

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Viszerale Transplantation
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. B. Nashan

**Vergleichendes Tissue Engineering mit Hepatozyten
auf verschiedenen PLLA-Matrices**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Maïke Scheller

aus Stuttgart

Hamburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 11.05.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. J.-M. Pollok
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. M.Dandri-Petersen
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr, R. Ganschow

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die Leber	6
1.1.1. Aufbau der Leber	6
1.1.2. Die Zellen der Leber	8
1.1.3. Funktionen der Leber	10
1.1.3.1. Glucosehomöostase	10
1.1.3.2. Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel	10
1.1.3.3. Aminosäuren und Proteine	11
1.1.3.4. Biotransformation	11
1.2. Kultivierung von Hepatozyten	15
1.2.1. Statische Zellkulturen	15
1.2.2. Dynamische Kultursysteme	16
1.2.3. Co-Kultur	16
1.2.4. Tissue Engineering	17
1.2.4.1. Matrices für das Engineering	18
1.2.4.2. Synthetische PLLA-Polymere	19
1.2.4.3. Oberflächenmodifikation	19
1.3. Probleme des Tissue Engineerings	20
1.4. Ziel dieser Arbeit	22

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere	23
2.2. Leberisolation	23
2.2.1. Verwendete Geräte	23
2.2.2. Die In-Situ-Leberperfusion	24
2.2.2.1. Herstellung der Stammlösungen	25
2.2.2.2. Herstellung der Perfusionslösungen	25
2.3. Zellkultur	27
2.4. Herstellung der verschiedenen Matrices	28
2.4.1. Herstellung der PLLA-Matrices mit nano-fibröser Struktur (genannt Nano)	28
2.4.2. Herstellung der PLLA-Matrices mit nicht-fibröser Wandstruktur (genannt Solid)	30
2.4.3. Herstellung der Polymere mittels Salt-Leaching Methode (nicht-fibröse Wandstruktur, genannt Salt)	30
2.4.4. Coated Polymer	30
2.5. Polymerbesiedelung	31
2.6. Verwendete Medien	31
2.6.1. Hormonstimuliertes Medium Williams' Medium E	31
2.6.2. Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM + FCS	32
2.7. Versuchsplanung	33
2.8. Immunhistochemie	34
2.8.1. ABC-Methode	35

2.9.Live-Death-Färbung	37
2.10.Rasterelektronenmikroskopie (Scanning electron microscopy SEM)	38
3.Erbgebnisse	
3.1.Durchlichtmikroskopie	40
3.2.Live/Dead-Färbung	42
3.2.1.Live/Dead-Färbung der Nano Polymere	42
3.2.2.Live/Dead-Färbung der Salt Polymere	45
3.2.3.Live/Dead-Färbung der Solid Polymere	48
3.3.Elektronenmikroskopie	53
3.3.1.Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nano Polymere	53
3.3.2.Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Salt Polymere	55
3.3.3.Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Solid Polymere	57
3.4.Immunhistochemische Differenzierung der Zellen	59
3.4.1.CK 18-Färbung	61
3.4.2.CK 19-Färbung	62
3.4.3.Smooth Muscle Actin-Färbung	63
3.4.4.Vimentin-Färbung	64
3.4.5.RECA-Färbung	65
4.Diskussion	
4.1.Tissue Engineering mit Poly-L-Laktatsäure Matrix	67
4.2.Zell-Matrix-Interaktion	69
4.3.Immunhistochemische Differenzierung der Zellen	70
5.Zusammenfassung	72
6.Literaturverzeichnis	74
7.Abkürzungsverzeichnis	80
8.Danksagung	82
9.Lebenslauf	83
10.Erklärung	84

1. Einleitung

1.1. Die Leber

Die Leber ist mit ca. 1500 g nach der Haut das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie spielt eine zentrale Rolle in zahlreichen Stoffwechselprozessen des Organismus.

1.1.1. Aufbau der Leber

Die Leber wird anatomisch unterteilt in zwei große (Lobus hepatis dexter et sinister) und zwei kleinere Lappen (Lobus caudatus et quadratus). Diese Leberlappen werden von 1-1,5 Mio. ca. 1-2 mm großen Leberläppchen aufgebaut. Im Bereich angrenzender Läppchen befinden sich die periportalen Felder mit den zuführenden Gefäßen Vena interlobularis (aus der Vena porta mit nährstoffreichem Blut) und Arteria interlobularis (mit sauerstoffreichem Blut aus der Arteria hepatica) und dem ableitenden Gallengang Ductulus interlobularis. Die Gallenflüssigkeit wird von den Hepatozyten gebildet und fließt über die Gallenkanälchen (Canaliculi biliferi, Aussparungen zwischen den Zellen) zu den mit Epithel ausgekleideten Gallengängen, von wo sie entgegen der Flussrichtung in den Blutgefäßen zur Gallenblase oder zum Duodenum weitergeleitet wird. Vene, Arterie und Gallengang bilden zusammen die Glisson-Trias.

Im Zentrum eines jeden Läppchens verläuft die Zentralvene, Vena centralis, welcher über Sinusoide (erweiterte Kapillargebiete) Mischblut aus der Arteria und Vena interlobulares zugeführt wird.

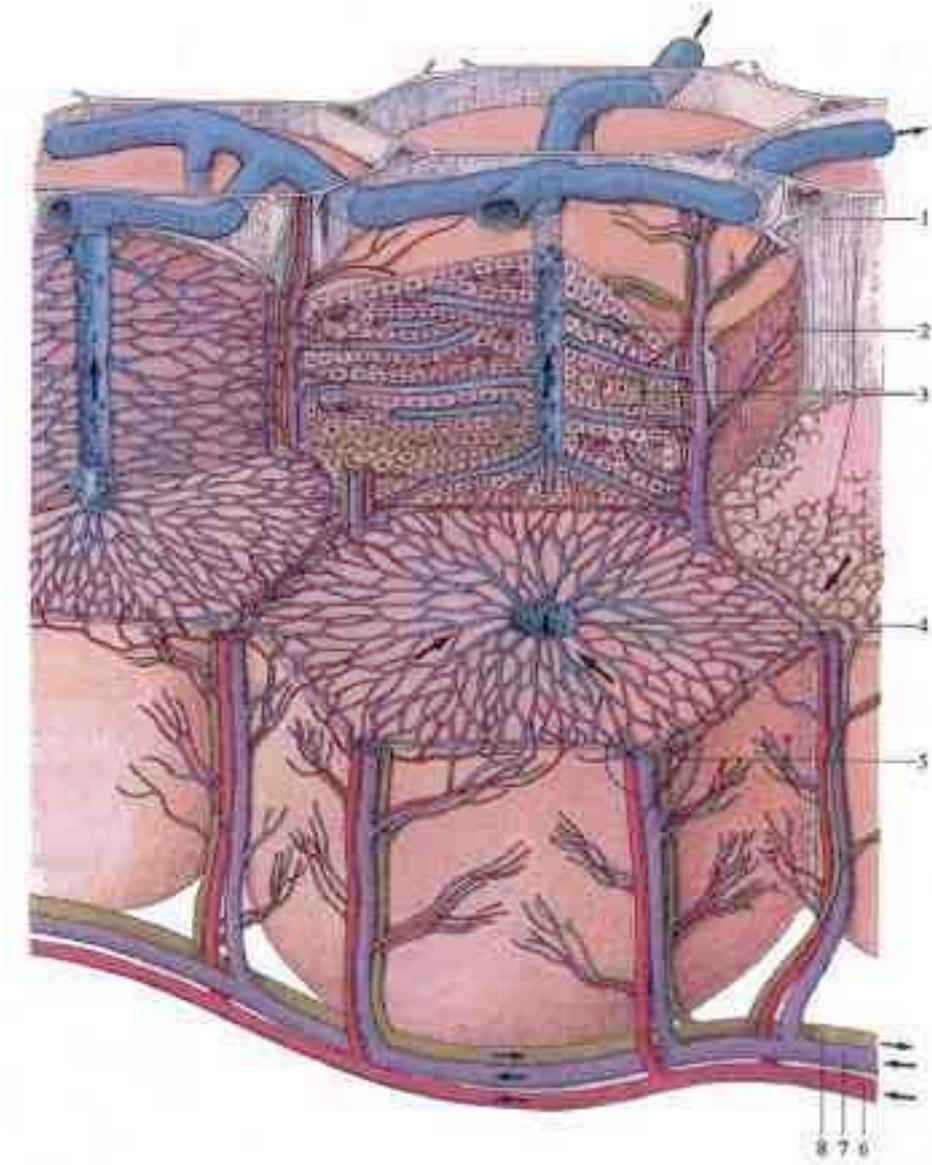


Abb. 1 Mikroskopischer Aufbau der Leber.

Wegen der deutlicheren Abgrenzung der einzelnen Leberläppchen ist die Leber des Schweins dargestellt.

- 1 Glisson- Trias umgeben von Bindegewebe des Mallory- Raumes.
- 2 Lebersinusoid mit Leberzellplatten.
- 3 System der interzellulären Canaliculi biliferi.
- 4 Vena centralis.
- 5 Glisson- Trias aus je einem Ast der A. interlobularis, V. interlobularis und Ductus interlobularis bilifer.
- 6 Ast der A. hepatica.
- 7 Ast der V. portae
- 8 Ast des Ductus bilifer

<http://www.educat.hu-berlin.de/schulen/fsag/projekt99/sektion/natur/medizin/anato2.htm>

1.1.2. Die Zellen der Leber

Hepatozyten

Die Lebergewebe wird hauptsächlich durch Hepatozyten aufgebaut. Diese machen etwa 80% des Lebervolumens und 60-65% aller Leberzellen aus. Der Hepatozyt ist eine morphologisch und funktionell polarisierte sekretorische Epithelzelle mit einer basolateralen (sinusoidalen), einer lateralen sowie einer kanalikulären (apikalen) Domäne (29).

Die sinusoidale Plasmamembran, die 70% des Hepatozyten ausmacht, ist dem Dissé-Raum zugewandt. Sie besitzt Mikrovilli und ist in der Lage Plasmaproteine durch rezeptorvermittelte Endozytose aufzunehmen. Die laterale Plasmamembran hat eine besondere Bedeutung für die interzelluläre Adhäsion und Kommunikation der Hepatozyten. Zur Begrenzung des Gallenkanälchens sind die lateralen Membranen benachbarter Hepatozyten durch Tight-Junctions als Diffusionsbarrieren und Adhering-Junctions mit Desmosomen als mechanische Verstärkung verbunden. Gap-Junctions stellen plasmatische Verbindungen zwischen den Zellen dar, die für Ionen und kleine Moleküle passierbar sind und auf diese Weise eine interzelluläre Kommunikation ermöglichen. Die kanalikuläre Plasmamembran, die in Form von Mikrovilli in das Gallenkanalikulolumen ragt, ist die entscheidende strukturelle Komponente für die Gallesekretion.

Endothelzellen

Die Endothelzellen bilden die Wände der Sinusoide, welche keine Basallamina besitzen. Ihre porenartige Fenestration (100-175 nm im Durchmesser) ermöglicht den Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen den Sinusoiden und dem Dissé-Raum beziehungsweise den Hepatozyten (28). Der Dissé-Raum ist ca. 0,3 μm breit und befindet sich zwischen dem Sinus-Endothel und den Hepatozyten.

Die Endothelzellen sezernieren vasoaktive Mediatoren und Zytokine. Sie sind zur Clearance von Medikamenten und spezifischen Molekülen mittels rezeptorvermittelter Endozytose fähig.

Kupfferzellen

Kupfferzellen sind große, sehr aktive leberspezifische Makrophagen mit endozytotischen Vesikeln und zahlreichen Lysosomen. Sie haften an den Endothelzellen und stehen im Lumen der Sinusoide in direktem Kontakt mit dem sinusoidalen Blut. Kupfferzellen werden bei Infekten aktiv, sie sind an der Virusabwehr beteiligt und phagozytieren Bakterien, Pilze, Parasiten, gealterte Erythrozyten sowie Tumorzellen. Aktivierte Kupfferzellen sezernieren zahlreiche Zytokine, lysosomale Hydrolasen, reaktive Sauerstoffmetabolite, Eicosanoide und Stickoxid (27).

Sternzellen

Sternzellen, auch Ito-Zellen genannt, liegen zwischen den Endothelzellen und den Hepatozyten im Dissé-Raum. Sie zeichnen sich durch multiple perinukleäre Vitamin-A-Speichertropfen (Oleosomen) aus und besitzen lange zytoplasmatische Ausläufer, welche die Endothelzellen umfassen. Bei zytokinvermittelter Aktivierung verlieren die Sternzellen ihre Vitamin-A-Tropfen, transformieren zu kontraktile Myofibroblasten und synthetisieren Kollagen, Glykoproteine und Proteoglykane. Sie sind die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrixsubstanz (26).

Pit Zellen

Pit Zellen sind leberspezifische natürliche Killerzellen und befinden sich im Lumen der Sinusoide beziehungsweise haften an Sinusendothelzellen oder Kupfferzellen. Sie sind an der Beseitigung von Tumorzellen, sowie an der Virusabwehr beteiligt und stimulieren die Kupfferzellen zur Produktion von zytotoxischen Substanzen (25).

Cholangiozyten

Cholangiozyten machen nur 2-5% der Leberzellmasse aus, spielen aber eine bedeutende Rolle bei der Gallesekretion. Sie sezernieren Chlorid- und Bicarbonationen in die Gallenflüssigkeit, katabolisieren Glutathion im Gallenwegslumen und resorbieren Glucose, Aminosäuren und Gallensäuren aus der Galle. Die luminal Akkumulation von Chlorid- und Bicarbonationen sowie von Gallen- und Aminosäuren induziert einen Nettoeinstrom von Wasser in die Galle (30).

Oval Zellen

Oval Zellen sind kleine parenchymale Zellen mit großen ovalen Kernen, die als bipotente Vorläufer- oder Stammzellen der Leberzellen angesehen werden und in Hepatozyten oder biliäre Zellen differenzieren können (31).

1.1.3.Funktionen der Leber

1.1.3.1.Glucosehomöostase

Postprandial wird in der Leber aus überschüssiger Glucose Glykogen synthetisiert. Sind die Glykogenspeicher gefüllt, werden zusätzlich Fettsäuren und Triglyceride hergestellt. Bei Nahrungskarenz wird durch Glycogenolyse und Gluconeogenese eine ausreichende Glucoseversorgung des Organismus sichergestellt.

1.1.3.2.Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel

Die Leber ist als einziges Organ in der Lage Cholesterin in nennenswertem Ausmaß zu katabolisieren und auszuschcheiden. Dies geschieht zum Teil in Form von VLDLs, welche zusätzlich endogen synthetisierte Triglyceride und die Apolipoproteine B, C und E enthalten. Die Cholesterinproduktion, welche einem strengen Feedback-Regulationsmechanismus unterliegt, erfolgt in den meisten Zellen, in gesteigertem Maße aber in den Zellen der Leber.

Die aus Triglyceriden freigesetzten Fettsäuren werden in der Leber bei Mangel an Kohlenhydraten durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut und anschließend im Citratzyklus zur Energiegewinnung verbrannt oder zur Bildung von Ketonkörpern

eingesetzt. Der mitochondrialen β -Oxidation langkettiger Fettsäuren kommt bei extremem Hungern, längerem Fasten und Diabetes mellitus eine wichtige Rolle in der Energiegewinnung zu.

1.1.3.3. Aminosäuren und Proteine

Die Leber baut überschüssige Aminosäuren ab und wandelt das dabei entstehende giftige Ammoniak im Harnstoffzyklus in Harnstoff um, welcher mit dem Urin ausgeschieden werden kann. Zudem werden die meisten Plasmaproteine (wie zum Beispiel Albumin) in der Leber synthetisiert und abgebaut.

Die Leber dient als Speicher für Energiereserven und Baustoffe, sowie für manche Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine.

1.1.3.4. Biotransformation

Pharmaka, Steroidhormone, Bilirubin, Ethanol und andere Xenobiotika werden von der Leber aufgenommen und in zwei Schritten (Phase-I- und Phase-II- Metabolismus) umgewandelt und ausgeschieden (62). In der Phase-I-Reaktion werden die Stoffe hydrolysiert, oxidiert oder reduziert, wobei spezifische funktionelle Gruppen (zum Beispiel OH, -NH, -SH, -COOH) in einem Molekül freigesetzt oder eingesetzt werden. Das Molekulargewicht wird hierbei nicht entschieden beeinflusst, wohl aber die Reaktivität. Durch diese Reaktionsschritte kann ein ungiftiger Ausgangsstoff giftig werden, ein zunächst unwirksames Medikament wirksam oder ein bereits wirksames Medikament in seiner Wirkung verstärkt werden.

In der Phase-I-Reaktion spielt die Cytochrom-P-450-Enzym-Superfamilie, deren Hauptwirkort die Leber ist, eine dominante Rolle (61). Viele verschiedene CYP-Isoformen, sowie ihre Induktoren und Inhibitoren sind detektiert und charakterisiert worden.

In der Phase-II-Reaktion werden hoch polare in der Regel inaktive, rasch ausscheidbare Konjugate gebildet. Dabei werden Reste aus dem Intermediärstoffwechsel wie zum Beispiel Glucuronsäure an die Stoffe gekoppelt,

wobei sich das Molekulargewicht erhöht sich. Phase-II-Enzyme sind vor allem Transferasen.

Als so genannte Phase-III-Enzyme werden Medikamententransporter bezeichnet, die laut Studien (63) die therapeutische Effektivität und Absorption, Verteilung sowie Eliminierung eines Medikamentes beeinflussen. Diese Transporter sind in den Epithel- und Endothelzellen der Leber, des Gastrointestinaltraktes, der Bluthirnschranke, den Nieren und anderen Organen lokalisiert (61).

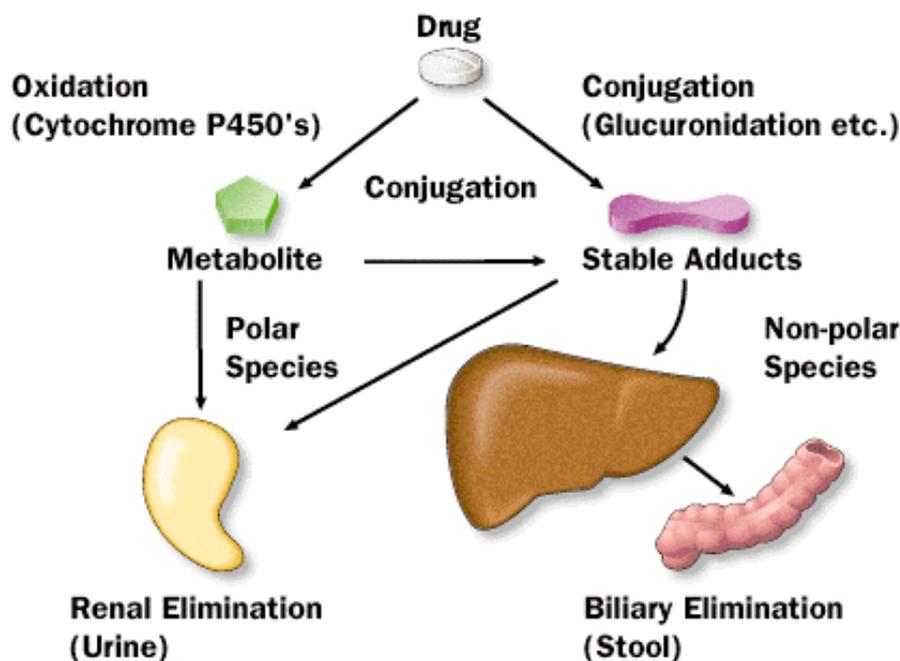


Abb.2 zeigt die schematische Darstellung der in der Leber stattfindenden Biotransformation

<http://img.medscape.com/fullsize/migrated/editorial/clinupdates/2000/301/cm.drug.fig3.gif>

Auf Grund ihrer zahlreichen Aufgaben ist ein Ausfall der Leber auf Dauer nicht mit dem Leben vereinbar. Einziger kurativer Ansatz vieler dekompensierter Lebererkrankungen stellt heutzutage die Organtransplantation dar (32). Durch den weltweit herrschenden Mangel an Spenderorganen können jedoch nicht alle Patienten auf den Wartelisten rechtzeitig mit einem Organ versorgt werden (Abbildung 3). Ausgehend von dieser Problematik wurden zahlreiche experimentelle Ansätze entwickelt, wie etwa die Leberzelltransplantation. Grundlage hierfür stellen in-vitro-Kulturen basierend auf Hepatozyten dar.

Eine wichtige Rolle spielen diese Kulturen auch in der Pharma-Forschung. Die Entwicklung eines neuen Medikaments dauert durchschnittlich 10 bis 12 Jahre und kostet etwa 800 Millionen US-Dollar (1). Durch den Einsatz der in-vitro-Testsysteme hofft man sowohl Zeit als auch Kosten bei der Medikamentenentwicklung einsparen zu können

Um die für eine spezielle Erkrankung geeignete Wirksubstanz unter den möglichen Ausgangssubstanzen herauszufinden, müssen zahlreiche Tierexperimente und Studien an freiwilligen Versuchspersonen durchgeführt werden. Diese Studien sind teuer, sehr zeitaufwendig, ethisch häufig fragwürdig und oftmals durch psychische Faktoren und individuelle Verhaltensmuster beeinflussbar (2).

