

# **Etablierung einer biologischen vaskularisierten Matrix als Grundlage für ein *in vitro* Lebertestsystem**

**Establishment of a biological vascularized scaffold  
as a basis for *in vitro* liver test system**

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur Erlangung  
der Würde einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte  
Dissertation

Vorgelegt von  
Johanna E. Schanz  
aus Hannover

Hauptberichter: Prof. Dr. techn. Herwig Brunner (Universität Stuttgart)  
Mitberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich (Universität Stuttgart)

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2007

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart  
2007

Diese Arbeit wurde erstellt in den Laboratorien der Abteilung Zellsysteme des Fraunhofer  
Instituts für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik (Fraunhofer IGB) in Stuttgart.

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stuttgart, den 10.10.2007

(Johanna E. Schanz)

## **1. Teilaspekte dieser Arbeit wurden in folgenden vorrezensierten Journalen veröffentlicht:**

Walles T, Giere B, Hofmann M, **Schanz J**, Hofmann F, Mertsching H, Macchiarini P: Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004;128(6):900-906

Walles T, **Schanz J**, Salehi N, Bindeballe T, Mertsching H: Bioartificial vascular grafts based on a biological matrix and mesenchymal stem cells. Cytotherapy 2004; 6 (3), 258

Mertsching H, Walles T, Hofmann M, **Schanz J**, Knapp WH: Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. Biomaterials 2005;26(33):6610-6617

Linke K, **Schanz J**, Hansmann J, Walles T, Brunner H, Mertsching H: Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research" - Tissue Engineering 2007; 13, 1-9

Walles T, **Schanz J**, Weimer M, Linke K, Hofmann M, Mertsching H: The potential of bioartificial tissues in oncology research and treatment. Onkologie 2007; 30(7): 388-394.

## **2. Buchartikel:**

Mertsching H, Hansmann J, **Schanz J**, Linke K, Brenner M, Michaelis J, Walles T: Vaskularisierte Trägersysteme für in vitro Testsysteme. In: D. Beckmann, M. Meister. 13. Heiligenstädter Kolloquium. Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt. Heiligenstadt. Inst. F. Bioprprozess- und Analysentechnik; 2006; ISBN-10: 3-00-018621-2; 47 - 55.

## **3. Teilaspekte dieser Doktorarbeit wurden bereits auf folgenden Kongressen präsentiert:**

4<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (München, 31.08.-03.09.2005)

Poster: "In vitro Engineered vascularised livercell-modul as testsystem"

**J. Schanz**

Falk Research Workshop "Liver Regeneration Stem Cells and Transdifferentiation" (Leipzig, 19.01-20.01.2006)

Poster: "An acellularized vascularised matrix: Scaffold for the development of a liver cell modul and for stem cell differentiation studies"

**J. Schanz**, K. Linke, H. Mertsching

13th Congress on Alternatives to Animal testing - Linz 2006 (Linz, 02.06.-04.06.2006)

Poster: "Vascularized liver test system as an alternative to animal tests"

**J. Schanz**, K. Linke, H. Mertsching

**Dieser Beitrag wurde vom Organisationskomitee mit dem PromoCell Poster Preis ausgezeichnet.**

Biomaterials 2006 (Essen, 05.09.-08.09.2006)

Poster: "Generation of a biological vascularized *in vitro* liver test system"

**J. Schanz**, K. Linke, J. Hansmann, H. Brunner, H. Mertsching

13. Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt"  
(Heiligenstadt, 25.09.-27.09.2006)

Vortrag in Vertretung für Prof. H. Mertsching gehalten

"Vaskularisierte Trägersysteme für *in vitro* Testsysteme"

H. Mertsching, J. Hansmann, **J. Schanz**, K. Linke, M. Brenner, J. Michaelis, T. Walles

Biostar 2006 (Stuttgart, 09.10.-11.10.2006)

Poster: "A vascularised matrix: scaffold for the development of a vascularised liver cell module"

**J. Schanz**, K. Linke, H. Mertsching

EuroNanoForum 2007 (Düsseldorf, 19.06.-21.06.2007)

Poster: "Vascularized liver cell module: a possible 3D test system for the evaluation of the toxicity of nanocytes in tissues?"

K. Linke, **J. Schanz**, H. Mertsching

14th Congress on Alternatives to Animal Testing - Linz 2007 (Linz, 28.09.-30.09.2007)

Poster: "A vascularised liver cell module as an alternative to animal experiments"

**J. Schanz**, K. Linke, H. Mertsching

Eurotox 2007 (Amsterdam, 07.10.-10.10.2007)

Poster: "Vascularised Liver Cell Module: A Possible 3D Test System For The Evaluation Of Substance Toxicity *In Vitro*?"

**J. Schanz**, K. Linke, H. Mertsching

**4. Beiträge zu dieser Arbeit wurden im WDR in der Sendereihe "Servicezeit Gesundheit" am 23.07.2007 und in den ARD Tagesthemen vom 01.10.2007 [<http://www.tagesschau.de/multimedia/sendung/tt72.html>] ausgestrahlt.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Zusammenfassung</b> .....	<b>9</b>
2.1 Zusammenfassung .....	9
2.2 Summary .....	12
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>15</b>
3.1 Die Leber .....	15
3.1.1 Aufbau .....	15
3.1.2 Zelltypen der Leber .....	16
3.1.3 Funktionen.....	19
3.2 Tissue Engineering.....	20
3.2.1 Matrices für das Tissue Engineering.....	21
3.2.2 Zellquellen für das Tissue Engineering .....	23
3.2.3 Zellversorgung.....	24
3.2.4 Co-Kultur .....	25
3.2.5 Bioreaktoren .....	26
3.2.6 Stand der Wissenschaft - Leberersatzsysteme und Lebertestsysteme.....	28
3.3 Ziel der Arbeit .....	33
<b>4. Materialien</b> .....	<b>34</b>
4.1 Biopsiematerial .....	34
4.2 Chemikalien .....	34
4.3 Zellkulturmedien, Perfusionslösungen, Puffer und Lösungen.....	36
4.4 Antikörper.....	39
4.5 Test-Kits für Funktionsnachweise .....	40
4.6 Verbrauchsmaterialien .....	40
4.7 Laborgeräte.....	41
<b>5. Methoden</b> .....	<b>44</b>
5.1 Isolation der Zellen .....	44
5.1.1 Isolation primärer Hepatozyten aus porcinen Leberbiopsien.....	44
5.1.2 Isolation von Endothelzellen aus porcinen Leberbiopsien.....	46
5.1.3 Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen (mvEC) aus humanen Präputienbiopsien .....	46
5.1.4 Isolation von mesenchymalen Vorläuferzellen (MSC) aus porcinem Knochenmarksaspirat .....	47
5.2 2D Kultivierung der Zellen .....	48
5.2.1 Zellkultur .....	48
5.2.2 Passage.....	48
5.2.3 Zählung und Vitalitätsbestimmung .....	49
5.2.4 Langzeitlagerung.....	50
5.2.5 Markierung der Zellen .....	51
5.3 Herstellung der biologischen vaskularisierten Matrix (BioVaSc).....	52
5.3.1 Explantation.....	52
5.3.2 Azellularisierung der BioVaSc im Bioreaktor.....	53
5.4 Besiedlung der BioVaSc- 3D Zellkultur .....	54
5.4.1 Besiedlung des Gefäßsystems mit Endothelzellen oder Vorläuferzellen aus dem Knochenmark .....	54
5.4.2 Besiedlung des Matrixlumens mit Hepatozyten.....	55

5.5 Zellcharakterisierung über immunhistologische Nachweismethoden .....	56
5.5.1 Herstellung von Cytospots .....	56
5.5.2 Herstellung von Kryoschnitten .....	56
5.5.3 Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten .....	57
5.5.4 Entparaffinierung .....	58
5.5.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	58
5.5.6 Antikörperfärbung .....	59
5.5.7 Lebend-Tot-Färbung .....	63
5.6 Zellcharakterisierung über Funktionstests an Medienüberständen .....	65
5.6.1 Laktat-Dehydrogenase-Test (LDH) .....	65
5.6.2 Laktatbestimmung .....	67
5.6.3 Harnstoff-Test .....	68
5.6.4 Albumin ELISA .....	70
5.6.5 VEGF ELISA .....	72
<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>75</b>
6.1 Rebesiedlung des Gefäßsystems mit Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen .....	75
6.1.1 Isolation der Zellen und Besiedlung der vaskularisierten Matrix .....	75
6.1.2 Histologische Überprüfung der Besiedlung über Fluoreszenzmarkierung .....	78
6.1.3 Immunhistologische Färbung der Zellen .....	79
6.2 Rebesiedlung des Lumens mit Hepatozyten .....	81
6.2.1 Isolation der Hepatozyten und Besiedlung des Matrixlumens .....	81
6.2.2 Histologische Bewertung der Zellen vor der Besiedlung .....	82
6.2.3 Immunhistochemische Färbung der Zellen vor der Besiedlung .....	83
6.2.4 Mikroskopische Bewertung der besiedelten Matrix nach Versuchsende .....	85
6.2.5 Immunhistochemische Bewertung der besiedelten Matrix nach Versuchsende .....	88
6.3 Funktionstests der Medienproben .....	92
6.3.1 Laktatdehydrogenase-Freisetzung .....	92
6.3.2 Laktatbildung .....	95
6.3.3 Harnstoffsynthese .....	97
6.3.4 Albuminsynthese .....	100
6.3.5 Dextromethorphanmetabolismus .....	102
6.3.6 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression .....	105
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>107</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>10. Anhang .....</b>	<b>132</b>
<b>11. Lebenslauf .....</b>	<b>145</b>

# 1. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALF	akutes Leberversagen bzw. acute liver failure
BAL	Bioartifizielles Lebersystem
BioVaSc	Biological Vascularized Scaffold
BSA	Bovines Serum Albumin
BR	Bioreaktor
CD	Cluster of Differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
EBM2	Endothelzell Basalmedium 2
EC	Endothelial Cell
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal calf serum
Fl.	Flasche
Gal-DH	$\beta$ -Galaktose-Dehydrogenase
GIDH	Glutamat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	horseradish peroxidase- Meerrettichperoxidase
LP	Leberpräparation
M	Molar
mM	millimolar
min	Minute
Mio	Millionen
mvEC	mikrovaskuläre Endothelzellen

NaCl	Natriumchlorid
NAD (H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
OT	Objektträger
P	Passage
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Polylaktatsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SIS	Small Intestinal Submucosa
TMB	3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VE-Wasser	Voll Entionisiertes Wasser
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WE-Medium	Williams Medium E
z.B.	zum Beispiel



## 2. Zusammenfassung

### 2.1 Zusammenfassung

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel eines Organismus. Sie ist aus einer Vielzahl hochspezialisierter Zellen aufgebaut und übernimmt komplexe, für den gesamten Organismus lebensnotwendige Stoffwechselfunktionen.

Eingenommene Medikamente und Substanzen gelangen im Menschen über das Blutkreislaufsystem zur Leber und werden dort von den Hepatozyten um- und abgebaut (Biotransformation). Hierbei entstehen sogenannte Metabolite, die oft eine ganz andere Wirkung haben als das ursprüngliche Medikament. Sehr häufig sind diese Metabolite toxisch und führen im Organismus zu unerwünschten oder unerwarteten Nebenwirkungen.

Aus diesem Grund sind Leberzellen (Hepatozyten) bzw. das gesamte Organ „Leber“ von besonderem Interesse als Analysesystem für Substanzen, Wirkstoffe und ihre Metabolite. Es gibt für Metabolismusstudien verschiedene, relativ einfache *in vitro* Testsysteme basierend auf isolierten Enzymen, Primärzellkulturen oder Leberschnitten, jedoch noch kein humanes organoides (organähnliches) Lebermodell, das Langzeitstudien an primären Hepatozyten ohne Funktionsverlust ermöglicht.

Damit isolierte Hepatozyten in der Kultur ihre Funktionalität behalten, ist die Bereitstellung einer möglichst *in vivo* ähnlichen Mikroumgebung wichtig. Dazu gehört einerseits die Co-Kultur mit nicht-parenchymalen Leberzellen und andererseits die Gewährleistung der Zellversorgung sowie eine geeignete Trägerstruktur (Matrix), die eine 3-Dimensionalität der Kultur schafft.

Zur Aufbau eines **Co-Kultursystems** wurden in dieser Arbeit Endothelzellen eingesetzt. Endothelzellen beeinflussen den Stoffwechsel der Leber, da sie eine Filtrationsbarriere für Makromoleküle zwischen dem Blut und den Gewebszellen bilden und an der Kontrolle wichtiger Stoffwechselabläufe beteiligt sind. Des Weiteren wird die Differenzierung und Vitalität von Hepatozyten *in vivo* durch ein Netzwerk von Signalen zwischen Hepatozyten und Endothelzellen mittels löslicher Faktoren und Mediatoren gesteuert.

Als **Trägerstruktur** wurde eine azellularisierte, vaskularisierte Matrix aus Schweinedarm, das so genannte „Biological Vascularized Scaffold“ (BioVaSc), verwendet. Sie basiert auf

einem 10 - 15 cm langen Stück porcinen Jejunums, welches sich unter Erhalt der Gefäßsystemstrukturen inklusive des arteriellen Zuflusses sowie des venösen Abflusses chemisch azellularisieren lässt. Die so entstandenen verzweigten Gefäßsystemstrukturen eignen sich für die Kultur von Endothelzellen, während die Kollagenstrukturen der ehemaligen Darmwand Platz zur Adhäsion und Migration von Hepatozyten bieten.

Eine ausreichende **Versorgung** der Hepatozyten mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Toxinen und Metaboliten nach Medikamenten-/Wirkstoff-Umsetzung sollte durch die arterielle Perfusion der BioVaSc gewährleistet werden. Dies war durch ein am Fraunhofer IGB in der Abteilung Zellsysteme entwickeltes computergesteuertes Bioreaktorsystem [Mertsching et al., 2006] möglich. Mit diesem System lässt sich über die Simulation physiologischer Blutdrücke im Gefäßsystem der BioVaSc eine optimale Zellversorgung erreichen. Die Perfusion unter kontrolliertem Druck trägt zudem als mechanischer Reiz zur Differenzierung bzw. zum Erhalt der Differenzierung von Endothelzellen bei.

Zum Aufbau eines Lebermoduls wurde die BioVaSc in zwei Schritten mit Zellen besiedelt:

Im ersten Schritt erfolgte die Rebesiedelung und somit Refunktionalisierung der Gefäßsystemstrukturen. Dazu wurden primäre mikrovaskuläre Endothelzellen oder endotheliale Vorläufer in den arteriellen Zufluss der Matrix injiziert und über einen Zeitraum von 1-3 Wochen kultiviert. Die Versorgung der Zellen war dabei über die arterielle Perfusion der BioVaSc mit zellspezifischem Medium gewährleistet.

Im zweiten Besiedlungsschritt erfolgte die Besiedlung des Matrixlumens (ehemaliger Darm) mit primären Hepatozyten. Dazu wurden die Zellen in einer Kollagen-I-Suspension ins Matrixlumen pipettiert und selbiges an beiden Seiten mit Klemmen verschlossen.

Das so entstandene Co-Kultursystem wurde mit einem selbst optimierten Hepatozytenmedium über einen Zeitraum von 2-3 Wochen im Bioreaktor kultiviert. Alle 5-7 Tage fand ein kompletter Medienwechsel statt. Eine Probenentnahme zur Überwachung der Zellfunktionen erfolgte wochentäglich.

Nach Versuchsende fand eine Fixierung der BioVaSc für die Herstellung von Paraffinpräparaten zur mikroskopischen Kontrolle der Matrixbesiedlung sowie für die immunhistochemische Charakterisierung der Zellen statt.

Anhand der Expression der endothelzellspezifischen Marker CD 31 und FLK-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Differenzierung porciner Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in Endothelzellen nachgewiesen werden. Humane Endothelzellen ließen sich unter Erhalt der genannten Marker in das Gefäßsystem integrieren und waren der Ursprung für neu entstandene Blutgefäße (Neoangiogenese). Die hier etablierte neuartige Form von humanem Testgewebe ermöglicht somit *in vitro* die Untersuchung von Prozessen der Blutgefäßentstehung (Angiogenese) und der Blutgefäßversorgung (Vaskularisation) von sich entwickelnden Gewebeeinheiten.

Die ins System integrierten Hepatozyten exprimierten ebenfalls zellspezifische Marker (CKLP 34, Hepatocyte) und bildeten wichtige Zell-Zellkontakte wie Tight Junctions und Adherens Junctions aus. Durch die Anfärbung von Tight Junctions ließen sich zwischen den Zellen Gallenkanälchenstrukturen sichtbar machen. Des Weiteren war die Proliferation einiger Zellen bis zum Tag 22 nach der Isolation über eine Anti-Ki 67 Färbung nachweisbar. Eine Kommunikation zwischen Endothelzellen und Hepatozyten (cellular Cross-Talk) konnte über die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) belegt werden.

Der Nachweis des Erhaltes hepatozytärer Stoffwechselfunktionen erfolgte über die Analyse der Medienproben. Eine Detoxifikationsfunktion war über die Synthese von Harnstoff bis Tag 22 nach der Zellisolation nachweisbar. Die Albuminsynthese und Laktatbildung als allgemeiner Stoffwechselmarker waren ebenfalls bis zum Ende der Kultur vorhanden. Der Phase-I- und Phase-II-Metabolismus von Dextrometorphan war im porcinen Modell bis Tag 22 ohne Enzyminduktion nachweisbar.

Die Etablierung des Lebermoduls erfolgte zunächst aufgrund der besseren Verfügbarkeit auf Basis porciner Zellen. Die Ergebnisse ließen sich jedoch anschließend auf das humane Modell übertragen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich die BioVaSc als Grundlage für ein Lebertestsystem eignet. Porcine sowie humane Hepatozyten und Endothelzellen ließen sich unter Erhalt ihrer Differenzierung und spezifischer Stoffwechselfunktionen über einen Zeitraum von bis zu 22 Tagen auf der Matrix co-kultivieren und zeigten dabei gewebespezifische Reorganisationprozesse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit an anderen Bioreaktorsystemen generierten Daten qualitativ vergleichbar. Das hier aufgebaute System hat jedoch als einziges Modell ein

Gefäßsystem zur Co-Kultur von Endothelzellen und Hepatozyten unter physiologischen Bedingungen. Erstmals stellt ein Lebermodell damit die Möglichkeit in Aussicht den Transport von im Blut gelösten Molekülen durch die sinusoidale Endothelzellschicht zu den Hepatozyten bzw. von Metaboliten durch die sinusoidale Endothelzellschicht zum Blut zu untersuchen.

In weiterer Zukunft wird die Bewährung dieses humanen organoiden Lebermodells in der Arzneimittelentwicklung oder/und als extra- bzw. intrakorporaler Leberersatz zu verifizieren sein.

## 2.2 Summary

The liver plays a decisive role in human metabolism. It is composed of a multiplicity of highly specialised cells which maintain numerous complex and important metabolic functions for the entire organism.

*In vivo* ingested active agents are presented to the liver by the blood circuit and are metabolised by the hepatocytes. These emerging metabolites may have different pharmacological properties than the original drug.

Therefore, hepatocyte- and liver-functions represent an interesting system for the analysis of drugs and their degradation products. Presently, various *in vitro* test systems exist for such studies of metabolism. However, these bottom-of-the range systems are based on isolated liver enzymes, primary cell cultures or liver slices. So far there is no organoid liver model which allows long term studies on primary hepatocytes without loss of cell specific functions.

To maintain the function of isolated hepatocytes in culture it is important to mimic their *in vivo* microenvironment. Aspects of this microenvironment are I) the co-culture with non-parenchymal cells, II) a suitable 3-D scaffold as well as III) a sufficient nutrient and gas supply.

For **co-culture** endothelial cells were chosen in the present work. They affect hepatocyte differentiation and viability by soluble factors like cytokines. EC are also a natural filtration barrier for macromolecules between blood and parenchymal cells and thus they are involved in the control of basic metabolic operations pathways within the liver.

The **scaffold** used in the present work was made of decellularised porcine jejunal segment. The so called "Biological Vascularised Scaffold" (BioVaSc) is based on a 10 to

15 cm long segment of porcine jejunum conserving its vascular system, which was acellularised by maintaining the existing vessel structures including their basal membrane. These tubular structures warrant the cultivation of endothelial cells within the BioVaSc tissue, whereas the luminal surface of the former jejunal mucosa fosters adhesion and migration of seeded hepatocytes.

Cell- and tissue **nutrient supply** was implemented by a closed-circuit perfusion of the BioVaSc integrated into a bioreactor system, which was developed at the Fraunhofer IGB [Mertsching et al., 2006]. In this work, an optimised medium composition was developed which was injected through the arterial inflow under pulsatile simulation of natural blood flow. By a control loop it was possible to adapt medium pressure in the organoid structure to the physiological conditions in the liver. The artificial “blood circuit” assured optimal nutrient and oxygen supply. Furthermore the mechanical impulse through blood flow showed induction of cell differentiation or sustainability of their differentiation status.

For generating an *in vitro* organoid liver system the BioVaSc was reseeded with cells in two steps. In the first step, the vascular structures of the scaffold were refunctionalised applying microvascular endothelial cells (mEC) and endothelial progenitor cells. Cells were introduced into the BioVaSc by arterial inflow and precultured in a cell type specific medium for 1 - 3 weeks.

In the second reseeding step, primary hepatocytes in a collagen I suspension were integrated into the scaffold.

The resulting co culture system was maintained for 2 -3 weeks. The medium was changed every 5 - 7 days. Tissue samples were collected daily to monitor cell functions. After the end of cultivation the whole BioVaSc was fixed for paraffin embedding. Paraffin sections were made for the control of matrix reseeding and cell characterisation by immunohistochemical methods.

The differentiation of porcine progenitors into EC could be demonstrated by the expression of endothelial cell specific markers CD 31 and FLK-1. Moreover, human EC integrated into the vascular structures and also expressed those markers denoting early neoangiogenesis.

Hepatocytes on the matrix developed tight and adherent intercellular junctions and expressed cell type specific markers (CKLP 34, Hepatocyte). Hepatocyte proliferation in culture continued for 22 days as was substantiated by anti-Ki 67 staining. Bile Canaliculi like structures between abutting hepatocytes were documented by the anti-zona-occludens staining. The expression pattern of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) suggests a communication between hepatocytes and EC.

The maintainance of metabolic functions was analysed by media samples. The detoxifying function of the hepatocytes could be demonstrated up to day 22 by urea synthesis. Albumin synthesis and lactate formation (as general marker for metabolism activity) were also performed until the end of the cultivation. Phase I and II metabolism of dextrometorphan were detectable in the porcine model up to day 22 without any enzyme induction.

The organoid liver module was established applying porcine hepatocytes due to their better availability at first. However, the model was subsequently transferred to a humanised model.

In the present work it is shown that the BioVaSc is a suitable basis for the generation of an organ like liver test system. A longterm culture and co culture model for porcine as well as human hepatocytes maintaining differentiation status and specific cell functionality could be established.

The presented results are coherent with findings of other groups applying different bioreactor systems. In contrast to existing models the co-culture of endothelial cells and hepatocytes was realized in the presented model, resulting in physiological culture conditions. For the first time therefore it is now foreseeable to investigate the transport of molecules traversing the sinusoidal EC layer to enter hepatocytes and, respectively, metabolites being released from the hepatocytes into the blood stream via the sinusoidal EC layer.

Work in progress will show the suitability of this organoid liver model for answering toxicological and metabolic aspects for the acceleration of drug development or for extra/ intra corporeal liver device.

## 3. Einleitung

### 3.1 Die Leber

Nach der Haut ist die Leber mit einem Gewicht von ca. 1500 g das größte Organ des Körpers. Sie liegt im rechten Oberbauch unter dem Zwerchfell [Schiebler et al., 1984]. Die Leber ist das wichtigste Organ für den Stoffwechsel endo- und exogener Substanzen. Sie trägt dazu bei, Schwankungen in der Konzentration verschiedener Stoffe im Blutplasma auszugleichen und so die konstante Versorgung peripherer Gewebe sicherzustellen (Homöostase).

#### 3.1.1 Aufbau

Die Leber ist unterteilt in zwei große Lappen, den rechten (Lobus hepatis dexter) und den linken Leberlappen (Lobus hepatis sinister) und zwei kleinere Lappen, den Lobus caudatus und den Lobus quadratus [Sternberg, 1992]. Diese Leberlappen sind wiederum in  $1 - 1,5 \times 10^6$  winzige Leberläppchen unterteilt (1 - 2 mm) [Siegenthaler et al., 2006]. Der Aufbau dieser, im Anschnitt sechseckigen Gebilde ergibt sich aus den engen Beziehungen zwischen intrahepatischem Gefäßsystem und Leberzellen. Je ein bis höchstens zwei zell-breite, miteinander anastomosierende (~ locker verbundene) Leberzellplatten stehen in enger räumlicher Verbindung zu dünnwandigen Sinusoiden (kleine Blutgefäße) (Abb.1, Punkt 2). Das intrahepatische Gefäßsystem hat zwei Zuflüsse: die Vena portae (Pfortader), die nährstoffreiches Blut aus Magen, Darm und Milz zuleitet und die Arteria hepatica, die sauerstoffreiches Blut aus dem Truncus coeliacus zuleitet. Die Sinusoide erhalten ihr Blut aus der Arteria hepatica und Vena portae. Sie enthalten dadurch gemischtes Blut. Abgeleitet wird das Blut anschließend durch die Zentralvene Venae centrales (Abb. 1, Punkt 4)[Schiebler et al., 1984].

Die Galle, die von den Hepatozyten der Leber produziert wird, läuft durch die Gallenkanälchen (Aussparungen zwischen den Zellen (Abb. 1, Punkt 3)) zu den mit Epithel ausgekleideten Gallengängen an der Läppchenperipherie und wird von da entgegen der Flussrichtung des Blutes zur Gallenblase oder direkt in den Zwölffingerdarm weitergeleitet.

An den Eckpunkten benachbarter Leberläppchen liegen die Periportalfelder, in denen jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang verlaufen. Dies bezeichnet man als Glisson-Trias (Abb.1, Punkt 1+5)[Schiebler et al., 1984].

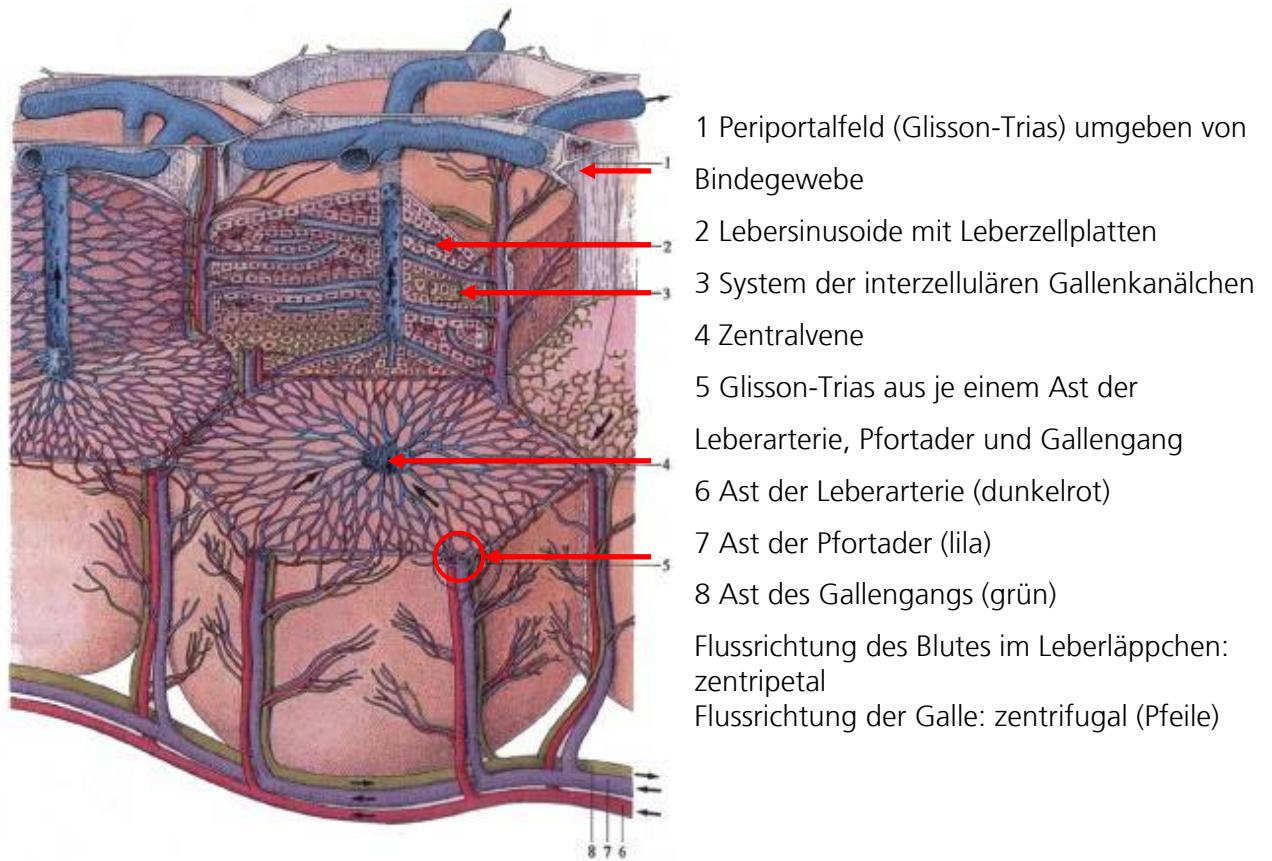


Abb. 1 Aufbau der Leber (aufgrund der deutlicheren Abgrenzung der Leberläppchen ist die Schweineleber dargestellt) [Beck, 1998]

### 3.1.2 Zelltypen der Leber

#### Hepatozyten

Die Leber besteht hauptsächlich aus Hepatozyten; sie machen 80% des Lebervolumens und 60-65% aller Leberzellen aus. Der Hepatozyt ist eine morphologisch und funktionell polarisierte, sekretorische Epithelzelle mit einer basolateralen (sinusoidalen - zu den Gefäßen hingewandte Seite), einer lateralen sowie einer kanalikulären (apikalen - zu den Gallenkanälchen zugewandten) Domäne (Abb. 2).

Die sinusoidale Plasmamembran, die 70% des Hepatozyten ausmacht, ist dem Disseraum zugewandt. Sie besitzt Mikrovilli und ist in der Lage, Plasmaproteine durch rezeptorvermittelte Endozytose aufzunehmen. Die laterale Plasmamembran hat eine besondere Funktion in der interzellulären Adhäsion und Kommunikation der Hepatozyten. Zur Begrenzung des Gallenkanalikus sind die lateralen Membranen benachbarter Hepatozyten durch Tight Junctions als Diffusionsbarrieren und Adhering Junctions mit Desmosomen als mechanische Verstärkungen verbunden (Abb. 2).

Gap Junctions stellen plasmatische Verbindungen zwischen den Zellen dar, die für



Ionen und kleine Moleküle passierbar sind und auf diese Weise eine interzelluläre Kommunikation ermöglichen. Außer über die Gap Junctions kommunizieren Hepatozyten auch parakrin.

Die kanalikuläre Plasmamembran, die in Form von Mikrovilli in das Gallenkanalikuluslumen ragt, ist die entscheidende, strukturelle Komponente für die Gallesekretion.

### **Endothelzellen**

Die Endothelzellen bilden die Wand der Sinusoide - es gibt keine Basallamina. Ihre porenartigen Fenestrationsen (100-175 nm Durchmesser) ermöglichen den Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen den Sinusoiden und dem Disse-Raum (Raum zwischen Sinus-Endothel und Hepatozyten ca. 0,3 µm breit) bzw. den Hepatozyten. Endothelzellen sezernieren vasoaktive Mediatoren und Zytokine. Sie sind zur Clearance von Medikamenten und spezifischen Molekülen mittels rezeptorvermittelter Endozytose befähigt.

### **Kupferzellen**

Kupferzellen sind große und sehr aktive, leberspezifische Makrophagen (Fresszellen), die endozytotische Vesikel und zahlreiche Lysosomen enthalten. Sie haften an den Endothelzellen und haben im Lumen der Sinusoide direkten Kontakt mit dem sinusoidalen Blut. Kupfer-Zellen werden bei Infekten aktiviert, sind an der Virusabwehr beteiligt und phagozytieren Bakterien, Pilze, Parasiten, gealterte Erythrozyten sowie Tumorzellen. Aktivierte Kupferzellen sezernieren zahlreiche Zytokine, lysosomale Hydrolasen, reaktive Sauerstoffmetabolite, Eicosanoide (vom Körper gebildete ungesättigte Fettsäuren) und Stickoxid.

### **Sternzellen**

Sternzellen oder auch Ito-Zellen liegen zwischen den Endothelzellen und den Hepatozyten im Disse-Raum. Sie zeichnen sich durch multiple, perinukleäre Vitamin-A-Speichertropfen (Oleosomen) aus und besitzen lange, zytoplasmatische Ausläufer, die die Endothelzellen umfassen. Bei Zytokin-vermittelter Aktivierung verlieren die Sternzellen ihre Vitamin-A-Tropfen und transformieren zu kontraktile Myofibroblasten und synthetisieren Kollagen, Glykoproteine und Proteoglykane. Sie sind die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix in der Leber.

### **Pit Cells**

Pit Zellen sind leberspezifische, natürliche Killerzellen im Lumen der Sinusoide, den Sinusendothelzellen oder den Kupfferzellen adhären. Sie sind an der Beseitigung von Tumorzellen beteiligt, üben antivirale Funktionen und stimulieren die Kupfferzellen zur Produktion zytotoxischer Substanzen.

### Cholangiozyten

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

### Oval Cells

Oval Cells sind wenige kleine, parenchymale Zellen mit großen, ovalen Kernen, die als bipotente Vorläufer- oder Stammzellen der Leberzellen angesehen werden [Siegenthaler et al., 2006] und in hepatozytäre und biliäre Zellen differenzieren können..

