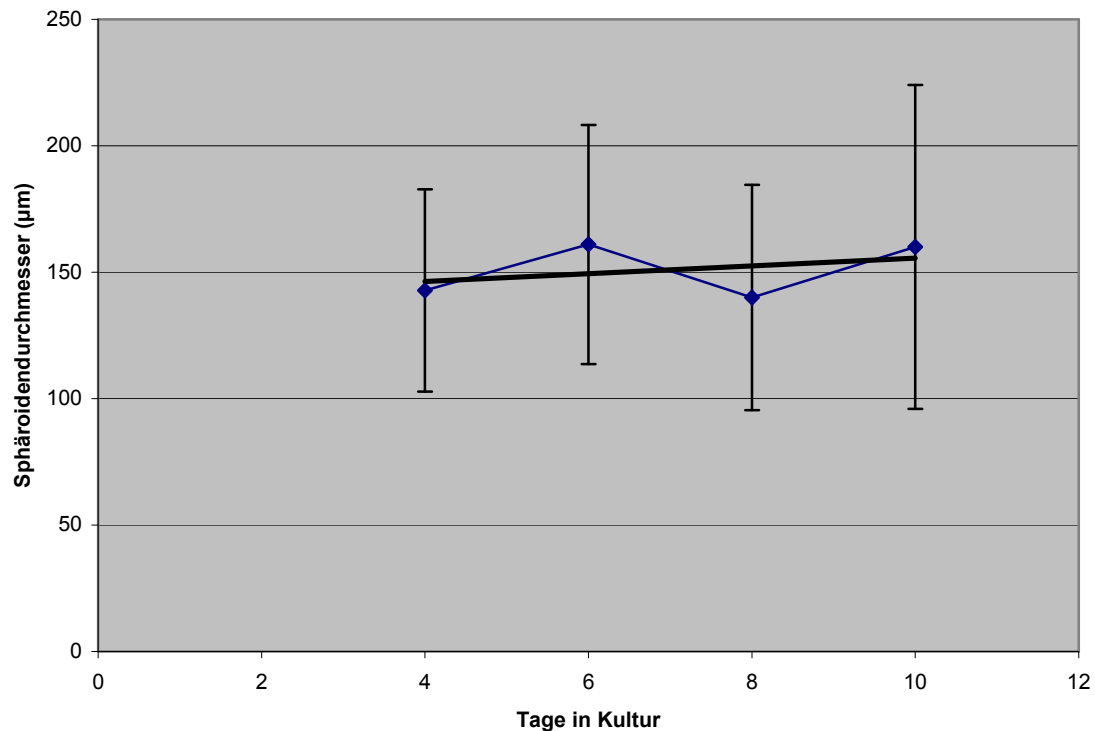
Tabelle 3.4. Übersicht über die Durchmesser der Sphäroide während der Flusskultur

	Isol. 17.06.00 Durchmesser Sphäroide (µm)	Isol. 17.01.01 Durchmesser Sphäroide (µm)	Isol. 03.04.01 Durchmesser Sphäroide (µm)	Isol. 11.07.01 Durchmesser Sphäroide (µm)	Isol. 08.11.01 Durchmesser Sphäroide (µm)	Isol. 06.02.02 Durchmesser Sphäroide (µm)
Tag 4	170	Keine	Keine	100	120	200
	100	Messung	Messung	110	120	150
	50			120	150	160
	180			90	130	190
	200			100	160	170
	140			80	200	130
	220			130	120	100
	170			90	150	200
	190			100	180	160
	150			110	150	170
MW	157			103	148	163
Stbw	50,34			14,94	26,99	31,29
Tag 6	200	150	Keine	190	130	Keine
	160	150	Messung	130	120	Messung
	50	200		120	140	
	190	250		150	160	
	150	100		160	230	
	200	70		130	150	
	200	140		210	160	
	200	180		150	200	
	120	200		140	100	
	300	120		180	160	
MW	177	156		156	155	
Stbw	64,82	53,17		29,14	37,79	
Tag 8		100	Keine	160	170	120
		110	Messung	190	160	100
		50		140	160	90
		120		90	130	70
		250		200	170	160
		100		110	120	140
		120		160	190	100
		150		210	190	140
		70		110	170	150
		150		240	120	120
MW		122		161	158	119
Stbw		54,73		49,09	26,16	28,85
Tag 10				200		190
				290		120
				240		140
				180		100
				130		100
				150		80
				270		160
				270		140
				100		120
				120		100
MW				195		125
Stbw				69,48		33,08

Tabelle 3.5. Übersicht über die Mittelwerte der Sphäroiddurchmesser während der Kulturzeit aller Isolationen mit Sphäroidbildung

Tage in Kultur	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10
Mittelwerte Sphäroiddurchmesser gesamt (µm)	142,75	161	140	160
Standardabweichung gesamt	40,00	47,27	44,61	63,99

Diagramm 3.2. Graphische Darstellung der Mittelwerte der Sphäroiddurchmesser während der Kulturzeit aller Isolationen mit Sphäroidbildung



3.3. Messung der Albuminkonzentration im Kulturmedium

Um die Syntheseleistung der Hepatozyten in der Flusskultur zu überprüfen wurden jeden Tag Mediumproben entnommen und diese mit ELISA-Technik auf ihren Albumingehalt untersucht. Ziel war es, eine Aussage über die Vitalität der Hepatozyten mit einer spezifischen Syntheseleistung auch im Vergleich der Kulturansätze mit und ohne Sphäroidbildungen zu erhalten. Im folgenden sind die um die Anzahl der in den jeweiligen Systemen eingesetzten Polymere korrigierten Messwerte der Albuminbestimmung tabellarisch dargestellt (Tabellen 3.6. bis 3.13.).

Tabelle 3.6. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 17.06.2000

Iso 17.06.00	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	Syst. 5 (ng/ml)	Syst. 6 (ng/ml)	Syst. 7 (ng/ml)	Syst. 8 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	52,25	53,5	52,75	54,75	25,75	20,75	24,75	26	38,813	15,60
Tag 2		42,5	39,5	50,25		66,75	76,5	124,50	66,667	31,73
Tag 2 neu			18	19,00			19	36,25	23,063	8,80
Tag 3			40,25	42,25			125,5	79,75	71,938	40,06
Tag 4			24,188	21,31			41,06	60,94	36,875	18,25
Tag 4 neu				46				83,75	64,875	26,69
Tag 5				257,8				439,8	348,75	128,69
Tag 6				305,5				687	496,25	269,76

Tabelle 3.7. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 17.01.2001

Iso 17.01.01	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	31,5	37	63,5	43,25	43,813	13,98
Tag 2	76,75	70,25	118,75	69,5	83,813	23,52
Tag 2 neu		36	53,25	41,5	43,583	8,81
Tag 3		57,75	105,25	74,75	79,25	24,07
Tag 4		95,25	169,75	94	119,67	43,38
Tag 4 neu			84	44	64	28,28
Tag 5			151,5	113,5	132,5	26,87
Tag 6			250	204,3	227,13	32,35
Tag 6 neu				94,75	94,75	
Tag 7				194,5	194,5	
Tag 8				358,5	358,5	

Tabelle 3.8. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 03.04.2001

Iso 03.04.01	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	25,25	43,25	36	34,5	34,75	7,40
Tag 2	43,25	105,3	55,75	52,5	64,188	27,88
Tag 2 neu		41,25	32,75	29	34,333	6,28
Tag 3		74,75	32,75	29	45,5	25,40
Tag 4		74,75	53,25	29	52,333	22,89
Tag 4 neu		119,3	93,75	103,5	105,5	12,87
Tag 5			38,5	40,25	39,375	1,24
Tag 6			86,5	91	88,75	3,18
Tag 6 neu				60,25	60,25	
Tag 7				129,5	129,5	
Tag 8				168,3	168,25	

Tabelle 3.9. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 24.04.2001

Iso 24.04.01	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	Syst. 5 (ng/ml)	Syst. 6 (ng/ml)	Syst. 7 (ng/ml)	Syst. 8 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	39,25	47,5	49,25	46,75	48	41	43,5	41,5	44,594	3,75
Tag 2	49,5	103	106	96,5	106	52	51,25	50	76,781	28,06
Tag 2 neu		37,5	44	32,5		30,75	47	32,25	37,333	6,79
Tag 3		65,5	68,5	61,25		38,75	47	32,25	52,208	15,04
Tag 4		94,25	94,25	79,5		60,75	80,25	41	75	20,73
Tag 4 neu			34,75	30,5			28	16	27,313	8,04
Tag 5			44,25	42,25			41,5	18,75	36,688	12,01
Tag 6			74,25	69,5			68,75	29	57,333	24,69
Tag 6 neu				25,5				10,5	18	10,61
Tag 7				29				12	20,5	12,02
Tag 8				38,25					38,25	

Tabelle 3.10. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 11.07.2001

Iso 11.07.01	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	Syst. 5 (ng/ml)	Syst. 6 (ng/ml)	Syst. 7 (ng/ml)	Syst. 8 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	66,5	75	70	48,50	73,5	72	76,5	65	68,375	8,96
Tag 2	92	98,5	93	69,00	99	96,5	105,5	90,50	93	10,81
Tag 2 neu		61,5	56	37,00	59,5	54	66	46,50	54,357	9,82
Tag 3		99,5	95	64,50	95,5	92,5	100,5	80,00	89,643	12,98
Tag 4		219	186	131,00	218,5	217,5	235	183,00	198,57	35,28
Tag 4 neu			Pilz	59	102	102,5	117	80	92,1	22,74
Tag 5				145	227	250,5	245	171,5	207,8	47,00
Tag 6				201	357	356,5	345	268	305,5	69,17
Tag 6 neu					192	203,5	190	134,5	180	30,91
Tag 7					250,5	251,5	243,5	203,00	237,13	23,03
Tag 8					489,5	474,5	453	359,50	444,13	58,37
Tag 8 neu						fehlt	229	173,50	201,25	39,24
Tag 9						348,5	355,5	277,50	327,17	43,15
Tag 10						498	476,5	321,5	432	96,30
Tag 10 neu							181,5	85,5	133,5	67,88
Tag 11							301,5	133,5	217,5	118,79
Tag 12							382,5	151,50	267	163,34
Tag 12 neu								49,50	49,5	
Tag 13								62,50	62,5	
Tag 14								62,5	62,5	

Tabelle 3.11. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 10.09.2001

Iso 10.09.01	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	Syst. 5 (ng/ml)	Syst. 6 (ng/ml)	Syst. 7 (ng/ml)	Syst. 8 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	1,67	2,33	2	3	1,33				2,066	0,64
Tag 2	3,67	5	6,67	6,33	3,33				5	1,51
Tag 2 neu	1	1,67	1,33		1				1,25	0,32
Tag 3	2,33	4	3		2,33				2,915	0,79
Tag 4	3	6	4,67		3,67				4,335	1,30
Tag 4 neu	0,67	1,67	1,67						1,3367	0,58
Tag 5	3,33	5	4						4,11	0,84
Tag 6	2,67	7,67	5,33						5,2233	2,50
Tag 6 neu			1,67						1,67	
Tag 7			4,67						4,67	
Tag 8			7,33						7,33	

Tabelle 3.12. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 08.11.2001

Iso 08.11.01	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	Syst. 5 (ng/ml)	Syst. 6 (ng/ml)	Syst. 7 (ng/ml)	Syst. 8 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	6,5	23	17,75	23,25	3,5	20	26	13	16,625	8,22
Tag 2	20	49,75	49	53,75	9,5	54,75	62	42,5	42,656	18,31
Tag 2 neu		24	19,75	24,25		23,75	21,25	13,5	21,083	4,12
Tag 3		57	51,5	67,75		63	72	48,25	59,917	9,30
Tag 4		93,5	91	121,3		107	116,3	94	103,83	12,93
Tag 4 neu			53,25	69,75			69,5	46,75	59,813	11,64
Tag 5			89	107,3			109,5	89	98,688	11,22
Tag 6			180	230,5			214,5	192,8	204,44	22,47
Tag 6 neu				122,3				76,75	99,5	32,17
Tag 7				187				146,3	166,63	28,81
Tag 8				205,3				168	186,63	26,34

Tabelle 3.13. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 12.06.2002

Iso 12.06.02	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 2	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 2 neu		0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 3		0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 4		0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 4 neu			0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 5			0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 6			0,01	0,01	0,01	0,00
Tag 6 neu				0,01	0,01	
Tag 7				0,01	0,01	
Tag 8				0,01	0,01	

Tabelle 3.14. Mediumkonzentration von Albumin korrigiert auf Albumin/Polymer des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 12.06.2002

Iso 15.06.02	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	1	7	4	6	4,5	2,65
Tag 2	4	18	4	12,5	9,625	6,87
Tag 2 neu		8	3	2,5	4,5	3,04
Tag 3		22,5	9,5	7	13	8,32
Tag 4		65	29,5	20,5	38,333	23,53
Tag 4 neu			16	9	12,5	4,95
Tag 5			55,5	35	45,25	14,50
Tag 6			96,5	81	88,75	10,96
Tag 6 neu			405		405	
Tag 7			68,5		68,5	
Tag 8			72		72	

Diagramm 3.3. Graphische Darstellung der Albuminsynthese in der Flusskultur der Kulturansätze ohne Sphäroidenbildung

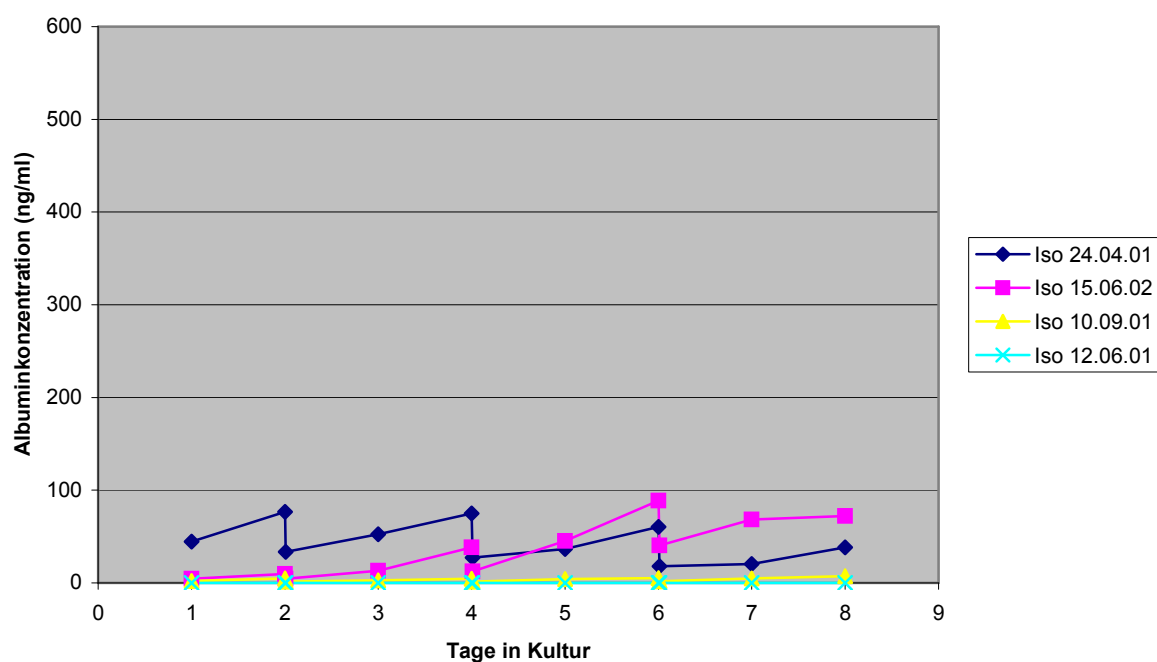
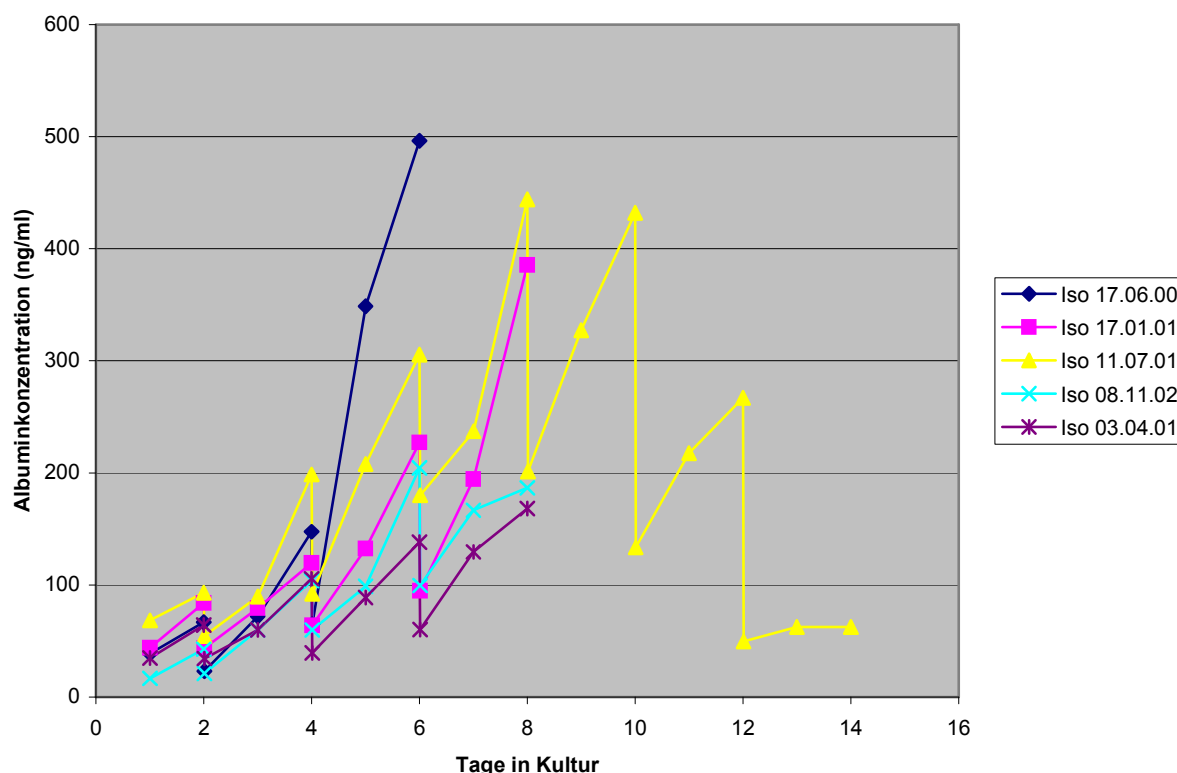


Diagramm 3.4. Graphische Darstellung der Albuminsynthese in der Flusskultur der Kulturansätze mit Sphäroidbildung



Es zeigten sich in den Kulturansätzen mit Sphäroidbildungen deutlich ansteigende Albuminsyntheseleistungen bis zum 8. Tag, im Falle der Isolation vom 11.7.2001 sogar bis zum 12. Tag. Ab dem 12. Tag war hier keine nennenswerte Syntheseleistung mehr zu erkennen (Tabelle 3.10. und Diagramm 3.4.). Das Niveau der Syntheseleistungen der einzelnen Kulturansätze war in den einzelnen Systemen und zwischen den unterschiedlichen Kulturansätzen unterschiedlich hoch. Im Vergleich dazu waren die Syntheseleistungen der Kulturansätze ohne Sphäroidbildungen im Niveau deutlich geringer (Diagramm 3.3.), wobei eine geringere Syntheseleistung feststellbar war. Im Falle des Kulturansatzes vom 12.06.2002 war keine Syntheseleistung messbar (Tabelle 3.13). Dieser Kulturansatz fällt aus den graphischen Darstellungen heraus.

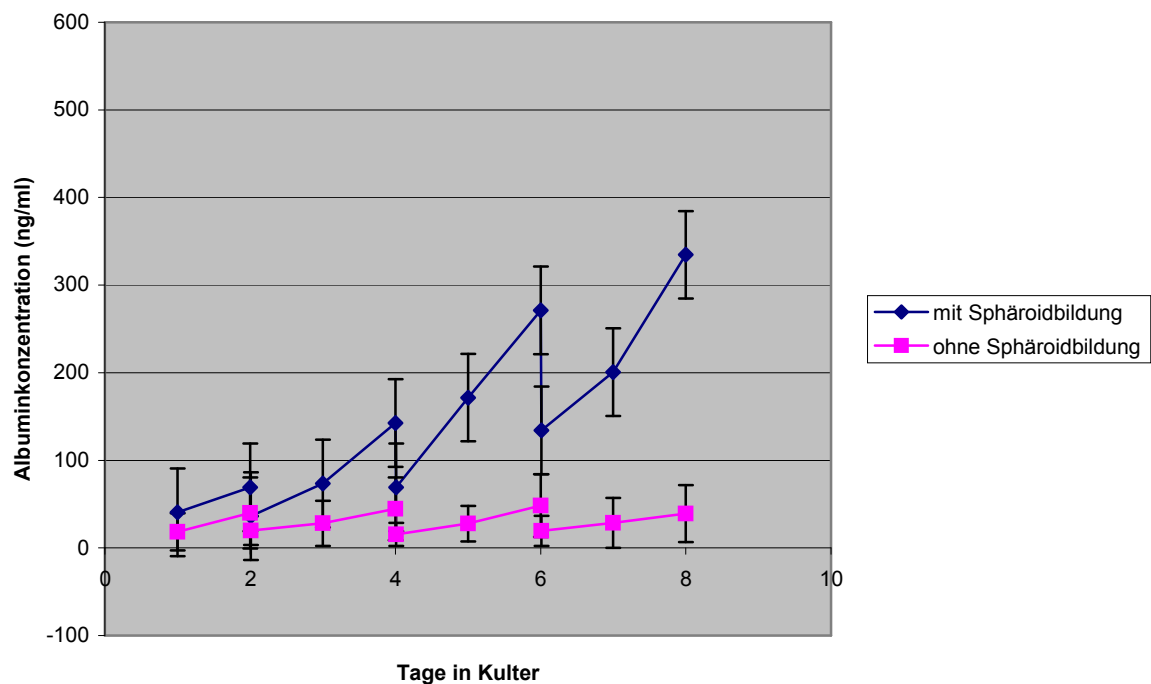
Tabelle 3.15. Übersicht über die Mittelwerte der Albuminkonzentrationen in den gesamten Kulturansätzen ohne Sphäroidbildungen (ohne Miteinbezug der Isolation vom 12.06.2002)

	Tag 1	Tag 2	Tag 2 neu	Tag 3	Tag 4	Tag 4 neu	Tag 5	Tag 6	Tag 6 neu	Tag 7	Tag 8
MW ges. (ng/ml)	18,339	39,87	16,81	28,07	44,79	15,36	27,731	48,30	19,542	28,54	39,19
Stbw. ges.	21,295	40,54	16,58	25,92	35,83	13,215	20,165	36,888	17,088	28,52	32,3

Tabelle 3.16. Übersicht über die Mittelwerte der Albuminkonzentrationen in den gesamten Kulturansätzen mit Sphäroidbildungen

	Tag 1	Tag 2	Tag 2 neu	Tag 3	Tag 4	Tag 4 neu	Tag 5	Tag 6	Tag 6 neu	Tag 7	Tag 8
MW ges. (ng/ml)	40,77	69,24	36,22	73,57	142,6	69,08	171,6	271,2	134,3	200,72	334,6
Stabw. ges.	21,6	28,38	16,06	22,72	54,4	25,12	97,79	136	55,71	46,53	136,8

Diagramm 3.5. Graphische Darstellung der Mittelwerte der Albuminsyntheseleistung aller Kulturansätze mit und ohne Sphäroidbildung im Vergleich bis zum 8.Tag (ohne Miteinbezug der Isolation vom 12.06.2002)



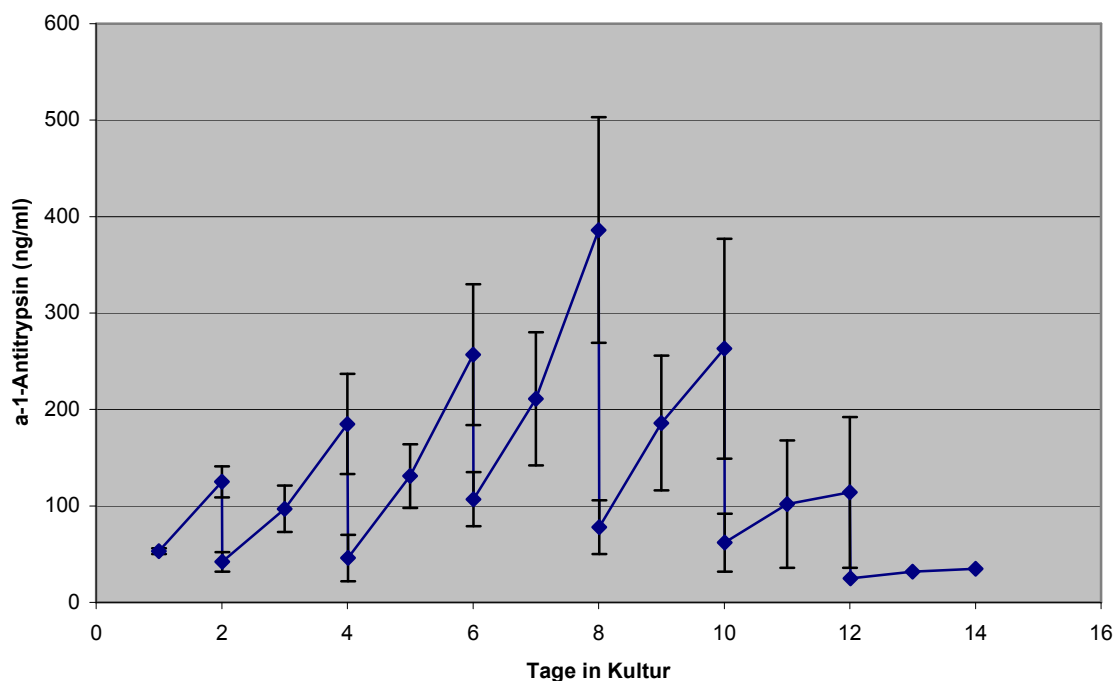
3.4. Messung der α -1-Antitrypsinkonzentration im Kulturmedium

Um eine weitere typische Stoffwechselleistung der Hepatozyten zu überprüfen, wurden exemplarisch die Mediumproben des Zellkulturaufbaues vom 11.07.2001 auf die Konzentration von α -1-Antitrypsin überprüft. Die Tabelle 3.17. und das Diagramm 3.6. zeigen die Ergebnisse. Wie schon bei der Überprüfung der Albuminsynthese zeigt sich auch hier eine stabile α -1-Antitrypsin-Synthese bis zum 10 Tag. Ab dem 12. Tag ist die Menge des neu synthetisierten α -1-Antitrypsins nicht mehr nennenswert und spiegelt auch hier einen Abbruch der Syntheseleistung wider.

