

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

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

**Heterotope Transplantation von mittels Tissue Engineering  
erzeugten Hepatozytenspheroiden in zweidrittelhepatektomierte  
Ratten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Christian Cordes

aus Stade

Hamburg im Sommer 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

7. Juli 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Priv. Doz. Dr. J.-M. Pollok

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Priv. Doz. Dr. J. Petersen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Priv. Doz. Dr. P. Adamietz

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Seite

---

1. Einleitung	
1.1 Probleme des Organ- oder Gewebeversagens.....	01
1.2 Probleme des Organmangels in Deutschland.....	01
1.3 Was ist Tissue Engineering?.....	01
1.4 Geschichte des Tissue Engineering.....	02
1.5 Ziele des Tissue Engineering.....	02
1.6 Matrices.....	03
1.7 Welche Gewebe können „tissue engineer“ werden?.....	03
1.8 In vitro Kultursysteme.....	04
1.9 Entwicklung im Bereich Hepatozytentransplantation.....	04
1.10 Arbeitshypothese und Fragestellung .....	05
2. Material und Methoden	
2.1 Isolation von Hepatozyten.....	07
2.1.1 Vorbereitungen für die Isolation .....	07
2.1.2 Vorbereitung der Grundlösungen.....	07
2.1.3 Herstellung der Perfusionslösungen.....	08
2.1.4 Aufbau der Perfusionsapparatur.....	09
2.1.5 Vorbereitung der Perfusionsapparatur.....	09
2.1.6 Beschaffung der Spenderorgane.....	09
2.1.7 Leberperfusion in situ.....	09
2.1.8 Lösen der Hepatozyten aus der verdauten Leber.....	12
2.1.9 Qualitätsüberprüfung.....	12
2.2 Probengruppen.....	13
2.2.1 Besiedelung der PLLA-Polymere.....	13
2.2.2 Herstellung eines „Hormon Stimulierten Mediums“ (HSM).....	13
2.2.3 Zusammenbau des Flussbioreaktors und Einbringen der besiedelten Polymere.....	13
2.2.4 Auswertung der kultivierten Polymere mit dem Phasenkontrastmikroskop.....	14

2.3	Kontrollgruppen.....	15
2.3.1	Besiedelung der Polymere.....	15
2.4	Implantation der Polymere in die Ratte .....	15
2.4.1	Beschaffung der Empfängertiere.....	15
2.4.2	Benötigtes Material für die Operation (OP).....	15
2.4.3	Operationstechnik.....	16
2.5	Zweidrittelhepatektomie in der Ratte.....	18
2.5.1	Einteilung der Tiere zur Zweidrittelhepatektomie.....	18
2.5.2	Operationstechnik.....	18
2.6	Explantation der Polymere aus der Ratte.....	19
2.6.1	Benötigtes Material.....	19
2.6.2	Operationstechnik.....	19
2.7	Präparation der Proben und Kontrollen für die histolog. Aufarbeitung.....	20
2.7.1	Polymerverarbeitung.....	20
2.7.2	Herstellen von Paraffinschnitten.....	21
2.7.2.1	Benötigtes Material.....	21
2.7.2.2	Fixierung der explantierten Polymere.....	21
2.7.2.3	Entwässerung des fixierten Polymers.....	21
2.7.2.4	Schneiden des Paraffinblocks.....	22
2.7.2.5	Einstellung der Schnittebene.....	22
2.7.3	Herstellen von Kryoschnitten.....	23
2.7.3.1	Benötigtes Material.....	23
2.7.3.2	Einfrieren der explantierten Polymere.....	23
2.7.3.3	Schneiden der Kryoblöcke.....	23
2.8	Histologische Aufarbeitung.....	24
2.8.1	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE).....	24
2.8.1.1	Benötigte Materialien.....	24
2.8.1.2	Durchführung der Färbung.....	24
2.8.2	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS).....	25
2.8.2.1	Benötigte Materialien.....	25
2.8.2.2	Durchführung der Färbung.....	25
2.8.3	Hepatozytenfärbung.....	26
2.8.3.1	Benötigte Materialien.....	26
2.8.3.2	Durchführung der Färbung.....	26

2.8.4	Cytokeratin (CK) 18-Färbung.....	27
2.8.4.1	Benötigte Materialien.....	27
2.8.4.2	Durchführung der Färbung.....	27
2.9	Auswertung der PAS-Färbung mit Lucia M.....	28
2.9.1	Eichung von Lucia M.....	28
2.9.2	Messen mit Lucia M.....	28
2.10	DNA-Messung mit DyNA-Quant.....	29
2.10.1	Vorbereitung der Lösungen.....	29
2.10.2	Vorbereitung der Proben.....	30
2.10.3	DNA-Assay.....	30
3.	Ergebnisse	
3.1	Gewinnung der Hepatozyten.....	32
3.2	Besiedelung der Polymere.....	32
3.3	Probengruppen.....	32
3.3.1	Kultivierung im Flussbioreaktor.....	35
3.3.2	Mediumwechsel.....	40
3.4	Kontrollgruppen.....	40
3.5	Implantation der Polymere in die Ratte.....	43
3.6	Explantation der Polymere aus den Ratten.....	43
3.7	Präparation der Proben und Kontrollen für die histolog. Aufarbeitung.....	44
3.8	Histologie.....	44
3.8.1	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE).....	44
3.8.2	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS).....	44
3.8.3	Immunhistochemische Färbung mit dem Hepatocyte Antikörper... ..	47
3.8.4	Immunhistochemische Färbung mit dem CK 18-Antikörper.....	47
3.9	Auswertung der Zelloberfläche mit dem Image Analyzer.....	49
3.10	DNA-Messung.....	70
3.10.1	DNA-Messung der kultivierten Polymere.....	70
3.10.2	DNA-Messung von mit 400 µl Zellsuspension besiedelten Polymeren.....	71
3.10.3	DNA-Messung von 400 µl Zellsuspension.....	71
3.10.4	DNA-Messung von 100 µl Zellsuspension.....	72
3.10.5	DNA-Messung von 25 µl Zellsuspension.....	72

3.10.6 Messung des DNA-Gehaltes eines besiedelten Polymers zusammen mit dem Rest von 400 $\mu$ l Zellsuspension.....	73
3.10.7 Messung der verbliebenen Zellsuspension nach Besiedelung mit 400 $\mu$ l Zellsuspension.....	73
4. Diskussion.....	75
5. Zusammenfassung.....	83
6. Literaturverzeichnis.....	84
7. Danksagung.....	89
8. Lebenslauf.....	90
9. Erklärung.....	91

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	= Avidin-Biotin-Complex
AP	= Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	= Aqua destillata
Best. Nr.	= Bestellnummer
ca.	= zirka
CaCl <sub>2</sub>	= Calciumchlorid
Cat. No.	= Katalognummer
Ch	= Charrière (1 Ch = 1/3 mm)
CK	= Cytokeratin
dd H <sub>2</sub> O	= Aqua bidestillata
DK	= Dänemark
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
EDTA	= Ethylene diamine Tetraacetic acid
EGTA	= Ethylene Glycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraacetic acid
et al.	= et alii
g	= Gramm
HCl	= Salzsäure
HE	= Hämalaun-Eosin-Färbung
HEPES	= (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
HSM	= Hormon stimuliertes Medium
i.E.	= internationale Einheiten
IgG	= Immunglobulin G
KCl	= Kaliumchlorid
l	= Liter
mg	= Milligramm
min	= Minuten
mM	= millimolar
mm	= Millimeter
mm <sup>2</sup>	= Quadratmillimeter
NaCl	= Natriumchlorid



NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	= Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaOH	= Natronlauge
ng	= Nanogramm
O <sub>2</sub>	= Sauerstoff
OP	= Operation
PAS	= Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	= phosphate buffered saline, pH 7,4
PLLA	= poly-L-lactic acid
SDS	= Sodium-dodecyl-sulfat
TNE	= Tris, NaCl, EDTA
Tris	= Tris [Hydroxymethyl]amino-methane
USA	= Vereinigte Staaten von Amerika
°C	= Grad Celsius

## **1. Einleitung**

### 1.1 Probleme des Organ- oder Gewebeversagens

Jedes Jahr leiden Millionen von Menschen an Gewebeversagen oder Organversagen im Endstadium. Die Kosten allein für das Gesundheitssystem der USA übersteigen dabei 400 Billionen Dollar pro Jahr und es werden jährlich 8 Millionen Operationen durchgeführt, um diese Krankheiten zu therapieren.<sup>[20]</sup> So kostet die Therapie einer Lebererkrankung im Endstadium je nach Therapieform zwischen durchschnittlich 37.684 € pro Jahr für die Behandlung mit einem transjugularem intrahepatischen portosystemischen Shunt und im Durchschnitt 111.150 € pro Jahr für eine Lebertransplantation.<sup>[46,48]</sup>

### 1.2 Probleme des Organmangels in Deutschland

In Deutschland warten derzeit ca. 14.000 Menschen auf ein neues Organ. Im Jahr 2000 wurden 3.571 Organspenden in Deutschland durchgeführt. Davon waren 3.135 postmortale Organspenden und 436 Lebendspenden (Niere oder Teilleber). Dennoch verstarben in den Jahren 1996-2002 1.996 Menschen auf der Warteliste für eine Herztransplantation und 1.017 Menschen auf der Warteliste für eine Lebertransplantation. Dies zeigt die enorme Bedeutung des Organmangels in Deutschland.<sup>[7]</sup>

### 1.3 Was ist Tissue Engineering?

Alle Operationen, die das Ziel haben fehlendes oder defektes Gewebe in Patienten zu ersetzen, brauchen bestimmte Strukturen oder Gewebe, um das defekte Gebiet oder das defekte Organ zu ersetzen. Der Ersatz kann zum einen durch künstliche Strukturen, wie zum Beispiel Herzklappen, erfolgen oder durch Gewebe, das von einer anderen Stelle des Patienten gewonnen wird, wie zum Beispiel bei der Spalthauttransplantation, oder von anderen Patienten, zum Beispiel durch eine Lebertransplantation.<sup>[21]</sup> Eine neue Alternative zu den sich bereits im klinischen Einsatz befindlichen oben genannten Beispielen ist Tissue Engineering: Ein interdisziplinäres Feld, das versucht, die Prinzipien des Ingenieurwesens mit denen der Medizin zu verbinden, um biologischen Gewebersatz zu gewinnen, der die Funktionen des verlorenen Gewebes wiederherstellen, erhalten oder sogar verbessern kann.<sup>[20]</sup>

#### 1.4 Geschichte des Tissue Engineering

Erste Versuche des Tissue Engineering wurden bereits 1933 gestartet, als Bisceglie Maustumorzellen in eine Polymermembran einschloss und in die Bauchhöhle von Schweinen transplantierte. Die Zellen lebten lange genug, um zu zeigen, dass sie nicht vom Immunsystem zerstört wurden.<sup>[5]</sup>

1975 kapselten Chick et al. Inselzellen des Pankreas in semipermeable Membranen ein, um den Glucosespiegel bei Patienten mit Diabetes mellitus zu kontrollieren.<sup>[6]</sup>

In den frühen 80er Jahren wurden mehrere Untersuchungen zum Thema Hautregeneration durch Zellen in Kollagengelen oder Kollagen-Glykosaminoglykan Gemischen durchgeführt. Derartige Techniken sind heute im klinischen Einsatz.<sup>[4]</sup>

Der nächste große Fortschritt war die Erkenntnis, dass dreidimensionale Stützgerüste dazu führten, dass sich implantierte Zellen zu vaskularisiertem Gewebe in vivo ausbildeten. Synthetische abbaubare Polymere wurden als Matrix der Zellen zum Ausbilden dauerhafter Gewebe genutzt. Die Polymere waren hoch porös, um eine möglichst große Zahl an Zellen aufnehmen zu können. Durch die sich anschließende Angiogenese bildeten sich permanente Gewebe aus.<sup>[45]</sup>

#### 1.5 Ziele des Tissue Engineering

Das gemeinsame Ziel aller Forschungsarbeiten ist es, die Funktion eines Gewebes durch die Entwicklung vitaler Strukturen wiederherzustellen, die dann auch noch vollständig in den Patienten integriert werden können. Dabei wurde einerseits versucht, nur auf die Verwendung von Matrices zu setzen, andererseits nur auf die Zellen. Es zeigt sich jedoch immer mehr, dass das viel versprechendste Modell um neue Gewebe zu erzeugen die Kombination von Matrices mit Zellen ist. Daneben gibt es auch Versuche, die Gewebe mit einer eigenen vaskulären Versorgung auszustatten und die Vorkultivierung der Zellen in einem Bioreaktor.<sup>[33,39,40]</sup> Es wurden sowohl Systeme entworfen, die komplett offen sind, als auch solche, die komplett in den Patienten integriert wurden, oder abgekapselte, um die Immunabwehr des Patienten zu umgehen. Außerdem wurden Systeme getestet, die konstant Medikamente freisetzen, um die Angiogenese zu beschleunigen oder die Zellneogenese zu intensivieren.<sup>[44]</sup>

## 1.6 Matrizes

Die meisten der verwendeten Materialien, die als Matrizes oder zur Umkapselung von Zellen genutzt werden, sind synthetisch hergestellt, wie zum Beispiel aus Polyglykolsäure oder Polyacrylonitrilpolyvenylchlorid, oder auch natürlich, wie Kollagen, Hydroxylapatit oder Alginate. Erstgenannte haben den Vorteil, dass die Materialeigenschaften, wie Stärke, Abbau, Mikrostruktur und Permeabilität, relativ gut beeinflusst werden können, während natürliche Materialien Vorteile in der Zellinteraktion und im Adhäsivverhalten haben. Ein Zweig der Forschung untersucht die Möglichkeit, die positiven Eigenschaften der natürlichen Materialien mit denen der synthetischen zu verbinden.<sup>[3,27]</sup>

Die Matrizes, die in „tissue engineerten“ Geweben genutzt werden, sollten biokompatibel sein und den biologischen und nutritiven Ansprüchen der Zellen des konstruierten Gewebes genügen. Viele Versuche sind mit synthetischen biologisch abbaubaren Polymeren durchgeführt worden. Für bestimmte Gewebe müssen diese Polymere gute mechanische Eigenschaften besitzen und eine spezielle Form, die sich möglichst auch nach der Transplantation als stabil erweist, um eine gewünschte Gewebestruktur zu erreichen. Zunächst wurden Polymere aus Polyglykolsäure verwendet,<sup>[45]</sup> die sich durch hochspezifische Herstellbarkeit von Strukturen, wie sie zum Beispiel beim Erstellen von Strukturknorpel gewünscht wird auszeichnen.<sup>[43]</sup> Im letzten Jahrzehnt wurden dann spezielle Matrizes entwickelt, die zum Beispiel das Einsprossen von Blutgefäßen<sup>[28]</sup> oder das Herstellen spezieller Knorpelformen zum Beispiel zum Erzeugen neuer Ohrläppchen<sup>[42]</sup> oder sogar Knorpelgerüsten für Herzklappen<sup>[37]</sup> ermöglichen.

Poröse Alginat-Hydrogele zeichnen sich dadurch aus, dass sie von der flüssigen in die Gelphase übergehen können und eignen sich daher besonders für den Einsatz in der Kathetertechnik, da sie über Katheter appliziert werden können.

## 1.7 Welche Gewebe können „tissue engineert“ werden?

Fast jede Zellart des menschlichen Körpers wurde bereits auf die Möglichkeit des Tissue Engineering untersucht, und die meisten Studien wurden mit einer speziellen Zellart durchgeführt. Für klinische Anwendungen werden die Zellen meistens vom Patienten selbst gewonnen. So ist zum Beispiel die autologe Chondrozytentransplantation zur Knorpelschadentherapie im Knie bereits in der klinischen Anwendung.<sup>[23]</sup> Im Falle von „tissue engineert“ Haut wurden neonatale

dermale Fibroblasten benutzt. Um Zellen zu gewinnen, wäre eine Quelle mit einer möglichst großen Auswahl von verschiedenen Zellen wünschenswert. Ein Versuch, um die Zellknappheit zu beseitigen, wäre die Benutzung von humanen Stammzellen. Diese Zellen, die sich in viele verschiedene Zellarten differenzieren können, wären dazu geeignet. Es konnten schon einige Erfolge mit der Arbeit von Stammzellen in Kombination mit Tissue Engineering auf dem Gebiet der Knorpel, Knochen und Muskelerzeugung erzielt werden. Progenitor Zellen wurden entdeckt, die durch eine Änderung der Kulturbedingungen vor Transplantation sich sowohl in Knorpel- als auch in Knochenzellen differenzieren können. Zusätzlich wurden kleine ovale Leberzellen entdeckt, die sich ebenfalls in Kultur sowohl in Hepatozyten als auch in Gallengangsepithelzellen differenzieren können.<sup>[25]</sup>

### 1.8 In vitro Kultursysteme

Die meisten der frühen Arbeiten im Bereich Tissue Engineering basierten auf statischen Zellkulturen, um Gewebe für die Implantation herzustellen. Es zeigte sich aber bald, dass Flusssysteme die Qualität bestimmter Gewebearten, wie zum Beispiel Knorpel, verbessern können.<sup>[47]</sup> Der Gebrauch von Flussbioreaktoren kann dazu beitragen, größere Mengen an Zellen als mit statischen Systemen zu kultivieren. Weiterhin kann der Fluss dazu genutzt werden, den Transfer von Reagenzien, Gasen und Metaboliten zu steuern, sowie die Größe der entstehenden Gewebe zu beeinflussen.<sup>[40]</sup> Daneben können Bioreaktoren dazu dienen, mechanische Regulationssignale, wie direkt ausgeübten Druck, weiterzuleiten und somit zum Beispiel die Eigenschaften von Knorpel zu verbessern. Auch wurde bereits gezeigt, dass „tissue engineerte“ Blutgefäße unter pulsatilem Fluss besser wachsen als unter statischen Bedingungen.<sup>[28]</sup>

### 1.9 Entwicklung im Bereich Hepatozytentransplantation

Bereits 1931 konnten Higgins und Anderson zeigen, dass sich nach einer Zweidrittelhepatektomie in der Ratte das Lebergewebe innerhalb von 10 Tagen komplett regeneriert.<sup>[12]</sup> Auf diesem wichtigen Tiermodell basiert praktisch die gesamte Forschung zum Thema Leberregeneration. 1980 wurden von Jirtle et al. Hepatozyten in die Rückenfaszie von Fischer-344-Ratten gespritzt. Sie überlebten für mindestens drei Monate und zeigten in dieser Zeit auch metabolische Aktivität.<sup>[14]</sup> 1981 konnten Kusano und Mito zeigen, dass in die Rattenmilz

transplantierte Rattenhepatozyten für mindestens 16 Monate ihre Funktion beibehielten und sogar proliferierten.<sup>[18]</sup> 1993 transplantierten Uyama et al. eine Zahl von Hepatozyten, die einer ganzen Leber entsprächen in das Mesenterium und unter die Haut von Lewis und Gunn Ratten und zeigten damals, dass nach einer Woche durchschnittlich zwischen 10,8% und 18% der Hepatozyten sich angesiedelt hatten und funktionierten.<sup>[41]</sup> 1995 transplantierten Ballardur et al. allogene Hepatozyten in das Peritoneum von Ratten und konnten durch eine semipermeable Membran eine Immunreaktion auf die fremden Zellen verhindern, so dass diese ohne Immunsuppression für über drei Monate überlebten.<sup>[2]</sup>

Bereits 1991 konnten Matsushita et al. nachweisen, dass kugelförmige multizelluläre Aggregate aus Hepatozyten, so genannte Spheroide eine weitaus höhere Albuminproduktion aufwiesen als Hepatozyten, die in einem normalen Monolayer wuchsen.<sup>[22]</sup> 1992 führten Tong et al. dann einen Versuch mit einer Langzeitkultur von Spheroiden aus adulten Rattenhepatozyten durch. Dabei behielten die Zellen metabolische Funktionen, wie Albuminsekretion oder Transferrinsekretion, in der Kultur für 2 Monate.<sup>[38]</sup> 1994 untersuchten Peshwa et al. die Kinetik von Spheroiden aus Hepatozyten auf verschiedenen Oberflächen und fanden heraus, dass die Bildung der Spheroide 3 bis 4 Tage dauert und in dieser Zeit eine um bis zu vier mal höhere Albuminproduktion aufwiesen als nicht aggregierte Hepatozyten.<sup>[31]</sup> 1997 zeigten Pollok et al., dass unter kontinuierlichem Fluss im Bioreaktor sich auf biologisch abbaubaren Polymeren Spheroide aus Hepatozyten bildeten. Diese Polymere eigneten sich im Gegensatz zu den vorher verwendeten Matrices erstmals zur Transplantation der Zellen, da sie zum einen biologisch abbaubar sind und zum anderen ein mutmaßlich besseres Überleben der ausgesiedelten Hepatozyten ermöglichen.<sup>[33]</sup>

#### 1.10 Arbeitshypothese und Fragestellung

Schon seit über 20 Jahren wurden Versuche unternommen, Hepatozyten zu transplantieren. Das größte Problem in der bisherigen Forschung bestand darin, dass die transplantierte Zahl an Zellen in keinem Verhältnis zu den Zellen stand, die die Transplantation langfristig überlebten.

Daher wurden verschiedene Techniken erdacht, den Verlust an Zellen so gering wie möglich zu halten. Eine dieser Ideen ist die Entwicklung eines

Flussbioreaktorsystems, in dem die Zellen einige Zeit vor der Transplantation kultiviert werden können und sich zu Spheroïden ausbilden, um so die Zahl an überlebenden Zellen zu erhöhen und deren Funktionen besser aufrecht zu erhalten. Dazu wurden Hepatozyten auf PLLA-Polymeren<sup>[27,40]</sup> ausgesiedelt und dann für 3 Tage im Flussbioreaktor kultiviert.

Um das Verhalten derartig vorbehandelter Zellen in vivo zu prüfen, wurden die Polymere anschließend in Mesenterialtaschen von zum Spender genetisch identischen Ratten transplantiert. Um den Zellen auch in der Ratte weiterhin einen Stimulus zur Teilung zu geben, wurde bei der Hälfte der Empfängerratten eine Zweidrittelhepatektomie vorgenommen.<sup>[9]</sup> Nach genau definierter Zeit in der Empfängerratte wurden die Polymere explantiert. Es wurden 4 verschiedene Zeitpunkte nach Transplantation gewählt: 1 Woche, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate.

Als Kontrollgruppen dienten Tiere, in die Polymere implantiert wurden, die direkt nach der Besiedelung mit Hepatozyten transplantiert wurden, sowohl mit, als auch ohne Zweidrittelhepatektomie.

Die Zellen mitsamt ihren Polymeren wurden schließlich den Tieren entnommen und der histologischen Untersuchung zugeführt. Dabei wurden Schnitte der entnommenen Polymere sowohl mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) untersucht, als auch immunhistochemisch gefärbt. Dazu wurden Hepatozytenantikörper und Antikörper gegen Cytokeratin 18 verwendet. Die PAS gefärbten Schnitte wurden quantitativ in Bezug auf die Hepatozytenoberfläche mittels Image Analyzer ausgewertet. Außerdem wurde der DNA-Gehalt der Polymere vor und nach Kultivierung im Flussbioreaktor mittels DyNA-Quant bestimmt.

In der vorliegenden Studie soll nun untersucht werden, wie sich die transplantierten Zellen im Hinblick auf ihre Quantität, aber auch auf ihre Funktion und Morphologie verhalten und ob die Vorkultivierung im Flussbioreaktor einen positiven Einfluss auf die Zahl oder Funktion der in vivo überlebenden Zellen hat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Isolation von Hepatozyten

#### 2.1.1 Vorbereitungen für die Isolation

Am Vortag Sterilisieren von:

- 4 x 0.5-Liter Glasflaschen mit Schraubdeckel (blau) für die Perfusionslösungen
- 4 x 0.5-Liter Glasflaschen mit Schraubdeckel (weiß) für das Kulturmedium
- Plastiktrichter, bespannt mit Nylongewebe mit 200 µm Maschen
- OP-Instrumente Set 1: 2 Klemmen, 2 Scheren, 2 Pinzetten, 2 Feinpinzetten,  
1 Feinschere, Faden, Tupfer, Wattestäbchen, 1 Klemme
- OP-Instrumente Set 2: 1 Pinzette, 1 Schere

Am Perfusionstag Ansetzen der Perfusionslösungen (eventuell pH-Meter eichen) und Aufbauen der Perfusionsapparatur.

#### 2.1.2 Vorbereitung der Grundlösungen:

##### Leffert's stock buffer :

1000 ml Lösung enthalten

- 23,83 g HEPES Puffer (=100 mM)
- 2,24 g KCl
- 75,87 g NaCl
- 1,38 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- H<sub>2</sub>O (Merck 1.06346)
- 18,02 g alpha-D-Glucose
- Aqua dest. (Apotheke Eppendorf, Best. Nr. 44616)
- der pH-Wert wird mit einmolarer NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt
- Bei 4°C lagern

##### EGTA Lösung:

Zu 100 ml 10 x Leffert's buffer werden 800 ml dd H<sub>2</sub>O und 1,9 g EGTA zugegeben. Die Lösung wird mit 5 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und solange gerührt, bis Trübungen verschwunden sind, dann mit dd H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und steril gefiltert. Die Konzentration sollte 5 mM sein und die Lösung sollte bei Raumtemperatur gelagert werden.



### CaCl<sub>2</sub> Lösung:

Man erhält eine 2,79 %ige CaCl<sub>2</sub>-Lösung, indem 14 g CaCl<sub>2</sub> zu 500 ml dd H<sub>2</sub>O gegeben werden. Auch diese Lösung steril filtern und bei Raumtemperatur lagern.

### 2.1.3 Herstellung der Perfusionslösungen

Sie werden kurz vor dem Verbrauch oder am Tag davor hergestellt, dann muss aber der pH-Wert neu eingestellt werden.