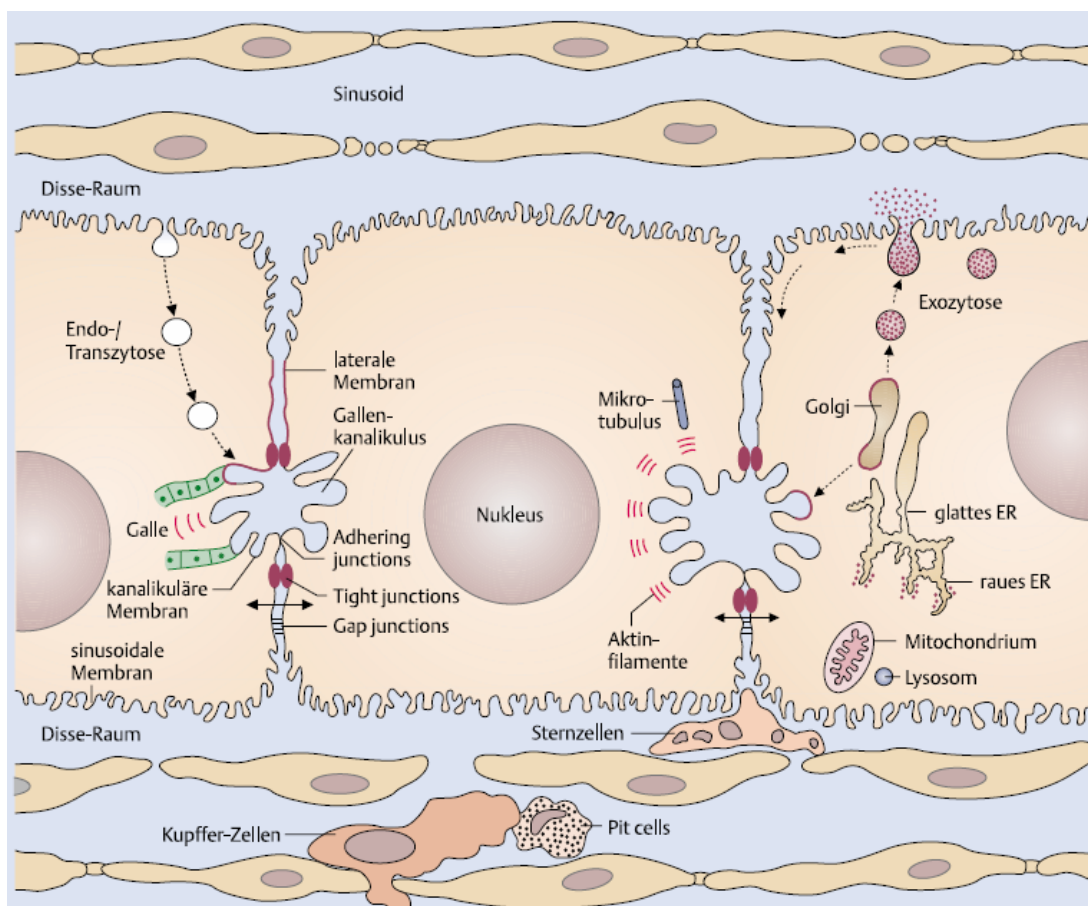


Abb. 2 Ultrastruktur des Hepatozyten als polarisierte, sekretorische Epithelzelle mit basolateraler und apikaler Plasmamembran [Siegenthaler et al., 2006]

### 3.1.3 Funktionen

Die Leber ist das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels und die größte Drüse des Körpers.

Sie ist am **Kohlenhydratstoffwechsel** beteiligt, indem sie Glucose und andere Monosaccharide aus dem Plasma aufnimmt und in Fettsäuren umwandelt oder in Form von Glykogen speichert. Das Glykogen wird dann bei Abfall des Blutzuckerspiegels wieder in Glucose abgebaut und ins Blut abgegeben. Wenn der Glykogenspeicher aufgebraucht ist, kann die Leber Glucose auch durch Gluconeogenese aus Laktat, Glycerol oder den Kohlenstoffgerüsten von Aminosäuren aufbauen.

In den **Lipid-Stoffwechsel** ist die Leber durch den Aufbau von Fettsäuren involviert, aus denen wiederum Fette und Phospholipide gebildet werden. Diese können wie auch Cholesterol, das ebenfalls in der Leber gebildet wird, als Lipoproteine ins Blut abgegeben werden und so anderen Geweben zugeführt werden. Überschüssiges Cholesterol wird in Gallensäuren umgewandelt oder mit der Galle ausgeschieden.

Durch die Kontrolle des Plasma Aminosäure-Spiegels greift die Leber auch in den **Aminosäure- und Proteinstoffwechsel** ein. Sie baut überschüssige Aminosäuren ab und wandelt das dabei entstehende giftige Ammoniak im Harnstoffzyklus zu Harnstoff um, welcher mit dem Urin ausgeschieden werden kann.

Zudem werden die meisten Plasmaproteine (wie z.B. Albumin) in der Leber synthetisiert und auch wieder abgebaut.

Die Leber dient als **Speicher** nicht nur **für Energiereserven und Baustoffe**, sondern auch für manche **Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine** (z.B. Vitamin A).

Die Aufgabe, die die Leber als Testsystem so interessant macht, ist jedoch ihre Rolle in der **Biotransformation**. Pharmaka, Steroidhormone, Bilirubin (ein Abbaustoff des Hämoglobins), Ethanol und andere Xenobiotika werden von der Leber aufgenommen und in zwei Schritten (Phase-I- und Phase-II-Metabolismus) umgewandelt [Koolmann et al., 2003]. Die Stoffe werden dabei entweder Phase-I oder Phase-II vermittelt abgebaut bzw. in einer Kombination aus beiden Reaktionen. In der Phase-I-Reaktion werden die Stoffe hydrolysiert, oxidiert oder reduziert, wobei spezifische funktionelle Gruppen (z.B. –OH, –NH, –SH, –COOH) in einem Molekül freigesetzt oder eingesetzt werden. Dabei wird das Molekulargewicht nicht entscheidend beeinflusst, aber die Reaktivität. Ein ungiftiger Ausgangsstoff kann durch Biotransformation giftig werden. In der Phase-I-Reaktion spielt die Cytochrom P450 Enzym Superfamilie, deren Hauptwirkungsort die Leber ist, eine

dominante Rolle [Brandon et al., 2003]. Viele verschiedene CYP Isoformen sowie ihre Induktoren und Inhibitoren sind detektiert und charakterisiert worden.

In der Phase-II-Reaktion werden hochpolare, in der Regel inaktive, rasch ausscheidbare Konjugate gebildet. Dabei werden Reste aus dem Intermediärstoffwechsel wie z.B. Glucuronsäure an die Stoffe gekoppelt. Das Molekulargewicht erhöht sich. Phase-II-Enzyme sind hauptsächlich Transferasen.

Als sogenannte Phase III werden Medikamententransporter bezeichnet, die laut neueren Studien [Zhang et al., 2003] die therapeutische Effektivität und Absorption, Verteilung sowie Eliminierung eines Medikamentes beeinflussen. Diese Transporter sind in den Epithel- und Endothelzellen der Leber, des Gastrointestinal Traktes, der Bluthirnschranke, den Nieren und anderen Organen lokalisiert [Brandon et al., 2003].

### **3.2 Tissue Engineering**

Tissue Engineering ist ein interdisziplinärer Arbeitsbereich, in dem „Erkenntnisse und Methoden der Materialforschung und der Naturwissenschaften für das fundamentale Verständnis von Struktur und Funktion normaler und pathologisch veränderter Gewebe genutzt werden - Ziel ist die Entwicklung von biologischen Substituten zur Reparatur, Erhaltung und Verbesserung der Gewebefunktion“ [Skalak et al., 1988].

Das Arbeitsgebiet Tissue Engineering ist ein relativ neuer Forschungszweig, der sich aufgrund verschiedener Defizite in der Behandlung des Verschleißes oder des Verlustes von Geweben und Organen entwickelt hat.

Probleme bei der Allotransplantation z.B. bereiten der Mangel an geeigneten Spenderorganen sowie die lebenslang notwendige Immunsuppression des Transplantatempfängers, die das Risiko schwer kontrollierbarer Infektionen und maligner Tumore in sich birgt.

Beim Einsatz künstlicher Prothesen sind häufig mangelnde Langlebigkeit, eingeschränkte Funktionalität und materialspezifische Inkompatibilität ein Problem.

Tissue Engineering Projekte gibt es in den unterschiedlichsten medizinischen Disziplinen. Die Entwicklungsstadien reichen von der reinen Grundlagenforschung wie z.B. der artifiziellen Trachea [Kojima et al., 2003] über präklinische Studien (z. B. Herzklappen [Dohmen et al., 2003]) bis hin zum klinischen Einsatz (z.B. Haut und Knorpel [Walgenbach et al., 2003]). Jedoch trifft im Allgemeinen zu: Je komplexer ein Organ ist, desto schwieriger ist es, ein bioartifizielles Substitut zu konstruieren. Obwohl seit den

60er Jahren daran geforscht wird, konnte z.B. immer noch kein vollfunktionsfähiger Leberersatz entwickelt werden. Es gibt allerdings Ansätze zur Therapie akuten Leberversagens durch extrakorporale Leberunterstützungssysteme, die in klinischen Studien getestet werden.

Bei Tissue Engineering Projekten wird versucht, durch im Labor (*ex vivo*) manipulierte Moleküle, Zellen, Gewebe oder Organe die Funktion ausgefallener oder beschädigter Gewebe zu ersetzen bzw. zu unterstützen.

Die drei Hauptansätze dazu sind:

- a) Die Implantation von autologen, allogenen oder xenogenen Zellen (Zelltransplantation)
- b) Die Verwendung von synthetisch veränderter Trägerstruktur, Matrix, (Guided Tissue Regeneration)
- c) Der Einsatz von mit Zellen besiedelten Matrices (Tissue Engineering) [Langer et al., 1993].

Tissue Engineering Produkte sind nicht nur als Transplantate interessant für die Wissenschaft und Industrie, sondern auch als Testsysteme. Somit bieten sie eine Alternative zu ethisch bedenklichen und sehr kostenintensiven Tierversuchen. Zudem sind Tierversuchsdaten aufgrund der Speziesdifferenzen in der Biotransformation von Arzneimitteln nur mit Einschränkung auf den Menschen übertragbar.

### **3.2.1 Matrices für das Tissue Engineering**

Bei der Generierung von Geweben ist die Wahl einer geeigneten Trägerstruktur von großer Bedeutung. Die Matrix dient zum einen zur dreidimensionalen Organisation der Zellen *in vitro*, zum anderen ist der Kontakt mit ECM (Extrazelluläre Matrix) Komponenten wichtig für den Erhalt der Zelldifferenzierung. Sie ist im Idealfall biokompatibel, bioabsorbierbar, nicht immunogen, in der Lage Angiogenese zu induzieren und unterstützt das Zellwachstum.

Matrices können aus synthetischen oder biologischen Materialien bestehen. Synthetische Materialien wie Polyglycolsäure oder Polyacetatsäure vereinfachen die Kontrolle der Materialeigenschaften wie Stabilität, Abbauprozess, Porosität und Mikrostruktur. Die Zellanhaftung kann durch chemische Modifizierung der Polymere oder ihre Beschichtung verbessert werden. Hauptnachteil aller synthetischen Polymere

sind ihre häufig toxischen Abbauprodukte und ihr Potential, Entzündungsreaktionen hervorzurufen.

Biologische Matrices sind biokompatibel, nicht immunogen und biodegradierbar. Diese Trägerstrukturen können künstlich aus einer oder mehreren ECM-Bestandteilen wie Kollagen und Laminin zusammengesetzt sein und mit variierenden Zusätzen wie z.B. Wachstumsfaktoren oder RGD (Arginin, Glycin, Aspartat)-Peptiden kombiniert sein, um die Mikroumgebung und Gerüststabilität zu optimieren.

Die *in vitro* Kultur von Leberzellen lässt sich hinsichtlich Zellvitalität und -funktion gegenüber der klassischen Monolayerkultur mit der sogenannten Sandwichkultur verbessern. Dabei werden die Zellen zwischen zwei Kollagen-Gelen kultiviert [Kern et al., 1997].

Der Nachteil bei der Verwendung solcher Matrices ist die fehlende Gewährleistung der notwendigen 3-D-Struktur und einer physiologischen Zellversorgung durch Blutgefäße sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten. Dies ist gerade bei der Leber, einem Organ mit sehr hoher Syntheseleistung, von großer Bedeutung.

Der alternative Ansatz, natives Gewebe *in vitro* zu azellularisieren und dann rezubesiedeln, bietet die Möglichkeit, die natürliche ECM-Zusammensetzung in ihrer dreidimensionalen Struktur zu erhalten. Rebesiedelte Schweinematrices wurden bereits erfolgreich von verschiedenen Gruppen für vorklinisches Tissue Engineering von z.B. Herzklappen [Bader et al., 1998], Blutgefäßen [Robotin-Johnson et al., 1998] und Harnblasen verwendet. Jedoch ist auch bei diesen Ansätzen das Problem der Zellversorgung nicht gelöst.

Im Bereich Leber Tissue Engineering wird versucht dieses Problem zu umgehen, indem Hohlfaserreaktoren (3.2.6) entwickelt wurden, die zum einen eine 3-D Organisation der Zellen und zum anderen ihre ausreichende Versorgung durch ein System von Hohlfasern, die als Kapillaren dienen, ermöglichen.

Der Einsatz einer biologischen vaskularisierten Matrix (BioVaSc) kombiniert die Vorteile eines Gefäßsystem und damit einer physiologischen Versorgung der Zellen mit den Vorteilen der Verwendung einer nativen azellularisierten Matrix.

### **3.2.1.1 Biological Vascularized Scaffold (BioVaSc)**

Die biologische vaskularisierte Trägerstruktur (BioVaSc), die am Fraunhofer IGB in der Abteilung Zellsysteme genutzt wird, besteht aus Schweinedünndarm.

Zur Explantation wird der Darm eines 15 - 25 kg Schweins im Bereich des Jejunums bis Duodenums freipräpariert. Die versorgenden Gefäßpaare (zuführende Arterie und ableitende Vene) werden mit Braunülen versehen. Dann erfolgt die Entnahme der Darmstücke in einer Länge von ca. 10 - 15 cm. Diese Stücke lassen sich im Bioreaktor mit einer Natriumdesoxycholatlösung von allen Zellen befreien. Nach dem Spülen mit Salzlösung wird eine Matrix mit erhaltenem Gefäßsystem sowie arteriellem Zufluss und venösem Abfluss, welche hauptsächlich aus Kollagen I besteht, zurückbehalten (Abb. 3). Im Anschluss an die Sterilisation durch Gamma-Bestrahlung lässt sich sowohl das Gefäßsystem [Mertsching et al., 2002] als auch das Lumen der Matrix mit Zellen rebesiedeln.



Abb. 3 BioVaSc - azellularisierter Schweinedünndarm mit arteriellem Zufluss (rosa Braunüle) und venösem Abfluss (grüne Braunüle)

### 3.2.2 Zellquellen für das Tissue Engineering

Mögliche Zellquellen für das Tissue Engineering sind

- Primäre Zellen (aus Biopsien isoliert, allogene oder xenogene)
- Zelllinien
- Stammzellen (embryonale oder adulte, extrahepatische oder intrahepatische).

Primäre Zellen sind funktionell, haben aber nur ein eingeschränktes Proliferationspotential und können leicht dedifferenzieren. Humane Hepatozyten proliferieren z.B. *in vitro* nicht. Hinzu kommt, dass die Quellen für humane Leberzellen sehr limitiert sind, da lediglich nicht als Spenderorgan geeignete Leberlappen sowie gesunde Bereiche von Tumorbiopsien zur Zellisolation zur Verfügung stehen. Die Zellen, die aus ungeeigneten Spenderorganen isoliert werden, zeichnen sich zudem durch

starke Heterogenität und schwache Vitalität aus, während aus kleineren Biopsien wiederum nur geringe Zellzahlen zu gewinnen sind.

Xenogene Leberzellen, z.B. von Ratten oder Schweinen, bieten eine gute Alternative für die Forschung; die Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen auf den Menschen ist allerdings noch nicht ausreichend belegt. Unterschiede im Stoffwechsel sind wahrscheinlich, da neue Studien belegen, dass es auch im Menschen individuelle sowie auch rassenspezifische Unterschiede in der Biotransformation einzelner Stoffe gibt [Klein et al., 2005]. Der Einsatz xenogener Zellen in Leberersatzsystemen eignet sich, um Zeiträume von maximal 6 Tagen bis zur Transplantation zu überbrücken. Ab diesem Zeitpunkt ist mit immunologischen Reaktionen zu rechnen. Die Gefahr von Zoonosenübertragung kann durch die Verwendung von SPF (Spezifiziert-Pathogen-Frei) Tieren verringert werden.

Zelllinien haben theoretisch ein unbegrenztes Proliferationspotential, damit verbunden aber auch eine hohe Mutationsgefahr. Außerdem kann es mit der Immortalisierung von Zellen zu Entdifferenzierungsprozessen kommen. Bisher gibt es keine Hepatozytenzelllinie mit einer zufriedenstellenden Funktionalität, die für Testsysteme oder bioartifiziellen Leberersatz geeignet wäre.

Stammzellen sind ebenfalls eine mögliche Zellquelle, da sie ein großes Proliferationspotential besitzen. Es gibt verschiedene Ansätze, Hepatozyten aus embryonalen Stammzellen [Soto-Gutiérrez et al., 2006] oder adulten intrahepatischen (z.B. Oval Cells, kleine Hepatozyten, Hepatoblasten) und extrahepatischen (hämatopoetische, mesenchymale [Chen et al., 2007]) Stammzellen zu differenzieren. Die differenzierten Zellen zeigen bisher aber nur wenige Leberfunktionen. Das gleiche gilt auch für transdifferenzierte Pankreaszellen.

Da die Funktionalität der Zellen wichtigstes Kriterium für die Konstruktion eines Testsystems oder eines Leberersatzes ist, sind beim momentanen Forschungsstand primäre, allogene und xenogene Zellen die favorisierte Zellquelle.

### **3.2.3 Zellversorgung**

Das Problem der Zellversorgung, als Hauptbegrenzung im Tissue Engineering größerer komplexerer Gewebe, ist mit bisherigen Technologien noch nicht gelöst. *In vivo* wird die Versorgung von Gewebszellen über das Blutgefäßsystem gewährleistet, das durch seine feinen Verästelungen die Diffusionswege zwischen Blut und Zellen minimiert.



Hepatozyten gehören zu den stoffwechselaktivsten Zellen im Körper. Deshalb ist jeder Hepatozyt direkt mit einem Sinusoid, d.h. einer Kapillare, assoziiert. Dieser Aufbau gewährleistet zum einen die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff und zum anderen den Abtransport möglicherweise giftiger Metabolite. Für das Tissue Engineering von 3D Lebergewebe ist deshalb die Versorgung der Zellen die zentrale Frage.

Dieses Problem lässt sich auf verschiedene Art angehen. Gefäßneubildung (Neoangiogenese) kann durch die Injektion von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF und TGF- $\beta$  in bioartifizielle Gewebe *in vitro* oder durch die Verwendung von Progenitorzellen aus dem peripheren Blut [Kalka et al., 2000] induziert werden. Dabei ist es schwierig, eine gerichtete Gefäßneubildung zu induzieren, die für eine Perfusion mögliche Anschlussstellen bietet. *In vitro* entstehen nur kapillarartige Gebilde, aber kein wirkliches Blutgefäßsystem mit Gefäßen in verschiedenen Durchmessern und mit einem arteriellen sowie einem venösen System, die miteinander verbunden sind.

Im Bereich des Leber Tissue Engineering wurden deshalb verschiedene Hohlfaserbioreaktoren entwickelt (3.2.6).

Eine weitere Möglichkeit für die physiologische Versorgung bioartifizieller Organe bietet die Verwendung der BioVaSc (3.2.1.1), deren Gefäßsystem mit arteriellem Zufluss und venösem Abfluss bei der Azellularisierung strukturell erhalten bleibt und mit autologen Zellen rebesiedelt werden kann [Mertsching et al., 2002].

### **3.2.4 Co-Kultur**

In der Leber wachsen Hepatozyten in enger Verbindung zu den sinusoidalen Endothelzellen. Die Kommunikation dieser beiden Zelltypen ist wichtig für ihre Funktion und Differenzierung. Experimente haben gezeigt, dass bei Regenerationsprozessen nach einer Heparektomie im Rattenmodell, Hepatozyten in hohen Konzentrationen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ausschütten, um die Neoangiogenese durch Endothelzellen zu induzieren [Shimizu et al., 2005]. Sinusoidale Endothelzellen wiederum stimulieren VEGF Rezeptor-1 vermittelt die Hepatozytenproliferation durch Produktion von HGF (Hepatocyte Growth Factor) und Interleukin-6 [Ferrara et al., 2003]. Endothelzellen sind im Körper die natürliche Barriere zwischen dem Blut sowie den darin gelösten Makromolekülen und den Gewebezellen. Der Transport ist dabei abhängig von der Molekülgröße, -ladung und -form sowie dem Kohlenhydratgehalt. Er erfolgt parazellulär (zwischen den Zellen hindurch, z.B. durch Fenestrierungen) oder

transzellulär, z.B. über rezeptorvermittelte Transzytose oder Endozytose. Während des Durchquerens der Zelle können Moleküle verändert werden, was für den späteren Metabolismus von Bedeutung ist [Irie et al., 1991], besonders dann wenn es sich um ein von der Leber verstoffwechseltes Medikament handelt. Deshalb ist für den Aufbau eines *in vitro* Lebertestsystems für Wirkstofftests die Co-Kultur von Hepatozyten mit Endothelzellen unverzichtbar.

Es gibt auch Arbeiten, in denen Hepatozyten mit Kupfferzellen co-kultiviert werden. Solche Modelle sind einerseits interessant zur Untersuchung von Entzündungsreaktionen beispielsweise nach Medikamentengabe, andererseits soll durch die Arbeit an diesen Projekten erforscht werden, ob durch die Co-Kultur hepatozytäre Zellfunktionen besser erhalten werden können [Zinchenko et al., 2006].

Die Arbeitshypothese hierbei ist, dass Kupfferzellen wichtige Stoffe, z.B. Co-Faktoren für Phase-II-Enzyme oder andere Zytokine, sezernieren, die von den Hepatozyten für ihren Stoffwechsel benötigt werden.

### **3.2.5 Bioreaktoren**

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass mechanische Bedingungen wie Medienfluss und Rotations-, Dehnungs-, Zug- oder Pulsationsstress wichtige Faktoren bei der Entwicklung bioartifizieller Gewebe sind [Ratcliffe et al., 2002]. Im Tissue Engineering ist es entscheidend neben einer Versorgung der Zellen auf einer geeigneten Matrix, auch die mechanischen *in vivo* Anforderungen *in vitro* zu simulieren. Dazu wurden neben den einfachsten verwendeten Bioreaktoren wie Zellkulturflaschen und Gewebekulturschalen auch eine Reihe weiterentwickelter, gewebespezifischer Mechanobioreaktoren entwickelt, z.B. für die Herstellung von Knorpel, Ligament und Gefäßen.

Im Bereich des Leber Tissue Engineering ist die Bioreaktortechnik bestimmend für eine ausreichende Versorgung der Zellen auf der Matrix. Durch das Perfundieren der Matrix mit Zellkulturmedium als *in vitro* Blutersatz bei einem bestimmten Druckverlauf kann die Zellversorgung gewährleistet werden. Der so entstehende mechanische Stress hat zudem Einfluss auf Funktion und Vitalität der gefäßbildenden Endothelzellen [Kadohama et al., 2007] und deren Differenzierung.

Am Fraunhofer IGB wurde in der Abteilung Zellsysteme ein Bioreaktorsystem (Abb.4 a)) entwickelt, welches die physiologische Perfusion einer vaskularisierten Matrix (der BioVaSc) mit Medium entsprechend des Blutflusses der Leber im Körper ermöglicht.

Dazu werden in einem selbstentwickelten Programm Druckkurven vorgeben (Abb.4 d)). Diesen Kurven folgend, steuert ein Rechner eine Pumpe an, die Medium durch das Gefäßsystem der Matrix im Bioreaktor (Abb.4 b) und c)) pumpt. Dabei bekommt der Rechner über einen Drucksensor vor dem arteriellen Anschluss der Matrix Informationen über den Druck im System, die er mit der vorgegebenen Kurve abgleicht. Dementsprechend reguliert er die Pumpe (Abb. 5). Durch diesen „Blutgefäßkreislauf“ soll eine optimale Versorgung der Zellen bei gleichzeitigem Abtransport von Toxinen und Metaboliten, z.B. nach Medikamenten- bzw. Wirkstoffumsetzung, ermöglicht werden.

Neben verschiedenen Bioreaktortypen wurde auch ein temperierter, mobiler Brutschrank konstruiert, der außer der permanenten Überwachung von CO<sub>2</sub>-Gehalt und Temperatur zusätzlich eine bessere Handhabung der Reaktoren ermöglicht. Die Sauerstoffsättigung des Mediums lässt sich durch einen O<sub>2</sub>-Sensor ebenfalls kontrollieren.

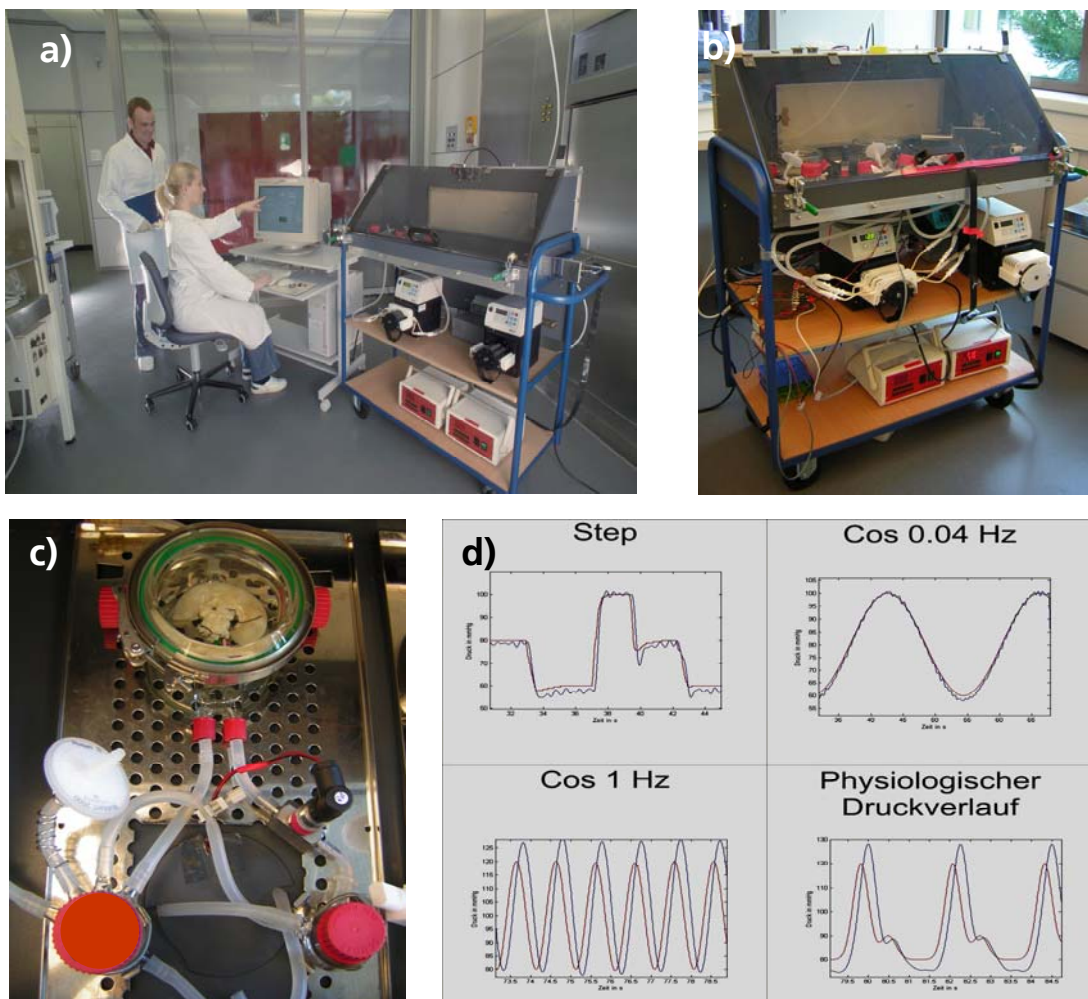


Abb. 3 a) Bioreaktorsystem mit mobilem Brutschrank, b) Bioreaktorwagen mit Inkubationskammer, Pumpen und Temperatur sowie CO<sub>2</sub> Überwachung, c) Bioreaktor mit BioVaSc und d) Beispiele für Druckkurven

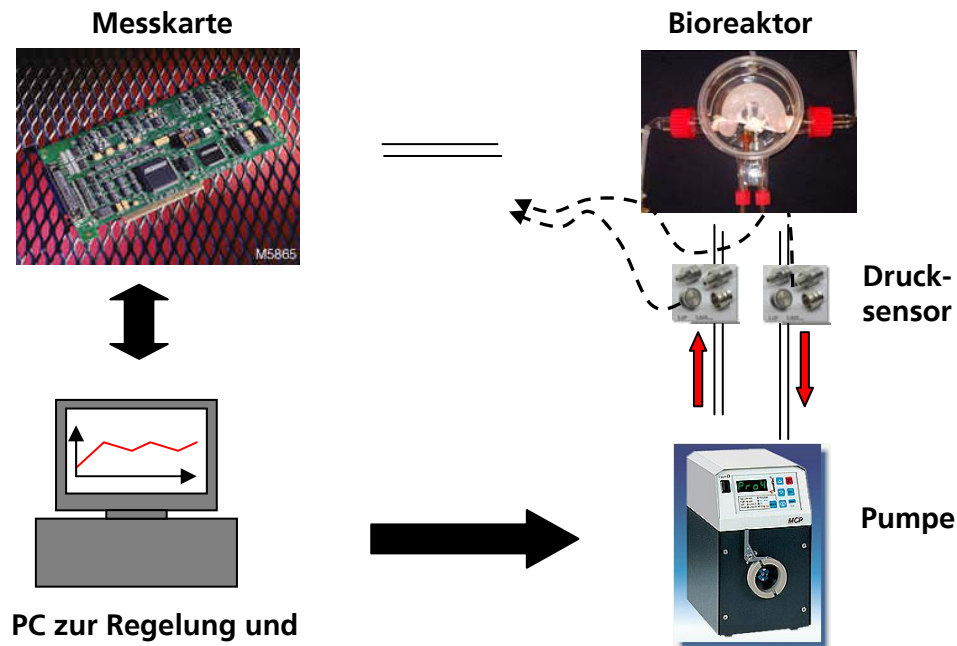


Abb. 4 Regelung des Druckverlaufs: Drucksensoren an den Anschlüssen der Matrix im Bioreaktor geben Messdaten zur Messkarte im Rechner weiter, welcher selbige mit der vorgegebenen Druckkurve vergleicht und ausgleichend die Pumpe ansteuert.

### 3.2.6 Stand der Wissenschaft - Leberersatzsysteme und Lebertestsysteme

#### Leberersatzsysteme

Durch lange Wartelisten für Leberorganspenden entstehen Überbrückungsphasen in der Therapie von akutem Leberversagen (ALF). In diesen Phasen muss die Entgiftungsfunktion der Leber kompensiert werden, um toxinvermitteltes Organversagen und hepatische Enzephalopathie zu vermeiden.

Derzeit gibt es verschiedene extrakorporale, maschinelle und bioartifizielle Lebersysteme in unterschiedlichen Phasen der Entwicklung. Die maschinellen Systeme dienen der Detoxifikation des Patientenblutes. Dazu wird das Blut, meist über Hämodialyseverfahren, teils mit Aktivkohle, Kationentauscher oder Filtration, von wasserlöslichen Toxinen befreit. Um auch proteingebundene Toxine zu entfernen, wurden Systeme wie z.B. MARS (Molecular Adsorbent Recycling System) entwickelt, die auf einer Dialyse entgegen des Kreislaufes mit Albumin als Transporter basieren [Rifai et al., 2003]. Diese Systeme können eine Kurzzeit-Unterstützung bei akutem Leberversagen (ALF) und eine Überbrückung bis zur Organtransplantation oder Leberregeneration sein [van de Kerkhove et al., 2004]. Sie ersetzen allerdings keine Biotransformationsprozesse.

Die bioartifiziellen Systeme (BAL - Bioartificial Liver) basieren auf Hepatozyten xenogenen oder humanen Ursprungs [van de Kerkhove et al., 2004], die genutzt werden, um die geschädigte Patientenleber in der Detoxifikation, verschiedenen Metabolismusfunktionen und der Synthese von Proteinen und anderen Molekülen zu unterstützen.

Es gibt einige BAL, die in klinischen Studien getestet wurden, z.B. [Gerlach, 2006]:

ELAD (Extracorporeal Liver Assist Device) von Vitagen: Hohlfaser-Membran-Bioreaktor mit humanen immortalisierten Hepatozyten (C3A); mit Blut perfundiert

HepatAssist von Circe Biomedical: Hohlfaser-Membran-Bioreaktor mit kryokonservierten porcinen Hepatozyten, die an Dextranmolekülen anhaften; mit Plasma perfundiert

BLSS (Bioartificial Liver Support System) von Excorp Medical: Hohlfaser-Membran-Bioreaktor mit frisch isolierten, porcinen (vom Schwein) Hepatozyten; mit Blut perfundiert

MELS (Modular Extracorporeal Liver System) von der Charité und Humboldt Universität in Berlin: Hohlfaser-Membran-Bioreaktor mit humanen, frisch isolierten Hepatozyten und integrierter Oxygenierung; mit Plasma perfundiert (als LSS mit porcinen Hepatozyten)

Hohlfaserreaktoren bestehen aus Fasern und Membranen, die in ein Gehäuse integriert sind. Dadurch entstehen zwei funktionelle Kompartimente, ein intrakapillärer und ein extrakapillärer Raum. In den extrakapillären Raum lassen sich Hepatozyten integrieren, die dort an den Oberflächen der Membranen oder Fasern anhaften und sich dreidimensional reorganisieren. Durch die intrakapillären Räume erfolgt die Versorgung der Zellen mit Medium oder Sauerstoff bzw. der Abtransport von Metaboliten und verbrauchtem Medium.

