

Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie Zentrum für Frauen-Kinder-Jugendmedizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. W. Lambrecht

Kultur und Transplantation von Rattenhepatozyten unter Verwendung eines Fibringel als Matrix

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der

Universität Hamburg vorgelegt von

Stephanie Anna Angelika Holzhüter

aus Rostock

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Warum Hepatozytentransplantation und Methodenentwicklung.....	1
1.2. Orthotope und heterotope Hepatozytentransplantation.....	2
1.2.1. Orthotope Transplantation in die Portalvene.....	2
1.2.2. Heterotope Hepatozytentransplantation in den Peritonealraum.....	3
1.3. Die Fragestellung der idealen Matrix.....	5
1.3.1. Ziele.....	6
2. Material und Methoden.....	7
2.1. Übersicht über das Versuchsmodell.....	7
2.2. Isolation und Aufarbeitung der Hepatozyten.....	8
2.3. In-vitro Versuch.....	9
2.3.1. Komposition der Zell-Matrix.....	9
2.3.2. Kulturmedium und Zellkulturbedingungen.....	9
2.3.3. DNA Assay mit Standardkurve.....	10
2.3.4. RNS-Isolation.....	11
2.3.5. PCR und Gel-Elektrophorese.....	12
2.3.6. Histologie und Immunhistologie.....	13
2.4. In-vivo Versuch	13
2.4.1. Vorversuch zur Etablierung der Färbemethode mit PKH26.....	13
2.4.2. Analysemethode: Färbung mit dem Fluoreszenzmarker PKH26.....	14
2.4.3. Fibringel Matrix Injektion.....	15
2.4.4. Gruppen der Empfängertiere und Hepatozytentransplantation.....	16
2.4.4.1. Gruppe 1: Vorversuch zur Etablierung der Methode ohne PKH26- Färbung.....	16
2.4.4.2. Gruppe 2: Empfängertiere mit PKH-Färbung.....	17
2.4.5. Leberexplantation und Präparatelagerung.....	18
2.4.6. Analysemethodenprotokoll: Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	19
2.4.7. Analysemethodenprotokolle: APAAP-Färbung.....	19
2.5. Statistische Analysen:.....	20
3. Ergebnisse.....	21
3.1. Hepatozytenkultur in der Fibrinmatrix.....	21
3.2. Genexpression der Hepatozytenkultur in der Fibrinmatrix.....	21
3.3. Histologie und Immunhistologie der Hepatozytenkultur.....	22
3.4. Hepatozytentransplantation mit Fibringel als Matrix.....	24
3.4.1. Allgemeine Komplikationen in beiden Gruppen.....	24
3.4.2. Histologie und Immunhistologie der Transplantationsstudie.....	25

4. Diskussion.....	36
4.1. Überblick.....	36
4.1.1. Hepatozytentransplantation in die Milz und das Pankreas.....	38
4.1.2. Heterotope Hepatozytentransplantation in die Nierenkapsel.....	40
4.2. Verwendung dreidimensionaler Matrizes und Hepatozytenkultur.....	40
4.2.1. Hepatozytenkultur.....	41
4.2.2. Einfluss dreidimensionaler Matrizes auf die Hepatozytenkultur.....	42
4.2.3. Künstliche Gewebezucht von Lebergewebe (BIOREAKTOR).....	43
4.3. Bedeutung des in-vitro Versuches.....	45
4.4. Engraftment von Hepatozyten in das Empfängergewebe.....	46
4.5. Engraftment von nicht-parenchymatösen Leberzellen in das Empfängergewebe.....	48
4.6. Ausblick.....	50
5. Zusammenfassung.....	51
6. Literaturverzeichnis.....	52

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aFGF	acidic fibroblast growth factor
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BAL	Bioartificial liver
Cat.No	Katalognummer
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CK	Cytokeratin
CNS	Crigler-Najjar- Syndrom
CO ₂	Kohlendioxid
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
ECM	Extrazelluläre Matrix
ED-1	Endothel
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
et al.	et alii
F-CaCl ₂	Calciumchlorid (Wasser frei)
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
g/ccm	Gramm pro Kubikzentimeter
HB-EGF	Heparin – binding EGF like growth factor
HE	Hämotoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N´-[2-ethanesulfonicacid]
HGF	Hepatocyte Growth Factor
H ₂ O	Wasser
HSC	Hepatische Stellatumzellen (Itozelle)
IE	Internationale Einheiten
KCl	Kaliumchlorid

KGF	keratinocyte growth factor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NAR	Nagase Analbuminemic Ratte
NaOHaq	Natronlauge konzentriert 32%
nm	Nanometer
NTBC	2-(2-nitro-4-trifluoromethyl-benzoyl)-cyclohexane-1, 3-dione
PBS	Phosphatase – buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKU	Phenylkentonurie
recomb.	Recombinante
RER	Ribosomales Endoplasmatisches Retikulum
RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
TGFalpha	transforming growth factor alpha
T ₃ / T ₄	Trijodthyronin/ Thyroxin
UDP	Uridin-5'-diphosphat
V.	Vena

1. Einleitung

1.1. Warum Hepatozytentransplantation und Methodenentwicklung

Die Lebertransplantation hat sich in der Behandlung fortgeschrittener chronischer Lebererkrankungen, in der Korrektur genetischer Störungen und in der Behandlung des akuten Leberausfalls als Goldstandard etabliert. Der großen Zahl von Patienten, die auf eine lebensrettende Transplantation warten, steht derzeit aber eine begrenzte Verfügbarkeit von geeigneten Spenderorganen gegenüber. In Deutschland warten derzeit ca. 1400 Menschen auf eine Lebertransplantation (Deutsche Stiftung Organtransplantation). Aus ökonomischen Gründen steht die therapeutische Option der Lebertransplantation in vielen Ländern der Erde überhaupt nicht zur Verfügung. Die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Transplantation ist daher dringend notwendig, um die Behandlung des akuten und chronischen Leberversagens in den nächsten Jahren zu gewährleisten. Eine signifikante Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten ist durch den Einsatz von Zelltherapieverfahren (Fox et al. 1988; Mito et al. 1992; Strohm et al. 1997) für Lebererkrankungen gezeigt worden. Ziele der Zelltherapie sind die biologische Funktion eines geschädigten Organs zu reparieren oder zu verbessern. Die Vorteile der Zelltransplantation sind insbesondere in der Spezifität der Therapie zu sehen. Vor allem für den Ersatz bei einzelnen Leberfunktionsstörungen, wie sie durch den genetischen Enzymmangel z.B. bei hereditären Stoffwechselerkrankungen vorkommen, könnte die Zelltransplantation an Stelle einer kompletten Organtransplantation vorgenommen werden. Für eine solche Behandlung wäre nur eine Zellmenge von ca. 5-10 % des Zellanteils der gesamten Leber erforderlich, so dass durch ein Spenderorgan mehrere Patienten behandelt werden könnten. Weiterhin könnte ein sicherer ex-vivo Gentransfer durchgeführt werden, um den jeweiligen Stoffwechseldefekt zu beheben (Grossmann et al. 1994). Die Verwendung von autologen Hepatozyten ergäbe den Vorteil, dass keine lebenslange Immunsuppression erforderlich wäre. Der Eingriff zur Zelltransplantation könnte bei optimalen Bedingungen minimalinvasiv durchgeführt werden. Operationen sind mit Komplikationen verbunden. Bei einer minimalinvasiv durchgeführten Zelltransplantation würde das Risiko der Akutkomplikationen, wie Blutungen, Embolien und Infektionen, wesentlich geringer sein. Derzeit werden international

Untersuchungen zur Isolation von menschlichen Hepatozyten durchgeführt (Baccarani et al. 2003). Zur Charakterisierung, Isolierung und Lagerung von Hepatozyten werden z.B. kryokonservierende Techniken erforscht und erprobt. So können kryokonservierte Hepatozyten in einer Zellbank vorgehalten und im Bedarfsfall jederzeit für die Behandlung von Patienten zur Verfügung gestellt werden (Canaple et al. 2001; Chen et al. 2002; Li et al. 1999; Lloyd et al. 2003; Park et al. 2003).

1.2. Orthotope und heterotope Hepatozytentransplantation

Viele verschiedene anatomische Lokalisationen für eine Hepatozytentransplantation sind bisher untersucht worden. Es wird zwischen zwei Verfahren der Hepatozytentransplantation unterschieden. Eine Methode ist die orthotope Hepatozytentransplantation. Bei der orthotopen Hepatozytentransplantation werden Hepatozyten in die Vena portae beziehungsweise in die Milz transplantiert und migrieren in die Leber. Diese Technik ist in tierexperimentellen Studien zur Behandlung des akuten oder des chronischen Leberversagens und für angeborene Stoffwechselstörungen untersucht worden. Eine weitere Methode ist die heterotope Hepatozytentransplantation. In verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Hepatozyten z.B. in die Nierenkapsel und in das Peritoneum transplantiert. In diesem Zusammenhang hat sich die zentrale Stellung einer spezifischen Stimulation der transplantierten Zellen durch Wachstumsfaktoren oder einer dreidimensionalen Matrix als Zellträger herausgestellt.

1.2.1. Orthotope Transplantation in die Portalvene

Eine Transplantation von Hepatozyten ist zum ersten Mal bei einem 10-jährigen Mädchen mit einem Crigler-Najjar-Syndrome Typ I angewandt worden. CNS-I ist eine Erkrankung, die mit einem angeborenen Mangel an UDP verbunden ist (Fox et al 1998). Nach der Transplantation in die Portalvene zeigte die Patientin eine Verringerung des Billirubingehaltes im Serum, was für den Erfolg der Methode spricht. Dieser Applikationsweg enthält aber auch Komplikationen, an denen andere Patienten verstorben sind. Die Hauptkomplikationen sind eine Portalvenenthrombose mit portaler Hypertension sowie die Abwanderung der transplantierten Hepatozyten in die Lunge

und der daraus resultierenden Gefahr der Embolieentwicklung (Baccarani et al. 2005; Strohm et al. 1997). Es besteht jedoch Unsicherheit, wie viele Zellen erforderlich sind, um den gewünschten Effekt herzustellen. Es ist belegt, dass hormonelle Substanzen des portalen Blutes als hepatotrophe Faktoren funktionieren. Insbesondere bei einer Unterbrechung der Versorgung der Leberzellen mit Insulin aus den Pankreasinseln über die Portalvene, kommt es zur Leberatrophie (Starzl et al. 1973). Unter diesem Aspekt sind extrazelluläre Stimulationsmodelle für Hepatozyten untersucht worden (Berthiaume et al. 1996; Mooney et al. 1992; Mooney et al. 1995).

1.2.2. Heterotope Hepatozytentransplantation in den Peritonealraum

Für unser Modell der Hepatozytentransplantation mit Hilfe einer Fibrinmatrix ist das Verständnis über die Wertigkeit einer Matrix bei einer Hepatozytentransplantation sehr wichtig. Henne-Brunns et al. untersuchten die intraperitoneale Hepatozytentransplantation als eine Therapie bei akutem Leberversagen ohne unterstützende Matrizes. Eine Hepatozytentransplantation in die Bauchhöhle ohne eine stimulierende Matrix führte zum Stillstand der Zelldifferenzierung, sowie zur Zellnekrose und Untergang der transplantierten Zellen, verbunden mit einer Granulombildung im Peritoneum (Henne-Brunns et al. 1991). Tissue Engineering ist definiert als eine Wissenschaft mit dem Ziel, durch Verbindung der Prinzipien des Ingenieurwesens mit denen der Medizin biologischen Gewebeersatz zu gewinnen. Dieser soll die Funktionen des verlorenen Gewebes wiederherstellen oder sogar verbessern (Langer R u. Vacanti JP 1993). Für die heterotope Hepatozytentransplantation kann das Prinzip des Tissue Engineering durch den Einsatz von dreidimensionalen polymeren Matrizes als Stützgerüst und zur Stimulation der transplantierten Zellen angewendet werden. Uyama et al. transplantierten eine Anzahl von Hepatozyten, die einer ganzen Leber entsprächen, auf einer polymeren Matrix in das Mesenterium und unter die Haut von Lewis- und Gunn-Ratten und zeigten, dass nach einer Woche durchschnittlich 10,8 % und 18 % der Hepatozyten sich angesiedelt hatten und funktionstüchtig waren (Uyama et al. 1993). Auch die Transplantation von allogenen Hepatozyten in das Peritoneum von Ratten wurde erfolgreich untersucht. Die semipermeable Membran verhinderte hier eine Immunreaktion auf die fremden Zellen, so dass diese ohne Immunsuppression über drei Monate überlebten (Balladur et al. 1995). Die Bauchhöhle als Transplantationsort zu verwenden, bietet bestimmte Vorteile,

so dass dieses Modell in verschiedenen Arbeitsgruppen weiter entwickelt worden ist (Demetriou et al. 1986). Der Zugang in die Bauchhöhle kann minimalinvasiv gewählt werden, so dass operative Risiken, wie unstillbare Blutungen, Narkosezwischenfälle und Bridenbildung, relativ klein gehalten werden können. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, höhere Zellzahlen in die Bauchhöhle zu transplantieren. Sie ist nicht in dem Maße limitiert, wie bei Transplantationen in die Portalvene oder in die Milz. Grundlegend war die Erkenntnis, dass dreidimensionale Stützgerüste bei Transplantation von Zellen die Ausbildung eines dauerhaften und vaskularisierten Gewebes unterstützen. Die meisten dreidimensionalen Stützgerüste, wie z.B. Polymere, wurden als Matrix zur Ausbildung von dauerhaftem Gewebe genutzt. Im Falle der Hepatozytentransplantation konnten Matsushita et al. nachweisen, dass kugelförmige multizelluläre Aggregate aus Hepatozyten, so genannte Spheroide, eine höhere Albuminproduktion haben als Hepatozyten, die in normalen Monolayern wuchsen (Matusushita et al. 1991). Mit der Anwendung von Angiogenese- und natürlichen proliferationsunterstützenden Wachstumsfaktoren, wurde die Überlebensdauer deutlich erhöht. Als weiteres Modell der heterotopen Transplantation sind Hepatozyten unter Co-Transplantation mit isolierten Langerhansinseln aus dem Pankreas auf einer dreidimensionalen Matrix in die Bauchhöhle erfolgreich transplantiert worden. Es konnte gezeigt werden, dass diese eine ähnliche, stimulierende Wirkung auf Hepatozyten zeigen, wie die Faktoren des portalen Venenblutes (Kaufmann et al. 1994; Kaufmann et al. 1999; Kneser et al. 1999; Xiangdong et al 1992). Gegenüber einer Infusion in die Portalvene ermöglicht die Methode der Transplantation in die Bauchhöhle keine Limitierung der Zellzahlanwendung. Eine Hepatozytentransplantation und Zellteilung kann unabhängig vom Organ Leber stattfinden. Nachteile ergeben sich aus der Tatsache, dass ein Fremdkörper in das Abdomen transplantiert wird. Ein nicht biologisch abbaubarer Fremdkörper verursacht Reaktionen, die mit dem Angriff auf das Transplantat verbunden sind. Im Mausmodell ist bestätigt worden, dass diese Form der Transplantation zur Akuttherapie der Enzephalopathie bei akutem Leberversagen dienen könnte (Ribel et al. 1992). Ein Fallbeispiel beschreibt, dass das akute Leberversagen bei einer schwangeren Patientin durch peritoneale Transplantation von humanen fetalen Hepatozyten signifikant verbessert werden konnte (Khan et al. 2004). Jedoch gilt für dieses Transplantationsmodell, dass die Zellteilungsrate aufgrund der Matrix und der Anzahl an Pankreasinseln limitiert und aufwendig ist. Zum anderen können diese transplantierten Hepatozyten keinen Gallengang ausbilden, bzw. haben

keinen Anschluss an ein funktionierendes Gallengangssystem.

1.3. Die Fragestellung der idealen Matrix

Für eine klinisch verwendbare orthotope Transplantation von Hepatozyten in die Leber wäre eine Methode ohne die erwähnten Nebeneffekte der intraportalen Injektion wünschenswert. Nach Schilderungen der verschiedenen Matricesysteme stellt sich nun die Frage, welche Vorteile eine Fibrinmatrix, als ein Beispiel für Zwei-Phasen-Klebstoffe, erreichen könnte. Hierfür ist es sicherlich erforderlich, sich vor Augen zu führen, in welchen Bereichen der Medizin Klebstoffe bereits obligat verwendet werden. Eine besondere Form chirurgischer Technik sind Klebstoffe zur Gewebevereinigung, zur Blutstillung und zum Abdichten von Hohlorganen. Insbesondere humanes Fibrin, Faktor XIII und Fibronectin, in Form einer Mischemulgation zubereitet und dann sofort aufgetragen, führen innerhalb von einer Minute zur Abdichtung eines Gewebeareals. Diese Lösung ist meist als Zwei-Komponenten-System erhältlich (Tissucol®, Beriplast®). Diese Technik ist so erfolgreich, da Fibrinklebstoffe resorbierbar und daher als biologische Matrix abbaubar sind. Zum Beispiel ist Fibrin in der Leberchirurgie als Substanz zum Verschluss von Leberrißen fest etabliert (Feinstein et al. 2001; Ochsner et al. 1990). Daraus entwickelt sich die Idee, Fibrin als injizierbare Matrix zur Leberzelltransplantation zu verwenden. Diese Substanz bildet eine dreidimensionale Konfiguration eines idealen Zell-Zell-Systems und unterstützt somit die Zellentwicklung und Differenzierung. Verschiedene Zelltypen, unter anderem Knorpel, Knochen und Urothelzellen wurden unter Verwendung des Firbingels als Zwei-Komponenten-Matrix transplantiert (Wechselberger et al. 2003; Xu et al. 2004). So konnten Urothelzellen im Cluster durch Fibrinkleber als mobile Zwei-Phasen Matrix erfolgreich zur Rekonstruktion der ableitenden Harnwege verwendet werden. Schlussfolgernd wird deutlich, dass Fibrin gerade dem Anspruch einer orthotopen Transplantation von Zellen gerecht wird. Fibrin ist für einen minimalinvasiven Eingriff zur Transplantation von unterschiedlichen Zelltypen geeignet.

1.3.1. Ziele

In dieser Arbeit wird die Methode untersucht, Fibrin als injizierbare Matrix für eine orthotope extravaskuläre Hepatozytentransplantation zu verwenden.

1. Ist eine injizierbare Matrix (z.B. Fibrinringel) geeignet für das Überleben und die Funktion von Leberzellen?

Diese Fragestellung soll im in-vitro Versuch beantwortet werden.

2. Ist es möglich, Zellen mit einer Matrix zur Stimulation in die Leber zu transplantieren?

Diese Fragestellung soll im in-vivo Versuch beantwortet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Übersicht über das Versuchsmodell

Das gesamte Modell wurde mit Rattenhepatozyten durchgeführt. Die Isolierung der Zellen erfolgte durch eine modifizierte Kollagenasenperfusion aus den Lebern von Lewis-Ratten. Wir teilten unseren Versuchsaufbau in einen in-vitro Versuch und einen in-vivo Versuch. Als Matrix für den jeweiligen Versuch diente das Fibrin, welches aus den Komponenten Thrombin und Fibrin hergestellt wurde. Zunächst sollte untersucht und überprüft werden, wie Hepatozyten im Fibrin reagieren. Hierfür wurden die Hepatozyten in einem Tropfen Fibrin mit dem Nährmedium für mehrere Tage beobachtet. Die Messung der Zellzahl wurde durch DNA-Assay protokolliert. Die Zelldifferenzierung und Vitalitätssicherung erfolgte mit Hilfe RT-PCR und immunhistologisch für die leberspezifischen Marker CK-18 und Albumin. Zur Analyse, in wie weit eine Injektion von Fibrin in vitales organisches Gewebe zur Hepatozytentransplantation möglich ist, führten wir einen in-vivo Versuch durch. Als Empfängertiere wurden ebenfalls Lewis-Ratten verwendet. Die Transplantation erfolgte sowohl unter die Kapsel der Leber des Empfängertieres, als auch mit einem tiefen Stichkanal in das Parenchym der Leber. Die Explantation erfolgte nach einer Transplantationsdauer in Stunde 0, nach 2 Tagen, nach 7 Tagen und nach drei Monaten. In dieser Testreihe wurden die isolierten Hepatozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 inkubiert. Die Vitalität und Funktion der Hepatozyten wurde in Gefrierschnitten geprüft. Im Rhodaminfilter (Emission 567 nm) konnten die transplantierten Zellen der Testreihe anhand der Fluoreszenz detektiert werden. Als immunhistochemische Marker zur Vitalitätsbestimmung der Zellen sind Färbungen mit HE und CK 18 durchgeführt worden. Die Untersuchung der Regeneration des Lebergewebes, die Wechselwirkungen der Matrix im ortständigen Gewebe und im traumatischen Areal erfolgte durch den nicht-parenchymatösen Bindegewebsmarker Desmin und ED-1. Den Tieren dieser Transplantationsstudie wurde täglich das Immunsuppressivum Cyclosporin A intramuskulär gespritzt.