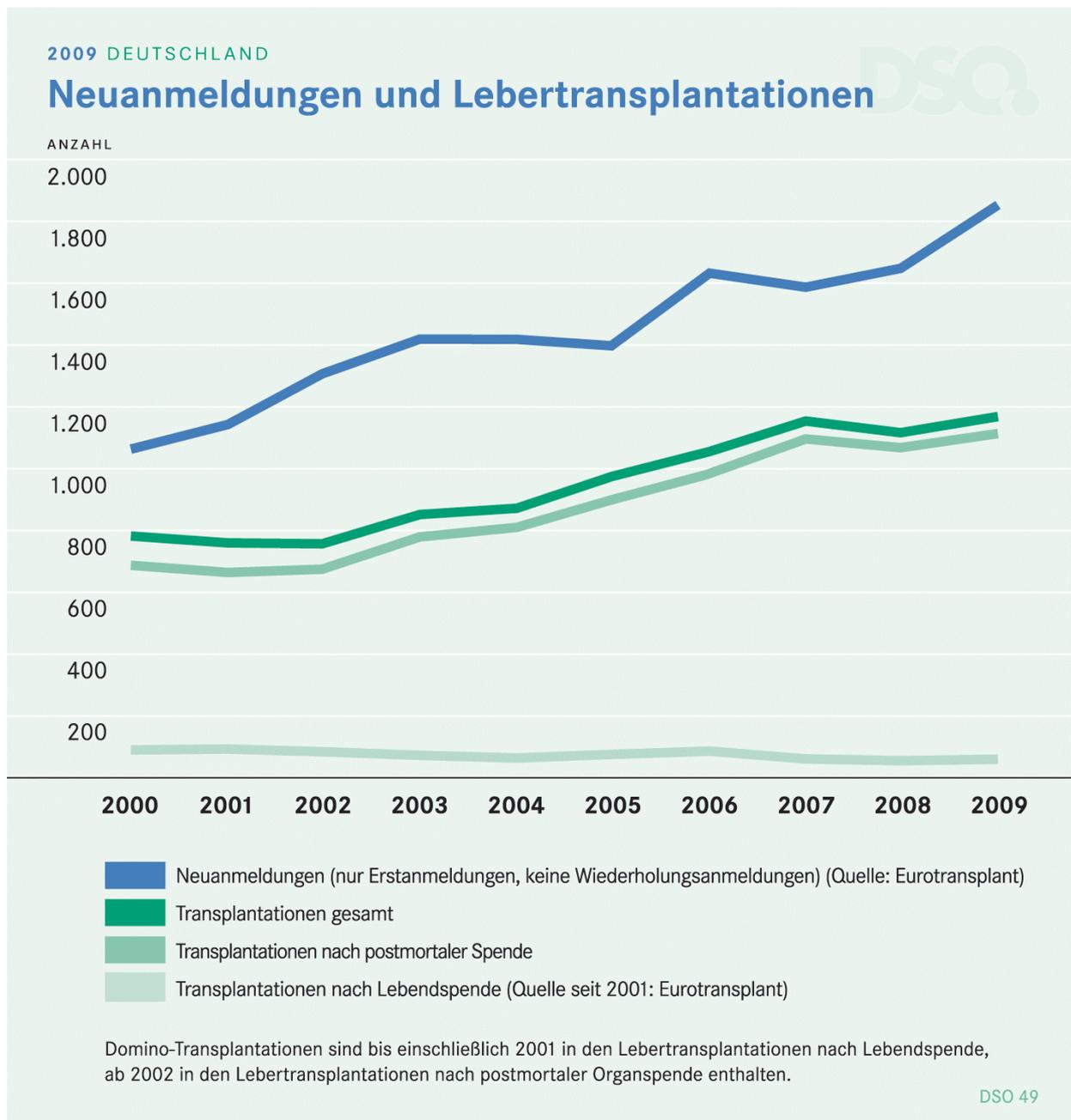


Abb.3 Neuanmeldungen und durchgeführte Lebertransplantationen im Jahr 2009 in Deutschland

<http://www.dso.de/grafiken/g49.html>

1.2.Kultivierung von Hepatozyten

1.2.1.Statische Zellkulturen

Unter einer Zellkultur versteht man die Kultivierung von Zellen außerhalb eines Organismus in einem Nährmedium unter kontrollierten Bedingungen. Basale Bedürfnisse der Zellen wie Deckung des Energiebedarfs, Aufrechterhaltung des Membranpotentials und der Temperatur müssen erfüllt werden.

Im Vergleich zu anderen Säugerzellen sind Hepatozyten anspruchsvoller und empfindlicher, wodurch sich ihre Kultivierung als große Herausforderung darstellt. In zweidimensionalen statischen Monolayerkulturen, die erfolgreich für viele andere primäre Zellen verwendet werden, kommt es bereits nach wenigen Tagen zu einer Dedifferenzierung der Hepatozyten und daraus resultierend zum Verlust ihrer spezifischen Funktionen (3)(4). Der Nachteil der Monolayer- und Suspensionskulturen besteht darin, dass die Adhäsion und Reorganisation der Hepatozyten erheblich erschwert ist. Auch die Polarisierung der Zellen, die für die leberspezifische Funktion der Zellen eine entscheidende Rolle spielt, geht in einer zweidimensionalen Zellkultur verloren.

Für die Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes der Zellen ist entscheidend, dass sie sich in Formationen anordnen können, die ihrer Organisation in vivo weitestgehend entspricht. Durch Adhäsion der Zellen an eine Oberfläche, welche dem in vivo Bindegewebe ähnelt, konnte die Aufrechterhaltung von Funktion und Differenzierung prolängert werden, wie Dunn et al zeigten. 1989 etablierten sie die so genannte Sandwichkonfiguration. Hierbei werden die Zellen auf einer Kollagenmatrix sedimentiert und nach Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und der Reorganisation der Gallenwege durch Aufbringen einer Kollagen-Deckschicht stabilisiert.

Große Bedeutung bei der Kultivierung von Hepatozyten kommt dem Medium zu. Durch Zugabe einer Vielzahl von Substraten und Hormonen, wie Insulin oder Glukokortikoiden, konnte die Funktion der Zellen in vitro für 1 bis 2 Wochen aufrechterhalten werden (5)(6)(7)(8)(9)(10).

1.2.2. Dynamische Kultursysteme

Als dynamische Kultursysteme werden perfundierbare Vorrichtungen bezeichnet, in denen das Medium an den Zellen vorbeigeführt wird. Ihre Entwicklung beruht auf der Erkenntnis, dass mechanische Bedingungen wie Medienfluss und Rotations-, Dehnungs-, Zug-, oder Pulsationsstress wichtige Faktoren bei der Entwicklung bioartifizieller Gewebe sind (11). Das pulsatile Perfundieren der Matrix mit Zellkulturmedium unter einem bestimmten Druckverlauf imitiert die Durchblutungssituation des Lebergewebes im Organismus, wodurch die Versorgung der Zellen auf den Matrices verbessert werden soll. Der entstehende mechanische Stress hat zudem Einfluss auf Funktion und Vitalität der gefäßbildenden Endothelzellen und deren Differenzierung (12). Ein weiterer Vorteil perfundierbarer Systeme ist die stetige Beseitigung metabolischer Abfallprodukte und inhibitorischer Faktoren.

1.2.3.Co-Kultur

Lebergewebe stellt ein komplexes Bauwerk aus einer Vielzahl verschiedener Zellen dar. Um in vitro eine möglichst physiologische Umgebung zu schaffen, werden oftmals neben Hepatozyten auch nicht-parenchymatöse Zellen mitkultiviert (13)(14).

In vivo befinden sich Hepatozyten in enger räumlicher Nachbarschaft zu den sinusoidalen Endothelzellen. Die Kommunikation dieser beiden Zelltypen ist wichtig für die Differenzierung und Funktion der Hepatozyten (15)(16). Experimente zeigen, dass bei Regenerationsprozessen nach einer Hepatektomie im Rattenmodell Hepatozyten in hoher Konzentration VEGF ausschütten um die Neoangiogenese durch Endothelzellen zu induzieren (17). Sinusoidale Endothelzellen wiederum stimulieren VEGF Rezeptor1 vermittelt die Hepatozytenproliferation durch Produktion von HGF und Interleukin 6 (18).

Endothelzellen stellen im Körper die natürliche Barriere zwischen Blut, den darin gelösten Makromolekülen und den Gewebezellen dar. Der Transport von Stoffen durch das Endothel ist abhängig von der Größe des zu transportierenden Moleküls, seiner Form und Ladung sowie dem Kohlenhydratgehalt. Transportwege bestehen parazellulär, zum Beispiel durch Fenestrierung oder transzellulär, zum Beispiel über

rezeptorvermittelte Transzytose oder Endozytose. Während des Durchquerens der Zelle können die Moleküle verändert werden. Dieser Vorgang hat eine große Bedeutung für den späteren Metabolismus der Moleküle, insbesondere wenn es sich um ein in der Leber verstoffwechseltes Medikament handelt. Aus diesem Grund ist für den Aufbau eines in-vitro-Lebertestsystems für Medikamentenstudien eine Co-Kultur aus Endothelzellen wichtig.

Des Weiteren wird durch eine Co-Kultur die Ausbildung stabiler Zell-Zell-Verbindungen in Form von Gap- und Tight-Junctions und damit die Beibehaltung der kubischen Zellform der Hepatozyten gefördert, welche für die Ausübung der spezifischen Funktionen entscheidend ist (19). Zusätzlich beteiligen sich die nicht-parenchymatösen Zellen der Co-Kultur an der Produktion von Bestandteilen der Extrazellulären Matrix und sekretorischer Signalstoffe.

1.2.4. Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein interdisziplinärer Arbeitsbereich, in dem Erkenntnisse und Methoden der Materialforschung und der Naturwissenschaft für das Verständnis von Struktur und Funktion normaler und pathologisch veränderter Gewebe genutzt wird. Ziel ist die Entwicklung von biologischen Substituten zur Reparatur, Erhaltung und Verbesserung der Gewebefunktion (Skalak 1988). Dieser Forschungszweig entwickelte sich auf Grund teilweise unzureichender Behandlungserfolge bei Verschleiß oder Verluste von Geweben und Organen.

Die Grundlage des Tissue Engineerings stellt die heterotrope Transplantation von Zellen auf dreidimensionalen Matrices dar. Erste Versuche mit Leberzellen wurden 1988 von Vacanti et al durchgeführt (32).

Der Großteil der frühen Arbeiten basiert auf statischen Zellkulturen mit dem Ziel Gewebe für die Implantation herzustellen. Es zeigte sich aber bald, dass Flusssysteme die Qualität bestimmter in Zellkulturen gezüchteter Gewebearten verbessern können (20). Ein weiterer Vorteil der dynamischen Kultur besteht darin, dass eine größere Zellzahl kultiviert werden kann.

Tissue Engineering kommt in den unterschiedlichsten Gebieten der Medizin zum

Einsatz. Die Entwicklungsstadien reichen dabei von der reinen Grundlagenforschung, zum Beispiel Herstellung einer artifiziellen Trachea, über präklinische Studien mit Herzklappen bis hin zum klinischen Einsatz von in vitro synthetisierter Haut oder der autologen Chondrozytentransplantation (21)(22)(33). Dabei gilt, je komplexer ein Organ ist, desto schwieriger lässt sich ein bioartifiziell Substitut konstruieren, wobei sich die Etablierung von in vitro Lebergewebe als ganz besondere Herausforderung darstellt.

Tissue Engineering Produkte sind nicht nur als Transplantate für die Wissenschaft und Industrie interessant, sondern auch als in-vitro-Testsysteme. Damit stellen sie eine Alternative zu ethisch bedenklichen, sehr aufwendigen und kostspieligen Tier- und Menschenversuchen dar.

1.2.4.1. Matrices für das Tissue Engineering

Bei der in-vitro-Anzucht von Gewebe ist die Wahl der geeigneten Trägersubstanz von großer Bedeutung. Die Trägersubstanz dient zum einen der dreidimensionalen Organisation der Zellen, zum anderen stellt sie einen Ersatz für die extrazelluläre Matrix dar, welche die Zellen in vivo umgibt. Die extrazelluläre Matrix spielt eine wichtige Rolle für den Erhalt der Differenzierung und der spezifischen Funktionen (34)(35).

Im Idealfall ist die Matrix biokompatibel und nicht immunogen, vollständig resorbierbar ohne das Entstehen von toxischen Abbauprodukten. Des Weiteren sollte sie in der Lage sein, die Angiogenese zu induzieren und die Zelladhäsion sowie die Zellproliferation zu fördern.

Matrices können aus synthetischen oder biologischen Materialien bestehen. Bei der Herstellung von Polymeren aus synthetischen Materialien können Eigenschaften wie Stabilität, Abbaugeschwindigkeit, Porosität und Mikroarchitektur kontrolliert werden, wodurch die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wird. Die Zelladhäsion ist auf Grund der meist bestehenden Hydrophobie der synthetischen Polymere deutlich eingeschränkt.

Nachteil der synthetischen Polymere besteht in den häufig toxischen Abbauprodukten und ihrem Potential Entzündungsreaktionen hervorzurufen.

Biologische Matrices bestehen meist aus Kollagen, Hydroxylapatit oder Alginat (36)(37). Ihr wesentlicher Vorteil gegenüber den synthetischen Polymeren besteht darin, dass die Zelladhäsion und –Interaktion deutlich ausgeprägter stattfinden kann.

1.2.4.2. Synthetische PLLA-Polymere

PLLA wird in der Medizin unter anderem zur Herstellung von Nahtmaterial, Stents und Implantaten für die orthopädische Chirurgie verwendet. Dieses Material hat den Vorteil, dass es vollständig im Körper durch nicht-enzymatische Hydrolyse abgebaut wird, wobei die Kinetik des Abbaus variiert und abhängig ist von den hydrophilen oder hydrophoben Eigenschaften der Polymere. Zusätzlich beeinflussen Faktoren wie Produktionstechnik, Molekulargewicht, Kristallinität, Größe und Form den Abbau des Materials. Die Abbauprodukte sind nicht toxisch und werden in Form von Kohlendioxid und Wasser eliminiert. Bei Verwendung von PLLA-Polymeren kommt es nur sehr selten zu nennenswerten Fremdkörperreaktionen (38). Ein weiterer Vorteil besteht in der Reproduzierbarkeit der Polymere durch standardisierte Herstellungsverfahren. Ebenfalls vorteilhaft sind die veränderbaren Eigenschaften der Polymere bezüglich ihrer chemischen Struktur, ihres molekularen Gewichtes, der Abbaurate und ihrer Hydrophobie beziehungsweise Hydrophilie, wodurch sich unterschiedliche mechanische Eigenschaften ergeben.

Nachteile der PLLA-Matrices bestehen vor allem in ihrer geringen Hydrophilie, wodurch die Zellen nur eine schwache Affinität zu den Polymeren aufweisen (39).

1.2.4.3. Oberflächenmodifikation

Durch eine Oberflächenmodifikation der synthetischen Polymere besteht die Möglichkeit die positiven Eigenschaften der natürlichen Matrices mit denen der synthetischen kombinieren zu können (23)(24). Eine Möglichkeit der Oberflächenmodifizierung besteht durch den Einsatz von Gelatine, Durch das Coating der Polymere mit Gelatine soll die Zelladhäsion, -Proliferation, -Differenzierung und folglich die Gewebeneubildung verstärkt werden (40).

Eine weitere Möglichkeit der Oberflächenmodifikation besteht durch das Anbringen von Wachstumsfaktoren an der Polymeroberfläche, wodurch ebenfalls die Adhäsion und Interaktion gefördert werden soll.

1.3.Probleme des Tissue Engineerings

Ein Problem des Tissue Engineerings besteht nach wie vor darin, dass das Transplantat keinen Anschluß an das Blutgefäßsystem hat. Auf Grund ihrer hohen metabolischen Aktivität stehen Hepatozyten in vivo direkt mit einem Sinusoid in Verbindung, wodurch die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und der Abtransport potentiell giftiger Metabolite gewährleistet ist.

Nach erfolgter Implantation der Matrices in das Empfängergewebe müssen die Zellen mit einem niedrigen Sauer- und Nährstoffangebot überleben, bis die Blutversorgung durch einwachsende Gefäße erfolgt und somit auch ein ausreichender Abtransport von Stoffwechselprodukten erfolgen kann.

	Vorteile	Nachteile
PLLA-Polymere	<ul style="list-style-type: none"> • dreidimensionale Anordnung der Zellen möglich • Zelladhäsion, Proliferation, Differenzierung, Überleben besser • Beschichtung möglich, wodurch Zellüberleben verbessert werden kann • Porengröße, -Form, -Anzahl und Interkonnektivität können bestimmt werden • Stofftransport, Sauerstoffaustausch verbessert • Mehr Zellen können kultiviert werden • Biokompatibilität, vollständiger Abbau in vivo • Reproduzierbarkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Langsames Einwachsen von Blutgefäßen • Hohe Porosität führt zu geringer mechanischer Stabilität • Aufwendige, kostspielige Herstellung • Hydrophobie dadurch nur geringe Zellaffinität

Tabelle 1 zeigt die Vor- und Nachteile der verwendeten PLLA- Polymere

1.4.Ziel dieser Arbeit

In-vitro-Zellkulturen aus Hepatozyten bergen ein enormes Potential in naher Zukunft relevante Alternativen für teure, sehr aufwendige und teilweise ethisch fragwürdige Medikamentenstudien darzustellen. Auch als Therapieoption bei der Behandlung bestimmter Lebererkrankungen können diese Zellkultursysteme unterstützend eingesetzt werden. Die Entwicklung dieser Systeme wird seit vielen Jahren von zahlreichen Forschergruppen vorangetrieben und spezifiziert.

Das Überleben der äußerst anspruchsvollen Hepatozyten in Kultur ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, die in ihrem Zusammenspiel möglichst identische in-vivo-Bedingungen ergeben sollten. Ein längerfristiges Überleben in zweidimensionalen Monolayerkulturen zeigte sich in Studien als nicht realisierbar. Erhalten Hepatozyten hingegen die Möglichkeit auch in vitro einen dreidimensionalen Zellverband auszubilden, kann die Differenzierung und leberspezifischen Aufgabenerfüllung für einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden.

Als Stützgerüst zur Ausbildung des dreidimensionalen Zellverbandes werden in unserer Studie synthetisch hergestellte PLLA-Matrices verwendet. Die Herstellung und der mikroskopische Aufbau variieren je nach Herstellungsverfahren. Wir wählten Matrices mit nano-fibröser Oberfläche, welche der in vivo Struktur der extrazellulären Matrix des Lebergewebes nachempfunden ist, sowie Matrices ohne diese spezielle Oberfläche. Des Weiteren führten wir bei einem Teil der Polymere eine Gelatine Beschichtung der Oberfläche durch.

Diese Arbeit soll zeigen, dass die Ergebnisqualität hinsichtlich Quantität und Vitalität der Hepatozyten in Kultur abhängig ist von der architektonischen Feinstruktur der PLLA-Matrices und gegebenenfalls eine Oberflächenbeschichtung mit Gelatine die Adhärenz und damit das Zellüberleben steigern kann.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Wir verwendeten für alle Versuche erwachsene, männliche Lewisratten mit einem Gewicht von 200 bis 300g. Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf nach den deutschen Richtlinien der Tierhaltungsgesetze gehalten; sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden einem 12 Stunden Tag/Nachtrhythmus ausgesetzt. Zur Narkose wurde das Narkotikum Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Kat.-Nr.: NDC-10019-773-60) benutzt.

2.2. Leberisolation

2.2.1. Verwendete Geräte

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

2.2.2. Die In-Situ-Leberperfusion

Zunächst wird das Schlauchsystem durch 30minütige Perfusion mit Aqua dest. gereinigt. Während diesem Vorgang wird die Flussgeschwindigkeit auf 30ml/min eingestellt und die Perfusionslösungen in das auf 40°C vorgewärmte Wasserbad gestellt.



Abb. 4 zeigt das zusammengebaute Perfusionssystem

2.2.2.1. Herstellung der Stammlösungen:

10 x Leffert´s Stammpuffer:

- 23,83g Hepes (Sigma, Steinheim/D, Kat.: H-0891),
- 2,24g KCl (Merck, Darmstadt/D, Kat.: 1.04936),
- 75,87g NaCl (J.T. Backer, Denventer/ Holland, Kat.: 0278),
- 1,38g NaH₂PO₄-H₂O (Merck, Darmstadt/ D, Kat.: 1.063646)
- 18,02g alpha-D-Glucose (Sigma, Steinheim/D, Kat.: G-7021)

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

EGTA Lösung:

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

CaCl₂ Lösung:

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

2.2.2.2. Herstellung der Perfusionslösungen :

Lösung 1: Präperfusionspuffer

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

Lösung 2: 1 x Leffert´s Puffer :

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

Lösung 3: Kollagenase-Lösung

50ml 10 x Leffert's Stammpuffer und 5 ml CaCl₂-Lösung werden mit Aqua dest. auf 500ml aufgefüllt und der pH Wert mit 1 N Salzsäure auf 7,4 eingestellt.