Die Frage nach der geeigneten Zellquelle für extrakorporalen Leberersatz ist sehr kontrovers diskutiert worden. Eine Studie von Pascher et al. weist jedoch daraufhin, dass nur der Einsatz humaner oder vom Pavian stammender Hepatozyten einen positiven Marker für die Vorhersagbarkeit von verbessertem Überleben darstellt [Pascher et al., 2002].

Teilweise konnten beim Einsatz der BAL zur Therapie von akutem Leberversagen verbesserte Überlebensraten detektiert werden. Der neurologische Zustand der

Patienten ließ sich in den meisten Studien verbessern, ebenso die biochemischen Parameter im Blut (Ammonium-, Bilirubingehalt). Im Tierversuch konnten sich die BAL bewähren. Zur ultimativen Ermittlung der Effekte der einzelnen Systeme auf das Überleben humaner Patienten bedarf es noch kontrollierter, randomisierter (Anwendung eines Zufallsergebnisse liefernden Verfahrens) Mega-Studien an großen Patientenzahlen, um statistisch signifikante Resultate zu erzielen [van de Kerkhove et al., 2004].

Bioartifizieller Leberersatz ist eine vielversprechende Zukunftsperspektive. Vorher sind jedoch noch viele Parameter zu optimieren und definieren. Die Bioaktivität der eingesetzten Zellen muss standardisierbar sein. Es muss geklärt werden, welche Funktionen und in welchem Maß ein solches System kompensieren können sollte. Dahingehend sind die einzelnen Systeme nicht vergleichbar. Die Anzahl der eingesetzten Zellen und somit der funktionellen Masse variiert von  $5 - 20 \times 10^9$  Zellen, wird aber teilweise auch in Gramm angegeben. Dabei wiederum wird die effektive Biomasse von der Vitalität der Zellen beeinflusst, die während des Einsatzes schwer zu überwachen ist.

Ein anderes mögliches Anwendungsgebiet für bioartifizielle Lebermodule ist der Einsatz als Testsystem.

### **Lebertestsysteme**

*In vitro* Testsysteme haben viele Vorteile. Bei *in vitro* Tests lassen sich z.B. systemische Einflüsse ausschalten. Der Bedarf an Testchemikalien ist geringer als im Tierversuch. Die Vergleiche von *in vitro* generierten, humanen und tierischen Daten können dazu herangezogen werden, das beste *in vivo* Modell für weiterführende Versuche herauszufinden. So lassen sich Tierversuche im Sinne des **3-R** Prinzips der Versuchstierkunde (**R**eplace, **R**efine, **R**educe) verbessern oder in der Zukunft vielleicht ganz ersetzen.

<b>In vitro Technik</b>	<b>Vorteil</b>	<b>Nachteil</b>
Humane CYP und UGT Supersomen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ein Isozym präsent</li> <li>- verschiedene Genotypen</li> <li>- hohe Enzymaktivität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- schwierige Extrapolation zum humanen Lebermetabolismus und in vivo Situation</li> </ul>
Humane Lebermikrosomen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bezahlbar</li> <li>- ermöglicht Studien zu individueller, geschlechts- und speziesspezifischer Biotransformation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ungeeignet für quantitative Messungen</li> <li>- nur CYP und UGT Enzyme</li> </ul>
Humanes Leber Cytosol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phase II Enzymaktivität hängt oft von der Anwesenheit von Co-Faktoren ab</li> <li>- hohe Enzymaktivität</li> <li>- individuelle, geschlechts- und speziesspezifische Biotransformationsstudien mögl.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nur begrenzte Enzyme</li> <li>- keine CYP</li> </ul>
Humane Leber S9 Fraktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phase I und II</li> <li>- individuelle, geschlechts- und speziesspezifische Biotransformationsstudien mögl.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geringere Enzymaktivität als bei Mikrosomen oder Cytosol</li> </ul>
Humane Leberzelllinien	<ul style="list-style-type: none"> <li>- leicht zu kultivieren</li> <li>- relativ stabile Enzymexpressionslevel</li> <li>- CYPs induzierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- niedrige Expressionslevel</li> </ul>
Transgene Zelllinien	<ul style="list-style-type: none"> <li>- leicht zu kultivieren</li> <li>- höhere Expressionslevel</li> <li>- Studien eines Isozyms oder Kombination von CYPs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- unvollständige Repräsentation der <i>in vivo</i> Situation</li> <li>- nur wenige Isozyme exprimiert</li> </ul>
Primäre Hepatozyten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gut etabliert und charakterisiert</li> <li>- Studien über Mediatoren und Enzym – Induzierer möglich</li> <li>- Drugtransporter noch präsent und funktionsfähig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolation kompliziert und zeitaufwendig</li> <li>- Zellen sind präselektiert</li> <li>- Zellschädigung während Isolation</li> </ul>
Leberschnitte	<ul style="list-style-type: none"> <li>- intakte zelluläre Interaktionen</li> <li>- morphologische Studien möglich</li> <li>- interindividuelle Variation kann studiert werden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inadequate Penetration</li> <li>- zerstörte Zellen an den Schnittkanten</li> <li>- limitierte Überlebenszeit</li> <li>- teures Equipment</li> </ul>
Isolierte perfundierte Leber	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gallenbildung</li> <li>- 3-D Architektur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- empfindliches Modell</li> <li>- limitierte Überlebenszeit</li> <li>- schlecht reproduzierbar</li> <li>- keine humanen Lebern verfügbar</li> </ul>

Tab. 1 Überblick über verschiedene *in vitro* Modelle, ihre Vorteile und Nachteile [Brandon et al., 2003]

In der Arzneimittelforschung gibt es für *in vitro* Systeme sehr unterschiedliche Ansätze, sowohl einfache als auch sehr komplizierte, geeignet für Kurzzeit- oder Langzeitversuche mit differierender Aussagekraft.

Die Wahl des optimalen Systems ist dabei von der Ausgangssituation abhängig und begründet durch Faktoren wie *in vivo* Entsprechung, Kosten, Verfügbarkeit des Modells und ethische Hintergründe (Tab.1).

Mit einfachen Testsystemen basierend auf isolierten Enzymen wie Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) aus Lebermikrosomen oder der S9 Fraktion der humanen Leber können Untersuchungen zur Biotransformation von Medikamenten oder Medikamenten-Wechselwirkungen durchgeführt und Metabolite isoliert werden. Enzyme, die aus ihrer Umgebung entfernt bzw. isoliert werden, zeigen allerdings oft nur Teilfunktionen des Organs und somit auch des zu erwartenden *in vivo* Effektes. Deshalb sind für vertiefende Studien primäre Hepatozyten oder Leberschnitte einzusetzen. Das erlaubt Untersuchungen an der intakten Zelle bzw. an intakten Leberstrukturen. Primäre Hepatozyten werden auch herangezogen, um die Toxizität von Medikamenten und ihrer Metabolite oder den Einfluss von Polymorphismen zu untersuchen sowie um ein geeignetes Tiermodell zu finden. Für Langzeitstudien, z.B. vertiefte Toxizitätsstudien oder Untersuchungen zur Gallesekretion der Zellen und Phase-III-Mechanismen, ist der Einsatz von Systemen notwendig, die noch näher an der *in vivo* Situation sind, und von Modellen, die eine maximale Kulturdauer der primären Hepatozyten erlauben. Dabei gilt, je komplexer und organoide der Ansatz, desto größer die Aussagekraft.

Es gibt einige bioartifizielle Lebersysteme, die auch auf ihre Verwendbarkeit als *in vitro* Modell für Studien getestet wurden. Nüssler et al. beispielsweise haben in einer Arbeit am Rattenmodell anhand von verschiedenen Funktionsparametern, die Eignung eines Unisyn Hohlfaserreaktors im Vergleich zu einem von Gerlach et al. entwickelten 3-D Membranreaktor sowie Sandwich- und Monolayerkulturen getestet [Nüssler et al., 2001; Gerlach et al., 1994]. Der 3-D Membranreaktor zeigte in der Studie gute Ergebnisse hinsichtlich der Metabolismusstabilität. Diese Ergebnisse reichten jedoch nicht aus, um die Vorteile der Sandwich- und Monolayerkultur hinsichtlich Einfachheit und geringem Zellbedarf aufzuwiegen.

Das zeigt, dass die bestehenden Lebersysteme ebenso wie der extrakorporale, bioartifizielle Leberersatz noch weiter zu optimieren und vor allem zu standardisieren sind.



### **3.3 Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Etablierung einer biologischen vaskularisierten Trägerstruktur (Biological Vascularized Scaffold - BioVaSc) als Grundlage für ein *in vitro* Lebertestsystem, z.B. zur Analyse von Substanzen und Wirkstoffen in der Pharmazie, Chemie- und Kosmetikindustrie.

Dazu waren Methoden zur Azellularisierung und Besiedlung der BioVaSc am Fraunhofer IGB in der Abteilung Zellsysteme aufzubauen und zu optimieren.

Des Weiteren sollte die Co-Kultur von porcinen Hepatozyten und Endothelzellen auf der Matrix im Bioreaktor etabliert und über verschiedene Parameter und Marker charakterisiert sowie analysiert werden.

Diese Kulturtechnik war hinsichtlich ihres Potentials zur Langzeitkultur von Hepatozyten unter Erhalt wichtiger Zellfunktionen zu testen.

Im Falle des erfolgreichen Aufbaus eines porcinen Lebermoduls sollte abschließend die Übertragung der Ergebnisse auf ein humanes Modell erfolgen.

## 4. Materialien

### 4.1 Biopsiematerial

Porcine Jejunumsegmente und Knochenmarksaspirat wurden in der Abteilung Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Tübingen unter sterilen Bedingungen von deutschen Landrasseschweinen (15 - 25kg) entnommen. Bis zu seiner Aufarbeitung lagerte das Material maximal einen Tag in phosphatgepufferter Salzlösung mit 1% Gentamycin bei 4°C.

Porcine Leberlappen wurden im Schlachthof Hemmingen von Deutsche Landrasseschweinen (15 – 25 kg) entnommen und bis zur weiteren Verwendung max. 1,5 Stunden in phosphatgepufferter Salzlösung mit 1% Gentamycin bei 4°C gelagert.

Humane Hepatozyten wurden in den Labors von Herrn Prof. Nüssler an der Charité Berlin aus gesunden Anteilen von Lebertumorbiopsien isoliert.

Humane, mikrovaskuläre Endothelzellen entstammen Präputienbiopsien von Spendern im Alter von 0 - 8 Jahren. Die Operationen erfolgten am Olga Hospital in Stuttgart.

### 4.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/ Firmensitz	Bestellnummer
Addel® N	Baxter/ Unterschleißheim	8425271
Albumin	Sigma Aldrich/ München	A9418
Albumin (zum Blocken)	Sigma Aldrich/ München	A9647
Aminoven 15%	Fresenius Kabi/ Bad Homburg	M090562/01
Antibody Diluent	Dako/ Hamburg	S3022
L-Ascorbic acid	Sigma Aldrich/ München	A4034
Biocoll Separating Solution	Biochrom/ Berlin	L-6115
Bouin's Reagenz	Sigma Aldrich/ München	HAT 101128
Calciumchlorid $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck/ Darmstadt	2382
Delimiting Pen	Dako /Hamburg	S2002
Dexamethason	Sigma Aldrich/ München	D1159
Dimethylsulfoxid DMSO	Sigma Aldrich/ München	D2438

EnVision+ System-HRP (DAB)	Dako/ Hamburg	K4007
EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako/ Hamburg	K5007
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma Aldrich/ München	E9644
Eosin B	Sigma Aldrich/ München	861006
Essigsäure	Merck/ Darmstadt	1.00056.1000
Ethanol	Roth/ Karlsruhe	K928.3
Fungizone	Invitrogen/ Karlsruhe	15290-026
Gentamycin	Invitrogen/ Karlsruhe	15710
Glucagon	Sigma Aldrich/ München	G3157
Glucose	Merck/ Darmstadt	8337.1000
L-Glutamin	Biochrom/ Berlin	K0283
Hämalaun	Sigma	
HEPES	Roth/ Karlsruhe	9105.3
Hydrocortison	Sigma Aldrich/ München	H0396
Insulin	Sigma Aldrich/ München	I5500
Isomount	LABOnord/ Templemars (B)	05547535
Isopropanol	Merck/ Darmstadt	
Kaliumchlorid	Merck/ Darmstadt	4936.5000
Kaliumhydrogenphosphat $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck/ Darmstadt	4873.1000
Kollagenase NB4	Serva/ Heidelberg	17454
Linolensäure, Oleinsäure, Arachidonsäure	Sigma Aldrich / München	L0163
Magnesiumchlorid $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck/ Darmstadt	5833
MEM Amino acids – L-Glutamine	Invitrogen/ Karlsruhe	11130
Natriumchlorid NaCl	Roth/ Karlsruhe	3957.1
Natriumdesoxycholat Monohydrat	Sigma Aldrich/ München	238392- 100G
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure Na-EDTA Salz	Sigma Aldrich/ München	E-1644
Natriumhydrogencarbonat	Roth/ Karlsruhe	8551.1
Natriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck/ Darmstadt	6580.1000
Nicotinamid	Sigma Aldrich/ München	N0636
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen/ Karlsruhe	3879
Peroxidase-Blocking Solution	Dako/ Hamburg	S2023
L-Prolin	Merck/ Darmstadt	7434
Roticlear®	Roth/ Karlsruhe	A538.1

Target Retrieval Solution Citrate pH 6	Dako/ Hamburg	S2369
Target Retrieval Solution pH 9,0	Dako/ Hamburg	S2367
3,3',5'5- Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma Aldrich/ München	T8665
Titriplex III	Merck/ Darmstadt	12029. 0100
Transferrin	Sigma Aldrich/ München	T1147
Trijodthyronin	Sigma Aldrich/ München	T6397
Trizma base	Sigma Aldrich/ München	T6066-500G
Tris Hydrochloride	Sigma Aldrich/ München	T-5941- 500G
Tween 20	Merck/ Darmstadt	822184
Versene	Invitrogen/ Karlsruhe	15040
Williams E Medium	Biochrom/ Berlin	F1125

### 4.3 Zellkulturmedien, Perfusionslösungen, Puffer und Lösungen

#### Zellkulturmedien

<b>Endothelial Cell Growth Medium mikrovaskulär (Promocell Heidelberg, C-22120)</b>	
Endothelial Cell Growth Supplement/ Heparin	0,4 %
Fetal Calf Serum	5 %
Epidermal Growth Factor	10 ng/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Endothelial Cell Basal Medium	500 ml

<b>Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit (Promocell Heidelberg, C-22011)</b>	
Fetal Calf Serum	2 %
Epidermal Growth Factor	5 ng/ml
Hydrocortison	0,2 ng/ml
Vascular Endothelial Growth Factor	0,5 ng/ml
Basic Fibroblast Factor	10 ng/ml
R3 IGF-1	20 ng/ml
Ascorbic Acid	1 µg/ml
Heparine	22,5 µg/ml
Endothelial Cell Basal Medium	500 ml

<b>Aussaatmedium</b>	
Fetal Calf Serum	5%
Gentamycin	1%
Hydrocortison	0,8 µg/ml
Insulin	0,25 µg/ml
Glucagon	10 ng/ml
Williams E Medium	500 ml

<b>Leberzellmedium</b>	
DMSO	5 ml
Gentamycin	1%
HEPES 3Molar	2,5 ml
L-Glutamin	5 ml
MEM Amino acids	10 ml
Linolensäure, Oleinsäure, Arachidonsäure	0,5 ml
Hydrocortison	0,8 µg/ml
Insulin	0,25 µg/ml
Glucagon	10 ng/ml
Transferrin	5 µg/ml
Trijodthyronin	27 ng/ml
Nicotinamid	0,6105 mg/ml
EGF	5 ng/ml
Ascorbinsäure	18 µg/ml
Prolin	15 µg/ml
Dexamethason	0,04 µg/ml
Aminoven	4,5 ml
D-Galaktose	0,5 mg/ml
Addel N	1 ml
Williams E Medium	458,1 ml

### Perfusionslösungen für Leberpräparation

<b>Grundpuffer, pH 7,4</b>	
NaCl	154 mM
KCl	5,6 mM
Glucose	5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Hepes	20 mM
Aqua destillata	Ad 1000 ml

<b>Perfusionspuffer 1, pH 7,4</b>	
Grundpuffer	1 l
EDTA	1 mM
Dexamethason	0,04 g/l

<b>Perfusionspuffer 2, pH 7,4</b>	
Grundpuffer	1 l
EDTA	1 mM

<b>Perfusionspuffer 4, pH 7,4 (immer frisch ansetzen)</b>	
Grundpuffer	0,5 l
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
Kollagenase	0,05%

## Puffer

<b>PBS-, pH 7,2</b>	
NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,5 mM
Aqua destillata	Ad 1000 ml

<b>PBS+, pH 7,2</b>	
NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,5 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,5 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,9 mM
Aqua destillata	Ad 1000 ml

<b>PBS- EDTA, pH 7,2</b>	
NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,5 mM
Na-EDTA Salz	0,5 mM
Aqua destillata	Ad 1000 ml

<b>Waschpuffer für Leberpräparation, pH 7,4</b>	
NaCl	120 mM
KCl	6,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,9 mM
Hepes	10 mM
Bovines Serum Albumin (BSA)	0,2%
Aqua destillata	Ad 1000 ml

## Lösungen für Zellkultur

<b>Trypsin/EDTA</b>	
Trypsin	5 g/l
EDTA- 4Na	2 g/l
NaCl	8,5 g/l
Versene (1:5000)	10 ml Trypsin/EDTA auf 100 ml Versene

<b>Azellularisierungslösung (Az-Lösung)</b>	
Natriumdesoxycholat	20 g
Aqua destillata	Ad 500 ml

## Lösungen für Immunhistologie

Bezeichnung	Ansatz
Fixierungsreagenz für die Kollagenmatrix (Bouin'sches Reagenz)	0,9 % Pikrinsäure 9 % Formaldehyd 5 % Essigsäure
Eosin	100 ml 1% Eosinlösung +1 Tropfen Eisessig

Lösung A, pH 7,5	
Tris HCL	65,3 g
Trizma base	11,8 g
Aqua destillata	Ad 500 ml

Lösung B (NaCl Stock)	
NaCl	146,1 g
Aqua destillata	Ad 500 ml

CaCl <sub>2</sub> - Lösung	
CaCl <sub>2</sub>	8,5 g
Aqua destillata	Ad 50 ml

Tris-Waschpuffer (2-3 Wochen bei 4°C haltbar)	
Lösung A	200 ml
Lösung B	60 ml
CaCl <sub>2</sub> - Lösung	4 ml
BSA (zum Blocken)	2 g
Aqua destillata	Ad 2 l

## 4.4 Antikörper

Antigen	Clone	Abstammung	Hersteller	Bestellnr.
Alpha 1 Sodium Potassium ATPase	M8-P1-A3	Monoclonal Mouse (IgG1)	Abcam/ Cambridge	Ab2872
Porcine CD 31	LCI-4	Mouse (IgG1)	AbD Serotec/ Düsseldorf	MCA1746G
Human Cytokeratin (5,6,18)	LP34	Monoclonal Mouse (IgG1)	Dako/ Hamburg	M0717
Anti Human Desmin		Polyclonal Rabbit	(Biomed) Biozol/ Eching	V2022
Human FLK-1	A-3	Monoclonal Mouse (IgG1)	Santa Cruz Biotechnology/ Heidelberg	Sc-6251

Human Hepatocytes	OCH1E 5	Monoclonal Mouse (IgG1)	Dako/ Hamburg	M7158
Human Ki 67	MIB-1	Monoclonal Mouse (IgG1)	Dako/ Hamburg	M7240
Human Macrophage/ L1Protein/ Calprotein	B314.1	Monoclonal Mouse (IgG1)	(Biomeda) Biozol/ Eching	V1146
Pan Cadherin	CH-19	Monoclonal Mouse (IgG1)	Abcam/ Cambridge	Ab6528
Human VEGF	VG1	Monoclonal Mouse (IgG1)	Dako/ Hamburg	M7273
ZO-1 Tight Junction-associated Polypeptide		Mouse (IgG1)	(Chemicon) Millipore GmbH/ Schwalbach	MAB1520

Isotypkontrolle	Hersteller	Bestellnummer
Negativ Control Mouse IgG1	Dako/Hamburg	X0931
Rabbit Immunglobulins	Dako/Hamburg	X0903

Sekundär-Antikörper	Spezifität	Hersteller	Bestellnummer
EnVision+-System	Anti mouse	Dako/Hamburg	K4007
EnVision+-System	Anti Mouse/Rabbit		K5007

#### 4.5 Test-Kits für Funktionsnachweise

Bezeichnung	Hersteller/ Firmensitz	Bestellnummer
CFDA SE Cell Tracer Kit Vybrant®	Invitrogen/ Karlsruhe	V12883
Harnstoff/ Ammoniak	Roche/ Mannheim	0542946
Life/Dead® Viability/ Cytotoxicity Kit	Invitrogen/ Karlsruhe	L3224
Pig Albumin ELISA	Bethyl Inc. /Texas	E100-110
Quantikine® Human VEGF	R&D Systems/ Wiesbaden Nordenstadt	DVE00

#### 4.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/ Firmensitz
Combitips für Multipette	Eppendorf/ Hamburg
Deckgläser	Assistent/ Sondheim



Easy-Load <sup>®</sup> Pipettenspitzen 100 µl, 200 µl und 1000 µl	Greiner/ Frickenhausen
Einmalhandschuhe, Safestein PFE	Kimberley-Clark/ Zaventem,B
Folienschlauch PE	NeoLab/ Heidelberg
Gewebekulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup>	Greiner/ Frickenhausen
Gewebekulturplatten, 6-well und 24-well	Greiner/ Frickenhausen
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc/ Wiesbaden
Lab Tek <sup>®</sup> Chamber-slides, 8-well	Nunc/ Wiesbaden
Objektträger mit Mattrand	Menzel/ Braunschweig
Pasteurpipetten	Hirschmann/ Eberstadt
Petrischalen: 60 mm, 94 mm, 145 mm	Greiner/ Frickenhausen
Probenzählgefäße	Sarstedt/ Nümbrecht
Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,2 ml	Eppendorf/ Hamburg
Skalpellklingen 11	Bayha/ Tuttlingen
Sterilfilter, Rotrand 0,2 µm	Schleicher&Schuell/ Dassel
Sterilfilter, Sterivex GS 0,22 µm	Millipore/ Eschborn
Vorfilter, Typ AP 25	Millipore/ Eschborn
Wilkinson Sword <sup>®</sup> Rasierklingen	Wilkinson/ Solingen
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner/ Frickenhausen

## 4.7 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller/
Analysenwaage Precisa 405M-200A	Sartorius/ Göttingen
Autoklav GE 66	Getinge/ Getinge, S
Autoklavispa FEDEGARI FVS/3	Fedegari/ Lugano, I
Begasungsbrutschrank BBD 6220	Heraeus/ Hanau
Binokular Modell-BMK	Euromex/ Arnheim, NL
Dewar-Transportgefäß 26B	Isotherm/ Karlsruhe
Diaphot	Nikon/ Düsseldorf
Dispenser Seripettor	Brand/ Wertheim

Einbettautomat Citadell 1000	Shandon/ Frankfurt a. M.
Einbettzubehör	Shandon/ Frankfurt a. M.
Eismaschine	Ziegra/ Isernhagen
Erlenmeyerkolben, Bechergläser	Schott-Glas/ Mainz
Färbetröge	Assistent/ Sondheim
Folienschweißgerät	Melag/ Berlin
Fotoapparate: F 301	Nikon/ Düsseldorf
Fotometer Spekol 1200	Analytikjena/ Jena
Fotoprinter P19	Mitsubishi/ Japan
FX 35 DX	Nikon/ Düsseldorf
Heißluftsterilisator ST-5050	Heraeus/ Hanau
Heizplatte Störk Tronic	Medax/ Kiel
Kühlschrank FKU 1800	Liebherr/ Biberach a. d. Riss
Laborfeinwaage Precisa 4000C	Sartorius/ Göttingen
Laborflaschen mit Gewinde Duran <sup>®</sup> , versch. Größen	Schott-Glas/ Mainz
Liquidblocker Super PapPen	Daido Sangyo/ Tokyo, J
Magnetrührer IKAMAG-RCT mit Heizung	IKA-Labortechnik/ Staufen i. Br.
Messpipetten für Gewebekultur, versch. Größen	Hirschmann/ Eberstadt
Messzylinder, versch. Größen	Brand/ Wertheim
Mikroskope: Mikrophot FXA	Nikon/ Düsseldorf
Mikrotiterplattenreader Spectra Thermo	Tecan/ Maennedorf, CH
Minishaker VF2	IKA-Labortechnik/ Staufen
Multifunktionsuhr, elektronisch	neoLab/ Heidelberg
Multipette Plus	Eppendorf/ Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld/ Lauda-Königshafen
Optiphot	Nikon/ Düsseldorf
Paraffin-Gießgerät Störk Tronic	Medax/ Kiel
Partikelzählgerät CASY-1	Schärfe System/ Reutlingen
pH-Meßgerät	Pharmacia Fine Chemicals/ Freiburg
Pipetboy acu	Integra Biosciences/ Fernwald

Plastik-Bechergläser, versch. Größen	Brand/ Wertheim
Präparierbesteck	Assistent/ Sondheim
Rotationsmikrotom RM 2145 für Paraffinschnitte	Leica/ Nussloch
Schlauchpumpe für Sterilfiltrationsanlage XX-80-202-30	Millipore/ Eschborn
Septophag 22	Hesse/ Emmerich
Sterilbank BSB 4A	Gelaire Flow Labora-tories/ Kirkham, UK
Sterilbox BSB 4 A	Gelaire Flow Labora-tories/ Kirkham, UK
Stickstoffbehälter für Langzeitkonser-vierung GT 330	L'air Liquide-D.M.C. / Champigny-sur Marne, F
Thermostat Ultra Temp	Julabo/ Seelbach
Tiefkühlschrank ULT 1786 (-80°C)	Revco/ Asheville, USA
Tischautoklav Typ 24	Melag/ Berlin
TMS	Nikon/ Düsseldorf
Universalwärmeschrank (U)	Memmert/ Schwabach
Vacuboy	Technomara AG/ Fernwald
Vakuumpumpe MZ 2C	Vacubrand/ Wertheim
Varipetten, versch. Größen	Eppendorf/ Hamburg
Wasseranlage, Super Q	Millipore/ Eschborn
Wasserbad für Paraffinschnitte	Medax/ Kiel
Wasserbad WTEvar 3185	Assistent/ Sondheim
Zentrifuge 5415C	Eppendorf/ Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf/ Hamburg

## 5. Methoden

### 5.1 Isolation der Zellen

#### 5.1.1 Isolation primärer Hepatozyten aus porcinen Leberbiopsien

Material:                   Transportbehälter mit Deckel  
                                  70% EtOH  
                                  1,5 l PBS- oder PBS+  
                                  1% Gentamycin  
                                  2 Aluschalen, steril  
                                  grobes Sieb 500 µm, groß, steril  
                                  Trypanblau  
                                  Neubauerkammer

**Perfusionslösungen:**     Grundpuffer pH 7,4:

154 mM	NaCl
5,6 mM	KCl
25 mM	NaHCO <sub>3</sub>
20 mM	HEPES
5 mM	Glucose

1L Puffer1 pH 7,4:

1L Grundpuffer + 40 mg/l Dexamethason + 1 mM EDTA

1L Puffer2 pH 7,4:

1L Grundpuffer + 1 mM EDTA

1L Kollagenase-Puffer pH 7,4:

1L Grundpuffer + 2 g Kollagenase + 5 mM CaCl<sub>2</sub>

1L Waschpuffer pH 7,4:

120 mM     NaCl

6,2 mM	KCl
0,9 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	Hepes
0,2 %	BSA

Aussaat-Medium: 500 ml Williams'E + 1% Gentamycin + 5% FCS (Fötale Kälberserum) +  
Hydrocortison (0,8 µg/ml)+ Glucagon (0,01µg/ml) +  
Insulin (0,25 µg/ml)

Am Tag der Präparation erfolgt die Desinfektion des Transportbehälters sowie dessen Deckels unter der Sterilwerkbank mit 70%igem Ethanol mit anschließender zweifacher Spülung mit PBS<sup>-</sup> (Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium).

Für den Transport der Leber vom Schlachthof wird der Behälter anschließend mit ca. 1L eiskaltem PBS<sup>+</sup> (PBS mit Calcium und Magnesium) + 1% Gentamycin befüllt. Der Zeitraum von der Entnahme der Leber bis zur Präparation sollte 1,5 h nicht überschreiten. Dabei gilt zudem, je älter die Tiere, desto geringer die Zellvitalität.

Der Leberlappen sollte rot und unverletzt sein, die Schnittfläche möglichst gering. Die Farbe der Leber darf nicht blauverfärbt (CO<sub>2</sub>) oder weißgefleckt (Parasiten) sein; die Galle darf nicht verletzt sein.

Zur Isolation einer ausreichenden Zellzahl an Hepatozyten, empfiehlt sich die Verwendung des links-medialen Leberlappens, dessen Vene zur Perfusion am geeignetsten ist.

Die Perfusion erfolgt in vier Schritten mit verschiedenen, auf 37°C vortemperierten Lösungen. Zunächst wird der Leberlappen mit Grundpuffer kurz gespült, der Schlauch entfernt und die Flüssigkeit aus dem Leberlappen entfernt (Thrombenentfernung). Dann wird der Leberlappen nacheinander mit den Puffern 1 und 2 für jeweils 8 - 12 min, mit dem Grundpuffer 3 min und mit dem Kollagenase-Puffer 10 - 15 min perfundiert. Die Zeiten lassen sich der Größe des Leberlappens anpassen, der Pufferfluss beträgt 100 ml/min.

Nach Abschluss der Perfusion erfolgt die Entfernung der Kapsel. Von dem blassen, angeschwollenen Leberlappen wird das weiche, bei einer sehr guten Perfusion zum Teil

flüssige Zellmaterial vorsichtig mit dem Skalpell herausgeschnitten bzw. mit dem Löffel herausgelöst und in eine sterile Petrischale mit gekühltem Waschpuffer überführt. Das Zellmaterial lässt sich bei Bedarf zerkleinern, die entstandene Zellsuspension mit einer Pipette aufnehmen und durch ein Sieb mit 500 µm Maschenweite pipettieren. Es folgt ein dreimaliges Waschen der filtrierten Zellsuspension mit Waschpuffer. Die Zentrifugation erfolgt jeweils bei 20 g für jeweils 5 min. Die Zellzahl wird nach dem Waschen mit dem Casy bestimmt, die Zellvitalität über eine Trypanblaufärbung. Die Vitalität sollte mindestens 85% sein.

Das Zellpellet lässt sich mit Aussaat-Medium definiert aufnehmen und mit einer Konzentration von ca. 10 - 20 x 10<sup>6</sup> Zellen/20 ml Medium pro 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche aussäen. Zum Anheften der Zellen werden die Flaschen im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach 4 h sind die meisten Hepatocyten adhärirt. Zur Entfernung toter Zellen und Zelldebris erfolgt ein kompletter Medienwechsel.

### **5.1.2 Isolation von Endothelzellen aus porcinen Leberbiopsien**

Bei der Zellisolation aus einer Leberbiopsie wird keine Reinkultur von Hepatozyten gewonnen, sondern eine Mischkultur aus allen Zellen der Leber: Hepatozyten, Sternzellen, Kupfferzellen und Endothelzellen. Cholangiozyten und Oval Zellen sind prozentual nur gering vorhanden. Erfolgt die Passage der Hepatozyten ein bis zwei Tage nach der Isolation ((5.2.2) bei 1-minütiger Inkubation mit PBS/EDTA vor Lösen der Zellen mit Trypsin/EDTA), bleiben mitisolierte Endothelzellen am Flaschenboden haften und lassen sich nun mit Endothelzell-spezifischem Medium weiterkultivieren und expandieren.

### **5.1.3 Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen (mvEC) aus humanen Präputienbiopsien**

Material:                    ECGM mv (Endothelial Cell Growth Medium mv)  
                                  FCS  
                                  PBS<sup>-</sup>  
                                  Dispase  
                                  Trypsin

Die Zellisolation mikrovaskulärer Endothelzellen erfolgt am Fraunhofer IGB nach einer Modifikation des Protokolls nach RICHARD ET AL., 1998.

Die Aufarbeitung der Präputien findet am gleichen bzw. spätestens einen Tag nach Erhalt der Biopsie statt. Zunächst ist das Gewebe vollständig von Fettgewebe zu befreien und mindestens dreimal mit PBS<sup>-</sup> zu spülen. Dann erfolgt die Zerkleinerung mittels Skalpell in max. 5 mm<sup>2</sup> große Stücke, welche wahlweise über Nacht bei 4°C im Kühlschrank oder für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Dispase-Lösung inkubiert werden. Anschließend lassen sich Dermis und Epidermis mit einer Pinzette voneinander trennen. Die Epidermis wird verworfen oder zur Isolation von Keratinozyten weiterverwendet. Die Dermis ist für 40 Minuten bei 37°C in Trypsin nochmals enzymatisch zu verdauen. Die Reaktion ist sofort nach Ende der Inkubationszeit mit 10% FCS abzustoppen. Die Stückchen sind zur Isolation der mvEC in eine Petrischale mit vorgewärmtem ECGM zu überführen.

Jedes Stückchen wird an der Dermisoberfläche mit einem Skalpell unter leichtem Druck ausgestrichen und danach verworfen. Die entstandene Zell-Medium-Suspension lässt sich durch Filtration über ein Zellsieb der Maschenweite 40 µm von Geweberückständen befreien. Es folgt eine Zentrifugation 200 g für 5 Minuten mit anschließender Resuspendierung in ECGM und Aussaat der Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche.

Zur Vermeidung einer Verunreinigung mit nicht erwünschten Zelltypen ist der erste Mediumwechsel bereits nach 3 Stunden erforderlich.

#### **5.1.4 Isolation von mesenchymalen Vorläuferzellen (MSC) aus porcinem Knochenmarksaspirat**

Material: EBM2 (Endothelzell Basalmedium 2)  
Bicoll  
PBS<sup>+</sup>

##### Aspiratentnahme

Zu Beginn der Entnahme erfolgen die Öffnung des Bauchraums des Schweins und die Präparation des Beckenkamms. Dann wird die Außenschicht des Knochens (Kortikalis) mit einer 50-ml-Perfusorspritze perforiert und die Nadel mit einem Stanzzyylinder entfernt. Durch den Stichkanal lässt sich eine neue Perfusorspritzennadel mit einer 20-ml-Spritze einführen und 5 – 10 ml Knochenmark unter langsamem Zug aspirieren.