2.2. Isolation und Aufarbeitung der Hepatozyten

In beiden Versuchen erfolgte die Haltung der Spendertiere zu den gleichen Bedingungen. Weiterhin erfolgte die Isolation und Aufarbeitung der Hepatozyten im in-vivo und in-vitro Versuch nach dem gleichen Verfahren. Die Isolation der Hepatozyten erfolgte durch eine Zwei-Schritt Collagenaseperfusion auf der Basis einer modifizierten Methode nach Seglen aus männlichen Lewis-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Germany, 250 g – 400 g) (Seglen 1976). Für die durchgeführten Eingriffe lag eine Genehmigung der Behörde für Arbeit und Gesundheit der Freien Hansestadt Hamburg (Organentnahme Antragsnummer Org. 172; Tierversuchsantragsnummer 53/ 01) vor. Die Spendertiere sind artgerecht mit Tag-Nacht-Rhythmus, freiem Zugang zu normaler Nahrung und Flüssigkeit von Tierpflegern im Institut für Versuchstierhaltung der Universitätsklinik Hamburg gehalten worden. Alle Experimente wurden gemäss den Anforderungen an die Gesundheit und Sicherheit für Labortiere durchgeführt. Bei allen Eingriffen hat eine Anästhesie mit Äther stattgefunden. Die Leibeshöhle wurde durch einen V – Schnitt eröffnet, die Vena Portae ist dargestellt worden und die lebernahen Zuflüsse (V. Pylorica und V. Lienalis) wurden mit 5 x 0 Ligaturen unterbunden. Das Versuchstier hat eine Heparinisierung mit 125 IE Heparin (Liqiumin Roche) erhalten. Die V. Portae wurde durch distale Ligatur und proximales Aufsetzen einer Gefäßklemme abgeklemmt. In diesem Bereich erfolgte eine Punktion mit einer Braunüle, die dann mit Hilfe der proximalen Gefäßklemme fixiert wurde. Die infrahepatische V. Cava ist als Abfluss durchtrennt worden. Im ersten Versuchsschritt ist die Leber mit kalziumfreier Pufferlösung (8,3 g NaOH, 2,38 g Hepes, 0,5 g KCl in 1,0l Aqua dest., pH 7,4 mit NaOHaq eingestellt, bei 37 °C, und 30 ml/min Flussgeschwindigkeit) 6 Minute perfundiert worden. Anschließend wurde die Leber mit Collagenaselösung (8,3 g NaCl, 2,38 g Hepes, 0,5 g KCl, 0,7 g CaCl₂x2H₂O, 500 mg Boehringer Collagenase H, 500 µl ICN-Trypsininhibitor, pH = 7,35 mit NaOHaq eingestellt, bei 37 °C, und 30 ml/min Flussgeschwindigkeit) 6-10 Minuten perfundiert. Die Perfusionsapparatur bestand aus einem Schlauchsystem mit getrennten Kreisläufen für Pufferlösung und Collagenaselösung. Die perfundierte Leber wurde entnommen und in 25 ml Williams-Medium E auf Eis gelagert. Die Kapsel konnte anschließend durch mehrere Schnitte eröffnet und die isolierten Zellen durch sanftes Ausschütteln in das Medium überführt werden. Die Suspension wurde durch ein Nylon-Netz mit 200 µm Poren filtriert und danach zweimal mit 30 ml Williams-Medium E gewaschen und

zentrifugiert (400 g; 4 °C für 12 Minuten). Zur Reinigung der Zellen wurde ein Percoll R (Dichte 1,13 g/ccm; Sigma, Seelzen, Germany) durchgeführt. Abschliessend sind die Zellen noch zweimal in 30 ml Williams-Medium E gewaschen und erneut zentrifugiert (400 g; 4 °C für 12 min.) worden. Die Zellviabilität und Morphologie wurde in der Neubauer-Zählkammer nach 0.5 %iger Trypan-Blau-Färbung ermittelt und dokumentiert. Es wurden nur Hepatozyten von 80-95 % Viabilität und einer Gesamtzahl zwischen 3.0 bis 4.0×10^8 lebender Zellen für weitere Transplantationen verwendet.

2.3. In-vitro Versuch

2.3.1. Komposition der Zell-Matrix

Nach Isolation und Aufarbeitung der Rattenhepatozyten wurde aus den Komponenten Fibrinogen (human, Sigma F-CaCl₂ x 2H₂O) und lyophilisiertem Thrombin (Tissucal-Kit 1.0, Baxter-Immuno, Deutschland) eine Suspension hergestellt. Die Endkonzentration des Fibrinogens betrug 20 mg/ml in 0,9 % NaCl und wurde bei -20 °C gelagert. Das Thrombin wurde mit CaCl₂ 40 mM auf eine Endkonzentration von 50 IE/ ml eingestellt und bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung eines Tropfens aus der Fibrinmatrix und den isolierten Hepatozyten wurde zunächst 1,0 ml Thrombin aufgezogen und auf Eis gelagert. Nacheinander sind das isolierte Zellpellet mit einem Volumen von mindestens 1,0 ml und das hergestellte Fibrinogen von 1,0 ml Volumen in einer Spritze aufgezogen worden.

2.3.2. Kulturmedium und Zellkulturbedingungen

Die isolierten Hepatozyten in der Fibrinmatrix wurden in Versorgung mit einem Kulturmedium inkubiert. Für die Herstellung des Kulturmediums wurden in 500 ml Williams-E-Medium ohne L-Glutamin (Gibco, BRL 22551-022), 11,0 ml Hepes-pufferlösung (Sigma) und 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco; Cat.No. 15140-023) mit 5,5 ml L-Glutamin (Gibco; Cat.No. 15032-014) gelöst. Weiterhin sind darin 11,0 ml Natriumpyruvat (Gibco), 100 µl Insulin (Sigma), 100 µl EGF (recomb. human epidermal growth factor, Gibco) und 50 µl Dexamethason gelöst worden. Alle Zellreihen im Fibrin-Tropfen wurden auf Polystyren-sechs-Well-Platten (Greiner,

Frickenhausen, Germany) mit 2 ml Kulturmedium bei statischen Zellkulturbedingungen von 37 °C, 95 %iger Feuchtigkeit und in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Der Kulturmediumwechsel erfolgte täglich. Die Mediumproben für Analysen der DNA-Quantifikation, RNS Isolation, Histologie und Immunhistologie wurden aus den Kulturen nach dem 1. Tag, nach dem 3. Tag und nach dem 7. Tag entnommen.

2.3.3. DNA Assay mit Standardkurve

Aus dem Fibringel wurde unter Anwendung des QI Amp DNA Mini Kit (Fa. Quiagen Cat.-No.: 51306, Berlin, Germany) die DNA anhand folgender Bedingungen isoliert. Als Gerät wurde ein Gene Quant pro mit Drucker DPU-414 Thermal Printer verwendet. Ein tiefgefrorenes Probenpellet oder eine frische Probe wurde in 200 µl PBS mit 20 µl Proteinase K gemischt. Diese Probe wurde für 15 Sekunden gemischt, dann bei 56 °C für 10 Minuten im Heizblock mit Schüttelfunktion inkubiert und nun für 2-3 Minuten zentrifugiert, wobei der Überstand belassen wurde. Dieser Lösung sind 200 µl 100 % Ethanol zugegeben worden und es folgte eine erneute Durchmischung. Die Lösung wurde über die im Kit enthaltene Säule gegeben und für 2-3 Minuten bei 6000 min⁻¹ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säule wurde auf einen Tubegestellt, mit 500 µl des AW1 Puffers aus dem Kit benetzt und bei 11000 min⁻¹ zentrifugiert. Nun wurde die Säule auf einen zweiten Tube gestellt, mit 500 µl des Puffers AW 2 aus dem Kit benetzt, und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nachdem dass untere Tube entleert und auf ein leeres Tube gestellt wurde, erfolgte eine erneute Zentrifugation. Nun ist die Säule auf ein 1,5 ml großes Eppendorf-Tube gesetzt worden, wobei 100 µl des AE Puffers aus dem Kit zugegeben worden sind. Diese Lösung ist für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 2 Minuten bei 6000 min⁻¹ zentrifugiert worden. Das Eluat aus dem unteren Teil der Säule wurde ebenfalls für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 2 Minuten mit 6000 min⁻¹ zentrifugiert. Der isolierte DNA Anteil wurde unter Gebrauch des Photometer (Hoefler DNA Quant 200, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) mit einer Wellenlänge von 365 nm und einer Emission von 460 nm ausgemessen. Die Kalibrierung der DNA erfolgte mit Thymus DNA (Pharmacia Biotech). Die Standardkurve wurde berechnet aus der DNA von bekannten Hepatozytenanzahlen.

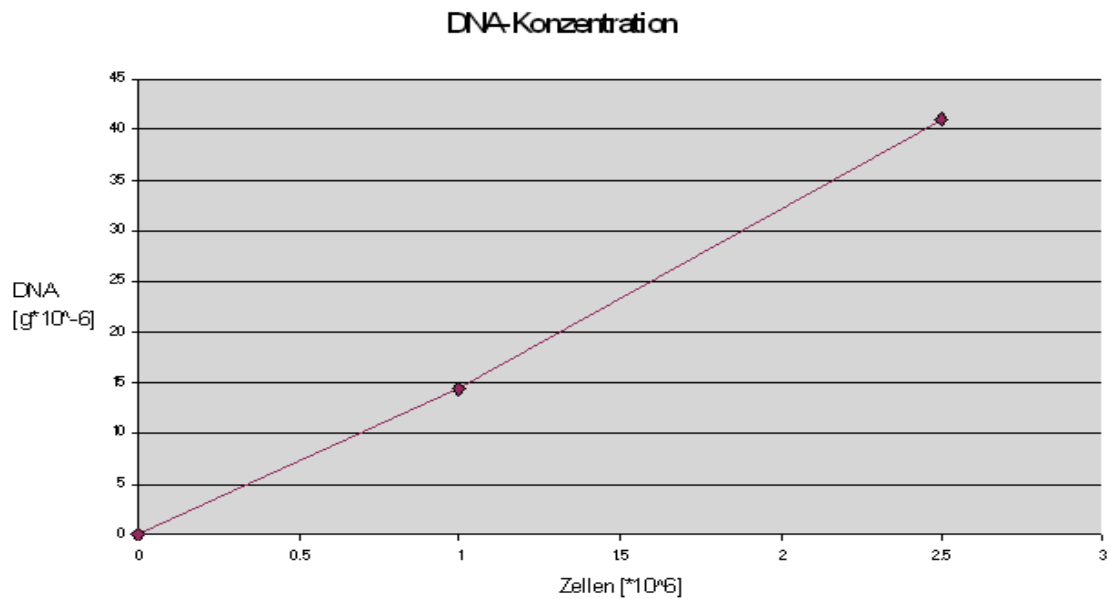


Diagramm 1 - DNA-Assay zur Berechnung der Standarddeichkurve -

Zur Zellzahl wurde eine Standardmenge DNA Menge pro Zelle im Verdünnungsversuch berechnet. Anhand dieser wurden die die DNA Mengen enthaltenen Zellen berechnet. Für jeden Zeitpunkt wurden 4 Proben evaluiert.

2.3.4. RNS-Isolation

Zur RNS Extraktion wurde das Invisorb Spin Cell-RNA™ Mini-kit (Invitex, Berlin, Germany) verwendet. Die Anwendung erfolgte laut folgendem Protokoll. Das Medium wurde in einer Pipette (200 μ l) resuspendiert, aus dem Well herausgenommen und in das 1,5 ml Eppi-Röhrchen gegossen. Dann erfolgte eine Zentrifugation von 6.000 min^{-1} für 5 Minuten. Es wurden 350 μ l RLT-Puffer hinzugegeben, das Pellet gut resuspendiert und für eine Minute homogenisiert. Nun sind 350 μ l 70 % Ethanol addiert worden. Somit wurden ca. 700 μ l ins Mini-Column pipettiert. Als nächster Schritt erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 min^{-1} für 1 Minute. Das Mini-Column ist in ein neues 2 ml Eppendorftube gestellt und mit 700 μ l RW1 vermischt worden. Wierderum erfolgt eine Zentrifugation bei 10.000 min^{-1} für 1 Minute. Das Rosa Mini-Column ist in ein zweites neues 2 ml großes Eppendorftube gestellt und mit 500 μ l RPE vermischt worden. Erneut erfolgte dann ein Zentrifugationsvorgang bei 10.000 min^{-1} für 1 Minute und ein Zusatz von 500 μ l RPE. Nun schloss sich eine Zentrifugation bei 10.000 min^{-1} für 2 Minuten an. Nachdem das Rosa Mini-Column in ein neues 1,5 ml großes Eppendorftube hineingestellt wurde, sind 20 μ l RNS-frei-Wasser (DEPC-Wasser) hinzugegeben worden. Eine erneute Zentrifugation bei 10.000 min^{-1} für 1 Minute schloss sich an. Das

Mini-Column wurde verworfen und 2 µl der Probe, sowie 198 µl DEPC-Wasser zur RNS-Bestimmung hinzugegeben. Die Probe wurde entweder sofort zur RT-PCR genutzt oder bei -80 °C tiefgefroren. Die reverse Transkriptase der isolierten RNS wurde unter Verwendung des First strand cDNA synthesis kit (Amersham, Freiburg, Germany) hergestellt. Die cDNA ist bei -20 °C gelagert worden.

2.3.5. PCR und Gel-Elektrophorese

In der Polymerasekettenreaktion mit der isolierten cDNA wurden folgende Primer hergestellt:

GAPDH, CK18, CK19 und Albumin. Die PCR Stränge wurden unter den statischen Bedingungen (siehe Tabelle 1) in dem programmierbaren Biometra Uno-Thermobloc (Biometra, Göttingen, Germany) in dem folgenden Programmablauf und der angegebenen Zyklenzahl amplifiziert. Zunächst erfolgte der Start mit 94 °C für 10 Minuten und dann die Amplifizierung in den Zyklen (siehe Tabelle 1), wobei jeweils eine Denaturierung für 1 Minute bei 94 °C, ein Annealing für 1 Minute bei 60 °C und die Elongation für 1 Minute bei 72 °C im Durchlauf integriert waren. Sobald die PCR abgeschlossen war, wurden die Tubes für 4 Minuten bei 72 °C und dann bei 4 °C in Ruhe gelagert. In jedem Durchgang wurde eine Negativkontrolle verwendet.

Primer	Temp. (°C)	Zeit (sec)	Zyklus -zahl
GAPDH Strang: 5' - CCT TCA TTG ACC TCA ACT AC - 3' Anti-Strang: 5' - GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC - 3'	62	60	30
Albumin Strang: 5' - GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC - 3' Anti-Strang: 5' - CCA CGA TCT TAC GGG TAG TTG - 3'	60	60	25
CK-18 Strang: 5' - ACC ATG CAG AAC CTG AAC GAT - 3' Anti-Strang: CAC CTC CAG CTC GCC ATT AG - 3'	62	60	30
CK-19 Strang: 5' - ATA CAC CCA GAA AGC ACC TC - 3' Anti-Strang: 5' - CAC GAA TTG TGC GAA TGT CAC - 3'	60	60	30

Tabelle 1 - Amplifizierte Primer in der Polymerasekettenreaktion -
Einzelne Stichproben der Amplifikation wurden in 1 % Agarose Gel (Agarose Eurogentec EP 0010-01 100 g) analysiert. Die Grössenbestimmung der PCR Fragmente erfolgte unter Verwendung der 100-base-pare ladder (Gibco BRL).

2.3.6. Histologie und Immunhistologie

Das isolierte Lebergewebe und das kulturgezüchtete Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur histologischen und immunhistologischen Untersuchung wurden Gefrierschnitte angefertigt. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde nach dem unter 2.4. aufgeführten Standardprotokoll durchgeführt. Die Immunhistologie erfolgte unter Anwendung von folgenden monoklonalen Mäuse Antikörpern (siehe Tabelle 2):

Antikörper	Technik-Färbung	Anti-Maus-AK Verdünnung	Hersteller
CK-18	APAAP	1:10, 1:800, 1: 200	ICN Cappel, Aurora, USA
ED-1	APAAP	1:10, 1:800, 1: 200	Serotec, Wiesbaden, Germany
Desmin	APAAP	1:10, 1:800, 1: 200	DE-R-11, Dako, Glostrup, Denmark
Albumin	Blockung durch 3% Peroxidase, Färbung: Diamino- benzidine	1:500, 1:100	FITC-markiertes anti-rat Albumin DPC, Wiesbaden, Germany, DAB-plus, DAKO

Tabelle 2 - Antikörper zur Immunhistologie -

Immunhistochemische Techniken zum Nachweis und Identifikation der antigenen Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper.

2.4. In-vivo Versuch

2.4.1. Vorversuch zur Etablierung der Färbemethode mit PKH26

Der fluoreszierende Farbstoff PKH26 wird zum Anfärben von Membranen der Zelle verwendet. Untersuchungen mit diesem Farbstoff zeigten, dass er in unterschiedlichen Systemen verwendet werden kann. PKH26 eignet sich insbesondere für Proliferationsstudien, da der Farbstoff sich in die Tochterpopulationen verteilt, wenn diese sich teilen. Dieser Farbstoff hat keine gesättigte Farbreaktion, die für alle Zelltypen gleichermaßen gelten könnte. Aufgrund dieses Hintergrundes ist es sehr wichtig, für den gewählten Versuch die beste Zusammensetzung des Farbstoffes und

seiner Verdünnungslösungen herauszufinden. In unserer Verdünnungsreihe wurde die Ausgangskonzentration mit 10^{-3} M PKH26 im Stock 100-mal verdünnt, um die optimale Leuchtintensität zu erhalten. In höheren Konzentrationen war die Erkennbarkeit der Zellgrenzen untereinander und zur Fibrinmatrix undeutlich. Unspezifische Leuchterscheinungen sind zur späteren Detektion unter dem entsprechenden Filter störend und somit unerwünscht. Neben diesem Effekt war auch in unseren Untersuchungen erkennbar, dass die Viabilität in zu hohen PKH26 Konzentrationen abnahm. So reagieren frisch isolierte Leberzellen mit einer Reduktion der Viabilität von ca. 10-20 % bei einer Steigerung der PKH26 Konzentrationen um 20 – 30 μ M. Zur Detektion der Zellen ist ein Rhodaminfilter (Filtermodul BX 60, Olympus optical, Europa) im Spektrumsbereich von 570 nm bis 590 nm verwendet worden.

2.4.2. Analysemethode: Färbung mit dem Fluoreszenzmarker PKH26

Die isolierten Hepatozyten wurden zur späteren Detektion im Empfängertier mit dem Fluoreszenzmarker PKH26-labeling kit (Sigma; USA) inkubiert. Dieser lagert sich in der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran ein. Die verwendete Ausgangskonzentration im Stock betrug 10^{-3} M. Mit der Durchführung der oben erläuterten Verdünnungsreihe wurde festgestellt, dass eine 100-fache Verdünnung der Ausgangskonzentration die optimale Leuchtintensität gewährleistet, ohne die Vitalität der Zellen zu schädigen. Zum Ansetzen des Farbstoffes wurden 10 μ l aus dem Stock mit 500 μ l Diluent C in einem Eppendorfgefäß resuspendiert. Anschließend sind 500 μ l des Zellpelletts mit 500 μ l Williams-Puffer mehrmals im angesetzten Farbstoff resuspendiert worden. Diese Suspension wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit ist mit dem Reinigungsvorgang begonnen worden. Mit 10 ml fetalem Kälberserum (FCS) wurde der Inkubationsvorgang gestoppt. Die Suspension ist zweimal im fetalen Kälberserum resuspendiert und zentrifugiert worden (500 g; 4 °C für 2 Minuten). Zur Eliminierung von FCS wurde das Zellpellet zweimal in 15 ml Williams-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (500 g; 4 °C für 4 Minuten). Bis zur Transplantation wurden die Hepatozyten auf Eis gelagert.

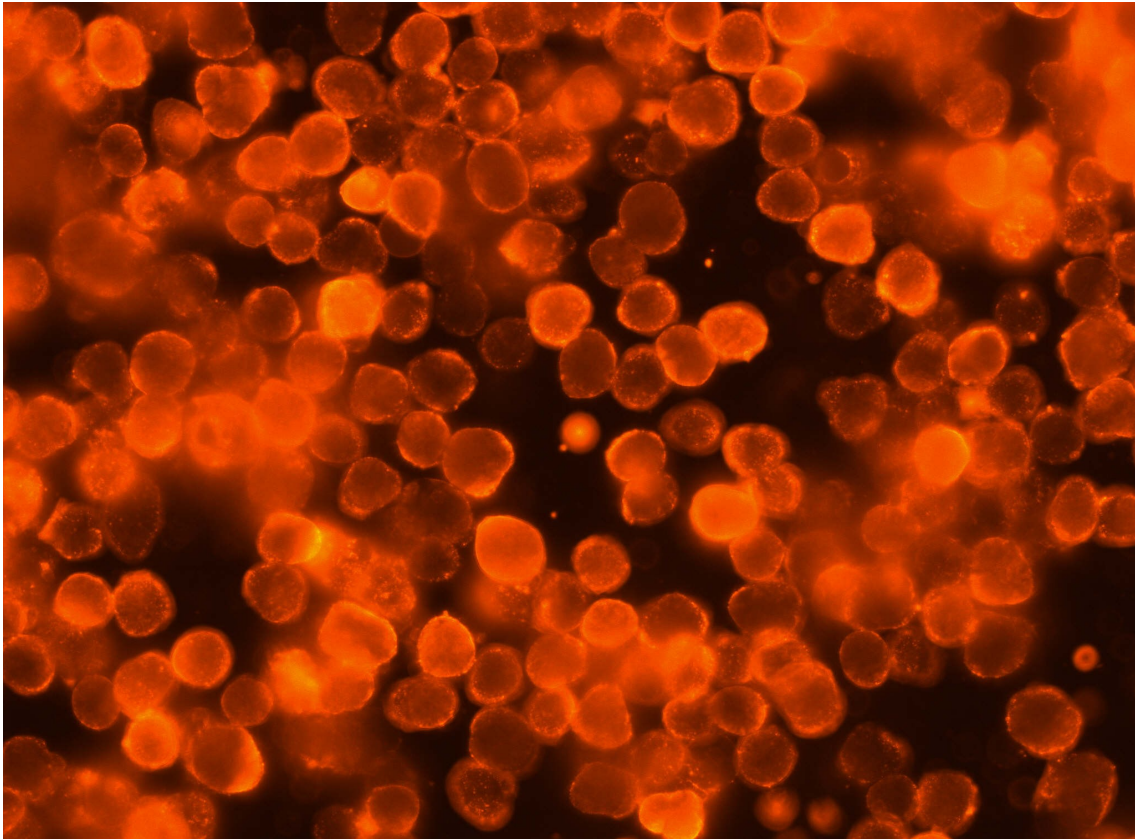


Abbildung 1 - Zytologischer Ausstrich isolierter Hepatozyten - Der Inkubationsvorgang mit PKH26 macht die Zellgrenzen und das Zytoplasma erkennbar. Eine Kernfärbung ist nicht erfolgt.