Anschließend werden 125mg Kollagenase (Collagenase Typ 2, 215U/mg, Worthington, Lakewood / NI, Kat.-Nr.: M9b2743, Lot: 4177) dazugegeben.

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

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

In Lösung 3 wird kurz vor OP-Beginn die abgewogene Menge Kollagenase gegeben (150mg) und gut verrührt, bis sie sich komplett aufgelöst hat.

Die Ratte wird mit Isofluran betäubt und nach Einstellung der nötigen Narkosetiefe gewogen und rasiert. Anschließend wird die Ratte entsprechend gelagert und das OP-Gebiet desinfiziert.

Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgt über eine V-förmige Hautinzision mit der Präparierschere. Zur besseren Darstellung der V. cava inferior und des Leberhilus werden die Darmschlingen vorsichtig aus dem Bauchraum luxiert. Mit einer spitzen, gebogenen Pinzette (Dumont forzep large radius, curved shanks, FST, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.: 11271-30) wird nun ein Zugang zwischen V. lienalis und V. mesenterica inferior sowie ein weiterer zwischen V. portae und A. hepatica geschaffen. Über diese Öffnungen wird ein 3-0 Seidenfaden (Resorba, Nürnberg/D, Kat.-Nr.: G2105) geführt um die V. pylorica zu ligieren. Als nächstes eröffnet man mit einer spitzen, gebogenen Pinzette die Bursa omentalis durch das Omentum minus. Jetzt wird eine Bulldogklemme (Teufel, Liptingen/D, Kat.-Nr.: FB 331) so platziert, dass ihre Branchen gleichzeitig die V. portae, die A. hepatica und den Gallengang ganz proximal am Leberhilus ausklemmen. Nachdem die V. portae durch die Stauung stark angeschwollen ist wird sie kaudal der V. lienalis mit dem 3-0 Seidenfaden

ligiert, um sie dann mit einer Mikroschere (spring scissor, Curved Pan, FST, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.:15061-08) in Höhe der V. pylorica zu inzidieren. Unter Fluss führt man nun die 17 G Venenverweilkanüle ein. Zur Fixation der Kanüle muss der Fluss kurz unterbrochen werden, bis die Bulldogklemme über der Kanüle wieder geschlossen ist. Jetzt eröffnet man die infrahepatische V. cava inferior um einen Abfluss für das Blut und die Perfusionslösungen zu schaffen. Die Leber wird zuerst vier Minuten mit Perfusionslösung 1, dann zwei Minuten mit Perfusionslösung 2 und am Schluss 10-13 Minuten mit der Kollagenaselösung perfundiert. Die Länge der Perfusion mit der Kollagenaselösung ist abhängig von der Lebergröße. Der optimale Zeitpunkt ist erreicht, wenn durch leichten Druck mit einem Wattestäbchen (Wattestäbchen, kleiner Kopf, Karl-BEESE, Barsbüttel/ D; Kat.-Nr.: 1260), auf die Leberkapsel sich diese blasenwerfend vom Parenchym löst (s. Abbildung 3b). Nach der Perfusion wird die Leber freipräpariert, und in 20ml Williams`Medium E (Gibco BRL, Paisley/ GB, Kat.-Nr.: 22551-022) in einem 50ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickison Labware, Le Pont de Claix/ France, Kat.-Nr.: 352070) auf Eis überführt.

2.3.Zellkultur

Unter der sterilen Werkbank (Heraeus Instruments Germany, Typ HS 12/2 1996) wird die so gewonnene Leber in eine 100 x 15mm Petrischale (Becton Dickison, New York/USA, Kat.-Nr.: 4-1029/3) mit Williams Medium E gegeben. Das weitere Vorgehen findet gekühlt auf Eis statt.

Es wird nun mit einer stumpfen, sterilen Pinzette (Graefe forcep, serrated, FST, Heidelberg/D, Kat.-Nr.: 11050-10) die Leberkapsel vorsichtig entfernt und durch leichtes schütteln die Hepatozyten aus dem Zellverband gelöst. Die Leberkapsel wird verworfen und die hergestellte Zellsuspension wird durch eine Nylonmembran mit 200µm großen Poren (Hydro-Bios, Kiel/ D, Kat.-Nr.: NY200 HC) filtriert. So werden unverdaute Leberanteile und Kapselreste separiert. Die erhaltene Zellsuspension wird nun zur weiteren Verarbeitung in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Zunächst werden nun die Zellzahl und die Vitalität bestimmt. Dafür werden 100µl der

Zellsuspension mit 800 μ l Williams Medium E (Gibco BRL, Paisley/ GB, Kat.-Nr.: 22551-022) verdünnt und mit 100 μ l 0,5%iger Trypan- Blau-Lösung (Merck, Darmstadt/D, Kat.-Nr.: 11732) in einem 1,5ml Eppendorf-Röhrchen (Save-Lock 1,5ml, Eppendorf- Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg/D, Kat.-Nr.: 0030120086) gemischt. Ein Tropfen dieses Gemisches wird nun in der Neugebauer-Zählkammer (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 631F1110) unter dem Mikroskop ausgezählt. Um nun fortfahren zu können muss die Gesamtzellzahl mindestens 10^6 und die Vitalität der Zellen mindestens 80% betragen. Werden diese Voraussetzungen erfüllt, wird nun die Zellsuspension bei 4°C und 50g für 5min zentrifugiert (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen/ D). Das erhaltene Zellpellet wird in Williams Medium E resuspendiert um die gewünschte Zellkonzentration zu erreichen.

2.4. Herstellung der verschiedenen Matrices

Alle verwendeten Polymere wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Ma, University of Michigan, Ann Arbor, und seinen Mitarbeitern hergestellt.

2.4.1. Herstellung der PLLA-Matrices mit nano-fibröser Struktur (genannt Nano)

12, 5% (wt/v) PLLA-Lösung

1:1 Dioxan und Pyridin Gemisch

Paraffin-Spheres (durch eine Dispersionsmethode hergestellt), Durchmesser 250-420 μ m

Die Bestandteile werden in eine zylindrische Teflonform mit einem Durchmesser von 18mm gegeben. In dieser werden sie bei 37°C für 45min erwärmt und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Durch das Erwärmen verbinden sich die Paraffin-Spheres und die gewünschten Zwischenporenverbindungen entstehen.

Zwischenporenverbindungen sind definiert als der durchschnittliche Durchmesser der Löcher, die zwei benachbarte Makroporen verbinden. Die vorbereitete Polymerlösung (0,32ml) wird tropfenweise auf die Paraffin-Verbindung gegeben.

Anschließend erfolgt ein Trocknungsprozess unter Vaccumbedingungen bei 250 mmHg und 37°C um eingeschlossene Luft zu entfernen. Die Polymerlösung wird über Nacht bei -70°C phasen-separiert. Anschließend wurden die Teflonformen, die das Polymer/Paraffin Gemisch enthalten, in kaltem Hexan (-18°C) für 2 Tage gelagert um die Flüssigkeit zu entziehen. Nach diesem Schritt wird das entstandene Produkt aus den Teflonformen entfernt und auf die richtige Form und Größe zu recht geschnitten (Höhe 1mm, Durchmesser 7,2mm). Anschließend werden die Proben bei Raumtemperatur in Hexan (Lösungsmittel für Paraffin, nicht aber für das Polymer) gegeben um auch die letzte Flüssigkeit zu entziehen und das Paraffin heraus zu waschen. Im Hexan verbleiben die Proben für zwei Tage, wobei das Hexan 3mal täglich gewechselt wird. Nach 2 Tagen wird das Hexan durch Cyclohexan ersetzt. Anschließend werden die Matrices bei -70°C für mindestens 6 Std. tief gefroren. Durch einen Druck < 30 mmHg und eine Temperatur von -70°C für 7 Tage und bei -5 bis -10°C für 2 Tage wird die Lipophilie der Matrices erreicht. Anschließend erfolgt eine Trocknung unter denselben Bedingungen für zwei Tage. Durch das Polymer/Paraffin-Verhältnis kann die Anzahl und Art der Poren bestimmt werden, wobei die Porengröße durch die gewählte Paraffin-Spheres-Größe bestimmt wird. Durch diese Methode wird eine Porosität von 95% erzielt. Wie viel Substanz zwischen den Poren zu finden ist, ist abhängig von der Art der Wärmebehandlung. Durch längere Wärmeeinwirkung entstehen mehr Verbindungen zwischen den Poren, es ist also weniger Zwischenporensbstanz vorhanden.

2.4.2. Herstellung der PLLA-Matrices mit nicht-fibröser Wandstruktur (genannt Solid)

12,5 %(wt/v) Lösung von PLLA in Dioxan.

Weiteres Vorgehen wie oben beschrieben. Die Polymer/Paraffin-Verbindung wird unter schwachem Vacuum (ca. 340 mmHg) über Nacht, anschließend in hohem Vacuum (<30mmHg) für 4 Tage getrocknet. Die weiteren Herstellungsschritte stimmen mit denen zur Herstellung der nano-fibrösen Polymere überein.

2.4.3. Herstellung der Polymere mittels Salt-Leaching Methode (nicht-fibröse Wandstruktur, genannt Salt)

Das PLLA wird in Lösung gebracht und Salzkristallen der gewünschten Größe (250-400µm) werden hinzugefügt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt. In einem weiteren Schritt werden die Salzpartikel mit Wasser heraus gewaschen.

2.4.4. Coated Polymere

Ein Nachteil der synthetischen Polymere ist ihr Mangel an funktionellen Gruppen, wodurch das Anbinden von Signalmolekülen, sowie die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung erschwert wird. Ein Ansatz dieses Problem zu lösen bestand darin, funktionelle Gruppen in das Polymer einzubauen. Hierdurch zeigten sich jedoch diverse unerwünschte Effekte und man ging zum Coating über, wodurch sich weniger Probleme ergaben.

Zum Coating wurde in dieser Versuchreihe Gelatine verwendet. Gelatine wird in einem Dioxan/Wasser-Gemisch bei 50°C gelöst. Die vorbereiteten Polymere werden in dieser Mischung untergetaucht, anschließend schnell herausgenommen und in 200ml Eis/Wasser-Gemisch für 10min abgekühlt. Daraufhin werden sie für 12 Stunden unter 40°C warmen Wasser abgespült, wobei das Wasser alle 3 Stunden gewechselt wird. Dieser Schritt erfolgt um nicht an die Oberfläche gebundene Gelatine zu entfernen. Nach diesen Schritten werden die Polymere für 24 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend für 24 Stunden bei Vakuum getrocknet.

2.5.Polymerbesiedelung

Unter sterilen Bedingungen (Werkbank Heraeus Instruments Germany, Typ HS 12/2 1996) werden nun die unterschiedlichen Polymere mit der Hepatozytensuspension besiedelt. Um eine gleichmäßige und optimale Verteilung der Hepatozyten zu erreichen werden zweimal 100µl auf unterschiedliche Stellen des Polymers pipetiert.

2.6.Verwendete Medien

2.6.1.Hormonstimuliertes Medium Williams' Medium E

500ml Williams` Medium E (Gibco, Scotland/ UK, Kat.-Nr.:22551-022)

5,5ml N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin (Biochrom K6, Berlin/ D, Kat.-Nr.: K0202)

11ml HEPES-Puffer (Biochrom K6, Berlin/ D, Kat.-Nr.: L1613)

5,5m Natriumpyruvat (1 mM, Gibco, Scotland/ UK, Kat.-Nr.: 11360-039)

100µl Insulin (4µg/ ml, aus Rinderpankreas, Sigma, Steinheim/ D,
Kat.-Nr.:I-5500)

50µl Dexamethason (5nM, Serva, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.: 18660)

100µl EGF (10ng/ ml, human, Invitrogen, Paisley/ GB, Kat.-Nr.: 1127679)

5,5ml Pen Strep (Penicillin + Streptomycin, Biochrom, Berlin/ D,
Kat.-Nr.: A2213)

2.6.2. Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM + FCS

20mmol/l	HEPES-Puffer (Biochrom K6, Berlin/ D, Kat.-Nr.: L1613)
30mg/l	L-Proline (Merck, Kat.-Nr.: 1074340100)
0,5mg/l	Insulin (Rinderpankreas, Sigma, Steinheim/D, Kat.-Nr.: 5500)
10% FCS	(fetale calv serum) (Merck, Kat.-Nr.: 341506-1GM)
10^{-7} mol/l	Dexamethason (Serva, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.: 18660)
10mmol/l	Nicotinamid (Merck, Kat.-Nr.: 481907)
1mmol/l	Ascorbinsäure
10 μ g/l	EGF (10 ng/ ml, human, Invitrogen, Paisley/ GB, Kat.-Nr.: 1127679)
1ml	Pen Strep (Penicillin + Streptomycin, Biochrom, Berlin/ D, Kat.-Nr.: A2213) pro 100ml Medium

2.7. Versuchsplanung

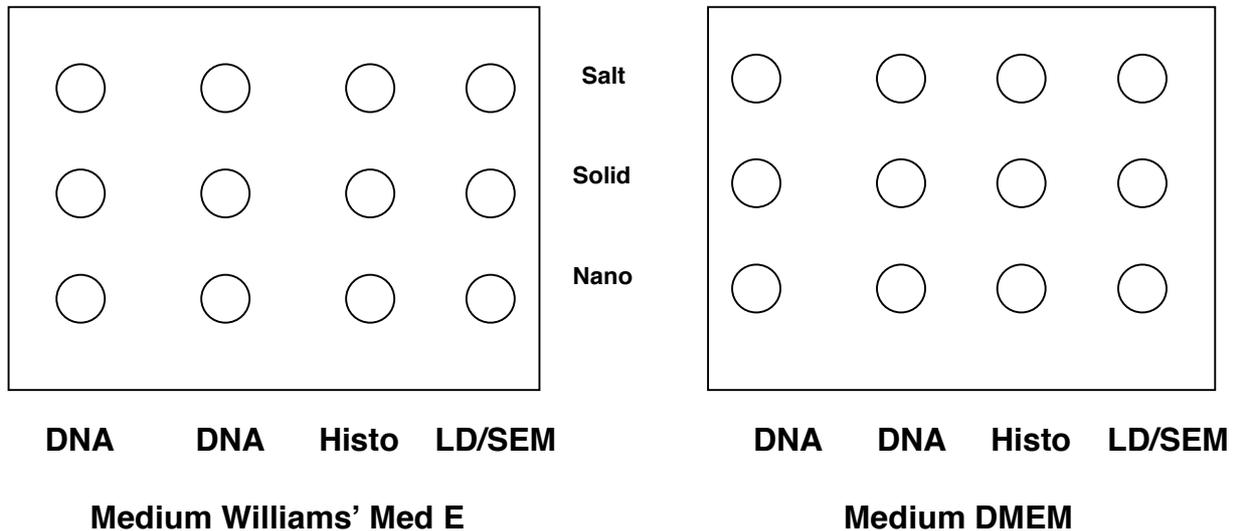


Abb.5 zeigt die graphische Darstellung des Versuchsaufbaus

Die Seeding-Trays bestehen aus 12 Wells. In jeweils einer horizontalen Reihe sind die verschiedenen Polymere angeordnet. In den vertikalen Spalten sind jeweils 2 Polymere für die DNA Bestimmung, ein Polymer für histologische Untersuchungen und jeweils eine Polymerhälfte für die Live/Dead-Färbung und die Rasterelektronenmikroskopie bestimmt. Die hier verwendeten Seeding-Trays wurden ebenfalls freundlicherweise von Prof. Ma et al hergestellt. Es handelt sich hierbei um eine spezielle Oberflächenbeschichtung, welche eine Adhäsion der Zellen an der Kunststoffoberfläche vermindern soll.

Die Analysen werden nach 12 Stunden, 72 Stunden und 120 Stunden der Polymere in Kultur durchgeführt. Während dieser Zeit werden die Trays in einem Brutschrank (Typ B5060 EC/CO₂, Heraeus, Hanau/D) bei 37°C und einer Co₂-Spannung von 5% auf einem Schüttelbrett (Certomat[®] SII, Sartorius Stedium Biotech S.A., Aubague Cedex/France) kultiviert.

Wir verwenden für unsere Untersuchungen mit Gelatine gecoatete und nicht-gecoatete Polymere, sowie zwei verschiedene Medien. Einmal täglich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt liegen 4 Platten vor, insgesamt besteht die Versuchsanordnung aus 12 Platten.

Zu den entsprechenden Zeitpunkten werden die Polymere vorsichtig aus den Seeding-Trays heraus gehoben. Polymere, welche für die Live/Dead-Färbung und die Elektronenmikroskopie bestimmt sind, werden halbiert, die anderen unverändert in Nunc™ CryoTube™ Vials (Apogent Denmark Cat.Nr. 2010 03) bei -80 °C eingefroren. Die Überstände werden gepoolt und in Original Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf AG Hamburg, Order no. 0030120.094) ebenfalls bei -80°C eingefroren.

2.8.Immunhistochemie

Polymere, die für immunhistochemische Untersuchung bestimmt sind, werden in einem Peel-away mit Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude/ NE, Kat.-Nr.:4583) eingebettet. Durch Eintauchen der Peelaways in -80°C kaltes Isopentan gefriert das Tissue Tec sehr schnell und die Proben bleiben unversehrt.

Nach der Einbettung werden die Polymere bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Mit Hilfe des Mikrotoms (Typ 335 E, Mikrom, Walldorf/ D, Kat.-Nr.: 502; Mikrotomklingen Feather, Typ N35H, Japan) werden 10µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (Menzel-Gläser, Superfrost® Plus Gold, Art.No.5800AMNZ) gezogen.

Die Färbungen führten wir nach der ABC-Methode (Vectstain® ABC Kit, Elite PK, Vectot Laboratories, Burlingame/USA) durch.

Hierbei wird die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert, in dem das endogene Biotin durch ein Biotin-Blocking-System blockiert wird.

2.8.1.ABC-Methode

Zunächst werden die Schnitte für mindestens 1 Stunde an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgt eine 5minütige Fixierung in -20°C kaltem Acteon (Biesterfeld, Hamburg/ D Kat.-Nr.: 67-64-1), gefolgt von zwei Waschvorgängen von jeweils 5min in TBS-Puffer (TRIS-Puffer: TRIS 60g, NaCl 85g, HCl 2N 200ml wird mit Aqua dest.auf 1l aufgefüllt).

Hierauf folgen der Peroxidase-Block (20ml 30% Wasserstoffperoxid Merck KGaA Germany, Cat. 1.08597.1000 und 180ml Methanol J:T. Baker, Cat. 0711711002) für 5min und wieder zwei Waschvorgänge für jeweils 5 min in TBS.

Nach diesen Schritten werden die Objektträger um die Schnitte herum vorsichtig mit einem Papiertuch (KIMTECH Science Kimberly-Clark® Professional Art. Nr. AA64.1) abgetrocknet. Ist dieser Schritt erfolgt, wird Avidin auf alle Schnitte gegeben, welches nach 5min abgeklopft und durch Biotin ersetzt wird. Biotin verbleibt für 10 min, bevor es ebenfalls durch leichtes Klopfen entfernt wird.

Die Objektträger werden anschließend wieder zweimal für 5min in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird das Horse-Blocking-Serum aufgetragen, das für 20-30min inkubieren muss. Nach dieser Zeit wird es ebenfalls abgeklopft. Nun wird der Primärantikörper in seiner gewünschten Verdünnung appliziert und für mindestens 45 min belassen. Es folgt wieder ein Waschvorgang von zweimal 5min bevor der Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-Mouse IgG, Rat adsorbed, Vector Laboratories Inc. Kat.Nr. BA 2001) aufgetragen werden kann. Dieser verbleibt für 30min, bevor anschließend wieder ein Waschvorgang erfolgt.

Anschließend muss für weitere 30min der ABC-Komplex einwirken, dessen Überstände durch einen zweimaligen Waschvorgang in TBS-Puffer entfernt werden.

Anschließend wird das gewünschte Substrat unter Sichtkontrolle wirken gelassen. Um die Substratreaktion zu stoppen, werden nun alle Objektträger in Aqua dest. gegeben.

Die Kernfärbung erfolgt mit Hämalaun für 3min und Bläuung unter fließendem Wasser für 10 min. Anschließend werden die Schnitte mit Aquatex (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 1.08562) und Deckgläschen (24*46 mm, Marienfeld/ D, Kat.-Nr.: 8500) abgedeckt.

Antikörper	Verdünnung	Clone	Hersteller	Cat.Nr
CK 18	1:100	RGE 53	Progen Biotechnik GmbH Heidelberg	10500
CK19	1:300	K4.62	Sigma	C-7159
Vim	1:20	N1521USA	Dako Corporation	
SMA	1:50	ASM-1	Progen Biotechnik GmbH Heidelberg	65001
RECA	1:10	bD-17	Santa Cruz, Biotechnology, Inc.	sc-30882

Tabelle 2 Übersicht der zur Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper

2.9.Live/Death-Färbung

Nach Herstellerangaben (Moleculare Probes)

Prinzip der Färbung:

Calcein wird in lebenden Zellen von Zellmembran-Enzym-Esterasen umgesetzt und erzeugt bei vorhandener Vitalität der Zellen eine grün fluoreszierende Färbung. Ethidium-homodimer-1 dagegen bindet an die DNA toter Zellen, deren Kerne folglich rot erscheinen.