## Aufreinigung der Probe

Das Knochenmarksaspirat wird 1:1 mit Medium oder PBS<sup>+</sup> verdünnt und vorsichtig über den Bicolllgradienten geschichtet (20 ml verdünntes Aspirat auf 15 ml Bicolll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen) und bei 800 g für 20 min, RT, ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand über der Phase, die die rötlichen MSC enthält, ist zu verwerfen und die Phase mit den MSC in ein Zentrifugenröhrchen zu überführen, mit 35 ml Medium oder PBS<sup>+</sup> zu mischen und zum Auswaschen der Bicolllösung bei 800 g für 10 min, RT zu zentrifugieren. Dieser Waschschrift wiederholt sich und das erhaltene Pellet lässt sich dann mit 10 ml Medium resuspendieren und in eine 75er-Zellkulturflasche überführen. Bei der angestrebten EC-Differenzierung sollte die Flasche mit Kollagen beschichtet sein, um die Adhäsion der Zellen zu verbessern.

Nach 3 – 4-tägiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> sind die restlichen Erythrozyten über einen einmaligen Spülschrift mit 10 ml PBS<sup>+</sup> zu entfernen. Weitere Medienwechsel erfolgen zweimal wöchentlich.

## 5.2 2D Kultivierung der Zellen

### 5.2.1 Zellkultur

Alle Zellkultur-Arbeiten sind steril unter der Laminar-Flow-Werkbank vorzunehmen. Die Zellkulturansätze werden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zweimal pro Woche ist eine mikroskopische Kontrolle, in deren Rahmen das Kultivierungsmedium gewechselt wird, durchzuführen. Wenn die Zellkulturflasche zu 80 - 90% zugewachsen ist und die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet haben, findet eine Passage statt.

### 5.2.2 Passage

Material:                    PBS<sup>+</sup>  
                                  PBS<sup>-</sup>/EDTA  
                                  Zellkulturmedium  
                                  Trypsin/EDTA  
                                  FCS

Zu Beginn der Passage werden Zellen aus der Zellkulturflasche je einmal mit 5 - 15 ml PBS<sup>+</sup> und einmal mit 5 - 15 ml PBS<sup>-</sup>/EDTA gespült. Je nach Zellart, bei EC 10 min bei



37°C, bei Hepatozyten ca.1 min bei RT mit anschließendem Klopfen der Flasche zur Ablösung von Debris, wirkt das PBS/EDTA unterschiedlich lange ein. Danach folgt eine 1 - 3 min Inkubation mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA bei 37°C zur Ablösung der Zellen von ihrem Untergrund. Diese Reaktion wird mit dem doppelten Volumen an PBS<sup>+</sup> und 10% FCS abgestoppt und die erhaltene Zellsuspension bei 1000 U/min für 7 min, RT zentrifugiert. Das Pellet lässt sich in Medium resuspendieren und entweder in der gewünschten Menge aussäen oder kryokonservieren (5.2.4).

### 5.2.3 Zählung und Vitalitätsbestimmung

Material: Casyton®  
Trypanblau-Lösung:  
5 ml Trypanblau  
45 ml PBS  
Neubauerkammer

Aus der Zellsuspension werden 100 µl entnommen und mit 10 ml Casyton® (isotone Elektrolytlösung) in einem Casy-Zählröhrchen verdünnt.

Die Zellzählung erfolgt elektronisch nach dem Widerstandsprinzip mit dem Zellzählgerät CASY 1. Dies geschieht durch die Einspeisung der Zellsuspension über eine Messkapillare in das System. Sobald eine Zelle in die Messkapillare eindringt, entsteht ein elektrischer Puls über die Widerstandsänderung. Die entstandenen Impulse sind nach Größe differenziert. Dabei ist die jeweilige Pulsfläche zum Zellvolumen proportional. Die angegebene Größenverteilung bietet wichtige Informationen über den Zustand der gemessenen Zellen, da sowohl zwischen Zelltrümmern als auch zwischen toten und vitalen Zellen unterschieden werden kann. Gemessen werden jeweils 3 x 400 µl der Zellsuspension. Daraus ist der Mittelwert zu berechnen. Die entsprechende Verdünnung ist jeweils in das Ergebnis mit einzubeziehen.

Zur Vitalitätsbestimmung erfolgt die Entnahme von 10 µl aus der Zellsuspension und die Verdünnung mit 90 µl Trypanblau-Lösung in einem Eppendorfhütchen. Trypanblau kann in die Zellmembran toter Zellen eindringen, wodurch tote Zellen blau erscheinen. 10 µl Zellsuspension werden unter das Deckgläschen der Neubauerkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop lassen sich anschließend 4 Großquadrate der Zählkammer auszählen.

Von der Anzahl der Gesamtzellzahl erfolgt die Subtraktion der toten Zellen, um die Anzahl der lebenden Zellen zu erhalten. Der Prozentsatz der lebenden Zellen ergibt sich durch die Multiplikation der Lebendzellzahl mit 100 und anschließender Division des Ergebnisses durch die Gesamtzellzahl.

Berechnung der Gesamtzellzahl pro Milliliter in der Neubauerkammer:

Die Kantenlänge eines Großquadrates beträgt 1 mm, der Abstand zwischen Neubauerkammer und Deckgläschen ist 0,1 mm.

Volumen:  $0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$

$1 \text{ dm}^3 = 1 \text{ L}$

$1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$

$1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l}$

Für 1 ml Zellsuspension gilt:  $1 \text{ ml} / 0,1 \mu\text{l} = 10.000$

Verdünnungsfaktor: 1 zu 10

Anzahl der ausgezählten Quadrate: 4

Zellzahl für 1 ml =  $(\text{Zellzahl}/4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$

## 5.2.4 Langzeitlagerung

Material: Zellkulturmedium

DMSO

FCS

Zellen, die bei der Durchführung von Experimenten nicht vollständig verbraucht werden, können durch Einfrieren über längere Zeiträume konserviert und dann bei Bedarf wieder in Kultur genommen werden. Bei Hepatozyten ist durch Kryokonservierung mit starkem Funktionsverlust zu rechnen.

Zum Einfrieren von Zellen erfolgt zunächst eine Passage, wie unter 5.2.2 beschrieben. Anschließend werden 1 ml Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) in Kultivierungsmedium mit 10% DMSO in einem Kryoröhrchen bei  $-20^\circ\text{C}$  so lange inkubiert (maximal 1 Stunde), bis die Flüssigkeit vollständig durchgefroren ist. Damit keine Kristallisation auftritt, ist der Einfrierprozess durch Anklopfen des Röhrchens auf eine feste Unterlage zu beschleunigen. Nach dem Durchfrieren erfolgt die Umlagerung der Zellen in den

Tiefgefrierschrank (-80°C). Zur Langzeitlagerung sind die Zellen maximal 2 Wochen später in den Stickstofftank zu überführen.

Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch ist, sollte es nur gekühlt verwendet werden. Die Zellen sollten nach Kontakt ebenfalls sofort auf Eis gestellt werden. Bei einem langsamen Einfrierprozess verhindert DMSO die Entstehung von Eiskristallen, die zum Zelltod führen.

Das Auftauen der Zellen erfolgt bei 37°C im Wasserbad, woran sich zügig ein Neutralisieren der DMSO-Toxizität durch Verdünnung mit PBS<sup>+</sup> und 10% FCS anschließt. Nachfolgend wird die Suspension bei 1000 U/min für 7 min, RT, zentrifugiert sowie das Pellet mit Kulturmedium resuspendiert und ausgesät.

### 5.2.5 Markierung der Zellen

Material:                    PBS+

                                  PBS-/EDTA

                                  Trypsin/EDTA

                                  CFDA-SE Tracer Kit:

                                  500 µg Komponente A : 5 (6)-CFDA, SE

                                  90 µl Komponente B: Dimethylsulfoxid

                                  CFSE-Lösung:

                                  10 ml PBS-/EDTA

                                  10 µl CFDA-SE Tracer Kit

                                  PBSE/BSA:

                                  10 ml PBS-/EDTA

                                  0,01 g BSA (0,1%)

                                  FCS

CFDA-SE (Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) ist ein nicht-fluoreszenter Farbstoff, der passiv ins Zytoplasma diffundiert und in der Zelle nach der Spaltung durch intrazelluläre Esterasen grün fluoresziert. Er wird bei der Teilung auf die Tochterzellen übertragen, was jedoch zu einem geringen Verlust der Fluoreszenzintensität führt. Die Färbung ist lange anhaltend und nicht zytotoxisch, was sie für Untersuchungen an Langzeitkulturen qualifiziert.

Zur Markierung erfolgt zunächst, wie in 5.2.2 beschrieben, die Passage der Zellen. Nach der Zentrifugation wird das Pellet auf 37°C erwärmt, in 10 ml CFSE-Lösung resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Das Stoppen der Inkubation erfolgt durch Zugabe von 250 µl FCS. Dann wird bei 600 U/min für 15 min, RT, zentrifugiert, das Pellet zweimal in 5 ml vorgewärmter PBSE/BSA aufgenommen, beim ersten Mal 10 min und beim zweiten Mal 5 - 10 min bei 37°C inkubiert und danach wieder bei 600 U/min für 15 min, RT, zentrifugiert. Das erhaltene Pellet lässt sich im benötigten Volumen an Zellkulturmedium resuspendieren und weiter zur Besiedlung von Matrices nutzen. Durch die CFDA-SE-Fluoreszenz-Markierung kann die Besiedlungsdichte mikroskopisch kontrolliert werden.

Bei sehr empfindlichen Zellen kann die Konzentration der CFDA-SE Reagenz runtergesetzt und die Waschschrirte verkürzt werden.

## **5.3 Herstellung der biologischen vaskularisierten Matrix (BioVaSc)**

### **5.3.1 Explantation**

Zur Explantation der BioVaSc lassen sich deutsche Landrasseschweine bis 30kg verwenden. Die Tiere werden heparinisiert und unmittelbar vor der Explantation durch eine Überdosis Narkotika getötet. Zu Beginn erfolgen die Öffnung des Bauchraumes und die Freilegung des Darmabschnitts im Anschluss des Magens (Bereich Duodenum, Jejunum), um gut zu präparierende Arterien-Venenpaare zu finden. Es empfiehlt sich dabei assoziiertes Lymphknotengewebe zu entfernen.

Arterien und Venen werden nun mit einer Braunüle versehen und das versorgte Darmsegment mit 0,9% NaCl-Lösung gespült. Anschließend werden Darmlumen und weitere abführende GefäÙe so abgebunden, dass ein 10 - 15 cm langes Stück mit erhaltenem Gefäßsystem, arteriellem Zufluss und venösem Rückfluss verbleibt, die sogenannte BioVaSc.

Der Transport der BioVaSc erfolgt in einem verschlossenen Plastikbehälter in gekühltem PBS<sup>-</sup> mit 1% Gentamycin auf Eis.

Die Azellularisierung sollte am Tag der OP erfolgen, spätestens aber einen Tag danach, wenn eine ausreichende Spülung der BioVaSc im Anschluss an die Explantation stattgefunden hat.

### 5.3.2 Azellularisierung der BioVaSc im Bioreaktor

Material: PBS<sup>-</sup>  
AZ-Lösung: 20 g Natriumdesoxycholat  
mit Aqua bidest auf 500 ml auffüllen  
Gentamycin

Zu Beginn der Azellularisierung erfolgt die Spülung der BioVaSc mit PBS<sup>-</sup> über die Arterie und das Matrixlumen, um Blut- und Kotreste zu entfernen.

Danach wird die BioVaSc in einen Bioreaktor überführt und dort langsam mit gekühlter AZ-Lösung 1,8 - 2,8 ml/min 60 - 90min perfundiert bis das Gewebe anschwillt und beginnt, blasser zu werden (Abb. 6).

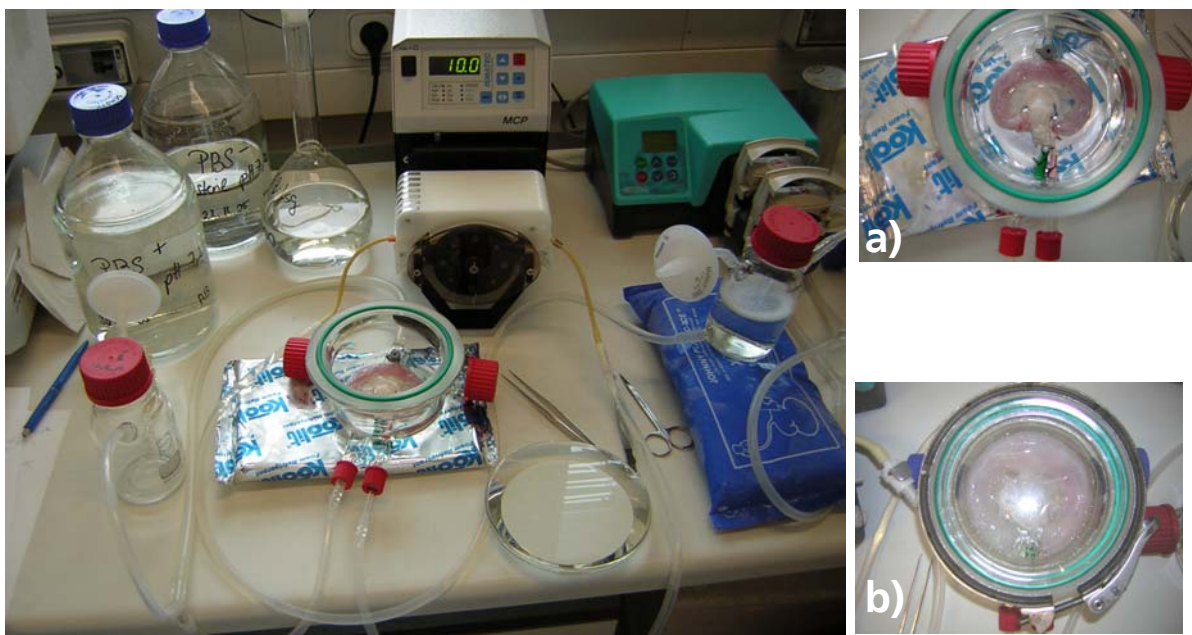


Abb. 5 Bioreaktoraufbau zur Azellularisierung mit BioVaSc a) am Anfang der Perfusion mit AZ-Lösung und b) nach der Perfusion

Das Natriumdesoxycholat in der AZ-Lösung führt dabei zur Zellyse im Gewebe. Zelltrümmer und verbliebene AZ-Lösung lassen sich mit PBS<sup>-</sup> bei 2,8 – 5 ml/min arterieller Perfusion über 1 - 2 Stunden im Bioreaktor auswaschen. Das verbleibende Gewebe sollte nun annähernd weiß und nicht mehr fleischfarben sein.

Während der Azellularisierung sollte das Darmlumen mehrfach mittels Pipette mit AZ-Lösung und später mit PBS<sup>-</sup> gespült werden. Es ist dabei darauf zu achten, dass zu keinem Zeitpunkt Luft durch das Gefäßsystem gepumpt wird.

Für weitere Spülschritte erfolgt die Überführung der BioVaSc in eine Schottflasche mit PBS<sup>-</sup> + 1% Gentamycin, welches 4 – 5 ml in 1 - 12h Intervallen gewechselt werden sollte. Die besten Spülergebnisse lassen sich auf einem Schwenker bei 4°C erzielen.

Die Sterilisation der BioVaSc erfolgt über Nacht durch Bestrahlung bei 25 kgray in gekühltem PBS<sup>-</sup> + 1% Gentamycin. Bis zur Verwendung lässt sich die Matrix bei 4°C lagern. Vor Gebrauch/ Besiedlung mit Zellen sollte sie am besten über Nacht im später verwendeten Medium inkubiert werden.

## 5.4 Besiedlung der BioVaSc- 3D Zellkultur

### 5.4.1 Besiedlung des Gefäßsystems mit Endothelzellen oder Vorläuferzellen aus dem Knochenmark

Material:                    PBS<sup>-</sup>  
                                  PBS<sup>-</sup>/EDTA  
                                  Trypsin/EDTA  
                                  CFDA-SE-Lösung  
                                  PBS<sup>-</sup>/EDTA + 0,1%BSA  
                                  FCS  
                                  EBM2

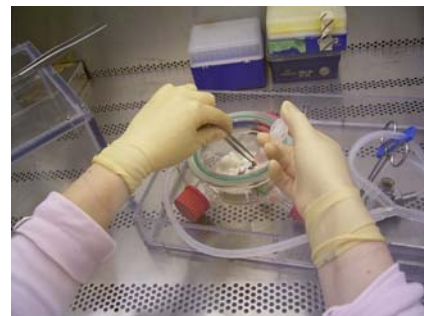


Abb. 6 Zellaufgabe mittels Spritze in die Arterie

Die Endothelzellen oder Vorläuferzellen werden, wie in 5.2.2 beschrieben, passagiert und mit CFDA SE fluoreszenzmarkiert (5.2.5). Nach der Markierung findet die Zählung der Zellen und eine Vitalitätsbestimmung (5.2.3) statt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1000 rpm, 7 min, RT, und die Resuspendierung des Pellets in der gewünschten Menge EBM2 (1,5 - 3,5x 10<sup>6</sup> Zellen/ml).

Die BioVaSc wird in einen Bioreaktor eingespannt und das Reaktorsystem mit Medium befüllt. Die Besiedlung des Gefäßsystems erfolgt über eine ein- oder mehrstufige Aufgabe der resuspendierten EC oder Vorläuferzellen mittels einer 10 ml Spritze (1x 3

ml Zellsuspension oder 2 - 3 mal 2 ml Zellsuspension mit 45 minütiger Pause jeweils) über den arteriellen Zufluss (Abb.7). Zur Adhäsion der Zellen wird das Gewebe 45 - 60 min bei minimalem Medienfluss (1,26 ml/min) perfundiert. Danach erfolgt eine computergesteuerte Perfusion unter physiologischen Bedingungen bei einem Druck von 20 zu 60 mmHg (Tag 1) bzw. 80 zu 120 mmHg (restlicher Kulturzeitraum) und einer Frequenz von 1Hz im Brutwagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 7 - 14 Tagen folgt die Besiedlung des Lumens mit Hepatozyten.

#### **5.4.2 Besiedlung des Matrixlumens mit Hepatozyten**

Material:                    PBS-  
                                  PBS/EDTA  
                                  Trypsin/EDTA  
                                  Gelgießlösung  
                                  Kollagenlösung (2 mg/ml)  
                                  Leberzellmedium

Das Bioreaktorsystem mit BioVaSc wird aus dem Brutwagen unter die Sterilwerkbank überführt, das Endothelzellmedium komplett entfernt und durch Leberzellmedium ersetzt sowie das Lumen der Matrix an einer Seite mit einer Arterienklemme verschlossen.

Die Besiedlung des Lumens erfolgt über Aufgabe von 15 - 100x10<sup>6</sup> Zellen einer Leberpräparation, die einen Tag nach ihrer Isolation passagiert (5.2.2) und in 2,5 ml eisgekühlter Gelgießlösung aufgenommen werden. Diese Zellsuspension lässt sich mit der Pipette vorsichtig 1:1 mit eisgekühlter Kollagenlösung vermischen und mithilfe einer Pinzette in das offene Ende des Matrixlumen pipettieren, welches danach ebenfalls mit einer Arterienklemme verschlossen wird.

Es ist darauf zu achten, die Zellen während Passage und Besiedlung nicht zu vielen Scherkräften auszusetzen.

Nach ca. 15 min Adhäsionszeit erfolgt die computergesteuerte Perfusion des Gefäßsystems im Brutwagen unter physiologischen Bedingungen bei einem Druck von 80 zu 120 mmHg und einer Frequenz von 1Hz bis zum Versuchsende bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>.

Während des Kulturzeitraums werden kontinuierlich Mediumproben aus dem Reaktor entnommen und bei -20°C gelagert, um einen Zerfall der enthaltenen Moleküle zu vermeiden.

## **5.5 Zellcharakterisierung über immunhistologische Nachweismethoden**

### **5.5.1 Herstellung von Cytospots**

Material:                PBS-  
                              Objektträger

Zur Herstellung von Cytospots werden die Zellen zuerst, wie in 5.2.2 beschrieben, passagiert und dann gezählt. Dann erfolgt die Herstellung einer Verdünnung mit PBS oder Medium auf eine Konzentration von ca. 100.000 Zellen/ml. Je 200 µl davon werden in eine Shandon Cytospotapparatur mit Objektträger (OT), Cytofunnel und Filterkarte eingefüllt und im Cytospin bei 600 U/min für 8 min zentrifugiert. Die fertigen Spots lassen sich nach 30 min Lufttrocknung bei -20°C lagern.

### **5.5.2 Herstellung von Kryoschnitten**

Material:                Tissue Tek®  
                              beschichtete Objektträger

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wird die in Tissue Tek® eingefrorene Gewebeprobe in das Gefriermikrotom überführt und dort bei -20°C Kammertemperatur und -17°C Objektstischhaltertemperatur 15 - 60 min temperiert, abhängig davon, ob die Gewebeprobe bei -20°C oder -80°C gelagert wurden. Anschließend erfolgt die Fixierung der Gewebeprobe auf dem Objektstisch in der gewünschten Position mit dem bei Raumtemperatur flüssigen Einbettungsmittel (Tissue Tek®), welches in der kalten Kammer aushärtet. Zur Herstellung einer glatten Schnittoberfläche werden zunächst einige Trimschnitte von 50 µm Dicke angefertigt, anschließend 6 - 10 µm Feinschnitte produziert und auf beschichtete Objektträger übertragen. Diese sollten 0,5 bis maximal 20 h lufttrocknen und bis zur späteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.



### 5.5.3 Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

#### Standard

Material:                Bouin's Lösung  
                              99,8% Ethanol  
                              100% Isopropanol  
                              100% Xylol  
                              Paraffin

#### Fixierung

Für die Paraffineinbettung müssen Gewebe zunächst in formaldehydhaltiger Bouin's Lösung fixiert werden. Die Fixierung führt zu einer Stabilisierung der strukturellen Form von Zellen und Matrix durch Vernetzung der Eiweißmoleküle.

Die Präparate werden für 10 - 60 min (je nach Präparatdicke und -dichte) mit Bouin's Lösung vollständig bedeckt und anschließend mittels Pinzette und Spatel in eine Einbettkassette mit eingelegtem Filterpapier überführt. Das Entfernen der überschüssigen Fixierlösung erfolgt während eines zweistündigen Waschschrattes in Leitungswasser.

#### Einbettung

Damit das Gewebe bei späteren Schneidvorgängen nicht deformiert wird, muss es durch eine Paraffineinbettung gefestigt werden. Dies erfolgt über eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und eine anschließende Überführung in Paraffin.

Dazu wird ein spezieller Einbettautomat verwendet, in dem die Einbettkassetten nacheinander in verschiedenen Lösungen in folgenden Schritten in Paraffin eingebettet werden:

2x 1h Leitungswasser

1h 70% Ethanol

1h 90% Ethanol

1h 96% Ethanol

2x 1h Isopropanol

1h Isopropanol/ Xylol 1:1,

2x 1h Xylol,

2x 3h Flüssig-Paraffin.

Nach Ablauf des Programms lassen sich die Einbettkassetten aus dem Automaten entnehmen und in 63°C vorgewärmtes Paraffin überführen. Die Kassetten werden geöffnet und das Präparat auf einer Heizplatte mit einem Skalpell zugeschnitten. Die Ausrichtung der Schnittkante erfolgt durch Zurechtlegen des Präparates in einer mit Paraffin befüllten Metallschale. Anschließend lassen sich die Blöcke nach Aushärtung bei 4°C im Kühlschrank lagern.

#### **5.5.4 Entparaffinierung**

Material:                Roticlear  
                              99,8% Ethanol  
                              Isopropanol

Vor jeder Färbung müssen Paraffinschnitte entparaffiniert werden, um Bindungsstellen für Farbstoffe und Antikörper wieder freizulegen und unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Dazu lässt sich das Paraffin zuerst im Trockenschrank bei 63°C über 15 min anschmelzen und dann in einer absteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur in die wässrige Phase überführen:

15min Roticlear I

15min Roticlear II

2min Isopropanol

2min 96% Ethanol I

2min 96% Ethanol II

2min 70% Ethanol

2min 50% Ethanol

Anschließend erfolgt ein Schwenken in VE (voll entionisiert) Wasser, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar sind.

#### **5.5.5 Hämatoxilin-Eosin-Färbung**

Kryoschnitte und Paraffin

Material:                Hämatoxilin  
                              Eosinlösung:  
                                  100 ml 1% Eosinlösung  
                                  1 Tropfen Eisessig  
                              100% Aceton

100% Ethanol  
Isopropanol  
Isomount®

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die dazu dient die Besiedlung von Geweben zu überprüfen. Hämatoxilin färbt im alkalischen Bereich basophile, anionische Strukturen wie z.B. DNA im Zellkern blau, während Eosin als saurer Farbstoff kationische Verbindungen wie Proteine im Cytoplasma und kollagene Fasern rot färbt.

Paraffinschnitte müssen vor der HE- Färbung entsprechend 5.5.4 entparaffiniert werden. Kryoschnitte werden 8 min in 100% Aceton bei -20°C fixiert und luftgetrocknet.

Die Färbung erfolgt durch Eintauchen der Objektträger in Glasküvetten in folgende Lösungen bei RT:

8 Minuten Hämatoxilin (frisch filtriert)

Spülen unter fließendem VE- Wasser bis die Lösung klar erscheint

2x Schwenken in 0,25% HCl / 50 vol. % Ethanol zur Differenzierung

Mehrfach Schwenken in frischem VE-Wasser

5 min Bläuen der Schnitte mit Leitungswasser (pH- Umschlag in den alkalischen Bereich))

1 min frisch angesäuerte Eosin- Lösung

Spülen der Schnitte unter fließendem VE-Wasser, bis die Lösung klar erscheint

1 min 70 % Ethanol

Zum Eindeckeln der Schnitte mit Isomount® (einem Kunstharz) für die Langzeitlagerung erfolgt im Anschluss eine Entwässerung:

2 min 96% Ethanol

2 min 98% Ethanol,

6 min Isopropanol I

6 min Isopropanol II

Eindecken der OT mit Isomount®

ca. 200 µl pro OT

### **5.5.6 Antikörperfärbung**

Material:                      Lösung A:

65,3 g Tris HCL

11,8 g Tris Base

pH 7,5 einstellen, mit Aqua bidest auf 500 ml auffüllen

Lösung B:

146,1 g NaCl

mit Aqua bidest auf 500 ml auffüllen

Calciumchloridlösung:

7,35 g  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$

mit Aqua bidest auf 50 ml auffüllen

Waschpuffer:

200 ml Lösung A

60 ml Lösung B

4 ml Calciumchloridlösung

2 g BSA

mit Aqua bidest auf 2 l auffüllen

Peroxidase Blocking Solution

Retrieval Solution pH 6,0 (Citratpuffer)

Retrieval Solution pH 9,0

Primärantikörper

Isotypkontrolle

Sekundärantikörper

Multilink-Verdünnung

Pronase (1 mg/ml)

Antibody Diluent

Streptavidinkomplex (+ Verdünnungsreagenz)

Chromogensubstrat (DAB oder AEC)

Chromogenpuffer

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)

Hämalaun

Ethanol

Isopropanol

Isomount® Eindeckmedium

## Aquatex

### Prinzip:

Immunohistochemische Antikörperfärbungen werden durchgeführt, um auf Präparaten spezifische Zellbestandteile sichtbar zu machen und daraus auf Zelltyp und Differenzierungszustand zu schließen bzw. Zell-Zellverbindungen zu untersuchen.

Vor der Färbung werden die Zellpräparate (Paraffinschnitte, Kryoschnitte, Cytospots oder Chamberslides) fixiert und gegebenenfalls die Epitope freigelegt.

Dann erfolgt die Inkubation der Präparate mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist. An diesen Primärantikörper bindet im zweiten Schritt ein Sekundärantikörper, der gegen alle Proteine aus dem Tier, in dem der Primärantikörper produziert wurde, gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist entweder fluoreszenzgekoppelt, mit Biotin gekoppelt (Abb. 8) oder beim EnVision System ein Dextranmolekül mit vielen Sekundärantikörper- und HRP-Molekülen (Abb. 9). Fluoreszenzfärbungen lassen sich direkt mikroskopisch oder nach anschließender Kernfärbung mit DAPI auswerten; es ist jedoch nur ein kleines Signal detektierbar. Biotinylierte Antikörper werden zur Signalverstärkung in einem weiteren Schritt mit einem Streptavidinkomplex+HRP gekoppelt (Abb. 8). Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung erfolgt über Zugabe eines Chromogens, das von HRP zu einem Farbstoff umgewandelt wird. Nach einer angeschlossenen Kernfärbung mit Hämalaun stellen sich unter dem Mikroskop die Zellkerne blau dar und die Bereiche, in denen eine Antikörperbindung stattgefunden hat, braun oder rot (je nach Chromogen).

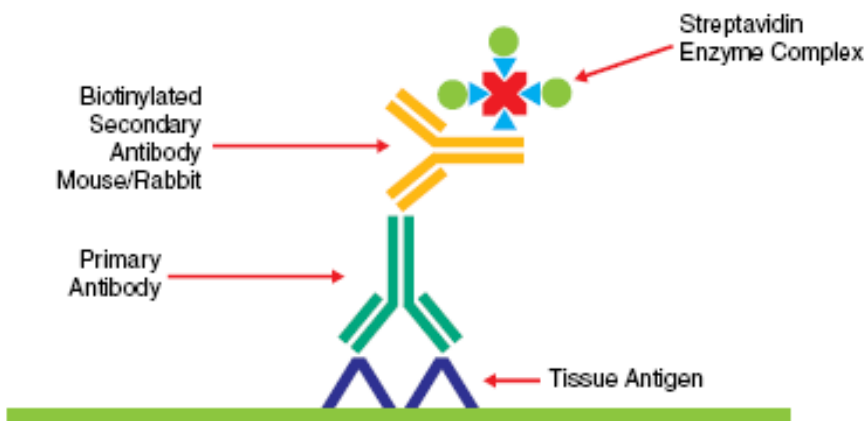


Abb. 7 Streptavidin- Biotin-Methode [Immunohistochemical Staining Methods Educational Guide, 4th Edition, No. 08002; 49-5,Dako GmbH]

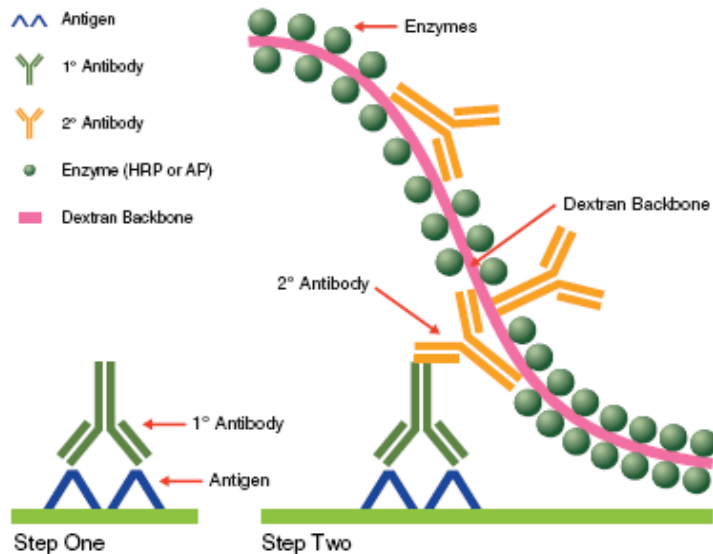


Abb. 8 EnVision System [Immunohistochemical Staining Methods Educational Guide, 4th Edition, No. 08002; 49-5, Dako GmbH]

Durchführung:

Präparatvorbereitung:

Bei Paraffinschnitten erfolgt vor der Färbeprozedur die Entparaffinierung (5.5.4) und anschließend eine Epitopdemaskierung. Dazu werden die Schnitte je nach Antikörper zur Aufbrechung der bei der Fixierung entstandenen Proteinquervernetzungen entweder im Dampfgarer 45 min in Retrieval Solution pH 6, 9 gart oder enzymatisch behandelt. Zur enzymatischen Epitopdemaskierung sind die Schnitte mit Pap Pen einzukreisen, 12 min mit Pronase bei RT zu inkubieren und in Waschpuffer zu überführen.

Bei Kryoschnitten oder Cytospots und Chamberslides ist keine Epitopdemaskierung notwendig; sie lassen sich bei -20°C lagern und vor Benutzung mit kaltem Aceton 8 min fixieren, trocknen und in Waschpuffer überführen.

Antikörperfärbung:

Vor der Antikörperfärbung erfolgt die Blockierung der endogenen Peroxidasen, die zu Hintergrundfärbungen führen können. Dazu werden die Präparate  $5 \pm 1$  min mit Peroxidase Blocking Solution inkubiert und anschließend in Waschpuffer 2 min gespült.

Währenddessen kann die Primärantikörperverdünnung hergestellt werden, in der die Präparate 1 Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Zur Überprüfung der Färbung sind eine Isotypkontrolle und eine Positivkontrolle mitzuführen. Als Isotypkontrolle dienen Antikörper aus der gleichen Isotyp-Klasse und dem gleichen Tier

wie der Primärantikörper, die in der gleicher Konzentration aufgegeben werden. Als Positivkontrolle lässt sich natives Gewebe verwenden, an dem der AK in jedem Fall binden müsste. Das weitere Vorgehen ist abhängig von dem gewählten Sekundär-AK System und findet in folgenden Schritten statt:

#### EnVision Methode

- 3x 2 min mit Waschpuffer spülen
- Sekundärantikörper für 30 min Inkubationszeit bei RT aufgeben
- 3x 2min mit Waschpuffer spülen
- Chromogensubstrat (DAB) ansetzen:
  - o 20µl Chromogen
  - o auf 1ml Puffer

#### Streptavidin- Biotin-Methode

- 3x 2 min mit Waschpuffer spülen
- Sekundär-AK (Biogenics) 1:20 mit Multilink-Verdünnung ansetzen, für 30 min bei RT inkubieren
- 3x 2min mit Waschpuffer spülen
- Streptavidin-HRP-Reagenz 1:20 mit zugehöriger Verdünnungslösung ansetzen, 30 min bei RT inkubieren
- 3x 2min mit Waschpuffer spülen
- Chromogensubstrat (AEC) ansetzen:
  - o 0,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate
  - o 2 ml Aqua bidest
  - o 1 Tropfen AEC Chromogen

- Chromogensubstrat 7 min inkubieren (Abzug!)