2.4.3. Fibringel Matrix Injektion

Als Komponenten des Fibringels sind auch im in-vitro Versuch Fibrinogen (human, Sigam F-CaCl₂ x 2H₂O) und lyophilisiertes Thrombin (Tissucal-Kit 1.0, Baxter-Immuno, Deutschland) verwendet worden. Das Fibrinogen hatte eine Endkonzentration von 20 mg/ml in 0,9 % NaCl und wurde bei -20 °C gelagert. Das Thrombin wurde mit CaCl₂ 40 mM auf eine Endkonzentration von 50 IE/ml eingestellt und bei 4 °C gelagert. Zur Transplantation in das Leberparenchym verwendeten wir den 2-Wege-Applikator (Tissuecol Duo S, Baxter, Vienna, Austria) mit einer integrierten Kanüle der Grösse 10. Zunächst wurde 1,0 ml Thrombin aufgezogen und auf Eis gelagert. Nacheinander sind das isolierte hepatozelluläre Pellet mit einem Volumen von mindestens 1,0 ml und das hergestellte Fibrinogen von 1,0 ml Volumen in einer Spritze aufgezogen worden. Auch diese Suspension wurde bis zur Transplantation auf Eis gelagert.

2.4.4. Gruppen der Empfängertiere und Hepatozytentransplantation

Als Empfängertiere wurden weibliche Lewis-Ratten (200-250 g; Charles River, Sulzfeld, Germany) verwendet. Alle Eingriffe wurden unter Äthernarkose durchgeführt. Die Leibeshöhle wurde durch einen Längsschnitt eröffnet, die Leber weiträumig und leicht zugänglich dargestellt. Die Komponenten Thrombin und die Fibrinzell-Suspension wurden in dem 2-Komponenten Applikator (Tissuecol Duo S, Baxter, Vienna, Austria) zusammengeführt. Anschließend wurde die Zell-Matrix-Suspension unter die Leberkapsel injiziert. Bereits kurz nach der Injektion ist jede Blutung gestoppt worden. Nach Abschluss der Transplantation wurde die Leber in die anatomische Lagerung zurückgelegt, die Durchblutung überprüft und die Leibeshöhle des Tieres mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Die Empfängertiere wurden sofort nach der Transplantation mit 2 IE Cyclosporin A (Sandimmun®) intra muskulär behandelt. Im weiteren Verlauf erfolgte eine tägliche Injektion mit dem Immunsuppressivum. Keines der Empfängertiere zeigte Symptome einer Beeinträchtigung der Vitalität.

2.4.4.1. Gruppe 1: Vorversuch zur Etablierung der Methode ohne PKH26-Färbung

Im Rahmen der Etablierung der Methode zum Erreichen von Zellzahlen mit einer Viabilität von über 90 %, und zum Erhalt von Langzeitergebnissen von bis zu 18 Monaten wurden in weibliche Lewis-Ratten Hepatozyten nach der oben beschriebenen Transplantationsmethode injiziert. Die in Versuchsgruppe 1 verwendeten Hepatozyten waren jedoch nicht mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 inkubiert worden. In dieser Gruppe bestand insbesondere die Fragestellung nach der Langzeitverträglichkeit der Methode für die Tiere und die Organe, wie Leber, Herz, Lunge und das Gefäßsystem. Wir verwendeten zur Transplantation in die weiblichen Lewis-Ratten Hepatozyten von männlichen Ratten. Im Rahmen dieser Überlegungen wurden folgende Tiere und Langzeitstudientiere untersucht. Es wurden 30 Tiere in die Studie der Gruppe 1 einbezogen. Insgesamt sind in dieser Gruppe 4 Tiere an Komplikationen der Äthernarkose verstorben. Diese Tiere sind aus der Studie ausgeschlossen worden.

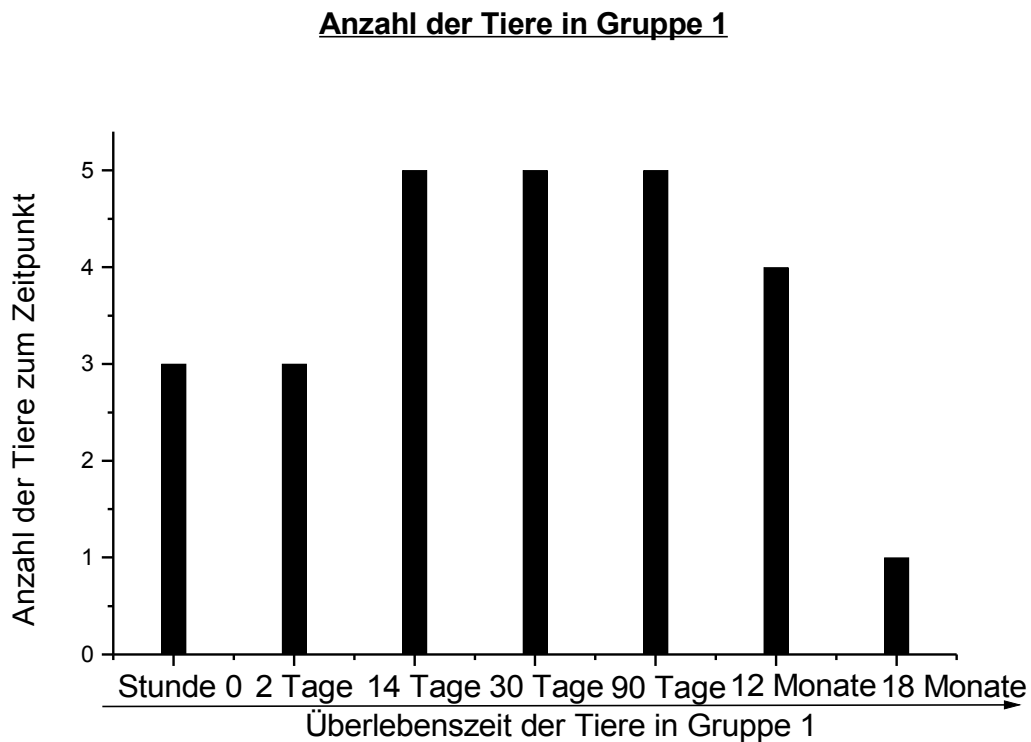


Diagramm 2 - Überlebensdiagramm Versuchstiergruppe 1 -
Verteilung der Anzahl der Tiere in Gruppe 1 bezüglich ihrer Überlebenszeit innerhalb des Analysenzeitraumes von 18 Monaten.

2.4.4.2. Gruppe 2: Empfängertiere mit PKH-Färbung

In dieser Studiengruppe sind 36 Tiere mit PKH26 markierten Hepatozyten transplantiert worden. Die Methodik wurde durchgeführt wie oben beschrieben. In dieser Gruppe ist 1 Tier an den Komplikationen der Äthernarkose verstorben, ein weiteres Tier entwickelte eine unstillbare Blutung des oberen Gastrointestinaltraktes durch Gefäßverletzung. Diese Tiere sind ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen worden.

Anzahl der Tiere in Gruppe 2

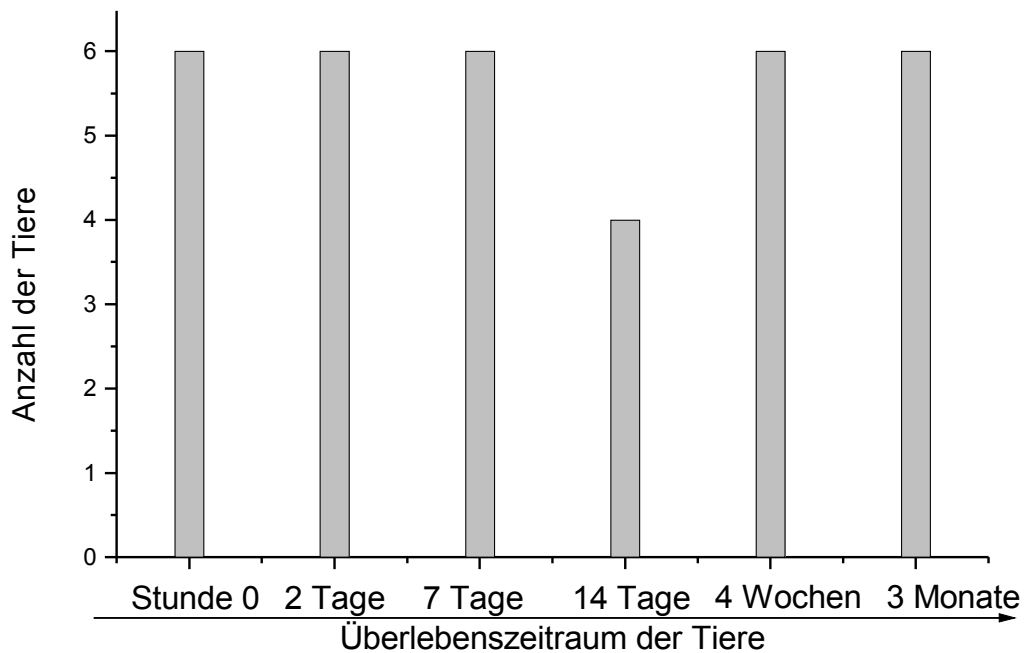


Diagramm 3 - Überlebensdiagramm Versuchstiergruppe 2 -

Verteilung der Anzahl der Tiere in Gruppe 2 bezüglich ihrer Überlebenszeit innerhalb des Analysenzeitraumes von 3 Monaten.

2.4.5. Leberexplantation und Präparatelagerung

Jedes der Empfängertiere hat bis zum Zeitpunkt der geplanten Explantation überlebt. Es konnten auch keine Symptome einer Unverträglichkeit gegenüber der Matrix oder der Operationsmethode festgestellt werden. Die Leberoberfläche war unauffällig und minderdurchblutete Areale waren makroskopisch nicht erkennbar. In weiteren entnommenen Organen, wie Herz und Lunge, gab es keine Hinweise auf Embolusbildung. Das Empfängertier wurde narkotisiert, die Leibeshöhle mit einem Längsschnitt eröffnet und die V. Cava sowie die Leber mobilisiert. Nach Durchtrennung der V. Cava erfolgte das Herauspräparieren der einzelnen Leberlappen. Die Leberlappen wurden in 3-4 cm kleine Einzelpräparate zerteilt und bis zur histologischen Aufarbeitung bei -80 °C tiefgefroren gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte mit der Gefrierschnitttechnik in die Schichtdicke von 6 µm.

2.4.6. Analysemethodenprotokoll: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der gewählte Gefrierschnitt wurde für 5 Minuten in Hämatoxylin gebadet. Dann erfolgte eine Reinigung von überschüssigen Farbbestandteilen unter fließendem Aqua dest. für 5 Minuten. Nun folgte das Spülen mit HCl. Eine erneute Neutralisierung wurde mit fließendem Aqua dest. für 5 Minuten durchgeführt. Nun ist der Objektträger in Eosin für 4 Minuten gebadet worden. Anschließend erfolgte das Spülen in der aufsteigenden Alkoholreihe. Zum Eindecken des Schnittes wurden Crystalmount und Clarion verwendet.

2.4.7. Analysemethodenprotokolle: APAAP-Färbung

Zunächst wurde der Gefrierschnitt durch Aceton RT für 10 Minuten fixiert. Dann erfolgte ein Neutralisierungsvorgang mit dem Puffer für 5 Minuten. Die anschließende Blockierung wurde mit Schweineserum 20 % (Dako Nr. XO901) durchgeführt. Als Primärantikörper wurden verwendet CK 18 (ICN Cappel, Aurora, USA) 1: 10 für 30 Minuten, der polyclonale FITC-markierte anti-rat Albumin (DPC, Wiesbaden, Germany), der Primärantikörper Desmin (DE-R-11, Dako, Glostrup, Denmark) 1: 200 für 30 Minuten sowie der Primärantikörper ED1 (Serotec, Wiesbaden, Germany) 1:800 ebenfalls für 30 Minuten. Nun erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang für jeweils 5 Minuten. Der dann verwendete Brückenantikörper wurde in 10 % rat Serum im Verhältnis 1:50 verdünnt (rabbit-anti-mouse Dako Nr. Z0456), Inkubation 30 Minuten. Im Anschluss erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang für jeweils 5 Minuten. Der Sekundärantikörper wurde in 10 % rat Serum verdünnt (mouse APAAP-konjugiert, Dako Nr. D0651) 1:100, Inkubation für 30 Minuten. Ein erneuter dreimaliger Waschvorgang folgte für jeweils 5 Minuten. Die Färbungen wurden mit Neufuchsin (Dako Nr. K698) und Levamisole (Dako Nr. 3021) für 10 bis 30 Minuten nach Vorschrift angesetzt. Ein kurzer Spülvorgang in Aqua dest. wurde angeschlossen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Gill's Hämalaun für 5-10 Minuten. Nun wurde eine Neutralisierung mit Aqua dest. und unter fließendem Leitungswasser durchgeführt. Das Eindecken des Schnittes erfolgte mit Crystalmount und Clarion (Biomedica Nr. M05). Bei den Objektträgern zum Nachweis von Albumin wurde zunächst ein Blockierungsvorgang mit 3 % H₂O₂ Peroxidase durchgeführt. Nun schloss sich der Inkubationsvorgang mit dem primären Antikörper in der Konzentration von 1:500 an.

Für den Nachweis wurde ein HRP-konjugierter rabbit-anti-FITC (Dako) Antikörper 1:100 verwendet. Die Färbung erfolgte mit Diamino-benzidine (DAB-plus, Dako). Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

2.5. Statistische Analysen:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahlen (10^3 Zellen/ Matrix) wurden berechnet. Statistische Analysen wurden mit MS-Windows system (Windows 98) unter Gebrauch von „Exel 2000“ software (Microsoft, Redmont, WA, USA) durchgeführt. P-Mengen wurden zweigeteilt und $p < 0,05$ als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Hepatozytenkultur in der Fibrinmatrix

Die Hepatozytenkultur in der Fibrinmatrix ermöglichte eine Darstellung der Entwicklung und Differenzierung der Zellzahlen. Weiterhin konnte die dreidimensionale Struktur des Neotissuegewebes in der Kultur sehr gut untersucht werden.

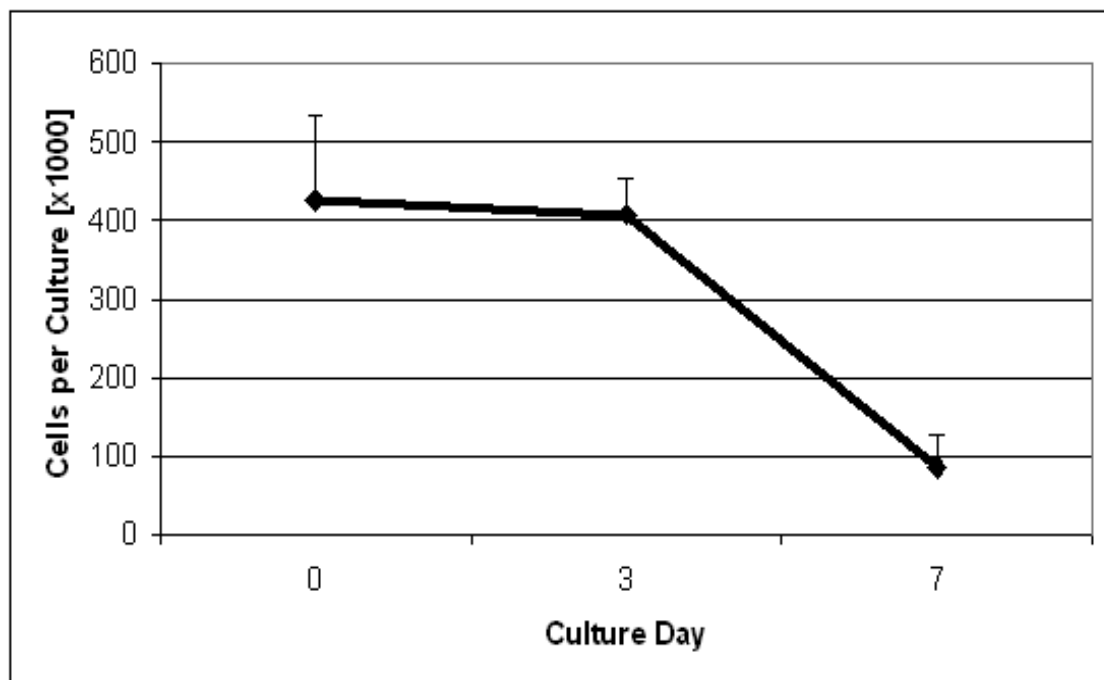


Diagramm 4 – Hepatozytenkultur in der Fibrinmatrix -

Die Graphik zeigt, dass die Zellzahl in der Kultur konstant war bis zum 3. Tag (425.970+107.790 Zellen am 1. Tag und 407.790 + 44.810 Zellen am 3. Tag per Kultur). Zwischen Tag 3 und Tag 7 zeigte sich ein kontinuierlicher Zellzahlverlust (Tag 7 mit 84. 420 + 44.810 Zellen per Kultur; $p < 0.05$).

3.2. Genexpression der Hepatozytenkultur in der Fibrinmatrix

Um die Zellzahlen und ihre Vitalität zu verfolgen, erfolgte eine kontinuierliche Darstellung von spezifischen Genen der Leberzellen. In unserem in-vitro Versuch zeigten die Hepatozyten eine kontinuierliche Expression der leberspezifischen Gene CK-18, Albumin und des biliären epithelialen Marker CK-19. Wir haben über die

gesamte Versuchsdauer eine Demonstration mit Hilfe von RT-PCR Analysen durchgeführt, wie auf der Abbildung 2 erkennbar ist.

Gene-Expression (RT-PCR)

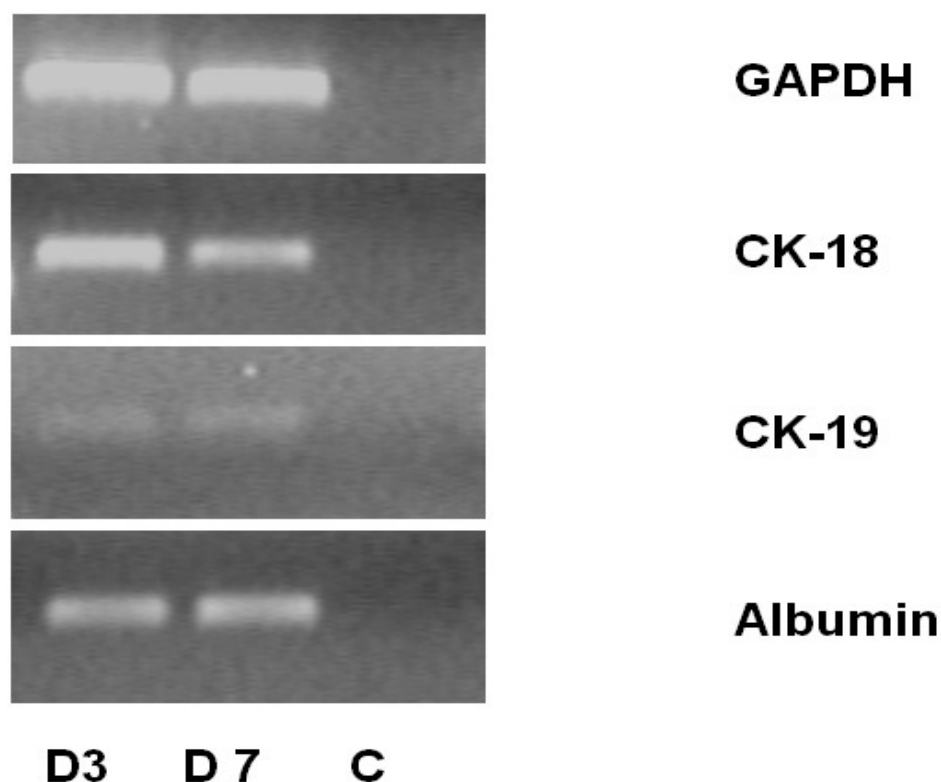


Abbildung 2 – RT-PCR Analysen der spezifischen Genexpression in Kultur - Hepatozyten in Kultur der dreidimensionalen Fibrinmatrix zeigen eine kontinuierliche Genexpression von CK-18, CK-19 und Albumin über die gesamte Periode. Legende: D3: 3 Tage in Kultur, D7: 7 Tage in Kultur, C: Kontrolle ohne RT-PCR Transplantate

3.3. Histologie und Immunhistologie der Hepatozytenkultur

Unter Verwendung der Histologie und Immunhistologie wurden die Formationen des Neotissues und der darin formierten Hepatozyten untersucht und dargestellt. Es zeigt sich, dass die 2-Phasen Matrix eine gleichmässige, wachstumsfördernde Ausbreitung der kultivierten Hepatozyten in den Fibrinfibrillen ermöglicht. Einen Eindruck vermittelt die Abbildung 3.