Tabelle 3.17. Mediumkonzentration von α -1-Antitrypsin des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 11.07.2001

Iso 17.06.01	Syst. 1 (ng/ml)	Syst. 2 (ng/ml)	Syst. 3 (ng/ml)	Syst. 4 (ng/ml)	Syst. 5 (ng/ml)	Syst. 6 (ng/ml)	Syst. 7 (ng/ml)	Syst. 8 (ng/ml)	MW	Stbw
Tag 1	45	60	57	40	60	60	57	41	52,5	8,90
Tag 2	117	155	127	76	141	128	147	110	125,13	24,91
Tag 2 neu		53	51	23	49	40	49	28	41,857	11,98
Tag 3		101	92	48	101	98	124	66	90	25,19
Tag 4		183	210	91	228	194	207	110	174,71	52,86
Tag 4 neu				35	65	65	14	39	43,6	21,72
Tag 5				78	138	147	155	83	120,2	36,78
Tag 6				135	262	307	306	151	232,2	83,62
Tag 6 neu					130	118	113	67	107	27,60
Tag 7					249	273	207	116	211,25	69,11
Tag 8					424	503	391	224	385,5	117,47
Tag 8neu						fehlt	97	58	77,5	27,58
Tag 9						236	217	106	186,33	70,22
Tag 10						339	319	132	263,33	114,18
Tag 10 neu							83	41	62	29,70
Tag 11							148	55	101,5	65,76
Tag 12							169	59	114	77,78
Tag 12 neu								25	25	
Tag 13								32	32	
Tag 14								35	35	

Diagramm 3.6. Graphische Darstellung der Syntheseleistung α -1-Antitrypsin des Kulturansatzes der Hepatozytenisolation vom 11.07.2001



3.5. Messung der Ammoniak- und Harnstoffkonzentration im Kulturmedium

Um die mitochondriale Leistungsfähigkeit der Hepatozyten in der Flusskultur zu überprüfen, wurden alle zwei Tage vor und nach partiellem Mediumwechsel Mediumproben entnommen und quantitativ auf Harnstoff analysiert.

Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurde die Menge Harnstoff je besiedeltem Polymer berechnet und das eingesetzte Probenvolumen bei der Messung rechnerisch auf 1 ml angeglichen.

Es wurde ein Durchlauf ohne Zellen mit und ohne Polymer durchgeführt, um zu ermitteln wie hoch der spontane Anfall von Ammoniak aus dem System mit dem Kulturmedium und den Polymeren ist (Tabelle 3.18.). Es ist ein spontaner Anfall von Ammoniak über die Zeit festzustellen. Ein eventuell von den Polymeren anfallender Anteil ist dabei nicht feststellbar. Der Anteil des spontan auftretenden Ammoniaks wurde in der weiteren Auswertung vernachlässigt, da Ammoniak aus der Harnstoffkonzentration herausgerechnet wurde.

Tabelle 3.18. Ergebnisse eines Kulturansatzes ohne Hepatozyten mit und ohne Polymere

	Tage in Kultur	Ammoniak (mg/l)
Leerlauf	Tag 1 mit Polymer	0,408
	Tag 2 mit Polymer	0,522
	Tag 2 neu mit Polymer	0,384
	Tag 4 mit Polymer	0,563
	Tag 4 neu mit Polymer	0,416
	Tag 7 mit Polymer	0,629
	Tag 7 neu mit Polymer	0,408
	Tag 9 mit Polymer	0,767
	Tag 1 ohne Polymer	0,392
	Tag 2 ohne Polymer	0,465
	Tag 2 neu ohne Polymer	0,392
	Tag 4 ohne Polymer	0,539
	Tag 4 neu ohne Polymer	0,400
	Tag 7 ohne Polymer	0,629
	Tag 7 neu ohne Polymer	0,416
	Tag 9 ohne Polymer	0,522

Tabelle 3.19. Ergebnisse der Ammoniak- und Harnstoffmessung der Kulturansätze mit Sphäroidbildung

	Tage in Kultur	Harnstoff (mg/l/Polymer)	Absolute Zunahme von Harnstoff mg/l/Polymer	Ammoniak (mg/l/Polymer)
Iso 17.06.00 System Nr. 4	18.06.	1,127		0,206
	19.06.	2,677	1,551	0,373
	19.06. Neu	0,761		0,198
	21.06.	2,612	1,825	0,369
	21.06. Neu	0,815		0,331
	23.06.	1,869	1,054	0,725
Iso 17.01.01 System Nr. 4	18.01.	0,99		0,186
	19.01.	1,815	0,825	0,229
	19.01. Neu	0,886		0,152
	21.01.	2,323	1,437	0,535
	21.01. Neu	1,075		0,286
	23.01.	2,717	1,642	0,327
	23.01. Neu	0,946		0,320
	25.01.	1,65	0,704	0,569
Iso 03.04.01 System Nr. 4	04.04.	1,038		0,179
	05.04.	1,489	0,451	0,372
	05.04. Neu	0,274		0,261
	07.04.	2,23	1,956	0,410
	07.04. Neu	0,475		0,231
	09.04.	1,683	1,208	0,592
	09.04. Neu	0,221		0,320
	11.04.	0,636	0,415	0,630
Iso 11.07.01 System Nr. 7	12.07.	0,703		0,339
	13.07.	1,587	0,884	0,502
	13.07. Neu	0,377		0,302
	15.07.	1,579	1,203	0,882
	15.07. Neu	0,464		0,359
	17.07.	1,297	0,833	0,592
	17.07. Neu	0,312		0,339
	19.07.	0,993	0,681	0,592
	19.07. Neu	0,21		0,314
	21.07.	0,696	0,485	0,588
	21.07. Neu	0		0,310
	23.07.	0,398	0,485	0,445
Iso 08.11.01 System Nr. 4	09.11.	1,235		0,186
	10.11.	2,011	0,775	0,318
	10.11. Neu	0,811		0,180
	12.11.	1,967	1,156	0,635
	12.11. Neu	0,833		0,294
	14.11.	1,739	0,906	0,590
	14.11. Neu	0,681		0,278
	16.11.	1,159	0,478	0,488

Tabelle 3.20. Ergebnisse der Ammoniak- und Harnstoffmessung der Kulturansätze ohne Sphäroidbildung

	Tage in Kultur	Harnstoff (mg/l/Polymer)	Absolute Zunahme von Harnstoff (mg/l/Polymer)	Ammoniak (mg/l/Polymer)
Iso 24.04.01 System Nr. 8	25.04.	1,864		0,354
	26.04.	2,632	0,769	0,506
	26.04. Neu	0,946		0,227
	28.04.	1,759	0,813	0,472
	28.04. Neu	0,616		0,213
	30.04.	0,93	0,314	0,354
	30.04. Neu	0,298		0,166
	02.05.	0,495	0,197	0,249
Iso 10.09.01 System Nr. 3	11.09.	1,381		0,207
	12.09.	2,183	0,802	0,378
	12.09. Neu	0,855		0,207
	14.09.	1,705	0,85	0,422
	14.09. Neu	0,584		0,226
	16.09.	0,966	0,382	0,359
	16.09. Neu	0,338		0,193
	18.09.	0,555	0,217	0,397
Iso 12.06.02 System Nr. 4	13.06.	1,320		0,404
	14.06.	2,294	0,974	0,481
	14.06. neu	0,886		0,363
	16.06.	1,167	0,282	0,581
	16.06. Neu	0,547		0,494
	18.06.	0,660	0,113	0,581
	18.06. Neu	0,378		0,440
	20.06.	0,459	0,081	0,549
Iso 15.06.02 System Nr. 8	16.06.	2,037		0,862
	17.06.	3,011	0,974	1,002
	17.06. Neu	1,481		0,694
	19.06.	2,302	0,821	0,930
	19.06. neu	1,030		0,712
	21.06.	1,369	0,338	0,748
	21.06. neu	0,741		0,517
	23.06.	1,175	0,435	0,794

Diagramm 3.7. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Harnstoffsynthese in Flusskultur in den Kulturansätzen mit Sphäroidbildung

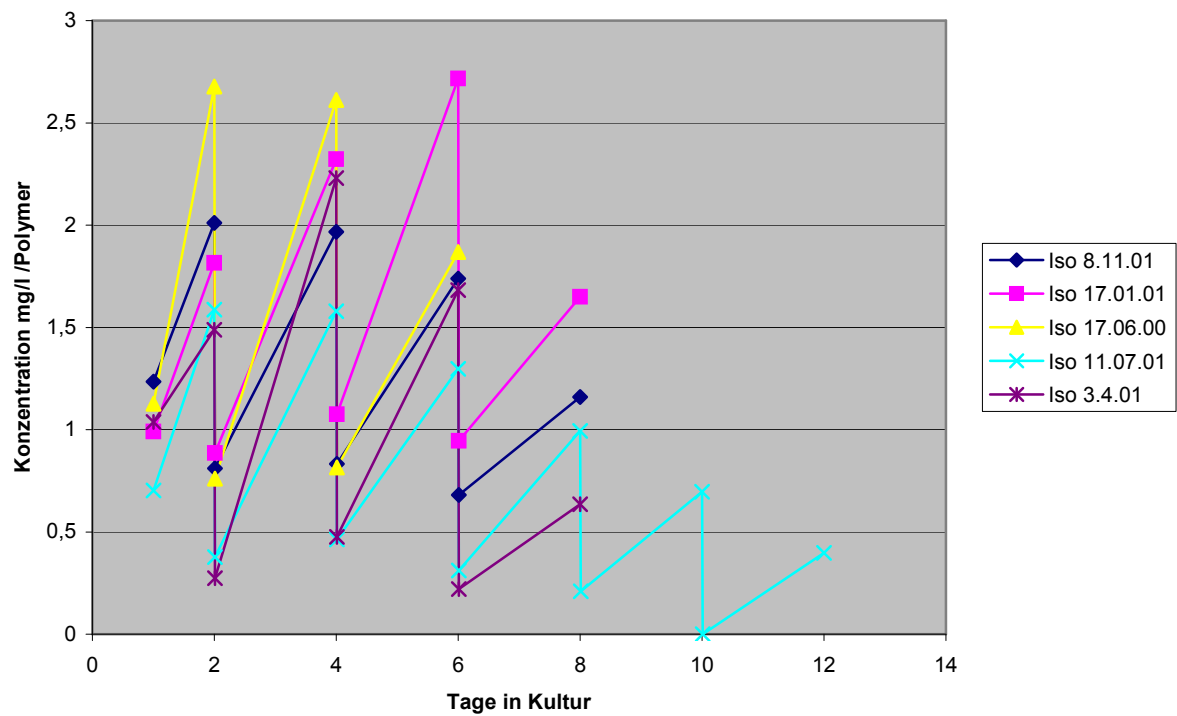


Diagramm 3.8. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Harnstoffsynthese in Flusskultur in den Kulturansätzen ohne Sphäroidbildung

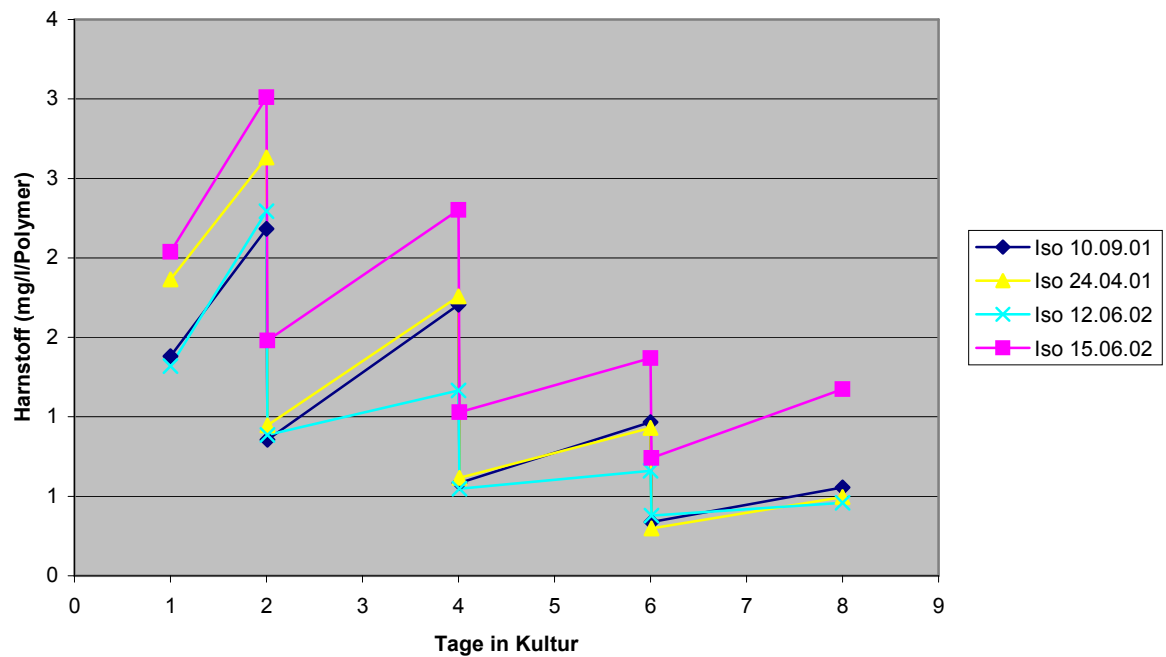
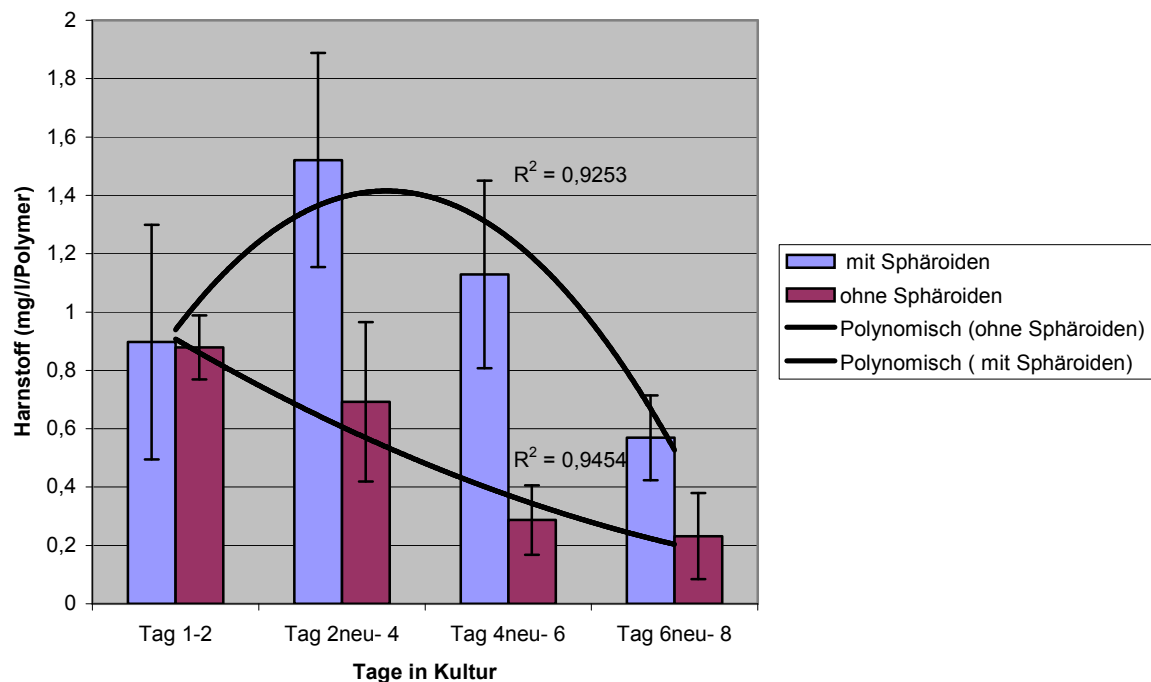


Diagramm 3.9. Graphische Darstellung der absoluten Zunahme von Harnstoff pro Polymer der Kulturansätze mit und ohne Sphäroidbildung im Vergleich mit Trendlinien



Es sind sowohl in der Gruppe der sphäroidbildenden als auch der nicht-sphäroidbildenden Kulturansätze Harnstoffsyntheseleistungen auf ähnlichem Konzentrationsniveau zu erkennen (Tabellen 3.19. und 3.20 sowie Diagramme 3.7. und 3.8.). Betrachtet man die absoluten Zuwächse zwischen den Messungen, zeigte sich vom zweiten bis zum vierten Kulturtag eine deutliche Aufspaltung in dem Sinne, dass bei den sphäroidbildenden Kulturen ab dem zweiten Tag eine weitere Steigerung der Harnstoffproduktion zu erkennen ist, während in den Kulturen ohne Sphäroidbildungen eine Abnahme der absoluten Harnstoffneubildung zu sehen ist (Diagramm 3.9.). Die sphäroidbildenden Zellen scheinen zu einer ausgeprägteren und länger andauernden mitochondrialen und zytoplasmatischen Funktion in der Lage zu sein.

3.6. Northern Blot für humane Albumin mRNA

Um darzustellen, dass die Albuminmengen, die mit der ELISA-Methode im Kultumedium gemessen wurden, tatsächlich die aktive Produktion von Albumin reflektieren, wurde exemplarisch für den Kulturansatz vom 17.06.2000 eine Northern Blot Analyse für humane Albumin-mRNA durchgeführt. Die Gesamt-RNA konnte mit Hilfe des TriPure Isolation Reagent Kit verlässlich aus den humanen Hepatozyten extrahiert werden, auch

nach der Sphäroidbildung innerhalb der PLLA-Polymer-Matrizes nach Flussbioreaktorkultur. Signale für humane Albumin mRNA konnten für alle Meßzeitpunkte detektiert werden: Direkt nach der Isolation (Tag 0), nach 1, 2, 4 und 6 Tagen in Flusskultur auf dem PLLA-Polymer.

Die Stärke des detektierten mRNA Signals nahm von Tag 0 bis Tag 1 ab um danach kontinuierlich anzusteigen. Ab Tag 4 überstieg das mRNA Signal den Wert von Tag 0 um dann noch weiter bis Tag 6 anzusteigen. Dies ist ein Indikator für differenzierten und aktiven funktionellen Metabolismus der flusskultivierten primären humanen Hepatozyten auf dem dreidimensionalen Polymer (Abbildung 6).

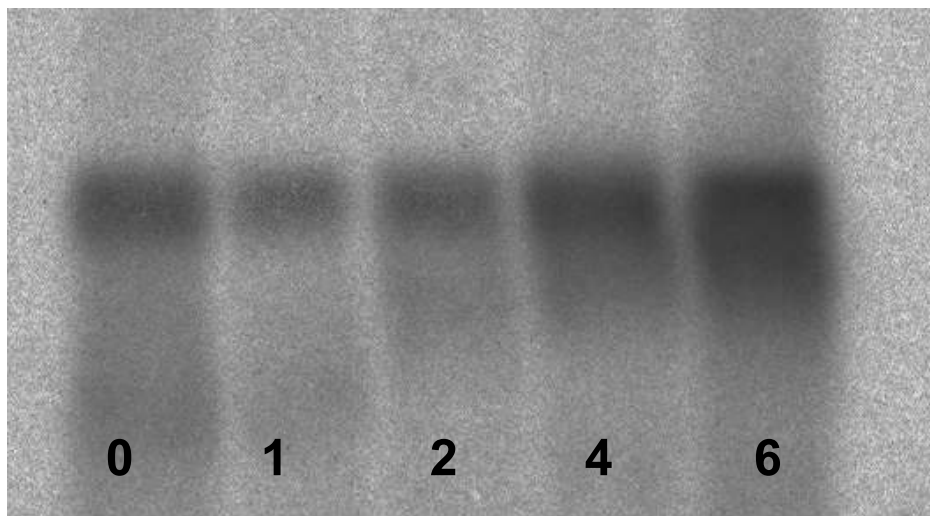


Abbildung 6: Northern Blot von humaner Albumin mRNA. Es findet sich ein ansteigendes Signal während der Zeit der Flusskultur. An den Tagen 4 und 6 übersteigt das Signal den Wert von frisch isolierten humanen Hepatozyten (Tag 0).

3.7. Ergebnisse der DNA-Messung

Um weiteren Aufschluss über die Effektivität der Zellkultur und der Polymerbesiedelung zu erhalten, wurde der DNA-Gehalt der Polymere nach der Zellkultur bestimmt.

Bei Besiedelung der Polymere mit Hepatozyten wurden 4×10^6 Zellen in einer Zellsuspension von 400 µl auf die Polymere getropft. Bei der Besiedelung fiel auf, dass ein großer Teil der Zellsuspension nach Besiedelung auf der Petrischale zurückblieb. Um den Zellverlust bei der Besiedelung zu quantifizieren, wurde einmalig doppelt der DNA-Gehalt der Zellsuspension direkt gemessen. Des weiteren wurde der nach Besiedelung in der Petrischale verbliebene Überstand doppelt bestmöglich mit einer Pipette aufgenommen und ebenfalls vermessen. Im Vergleich dazu wurden zwei Polymere nach Besiedelung direkt eingefroren und dann vermessen, auch um den Zellverlust auf den Polymeren durch die nachfolgende Flusskultur quantifizieren zu können.