Danach wird 3x mit Aqua dest. gespült und eine Hämalaun-Gegenfärbung durchgeführt: 20 sec Färben in frisch filtriertem Hämalaun, 2 - 5 min Bläuen unter fließendem Leitungswasser, Spülen in Aqua dest. und Differenzierung sowie Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (kurz 70%, 2 min 96%, 2 min 100%, 2x 5 min Isopropanol). Abschließend erfolgt das Eindeckeln der Präparate mit Isomount®. Da das AEC von Biogenics ein alkohollösliches Chromogen ist, wird nach der Hämalaun-Färbung direkt mit Aquatex eingedeckelt. Die fertigen Präparate trocknen über Nacht unter dem Abzug und können am nächsten Tag mikroskopisch ausgewertet werden.

### **5.5.7 Lebend-Tot-Färbung**

Material: LIVE/DEAD Viability/CytotoxicityKit (Molecular Probes):

Calcein AM  
Ethidium homodimer-1  
PBS<sup>+</sup>  
FCS  
Zellkulturmedium

Die Lebend-Tot-Färbung ist eine zweifarbige auf Fluoreszenz basierende Methode, um die Vitalität von Zellen unter anderem in Geweben nachzuprüfen.

Testprinzip:

Der Kit enthält zwei Substanzen, Calcein AM und Ethidium homodimer-1, die zur Detektion zweier verschiedener Zellvitalitätsparameter dienen: Intrazelluläre Esterase-Aktivität und Membranintegrität. Calcein AM ist fluorogenes Esterasesubstrat, das intrazellular zu einem grün fluoreszierenden Produkt hydrolysiert wird und somit ein Indikator für lebende Zellen ist. Ethidium homodimer-1 ist ein hochaffiner rotfluoreszierender Nukleinsäure-Farbstoff, der nur durch die beschädigten Membranen toter Zellen passieren kann. Somit stellen sich nach der Färbung lebende Zellen grün und tote Zellen rot dar.

Durchführung:

Für die Färbelösung erfolgt die Mischung von 20 µl Ethidium homodimer-1 (4 µmol) und 5 µl Calcein AM (2 µmol) mit 10 ml Zellkulturmedium + 10% FCS. Die Lösung ist lichtempfindlich und muss am selben Tag verbraucht werden.

Die zu untersuchenden Gewebeprobe werden in ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke zerkleinert, um eine Diffusion des Farbstoffes zu ermöglichen, und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Proben sind nach Zugabe von 1000 µl Färbelösung 30 min bei 37°C zu inkubieren. Danach folgt dreimaliges Waschen über je 10 min mit 1,5 - 2 ml PBS<sup>+</sup>, um nicht-gebundene Farbstoffreste zu entfernen.

Dünne, lockere Gewebe lassen sich direkt nach der Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop anschauen. Von dickerem Gewebe werden Kryopräparate angefertigt und Schnitte, wie unter 5.5.2 beschrieben, hergestellt und selbige mikroskopiert. Die Fluoreszenz hält sich max. einen Tag, deshalb müssen die Schnitte dunkel lagern.



## 5.6 Zellcharakterisierung über Funktionstests an Medienüberständen

### 5.6.1 Laktat-Dehydrogenase-Test (LDH)

Material: Cytotoxicity Detection Test (Boehringer Mannheim):  
R1 Diaphorase (Fläschcheninhalt mit 1 ml Aqua bidest lösen)  
R2 INT Dye Solution  
Laktatdehydrogenase 3000U (Roche)  
Williams Medium E

Das Absterben von Zellen in einer Kultur kann über eine Quantifizierung der Membranschädigung bestimmt werden. Bei diesem Test wird die Konzentration des zytosolischen Enzyms LDH im Medienüberstand gemessen. LDH ist ein ubiquitäres Enzym, welches bei Membranschädigung sofort ins Kulturmedium abgegeben wird. Die gemessene Enzymaktivität im Medium ist direkt proportional zu der Anzahl der lysierten Zellen.

Testprinzip:

LDH kann im Kulturmedium über zwei Enzymreaktionen gemessen werden.

Im ersten Schritt reduziert die freigesetzte Laktat-Dehydrogenase  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  durch die gleichzeitige Oxidation von Laktat zu Pyruvat. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden über den Katalysator Diaphorase, 2 Protonen (H) von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  auf das gelbe Tetrazolium-Salz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium Chlorid) übertragen. Dieser Schritt reduziert INT zu rotem Formazan [Luttmann et al., 2004], der dann photometrisch gemessen werden kann (Abb. 10).

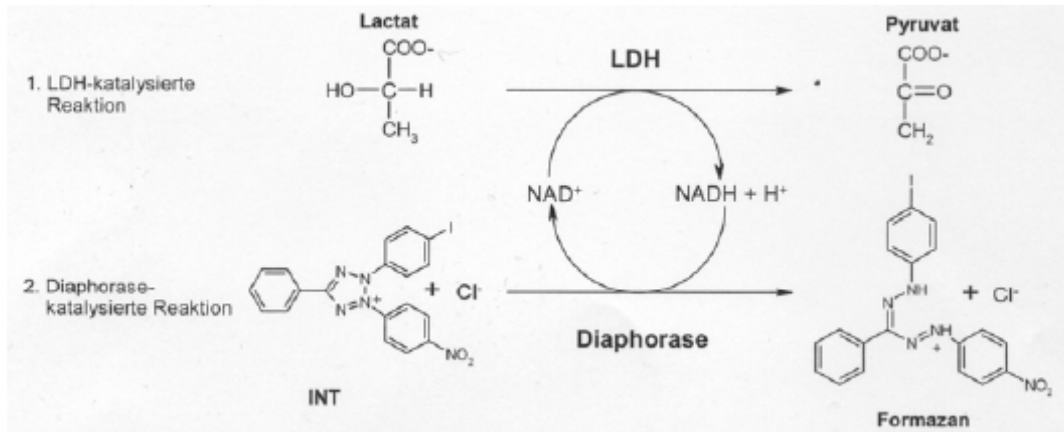


Abb. 9 Schematische Darstellung der LDH-katalysierten Reaktion gekoppelt mit der Farbreaktion zur Detektion der LDH-Aktivität [Luttmann et al., 2004]

Durchführung:

Während eines Bioreaktorversuches werden jeden Tag Mediumproben genommen, an welchen zur Überprüfung der Zellvitalität während des Kulturzeitraums die LDH Enzymaktivität gemessen wird.

Für die Versuchsdurchführung ist zunächst eine Standardreihe mit definierter LDH-Aktivität aufzunehmen. Hierfür wird eine Stammlösung mit 5 µl Laktatdehydrogenase (3000 U) in 30 ml Medium hergestellt und in weiteren Schritten 9x im Verhältnis 3:4 mit Medium verdünnt (je 1200 µl Vorverdünnung+ 400 µl Medium)

Die Konzentrationen der einzelnen Standards sind wie folgt:

Standard 1	0,5 [U/ml]
Standard 2	0,375 [U/ml]
Standard 3	0,281 [U/ml]
Standard 4	0,211 [U/ml]
Standard 5	0,158 [U/ml]
Standard 6	0,119 [U/ml]
Standard 7	0,089 [U/ml]
Standard 8	0,066 [U/ml]
Standard 0	Medium

Anschließend sind je 100 µl Standard, Nullwert und Proben (Dreifachbestimmung) auf eine 96 Well Mikrotiterplatte zu pipettieren. Das Ansetzen der Reaktionslösung erfolgt über die Zugabe von 250 µl R1 zu 12,5 ml R2 pro Mikrotiterplatte. Von dieser Lösung werden mit dem Multistepper je 100 µl zu Standard und Proben pipettiert.

Es folgt eine Inkubationsdauer von 30 min bei RT im Dunkeln.

Danach werden die Proben bei einer Extinktion von 492 nm vermessen; dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Formazan.

Proben für den LDH Test sollten nicht mehr als einmal aufgetaut werden, da die LDH sonst zerfällt.

### 5.6.2 Laktatbestimmung

Material:                   Laktat Test (Randox):  
                                  Puffer  
                                  Enzymreagenz  
                                  Laktat Standard ( 0,4 mg/ml)  
                                  Lactic Acid (1,2577 g Lactic Acid entsprechen 1 g Laktat)

Laktat ist ein Produkt der anaeroben Glykolyse. In der Leber kann Laktat zur Glukoneogenese verwendet oder in Pyruvat zurückverwandelt werden. Die Laktatsynthese wird an Medienproben aus den Bioreaktoren als allgemeiner Stoffwechselmarker über den gesamten Kulturzeitraum überprüft.

Testprinzip [Jacobs et al., 1990]:

Laktat wird katalysiert von Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid gespalten. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert Peroxidase die oxidative Kondensierung einer chromogenen Vorstufe (4-aminophenazone) zu einem Farbstoff mit Absorptionsmaximum bei 540 nm.

Die Laktatkonzentration in der Probe ist proportional zum gemessenen Absorptionsanstieg bei 540 nm.

Durchführung:

Für die Versuchsdurchführung ist zunächst eine Standardreihe mit definierter Laktatkonzentration herzustellen. Dazu wird eine Stammlösung von 15 mg/ml für den ersten Standard 1:10 mit Aqua dest. verdünnt (100 µl Stammlösung + 900 µl Aqua dest.). Für die weiteren Standards 2 - 6 wird je 1:1 weiter verdünnt (je 500 µl Vorverdünnung + 500 µl Aqua dest.). Daraus ergeben sich folgende Konzentrationen für die Standards:

Standard 1	1,5 mg/ml
Standard 2	0,75 mg/ml
Standard 3	0,375 mg/ml
Standard 4	0,1875 mg/ml
Standard 5	0,09375 mg/ml
Standard 6	0,046875 mg/ml
Standard 0	Aqua dest. pur

(weiterer Nullwert Leberzellmedium)

Es werden je 10 µl Standard bzw. Probe auf eine 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert (Dreifachbestimmung). Die Reaktion startet mit der Zugabe von 100 µl Reaktionsreagenz pro Well. Die Herstellung des Reaktionsreagenz erfolgt über die Zugabe von 6 ml Puffer zu einem Fläschchen Enzymreagenz und vorsichtigem Schwenken zur Vermischung. Die Inkubation des Tests findet über 10 min bei RT statt. Der entstandene Farbumschlag lässt sich bei 550 nm photometrisch messen. Zur Auswertung wird von allen Probenwerten der Nullwert abgezogen und die Konzentrationen anhand der Standardreihe berechnet.

### 5.6.3 Harnstoff-Test

Material:                   Harnstoff/Ammoniak UV-Test (Boehringer Mannheim):

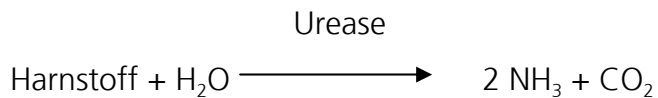
- Flasche 1 Puffer
- Flasche 2 NADH Tabletten
- Flasche 3 Urease Lösung
- Flasche 4 Glutamat-Dehydrogenase-Lösung

Williams Medium E  
Harnstoff

Der qualitative Nachweis der Harnstoffsynthese ist ein wichtiger Funktionsparameter in der Leberzellkultur. Beim Proteinstoffwechsel entsteht durch den Abbau von Aminosäuren giftiger Ammoniak, welcher von den Hepatozyten in der Leber in Harnstoff umgewandelt wird und so ausgeschieden werden kann.

Testprinzip [Gutmann et al., 1974]:

1) Harnstoff wird durch Urease katalysiert zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid gespalten:



2) Ammoniak setzt 2-Oxoglutarat in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu L-Glutamat um, wobei NADH verbraucht wird:



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Ammoniak-Menge bzw. der halben Harnstoffmenge äquivalent. NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Durchführung:

Zu Beginn des Tests werden die Medienproben im Verhältnis 1:1 mit Williams Medium E (WE-Medium) verdünnt. Die Standardreihe wird aus einer Stammlösung mit einer Harnstoffkonzentration von 1,5 mg/ml hergestellt, jeweils im Verhältnis 1:1 mit WE-Medium verdünnt.

Daraus ergeben sich für die Standards folgende Konzentrationen:

Standard 1	0,75 mg/ml
Standard 2	0,375 mg/ml
Standard 3	0,188 mg/ml
Standard 4	0,094 mg/ml
Standard 5	0,047 mg/ml
Standard 6	0,023 mg/ml
Standard 7	0,012 mg/ml
Standard 0	WE-Medium

(weiterer Nullwert Leberzellmedium)

Je 10 µl Standard und Proben (Dreifachbestimmung) werden in ein Well einer UV-Licht durchlässigen 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Testreagenzien werden wie folgt pipettiert (Ansatz für eine Platte berechnet):

100 µl Lösung 1 (10 Tabletten aus Fl.2 + 10 ml Puffer aus Fl.1 mischen (schwenken))

10 µl Lösung 3 (800 µl Aqua bidest. + 200 µl Enzym aus Fl. 3)

200 µl Aqua bidest.

Photometrische Messung des Nullwertes bei 340 nm

10 µl Lösung 4 (800 µl Aqua bidest. 200 µl Enzym aus Fl. 4)

Die erste Messung erfolgt nach 4 Stunden, die zweite nach einer Inkubation des Tests über Nacht bei RT. Zur Auswertung werden die Ergebnisse vom Nullwert abgezogen und die Konzentration anhand der Standardreihe berechnet.

Alle Lösungen und Enzymverdünnungen sind erst unmittelbar vor Gebrauch ansetzen.

#### **5.6.4 Albumin ELISA**

Material: Albumin Elisa (Bethyl Laboratories):  
Goat anti Pig Albumin purified Antibody (1. AK)  
Pig Reference Serum  
Goat anti Pig Albumin-HRP conjugate (2. AK)

Coating Puffer (pH 9,6):  
0,05 M Natriumcarbonat

Waschpuffer (pH 8,0):  
50 mM Tris  
0,14 mM NaCl  
+ 0,05% Tween 20

Blockpuffer (pH 8,0):  
50 mM Tris  
0,14 mM NaCl  
+ 1% BSA

2 M Schwefelsäure  
3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine (TMB) liquid substrate system  
Williams Medium E

Albumin wird in der Leber produziert und ist eines der wichtigsten Blutplasmae. Die Beobachtung der Albuminsynthese während einer Leberzellkultur ist deshalb ein aussagekräftiger Funktionsparameter.

Testprinzip:

Der Test ist ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und basiert auf einer Antikörper-Antigen-Bindung mit anschließender, enzymatischer Farbreaktion.

Eine 96 Well Mikrotiterplatte wird mit einem ersten Antikörper (AK) gegen porcines Albumin gekoppelt und dann mit der Probe inkubiert. Das Albumin in der Probelösung bindet an den Antikörper. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, ebenfalls gegen porcines Albumin gerichteter Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, zugegeben. Es entstehen 1. AK- Albumin -2. AK+HRP Konjugate. Bei Zugabe eines Chromogensubstrates kommt es zu einem Farbumschlag, dessen Intensität proportional zur Albuminkonzentration in der Probelösung ist.

Durchführung:

Zu Beginn des ELISA findet die Verdünnung aller Proben mit WE-Medium im Verhältnis 1:10 und das Ansetzen einer Standardreihe statt. Dazu wird 1 µl porcines Serum in 5 ml Medium gelöst, davon 100 µl mit 1,9 ml WE-Medium vermischt und im Verhältnis 1:1 weiter verdünnt.

Daraus ergeben sich folgende Konzentrationen für die Standards:

Standard 1	0,500 mg/mL
Standard 2	0,250 mg/mL
Standard 3	0,125 mg/mL
Standard 4	0,063 mg/mL
Standard 5	0,031 mg/mL
Standard 6	0,016 mg/mL
Standard 7	0,008 mg/mL
Standard 0	WE-Medium

(weiterer Nullwert Leberzellmedium)

Der ELISA wird wie folgt pipettiert:

- 100 µl 1.AK (100 µl AK in 10 ml Coating-Puffer pro Platte)
- 3x 200 µl Waschpuffer

Inkubation

1h

- 200 µl Blockierungspuffer zur Absättigung unspezifische Bindungstellen 0,5h
- 3x 200 µl Waschpuffer
- 100 µl Probe bzw. Standard (Dreifachbestimmung) 1h
- 5x 200 µl Waschpuffer
- 100 µl 2.AK+HRP (1 µl in 1ml Blockierungspuffer, daraus 100 µl in 10 ml  
1h Blockierungspuffer lösen)
- 5x 200 µl Waschpuffer
- 100 µl TMB Substrat (giftig- unter dem Abzug arbeiten) 15min
- 100 µl 2M Schwefelsäure (zum Abstoppen der Reaktion)

Der Farbumschlag wird bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Verdünnungen und Standardreihe sollten immer erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden. Zur Auswertung wird von allen Probenwerten der Nullwert abgezogen und die Konzentrationen anhand der Standardreihe berechnet.

### **5.6.5 VEGF ELISA**

#### **Material:**

Human VEGF Immunoassay (R&D)

- VEGF Mikrotiterplatte
- VEGF Konjugat
- VEGF Standard
- Assay Verdünnung RD1W
- Kalibrator Verdünnung RD5K
- Waschpuffer Konzentrat
- Farbreagenz A
- Farbreagenz B
- Stopplösung
- Plate Covers

Prinzip:

Der Test bedient sich der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Dazu erfolgt die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF und eine Beschickung der Wells mit einer VEGF Standardreihe bzw. den zu messenden Proben. Das in den Proben enthaltene VEGF bindet an den Antikörpern und



lässt sich so immobilisieren. Nach dem Abwaschen aller ungebundenen Substanzen wird ein mit einem Enzym gekoppelter, polyklonaler VEGF Antikörper hinzugegeben, der wiederum an das bereits gebundene VEGF bindet. Alle ungebundenen Substanzen werden abgewaschen und eine Substratlösung hinzu pipettiert. Durch das Enzym am zweiten Antikörper kommt es zu einer Farbreaktion, deren Intensität proportional zu der Konzentration des gebundenen VEGF ist. Die Farbreaktion lässt sich nach der vorgegebenen Reaktionszeit mit einer Stopplösung beenden und die Farbintensität dann am ELISA-Reader messen.

Durchführung:

Zu Beginn des Tests wird das Waschpufferkonzentrat 1: 25 mit Aqua bidest. verdünnt und der VEGF Standard angesetzt. Dazu wird das VEGF Standard- Fläschchen mit 1 ml RD5K Verdünnung angesetzt und 15 min zum Lösen stehen gelassen. Es ergibt sich eine Konzentration von 2000 pg/ml, die dann 1:1 (500 µl Standard + 500 µl RD5K) weiter verdünnt wird. Daraus ergeben sich folgende Konzentrationen für die Standards:

Standard 1	2000 pg/mL
Standard 2	1000 pg/mL
Standard 3	500 pg/mL
Standard 4	250 pg/mL
Standard 5	125 pg/mL
Standard 6	62,5 pg/mL
Standard 7	31,2 pg/mL
Standard 8	15,6 pg/mL
Standard 0	RD5K pur

Die Mikrotiterplatte wird mit 50 µL RD1W Verdünnung pro Well bestückt. Dann werden je 200 µL Standard in Dreifachbestimmung und 200 µL Probe in Zweifachbestimmung pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Das Waschen der Platte erfolgt mittels dreimaligem Pipettieren und Abklopfen von je 400 µL Waschpuffer pro Well. Dann findet die Zugabe von 200 µL des konjugierten VEGF Antikörper pro Well statt und die Inkubation über 2 h. Drei weitere Waschschritte folgen und eine Zugabe von 200 µL Substrat Lösung (Farbreagenz A 1:1 mit Farbreagenz B- max.15 min vor Gebrauch ansetzen) pro Well. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wird die

Farbreaktion über Zugabe von 50  $\mu$ L Stopplösung pro Well abgebrochen und kann innerhalb von 30 min am ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenz von 540 oder 570 nm gemessen werden.

## 6. Ergebnisse

Es konnten 13 Co-Kulturen von Endothelzellen bzw. endothelialen Vorläufern und Hepatozyten auf der vaskularisierten Matrix aufgebaut werden und im Bioreaktor unter kontrolliertem Fluß über einen Zeitraum von 14 - 37 Tagen perfundiert werden. Die Hepatozyten stammten aus sieben verschiedenen Schweineleberpräparationen (LP) und zwei humanen Leberbiopsien, die Endothelzellen aus vier Schweineleberpräparationen, vier porcinen Knochenmarksaspiraten und einer humanen Präputie.

### 6.1 Rebesiedlung des Gefäßsystems mit Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen

#### 6.1.1 Isolation der Zellen und Besiedlung der vaskularisierten Matrix

Porcine Endothelzellen ( $n = 4$ ) wurden aus den Lebern von vier 20 - 25kg Deutsche Landrasseschweinen, wie in 3.1.2 beschrieben, isoliert und in Zellkulturflaschen expandiert (Abb. 11). Die Isolation porciner, endothelialer Vorläufer erfolgte, wie in 5.1.4 beschrieben, aus Knochenmarksaspiraten ( $n = 4$ ) von vier 20 - 25kg Deutsche Landrasseschweinen mit anschließender Expansion in Zellkulturflaschen (Abb. 13).

Mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEC) ließen sich, wie in 5.1.3 beschrieben, aus dem Dermisanteil einer Präputienbiopsie gewinnen und vermehren (Abb. 12).

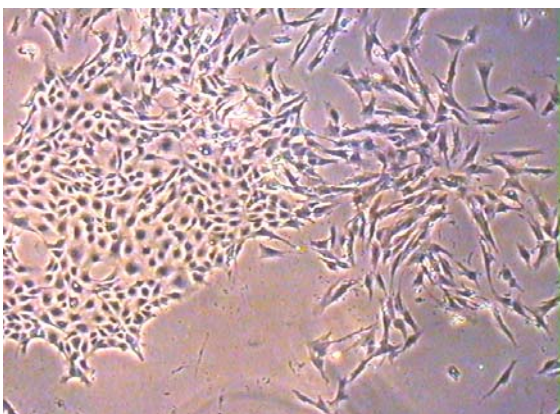


Abb. 10 Endothelzellen aus Leberpräparation 4fach vergrößert

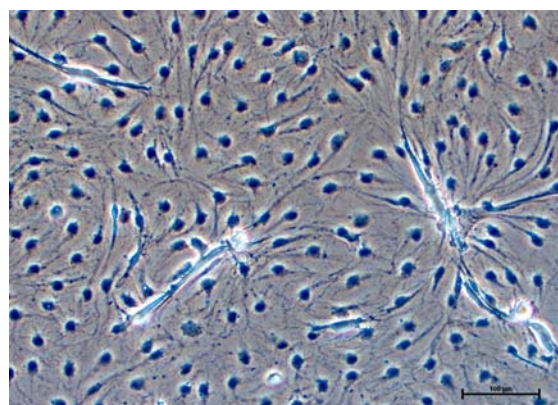


Abb. 12 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen

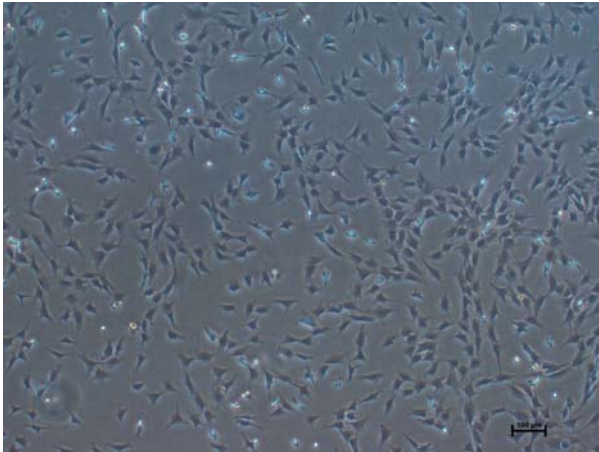


Abb. 13 Mononucleäre Zellen aus Knochenmarksaspirat

Die Besiedlung des Gefäßsystems der vaskularisierten Matrix erfolgte, wie in 5.4.1 beschrieben, durch Aufgabe der Zellen in den arteriellen Zufluss, wobei Zellzahl und Aufgabeeart zwischen den einzelnen Bioreaktoren (BR) variierten (Tab. 2). Für jeden Bioreaktor wurden nur die Zellen der Isolation von einem Tier/ Mensch genutzt. Bei den Zellen der Experimente BR 1 - 9 fand vor der Besiedlung eine Fluoreszenz-markierung mit CFDA-SE statt, bei BR 10, 11, 13 nicht. Bei Bioreaktor 1 und 3 erfolgte die Besiedlung des Gefäßsystems dreifach, wobei jeweils 1/3 der Zellen unter Minimalperfusion in 45 - 60 min Abständen in das Gefäßsystem der Matrix gespült wurden. Bei den anderen Bioreaktoren erfolgte eine einmalige Zellaufgabe, gefolgt von einer Adhärenzzeit von 60 min für die Zellen bei Minimalperfusion.

Die Verwendung der Matrix für die Hepatozytenkultur bei BR 12 fand ohne vorherige Besiedlung des Gefäßsystems statt.

<b>Bioreaktor</b>	<b>Zelltyp+Ursprung /Passage/ Morphologie</b>	<b>Zellzahl/ Vitalität</b>	<b>Besiedlung/ Besonderheiten</b>	<b>Kulturdauer mit EC-spezifischen Medium [d]</b>
BR 1	pEC LP121005, 1.P; nicht typisch	7,3x10 <sup>6</sup> Zellen, 70-80% vital	Besiedlung in 3 Schüben (je 1h); CFDASE- Markierung	6
BR 2	pEC LP121005, 1.P; nicht typisch	7,3x10 <sup>6</sup> Zellen, 70-80% vital	Besiedlung in einem Schub; CFDASE- Markierung	5
BR 3	pEC LP200206, 1.P 50-60% typisch	20x10 <sup>6</sup> Zellen, nicht gemessen	Besiedlung in 3 Schüben (45min); CFDASE- Markierung	8
BR 4	pEC LP130306, 1.P; nicht typisch	15x10 <sup>6</sup> Zellen, 70-80% vital	Besiedlung in einem Schub; CFDASE- Markierung	9
BR 5	pMSC Iso 19.07.06, 2.P aufgetaut	14,2x10 <sup>6</sup> Zellen, nicht gemessen	Besiedlung in einem Schub; CFDASE- Markierung	26
BR 6	pMSC Iso 19.07.06, 2.P aufgetaut	14,2x10 <sup>6</sup> Zellen, nicht gemessen	Besiedlung in einem Schub; CFDASE- Markierung	26
BR 7	pMSC Iso 05.10.06, 2.P	7,5x10 <sup>6</sup> Zellen, 95% vital	Besiedlung in einem Schub; CFDASE- Markierung	15
BR 8	pMSC Iso 05.10.06, 2.P	7,5x10 <sup>6</sup> Zellen, 95% vital	Besiedlung in einem Schub; CFDASE- Markierung	15
BR 9	pMSC Iso 05.10.06, 1.P aufgetaut in 2.P verwendet	10x10 <sup>6</sup> Zellen, nicht gemessen	Besiedlung in einem Schub; CFDASE- Markierung	8
BR 10	pMSC v.02.07.06, 1.P	8,4x10 <sup>6</sup> Zellen, nicht gemessen	Besiedlung in einem Schub; unmarkiert	6
BR 11	pMSC v.02.07.06, 1.P	12,5x10 <sup>6</sup> Zellen nicht gemessen	Besiedlung in einem Schub; unmarkiert	6
BR 13	mvEC, Spender 5 J., 4.P	4,5x10 <sup>6</sup> Zellen, nicht gemessen	Besiedlung in einem Schub; unmarkiert	16

Tab. 2 Gefäßsystembesiedlung Bioreaktor 1- 13

#### 4.1.2 Histologische Überprüfung der Besiedlung über Fluoreszenzmarkierung

Die Besiedlung des Gefäßsystems ließ sich bei BR 1 - 9 durch Fluoreszenzmikroskopie überprüfen (Abb. 14 und 15).

Folgende Kriterien wurden für die Bewertung der Besiedlung des Gefäßsystems mit CDFA SE- markierten Zellen festgelegt:

##### 1. Ausbreitung der Besiedlung

- = keine besiedelten Gefäße erkennbar
- o = einzelne besiedelte Gefäße erkennbar
- + = stellenweise Gefäßnetz mit Besiedlung zu erkennen
- ++ = flächendeckend Gefäßnetz mit Besiedlung zu erkennen

##### 2. Qualität der Besiedlung

- = keine Zellen in den Gefäßen erkennbar
- o = über das ganze Gefäßsystem verteilt Zellen erkennbar
- + = Gefäße durchgehend besiedelt mit Lücken
- ++ = Gefäße durchgehend besiedelt

Bioreaktor	Ausbreitung der Besiedlung	Qualität der Besiedlung
1	o	o bis +
2	+	+
3	++	o bis +
4	+	+ bis ++
5	o	o
6	Keine Auswertung, Kontamination am Versuchsende	
7	++	+ bis ++
8	+	o bis +
9	+	o bis +

Tab. 3 Mikroskopische Bewertung der Besiedlung der Gefäßsysteme BR 1-9 (Die Läufe BR 10-13 ließen sich nicht auswerten, da die aufgesiedelten Zellen nicht fluoreszenzmarkiert waren.)

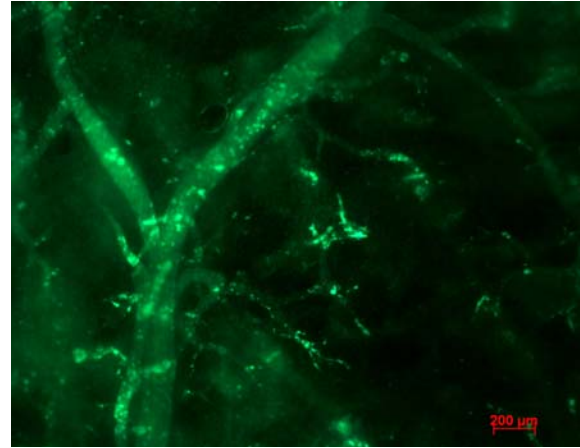
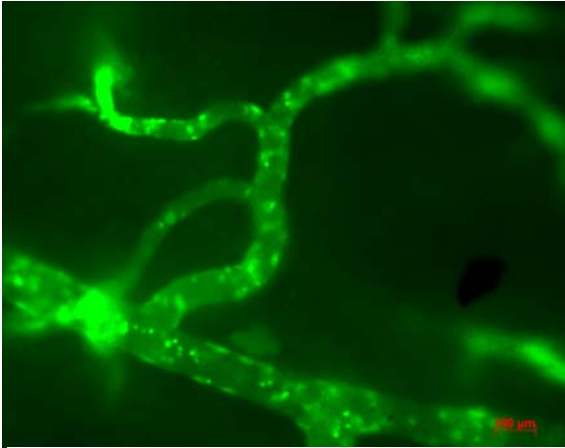


Abb. 14 Gefäßstrukturen mit markierten Zellen besiedelt (Bild 1 und 2); Beleg für die Kapillarsprossung aus bestehenden Gefäßen in der BioVaSc (Bild 2)

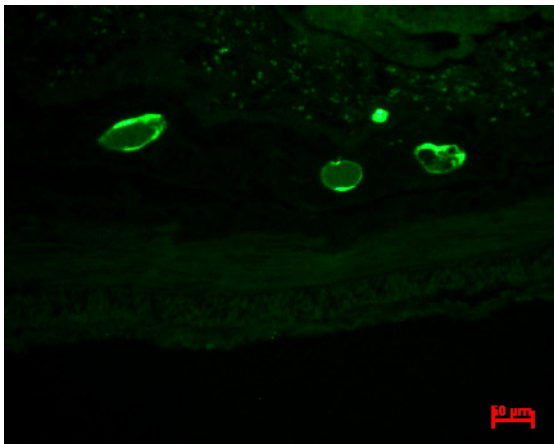


Abb. 15 Gefäße mit fluoreszenzmarkierten Zellen im Querschnitt (Paraffinschnitt)

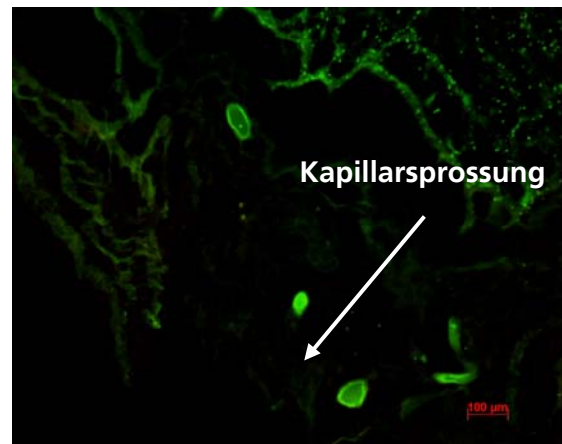


Abb. 16 Lebend-Tot-Färbung von Kryoschnitt mit vitalen Zellen in Gefäßquerschnitten

Bei den Bioreaktoren 7 und 8 wurde nach Versuchsende eine Lebend-Tot-Färbung des Gewebes, wie in 5.5.7 beschrieben, durchgeführt. Dabei stellen sich lebende Zellen grün und tote Zellen rot dar. Es waren keine roten Zellen im Bereich der Gefäße detektierbar (Abb. 16).