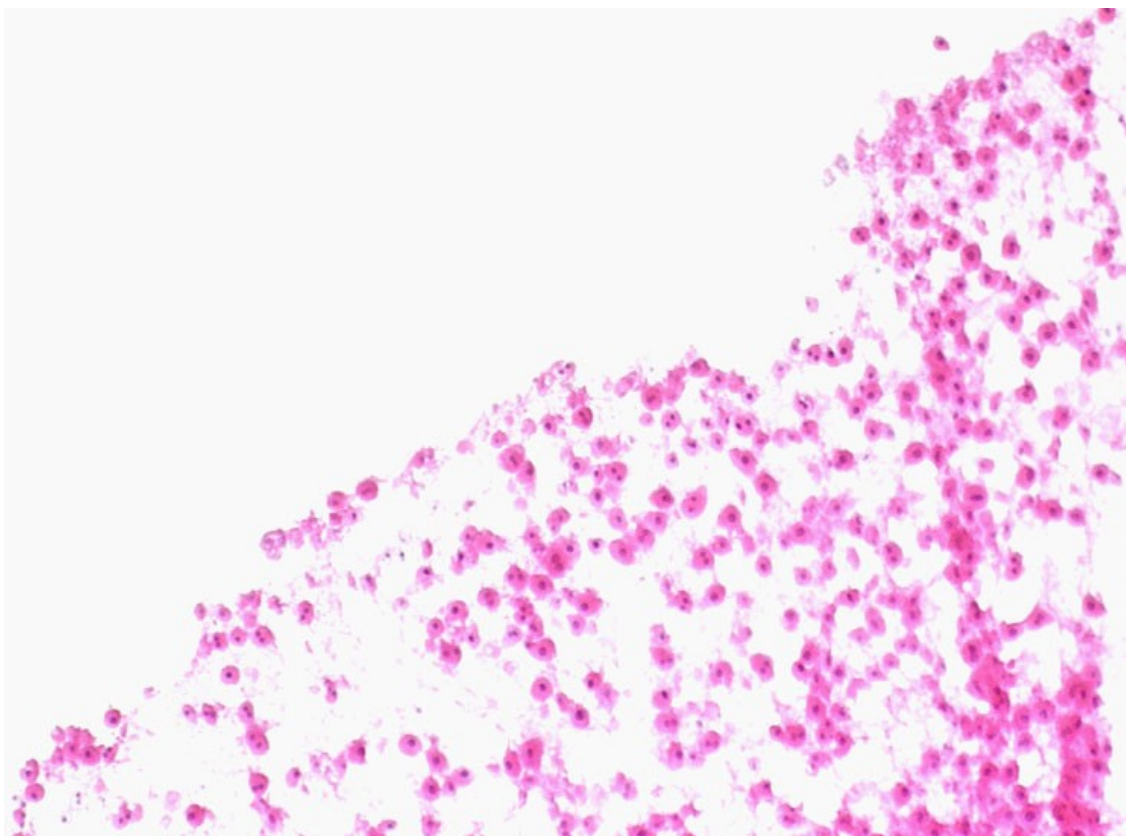


Abbildung 3 – *Isolierte Hepatozyten in Fibrinmatrix I -*

Die isolierten Hepatozyten in der Fibrinmatrix sind sowohl singulär als auch im Verband angeordnet. Die Zellen sind vital.

Die Zellgrenzen sind sehr gut abgrenzbar und weisen eine Zellmembran ohne Diskontinuitätsmerkmale auf. Das Zytoplasma ist von homogener, vitaler Färbung. Es wird somit deutlich, dass die Matrix in der ersten Phase des Kontakts mit der Zelle, keinen störenden Einfluss auf die Hepatozytenvitalität ausübt. Weiterhin stellt sich der Zellkern prominent und ohne pyknotische Lysezeichen dar (Abbildung 4). Im Verlauf wird erkennbar, dass die Hepatozyten eine weit verzweigte, dreidimensionale Gewebestruktur mit einer hohen Zellzahldichte und einem hohen Zell-Zellkontakt in der Kultur formieren. Die Dreidimensionalität der Matrix ermöglicht somit eine Formation der Zellen, die für den Zellzuwachs unerlässlich ist, wie in 1.3.2. erläutert wurde. Mit Hilfe des leberspezifischen Markers CK-18 ist die Vitalität der kultivierten Hepatozyten nachgewiesen worden.

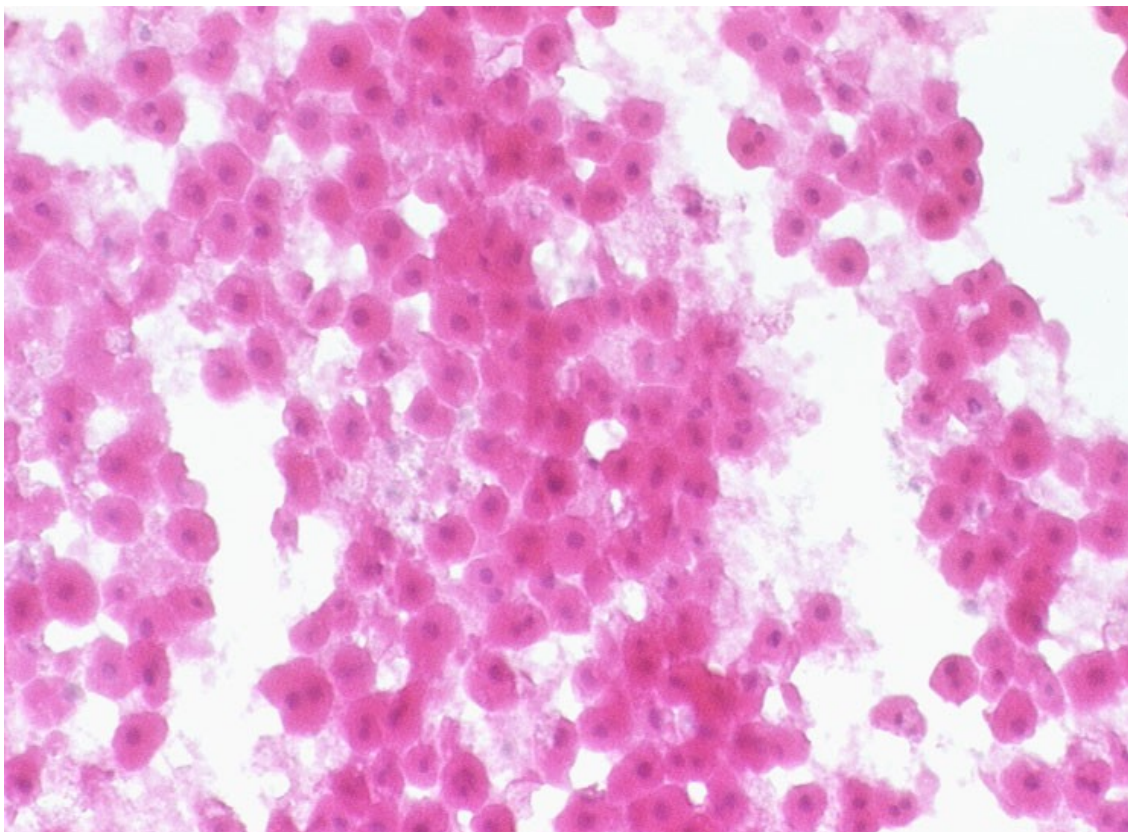


Abbildung 4 - *Isolierte Hepatozyten in Fibrinmatrix II* -

Die Hepatozyten bilden orthotop typische sinusoidale Formationen aus. Weiterhin abgrenzbar die prominenten vitalen Zellkerne. Für synthetisierende Hepatozyten typisch, Ausbildung von zwei Nukleuli in einer Zelle.

3.4. Hepatozytentransplantation mit Fibrinringel als Matrix

3.4.1. Allgemeine Komplikationen in beiden Gruppen

Insgesamt wurden 64 Tiere in Gruppe 1 und Gruppe 2 mit dem Hepatozyten-Fibrin-Polymer transplantiert. 5 Tiere (7,8 %) starben unter der Anästhesie. Ein Tier (1,6 %) verstarb nach Gefäßverletzung an einer unstillbaren Blutung des oberen Gastrointestinaltraktes. Die Autopsien aller Tiere zeigten keine Hinweise für Komplikationen im Zusammenhang mit dem chirurgischen Eingriff. Die Tiere überlebten die Transplantationstechnik und die Narkose ohne Komplikationen in der postoperativen Phase.

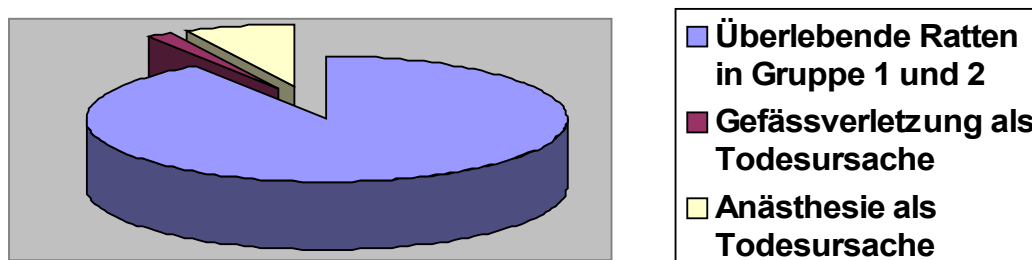


Diagramm 5 – Vergleichende Darstellung der Versuchstiere -

Verhältnis der innerhalb der Studie untersuchten Tiere zu den nicht in die Studie einbezogenen Tieren und deren Todesursachen.

3.4.2. Histologie und Immunhistologie der Transplantationsstudie

Zwei Tieren wurde direkt nach der erfolgten Transplantation die Leber zur Untersuchung explantiert (Tag 0). Zum Zeitpunkt der Explantation gab es keine Hinweise für Nebeneffekte. Die Leber war gut durchblutet und erschien unauffällig. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Fibrinmatrix direkt nach der Injektion einen blutstillenden „Pfropf“ ausbildet. Dieser verhindert in ausreichendem Masse eine Blutung in die Kapsel der Leber, die möglicherweise durch die Injektion hervorgerufen werden könnte. Wie bereits im in-vitro Versuch deutlich geworden, zeigen die transplantierten Zellen keine Zeichen eines Zelluntergangs. Die Hepatozyten sind durch die PKH26 Markierung sehr gut vom ortsständigen Lebergewebe abgrenzbar. In der Abbildung 5 ist ein transplantiertes Areal kurz nach der Inkubation mit PKH26 erkennbar. Für frisch injizierte Hepatozyten bietet die Fibrinmatrix eine stimulierende und schützende Matrix zur weiteren Differenzierung (Abbildung 6). Auch nach 2 Tagen sind die markierten Hepatozyten gut erkennbar. Um die isolierten Hepatozyten wird durch die Fibrinmatrix ein dreidimensionales Gitter gespannt, in das sie sich integrieren (Abbildung 7). Die Zellmarker Desmin und CK-18 sind deutlich positiv bei den transplantierten Zellen und der Umgebung. Diese Marker werden zur Vitalitätskontrolle verwendet (Abbildung 8 und Abbildung 9). Bereits am 2. Tag nach der Transplantation kommt es zur Einwanderung von ED-1 positiven Makrophagen, die den Abbau der

Marix fördern (Abbildung 10). Bei der Untersuchung der explantierten Lebern nach 7 Tagen war das Fibringitter weiterhin gut sichtbar (Abbildung 11). Mit Hilfe von histologischen Markern wurde deutlich, dass sowohl Hepatozyten als auch nicht-parenchymatöse Zellen innerhalb der Matrix überlebten und transplantiert wurden. Zum einen konnten CK-18 angefärbte Spenderzellen im Empfängergewebe sichtbar gemacht werden (Abbildung 12). Zum anderen waren Desmin positive transplantierte und eingewanderte Ito- bzw. Sternzellen, die die Regeneration anregen, (HSC) erkennbar (Abbildung 13). Auffällig war auch die Integration von ED-1 positiven Makrophagen bzw. Kupfferzellen des Empfängertieres in das Fibrin-Gitter. Hiermit wird die natürliche Abbauphase der Matrix verdeutlicht. Es zeigten sich keine granulozytären oder lymphozytären Zellreaktionen im Empfängergewebe, die auf einen Entzündungsprozess hinweisen könnten. Das Muster der Abbaureaktion im Lebergewebe erscheint mikroskopisch eher im Sinne eines Granuloms. Dieser Begriff ist nicht einheitlich definiert, jedoch kommt es zu einer fokalen Konzentration der am Aufbau beteiligten Entzündungszellen des Makrophagensystems (Makrophagen, Epitheloidzellen und mehrkernige Riesenzellen). Man könnte annehmen, dass die Fibrinmatrix eine Fremdkörperreaktion mit einer Ansammlung von mehrkernigen Riesenzellen hervorruft. Jedoch ist diese Abbaureaktion nicht sehr stark ausgeprägt und die Verlaufskontrolle bestätigt einen vollständigen Abbau der Matrix. Der Begriff Fremdkörpergranulom ist für ein über einen längeren Zeitraum sich vollständig organisierendes Granulom um einen nicht zügig abbaubaren, kristallinen oder nicht-kristallinen Fremdkörper definiert (Riede u. Schaefer 2001). Eine solche Reaktion ist in unserem Versuch nicht erkennbar. Im Verlauf wurde deutlich, dass ab dem Tag 7 nach Transplantation eine signifikante Reduktion des Fibringitters erfolgte. Wobei hervorzuheben ist, dass die transplantierten Hepatozyten weiterhin durch ihre positive PKH26 Färbung detektiert werden konnten. Auch hier wurden histologische Marker zur Charakterisierung der integrierten transplantierten Zellen verwendet. CK-18 positive Hepatozyten sind weiterhin ortsständig in der Empfängerleber. Wir haben ebenfalls Langzeittiere mit einer Untersuchung der Lebern nach 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten in unserem Versuchsdesign integriert. Leider war nach 2 Wochen die fluoreszierende Wirkung des PKH26 zur Detektion stark zurückgegangen. Nach 3 Monaten konnten wir keine deutlich fluoreszierenden Hepatozyten mehr entdecken. Aus diesem Grund sind diese Versuchsgruppen aus dem Versuchsdesign ausgeschlossen worden. Für Langzeitstudien müssen andere Methoden wie z.B. FISH verwendet

werden. Die Ergebnisse der Langzeituntersuchungen aus der Gruppe 1 über 90 Tage, 12 Monate und 18 Monate sind in Bezug auf die Komplikationen, die durch die Transplantation entstehen könnten, interessant. Diese Tiere zeigten keine pathologischen Veränderungen in ihrem Körperkreislauf. Es wurden sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch keine morphologischen Veränderungen im Sinne einer Steatose der Leber, einer Leberfibrose oder sogar Leberzirrhose gefunden. Die Segmente der Lunge waren beiderseits gut durchblutet, ohne Hinweise auf abgelaufene Thrombembolien mit dem sogenannten „Strickleiterphänomen“.

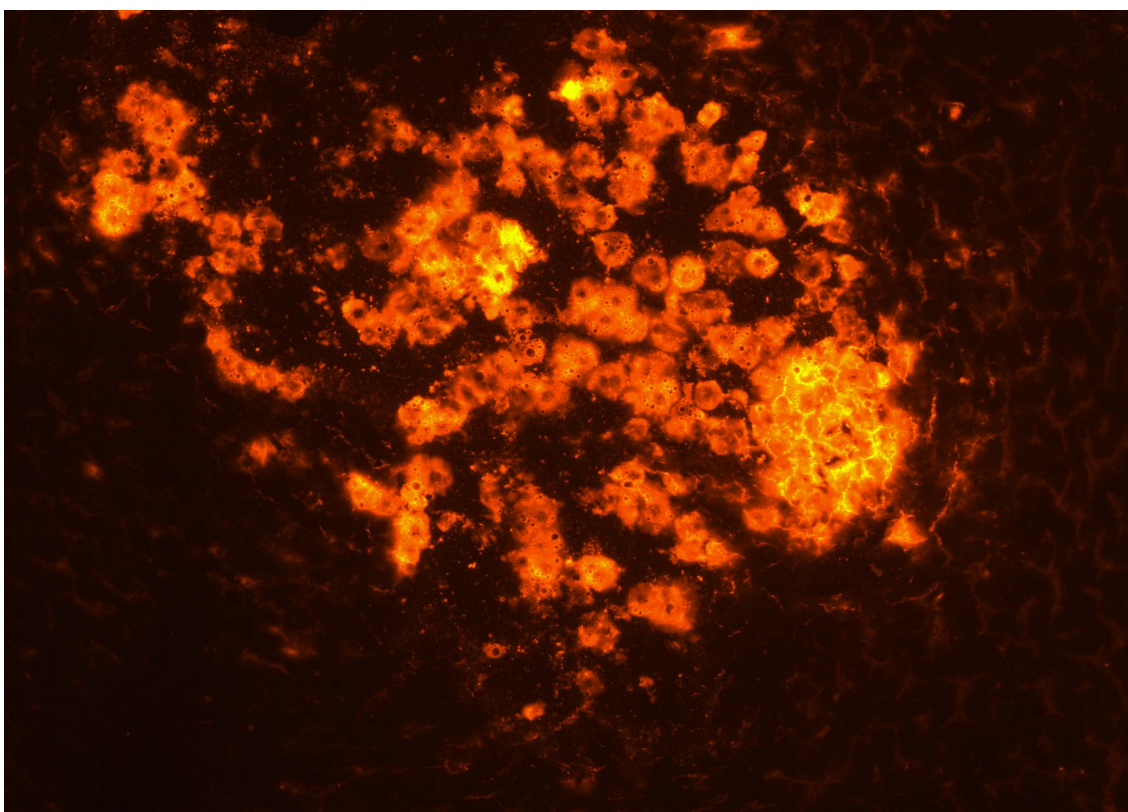


Abbildung 5 – *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres zur Stunde null -*

Inkubation der isolierten Hepatozyten mit PKH26 und Injektion in das Leberparenchym des Empfängertieres. Das Zytoplasma der Zellen ist deutlich erkennbar und grenzt sich vom Zellkern gut ab. Die Explantation erfolgte sofort (Stunde 0).

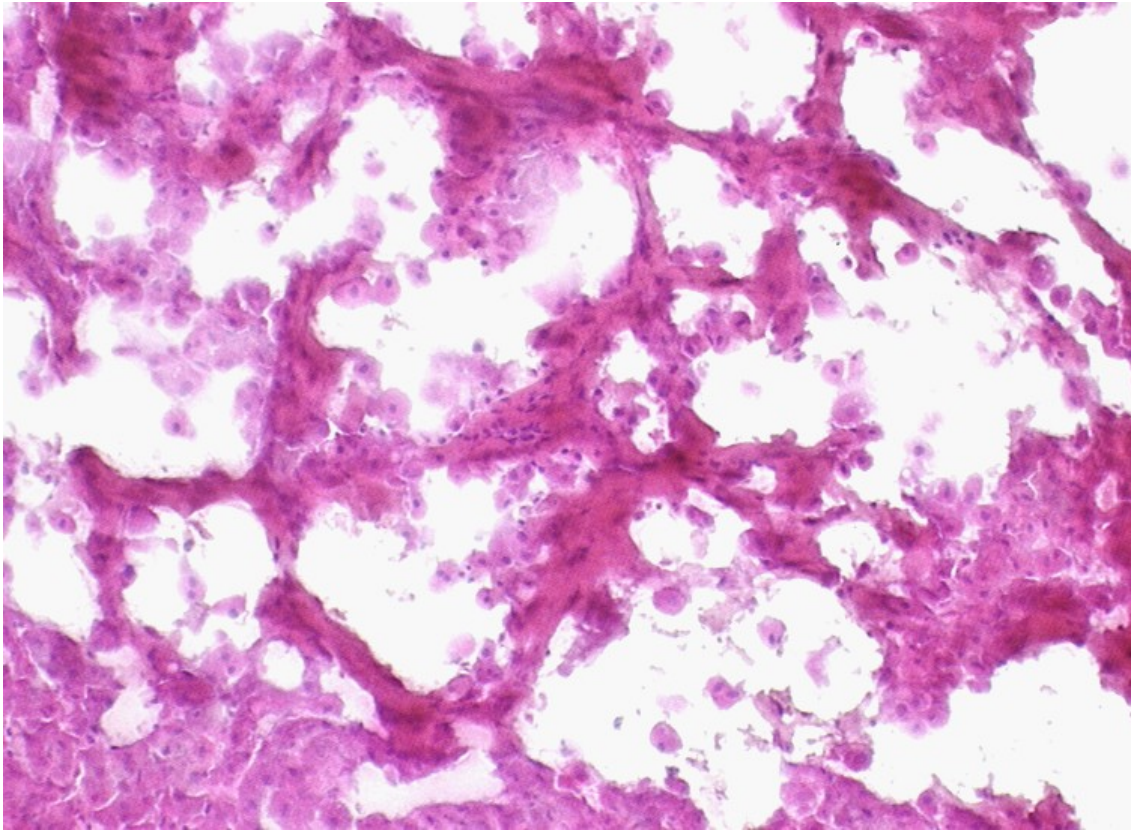


Abbildung 6 – *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres zur Stunde null -*

Morphologische Analysen der Hepatozyten in-vivo in HE Färbung. Darstellung von injizierten Hepatozyten direkt nach der Transplantation in eine Empfängerleber (Mikroskopvergrößerung 10x10). Die transplantierten Hepatozyten sind in der Fibrinmatrix erkennbar und von dem ortsständigen Lebergewebe des Empfängertieres abgrenzbar.