Tabelle 3.21. Übersicht des Zellverlustes des Zellverlustes durch Zellaussiedelung auf die Polymere und durch die Zellkultur ermittelt durch DNA-Messung (Messwerte um Probenvolumen korrigiert)

Probe	Messung 1 (ng/ml)	Messung 2 (ng/ml)	Messung 3 (ng/ml)	MW (ng/ml)	Stbw	MW A+B (ng/ml)	Stabw A+B
DNA Soll A	33400	34400	35000	34266,67	808,29	33966,67	924,48
DNA Soll B	34200	34400	32400	33666,67	1101,51		
DNA Polymer direkt A	8200	8400	7000	7866,67	757,19		
DNA Polymer direkt B	11100	10700	10100	10633,33	503,32	18433,33	500,67
DNA Überstand A	18300	17900	18500	18233,33	305,51		
DNA Überstand B	17900	19100	18900	18633,33	642,91		
DNA Kultur Tag 2	2400	2700	2700	2600,00	173,21		

Diagramm 3.10. Graphische Darstellung des Zellverlustes durch Zellaussiedelung auf die Polymere und durch die Zellkultur ermittelt durch DNA-Messung

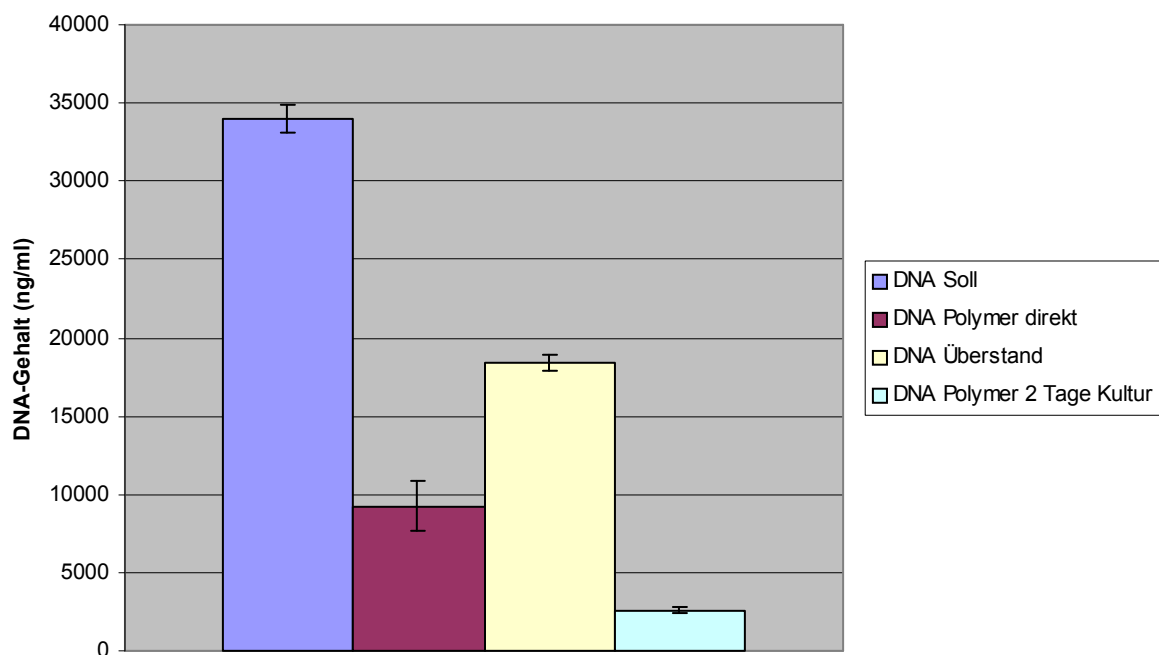


Tabelle 3.21. und Diagramm 3.10. zeigen die Messergebnisse. Es ist zu erkennen, dass auf den Polymeren nach Besiedelung lediglich 27,23% der Zellen verbleiben. Im Überstand verblieben laut Messungen 54,27%. Die Differenz von 18,5% ist durch den Zellverlust beim aufpipettieren des Überstandes zu erklären, da eine vollständige Zellaufnahme mit der Pipette von der Petrischale technisch nur schwer zu gewährleisten ist. Nach 2 Tagen Kulturlaufzeit in der Flusskultur finden sich lediglich 7,7% der Ausgangsmenge der Zellen auf den Polymeren.

Im nachfolgenden sind die Messwerte der DNA-Messungen aller Kulturansätze dargestellt, bei denen ein Polymer für die DNA-Messungen bereitgestellt werden konnte (Tabelle 3.22. und Diagramm 3.11.). Auch hier wurde der Mittelwert einer Dreifachbestimmung einer Probe ermittelt. Die Durchschnittswerte aller DNA-Messungen sind in der Tabelle 3.23. und im Diagramm 3.12. dargestellt.

Tabelle 3.22. Ergebnisse der DNA-Messungen in Dreifachbestimmung pro Polymer (korrigiert um Probenvolumen und Polymeranzahl) aller Messungen

Isolation	Probe	Messung 1 (ng/ml)	Messung 2 (ng/ml)	Messung 3 (ng/ml)	MW (ng/ml)	Stbw
Iso 11.07.01	System 1, Tag 2	8600	8300	8600	8500,00	173,21
	System 2, Tag 4	6300	6500	6300	6366,67	115,47
	System 4, Tag 6	3500	4200	4000	3900,00	360,56
	System 5, Tag 8	8200	8400	8500	8366,67	152,75
	System 6, Tag 10	8500	8500	8200	8400,00	173,21
	System 7, Tag 12	4200	4300	4100	4200,00	100,00
	System 8, Tag 14	6300	6100	6000	6133,33	152,75
Iso 08.11.01	System 1, Tag 2	3800	3700	4100	3866,67	208,17
	System 5, Tag 2	4200	4300	4300	4266,67	57,74
	System 2, Tag 4	7900	7900	7500	7766,67	230,94
	System 6, Tag 4	6100	5900	5900	5966,67	115,47
	System 3, Tag 6	7300	6500	7200	7000,00	435,89
	System 7, Tag 6	2700	2200	2300	2400,00	264,58
	System 4, Tag 8	7300	7400	6800	7166,67	321,46
	System 8, Tag 8	4900	4900	4900	4900,00	0,00
Iso 06.02.02	System 1, Tag 2	6300	6100	6700	6366,67	305,51
	System 2, Tag 4	8000	8100	8800	8300,00	435,89
	System 3, Tag 6	5700	6100	6300	6033,33	305,51
	System 4, Tag 8	3900	3900	3900	3900,00	0,00
	System 5, Tag 10	5700	5500	5300	5500,00	200,00
	System 6, Tag 12	4800	4900	5000	4900,00	100,00
Iso 12.6.02	System 1, Tag 2	2400	2700	2700	2600,00	173,21
	System 2, Tag 6	3100	3000	3000	3033,33	57,74
	System 3, Tag 8	2300	1700	1700	1900,00	346,41
	System 4, Tag 8	2200	2200	2300	2233,33	57,74
Iso 15.06.02	System 1, Tag 2	3900	3500	3700	3700,00	200,00
	System 2, Tag 4	4700	4600	4500	4600,00	100,00
	System 3, Tag 6	5100	4700	4800	4866,67	208,17
	System 4, Tag 8	2600	2900	3400	2966,67	404,15

Diagramm 3.11. Graphische Darstellung des DNA-Gehaltes der einzelnen Isolationen (laut Tabelle 3.22)

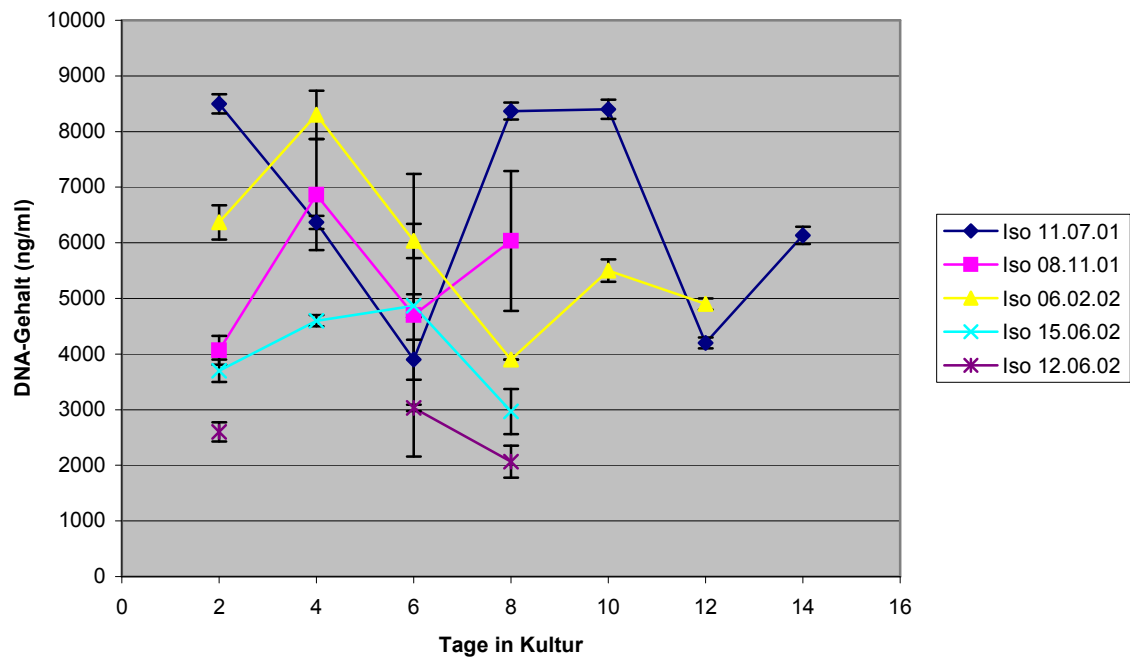
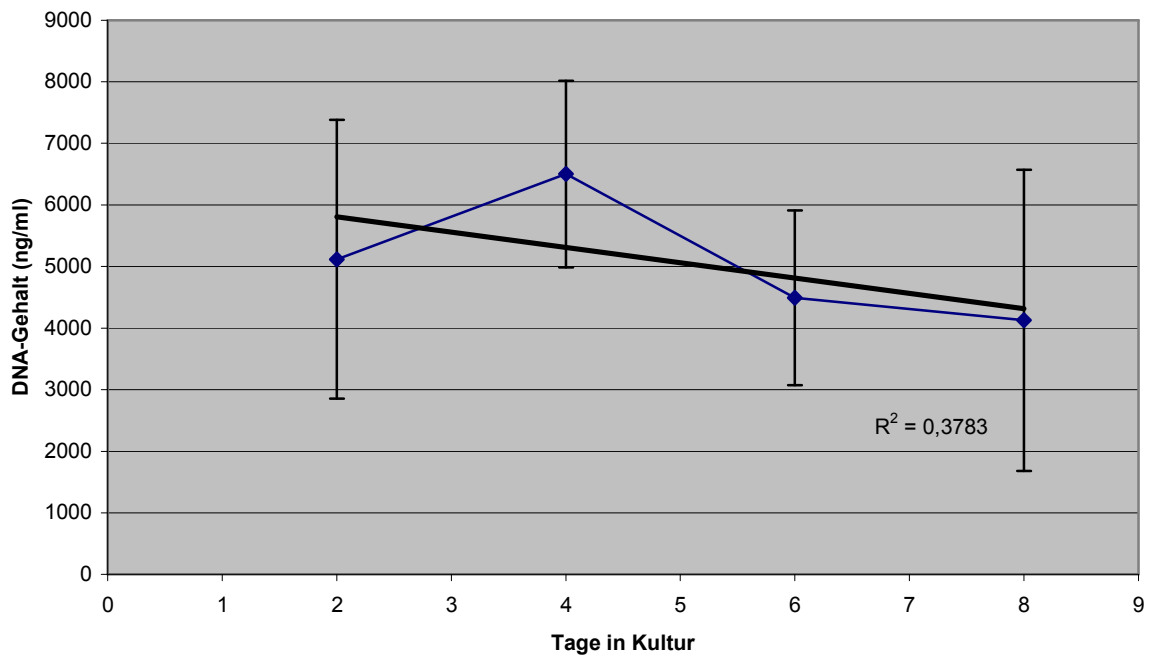


Tabelle 3.23. Mittelwerte aller Ergebnisse^{*1} der DNA-Messungen pro Polymer (korrigiert um Probenvolumen und Polymeranzahl)

Tage in Kultur	MW (ng/ml)	Stbw
Tag 2	5117	2265,48
Tag 4	6503	1513,89
Tag 6	4493	1419,35
Tag 8	4127	2443,35

^{*1}: Bei Messungen von zwei Polymeren eines Kulturansatzes wurden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Systeme in die Wertung genommen, da sonst deren Gewicht im Gesamt-Mittelwert zu hoch ist.

Diagramm 3.12. Graphische Darstellung der Mittelwerte aller Ergebnisse der DNA-Messungen pro Polymer (laut Tabelle 3.23) bis zum Tag 8 in Kultur



3.8. Ergebnisse Histologie

3.8.1. Ergebnisse der Histologie mit Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Um Aussagen über die morphologischen Merkmale der Sphäroiden zu erhalten, wurden Gefrierschnitte der Polymere nach der Flusskultur angefertigt und diese mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Zum Vergleich wurden Gefrierschnitte humanen Lebergewebes angefertigt (Abbildungen 7 und 8).

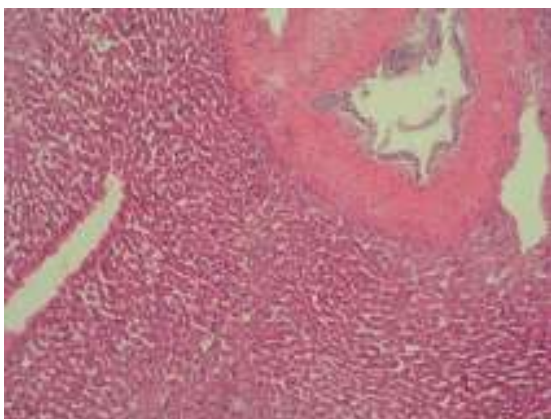


Abbildung 7: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humanes Lebergewebe. HE-Färbung. Vergrößerung 10-fach. Es ist die zelluläre Anordnung der Hepatozyten mit den Sinusoiden zu erkennen. Im Anschnitt ist ebenfalls ein Gefäßstrang mit einem Gallengangsgefäß zu erkennen.

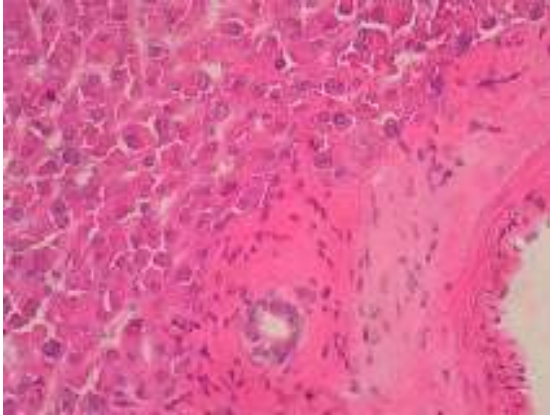


Abbildung 8: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humanes Lebergewebe. HE-Färbung. Vergrößerung 40-fach. Es ist der polygonale Aufbau der Hepatozyten erkennbar. Die Zwischenräume der Zellen sind artifiziell bedingt. Ebenfalls Darstellung eines Gallenganges und einer Arterie.

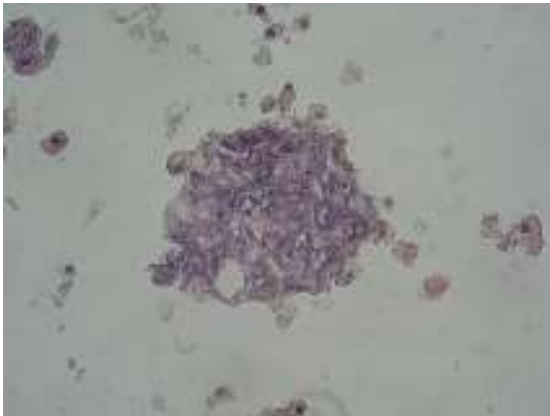


Abbildung 9: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humaner Lebersphäroid der Isolation vom 08.11.01 nach 2 Tagen Flusskultur. HE-Färbung. Vergrößerung 40-fach. Die zelluläre Ordnung wirkt noch unorganisiert. Die Zellkerne haben zum Teil spindelartige Gestalt.

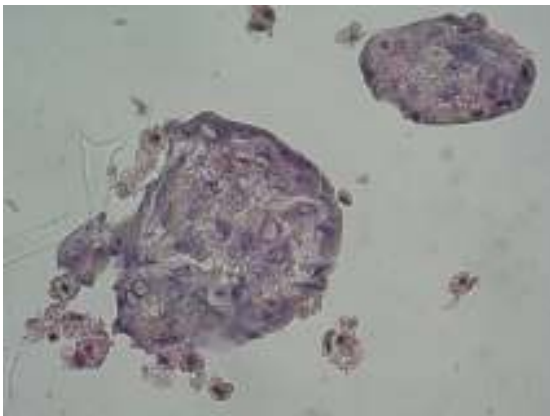


Abbildung 10: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humane Lebersphäroide der Isolation vom 08.11.01 nach 4 Tagen Flusskultur. HE-Färbung. Vergrößerung 40-fach. Es ist eine beginnende zelluläre Organisation mit polygonaler Zellform im Zentrum und flachen deckzellartigen Zellen an der Außenfläche.

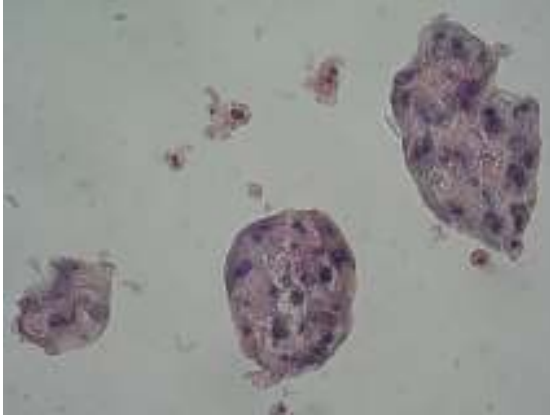


Abbildung 11: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humane Lebersphäroide der Isolation vom 08.11.01 nach 6 Tagen Flusskultur. HE-Färbung. Vergrößerung 40-fach. Die Organisation mit ovalkernigen, polygonalen Zellen innerhalb und spindelkernigen, deckenden Zellen an den Außenflächen ist abgeschlossen.

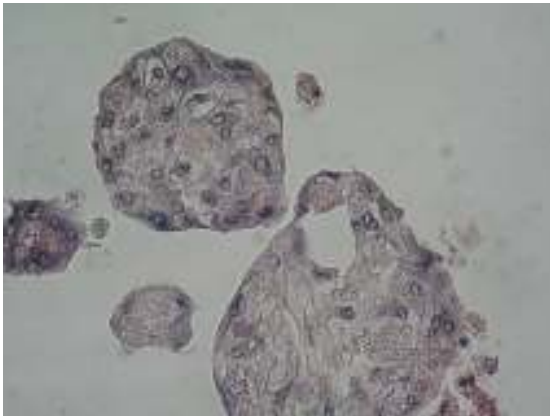


Abbildung 12: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humane Lebersphäroide der Isolation vom 08.11.01 nach 8 Tagen Flusskultur. HE-Färbung. Vergrößerung 40-fach. Das Zytoplasma der Hepatozyten wirkt vakuolig verändert.

Es wurde exemplarisch eine Kulturreihe des Kulturansatzes vom 08.11.2001 histologisch mit der HE-Färbung aufgearbeitet. Dieser Kulturansatz zeigte schon in der phasenkontrastmikroskopischen Betrachtung die Ausbildung von Sphäroiden (Abbildung 5). Es ist in den Präparaten von Tag 2 in Kultur die Zusammenlagerung mit einer deutlichen Verbindung der Hepatozyten untereinander zu erkennen. Eine scharfe einheitliche Abgrenzung zur Umgebung ist hierbei noch nicht zu erkennen. Die Ordnung der Zellen wirkt uneinheitlich (Abbildung 9). Ab dem vierten Tag in Kultur ist eine scharfe Abgrenzung zur Umgebung erkennbar. Die Zellen sind geordneter und in den Randbezirken grenzen sich flache längliche Zellen ab, welche die Außenfläche der nun als Sphäroiden bezeichneten Zellaggregate abgrenzen (Abbildung 10). Die Ordnung der Zellen untereinander setzt sich bis zum Tag 6 in Kultur fort, es ist kaum Unordnung erkennbar. Rein morphologisch ist ab hier eine Vergleichbarkeit zu den normalen histologisch-anatomischen Verhältnissen eines normalen Lebergewebes feststellbar (Abbildung 11). Die größeren Sphäroide zeigen am Tag 8 in den zentralen Arealen Zeichen der Kernaufösungen, wohl als Zeichen der zentralen Nekrose. Es sind ebenfalls Vakuolisierungen des Zytoplasmas zu erkennen (Abbildung 12).

3.8.2. Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbung

Zur Charakterisierung der Zellen und als Nachweis, dass es sich bei den kultivierten Zellen um Hepatozyten handelt, wurden immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten der Polymere mit den Zellen nach der Zellkultur angefertigt. Durch spezifische Antikörper wurden die Antigene von Albumin, α -1-Antitrypsin und Cytokeratin 18 untersucht. Es wurde jeweils zur Positivkontrolle ein gefrierschnittliches Präparat mit humanem Lebergewebe mitgefärbt (Abbildungen 13, 14, 17, 20, 25 und 26). Zur Negativkontrolle diente ein Präparat mit humanem Muskelgewebe.

Um festzustellen, ob in den Zellkulturen Zellen nicht-epithelialen Ursprungs sind, wurden die Gefrierschnitte auf Vimentin als Markerantigen für Gewebe mesenchymalen Ursprungs untersucht.

Um Hinweise zu erhalten, ob sich innerhalb der Zellaggregate Zellteilungsprozesse abspielen, wurden die Gefrierschnitte auf das Antigen PCNA als Proliferationsmarker untersucht. Zur Positivkontrolle wurde Darmschleimhautgewebe von der Ratte mit proliferierenden Darmepithelien vom Grund der Schleimhautkrypten angefärbt.

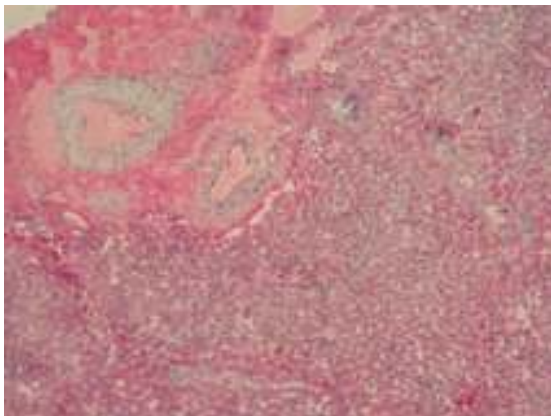


Abbildung 13: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Lebergewebe. Immunhistologische Darstellung von human-Albumin, Primärantikörperversdünnung 1:5000. Vergrößerung 10-fach. Ein positives Signal für Albumin unterschiedlicher Signalstärke als Ausdruck unterschiedlicher Syntheseleistung ist zu erkennen.

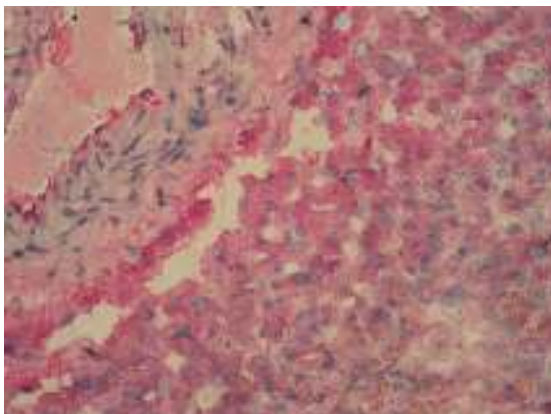


Abbildung 14: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Lebergewebe. Immunhistologische Darstellung von human-Albumin, Primärantikörperversdünnung 1:5000. Vergrößerung 40-fach. Das Zytoplasma der Hepatozyten ist deutlich positiv angefärbt. Die blassere Anfärbung des Bindegewebes ist unspezifisch.

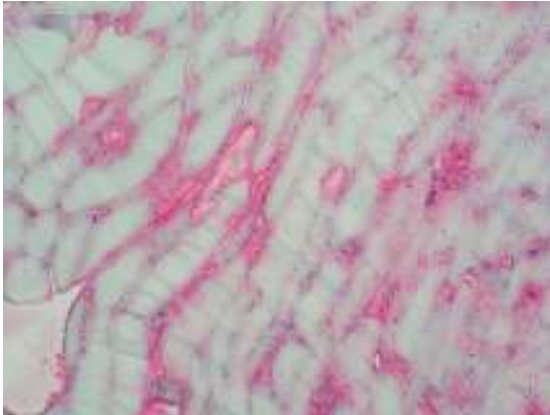


Abbildung 15: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Muskelgewebe. Immunhistologische Darstellung von human-Albumin, Primärantikörperverdünnung 1:5000. Vergrößerung 10-fach. Das Zytoplasma der Muskelzellen zeigt kein positives Signal im Sinne einer Negativkontrolle. Im Bereich zwischen den Muskelzellen stellt sich präzipitiertes Albumin der durchbluteten Areale dar.