Zunächst wird das Medium von den Proben abpipetiert. Anschließend erfolgt ein Waschvorgang für zwei mal 5 Minuten in PBS (Sigma, Steinheim/ USA, Kat.-Nr.: P-3813). Es folgt die Inkubation für 30 Minuten in $2\mu\text{M}$ Ethidium-homodimer-1 und $2\mu\text{M}$ Calcein. Gefolgt werden diese Schritte von zwei Waschvorgängen für je 5 Minuten in PBS. Nach diesen Schritten werden die Polymere in Tissue Tec eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es werden Präparate mit einer Schichtdicke von 10-50 μm angefertigt.

Die Analyse erfolgt unter dem konfokalem Lasermikroskop (LSM 70, Fa. Zeiss, Jena/D) mit folgenden Einstellungen:

	RED		GREEN	
Kr	568 nm	66,8%	488 nm	49,1%
Iris	1,8		2,1	
Gain	27,3		33,6	
Offset	-16,4		-1,8	

Tabelle 3 Einstellungen des konfokalen Lasermikroskops

2.10. Rasterelektronenmikroskopie (Scanning electron microscopy SEM)

- Proben in 0,1M Cacodylate Puffer, pH 7,4 (Agar Scientific, Kat.-Nr.: R1103) waschen

Cacodylate Puffer 0,2 M:

Sodium Cacodylate (4,28g)
Destilliertes Wasser
0,2N HCl 5,6 ml (Merck/D,
Kat.-Nr.: 1.00317.1000)
(oder bis pH 7,4 erreicht wird)

Cacodylate Puffer 0,1 M:

0,2 M Cacodylate Puffer 50 ml
Destilliertes Wasser 50 ml
Saccharose 3g (Merck/D, Kat.-Nr.: 107651)
pH 7,2-7,4

- Die Fixation erfolgt über Nacht in 2,5 % Glutaraldehyd (Merck/D, Kat.-Nr.: 354400) in
 - 0,1M Cacodylate Puffer
 - 25% Glutaraldehyd 5ml
 - 0,2M Cacodylate Puffer Stock-Lösung 25ml
 - Destilliertes Wasser 10 ml
 - Calciumchlorid 12,5 mg (Merck/D, Kat.-Nr.: 1.04936.0500)
 - 10% Paraformaldehyd 10ml (Merck/D, Kat.-Nr.: 104004)
 - pH 7,4
- Waschen in 0,1M Cacodylate Puffer
- Eine Stunde in 1% Osmiumtetraoxid (Merck/D, Kat.-Nr.: 1245050001) in 0,1M Cacodylate Puffer
- Waschen mit destilliertem Wasser
- Dehydration:
 - 50% Ethanol 30min
 - 70% Ethanol 30min
 - 90% Ethanol 30min
 - 95% Ethanol 30min

100% Ethanol 30min

100% Ethanol 30min (Walter CMP, UN 1170)

- Trocknen der Schnitte mit Hexamethyldisilazan (Merck/D, Kat.-Nr.: 804324)
- Coating mit Gold-Sputter (Desk-II, Denton Vacuum inc., Moorstown, NJ)
- Analyse der Proben

3. Ergebnisse

3.1. Durchlichtmikroskopie

Die Durchlichtmikroskopie erfolgt mit dem Primo Star Durchlichtmikroskop der Fa. Zeiss, Jena/D nach 12, 72 und 120 Stunden in Kultur.

Zum Zeitpunkt 12 Stunden zeigen sich auf den Salt und Solid Polymeren deutlich mehr Zellen als auf den nano-fibrösen Matrices. Die Poren der Salt und Solid Polymere sind gut gefüllt mit Hepatozyten, während die nano-fibrösen Polymere nur eine geringe Besiedelungsdichte aufweisen.

Nach 72 Stunden in Kultur zeigen sich auf den Salt und Solid Polymere wie schon nach 12 Stunden deutlich mehr Zellen als die Nano Polymere. Die Zellen haben sich in den Poren der Salt Polymere angesammelt und zu großen Aggregaten zusammen gelagert; die nicht-fibrösen Polymere weisen eine etwas homogenere Zellverteilung auf ihrer Oberfläche auf.

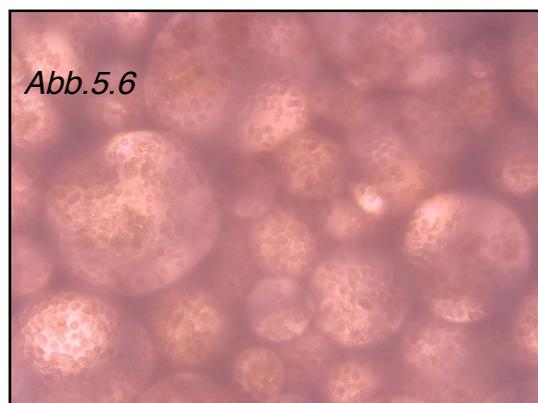
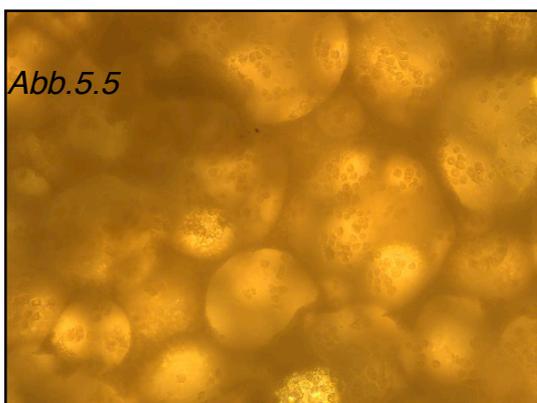
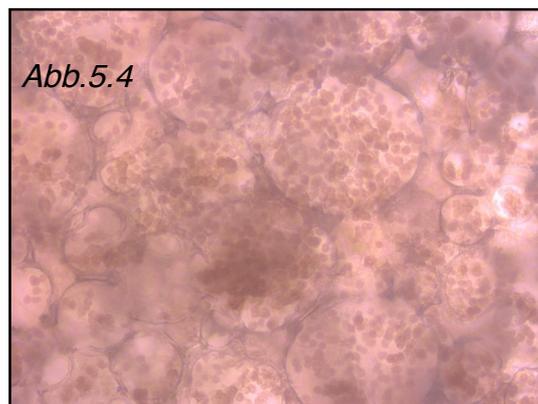
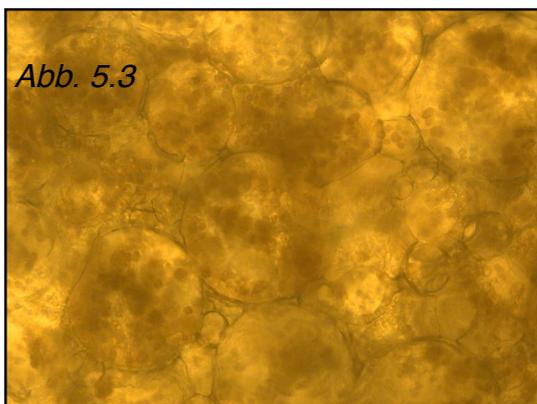
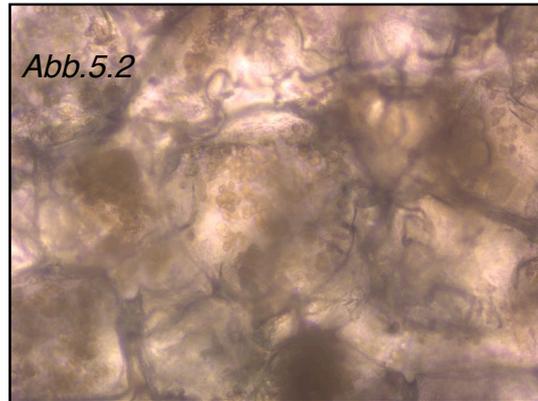
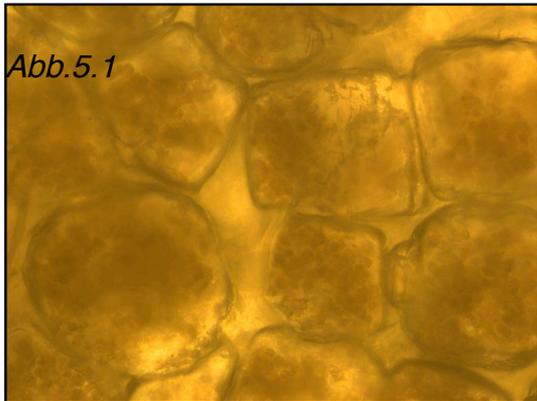
Zum letzten Analysezeitpunkt der nicht-gecoateten Polymere nach 120 Stunden lassen sich auf den Salt Polymeren die meisten Zellen erkennen.

Der Großteil der Hepatozyten auf den Solid Polymere haben sich nach 120 Stunden zu gut erkennbaren Zellverbänden zusammengelagert, deutlich weniger Zellen liegen einzeln vor.

Die Zellzahl auf den Nano Polymere hat im Vergleich zur Voruntersuchung nach 72 Stunden weiter abgenommen und ist weiterhin deutlich geringer als die Zellzahl auf den Salt und Solid Polymere. Es lassen sich kaum Zellverbände erkennen, die Zellen befinden sich zumeist einzeln in den Poren der Polymere.

Die durchlichtmikroskopische Betrachtung der mit Gelatine gecoateten Polymere nach 12, 72 und 120 Stunden zeigt eine zu allen Zeitpunkten höhere Zellzahl im Vergleich zu den nicht-gecoateten Polymeren. Auch die Nano Polymere, welche im nicht-gecoateten Zustand bereits 12 Stunden nach Besiedelung nur noch eine geringe Zellzahl aufweisen, sind im gecoateten Zustand deutlich dichter mit Zellen bedeckt.

Die höchste Zellzahl unter den gecoateten Polymeren weisen zu allen drei Zeitpunkten die Solid Polymere auf. Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Medien konnten mit der Durchlichtmikroskopie nicht festgestellt werden.



*Abb.5.1 bis 5.6 zeigen durchlichtmikroskopische Aufnahmen gecoateter und nicht-gecoateter Salt, Solid und Nano Polymere nach 72 Stunden in Kultur in DMEM oder Williams' Medium E. **Abb.5.1** Salt Polymer in Williams' Med E, zeigt eine hohe Zellzahl, die Poren sind mit Hepatozyten nahezu vollständig ausgefüllt. **Abb.5.2** (Salt Polymer 72 Stunden, gecoatet, DMEM) zeigt eine geringfügig höhere Zellzahl, wobei die Zellen im Vergleich zu der nicht-gecoateten Version homogener verteilt sind. Sie befinden sich in den Poren und an der Polymersubstanz. Eine höhere Besiedlungsdichte als das Salt Polymer zeigt das Solid Polymer (72 Stunden, Williams' Med E) in **Abb.5.3** Die Oberfläche des Polymers ist flächig mit Hepatozyten bedeckt. Das in **Abb. 5.4** gezeigte gecoatete Solid Polymer weist eine gering gradig höhere Besiedlungsdichte auf. **Abb. 5** zeigt das nano-fibröse Polymer (72 Stunden, William's Med E) mit einer geringen Zellzahl im Vergleich zu den anderen Polymeren. Die Zellen befinden sich im Bereich der Poren und der Bogengänge. Die gecoatete Version des nano-fibrösen Polymers (72 Stunden, DMEM) in **Abb5.6**.imponiert mit einer deutlich höheren Zellzahl. Die Poren sind fast vollständig mit Hepatozyten gefüllt.*

3.2.Live/Dead-Färbung

3.2.1. Live/Dead-Färbung der Nano Polymere

Die Abbildungen 6.1-6.6 zeigen den charakteristischen Aufbau der Nano Polymere, geprägt durch Hemisphären, welche durch runde, sich in ihren Durchmessern unterscheidende Poren in Verbindung stehen. Der durch das Herstellungsverfahren bedingt hohe Anteil an Polymersubstanz kommt zur Darstellung.

Die Aufnahmen nach 12 Stunden zeigen Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl und Vitalität der Zellen auf den gecoateten und nicht-gecoateten Polymeren. Die Zellzahl auf den gecoateten Polymeren überwiegt im Vergleich zu den nicht-gecoateten.

Der Großteil der nur spärlich vorhandenen Zellen auf den nicht-gecoateten Polymeren ist gelb gefärbt, was für ein Absterben der Zelle steht. Deutliche Unterschiede lassen sich hinsichtlich der Zellverteilung zwischen den beiden Polymerarten erkennen. Sind die Zellen auf den nicht-gecoateten Polymeren mehrheitlich einzeln verteilt ohne in Kontakt mit anderen Zellen zu stehen, bilden sich auf den gecoateten Matrices dagegen Zellverbände. Der überwiegende Anteil der Zellen dieser Zellverbände stellt sich grün dar, nur Zellen im Inneren dieser Verbände sind bereits abgestorben.

Weitere Unterschiede zeigen sich hinsichtlich der Zelllokalisierung. Wie Abbildung 6.1 zeigt befinden sich die meisten Zellen im Bereich der Interporenregion und weniger im Bereich der Hemisphären, bzw. der Verbindungsporen. Abbildung 6.2 hingegen zeigt die meisten Zellen im Bereich der Hemisphären; hier sind auch die meisten Zellverbände zu finden sind. Alleinfalls einige Einzellzellen sind im Bereich der Interporenregion lokalisiert.

Ein deutlicher Unterschied im Bezug auf die Zellquantität wird auf Abb.6.3-6.4 deutlich. Während das gecoatete Polymer in seinen Hemisphären und Poren nahezu vollständig mit Zellen bedeckt ist, finden sich auf dem nicht-gecoateten Polymer verschwindend wenige Zellen, in etwa übereinstimmend mit der Zellzahl zum Zeitpunkt nach 12 Stunden. Auf Grund der Live/Dead-Färbung ist davon auszugehen, dass nahezu alle Zellen tot sind.

Ebenfalls sehr deutlich lässt sich auf Abb.6.4 die Zellverteilung beurteilen. Auch hier erscheinen die Zellen in Kontakt zu stehen, es bilden sich Zellverbände aus, die erneut überwiegend in den Bogengängen zu finden sind. Im Vergleich zur Aufnahme nach 12 Stunden hat die Anzahl toter Zellen gering zugenommen, der Großteil der abgestorbenen Zellen befindet sich auch hier im Zentrum der Zellverbände. Die Aufnahme der nicht-gecoateten Polymere nach 120 Stunden zeigt deutlich mehr Zellen, als die vorherigen Aufnahmen, wobei neben der Quantität auch eine deutliche Steigerung der Qualität, d.h. mehr lebende Zellen, erkennbar ist. Zwischen Abb.6.6 und 6.4 zeigen sich nur sehr geringe Unterschiede. Auch nach 120 Stunden sind die gecoateten Nano Polymere noch dicht mit Zellen besiedelt, wobei der Anteil der toten Zellen an der Gesamtanzahl der Zellen nur sehr gering ist. Die auf vorherigen Aufnahmen beschriebenen Zellnester mit toten Zellen im Zentrum kommen auch hier zur Darstellung.

Nano Polymere

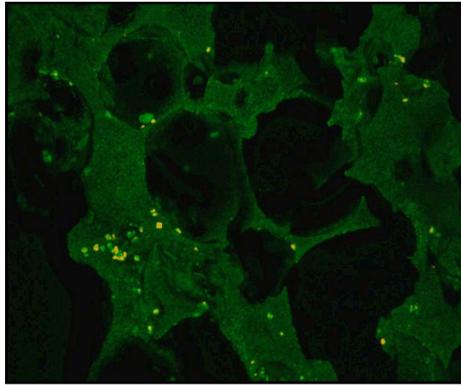


Abb. 6.1

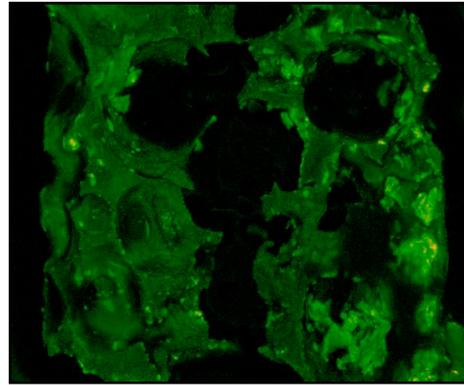


Abb. 6. 2

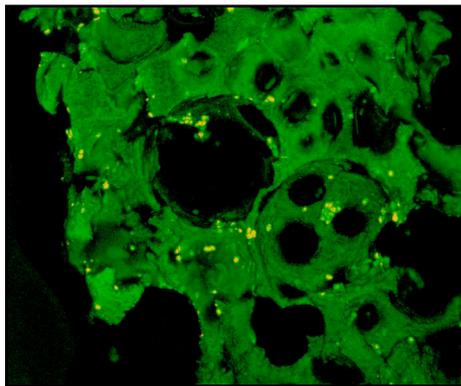


Abb.6.3

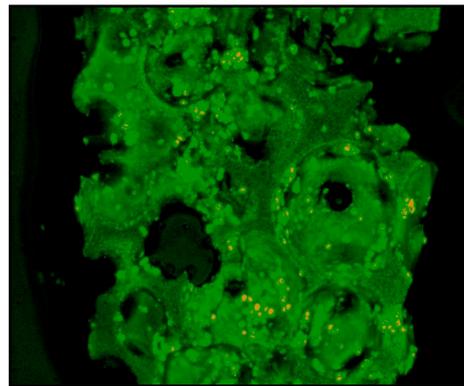


Abb. 6.4

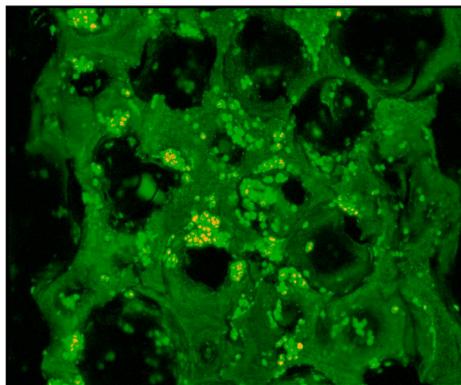


Abb.6.5

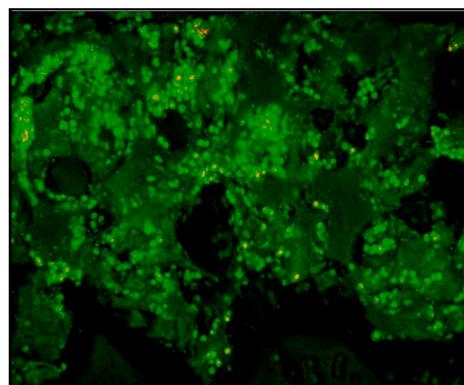


Abb.6.6

Abb. 6.1-6.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gecoateten und nicht-gecoateten Nano Polymere nach Live/Dead-Färbung zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden.

Auf den Abbildungen lässt sich die charakteristische Struktur der nano-fibrösen Polymere erkennen, welcher durch sphärischen Poren und deren Verbindungsöffnungen gekennzeichnet ist.

Abb. 6.1 zeigt einen nicht-gecoateten nano-fibrösen Polymer, **Abb. 6.2** den entsprechenden mit Gelatine gecoateten Polymer zum Zeitpunkt 12 Stunden. Die Anzahl der Zellen auf der gecoateten Matrix überwiegt deutlich im Vergleich mit der nicht-gecoateten Version. Auf **Abb. 6.2** zeigen sich im Bereich der Bogengänge Zellverbände. Nach 72 Stunden (**Abb. 6.3** und **6.4**) finden sich auf dem gecoateten Polymer deutlich mehr Zellen bei nur geringem Anteil toter Zellen. Der Anteil toter und lebender Zellen ist auf dem nicht-gecoateten Polymer beinahe gleich (87 lebend, 73 tot). Diese Beobachtung wird durch die **Abbildungen 6.5** und **6.6** gestützt, welche die Polymere nach 120 Stunden in Kultur zeigen. Auch hier befindet sich auf dem gecoateten Polymer eine deutlich höhere Zellzahl mit nur einem geringen Prozentsatz toter Zellen. Die toten Zellen befinden sich meist im Innern der Zellverbände.

3.2.2.Live/Dead-Färbung der Salt Polymere

Die Abbildungen zeigen den typischen Aufbau der Salt Polymere, welcher durch regelmäßige viereckige Poren bei vergleichsweise geringem Anteil an Polymersubstanz gekennzeichnet ist.