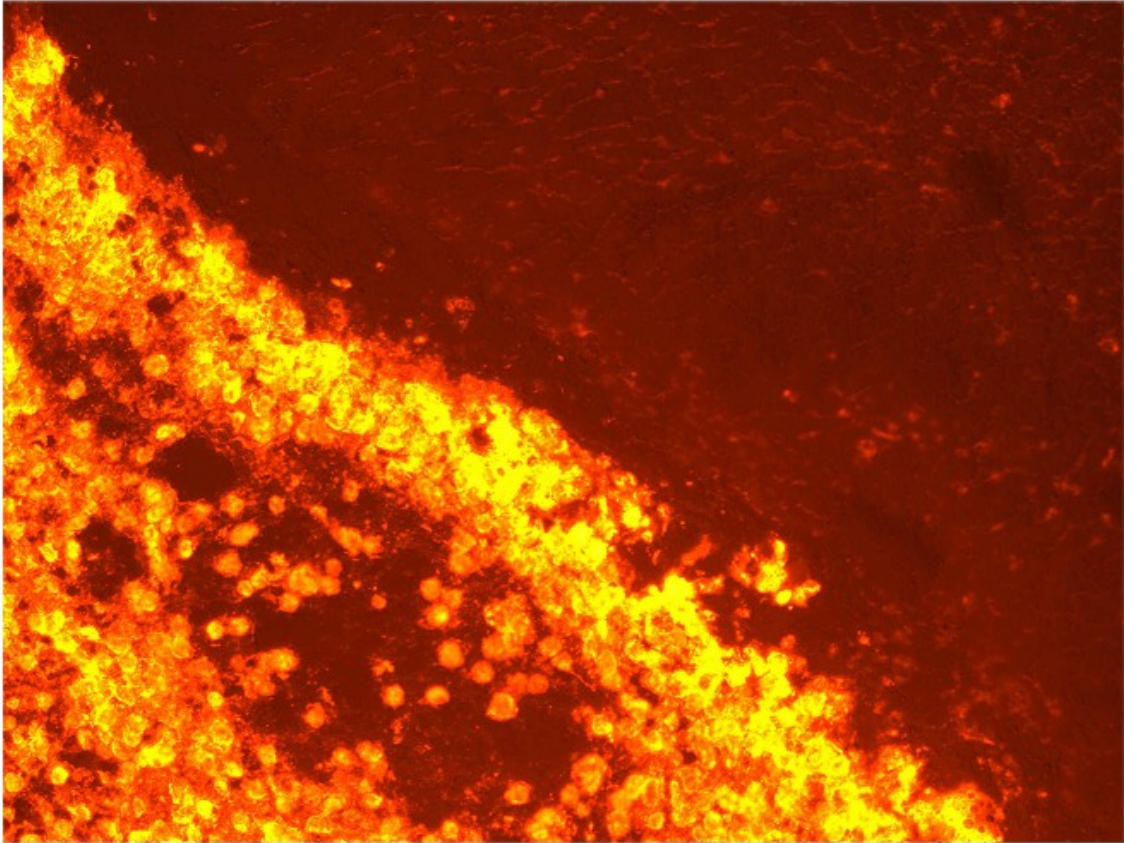


Abbildung 7 - *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres am Tag zwei -*

Morphologische Analysen der Hepatozyten in-vivo. Explantiertes Lebergewebe zum Tag 2 nach Transplantation. Das Fluoreszenzmikroskop zeigt mit PKH26 inkubierte Hepatozyten (Mikroskopvergrößerung 10 x 10). Die transplantierten Hepatozyten von dem ortsständigen Lebergewebe abgrenzbar. Die Zellen zeigen einen deutlichen Zusammenhalt in der Fibrinmatrix.

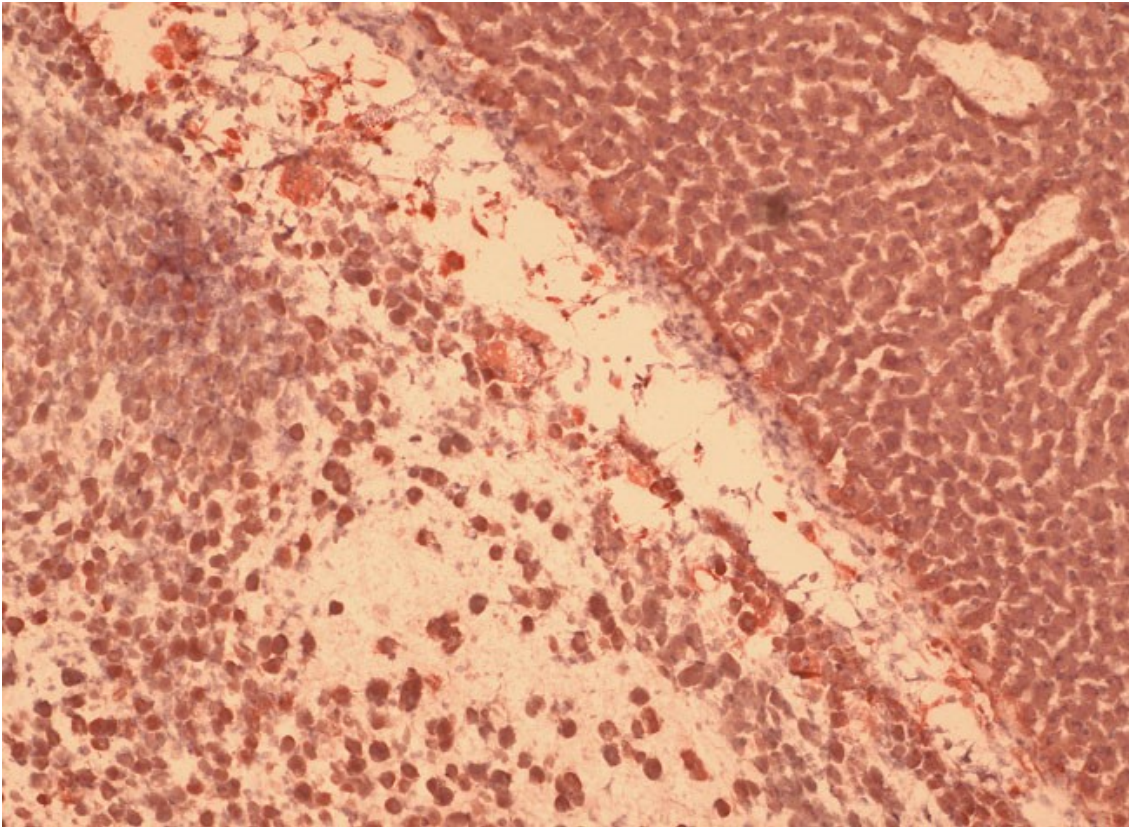


Abbildung 8 - *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres am Tag zwei -*

Lebergewebe zum Tag 2 nach Transplantation mit Hilfe der CK-18 Färbung (Mikroskopvergrößerung 10 x 10). Die in Abbildung 7 gezeigten transplantierten Hepatozyten sind hier im Netz der Fibrinmatrix erkennbar. Zellkerne und Zell-Plasmagrenzen sind klar, so dass die Zellen vital sind. Das originäre Lebergewebe ist abgrenzbar. Es zeigt ebenfalls vitale CK-18 positive Zellen und normal weite Gefäße.

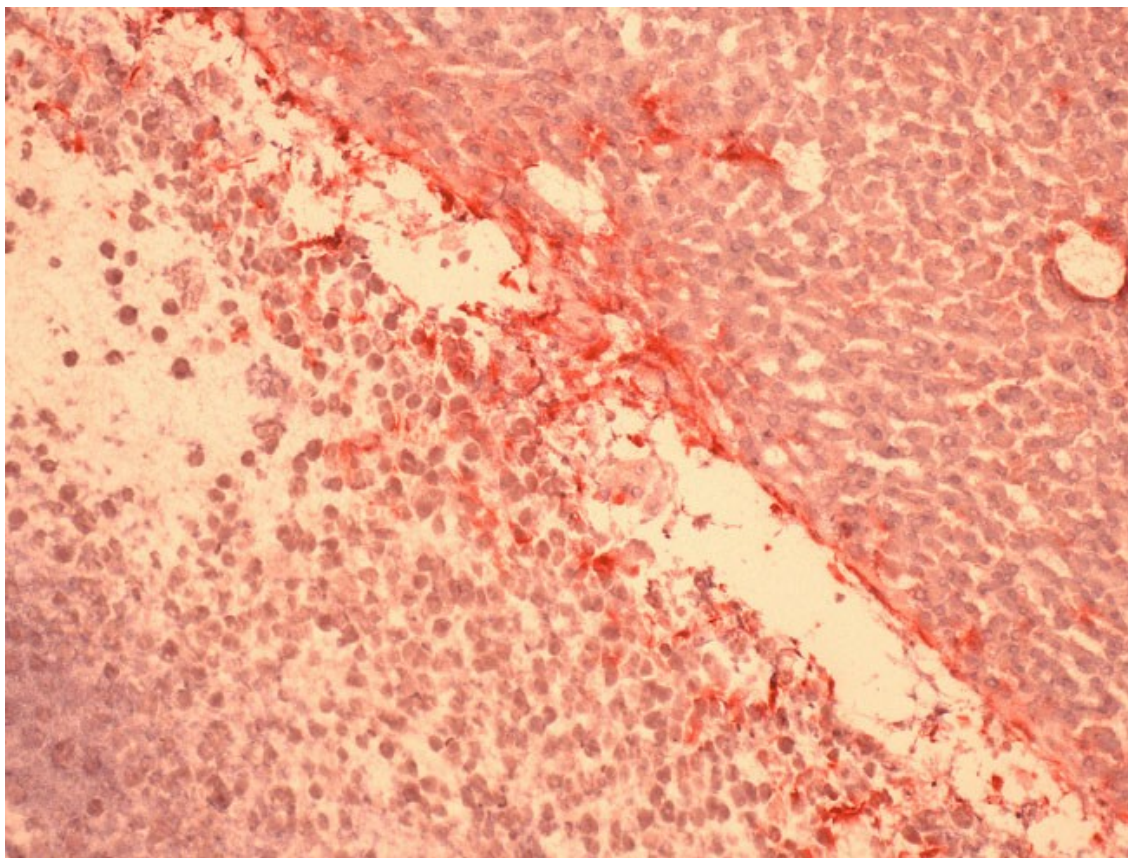


Abbildung 9 - *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres am Tag zwei -*

Morphologische Analysen der Hepatozyten in-vivo. Darstellung des explantierten Lebergewebes zum Tag 2 nach Transplantation mit Hilfe der Desmin Färbung (Mikroskopvergrößerung 10x10). Die nicht-parenchymatösen Zellen sind am 2. Tag nach der Transplantation bereits vorhanden. So ist die Desminfärbung auf nicht-parenchymatösen Zellen positiv, z.B. in der Leberkapsel. Die transplantierten Hepatozyten sind noch teilweise von der Fibrinmatrix umgeben und zeigen kaum Kontakt mit nicht-parenchymatösen Desmin positiven Zellen. Die Umgebungsreaktion wird sich erst in einem längeren Zeitraum nach der Transplantation herausstellen.

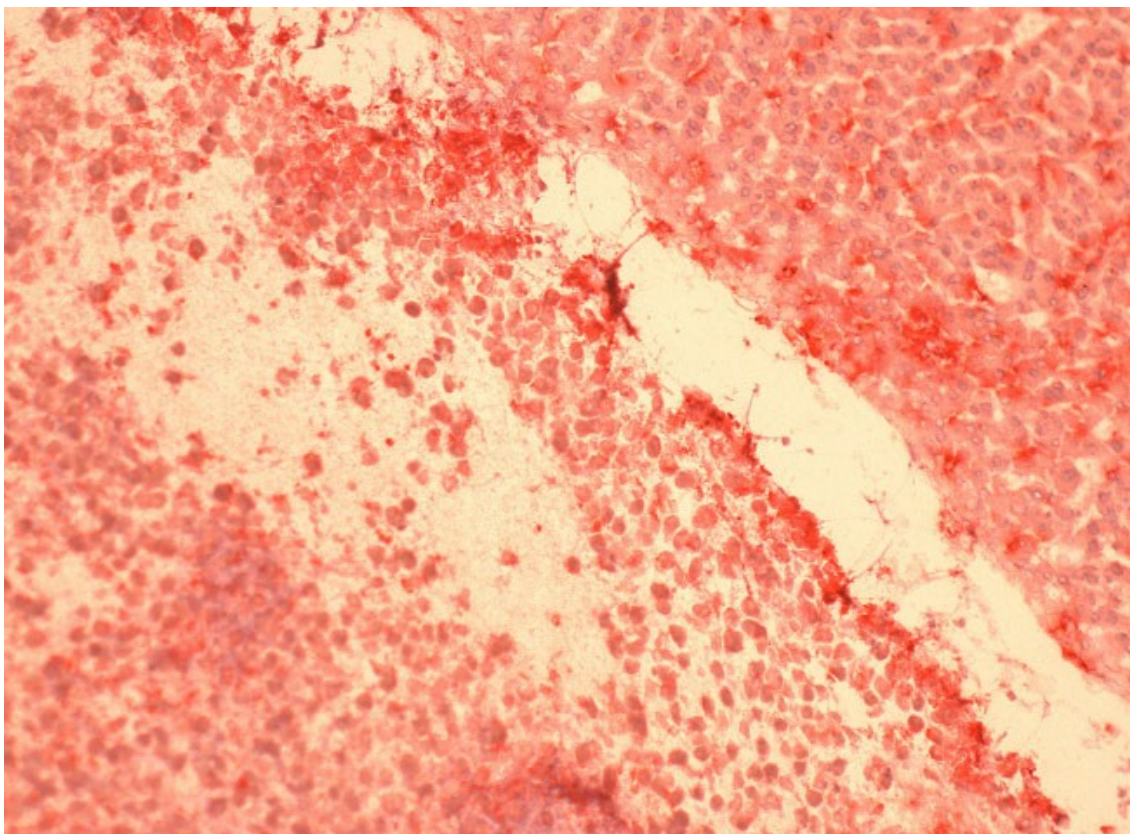


Abbildung 10 - *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres am Tag zwei -*

Morphologische Analysen der Hepatozyten in-vivo. Explantiertes Lebergewebe zwei Tage nach Transplantation. Nachweis von ED-1 positiven Makrophagen (Mikroskopvergrößerung 10x10). Die in Abbildung 7 gezeigten transplantierten Hepatozyten sind im Netz der Fibrinmatrix erneut deutlich erkennbar. Zum Teil liegen die Zellen einzeln. Die Mehrzahl ist jedoch in einem Cluster zusammengehalten. Diese Formation erhöht die Vitalitätsdauer der Zellen. Die Einwanderung der Makrophagen unterstützt den Abbau der Matrix. Die Fibrinmatrix begünstigt somit eine vitale physiologische Gewebsreaktion.

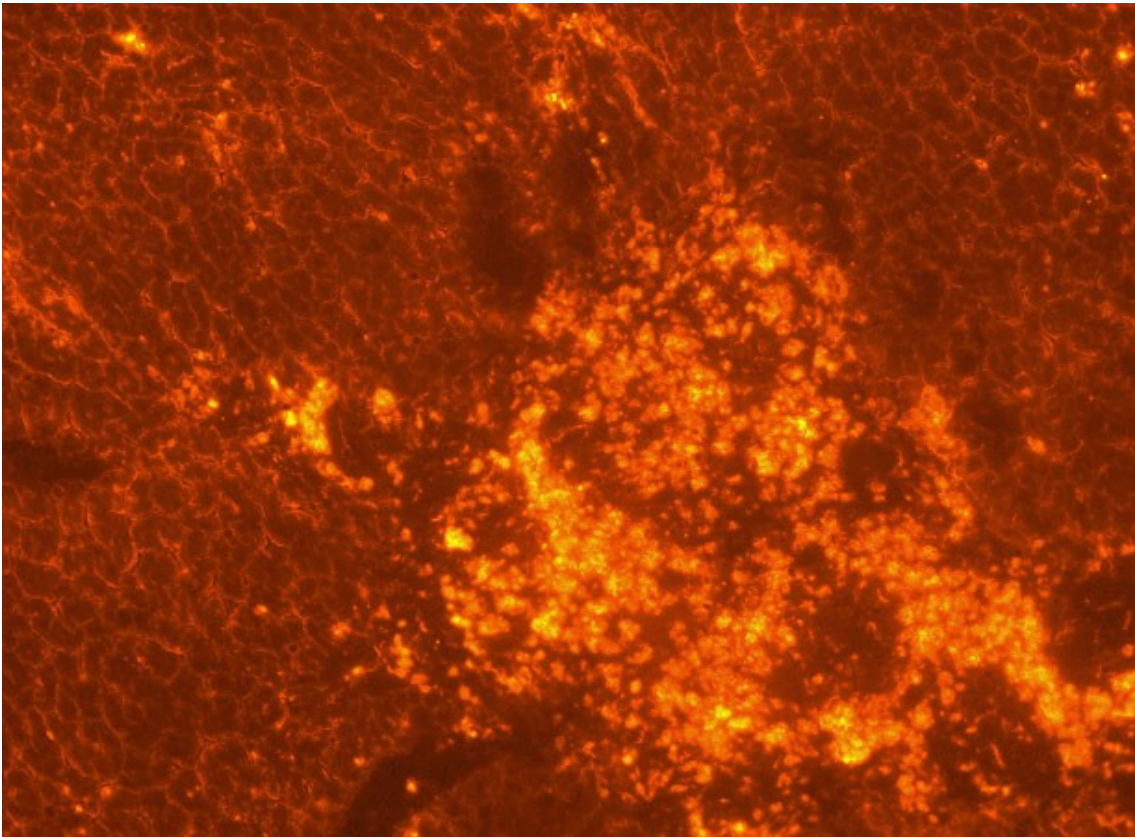


Abbildung 11 - *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres am Tag sieben -*

Morphologische Analysen der Hepatozyten in-vivo. Explantiertes Lebergewebe 7 Tage nach Transplantation. Das Fluoreszenzmikroskop zeigt mit PKH26 inkubierte Hepatozyten in dem ortsständigen Lebergewebe (Mikroskopvergrößerung 10x10). Die transplantierten Hepatozyten sind somit deutlich abgrenzbar von dem ortsständigen Lebergewebe. Die Zellformation könnte einer Fremdkörperreaktion entsprechen.

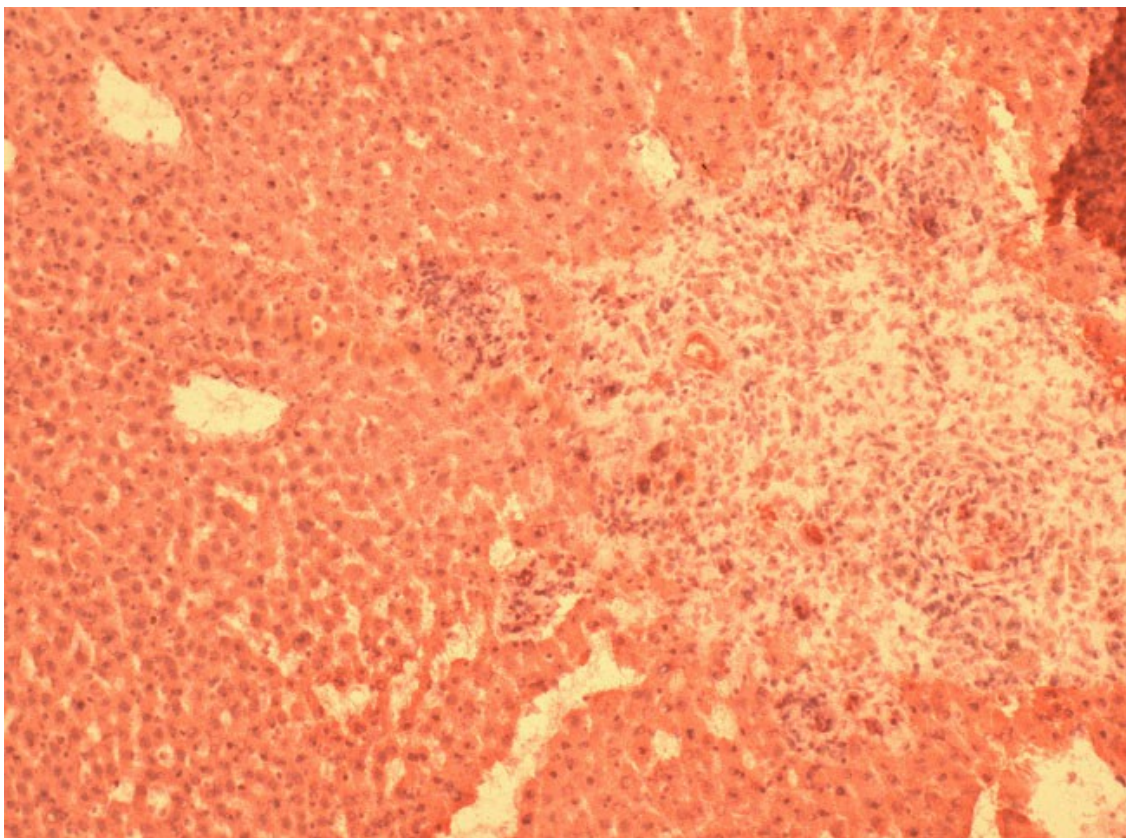


Abbildung 12 - *Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres am Tag sieben -*

Morphologische Analysen der Hepatozyten in-vivo. Explantiertes Lebergewebe 7 Tage nach Transplantation. Nachweis der Vitalität durch eine CK-18 Färbung (Mikroskopvergrößerung 10x10). Die in Abbildung 11 mit PKH26 detektierten Hepatozyten sind in der gezeigten Zellformation erneut deutlich erkennbar. Diese Struktur entspricht einer Granulombildung mit mehrkernigen Riesenzellen. Die Vitalität der transplantierten Hepatozyten ist durch das Cytokeratin 18 nachgewiesen worden. Auch das umliegende Lebergewebe ist vital und durch die Transplantation unbeeinflusst.