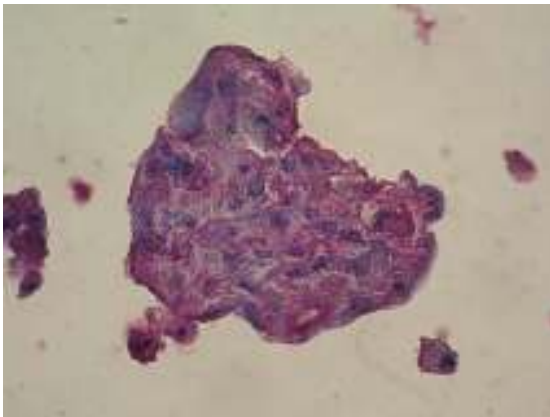


Abbildung 16: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humane Lebersphäroide der Isolation vom 08.11.01 nach 8 Tagen Flusskultur. Immunhistologische Darstellung von human-Albumin, Primärantikörperverdünnung 1:5000. Vergrößerung 40-fach. Das Zytoplasma der meisten Zellen zeigt ein positives Signal für Albumin.

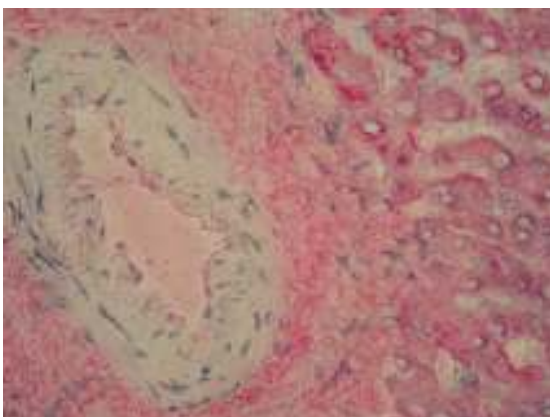


Abbildung 17: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Lebergewebe. Immunhistologische Darstellung von α -1-Antitrypsin, Vergrößerung 40-fach. Das Zytoplasma der Hepatozyten ist deutlich positiv angefärbt (rechts). Die blässere Anfärbung des Bindegewebes (links) ist unspezifisch.

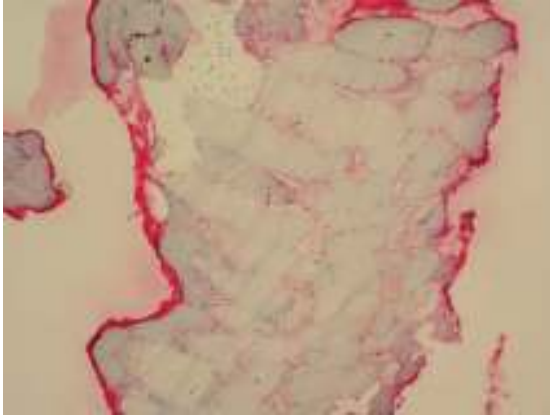


Abbildung 18: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Muskelgewebe. Immunhistologische Darstellung von α -1-Antitrypsin. Vergrößerung 10-fach. Das Zytoplasma der Muskelzellen zeigt kein positives Signal im Sinne einer Negativkontrolle. An den Geweberändern zeigt sich ein unspezifisches Signal auf Grund von Blut am Muskelbiopsiegewebe.

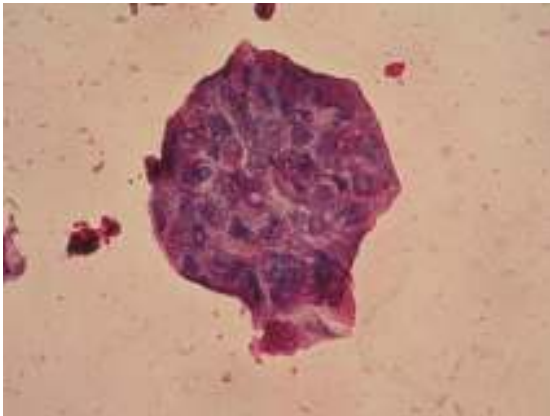


Abbildung 19: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humane Lebersphäroide der Isolation vom 08.11.01 nach 8 Tagen Flusskultur. Immunhistologische Darstellung von α -1-Antitrypsin. Vergrößerung 40-fach. Das Zytoplasma der Zellen zeigt ein positives Signal für α -1-Antitrypsin.

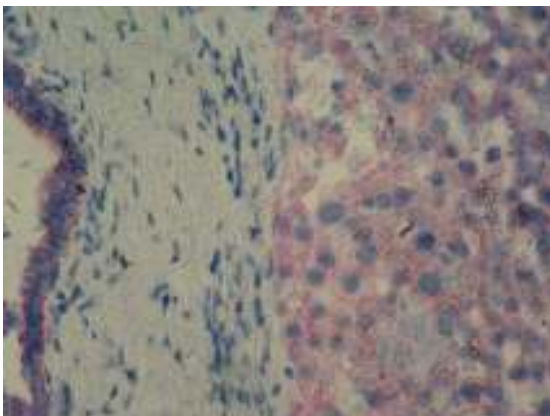


Abbildung 20: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Lebergewebe. Immunhistologische Darstellung von Zytokeratin 18, Vergrößerung 40-fach, Primärantikörperverdünnung 1:500. Das Zytoplasma der Hepatozyten ist deutlich positiv angefärbt (rechts). Ebenso positiv angefärbt ist das Epithel des Gallenganges.



Abbildung 21: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humanes Muskelgewebe. Immunhistologische Darstellung von Zytokeratin 18. Vergrößerung 10-fach, Primärantikörperverdünnung 1:500 . Das Zytoplasma der Muskelzellen zeigt kein positives Signal im Sinne einer Negativkontrolle.

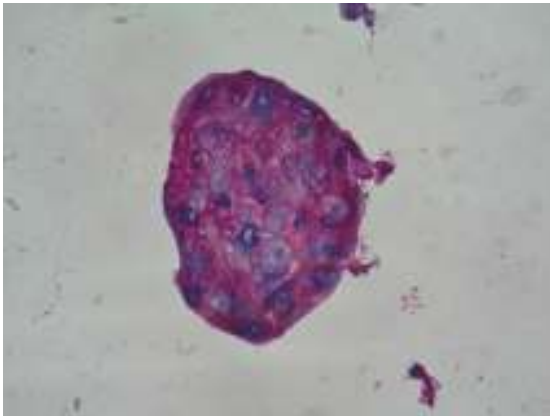


Abbildung 22: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humane Lebersphäroide der Isolation vom 08.11.01 nach 8 Tagen Flusskultur. Immunhistologische Darstellung von Zytokeratin 18, Primärantikörperverdünnung 1:500. Vergrößerung 40-fach. Das Zytoplasma der Zellen zeigt ein positives Signal für Zytokeratin 18.

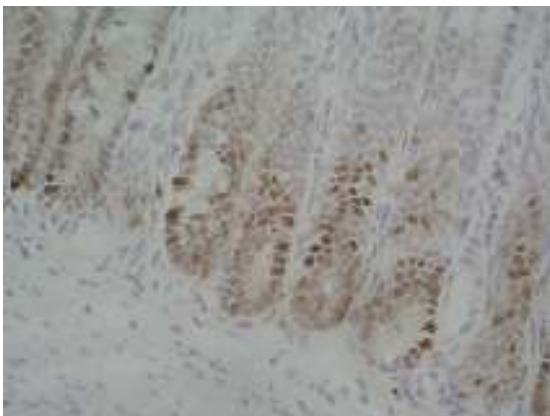


Abbildung 23: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, Ratten-Darmschleimhaut. Immun-histologische Darstellung von PCNA. Vergrößerung 40-fach. Es zeigen sich Anfärbungen der Zellkerne in den Tiefen der Krypten der Darmschleimhaut als Zeichen der Proliferationsvorgänge zur Regeneration des Epithels im Sinne einer Positivkontrolle.

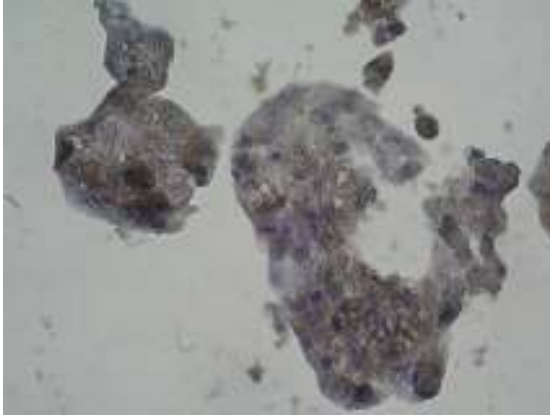


Abbildung 24: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humane Lebersphäroide der Isolation vom 08.11.01 nach 8 Tagen Flusskultur. Immunhistologische Darstellung von PCNA. Vergrößerung 40-fach. Im kleineren linken Sphäroid zeigen sich einzelne Kerne positiv angefärbt, so dass hier von vereinzelt proliferativen Vorgängen ausgegangen werden kann.

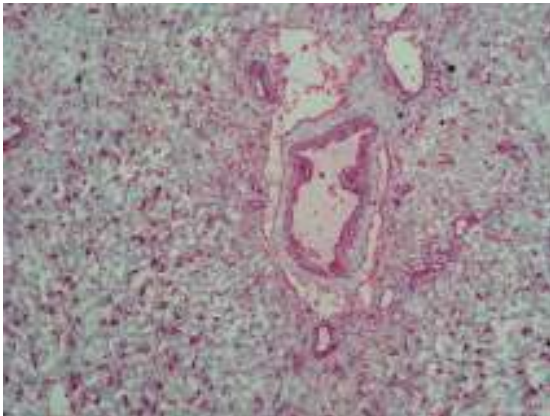


Abbildung 25: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Lebergewebe. Immunhistologische Darstellung von Vimentin, Vergrößerung 10-fach. Es sind die einzelnen versprengten Zellen mesenchymalen Ursprungs durch das rote Signal dargestellt.

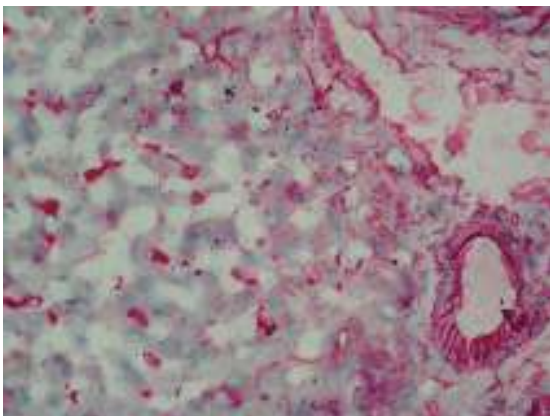


Abbildung 26: Feingewebliches Gefrierschnittpräparat, 5 μ m Schichtdicke, humanes Lebergewebe. Immunhistologische Darstellung von Vimentin, Vergrößerung 40-fach. Es sind die einzelnen versprengten Zellen mesenchymalen Ursprungs durch das rote Signal dargestellt. Die Hepatozyten zeigen kein Signal als Zeichen ihres epithelialen Ursprungs.

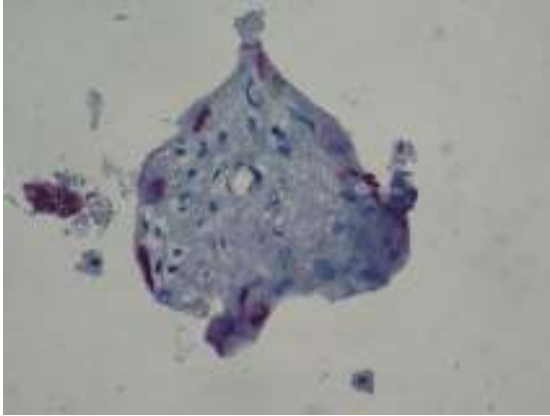


Abbildung 27: Feingewebliches Gefrier-schnittpräparat, 5 µm Schichtdicke, humaner Lebersphäroid der Isolation vom 08.11.01 nach 8 Tagen Flusskultur. Immunhistologische Darstellung von Vimentin. Vergrößerung 40-fach. In den äußeren Bereichen des Sphäroids zeigen vereinzelte rote Signale die Anwesenheit von Zellen mesenchymalen Ursprungs an.

Die Sphäroide in der Kultur zeigen an allen Phasen der Kultur ein positives Signal für Albumin und α -1-Antitrypsin (Abbildungen 16 und 19). Insgesamt erscheint das Signal in den Sphäroid-Präparaten etwas schwächer als in den Vergleichspräparaten mit humanem Lebergewebe. Es wurde in Vorversuchen an Präparaten mit humanem Lebergewebe die optimale Antikörperversdünung heraufgeführt, bei der sich das Verhältnis zwischen Signal und unspezifischer Hintergrundfärbung am besten darstellt und sich innerhalb des Gewebepreparates Areale mit unterschiedlicher Signalstärke als Zeichen der unterschiedlichen Funktionseinbindung in die Syntheseleistung innerhalb des Organs zeigt. Diese Antikörperversdünungen wurden auf die Sphäroid-Präparate übertragen. Mit dem Antikörper gegen CK-18 wurde in gleicher Weise verfahren, mit der Einschränkung, dass sich hier keine Areale unterschiedlicher Aktivität innerhalb des Organs zeigten, da es sich um zelleigene Strukturen des Zytoskelettes handelt. Auch hier zeigte sich in allen Phasen der Kultur ein positives Signal der Zellen für CK-18 (Abbildung 22). Die parallel als Negativ-Kontrollen für Albumin, α -1-Antitrypsin und CK-18 verwendeten Muskelpräparate waren allesamt negativ für die untersuchten Antigene (Abbildungen 15, 18 und 21). An den Geweberändern zeigten sich beim Nachweis von Albumin und α -1-Antitrypsin ein positives Signal als Zeichen der unspezifischen Anlagerung an Geweberänder. Ebenso zeigen sich positive Signale zwischen den Muskelgewebeverbänden, da hier eine Durchblutung anzunehmen ist und sich die Serumproteine dort abgelagert haben (Abbildungen 15 und 18). Die Negativkontrolle für CK-18 blieb vollständig ohne Signal (Abbildung 21). Bei der Überprüfung auf das Vorhandensein nicht-epithelialer Zellen durch den Nachweis von Vimentin zeigten sich in den Sphäroiden vereinzelt positive Signale als Hinweis darauf, dass sich wenige nicht-epitheliale Zellen in die Sphäroide integriert haben (Abbildung 27). Eine vollständige Auftrennung der Zellfraktionen bei der Zellisolation durch Zentrifugation ist also nur bis zu einem gewissen Grad erfolgt.

Die Positivkontrolle bei der PCNA-Darstellung des Rattendarm-Schleimhautepithels zur Detektion von Proliferationsvorgängen zeigt deutliche Proliferationsvorgänge durch Kernanfärbungen in den basalen Schleimhaut-Krypten (Abbildung 23). In den Sphäroidpräparaten zeigte sich lediglich an zwei Sphäroiden ein Signal für PCNA von denen eines hier abgebildet ist (Abbildung 24). Alle übrigen Sphäroiden zeigten sich frei von einem Proliferationssignalen, so dass nicht von einer erhöhten Proliferationsrate ausgegangen werden kann.

Insgesamt zeigen die Zellen der Sphäroiden nach der Flusskultur morphologisch und immunhistochemisch die Merkmale humaner Hepatozyten. Es finden sich allerdings vereinzelt Zellen nicht-epithelialen Ursprungs. Anzeichen einer erhöhten Proliferationsneigung finden sich nicht.

3.9. Ergebnisse der Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der humanen Hepatozytensphäroide nach Flussbioreaktorkultur stellen diese innerhalb der Poren der PLLA-Polymer-Matrizes dar. Hier ist die kugelige Organisation der Zellen, die sich an der Außenfläche durch leichte Ausbeulungen darstellen, gut nachzuvollziehen (Abbildung 28).

Bei stärkerer Vergrößerung stellen sich die Begrenzungen der einzelnen Hepatozyten, sowie der Rasen von feinen Microvilli auf ihrer Oberflächen besser dar, was ein Hinweis auf Vitalität darstellt. Löcher und Schlitze zwischen den Hepatozyten auf der Oberfläche der Sphäroide wurden speziell an den Kontaktstellen von jeweils drei aneinander grenzenden Hepatozyten gefunden (Abbildung 29).

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnten die zellulären Elemente der zu Sphäroiden aggregierten Hepatozyten beobachtet und die typischen feinstrukturellen Charakteristika der polarisierten und aggregierten humanen Hepatozyten, einschließlich der Ausbildung von Gallecanaliculi mit Microvilli und reifen junctionalen Komplexen dargestellt werden (Abbildungen 30 und 31). Intakte Nucleoli und das Vorhandensein von reichlich Mitochondrien sowie zellmembrannähe Vesikel weisen ebenfalls auf ein intaktes Zellgefüge mit Stoffwechselaktivität hin. Es können ebenso Coated Pits und Vesikel gesehen werden, die auf eine Rezeptor vermittelte Mikropinozytose hinweisen (Abbildung 30). Ob die Öffnungen bzw. Poren zwischen den benachbarten Hepatozyten an der Oberfläche der Sphäroide Gallenkanälchen oder durch seitliche Zelloberflächen

gebildete interzelluläre Räume darstellen, ist schwer zu unterscheiden, da beide Strukturen reich an Microvilli sind (Abbildung 31).

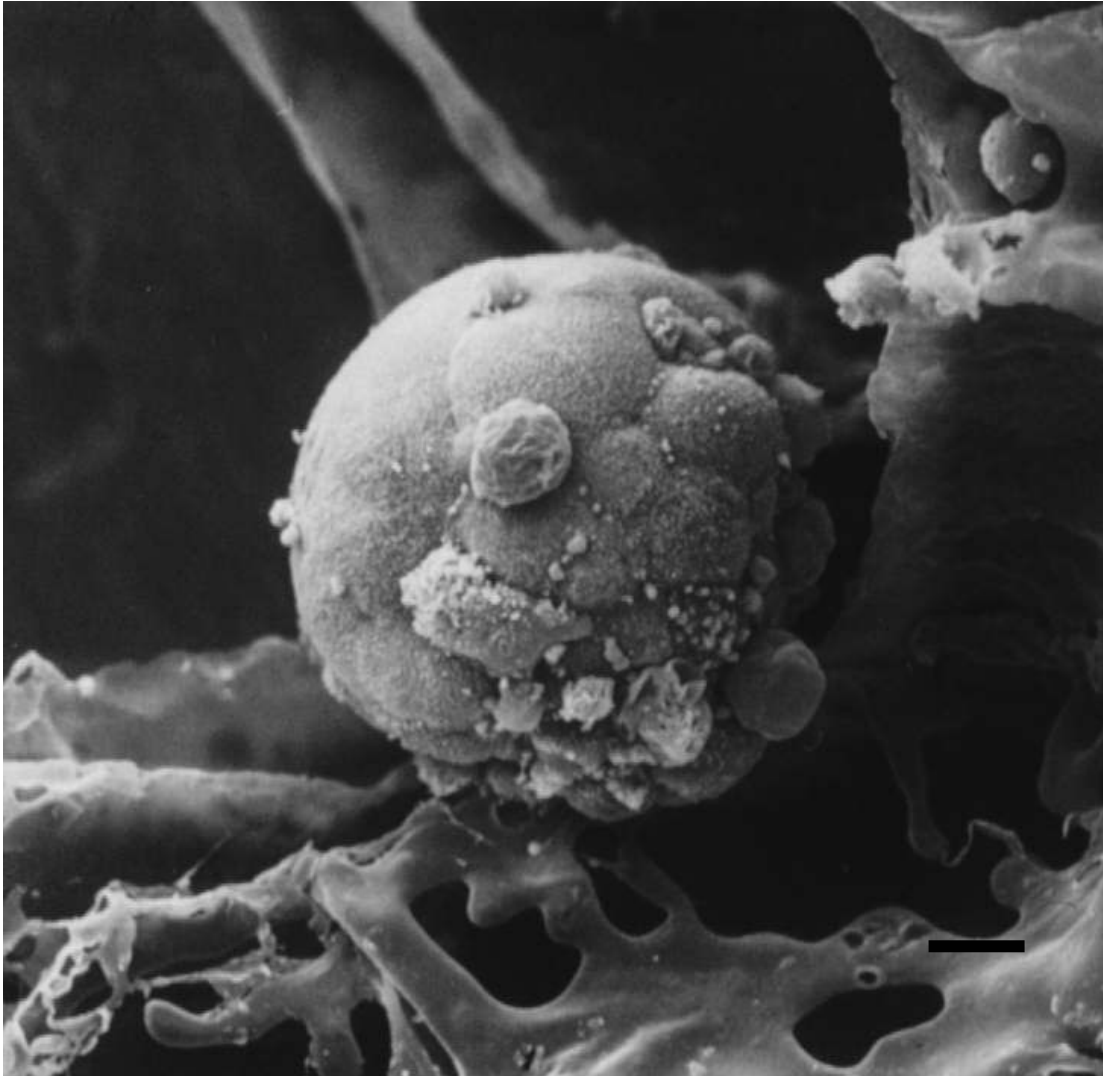


Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopie von primären humanen Hepatozyten nach 6 Tagen in Flußkultur. Die Hepatozyten bilden Sphäroide in den Poren des PLLA-Polymers. Der Meßbalken zeigt 20 μm an.

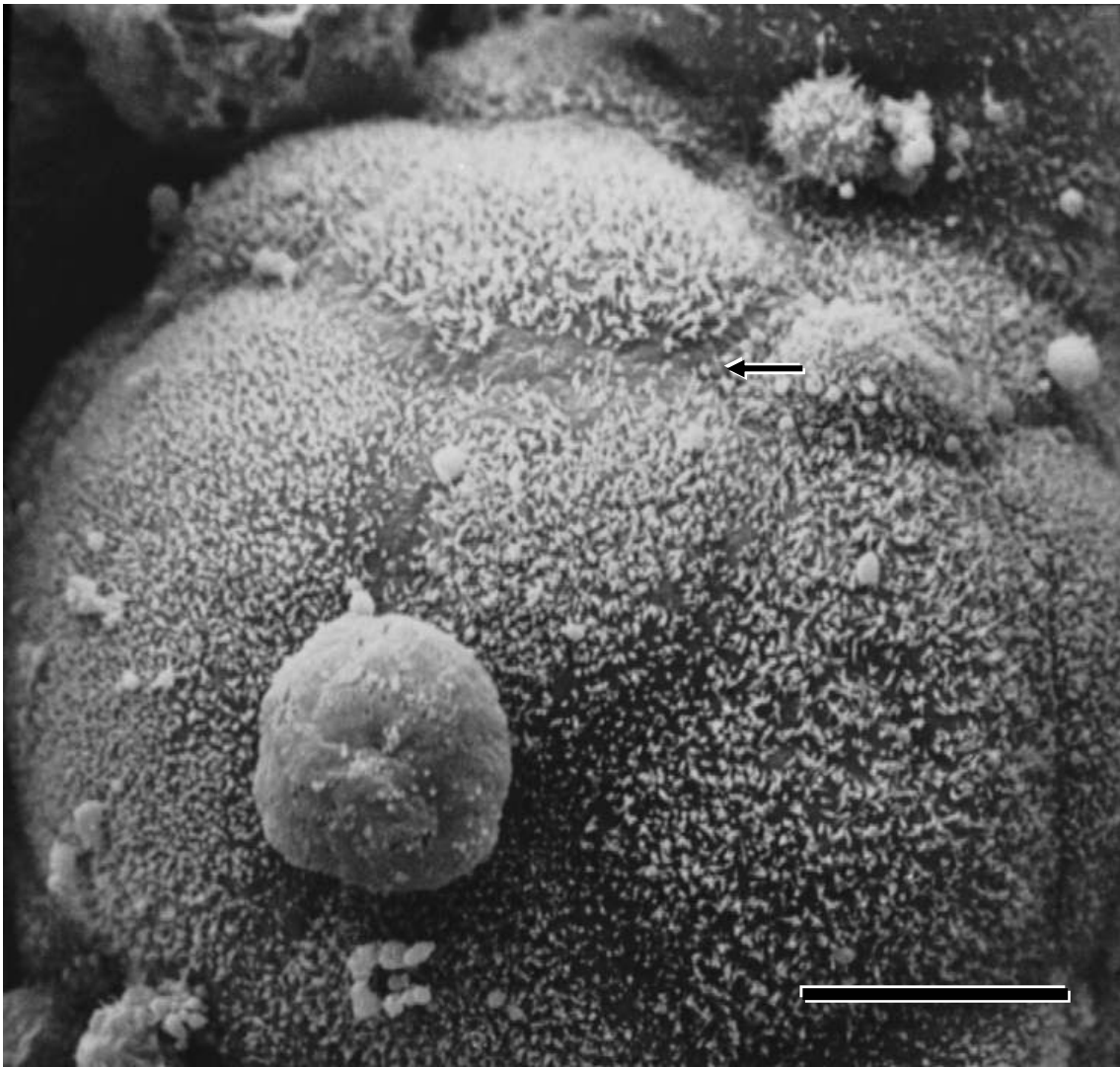


Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopie von primären humanen Hepatozyten nach 4 Tagen in Flusskultur, die sich in ein sphäroidales Aggregat organisiert haben. Die individuellen Zellen sind noch von einander abgrenzbar. Die Oberfläche der Zellen ist reichlich Microvilli besetzt. An dem mit einem Pfeil markierten Punkt grenzen 3 Hepatozyten aneinander. Der Meßbalken zeigt 12.5 μm an.