Zum Zeitpunkt 12 Stunden befindet sich auf dem nicht-gecoateten Polymer eine hohe Anzahl von Hepatozyten, wobei der überwiegende Anteil nicht vital erscheint. Die Abbildung des gecoateten Polymers weist im Vergleich hierzu eine geringere Zellzahl auf, allerdings mit nur sehr geringem Anteil toter Zellen. Zum Zeitpunkt 72 Stunden zeigt sich eine in etwa gleich hohe Zellzahl auf den gecoateten und nicht-gecoateten Polymeren, wobei der Anteil toter Zellen auf den nicht-gecoateten Polymeren deutlich überwiegt. Auf dem gecoateten Polymer zeigen sich neben einzeln verteilten Zellen auch einige relativ große Zellverbände, in deren Zentren sich tote Zellen befinden. Außerhalb der Zellverbände finden sich dagegen nur sehr wenig tote Zellen. Zellverbände lassen sich auch auf den Abbildung des nicht-gecoateten Polymers erkennen, die toten Zellen beschränken sich hier jedoch nicht auf das Zentrum.

Der Vergleich der Polymere nach 120 Stunden zeigt auf dem nicht-gecoateten Polymer fast keine vitalen Zellen mehr, bei immer noch relativ hoher absoluter Zellzahl, während auf der gecoateten Version der Anteil an lebenden Zellen überwiegt.

Nur vereinzelt finden sich tote Zellen, eine größere Anzahl davon im Zentrum eines Zellverbandes.

Salt Polymere

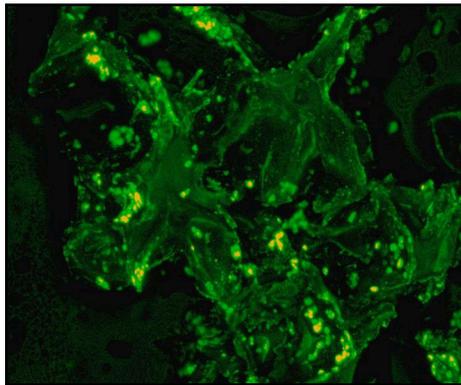


Abb. 7.1

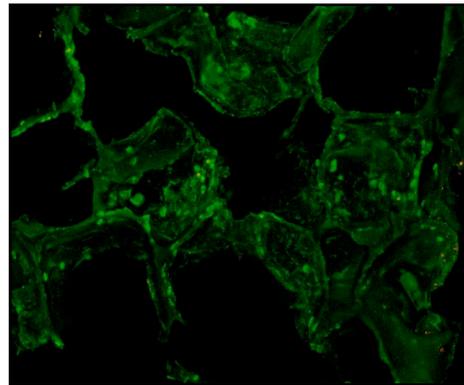


Abb. 7.2

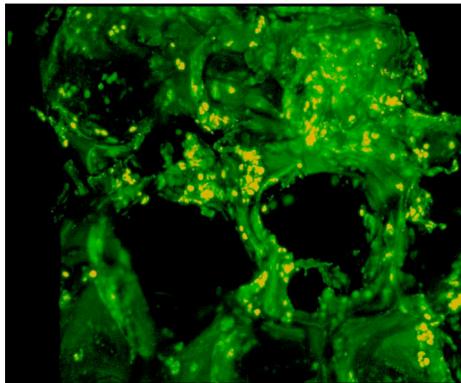


Abb. 7.3

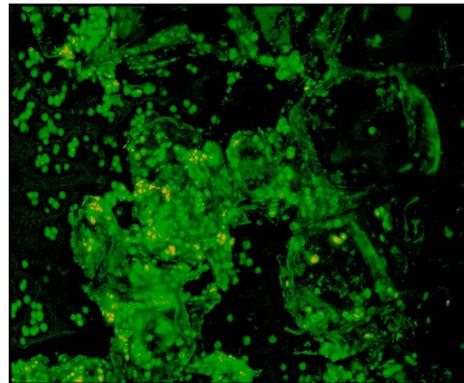


Abb. 7.4

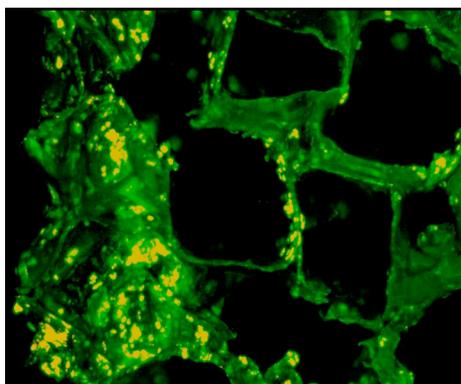


Abb. 7.5

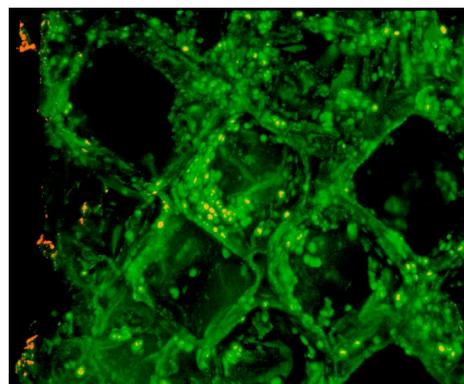


Abb. 7.

Abbildung 7.1-7.6 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von gecoateten und nicht-gecoateten Salt Polymere nach Live/Dead-Färbung zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden. Der für die Herstellungsmethode typische Aufbau der Polymere wird auf den Abbildungen deutlich. Es zeigen sich regelmäßige viereckige Poren, die untereinander nicht in Verbindung stehen. Der Anteil an Polymersubstanz zwischen den Poren ist gering. Zum Zeitpunkt 12 Stunden befinden sich auf der nicht-gecoateten Variante des Salt Polymers (Abb 7.1) mehr Zellen als auf der gecoateten (Abb 7.2). Der Anteil an toten und lebenden Zellen ist in Abb. 7.1 ungefähr gleich, in Abb. 7.2 hingegen überwiegen die lebenden Zellen. Abb. 7.3 und 7.4 nach 72 Stunden zeigen eine höhere Zellzahl, als die Aufnahmen nach 12 Stunden. Die Zahl lebender und toter Zellen ist auf dem nicht-gecoateten Salt Polymer (Abb 7.3) in etwa gleich, auf dem gecoateten Polymer (Abb 7.4) finden sich hingegen deutlich mehr lebende Zellen. Ähnliches ist für den Zeitpunkt 120 Stunden zutreffend, wobei die toten Zellen auf dem nicht-gecoateten Salt Polymer eindeutig den größten Anteil ausmachen (Abb. 7.5). Das gecoatete Polymer in Abb 7.6 weist circa viermal mehr lebende als tote Zellen auf. In dieser Darstellung lässt sich gut die bevorzugte Lokalisation der Zellen in den Ecken und am Boden der Poren erkennen. Im Inneren dieser Zellansammlungen finden sich vor allem tote Zellen.

3.2.3.Live/Dead-Färbung der Solid Polymere

Der Aufbau und die Porenstruktur der Solid Polymere lassen sich auf Grund der flächigen Bedeckung mit Zellen zu allen Zeitpunkten weniger gut beurteilen, als bei den Nano und Salt Polymeren.

Zum Zeitpunkt 12 Stunden befinden sich annähernd gleich viele lebende Zellen auf den gecoateten und nicht-gecoateten Polymeren, eine höhere Anzahl toter Zellen findet sich auf der nicht-gecoateten Matrix. Während die toten Zellen auf dem nicht-gecoateten Polymer gleichmäßig verteilt sind, finden sie sich auf dem gecoateten Polymer vor allem im Inneren von Zellverbänden. Diese haben sich entlang der Bogengänge und Polymersubstanz auf beiden Polymerarten gebildet.

Das gecoatete Polymer zum Zeitpunkt 72 Stunden fällt durch eine hohe Anzahl an Zellen auf, welche Zellkontakte ausgebildet und sich flächig auf der Polymeroberfläche verteilt haben. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um lebende Zellen, nur vereinzelt finden sich tote Zellen, die bevorzugt im Inneren der Zellverbände zu finden sind. Die Polymerstruktur lässt sich kaum mehr nachvollziehen, da die Poren fast vollständig mit Zellen ausgefüllt sind.

Nach 120 Stunden in Kultur hat der Anteil an toten Zellen auf dem nicht-gecoateten Polymer weiter zugenommen, während er auf dem gecoateten Polymer etwa gleich

geblieben ist. Die absolute Zellzahl der beiden Polymervarianten hat sich im Vergleich zum Zeitpunkt 72 Stunden fast nicht verändert.

Im Vergleich mit den Nano und Salt Polymeren finden sich auf den Solid Polymeren sowohl auf der gecoateten wie auch auf der nicht-gecoateten Variante deutlich mehr Zellen. Auf den gecoateten und nicht-gecoateten Solid Polymeren überwiegen zu allen Zeitpunkten lebende Zellen. Tote Zellen finden sich auf den gecoateten Polymeren vor allem im Inneren der Zellverbände. Neben den Poren sind diese Zellverbände auch entlang der Polymersubstanz angesiedelt.

Solid Polymere

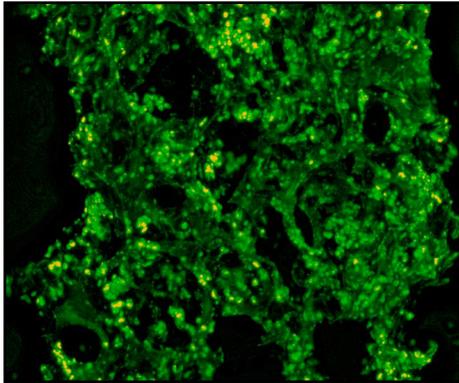


Abb.8.1

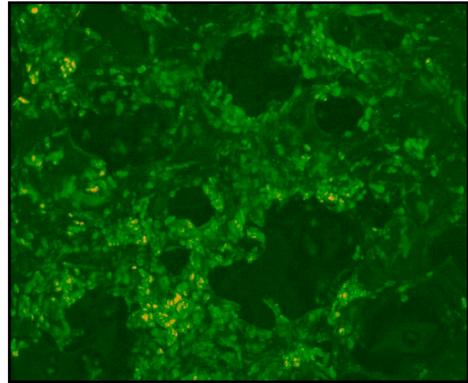


Abb.8.2

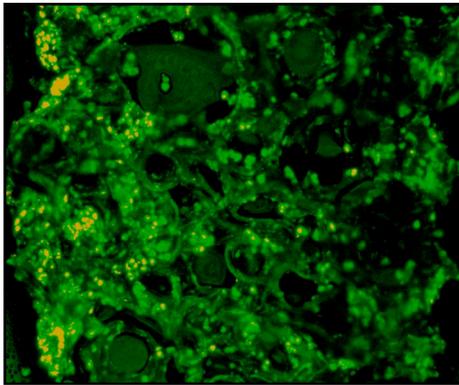


Abb.8.3

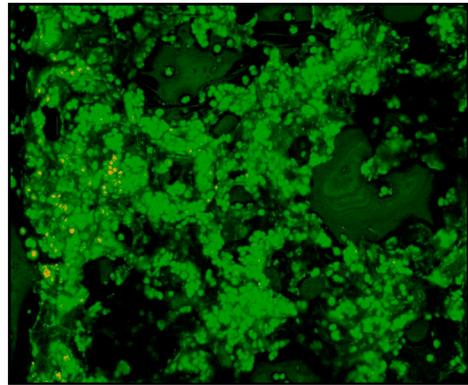


Abb.8.4

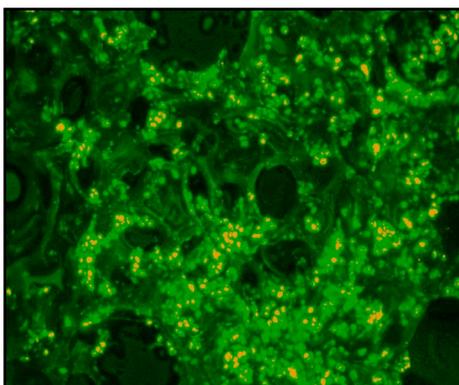


Abb.8.5

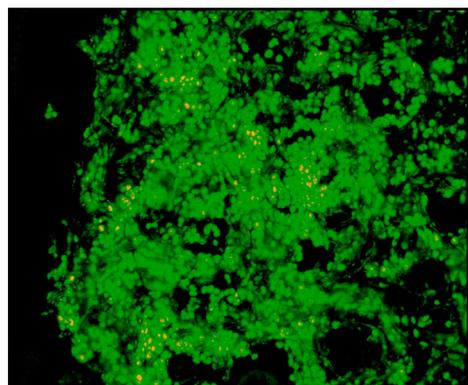


Abb.8.6

Abb. 8.1-8.6 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von gecoateten und nicht-gecoateten Solid Polymere nach Live/Dead-Färbung zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden. Der Aufbau der Polymere, insbesondere die Porenstruktur lässt sich an hand dieser Aufnahmen nur eingeschränkt beurteilen, da zu allen Zeitpunkten eine flächige Bedeckung der Polymeroberfläche mit Zellen vorliegt. Die Poren werden dabei nahezu vollständig durch Zellen ausgefüllt.

Abb. 8.1 zeigt das nicht-gecoateten Solid Polymer zum Zeitpunkt 12 Stunden. Die Oberfläche ist fast vollständig von Zellen bedeckt, die Porenstruktur lässt sich nur erahnen. Der Anteil an lebenden Zellen überwiegt, die toten Zellen sind über das gesamte Polymer verteilt. Das gecoatete Polymer zum Zeitpunkt 12 Stunden (**Abb.8.2**) weist ebenfalls eine hohe Zellzahl auf, wobei sich die Zellen hauptsächlich im Bereich der Bogengänge der Poren, aber auch entlang der Polymersubstanz angesiedelt haben. Es haben sich Zellverbände ausgebildet, tote Zellen machen nur einen kleinen Teil der Gesamtzellzahl aus und befinden sich vor allem im Zentrum der Zellverbände.

Zum Zeitpunkt 72 Stunden hat sich bei der nicht-gecoateten Version (**Abb. 8.3**) im Vergleich zum Zeitpunkt 12 Stunden keine wesentliche Änderung hinsichtlich Zellanzahl und Anteil der toten Zellen ergeben. **Abb. 8.4**, welche das gecoateten Polymer zum Zeitpunkt 72 Stunden zeigt, weist deutlich mehr Zellen auf, wobei der Anteil an toten Zellen im Vergleich zu dem früheren Zeitpunkt konstant geblieben ist. Die Zellen haben sich noch dichter zusammengelagert und füllen die Poren fast vollständig aus.

Beim Zeitpunkt 120 Stunden nimmt der Anteil der toten Zellen auf dem nicht-gecoateten Polymer (**Abb. 8.5**) deutlich zu, wohingegen beim gecoateten Polymer (**Abb. 8.6**) sowohl an der Gesamtzellzahl als auch am Anteil toter Zellen kaum Änderungen zu detektieren sind. Im Vergleich der beiden Aufnahmen zeigt sich deutlich das unterschiedliche Verteilungsmuster der toten Zellen, die auf dem nicht-gecoateten Polymer nahezu ubiquitär, auf dem gecoateten Polymer vor allem im Inneren der Zellverbände zu finden sind.

NANO POLYMERE

	Gecoatete Polymere	Nicht-gecoatete Polymere
	Tote Zellen in Prozent	Tote Zellen in Prozent
12 Stunden	17%	37 %
72 Stunden	21%	46%
120 Stunden	12%	24%

SALT POLYMERE

	Gecoatete Polymere	Nicht-gecoatete Polymere
	Tote Zellen in Prozent	Tote Zellen in Prozent
12 Stunden	13%	31%
72 Stunden	10%	59%
120 Stunden	20%	60%

SOLID POLYMERE

	Gecoatete Polymere	Nicht-gecoatete Polymere
	Tote Zellen in Prozent	Tote Zellen in Prozent
12 Stunden	15%	23%
72 Stunden	7%	21%
120 Stunden	13%	31%

Tabelle 4 zeigt den Anteil toter Zellen nach Live/Dead-Färbung auf den verschiedenen Matrices

Vergleich Live/Death-Färbung an Nano, Salt und Solid Polymeren

	Zellzahl gesamt		Anteil tote Zellen		Zellverband	
	coat	∅ coat	coat	∅ coat	coat	∅ coat
Nano	+	+	+++	+++	+	+
Salt	+	++	++	+++	+	+
Solid	++++	++++	+	+	++++	++++

∅ coat...nicht gecoatet coat...gecoatet

+...wenig/geringe Ausprägung ++...viel/mäßige Ausprägung

+++...sehr starke Ausprägung

Tabelle 5: Ergebnisvergleich der Live/Dead-Färbung

3.3. Elektronenmikroskopie

3.3.1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nano Polymere

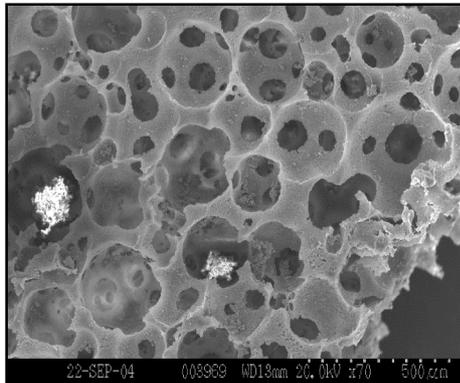


Abb.9.1

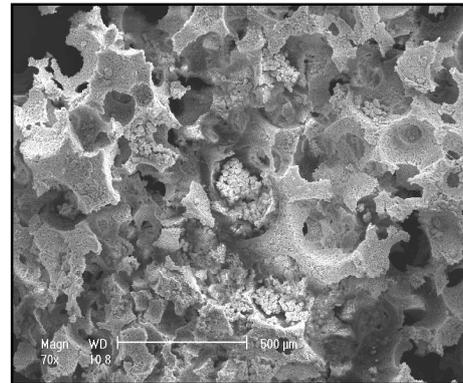


Abb.9.2

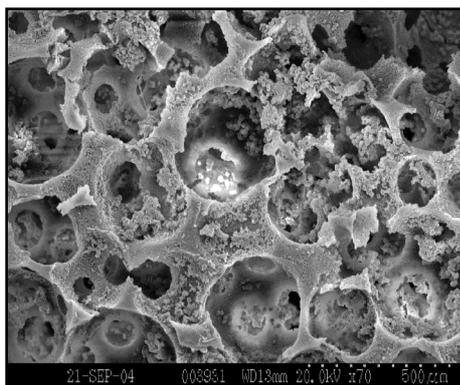


Abb.9.3

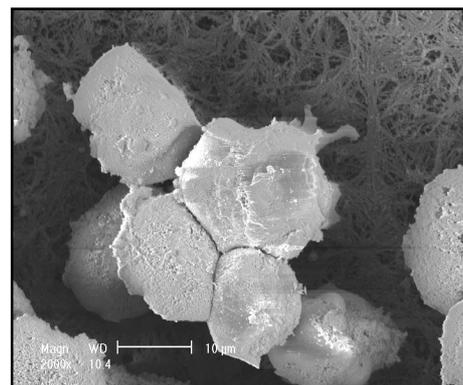


Abb.9.4

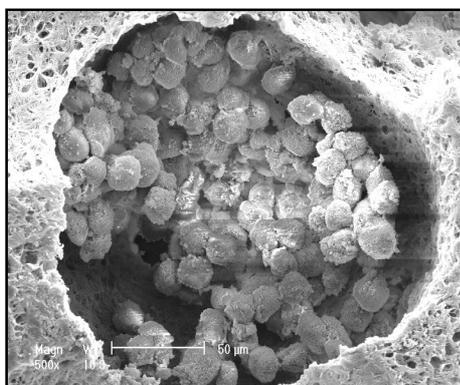


Abb.9.5

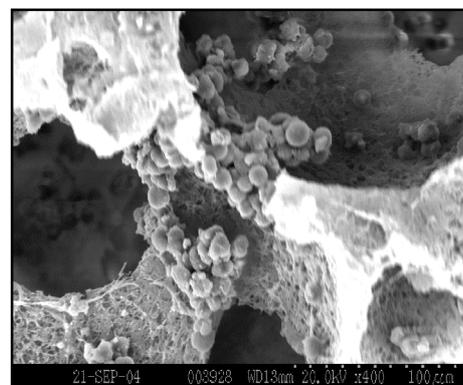


Abb.9.6

Abbildung 9.1-9.6 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von gecoateten und nicht-gecoateten Nano Polymeren zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden.

Der charakteristische Aufbau der Nano Polymere zeigt sich deutlich in **Abb.9.1** (nicht-gecoatet, Zeitpunkt 12 Stunden, Williams' Medium E). Die Hemisphären stehen über unterschiedlich viele Poren in Verbindung. Die Verbindungsporen variieren in ihren Durchmessern. Im Bereich der Hemisphären finden sich vereinzelte Zellverbände.

In **Abb.9.2** eines gecoateten Nano Polymers zum Zeitpunkt 12 Stunden, DMEM, finden sich deutlich mehr Zellverbände, welche sich ebenfalls vor allem im Bereich der Poren befinden. Das Polymer weist eine teilweise zerstörte Struktur auf, der typische Aufbau lässt sich nur schwer erkennen.

In **Abb.9.3** (Nano Polymer, nicht-gecoatet, 72 Stunden, DMEM) zeigen sich zahlreiche Zellverbände. Diese sind mehrheitlich im Bereich der Poren und weniger an der Interporensubstanz lokalisiert. Auch auf dieser Aufnahme ist die Polymerstruktur teilweise beschädigt.