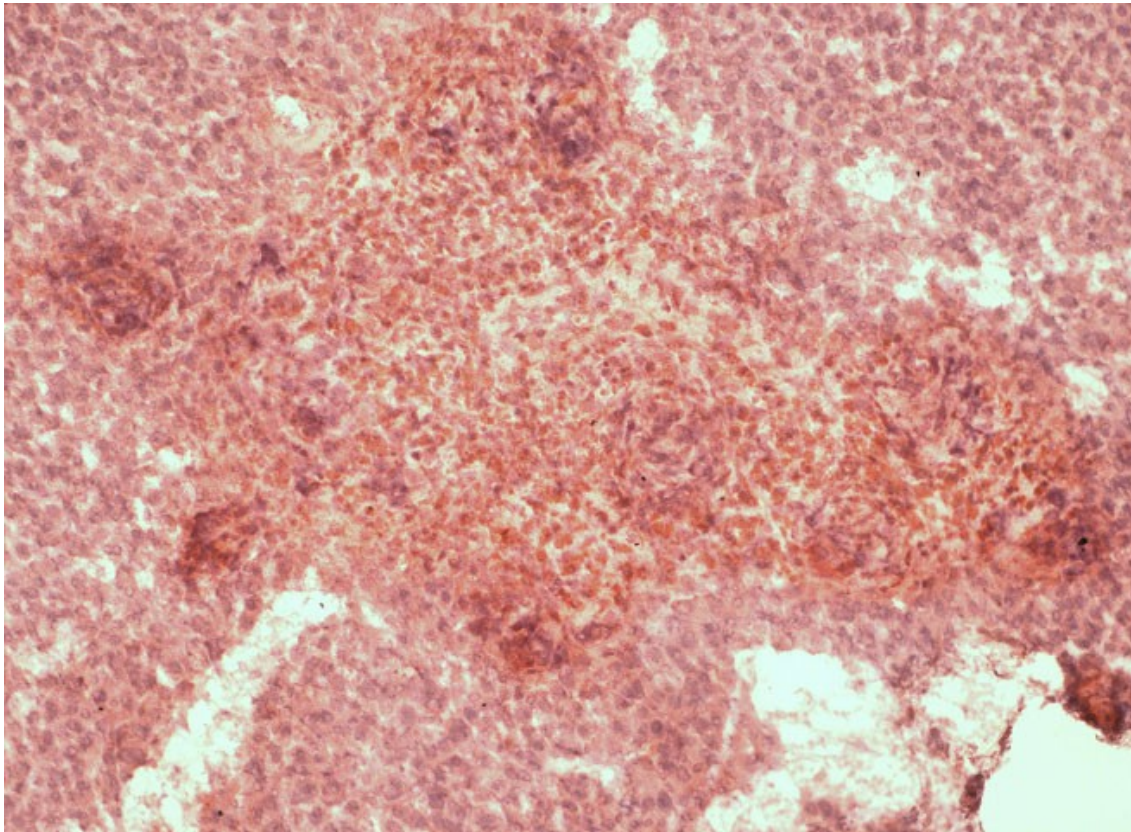


Abbildung 13 - Transplantierte Hepatozyten in der Leber des Empfängertieres am Tag sieben -

Morphologische Analysen der Hepatozyten in-vivo. Explantiertes Lebergewebe 7 Tage nach Transplantation mit Hilfe der Desmin Färbung (Mikroskopvergrößerung 10x10). Die Desminfärbung lässt die unter Abbildung 11 erkennbare Granulomformation der transplantierten Hepatozyten ebenfalls erkennen. Diese Färbung demonstriert, dass auch nicht-parenchymatöse Sternzellen (Itozellen) am Einbau der transplantierten Leberzellen in die orthotope Leber beteiligt sind.

4. Diskussion

4.1. Überblick

Die bisher zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten des akuten Leberversagens sind unbefriedigend. Es besteht die Möglichkeit fehlende Syntheseleistungen der Leber durch Substitution auszugleichen. Als Anwendungsbeispiele sind zu nennen die Substitution von Albumin, Gerinnungsfaktoren, Vitamin K oder Vitamin B₁₂ (Holstege et al. 1996). Diese Therapieoption ist aufwendig, kostenintensiv und teilweise unspezifisch. Der Goldstandard bei angeborenen Enzymdefekten, ist jedoch die orthotope Lebertransplantation. Folgende aus Enzymdefekten resultierenden Stoffwechselerkrankungen sind für eine Hepatozytentransplantation interessant und in Tabelle 3 zusammengestellt.

Stoffwechselerkrankung	Enzymdefekt	Folgen und Therapie
Alpha-Anti-Trypsinmangel Inzidenz 1: 10.000	α_1 -Antitrypsinmangel (Proteaseninhibitorenmangel)	<ul style="list-style-type: none"> • bei der homozygoten Form Lungenemphysem und Leberzirrhose • Substitutionsbehandlung, Transplantation der Lunge/ Leber
Ahornsirupkrankheit (Leuzinose) Inzidenz 1: 200.000	Defekt der Dekarboxylase der α -Ketosäuren der verzweigten Aminosäuren Leuzin, Isoleuzin, Valin	<ul style="list-style-type: none"> • progrediente neurologische Symptomatik mit Tod in den ersten Lebensmonaten • Einschränkung der Aufnahme von verzweigt-kettigen Aminosäuren
Koagulopathien (z.B. Hämophilie A) Inzidenz 1: 10.000	Mangel an Faktor VIII Protein C-Mangel	<ul style="list-style-type: none"> • unvollständigem Wundverschluss führt zu Spontanblutungen • Substitutionstherapie
Hepatolentikuläre Degeneration (Morbus Wilson)	Dysfunktion oder Fehlen des Wilson-Gens (ATB7-B-Gen auf Chromosom 13q14,3)	<ul style="list-style-type: none"> • Leberzirrhose • neurologische Manifestation • kupferarme Diät • D-Penicillamineinnahme • Lebertransplantation
Hyperbilirubinämien (z.B. Crigler-Najjar-Syndrom Typ I)	Fehlen der UDP-Glukuronyltransferase	<ul style="list-style-type: none"> • Kernikterus nach der Geburt • ohne Transplantation letal

Tabelle 3 - Beispiele von Enzymdefekten, zugänglich für eine Hepatozytentransplantation –

Die ideale Indikation für eine Transplantation isolierter Hepatozyten ist die Korrektur angeborener Stoffwechselerkrankungen. Das native Lebergewebe ist meist nicht vorgeschädigt und eine geringe Anzahl an Hepatozyten würde ausreichen, um den Enzymdefekt zu kompensieren (Nissen 2001).

Seit über 20 Jahren werden Versuche unternommen, Hepatozyten zu transplantieren. In experimenteller Erforschung befinden sich Verfahren, die die extrakorporale Kultur der Hepatozyten nutzen. Hepatozyten mit Gendefekten bei genetisch metabolischen Lebererkrankungen werden gentechnisch verändert, die Zellen reimplantiert, um die angeborene Erkrankung zu therapieren (Raper u. Wilson 1993). Die Durchführbarkeit der Therapieansätze konnte anhand der familiären Hypercholesterinämie und am Beispiel des Crigler-Najjar-Syndrom Typ I demonstriert werden (Fox et al. 1998;

Grossmann et al. 1994). Aufgrund der bereits beschriebenen entstehenden Nachteile dieser Therapie werden vielversprechende Ansätze mit implantierbaren Leberersatzsystemen entwickelt. Die Idee ist, mit Hilfe der Transplantation von isolierten Hepatozyten die Leberfunktion bis zur Regeneration des Leberparenchyms zu substituieren (*Bioreaktor*) oder sogar eine neue funktionsfähige Leber zu schaffen. Besonders weit entwickelt sind daher die Zellkulturbedingungen, um Hepatozyten länger am Leben zu erhalten (Koide et al. 1989; Landry et al. 1985; Olive u. Durand 1994).

Es existieren Tierversuchsmodelle entsprechend den Ursachen für einen Leberausfall. Hierzu zählen das akute Leberversagen, die chronische Leberinsuffizienz durch Leberzirrhose und der hereditäre Enzymmangel (Abrahamse et al. 2002; Washizu et al. 2000). Ein Überblick soll im Folgenden gegeben werden.

4.1.1. Hepatozytentransplantation in die Milz und das Pankreas

Die Funktionen und die Architektur der Milz gewährleisten Voraussetzungen zur Hepatozytentransplantation (Ikebukuro et al. 1999; Pilichos et al. 2004; Strohm et al. 1997). Die Milz wird kontinuierlich von Blut durchflossen und es besteht eine Interaktion mit mesenchymalen Zellen. Diese Konstellation ist für die Differenzierung von Hepatozyten nutzbar. Hepatozyten können nur in Organen überleben, die Sinusoide in ihrer Architektur aufweisen. So konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten in der Milz von Ratten überleben, während in der Milz von Mäusen aufgrund des Fehlens der Sinusoide die Hepatozyten nicht engraften (MacFee et al. 1988). Die transplantierten Hepatozyten zeigten eine gute Integration in das Milzparenchym, wobei die weiße Pulpa ausgespart blieb. Diese Methode wurde durch die Transplantation von Leberzellen in die Milz von Nagase Analbuminemic Ratten (NAR) untersucht (David et al. 2001; Ikebukuro et al. 1999). 18 Monate nach der Transplantation wurde in Hämatoxylin-Eosin Schnitten erkennbar, dass ca. 35 % des Milzparenchyms durch transplantierte Hepatozyten eingenommen wurden. Die Morphologie entsprach der normalen sinusoidalen Leberstruktur, als auch der biliären caniculären Struktur. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass Hepatozyten unter anderem den Serumalbuminspiegel erhöhten, Glykogenspeicherung und Glykogenolyse durchführten und somit ihre Funktionsfähigkeit deutlich wurde (Ribel et al. 1992; Sigot et al. 2004). Die Nachteile dieser Methode sind in der eingeschränkten Zellmenge zur

Transplantation zu sehen. Es kann kein Ersatz für die gesamte Leberzellzahl und Funktion erreicht werden. Die Hepatozyten machen 80 % des Leber Volumens aus (Arias et al. 1988b). Man geht davon aus, dass in die Milz nur 0.1 - 0.7 % des Leberkontingents transplantiert werden können. Die Limitation der transplantierten Zellzahl ist erforderlich, um den negativen Begleiterscheinungen bei einer Injektion in die Milz vorzubeugen. Im Tiermodell wurde deutlich gemacht, dass zu hohe Zellzahlen bei einer Transplantation lebensbedrohliche, pathophysiologische Durchblutungsstörungen im Sinne einer akuten portalen Hypertension verursachen. Die resultierende Zyanose in der Leber und dem Gastrointestinaltrakt kann zum Tod des Organismus führen. Schlussfolgernd geht man im Tiermodell von einer sicheren Transplantation bei 0.2×10^9 Zellen/ kg aus (Benedetti et al. 1997).

Ein weiterer Nachteil besteht in der Dynamik der Zellen und dem daraus resultierenden prolongierenden Zeitfaktor. Eine Erweiterung des transplantierten Zellpools in der Milz erfolgt nach Abwanderung der Hepatozyten aus dem Milzparenchym. Diese Zellen wandern in die originäre Leber aus und werden in diese orthotope und stimulierende Umgebung integriert (Mito et al. 1979b; Sigot et al. 2004). Es wird deutlich, dass Methoden entwickelt werden sollten, die praktikabel, minimalinvasiv und mit einer größeren Proliferationsrate der Hepatozyten einhergehen.

Neben der Milz ist auch das Pankreas im Rattenmodell ein geeigneter Transplantationsort. Auch hier findet sich ein Retikulingerüst, das für das Wachstum von Hepatozyten wichtig ist. Als besonders günstig für die Leberzellentwicklung erwies sich der hohe Bestand an hepatotropen Substanzen, wie Insulin und Glucagon im Inselgewebe (Kneser et al. 1999).

Die Ergebnisse der heterotopen Hepatozytentransplantation in den Peritonealraum, die bereits in der Einleitung diskutiert wurden, ergaben einen wichtigen Baustein für Überlegungen zur Weiterentwicklung unserer Transplantationsstudie. Dieses Modell erlaubt Hepatozytentransplantationen, die der Anzahl einer ganzen Leber entsprechen. Es ermöglicht die Transplantation von Zellen, die genetisch verändert sind, und gibt den Zellen die Möglichkeit eines Engraftment für einen längeren Zeitraum (Gilbert et al. 1993; Kneser et al. 1999; Uyama et al. 1993). Gerade die Weiterentwicklung der dreidimensionalen Matrizes brachte diese Vorteile hervor. Doch anstatt eine Matrix außerhalb der Leber weiter zu entwickeln, wollten wir ein Transplantationsmodell aufbauen, welches den entstehenden Nachteilen einer extrahepatischen Transplantation entgegenwirkt. So können die Stimulantien und Wachstumsfaktoren der Leber für

transplantierte Hepatozyten genutzt werden. Weiterhin ist ein nativer Anschluss an das Gallengangssystem möglich.

4.1.2. Heterotope Hepatozytentransplantation in die Nierenkapsel

Als anatomisch relevanter Transplantationsort wurde auch die Nierenkapsel erforscht. Das Modell der Co-Transplantation von Hepatozyten mit Langerhansinseln zur Verbesserung der Hepatozytenüberlebenszellrate ist auch für die heterotope Transplantation in die Nierenkapsel von Bedeutung. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die subkapsuläre Transplantation von Hepatozyten und Inseln die Mortalität signifikant senkt. Bei einer Transplantation werden keine Zellpopulationen entsprechend einer Leber implantiert. Es wird deutlich, dass die Nierenkapsel einen Transplantationsort für Hepatozyten darstellt, jedoch ineffektiv ist (Papalois et al. 1994).

4.2. Verwendung dreidimensionaler Matrices und Hepatozytenkultur

In der vergleichenden Darstellung der Transplantationsmethoden für Hepatozyten ist deutlich geworden, welche verschiedenen Faktoren zur ausreichenden Differenzierung und Funktionalität von Hepatozyten untersucht werden müssen. Zur Entwicklung von Leberzelltransplantationsmodellen muss man sich mit Wachstumsfaktoren, der Oberflächenbeschaffenheit und der Dimensionalität von Matrices beschäftigen. Alle diese Komponenten bilden eine Einheit zur optimalen Hepatozytentransplantation. Die ersten Arbeiten im Bereich Tissue Engineering basierten auf statischen Zellkulturen, um Gewebe für die Implantation herzustellen. Bald stellte sich heraus, dass Flusssysteme die Qualität bestimmter Gewebearten, wie zum Beispiel Knorpel, verbessern können (Vunjak et al. 1996). Der Gebrauch von Flussbioreaktoren kann dazu beitragen, größere Mengen an Zellen im Vergleich zu statischen Systemen zu kultivieren. Die meisten Materialien, die als Matrices von Zellen genutzt werden, sind synthetisch hergestellt, z.B. aus Polyglykolsäure oder natürlich, wie Kollagen und Hydroxylapatit. Die synthetisch hergestellten Materialien haben den Vorteil, dass ihre Materialeigenschaften wie Stärke, Mikrostruktur und Permeabilität gut beeinflusst werden können. Auf der anderen Seite sind natürliche Materialien in der Zellinteraktion und im Adhäsivverhalten überlegen. In den aktuellen Forschungen wird versucht, die positiven Eigenschaften zu

verbinden (Barrera et al. 1993; Mooney et al. 1995; Török et al. 2001).

4.2.1. Hepatozytenkultur

Die Proliferation und Differenzierung einer Zelle ist von folgenden wesentlichen Faktoren abhängig: Humorale Mediatoren und ihre Rezeptorwirkung, extrazelluläre Matrix und interzelluläre Kontakte mit ihren Wechselwirkungen. Im Rahmen der Forschung zur Leberregeneration stehen die Einflüsse der Wachstumsfaktoren im Vordergrund. Traditionell unterscheidet man humorale Mediatoren in Wachstumsfaktoren und Zytokine. Wachstumsfaktoren wirken mitogen (Mitogene, Comitogene) oder inhibitorisch (Inhibitoren) auf den Zellzyklus (Michalopoulos 1990). Komplette Mitogene bewirken bei kultivierten Zellen eine Zunahme der Proliferationsrate. Für die Leberzellen sind EGF, TGFalpha, HGF, KGF, aFGF und HB-EGF als Mitogene beschrieben (Housley et al. 1994; Ito u. Kawata et al. 1994; Matsumoto u. Nakamura et al. 1992). Comitogene sind inkomplette Mitogene. Sie alleine stimulieren nicht die Proliferation von kultivierten Zellen, verstärken aber den Effekt von Mitogenen. Comitogene sind z.B. Insulin, Glukagon, Vasopressin, Adrenalin, T₃ und T₄. Cytokine aktivieren Effektorzellen und bewirken so eine Veränderung der Immunität, der Zelladhäsion, Migration und Chemoattraktion (Fausto u. Laird et al. 1995). Bei der Organregeneration und Organogenese der Leber wirken Wachstumsfaktoren und Zytokine zusammen. Die definitionsgemäße Trennung ist hier nicht sinnvoll, da beide Gruppen die Zellproliferation, Morphogenese, Angiogenese, Zellmotilität, Differenzierung und Zellüberleben beeinflussen. Das Wissen über diese Zusammenhänge gibt die Möglichkeit, Hepatozyten in Kultur zu halten. Die Zellen von TGFalpha transgener Mäuse können in serumfreiem Medium kultiviert werden. Nach dreissig Tagen Kulturdauer bilden sich replizierende Kolonien. Durch Isolation der Kolonien kann man Zelllinien etablieren, die alpha1-Antitrypsin, Transferrin, Albumin und Hepatozyten-Connexine bilden (Wu u. Merlino et al. 1994).

Neben den Wachstumsfaktoren ist die extrazelluläre Matrix (ECM) ein entscheidender Aspekt für die Kultur und Regeneration von Leberzellen. Die Matrix ermöglicht einerseits die physikalische Stabilität (Stützgerüst), andererseits moduliert sie biologische Vorgänge wie Zelladhäsion, Migration, Differenzierung, Reparatur und Entwicklung. Die extrazelluläre Matrix wirkt als Festphasenagonist für Zellrezeptoren und aktiviert die Freisetzung und Bindung von Cytokinen. In der Leber ist die ECM in

der Leberkapsel, den Septen und Portaltriaden lokalisiert. Sie besteht aus Kollagenen, Laminin, Elastin, strukturellen Glykoproteinen und Proteoglykanen. Jeder einzelne dieser Bestandteile ist ein weiterer Baustein für die Kultur und Transplantation von Hepatozyten. Man kann eine Kontrolle der Morphogenese in-vitro durch die extrazelluläre Matrix erreichen. Matrixmoleküle können durch den Wechsel mechanischer Integrität die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum beeinflussen. Am Modell der Angiogenese in-vitro kann man die Effekte von Matrixmolekülen studieren (Folkman u. Haudenschild 1980). In Hinblick auf die Hepatozytenkultur bedeutet das eine deutliche Verlängerung der Kulturdauer von Hepatozyten. Der Gebrauch von Matrices erlaubt in kultivierten Zellen eine Zunahme der Zellfunktion, aber auch die Imitation von in-vivo Strukturen (Mooney et al. 1995).

4.2.2. Einfluss dreidimensionaler Matrices auf die Hepatozytenkultur

Hepatozyten sind epitheliale Zellen, die einen selektiven Stoffaustausch auf der apikalen einerseits und der basolateralen Seite andererseits aufweisen. In den üblichen Monolayerkulturen primärer Hepatozyten auf Plastikunterlagen geht diese Selektivität teilweise verloren. Die Tatsache, dass Hepatozyten in-vivo auf der apikalen und basolateralen Zellseite unterschiedliche zelluläre sowie nutritive Mikromilieus vorfinden, wird nicht berücksichtigt. Die Zellen können durch extrazelluläre Faktoren so gesteuert werden, dass sie dreidimensionale tubuläre Netzwerke ausbilden. Faktoren, die eine Veränderung der morphologischen Struktur bewirken, sind z.B. unlösliche Faktoren wie die ECM-Substrate, Collagengele, Matrixgel oder Fibronectine. Diese Faktoren wirken über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren. Sie aktivieren sowohl second-messenger abhängige Transduktion, wie auch Kaskaden, die durch Anordnung des Zytoskeletts Signale vermitteln. Dieser Prozess wird als mechanochemische Signaltransduktion bezeichnet. Die Erkenntnis, dass ECM induzierte, physikalische Kräfte die Zellmorphologie und Zellfunktion beeinflussen, nutzt man ebenfalls für die Hepatozytenkultur.

Eine Reihe von Matrices auf der Basis einer Kollagenpräparation, die in verschiedenen Kulturmodellen Verwendung finden und gute Kultureigenschaften für Hepatozyten bieten, sind die Biomatrix, das Matrigel®, das Vitrogen® und die Sandwichtechnik.

Die „Biomatrix“ stellt eine komplexe Bindegewebsmatrix dar, die aus homogenisierter Rattenleber hergestellt wird und alle bekannten Kollagentypen sowie Basalmembran

enthält. Das Matrigel®, aus dem Engle-Holm-Swarm-Sarkom der Maus gewonnen, ist als komplexe, extrazelluläre Matrixzusammensetzung etabliert und kommerziell erhältlich (Orkin et al. 1977). Diese Matrix enthält Laminin, Kollagen Typ IV und Heparansulfatproteoglykan als Hauptbestandteile und wurde für die Anwendung in Zellkultursystemen adaptiert. In diesem Milieu schaffen sich die Hepatozyten eine dreidimensionale Ausrichtung, präsentieren eine intakte morphologische Ultrastruktur und zeigen erhaltene Transkriptions- und Expressionsmuster von leberspezifischen Genen.

Unter Verwendung von Vitrogen® (ein kommerziell erhältliches, hydriertes Typ-I-Kollagen) wird eine Kulturdauer von Rattenhepatozyten von bis zu fünf Wochen unter der Beibehaltung von biochemischen und morphologischen Charakteristika beschrieben. Es ergeben sich bei den Rattenhepatozyten signifikant höhere transkriptionale Aktivitäten für Albumin mRNA als in konventionellen Kulturen ohne Kollagendeckel.

Die Sandwichtechnik besteht in der Hinzufügung einer Kollagenschicht als so genannter „Deckel“ zu einem bestehenden Hepatozytenmonolayer. Durch solche Sandwichkulturen konnten die Kulturdauern auf das doppelte erhöht werden (Berthiaume et al. 1996). Auch andere leberspezifische Funktionen werden durch die Sandwichkonfiguration im Vergleich zu normalen Monolayern gesteigert. Humane Hepatozyten können über ein bis zwei Monate in einem Sandwichsystem kultiviert werden und zeigen ihre typische polygonale Morphologie. Die extrazelluläre Matrix übt dabei einen großen Effekt auf die Organisation und Expression des Zytoskeletts aus. Mit der Ausbildung von Gallenkanalikuli in Sandwichkulturen tritt gleichzeitig eine Veränderung der Mikrotubuli – und Mikrofilamentverteilung auf. Hepatozyten in Sandwichkulturen weisen eine physiologische Polarität auf (Ezzel et al. 1993; Moghe et al. 1996). Jedoch ergibt sich eine Limitierung bei der statischen Kultur durch die Mangelversorgung der zentralen Zellen, da hier eine Versorgung durch Diffusion erfolgt. Daraus resultiert unter anderem die Vorstellung, ein Neogewebe zu entwickeln.