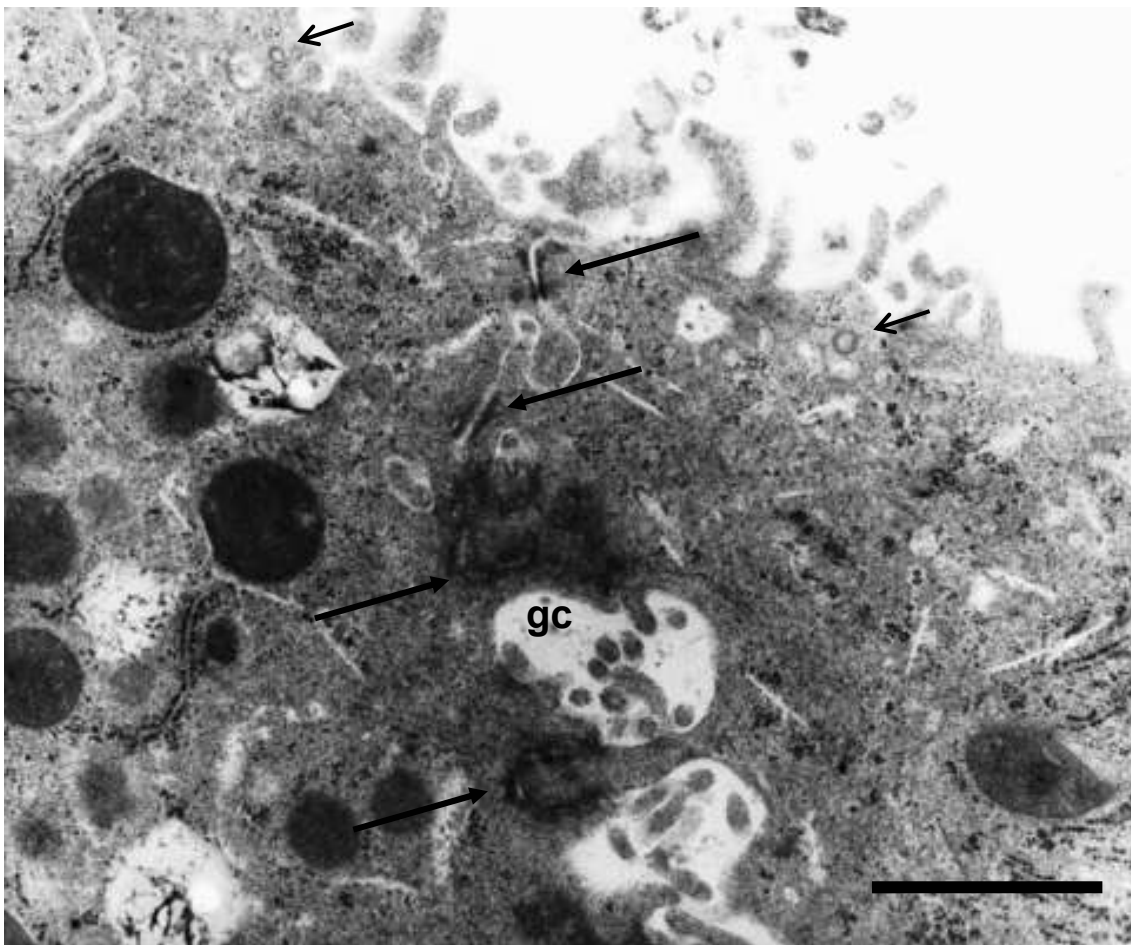


Abbildung 30: Transmissionselektronenmikroskopie eines humanen Hepatozytensphäroids nach 4 Tagen in Flusskultur. Aneinander grenzende Zellen formen Gallecanaliculi (gc) ähnelnde Strukturen mit Microvilli, die in Poren an der Oberfläche der Sphäroide münden und junctionale Komplexe (große Pfeile) zwischen den Hepatozyten ausbilden. Hier können Coated Pits und Vesikel (kleine Pfeile) gesehen werden, die auf eine Rezeptor vermittelte Mikropinozytose hinweisen. Der Meßbalken zeigt 1 μm an.

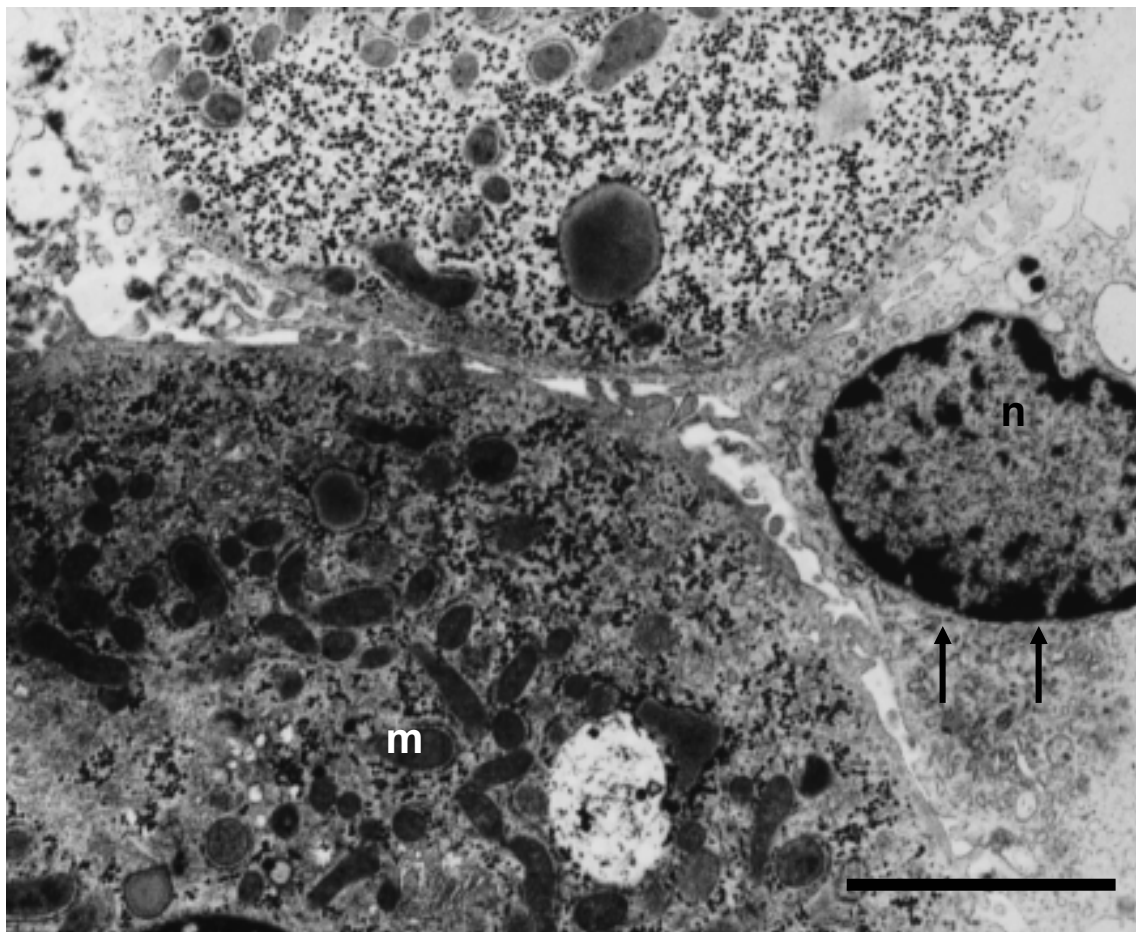


Abbildung 31: Transmissionselektronenmikroskopie eines humanen Hepatozytensphäroids nach 4 Tagen in Flusskultur. Es finden sich Gallecanaliculi zwischen den Zellen. Die Zellen innerhalb des Sphäroids sind intakt. Reichlich Glycogengranula und Mitochondrien können im Zytoplasma dargestellt werden. Als ein Zeichen von aktiver metabolischer Funktion findet sich eine runder Nucleus (n) mit Kernporen (Pfeile), die von perinukleärem Heterochromatin umgeben sind. Es sind reichlich Mitochondrien (m) sichtbar. Der Meßbalken zeigt 5 μ m an.

4. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war es, ein dreidimensionales Flusskulturmodell für die in vitro Kultur von humanen Hepatozyten, die auf PLLA-Polmerer-Matrices ausgesiedelt wurden, auf die Bildung von sphäroidalen Aggregationen zu prüfen und deren Funktionalität durch Messung der Stoffwechselleistung und Erfassung derer anatomischen Eigenschaften zu erfassen. Dieses Flusskulturmodell wurde bereits mit Rattenhepatozyten in Vorversuchen in Hinblick auf die Ausbildung von Sphäroiden und dem Nachweis von hepatozytenspezifischen Funktionsleistungen erfolgreich getestet [54, 70-72].

Hintergrund dieser Arbeit ist die Suche nach Alternativen zur Lebertransplantation. Die Lebertransplantation stellt bis heute die ultimative Therapie bei akutem und chronisch-fortgeschrittenem Leberversagen dar. Trotz Verbesserungen der Operationstechniken, des Verteilungsverfahrens von Spenderorganen, der Einführung der Leberlebendspende [9] und der Split-Leber-Transplantation [57], besteht bei nur leicht ansteigender Zahl der Organspenden und überdeutlich ansteigender Zahl neuangemeldeter Patienten zur Lebertransplantation ein Mangel an Spenderorganen [1, 2].

Ein Weg, dem Organmangel zu begegnen, könnte der Ansatz der Leberzelltransplantation sein. Im Falle einer Transplantation autologer Zellen fiel die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie mit all den Nebenwirkungen und Komplikationen einer Abstoßungsreaktion weg. Im Falle einer allogenen Transplantation von Leberzellen könnte ein Spenderorgan Zellmaterial für mehrere Empfänger bereitstellen.

Ein Hauptproblem bei der Transplantation von Zellen ist der große Zellverlust nach Transplantation. Durch den Verlust von Zell-zu-Zell-Kontakten werden Apoptosevorgänge eingeleitet [16]. In Versuchen mit Rattenhepatozyten haben sich sphäroidale Aggregationen überlegen gegenüber Einzelzell- oder Monolayerkulturen in Hinblick auf Überlebensraten, Syntheseleistungen und Widerstandsfähigkeit gezeigt [28, 43, 51, 52]. Versuche der Transplantation von Rattenlebersphäroiden in die Milz [62] und in das Peritoneum [23] waren erfolgreich getestet und den Einzelzelltransplantation bei Syntheseleistung und Überlebensrate als überlegen befunden worden.

Bei Injektionen von Zellsuspensionen oder Sphäroidsuspensionen in Organe wie die Milz oder Leber besteht die Gefahr des embolischen Verschlusses der Gefäße mit nachfolgendem Gewebeschaden, so dass nur kleine Mengen in einem Transplantationsschritt injiziert werden können und so viele gleichartige Eingriffe erfolgen

müssten [59]. Diese wären mit einer kumulativen Komplikationsrate behaftet und bietet sich als Methode wegen des hohen technischen Aufwandes nicht an.

Neben der nicht ausreichenden Immunsuppression war das Problem der geringen injizierbaren Zellmenge die Hauptursache für die schwächeren, aber hoffnungsvollen Ergebnisse bei der experimentellen klinischen Therapie von Patienten mit angeborenen Enzymdefekten wie familiärer Hypercholesterinämie, Crigler-Najjar-Syndrom Typ I und Ornithintranscarbamylasemangel.

Bei der Transplantation von autologen, durch Injektion per Pfortader in die Leber eingebrachten Hepatozyten von einer Patientin, die ex vivo einer retroviralen Gentherapie zur Ausbildung des LDL-Rezeptors unterzogen wurde, zeigte sich eine Senkung des LDL/HDL-Verhältnisses von 10-13 auf 5-8 über 18 Monate, bei $1,1 \times 10^9$ injizierten Zellen und einer Transduktionseffizienz von 20% [20]. Postoperativ wurden bei dieser und vier weiteren Patienten gleicher Behandlung Anstiege von Transaminasen und Leukozyten im Blut sowie des portalen Venendruckes beobachtet, die sich innerhalb weniger Tage wieder normalisierten [56].

Durch Transplantation von $7,5 \times 10^9$ allogenen Hepatozyten (entsprechen etwa 5 % der menschlichen Leberzellmasse) bei einem Patienten mit Crigler-Najjar-Syndrom Typ 1 konnte eine 5%-ige Korrektur der UDP-Glucuronyltransferase-Enzymaktivität nach 11 Monaten festgestellt werden [15].

Ein frisch geborener Säugling mit schwerem Ornithintranscarbamylasemangel erhielt während der ersten 3,5 Lebenswochen fraktioniert Transplantationen von insgesamt 4×10^9 allogener Leberzellen in die Leber über einen Umbilikalkatheter. Bis zum 31. Lebenstag normalisierte sich der Stickstoff- und Ammoniakhaushalt. Wegen einer Abstoßungsreaktion bei insuffizienter Immunsuppression musste allerdings die Organtransplantation erfolgen [25].

Um eine leichtere Handhabbarkeit bei der Implantation zu erreichen, den Hepatozyten ein Gerüst zu geben, sowie den Zellverlust bei dem Transplantationsvorgang selbst durch Immobilisation gering zu halten, bietet sich die Kultur der Hepatozyten zur Sphäroidbildung mit den Methoden des Tissue Engineerings auf einer biokompatiblen Matrix an, die in den Empfängerorganismus implantiert und diese von ihr abgebaut werden kann [55]. Es konnte anhand eines Rattenmodells gezeigt werden, dass sich mit der Methode der Transplantation von Hepatozyten und mit Hilfe einer Polymer-Matrix Zellenmengen mit einem Äquivalent zu einem vollständigen Organ transplantieren lassen [74]. Somit könnte eine ausreichende Zellmenge transplantiert werden. In Langzeitstudien konnte ebenfalls am Rattenmodell gezeigt werden, dass nach anfänglich hohem

Zellverlust von mit Rattenhepatozyten besiedelten Polymermatrices nach Implantation in das Peritoneum eine Regeneration der überlebenden Zellen mit Zunahme der Zellzahl auf das zehnfache nach 12 Monaten erreicht werden konnte [27], was das große Proliferationspotenzial der Hepatozyten widerspiegelt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte in einer Langzeitstudie gezeigt werden, dass durch Flusskultur auf PLLA-Matrices zu Sphäroiden aggregierte Rattenhepatozyten nach heterotoper Transplantation in das Peritoneum syngener Ratten eine höhere Überlebensrate im Vergleich zu auf PLLA-Matrices ausgesiedelte Rattenhepatozyten ohne vorheriger Flusskultur und sphäroidaler Aggregation aufwiesen [38].

In der Vereinigung von Vorteilen, einerseits in der Möglichkeit der Transplantation einer ausreichenden Zellmenge durch Nutzung von bioabbaubaren Polymer-Matrices, andererseits in der Möglichkeit, durch Vorkultur der Hepatozyten die Ausbildung von Zellaggregationen mit Ausbildung von Extrazellulärmatrix und Zell-zu-Zell-Kontakten zu konditionieren und somit die initiale Überlebensrate zu erhöhen, liegt die Vorstellung dieser Arbeit, die Effektivität der Zelltransplantation zu verbessern.

In dieser Arbeit wurden Hepatozyten aus humanem Lebergewebe isoliert und diese analog zu dem Rattenhepatozytenmodell in einer Konzentration von 10×10^6 Zellen /ml mit 400 µl besiedelt. Die Zellen wurden aus nicht transplantierten Organen oder Organresten sowie aus tumorfreien Operationsresektaten mittels Kollagenaseverdau in Anlehnung an die Methoden zur Rattenhepatozytenisolation nach Seglen [65], modifiziert von Aiken et al. [3] sowie in Anlehnung an die Methoden zur Isolation von humanen Hepatozyten aus kompletten oder Splitleberorganen nach Dorko et al. [12], isoliert. Hierbei wurde der Isolationserfolg anhand der Gesamtzahl und Prozentsatz der vitalen Zellen dokumentiert. Es wurde festgestellt, ob sich unter den gleichen Kulturbedingungen, wie es sich zur Ausbildung von Sphäroiden aus Rattenleberzellen als günstig erwiesen hatte, ebenfalls Sphäroiden aus humanen Hepatozyten bildeten. Die Kinetik der Sphäroidentwicklung bezüglich der Sphäroidanzahl und –Größe wurde durch mikroskopische Auszählung und Ausmessung über den Zeitverlauf sowie durch quantitative DNA-Messungen über den Zeitverlauf ermittelt. Es wurden anhand von histologischer Aufarbeitung mittels HE-Färbung morphologische Merkmale erfasst und beschrieben und mit Hilfe immunhistochemischer Detektion leberspezifische Merkmale, wie den Nachweis von Albumin, α -1-Antitrypsin und Cytokeratin 18, nachgewiesen. Die Stoffwechselleistung wurde anhand der Bestimmung leberspezifischer Syntheseprodukte wie Albumin und α -1-Antitrypsin mittels ELISA-Methode sowie Harnstoff photometrisch-

enzymkinetisch quantifiziert. Ergänzend wurde durch mRNA-Messung mit der Northern-Blot-Methode der Albuminanstieg im Kulturmedium die tatsächliche neue Syntheseleistung von Albumin dokumentiert. Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mikroanatomische Merkmale mit dem Nachweis von Vitalitäts- und Stoffwechselzeichen beschrieben.

Die Resultate dieser Arbeit finden sich im Ergebnisteil im Kapitel 3 und werden im folgenden diskutiert.

4.1. Isolation humaner Hepatozyten

Es wurden 16 Versuche der Isolation von humanen Hepatozyten unternommen. Als Quelle für die Zellen dienten acht Reste Größenreduzierter Transplantatorgane, vier wegen Kontraindikationen wie Organverfettung oder zerstörter Anatomie abgelehnte Spenderorgane und vier Operationsresektate bei Tumoroperationen (Tabelle 3.1.).

Da aufgrund von Verbesserungen der Operationsmethoden bei der Resektion von Tumoren der Leber mit atypischen Resektionen, die sich nicht an die anatomischen Lebersegmentgrenzen halten, und so dem Patienten möglichst viel eigenes gesundes Lebergewebe erhalten, war die Menge an Möglichkeiten zur Gewinnung gesunden humanen Lebergewebes durch Kollagenaseperfusion limitiert. Durch Verbesserungen der Operationstechniken im Bereich der Lebertransplantation durch Splitting der Organe, waren nur selten Organreste von Größenreduzierten Transplantaten zu erhalten. Die Anzahl der wegen mangelhafter Organqualität abgewiesenen Transplantationsorgane ist wegen der vorherigen sorgfältigen prä- und perioperativen Beurteilung der Spenderorgane bei der Organentnahme gering und stellte ebenfalls keine zuverlässige Quelle für Zellmaterial dar. Die Schwierigkeit, humanes, qualitativ gutes und vitales Lebergewebe in ausreichender Menge zu erhalten spiegelt sich in der Heterogenität der Bezugsquellen für die Hepatozyten wider.

Im Versuchsdesign konnten für die Quelle des Zellmaterials nur die Kalt- und Warmischämiezeit sowie die anatomisch-technische Erforderlichkeit eines umkapselten Endstromgebietes mit ausreichender Möglichkeit Perfusion der kapillären Lebersegment-Endstromgebiete aufgenommen werden. Alter und Geschlechtsursprung der Organe, anatomischer Bereich der zur Zellisolation mit Kollagenase perfundierten Lebersegmente, der Zustand der Organe mit unterschiedlichem Grad der Verfettung und des Anteils an bindegewebigen Umbaus wurden nicht als Kriterien in den Versuchen einbezogen.

Die Isolationsergebnisse reichten von einer Zahl isolierter vitaler Zellen von weniger als 100000 Zellen bis $9,9 \times 10^{12}$ Zellen und es zeigte sich somit ein recht unterschiedlicher Isolationserfolg. Die Vitalität der Isolierten Zellen lag im Mittel bei 74 % bei Werten zwischen 60 und 89 %. Es war nur bei zehn Isolationen möglich, die Vitalitätsgrenze von 80 % für eine weitere Zellkultur zu erreichen (Tabelle 3.1.). Somit konnte bei erheblicher Variabilität bei der Zahl der isolierten vitalen Zellen und deren prozentualer Vitalität kein allgemeingültiges Standardprotokoll zur sicheren Isolation von vitalen humanen Hepatozyten in ausreichender Zahl aufgestellt werden. Zur klinischen Anwendung der Isolation von humanen Hepatozyten in vivo oder ex vivo müssten weitere Versuche zur Definition eines geeigneten Stromgebietes der Leber mit Findung eines technischen Standards erfolgen. Weiterhin müssten die Techniken und die Agenzien, wie etwa die Findung einer optimalen Kollagenasemischung, für die Anwendung an humanem Lebergewebe angepasst werden. Dorko et al. beschrieben bereits 1994 eine Methodik zur Isolation von humanen Hepatozyten aus ganzen Leberorganen oder Split-Leber-Resektaten unterschiedlichsten Ursprungs und Qualität mit ebenfalls heterogenem Erfolg in der erreichten Vitalität. Diese Gruppe empfahl auf Grund ihrer Ergebnisse die Perfusion mit Kollagenase via Pfortader [12]. Die anatomischen Verhältnisse der Resektate waren in dieser Arbeit zum Teil erheblich zerstört. Es mussten Gefäßöffnungen einer Schnittrandfläche zur Perfusion mit den Lösungen katheterisiert werden. Es war größtenteils nicht möglich, zwischen venösen und portalvenösen Gefäßanschnitten zu unterscheiden, so dass sich hier eine mögliche Fehlerquelle in der Perfusion eines nicht optimalen Gefäßes zeigt.

4.2. Besiedelungseffektivität der PLLA-Polymer-Matrix

In vorherigen Experimenten wurde die optimale Konzentration der Hepatozyten-Zellsuspension und die Menge der Hepatozyten zur Besiedelung der PLLA-Polymer-Matrix mit Rattenhepatozyten ermittelt [70-72]. Um den Zellen die Möglichkeit zur Formierung von Sphäroiden in geeigneter Größe zu geben, betrug die Porengröße der Polymere 250 bis 400 μm [39], da sich gezeigt hatte, dass sich bei Zellaggregationen ab 150 μm Durchmesser zentrale Nekrosen zeigten [52].