### Pre-perfusion buffer

Zu 54 ml 10 x Leffert's buffer werden 60 ml 5mM EGTA Lösung gegeben und mit dd H<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt. PH-Wert auf 7,4 einstellen und Volumen auf 600 ml bringen. Steril filtern und im Wasserbad auf 37°C erwärmen. Lagerung bis Gebrauch bei 4°C. ½ Stunde vor der Kollagenaselösung ins Wasserbad geben.

### 1 x Leffert's buffer

Zu 50 ml Leffert's buffer 400 ml dd H<sub>2</sub>O geben und den pH-Wert auf 7,4 einstellen. Volumen auf 500 ml bringen, steril filtrieren und im Wasserbad auf 37°C erwärmen.

### Collagenase-Lösung

Zu 50 ml 10 x Leffert's buffer werden 400 ml dd H<sub>2</sub>O und 5 ml CaCl<sub>2</sub> (2,97 %) gegeben. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt und das Volumen auf 500 ml gebracht (in diesem Zustand kann sie bei 4°C gelagert werden).

500 µl Trypsininhibitor (= 7,5 mg; ICN 101113), sowie 125 mg Collagenase (Worthington LS 04176-1 g, LS 04177-5 g Cat. No. M9B2743, Lagerung bei -20°C) zugegeben und steril filtern. Vor Benutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmen und innerhalb von 20 Minuten verwenden.

Bei beiden Lösungen ist das Lösungsmittel dd H<sub>2</sub>O (Millipore). Beide Lösungen werden durch einen 0,2 µm Filter (+Filterscheibe bei Collagenase-Lösung) filtriert (Bottle Top Filtersystem von Costar, 0,2 µm, 45 mm neck size, 500 ml funnel Cat. No. 8380).

#### 2.1.4 Aufbau der Perfusionsapparatur

Die Perfusionsapparatur besteht aus einem Wasserbad (Julabo E07 Typ HC-2/8, siehe Abbildung 2/1) zum Anwärmen der Lösungen auf 37,0 °C und einer Pumpe (Digi-Saltic Cat. No. 7526/05). Für die Perfusion mit Pufferlösungen und Collagenaselösung wird ein Schlauchsystem verwendet. In diesem System ist eine Luftfalle eingebaut, es gibt einen Rückfluß zu der Lösungsflasche. Die Apparatur wird 1 Stunde vor Beginn der Leberperfusion auf 38,0°C Wasserbadtemperatur angewärmt, die Flußrate bei der Rattenleberzellisolierung beträgt während der ganzen Perfusion 30 ml/min (Kalibirierung).

#### 2.1.5 Vorbereitung der Perfusionsapparatur

Erst den Alkohol aus dem Schlauchsystem in die entsprechenden Flaschen entleeren. Ansaugschläuche (Bronchialis S Absaugkatheter gerade Ch 16 = 5,3 mm, Length 060, Cat. No. 6886, Steridan DK-3390 Hundested) aufstecken. Dann wird die Perfusionsapparatur mit ca. 300 ml dd H<sub>2</sub>O gespült. Während des Spülens Flussrate auf 30 ml/min eichen (Geräteeinstellung ca. 2,20-2,40). Anschließend wird das Perfusionssystem komplett entleert. Der Ansaugschlauch wird in die Pre-perfusion Flasche gesteckt. Nun wird die ganze Perfusionsapparatur mit Pre-perfusion buffer geflutet und die Luftfalle aufgefüllt. Durch Beklopfen Luftblasen entfernen. Drei Minuten das System spülen und dabei die Pufferlösung verwerfen. Braunüle anschließen und in Pufferlösung stecken.

#### 2.1.6 Beschaffung der Spenderorgane

Erwachsene, männliche Lewis Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250–350 g dienten als Spendertiere für die benötigten Hepatozyten (Tierversuch Nummer A43, Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Hamburg). Die Firma Charles River, Deutschland lieferte die Tiere, die bis zum Tag der Operation in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Sicherstellung der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten wurden. Sie unterlagen einem 12–Stunden–Tag–Nacht–Rhythmus und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

#### 2.1.7 Leberperfusion in situ

Das Tier wird mit Äther (Äther zur Narkose, Riedel de Haen, Best. Nr. 24042) in

einem luftdichten Glasgefäß narkotisiert. Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe beginnt die OP mit der Rasur und Desinfektion des Bauches. Im weiteren Verlauf der OP wird die Inhalationsnarkose über einen mit Äther getränkten Tupfer, welcher in einem Falcontube steckt und vor dem Kopf der Ratte platziert wird, fortgeführt. Die Ratte wird auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten mittels Gummibändern fixiert. Danach wird der Bauchraum durch einen V-förmigen Schnitt von der Höhe des Nabels bis zum Rippenbogen eröffnet. Der Hautlappen wird mittels einer kleinen Klemme über dem Kopf der Ratte fixiert. Die Darmschlingen werden mit einem Wattetupfer nach links aus dem Situs geschoben, das Duodenum mit einer Klemme gefasst und diese ebenfalls nach links geklappt. Dadurch werden die Vena cava inferior und der Leberhilus dargestellt. Die Leber wird mit einer feuchten Kompresse nach kranial mobilisiert. Die Vena pylorica und Vena lienalis werden ligiert (5-0 Seide, Resorba, Germany). Das Tier wird durch die Vena cava inferior heparinisiert (500 i.E.; Liquemin N 25000 mit 1 ml = 5000 i.E. Heparin-Natrium, Roche, Tuberkulin-Spritze, 0,4 ml 0,9% NaCl und 0,1 ml Liquemin). Jetzt wird die die Leber anhebende Kompresse zur guten Heparinisierung der Leber gelöst. Anschließend wird eine Klemme zur Sicherung der später eingeführten Braunüle kranial der Vena pylorica um die Vena porta vorgelegt. Die Vena porta wird nun kaudal der Vena lienalis ligiert. Nun wird eine Inzision etwa in Höhe der Pylorusvene vorgenommen und eine Braunüle (Vasofix 17G, Braun Cat. No. 04268156) unter Fluß der Perfusionslösung eingeführt. Die Perfusion wird nun unterbrochen. Dann wird die proximale Klemme kurz geöffnet und zur Fixierung der Katheterlage wieder geschlossen. Schließlich wird die infrahepatische Vena cava inferior eröffnet, damit die Perfusionslösung das Gefäßsystem verlassen kann und es keinen Stau gibt. Danach wird die Perfusion wieder begonnen und die Stoppuhr gestartet.

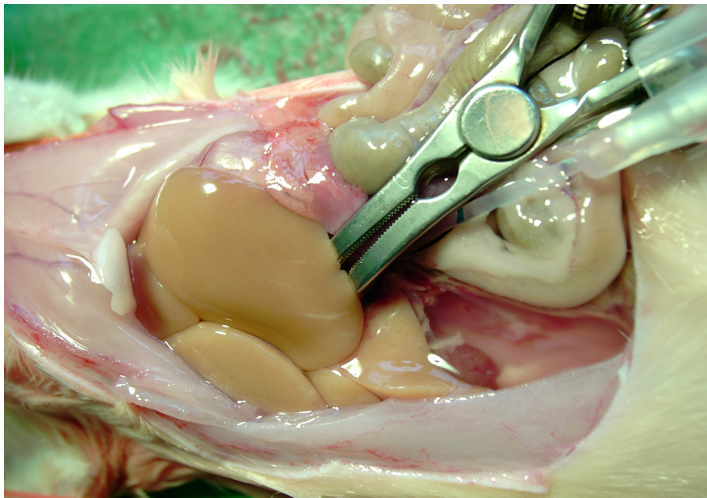
Die Leber wird 4 Minuten mit Pre-perfusion buffer, etwa 2 Minuten mit 1 x Leffert's buffer und danach 10-15 Minuten mit Collagenaselösung perfundiert. Während der Pufferperfusion müssen die Leberlappen mobilisiert werden. Nach der Perfusion wird die Leber freipräpariert, mit der Pinzette am Stumpf der Vena cava gefasst und in 20 ml Williams Medium E (Gibco BRL Cat. No. 22551-022; ohne L-Glutamin) in ein 50 ml Röhrchen auf Eis überführt (Costar Cat. No. 6751). Ein Bild einer perfundierten Leber zeigt Abbildung 2/2.

**Abbildung 2/1 – Aufbau der Perfusionsapparatur**



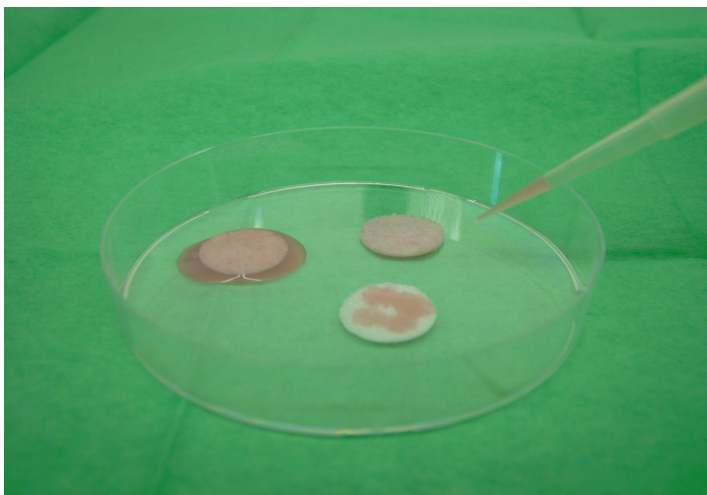
Fotografie der Perfusionsapparatur und des Wasserbades. Im Wasserbad werden die Lösungen angewärmt. Die Perfusionsapparatur pumpt die Lösungen dann durch die Rattenleber.

**Abbildung 2/2 - Hepatozytenisolation**



Die Ratte wurde rücklings auf dem OP - Tisch fixiert. Eine V-förmige Laparotomie wurde durchgeführt und die Vena Porta kannüliert. Dann wurde die Leber perfundiert. Sie nahm eine braungelbe Farbe an, als das Blut herausgespült wurde.

**Abbildung 2/3 Besiedelung der Polymere**



Mit einer Pipette werden je 4 x 100  $\mu$ l Zellsuspension auf das Polymer gebracht, um es homogen zu besiedeln. Die besiedelten Polymere wurden bis zur Implantation auf Eis gelagert.

### 2.1.8 Lösen der Hepatozyten aus der verdauten Leber

Die verdaute Leber wird auf einer Petrischale (100 x 15 mm, Falcon Cat. No. 4-1029/3) auf Eis nach Einschnitten in der Kapsel (2-3 pro Leberlappen) oder Abschälen der Kapsel für etwa 4-5 Minuten sanft ausgeschüttelt, die entstandene Zellsuspension wird durch ein Nylongewebe mit 200 µm Maschen (Hydro-Bios, Cat. No. 162) in ein neues Röhrchen filtriert, das Gewebe wird anschließend noch mit 10 ml Medium gespült.

### 2.1.9 Qualitätsüberprüfung

Die Anzahl der Hepatozyten wird ermittelt und die Überlebensrate mit Trypan-Blue bestimmt. Hierzu werden 100 µl der Zellsuspension mit 800 µl Medium verdünnt und mit 100 µl 0,5%iger (gefilterter) Trypanblau-Lösung (Merck, Germany, Cat. No. K17825632) in einem Eppendorf-Röhrchen gemischt, ein Tropfen wird auf dem Neubauer-Objekträger (Neubauer Zählkammer O, 100 µm Tiefe, 0,0025 mm<sup>2</sup>, Assistent) unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Überlebensrate sollte über 80 % liegen, die Zellzahl über 10<sup>8</sup> Zellen liegen. Nach der Herstellung der Zellsuspension wird die 1. Zählung vorgenommen. Sie dient der Feststellung der Vitalität sowie der Zellzahl pro ml (vitale Zellen x 10<sup>5</sup>). Danach folgen ein bis zwei weitere Zentrifugierschritte. Vor dem Letzten wird erneut gezählt und die gewünschte Zellkonzentration von 1 x 10<sup>7</sup>/ml eingestellt.

Die Formel lautet:  $\text{Volumen alt} \times \text{Konzentration alt} / 10^7 = \text{Volumen neu}$

Einstellung der Zentrifuge:

Accel	Speed	Brake	Time	Temp
3	500	5	2	4

Nullwertbestimmung:

Aus der Endkonzentration werden 4 Stück 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit jeweils 400 µl Zellsuspension gefüllt und in der Ultrazentrifuge mit folgenden Einstellungen zentrifugiert:

Accel	Speed	Brake	Time	Temp
3	500	5	5	4

Der Überstand wird verworfen und die Röhrchen bei -80 °C endgelagert.

## 2.2 Probengruppen

### 2.2.1 Besiedelung der PLLA-Polymere

Jeweils 5 biologisch abbaubare PLLA-Polymere von 18 mm Durchmesser und 1 mm Dicke werden steril in einer Petrischale platziert. Die Petrischale wird auf crushed Eis gelagert. Nun werden jeweils 100 µl Lösung in 4 Tropfen à 25 µl auf jedes Polymer gegeben. Nach kurzer Zeit sollte die Suspension von dem Polymer aufgesogen worden sein. Dieser Vorgang wird nun viermal wiederholt, so dass die Polymere vollständig homogen mit Suspension getränkt sind. Einen Überblick über das Besiedeln der Polymere gibt Abbildung 2/3.

### 2.2.2 Herstellung eines „Hormon Stimulierten Mediums“ (HSM)

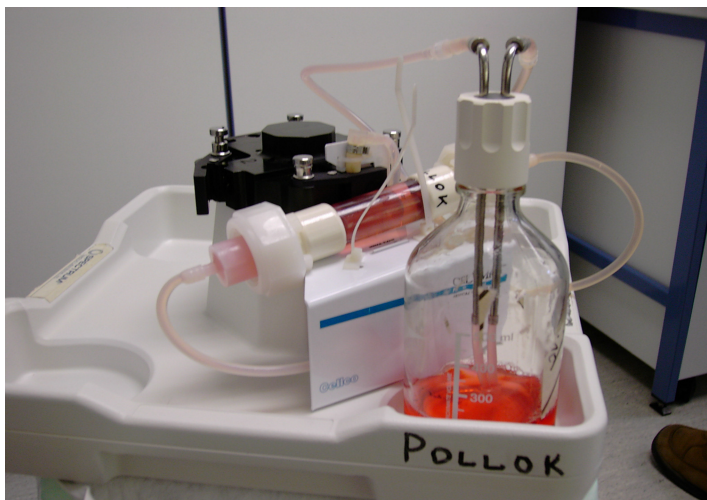
- 1.) 500 ml Williams Medium E without L–glutamine
  - 2.) 5,5 ml N–acetyl–L–alanyl–L–glutamine  
(Biochrom K6; Seromed R; Cat. No.: K 0202; 50 ml)
  - 3.) 11 ml HEPES–Buffer (1M)  
(Biochrom K6; Seromed R; Cat. No.: L 1613; 100 ml)
  - 4.) 5,5 ml Sodium Pyruvat (1mM)  
(Gibco BRL; Cat. No.: 11360–039; 100 ml)
  - 5.) 100 µl Insulin (4 µg/ml; Gibco BRL)
  - 6.) 100 µl Epidermal Growth Factor (10 ng/ml; Gibco BRL)
  - 7.) 50 µl Dexamethason (5nM; Sigma, St. Louis, MO, USA)
  - 8.) 5,5 ml Pen Strip (Penicillin + Streptomycin; 1%; Biochrom, Berlin, Germany)
- ⇒ Ergibt zusammen 527,75 ml Medium

### 2.2.3 Zusammenbau des Flussbioreaktors und Einbringen der besiedelten Polymere

Die Flusskammer wird mit dem Ventilsystem verbunden. Dieses wiederum wird mit dem Ansaugstutzen konnektiert. Die besiedelten Polymere werden mit einer Pinzette aufrecht in einen spiralförmig eingeschnittenen Plastikschauch gesteckt. Der Schlauch wird der Länge nach in die Flusskammer eingeschoben. Nun wird die Flusskammer verschlossen und ebenfalls an den Ansaugstutzen angeschlossen. Der Ansaugstutzen wird in eine mit 260 ml „Hormon Stimuliertem Medium“ gefüllte 0,5 l-Flasche mit Schraubverschluss überführt und das System

wird nun luftdicht verschlossen. Mit dem Ventilgummi kann jetzt vorsichtig das gesamte Schlauchsystem sowie die Flusskammer geflutet werden. Dabei ist darauf zu achten, dass möglichst wenige Zellen von den Polymeren abschwimmen. Der gesamte Flussbioreaktor kann jetzt in einen auf 37° C temperierten Brutschrank überführt werden. Dabei wird das Ventilgummi in den Antriebsbolzen der Pumpmaschine geklemmt, so dass im gesamten Flussbioreaktor ein konstanter Fluss herrscht. Auf diese Weise verbleibt das System für 72 Stunden im Brutschrank. Alle 24 Stunden werden eventuelle Undichtigkeiten des Systems oder Verfärbungen des HSM kontrolliert. Einen Überblick über den Aufbau des Bioreaktors gibt Abbildung 2/4.

**Abbildung 2/4 – Aufbau eines Flussbioreaktors**



Fotographie des Cellmax Quad Bioreactor Systems. In der Kammer des Flussbioreaktors wurden die Polymere quer zur Flussrichtung fixiert. Die Silikonschläuche verbinden die Kammer mit dem Mediumreservoir, das Gasaustausch ermöglicht.

Das gesamte System einschließlich der Pumpe, die für pulsatilen Fluss sorgt, wurde im Brutschrank bei 37°C und 5 % O<sub>2</sub> gelagert.

#### 2.2.4 Auswertung der kultivierten Polymere mit dem Phasenkontrastmikroskop

Nach der Kulturzeit werden die Polymere aus dem Flussbioreaktor entfernt und alle 5 kultivierten Polymere werden kurz in der Übersicht unter dem Mikroskop (Ix50 Inverted System Microscope, Olympus optical GmbH) betrachtet. Das subjektiv schlechteste wird für die Zählung ausgewählt und später der DNA-Messung zugeführt. In jeweils 10 verschiedenen Bildausschnitten werden bei 100facher Vergrößerung sowohl die Anzahl der Polymere pro Bildausschnitt, als auch der Durchmesser eines mittelgroßen Spheroids bestimmt.

## 2.3 Kontrollgruppen

### 2.3.1 Besiedelung der Polymere

Jeweils 4 biologisch abbaubare Polymere werden steril in einer Petrischale platziert. Die Petrischale wird auf crushed Eis gelagert. Nun werden jeweils 100 µl Lösung in 4 Tropfen à 25 µl auf jedes Polymer gegeben. Nach kurzer Zeit sollte die Suspension von dem Polymer aufgesogen worden sein. Dieser Vorgang wird nun viermal wiederholt, so dass die Polymere vollständig homogen mit Suspension getränkt sind.

## 2.4 Implantation der Polymere in die Ratte

### 2.4.1 Beschaffung der Empfängertiere

Erwachsene, männliche Lewis Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250–350 g dienten als Empfängertiere für die gewonnenen Hepatozyten (Tierversuch Nummer 29/99, Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Hamburg). Die Firma Charles River, Deutschland lieferte die Tiere, die bis zum Tag der Operation und auch die Zeit nach der Operation bis zur Explantation in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Sicherstellung der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten wurden. Sie unterlagen einem 12–Stunden–Tag–Nacht–Rhythmus und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

### 2.4.2 Benötigtes Material für die Operation (OP)

- OP-Set: 1 Nadelhalter, 1 Anatomische Pinzette, 1 Chirurgische Pinzette, 1 Cooperschere, 1 Wittgensteinschere
- Wattestäbchen Raucotupf, (Lohmann Rauscher, Germany)
- Isotone Kochsalzlösung, (Baxter, Germany)
- 5 x 5 cm Kompressen, (Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Germany)
- Nahtmaterial: 5-0 Nylon, (Resorba, Germany), 3-0 Mopylen, (Resorba, Germany)
- Petrischale 11 cm, (NUNC, Denmark)
- Sterile Polystyrolpinzette, (J. Söllner GmbH, Deggendorf)
- Luftdichtes Glasgefäß mit Deckel



- Desinfektionsmittel (Cutasept F, Hautdesinfizienz, Bode Chemie, Cat. No. 382)
- Falcontube, (Falcon, Germany)
- OP-Tuch Klinidrape, (Mölnlycke Health Care S. A., Cat. No. 800330-40)
- Novaminsulfon-Ratiopharm, (Ratiopharm, Ulm)
- Diethyläther, (Riedel de Haen, The Netherlands)

### 2.4.3 Operationstechnik

Die Ratte wird mit Äther in einem luftdichten Glasgefäß narkotisiert. Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe beginnt die OP mit der Rasur und Desinfektion des Bauches. Im weiteren Verlauf der OP wird die Inhalationsnarkose über einen mit Äther getränkten Tupfer, welcher in einem Falcontube steckt und vor dem Kopf der Ratte platziert wird, fortgeführt. Die Ratte wird auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten mittels Gummibändern fixiert. Der OP-Zugang erfolgt über eine mediane Laparotomie. Dabei wird in zwei Schritten zuerst nur die Haut eröffnet, um dann die Muskulatur darzustellen und unter Sicht in einem zweiten Schnitt die Bauchhöhle zu eröffnen. Die Wundumgebung wird mit feuchten Kompressen abgedeckt.

Zunächst wird mit zwei Wattestäbchen die Flexura Doudonojejunalis aufgesucht und der Darm rosettenförmig auf dem bereitgelegten feuchten Kompressen ausgebreitet. Das erste Polymer wird auf eine Hälfte der Mesenterialrosette gelegt und die andere Hälfte locker darüber geklappt.

Die so entstandene Tasche wird mit einer fortlaufenden Naht (Mopylen 5/0, Resorba, Germany) fixiert. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Blutgefäße komprimiert werden. Die Taschen werden abwechselnd nach links und rechts in dem Bauchraum platziert.

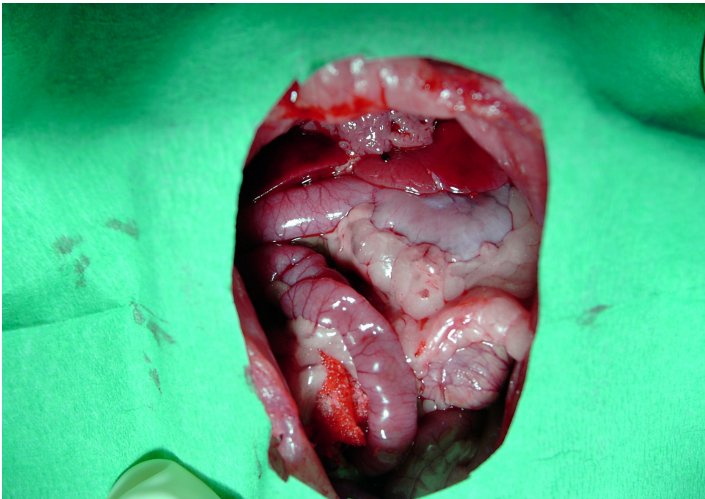
Wichtig ist es, möglichst wenig Darm offen liegen zu lassen, um Wärme- und Flüssigkeitsverluste zu minimieren. Den Darm regelmäßig mit warmer Isotoner Kochsalzlösung feucht halten. Nachdem alle vier Polymere in je eine Tasche implantiert wurden, wird der Ratte ein Tropfen Novaminsulfon-Ratiopharm intraperitoneal mit etwas Flüssigkeit appliziert. Schließlich werden die Muskulatur und die Haut getrennt jeweils mit einer fortlaufenden Naht (Prolene 3/0, Resorba, Germany) vernäht. Ein in eine Darmschlinge eingenähtes Polymer zeigt Abbildung 2/5.

**Abbildung 2/5 – Polymerimplantation in die Ratte**



Die Abbildung 2/5 zeigt eine aus Dünndarm gebildete Tasche, in die ein Polymer eingenäht wurde.

**Abbildung 2/6 – Situs einer zweidrittelhepatektomierten Ratte**



Das Foto zeigt oben in der Mitte den verbleibenden Teil der Leber sowie den Reststumpf der entnommenen Lappen.

**Abbildung 2/7 – Aus zweidrittelhepatektomierter Ratte entferntes Lebergewebe.**



Abbildung 2/7 zeigt die aus der Ratte entfernten Mittellappen und den linken Seitenlappen der Leber.

## 2.5 Zweidrittelhepatektomie in der Ratte

### 2.5.1 Einteilung der Tiere zur Zweidrittelhepatektomie

Alle Ratten aus der Probengruppe A und der Kontrollgruppe A mussten sich zusätzlich zur Implantation der Polymere einer Zweidrittelhepatektomie unterziehen.

### 2.5.2 Operationstechnik

Die Rattenleber besteht aus vier Hauptlappen. Diese sind der Mittellappen, der durch eine longitudinale Fissur in den rechten und linken Mittellappen geteilt wird, der rechte Seitenlappen, der durch eine transversale Fissur in den vorderen und hinteren rechten Seitenlappen geteilt wird, der linke Seitenlappen und der Unterlappen.

Die Ratte wird mit Äther in einem luftdichten Glasgefäß narkotisiert. Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe beginnt die OP mit der Rasur und Desinfektion des Bauches. Im weiteren Verlauf der OP wird die Inhalationsnarkose über einen mit Äther getränkten Tupfer, welcher in einem Falcontube steckt und vor dem Kopf der Ratte platziert wird, fortgeführt. Die Ratte wird auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten mittels Gummibändern fixiert. Der OP-Zugang erfolgt über eine mediane Laparotomie. Dabei wird in zwei Schritten zuerst nur die Haut eröffnet, um dann die Muskulatur darzustellen und unter Sicht in einem zweiten Schnitt die Bauchhöhle zu eröffnen. Die Wundumgebung wird mit feuchten Kompressen abgedeckt.