4.2.3. Künstliche Gewebezucht von Lebergewebe (BIOREAKTOR)

Die ersten Arbeiten im Bereich Tissue Engineering basierten auf statischen Zellkulturen, um Gewebe für eine Implantation herzustellen. Es wurde aber deutlich, dass Flusssysteme die Qualität bestimmter Gewebearten, wie z.B. Knorpel, verbessern können (Vunjak et al. 1996).

Die Verwendung von Flussbioreaktoren ermöglicht die Kultivierung einer größeren Menge an Zellen als bei statischen Systemen. Weiterhin kann die Steuerung von Metaboliten und Gasen durch den Fluss wesentlich besser erfolgen (Török et al. 2001). Es ist gezeigt worden, dass Blutgefäße besser unter pulsatilem Fluss, als unter statischen Bedingungen wachsen (Niklason et al. 1999). Ein Reaktorsystem, das die Hepatozytenkultur über lange Zeiträume bei Erhalt der leberspezifischen Funktion ermöglicht, muss somit die Adhärenz der Zellen auf der Oberfläche fördern, aber auch einen kontinuierlichen Mediumsfluss für alle Zellen ermöglichen. Diese neuartigen Zellzuchttechniken verbinden die Vorteile eines Festbettreaktors (hohe Zelldichte, kontinuierlicher Mediendurchfluss, leichte Entnahme von Zellen und Wiederverwendung der Polymerträger) mit einer Rekonstruktion der Mikroumgebung in-vivo (bipolarer Zellwuchs auf Collagenunterlagen). Ein Beispiel eines Bioreaktors ist die Magnetisierung von Polyacrylamidpartikeln. Dieser Zellzuchtreaktor ist im Labormassstab drei Wochen kontinuierlich einsetzbar. Auch in nanoporöse Keramikmaterialien als Zweikammer-Durchflussreaktor werden primäre Rattenhepatozyten kontinuierlich für vierzehn Tage kultiviert (Aurich et al. 2005). Gezielte in-vitro Versuche mit Hepatozyten haben diese Überlegungen bestätigt (Kaufmann et al. 1997; Mooney et al. 1992). Tong et al. führten einen Versuch mit einer Langzeitkultur von Sphäroiden aus adulten Rattenhepatozyten durch. Die Zellen behielten ihre Funktionsfähigkeit, wie Albuminproduktion, in der Kultur für zwei Monate (Tong et al. 1992). Ebenfalls wird die Anwendung von Polymeren in Transplantationsmodellen mit genetisch veränderten Zellen untersucht (Gilbert et al. 1993).

Die neuesten Arbeiten beschäftigen sich intensiv mit der Weiterentwicklung der „künstlichen Leber“-Bioartificial Liver System (BAL) (Park u. Lee 2005). Prinzipiell besteht ein BAL System aus isolierten Hepatozyten in einem Bioreaktor. Die Zellen werden unbeweglich in Kultur gehalten und führen leberspezifische Funktionen aus. In diesem BAL System besteht ein Durchfluss an Blut oder Plasma eines von akutem Leberversagen betroffenen Patienten (Cao et al. 1998; Mito 1986). Das System soll dem Patienten eine längere Wartezeit auf ein Spenderorgan ermöglichen, bzw. bis eine Regeneration der eigenen Leber erfolgt ist (Strain u. Neuberger 2002). Es gibt einige Übersichtsarbeiten, die sich mit der Geschichte, der Technologie, den vorklinischen sowie den klinischen Ergebnissen des BAL Systems beschäftigt haben (Allen et al. 2001; Busse et al. 1999; Chan et al. 2004; Hui et al. 2001; Legallias et al. 2001).

Insgesamt sind bisher neun BAL Systeme getestet worden, wobei Unterschiede unter anderem in der Form der Zellaggregate, der Art des Plasmas oder Blutflusses pro Einheit und der klinischen Resultate, wie in der Rückresorption von Ammoniak und Elimination von Bilirubin, bestehen. In den frühen BAL Systemen wurden dem Kreislauf keine speziellen Hepatozytenkulturen beigefügt, nur eine Zellsuspension ist genutzt worden (Margulis et al. 1989; Matsumura et al. 1987). Später erfolgte eine Anwendung von Mikrocarriern und Kollagenen in den Kulturen des Systems (Demetriou et al. 1995; Patzer et al. 2002). Heute haben sich in BAL Systemen poröse Matrices, Spheroide, Kokulturen aus Kollagenen und Sandwichkulturen etabliert (Lee et al. 2004; Washizu et al. 2001).

4.3. Bedeutung des in-vitro Versuches

Wir haben den in-vitro Versuch ganz bewusst vor die Transplantationsstudie gestellt, um die Frage zu klären, wie sich die Hepatozyten in der Fibrinmatrix verhalten. Im in-vitro Versuch konnten wir die Effekte der Fibrinmatrix auf das Wachstum und die Differenzierung von Hepatozyten in Kultur untersuchen. Eine gleichbleibende Zellzahl bis zum 3. Tag in Kultur bestätigt die Annahme, dass eine Fibrinmatrix eine adäquate Umgebung und Konditionen zum Überleben von frisch isolierten Hepatozyten bietet. Der Zellzahlverlust ab dem 3. Tag macht jedoch deutlich, dass eine in-vitro Umgebung nur bis zu einem gewissen Grad ein Wachstum der Zellen und die Formation des Neogewebes positiv beeinflussen kann. Als Begründung sind sowohl die Minderversorgung mit Wachstumsfaktoren bei ungleichmäßigem Mediumfluss durch die gesamte Kultur, als auch eine mangelnde Sauerstoffversorgung der Kultur anzunehmen. Die Problematik einer begrenzten Versorgung von Zellen im Mittelpunkt von dreidimensionalen Kulturen unter statischen Konditionen ist bekannt und in der Literatur beschrieben (Fiegel et al. 2004). Herauszuheben ist jedoch, dass die Fibrinmatrix eine dreidimensionale Zellorientierung und die Entwicklung des Neogewebes ausreichend unterstützt. Gerade die dreidimensionale Ausrichtung der Zellen ist ein sehr wichtiger Parameter zur Orientierung des Zytoskeletts. In-vitro Versuche mit Hepatozyten haben gezeigt, welche Auswirkungen die mechanisch-chemische Signaltransduktion für die Änderung der Genexpression haben kann (Mooney et al. 1992). Die Analysen der Genexpression und die Anwendung der Immunhistologie für die isolierten Hepatozyten in der dreidimensionalen Kultur zeigte

eine konstante Differenzierung der Zellen über den gesamten Zeitraum. Dieser umfasste das Minimum von 7 Tagen. Mit dieser Zeitspanne sind wir, im Vergleich zu bisher durchgeführten Studien, über die durchschnittliche Untersuchungsdauer von statischen Kultursystemen gelangt. In den üblichen zweidimensionalen Kultursystemen wurde ein Rückgang der leberspezifischen Genexpression und Funktion der Zellen bereits nach wenigen Tagen beobachtet. Diese Ergebnisse implizieren, Fibrin als injizierbare Matrix zur Hepatozytentransplantation zu verwenden. Bereits andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, wie effektiv Fibrin als Transportermedium zur Gewebsentwicklung z.B. bei Knorpel, Knochen, Urothelzellen und auch Hepatozyten verwendet werden kann (Wechselberger et al. 2003; Xu et al. 2004). Die zwei Komponenten Thrombin und Fibrinogen ermöglichen eine fluide Matrix, die injiziert werden kann und im Parenchym des Transplantationsorgans eine solide Matrix zur Zellentwicklung bietet. Wir bauten somit ein Modell der Matrix basierten Transplantation auf (Bruns et al. 2005).

4.4. Engraftment von Hepatozyten in das Empfängergewebe

In der Leber haben Hepatozyten eine ganz unverwechselbare epitheliale Polarität und Zell-Zell Kommunikationsstrukturen, die mit Hilfe von Gallenkaniculi, Tight junctions und Gap junctions ermöglicht werden. Diese Polarität ermöglicht eine besondere Regenerationsfähigkeit und die sehr differenzierten Funktionen der Hepatozyten (Spray et al. 1994; Steer 1995). In unserem in-vivo Versuch untersuchten wir die Anwendung eines Fibringels als Injektionsmatrix für Hepatozyten direkt in die Leber. Unsere Daten zeigen, dass diese Methode technisch durchführbar ist, ohne signifikante Sicherheitsprobleme oder negative Nebenwirkungen. Besonders die Untersuchungsergebnisse zur Versuchstiergruppe 1 über 12 Monate bis 18 Monate konnten zeigen, dass das Transplantationsverfahren zu keiner pathologischen Veränderungen des Organismus, wie zum Beispiel einer Leberzirrhose oder rezidivierenden Embolien in der Lunge bzw. zur Ausbildung eines portalen Hypertonus führt. Diese Ergebnisse gehen einher mit klinischen Studien, in denen Fibrin als erfolgreiche Methode zur Blutstillung bei operativen Lebereingriffen oder traumatischen Leberverletzungen verwendet wurde (Feinstein et al. 2001; Ochsner et al. 1990). Fibrin stellt eine adäquate und stimulative Matrix für die Hepatozytenentwicklung bei Transplantation dar. Dies konnten unsere histologischen Aufarbeitungen zeigen. Bereits direkt nach Transplantation organisierte sich das

Fibringel als dreidimensionales Netzwerk, um somit ein wichtiges stimulatives Gitter für die Hepatozytenentwicklung aufzubauen. Welche entscheidende Rolle Matrices für die Gewebeformation und Funktionsfähigkeit von transplantierten Zellen darstellen, ist auch in anderen Arbeitsgruppen bestätigt worden (Fiegel et al. 2004; Gwak et al. 2004). In allen Transplantationsproben und in allen Gruppen zu jedem Zeitpunkt liessen sich morphologisch unauffällige Hepatozyten nachweisen. In den immunhistochemischen Untersuchungen wurde durch den Nachweis von Cytokeratin 18 deutlich, dass es sich bei den transplantierten Zellen wirklich um Hepatozyten handelt (Moll et al. 1982). Die immunhistologische Untersuchung mit Hilfe des Parenchymmarkers CK-18 zeigte die hohe Anzahl an integrierten transplantierten Hepatozyten in das ortsständige Lebergewebe. Verantwortlich sind die folgenden, bereits erläuterten Faktoren. Zum einen die Fibrinmatrix, die eine Vernetzung der Hepatozyten unterstützt, zum anderen die stimulative Wirkung der orthotopen Umgebung. Unter Verwendung der Leber als Transplantationsort ist die Versorgung mit essentiellen Ernährungs- und Wachstumsfaktoren gesichert. Dieser Faktor ist entscheidend und war in der Kultur des in-vitro Versuches limitiert. Die transplantierten Zellen haben in dieser orthotopen Umgebung auch einen nativen Anschluss an die Gallengänge, was bei einer peritonealen Transplantation nicht gegeben ist.

Jedoch wollten wir eine eindeutigere Nachweismethode zur Erkennung der transplantierten Hepatozyten, so dass zur Auswertung der fluoreszierende Farbstoff PKH26 angewandt wurde. Der Gebrauch von PKH26 ist sinnvoll bei in-vitro Versuchen, insbesondere bei in-vitro Proliferationsstudien von Zellen (Givan et al. 1999; von Mach et al. 2004). Auch in in-vivo Transplantationsmodellen wurde PKH26 verwendet, z.B. für den Nachweis von transplantierten Speicheldrüsenzellen oder Stammzellen (Hendrikx et al. 1996; Sugito et al. 2004). Andere Arbeiten zeigten eine gute Kurz- und Langzeituntersuchung von hämatopoetischen Zellreihen mit Hilfe der Anfärbung von PKH26 (Lanzkron et al. 1999). PKH26 stellt eine einfach durchführbare Methode zur Zelldetektion dar. Es kann aber bei zu hoher Konzentration zytotoxisch wirken. Die Intensität der Färbung nimmt linear mit jeder Zellteilung ab. Wir konstatieren, dass die höchste Intensität der Fluoreszenz in den transplantierten Hepatozyten in der Stunde Null und am Tag zwei nach der Transplantation vorlag. Auch in anderen Arbeiten wird dieses Phänomen beschrieben (Lanzkron et al. 1999). Die lineare Abnahme in der Fluoreszenzintensität konnten wir ebenfalls nachvollziehen. Wir konnten im Gegensatz zu anderen nach einem Transplantationszeitraum von bis zu

drei Monaten keine einzelnen PKH26 markierten Hepatozyten mehr feststellen, die sich in das orthotope Lebergewebe integrierten (Mach et al. 2004). Hier sehen wir einen deutlichen Vorteil im Nachweis von cross-sex Genen mit Hilfe von FISH oder dem in Säugetierzellen nachgewiesenen Fluorophoren EGFP.

4.5. Engraftment von nicht-parenchymatösen Leberzellen in das Empfängergewebe

Eine besondere Bedeutung für die Leberfunktion haben die Lebersinoide. Sie sind 350-500 µm lang und unregelmässig weit (Durchmesser 4-15 µm). Dies bewirkt eine Blutstromverlangsamung und eine Verbesserung des Stoffaustausches mit der Umgebung. Die Wände der Lebersinoide werden gebildet von den flachen Endothelzellen, den Kupfferzellen und den Pit-Zellen. Die Kupfferzellen werden heute als die Sinusmakrophagen der Leber bezeichnet. Zwischen den zellulären Elementen der Sinuswand und den Hepatozyten befindet sich der nach Dissé benannte perisinusoidale Raum (Dissé 1890). Im Dissé-Raum liegen die Vitamin A-speichernden Itozellen (Düllmann et al. 2000). Weitere Synonyma sind parasinusoidale Zellen oder Sternzellen [hepatic stellate cells (HSC)]. Ein weitgestelltes ribosomales endoplasmatisches Reticulum und ein aktiver Golgi-Apparat geben den Itozellen Ähnlichkeit mit Fibroblasten. Wie Zellen mesenchymaler Herkunft bei Mensch und Ratte enthalten auch sie Vimentin als Protein intermediärer Filamente. Bei Ratten kommt allerdings gleichzeitig das Zytoskelettprotein Desmin vor, welches einen effektiveren Marker für mesenchymale Itozellen bzw. HSC darstellt (Yokoi et al. 1984). Nicht-parenchymatöse Leberzellen sind signifikant proliferationsunterstützend bei transplantierten Hepatozyten. Durch Nachweis des Markers Desmin ist der Verlauf dieses Zelltypes am Transplantationsort genauer darstell- und untersuchbar (Malik et al. 2002). In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass Zelltransplantation zu einer Aktivierung der Sternzelle führt, was wiederum das Engraftment der transplantierten Hepatozyten fördert (Benten et al. 2005b). Die Proliferation der HSC wird ebenfalls durch Signale der Kupfferzellen und der sinusoidalen Endothelzellen stark angeregt (Pinzani u. Marra 2001). In unserem in-vivo Versuch ist es in dem Transplantationsgebiet zu einer Proliferation der Desmin positiven hepatischen Stellatumzellen (HSC) gekommen. Diese Zellen sind in einer Leber zur Kontrolle der extrazellulären Matrix vorhanden und kontrollieren den sinusoidalen Blutfluss. HSC ist

der führende Zelltyp zur Entwicklung einer Leberzirrhose. Auch in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der HSC am 3. Tag nach Transplantation der Hepatozyten am höchsten ist (Benten et al. 2005a; Benten et al. 2005b). In unserem Versuch kam es im Zeitraum von 3-18 Monaten nach der Transplantation bei keinem der Tiere zur Zirrhosebildung. Die Leberoberfläche war glatt und spiegelnd, in der Histologie kein Anhalt für einen zirrhosetypischen knotigen Parenchymbau oder Malignität.

Wie bereits beschrieben ist die Kupfferzelle ebenfalls von Bedeutung bei einer Transplantation von Hepatozyten. Die besondere Funktion der Kupfferzellen (Sinusmakrophagen) besteht in der Aufnahme und Eliminierung von geschädigten oder überalterten Erythrozyten, apoptotischen Neutrophilen, Endotoxinen oder kolloidalem Material (Düllmann et al. 2000). Nach Kontakt und Aufnahme von bestimmten Substanzen sezernieren Kupfferzellen Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels, unter anderem Prostaglandine, Thromboxan und geringe Mengen von Leukotrienen. Die genannten Substanzen haben ein breites Spektrum von biologischen Aktivitäten. Sie regulieren den Gefäßtonus und haben einen protektiven Effekt auf Hepatozyten. So konnten wir in unserem Transplantationsmodell ein Einwandern von ED-1 positiven Kupfferzellen als auch anderen Makrophagen deutlich erkennen. Es lag eine massive Einwanderung von Makrophagen in das Transplantationsgebiet vor. Es ist zu einer Fremdkörperreaktion im Gewebe gekommen. Die nachgewiesenen mehrkernigen Riesenzellen in der Abbaureaktion einer Granulombildung bestätigen dieses. Bereits am 7. Tag nach der Transplantation war das Gitter aus Fibrin nur noch spärlichst sichtbar. Eine Erklärung gibt die Taxis der Makrophagen. Die Vitalität der transplantierten Zellen ist durch den zügigen Abbau der Matrix nicht beeinflusst worden. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes sind keine Veränderungen bezüglich der Differenzierung der Hepatozyten aufgetreten. Es ist sicherlich ein Merkmal des Lebergewebes, eine gute Regenerationsfähigkeit zu besitzen. Daher behaupten wir, dass Fibrin als injizierbare Matrix als Träger zur Hepatozytentransplantation genutzt werden kann. Es kann sogar davon ausgegangen werden, dass die Matrix ein Einwandern von ortsständigen Kupfferzellen und Sternzellen fördert, was folgernd das Engraftment der transplantierten Hepatozyten unterstützt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, Fibrin hat einen konzentrationsabhängigen, adhäsions- und proliferationsfördernden Effekt auf Hepatozyten. Fibrinogen und Fibrin bilden bezüglich der zellulären Antwort nicht nur eine strukturelle, passiv wirkende

Matrix, sondern ihre substanzspezifischen Interaktionen über zelluläre Rezeptoren Einfluss auf das Adhäsions- und Proliferationsverhalten der transplantierten Hepatozyten und nicht-parenchymatösen Zellen aus.

4.6. Ausblick

Zunächst konnten wir im in-vitro Kulturmodell zeigen, dass Fibrin als unterstützende Matrix zur Differenzierung und dem Engraftment von Hepatozyten beiträgt. Die Dreidimensionalität der Fibrinmatrix beinhaltet einen großen Vorteil gegenüber den konventionellen Kulturmodellen. Auf der Basis dieser Ergebnisse haben wir mit dem in-vivo Versuch ein Transplantationsmodell entwickelt. Es handelt sich hierbei natürlich nur um eine sehr kleine Transplantationsstudie mit wenigen Tieren. Wir konnten jedoch die entscheidenden Vorteile gegenüber bisherigen Hepatozytentransplantationen herausarbeiten. Das intrahepatische Transplantationsverfahren ist wesentlich risikoloser gegenüber der Injektion von Hepatozyten in die Portalvene oder der Fremdkörper assoziierten Transplantation in den Peritonealraum. Wichtig ist auch zu erkennen, dass eine Transplantation in die physiologische Umgebung der Hepatozyten, eine wesentliche Vereinfachung der Versorgung mit Stimulantien und Wachstumsfaktoren darstellt. Wir konnten in dieser Studie keine Langzeitergebnisse untersuchen, da die PKH26 Fluoreszenz nur auf ca. vier Wochen hinreichend nachweisbar ist. Hier sind die Methoden, wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und die EGFP Methode zur Beobachtung der Verteilung von Proteinen von Vorteil. Wir sind aber der Meinung, dass es sich lohnt, diese Methode der Hepatozytentransplantation weiter zu entwickeln. Sollte dies gelingen, so würde es eine Möglichkeit geben, verschiedene Lebererkrankungen auf Dauer zu behandeln.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Zelltransplantation und Tissue Engineering der Leberzelle werden in aktuellen Studien und Experimenten zur Therapie für bestimmte Lebererkrankungen erforscht. In dieser Arbeit haben wir zwei Versuche durchgeführt. Zum einen haben wir untersucht, in wieweit eine Fibringel Matrix zur Hepatozytenkultur verwendet werden kann. Zum anderen haben wir im Rattenmodell eine Methode zur Hepatozytentransplantation durch eine Fibrinmatrix evaluiert.

Material und Methoden: Es wurden Hepatozyten mittels einer Kollagenase Verdauungstechnik aus männlichen Lewis-Ratten isoliert. Die Fibringel Matrix wurde mit Hilfe der Komponenten Fibrinogen und Thrombin hergestellt. Die isolierten Hepatozyten wurden in einem Tropfen der Matrix auf Plastikkulturplatten in einem Medium mit EGF und Insulin gehalten. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe einer DNA Verdünnungsreihe berechnet. Die Hepatozytendifferenzierung ist unter Anwendung der RT-PCR und der Immunhistologie von CK-18 und Albumin kontrolliert worden. Im Transplantationsmodell sind die Hepatozyten zur Detektion mit dem Marker PKH26 inkubiert und unter die Leberkapsel und in das Parenchym der Empfängerlebern injiziert worden. Die Auswertung des Neogewebes erfolgte mikroskopisch durch ein Fluoreszenzfiltersystem und in der Histologie mit den Markern CK-18, ED-1 und Desmin.

Ergebnisse: Die Hepatozytenkultur in der Fibrinmatrix ermöglichte eine stabile Zellzahl und eine dreidimensionale Neogewebeformation. Mit der RT-PCR und der Immunhistologie liessen sich Vitalitätsmarker wie CK-18 und Albumin nachweisen. Die transplantierten Zellen konnten eindeutig nach 2 und 7 Tagen in der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. CK-18 und Desmin liessen auf eine Integration von Hepatozyten und Sternzellen in die Empfängerleber schliessen.

Diskussion: Die Fibringel Matrix stellt eine geeignete Umgebung für die Hepatozytenkultur dar. Die direkte intrahepatische Injektion von Hepatozyten in eine Matrix aus Fibringel ist technisch durchführbar. Wir schlussfolgern, dass Fibringel eine entwicklungsfähige Matrix für das Tissue Engineering der Leber darstellt.