Bei den Besiedelungen der Polymere zeigte sich regelmäßig ein von Zellsuspension getrüübter Überstand, der in der Petrischale zurückblieb. In einer exemplarischen Doppelbestimmung konnte ein Zellverlust von 72,77 % allein bei der Besiedelung der

beiden Polymere nachgewiesen werden. Nach 2 Tagen Kulturlaufzeit in der Flusskultur finden sich lediglich 7,7% der Ausgangsmenge der Zellen auf den Polymeren wieder (Tabelle 3.21 und Diagramm 3.10). Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich von den 4×10^6 Zellen, die ursprünglich auf den Polymeren ausgesiedelt wurden, ca. 1100000 Zellen beim Aussiedeln auf dem Polymer verbleiben und in der Größenordnung von ca. 30000 bis 120000 Zellen (siehe Messergebnisse der anderen Kulturansätze) nach zwei Tagen Flusskultur noch auf dem Polymer befinden. Diese Werte sind als Angabe von Größenordnungen zu verstehen, da die Polymere einzeln ein individuelles Fassungsvermögen aufgrund der individuellen Herstellung haben.

Bei einem rechnerischen Fassungsvermögen der Polymere mit bis zu 98-prozentiger Porosität und Abmessungen von 1,8 cm Durchmesser und 0,1 cm Höhe von ca. 278 μl (ohne Berücksichtigung der Oberflächenspannung des Zellmediums) ist das gewählte Volumen zur Besiedelung mit 400 μl zu groß und stellt einen systematischen Fehler dar und erklärt einen großen Teil des Zellverlustes bei der Besiedelung. Es kann also nicht von einer Besiedelung von 4×10^6 Zellen ausgegangen werden, was sich in der Größenordnung bei der Bestimmung der Syntheseleistungen und des DNA-Gehaltes widerspiegelt, wollte man den direkten quantitativen Vergleich zu anderen Zellkulturverfahren ziehen. Für die qualitativen Aussagen dieser Arbeit hat dieser Fehler allerdings keine Bedeutung.

4.3. PLLA-Polymer-Matrix

Die von uns verwendeten PLLA-Polymer-Matrices wurden in kleinen Margen und unterschiedlichen Chargen in Handarbeit nach der Salt-Leaching-Technik von Prof. Ma hergestellt [39]. Salzkristalle mit einer Größe von 250 bis 400 μm werden mit einer PLLA-Lösung vermischt, das Lösungsmittel anschließend entfernt und die Salzkristalle in einem weiteren Arbeitsschritt herausgelöst, so dass das PLLA-Polymergerüst verbleibt. So lässt sich eine gute Kontrolle der Porengröße erreichen. Allerdings bleibt die Verbindungsrate zwischen den einzelnen Poren nur schlecht beeinflussbar, so dass Poren verschlossen bleiben können.

Aufgrund der Heterogenität der Porenbeschaffenheit und den Unterschieden in den einzelnen Polymer-Chargen und Margen bei nicht industriell standardisierter Produktion sind Unterschiede in der Fähigkeit Zellen aufzunehmen erklärbar. Bedingt durch das Herstellungsverfahren haben die Polymere eine offene Fläche mit geöffneten Poren und eine Fläche mit nur wenigen und kleineren Porenöffnungen. Dieses kann sich beim

Besiedeln der Polymere einerseits und beim Einsetzen der Polymere in das Kultursystem andererseits auf den Besiedlungserfolg und die nachfolgende Kultur auswirken, dann nämlich, wenn die offene oder geschlossene Fläche zur oder gegen die Flussrichtung des Kulturmediums zeigt.

Dieses macht eine Vergleichbarkeit der Besiedlung und der qualitativen sowie quantitativen Funktionsanalysen schwierig. So kann ein Teil der großen Streubreite, die sich auch innerhalb der einzelnen Kulturansätze bei den Analysen ergeben hat, erklärt werden.

In der Zwischenzeit haben sich die Techniken zur Kontrolle der dreidimensionalen Struktur mittels Verfahren wie „solid free-form fabrication (SSF)“ und Stereolithographie verfeinert [44].

Des Weiteren werden in der aktuellen Forschung Polymere verwendet und entwickelt, die mit Wachstumsfaktoren und anderen Liganden gekoppelt werden, um eine schnellere und effektivere Vaskularisation der Zellen nach Transplantation zu erreichen [66].

4.4. Bildung von Sphäroiden aus humanen Hepatozyten in der Flusskultur

Ein großes Problem der Zelltransplantation von Hepatozyten stellt der hohe Zellverlust nach Transplantation dar, der auf Apoptosevorgänge [16] und Anoikis durch den Verlust von Zell-zu-Zellkontakten und der Extrazellulärmatrix zurückgeführt wird. Die Verbesserungen der Überlebensrate in vitro und nach Transplantation sowie der Syntheseleistungen durch sphäroidale Zellaggregationen mit Ausbildung von Zell-zu-Zellkontakten und Extrazellulärmatrix wurden bereits für Rattenhepatozyten beschrieben [23, 28, 43, 52, 62]. Sphäroidbildungen von humanen Leberzellen in statischen Kulturen mit dem Nachweis von Leberzelltypischen Syntheseleistungen wurden ebenfalls beschrieben [69]. Es wird angenommen, dass durch eine Vorkultur von Hepatozyten zur Ausbildung von Sphäroiden mit Ausbildung leberähnlicher Struktur ein Vorteil gegenüber der Transplantation von Einzelzellsuspensionen ist.

In dieser Arbeit sind Kulturversuche von zehn – anhand von prozentualer Zellvitalität und absoluter vitaler Zellzahl – vorausgewählten Zellisolationen humaner Hepatozyten unternommen worden. In sechs Kulturläufen konnten am vierten Tag durchgehend Ausbildungen von sphäroidalen Aggregationen beobachtet werden (Tabelle 3.2). Dieses zeigt die prinzipielle Möglichkeit der humanen Hepatozyten, unter den für Rattenhepatozyten günstigen Flusskulturbedingungen ebenfalls sphäroidale Strukturen

ausbilden zu können. Es ist denkbar, dass sich klar abgrenzbare Sphäroide auch schon ab dem dritten Tage in Flusskultur ausbilden. An diesem Tag fand allerdings keine Polymerentnahme zu Beobachtung statt, so dass hier keine genauere Aussage zum Zeitpunkt des Beginns der Sphäroidbildung gemacht werden kann.

Eine statistische Signifikanz über die Reproduzierbarkeit und über die Aussage von den erfassten Einflussvariablen wie Zellursprung ist bei der geringen Anzahl von erfolgreichen Zellisolationen nicht zu machen. Es zeigte sich je ein Erfolg und Misserfolg mit Sphäroidbildung bei den wegen höhergradiger Steatosis hepatis abgelehnten Organen. Zwei Kulturläufe mit Sphäroidbildung stehen drei Kulturläufen ohne Sphäroidbildung bei den kultivierten Zellen aus größenreduzierten Transplantaten gegenüber. Auffällig ist allein, dass alle drei Kulturläufe mit Leberzellen aus Operationsresektaten eine Sphäroidbildung zeigten. Es ist möglich, dass durch die lange kalte Ischämiezeit der Transplantorgane ein irreversibler Zellschaden entstanden ist und dadurch die Fähigkeiten der Hepatozyten, sich zu Sphäroiden zusammenzuschließen, trotz anfänglich ausreichender Vitalität, verlorengegangen ist. In der Transplantationsmedizin werden bei Lebertransplantationen Kaltischämiezeiten von 12 bis 15 Stunden toleriert. Die entstandene warme Ischämiezeit bei den Operationsresektaten vor der Perfusion der kalten Konservierungslösung betrug maximal zwei Stunden und war zum Überleben des Großteils der isolierten Zellen offenbar ausreichend.

4.5. Kinetik der Sphäroide hinsichtlich Größe und Anzahl in der Flusskultur

Um eventuelle Entwicklungen in der Größe und Anzahl der sich in der Flusskultur bildenden Sphäroide zu erkennen, wurden die Sphäroidaggregationen auf den Polymeren unter dem Phasenkontrastmikroskop nach vorher definiertem Prozedere ausgezählt und deren Querdurchmesser vermessen. Dieses erfolgte auch in Hinblick auf die Identifizierung eines optimalen Zeitpunktes einer Entnahme aus der Kultur zu einer eventuellen Transplantation. Hier dienten als Vorlage die Untersuchungen von Peshwa et al. [52], welche die Kinetik der Sphäroidbildung von Rattenhepatozyten in statischer Kultur hinsichtlich unter anderem Sphäroidgröße und Syntheseleistungen über die Zeit beschrieb. Auch Peshwa et al. beschrieben Nekrosebildungen in Sphäroiden mit einem Durchmesser ab 150 µm, so dass ein geeigneter Zeitpunkt für eine Transplantation bei vorhandener Kinetik im Sinne von Wachstum jener wäre, bei dem die meisten Sphäroide einen kleineren Durchmesser haben. Peshwa et al. beschrieben die Sphäroidbildung in

einer statischen Kultur, in der die Bildung von Sphäroiden aus den am Grund liegenden Zellen beschrieben wurde, deren Anzahl über die Zeit mit dem Wachstum der Sphäroiden geringer wurde. Die beschriebene Größenzunahme war in diesem Falle wohl nicht durch Proliferation sondern durch numerischen Zellzuwachs durch bisher nicht in Sphäroiden organisierte Hepatozyten, die über die Zeit aber in die Zellverbände integriert wurden, bedingt.

Die Methode der Sphäroidgrößenbestimmung erfolgte mit einem Messokular mittels Phasenkontrastmikroskopie. Es wurden zufällig zehn verschiedene Sphäroide eingestellt, die sich je nach wiederholter Bewegung des Objektes in der Nähe des Zentrums des Sichtfeldes befanden. Die Bestimmung der Größe selbst unterliegt den Schwankungen des Untersuchers, der anhand einer Phasentrennung eines dreidimensionalen Objektes nur Angaben im Bereich von 10 μm -Schritten machen kann. Die Auswahl der zehn vermessenen Sphäroide unterliegt einer gewissen Subjektivität und Suggestivität des Untersuchers, wenn herausgefunden werden soll, ob ein Trend zu Wachstum vorliegt oder nicht. Die meisten Sphäroide liegen in einer reinen Kugelform vor, so dass die Bestimmung nur eines Diameters als ausreichend bezeichnet werden kann. Es wurde sich um größtmögliche Objektivität bei der Auswahl der zehn Sphäroide je Polymer bemüht.

Die Ergebnisse der Messung der Sphäroiddurchmesser zeigen eine große Standardabweichung auch innerhalb der einzelnen Polymere. Ein eindeutiger Trend im Sinne von Wachstum oder Schrumpfung ist hierbei nicht erkennbar. Die Trendlinie zeigt vielmehr eine Stagnation der erstmals erreichten Größe der Sphäroide (Tabelle 3.4., Tabelle 3.5 und Diagramm 3.2). Die von Peshwa et al. beschriebene Kinetik von Rattenleberzellsphäroiden ist in diesen Experimenten nicht nachvollziehbar. Dieses ist wohl vor allem darauf zurückzuführen, dass sich die Sphäroiden innerhalb von wabenartigen Hohlräumen von 250 bis 400 μm Durchmesser formieren müssen. Innerhalb dieser Hohlräume ist die Anzahl der Leberzellen limitiert, so dass sich nur eine begrenzte Anzahl an Sphäroiden bilden kann. Die Größe der Hohlräume gibt die Menge der zur Verfügung stehenden Zellen als auch die maximale Raumausdehnung vor. In sofern ist dieser Ansatz von Vorteil, weil keine wesentlich größeren Sphäroide entstehen können. Im Durchschnitt sind die Sphäroiden über den Zeitverlauf zwischen 140 bis 160 μm groß, was an der beschriebenen Grenze zur Ausbildung von Nekrosen innerhalb der Sphäroiden liegt. Hier könnte die Wabengröße verkleinert werden, um die Zellmenge und damit die Durchschnittsgröße der Sphäroiden geringer zu halten.

Zur Erfassung einer Veränderung der Anzahl der Sphäroiden wurden die Polymere mit dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Dabei wurde je ein volles Sichtfeld mit dem Feintrieb des Phasenkontrastmikroskopes die gesamte Dicke des Polymers nach Sphäroiden durchsucht und ausgezählt. Es wurden zwei gesamte Querdiameter Sichtfeld an Sichtfeld bei acht Sichtfeldern je Polymer durchsucht und ausgezählt. Die absolute Anzahl aller sich auf den Polymeren befindlichen Sphäroiden wurde somit nicht erfasst, dieses war allerdings zum Vergleich der Besiedelungsdichte der Polymere nicht notwendig. Eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Polymeren ist gewährleistet. Die manuelle Auszählung ist auch bei zu Hilfenahme eines manuellen Zählgerätes eine subjektive Methode und es können Abweichungen zwischen unterschiedlichen Untersuchern auftreten.

Die Ergebnisse der Anzahlbestimmung der Sphäroide zeigten zwischen den einzelnen Kulturläufen und auch innerhalb der einzelnen Kulturläufe zum Teil erhebliche Niveauunterschiede. Besonders der Kulturansatz der Isolation vom 17.06.2000 hebt sich von den übrigen Kulturansätzen hinsichtlich der Sphäroidanzahl ab, was sich auch in einer deutlich erhöhten Albuminsynthese und steil ansteigender Harnstoffsynthese widerspiegelt. Es zeigt sich bei allen Kulturansätzen ein Aufwärtstrend in den ersten 6 Tagen und, so erfasst, auch wieder ein Abwärtstrend, so dass die Verläufe in sich stimmig zu sein scheinen. Insgesamt lässt sich ein leichter Trend eines Maximums der Sphäroidanzahl am 6. Tag in der Kultur für die Kulturansätze vom 17.01.2001, vom 08.11.2001 und eingeschränkt, da nur sechs Tage in Kultur gehalten, vom 17.06.2000 ausmachen. In dem Kulturansatz vom 11.07.2001 zeigt sich ein Maximum erst am 8. Tag (Tabelle 3.3 und Diagramm 3.1.). Die Aussage über ein Maximum der Sphäroidanzahl ist insgesamt eingeschränkt durch das Fehlen von Daten von dem Kulturansatz vom 05.04.2001 und einer fehlenden Bestimmung am Tag 6 des Kulturansatzes vom 06.02.2002. Bei dem letztgenannten Kulturansatz liegt die durchschnittliche Sphäroidanzahl des 8. Tages unterhalb der des 4. Tages, so dass auch hier ein Maximum am 6. Tag vermutet werden kann.

Die Niveauunterschiede der Anzahl der Sphäroide zwischen den einzelnen Kulturansätzen ist erklärbar durch die unterschiedliche Herkunft der Zellen, die für jeden einzelnen Kulturansatz bei der Vielzahl der unterschiedlichen Variablen wie Alter und Geschlecht des Spenders, Zustand des Lebergewebes bezüglich makroskopischer und mikroskopischer Verfettung und bindegewebigen Umbaus sowie kalte und warme Ischämiezeit zu erklären. Zum anderen ist die Heterogenität und Individualität der nicht nach Industriestandard gefertigten Polymere anzumerken, was auch die große Streuung innerhalb der einzelnen Kulturansätze erklären kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass, erklärbar durch die Architektur des Polymergerüsts, keine nennenswerte Größenzunahme der Sphäroiden in der Flusskultur festgestellt werden kann. Die Anzahl der Sphäroiden hat ein Maximum mit einem Scheitelpunkt um Tag 6, teilweise bis Tag 8, in Kultur. Die Aussagen haben qualitativen deskriptiven Charakter aufgrund der hohen Variabilität der Messungen und Zählungen und Fehler in der Auswertungskontinuität.

4.6. Albuminsynthese der Zellen in Kultur

Um eine Aussage über die leberspezifische Leistungsfähigkeit der kultivierten Zellen zu bekommen, wurde der Albumingehalt im Kulturmedium bestimmt. Zusätzlich wurde für einen Kulturansatz durch Northernblot der mRNA-Gehalt der Sphäroide auf den Polymeren bestimmt, um zu unterlegen, dass die im Zellkulturmedium gemessenen Albuminkonzentrationen das Produkt aktiver Synthese während der Zellkultur darstellen.

Albumin ist ein Syntheseprodukt ausschließlich von Hepatozyten. Seine Hauptaufgaben im menschlichen Organismus bestehen in der Funktion als unspezifisches Transportprotein im Serum und zur Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Druckes, da Albumin die Hauptfraktion der Serumproteine darstellt. Klinisch wird die Konzentration von Albumin routinemäßig als Syntheseparameter der Leber bestimmt, um diagnostische Aussagen über den Funktionszustand der Leber zu erhalten oder um Aussagen über die Auswirkungen eines Proteinverlustes beispielsweise über die Niere beim nephrotischen Syndrom zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde Albumin im Kulturmedium quantitativ mit der ELISA-Methode mit einem polyklonalen Primärantikörper und einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in Doppelbestimmung inkubiert und die Extinktion gegen eine doppelte Standardreihe abzüglich eines doppelt bestimmten Leerwertes photometrisch gemessen. Die Messungen wurden für einzelne Proben bei in der Doppelbestimmung zu weit auseinanderreichenden Messwerten wiederholt, bis die Abweichungen in den Doppelbestimmungen in dem definierten Bereich einer Varianz von 5% lagen. Es ist denkbar, dass bei polyklonalem Primärantikörper eine Kreuzreaktivität zu anderen Antigenen vorliegen kann und somit die Messwerte verfälscht werden könnten. Eine sicherere Methode ist die Verwendung von monoklonalen Primärantikörpern, da die Antikörper aus einem Lymphozyten-Klon gewonnen werden, der auf ein bestimmtes

Antigen des Albumins sensibilisiert wurde. Dennoch lässt sich auch mit polyklonalen Primärantikörpern eine ausreichend gute Spezifität erreichen, da im Falle dieser Arbeit der Vergleich zwischen Mediumproben aus definiertem Medium und gleicher Zellarten gezogen werden sollte und dieser eher vergleichend im Sinne einer Bestimmung von Niveauunterschieden und als Mittelwert der Summe vieler Proben innerhalb dieser Studie ist. Somit ist diese Methode als verlässlich, reproduzierbar und objektiv zu bewerten.

In der Betrachtung der Ergebnisse fällt ein deutlicher Unterschied in der Albuminsyntheserate zwischen den sphäroidbildenden und nicht-sphäroidbildenden Kulturansätzen auf (Tabellen 3.15., 3.16. und Diagramm 3.5.). Das Niveau der durchschnittlichen Albuminkonzentrationen der nicht-sphäroidbildenden Kulturansätze am ersten Tag liegt, mit Ausnahme des Kulturansatzes vom 24.02.2001, deutlich unter dem der sphäroidbildenden Kulturen (Diagramm 3.3.). Bei den sphäroidbildenden Kulturen vervielfachen sich die Albuminkonzentrationen über die ersten acht Tage (Diagramm 3.4.), wohingegen bei den nicht-sphäroidbildenden Kulturansätzen keine wesentliche Steigerung über das doppelte in zwei Tagen hinaus festgestellt werden kann. Dieses spiegelt sich auch in den Ergebnissen des Northern-Blots bei der mRNA für Albumin wider, in denen am Tag 6 ein höheres Niveau erreicht wird, als direkt nach Isolation (Abbildung 6). Einschränkend muss auf die kurze Halbwertszeit von mRNA von 15 bis 30 Minuten hingewiesen werden. Bei nicht sofortiger Überführung in die Tiefkühlung könnten große Schwankungen in den Ergebnissen auftreten. Das Ergebnis scheint auf Grund der auch im ELISA festgestellten Steigerung der Albuminmenge stimmig.

Es bietet sich die Einteilung in zwei Gruppen an, da sich eine Korrelation zwischen dem Niveau der Leistungsfähigkeit und der Eigenschaft der Sphäroidbildung zeigt, wie sie auch bei der Untersuchung der Harnstoffsyntheseleistung in ähnlicher Weise gegeben ist. In der Gruppe der nicht-sphäroidbildenden Kulturansätze (N-SPH) zeigen sich kleinere Syntheseraten in ansteigenden Albuminspiegeln bis zum achten Tage in Kultur. Im Falle des Kulturansatzes vom 10.09.2001 geschah dieses auf minimalstem gerade noch messbarem Niveau, bei dem Kulturansatz vom 12.06.2002 war eine Albuminkonzentration nicht messbar.

In der Gruppe der sphäroidbildenden Kulturansätze (SPH) zeigen sich bis zum achten Tag in der Kultur deutliche Anstiege in der Syntheseleistung. Die Syntheseleistungen steigen bis zum vierten Tag an. Ein Maximum der Albuminsyntheseleistung lässt sich bis zum achten Tag bei unterschiedlichen Kurvenverläufen nur schwer ausmachen und zeichnet sich allenfalls vom 7. auf den 8. Tag ab. Die Standardabweichungen der Messungen selbst innerhalb der Kulturansätze sind zum Teil erheblich. Die Fehlerquellen

bezüglich der Zellen und der Polymere wurden bereits in den Kapiteln 4.1. bis 4.3. diskutiert.

Die Albuminsynthese zeigt sich im Falle des Kulturansatzes vom 11.07.2001 bis zum 10. Tag auf hohem Niveau und flacht bis zum 12. Tag weiter ab. Ab dem 12. Tag ist die Albuminsynthese allenfalls nur noch minimal (Diagramm 3.4.). Dieses geht einher mit den Beobachtungen unter dem Phasenkontrastmikroskop, in denen sich ab dem 10. Tag die Sphäroidverbände aufzulösen beginnen.

Zusammenfassend kann der Schluss gezogen werden, dass die SPH-Gruppe der N-SPH-Gruppe bei der Albuminsyntheseleistung, die als tatsächliche Neusynthese in der Kultur gewertet werden kann, deutlich überlegen ist. Es wurde bereits beschrieben, dass die zu Sphäroiden zusammengelagerten Rattenhepatozyten den nicht dreidimensional aggregierten Zellen in den Syntheseleistungen überlegen sind [28, 43, 52]. In Falle dieser Arbeit hatten alle Zellen im Unterschied zu den zitierten Untersuchungen die gleichen Kulturbedingungen und somit auch die Möglichkeit, Sphäroide zu bilden. Diese Ergebnisse legen bisher die Hypothese nahe, dass die Fähigkeit Sphäroide auszubilden an sich ein Merkmal für die Vitalität von humanen Hepatozyten ist.

4.7. α -1-Antitrypsinsynthese

α -1-Antitrypsin ist ein hauptsächlich von den Hepatozyten (in geringerem Maße auch von Monozyten und neutrophilen Leukozyten) synthetisiertes Akute-Phase-Protein mit einer Größe von 54 kDa (394 Aminosäuren). In der Plasma-Elektrophorese ist es in der α -1-Fraktion zu finden. Es wirkt als Inhibitor von Serin-Proteasen und ist vor allem im Lungengewebe zum Schutz vor von Granulozyten und phagozytierenden Zellen freigesetzten Proteasen aktiv. Bei Mangel von funktionsfähigem α -1-Antitrypsin, zumeist autosomal rezessiv vererbt oder durch Zigarettenrauch begünstigt, besteht die Gefahr der Entwicklung eines Lungenemphysems.

Der Nachweis einer Synthese von α -1-Antitrypsin dient in dieser Arbeit der Ergänzung und der Darstellung weiterer leberspezifischer Syntheseleistungen. Es wurde exemplarisch nur bei einem Kulturansatz aus der SPH-Gruppe (Kulturansatz vom 11.07.2001) die Mediumkonzentration von α -1-Antitrypsin über 14 Tage gemessen. Das Testprinzip ist ähnlich wie bei der Albuminmessung und beruht ebenfalls auf der ELISA-Technik. Hier wurde ein komplettes Testkit verwendet, das zur Messung von α -1-Antitrypsin im Stuhl und im Blut ausgelegt wurde.

Es zeigt sich ein vergleichbares Bild wie bei der Albuminbestimmung mit hohen Syntheseraten bis zum 10. Tage. Zwischen dem 10. und 12. Tage schwächt sich die Neusynthese weiter ab. Ab dem 12. Tag in Kultur ist ebenfalls keine nennenswerte α -1-Antitrypsin-Synthese festzustellen (Tabelle 3.17. und Diagramm 3.6). Dieses Ergebnis ist konform mit dem der Albuminmessung dieses Kulturansatzes und der mikroskopischen Beobachtung mit sich auflösenden Sphäroidaggregaten ab dem 10. Kulturtag und validiert diese.