Nun wird der Processus Xiphoideus mit einer leicht gebogenen Klemme nach oben mobilisiert, so dass das Ligamentum falciforme hepatis sichtbar wird. Diese wird nun mit einer Mikroschere unter Sicht bis zum Ansatz durchtrennt. Dann werden der Mittellappen und der linke Seitenlappen mittels zweier Wattetupfer mobilisiert. Eine 2-0 Seidenschlinge wird um diese Lappen gelegt und sie werden vorsichtig ligiert. Schließlich werden die beiden Lappen mit der Mikroschere herausgetrennt. Mit einem Tupfer werden eventuell auftretende Blutungen an der Schnittfläche gestillt und mit NaCl-Lösung gespült.

Zunächst wird mit zwei Wattestäbchen die Flexura Doudonojejunalis aufgesucht und der Darm rosettenförmig auf dem bereitgelegten feuchten Kompressen

ausgebreitet. Das erste Polymer wird auf eine Hälfte der Mesenterialrosette gelegt und die andere Hälfte locker darüber geklappt.

Die so entstandene Tasche wird mit einer fortlaufenden Naht mit einem Prolene 5/0 Faden fixiert. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Blutgefäße komprimiert werden. Die Taschen werden abwechselnd nach links und rechts in dem Bauchraum platziert.

Wichtig ist es, möglichst wenig Darm offen liegen zu lassen, um Wärme- und Flüssigkeitsverluste zu minimieren. Den Darm regelmäßig mit warmem NaCl (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%, Braun, Germany) feucht halten. Nachdem alle vier Polymere in je eine Tasche implantiert wurden, wird der Ratte ein Tropfen Novaminsulfon-Ratiopharm intraperitoneal mit etwas Flüssigkeit appliziert. Schließlich werden die Muskulatur und die Haut getrennt jeweils mit einer fortlaufenden Naht mit einem Prolene 3/0 Faden vernäht. Den Situs einer zweidrittelhepatektomierten Ratte zeigt Abbildung 2/6. Abbildung 2/7 zeigt das aus einer zweidrittelhepatektomierten Ratte entfernte Lebergewebe.

## 2.6 Explantation der Polymere aus der Ratte

### 2.6.1 Benötigtes Material

1 Nadelhalter, 1 Anatomische Pinzette, 1 Chirurgische Pinzette, 1 Cooperschere und 1 Wittgensteinschere, OP-Tuch, Klinikdrappe, (Mölnlycke Health Care S. A.), Diethyläther, (Riedel-de-Haen, Seelze), Serum-Monovette, (Sarstedt, Germany), Kanüle Sterican Größe 2, (Braun, Germany), Falcontube, (Falcon, Germany), Desinfektionsspray, 1 ml NUNC-Röhrchen, (NUNC, Denmark), Flüssiger Stickstoff, Plastikgefäß, Peel awell, Tissue-Tek, (Sakura Finetek, The Netherlands)

### 2.6.2 Operationstechnik

Die Ratte wird mit Äther in einem luftdichten Glasgefäß narkotisiert. Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe beginnt die OP mit der Rasur und Desinfektion des Bauches. Im weiteren Verlauf der OP wird die Inhalationsnarkose über einen mit Äther getränkten Tupfer, welcher in einem Falcontube steckt und vor dem Kopf

der Ratte platziert wird, fortgeführt. Die Ratte wird auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten mittels Gummibändern fixiert. Der OP-Zugang erfolgt über eine mediane Laparotomie. Dabei wird in zwei Schritten zuerst nur die Haut eröffnet, um dann die Muskulatur darzustellen und unter Sicht in einem zweiten Schnitt die Bauchhöhle zu eröffnen. Die Wundumgebung wird mit feuchten Kompressen abgedeckt.

Zusätzlich wird jetzt mit einer Schere der Thorax der Ratte eröffnet und mit einer 10 ml fassenden Monovette Blut aus dem Herzen gewonnen.

Dann wird erneut die Flexura duodenojejunalis aufgesucht. Mit Schere und Anatomischer Pinzette werden Die Polymere vorsichtig aus Ihren Mesenterialtaschen gelöst. Dabei ist darauf zu achten, dass der Darm möglichst nicht verletzt wird, um Verunreinigungen mit Stuhl zu vermeiden. Die Polymere werden immer von oral nach aboral entnommen.

## 2.7 Präparation der Proben und Kontrollen für die histologische Aufarbeitung

### 2.7.1 Polymerverarbeitung

1. Polymer:           nativ in 1ml NUNC-Röhrchen geben,  
                          in flüssigem Stickstoff einfrieren,  
                          Endlagerung bei -80 °C
  
2. Polymer:           Polymer in eine kleine Plastikdose, die mit BOUIN'scher  
                          Lösung (1350 ml 1,2%ige Pikrinsäure, 450 ml 37%iges  
                          Formalin (Riedel de Haen, Cat. No. 36011) und 90 ml Eisessig  
                          (Essigsäure 100%, Riedel de Haen, Cat. No. 2789)) gefüllt ist,  
                          geben.  
                          Endlagerung bis zur Paraffineinbettung bei Zimmertemperatur.
  
3. Polymer:           Polymer in Peal away Gefäß mit Tissue-Tek bedecken und in  
                          flüssigem Stickstoff einfrieren,  
                          Endlagerung bei -20 °C

4. Polymer: Polymer in Peel away Gefäß mit Tissue-Tek bedecken und in flüssigem Stickstoff einfrieren,  
Endlagerung bei -20 °C

Die Monovette mit 10 ml Blut wird bis zur Zentrifugation im Kühlschrank aufbewahrt.

Dann mit folgenden Einstellungen zentrifugiert:

Accel	Speed	Break	Time	Temp
5	2000	5	10	4

Nach 10 Minuten: Absaugen des Überstandes mit 10 ml Spritze mit grüner Kanüle.

Das gewonnene Serum in zwei 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen geben und diese bei -80 °C zusammen mit den NUNC-Röhrchen lagern.

## 2.7.2 Herstellen von Paraffinschnitten

### 2.7.2.1 Benötigtes Material

Autotechnikon (Technikon Tissue Processor, The Technicon Company), Paraffinwachs (Paraffin, Merck, Cat. No. 1.07337.1000) , Microtom, (Microm HM 335 E, Microm GmbH, Germany), Microtome Blades N35H, (Feather, Japan), Objektträger Superfrost Plus 25 x 75 x 1 mm, (Menzel Gläser, Germany)

### 2.7.2.2 Fixierung der explantierten Polymere

Ein Polymer aus jeder Ratte wird sofort nach der Explantation in BOUIN'sche – Lösung überführt und verbleibt dort für 12- 24 Stunden.

### 2.7.2.3 Entwässerung des fixierten Polymers

Nach der Fixation wird das Polymer in ein Entwässerungskarussel gegeben. Dabei wird das Polymer je eine Stunde in 60%igen, 80%igen, 2 x 96%igen, 2 x 100%igen Alkohol, 2 x in Xylol und schließlich in flüssiges Paraffin überführt. Aus dem flüssigen Paraffin wird es in einer kleinen Metallschale gegossen, das Paraffinwachs kühlt ab und bildet so einen Paraffinblock.

#### 2.7.2.4 Schneiden des Paraffinblocks

Der Paraffinblock wird mit einem Mikrotom (Microm HM 335 E, Germany) geschnitten. Zuerst wird ein Messer Microtome Blades N35H, (Feather, Japan) in das Mikrotom eingespannt. Dann wird der Block ebenso eingespannt und mit dem Grobvortrieb überschüssiges Paraffin weg geschnitten. Mit dem Kurbelrad wird dann die richtige Schnittebene eingestellt. Vor jedem geplanten Schnitt muss die Klinge mit einem weichen Pinsel gereinigt werden. Nun wird langsam ein 5-6  $\mu\text{m}$  dicker Schnitt durch Drehen am Kurbelrad vom Block geschnitten. Der Schnitt rollt sich am Messer auf und wird nun vorsichtig mit zwei weichen Pinseln in ein kaltes Wasserbad überführt. Dort entrollt sich der Schnitt wieder und kann jetzt mit einem Objektträger in ein warmes Wasserbad überführt werden. Dort glätten sich eventuell entstandene Falten im Präparat und dieses kann nun endgültig auf dem Objektträger abgelegt werden. Ein zweites Präparat kann ebenfalls auf diese Art und Weise auf denselben Objektträger gebracht werden. Dann wird der Objektträger kurz von hinten mit einem Papiertuch abgewischt, kurze Zeit an der Luft getrocknet und dann über Nacht im 60 °C-Brutschrank fixiert.

#### 2.7.2.5 Einstellung der Schnittebenen

Um einen möglichst repräsentativen Überblick über das ganze Polymer zu bekommen, wurden pro Polymer jeweils drei Hauptschnittebenen eingestellt. Diese lagen immer möglichst horizontal zum Polymer. Die erste Schnittebene war immer peripher und die beiden weiteren Schnittebenen lagen jeweils 300  $\mu\text{m}$  bzw. 600  $\mu\text{m}$  vom der ersten Ebene entfernt, so dass bei einer Polymerdicke von 1000  $\mu\text{m}$  aus den gleichen, unterschiedlich weit von der Oberfläche des Polymers entfernten, Schichten Schnitte gewonnen wurden. Aus jeder Ebene wurden drei Objektträger mit jeweils zwei Präparaten hergestellt, so dass am Ende neun Objektträger pro Tier entstanden, von denen aus jeder Schicht der Beste mit PAS gefärbt wurde und so in die Auswertung kam.

## 2.7.3 Herstellen von Kryoschnitten

### 2.7.3.1 Benötigtes Material

Kryotom, (Microm HM 505 E, Germany), Objektträger Superfrost Plus 25 x 75 x 1 mm, (Menzel Gläser, Germany), Tissue Tek, (Sakura Finetek, The Netherlands, Cat. No. 4583), Microtome Blades C 35, (Feather, Japan), flüssiger Stickstoff

### 2.7.3.2 Einfrieren der explantierten Polymere

Zwei Polymere aus der Ratte werden sofort nach der Explantation in Tissue Tek getaucht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Einfrieren werden die Polymere bei – 20 °C gelagert.

### 2.7.3.3 Schneiden der Kryoblöcke

Die Blöcke werden in das Kryotom überführt. Zunächst wird ein Messer in das Kryotom eingespannt. Dann wird der Block mit etwas Tissue Tek auf einem kleinen runden Metallteller angefroren, damit er in das Kryotom eingespannt werden kann. Dann wird überschüssiges Tissue Tek weggeschnitten und mittels Grobvortrieb mit der Kurbel die richtige Schnittebene eingestellt. Vor jedem geplanten Schnitt muss die Klinge und die Glasplatte, auf der der Schnitt zum Liegen kommt, mit einem weichen Pinsel gereinigt werden.

Nun wird langsam ein 6 µm dünner Schnitt mit der Kurbel vom Block geschnitten. Dann wird die Glasplatte, auf der jetzt der Schnitt liegt, umgeklappt und das Gewebe kann mit einem warmen Super Frost Plus Objektträger aufgenommen werden. Dazu wird der Objektträger für sehr kurze Zeit auf die Glasplatte gelegt, so dass das Gewebe an ihm haftet. Sollte sich das Gewebe nicht schneiden lassen, so kann der Block für 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff gehalten und auf diese Weise gehärtet werden. Die fertigen Schnitte werden über Nacht getrocknet.



## 2.8 Histologische Aufarbeitung

### 2.8.1 Hämalaun – Eosin – Färbung (HE)

#### 2.8.1.1 Benötigtes Material

Mayers Hämatoxilin, (Sigma Diagnostics, USA), Eosin, (Merck, Germany), Entellan, (Merck, Germany)

#### 2.8.1.2

##### Durchführung der Färbung

- Entparaffinieren in Xylol für 2 x 10 min
- Absteigende Alkoholreihe je 2 min
- Aqua dest. kurz
- Mayers Hämatoxilin für 3 - 4 Minuten zum Färben der Kerne
- Aqua dest. kurz
- 10 Minuten unter Leitungswasser wässern zum Bläuen der Kerne
- Eosin 0,1 % zum Färben des Plasmas
- Aufsteigende Alkoholreihe je 2 Minuten
- 2 x 5 Minuten in Xylol
- Einbetten mit Entellan

## 2.8.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

### 2.8.2.1 Benötigtes Material

Perjodsäure, (Merck, Germany), 5.5-dimethylcyclohexan-1.3-dion, (Merck, Germany), Schiff'sches Reagenz, (Merck, Germany), 1 Mol HCl, Natriumdisulfid, (Merck, Germany), Mayers Hämatoxin, (Sigma Diagnostics, USA), Entellan, (Merck, Germany)

### 2.8.2.2 Durchführung der Färbung

- Entparaffinieren in Xylol 2 x 10 min
- Absteigende Alkoholreihe je 2 min
- Aqua dest. kurz
- 0,8%ige Perjodsäure-Lösung 10 min
- In Aqua dest. gründlich spülen 3 x 2 min
- Die Präparate 3 Stunden bei 60 °C in einer 5%igen Lösung von Dimedon (5.5-dimethylcyclohexan-1.3-dion) in absolutem Äthanol einstellen
- In Aqua dest. gründlich spülen 3 x 2 min
- Schiff'sches Reagenz im Dunkeln 30 min
- 3 x 2 min in Sulfitlese inkuieren (immer frisch aus 315 ml Aqua dest., 15 ml HCl, 1,5 g Natriumdisulfid herstellen).
- 20 min unter fließendem Wasser wässern
- Aqua dest. kurz
- Gegenfärben mit Hämatoxin:
  - a) 4 min in Mayers Hämatoxin
  - b) kurz in Aqua dest. differenzieren
  - c) 10 min unterfließendem Wasser bläuen
- Aqua dest. kurz
- aufsteigende Alkoholreihe je 2 min
- 2 x 5min in Xylol
- Einbetten mit Entellan

## 2.8.3 Hepatozytenfärbung

### 2.8.3.1 Benötigte Materialien

Aceton, PBS, pH 7,4, (Sigma, Cat. No. P3813, Germany), DAKO Biotin Blocking System, (DAKO, Cat. No. X0590, Denmark), Vektastain ABC-Kit AP Mouse IgG, (Vector, Cat. No. AK5002, Germany), Monoclonal Mouse Anti-Human Hepatocyte, (Clone OCH1E5, DAKO, Cat. No. M7158, Denmark), Sekundär-Antikörper, (Anti Mouse IgG, Rat absorbed, Cat. No. AK5002), AP-Substrat, Vector Red Substrate Kit, (Vektor, Cat. No. SK5100, Germany), Levamisole Solution, (Vektor, Cat. No. SP5000, Germany), Mayers Hämatoxin, (Sigma Diagnostics, USA), Aqua Tex

### 2.8.3.2 Durchführung der Färbung

- Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Fixierung 4 min in Aceton bei -20 °C
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Dako Blocking Reagenz 1 für 10 min (DAKO Biotin Blocking System)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Dako Blocking Reagenz 2 für 10 min (DAKO Biotin Blocking System)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Normalserum 3 Tropfen auf 10 ml für 30 min (Vektastain ABC- Kit AP Mouse IgG)
- Primär Antikörper für 60 min (Hepatocyte, Verdünnung 1:250)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Sekundär Antikörper 50 µl auf 10 ml für 30 min (Sekundärantikörper biotiniert)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Biotiniertes Enzym für 30 min (Vektastain Kit AP Mouse IgG)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- AP-Substrat für 2 x 20 min (Vektastain Kit 1) + 2 Tropfen Levamisole
- Aqua dest. kurz
- Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 5 min
- Aqua dest. kurz
- Leitungswasser (fliessend) für 10 min
- Eindeckeln mit Aqua Tex

## 2.8.4 Cytokeratin (CK) 18 – Färbung

### 2.8.4.1 Benötigte Materialien

Aceton, PBS, pH 7,4, (Sigma, Cat. No. P3813, Germany), DAKO Biotin Blocking System, (DAKO, Cat. No. X0590, Denmark), Vektastain ABC-Kit AP Mouse IgG, (Vector, Cat. No. AK5002, Germany), Cytokeratin 18; RGE 53; Mouse monoclonal IgG, (Progen Heidelberg, Cat. No. 10500, Germany), Sekundär-Antikörper, (Anti Mouse IgG, Rat absorbed, Cat. No. AK5002), AP-Substrat, Vector Red Substrate Kit, (Vektor, Cat Nr. SK5100, Germany), Levamisole Solution, (Vektor, Cat. No. SP5000, Germany), Mayers Hämatoxilin, (Sigma Diagnostics, USA), Aqua Tex

### 2.8.4.2 Durchführung der Färbung

- Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Fixierung 4 min in Aceton bei -20 °C
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Dako Blocking Reagenz 1 für 10 min (DAKO Biotin Blocking System)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Dako Blocking Reagenz 2 für 10 min (DAKO Biotin Blocking System)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Normalserum 3 Tropfen auf 10 ml für 30 min (Vektastain ABC- Kit AP Mouse IgG)
- Primär Antikörper für 60 min (RGE 53 Verdünnung 1:50)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Sekundär Antikörper 50 µl auf 10 ml für 30 min (Sekundärantikörper biotiniert)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- Biotiniertes Enzym für 30 min (Vektastain Kit AP Mouse IgG)
- Waschen in PBS 3 x 2 min
- AP- Substrat für 2 x 20 min (Vektastain Kit 1) + 2 Tropfen Levamisole
- Aqua dest. kurz
- Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 5 min
- Aqua dest. kurz
- Leitungswasser (fliessend) für 10 min
- Eindeckeln mit Aqua Tex

## 2.9 Auswertung der PAS-Färbung mit Lucia M

### 2.9.1 Eichung von Lucia M

Einschalten des Mikroskops und des Computers. Objektiv mit 4 x Vergrößerung in den Strahlengang bringen. Computerprogramm (Lucia M, Version 2.04, Nikon Copyright<sup>C</sup> 1991-1993) mit Befehl „win“ starten. Lucia M wird automatisch gestartet. Eichobjektträger (Objective Micrometer 0,01 mm, Olympus, Japan) unter das 4 x Objektiv legen und scharf stellen. Dann über das Menü auf „Measure, Calibration“ gehen und „read only“ deaktivieren. „Add“ anklicken und eine neue Kalibrationsdatei erstellen, z. B. „Christian4x“. Dann bei „Units“ mm anklicken und als „Aspect ratio“ 1 eingeben. Danach „set calibration via horizontal line“ anklicken und mittels des Eichobjektträgers genau 1 mm auf dem Bildschirm ausmessen. Als „real size“ 1 mm eingeben und mit OK bestätigen. Es erscheint die „Calibration“. Bestätigen und „Close“ drücken. Damit ist die Kalibrierung abgeschlossen und es können jetzt definierte Flächen in mm<sup>2</sup> ausgemessen werden. Schließlich ergibt ein voll ausgefüllter Bildschirm die Fläche von 2,9426 mm<sup>2</sup>. Mit den anderen Objektiven kann nach demselben Schema verfahren werden. In diesem Fall wurden jedoch alle Messungen mit dem 4 x Objektiv + 2,5 x Linse = 10fache Vergrößerung durchgeführt.

### 2.9.2 Messen mit Lucia M

PAS-gefärbtes Präparat auf Objektträger unter das 4 x Objektiv legen. Drei verschiedene Ausschnitte aus einem Präparat sollen gemessen werden. Den ersten Ausschnitt so einstellen, dass er auf dem Bildschirm scharf erscheint. Dann mit „Image – Grabbing - Capture“ das Bild auf dem Monitor einfrieren. Jetzt mit „Edit – Binary Editor“ die Zeichenleiste aufrufen. Mit dem fortlaufenden Stift alle roten Bezirke = Hepatozyteninseln umkreisen und die so entstehenden Kreise mit der „Fill“- Funktion ausfüllen und durch anklicken von „Close“ die Zeichenleiste wieder schließen. Nun das Menü „Measure - Field“ aufrufen. Die Größe und Anzahl der markierten Bezirke wird nun gemessen und automatisch gespeichert. Dann das nächste Messfeld einstellen und wie oben verfahren. Ebenso mit dem dritten Messfeld. Nachdem alle drei Felder gemessen wurde, Menü „Measure - Field Data“ aufrufen.

Jetzt werden die Ergebnisse der Messung in folgender Form angezeigt: „Number of Objects, Area Fraction, Area und Measured Area“, wobei die „Measured Area“ immer 2,9426 betragen muß. Die Ergebnisse werden notiert, mit „Reset“ werden die Messungen gelöscht und der nächste Objektträger kann nun vermessen werden.

## 2.10 DNA-Messung mit DyNA-Quant

### 2.10.1 Vorbereitung der Lösungen

#### H33258 Dye Solution

- 10 mg H33258 (Hoechst dye H33258)
- 10 ml ddH<sub>2</sub>O

Lagerung in lichtundurchlässiger Flasche bei 4 °C bis zu 6 Monaten

#### 10 x TNE- Puffer

- 12,11 g Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)
- 3,72 g EDTA
- 116,89 g NaCl
- 800 ml ddH<sub>2</sub>O

pH mit HCl auf 7,4 einstellen

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml bringen und filtern (0,45 µm)

Bei 4 °C bis zu 3 Monaten haltbar

#### Calf-Thymus DNA-Standard (100 µg/ 100 ml)

- 100 µl Calf-Thymus DNA-Standard (1 µg/ml) (Sigma D-0805)
- 100 µl 10 x TNE-Puffer
- 800 µl ddH<sub>2</sub>O

Bei 4 °C bis zu 3 Monaten haltbar

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

- 10 µl der 1mg/ml H33258 Lösung
- 10 ml 10 x TNE- Puffer
- 90 ml destilliertes gefiltertes Wasser

Proteinase K Digestion Solution

- 0,5 mg/ml Proteinase K (Gibco BRL, Cat. No. 25530-049)
- 0,1 mg/ ml SDS (Sodium dodecyl sulfat)

in einen Puffer aus:

- 50 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 0,2 M NaCl

pH auf 7,5 einstellen

#### 2.10.2 Vorbereitung der Proben

- Deckel des NUNC-Röhrchens abdrehen und Röhrchen mit Parafilm verschließen, in den Parafilm einige kleine Löcher stechen
- Zellen über Nacht im Lyophilisator lyophilisieren (Lyovac GT2, Leybold-Heraeus)
- 1 ml Proteinase K Lösung auf die lyophilisierten Zellen (im Polymer) geben
- Jetzt NUNC-Röhrchen wieder verschließen und für mindestens 10 Stunden im 55-60 °C warmen Wasserbad mit eingeschaltetem Schüttler inkubieren
- Während dieser Zeit mindestens dreimal die Röhrchen ordentlich mixen

#### 2.10.3 DNA-Assay:

- Fluorometer anschalten und mindestens 15 min warten, bevor die erste Messung vorgenommen wird
- 2 ml Assay-Solution in die Glasküvette geben und Küvette in den DyNA-Quant (DyNA-Quant 200 Fluorometer) stellen
- Deckel schließen und Auswahl 1 drücken um zu messen
- 0 drücken um das Gerät zu nullen
- 4 µl DNA- Standard in die Küvette hinzugeben (100µg/ml)
- Küvette herausnehmen und durch mehrmaliges Umschwenken den Küvetteninhalt gut mischen

- Küvette wieder hineinstellen, „calib“ drücken, 200 ng/ml eingeben und „enter“ drücken
- Jetzt Glasküvette zweimal mit Aqua dest. spülen und Flüssigkeit in Hoechst- Abfall entsorgen
- Küvette mit 2 ml Assay-Solution füllen, in DyNA-Quant stellen und „zero“ drücken
- 2  $\mu$ l der unbekannt Probe in die Küvette geben und erneut gut mischen
- Küvette in das Gerät stellen, Deckel schließen und das Messergebnis notieren



### **3. Ergebnisse**

#### 3.1 Gewinnung der Hepatozyten

Für die Gewinnung der Hepatozyten wurden insgesamt 14 Rattenlebern von 250 - 340 g schweren männlichen Lewis Ratten perfundiert. Abhängig vom Gewicht der Rattenleber und von der Qualität der Perfusion ergaben sich verschiedene Vitalitäten und Gesamtzellzahlen. Nach einer durchschnittlich 12,8 Minuten dauernden Perfusion der Leber nach der unter Punkt 2.1.7 beschriebenen Technik gelang es, im Mittel  $3,46 \times 10^8 \pm 1,54 \times 10^8$  Hepatozyten pro Rattenleber zu isolieren. Durch den Zusatz von Trypanblau-Lösung bei der Auszählung ließen sich tote von vitalen Zellen abgrenzen. Im Verhältnis zur Gesamtzahl der isolierten Zellen fanden sich im Durchschnitt  $84,6\% \pm 3,4\%$  vitale Zellen. Mit den so gewonnenen Zellen wurden insgesamt 256 Polymere besiedelt. Eine Übersicht über die beschriebenen Ergebnisse der Hepatozytengewinnung zeigt Tabelle 3/1.

#### 3.2 Besiedelung der Polymere

Aus der gewonnenen Hepatozytensuspension werden jeweils 400 µl in 100 µl Schritten, entsprechend  $4 \times 10^6$  Hepatozyten auf ein biologisch abbaubares Polymer pipettiert. Dabei verblieben Reste der Suspension auf der Petrischale. Dieser nicht vom Polymer aufgenommene Rest wurde gemessen. Danach befanden sich nach dem Besiedeln  $284 \pm 26,1$  µl Suspension auf der Petrischale, was  $71\% \pm 6,5\%$  der eingesetzten Suspension entspricht. Einen Überblick über das Besiedeln der Polymere gibt Abbildung 2/3. Tabelle 3/2 zeigt die Ergebnisse der Messung.