### 6.1.3 Immunhistologische Färbung der Zellen

Vor der Besiedlung des Gefäßsystems wurden von den zu besiedelnden Zellen Cytospots angefertigt und diese immunhistologisch, wie in 5.5.5 beschrieben, auf die Expression der endothelialen Marker CD 31 und FLK-1 (VEGF-Rezeptor 2) untersucht. Bei keiner der Kulturen war eine Expression von CD 31 oder FLK-1 in über 8% der Zellen nachweisbar. Bei den Endothelzellkulturen aus Leberbiopsien war dies begründet durch die starke Kontamination der Kulturen mit fibroblastären Zellen, die schneller und besser ablösbar sind als die isolierten Endothelzellen. Deshalb wurde ab BR 5 mit endothelialen

Vorläufern aus dem Knochenmark besiedelt, welche in vorhergegangenen Studien gute Ergebnisse hinsichtlich einer Differenzierung in Endothelzellen erzielt hatten [Walles et al., 2004 und Schanz, 2004] (Abb. 17). Die Besiedlung des Gefäßsystems und die Vorläuferzellendifferenzierung wurden bei Versuchsende ebenfalls immunhistologisch überprüft. Die rebesiedelten, vaskularisierten Matrices wurden dazu dem Bioreaktorsystem entnommen und in kleinere Gewebestücke zerteilt. Es erfolgte eine Herstellung von Paraffin- und Kryopräparaten sowie Gewebeschnitten, wie in 5.5.3 beschrieben.

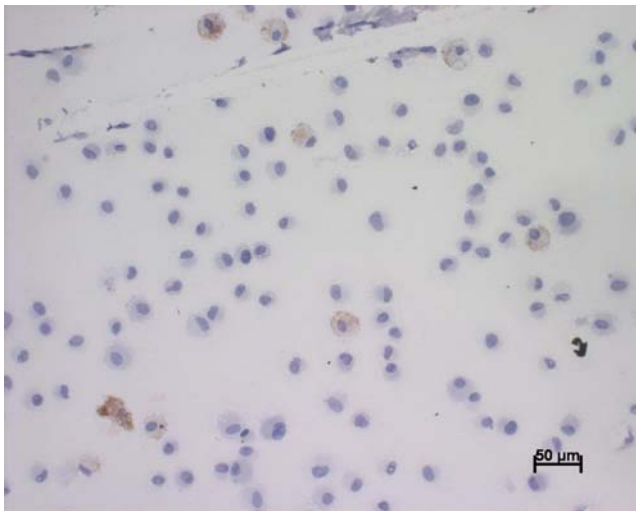


Abb. 17 Cytospot- endotheliale Vorläufer zur Besiedlung von BR 10 und 11 Anti-CD 31 Färbung

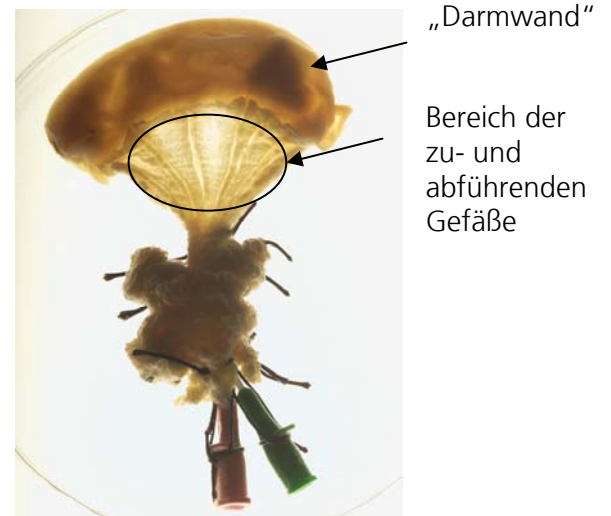


Abb. 18 Matrix nach Co-Kultur in Zonen eingeteilt

Die Gewebeschnitten wurden immunhistologisch mit Anti-CD 31 und Anti-FLK-1 Antikörper gefärbt, um den Differenzierungszustand der Zellen zu überprüfen. Es ließen sich besonders im Bereich der zu- und abführenden Gefäße sowie auch in der ehemaligen Darmwand (Abb. 18) CD-31 und FLK-1 positive Gefäße nachweisen (Abb. 19 und 20). Die beste Differenzierung der Zellen zeigte sich bei den Bioreaktorenläufen 10 und 11, bei denen die Zellen unmarkiert in das Gefäßsystem integriert wurden. Bei den Bioreaktorenläufen 1 - 4, die mit isolierten Endothelzelmischkulturen aus Leberbiopsien besiedelt wurden, war auch nach Versuchsende keine Expression endothelspezifischer Marker nachweisbar.



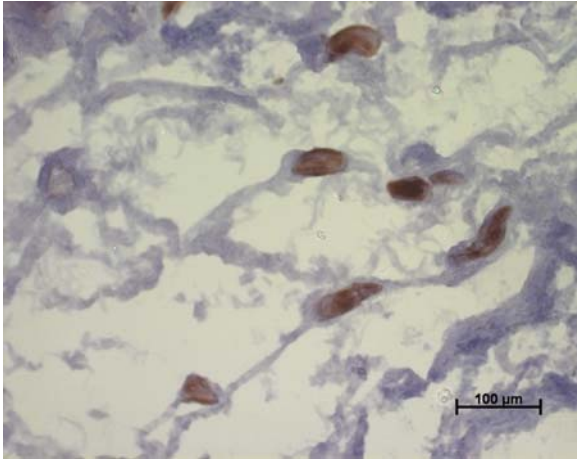


Abb. 19 BR 11 Gefäßquerschnitte im Bereich der „Darmwand“ mit angefärbten Endothelzellen, Anti-CD 31 Färbung auf Kryoschnitt

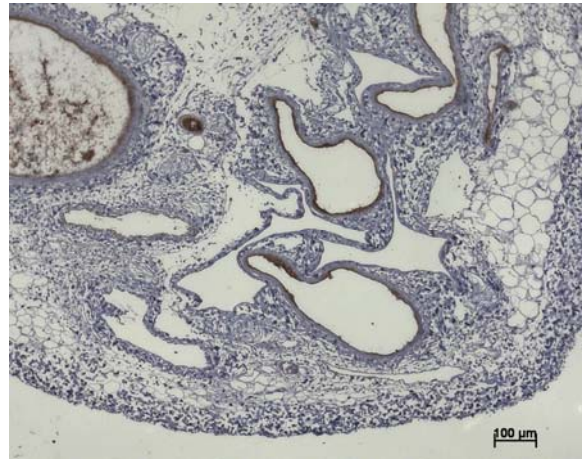


Abb. 20 BR 10 Gefäßquerschnitte im Bereich der zu- und abführenden Gefäße mit angefärbten Endothelzellen, Anti-FLK-1 Färbung auf Paraffinschnitt

## 6.2 Rebesiedlung des Lumens mit Hepatozyten

### 6.2.1 Isolation der Hepatozyten und Besiedlung des Matrixlumens

Die Isolation der porcinen Hepatozyten erfolgte über die Perfusion des links-medialen Leberlappens, wie in 5.1.1 beschrieben. Es wurden sieben Isolationen durchgeführt, wobei die Vitalität der Zellen nach der Präparation zwischen 87% - 95% lag und die Ausbeute von  $1,9 - 4,5 \times 10^8$  Zellen variierte. Die Aussaat der Zellen erfolgte zunächst in eine Zellkulturflasche, um die Zellen an Tag 1 nach der Isolation vor der Aufgabe auf die BioVaSc morphologisch bewerten zu können. Die Isolation der humanen Hepatozyten erfolgte in der AG Nüssler an der Charité in Berlin, die Zellen wurden anschließend in Zellkulturflaschen ans IGB verschickt und dort am dritten Tag nach der Isolation verwendet. Die Besiedlung des Darmlumens der vaskularisierten Matrix fand, wie in 5.4.2 beschrieben, durch Aufgabe der Hepatozyten in einer Kollagensuspension in das Matrixlumen statt, wobei Zellzahl und Besiedlungsart zwischen den einzelnen Bioreaktoren (BR) variierten (Tabelle 4). Für jeden Bioreaktor wurden nur die Zellen der Isolation von einem Tier/ Mensch genutzt. Bei den Bioreaktoren 6, 8, 9 und 11 erfolgte neben der Perfusion der Matrix über den arteriellen Zufluss eine Perfusion durch das Lumen zur verbesserten Versorgung der aufgesiedelten Hepatozyten. Bei den Bioreaktoren 6 und 8 geschah dies über einen perforierten Silikonschlauch ( $\varnothing$  6mm), bei BR 9 über ein integriertes Stück SIS (Small Intestinal Submucosa) und bei BR 11 angelehnt an Hohlfaserreaktormodelle über 11 integrierte Dialysekapillare aus

hydrophobem Material, die zusätzlich mit einer Kanüle perforiert wurden. Der Druck und Fluss des Lumenstroms ließ sich dabei über eine Klemme regulieren.

Während der Kulturdauer, die zwischen 10 - 22 Tagen lag, fand alle 5 - 7 Tage ein Medienwechsel statt (Ausnahme BR 2), wobei das Medium komplett oder zur Hälfte ersetzt wurde. Für spätere Funktionstests erfolgte an jedem Wochentag steril die Entnahme von ca. 2 ml Medium (Lagerung der Proben bei -20°C).

Bioreaktor	Leber-Präparation	Zellzahl	Besiedlung/ Besonderheiten	Dauer [d]
BR 1	LP200206	140x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	13
BR 2	LP200206	117x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	9
BR 3	LP130306	102x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	21
BR 4	LP260406	200x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	13
BR 5	LP290906	72x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	9
BR 6	LP290906	75x10 <sup>6</sup>	Lumenfluss über perforierten Silikonschlauch	9
BR 7	LP301006	47x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	22
BR 8	LP301006	50x10 <sup>6</sup>	Lumenfluss über perforierten Silikonschlauch	22
BR 9	LP041206	55x10 <sup>6</sup>	Lumenfluss durch SIS-Schlauch	16
BR 10	LP120207	53x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt, O <sub>2</sub> Sensor angeschlossen	20
BR 11	LP120207	63x10 <sup>6</sup>	Lumenfluss über 11 Kapillare	20
BR 12	Human, Patient 1	15x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	18
BR 13	Human, Patient 2	19x10 <sup>6</sup>	Lumen zugeklemmt	18

Tab. 4: Besiedlung des Matrixlumens mit Hepatozyten BR 1-9

### 6.2.2 Histologische Bewertung der Zellen vor der Besiedlung

Die erste Bewertung der Hepatozyten erfolgte vor der Besiedlung der Matrix histologisch. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen adhärent waren, vital

erschieden und die Aussaatdichte ausreichend war, um Zell-Zellkontakte zu ermöglichen.

Der vitale Hepatozyt hat einen Helligkeitskontrast zwischen Zellkern und Zytoplasma sowie einen refraktionsbedingten Ring um die Zellmembran. Bei zellulärer Schädigung des Hepatozyten beginnen sich zahlreiche schmale Blasen im Zytoplasma zu bilden, die dann zu einer oder mehreren größeren Blasen verschmelzen und sich aus der Zellmembran ausstülpfen. Diese Phase ist noch reversibel. Erst wenn die Blasen verschwinden und die Plasmamembran diskontinuierlich wird, stirbt die Zelle.

Die Anhaftung toter Zellen und Zelldebris an die Hepatozyten (Abb. 21) in Kultur ist normal und sagt nichts über die Qualität der Zellen aus.

Die verwendeten Zellen erfüllten die oben genannten Kriterien.

**Vitaler Hepatozyt**

**Tote Zellen und  
Zelldebris**

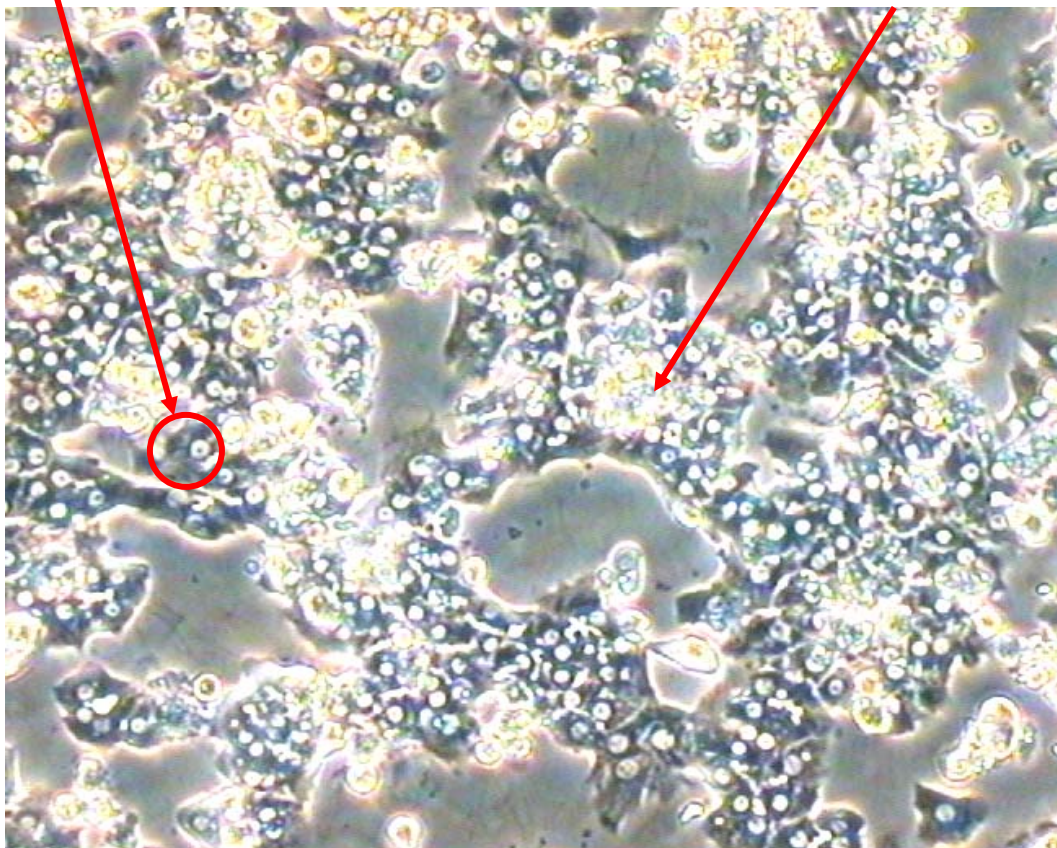


Abb. 21 Hepatozytenkultur Tag 1 nach der Isolation in der Zellkulturflasche mit vitalen Hepatozyten und Zelldebris

### 6.2.3 Immunhistochemische Färbung der Zellen vor der Besiedlung

Zur genauen Charakterisierung der isolierten, zur Besiedlung genutzten Zellen und zur Verifizierung vorheriger, am IGB generierter Daten wurden exemplarisch von den

Leberpräparationen LP301006, LP041206 und LP120207 Cytospots und Chamberslides angefertigt.

Da die Leber, wie in 3.1.2 beschrieben, aus verschiedenen Zelltypen besteht, sollte der prozentuale Anteil der Hepatozyten ermittelt werden. Diese Charakterisierung der Zellen erfolgte über eine immunhistochemische Antikörperfärbung, wie in 5.5.6 beschrieben.

Auf diesem Wege ließ sich die Expression folgender Antikörper überprüfen:

- |                        |                                                     |
|------------------------|-----------------------------------------------------|
| CD 31                  | - spezifischer Endothelzellefaktor                  |
| CKLP 34                | - färbt die Cytokeratin 5,6 und 18 in Epithelzellen |
| Hepatozyte             | - färbt hepatozytäre Mitochondrien                  |
| Desmin                 | - positiv in Sternzellen                            |
| Macrophage/ L1 Protein | - färbt Kupfferzellen                               |

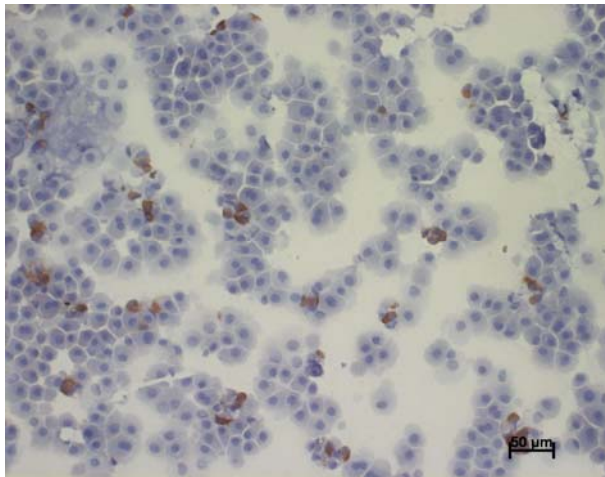


Abb. 22 Anti-CD 31 Färbung von Cytospot der LP301006 – 6% der isolierten Zellen sind Endothelzellen, positiv für CD 31

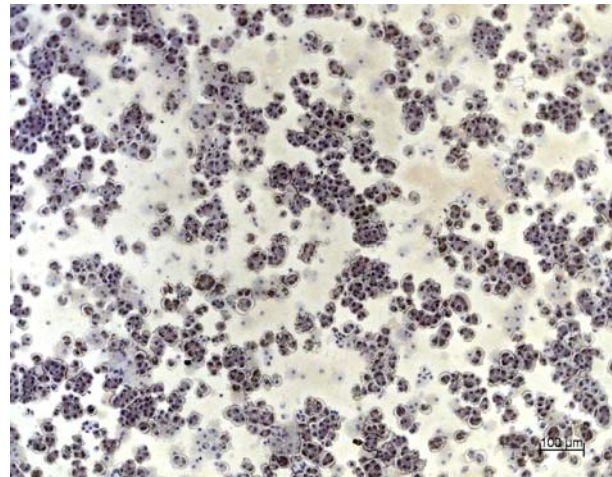


Abb. 23 Anti-Hepatozytenfärbung von Cytospot der LP041206 – 81% der isolierten Zellen sind Hepatozyten

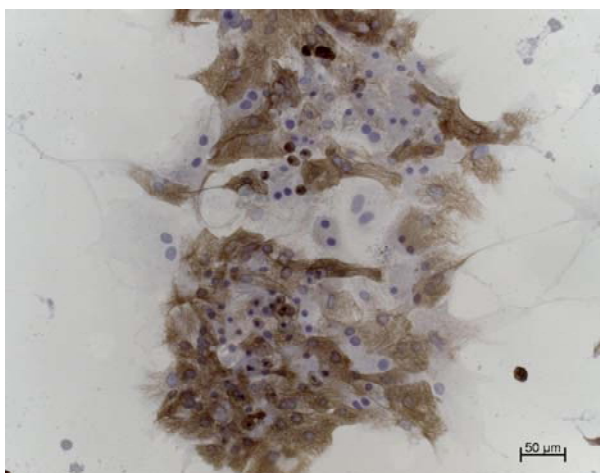


Abb. 24 Anti-CKLP 34 Färbung von Chamberslide der LP041206- Intermediärfilamente klar erkennbar, 80% der Zellen sind Hepatozyten

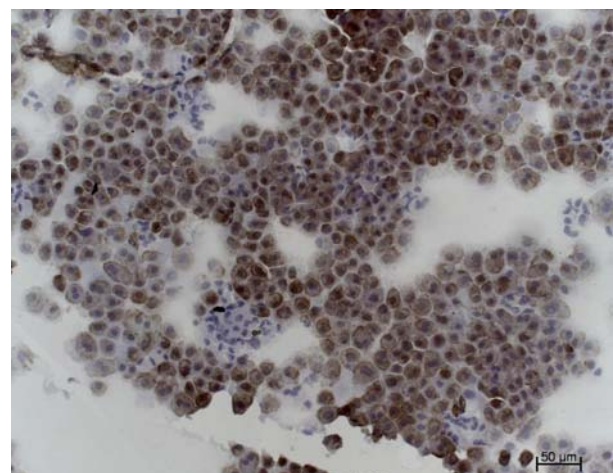


Abb. 25 Anti-CKLP 34 Färbung von Cytospot der LP041206- Intermediärfilamente klar erkennbar, 88% der Zellen sind Hepatozyten

Zellen, die positiv für einen Antikörper sind, stellen sich nach der immunhistochemischen Färbung braun, ihre Zellkerne blau dar. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit nur Färbungen ausgewertet, bei denen sich die Isotypkontrolle nicht anfärbte.

Kupffer- und Sternzellen ließen sich in den Primärkulturen nur sehr vereinzelt finden, wogegen der Anteil sinusoidaler Endothelzellen bei  $\leq 10\%$  lag (Abb. 22). Die Leberpräparationen zeigten alle einen Anteil von CKLP 34- und Hepatozytenantikörperpositiver Zellen  $\leq 80\%$  (Abb. 23-25).

#### **6.2.4 Mikroskopische Bewertung der besiedelten Matrix nach Versuchsende**

Nach Ende der Kulturzeit im Bioreaktor wurden die Matrices entnommen, mit Präparierbesteck in ca. 1x1cm große Stücke zerteilt, fixiert und in Paraffin eingebettet bzw. eingefroren, wie in 5.5.3 beschrieben. Beim Aufschneiden der Matrix war bei den Bioreaktoren 1 - 10 im ehemaligen Darmlumen eine gewebeartige Struktur (Abb. 26) entstanden.

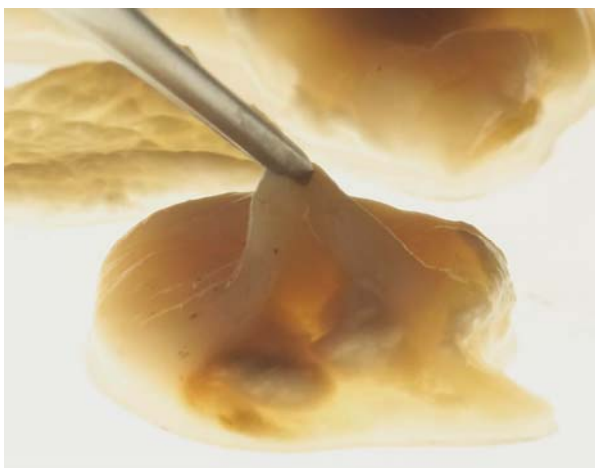


Abb. 26 Matrixlumen im Querschnitt bei Versuchsende mit gewebeartigem Inhalt (BR 5).

Um diese Substanz und die Besiedlung der Matrix mit Zellen zu untersuchen, wurden von den Paraffinpräparaten Schnitte angefertigt und selbige mit Hämalaun und Eosin (HE) angefärbt (5.5.5). Dabei handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, bei der sich Zellkerne blau und Zytoplasma sowie Kollagenfasern rötlich anfärben. Die Bewertung der Besiedlung erfolgte nach den Kriterien Zellmigration und –morphologie (Tab. 5).

Bioreaktor	Zellmigration in die Matrix	Zellvitalität im Matrixwandbereich	Zellvitalität im Matrixlumen
BR 1	O	O	- bis O
BR 2	O	O bis +	- bis O
BR 3	O	O bis +	- bis O
BR 4	O bis + (in d. Darmwand)	O	- bis O
BR 5	O	O	- bis O
BR 6	Keine histologische Auswertung möglich, Abbruch nach Verkeimung		
BR 7	O	O bis +	O
BR 8	O	+	O
BR 9	+	+	O
BR 10	+	+	O
BR 11	- bis O	+	+ bis ++
BR 12	+	+ bis ++	+ bis ++
BR 13	+	+ bis ++	+ bis ++

Tab. 5 Bewertung der Besiedlung mit Hepatozyten: - = schlecht, o = wenig, + = gut, ++ = sehr gut

Es waren in allen Bioreaktorläufen nach Versuchsende morphologisch vital aussehende Zellen zu detektieren. Die morphologisch typischsten Zellen ließen sich jeweils in Assoziation zur azellularisierten Mucosa entdecken; dort war der Abstand zu den versorgenden Gefäßen am geringsten (Abb. 28 + 29). Die Bereiche innerhalb des Lumens einschließlich der gewebeartigen Substanz erwiesen sich bei mikroskopischer Betrachtung als abgestorbene Zellen (Abb. 29). Morphologisch typische, vitale Zellen sind in der HE- Färbung durch einen großen, leicht bläulichen Kern zu erkennen, der einen oder mehrere dunkle, blaue Punkte, die Kernkörperchen, enthält. Das Zellplasma stellt sich leicht rosa dar. Bei den Bioreaktoren 12 und 13, die mit humanen Hepatozyten besiedelt waren, ließen sich die meisten vitalen Zellen detektieren (Abb. 31). In einigen Bereichen, in denen die Hepatozyten vital waren und enge Zell-Zellkontakte ausprägen konnten, ließen sich vereinzelt Hohlräume erkennen, bei denen es sich vermutlich um vaskuläre Strukturen handelt.

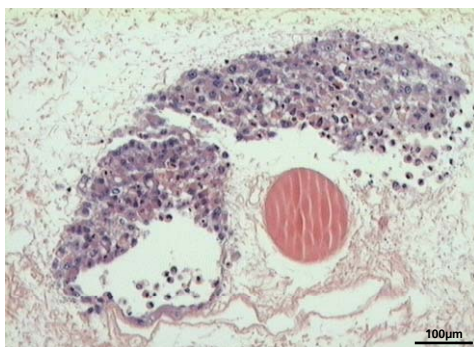


Abb. 27 HE Färbung BR 4: vitale Hepatozyten , die sich in einer Gewebetasche im Bereich der Darmwand um eines größeres Gefäß angesiedelt haben

Des Weiteren waren besonders bei den Experimenten 4 und 13, Bereiche in der Darmwand zu erkennen, wo Hepatozyten in Gefäße gespült bzw. in einer Art Gewebetasche angesiedelt worden waren (Abb. 27).

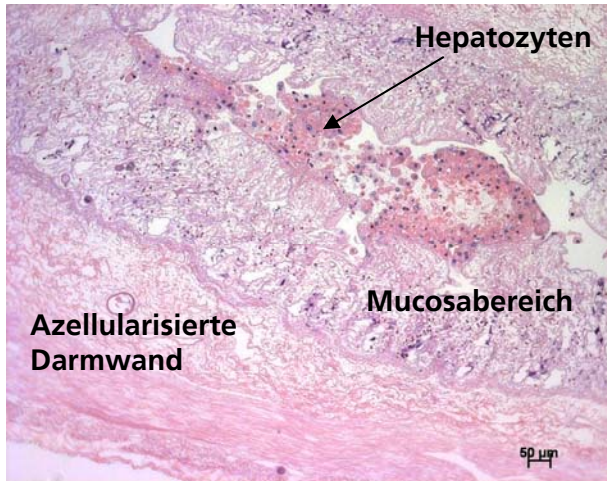


Abb. 28 HE -Färbung von BR 12- Querschnitt des ehemaligen Darmlumens mit vitalen Hepatozyten im Mucosabereich

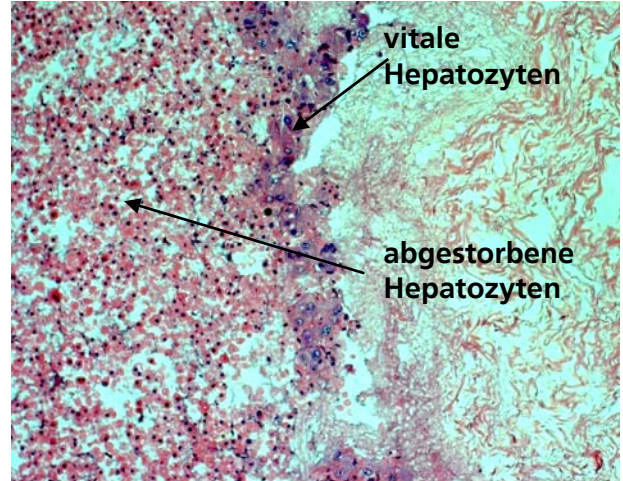


Abb. 29 HE -Färbung BR 9 mit vitalen Hepatozyten im Mucosabereich und abgestorbenen in tieferen Lumenbereichen (x200)

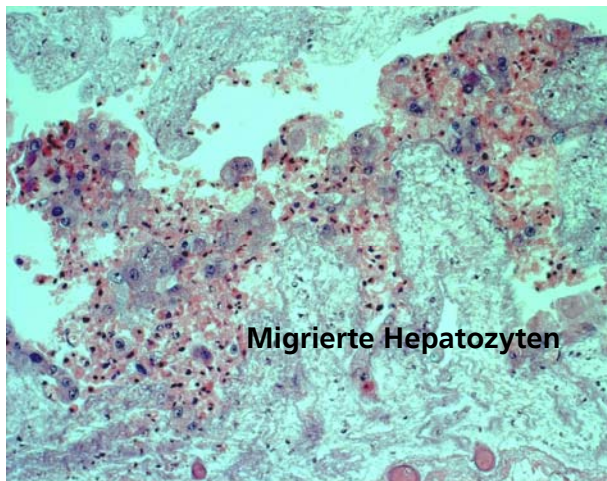


Abb. 30 HE -Färbung BR 9- migrierte Hepatozyten im Lumen der BioVaSc zwischen den Zotten der Mucosa (x200)

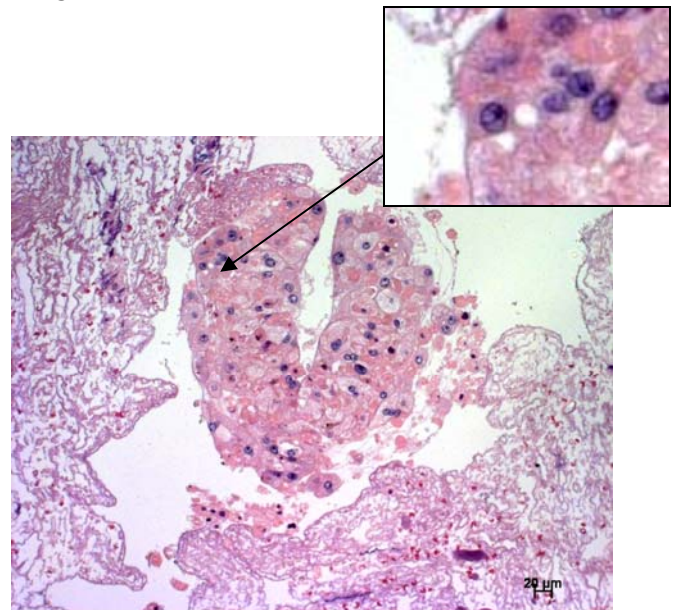


Abb. 31 HE -Färbung BR 12 –vitalen, humane Hepatozyten im Lumen der BioVaSc; Hohlräume zwischen den Zellen sind vaskuläre Strukturen Im Querschnitt

## 6.2.5 Immunhistochemische Bewertung der besiedelten Matrix nach Versuchsende

Zur genaueren Charakterisierung der Hepatozyten und ihrer Kontakte untereinander sowie ihres Proliferationsverhaltens erfolgten zusätzlich zu den Übersichtsfärbungen Antikörperfärbungen. Dabei wurden die Zellen auf die Expression spezifischer Hepatozyten- bzw. Epithelzellmarker wie Anti-Hepatoocyte und Anti-CKLP 34 (5.2.3) untersucht. Damit sollte verifiziert werden, dass es sich bei den auf der Matrix zu erkennenden Zellen um Hepatozyten handelt, die die typischen Marker exprimieren und ihren Differenzierungsstatus erhalten haben. Nach einer immunhistochemischen Färbung stellen sich Zellen, die das zu färbende Antigen enthalten, braun und Zellkerne blau dar.

Bei allen Bioreaktorläufen ließen sich großflächige Bereiche im Lumen der Matrix mit Anti-CKLP 34 (Abb. 32) und Anti-Hepatoocyte anfärben (Abb. 34). Die CKLP 34 Färbung ließ sich besonders in den Bereichen der vitalen Zellen als filamentäre Cytoskelettfärbung erkennen (Abb. 33). In diesen Gebieten zeigte sich auch bei dem Hepatoocyte-Antikörper eine typische Färbung rund-ovaler Plasmabestandteile, den hepatozytären Mitochondrien (Abb. 35). Durch die Schrumpfung der Zellen und damit Aufkonzentrierung der Plasmabestandteile stellte sich die Färbung im Bereich des Lumens dunkler (Abb. 34) dar.

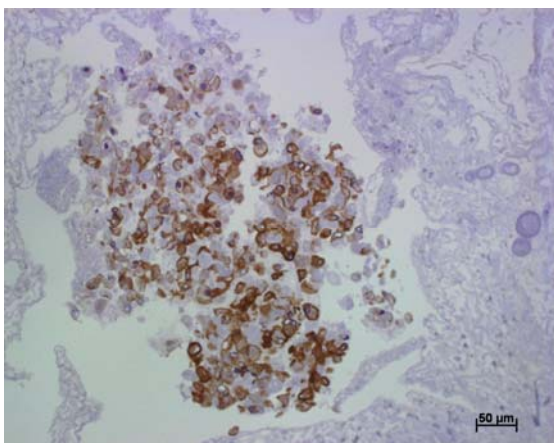


Abb. 32 AntiCKLP 34-Färbung von BR 12  
Hepatozyten im Lumen

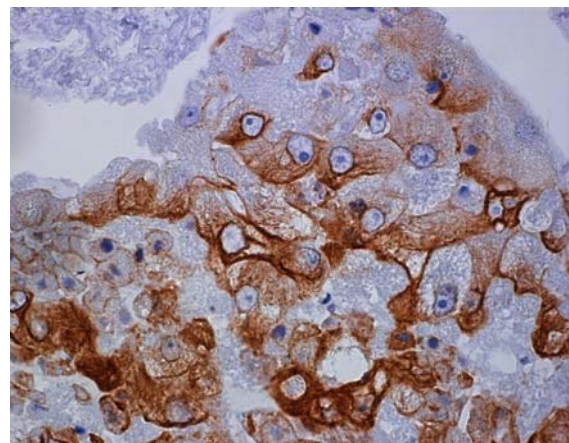


Abb. 33 AntiCKLP 34-Färbung von BR 9-  
Vitale Hepatozyten mit gefärbtem Cytoskelett  
(x630)



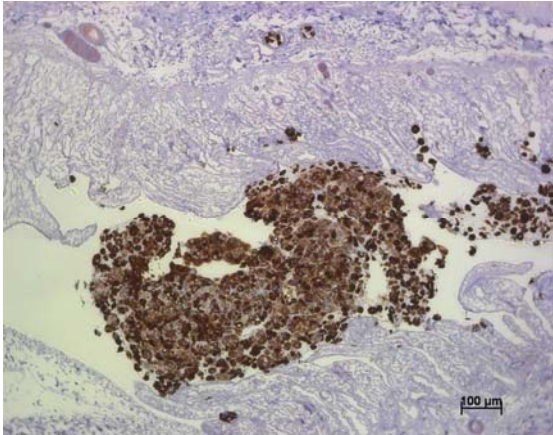


Abb. 34 Anti-Hepatocyte-Färbung BR 12-  
Hepatozyten im Lumen

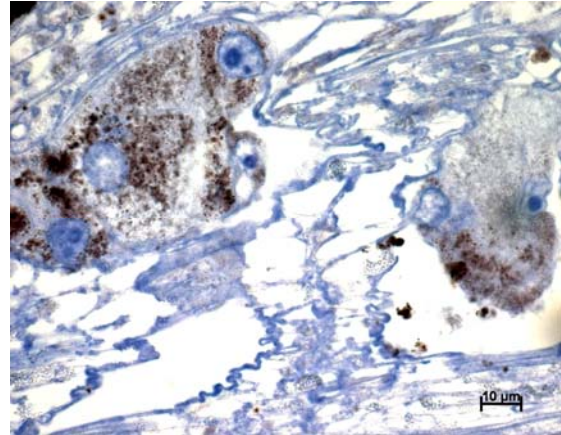


Abb. 35 Anti-Hepatocyte-Färbung BR 11-  
Hepatozyten mit gefärbten Mitochondrien

Eine wichtige Voraussetzung für die Funktion von Hepatozyten ist die Ausbildung von Zell-Zellkontakten. Deshalb wurden die Gewebeschnitte der Bioreaktoransätze auf die Ausbildung von Tight Junctions und Adhering Junctions zwischen den Zellen überprüft. Diese beiden Zellverbindungen spielen eine wichtige Rolle bei der Ableitung von durch Hepatozyten gebildeter Gallensäuren (Abb. 2). ZO-1 (Zona Occludens 1) ist ein Marker für Tight Junctions, schmalen Bändern aus Membranproteinen, die Zellzwischenräume verschließen. Dieser Antikörper ist auf den Gewebeschnitten hauptsächlich in den Membranen vitaler Zellen detektierbar. Die Abbildungen 36 bis 38 zeigen, wie sich sowohl im nativen als auch im generierten Gewebe, durch Färbung von Tight-Junction-Proteinen Gallenkanälchenstrukturen sichtbar machen lassen. Der verwendete Antikörper zeigte keine Kreuzreaktivität gegen humane Tight-Junction-Proteine. Pan Cadherin ist ein Antikörper, der an Cadherine bindet, eine Gruppe transmembraner Glykoproteine, die in Desmosomen und Adhering Junctions vorkommt. Dieser Antikörper zeigte auf den Gewebeschnitten bei vitalen Hepatozyten eine durchgängige Membranfärbung (Abb. 39), wurde aber punktuell auch in den Membranen bereits geschrumpfter Zellen exprimiert (Abb. 40).