Abb. 9.4 (Nano Polymer, Gelatine-gecoatet, 120 Stunden, Williams' Medium E): Zellverband aus 3-4 Zellen, die auf Grund ihrer Größe Hepatozyten entsprechen können, in einer Pore des Polymers. Die hohe Vergrößerung zeigt den faserartigen Aufbau der Polymersubstanz. Zelle mit Zellausläufer zu Kontaktaufnahme.

Fast vollständig mit Zellen ausgefüllte Pore eines mit Gelatine-gecoateten Nano Polymers in **Abb.9.5** (12 Stunden, Williams' Medium E)

Abb.9.6 (Nano Polymer, nicht-gecoatet, 72 Stunden, Williams' Medium E) zeigt die typische Lokalisation der Zellverbände auf den Polymeren, welche sich im Bereich der Hemisphären und der Verbindungsporen befinden.

Nano Polymere

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die charakteristische Struktur der nano-fibrösen Polymere, welcher durch einen hemisphärischen Aufbau gekennzeichnet ist, sowie durch zahlreiche Poren verschiedener Größe, welche die einzelnen Hemisphären verbinden. Die Nachahmung der Kollagen-Fibrillen-Struktur der nano-fibrösen Matrices zeigt sich in Aufnahmen mit hoher Vergrößerung. Auf einigen Abbildungen weisen die Polymere eine beschädigte Oberfläche auf, dies ist durch die Vorbereitungsmaßnahmen für die Aufnahmen zu erklären.

Im Vergleich zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Live/Dead-Färbung lassen sich auf den nicht-gecoateten Polymeren mehr Zellverbände erkennen, bei ebenfalls geringer Gesamtzellzahl. Die bevorzugte Lokalisation dieser Verbände und auch der Einzelzellen befindet sich im Bereich der Poren, welche

teilweise nahezu komplett von Zellen ausgefüllt werden. Wenige Zellen lassen sich im Bereich der Interporensubstanz ausmachen.

Die Oberfläche der mit Gelatine-gecoateten Polymere erscheint etwas unruhiger und rauer. Die Porenstruktur der gecoateten Polymere erscheint in einem höheren Maße beschädigt, was auf eine geringere mechanische Stabilität dieser Polymere hindeuten kann. Auch auf den gecoateten Polymeren siedeln sich die Zellen vor allem im Bereich der Poren an.

Abb.9.4 zeigt einen Zellverband aus drei bis vier Zellen in einer Pore eines gecoateten Nano Polymers in hoher Vergrößerung. Hier ist zum einem die faserartige Struktur der Polymersubstanz gut zuerkennen, zum anderen zeigt sich ein Zellausläufer, welchen die Zelle wie zur Kontaktaufnahme gebildet und ausgestreckt hat. Auf Grund der Zellgröße handelt es sich am wahrscheinlichsten um Hepatozyten.

3.3.2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Salt Polymere

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen den charakteristischen Aufbau der durch Salt-Leaching hergestellten Polymere. Typisch für diese Herstellungsmethode sind würfelförmige Poren, welche in ihrer Größe, nicht aber in ihrer Lokalisation beeinflussbar sind. Ein wesentlicher Unterschied zu den Solid und Nano Polymeren besteht darin, dass die Poren der Salt Polymere nicht miteinander in Verbindung stehen. Die Poren sind nur auf einer Seite geöffnet, wodurch die Mobilität der Zellen stark eingeschränkt ist. Es kommt zu einer vermehrten Ansammlung der Zellen am Boden, bzw. in den Ecken der Poren.

Die gecoateten und nicht-gecoateten Polymere unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der Gesamtzellzahl, wobei die Anzahl auf der gecoateten Variante überwiegt. In den Poren befinden sich auch Zellverbände, es überwiegen aber Einzelzellen. Die nicht-gecoateten Polymere weisen teilweise fast komplett leere Poren auf.

Die Oberflächenstruktur der Matrices ist auf allen Aufnahmen nahezu vollständig erhalten, wodurch auf eine hohe mechanische Stabilität der Salt Polymere geschlossen werden kann.

3.3.2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Salt Polymere

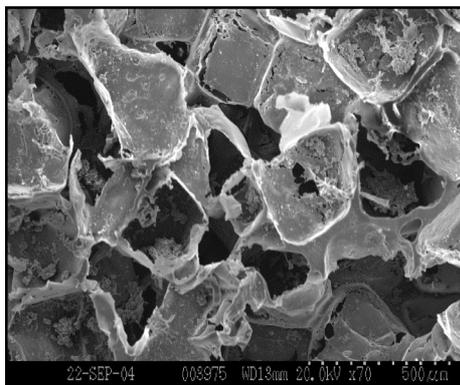


Abb.10.1

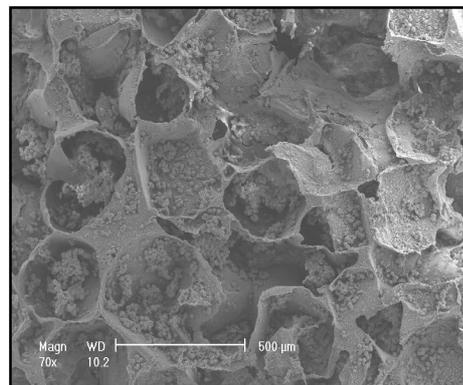


Abb.10.2

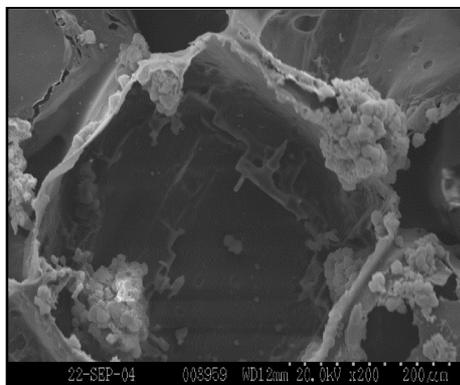


Abb. 10.3

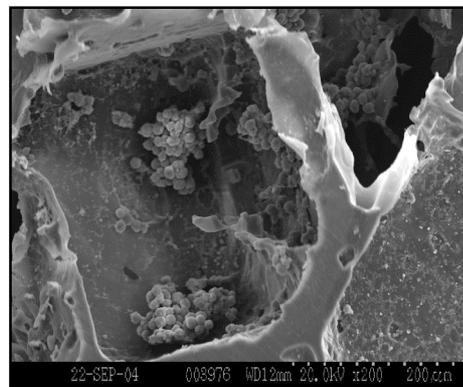


Abb. 10.4

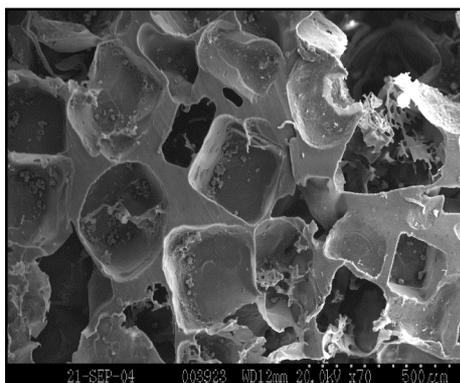


Abb. 10.5

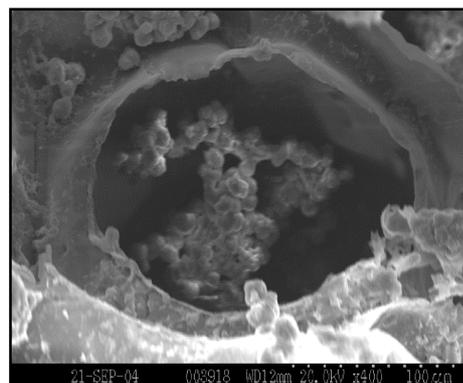


Abb. 10.6

Abbildung 10.1-10.6 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen gecoateter und nicht-gecoateter Salt Polymere zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden.

*Abb. 10.1 (Salt Polymer, nicht-gecoatet, 12 Stunden, DMEM) zeigt den charakteristischen Aufbau der Salt Polymere, welcher durch ein ungeordnetes Vorkommen der würfelförmigen Poren gekennzeichnet ist. Die Poren sind nur an einer Seite geöffnet und stehen nicht untereinander in Verbindung. Es lassen sich vor allem im Bereich der Ecken einzelne Zellverbände ausmachen, wobei die Gesamtzellzahl gering ist. Eine höhere Zellzahl findet sich in **Abb.10.2**, die eine gecoatete Version des Salt Polymers nach 120 Stunden Kultur in DMEM zeigt. Die Zellverbände sind in den Ecken und am Boden der Poren angeordnet, in geringerem Maße auch an der Interporensubstanz. Zellansammlungen in höherer Vergrößerung und typischer Lokalisation werden in **Abb.10.3** (Salt Polymer, nicht-gecoatet, 72 Stunden, DMEM) und **Abb.10.4** (Salt Polymer, nicht-gecoatet, 12 Stunden, DMEM) gezeigt. Deutlich weniger Zellen als auf dem gecoateten Polymer finden sich auf der ungecoateten Matrix in **Abb.10.5** (Salt Polymer, nicht-gecoatet, 120 Stunden, DMEM). Es befinden sich nur sehr wenige Zellen in den Poren, die Zellen liegen als Einzelzellen vor. **Abb. 10.6** (Salt Polymer, nicht-gecoatet, 120 Stunden, Williams' Med E) zeigt in einer hohen Vergrößerung einen großen Zellverband in einer Pore eines Salt Polymers. Auch an der Interporensubstanz haben sich Zellansammlungen gebildet.*

3.3.3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Solid Polymere

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der gecoateten und nicht-gecoateten Polymere zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden zeigen den charakteristischen Aufbau der Solid Polymere, welcher in erster Linie durch eine hohe Porosität gekennzeichnet ist. Die Hemisphären, welche in der elektronenmikroskopischen Darstellung der Nano Polymere gut zu erkennen sind, lassen sich in den Abbildungen der Solid Polymere auf Grund des geringen Anteils an Interporensubstanz kaum abgrenzen. Die Aufnahmen in hoher Vergrößerung zeigen den Aufbau der Porenwände, der nicht wie bei den Nano Polymeren der Fibrillenstruktur des Kollagens nachempfunden ist, sondern eine solide Bauart aufweist. Beide Versionen der Solid Polymere zeigen eine hohe Besiedlungsdichte, die höchste Anzahl an Zellen wird auf den gecoateten Matrices gefunden. Die Zellen lagern sich überwiegend zu großen Zellverbänden zusammen, welche die Poren nahezu vollständig ausfüllen. Nur wenige Zellen finden sich außerhalb dieser Zellansammlungen

Solid Polymere

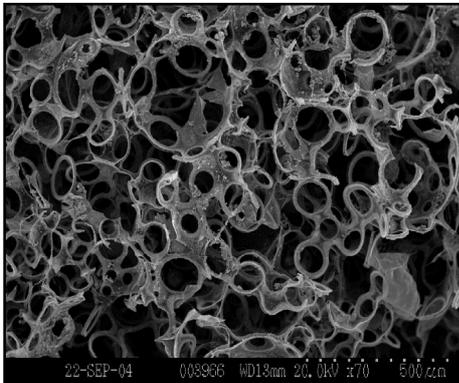


Abb.11.1

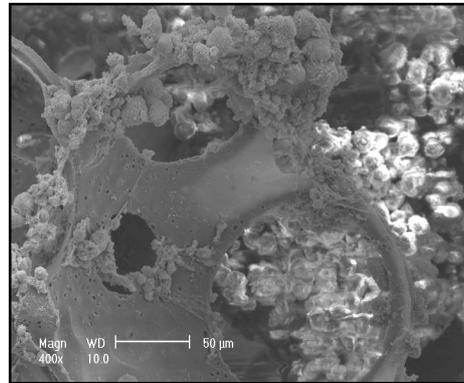


Abb.11.2

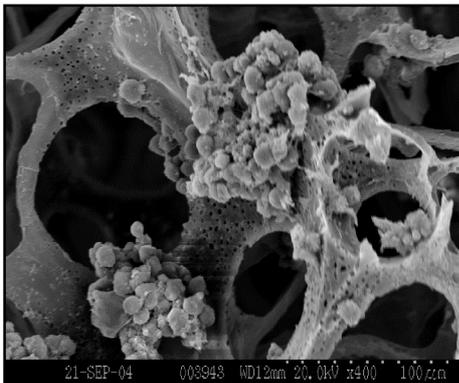


Abb.11.3

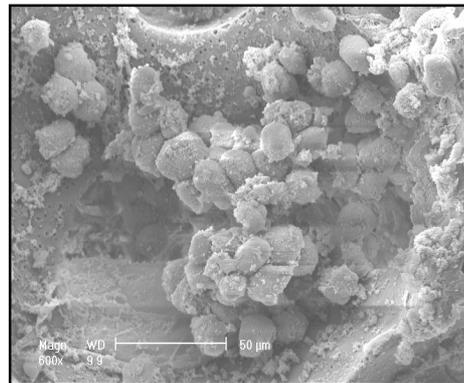


Abb.11.4

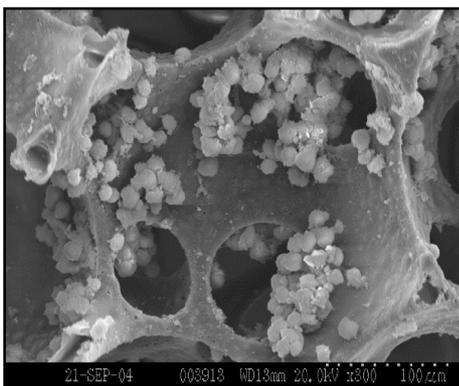


Abb.11.5

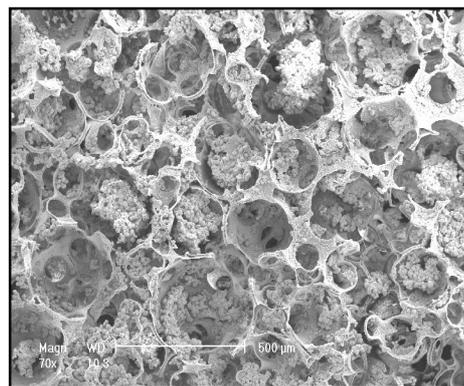


Abb.11.6

Abbildungen 11.1-11.6 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen der gecoateten und nicht-gecoateten Solid Polymere zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden.

*Abb.11.1 (Solid Polymer, nicht-gecoatet, 12 Stunden, DMEM) zeigt den typischen Aufbau der nicht-fibrösen Solid Polymere, welcher durch eine hohe Porosität, d.h. eine große Anzahl an Poren bei geringem Anteil an Interporensubstanz, gekennzeichnet ist. Die Struktur der Hemisphären, welche bei den Nano Polymeren gut zur erkennen ist, lässt sich auf Grund der hohen Anzahl an Verbindungsporen bei äußerst reduzierter Polymersubstanz kaum abgrenzen. Die Anzahl der Zellen ist gering. Eine höhere Zellzahl kommt in **Abb.11.2** (Solid Polymer, gecoatet, 12 Stunden, DMEM) zur Darstellung. Die hohe Vergrößerung zeigt Zellverbände, welche sich im Bereich der Poren gebildet haben, wobei es sich hier um relativ große Zellansammlungen handelt. Weitere Zellverbände in hoher Vergrößerung werden in **Abb.11.3** (Solid Polymer, nicht-gecoatet, 72 Stunden, DMEM), **Abb.11.4** (Solid Polymer, gecoatet, 72 Stunden, DMEM) und **Abb.11.5** (Solid Polymer, nicht-gecoatet, 120 Stunden, DMEM) gezeigt. Eine hohe Besiedlungsdichte, sowie eine große Anzahl an Zellverbänden zeigt sich in **Abb.11.6** (Solid Polymer, gecoatet, 120 Stunden, Williams' Med E). Die Zellverbände bestehen aus einer großen Anzahl an Zellen und füllen die Poren teilweise vollständig aus.*

3.4.Immunhistochemische Differenzierung der Zellen

Zu Beginn der Zellkultur befinden sich neben Hepatozyten auch nicht-parenchymatöse Zellen auf den Polymeren. Mit immunhistochemischen Verfahren werden die zu den Zeitpunkten 12, 72 und 120 Stunden auf den Polymeren vorhandenen Zellen differenziert und so mögliche Co-Kulturen identifiziert.

Als leberzelltypisch gilt die Färbung mit Antikörpern gegen Cytokeratin 18. Cytokeratin 18 ist ein Intermediärfilament und Bestandteil des Cytoskeletts epithelialer Zellen, wodurch neben Hepatozyten auch Gallengangsepithelien positiv reagieren. Bei erfolgter Positivkontrolle an Rattenleber zeigen sich ebenfalls positive Zellen auf allen Proben, die morphologisch Hepatozyten entsprechen.

Ein weiteres Intermediärfilament und Bestandteil des Cytoskeletts ist das Cytokeratin 19, das im Vergleich zum Cytokeratin 18 insbesondere in Gallengangsepithelien, Progenitorzellen oder transdifferenzierten Zellen aus dem Knochenmark expremiert wird. Eine positive Reaktion der CK 19 Färbung blieb aus, wodurch kein Nachweis von Gallengangsepithelien, Progenitorzellen oder transdifferenzierten Zellen erfolgen kann und eine eindeutige Zuordnung der durch CK 18 gefärbten Zellen als

Hepatozyten möglich ist. Die Positivkontrolle, die stets mit Rattenlebergewebe durchgeführt wurde, zeigt eine deutliche Anfärbung der Gallenwege, sowie einiger Zellen des umliegenden Gewebes, welche vermutlich Makrophagen entsprechen.

Vimentin stellt ebenfalls ein Intermediärfilament dar, zugehörig zur Gruppe der Desmine. Es zählt wie die Cytokeratine zu den Bestandteilen des Zytoskeletts, jedoch nicht epithelialer sondern mesenchymaler Zellen. Hierzu gehören unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Bei positiver Kontrollfärbung kam es zu keinem Nachweis Vimentin-positiver Zellen auf unseren Polymeren, wodurch das Vorhandensein mesenchymaler Zellen ausgeschlossen werden kann.

Ein weiterer Nachweis glatter Muskulatur erfolgt mittels Antikörpern gegen Smooth Muscle Actin (SMA). Physiologischer Weise findet sich glatte Muskulatur im Bereich der Gefäßwände. Eine positive Reaktion von Zellen kann des weitern auf aktivierte Sternzellen hinweisen, welche maßgeblich an der Entstehung einer Leberfibrose beteiligt sind. Positive Reaktionen in der Kontrollfärbung zeigten sich entlang der Gefäßwände, eine Anfärbung weiterer Strukturen zeigte sich nicht. Eine positive SMA-Reaktion erfolgte auf unseren Proben nicht.

Durch Anwendung der RECA-Färbung gelingt der spezifische Nachweis endothelialer Zellen, welche die innere Auskleidung von Blutgefäßen darstellen. Es zeigte sich eine positive Kontrollfärbung des Rattenlebergewebes, jedoch keine positive Farbreaktion auf unseren Kryoschnitten der verschiedenen Polymere. Es konnte somit keine Anwesenheit von Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die Interpretation aller durchgeführten immunhistochemischen Farbreaktionen zeigt das Vorliegen einer Hepatozyten-Monokultur ohne Nachweis nicht-parenchymatöser Zellen auf unseren Polymeren zu jedem Zeitpunkt der angefertigten Proben.