#### 3.3 Probengruppen

Es wurden jeweils fünf besiedelte Polymere für drei Tage in einen Flussbioreaktor überführt, bevor vier von ihnen in eine Ratte transplantiert wurden. Das fünfte wurde zur DNA-Messung in flüssigen Stickstoff überführt. Es fand eine Unterteilung in zwei Untergruppen statt. Während sich die Ratten der Probengruppe A einer Zweidrittelhepatektomie wie im Kapitel 2.5.2 beschrieben

unterzogen, wurde bei der Probengruppe B die Leber in toto belassen. Den Tieren ohne Zweidrittelhepatektomie (Probengruppe B) wurden die Nummern 21–36 zugewiesen und die Tiere mit Zweidrittelhepatektomie (Probengruppe A) bekamen die Nummern 37–52. Jeweils 4 Tiere aus jeder Untergruppe wurden nach einer Woche, 4 Tiere nach einem Monat, 4 Tiere nach drei Monaten und 4 Tiere nach sechs Monaten explantiert. Einen Überblick über die Einteilung der Probengruppen gibt Tabelle 3/3.

**Tabelle 3/1 - Hepatozytengewinnung** – Es wurden im Durchschnitt  $3,46 \times 10^8 \pm 1,54 \times 10^8$  Zellen isoliert, die eine durchschnittliche Vitalität von  $84,6 \pm 3,4$  % aufwiesen.

<b>Hepatozytenisolation</b>	<b>Gewicht der Ratte in g</b>	<b>Anzahl der Hepatozyten</b>	<b>Vitalität in %</b>
01	340	$1,98 \times 10^8$	89
02	330	$5,70 \times 10^8$	88
03	300	$3,93 \times 10^8$	86
04	250	$2,62 \times 10^8$	82
05	250	$2,13 \times 10^8$	88
06	310	$2,90 \times 10^8$	87
07	320	$5,45 \times 10^8$	86
08	250	$4,76 \times 10^8$	86
09	250	$4,12 \times 10^8$	81
10	290	$0,96 \times 10^8$	83
11	280	$2,34 \times 10^8$	80
12	320	$1,79 \times 10^8$	80
13	300	$4,70 \times 10^8$	88
14	300	$5,08 \times 10^8$	80
<b>Durchschnitt</b>	<b>292,1</b>	<b><math>3,46 \times 10^8</math></b>	<b>84,6</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>31,7</b>	<b><math>1,54 \times 10^8</math></b>	<b>3,4</b>
<b>Summe</b>	<b>-</b>	<b><math>4,85 \times 10^9</math></b>	<b>-</b>

**Tabelle 3/2 - Besiedelung der Polymere** – Durchschnittlich verblieben von den 400  $\mu$ l Zellsuspension  $284 \pm 26$ , 1  $\mu$ l auf der Petrischale.

Nummer	Hepatozytensuspension in $\mu$ l	Rest in $\mu$ l	Rest in %
1	400	320	80
2	400	260	65
3	400	260	65
4	400	280	70
5	400	300	75
<b>Durchschnitt</b>	<b>400</b>	<b>284</b>	<b>71</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0</b>	<b>26,1</b>	<b>6,5</b>

**Tabelle 3/3 - Einteilung der Probengruppen**

**Probengruppe A:** Polymer mit vorkultivierten Hepatozyten mit dem Stimulus einer Zweidrittelhepatektomie

Rattennummer	Verweildauer	Konservierungsart	Zellen aus Isolation Nr.
37	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
38	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
39	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
40	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
41	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
42	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
43	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	14
44	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
45	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
46	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
47	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
48	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
49	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7
50	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7
51	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7
52	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7

**Probengruppe B:** Polymere mit vorkultivierten Hepatozyten ohne den Stimulus einer Zweidrittelhepatektomie

Rattennummer	Verweildauer	Konservierungsart	Zellen aus Isolation Nr.
21	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	2
22	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	2
23	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	2
24	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	2
25	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7
26	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7
27	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7
28	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	7
29	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
30	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
31	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
32	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
33	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
34	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
35	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
36	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5

### 3.3.1 Kultivierung im Flussbioreaktor

Für die Versuchsreihe wurde der Teil der Hepatozyten, der in den Isolationen 2, 5, 7, 10, 13 und 14 gewonnen wurde, benutzt. Insgesamt wurden für diese Gruppen 160 Polymere besiedelt und darauf für drei Tage im Flussbioreaktor kultiviert. Die Besiedelung der Polymere ist in Abbildung 2/3 dargestellt. Die Zusammensetzung des Flussbioreaktors wird im Kapitel 2.2.3 detailliert beschrieben. Einen Überblick über den Aufbau des Bioreaktors gibt Abbildung 2/4. Während der drei Tage der Kultur wurden die Bioreaktoren täglich auf Undichtigkeiten oder Verfärbungen des Kulturmediums kontrolliert. Nach drei Tagen wurden die Polymere dem System entnommen und einzeln phasenkontrastmikroskopisch begutachtet. Zur Technik der Auswertung im Phasenkontrastmikroskop siehe Kapitel 2.2.4. Bei der Auswertung der Polymere im Phasenkontrastmikroskop ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Polymere 21-24, 26 und 49 wurden nicht phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Die Polymere der Probengruppe B, die

für einen Monat im Tier verblieben, enthielten im Mittel  $53,5 \pm 16,3$  Spheroide pro Gesichtsfeld, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $95,4 \pm 4,0 \mu\text{m}$  hatten. Die Polymere der Probengruppe B, die für drei Monate im Tier verblieben, enthielten im Mittel  $50,6 \pm 4,8$  Spheroide pro Gesichtsfeld, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $101,9 \pm 18,6 \mu\text{m}$  hatten. Die Polymere der Probengruppe B, die für sechs Monate im Tier verblieben, enthielten im Mittel  $45,6 \pm 16,2$  Spheroide pro Gesichtsfeld, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $92,8 \pm 14,8 \mu\text{m}$  hatten. Die Polymere der Probengruppe A, die für eine Woche im Tier verblieben, enthielten im Mittel  $33,1 \pm 7,8$  Spheroide pro Gesichtsfeld, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $106,6 \pm 11,7 \mu\text{m}$  hatten. Die Polymere der Probengruppe A, die für einen Monat im Tier verblieben, enthielten im Mittel  $44,7 \pm 21,7$  Spheroide pro Gesichtsfeld, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $98,8 \pm 24,3 \mu\text{m}$  hatten. Die Polymere der Probengruppe A, die für drei Monate im Tier verblieben, enthielten im Mittel  $31,5 \pm 6,5$  Spheroide pro Gesichtsfeld, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $112,8 \pm 8,3 \mu\text{m}$  hatten. Die Polymere der Probengruppe A, die für sechs Monate im Tier verblieben, enthielten im Mittel  $55,7 \pm 20,7$  Spheroide pro Gesichtsfeld, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $89,6 \pm 20,8 \mu\text{m}$  hatten. Abbildung 3/1 zeigt das phasenkontrastmikroskopische Bild eines 3 Tage kultivierten Polymers. Die Tabellen 3/4 und 3/5 zeigen die gemessenen Ergebnisse im einzelnen.

**Tabelle 3/4 – Hepatozytenkultivierung für Ratten ohne Zweidrittelhepatektomie**

(Probengruppe B)

<i>Verbleib der Hepatozyten für einen Monat im Tier</i>	<i>Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld</i>			<i>Durchmesser der Spheroide in µm</i>		
<b>Nummer des Tieres</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>28</b>
1. Messung	64	73	38	100	80	100
2. Messung	73	58	41	110	90	80
3. Messung	69	53	23	80	100	80
4. Messung	62	61	37	120	100	100
5. Messung	55	53	23	80	90	110
6. Messung	72	56	45	60	110	80
7. Messung	59	58	36	120	90	90
8. Messung	57	83	45	130	90	100
<b>Mittelwert</b>	<b>63,9</b>	<b>61,9</b>	<b>34,8</b>	<b>100</b>	<b>93,8</b>	<b>92,5</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,9</b>	<b>10,6</b>	<b>7,9</b>	<b>24,5</b>	<b>9,2</b>	<b>11,6</b>
<b>Mittelwert der Gruppenmittelwerte</b>	<b>53,5</b>			<b>95,4</b>		
<b>Standardabweichung der Gruppenmittelwerte</b>	<b>16,3</b>			<b>4,0</b>		

<i>Verbleib der Hepatozyten für drei Monate im Tier</i>	<i>Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld</i>				<i>Durchmesser der Spheroide in µm</i>			
<b>Nummer des Tieres</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>
1. Messung	29	52	65	42	120	60	50	130
2. Messung	44	64	59	38	100	100	80	150
3. Messung	61	40	38	55	130	80	80	150
4. Messung	70	70	66	65	80	110	70	80
5. Messung	58	48	33	48	80	60	90	150
6. Messung	53	70	25	53	150	110	110	120
7. Messung	40	63	25	61	100	80	100	110
8. Messung	45	48	51	39	110	100	110	110
<b>Mittelwert</b>	<b>50,0</b>	<b>56,9</b>	<b>45,3</b>	<b>50,1</b>	<b>108,8</b>	<b>87,5</b>	<b>86,3</b>	<b>125</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>13,1</b>	<b>11,3</b>	<b>17,2</b>	<b>10,3</b>	<b>24,2</b>	<b>20,5</b>	<b>20,7</b>	<b>25,1</b>
<b>Mittelwert der Gruppenmittelwerte</b>	<b>50,6</b>				<b>101,9</b>			
<b>Standardabweichung der Gruppenmittelwerte</b>	<b>4,8</b>				<b>18,6</b>			

<i>Verbleib der Hepatozyten für sechs Monate im Tier</i>	<i>Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld</i>				<i>Durchmesser der Spheroide in µm</i>			
<b>Nummer des Tieres</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>
1. Messung	43	18	27	55	80	80	80	100
2. Messung	66	17	42	48	50	80	170	130
3. Messung	71	28	22	86	100	100	70	110
4. Messung	38	34	60	80	90	80	120	130
5. Messung	44	41	30	73	100	110	70	110
6. Messung	24	12	35	68	80	60	90	120
7. Messung	54	30	28	43	80	100	80	100
8. Messung	71	36	70	66	100	80	100	120
<b>Mittelwert</b>	<b>51,4</b>	<b>27,0</b>	<b>39,3</b>	<b>64,9</b>	<b>85,0</b>	<b>86,3</b>	<b>85,0</b>	<b>115</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>17,1</b>	<b>10,3</b>	<b>17,2</b>	<b>15,2</b>	<b>16,9</b>	<b>16,0</b>	<b>17,7</b>	<b>12,0</b>
<b>Mittelwert der Gruppenmittelwerte</b>	<b>45,6</b>				<b>92,8</b>			
<b>Standardabweichung der Gruppenmittelwerte</b>	<b>16,2</b>				<b>14,8</b>			

**Tabelle 3/5 – Hepatozytenkultivierung für Ratten mit Zweidrittelhepatektomie**

(Probengruppe A)

<i>Verbleib der Hepatozyten für eine Woche im Tier</i>	<i>Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld</i>				<i>Durchmesser der Spheroide in µm</i>			
<b>Nummer des Tieres</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
1. Messung	16	32	31	31	120	100	110	80
2. Messung	32	55	18	38	100	80	80	80
3. Messung	36	45	11	39	80	150	80	100
4. Messung	14	32	38	46	80	150	80	100
5. Messung	33	35	24	38	110	130	80	140
6. Messung	21	35	35	43	130	110	140	70
7. Messung	33	39	27	44	110	120	110	100
8. Messung	26	41	26	44	100	150	80	110
<b>Mittelwert</b>	<b>26,4</b>	<b>39,3</b>	<b>26,3</b>	<b>40,4</b>	<b>103,8</b>	<b>123,8</b>	<b>98,8</b>	<b>100,0</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>8,5</b>	<b>7,8</b>	<b>8,8</b>	<b>4,9</b>	<b>17,7</b>	<b>26,2</b>	<b>22,3</b>	<b>23,3</b>
<b>Mittelwert der Gruppenmittelwerte</b>	<b>33,1</b>				<b>106,6</b>			
<b>Standardabweichung der Gruppenmittelwerte</b>	<b>7,8</b>				<b>11,7</b>			

<i>Verbleib der Hepatozyten für einen Monat im Tier</i>	<i>Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld</i>				<i>Durchmesser der Spheroide in <math>\mu\text{m}</math></i>			
<b>Nummer des Tieres</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>
1. Messung	74	40	12	28	130	130	70	70
2. Messung	69	46	28	21	180	120	100	60
3. Messung	85	33	32	38	110	90	100	50
4. Messung	63	56	33	30	90	130	70	50
5. Messung	56	71	23	39	100	150	90	60
6. Messung	66	63	15	26	130	130	60	80
7. Messung	83	52	27	37	100	120	100	90
8. Messung	76	57	14	37	110	90	80	120
<b>Mittelwert</b>	<b>71,5</b>	<b>52,3</b>	<b>23,0</b>	<b>32,0</b>	<b>118,8</b>	<b>120,0</b>	<b>83,8</b>	<b>72,5</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>9,9</b>	<b>12,3</b>	<b>8,3</b>	<b>6,7</b>	<b>28,5</b>	<b>16,0</b>	<b>23,8</b>	<b>14,1</b>
<b>Mittelwert der Gruppenmittelwerte</b>	<b>44,7</b>				<b>98,8</b>			
<b>Standardabweichung der Gruppenmittelwerte</b>	<b>21,7</b>				<b>24,3</b>			

<i>Verbleib der Hepatozyten für drei Monate im Tier</i>	<i>Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld</i>				<i>Durchmesser der Spheroide in <math>\mu\text{m}</math></i>			
<b>Nummer des Tieres</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>
1. Messung	36	15	33	33	100	150	100	140
2. Messung	25	12	50	32	110	100	110	150
3. Messung	26	22	32	31	140	70	100	110
4. Messung	28	25	28	39	130	100	120	120
5. Messung	41	31	41	18	100	110	90	100
6. Messung	33	25	44	29	110	80	150	100
7. Messung	28	24	35	51	120	110	120	120
8. Messung	24	33	47	37	110	100	100	140
<b>Mittelwert</b>	<b>30,1</b>	<b>23,4</b>	<b>38,8</b>	<b>33,8</b>	<b>115,0</b>	<b>102,5</b>	<b>111,3</b>	<b>122,5</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,0</b>	<b>7,2</b>	<b>7,9</b>	<b>9,4</b>	<b>14,1</b>	<b>23,8</b>	<b>18,9</b>	<b>19,1</b>
<b>Mittelwert der Gruppenmittelwerte</b>	<b>31,5</b>				<b>112,8</b>			
<b>Standardabweichung der Gruppenmittelwerte</b>	<b>6,5</b>				<b>8,3</b>			



<i>Verbleib der Hepatozyten für sechs Monate im Tier</i>	<i>Anzahl der Spheroide pro Gesichtsfeld</i>			<i>Durchmesser der Spheroide in µm</i>		
<b>Nummer des Tieres</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>
1. Messung	39	65	58	100	60	100
2. Messung	47	80	64	70	80	90
3. Messung	28	57	54	110	60	120
4. Messung	31	84	57	96	60	90
5. Messung	30	91	44	80	60	80
6. Messung	36	71	73	110	70	110
7. Messung	31	75	65	120	60	130
8. Messung	28	75	54	90	80	130
<b>Mittelwert</b>	<b>33,8</b>	<b>74,8</b>	<b>58,6</b>	<b>96,3</b>	<b>66,3</b>	<b>106,3</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,6</b>	<b>10,7</b>	<b>8,7</b>	<b>16,9</b>	<b>9,2</b>	<b>19,2</b>
<b>Mittelwert der Gruppenmittelwerte</b>	<b>55,7</b>			<b>89,6</b>		
<b>Standardabweichung der Gruppenmittelwerte</b>	<b>20,7</b>			<b>20,8</b>		

### 3.3.2 Mediumwechsel

Das Kulturmedium wurde während der drei Tage der Zellkultur nicht gewechselt. Am dritten Tag der Kultur wurden 4 x 1ml Mediumproben genommen und bei – 80° C gelagert.

### 3.4 Kontrollgruppen

Als Kontrollgruppen dienten Ratten, in die Polymere implantiert wurden, die zuvor mit nicht kultivierten Hepatozyten besiedelt worden waren. Für die Kontrollgruppen wurde der Teil der Hepatozyten benutzt, der in den Isolationen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 gewonnen wurden. Auch die Kontrollgruppen wurden wie die Probengruppen in zwei Untergruppen aufgeteilt. Eine Untergruppe musste sich einer Zweidrittelhepatektomie unterziehen (Kontrollgruppe A). Die Tiere dieser Gruppe erhielten die Nummern 53–68. Die zweite Untergruppe musste sich keiner Zweidrittelhepatektomie unterziehen (Kontrollgruppe B). Die Tiere dieser Gruppe wurden mit den Nummern 5–20 bezeichnet. Jeweils 4 Tiere aus jeder Untergruppe

wurden nach 1 Woche, 4 Tiere nach einem Monat, 4 Tiere nach drei Monaten und 4 Tiere nach sechs Monaten explantiert.

Außerdem wurde eine weitere Kontrollgruppe angelegt (Kontrollgruppe C), in der nur mit Williams Medium E besiedelte Polymere in der gleichen Weise wie in der Probengruppe implantiert und nach 1 Woche, 1 Monat, 3 Monaten und 6 Monaten explantiert wurden. Für jeden Zeitpunkt wurde ein Tier operiert und die Tiere wurden mit 1 – 4 bezeichnet.

Einen Überblick über die Kontrollgruppen gibt Tabelle 3/6.

### **Tabelle 3/6 – Einteilung der Kontrollgruppen**

**Kontrollgruppe A:** Polymer mit nicht vorkultivierten Hepatozyten mit dem Stimulus einer Zweidrittelhepatektomie

Rattennummer	Verweildauer	Konservierungsart	Zellen aus Isolation Nr.
53	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	11
54	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	11
55	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
56	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
57	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
58	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
59	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
60	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	13
61	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	9
62	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
63	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	12
64	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	11
65	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	10
66	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	8
67	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	9
68	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	9

**Kontrollgruppe B:** Polymer mit nicht vorkultivierten Hepatozyten ohne den Stimulus einer Zweidrittelhepatektomie

Rattennummer	Verweildauer	Konservierungsart	Zellen aus Isolation Nr.
5	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	1
6	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	1
7	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	2
8	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	2
9	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	3
10	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	6
11	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	6
12	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	6
13	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	3
14	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	4
15	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
16	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	5
17	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	3
18	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	3
19	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	3
20	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	3

**Kontrollgruppe C:** Polymere mit Williams Medium E ohne den Stimulus einer Zweidrittelhepatektomie

Rattennummer	Verweildauer	Konservierungsart	Zellen aus Isolation Nr.
1	1 Woche	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	Keine Zellen
2	1 Monat	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	Keine Zellen
3	3 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	Keine Zellen
4	6 Monate	1xNativ, 1xParaffin, 2xKryo	Keine Zellen

### 3.5 Implantation der Polymere in die Ratten

Die Implantation der Polymere fand wie im Kapitel 2.4.3 beschrieben statt. Im Allgemeinen wurde die Operation gut vertragen, bei einigen Tieren ergaben sich jedoch Komplikationen.

Im postoperativen Verlauf starben vier Tiere der Probengruppe A an Darmischämien oder Blutungen aus den Leberresektionsrändern.

In der Probengruppe B starben zwei Tiere am dritten postoperativen Tag an einer Peritonitis und ein Tier an einer Darmblutung.

Alle verstorbenen Tiere wurden durch erneute Operationen neuer Tiere ersetzt.

Im postoperativen Verlauf starben in der Kontrollgruppe A 8 Tiere innerhalb der ersten drei postoperativen Tage. Obduktionen der verstorbenen Tiere zeigten Ischämien einiger Darmabschnitte oder Blutungen im Bereich der Leberresektionsränder. Ein Tier verstarb 7 Wochen nach der Operation und ein Tier verstarb nach 5 Monaten. Bei diesen Tieren konnten keine sichtbaren Pathologien entdeckt werden.

In der Kontrollgruppe B verstarben drei Tiere in den drei ersten postoperativen Tagen. Hier zeigten sich ebenfalls ischämische Darmabschnitte und in einem Fall hatte die Ratte eine Peritonitis.

In der Kontrollgruppe C verkrafteten alle Tiere die Polymerimplantation ohne Probleme.

Alle verstorbenen Tiere wurden durch erneute Operationen neuer Tiere ersetzt.

### 3.6 Explantation der Polymere aus den Ratten

Die Explantation der Polymere fand wie im Kapitel 2.6.2 beschrieben statt. Dabei wurde sehr darauf geachtet, dass die Narkose tief genug war, damit die Tiere keine Schmerzen empfanden.

### 3.7 Präparation der Proben und Kontrollen für die histologische Aufarbeitung

Für die spätere histologische Aufarbeitung wurden die einzelnen Proben, die Kontrollen, sowie einige Nativpräparate von Leber und Darm – wie unter dem Punkt 2.7 beschrieben – verarbeitet.

### 3.8 Histologie

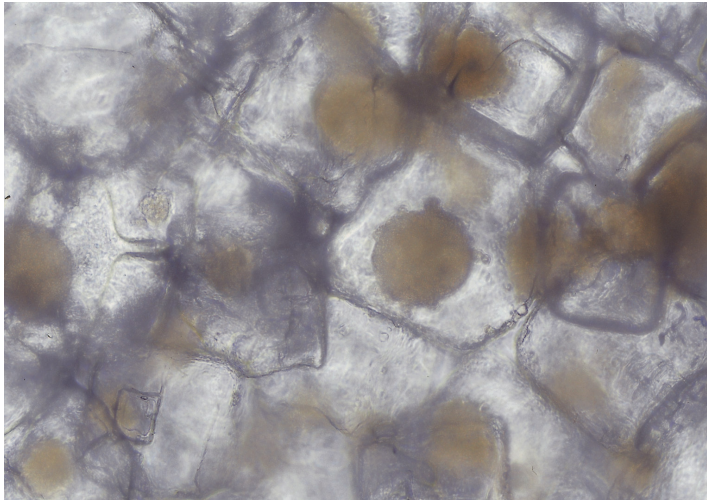
#### 3.8.1 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)

Die Hämalaun-Eosin-Färbung wurde als gebräuchlichste Übersichtsfärbung verwendet. Sowohl in den Proben-, wie auch in den Kontrollgruppen ließen sich zu allen Zeitpunkten (außer Kontrollgruppe C) morphologisch unauffällige Hepatozyten nachweisen. Diese waren vom umgebenden Bindegewebe jedoch nur schwer zu unterscheiden, so dass zur bevorstehenden Auswertung der Schnitte auf die Färbung der Schnitte mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion übergegangen wurde. Einen HE gefärbten Schnitt zeigt Abbildung 3/2.

#### 3.8.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

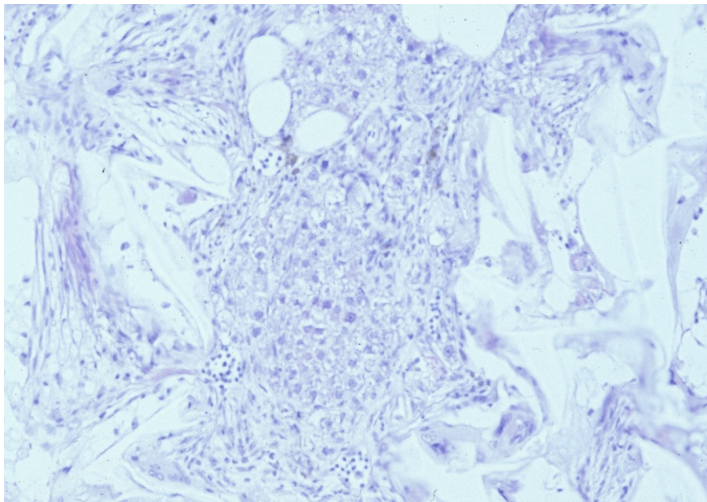
Die PAS-Färbung ist die gebräuchlichste Muzin-Färbung in der Routine-Histologie. Sie färbt neutrale Glykosaminoglykane, Kohlenhydrate und Glykogen dunkelrot bis lila, während die Zellkerne blau gefärbt werden. Die PAS-Färbung hat sich zur Unterscheidung von Hepatozyten und Bindegewebe als sehr nützlich erwiesen. Um wirklich nur eine positive Darstellung von Glykogen allein zu erhalten, wurde eine Blockierungsreaktion mit Dimedon durchgeführt. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die transplantierten Hepatozyten Glykogen aufbauen und speichern können. (Abbildungen 3/3 - 3/6)

**Abbildung 3/1 - Phasenkontrastmikroskopisches Bild eines 3 Tage kultivierten Polymers**



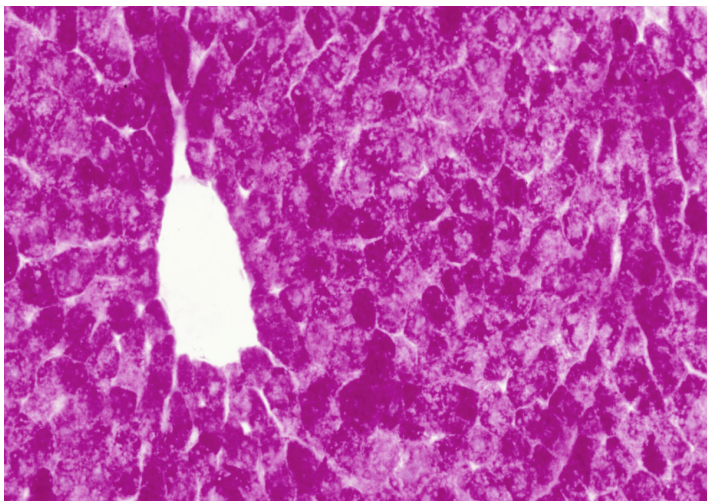
Phasenkontrastmikroskopisches Bild von Hepatozyten auf Polymeren nach 3 Tagen im Flussbioreaktor. Es zeigt Spheroid in den Poren des Polymers. Der Spheroid in der Mitte hatte einen Durchmesser von 200 µm.