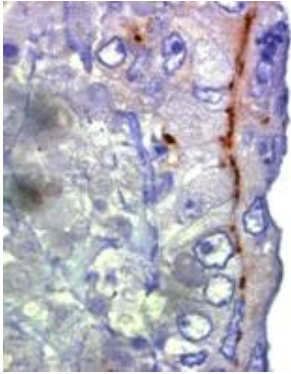


Abb. 36 Anti-ZO-1-Färbung BR 11, kapillarzyugewandte Seite mit Gallenkanälchenstruktur (x630)

Abb. 37 Porkine Leber nativ - Gallenkanälchen mit Anti-ZO-1 angefärbt

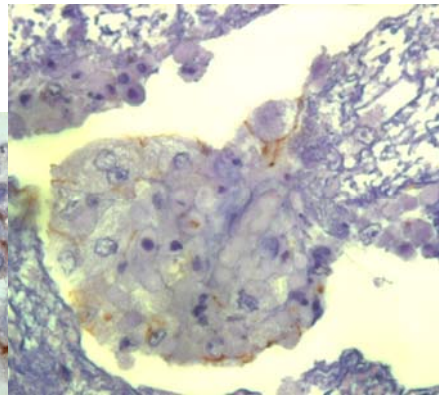
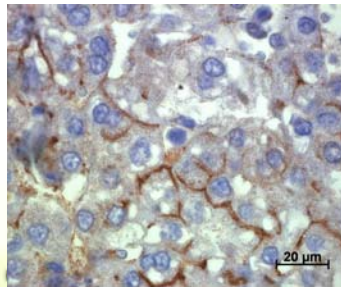


Abb. 38 Anti-ZO-1-Färbung BR 2 Gallenkanälchenstrukturen zwischen den Hepatozyten (x1000)

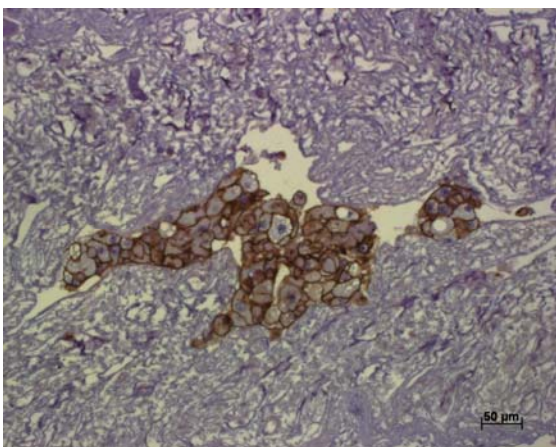


Abb. 39 Anti-panCadherin-Färbung vitaler Hepatozyten BR 12

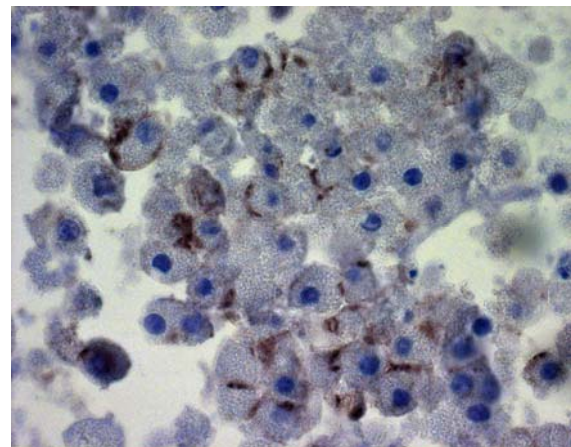


Abb. 40 Anti-panCadherin-Färbung geschrumpfter Zellen- BR 9 (x1000)

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Analyse einer Zellkultur ist das Proliferationsverhalten der Zellen. Obwohl die Leber *in vivo* ein hoch regeneratives Organ ist, teilen sich Hepatozyten *in vitro* kaum noch. Ki 67 ist ein Antigen, das im Zellkern und seiner Umgebung von sich teilenden Zellen exprimiert wird. Mit der Ki 67 Färbung ließen sich auf den Gewebeschnitten der Bioreaktoren auch nach 22-tägiger Kultur noch Areale proliferierender Zellen identifizieren (Abb. 41) - jedoch nur bei morphologisch vital aussehenden Zellen. In den Bioreaktorläufen mit humanen Hepatozyten waren nur sehr wenige, einzelne Ki 67 positive Zellkerne zu erkennen.

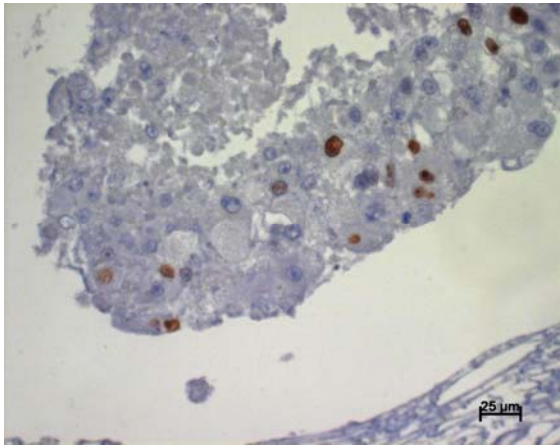


Abb. 41 AntiKi 67-Färbung BR 10 – proliferierende Hepatozyten im Matrixlumen

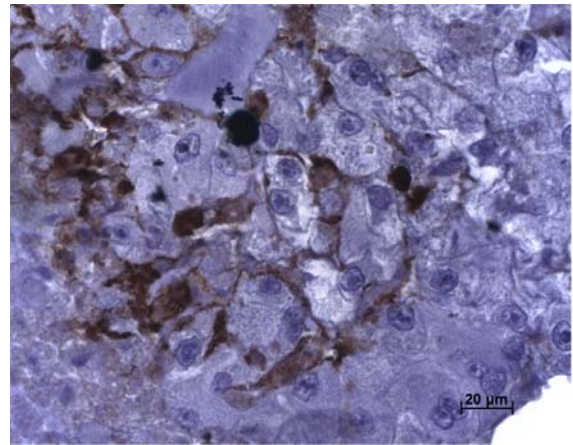


Abb. 42 AntiVEGF-Färbung BR 11 – VEGF exprimierender Hepatozytenverband

Weitere Antikörper, auf die exemplarisch getestet wurde, waren Anti-alpha1-Natrium-Kalium-ATPase (Ionenpumpe in der Zellmembran) und Anti-VEGF. Anti-alpha1-Natrium-Kalium-ATPase konnte bei den Ansätzen mit porcinen Zellen in den Membranen aller Zellen durchgängig detektiert werden (Abb. 43), in den humanen Hepatozyten nur punktuell (Abb. 44).

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) spielt eine Schlüsselrolle bei der Neoangiogenese und auch bei der Leberregeneration [Bockhorn et al., 2007]. Dieser Faktor war im Bioreaktor 11 stark exprimiert (Abb. 42), was durch die ELISA-Ergebnisse in 5.3.5. bestätigt wurde. Exemplarisch wurden die Ansätze BR 10, 11, 12 und 13 auf die Expression von VEGF getestet. Bei den humanen Experimenten ließen viel weniger Stellen und diese nur punktuell anfärben.

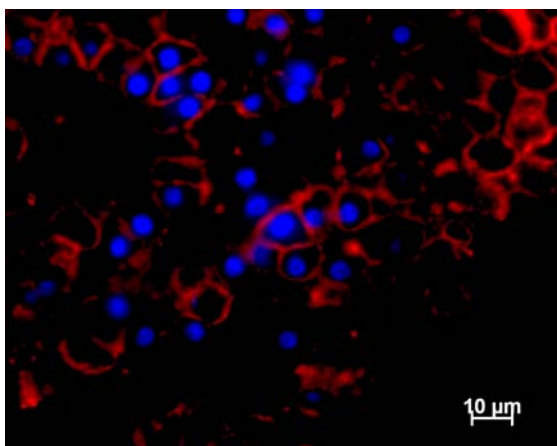


Abb. 43 Anti-alpha1-Na<sup>+</sup>Ka<sup>+</sup>ATPase – Fluoreszenzfärbung BR 9 (rot= positive Bereiche, blau= Zellkerne)

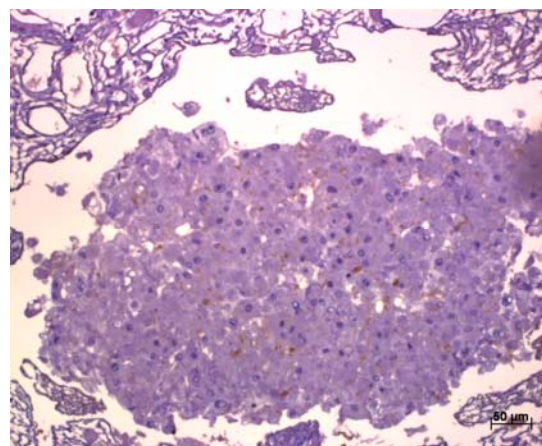


Abb. 44 Anti-alpha1-Na<sup>+</sup>Ka<sup>+</sup>ATPase – Färbung BR 13

Auf den Gewebeschnitten der humanen Ansätze BR 12 und 13 konnten zudem im Lumen der Matrix CD 31 positive Zellen detektiert werden (Abb. 45). Teilweise ließen sich Hohlraumstrukturen anfärben, was auf Neubildung von Gefäßen schließen lässt (Abb. 46).

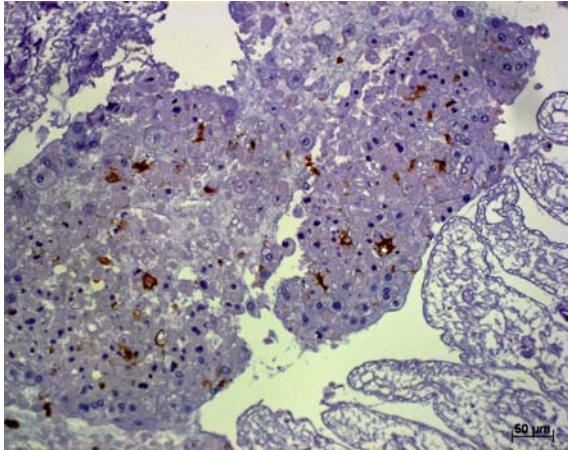


Abb. 45 Anti-CD 31-Färbung BR 12 – Endothelzellen in Co-Kultur mit Hepatozyten im Matrixlumen

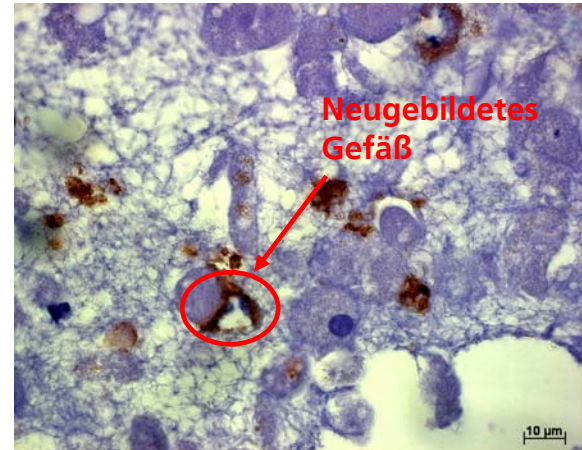


Abb. 46 Anti-CD 31-Färbung BR 12 - Endothelzellen haben ein neues Gefäß gebildet

### 6.3 Funktionstests der Medienproben

Histologische Untersuchungen sind wichtig für die qualitative Beurteilung einer Zellkultur; sie lassen jedoch keine quantitativen Aussagen über die Funktion der kultivierten Zellen zu. Entscheidend für die Leistungsfähigkeit eines bioartifziellen Lebermoduls zur Nutzung als Testsystems oder Leberersatz ist der Erhalt der zahlreichen Hepatozytenfunktionen über längere Kulturzeiträume. Entscheidende Parameter sind dabei die Albumin- und Ureasythese der Zellen sowie ihre Biotransformationsfunktionen. Des Weiteren ist es wichtig, den Verlauf unspezifischer Parameter wie Laktatbildung als allgemeinen Stoffwechsellmarker und LDH-Freisetzung als Marker für Zellsterben über den gesamten Kulturzeitraum zu überwachen. Das Gesamtmedienvolumen war bei den einzelnen Ansätzen vergleichbar und variierte zwischen 220 und 250 ml.

#### 6.3.1 Laktatdehydrogenase-Freisetzung

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches in fast allen Körperzellen vorkommt und beim Absterben der Zellen freigesetzt wird. Die Auswertung der

Laktatdehydrogenase-Konzentration in den Mediumproben über den Kulturverlauf wurde überwacht, um vergleichend bei den verschiedenen Ansätzen zu beobachten, ob und wann vermehrtes Zellsterben stattfindet. Es ist bei diesem Versuchsaufbau jedoch nicht möglich, Aussagen über die genaue Anzahl der sterbenden Zellen zu machen. LDH-Tests wurden, wie in 5.6.1 beschrieben, bei den Ansätzen BR 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 durchgeführt.

Die höchste LDH-Freisetzung zeigte sich bei BR 4, dem Ansatz, der mit der größten Anzahl an Hepatozyten ( $200 \times 10^6$ ) besiedelt wurde (Abb. 47). Die niedrigste Freisetzung ließ sich bei den Reaktoren BR 12 und 13, dem humanen Ansatz mit der geringsten Zellzahl, verzeichnen (Abb. 48).

Generell war (Ausnahme BR 7) die LDH-Freisetzung direkt nach der Matrixbesiedlung im Kulturzeitraum bis zum ersten Medienwechsel am höchsten, unabhängig davon, ob bei diesem Wechsel eine Zugabe von Dextrometorphan erfolgte (BR 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13). Bei dem Vergleich der Ansätze BR 10 und 11 zeigte sich eine verringerte LDH-Freisetzung bei BR 11 (Abb. 47)- sowohl bei Versuchsbeginn als auch über den weiteren Verlauf. Diese Bioreaktoren waren mit der gleichen Anzahl von Zellen aus derselben Leberpräparation besiedelt worden, wobei bei BR 11 neben dem arteriellen zusätzlich ein luminaler Kreislauf über 11 Dialysekapillare stattfand. BR 7 und 8, ebenfalls mit Zellen aus einer Präparation besiedelt, mit zusätzlichem luminalen Fluss über einen perforierten Silikonschlauch bei BR 8, zeigten eine höhere Anfangskonzentration von LDH bei BR 8 vor dem ersten Medienwechsel, über den gesamten Verlauf der Kulturzeit betrachtet jedoch eine geringere Freisetzung.

Die LDH-Freisetzung bei den Bioreaktoransätzen ist von Zellzahl und Versorgung abhängig. Die Übersicht aller Graphen befindet sich im Anhang.

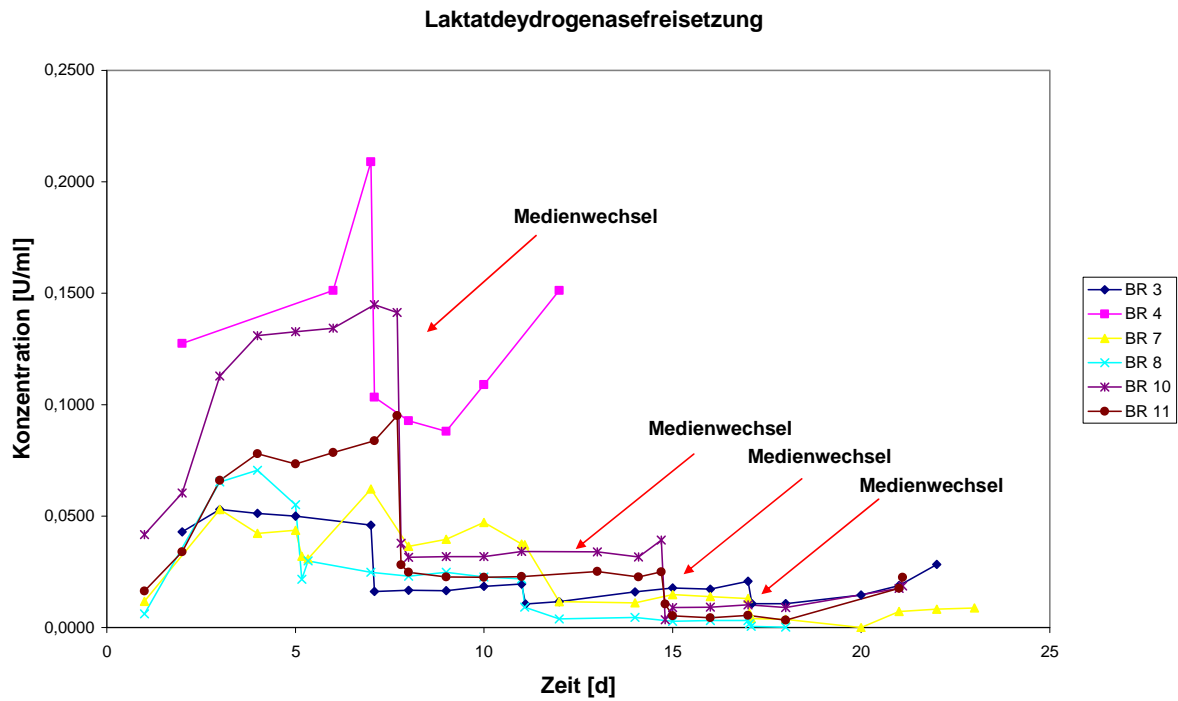


Abb. 47 Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 3, 4, 7, 8, 10 und 11 im Vergleich

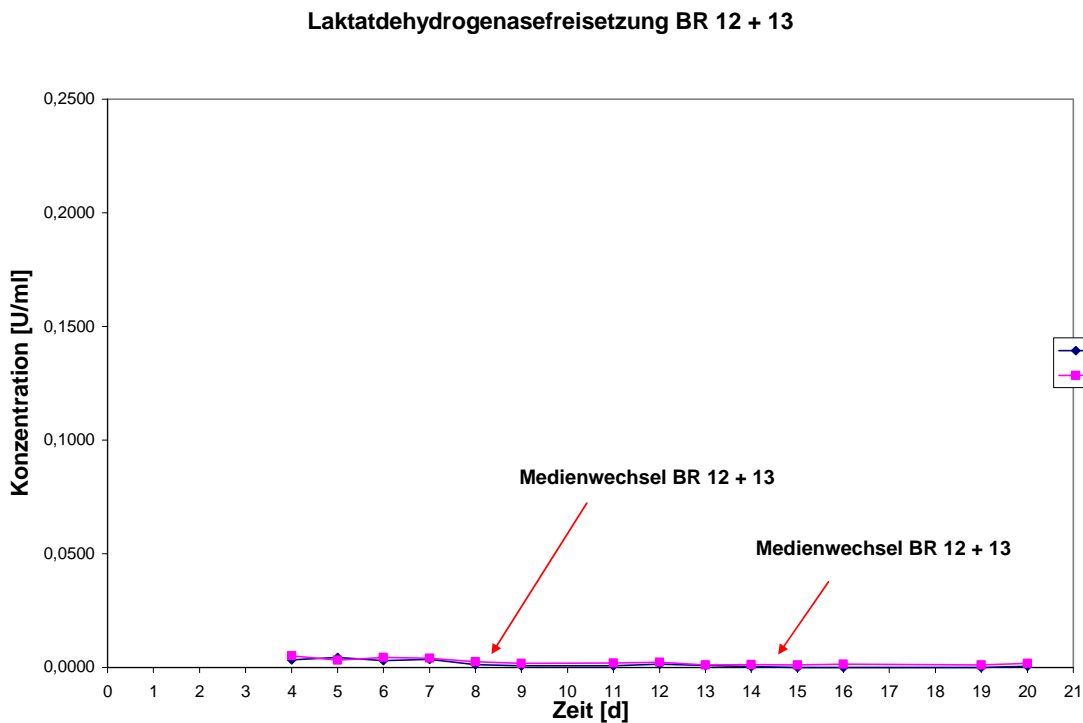


Abb. 48 Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 12 + 13

### 6.3.2 Laktatbildung

Laktat entsteht nach der Glykolyse aus Pyruvat und wird bei Leberbioreaktorstudien oft als genereller Stoffwechselformparameter mitgeführt. Eine starke Anreicherung von Laktat im Medium (oder *in vivo* im Blut) ist jedoch auch ein Marker für Sauerstoffmangel, da es unter anaeroben Bedingungen nicht möglich ist, Laktat wieder in Pyruvat umzuwandeln und zur weiteren Energiegewinnung in den Zitratzyklus einzuspeisen.

Die Laktatkonzentration im Medium wurde bei allen Bioreaktoransätzen über den gesamten Kulturzeitraum analysiert (5.6.2). In allen Läufen mit Ausnahme von BR 5 und 8 ließ sich nach vorgenommenen Medienwechseln wieder ein Anstieg des Laktatlevels im Mediums beobachten.

Bei den Reaktorläufen BR 3, 7, 9, 10, 12 und 13 zeigt sich, dass die Laktatkonzentrationen nach jedem Medienwechsel wieder auf einen konstanten Spiegel ansteigen (Abb. 50 und 51), das jedoch bei den einzelnen Ansätzen unterschiedlich hoch ist. Auch der Kurvenverlauf des BR 2, ein Reaktorlauf, bei dem kein Medienwechsel stattgefunden hat, lässt eine Sättigung ab ca. Tag 4 erkennen und danach nur noch einen sehr geringen Anstieg (Abb. 49). Bei BR 11 ist die höchste Laktatkonzentration zu verzeichnen, wobei der Kurvenverlauf nicht dem der anderen Reaktoren entspricht. Die Kurve steigt nach dem ersten Medienwechsel sehr viel höher an als davor, zeigt jedoch auch hier eine Sättigung (Abb. 50). Dabei ist ohne vergleichende Pyruvatanalyse schwer zu beurteilen, ob dieser Anstieg auf eine vermehrte Zellaktivität, z.B. durch Proliferation, zurückzuführen ist oder auf Sauerstoffmangel. Exemplarische Messungen mit einem O<sub>2</sub>-Sensor bei BR 10 zeigten keinen Abfall der Sauerstoffkonzentration im Medium während der gesamten Kulturzeit.

Die Kurve des BR 5, 7 und 8 zeigen kaum Laktatbildung.

Die Übersicht aller Laktatgraphen befindet sich im Anhang.

Laktatbildung BR 1 + 2

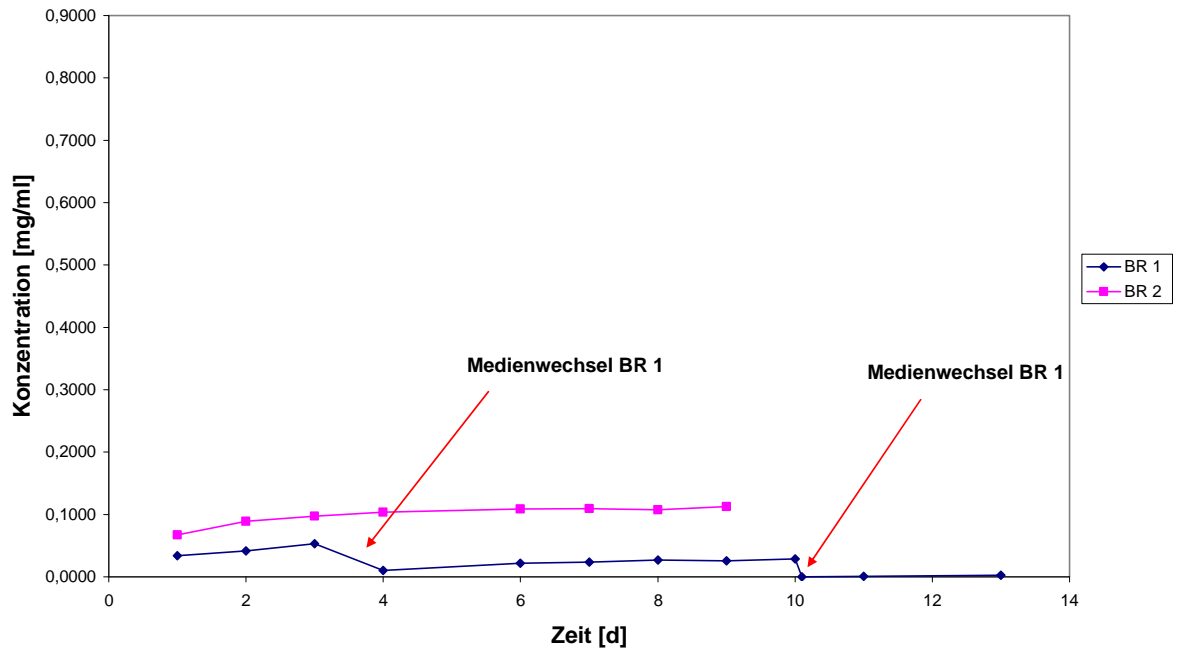


Abb. 49 Laktatbildung BR 1+2

Laktatbildung BR 10 + 11

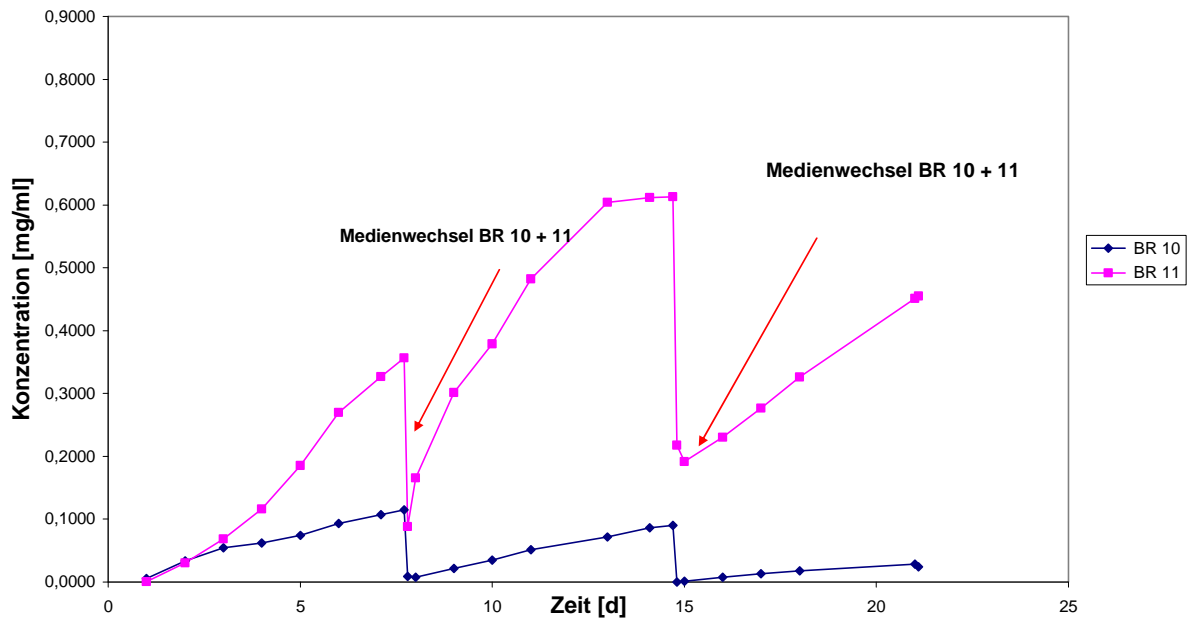


Abb. 50 Laktatbildung BR 10+11



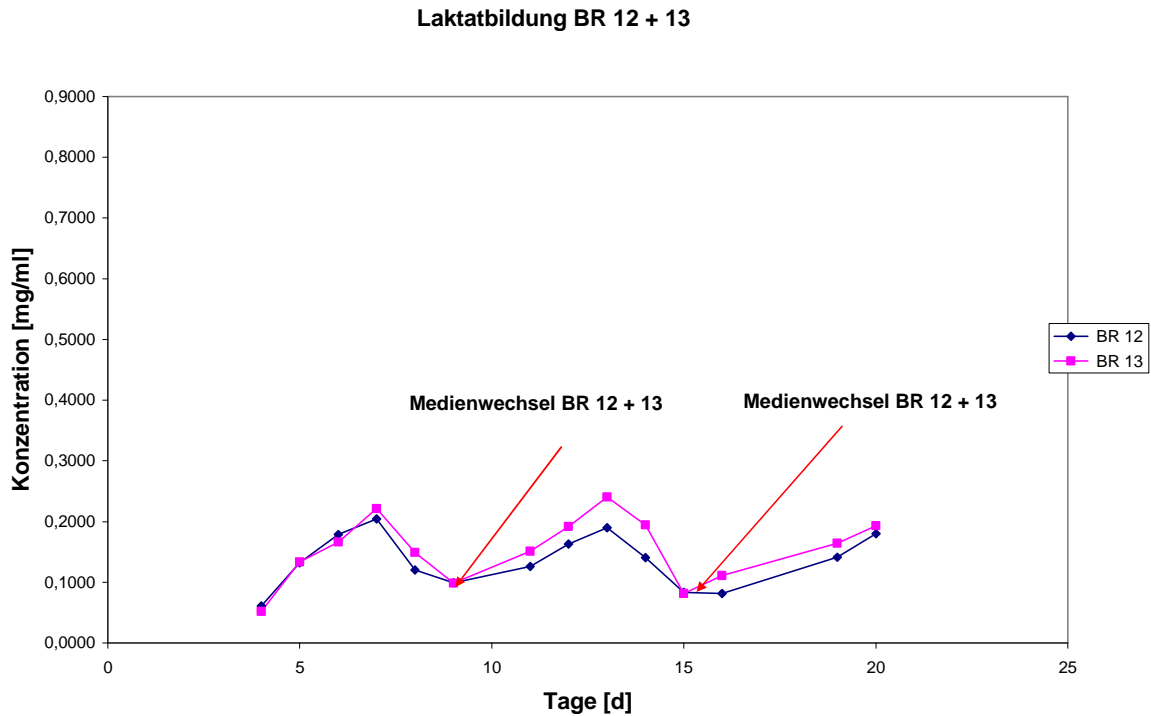


Abb. 51 Laktatbildung BR 12 +13

### 6.3.3 Harnstoffsynthese

Die Leber bildet aus dem hochtoxischen Ammoniak, das beim Abbau von Aminosäuren im Körper entsteht, Harnstoff (Urea), der über die Nieren oder Darmsekrete ausgeschieden werden kann.

Die Harnstoffsynthese wurde bei allen Bioreaktoransätzen über den gesamten Kulturzeitraum analysiert (5.6.3). Bei allen Läufen ließ sich auch nach den vorgenommenen Medienwechseln wieder ein Anstieg der Konzentration beobachten. Ähnlich wie bei der Laktatbildung zeigen die Kurven einen Sättigungsverlauf (Ausnahme BR 5, 6). Bei den Ansätzen BR 2, 3, 4, 9, 10, 11 liegt die Sättigungskonzentration unabhängig von den kultivierten Zellzahlen bei 0,1 - 0,14 mg/ml (Abb. 52 und 54). Die natürliche Varianz der Harnstoffkonzentration im Serum dieser Schweinerasse liegt zwischen 0,138 - 0,4 mg/ml [Kixmüller, 2004]. Bei BR 7 und 8 ist der Kurvenlauf nicht so eindeutig (Abb. 53) und die Harnstoffkonzentration insgesamt höher. Bei den Ansätzen 12 und 13 mit humanen Zellen ist die Ureakonzentration von Beginn der Kultur an niedriger als bei den anderen Läufen (Abb. 55).

Die Übersicht aller Harnstoffgraphen befindet sich im Anhang.