4.8. Harnstoffsynthese

Die Umwandlung von Ammoniak in Harnstoff ist eine wichtige Entgiftungsfunktion der Hepatozyten, da nur sie die vollständige enzymatische Ausstattung zur Biosynthese von Harnstoff hat. Diese findet im Zytoplasma und in den Mitochondrien der Leberzellen statt. Stickstoff wird für die körpereigene Synthese nicht essentieller Aminosäuren benötigt. Im Umkehrschluss fällt Stickstoff im Abbau der Aminosäuren bei kataboler Stoffwechsellaage als Abfallprodukt in Form von Ammoniak im Kreislauf an. Ammoniak ist in höherer Konzentration zytotoxisch. Eine erhöhte Ammoniakkonzentration im Blut wirkt sich vor allem auf das zentrale Nervensystem aus. Symptome eines zu hohen Ammoniakspiegels im Blut sind vor allem Vigilanzminderung bis zum Koma, Flapping Tremor und andere neurologische Symptome. Die Hepatozyten übernehmen die Regulierung und Entgiftung des anfallenden Ammoniaks, einerseits über den Glutamatstoffwechsel und andererseits in der Harnstoffsynthese.

Ammoniak wird im sogenannten und von Henseleit und Krebs 1932 entdeckten Ornithin- oder auch Harnstoffzyklus in Harnstoff umgewandelt und somit als zelltoxische Substanz aus dem Kreislauf entfernt. Harnstoff ist weniger toxisch und wird bei Säugetieren und so auch beim Menschen durch den Harn über die Niere ausgeschieden.

Mit der Messung von Harnstoff im Kulturmedium kann so die mitochondriale Funktion der Hepatozyten überprüft werden. Es wurden Mediumproben von jedem zweiten Tag in Kultur gemessen.

Die Harnstoffbestimmung erfolgte mit einem enzymatischen Testkit, in dem die von der Ammoniak-abhängigen Substratabnahme photometrisch gemessen wird. Dieses Kit findet primär in der Lebensmitteldiagnostik Anwendung, hat aber auch Anwendungsbereiche in der Labordiagnostik für Zellkulturüberstände. Die Mediumproben wurden nach Anleitung

vor der Messung denaturiert. Um genauere Ergebnisse zu erhalten und die Richtigkeit der Messungen zu validieren wäre eine Doppelbestimmung sinnvoll. Diese war aber wegen des insgesamt geringen Volumens der entnommenen Mediumproben und bei relativ hohem Probenvolumenbedarf bei insgesamt geringen Harnstoffkonzentrationen im Kulturmedium nicht praktikabel. Hier fand eine Abwägung zwischen Mediumvolumenverlust durch die regelmäßigen Entnahmen von Mediumproben und die dadurch erfolgte Verfälschung der Messwerte und der Notwendigkeit einer Doppelbestimmung bei der Harnstoffmessung statt. Da hier ebenfalls keine absolute Genauigkeit der Messwerte für den Vergleich zwischen den Kulturansätzen notwendig war, wurde auf die Doppelbestimmung von Harnstoff verzichtet.

Die Fehlerquellen der Meßmethode liegen vor allem in der Möglichkeit der Kontamination mit Ammoniak etwa durch Urease-bildende Bakterien oder Zigarettenrauch in der Luft. Luftbläschen in der Messküvette können die Extinktionsmessung verfälschen. Deswegen wurden die Küvetten vor den Messungen mit einem Spatel von Luftblasen befreit. Des weiteren kann bereits vorhandenes Ammoniak den Harnstoffwert als zu hoch verfälschen. Deswegen wurde bei jeder Harnstoffmessung parallel auch die Ammoniakkonzentration im Kulturmedium mitbestimmt und diese dann rechnerisch von der Harnstoffkonzentration abgezogen.

In einem Testlauf wurde die Harnstoff- und die Ammoniakkonzentration in je einem Kultursystem mit und ohne Polymeren ohne Zellbesiedelung gemessen, um eventuell vom Kultursystem oder den Polymeren anfallendes Ammoniak oder Harnstoff zu erfassen und so eine Falschbestimmung einer eventuellen Syntheseleistung der Hepatozyten auszuschließen. Harnstoff war in diesen Testläufen nicht messbar. Es zeigte sich allerdings ein spontaner Anstieg von Ammoniak im Kulturmedium, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied mit und ohne Polymeren zeigte (Tabelle 3.18.). Es ist möglich, dass Produkte des Mediums innerhalb oder mit Bestandteilen des Kultursystems reagieren und unter anderem zu Ammoniak zerfallen. Woher das Ammoniak stammt, bleibt unklar. Im Falle dieser Arbeit diente es als Substrat zum Nachweis einer Harnstoffsynthese und es musste kein zusätzlicher Stress auf die kultivierten Hepatozyten durch das Hinzufügen von Ammoniak in noch zu bestimmender, nicht letaler aber messbarer Konzentration ausgeübt werden.

Die Ergebnisse der Harnstoffmessungen zeigen zwischen den einzelnen Kulturansätzen zum Teil erhebliche Unterschiede in den Konzentrationsniveaus, die auf die vielfältigen, bereits in Kapitel. 4.1. bis 4.3. beschriebenen Variablen bezüglich der Zellen und der

Polymere zurückzuführen sind. In den Größenordnungen der Zuwächse der Harnstoffkonzentrationen lassen sich die Werte aber direkt vergleichen. Auch hier lässt sich die Einteilung in die SPH- und N-SPH-Gruppen deutlich bestätigen. Sind die Zuwächse an Harnstoff von Tag 1 auf Tag 2 in Kultur in beiden Gruppen noch auf gleichem Niveau, zeigt sich ab Tag 2 auf Tag 4 ein signifikanter Unterschied. In der kompletten SPH-Gruppe erhöht sich die Neusynthese an Harnstoff bis fast auf die doppelte Leistung vom Vorvortag mit einem Maximum zwischen dem 4. und 6. Tag, während sich die Neusynthese in der kompletten N-SPH-Gruppe ab Tag 2 auf Tag 4 verringert und weiter einem stetigen Abwärtstrend folgt.

Die polynomischen Trendlinien der beiden Gruppen nehmen einen signifikant unterschiedlichen Verlauf und zeigen, dass die Ergebnisse dieser Messungen mit den Ergebnissen der Albuminmessung und der mikroskopischen Beobachtung der Sphäroidbildung konform ist und diese bestätigen (Diagramm 3.9.). Auch hier wird deutlich, dass die sphäroidbildenden Hepatozyten den anderen in der Syntheseleistung überlegen sind, und diese über einen längeren Zeitraum ausbauen und erhalten können.

4.9. DNA-Messung

Um eine Aussage über die Zunahme der Zellen auf den Polymeren in Kultur durch Proliferation zu erhalten, oder um die Besiedelungseffektivität und –Konstanz zu ermitteln, wurden die Polymere einiger Kulturansätze auf deren DNA-Gehalt untersucht. Der DNA-Gehalt wurde mit der DyNA-Quant-Methode quantifiziert [33]. Die DNA wird mit Bisbenzimid (Hoechst 33258), einem fluoreszierendem Stoff, markiert und dann photometrisch mit dem DyNA Quant 200 Fluorometer gemessen. Es emittiert Licht der Wellenlänge von $365\text{ nm} \pm 7\text{ nm}$ und misst bei $460\text{ nm} \pm 15\text{ nm}$. Damit werden selbst geringe DNA-Mengen bei hoher Kontamination durch Proteine und RNA gemessen. Die Messung der Proben erfolgte in dreifacher Bestimmung, um Pipettierfehler auszumitteln.

Die Messungen in Dreifachbestimmung waren gut reproduzierbar und es kam innerhalb der Messungen der einzelnen Proben nur zu geringen Standardabweichungen. Allerdings zeigten die Messungen der Polymere der einzelnen Kulturansätze über die Zeitverläufe in Kultur keine signifikant verwertbaren Ergebnisse. Innerhalb von den Kulturansätzen zeigten sich unabhängig von der Dauer des Polymeres in Kultur widersinnige Ergebnisse mit hohen Schwankungen der DNA-Konzentration. Es ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der SPH-Gruppe und der N-SPH-Gruppe erkennbar (Tabellen 3.22., 3.23. und Diagramme 3.11., 3.12.). Es wurde bei dieser Methode die DNA-

Konzentration aus der Summe aller sich auf den Polymeren befindlichen Zellen gemessen, unabhängig davon ob diese in Sphäroiden organisiert sind. Deswegen ist kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Diese Methode unterscheidet auch nicht zwischen intakter, vitaler von defekter DNA, so dass damit keine Aussage über die Vitalität der Zellen gemacht werden kann.

Von dem Kulturansatz vom 08.11.01 konnten bei zwei parallel laufenden Pumpmodulen mit insgesamt acht Kultursystemen mit je vier besiedelten Polymeren in einem Kultursystem pro System ein Polymer zur Messung verwendet werden. An dieser Doppelbestimmung aus je zwei parallel laufenden Zellkulturen mit Zellen aus der gleichen Isolation ist die starke Varianz der DNA-Konzentration allein bedingt durch die Eigenheiten der einzelnen Polymere und eventueller Unterschiede bei der Besiedelung selbst augenscheinlich. Besonders am Tag 6 des Kulturansatzes vom 08.11.01 ist ein Unterschied in den Mittelwerten mit einer Differenz von 3900 ng/ml festzustellen, was eine Vergleichbarkeit zu anderen Kulturansätzen schwierig macht, da von denen nur ein Polymer vermessen wurde (Tabelle 3.22.).

So lässt sich auch kein Trend über den Verlauf der DNA-Konzentration über die Kulturzeit ausmachen. In Tabelle 3.23 und im Diagramm 3.12 wurden die Mittelwerte aller Messungen zusammengefasst. Dort ist eine Steigerung der DNA-Konzentration am vierten Tage zu erkennen. Einschränkend muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass es vom Kulturansatz vom 12.06.02 keinen Wert vom vierten Tag gibt, da an diesem Tag keine Polymerentnahme stattfand. Die DNA-Konzentrationen der übrigen Tage dieses Zellkulturansatzes sind auf allgemein niedrigem Niveau, so dass ein Wert vom Tag 4 den Gesamt-Mittelwert dieses Tages vermutlich nach unten korrigieren würde und somit eine vermeintliche Steigerung sich nicht mehr so darstellen würde. Insgesamt ist bei starker Streuung der Werte kein gültiger Trend zu DNA-Vermehrung oder –Minderung auszumachen.

4.10. Histologische Beobachtungen

Zur Beurteilung der morphologischen Eigenschaften auf zellulärer Ebene wurden feingewebliche Schnittpräparate von den in Tissue-Tek® eingebetteten und kryokonservierten Polymeren nach Kulturrende angefertigt. Die Anfertigung der Schnittpräparate gestaltete sich wegen der Brüchigkeit und Härte der Polymere schwierig und es kam zu Stauchungen vieler Präparate. Dennoch gelang es einige Präparate herzustellen, in denen das Polymer in seinen Dimensionen erhalten werden konnte.

Es wurden exemplarisch aus der SPH-Gruppe die Polymere des Kulturansatzes vom 08.11.2001 histologisch aufgearbeitet.

Durch den Schneideprozess selbst und durch längere Lagerung bei -30°C können sowohl die Zellmorphologie als auch die Antigene der einzelnen zellulären Strukturen artifiziell verändert werden. Weitere artifizielle morphologische und strukturelle Veränderungen sind durch nachfolgende Fixationsschritte in der weiteren Aufarbeitung durch Lufttrocknung und Acetonfixation möglich. Bei jedem weiteren Aufarbeitungsschritt können durch Spülungen oder Bad in Pufferlösungen Präparate abgespült werden und sich gegebenenfalls neu ortsfern ablagern. Artefakte müssen bei jeder histologischen Beurteilung mit einbezogen werden.

4.10.1 HE-Färbung

Zum morphologischem Studium wurden Gefrierschnitte mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt. Anhand eines Präparates mit humanem Lebergewebe wurden die günstigsten Inkubationszeiten in den Farbstoffbädern ermittelt (Abbildungen 7 und 8). Das Zytoplasma stellte sich hellrot dar, während sich die Zellkerne violett anfärbten. Anhand der Färbung des Lebergewebes wird der typische zelluläre Aufbau der Leber und der Hepatozyten mit ihrer polygonalen Zellform sichtbar. Freiräume zwischen den Zellen sind artifiziell bedingt.

Die Präparate der Sphäroide wirken bei gleicher Behandlung wie die Gewebepräparate insgesamt blasser angefärbt (Abbildungen 9 bis 12).

Es zeigen sich analog zu den phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen in vitro am Tag 2 in Kultur Zusammenlagerungen ohne scharfe Abgrenzung nach außen. Die Zellen zeigen deutliche Assoziationen zu einander, die über eine bloße lockere Zusammenlagerung hinausgehen. Allerdings ist keine Ordnung der Zellen zu einander erkennbar. Die in vivo typische polygonale Zellform der Hepatozyten ist größtenteils aufgehoben (Abbildung 9).

Am vierten Tag in Kultur zeigt sich eine beginnende Organisation der Zellen innerhalb der Sphäroide. Es ist deutlich, dass sich die Zelle untereinander ordnen und zum Teil schon die polygonale Form annehmen, wie sie für Hepatozyten innerhalb des Lebergewebes typisch ist. An der Grenzfläche der Sphäroiden zum Medium sind abgeflachte Zellen zu erkennen, deren Zytoplasma sich nicht so hell anfärbt, wie das der polygonal organisierten Zellen, und deren Zellkerne im den Anschnitten eher spindelförmig als oval erscheinen. Diese Zellen scheinen innerhalb des Verbandes eine eigenständige anatomische Deck-Funktion zu übernehmen. Es ist ebenfalls denkbar, dass diese Zellen nicht-epithelialen Ursprungs sein könnten (Abbildung 10).

Am sechsten und am achten Tag scheint die Organisation der Zellen innerhalb der Sphäroide abgeschlossen. Es ist deutlich die polygonale Zellform der Hepatozyten zu erkennen. Teilweise sind an den Grenzflächen der Sphäroide abgeflachte Zellen mit spindelförmigen Kernen und dunkler angefärbtem Zytoplasma zu erkennen. Vereinzelt zeigen sich Einzelzellnekrosen (Abbildungen 11 und 12).

Insgesamt ist die Organisation eines Leberneogewebes mit der Ausbildung von typischen polygonalen Zellen innerhalb der Sphäroiden sichtbar. Es ist nicht klar, ob sich im Grenzbereich nach außen Hepatozyten morphologisch im Sinne von Deckzellen anpassen oder restliche in der Zellsuspension enthaltene nicht-epitheliale Zellen diese Funktion übernehmen.

4.10.2. Immunhistochemische Färbungen der Sphäroide

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen und zum Nachweis hepatozytentypischer antigener Eigenschaften wurden die Gefrierschnitte immunhistochemisch auf Antigene von Albumin, α -1-Antitrypsin und Cytokeratin 18 untersucht und mit einer Farbreaktion auf den Präparaten sichtbar gemacht.

Albumin und α -1-Antitrypsin sind Serumproteine, die von Hepatozyten gebildet werden. Da sie im Blut frei schwimmen, werden positive Farbreaktionen in jedem durchblutetem Gewebe, besonders als Ablagerungen in Gefäßen nachweisbar sein. Der intrazytoplasmatische Nachweis ist allerdings nur typisch für Hepatozyten.

Cytokeratin 18 ist ein Protein des Zytoskelettes typischer Weise von Hepatozyten. Zytokeratine finden sich ausschließlich in Zellen epithelialen Ursprungs. Jede einzelne Epithelart hat je nach Organherkunft ein eigenes Muster an unterschiedlichen Zytokeratinen. Anhand des Musters der Zusammensetzungen der Zytokeratine lassen sich Rückschlüsse auf die Herkunft eines epithelialen Gewebes schließen. Dieses wird unter anderem in der pathologischen Tumordiagnostik genutzt, um auf den Ursprung von Tumoren rückschließen zu können, wonach sich dann die weitere Prognose und Therapieentscheidung richtet. Die Expressionsprofile der Epithelien und Tumoren wurden von Moll et al. zusammengefasst [46]. Anhand der Überprüfung der einzelnen Zytokeratinexpressionsprofile der einzelnen Leberzellarten könnte Rückschluss auf die zelluläre Zusammensetzung der Sphäroide gewonnen werden, um andere Leberzellen epithelialen Ursprungs, wie Gallengangepithelzellen (typisches Zytokeratinexpressionsprofil: CK-7/CK-19), zu erfassen.

Um Zellen nicht-epithelialen Ursprungs, wie Endothelzellen, Ito-Zellen, etc., zu erfassen, wurde Vimentin als Markerantigen für Zellen mesenchymalen Ursprungs als Antigen dargestellt.

Die Zellen der Sphäroide zeigen ein positives Signal für Albumin, α -1-Antitrypsin und Cytokeratin 18 und somit die Merkmale von Hepatozyten (Abbildungen 16, 19 und 22). Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich die Sphäroide zum allergrößten Teil aus Hepatozyten zusammensetzen. Die Darstellung von Vimentin zeigte vereinzelt auch den Nachweis von Zellen mesenchymalen Ursprungs, ohne dass diese genauer charakterisiert wurden. Diese Zellen finden sich eher im peripheren Bereich der Sphäroide (Abbildung 27). Durch die Zellseparation mittels Zentrifugation ist es nicht gewährleistet, dass ausschließlich Hepatozyten kultiviert werden. Mit einer gewissen Verunreinigung durch Zellen anderer Art ist zu rechnen.

Es zeigten sich in anderen Arbeiten allerdings Hinweise, dass eine Co-Kultur von nicht-parenchymalen Zellen bei der Kultur von Hepatozyten einen günstigen Einfluss auf die Überlebensrate haben. Insofern ist zu diskutieren, bis zu welchem Grad eine Verunreinigung mit Zellen nicht epithelialen Ursprungs zumindest im Falle einer Autotransplantation nicht sogar wünschenswert wäre [21, 41]. Im Falle der Allotransplantation müssten die Besonderheiten der verstärkten Sensibilisierung gegen Fremdagene in der Gegenwart von endothelialen Zellen, Lymphozyten oder dendritischen Zellen etc. bei der Transplantation co-kultiverter nicht-epithelialer Zellen berücksichtigt werden. Ansätze zur Herabsetzung der Antigenität oder Blockierung von T-Zell-Aktivität durch antigenpräsentierende Zellen sind beschrieben [14, 37].

Um Hinweise auf mitotische Aktivität innerhalb der Hepatozytensphäroiden zu erhalten, wurden Schnittpräparate auf den Proliferationsmarker PCNA angefärbt. PCNA ist ein non-histonisches Protein in Nucleolen, welches eine Rolle bei der Initiierung der Zellproliferation spielt, in dem es die DNA-Polymerase beeinflusst. Es fanden sich lediglich auf zwei Sphäroiden in acht Schnittpräparaten von Polymeren, die sich sechs bis acht Tage in Kultur befanden, vereinzelte positive Signale im Sinne einer Farbreaktion für die Aktivität von PCNA (Abbildung 24). In allen übrigen dargestellten Sphäroiden fand sich kein Hinweis auf mitotische Aktivität. Somit liegt kein Hinweis für eine erhöhte Proliferationsrate sich innerhalb der Sphäroide befindlicher Hepatozyten vor. Analog zu diesem Ergebnis hatten sich in Versuchen mit Rattenhepatozyten im Gegensatz zu einer höheren Überlebens- und Syntheserate eine geringere Proliferationsneigung im Sphäroidverband im Vergleich zur Monolayer-Kultur gezeigt [52].

4.11. Elektronenmikroskopie

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte die erhaltene typische differenzierte Zellstruktur der Hepatozyten innerhalb der Sphäroide dargestellt werden. Die Anordnung der Zellen in den Sphäroiden ist ähnlich derer im Leberläppchenverband in vivo. Als Hinweise auf die erhaltene polarisierte Hepatozytenmorphologie zeigen sich zahlreiche Microvilli, zytoplasmatische Interdigitationen, Gallencanaliculi und junctionale Komplexe. Es konnten Coated Pits und Vesikel als Hinweise auf rezeptorvermittelte Mikropinozytose, und somit als Beweis für ein funktionsfähiges vesikuläres Transportsystem, nachgewiesen werden (Abbildungen 28 bis 31). Diese Untersuchungen bestätigen die Ausbildung der Zell-zu-Zell-Kontakte innerhalb der sphäroidalen Hepatozytenaggregationen, die zur Vermeidung von Apoptosevorgängen essentiell sind. Diese Ausbildung von Zell-zu-Zellkontakten wurde auch schon innerhalb von Rattenleberzell-Sphäroiden beschrieben [35].

4.12. Zusammenfassung der Diskussion der Ergebnisse:

Insgesamt zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich unter den getesteten Flusskulturbedingungen in einem Teil der Kulturansätze Hepatozyten zu sphäroidalen Aggregationen zusammenschließen, deren zelluläre Organisation bis zum sechsten Tage abgeschlossen ist. Die Syntheseleistung ist über 10 Tage stabil und durch Neusynthese in der Kultur bedingt. Der optimale Zeitpunkt, an denen die Zellkulturen ihre höchsten Syntheseleistungen zeigen, die Anzahl der Sphäroide auf den Polymeren am größten und die zelluläre Organisation abgeschlossen ist, ist der sechste Kulturtag. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die histologischen Merkmale und die Harnstoffsyntheseleistung für den 5. und 7. Tag nicht überprüft wurden. Der weit überwiegende Teil der Zellen in den Sphäroiden zeigt die Merkmale von Hepatozyten, wie Antigene für Albumin, α -1-Antitrypsin und Cytokeratin 18. Es konnten ebenfalls leberzelltypische mikroanatomische Attribute wie polare Anordnung, Zell-zu-Zell-Kontakte, Glykogengranula, Mitochondrienreichtum sowie Hinweise auf ein funktionierendes vesikuläres Transportsystem dargestellt werden. Ein weitaus geringerer Zellanteil weist antigene Eigenschaften von Zellen mesenchymalen Ursprungs auf. Eine erhöhte Proliferationsneigung innerhalb der Sphäroide konnte nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse sind insgesamt eingeschränkt durch die Vielzahl der Variablen bei der Zellisolation in den anatomischen Begebenheiten, der Qualität und der Herkunft der Zellen und der Variabilität der Polymerbeschaffenheit. Durch eine sorgfältigere Auswahl

der Spenderorgane und Einhaltung einer kurzen Warm- und Kaltischämiezeit, wie sie bei der Organspende in der Praxis gebräuchlich ist, könnte zu reproduzierbareren Ergebnissen bei der Zellgewinnung führen. Die Schwierigkeit der Einhaltung solcher Standards für Forschungszwecke liegt bei der vorhandenen Knappheit von qualitativ hochwertigen Spenderorganen allein aus ethischen Gründen auf der Hand. Ein technischer Standard bei der Fertigung bioabbaubarer synthetischer Polymere zukünftiger Generationen ist wünschenswert. Neuere Verfahren in der Herstellung von Polymeren mit einer genauen Kontrolle der dreidimensionalen Architektur, wie Stereolithographie und „solid free-form fabrication (SSF)“ erscheinen vielversprechend.

Sphäroide sind Einzelzellsuspensionen überlegen und deren Einsatz im Bereich der durch Tissue Engineering unterstützten Zelltransplantation sollten zur Entwicklung von Alternativen zur Organtransplantation weiter verfolgt werden. In der Vereinigung von den Vorteilen der sphäroidalen Organisation und der Kultur auf abbaubaren Polymermatrices zur Verbesserung der Transplantationseffizienz liegt ein möglicher Weg, dem Mangel an Spenderorganen durch vorkultivierte Leberzelltransplantation in Zukunft zu begegnen.

5. Allgemeine Zusammenfassung

Einleitung:

Hintergrund dieser Arbeit ist die Suche nach Alternativen zur Lebertransplantation. Die Lebertransplantation stellt bis heute die ultimative Therapie bei akutem und chronisch-fortgeschrittenem Leberversagen dar. Trotz Verbesserungen der Operationstechniken, des Verteilungsverfahrens von Spenderorganen, der Einführung der Leberlebendspende und der Split-Leber-Transplantation, besteht bei nur leicht ansteigender Zahl der Organspenden und überdeutlich ansteigender Zahl neuangemeldeter Patienten zur Lebertransplantation ein Mangel an Spenderorganen.

Ein Weg, dem Organmangel zu begegnen, könnte der Ansatz der Leberzelltransplantation sein. Ein Hauptproblem ist der große Zellverlust nach Transplantation. Ein vielversprechender Ansatz ist die mit Mitteln des Tissue Engineering Vorkultivierung von Hepatozyten auf biokompatiblen, abbaubaren Polymeren mit Bildung von sphäroidalen Hepatozytenaggregationen, die sich in Versuchen mit Rattenleberzellen als vorteilhaft bezüglich der Überlebensrate, Syntheserate und Widerstandsfähigkeit gegenüber Einzelzell- oder Monolayerkulturen gezeigt haben.