**Abbildung 3/2 – HE-Färbung eines Polymers**



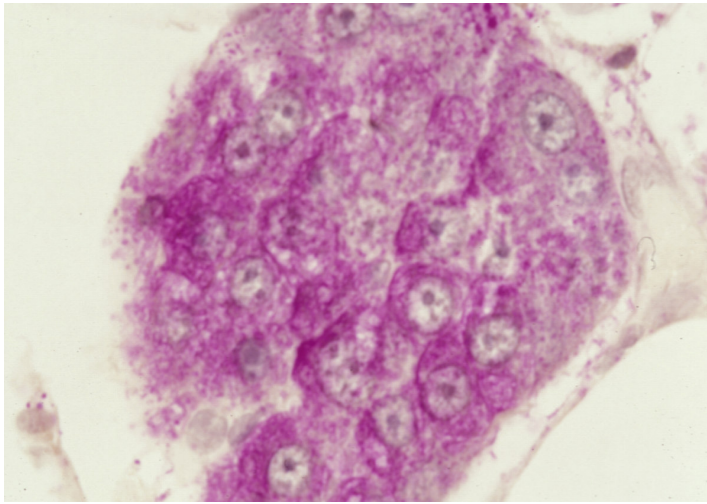
In dem HE gefärbten Schnitt sind die Hepatozyten nur schwer vom umgebenden Bindegewebe zu unterscheiden. Vergrößerung 50fach

**Abbildung 3/3 – PAS-Färbung von normaler Rattenleber**



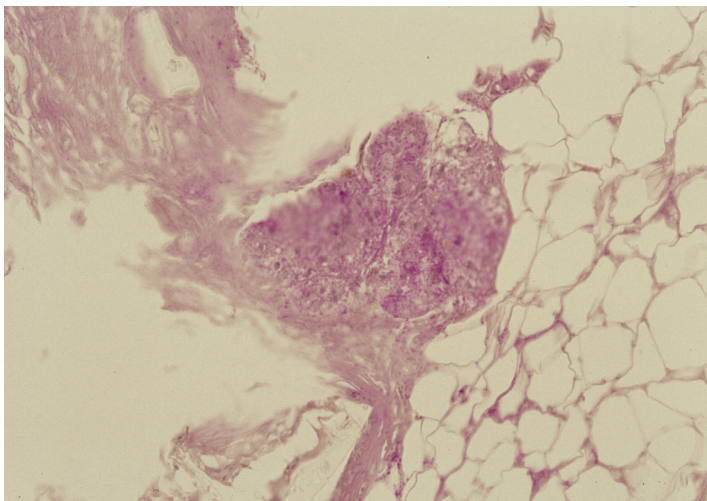
Normales Rattenlebergewebe. Positive Anfärbung aller Hepatozyten durch die PAS-Färbung, da diese Glykogen in großen Mengen enthalten. In der Mitte der Abbildung ist eine Zentralvene zu erkennen. Vergrößerung 100fach.

**Abbildung 3/4 – PAS gefärbte Hepatozyteninsel**



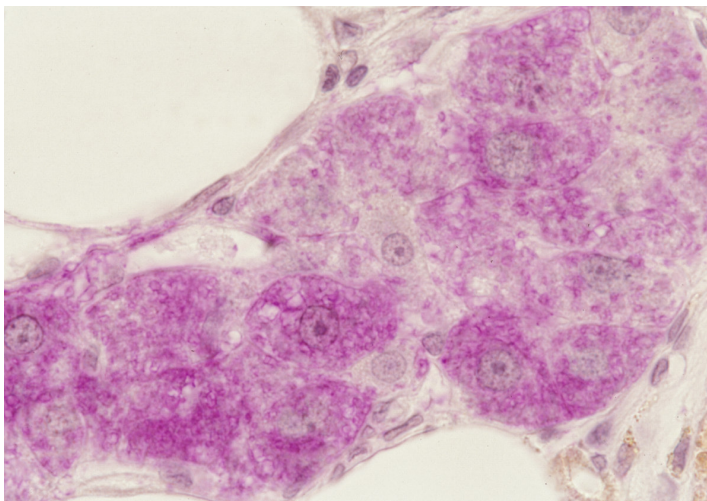
Hepatozyteninsel aus einem Polymer eines Tieres der Kontrollgruppe B, das nach drei Monaten explantiert wurde. Man sieht eine Hepatozyteninsel im Polymer. Diese ist von Bindegewebe umgeben. Dunkelblau stellen sich die Zellkerne dar, während die Glykogengranula der Hepatozyten sich kräftig lila färben. Vergrößerung 250fach.

**Abbildung 3/5 - PAS gefärbte Hepatozyteninsel**



Hepatozyteninsel aus einem Polymer eines Tieres der Probengruppe A, das nach 6 Monaten explantiert wurde. Die Insel ist von einigen Adipozyten auf der rechten Seite und von Lockerem Bindegewebe auf der linken Seite des Bildes eingerahmt. Vergrößerung 50fach.

**Abbildung 3/6 – PAS gefärbte Hepatozyteninsel**



Hepatozyteninsel aus einem Polymer eines Tieres der Probengruppe B, das nach 3 Monaten explantiert wurde. Sehr schön sind auf diesem Bild die blauen Zellkerne und die lila Anfärbung einzelner Glykogengranula in den Hepatozyten zu sehen. Links oben und unten sind zwei Adipozyten zu erkennen. Vergrößerung 250fach.

### 3.8.3 Immunhistochemische Färbung mit dem Hepatocyte Antikörper

Der Hepatocyte Antikörper der Firma DAKO dient zur zweifelsfreien Diagnostik von Hepatozyten und wird auch in der Routinediagnostik der Pathologie zur selbigen verwendet. Dabei färben sich die Hepatozyten rot und ihre Kerne blau. Die Färbung wurde wie im Kapitel 2.8.3.2 beschrieben durchgeführt. Dabei markiert der Antikörper spezifisch Hepatozyten im mit Bindegewebe durchsetzten Polymer, während Gallengangsepithelien und nicht parenchymatöse Zellen nicht markiert werden. Es wurde somit noch einmal zweifelsfrei die Existenz von Hepatozyten in den Polymeren nachgewiesen.

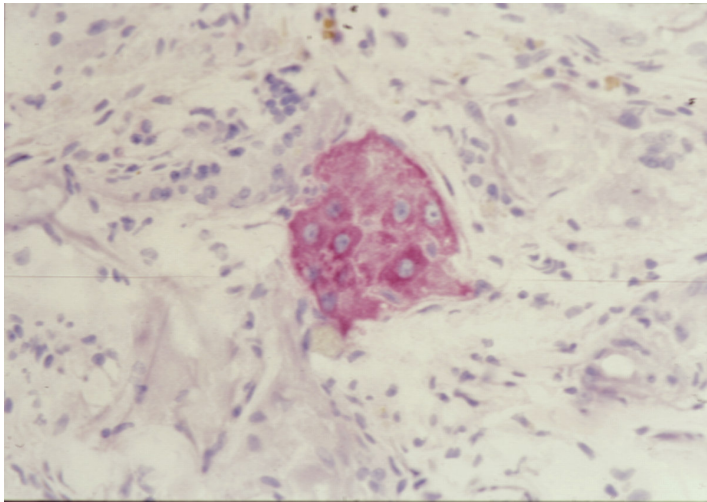
Abbildungen 3/7 und 3/8 zeigen immunhistochemische Färbungen mit dem Hepatocyte Antikörper

### 3.8.4 Immunhistochemische Färbung mit dem CK 18 – Antikörper

Cytokeratine dienen zur Anfärbung von Epithelien. Der von uns verwendete Cytokeratin-18-Klon RGE 53 färbte selektiv Hepatozyten rot, während das umgebende Bindegewebe nicht angefärbt wurde. Die Zellkerne wurden Blau angefärbt. Die Färbung wurde wie im Kapitel 2.8.4.2 dargestellt durchgeführt. Eine CK 18 Färbung zeigt Abbildung 3/9.

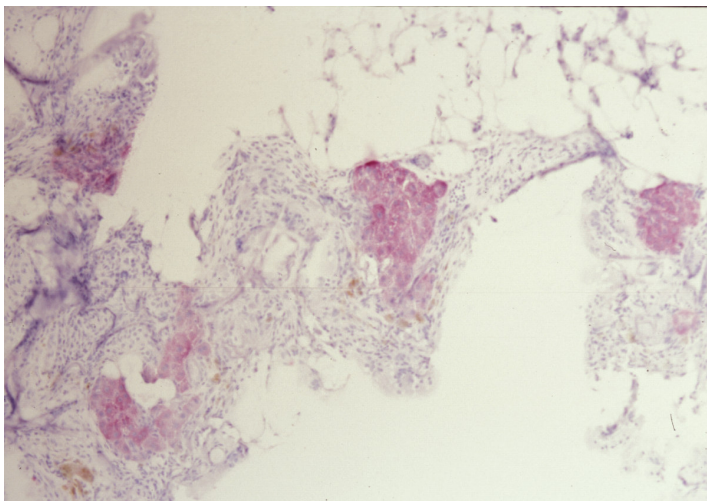


**Abbildung 3/7 –Mit Hepatocyte-Antikörper gefärbte Hepatozyteninsel**



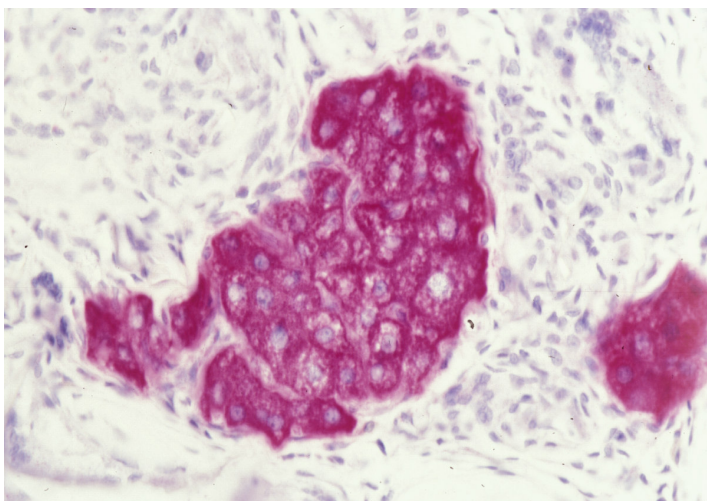
Das Bild zeigt eine Hepatozyteninsel aus einem Polymer einer Ratte der Probengruppe A, das nach 3 Monaten explantiert wurde. Man sieht in rot das gefärbte Zytoplasma der Hepatozyten, während sich die Zellkerne aller Zellen blau darstellen. Vergrößerung 100fach.

**Abbildung 3/8 –Mit Hepatocyte-Antikörper gefärbte Hepatozyteninsel**



Das Bild zeigt Hepatozyteninseln aus einem Polymer einer Ratte der Kontrollgruppe A, das nach 6 Monaten explantiert wurde. Man sieht eine Ansammlung von vier Hepatozyteninseln auf geringem Raum, die von lockerem Binde- und Fettgewebe umgeben sind. Vergrößerung 50fach.

**Abbildung 3/9 – CK 18 gefärbte Hepatozyteninsel**



Hepatozyteninsel aus einem Polymer einer Ratte der Kontrollgruppe A, das nach 6 Monaten explantiert wurde. Man sieht eine große und eine kleine Insel aus Hepatozyten, die stark rot gefärbt wurden. Die Zellkerne stellen sich blau dar. Vergrößerung 100fach.

### 3.9 Auswertung der Zelloberfläche mit dem Image Analyzer

Um eine Aussage über die Menge der die Transplantation überlebenden Zellen machen zu können, und um deren Wachstum und Proliferation nach der Transplantation beurteilen zu können, wurden PAS gefärbte Schnitte ausgewertet. Dazu wurde aus jedem Tier ein Polymer in drei Ebenen geschnitten und aus jeder Ebene 3 Schnitte gefärbt. Aus den Schnitten wurden unter dem Mikroskop zufällig 3 Bildebenen ausgewählt und diese wie in Kapitel 2.9 beschrieben ausgewertet. Dabei wurden die folgenden Ergebnisse beobachtet: Es zeigt sich, dass bei allen Gruppen, außer bei der Kontrollgruppe B von der ersten Woche zum Zeitpunkt ein Monat ein Rückgang der Zelloberfläche zu finden ist. Vom Zeitpunkt ein Monat bis zum Zeitpunkt drei Monate kommt es dann in allen Gruppen zu einer Zunahme der Zelloberfläche. Vom Zeitpunkt drei Monate zum Zeitpunkt sechs Monate kommt es bei allen Gruppen zu einem starken Anstieg der Hepatozytenoberfläche. Dabei ist dieser Anstieg in Probengruppe A ( $p=0,003$ ), in Kontrollgruppe A ( $p=0,008$ ) und in Kontrollgruppe B ( $p=0,006$ ) hoch signifikant. Vergleicht man die einzelnen Gruppen untereinander, so zeigt sich im Trend, dass mehr Hepatozyten der Kontrollgruppen als Hepatozyten der Probengruppen die Transplantation überlebten. Im einzelnen zeigt sich aber, dass diese Unterschiede zum Zeitpunkt sechs Monate ( $p=0,149$ ) statistisch nicht signifikant sind. Von den Hepatozyten der Probengruppe B überlebten im Vergleich zur Kontrollgruppe B eine Woche nach Transplantation mehr Zellen die Prozedur. Weiterhin waren zu allen Zeitpunkten mehr Hepatozyteninseln in den Kontrollgruppen als in den Probengruppen zu sehen, die gesehenen Hepatozyteninseln waren aber in den Probengruppen zu den Zeitpunkten 1 Woche und 1 Monat größer. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 3/7 dargestellt. Einen zusammenfassenden Überblick über die gemessene Hepatozytenoberfläche gibt Diagramm 3/1. Diagramm 3/2 zeigt die Anzahl der Hepatozyteninseln pro Gesichtsfeld in der Übersicht und Diagramm 3/3 bietet eine Zusammenfassung über die Größe der ausgemessenen Hepatozyteninseln.

**Tabelle 3/7 – Auswertung der Zelloberfläche mit dem Image Analyzer**

**Probengruppe A – 1 Woche nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,3707 \pm 0,1136$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $2,1944 \pm 0,9089$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
37Ia1	3	0,5826	2,9426
37Ia2	2	0,2531	2,9426
37Ia3	2	0,2502	2,9426
37IIa1	5	0,6928	2,9426
37IIa2	4	1,0066	2,9426
37IIa3	2	0,3780	2,9426
37IIIa1	5	0,5242	2,9426
37IIIa2	1	0,1135	2,9426
37IIIa3	7	1,0252	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,4444	0,5363	2,9426
38Ia1	3	0,4989	2,9426
38Ia2	1	0,0510	2,9426
38Ia3	1	0,5920	2,9426
38IIa1	1	0,0612	2,9426
38IIa2	0	0	2,9426
38IIa3	0	0	2,9426
38IIIa1	6	1,3007	2,9426
38IIIa2	0	0	2,9426
38IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,3333	0,2782	2,9426
39Ia1	2	0,4337	2,9426
39Ia2	2	0,4816	2,9426
39Ia3	2	0,2133	2,9426
39IIa1	2	0,1398	2,9426
39IIa2	2	0,2194	2,9426
39IIa3	1	0,6525	2,9426
39IIIa1	1	0,4010	2,9426
39IIIa2	2	0,1875	2,9426
39IIIa3	2	0,3329	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,7778	0,3402	2,9426
40Ia1	2	0,6454	2,9426
40Ia2	3	0,4528	2,9426
40Ia3	2	0,1408	2,9426
40IIa1	2	0,2115	2,9426
40IIa2	3	0,3469	2,9426
40IIa3	2	0,3130	2,9426
40IIIa1	3	0,5913	2,9426
40IIIa2	2	0,0860	2,9426
40IIIa3	1	0,1671	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,2222	0,3283	2,9426
Durchschnitt	2,1944	0,3707	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	0,9089	0,1136	0

**Probengruppe A – 1 Monat nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,2892 \pm 0,0825$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $1,9167 \pm 0,4095$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
41Ia1	1	0,0954	2,9426
41Ia2	3	0,2495	2,9426
41Ia3	1	0,1423	2,9426
41IIa1	4	1,2219	2,9426
41IIa2	1	0,0656	2,9426
41IIa3	1	0,1046	2,9426
41IIIa1	2	0,1931	2,9426
41IIIa2	3	0,1946	2,9426
41IIIa3	1	0,2263	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,8889	0,2771	2,9426
42Ia1	3	0,9341	2,9426
42Ia2	1	0,2020	2,9426
42Ia3	2	0,2069	2,9426
42IIa1	3	0,2482	2,9426
42IIa2	2	0,5173	2,9426
42IIa3	4	0,4110	2,9426
42IIIa1	3	0,7140	2,9426
42IIIa2	4	0,3849	2,9426
42IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,4444	0,4020	2,9426
43Ia1	2	0,2877	2,9426
43Ia2	1	0,0962	2,9426
43Ia3	1	0,1158	2,9426
43IIa1	2	0,1013	2,9426
43IIa2	2	0,1768	2,9426
43IIa3	1	0,1480	2,9426
43IIIa1	2	0,2589	2,9426
43IIIa2	1	0,5533	2,9426
43IIIa3	1	0,0944	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,4444	0,2036	2,9426
44Ia1	3	0,3207	2,9426
44Ia2	1	0,0793	2,9426
44Ia3	1	0,2069	2,9426
44IIa1	2	0,2413	2,9426
44IIa2	3	0,2360	2,9426
44IIa3	0	0	2,9426
44IIIa1	2	0,3803	2,9426
44IIIa2	3	0,7734	2,9426
44IIIa3	2	0,2296	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,8889	0,2742	2,9426
Durchschnitt	1,9167	0,2892	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	0,4095	0,0825	0

**Probengruppe A – 3 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,1853 \pm 0,0824$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $0,9722 \pm 0,4095$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
45Ia1	1	0,0579	2,9426
45Ia2	1	0,1089	2,9426
45Ia3	0	0	2,9426
45IIa1	1	0,1906	2,9426
45IIa2	2	0,3599	2,9426
45IIa3	2	0,2791	2,9426
45IIIa1	1	0,2791	2,9426
45IIIa2	1	0,1589	2,9426
45IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	1	0,1594	2,9426
46Ia1	1	0,0676	2,9426
46Ia2	1	0,1161	2,9426
46Ia3	0	0	2,9426
46IIa1	1	0,3064	2,9426
46IIa2	0	0	2,9426
46IIa3	0	0	2,9426
46IIIa1	1	0,2332	2,9426
46IIIa2	0	0	2,9426
46IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	0,4444	0,0804	2,9426
47Ia1	1	0,1054	2,9426
47Ia2	0	0	2,9426
47Ia3	0	0	2,9426
47IIa1	1	0,2033	2,9426
47IIa2	3	0,8086	2,9426
47IIa3	0	0,1982	2,9426
47IIIa1	2	0,6416	2,9426
47IIIa2	2	0,2268	2,9426
47IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	1	0,2426	2,9426
48Ia1	1	0,0597	2,9426
48Ia2	1	0,0643	2,9426
48Ia3	0	0	2,9426
48IIa1	1	0,7752	2,9426
48IIa2	1	0,0638	2,9426
48IIa3	1	0,2097	2,9426
48IIIa1	2	0,3316	2,9426
48IIIa2	3	0,5806	2,9426
48IIIa3	3	0,2431	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,4444	0,2587	2,9426
Durchschnitt	0,9722	0,1853	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	0,4095	0,0824	0

**Probengruppe A – 6 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $1,6216 \pm 0,9503$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $3,8333 \pm 1,9887$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
49Ia1	6	1,3678	2,9426
49Ia2	3	0,6214	2,9426
49Ia3	6	0,3928	2,9426
49IIa1	2	1,6573	2,9426
49IIa2	2	0,2270	2,9426
49IIa3	3	0,2056	2,9426
49IIIa1	3	1,8606	2,9426
49IIIa2	2	1,8137	2,9426
49IIIa3	5	1,2601	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,5556	1,0452	2,9426
50Ia1	3	1,7550	2,9426
50Ia2	3	0,8612	2,9426
50Ia3	6	3,1383	2,9426
50IIa1	2	1,6305	2,9426
50IIa2	2	2,7060	2,9426
50IIa3	2	2,4131	2,9426
50IIIa1	2	1,1867	2,9426
50IIIa2	6	2,8118	2,9426
50IIIa3	5	2,2634	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,4444	2,0851	2,9426
51Ia1	1	0,2074	2,9426
51Ia2	1	0,0972	2,9426
51Ia3	0	0	2,9426
51IIa1	1	1,4540	2,9426
51IIa2	1	0,4270	2,9426
51IIa3	1	0,4365	2,9426
51IIIa1	6	1,5815	2,9426
51IIIa2	3	1,0836	2,9426
51IIIa3	2	0,4720	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,7778	0,6399	2,9426
52Ia1	8	3,5365	2,9426
52Ia2	5	2,2726	2,9426
52Ia3	7	2,1961	2,9426
52IIa1	5	5,0581	2,9426
52IIa2	3	2,2343	2,9426
52IIa3	5	1,9218	2,9426
52IIIa1	6	1,7489	2,9426
52IIIa2	6	2,6294	2,9426
52IIIa3	14	2,8491	2,9426
Mittelwert des Tieres	6,5556	2,7163	2,9426
Durchschnitt	3,8333	1,6216	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	1,9887	0,9503	0

**Probengruppe B – 1 Woche nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,3778 \pm 0,1879$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $2,0278 \pm 1,2014$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
21Ia1	6	1,5259	2,9426
21Ia2	2	0,4681	2,9426
21Ia3	2	0,4819	2,9426
21IIa1	2	0,6112	2,9426
21IIa2	3	0,4224	2,9426
21IIa3	3	0,3903	2,9426
21IIIa1	2	0,2281	2,9426
21IIIa2	2	0,3018	2,9426
21IIIa3	5	0,5505	2,9426
Mittelwert des Tieres	3	0,5533	2,9426
22Ia1	1	0,1349	2,9426
22Ia2	2	0,1620	2,9426
22Ia3	3	0,6694	2,9426
22IIa1	3	0,5145	2,9426
22IIa2	2	0,6765	2,9426
22IIa3	1	0,3844	2,9426
22IIIa1	7	1,0647	2,9426
22IIIa2	5	0,4709	2,9426
22IIIa3	4	0,5926	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,1111	0,5189	2,9426
23Ia1	1	0,2862	2,9426
23Ia2	1	0,1031	2,9426
23Ia3	0	0	2,9426
23IIa1	1	0,0717	2,9426
23IIa2	1	0,0732	2,9426
23IIa3	1	0,2161	2,9426
23IIIa1	1	0,3191	2,9426
23IIIa2	1	0,4523	2,9426
23IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	0,7778	0,1691	2,9426
24Ia1	1	0,4066	2,9426
24Ia2	2	0,4278	2,9426
24Ia3	0	0	2,9426
24IIa1	1	1,1599	2,9426
24IIa2	0	0	2,9426
24IIa3	0	0	2,9426
24IIIa1	1	0,1082	2,9426
24IIIa2	5	0,2406	2,9426
24IIIa3	1	0,0878	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,2222	0,2701	2,9426
Durchschnitt	2,0278	0,3778	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	1,2014	0,1879	0

**Probengruppe B – 1 Monat nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,2482 \pm 0,2715$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $1,4722 \pm 1,3977$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
25Ia1	6	0,6752	2,9426
25Ia2	4	0,4444	2,9426
25Ia3	1	0,8704	2,9426
25IIa1	6	1,2323	2,9426
25IIa2	4	0,3250	2,9426
25IIa3	5	1,0063	2,9426
25IIIa1	3	0,7472	2,9426
25IIIa2	1	0,3360	2,9426
25IIIa3	2	0,2597	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,5556	0,6551	2,9426
26Ia1	0	0	2,9426
26Ia2	1	0,2051	2,9426
26Ia3	1	0,0990	2,9426
26IIa1	0	0	2,9426
26IIa2	1	0,1816	2,9426
26IIa3	2	0,1923	2,9426
26IIIa1	1	0,0719	2,9426
26IIIa2	2	0,1173	2,9426
26IIIa3	1	0,2564	2,9426
Mittelwert des Tieres	1	0,1249	2,9426
27Ia1	1	0,2383	2,9426
27Ia2	0	0	2,9426
27Ia3	0	0	2,9426
27IIa1	1	0,0957	2,9426
27IIa2	2	0,5689	2,9426
27IIa3	0	0	2,9426
27IIIa1	2	0,1082	2,9426
27IIIa2	0	0	2,9426
27IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	0,6667	0,1123	2,9426
28Ia1	1	0,1587	2,9426
28Ia2	0	0	2,9426
28Ia3	0	0	2,9426
28IIa1	2	0,1089	2,9426
28IIa2	1	0,2520	2,9426
28IIa3	1	0,1781	2,9426
28IIIa1	1	0,2056	2,9426
28IIIa2	0	0	2,9426
28IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	0,6667	0,1004	2,9426
Durchschnitt	1,4722	0,2482	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	1,3977	0,2715	0



**Probengruppe B – 3 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,3701 \pm 0,1494$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $2,2222 \pm 0,7590$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
29Ia1	1	1,2237	2,9426
29Ia2	6	1,0752	2,9426
29Ia3	2	0,2025	2,9426
29IIa1	2	0,4546	2,9426
29IIa2	3	0,4740	2,9426
29IIa3	1	0,1525	2,9426
29IIIa1	1	0,2525	2,9426
29IIIa2	2	0,4505	2,9426
29IIIa3	3	0,4740	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,3333	0,5288	2,9426
30Ia1	2	0,1002	2,9426
30Ia2	3	0,3905	2,9426
30Ia3	3	0,5612	2,9426
30IIa1	1	0,2117	2,9426
30IIa2	1	0,0546	2,9426
30IIa3	0	0	2,9426
30IIIa1	2	0,1084	2,9426
30IIIa2	3	0,3589	2,9426
30IIIa3	2	0,2921	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,8889	0,2308	2,9426
31Ia1	6	0,5637	2,9426
31Ia2	3	0,3666	2,9426
31Ia3	4	0,8035	2,9426
31IIa1	3	0,6166	2,9426
31IIa2	3	0,3104	2,9426
31IIa3	3	0,4038	2,9426
31IIIa1	2	0,5084	2,9426
31IIIa2	3	0,4196	2,9426
31IIIa3	2	0,1969	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,2222	0,4655	2,9426
32Ia1	1	0,2219	2,9426
32Ia2	1	0,1918	2,9426
32Ia3	0	0	2,9426
32IIa1	1	0,3329	2,9426
32IIa2	1	0,5892	2,9426
32IIa3	0	0	2,9426
32IIIa1	5	0,5263	2,9426
32IIIa2	1	0,1770	2,9426
32IIIa3	3	0,2564	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,4444	0,2551	2,9426
Durchschnitt	2,2222	0,3701	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	0,7590	0,1494	0