3.4.1. CK 18-Färbung

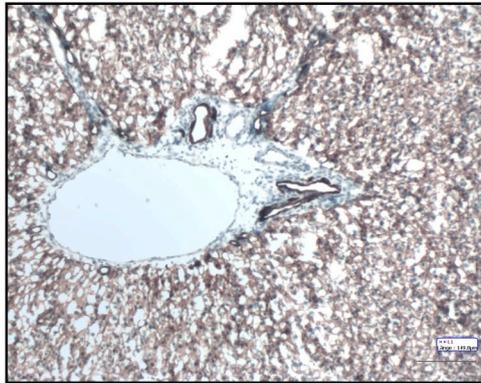


Abb. 12.1

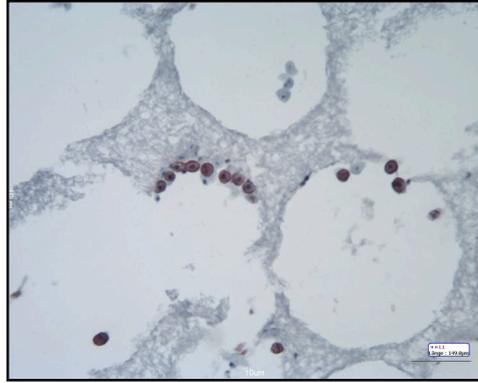


Abb. 12.2

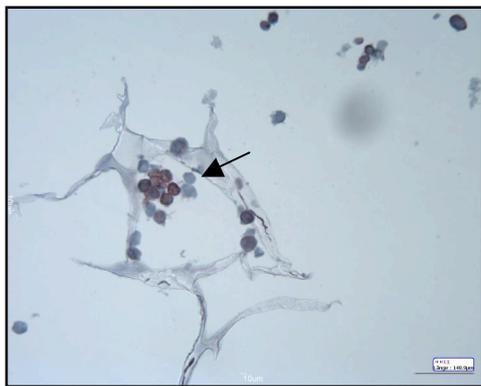


Abb. 12.3

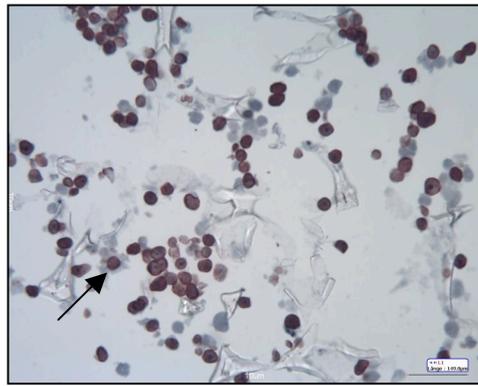


Abb. 12.4

Abb. 12.1-12.4: immunohistochemische Reaktion mit Antikörpern gegen Cytokeratin 18 als Bestandteil des Cytoskeletts epithelialer Zellen, durchgeführt an Kryoschnitten der Polymere. CK 18 Färbung gilt als lebertypische Färbung. **Abb. 12.1:** Positivkontrolle der CK 18 Färbung an Rattenleber. Neben Hepatozyten sind Gallengangsepithelien gefärbt, die ebenfalls Cytokeratin 18 exprimieren. **Abb. 12.2:** Gecoateter Nano Polymer nach 72 Stunden in DMEM Medium kultiviert. CK 18 positive Zellen haben sich am Boden der Polymerporen angelagert. Gut zu erkennen ist der Aufbau der Porenwände des nano-fibrösen Polymers, welcher der Kollagenstruktur *in vivo* nachempfunden ist. **Abb. 12.3** (gecoatetes Salt Polymer, 120 Stunden, DMEM): neben CK 18 positiven sind CK 18 negative Zellen ohne sichtbaren Nukleolus abgebildet. Diese Zellen sind vermutlich bereits abgestorben. Typisch für die Herstellungsmethode ‚salt-leaching‘ sind die würfelförmigen Poren, sowie der sehr massiv wirkende Wandaufbau. **Abb. 12.4** (Solid Polymer, gecoatet, 72 Stunden, DMEM) zeigt im Vergleich zu **Abb. 12.2** und **12.3** die meisten Zellen. Neben vielen CK positiven sind auch einige CK negative Zellen vorhanden. Der Pfeil zeigt eine sich teilende Zelle.

3.4.2. CK 19-Färbung

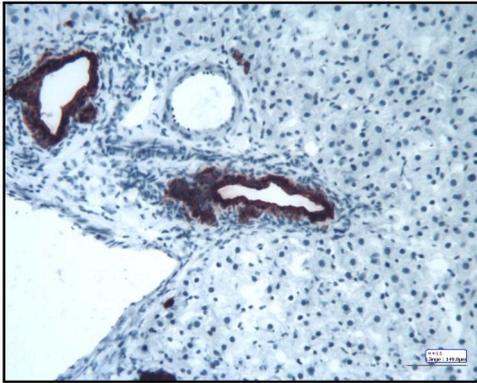


Abb. 13.1

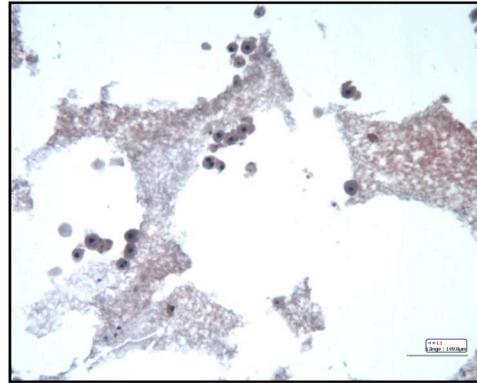


Abb. 13.2



Abb. 13.3



Abb. 13.4

Abb. 13.1-13.4 zeigen die immunohistochemische Detektion Cytokeratin 19 (CK 19)-positiver Zellen. CK 19 ist Bestandteil des Cytoskeletts und wird bevorzugt in Gallengangsepithelien, sowie in Progenitorzellen und transdifferenzierten Zellen aus dem Knochenmark expremiert. **Abb. 13.1:** Die Positivkontrolle an Rattenlebergewebe zeigt eine erfolgte Antikörperreaktion gegen Cytokeratin 19 im Bereich der Gallenwege und einzelner Zellen im umliegenden Gewebe, welche am ehesten Makrophagen entsprechen. **Abb. 13.2** (Nano Polymer, geocoatet, 72 Stunden, DMEM): Unspezifische Anfärbung des Polymers, kein Nachweis CK 19 positiver Zellen. **Abb. 13.3** (Salt Polymer, geocoatet, 12 Stunden, Williams' Medium E) und **Abb. 13.4** (geocoatetes Solid Polymer, 72 Stunden, Williams' Med E) zeigen ebenfalls keine positiven Farbreaktion nach Inkubation mit Antikörpern gegen CK 19. Das Vorhandensein von Gallengangsepithelien, Progenitorzellen sowie transdifferenzierten Zellen aus dem Knochenmark konnte bei erfolgter positiver Kontrollfärbung und negativen Reaktionen der Proben nicht nachgewiesen werden.

3.4.3 Smooth Muscle Actin-Färbung

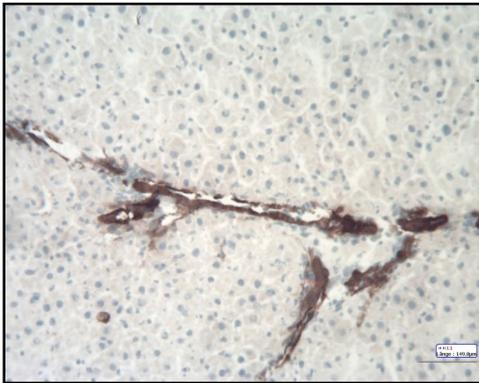


Abb. 14.1

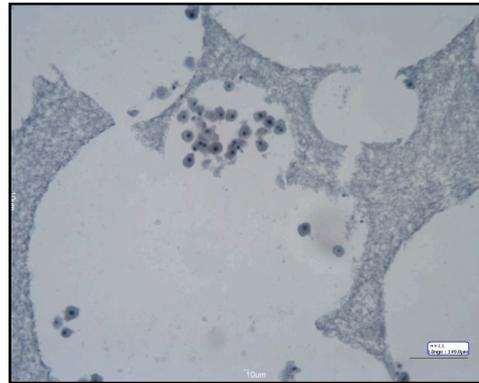


Abb. 14.2

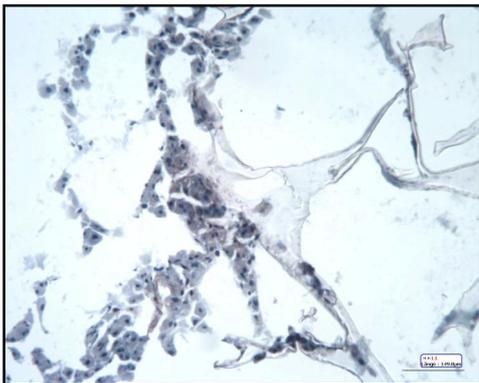


Abb. 14.3



Abb. 14.4

Auf **Abb.14.1** ist die immunhistochemische Färbung SMA-positiver Zellen in Rattenlebergewebe im Sinne einer Positivkontrolle zu sehen. SMA-positive Zellen besitzen glatte Muskulatur, welche in Lebergewebe unter physiologischen Umständen nur im Bereich der Gefäßwände zu finden ist. Aktivierte Sternzellen, die eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Fibrose spielen, exprimieren ebenfalls SMA. **Abb.14.2** (Nano Polymer, gecoatet, 72 Stunden, DMEM) zeigt keine SMA positiven Zellen. Die Abbildung verdeutlicht nochmals die Unterschiede der einzelnen Polymere bezüglich ihres Wandaufbaus. Die nanofibröse Architektur der Porenwände wird hier eindrücklich gezeigt. **Abb.14.3** (Salt Polymer, gecoatet, 12 Stunden, Williams' Medium E) zeigt eine Zusammenlagerung der SMA negativen Zellen zu einer Art Zellverband. Die Zellen weisen eine für Hepatozyten typische Größe auf, außerdem zeigt die Mehrheit der Zellen mindestens einen Zellkern, wodurch, soweit mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung zu beurteilen, von vitalen Zellen ausgegangen werden kann. **Abb.14.4** (Solid Polymer, gecoatet, 12 Stunden, Williams' Medium E): auch hier finden sich keine SMA positiven Zellen, es lässt sich wie in **Abb.14.2** und **14.3** ebenfalls gut der Wandaufbau betrachten. Es konnte kein Nachweis SMA positiver Zellen und damit von glatter Muskulatur auf den Kryoschnitten der Proben erfolgen.

3.4.4. Vimentin-Färbung

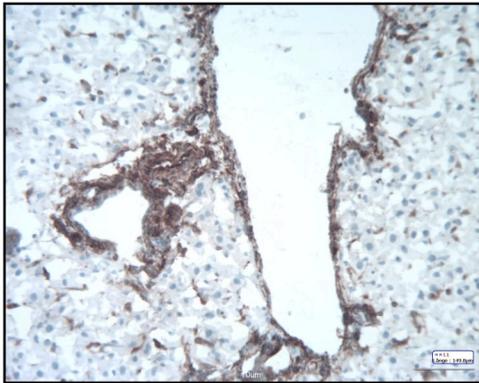


Abb. 15.1

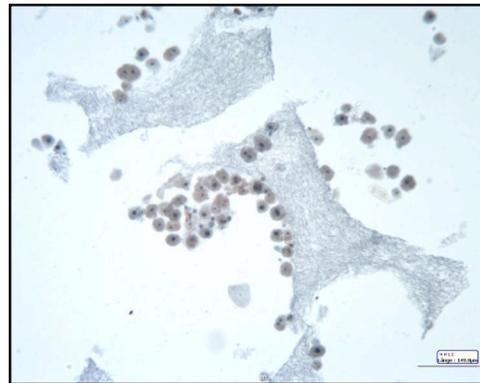


Abb. 15.2

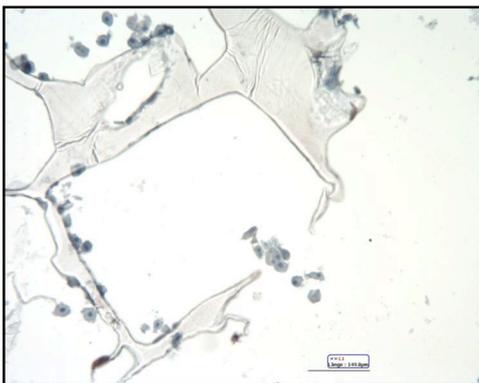


Abb. 15.3

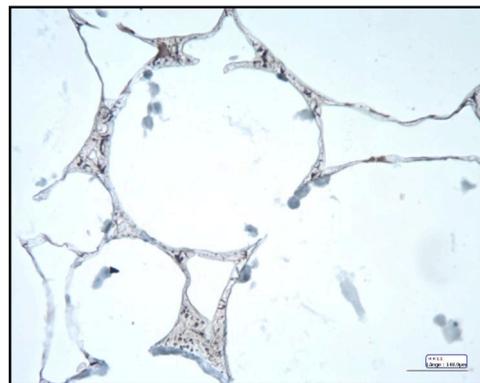


Abb. 15.4

Abb. 15.1-15.4 zeigen den immunhistochemisch erbrachten Nachweis Vimentin positiver Zellen. Vimentin ist ein Cytoskelettprotein mesenchymaler Zellen, zu welchen auch Fibroblasten, Endothel- und glatte Muskelzellen gehören. Es gehört zur Gruppe der Desmine und wird in vivo vor allem im Bereich der Gefäße und im Bindegewebe gefunden. **Abb. 15.1**, Positivkontrolle an Rattenlebergewebe, zeigt Vimentin positive Zellen im Bereich des Gefäßendothels und des Bindegewebes. **Abb. 15.2** (Nano Polymer, gecoatet, 72 Stunden, DMEM): Die Zellen haben sich entlang des Porenbogens angeordnet, werden aber durch die Antikörper gegen Vimentin nicht gefärbt, wodurch gezeigt wird, dass es sich nicht um mesenchymale Zellen handelt. **Abb. 15.3** (Salt Polymer, nicht-gecoatet, 12 Stunden, Williams' Med E) zeigt vereinzelte Vimentin-negative Zellen. Einige der Zellen haben sich ebenfalls am Boden der Poren angesammelt. **Abb. 15.4** (Solid Polymer, gecoatet, 12 Stunden, Williams' Med E): Fast vollständige Darstellung einer Makropore mit nicht-fibrösem Wandaufbau. Die wenigen vorhandenen Zellen zeigen keinen Zellkern, wodurch davon auszugehen ist, dass sie bereits abgestorben sind. Auch hier konnte kein Nachweis vimentinexpmierender Zellen erfolgen.

3.4.5. RECA-Färbung

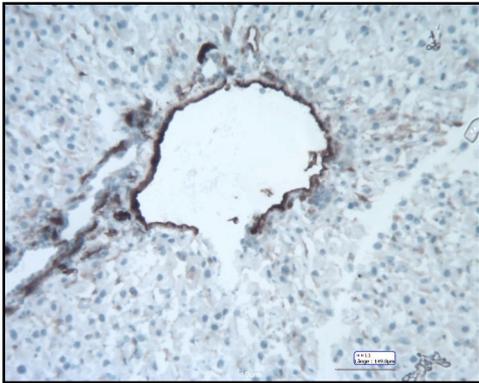


Abb.16.1

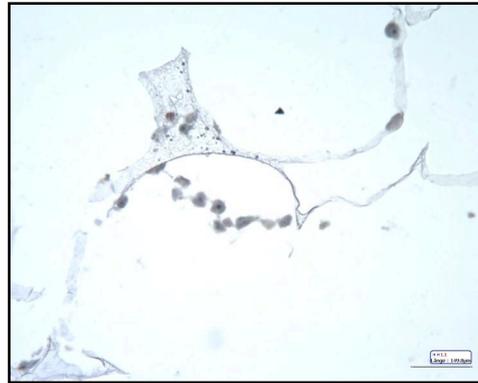


Abb.16.2

Abb.16.1: immunhistochemische Anfärbung der Endothelzellen mit RECA-Antikörpern auf einem Kryoschnitt von Rattenleber als Positivkontrolle. Die Farbreaktion ist auf den Bereich der Endothelauskleidung der Blutgefäße begrenzt.

Abb.16.2 (Solid Polymer, gecoatet, 72 Stunden, Williams' Med E) soll exemplarisch den nicht erfolgten Nachweis RECA-positiver Zellen auf all unseren Proben zeigen. Es konnte somit auf keinem Polymer zu keiner Zeit die Anwesenheit von Endothelzellen nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im menschlichen Körper. Entgiftungs- und Synthesefunktionen, sowie die Biotransformation von Fremdstoffen (Xenobiotika) gehören zu ihren Hauptaufgaben. Bei der Umsetzung zunächst ungiftiger Stoffe können toxische Substanzen entstehen, welche zu schweren Nebenwirkungen führen können. Aus diesen Gründen müssen im Rahmen der Medikamentenentwicklung zahlreiche kosten- und zeitintensive Tierversuche durchgeführt werden. Speziespezifische Metabolismusunterschiede können dazu führen, dass unerwünschte Nebenwirkungen nicht im Tierversuch, sondern erst während der klinischen Anwendung auftreten, mit der Folge, dass das neu hergestellte Medikament vom Markt genommen werden muss und somit viel Geld und Zeit umsonst investiert wurde. Um Ausfälle dieser Art möglichst zu vermeiden, werden pharmakologische Studien an in-vitro-Testsystemen durchgeführt, welche auf isolierten Leberenzymen, Primärzellkulturen oder Leberschnitten basieren. Ein kommerzielles, organoides Lebertestsystem, welches Langzeitstudien an primären Hepatozyten ohne Funktionsverlust ermöglicht, liegt zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vor. Bereits existierende Lebermodelle besitzen oft nur Teilfunktionen der Leber und lassen somit nur begrenzte Aussagen bezüglich einer zu erwartenden in-vivo-Wirkung zu.

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet des in vitro synthetisierten Lebergewebes stellt die Behandlung der dekompensierten Leberinsuffizienz dar. Mit Hilfe eines Leberersatzsystems kann die Zeit bis zur Organregeneration bzw. Organtransplantation überbrückt werden, indem das geschädigte Organ in seiner (Rest)Funktion unterstützt bzw. ersetzt wird. Die bereits entwickelten extrakorporalen Systeme sind jedoch nur in der Lage die Detoxikationsfunktion der Leber zu ersetzen, ein Ersatz der Syntheseleistung oder Biotransformation ist bis dato noch nicht möglich.

Tissue Engineering mit Poly-L-Laktatsäure (PLLA) Matrix

Unsere PLLA Matrices wurden von Prof. Dr. Ma durch verschiedene Verfahren hergestellt.

Salt-Polymere: Die Herstellung erfolgt mittels der Salt-Leaching-Technik. Hierbei lässt sich eine genaue Kontrolle der Porengröße (41) durchführen, so dass eine Porosität von bis zu 98% erreicht werden kann. Studien zeigten, dass die Porengröße für das schnelle Einwachsen von fibrovaskulärem Gewebe entscheidend ist (42). Das schnelle Einwachsen fibrovaskulären Gewebes spielt vor allem bei der Zelltransplantation eine wichtige Rolle.

Für die Herstellung unserer Polymere wurden Salzkristalle mit einer Größe von 250-400 μ m gewählt. Nachteil des Salt-Leaching ist, dass die Verbindungsrate der Poren nicht beeinflusst werden kann (41) und einzelne Poren verschlossen bleiben können. Der Aufbau der Salt Polymere führt zu einer eingeschränkten Mobilität der Zellen, wodurch diese sich bevorzugt am Boden und in der Ecken der Poren ansammeln. Die durchlichtmikroskopisch festgestellte hohe Zellzahl nach 120 Stunden kann ebenfalls durch die Porenarchitektur bedingt sein, da das Abschwemmen der Zellen erschwert wird. Dies könnte auch die Erklärung für die ungefähr gleich hohe Zellzahl auf den gecoateten und nicht-gecoateten Polymeren darstellen. Im Vergleich zu den anderen verwendeten Polymerarten zeigen die Salt Polymere die höchste Stabilität, wahrscheinlich bedingt durch die fehlende bzw. nur gering ausgeprägte Interkonnektivität der Poren.

Große Streubreiten der Ergebnisse wurde in Studien durch das stark variierende Verhältnis von geschlossenen zu offenen Poren innerhalb einer Serie erklärt. Durch die Herstellungsmethode bedingt kommt es des Weiteren dazu, dass auf einer Seite der Matrix die Poren nur nach innen geöffnet und nach außen hin komplett verschlossen sind. Histologische Analysen nach in vivo Versuchen zeigten, dass nur von der offenen Seite her Bindegewebe einwächst und die Hepatozyten auch nur auf dieser Seite überleben können.

Dies alles sind Nachteile des Salt-Leaching-Verfahrens auf Grund dessen weitere Techniken der Matrixherstellung etabliert wurden, mit denen eine dreidimensionale Kontrolle der Porenarchitektur ermöglicht wird. Hierzu zählen das Rapid Phototyping, die Stereo Litography oder die Verwendung von Paraffin-Spheres (41) (44) (45).

Nano-fibröse Polymere: Das Verhalten der Zellen in vitro wird maßgeblich vom dreidimensionalen Aufbau der Matrices beeinflusst. Ma et al entwickelten eine Methode zur Herstellung synthetischer nano-fibröser Polymere, deren Aufbau der Fibrillenstruktur des Kollagens ähnelt. Kollagen ist eines der am häufigsten vorkommenden Strukturproteine des menschlichen Körpers. Zahlreiche Studien zeigten die wichtige Bedeutung der Fibrillenstruktur (Fibrillendurchmesser 50-500 nm) (46)(47) für die Zelladhäsion, -proliferation und – differenzierung (46)(48)(49). Durch den geringen Durchmesser und den weiten Abstand der Fibrillen (im μm Bereich) soll der Zell-Zell-Kontakt sowie der Stoffaustausch begünstigt werden.

Die Herstellung erfolgt mittels Paraffin-Spheres, wodurch neben Größe und Anzahl der Poren auch der Grad der Interkonnektivität beeinflusst und reproduziert werden kann.

Solid Polymere: Sie gleichen in Aufbau und Herstellungsverfahren weitestgehend den nano-fibrösen Polymeren. Der wichtigste Unterschied zu den nano-fibrösen Polymeren besteht darin, dass ihr Wandaufbau keine Fibrillenstruktur aufweist, sondern ‚solide‘ ist.

Erste Studien mit osteoblastischen Progenitorzellen (MC3T3-E1) zeigten auf den nano-fibrösen Polymeren eine um 70% höhere Zelladhäsion als auf den nicht-fibrösen Polymeren. Des Weiteren fand sich eine deutlich höhere mRNA-Expression von Osteocalcin und BSP als Ausdruck einer gesteigerten Differenzierung der Osteoblasten (50)(51).