6. Literaturverzeichnis

Abrahamse SL, van de Kerkhove MP, Sosef MN, Hartman R, Chamuleau RA, van Gulik TM (2002) Treatment of acute liver failure in pigs reduces hepatocyte function in a bioartificial liver support system. *Int J Artif Organs* 25: 966-974

Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN (2001) Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 34: 447-455

Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (1988b) (eds) *The liver. Biology and pathobiology.* Raven Press, New York, pp 9 - 10

Aurich H, Koenig S, Schneider C, Walldorf J, Krause P, Fleig WE, Christ B (2005) Functional applications of serum-free cultured rat hepatocytes for downstream transplantation application. *Cell Transplant* 14: 497-506

Baccarani U (2003) Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transplantation* 9: 506-512

Baccarani U, Adani GL, Sanna A, Avellini C, Sainz-Barriga M, Lorenzin D (2005) Portal vein thrombosis after intraportal hepatocytes transplantation in a liver transplant recipient. *Transpl Int* 18: 750-754

Balladur P, Crema E, Honiger J, Calmus Y, Baudrimont M, Delelo R, Capeau J (1995) Transplantation of allogenic hepatocytes without immunosuppression: Long-term survival. *Surgery* 117: 189-194

Barrera DA, Zylstra E, Lansbury PT, Langer R (1993) Synthesis and RGD peptide modification of new biodegradable copolymer (polylactic acid-co-lysine). *J Am Chem Soc* 115: 11010-11011

Benedetti E, Kirby JP, Asolati M, Blanchard J, Ward MG, Williams R, Hewett A, Fontaine M, Pollak R (1997) Intrasplenic Hepatocyte Allotransplantation in Dalmatian dogs with and without cyclosporine immunosuppression. *Transpl* 63: 1206-1209

Benten D, Follenzi A, Bhargava KK, Kumaran V, Palestro CJ, Gupta S (2005a) Hepatic Targeting of Transplanted Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Intact Mice. *Hepatology* 42: 140-148

Benten D, Kumaran V, Joseph B, Schattenberg J, Popov Y, Schuppan D, Gupta S (2005b) Hepatocyte Transplantation Activates Hepatic Stellate Cells With Beneficial Modulation of Cell Engraftment in the Rat. *Hepatology* 42: 1072-1081

Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML (1996) Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J* 10: 1471-1484

Bruns H, Kneser U, Holzhüter S, Roth B, Kluth J, Kaufmann PM, Kluth D, Fiegel HC (2005) Injectable Liver: a novel approach using fibrin gel as a matrix for culture and intrahepatic transplantation of hepatocytes. *Tissue Engineering* 11 (11-12): 1718-26

Busse B, Smith MD, Gerlach JC (1999) Treatment of acute liver failure: hybrid liver support. A critical overview. *Langenbecks Arch Surg* 384: 588-599

Canaple L, Nurdin N, Angelova N, Saugy D, Hunkeler D, Desverge B (2001) Maintenance of primary murine hepatocyte function in multicomponent polymer capsules-in vitro cryopreservation studies. *J Hepatol* 34:11-18

Cao S, Esquivel CO, Keeffe EB (1998) New approaches to supporting the failing liver. *Annu Rev Med* 49: 85-94

Chan C, Berthiaume F, Nath BD, Tilles AW, Toner M, Yarmush ML (2004) Hepatic tissue engineering for adjunct and temporary liver support: critical technologies. *Liver Transpl* 10: 1331-1342

Chen Z, Ding Y, Zhang H (2001) Cryopreservation of suckling pig hepatocytes. *Ann Clin Lab Sci* 31: 391-398

David P, Alexandre E, Audet M, Chenard-New MP, Wolf P, Jaeck D, et al. (2001) Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase albuminemic rats (NAR). *Cell Transpl* 10:67-80

Demetriou A A, Whiting JF, Feldman D, Levenson SM, Chowdhury NR, Moscioni AD, Kram M, Chowghury JR (1986) Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier attached hepatocytes. *Science* 233: 1190-1192

Demetriou A A, Rozga J, Mears D, Horvat M, Sheil AG (1998) Comparison of porcine hepatocytes with human hepatoma (C3A) cells for use in a bioartificial liver support system. *Cell Transpl* 7: 459-468

Deutsche Stiftung Organtransplantation Organspende und Transplantation in Deutschland www.dso.de

Disse J (1890) Über die Lymphbahnen der Säugetierleber. *Arch Mikr Anat* 36: 203-224

Düllmann J, Wulfhekel U, Lierse W (2000) Die Struktur der Leber und der Gallenwege. In: Seifert G (Hrsg.) *Pathologie der Leber und der Gallenwege*. Springer, Berlin Heidelberg New York

Ezzel RM, Toner M et al. (1993) Effect of collagen gel configuration on the cytoskelett in cultured rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 208: 442-452

Fausto N, Laird AD, et al. (1995) Role of growth factor and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 9: 1527-1536

- Feinstein AJ, Varela JE, Cohn SM, Compton PR, McKenney MG (2001)** Fibrin glue eliminates the need for packing after complex liver injuries. *Yale J Biol Med* 75: 315-321
- Fiegel HC, Havers J, Kneser U, Smith MK, Moeller T, Kluth D, Mooney DJ, Rogiers X, Kaufmann PM (2004)** Influence of flow conditions and matrix coatings on growth and differentiation of three-dimensionally cultured rat hepatocytes. *Tissue Eng* 10: 165-174
- Folkman J, Haudenschild C (1980)** Angiogenesis in vitro. *Nature*; 288: 551-556
- Fox IJ, Chowdhury, JR, Kaufmann SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI (1998)** Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl JMed* 338:1422-1426
- Gilbert JC, Takeda T, Stein JE, Langer R Vacanti JP (1993)** Cell transplantation of genetically altered cells on biodegradable polymer scaffolds in syngenic rats. *Transplantation*; 56: 423-427
- Givan AL, Fisher JL, Wangh M, Ernstoff MS, Wallace PK (2000)** A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. *J Immunol Meth* 230: 99-112
- Grossmann M, Raper SE, Stein EA, Engelhardt JF, Müller DW, Lupien PJ, Wilson JM (1994)** Successful ex vivo gene therapy directed to the liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat Genet*; 6: 335-341
- Gwak SJ, Choi D, Paik SS, Lee EY, Lee KS, Kim BS (2004)** Stable hepatocyte transplantation using fibrin matrix. *Biotechnol Lett* 26: 505-508
- Hendriks PJ, Martens CM, Hagenbeek A, Keij JF, Visser JW (1996)** Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 24: 129-140
- Henne-Bruns D, Kruger U, Sumpelmann D, Lierse W, Kremer B (1991)** Intraperitoneal hepatocytes transplantation: morphological results. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 419: 45-50
- Henne-Bruns D, Kruger U, Sumpelmann D, Lierse W, Kremer B (1991)** Intraperitoneal hepatocyte transplantation: morphological findings and clinical relevance. *Helv Chir Acta* 57: 717-723
- Holstege A, Lock G, Köllinger M, Scholmerich J (1996)** Conservative treatment of acute hepatic failure. *Z Gastroenterol* 34: 192-201
- Housley RM, Morris C, Boyle W, Ring B, Biltz R, Tarpley JE, Ankerman SL, Devine PL (1994)** Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 94: 1764-1777

- Hui T, Rozga J, Demetriou AA (2001)** Bioartificial liver support. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8: 1-15
- Ikebukuro H, Inagaki M, Mito M, Kasai S (1999)** Prolonged Function of Hepatocytes Transplanted into Spleens of Nagase Analbuminemic Rats. *European Surgical Research* 31: 39-47
- Ito N, Kawata S, Tamura S, Kiso S, Tsushima H, Damm D, Abraham JA, Higashiyama S, Taniguchi N, Matsuzawa Y (1994)** Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 198: 25-31
- Junqueira LC, Carneira J (1996)** *Histologie*, 4. Aufl., Springer, Berlin Heidelberg New York
- Kaufmann PM, Heimrath S, Kim BD, Mooney D (1997)** Highly porous polymer matrices as three dimensional culture system for hepatocytes. *Cell Transplant* 6: 463-468
- Kaufmann PM, Kneser U, Fiegel HC, Kluth D, Herbst H, Rogiers X (1999)** Long-term hepatocyte transplantation using three dimensional matrices. *Transpl Proc* 31: 1928-1929
- Kaufmann PM, Sano K, Uyama S, Takeda T, Vacanti JP (1994)** Heterotopic hepatocyte transplantation: assessing the impact of hepatotrophic stimulation. *Transpl Proc* 26: 2240
- Khan AA, Habeeb A, Parveen N, Naseem B, Babu RP, Capoor AK, Habibullah CM (2004)** Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report. *Trop Gastroenterol* 25: 141-143.
- Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X (1999a)** Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islets cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric analysis. *Pediatr Surg Int* 15: 168-174
- Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Izbicki JR, Herbst H, Rogiers X (1999b)** Long Term Differentiated Function of Heterotopically Transplanted Hepatocytes on Three Dimensional Polymer Matrices. *J Biomed Mater Res* 47: 494-503
- Koide N, Shinji T, Tanabe T, Asano K, Kawaguchi M, Sakaguchi K, Koide Y, Mori M, Tsuji T (1989)** Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 385-391
- Kusano M, Mito M (1982)** Observations on the fine structure of long survival isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 82: 616-628
- Landry B, Bernier C, Ouellet R, Gayety R, Marcia N (1985)** Spheroidal aggregate of rat liver cells: Histotypic reorganisation, biomatrix deposition and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 101: 914-923

- Langer R, Vacanti JP (1993)** Tissue engineering. *Science* 260: 920-926
- Lanzkron SM, Collector MI, Sharkis SJ (1999)** Hematopoietic Stem Cell Tracking In Vivo: A Comparison of Short-Term and Long-Term Repopulating Cells. *Blood* 93: 1916-1921
- Lee DH, Yoon HH, Lee JH, Lee KW, Lee SK, Kim SK, Choi J, Kim YJ, Park JK (2004)** Enhanced liver-specific functions of endothelial cell-covered hepatocytes heterospheroids. *Biochem Eng J* 20: 181-187
- Legallais C, David B, Doré E (2001)** Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. *J Membr Sci* 181: 81-95
- Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R et al. (1999)** Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Boil Interact* 121: 117-123
- Lloyd TDR, Orr S, Skett P, Berry DP, Dennison AR (2003)** Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell Tissue Bank* 4: 3-15
- MacFee PJ, Schmidt EE, Keown PA, Groom AC (1988)** Microcirculatory changes in liver of mice infected with murine hepatitis virus. Evidence from microcorrosion casts and measurement of red cell velocity. *Microvasc Res* 36: 140-149
- Mach von MA, Hengstler JG, Brulport M, Eberhardt M, Schormann W, Hermes M, Prawitt D, Zabel B, Grosche J, Reichenbach A, Muller B, Weilemann LS, Zulewski H (2004)** In vitro cultured islet-derived progenitor cells of human origin express human albumin in severe combined immunodeficiency mouse liver in vivo. *Stem Cells* 22: 1134-1141
- Malik R, Selden C, Hodgson H (2002)** The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Sem Cell Devel Biol* 13: 425-431
- Margulis MS, Erukhimov EA, Andreiman LA, Viksna LM (1989)** Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency. *Resuscitation* 18: 85-94
- Matsumoto K, Nakamura T (1992)** Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration and other biological functions. *Crit Rev Oncogen* 3: 27-54
- Matsumura KN, Guevara GR, Huston H, Hamilton WL, Rikimaru M, Yamasaki G, Matsumura MS (1987)** Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery* 101: 99-103
- Matsushita T, Ijima H, Koide N, Funatsu K (1991)** High albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the pores of polyurethane foam. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 324-326

- Michalopoulos GK (1990)** Liver Regeneration: molecular mechanisms and growth control. *The FASEB Journal* 4: 176-184
- Mito M, Ebata H, Kusano M, Onishi T, Saito T, Sakanzoto S (1979b)** Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation* 28: 499-505
- Mito M, Kusano M, Kawara Y (1992)** Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 24: 3052-3053.
- Mito M (1986)** Hepatic assist: present and future. *Artif Organs* 10: 214-218
- Moghe PV, Berthiaume F et al. (1996)** Role of extracellular matrix composition and configuration in maintenance of hepatocyte polarity and function. *Biomaterials* 17: 373-385
- Moll R, Franke WW, Schiller DL (1982)** The Catalog of Human Cytokeratins: Pattern of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells. *Cell* 31: 11-24
- Mooney D, Hansen L, Vacanti J, Langer R, Farmer S, Ingber D (1992)** Switching from differentiation to growth in hepatocytes: Control by extracellular matrix. *J Cell Physiol* 151: 497-505
- Mooney DJ, Park S, Kaufmann PM, Sano K, McNamara K, Vacanti JP, Langer R (1995)** Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. *J Biomed Mater Res* 29: 959-965
- Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. (1999)** Functional arteries grown in vivo. *Science* 284: 489-493
- Nissen KH (2001)** Pädiatrie, 6. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York
- Ochsner MG, Maniscalco-Theberge ME, Champion HR (1990)** Fibrin glue as a hemostatic agent in hepatic and splenic trauma. *J Trauma* 30: 884-887
- Olive PL, Durans RE (1994)** Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer and metastasis reviews* 13: 121-138
- Orkin RW, Williams BR, Cranley RE, Poppke DC, Brown KS (1977)** Defects in the cartilaginous growth plates of brachymorphic mice. *J Cell Biol* 73: 287-299
- Papalois A, Arkadopoulos N, Pataryas TH, Papadimitriou J, Golematis B (1994)** Combined hepatocyte-islet transplantation: an allograft model. *Transpl Int* 7: 432-435
- Park JK, Lee DH (2005)** Bioartificial Liver Systems: Current Status and Future Perspective. *J Bioscience and Bioeng* 99: 311-319

- Park YG, Tosha T, Fujita S, Zhu B, Iwata H, Ryu HW (2003)** Effect of low temperature preservation and cell density on metabolic function in a bioartificial liver. *Biotechnol Bioprocess Eng* 8: 41-46
- Patzer JF, Mazariegos GV, Lopez R (2002)** Bioartificial liver program investigators. Preclinical evaluation of the Excorp Medical bioartificial liver support system after the first four patient. *ASAIO J* 47: 471-475 (ÄNDERN)
- Pilichos C, Perrea D, Demonakou M, Preza A, Donta I (2004)** Management of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats by syngeneic hepatocyte transplantation in spleen and peritoneal cavity. *World J Gastroenterol* 10: 2099-2102
- Pinzani M, Marra F (2001)** Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21: 397-416
- Pollok JM, Kluth D, Cusick RA, Lee H, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R, Broelsch CE, Vacanti JP (1998)** Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions. *Eur J Pediatr Surg* 8: 195-199
- Raper SE, Wilson JM (1993)** Cell transplantation in liver-directed gene therapy. *Cell Transpl* 2: 381-400
- Ribel J, Nordlinger B, Ballet F, Cynober L, Coudray-Lucas C, Baudromont M, Legendre C, Delelo R, Panis Y (1992)** Intrasplenic hepatocellular transplantation corrects hepatic encephalopathy in portacaval-shunted rats. *Hepatology* 15:12-18
- Riede UN, Schaefer HE (1999/2001)** Allgemeine und Spezielle Pathologie. 4. Aufl., Thieme, Stuttgart New York
- Seglen PO (1976)** Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13: 29-83
- Selden C, Casbard A, Themis M, Hodgson HJ (2003)** Characterization of long-term survival of syngeneic hepatocytes in rat peritoneum. *Cell Transplant* 12: 569-578
- Sigot V, Mediavilla MG, Furno G, Rodriguez JV, Guibert EE (2004)** A simple and effective method to improve intrasplenic rat hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 13: 775-781
- Spray DC, Saez JC, Hertzberg EL, Dermietzel R (1994)** Gap junctions in liver: composition, junction and regulation. In: Aria IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA. (ed) *The liver Biology and pathobiology*, 3rd edn. Raven Press, New York
- Steer CJ (1995)** Liver regeneration. *FASEB J* 9: 1396-1400
- Strain AJ, Neuberger JM (2002)** A bioartificial liver-state of the art. *Science* 295: 1005-1009

Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH, Putnam CW (1973) The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 137: 179-199

Strohm SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP (1997) Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 63: 559-569

Sugito T, Kagami H, Hata K, Nishiguchi H, Ueda M (2004) Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. *Cell Transplant* 13: 691-699

Tong JZ, De Lagausie P, Furlan V, Cresteil T, Bernard O, Alvarez F (1992) Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroid. *Exp Cell Res* 200: 326-332

Török E, Pollok JM, Ma PX, Vogel C, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Kafmann PM, Kluth D, Rogiers X (2001) Hepatic Tissue Engineering on 3-Dimensional Biodegradable Polymers within a Pulsatile Flow Bioreactor. *Dig Surg* 18: 196-203

Uyama S, Kaufmann PM, Takeda T, Vacanti JP (1993) Delivery of whole liver-equivalent hepatocytes mass using polymers devices and hepatotrophic stimulation. *Transplantation* 55: 932-935

Vacanti JP, Morse MA, Saltzmann WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R (1988) Selective cell transplantation using bio absorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 23: 3-9

Vunjak-Novakovic G, Freed L, Biron RJ, Langer R (1996) Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. *Am Inst Chem Eng J* 42: 850-860

Washizu J, Berthiaume F, Mokuno Y, Tompkins RG, Toner M, Yarmush ML (2001) Long-term maintenance of cytochrome P450 activities by rat hepatocytes/ 3T3 cell co-cultures in heparinized human plasma. *Tissue Eng* 7: 691-703

Washizu J, Chan C, Berthiaume F, Tompkins RG, Toner M, Yarmush ML (2000) Amino acid supplementation improves cell-specific functions of the rat hepatocytes exposed to human plasma. *Tissue Eng* 6: 497-504

Wechselberger G, Russell RC, Neumeister MW, Schoeller T, Piza-Katzer H, Rainer C (2003) Successful transplantation of three tissue engineered cell types using capsule induction techniques and fibrin glue as a delivery vehicle. *Plast Reconstr Surg* 110: 123-129

Weisel JW, Stauffacher CV, Bullit E, Cohen C (1985) A model for fibrinogen: Domains and sequences. *Science* 230: 1388-1391

Wu J, Merlino G, Fausto N (1994) Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc. Natl Acad Sci USA* 91: 674-678

Xiangdong W, Ar`Rajab A, Ahren B, Andersson R, Bengmark S (1992) The effect of pancreatic islets on transplanted hepatocytes in the treatment of acute liver failures in rats. Res Exp Med (Berl) 191: 429-435

Xu JW, Zaporozhan V, Peretti GM, Roses RE, Morse KB, Roy AK, Mesa JM, Randolph MA, Bonassar LJ, Yaremchuk MJ (2004) Injectable tissue-engineered cartilage with different chondrocyte sources. Plast Reconstr Surg 113: 1361

Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe S, Usui K (1984) Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). Hepatology 4: 709-714

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation fanden Eingang in die folgende Publikation:

Bruns H, Kneser U, Holzhüter S, Roth B, Kluth J, Kaufmann PM, Kluth D, Fiegel HC (2005) Injectable Liver: a novel approach using fibrin gel as a matrix for culture and intrahepatic transplantation of hepatocytes. Tissue Engineering 11 (11-12): 1718-26

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. Lambrecht und meinem Doktorvater PD Dr. med. Dietrich Kluth für die Arbeit an dem Thema in der Arbeitsgruppe, die freundliche Unterstützung, sowie die Bereitstellung der erforderlichen Räumlichkeiten und verwendeten Apparaturen in der kinderchirurgischen Forschung danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr.med. Henning C. Fiegel bedanken, der mich während der gesamten Zeit sehr gut betreut, und mich in allen Höhen und Tiefen zum konstanten Arbeiten motiviert hat.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern im Labor bedanken. Besonders mit der Hilfe von Frau Beate Roth empfand ich die Arbeit im Labor als angenehm.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie ganz herzlichen Dank aussprechen, die mich immer unterstützt und stets zu mir gehalten hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Holzhüter
Vorname: Stephanie Anna Angelika
Geburtsdatum: 15.04.1978
Geburtsort: Rostock
Wohnort: Rostocker Str. 15, 18209 Parkentin, Mecklenburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 – 1991 Grundschule und Gesamtschule Parkentin
1991 – 1996 Friderico Francisceum Gymnasium zu Bad Doberan
1996 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung und Hochschulbildung

1996 – 1998 Studium der Germanistik und Altertumswissenschaft an der
Universität Rostock
1998 – 1999 Freiwilliges soziales Jahr an der Neurologischen Klinik/
Odenwald
1999 – 2001 Universität Marburg: Studiengang Medizin
03/ 2001 Ärztliche Vorprüfung
2001 – 2005 Universität Hamburg: Studiengang Medizin
03/ 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/ 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
20. 10. 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des
Medizinstudiums an der Universität Hamburg
04/ 2002 – 2005 Arbeit an der tierexperimentellen Doktorarbeit in der Abteilung
Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. W. Lambrecht
Seit Januar 2006 Assistenzärztin am Institut für Pathologie der Universität Rostock

Veröffentlichungen

Fiegel HC, Kluth J, Lioznov MV, Holzhüter S, Fehse B, Zander AR, Kluth D (2003) Hepatic lineages isolated from developing rat liver show different ways of maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 305(1): 46-53

Bruns H, Kneser U, Holzhüter S, Roth B, Kluth J, Kaufmann PM, Kluth D, Fiegel HC (2005) Injectable Liver: a novel approach using fibrin gel as a matrix for culture and intrahepatic transplantation of hepatocytes. *Tissue Engineering* 11 (11-12): 1718-26

Jaster R, Fitzner B, Brock P, Holzhüter S A, Nizze H, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S (2007) In vitro and in vivo studies on bosentan effects in chronic pancreatitis and pancreatic fibrosis. *GUT* (Manuscript Submission)

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln 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.

.....