**Probengruppe B – 6 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,7621 \pm 1,0297$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $2,2222 \pm 2,7652$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
33Ia1	13	5,3747	2,9426
33Ia2	3	0,2979	2,9426
33Ia3	5	0,3584	2,9426
33IIa1	9	2,3292	2,9426
33IIa2	3	3,6832	2,9426
33IIa3	1	0,2250	2,9426
33IIIa1	13	4,3469	2,9426
33IIIa2	7	3,7495	2,9426
33IIIa3	3	0,3456	2,9426
Mittelwert des Tieres	6,3333	2,3012	2,9426
34Ia1	1	0,1668	2,9426
34Ia2	0	0	2,9426
34Ia3	1	0,5263	2,9426
34IIa1	1	0,2627	2,9426
34IIa2	0	0	2,9426
34IIa3	0	0	2,9426
34IIIa1	1	0,5038	2,9426
34IIIa2	0	0	2,9426
34IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	0,4444	0,1622	2,9426
35Ia1	1	0,1240	2,9426
35Ia2	1	0,0844	2,9426
35Ia3	2	0,0648	2,9426
35IIa1	1	1,0775	2,9426
35IIa2	1	0,3837	2,9426
35IIa3	0	0	2,9426
35IIIa1	1	0,2186	2,9426
35IIIa2	0	0	2,9426
35IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	0,7778	0,2170	2,9426
36Ia1	2	0,4944	2,9426
36Ia2	1	0,3451	2,9426
36Ia3	2	0,3041	2,9426
36IIa1	5	1,1188	2,9426
36IIa2	1	0,8492	2,9426
36IIa3	0	0	2,9426
36IIIa1	0	0	2,9426
36IIIa2	0	0	2,9426
36IIIa3	1	0,2020	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,3333	0,3682	2,9426
Durchschnitt	2,2222	0,7621	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	2,7652	1,0297	0

**Kontrollgruppe A – 1 Woche nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,4746 \pm 0,1715$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $3,2778 \pm 0,8140$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
53Ia1	3	0,4237	2,9426
53Ia2	5	0,4645	2,9426
53Ia3	4	0,2926	2,9426
53IIa1	6	0,6709	2,9426
53IIa2	3	0,5604	2,9426
53IIa3	3	1,4861	2,9426
53IIIa1	7	1,3645	2,9426
53IIIa2	2	0,4432	2,9426
53IIIa3	1	0,4411	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,7778	0,6830	2,9426
54Ia1	4	0,3337	2,9426
54Ia2	1	0,0681	2,9426
54Ia3	0	0	2,9426
54IIa1	4	0,4750	2,9426
54IIa2	3	0,1064	2,9426
54IIa3	4	0,1217	2,9426
54IIIa1	1	0,5474	2,9426
54IIIa2	1	0,1048	2,9426
54IIIa3	1	0,7487	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,1111	0,2784	2,9426
55Ia1	3	0,3207	2,9426
55Ia2	8	1,2782	2,9426
55Ia3	2	0,1816	2,9426
55IIa1	4	0,4255	2,9426
55IIa2	2	0,3405	2,9426
55IIa3	6	0,5423	2,9426
55IIIa1	4	0,2951	2,9426
55IIIa2	3	0,1230	2,9426
55IIIa3	3	0,2079	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,8889	0,4128	2,9426
56Ia1	2	0,4388	2,9426
56Ia2	3	0,4962	2,9426
56Ia3	2	1,3339	2,9426
56IIa1	3	0,2612	2,9426
56IIa2	7	0,8428	2,9426
56IIa3	6	0,4331	2,9426
56IIIa1	2	0,4671	2,9426
56IIIa2	3	0,2783	2,9426
56IIIa3	2	0,1658	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,3333	0,5241	2,9426
Durchschnitt	3,2778	0,4746	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	0,8140	0,1715	0

**Kontrollgruppe A – 1 Monat nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,4313 \pm 0,2895$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $3,3889 \pm 2,3960$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
57Ia1	2	0,3525	2,9426
57Ia2	1	0,3497	2,9426
57Ia3	0	0	2,9426
57IIa1	1	0,1582	2,9426
57IIa2	1	0,1339	2,9426
57IIa3	1	0,0936	2,9426
57IIIa1	1	0,4000	2,9426
57IIIa2	3	0,1747	2,9426
57IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,1111	0,1847	2,9426
58Ia1	1	0,2235	2,9426
58Ia2	1	0,1934	2,9426
58Ia3	1	0,0679	2,9426
58IIa1	2	0,2250	2,9426
58IIa2	4	0,1900	2,9426
58IIa3	0	0	2,9426
58IIIa1	2	0,1574	2,9426
58IIIa2	2	0,2895	2,9426
58IIIa3	1	0,2604	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,5556	0,1786	2,9426
59Ia1	2	0,1985	2,9426
59Ia2	4	0,2311	2,9426
59Ia3	2	0,2564	2,9426
59IIa1	10	1,0612	2,9426
59IIa2	3	0,4841	2,9426
59IIa3	1	0,1304	2,9426
59IIIa1	12	2,4662	2,9426
59IIIa2	9	0,6875	2,9426
59IIIa3	3	0,3263	2,9426
Mittelwert des Tieres	5,1111	0,6491	2,9426
60Ia1	2	0,2719	2,9426
60Ia2	3	0,4824	2,9426
60Ia3	4	0,2459	2,9426
60IIa1	8	0,9183	2,9426
60IIa2	8	1,1895	2,9426
60IIa3	4	0,3959	2,9426
60IIIa1	6	1,1101	2,9426
60IIIa2	11	0,5252	2,9426
60IIIa3	6	1,2765	2,9426
Mittelwert des Tieres	5,7778	0,7129	2,9426
Durchschnitt	3,3889	0,4313	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	2,3960	0,2895	0

**Kontrollgruppe A – 3 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,6791 \pm 0,5959$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $3,5 \pm 3,001$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
61Ia1	4	1,2474	2,9426
61Ia2	1	0,7035	2,9426
61Ia3	8	2,0550	2,9426
61IIa1	14	2,4096	2,9426
61IIa2	4	1,2663	2,9426
61IIa3	2	0,9232	2,9426
61IIIa1	21	2,4807	2,9426
61IIIa2	10	1,3895	2,9426
61IIIa3	7	1,5083	2,9426
Mittelwert des Tieres	7,8889	1,5537	2,9426
62Ia1	10	1,1025	2,9426
62Ia2	3	1,2609	2,9426
62Ia3	1	0,1826	2,9426
62IIa1	3	0,4497	2,9426
62IIa2	1	0,1365	2,9426
62IIa3	0	0	2,9426
62IIIa1	2	0,5265	2,9426
62IIIa2	4	1,2930	2,9426
62IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,6667	0,5502	2,9426
63Ia1	1	0,1048	2,9426
63Ia2	2	0,3212	2,9426
63Ia3	0	0	2,9426
63IIa1	1	0,1480	2,9426
63IIa2	1	0,5436	2,9426
63IIa3	2	0,4747	2,9426
63IIIa1	2	0,5135	2,9426
63IIIa2	1	0,1760	2,9426
63IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,1111	0,2535	2,9426
64Ia1	6	0,8089	2,9426
64Ia2	2	0,4645	2,9426
64Ia3	0	0	2,9426
64IIa1	2	0,3546	2,9426
64IIa2	1	0,4821	2,9426
64IIa3	0	0	2,9426
64IIIa1	3	0,5028	2,9426
64IIIa2	3	0,2441	2,9426
64IIIa3	4	0,3732	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,3333	0,3589	2,9426
Durchschnitt	3,5	0,6791	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	3,001	0,5959	0

**Kontrollgruppe A – 6 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $1,8677 \pm 0,9089$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $4,3889 \pm 1,7789$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
65Ia1	7	4,4143	2,9426
65Ia2	1	0,2054	2,9426
65Ia3	0	0	2,9426
65IIa1	4	3,4087	2,9426
65IIa2	7	5,0530	2,9426
65IIa3	9	4,1717	2,9426
65IIIa1	3	3,5990	2,9426
65IIIa2	5	2,1198	2,9426
65IIIa3	4	2,6055	2,9426
Mittelwert des Tieres	4,4444	2,8419	2,9426
66Ia1	20	6,1997	2,9426
66Ia2	3	0,9451	2,9426
66Ia3	11	0,2118	2,9426
66IIa1	2	2,5465	2,9426
66IIa2	4	0,4954	2,9426
66IIa3	1	0,7581	2,9426
66IIIa1	11	2,7009	2,9426
66IIIa2	3	0,8349	2,9426
66IIIa3	5	1,0997	2,9426
Mittelwert des Tieres	6,6667	1,7547	2,9426
67Ia1	1	0,3048	2,9426
67Ia2	3	0,3918	2,9426
67Ia3	1	0,2860	2,9426
67IIa1	1	1,0364	2,9426
67IIa2	3	1,2558	2,9426
67IIa3	1	0,1474	2,9426
67IIIa1	7	1,4665	2,9426
67IIIa2	2	0,5740	2,9426
67IIIa3	2	0,6607	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,3333	0,6804	2,9426
68Ia1	6	3,0792	2,9426
68Ia2	3	1,8700	2,9426
68Ia3	2	1,0206	2,9426
68IIa1	4	3,4207	2,9426
68IIa2	10	3,7299	2,9426
68IIa3	6	2,1440	2,9426
68IIIa1	2	1,8326	2,9426
68IIIa2	1	0,9372	2,9426
68IIIa3	3	1,7119	2,9426
Mittelwert des Tieres	4,1111	2,1940	2,9426
Durchschnitt	4,3889	1,8677	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	1,7789	0,9089	0

**Kontrollgruppe B – 1 Woche nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,2159 \pm 0,0727$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $2,1944 \pm 0,4747$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
5Ia1	2	0,2252	2,9426
5Ia2	1	0,0296	2,9426
5Ia3	0	0	2,9426
5IIa1	4	0,2967	2,9426
5IIa2	2	0,1224	2,9426
5IIa3	0	0	2,9426
5IIIa1	4	0,5117	2,9426
5IIIa2	2	0,0758	2,9426
5IIIa3	0	0	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,6667	0,1402	2,9426
6Ia1	4	0,2918	2,9426
6Ia2	4	0,1329	2,9426
6Ia3	1	0,1099	2,9426
6IIa1	4	0,1791	2,9426
6IIa2	1	0,0472	2,9426
6IIa3	0	0	2,9426
6IIIa1	3	0,1890	2,9426
6IIIa2	3	0,4372	2,9426
6IIIa3	1	0,1337	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,3333	0,1690	2,9426
7Ia1	2	0,2515	2,9426
7Ia2	3	0,2908	2,9426
7Ia3	3	0,4237	2,9426
7IIa1	0	0	2,9426
7IIa2	1	0,0452	2,9426
7IIa3	0	0	2,9426
7IIIa1	1	0,0452	2,9426
7IIIa2	3	0,8377	2,9426
7IIIa3	5	0,4704	2,9426
Mittelwert des Tieres	2	0,2627	2,9426
8Ia1	1	0,0788	2,9426
8Ia2	0	0	2,9426
8Ia3	2	0,2686	2,9426
8IIa1	5	0,5727	2,9426
8IIa2	5	0,6117	2,9426
8IIa3	3	0,1003	2,9426
8IIIa1	4	0,5931	2,9426
8IIIa2	4	0,3464	2,9426
8IIIa3	1	0,0536	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,7778	0,2917	2,9426
Durchschnitt	2,1944	0,2159	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	0,4747	0,0727	0

**Kontrollgruppe B – 1 Monat nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0,5526 \pm 0,3585$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $5,0833 \pm 3,2297$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
9Ia1	3	0,4125	2,9426
9Ia2	2	0,1130	2,9426
9Ia3	1	0,0485	2,9426
9IIa1	11	0,6622	2,9426
9IIa2	2	0,1855	2,9426
9IIa3	6	0,6194	2,9426
9IIIa1	4	0,2110	2,9426
9IIIa2	5	0,2324	2,9426
9IIIa3	2	0,1360	2,9426
Mittelwert des Tieres	4	0,2911	2,9426
10Ia1	1	0,0388	2,9426
10Ia2	0	0	2,9426
10Ia3	0	0	2,9426
10IIa1	1	0,1179	2,9426
10IIa2	0	0	2,9426
10IIa3	0	0	2,9426
10IIIa1	4	0,5956	2,9426
10IIIa2	2	0,6859	2,9426
10IIIa3	3	0,5196	2,9426
Mittelwert des Tieres	1,2222	0,2175	2,9426
11Ia1	6	0,8984	2,9426
11Ia2	12	1,2964	2,9426
11Ia3	2	0,4104	2,9426
11IIa1	10	1,8032	2,9426
11IIa2	8	0,9931	2,9426
11IIa3	4	0,7512	2,9426
11IIIa1	2	0,1760	2,9426
11IIIa2	10	2,1165	2,9426
11IIIa3	3	0,2576	2,9426
Mittelwert des Tieres	6,3333	0,9670	2,9426
12Ia1	10	0,7336	2,9426
12Ia2	6	0,5887	2,9426
12Ia3	2	0,1773	2,9426
12IIa1	2	0,1944	2,9426
12IIa2	14	0,9895	2,9426
12IIa3	11	1,0045	2,9426
12IIIa1	13	1,2510	2,9426
12IIIa2	6	0,3518	2,9426
12IIIa3	15	1,3214	2,9426
Mittelwert des Tieres	8,7778	0,7347	2,9426
Durchschnitt	5,0833	0,5526	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	3,2297	0,3585	0



**Kontrollgruppe B – 3 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $1,0108 \pm 0,1799$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $6,7778 \pm 2,114$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
13Ia1	18	1,4030	2,9426
13Ia2	11	0,9280	2,9426
13Ia3	4	0,5625	2,9426
13IIa1	8	0,8875	2,9426
13IIa2	9	1,0540	2,9426
13IIa3	7	1,0614	2,9426
13IIIa1	7	0,8209	2,9426
13IIIa2	4	0,5130	2,9426
13IIIa3	9	0,8752	2,9426
Mittelwert des Tieres	8,5556	0,9006	2,9426
14Ia1	4	1,5221	2,9426
14Ia2	3	1,5162	2,9426
14Ia3	3	0,4308	2,9426
14IIa1	3	0,9456	2,9426
14IIa2	3	1,0556	2,9426
14IIa3	3	0,6923	2,9426
14IIIa1	6	0,5992	2,9426
14IIIa2	5	0,5622	2,9426
14IIIa3	4	0,2056	2,9426
Mittelwert des Tieres	3,7778	0,8364	2,9426
15Ia1	11	1,4048	2,9426
15Ia2	6	1,1408	2,9426
15Ia3	10	1,5795	2,9426
15IIa1	4	1,0650	2,9426
15IIa2	5	0,6701	2,9426
15IIa3	4	0,4110	2,9426
15IIIa1	8	1,0711	2,9426
15IIIa2	7	1,4614	2,9426
15IIIa3	7	0,8171	2,9426
Mittelwert des Tieres	6,8889	1,0690	2,9426
16Ia1	5	1,1277	2,9426
16Ia2	2	0,1722	2,9426
16Ia3	4	0,2722	2,9426
16IIa1	22	3,3100	2,9426
16IIa2	6	0,9336	2,9426
16IIa3	4	0,7801	2,9426
16IIIa1	18	2,5601	2,9426
16IIIa2	4	0,6872	2,9426
16IIIa3	6	1,2905	2,9426
Mittelwert des Tieres	7,8889	1,2371	2,9426
Durchschnitt	6,7778	1,0108	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	2,1140	0,1799	0

**Kontrollgruppe B – 6 Monate nach Implantation.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $1,4824 \pm 0,6961$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $4,3889 \pm 2,2671$ .

Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
17Ia1	4	0,7482	2,9426
17Ia2	4	1,9402	2,9426
17Ia3	5	1,0431	2,9426
17IIa1	13	3,7194	2,9426
17IIa2	4	1,0425	2,9426
17IIa3	5	1,1073	2,9426
17IIIa1	13	2,4927	2,9426
17IIIa2	9	1,5622	2,9426
17IIIa3	9	1,6999	2,9426
Mittelwert des Tieres	7,3333	1,7062	2,9426
18Ia1	9	4,0712	2,9426
18Ia2	4	2,6169	2,9426
18Ia3	7	2,4833	2,9426
18IIa1	5	1,5162	2,9426
18IIa2	2	0,5229	2,9426
18IIa3	5	1,2183	2,9426
18IIIa1	6	3,1797	2,9426
18IIIa2	2	0,5278	2,9426
18IIIa3	5	3,8814	2,9426
Mittelwert des Tieres	5	2,2242	2,9426
19Ia1	2	0,4240	2,9426
19Ia2	1	0,1747	2,9426
19Ia3	2	0,2105	2,9426
19IIa1	4	0,8137	2,9426
19IIa2	2	0,4783	2,9426
19IIa3	2	0,7137	2,9426
19IIIa1	4	1,1229	2,9426
19IIIa2	5	0,5181	2,9426
19IIIa3	3	0,5813	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,7778	0,5597	2,9426
20Ia1	2	0,5668	2,9426
20Ia2	2	0,5655	2,9426
20Ia3	2	0,7709	2,9426
20IIa1	5	3,6661	2,9426
20IIa2	4	2,2195	2,9426
20IIa3	1	0,2079	2,9426
20IIIa1	3	3,7179	2,9426
20IIIa2	1	0,4324	2,9426
20IIIa3	2	0,8102	2,9426
Mittelwert des Tieres	2,4444	1,4397	2,9426
Durchschnitt	4,3889	1,4824	2,9426
Standardabweichung der Mittelwerte der Tiere	2,2671	0,6961	0

**Kontrollgruppe C – Alle Zeitpunkte.** Es wurde im Durchschnitt eine prozentuale Gesamtfläche von  $0 \pm 0$  Hepatozyten gemessen. Dabei betrug die Anzahl der Hepatozyteninseln im Mittel  $0 \pm 0$ .

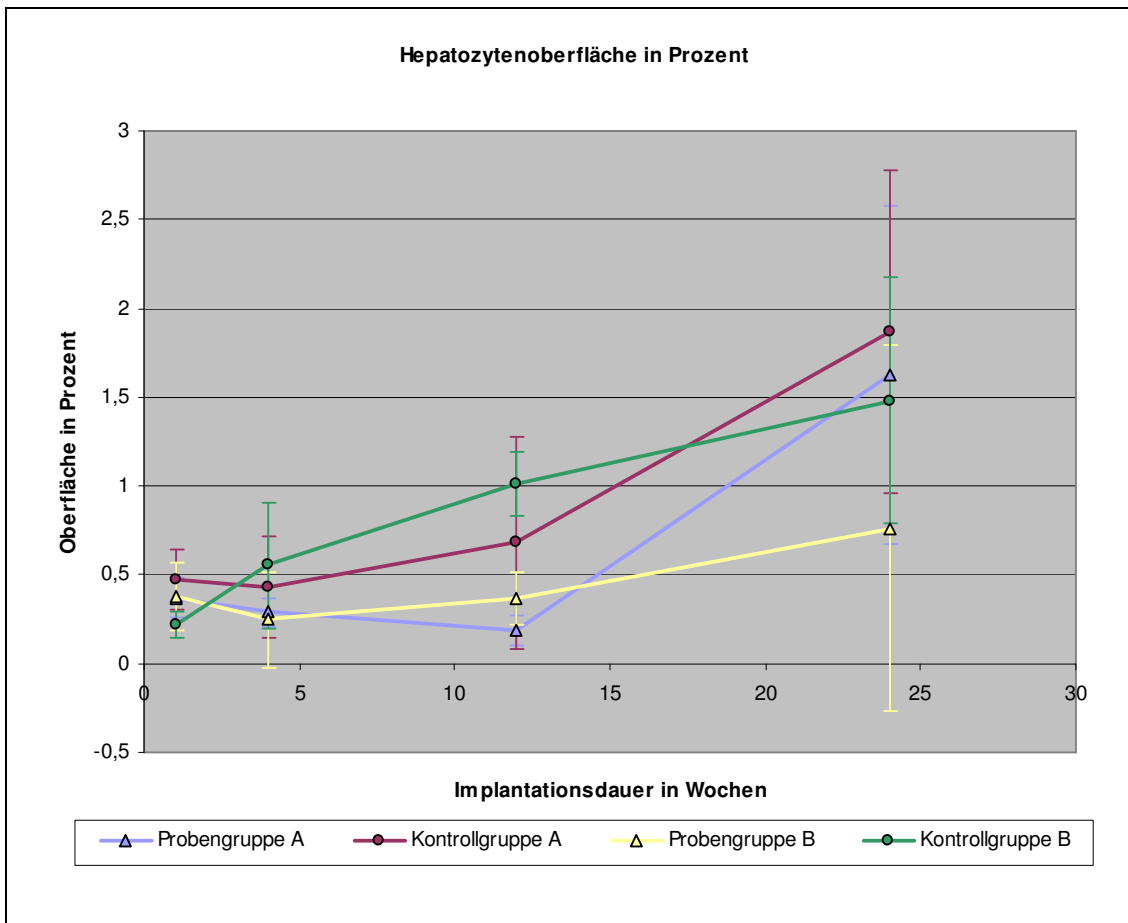
Polymernummer	Anzahl der Hepatozyteninseln	Anteil der Hepatozyteninseln an der Gesamtfläche in %	Gemessene Fläche in mm <sup>2</sup>
1Ia1	0	0	2,9426
1Ia2	0	0	2,9426
1Ia3	0	0	2,9426
1IIa1	0	0	2,9426
1IIa2	0	0	2,9426
1IIa3	0	0	2,9426
1IIIa1	0	0	2,9426
1IIIa2	0	0	2,9426
1IIIa3	0	0	2,9426
2Ia1	0	0	2,9426
2Ia2	0	0	2,9426
2Ia3	0	0	2,9426
2IIa1	0	0	2,9426
2IIa2	0	0	2,9426
2IIa3	0	0	2,9426
2IIIa1	0	0	2,9426
2IIIa2	0	0	2,9426
2IIIa3	0	0	2,9426
3Ia1	0	0	2,9426
3Ia2	0	0	2,9426
3Ia3	0	0	2,9426
3IIa1	0	0	2,9426
3IIa2	0	0	2,9426
3IIa3	0	0	2,9426
3IIIa1	0	0	2,9426
3IIIa2	0	0	2,9426
3IIIa3	0	0	2,9426
4Ia1	0	0	2,9426
4Ia2	0	0	2,9426
4Ia3	0	0	2,9426
4IIa1	0	0	2,9426
4IIa2	0	0	2,9426
4IIa3	0	0	2,9426
4IIIa1	0	0	2,9426
4IIIa2	0	0	2,9426
4IIIa3	0	0	2,9426
Durchschnitt	0	0	2,9426
Standardabweichung	0	0	0

### Diagramm 3/1 – Hepatozytenoberfläche in Prozent

Das Diagramm zeigt die Entwicklung der Hepatozytenoberfläche über 6 Monate. Vom Zeitpunkt 1 Woche zum Zeitpunkt 1 Monat kommt es bei allen Gruppen außer der Kontrollgruppe B zu einem Rückgang der Zelloberfläche. Danach nimmt die Zelloberfläche kontinuierlich statistisch signifikant zu.

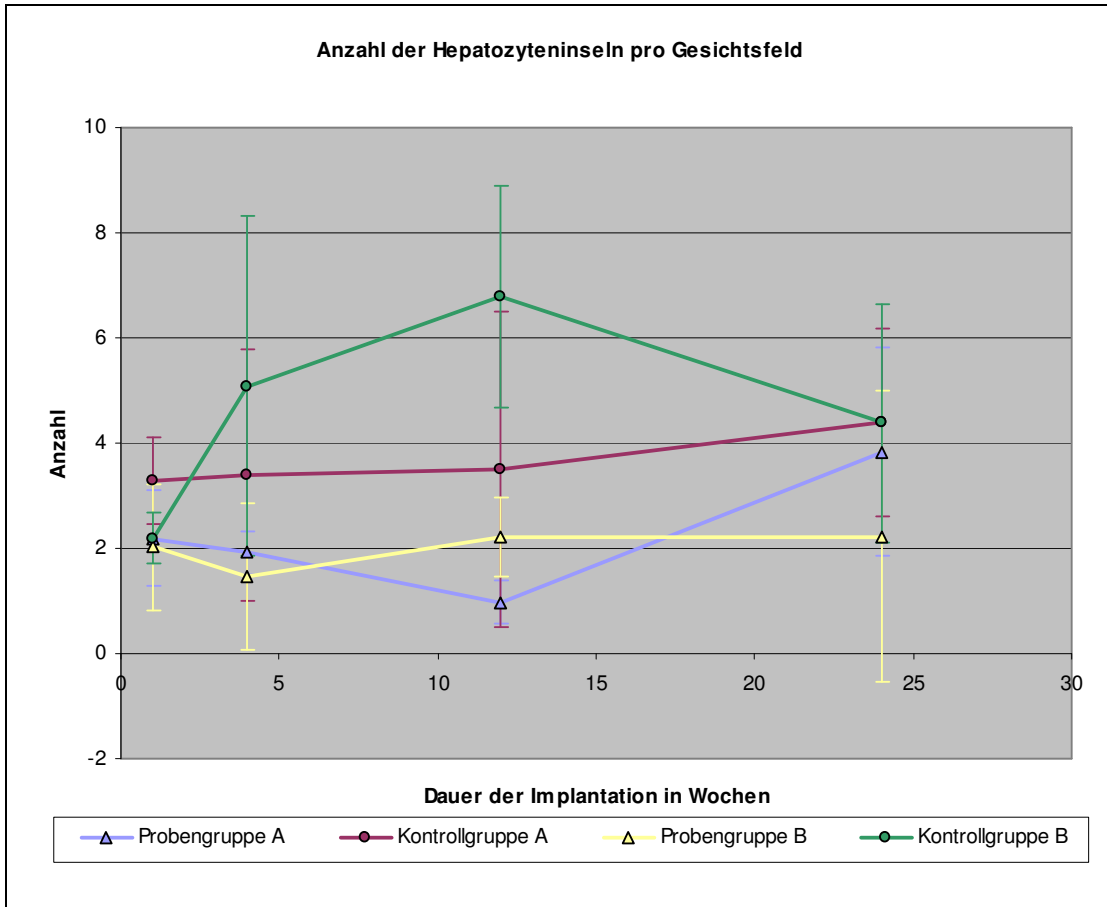
Im Vergleich der Probengruppen mit den Kontrollgruppen kann man tendenziell feststellen, dass die Kontrollgruppen eine größere Hepatozytenoberfläche als die Probengruppen haben. Diese Unterschiede sind aber statistisch nicht signifikant.