Unsere Untersuchungen mit primären Rattenhepatozyten sowie nicht-parenchymatösen Leberzellen zeigten hingegen auf den nano-fibrösen Polymeren eine deutlich geringere Gesamtzellzahl als auf den nicht-fibrösen Polymeren. Die wenigen vorhandenen Zellen stellten sich in den verschiedenen Untersuchungsmethoden überwiegend als abgestorben dar. Die Anordnung der Zellen

auf den Polymeren erfolgt nur selten in Form von Zellverbänden, wie sie sich vor allem auf den Solid Polymeren ausbilden. Einige wenige Zellverbände bei gering gradig höherer Gesamtzellzahl finden sich auf den gecoateten Varianten der nano-fibrösen Polymere. Wie auch auf den anderen Polymerarten finden sich im Bereich der Zellverbände im Zentrum vor allem tote Zellen. Diese Tatsache ist auf die schlechtere Nährstoffversorgung bzw. den eingeschränkten Stoffaustausch im Allgemeinen zurückzuführen, welcher auf Grund der fehlenden Gefäßversorgung ein großes Problem in der Langzeitkultur darstellt.

Eine Überlegenheit der nano-fibrösen Polymere gegenüber den Solid und Salt Polymeren hinsichtlich Zelladhäsion, -proliferation, -überleben und Neubildung von Lebergewebe kann durch unsere Untersuchungen nicht gezeigt werden.

Zell-Matrix-Interaktion

Die Oberflächenbeschaffenheit der Matrices ist entscheidend für eine gute Zell-Matrix-Interaktion. Unsere PLLA-Polymere sind mit Poly-Vinyl-Alkohol beschichtet, wodurch die Matrices deutlich hydrophiler werden (der Kontaktwinkel von PLLA-Matrix und Wasser beträgt ohne PVA-Oberfläche 79 ± 20 und wird durch das Beschichten auf 17 ± 30 gesenkt) jedoch noch keine optimale Zelladhäsion erzielt wird (53). Ein weiteres Problem vieler rein synthetischer Matrices besteht darin, dass ihre Oberfläche von Adhäsionsmolekülen nicht „erkannt“ wird. Auf Grund der unzureichenden Zell-Matrix-Interaktion wird ein Großteil der Zellen von den Polymeren abgeschwemmt.

Oberflächenmodifikationen der Matrices mit Chitosan-Beschichtung (54), chemisches Koppeln von Peptiden z.B. RDG und YIGSR an Lysinreste in der Matrix (55)(56) oder Niedrigdruckbeschichtung mit NH_3 Plasma (57) haben sich bei Osteoblasten- (59) und Hepatozytenkulturen (56) als effektiv erwiesen und auf diesen modifizierten Matrices zu einer höheren Zelladhäsionsrate geführt .

In dieser Arbeit wird die Oberflächenmodifikation via Layer-By-Layer-Self-Assembly Technique durchgeführt. Diese Methode wurde in den Ma Laboratorien entwickelt und ermöglicht eine Beschichtung der Polymeroberfläche mit Gelatine. Gelatine ist eine hydrolysierte Form des Kollagens und fördert die Zelladhäsion.

Osteoblasten kultiviert auf Gelatine gecoateten nano-fibrösen Polymeren zeigten eine höhere Gesamtzellzahl und eine höhere Proliferationsrate, als Osteoblasten der Kontrollgruppe auf nicht-fibrösen Polymeren. In einer weiteren Studie wurden die Proteinabsorption und Zelladhäsion der Nano und Solid Polymere verglichen. Es zeigte sich eine 4.2fach höhere Absorption von humanen Serumproteinen durch die Nano Polymere. Einige Serumproteine wurden von beiden Polymerarten in gleichem Umfang absorbiert, Fibronectin hingegen in großem Maße durch die nano-fibrösen Polymere, kaum dagegen durch die Solid Polymere.

Diese Arbeit zeigt hinsichtlich Zellzahl und Zellüberleben eine deutliche Überlegenheit der mit Gelatine gecoateten Polymere. Die Solid Polymere zeigen zu allen Zeiten die höchste absolute Zellzahl bei gleichzeitig niedrigstem Anteil toter Zellen. Die Zellen sind homogen über die Polymeroberfläche verteilt, bevorzugte Lokalisationen bestehen im Bereich der Porengänge. Es bilden sich Zellverbände aus, tote Zellen finden sich fast ausschließlich im Zentrum dieser Ansammlungen.

Auf den nano-fibrösen Polymere, die zu allen Untersuchungszeitpunkten und in allen Analysen nur sehr wenige Zellen aufweisen, finden sich auf den gecoateten Varianten eine höhere Zellzahl mit einem größeren Anteil lebender Zellen, als auf den nicht gecoateten Polymeren. Höhere Gesamtzellzahlen und weniger tote Zellen finden sich auch auf den gecoateten Salt Polymeren.

Immunhistochemische Differenzierung der Zellen

Lebergewebe stellt ein komplexes Konstrukt aus zahlreichen Zellen dar, die nur im streng regulierten Zusammenspiel die verschiedenen Aufgaben des Organs erfüllen können. Für die differenzierten Funktionen der einzelnen Zellen ist neben der dreidimensionalen Anordnung auch eine ausgeprägte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion bzw. -Kommunikation erforderlich. Um die Zellfunktionen in vitro aufrechterhalten zu können, muss eine für die Zellen möglichst physiologische Mikroumgebung geschaffen werden. Dies wird durch den Einsatz der dreidimensionalen Matrices und durch eine Co-Kultivierung mit nicht-parenchymatösen Zellen versucht zu erreichen.

Die Differenzierung der auf den Matrices vorhandenen Zellen erfolgt mit

immunhistochemischen Verfahren, welche zu keinem Zeitpunkt weitere Zellarten außer Hepatozyten nachweisen konnte.

Ein Grund hierfür besteht darin, dass die Oberfläche der meisten synthetischen Polymere durch die Zellen nicht erkannt wird und somit nur eine äußerst geringe Zelladhäsion durch nicht-parenchymatöse Zellen möglich ist. Auch eine Oberflächenmodifikation mittels Gelatine konnte die Adhäsion der nicht-parenchymatösen Zellen nicht fördern. Eine gesteigerte Adhäsion der Hepatozyten konnte hingegen gezeigt werden.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Tissue Engineering mit Hepatozyten stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Die größten Erfolge werden derzeit durch den Einsatz dreidimensionaler Kultursysteme erzielt, welche eine Reorganisation der Zellen zu einem möglichst identischen Zustand wie er in vivo zu finden ist ermöglichen soll. Nur so ist die längerfristige Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und damit der Zellfunktion und des Zellüberlebens möglich. Das Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass die Zellquantität und –vitalität im Kultursystem abhängig ist von dem feinarchitektonischen Aufbau der verwendeten Matrices.

Methoden: Es wurden synthetische PLLA-Polymere verwendet, welche mittels unterschiedlichen Herstellungsverfahren produziert wurden. Die Matrices wurden mit Ratten-Hepatozyten beimpft, welche zuvor mithilfe einer Kollagenaseverdautechnik isoliert worden waren. Bei einer Gruppe der verwendeten Polymere führten wir eine Oberflächenmodifikation mit Gelatine durch, wodurch die Zelladhäsion gesteigert werden sollte. Die Untersuchungen hinsichtlich der Zellquantität und –vitalität fanden nach 12, 72 und 120 Stunden in Kultur statt. Zur Kultivierung wurden zwei unterschiedliche Medien verwendet.

Ergebnis: Es wurden insgesamt 144 Polymere untersucht. Es zeigten sich zu allen Untersuchungszeitpunkten auf den Gelatine-gecoateten Polymeren deutlich mehr Zellen, als auf den nicht oberflächenmodifizierten. Die meisten Zellen mit dem geringsten Anteil toter Zellen konnten durch alle angewandten Untersuchungsmethoden auf den Solid Polymeren festgestellt werden. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich ausschließlich um Monokulturen mit Hepatozyten handelte und die ebenfalls transplantierten nicht-parenchymatösen Zellen schon zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach 12 Stunden in Kultur nicht mehr nachweisbar waren. Eine Überlegenheit des einen Mediums gegenüber dem anderen konnte nicht nachgewiesen werden.

Diskussion: Anhand der erhobenen Daten konnte gezeigt werden, dass die Zellquantität und Vitalität der Kultursysteme basierend auf PLLA-Polymeren mit Oberflächenmodifikation mittels Gelatine ungleich höher ausgeprägt war, als auf nicht-gecoateten Polymeren. Eine Überlegenheit der nano-fibrösen Polymeren, welche in ihrem Aufbau der in vivo Extrazellulärsubstanz nachempfunden sind, und damit das Zellüberleben mutmaßlich deutlich fördern sollten konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Es erscheint somit erforderlich die Zelladhäsion an PLLA-Polymeren mittels Gelatine-Beschichtung der Matrices zu fördern. Eine der Extrazellulärmatrix des in vivo vorkommenden Gewebes nachempfundenen Aufbau der Polymeren ist unseren Untersuchungen nach weniger entscheidend.

6.Literaturverzeichnis

- (1) DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ.*: 22(2):151-85.
- (2) WHO Standards: www.who.int/ethics/research/en/; World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects: www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf
- (3) Bissell DM, Guzelian PS (1980). Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349: 85-98.
- (4) Ichihara A, Nakamura T, Tanaka K, Tomita Y, Aoyama K, Kato S, Shinno H (1980). Biochemical functions of adult rat hepatocytes in primary culture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349: 77-84.
- (5) Crane LJ, Miller DL (1983). Plasma protein induction by isolated hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 53-54: 89-109.
- (6) Flaim KE, Hutson SM, Lloyd CE, Taylor JM, Shiman R, Jefferson LS (1985). Direct effect of insulin on albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *American Journal of Physiology* 249: E447-53. 5
- (7) Lloyd CE, Kalinyak JE, Hutson SM, Jefferson LS (1987). Stimulation of albumin gene transcription by insulin in primary cultures of rat hepatocytes. *American Journal of Physiology* 252: C205-14.
- (8) Michalopoulos G, Sattler GL, Pitot HC (1976). Maintenance of microsomal cytochromes b5 and P-450 in primary cultures of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Life Sciences* 18: 1139-44. 7
- (9) Jefferson DM, Reid LM, Giambrone MA, Shafritz DA, Zern MA (1985). Effects of dexamethasone on albumin and collagen gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Hepatology* 5: 14-20. 8
- (10) Nawa K, Nakamura T, Kumatori A, Noda C, Ichihara A (1986). Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 261: 16883-8.
- (11) Ratcliffe, Niklason (2002). Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering, *Ann N Y Acad Sci.* 961:210-5

- (12) Kadohama T, Nishimura K, Hoshino Y, Sasajima T, Sumpio BE (2007). Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival. *J Cell Physiol.* 212(1):244-51
- (13) Guguen-Guillouzo C, Clement B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, Guillouzo A (1983). Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Experimental Cell Research* 143: 47- 54.
- (14) Begue, JM, Guguen-Guillouzo C, Padeloup N, Guillouzo A (1984). Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. *Hepatology* 4: 839-42.
- (15) Guguen-Guillouzo C, Clement B, Lescoat G, Glaise D, Guillouzo A (1984). Modulation of human fetal hepatocyte survival and differentiation by interactions with a rat liver epithelial cell line. *Developmental Biology* 105: 211-20.
- (16) Clement B, Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Glaise D, Bourel M, Guillouzo A (1984). Long-term co-cultures of adult human hepatocytes with rat liver epithelial cells: modulation of albumin secretion and accumulation of extracellular material. *Hepatology* 4: 373-80.
- (17) Shimizu H, Mitsuhashi N, Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M. *World (2005): Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats* *J Gastroenterol.* 14;11(46):7254-60
- (18) Ferrara N, LeCouter J, Lin R, Peale F (2004): EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors *Biochim Biophys Acta.* 1654(1):69-78.
- (19) Goulet F, Normand C, Morin O (1988). Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology* 8: 1010-8.
- (20) 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.
- (21) Kojima K, Bonassar LJ, Ignatz RA, Syed K, Cortiella J, Vacanti CA (2003): Comparison of tracheal and nasal chondrocytes for tissue engineering of the trachea. *Ann Thorac Surg.* 76(6):1884-8.
- (22) Walgenbach KJ, Voigt M, Riabikhin AW, Andree C, Schaefer DJ, Galla TJ, Björn G (2001). Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec.* 263(4):372-8.

- (23) Barrera DA, Zylstra E, Lansbury PT, Langer R (1993): Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer (polylactic acid-co-lysine). *J Am Chem Soc*; 115: 11010-11011
- (24) Vacanti JP, Langer R (1995): Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. *J Biomed Mater Res*; 29: 959-965
- (25) Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y (2004): Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc.* 37(1):29-36
- (26) Kordes C, Sawitzka I, Häussinger D (2009): Hepatic and pancreatic stellate cells in focus *Biol Chem*.
- (27) Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C (2009): Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol*.
- (28) March S, Hui EE, Underhill GH, Khetani S, Bhatia SN (2009): Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro..*Hepatology*.
- (29) Petell JK, Bujanover Y, Gocayne J, Amarri S, Doyle D (1987): Isolation of domains of the plasma membrane of hepatocytes. *Exp Cell Res.* 173(2):473-85.
- (30) Strazzabosco M, Fabris L (2008): Functional anatomy of normal bile ducts. *Anat Rec (Hoboken)*. 291(6):653-60.
- (31) Oh SH, Hatch HM, Petersen BE (2002): Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 13(6):405-9.
- (32) Vacanti JP (1988). Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixer lecture. *Arch Surg* 123: 545-549.
- (33) Dohmen PM, Ozaki S, Nitsch R, Yperman J, Flameng W, Konertz W. (2003): A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model. *Med Sci Monit.* 9(4):BR97-BR104.
- (34) Mooney DJ, Kaufmann PM, Sano K, McNamara KM, Vacanti JP, Langer R, (1994). Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges. *Transplant Proc* 26: 3425-3426.
- (35) Mooney DJ, Sano K, Kaufmann PM, Majahod K, Schloo B, Vacanti JP, Langer R, (1997). Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges. *J Biomed Mater Res* 37: 413-420.
- (36) Barbeta A, Barigelli E, Dentini M (2009): Porous Alginate Hydrogels: Synthetic Methods for Tailoring the Porous Texture. *Biomacromolecules*.

- (37) Yu HS, Jang JH, Kim TI, Lee HH, Kim HW (2009): Apatite-mineralized polycaprolactone nanofibrous web as a bone tissue regeneration substrate. *J Biomed Mater Res A*. 88(3):747-54.
- (38) Lazzeri L, Cascone MG, Danti S, Serino LP, Moscato S, Bernardini N (2007): Gelatine/PLLA sponge-like scaffolds: morphological and biological characterization. *J Mater Sci Mater Med*. 18(7):1399-405.
- (39) Török E, Vogel C, Lütgehetmann M, Ma PX, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Siebert K, Düllmann J, Rogiers X, Pollok JM (2006). Morphological and functional analysis of rat hepatocyte spheroids generated on poly(L-lactic acid) polymer in a pulsatile flow bioreactor. *Tissue Eng*. 12(7):1881-90.
- (40) Zhang Y, He Y, Bharadwaj S, Hammam N, Carnagey K, Myers R, Atala A, Van Dyke M (2009). Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials*. 30(23-24):4021-8.
- (41) Ma PX, Choi JW, (2001). Biodegradable polymer scaffolds with well defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng* 7: 23-33
- (42) Wake MC, Patrick CW, Jr. and Mikos AG, (1994). Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. *Cell Transplant* 3: 339-343
- (43) Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ (1996). Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J Biomater Sci Polym Ed* 8: 63-75.
- (44) Yang S, Leong KF, Du Z and Chua CK, (2002). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng* 8: 1-11
- (45) Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T and Hetzer R, (2002). Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *Asaio J* 48: 12-16.
- (46) Elsdale T, Bard J (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 54(3):626-37.
- (47) Hay ED (1990). Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation. *Cell Differ Dev*. 32(3):367-75.
- (48) Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, Irons G, McLain JR, Michalopoulos G (1982). Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J Natl Cancer Inst*. 68(5):771-8.
- (49) Grinnell F, Bennett MH (1982). Ultrastructural studies of cell-collagen interactions. *Methods Enzymol*. 82 Pt A:535-44.

- (50) Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM, Kim GS, Somerman MJ, Ma PX (2007). Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials*. 28(2):335-43.
- (51) Hu J, Liu X, Ma PX (2008). Induction of osteoblast differentiation phenotype on poly(L-lactic acid) nanofibrous matrix. *Biomaterials*. 29(28):3815-21
- (52) 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.
- (53) Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R, (1994). Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 15: 55-58.
- (54) Cai K, Liu W, Li F, Yao K, Yang Z, Li X, Xie H, (2002). Modulation of osteoblast function using poly(D,L-lactic acid) surfaces modified with alkylation derivative of chitosan. *J Biomater Sci Polym Ed* 13: 53-66.
- (55) Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R (1997). Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res* 35: 513-523.
- (56) Carlisle ES, Mariappan MR, Nelson KD, Thomes BE, Timmons RB, Constantinescu A, Eberhart RC, Bankey PE, (2000). Enhancing hepatocyte adhesion by pulsed plasma deposition and polyethylene glycol coupling. *Tissue Eng* 6: 45-52.
- (57) Nitschke M, Schmack G, Janke A, Simon F, Pleul D, Werner C, (2002). Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res* 59: 632-638.
- (58) Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R (1997). Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res* 35: 513-523.
- (59) Cai K, Liu W, Li F, Yao K, Yang Z, Li X and Xie H, (2002). Modulation of osteoblast function using poly(D,L-lactic acid) surfaces modified with alkylation derivative of chitosan. *J Biomater Sci Polym Ed* 13: 53-66.
- (60) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sick cell anemia. *Science*. 230: p. 1350-1354.

- (61) Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH (2003): An update on in vitro test methods in hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 189(3):233-46.
- (62) Cerny MA, Hanzlik RP (2005): Cyclopropylamine inactivation of cytochromes P450: role of metabolic intermediate complexes. *Arch Biochem Biophys* *Arch Biochem Biophys*; 436(2):265-75.
- (63) Li N, Liu Z, Jia X, Cui W, Wang W, Zhang X, Han C, Chen J, Wang M (2003): Study on the toxicological effect of chloropropanois on rats. *Wie Sheng Yan Jiu*. 32(4):349-52.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Aqua dest	Aqua destillata
b	Base
bp	Basenpaare
BSP	Bone Sialoprotein
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cat.#	Katalognummer
CK	Cytokeratin
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlendioxid
-COOH	Carboxylgruppe
CYP	Cytochrom P
D	Deutschland
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythimidintriphosphat
EGF	Epidermal growth Factor
EGTA	Ethylene Glycol-bis(β-Aminoethylether)- N,N,N',N'- Tetraacetic acid
et al.	et alii
FCS	Fetale Calv Serum
g	Gramm
G	Gauche
HCl	Salzsäure
HGF	Hepatocyte Groth Factor
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2- ethanesulfonic acid]
Kat.-Nr.	Katalog-Nummer
KCl	Kaliumchlorid
LINE	Long Interspersed Element
μm	Mikrometer
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

Abkürzungsverzeichnis

mmol/l	Milimol pro Liter
mol/l	Mol pro Liter
mRNA	messengerRibonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
ng	Nanogramm
-NH	Amid-Gruppe
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
-OH	Hydroxidgruppe
PBS	Phosphate Buffered Saline, pH 7,4
PCR	Polymerase Chain Reaction
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
pg	Pikogramm
PLLA	Poly L lactid acid
pH	potentia Hydrogenii
PVA	Poly-Vinyl-Alkohol
RDG	Arginin-Glycin-Aspartat
rpm	Rounds per minutes
s	Sekunde
-SH	Sulfhydrylgruppe
SINE	Short Interspersed Element
SMA	Smooth Muscle actin
Std	Stunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-Puffer	Tris Buffered Saline, pH 7,4
TRIS	Tris [Hydroxymethyl]amino-methane
U/mg	Einheiten pro Milligramm
UV	Ultraviolett
V	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vim	Vimentin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
YIGSR	Tyrosin-Isoleucin-Glycin-Serin-Arginin

8.Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Dr. med Jörg-Matthias Pollok bedanken. Über all die Jahre stand er mir sowohl bei medizinischen als auch bei persönlichen Problemen zur Seite, hatte stets ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme und nahm jede Verzögerung bei der Fertigstellung dieser Arbeit verständnisvoll in Kauf. Mein weiterer Dank gebührt dem ganzen Labor-Team, vor allem den Mitarbeitern, die zu Beginn dieser Arbeit dazuzählten. In erster Linie ist hier mein Betreuer Dr. med. Marc Lütgehetmann zu nennen, der an der Realisierung dieser Doktorarbeit maßgeblich beteiligt war und Silke Brillhof, die mich mit unendlicher Geduld eingearbeitet hat.

Und zum Schluß natürlich Daniel. Für alles.

10. Erklärung

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

.....