Gegenstand dieser Arbeit war es, ein dreidimensionales Fluss-Kulturmodell für die in vitro Kultur von humanen Hepatozyten, die auf PLLA-Polymer-Matrices ausgesiedelt wurden, auf die Bildung von sphäroidalen Aggregationen zu prüfen und deren Funktionalität durch Messung der Stoffwechselleistung und Erfassung deren anatomischen Eigenschaften zu erfassen. Dieses Flusskulturmodell wurde bereits mit Rattenhepatozyten in Vorversuchen in Hinblick auf die Ausbildung von Sphäroiden und dem Nachweis von hepatozytenspezifischen Funktionsleistungen erfolgreich getestet.

Methoden:

Isolierte Hepatozyten von nicht transplantierten Spenderorganen, Resektaten größenreduzierter Spenderorgane und Operationsresektaten wurden auf PLLA-Polymer-Matrices ausgesiedelt und in Flusskultur gebracht. Alle zwei Tage erfolgte die Entnahme eines Systems und ein Mediumwechsel. Die Polymere wurden phasenkontrastmikroskopisch auf Sphäroidbildung untersucht. Die Sphäroide wurden ausgezählt und vermessen. Die Zellen auf den Polymeren wurden auf den DNA-Gehalt und auf den mRNA-Gehalt für Albumin untersucht. Im Kulturmedium wurden die Syntheseprodukte Albumin, α -1-Antitrypsin und Harnstoff quantitativ bestimmt. Histologisch wurden die Sphäroide mit der HE-Färbung aufbereitet und immunhistochemisch die Antigene Albumin, α -1-Antitrypsin, Cytokeratin 18, Vimentin und

PCNA dargestellt. Elektronenmikroskopisch wurde die Morphologie der Sphäroide sowie deren zellulärer Aufbau dargestellt.

Ergebnis:

Es wurden 16 Versuche der Isolation von humanen Hepatozyten unternommen. Die Isolationsergebnisse reichten von einer Zahl isolierter vitaler Zellen von weniger als 100000 Zellen bis $9,9 \times 10^{12}$ Zellen mit einer mittleren Vitalität von 74%. Von 10 Isolationen wurden Hepatozyten kultiviert, von denen in 6 Kulturen die Bildung von sphäroidalen Aggregationen ab dem 4. bis zum 12. Tag zu beobachten war. Die Sphäroide hatten durchschnittliche Durchmesser von 140 bis 160 μm . Eine signifikante Tendenz zur Größenzunahme zeigte sich nicht. Das Maximum der Sphäroidanzahl war durchschnittlich am 6. Kulturtag erreicht. Die SPH-Gruppe war der N-SPH-Gruppe in Albumin- und Harnstoff deutlich überlegen. Es wurde analog zur Albumin- und Harnstoffsynthese die α -1-Antitrypsin-Synthese bis zum 12. Tag in Kultur nachgewiesen. Die DNA-Messung war ohne statistisch signifikantes Ergebnis. In der histologischen und elektronenmikroskopischen Aufarbeitung der Sphäroide zeigte sich die leberzelltypische Organisation bis zum sechsten Tage abgeschlossen. Der Nachweis von Albumin, α -1-Antitrypsin und Cytokeratin 18 bestätigte, dass Hepatozyten den allergrößten Anteil der Sphäroiden ausmachten. Eine geringe Beteiligung nicht-epithelialer Zellen konnte durch Detektion von Vimentin dargestellt werden.

Diskussion:

Die Ausbildung von sphäroidalen Aggregationen von humanen Hepatozyten in Flusskultur auf dreidimensionalen PLLA-Polymer-Matrices ist prinzipiell möglich. Die Fähigkeit zur Bildung von Sphäroiden scheint ein Indikator für die Vitalität und Funktionalität der Hepatozyten zu sein, denn sie zeigen stabile Syntheseraten. Die Vielzahl der Variablen bezüglich anatomischer Bezugsquelle, Zellqualität und Polymerbeschaffenheit müssten noch weiter definiert werden, um gezielter zum Erfolg einer Vorkultivierung mit Sphäroidbildung zu gelangen. Sphäroide sind Einzelzellsuspensionen überlegen und deren Einsatz im Bereich der durch Tissue Engineering unterstützten Zelltransplantation sollten zur Entwicklung von Alternativen zur Organtransplantation weiter verfolgt werden. In der Vereinigung von den Vorteilen der sphäroidalen Organisation und der Kultur auf abbaubaren Polymermatrices zur Verbesserung der Transplantationseffizienz liegt ein möglicher Weg, dem Mangel an Spenderorganen durch vorkultivierte Leberzelltransplantation in Zukunft zu begegnen.

6. Literaturverzeichnis

1. *Eurotransplant International Foundation. Annual report 2005.*, ed. A Osterlee, A Rahmel, and W Van Zweet. 2006, Leiden/ The Netherlands: Eurotransplant. 56.
2. *Organspende und Transplantation in Deutschland*, ed. DS Organtransplantation. 2006, Neu-Isenburg/ Deutschland: Deutsche Stiftung Organtransplantation. 44.
3. Aiken, J, L Cima, B Schloo, D Mooney, L Johnson, R Langer, and JP Vacanti, *Studies in rat liver perfusion for optimal harvest of hepatocytes*. J Pediatr Surg, 1990. **25**(1): p. 140-4; discussion 144-5.
4. Ajioka, I, T Akaike, and Y Watanabe, *Expression of vascular endothelial growth factor promotes colonization, vascularization, and growth of transplanted hepatic tissues in the mouse*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 396-402.
5. Amass, W, A Amass, and B Tighe, *A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies*. Polymer International, 1998. **47**(2): p. 89-144.
6. Anderson, JM, *Inflammatory response to implants*. ASAIO Trans, 1988. **34**(2): p. 101-7.
7. Asonuma, K, JC Gilbert, JE Stein, T Takeda, and JP Vacanti, *Quantitation of transplanted hepatic mass necessary to cure the Gunn rat model of hyperbilirubinemia*. J Pediatr Surg, 1992. **27**(3): p. 298-301.
8. Babensee, JE and MV Sefton, *Viability of HEMA-MMA microencapsulated model hepatoma cells in rats and the host response*. Tissue Eng, 2000. **6**(2): p. 165-82.
9. Broelsch, CE, PF Whittington, JC Emond, TG Heffron, JR Thistlethwaite, L Stevens, J Piper, SH Whittington, and JL Lichtor, *Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results*. Ann Surg, 1991. **214**(4): p. 428-37; discussion 437-9.
10. Clarke, D, C Johansson, J Wilbertz, B Veress, E Nilsson, H Karlström, U Lendahl, and J Frisén, *Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells*. Science, 2000. **288**(5471): p. 1660-1663.
11. Cordes, C, *Heterotope Transplantation von mittels Tissue Engineering erzeugten Hepatozytenspheroiden in zweidrittelhepatektomierten Ratten*. 2003, Medizinische Dissertation. Universität Hamburg: Hamburg. p. 1-91.
12. Dorko, K, PD Freeswick, F Bartoli, L Cicalese, BA Bardsley, A Tzakis, and AK Nussler, *A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation*. Cell Transplant, 1994. **3**(5): p. 387-95.
13. Elisseeff, J, K Anseth, D Sims, W McIntosh, M Randolph, and R Langer, *Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 3104-7.

14. Falanga, V, D Margolis, O Alvarez, M Auletta, F Maggiasco, M Altman, J Jensen, M Sabolinski, and J Hardin-Young, *Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent*. Human Skin Equivalent Investigators Group. Arch Dermatol, 1998. **134**(3): p. 293-300.
15. Fox, IJ, JR Chowdhury, SS Kaufman, TC Goertzen, NR Chowdhury, PI Warkentin, K Dorko, BV Sauter, and SC Strom, *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation*. N Engl J Med, 1998. **338**(20): p. 1422-6.
16. Frisch, SM and H Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 619-26.
17. Galletti, PM, KB Hellman, and RM Nerem, *Tissue engineering: From basic science to products: A preface*. Tissue Engineering, 1995. **1**(2): p. 147-149.
18. Gerlach, JC, K Zeilinger, IM Sauer, T Mieder, G Naumann, A Grunwald, G Pless, G Holland, A Mas, J Vienken, and P Neuhaus, *Extracorporeal liver support: porcine or human cell based systems?* Int J Artif Organs, 2002. **25**(10): p. 1013-8.
19. Greisler, HP, JW Dennis, ED Endean, J Ellinger, R Friesel, and W Burgess, *Macrophage/biomaterial interactions: the stimulation of endothelialization*. J Vasc Surg, 1989. **9**(4): p. 588-93.
20. Grossman, M, SE Raper, K Kozarsky, EA Stein, JF Engelhardt, D Muller, PJ Lupien, and JM Wilson, *Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia*. Nat Genet, 1994. **6**(4): p. 335-41.
21. Guguen-Guillouzo, C, B Clement, G Baffet, C Beaumont, E Morel-Chany, D Glaise, and A Guillouzo, *Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type*. Exp Cell Res, 1983. **143**(1): p. 47-54.
22. Gupta, S, JM Wilson, and JR Chowdhury, *Hepatocyte transplantation: development of new systems for liver repopulation and gene therapy*. Semin Liver Dis, 1992. **12**(3): p. 321-31.
23. Hamazaki, K, Y Doi, and N Koide, *Microencapsulated multicellular spheroid of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy*. Hepatogastroenterology, 2002. **49**(48): p. 1514-6.
24. Han, DK, KD Park, JA Hubbell, and YH Kim, *Surface characteristics and biocompatibility of lactide-based poly(ethylene glycol) scaffolds for tissue engineering*. J Biomater Sci Polym Ed, 1998. **9**(7): p. 667-80.
25. Horslen, SP, TC McCowan, TC Goertzen, PI Warkentin, HB Cai, SC Strom, and IJ Fox, *Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder*. Pediatrics, 2003. **111**(6 Pt 1): p. 1262-7.
26. James, K and J Kohn, *Applications of Pseudo-poly(amino acid) Biomaterials*. Trends in Polymer Science, 1996. **4**(12): p. 394-397.
27. Kneser, U, PM Kaufmann, HC Fiegel, JM Pollok, D Kluth, H Herbst, and X Rogiers, *Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices*. J Biomed Mater Res, 1999. **47**(4): p. 494-503.

28. Koide, N, K Sakaguchi, Y Koide, K Asano, M Kawaguchi, H Matsushima, T Takenami, T Shinji, M Mori, and T Tsuji, *Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments*. Exp Cell Res, 1990. **186**(2): p. 227-35.
29. Kondo, T and M Raff, *Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells*. Science, 2000. **289**(5485): p. 1754-7.
30. Kosaka, T, S Tsuboi, K Fukaya, H Pu, T Ohno, T Tsuji, M Miyazaki, and M Namba, *Spheroid cultures of human hepatoblastoma cells (HuH-6 line) and their application for cytotoxicity assay of alcohols*. Acta Med Okayama, 1996. **50**(2): p. 61-6.
31. Kulkarni, RK, EG Moore, AF Hegyeli, and F Leonard, *Biodegradable poly(lactic acid) polymers*. J Biomed Mater Res, 1971. **5**(3): p. 169-81.
32. Kusano, M and M Mito, *Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen*. Gastroenterology, 1982. **82**(4): p. 616-28.
33. Labarca, C and K Paigen, *A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure*. Anal Biochem, 1980. **102**(2): p. 344-52.
34. Lagasse, E, H Connors, M Al-Dhalimy, M Reitsma, M Dohse, L Osborne, X Wang, M Finegold, IL Weissman, and M Grompe, *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1229-34.
35. Landry, J, D Bernier, C Ouellet, R Goyette, and N Marceau, *Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities*. J Cell Biol, 1985. **101**(3): p. 914-23.
36. Langer, R and JP Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
37. Larsen, CP, ET Elwood, DZ Alexander, SC Ritchie, R Hendrix, C Tucker-Burden, HR Cho, A Aruffo, D Hollenbaugh, PS Linsley, KJ Winn, and TC Pearson, *Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways*. Nature, 1996. **381**(6581): p. 434-8.
38. Lütgehetmann, M, *Optimierung der PLLA Matrix basierten heterotropen Hepatozytentransplantation mittels Tissue Engineering, eine in vivo Langzeitstudie*. 2005, Medizinische Dissertation. Universität Hamburg: Hamburg. p. 1-107.
39. Ma, PX and JW Choi, *Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network*. Tissue Eng, 2001. **7**(1): p. 23-33.
40. Mai, G, TH Nguyen, P Morel, J Mei, A Andres, D Bosco, R Baertschiger, C Toso, T Berney, P Majno, G Mentha, D Trono, and LH Buhler, *Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes*. Xenotransplantation, 2005. **12**(6): p. 457-64.
41. Malik, R, C Selden, and H Hodgson, *The role of non-parenchymal cells in liver growth*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(6): p. 425-31.

42. Matas, AJ, DE Sutherland, MW Steffes, SM Mauer, A Sowe, RL Simmons, and JS Najarian, *Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasms bilirubin in Gunn rats*. Science, 1976. **192**(4242): p. 892-4.
43. Matsushita, T, H Ijima, N Koide, and K Funatsu, *High albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the pores of polyurethane foam*. Appl Microbiol Biotechnol, 1991. **36**(3): p. 324-6.
44. McIntire, LV, HP Greisler, L Griffith, PC Johnson, DJ Mooney, M Mrksich, NL Parenteau, and D Smith, *WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research*. 2002, International Technology Research Institute, World Technology (WTEC) Division: Baltimore/ Maryland/ USA. p. 1-209.
45. Miller, W, *Bioreactor design considerations for cell therapies and tissue engineering*, in *WTEC Workshop on Tissue Engineering Research in the United States, Proceedings, June 5, 2000*. 2000, International Technology Research Institute, World Technology (WTEC) Division: Baltimore/ Maryland/ USA. p. 154-157.
46. Moll, R, *Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren*. Veröffentlichungen aus der Pathologie 1993, Band 142. 1993, Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag. 1-197.
47. Montesano, R, *1992 Mack Forster Award Lecture. Review. Regulation of angiogenesis in vitro*. Eur J Clin Invest, 1992. **22**(8): p. 504-15.
48. Mooney, DJ, S Park, PM Kaufmann, K Sano, K McNamara, JP Vacanti, and R Langer, *Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation*. J Biomed Mater Res, 1995. **29**(8): p. 959-65.
49. O'Connell, P, A Cunningham, and J d'Aprice, *Xenotransplantation: Its problems and potential as a clinical procedure*. Transplantation Reviews, 2000. **14**(1): p. 18-40.
50. Ochoa, ER and JP Vacanti, *An overview of the pathology and approaches to tissue engineering*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **979**: p. 10-26; discussion 35-8.
51. Olive, PL and RE Durand, *Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics*. Cancer Metastasis Rev, 1994. **13**(2): p. 121-38.
52. Peshwa, MV, FJ Wu, BD Follstad, FB Cerra, and W-S Hu, *Kinetics of hepatocyte spheroid formation*. Biotechnol. Prog., 1994. **10**: p. 460-466.
53. Pollok, JM, C Ibarra, and JP Vacanti, *Immunoisolation of xenogeneic islets using a living tissue engineered cartilage barrier*. Transplant Proc, 1997. **29**(4): p. 2131-3.
54. Pollok, JM, D Kluth, RA Cusick, H Lee, H Utsunomiya, PX Ma, R Langer, CE Broelsch, and JP Vacanti, *Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions*. Eur J Pediatr Surg, 1998. **8**(4): p. 195-9.
55. Pollok, J-M and X Rogiers, *Alternativen zur Spenderorgantransplantation bei Patienten mit hepatischen Erkrankungen*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2002. **45**(10): p. 195-800.

56. Raper, SE, M Grossman, DJ Rader, JG Thoene, BJ Clark, 3rd, DM Kolansky, DW Muller, and JM Wilson, *Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia*. Ann Surg, 1996. **223**(2): p. 116-26.
57. Rogiers, X, M Malago, K Gawad, KW Jauch, M Olausson, WT Knoefel, M Gundlach, A Bassas, L Fischer, M Sterneck, M Burdelski, and CE Broelsch, *In situ splitting of cadaveric livers. The ultimate expansion of a limited donor pool*. Ann Surg, 1996. **224**(3): p. 331-9; discussion 339-41.
58. Rowley, JA, G Madlambayan, and DJ Mooney, *Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials*. Biomaterials, 1999. **20**(1): p. 45-53.
59. Rozga, J, M Holzman, AD Moscioni, H Fujioka, E Morsiani, and AA Demetriou, *Repeated intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic rats*. Cell Transplant, 1995. **4**(2): p. 237-43.
60. Rugstad, HE, SH Robinson, C Yannoni, and AH Tashjian, Jr., *Transfer of bilirubin uridine diphosphate-glucuronyltransferase to enzyme-deficient rats*. Science, 1970. **170**(957): p. 553-5.
61. Ruoslahti, E and MD Pierschbacher, *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science, 1987. **238**(4826): p. 491-7.
62. Saito, S, K Sakagami, T Matsuno, K Tanakaya, Y Takaishi, and K Orita, *Long-term survival and proliferation of spheroidal aggregate cultured hepatocytes transplanted into the rat spleen*. Transplant Proc, 1992. **24**(4): p. 1520-1.
63. Sauer, IM, D Kardassis, K Zeillinger, A Pascher, A Gruenwald, G Pless, M Irgang, M Kraemer, G Puhl, J Frank, AR Muller, T Steinmuller, J Denner, P Neuhaus, and JC Gerlach, *Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells*. Xenotransplantation, 2003. **10**(5): p. 460-9.
64. Schense, JC and JA Hubbell, *Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa*. Bioconjug Chem, 1999. **10**(1): p. 75-81.
65. Seglen, PO, *Preparation of isolated rat liver cells*. Methods Cell Biol, 1976. **13**: p. 29-83.
66. Sheridan, MH, LD Shea, MC Peters, and DJ Mooney, *Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery*. J Control Release, 2000. **64**(1-3): p. 91-102.
67. Skalak, R and C Fox. *Tissue engineering: Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988 (UCLA symposia on molecular and cellular biology)*. in *UCLA symposia on molecular and cellular biology*. 1988. Granlibakken, Lake Tahoe, California/USA: Liss.
68. Tong, JZ, P De Lagausie, V Furlan, T Cresteil, O Bernard, and F Alvarez, *Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids*. Exp Cell Res, 1992. **200**(2): p. 326-32.
69. Tong, JZ, S Sarrazin, D Cassio, F Gauthier, and F Alvarez, *Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation*. Biol Cell, 1994. **81**(1): p. 77-81.

70. Torok, E, JM Pollok, PX Ma, PM Kaufmann, M Dandri, J Petersen, MR Burda, D Kluth, F Perner, and X Rogiers, *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**(1): p. 34-41.
71. Torok, E, JM Pollok, PX Ma, C Vogel, M Dandri, J Petersen, MR Burda, PM Kaufmann, D Kluth, and X Rogiers, *Hepatic tissue engineering on 3-dimensional biodegradable polymers within a pulsatile flow bioreactor*. Dig Surg, 2001. **18**(3): p. 196-203.
72. Torok, E, C Vogel, M Lutgehetmann, PX Ma, M Dandri, J Petersen, MR Burda, K Siebert, J Dullmann, X Rogiers, and JM Pollok, *Morphological and functional analysis of rat hepatocyte spheroids generated on poly(L-lactic acid) polymer in a pulsatile flow bioreactor*. Tissue Eng, 2006. **12**(7): p. 1881-90.
73. Uludag, H, P De Vos, and PA Tresco, *Technology of mammalian cell encapsulation*. Adv Drug Deliv Rev, 2000. **42**(1-2): p. 29-64.
74. Uyama, S, PM Kaufmann, T Takeda, and JP Vacanti, *Delivery of whole liver-equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation*. Transplantation, 1993. **55**(4): p. 932-5.
75. Wang, L, J Sun, L Li, D Mears, M Horvat, and AG Sheil, *Comparison of porcine hepatocytes with human hepatoma (C3A) cells for use in a bioartificial liver support system*. Cell Transplant, 1998. **7**(5): p. 459-68.
76. Xue, L, PK Shireman, B Hampton, WH Burgess, and HP Greisler, *The cysteine-free fibroblast growth factor 1 mutant induces heparin-independent proliferation of endothelial cells and smooth muscle cells*. J Surg Res, 2000. **92**(2): p. 255-60.

7. Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Dr. med. Jörg-Matthias Pollok für die Überlassung des Themas und für den menschlichen und unkomplizierten Umgang während seiner Betreuung dieser Forschungsarbeit. Mein Dank gilt auch dem ehemaligen ärztlichen Leiter der Klinik für hepatobiliäre Chirurgie und des Transplantationszentrums des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Herrn Dr. med. Dr. h.c. Xavier Rogiers für die Bereitstellung der erforderlichen Räumlichkeiten und Apparaturen.

Ich danke besonders Frau Dr. Éva Török-Pollok für die ausführliche Einarbeitung in die verschiedenen Methodiken im Labor, die Hilfe bei den Zellisolationen und bei der Beschickung der Zellkultursysteme und für die gewissenhafte Betreuung.

Für die Unterstützung bei der Isolation von humanen Leberzellen und bei der Northern Blot Analyse danke ich den Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Institutes, Frau Dr. Maura Dandri und Herrn Dr. rer. nat. Martin R. Burda.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Jochen Düllmann und Klaus Siebert für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Besonderer Dank gilt meinen Doktorandenkolleginnen und –Kollegen Ulrike Markus, Inga Paasch, Christian Cordes und Marc Lütgehetmann. Aus der gemeinsamen Situation heraus konnte so die Arbeit auch bei frustrierten Versuchen in netter partnerschaftlicher Atmosphäre und im gegenseitigen Erfahrungsaustausch motivierend vorangehen.

Den netten und hilfsbereiten Mitarbeiterinnen im Labor der chirurgischen Forschung, namentlich besonders Frau Sigfried Himpel und Frau Silke Brilloff, danke ich für ihre Unterstützung durch Rat und Tat.

Ich möchte meinem ersten Chefarzt Dr. med. Thomas Stamm für die Bewilligung eines Sonderurlaubes zum Fertigstellen dieser Arbeit danken.

Ich danke meinem Vater für die moralische und materielle Unterstützung während der ganzen Zeit des Studiums. Ich war mir seines Vertrauens in das Gelingen sicher.

Ich danke meiner Mutter, die an mich glaubt und mich mit ihrer Zuversicht stärkt.

Zuletzt danke ich all meinen Lieben, die mich während der ganzen Zeit unterstützt haben, und die hinter diesem Projekt manchmal zurückstehen mussten, wenn die Zellen meine Anwesenheit im Labor erforderten, für ihre Geduld, Nachsicht und ihre Zuversicht.

8. Lebenslauf

Geburtsdatum: 02.10.1976
Geburtsort: Hamburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Helmut Melbeck, geb. 03.02.1946
Ute R. Melbeck, geborene Schumann, geb. 07.08.1955

Schule

1983 – 1987 Grundschohle Heist
1987 – 1989 Realschohle Moorree
1989 – 1996 Ludwig-Meyn-Gymnasium Uetersen (Abitur)

Zivildienst

1996 – 1997 Zivildienst (Diakoniestation Moorree-Elbmarsch)

Studium

April 1998 Immatrikulation Universität Hamburg: Medizin
März 2000 Physikum
März 2001 1. Staatsexamen
September 2003 2. Staatsexamen
Dezember 2004 3. Staatsexamen: Approbation als Arzt

Forschung

Seit Juni 2000 Chirurgische Forschung, Transplantationszentrum, Klinik und Poliklinik für hepatobiliäre Chirurgie und viszerale Transplantation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Xavier Rogiers
Doktorvater: PD Dr. med. Dr. phil. Jörg-Matthias Pollok

Ärztliche Tätigkeit

15.02.2005 – 30.11.2006 Westküstenklinikum Heide, Klinik für Frührehabilitation und Geriatrie, Schlaganfallmedizin. Chefarzt Dr. med. Thomas Stamm: Weiterbildung Innere Medizin und Neurologie
Seit 01.12.2006 Praxis Dr. med. Johannes Kielholz in Wöhrden: Weiterbildung Allgemeinmedizin

9. Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....