Im einzelnen ist die Hepatozytenoberfläche der Kontrollgruppe A zu allen Zeitpunkten größer als die Hepatozytenoberfläche der Probengruppe A. Die Hepatozytenoberfläche der Kontrollgruppe B ist ebenfalls zu allen Zeitpunkten bis auf den Zeitpunkt 1 Woche größer als die Hepatozytenoberfläche der Probengruppe B.



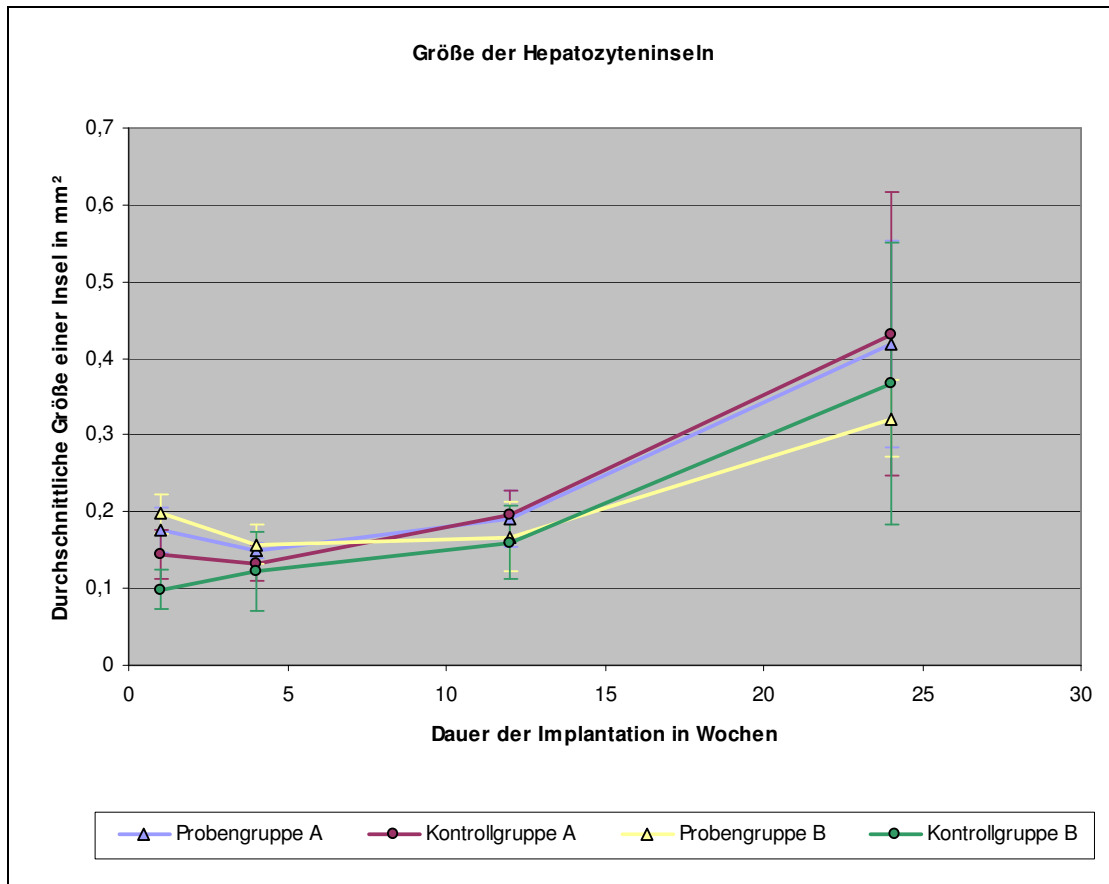
### Diagramm 3/2 – Anzahl der Hepatozyteninseln pro Gesichtsfeld

Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl der Hepatozyteninseln pro 2,9624mm<sup>2</sup> großem Gesichtsfeld. Dabei haben die Kontrollgruppen im Durchschnitt jeweils mehr Hepatozyteninseln als in den entsprechenden Probengruppen.



### Diagramm 3/3 – Größe der Hepatozyteninseln

Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Größe der einzelnen Hepatozyteninseln. Dabei zeigt sich, dass die einzelnen Hepatozyteninseln der Probengruppen zum Zeitpunkt 1 Woche und 1 Monat größer sind als die Hepatozyteninseln der Kontrollgruppen. Zu den Zeitpunkten 3 Monate und 6 Monate nähern sich dann die Größen der Hepatozyteninsel zwischen entsprechenden Proben- und Kontrollgruppen wieder einander an. Insgesamt fällt auf, dass die Größe der einzelnen Inseln bis zum Zeitpunkt 1 Monat leicht rückläufig ist und dann im weiteren Verlauf erneut zunimmt.



### 3.10 DNA-Messung

#### 3.10.1 DNA-Messung der kultivierten Polymere

Um etwas über die Ausgangs-DNA-Gehalt der kultivierten Polymere aussagen zu können, wurde jeweils ein fünftes Polymer mit im Flussbioreaktor kultiviert. Dieses wurde sofort nach der Demontage des Systems in flüssigen Stickstoff überführt und dann wie im Kapitel 2.10 beschrieben ausgewertet. Dabei wurde ein durchschnittlicher DNA-Gehalt von  $9,28 \pm 4,69$  ng/ml Probe pro im Flussbioreaktor kultivierten Polymer gemessen.

Polymernummer	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert der Messungen
25	8,0	10,1	9,8	9,2833
26	11,6	8,3	8,6	9,5
27	13,8	11,9	9,5	11,7333
28	6,5	9,4	9,6	8,5
29	7,6	7,2	8,4	7,7333
30	9,1	8,6	7,3	8,3333
31	7,8	7,8	12,7	9,4333
32	22,4	16	9,8	16,0667
33	4,6	7,1	7,3	6,3333
34	3,5	3,8	5,5	4,2667
35	5,7	6,4	6,0	6,0333
37	11,8	11,1	14,7	12,5333
38	2,8	2,9	2,9	2,8667
39	4,9	7,8	5,7	6,1333
40	4,6	5,2	3,6	4,4667
41	7,0	7,4	7,8	7,4
42	9,6	8,2	9,7	9,1667
43	9,5	11,1	7,8	9,4667
44	16,1	12,7	13,0	13,9333
45	5,1	5,7	5,3	5,3667
46	4,1	3,7	2,8	3,5333
47	10,8	22,6	16,4	16,6
48	16,6	19,9	24,4	20,3
49	5,6	5,0	6,1	5,5667
50	5,1	2,8	3,6	3,8333
51	15,0	17,6	18,4	17
52	15,6	15,0	15,1	15,2333
Gesamtmittel aller Messungen				9,2821
Standardabweichung				4,6915

### 3.10.2 DNA-Messung von mit 400 µl Zellsuspension besiedelten Polymeren

Um einen Vergleich der besiedelten Polymere zur Situation vor der Kultur der Polymere machen zu können, wurden sechs Polymere mit jeweils 400 µl Zellsuspension besiedelt, dann in flüssigen Stickstoff überführt und schließlich wie im Kapitel 2.10 beschrieben ausgewertet. Die so behandelten Polymere enthielten im Durchschnitt  $29,12 \pm 7,29$  ng/ml Probe DNA.

Polymernummer	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert der Messungen
B1	29	38,5	32	33,1667
B2	22	24	24,5	23,5
B3	24	22,5	24,5	23,6667
B4	19,7	23,3	19,9	20,9667
B5	38,6	40,2	36,6	38,4667
B6	39,7	33,8	31,4	34,9667
Gesamtmittel aller Messungen				29,1222
Standardabweichung				7,2899

### 3.10.3 DNA-Messung von 400 µl Zellsuspension

Um den Verbleib an Zellen auf der Petrischale durch das Besiedeln der Polymere zu dokumentieren wurde schließlich noch der DNA-Gehalt von 400 µl Zellsuspension bestimmt. Dies wurde ebenfalls wie in Kapitel 2.10 dargestellt durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass 400 µl Zellsuspension im Mittel  $90,17 \pm 10,16$  ng/ml Probe DNA enthielten.

Polymernummer	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert der Messungen
K1	92,5	98,5	83	91,3333
K2	81	80	75,5	78,8333
K3	86	88,5	76	83,5
K4	73,4	72,6	76,6	74,2
K5	89,6	90	95,2	91,6
K6	86,6	89,8	89,2	88,5333
K7	106,1	96,6	103,6	102,1
K8	100,4	104	109	104,4667
K9	97,2	99,2	94,4	96,9333
Gesamtmittel aller Messungen				90,1667
Standardabweichung				10,1648

Einen Überblick über den DNA-Gehalt der verschiedenen untersuchten Materialien gibt Diagramm 3/4.



### 3.10.4 DNA-Messung von 100 µl Zellsuspension

Des Weiteren wurde der DNA-Gehalt von 100 µl Zellsuspension gemessen. Dabei zeigte sich, dass 100 µl Zellsuspension wie erwartet mit  $24,94 \pm 2,16$  ng/ml Probe DNA in etwa ein Viertel von 400 µl Zellsuspension enthielten.

Polymernummer	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert der Messungen
K10	28	28,4	29,2	28,5333
K11	26,6	26	27,4	26,6667
K12	22,6	23,3	23,7	23,2
K13	22,9	24,3	24,6	23,9333
K14	22,9	24,3	24,6	23,9333
K15	23,3	23,2	23,7	23,4
Gesamtmittel aller Messungen				24,9444
Standardabweichung				2,1596

### 3.10.5 DNA-Messung von 25 µl Zellsuspension

Außerdem wurden noch 6 Proben mit jeweils 25 µl Zellsuspension vermessen. Dabei zeigte sich, dass 25 µl Zellsuspension im Mittel  $7,62 \pm 0,42$  ng/ml Probe DNA enthielten.

Polymernummer	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert der Messungen
K16	8,2	7,9	8,9	8,3333
K17	7,7	7,5	7,7	7,6333
K18	7,9	7,3	7,2	7,4667
K19	8	7,9	7,5	7,8
K20	6,8	7,6	7,6	7,3333
K21	7,4	6,7	7,3	7,1333
Gesamtmittel aller Messungen				7,6167
Standardabweichung				0,4205

3.10.6 Messung des DNA-Gehaltes eines besiedelten Polymers zusammen mit dem Rest von 400 µl Zellsuspension

Um zu zeigen, dass die gesamte Zellsuspension aus dem Polymer gelöst wurde, wurde ein besiedeltes Polymer inklusive der zum Besiedeln eingesetzten 400 µl Zellsuspension gemessen.

Polymernummer	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert der Messungen
P+R	81,5	81	89,5	84
P+R	82,5	86	80	82,8333
P+R	76	76	74,5	75,5
Gesamtmittel aller Messungen				80,7778
Standardabweichung				4,6078

Mit  $80,78 \pm 4,61$  ng/ml Probe DNA entspricht der DNA-Gehalt fast genau der eingesetzten Menge von 400µl Zellsuspension mit im Mittel  $90,17 \pm 10,16$  ng/ml Probe DNA.

3.10.7 Messung der verbliebenen Zellsuspension nach Besiedelung mit 400 µl Zellsuspension.

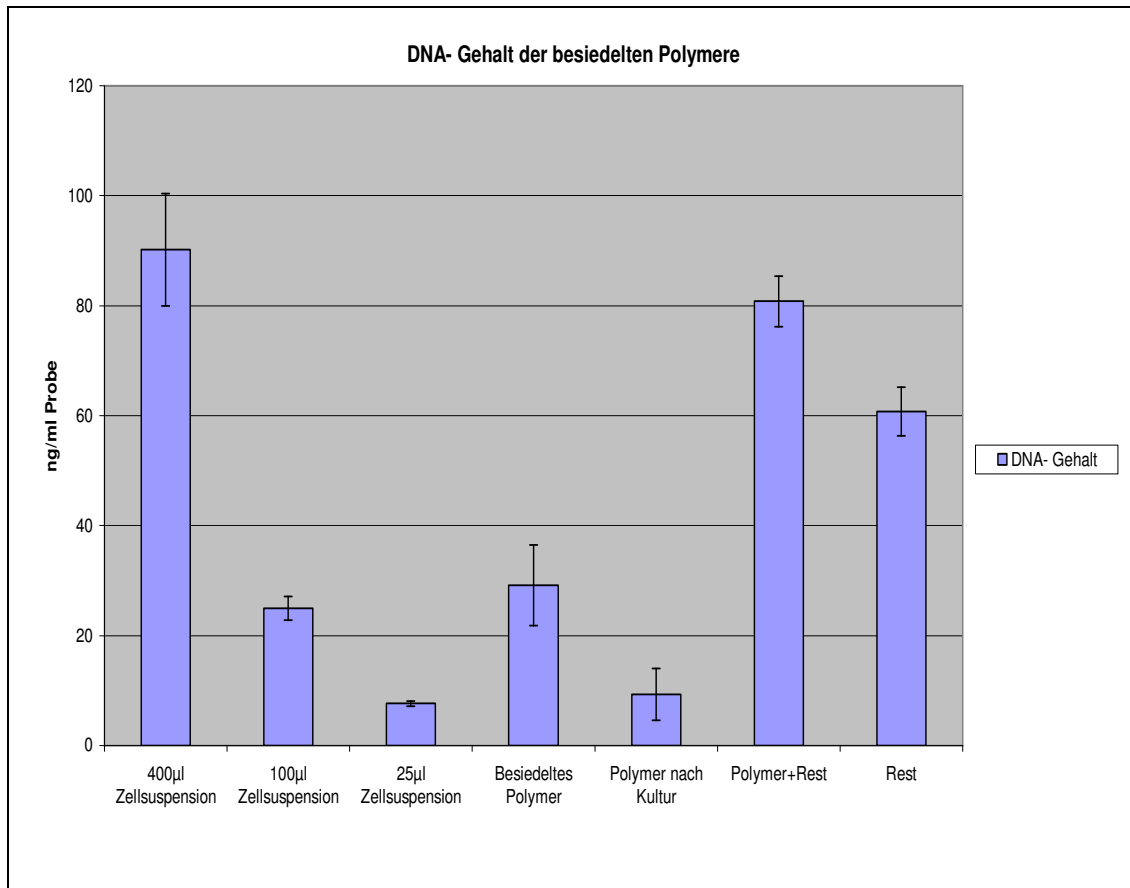
Zur Demonstration des Verbleibs eines Teils der Zellsuspension auf der Petrischale wurde der Rest einzeln gemessen.

Polymernummer	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert der Messungen
Rest	56,5	67	58,5	60,6667
Rest	56,5	55,5	57	56,3333
Rest	64,5	64,5	66,5	65,1667
Gesamtmittel aller Messungen				60,7222
Standardabweichung				4,4169

Rest und Besiedeltes Polymer enthalten zusammen  $89,84 \pm 6,33$  ng/ml Probe DNA, also fast exakt genau soviel DNA wie die ursprünglichen eingesetzten 400 µl Zellsuspension enthalten.

### Diagramm 3/4 DNA-Gehalt der verschiedenen Materialien

Das Diagramm zeigt, dass bei der Besiedelung des Polymers ein Teil der Zellen (32,3%) vom Polymer aufgenommen wird und dass nach der Kultur der Zellen im Flussbioreaktor 10,29 % der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge auf dem Polymer zu finden ist.



## **4. Diskussion**

Der Verlust eines Organs oder einer Organfunktion zieht häufig die Notwendigkeit nach Ersatz hierfür nach sich. Hierdurch ließe sich schließlich die physiologische Situation, die vor dem Verlust bestanden hat, wieder herstellen.

Dabei muss bei einem Ausfall der Leber als Organ zwischen dem Ausfall des in der Leber stattfindenden Intermediärstoffwechsels, dem Ausfall der Leber als Funktionsorgan der Biotransformation und dem Ausfall der Leber als exkretorischem Organ unterschieden werden. Zwar besteht die Möglichkeit die fehlende Syntheseleistung der Leber durch Substitution von ihren Effektorsubstanzen, wie z. B. Albumin oder Gerinnungsfaktoren, symptomatisch zu therapieren oder Substanzen, die von der Leber gespeichert werden, wie zum Beispiel Vitamin K oder Vitamin B<sub>12</sub>, zu substituieren<sup>[13]</sup>, aber dennoch kann die Homöostase im Körper niemals so gut aufrecht erhalten werden, wie durch eine gesunde Leber. Ein besonderes Problem stellt die fehlende Entgiftungsleistung einer schwer geschädigten Leber dar. Dabei spielt die Entwicklung einer Hepatischen Enzephalopathie, die durch den fehlenden Abbau von Ammoniak durch die Hepatozyten entsteht, eine entscheidende Rolle. Oftmals bleibt in solchen Fällen als letzter Therapieversuch die Lebertransplantation.

Es kommt eine Reihe von Grunderkrankungen in Frage, die durch eine Lebertransplantation therapiert werden können. Dazu zählen das fulminante Leberversagen, fortgeschrittene chronische Lebererkrankungen, nichtresektable hepato-cholangiozelluläre Malignome und kongenitale Lebererkrankungen. Seit der ersten Lebertransplantation durch Starzl et al. 1967 sind weltweit ca. 25000 Lebertransplantationen vorgenommen worden. In Deutschland lag die Rate 2001 bei 662 Lebertransplantationen nach postmortaler Organspende und bei 95 Lebersegment-Lebendspenden.<sup>[8]</sup> Ein konstanter deutlicher Anstieg der Meldungen zur Lebertransplantation zeigt jedoch zugleich das größte Problem der Transplantationsmedizin – Es besteht ein eklatanter Organmangel. Wurden 1994 bei ca. 600 Neuanmeldungen 586 Lebertransplantationen durchgeführt und somit fast jeder gemeldete Patient auch transplantiert, so betrug die Zahl der Meldungen 2001 schon 1148. Dies bedeutet, dass viele Patienten nicht therapiert werden können und somit auf der Warteliste versterben.<sup>[7]</sup>

Eine denkbare Möglichkeit diesen Mangel an Spenderlebern zu kompensieren sind Leberersatzsysteme. Diese wiederum werden in extrakorporale und in implantierbare Systeme unterteilt. Dabei ist im Moment das Ziel, die Patienten kurzfristig bis zu einer Transplantation am Leben zu erhalten, beziehungsweise eine kurze Zeitspanne zu überbrücken, bis sich die geschädigte Leber des Patienten von allein wieder erholt. So konnten Rozga et al.<sup>[35]</sup> 7 Patienten mit schwerem akutem Leberversagen für 24 Stunden bis zur Lebertransplantation durch einen mit Schweinehepatozyten beladenen extrakorporalen Bioreaktor am Leben erhalten. Außerdem wäre ein solches extrakorporales Leberersatzsystem denkbar, um die postoperative Zeit nach großen Leberteilresektionen bis zur Leberregeneration zu überbrücken. Im experimentellen Stadium befinden sich auch Studien, die die extrakorporale Kultur der Hepatozyten dazu nutzen, Hepatozyten mit Gendefekten bei genetisch metabolischen Lebererkrankungen gentechnisch zu verändern, dann die Zellen zu reimplantieren und die kongenitale Erkrankung somit zu therapieren.<sup>[34]</sup> Die Durchführbarkeit dieser Therapieansätze konnten zum Beispiel Grossman et al.<sup>[11]</sup> mit autologen Hepatozyten am Beispiel der familiären Hypercholesterinämie und Fox et al.<sup>[10]</sup> mit allogenen Hepatozyten am Beispiel des Crigler-Najjar-Syndrom Typ I demonstrieren. Aber auch diese Therapieansätze sind mit Nachteilen für den Patienten behaftet. So wurden in den erwähnten Studien die Hepatozyten als Zellsuspension in die Pfortader gespritzt, was zu schwerwiegenden Komplikationen, wie zum Beispiel Pfortaderthrombose führen kann. Daher ist eine wiederholte Injektion mit erheblichen Risiken behaftet und nicht empfehlenswert. Außerdem war die Masse der ersetzten Leberzellen gering (etwa 1-5%), weshalb die metabolischen Defekte nur teilweise korrigiert werden konnten.

Zudem ist es weiterhin nicht möglich, Patienten, die eine neue Leber benötigen und für die kein passendes Ersatzorgan gefunden wird, über einen längeren Zeitraum am Leben zu erhalten. Zur Therapie solcher Patienten wären vielmehr implantierbare Leberersatzsysteme denkbar.

Einen viel versprechenden Ansatz stellt somit unser implantierbares Leberersatzsystem dar. Die isolierten Hepatozyten werden zunächst im Flussbioreaktor vorkultiviert. Diese Art der Vorkultivierung der Hepatozyten führt

dazu, dass sich die Hepatozyten in einer bestimmten Formation anordnen, den so genannten Spheroiden. Diese Anordnung, bestehend aus funktionell aktiven und differenzierten Hepatozyten, soll dazu führen, dass die Hepatozyten besser ihre metabolischen Funktionen aufrechterhalten und dass mehr Hepatozyten die Transplantation überleben, was in der Vergangenheit das größte Problem der Hepatozytentransplantation darstellte.

Zahlreiche Forschungsgruppen konnten inzwischen zeigen, dass Hepatozyten in Spheroidform unter verschiedenen Zellkulturbedingungen sowohl die Hepatozyten besser am Leben erhalten, als auch die leberspezifischen Funktionen verbessern, die Resistenz der Zellen gegenüber äußeren Einflüssen verbessern und so ein längeres Überleben der Zellen *in vitro* ermöglichen.<sup>[17,19,29,32,38]</sup>

Der wesentlicher Vorteil des Systems ist weiterhin, dass der gesamte Hepatozytenträger mit den sich auf ihm befindenden Hepatozyten nach einer bestimmten Zeit transplantiert werden kann.<sup>[39]</sup> Somit wäre es bei einem guten Überleben der Hepatozyten möglich, die Hepatozyten einer Leber ähnlich der Lebersplittransplantation auf mehrere Empfänger zu verteilen. So ist es zum Beispiel möglich, mit nur 30% der Hepatozytenmasse einer normalen Leber deren Funktionen aufrecht zu erhalten, was sich dadurch zeigt, dass Patienten mit einem Ausfall von mehr als 70% der Hepatozyten ihrer Leber eine wesentlich schlechtere Prognose haben als Patienten, bei denen weniger als 70% der Hepatozyten ausgefallen sind.<sup>[30]</sup>

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführte Arbeit erbrachte die im Ergebnisteil beschriebenen Resultate:

Mittels einer im Labor etablierten Kollagenasedigestionstechnik, die ursprünglich von Seglen<sup>[36]</sup> beschrieben und dann von Aiken et al.<sup>[1]</sup> modifiziert wurde, gelang es, aus 14 Lewis-Ratten insgesamt  $4,85 \times 10^9$  Hepatozyten zu isolieren. Es wurde eine 0,05 % Typ H Kollagenase der Firma Boehringer-Mannheim verwendet, die sich in vorhergehenden Studien als die am besten geeignete Kollagenase herausgestellt hatte. Dabei wurden pro Isolation im Durchschnitt  $3,46 \times 10^8 \pm 1,54 \times 10^8$  Hepatozyten mit einer Vitalität von  $84,6\% \pm 3,4\%$  gewonnen. Die operierten Ratten wogen im Durchschnitt vor der Isolation  $292,1 \text{ g} \pm 31,7 \text{ g}$  (Tabelle 3/1).

Mit den aufgearbeiteten und gereinigten Hepatozyten wurden 160 PLLA-Polymere besiedelt.<sup>[27,40]</sup> Jedes Polymer wurde viermal mit je 100 µl Hepatozytensuspension besiedelt um eine möglichst homogene Verteilung der Hepatozyten auf dem Polymer zu gewährleisten. Von den insgesamt 400 µl Hepatozytensuspension, die einer Besiedelung mit  $4 \times 10^6$  Hepatozyten entsprechen, wurden im Schnitt 116 µl von dem Polymer aufgenommen, was einer realen Besiedelung mit  $1,16 \times 10^6$  Hepatozyten entspricht. Dieses sind 29% der eingesetzten 400 µl Hepatozytensuspension (Tabelle 3/2).

Jeweils 5 besiedelte Polymere wurden in definiertes serumfreies Kulturmedium überführt, wie es erstmals von Mc Gowan et al.<sup>[24]</sup> verwendet und im Teil Material und Methoden bereits beschrieben wurde. In diesem Medium wurden die Polymere für 3 Tage in einen Flussbioreaktor kultiviert. Die Flussgeschwindigkeit des Bioreaktors wurde auf 24 ml/min pulsatilen Fluss eingestellt, da sich diese Geschwindigkeit in vorhergehenden Versuchen in unserem Labor als die günstigste für die Vitalität, aber auch für die Funktion der Hepatozyten herausgestellt hat.<sup>[39,40]</sup>

Nach drei Tagen wurden die Polymere entnommen und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich pro Gesichtsfeld durchschnittlich  $44,2 \pm 15,4$  Spheroide ausmachen ließen, die im Durchschnitt einen Durchmesser von  $100,2 \pm 16,0$  µm hatten (Tabellen 3/4 und 3/5).

Jeweils 4 der 5 Polymere wurden dann in männliche Lewis-Ratten die zwischen 300 g und 350 g wogen implantiert. Das 5. Polymer wurde für eine quantitative DNA-Messung verwendet. Die Ratten wurden in zwei Probengruppen eingeteilt. In die 16 Ratten der Probengruppe A wurden die 4 Polymere implantiert und die Tiere wurden zweidrittelhepatektomiert, um auf die transplantierten Hepatozyten einen Wachstumsstimulus auszuüben.<sup>[9,41]</sup> In die 16 Ratten der Probengruppe B wurden nur die Polymere implantiert. Je 4 Tiere aus jeder Gruppe wurden nach einer Woche, einem Monat, drei Monaten und sechs Monaten explantiert (Tabelle 3/3).

Als Kontrollgruppen dienten Ratten, denen Polymere implantiert worden waren, die wie die Polymere der Probengruppen behandelt worden waren, außer dass sie nicht für 3 Tage im Flussbioreaktor kultiviert worden waren. Auch in den Kontrollgruppen wurden 16 Tiere zusätzlich zur Polymerimplantation

zweidrittelhepatektomiert (Kontrollgruppe A) und in 16 Tiere wurden nur Polymere implantiert (Kontrollgruppe B). Je 4 Tiere aus jeder Gruppe wurden nach einer Woche, einem Monat, drei Monaten und sechs Monaten explantiert (Tabelle 3/6). Außerdem wurden in 4 Tiere Polymere implantiert, auf denen sich nur Williams Medium E befand. Diese Ratten bildeten die Kontrollgruppe C. Je ein Tier wurde nach den gleichen Abständen wie in den anderen Gruppen explantiert. Die Kontrollgruppe C diente dem Beweis, dass sich nicht von allein Hepatozyten auf den in das Mesenterium transplantierten Polymeren ansiedelten. Dies ist auch in keinem Fall geschehen.

Es gelang des weiteren aus den explantierten Polymeren histologische Schnitte herzustellen, was sich besonders im Falle der kryo-präservierten Polymere als sehr schwierig erwies, da sich diese Polymere zum Teil nur sehr schwer schneiden ließen. In der Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung und in der PAS-Färbung ließen sich sowohl in den Probengruppen wie auch in den Kontrollgruppen A und B zu allen Zeitpunkten nach Transplantation morphologisch unauffällige Hepatozyten nachweisen. Die Hepatozyten hatten sich meist zu kleinen Inseln gruppiert und es fanden sich auffällig häufig Blutgefäße und Fettgewebe in der Nähe dieser kleinen Inseln. Durch die PAS-Reaktion gelang ein positiver Glykogenachweis, der jedoch bei den Gruppen, die schon nach einer Woche explantiert worden waren, noch sehr schwach ausfiel. Somit kann von einer erhaltenen Glykogenspeicherfähigkeit der Hepatozyten ausgegangen werden. In den immunhistochemischen Untersuchungen gelang durch den Nachweis von Cytokeratin 18 und der positiven Reaktion des Hepatocyte Antikörpers der Nachweis, dass es sich bei den besagten Zellen wirklich um Hepatozyten handelt. Cytokine färben spezifisch epitheliales Gewebe. Dabei konnten Moll et al.<sup>[26]</sup> zeigen, dass Cytokeratin 18 Hepatozyten färbt. Die Grundlage für immunhistochemische Färbungen ist die Antigen-Antikörperreaktion. Bei Antikörpern handelt es sich um Proteine, die als Antwort auf den Kontakt mit dem Antigen gebildet werden. Antikörper, die für immunhistochemische Färbungen eingesetzt werden, sind hauptsächlich vom Typ IgG. Man unterscheidet polyklonale und monoklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Lymphozyten gebildet und sind immunochemisch unterschiedlich. Die monoklonalen Antikörper hingegen werden



von einem B-Lymphozytenklon gebildet. Sie reagieren nur mit einem spezifischen Epitop, gegen das sie gerichtet sind.

Bei den Untersuchungen auf das Vorkommen von Markerproteinen wurden immunhistochemische Färbungen mit monoklonalen Antikörpern wiederholt durchgeführt. Dabei wurden Zellen gefärbt, die aus unterschiedlichen Spenderratten stammten, und die in unterschiedliche Empfänger transplantiert waren. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurden die Färbungen wiederholt. So konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um einmalige Ergebnisse handelte. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde aus jeder Gruppe ein Polymer exemplarisch gefärbt. Bei den Färbungen wurden immer eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt, da die Intensität der Färbungen in den verschiedenen Durchgängen der Untersuchung variierte und Fehler so abgeglichen werden konnten. Als Färbemethode fand die Immunoperoxidase-Methode Anwendung. Zum Nachweis der Antikörper an den Gewebsschnitten wurde das Vektastain ABC-Kit AP Mouse IgG eingesetzt.

In der Auswertung der Hepatozytenoberflächen an den PAS-Färbungen konnte erstmals überhaupt gezeigt werden, dass sich nach Transplantation von Hepatozytenspheroiden zu allen Zeitpunkten Leberneogewebe auf den explantierten Polymeren fand. Es findet sich zwar in den meisten Gruppen ein Rückgang der Zelloberfläche von einer Woche nach Transplantation zum Zeitpunkt ein Monat, der auch von Kaufmann et al.<sup>[15]</sup> beschrieben wurde, aber auch der von Kneser et al.<sup>[16]</sup> beschriebene Anstieg der Hepatozytenoberfläche vom Zeitpunkt 1 Monat zum Zeitpunkt 12 Monate konnte in dieser Arbeit zum Zeitpunkt 6 Monate verifiziert werden. Dabei nahm vom Zeitpunkt eine Woche nach Transplantation zum Zeitpunkt 6 Monate nach Transplantation die Hepatozytenoberfläche in der Probengruppe A statistisch hoch signifikant zu, was für eine starke Proliferation der Hepatozyten spricht (Diagramm 3/1). Betrachtet man die Effektivität der angewandten Methode, indem man berücksichtigt, dass vor der Vorkultivierung im Flussbioreaktor 3,14 mal mehr ausgesiedelte Zellen auf dem Polymer sind als nach der Vorkultur, was durch die DNA-Messung belegt wurde, und betrachtet nun, wie viele Zellen sich nach der Implantation auf dem Polymer befinden würden, wenn in allen Gruppen die gleiche Ausgangszellzahl in die Ratten implantiert worden wäre, so kommt man zu dem Ergebnis, dass die im

Flussbioreaktor vorkultivierten Zellen in der Ratte wesentlich stärker proliferieren als die Zellen, die nicht im Flussbioreaktor vorkultiviert worden sind. Diese Schlussfolgerung ergibt sich, da in den im Flussbioreaktor vorkultivierten Polymeren der Probengruppen aus einer erheblich geringeren Ausgangszellzahl eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen im Verhältnis wesentlich bessere Endzellzahl gemessen wurde. So zeigt sich im einzelnen, dass aus den eingesetzten Hepatozyten der Probengruppe A im Vergleich zu den eingesetzten Hepatozyten der Kontrollgruppe A zu den Zeitpunkten 1 Woche, 1 Monat und 6 Monate nach Transplantation erheblich mehr Zellen effektiv resultieren. Von den Hepatozyten der Probengruppe B resultieren im Effektivitätsvergleich zur Kontrollgruppe B sogar zu allen Zeitpunkten nach Transplantation mehr Zellen. Zu allen Zeitpunkten war die Anzahl der gesehenen Hepatozyteninseln in den Kontrollgruppen größer als in den Probengruppen. (Diagramm 3/2). Dieses lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass in den Kontrollgruppen viele einzelne Hepatozyten proliferieren und sich so mehr Hepatozyteninseln in den Polymeren ausbilden als in den Probengruppen.

Dafür waren die gesehenen Hepatozyteninseln in den Probengruppen aber im Durchschnitt zum Zeitpunkt 1 Woche und 1 Monat nach Transplantation größer als in den Kontrollgruppen. Dieser Größenvorteil lässt sich durch die Aggregation der einzelnen Hepatozyten während der Vorkultivierung zu den Hepatozytensphäroiden gut erklären, die den Hepatozyten direkt nach der Transplantation einen besseren Zusammenhalt zu ermöglichen scheint. Hierin könnte auch ein wesentlicher Vorteil liegen, der den Hepatozyten der Probengruppen die beschriebene bessere Proliferation ermöglicht. Die gesehenen Größenunterschiede glichen sich dann zu den Zeitpunkten 3 Monate und 6 Monate aneinander an (Diagramm 3/3).

In der quantitativen DNA-Messung wurden die zuvor gemachten Beobachtungen bestätigt (Diagramm 3/4). Während nach dem Besiedeln der Polymere wie in Tabelle 3/2 beschrieben 29 % der Ausgangszellzahl auf dem Polymer gemessen wurden, wurden in der DNA-Messung mit 32,3 % der Ausgangszellzahl etwas mehr gemessen. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass in der 1. Messung nur das reine Mediumvolumen gemessen wurde, während bei der DNA-Messung der DNA-Gehalt der im Polymer verbliebenen Zellen gemessen wurde.

Vermutlich sind proportional zum Medium mehr Zellen im Polymer hängen geblieben, so dass der DNA-Gehalt prozentual höher als der Mediumgehalt des Polymers war.

Nach der Kultur im Flussbioreaktor befanden sich von der ursprünglich durchschnittlich in 400 µl enthaltenen DNA-Menge von  $90,17 \pm 10,16$  ng/ml Probe auf dem kultivierten Polymer  $9,28 \pm 4,69$  ng/ml Probe oder 10,29 %.

Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven:

Diese Studie und die Arbeiten von Pollok et al. und Török et al.<sup>[33,39,40]</sup> zeigen, dass Hepatozyten sich unter pulsatilem Fluss im Bioreaktor zu Spheroïden anordnen. Durch den Einsatz von Tissue Engineering lassen sich mit Hepatozytenspheroïden besiedelte Polymere herstellen, die erstmals komplett in Empfängerratten transplantiert werden konnten. Auf den Polymeren lassen sich auch nach sechs Monaten mit morphologisch unauffälligen Hepatozyten besiedelte Areale nachweisen. Die Hepatozyten behalten während der gesamten Zeit der Implantation die Fähigkeit zur Glykogenspeicherung. Aus den explantierten Polymeren ließen sich histologische Schnitte herstellen, die mit HE, PAS, Cytokeratin-18-Antikörper und Hepatozyten-Antikörper gefärbt werden konnten. Dabei zeigen die Zahl und die Größe der Hepatozyteninseln über die Zeit einen deutlichen Anstieg.

Nachdem im in-vivo Rattenmodell gezeigt werden konnte, dass die Transplantation von mit Hepatozytenspheroïden besiedelten Polymeren möglich ist und die Zellen nach der Transplantation proliferieren, muss nun daran gearbeitet werden, den Anteil der Zellen, die transplantiert werden, so hoch wie möglich zu halten. Ein denkbarer Ansatz hierzu wäre die Verwendung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren, um die Versorgung der transplantierten Zellen zu optimieren und die Besiedelung der Polymere mit einer größeren Anzahl von Zellen, um die Ausgangszellzahl zu erhöhen. Sollte es gelingen, die effektiv transplantierte Zellzahl zu optimieren, so wäre eine Möglichkeit geschaffen, verschiedene Lebererkrankungen temporär oder auf Dauer zu behandeln.

## **5. Zusammenfassung**

**Einleitung:** Ein Problem bei der Transplantation von Organen stellt der Mangel an Spenderorganen dar. Um dieses Problem zu verringern wurden Versuche unternommen, in denen einzelne Zellen transplantiert wurden. Hepatozyten wurden teilweise direkt in Organe wie die Milz gespritzt oder, wie in unserer Studie, auf so genannten Matrizes transplantiert. In dieser Studie soll überprüft werden, ob Hepatozyten, die durch dreitägige Vorkultur im Flussbioreaktor so genannte Spheroide ausbilden, einen Vorteil hinsichtlich des Überlebens gegenüber Hepatozyten haben, die ohne Vorkultur transplantiert wurden.

**Methoden:** Es wurden Hepatozyten mittels einer Kollagenase Verdauungstechnik aus männlichen Lewis-Ratten isoliert, auf ein PLLA-Polymer ausgesiedelt und anschließend für drei Tage unter pulsatilem Fluss in einem Bioreaktor kultiviert. Die so kultivierten Polymere und die nicht vorkultivierten Kontrollen wurden in Mesenterialtaschen von männlichen Lewis-Ratten implantiert. Dazu wurde bei jeweils der Hälfte der Tiere eine Zweidrittelhepatektomie durchgeführt. Die Polymere verblieben für eine Woche, einen, drei und sechs Monate in den Ratten und wurden dann explantiert. Nach Abschluss des Versuches wurden histologische Färbungen der Polymere angefertigt, anhand derer auch die Besiedelung des Polymers mit Hepatozyten ausgewertet wurde. Außerdem wurde quantitativ die DNA-Menge im Polymer vor und nach Kultur im Bioreaktor gemessen.

**Ergebnisse:** In den Histologien (HE, PAS, Cytokeratin 18, Hepatocyte-Antikörper) zeigten sich vitale und morphologisch unauffällige Hepatozyten. Eine Glykogenspeicherung der Hepatozyten konnte zu allen Zeiten nachgewiesen werden. Die Größe der sich bildenden Hepatozyteninseln nahm über die Zeit im Tier zu, war bei den Probengruppen nach einer Woche und einem Monat größer und glich sich dann im weiteren Verlauf der Größe der Kontrollgruppen an.

**Diskussion:** Es ist erstmals gelungen mittels Tissue Engineering hergestellte und mit Hepatozytenspheroide besiedelte Polymere für mindestens sechs Monate zu transplantieren, so dass Hepatozyten überleben, proliferieren und metabolische Funktionen aufrechterhalten. Die Effektivität der Transplantation hinsichtlich des Überlebens der Hepatozyten war in den vorkultivierten Probengruppen im direkten Vergleich mit den nicht vorkultivierten Kontrollgruppen besser, da die sich ausbildenden Hepatozytenspheroide einen Proliferationsvorteil bieten.

## **6. Literaturverzeichnis**

- 1) Aiken J, Cima L, Schloo B, Mooney D, Johnson L, Langer R, Vacanti JP**  
Studies in rat liver perfusion for optimum harvest of hepatocytes.  
*J Pediatr Surg* 1990; 25: 140-145
- 2) Ballardur P, Crema E, Honiger J, Calmus Y, Baudrimont M, Delelo R, Capeau J**  
Transplantation of allogenic hepatocytes without immunosuppression: Long- term survival  
*Surgery* 1995; 117: 189-194
- 3) Barrera DA, Zylstra E, Lansbury PT, Langer R**  
Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer (polylactic acid-co-lysine).  
*J Am Chem Soc* 1993; 115: 11010-11011
- 4) Bell E, Ehrlich P, Buttle DJ, Nakatsuji T**  
Living tissue formed in vitro and accepted as skin- equivalent of full thickness.  
*Science* 1981; 221: 1052-1054
- 5) Bisceglie V**  
Über die antineoplastische Immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner Embryonen  
*Ztschr f Krebsforsch* 1933; 40: 122-140
- 6) Chick WL, Like AA, Lauris V**  
Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas  
*Science* 1975; 187: 847-848
- 7) Deutsche Stiftung Organtransplantation**  
Gespendete und transplantierte Organe 1992-2000  
[www.dso.de](http://www.dso.de)
- 8) Deutsche Stiftung Organtransplantation**  
Organspende und Transplantation in Deutschland 2001  
[www.dso.de](http://www.dso.de)
- 9) Fiegel HC, Kaufmann PM, Kneser U, Kluth D, Rogiers X**  
Priming of hepatocytes for cell culture by partial hepatectomy prior to cell isolation  
*Tissue Eng* 2000; 6(6): 619-626
- 10) Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC**  
Treatment of Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation  
*N Engl J Med* 1998; 338: 1422-1426
- 11) Grossman M, Raper SE, Stein EA, Engelhardt JF, Müller DW, Lupien PJ, Wilson JM**  
Successful ex vivo gene therapy directed to the liver in a patient with familial hypercholesterolemia  
*Nat Genet* 1994; 6: 335-341

- 12) Higgins GM, Anderson RM**  
Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver in the white rat following partial surgical removal  
*Arch Pathol* 1931; 12: 186-202
- 13) Holstege A, Lock G, Köllinger M, Schölmerich J**  
Conservative treatment of acute hepatic failure  
*Z Gastroenterol* 1996; 34: 192-200
- 14) Jirtle RL, Biles C, Michalopoulos G**  
Morphologic and histochemical analysis of hepatocytes transplanted into syngeneic hosts  
*Am J Pathol* 1980; 101: 115-126
- 15) Kaufmann PM, Kneser U, Fiegel HC, Kluth D, Herbst H, Rogiers X**  
Long- term hepatocyte transplantation using three dimensional matrices  
*Transpl Proc* 1999; 31(4): 1928-1929
- 16) Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Izbicki JR, Herbst H, Rogiers X**  
Long Term Differentiated Function of Heterotopically Transplanted Hepatocytes on Three Dimensional Polymer Matrices  
*J Biomed Mater Res* 1999; 47(4): 494-503
- 17) Koide N, Shinji T, Tanabe T, Asano K, Kawaguchi M, Sakaguchi K, Koide Y, Mori M, Tsuji T**  
Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans  
*Biochem Biophys Res Commun* 1989;161: 385-391
- 18) Kusano M, Mito M**  
Observations on the fine structure of long- survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen  
*Gastroenterologie* 1982; 82: 616-628
- 19) Landry B, Bernier C, Ouellet R, Gayety R, Marcia N**  
Spheroidal aggregate of rat liver cells: Histotypic reorganisation, biomatrix deposition and maintenance of functional activities  
*J Cell Biol* 1985; 101: 914-923
- 20) Langer R, Vacanti JP**  
Tissue Engineering  
*Science* 1993; 260: 920-926
- 21) Langer R, Vacanti JP**  
Tissue engineering: the challenges ahead.  
*Sci Am* 1999; 280: 62-65
- 22) Matsushita T, Ijima H, Koide N, Funatsu K**  
High albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the pores of polyurethane foam  
*Appl Microbiol Biotechnol* 1991; 36: 324-326

- 23) Mayhew TA, Williams GR, Senica MA, Kuniholm G, Du Moulin GC**  
Validation of a quality assurance program for autologous chondrocyte implantation.  
*Tissue Eng* 1998; 4: 325-334
- 24) McGowan JA, Bucher NLR**  
Pyruvate promotion of DNA synthesis in serum-free primary cultures of adult rat hepatocytes  
*In Vitro* 1983; 19(3): 159-166
- 25) Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y**  
Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells.  
*Hepatology* 1999; 29: 111-125
- 26) Moll R, Franke WW, Schiller DL**  
The Catalog of Human Cytokeratins: Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells  
*Cell* 1982; 31: 11-24
- 27) Mooney DJ, Park S, Kaufmann PM, Sano K, McNamara K, Vacanti JP, Langer R**  
Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation  
*J Biomed Mater Res* 1995; 29: 959-965
- 28) Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al.**  
Functional arteries grown in vivo  
*Science* 1999; 284: 489-493
- 29) Olive PL, Durand RE**  
Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics  
*Cancer and metastasis reviews* 1994; 13: 121-138
- 30) Patzer JF**  
Advances in Bioartificial Liver Assist Devices  
*Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; 944: 320-333
- 31) Peshwa MV, Wu FJ, Follstad BD, Cerra FB, Hu WS**  
Kinetics of Hepatocyte Spheroid Formation  
*Biotechnol Prog* 1994; 10: 460-466
- 32) Peshwa MV, Wu FJ, Sharp HL, Cerra FB, Hu WS**  
Mechanistics of formation and cultural ultrastructural evaluation of hepatocyte spheroids  
*In Vitro Cell Dev Biol Animal* 1996; 32: 197-203
- 33) Pollok JM, Kluth D, Cusick RA, Lee H, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R, Broelsch CE, Vacanti JP**  
Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions.  
*Eur J Pediatr Surg* 1998; 8: 195-199

**34) Raper SE, Wilson JM**

Cell transplantation in liver-directed gene therapy  
*Cell Transpl* 1993; 2: 381-400

**35) Rozga J, Podesta L, LePage E**

A bio artificial liver to treat severe acute liver failure  
*Ann Surg* 1994; 219: 538-546

**36) Seglen PO**

Preparation of isolated rat liver cells.  
*Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83

**37) Shinoka T, Ma PX, Shum- Tim D, et al.**

Tissue engineered heart valves  
*Circulation* 1996; 94 (suppl II): 164-168

**38) Tong JZ, De Lagausie P, Furlan V, Cresteil T, Bernard O, Alvarez F**

Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids.  
*Exp Cell Res* 1992; 200: 326-332

**39) Török E, Pollok JM, Ma PX, Kaufmann PM, Dandri M, Petersen J, Burda M, Kluth D, Perner F, Rogiers X**

Optimization of flow bioreactor conditions for hepatic tissue engineering on 3-dimensional biodegradable polymer prior to implantation  
*Cells Tissues Organs* 2001; 169 (1): 34-41

**40) Török E, Pollok JM, Ma PX, Vogel C, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Kaufmann PM, Kluth D, Rogiers X**

Hepatic Tissue Engineering on 3-Dimensional Biodegradable Polymers within a Pulsatile Flow Bioreactor  
*Dig Surg* 2001; 18: 196-203

**41) Uyama S, Kaufmann PM, Takeda T, Vacanti JP**

Delivery of whole liver- equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation  
*Transplantation* 1993; 55: 932-935

**42) Vacanti CA, Cima LG, Ratkowski D, Upton J, Vacanti JP**

Tissue engineered growth of new cartilage in the shape of a human ear using synthetic polymers seeded with chondrocytes.  
*In: Cima LG, Ron ES, eds. Tissue- inducing biomaterials, Material Research Society Symposium Proceedings (Vol 252). Pittsburgh: Material Research Society, 1992: 367-374*

**43) Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP**

Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation.  
*Plastic Reconstr Surg* 1991; 88: 733-759



**44) Vacanti JP, Langer R**

Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation

*The Lancet* 1999; 354: 32-34

**45) Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez- Atayde A, Langer R**

Selective cell transplantation using bio absorbable artificial polymers as matrices

*J Pediatr Surg* 1988; 23: 3-9

**46) Van Agthoven M, Metselaar, HJ, Tilanus HW, De Man RA, Ijzerman JNM, Van Ineveld BM**

A comparison of the costs and effects of liver transplantation for acute and for chronic liver failure

*Transpl Int* 2001; 14: 87-94

**47) Vunjak-Novakovic G, Freed L, Biron RJ, Langer R**

Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage.

*Am Inst Chem Eng J* 1996; 42: 850-860

**48) Wong LL, McFall P, Wong LMF**

The Cost of Dying of End-Stage Liver Disease

*Arch Intern Med* 1997; 157: 1429-1432

## **7. Danksagung**

Als erstes möchte ich Prof. Dr. med. Dr. h. c. Xavier Rogiers und meinem Doktorvater PD Dr. med. Jörg-Matthias Pollok für die Überlassung des Themas, ihre freundliche Unterstützung sowie für die Bereitstellung der erforderlichen Räumlichkeiten und benötigten Apparaturen in der Klinik danken.

Für die Möglichkeit der Nutzung der Räume und Gerätschaften danke ich ebenso Herrn PD Dr. med. Dietrich Kluth in der kinderchirurgischen Forschung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. med. Eva Török, die mir während der gesamten Zeit eine große Hilfe war, mich immer unterstützt hat und mir oft in Diskussionen neue Anregungen zum Thema gab.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen und Mitarbeitern im Labor bedanken, durch die die Arbeit im Labor meistens sehr angenehm und lustig gestaltet werden konnte. Danke an Ulrike Markus, Inga Horstmann und Stefan Melbeck. Einen besonderen Dank möchte ich meinem Kollegen Marc Lütgehetmann aussprechen, der mich stets unterstützt und auch an schlechten Tagen immer wieder zum Weitermachen motiviert hat und so zu einem guten Freund geworden ist.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und all meinen Freunden Danke sagen, die mich immer unterstützt und stets zu mir gehalten haben. Sie haben dafür gesorgt, dass ich auch nach Misserfolgen immer wieder den Mut gefunden habe weiterzumachen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich dann noch meiner Freundin Annika sagen, die allzeit ein offenes Ohr für meine Probleme hatte, mich immer ermutigte und mir mit ihrer Liebe geholfen hat, dass diese Arbeit entstanden ist.

Danke!

## **8. Lebenslauf**

### Persönliche Daten:

Name: Cordes  
Vorname: Christian  
Geburtsdatum: 08. Januar 1978  
Geburtsort: Stade  
Wohnort: Rüttersbarg 37, 22529 Hamburg  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule Fredenbeck  
1988 – 1990 Orientierungsstufe Fredenbeck  
1990 – 1997 Gymnasium Athenaeum Stade  
1997 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

06/1997 – 04/1998 Grundwehrdienst in Roth und Hamburg

### Hochschulbildung:

04/1998 – jetzt Universität Hamburg: Studiengang Medizin  
03/2000 Ärztliche Vorprüfung  
03/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2000 – 04/2003 Chirurgische Forschung, Transplantationszentrum  
Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und  
Viszerale Transplantation,  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Xavier Rogiers

## 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.

.....