### Ureasynthese BR 3 + 4

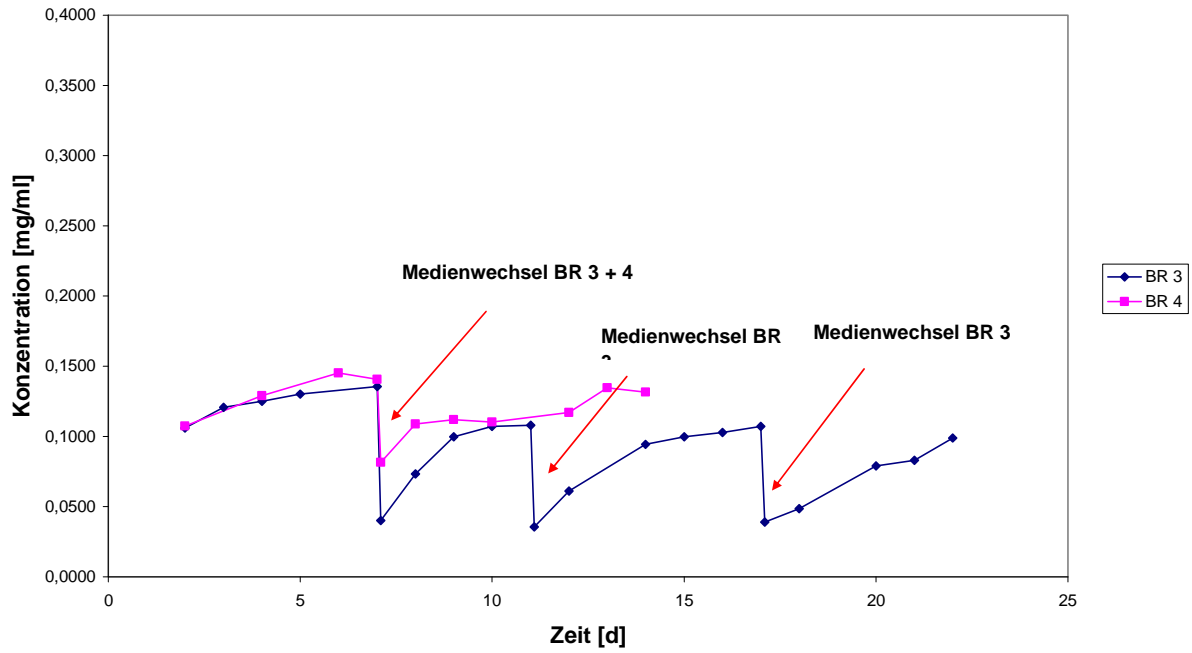


Abb. 52 Harnstoffsynthese BR 3 + 4

### Ureasynthese BR 7 + 8

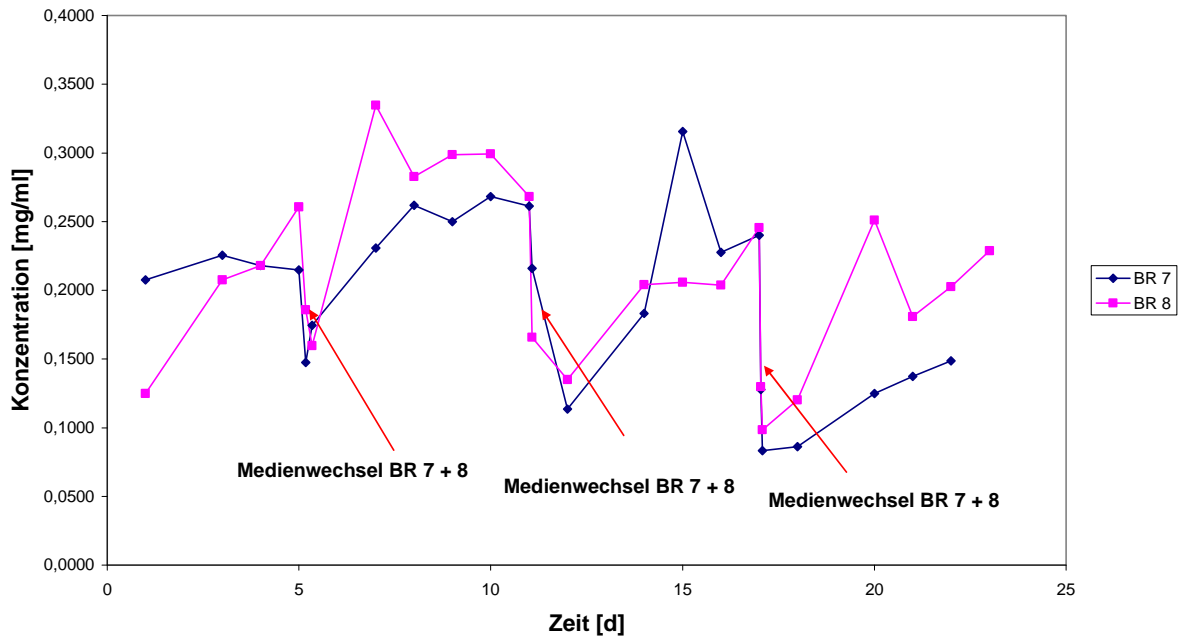


Abb. 53 Harnstoffsynthese BR 7 + 8

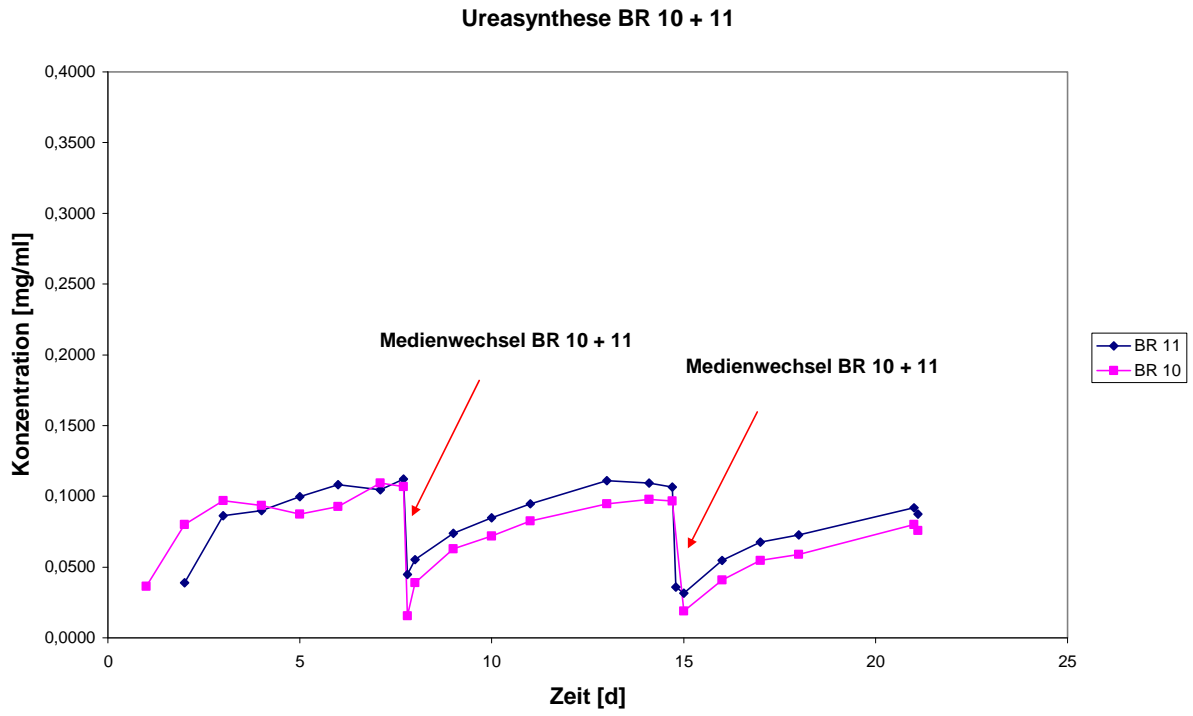


Abb. 54 Harnstoffsynthese BR 10 + 11

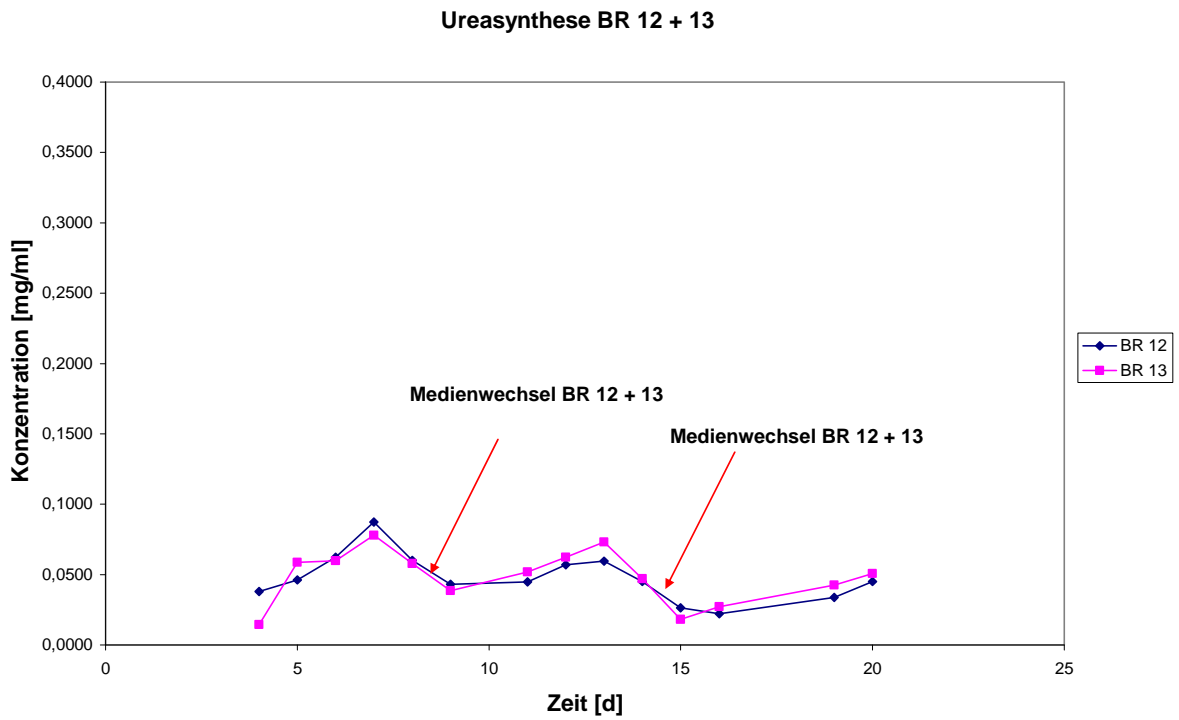


Abb. 55 Harnstoffsynthese BR 12 + 13

### 6.3.4 Albuminsynthese

Albumin ist ein Protein, dessen Synthese in der Leber durch die Hepatozyten erfolgt. Es ist zum einen zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes des Blutes verantwortlich und zum anderen ein Transportprotein für z.B. Bilirubin, Pharmaka oder deren Metabolite, was es unabdingbar in der Entwicklung von Lebermodellen macht.

Die Albuminsynthese wurde bei allen Bioreaktoransätzen über den gesamten Kulturzeitraum analysiert (5.6.4). In allen Läufen ließ sich auch nach den vorgenommenen Medienwechseln wieder ein Anstieg der Albuminkonzentration im Medium beobachten. Eine Ausnahme bildete dabei BR 8 mit insgesamt fast keiner Synthese.

Die Kurven von BR 1, 2, 3, 9 und 10 zeigen einen Sättigungsverlauf nach den einzelnen Medienwechseln (Abb. 56 und 58), der bei jeweils unterschiedlichen Albuminkonzentrationen liegt. Bei den Ansätzen BR 1 und 3 liegt die Kurve im Bereich vor dem ersten Medienwechsel höher als danach (Abb. 56).

Die Reaktorenläufe 7, 11 und 13 zeigen im Bereich zwischen dem ersten und zweiten Medienwechsel (BR 11 und 13) bzw. dem zweiten und dritten (BR 7) die höchsten Peaks (Abb. 57 und 59). Bei diesen Reaktoren wurde jeweils nach dem ersten Medienwechsel Dextrometorphan oder Ethoxycoumarin zugeführt.

Die Übersicht aller Albumingraphen befindet sich im Anhang.

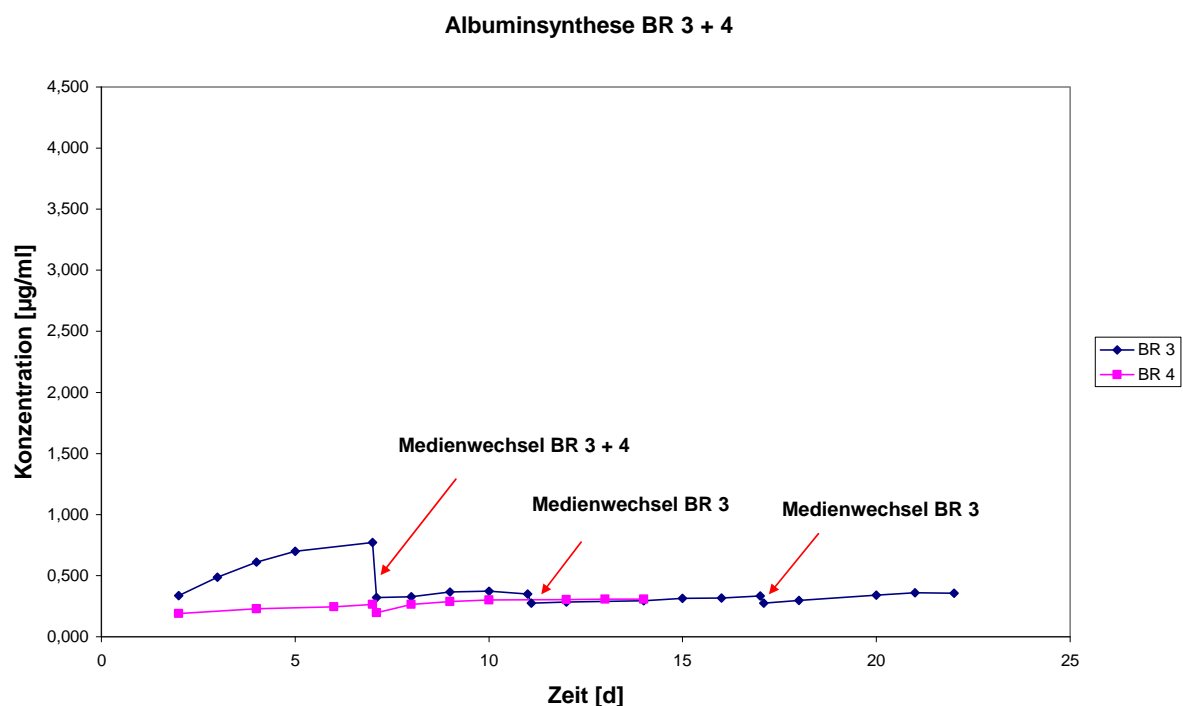


Abb. 56 Albuminsynthese BR 3 + 4

### Albuminsynthese BR 7 + 8

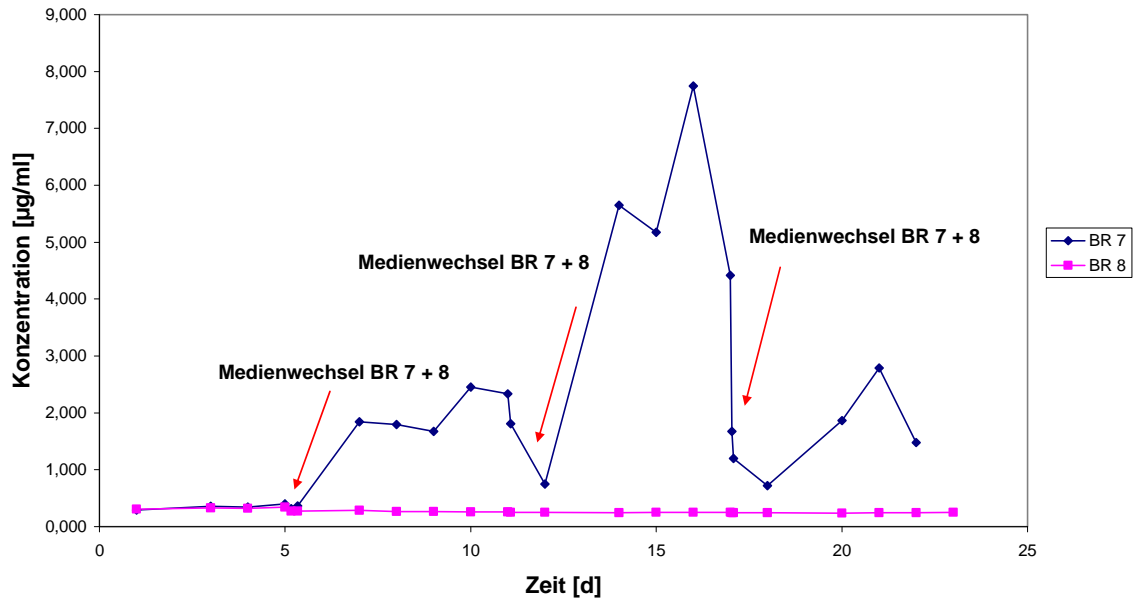


Abb. 57 Albuminsynthese BR 7 + 8

### Albuminsynthese BR 9

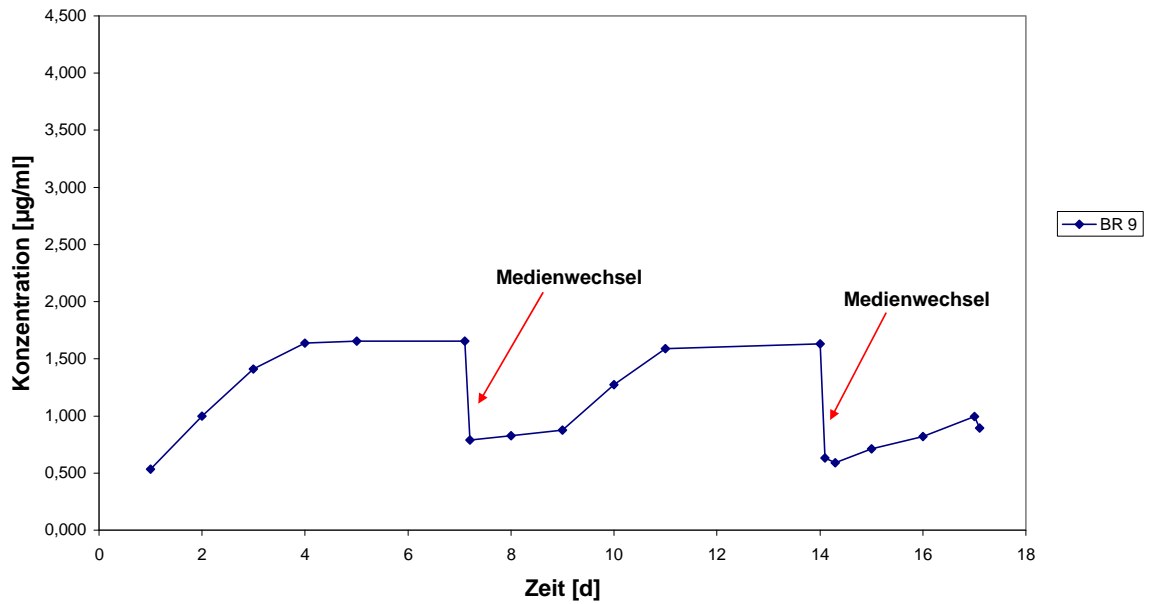


Abb. 58 Albuminsynthese BR 9

### Albuminsynthese BR 12 + 13

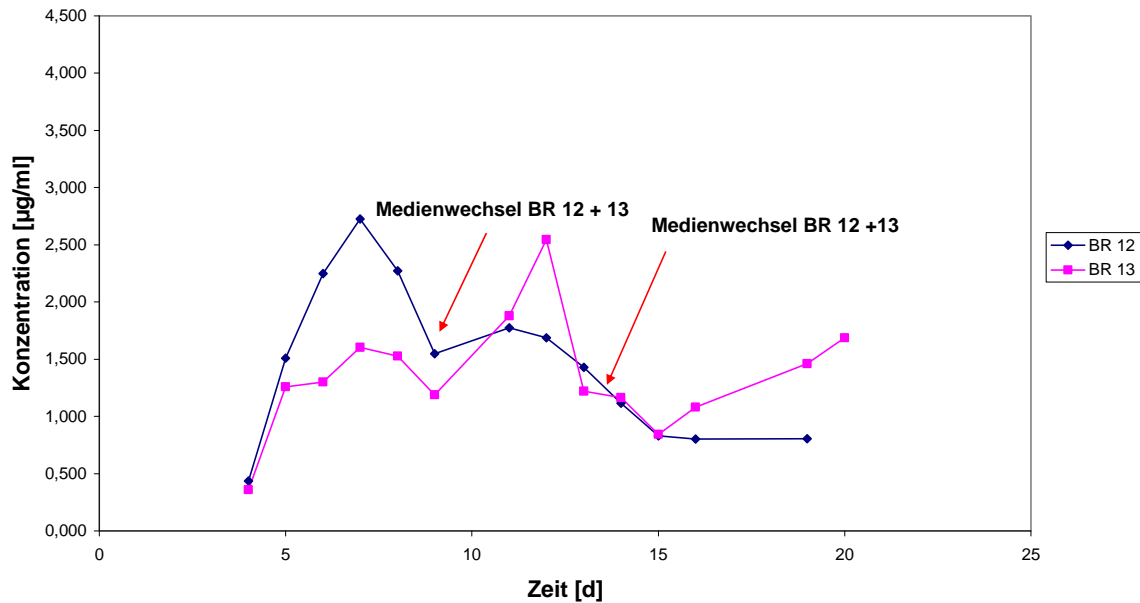


Abb. 59 Albuminsynthese BR 12 + 13

### 6.3.5 Dextromethorphanmetabolismus

Dextromethorphan ist ein Morphinabkömmling und wird zur Behandlung von Husten eingesetzt (Antitussivum). Seine Hauptmetabolite sind nach O- und N-Demethylierung durch das Enzym Cytochrom P450 2D6 in der Phase-I-Reaktion das pharmakologisch aktive Dextrorphan sowie nach der Phase-II-Reaktion dessen inaktives Glucuronid. Weitere Metabolite sind Methoxy-Methorphone und Hydroxy-Methorphone.

Dextromethorphan wurde dem Medium der Experimente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 und 13 nach dem ersten Medienwechsel in einer Konzentration von 10 µM zu gesetzt. Die Metabolite wurden anschließend per High Performance Liquid Chromatography (HPLC) am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie in der Arbeitsgruppe Pharmakogenetik gemessen.

Bei den Ansätzen BR 5, 6 und 8 ließen sich keine Metabolite im Medium nachweisen.

Die Ansätze BR 4, 7 und 9 zeigten eine Verstoffwechslung von Dextromethorphan in unterschiedlichem Ausmaß. Die größte Menge des Phase-I-Metaboliten Dextrorphan wurde im Ansatz BR 4 gebildet (Abb. 60), die anderen Metabolite waren jedoch nur in sehr geringer Konzentration zu detektieren (Abb. 61). Die beste Gesamtumsetzung von

Dextrometorphan zeigt BR 7 (Abb. 62). Hier ist nach dem ersten und zweiten Medienwechsel zu beobachten, wie die Dextrorphan-Kurve erst ansteigt und dann abfällt, während im gleichen Zuge die Konzentration des Phase-II-Metabolits (Dextrorphan-Glucuronid) ansteigt.

Bei BR 9 ist ab Tag 10 eine ähnliche Konzentrationsveränderung der beiden Metabolite zu verzeichnen, die Kurve des Phase-II-Metaboliten verläuft jedoch viel flacher (Abb. 63). Bei den humanen Ansätzen war keine Entstehung von Metaboliten im messbaren Bereich nachweisbar. Die Besiedlung der BioVaSc mit Zellen erfolgte bei diesen Versuchen erst an Tag 4 nach der Isolation, was zu Enzymaktivitätsverlust führte. Des Weiteren wurde Dextrometorphan erst an Tag 9 der Kultur zugeführt, ohne vorher die Enzymaktivität zu induzieren.

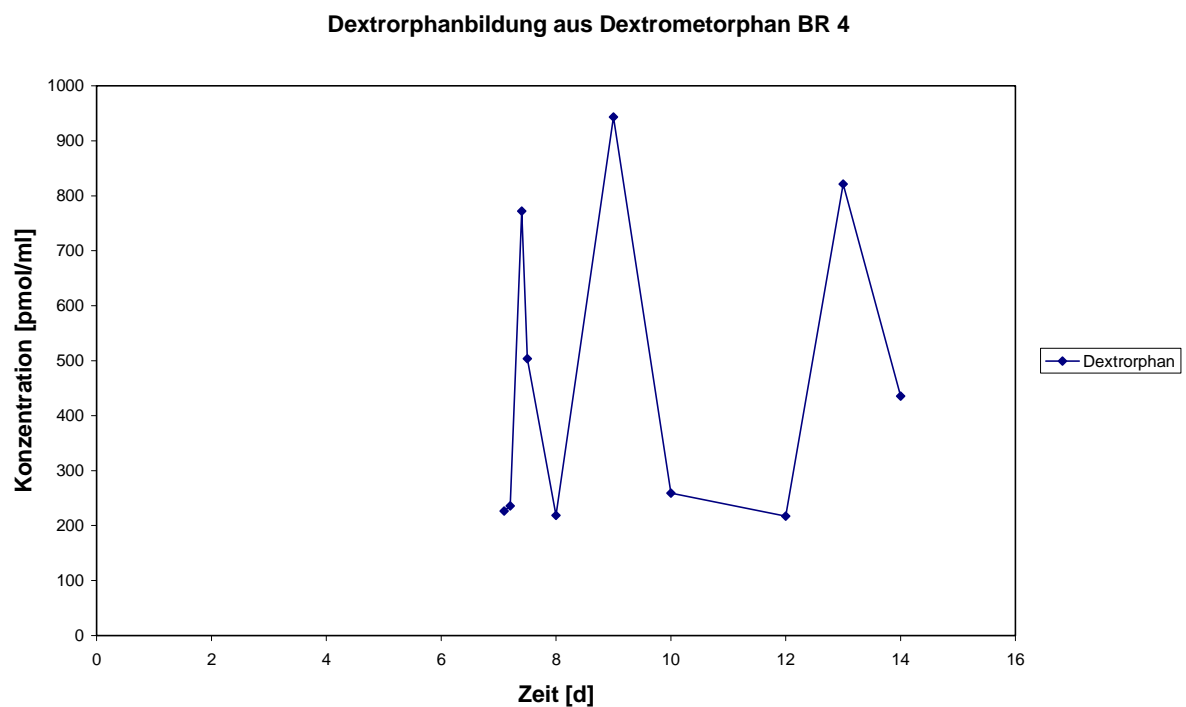


Abb. 60 Dextrorphanbildung aus Dextrometorphan BR 4

Dextrometorphanmetabolite BR 4

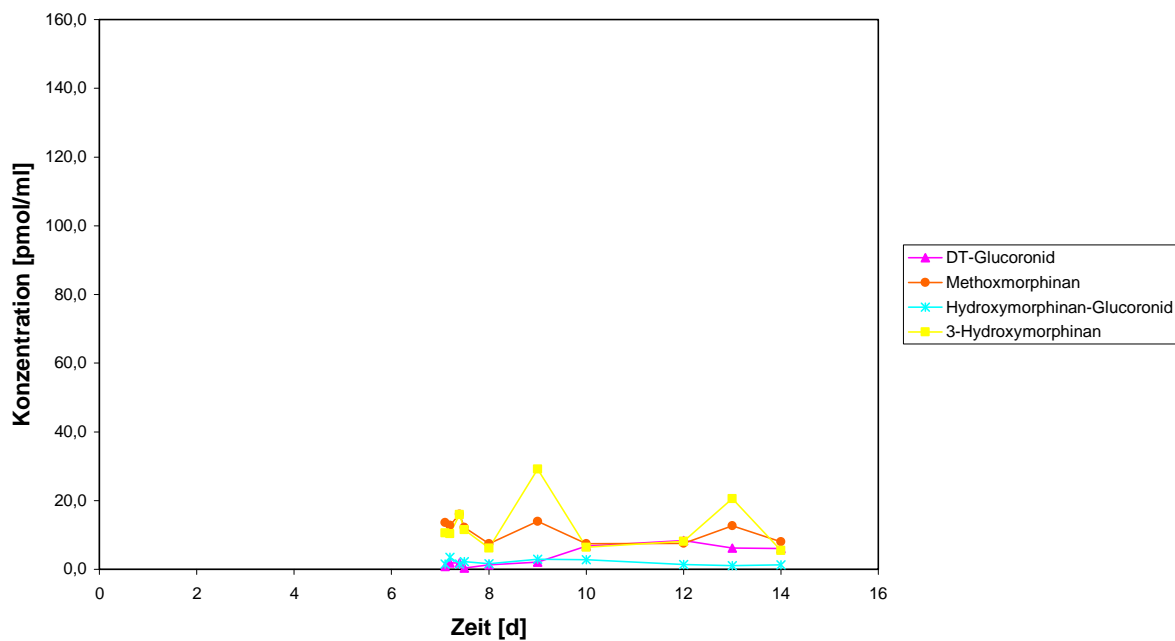


Abb. 61 Dextrometorphanmetabolite BR 4

Dextrometorphanmetabolite BR 7

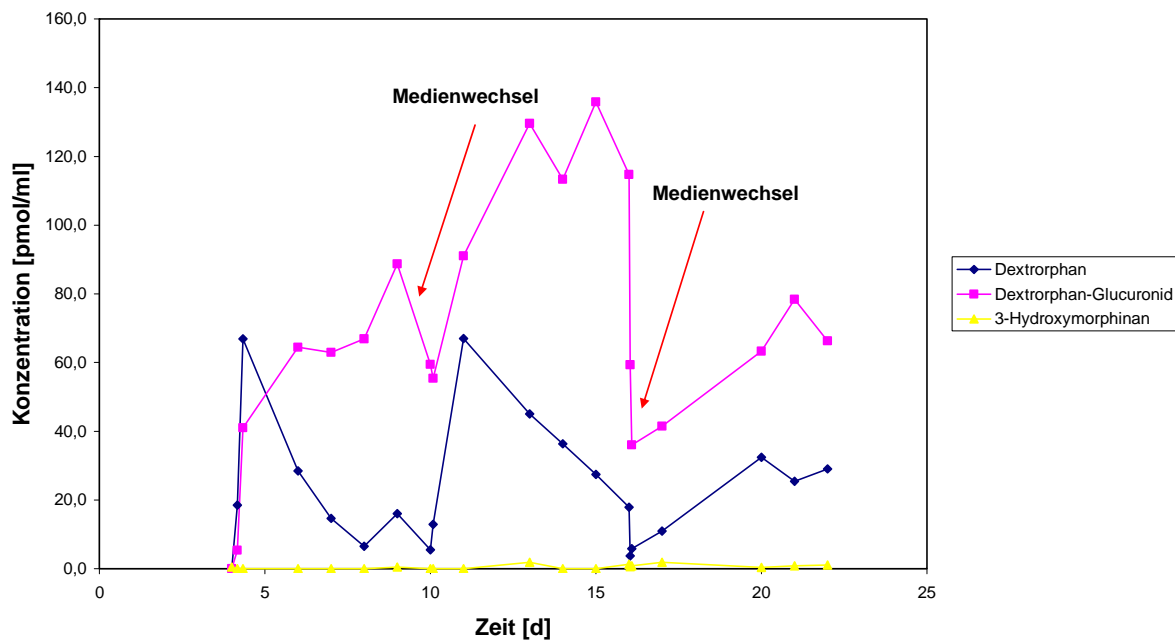


Abb. 62 Dextrometorphanmetabolite BR 7



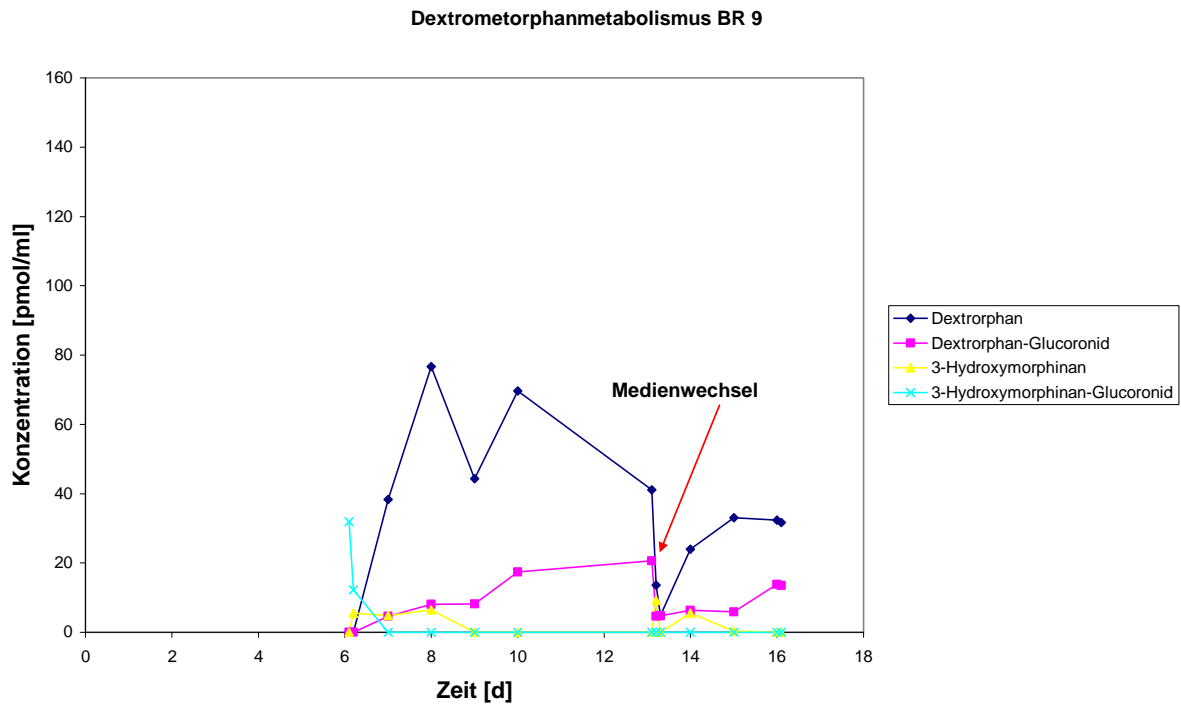


Abb. 63 Dextrometorphanmetabolite BR 9

### 6.3.6 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression

VEGF ist einer der wichtigsten Faktoren bei der Neoangiogenese und spielt auch eine Rolle bei der Leberregeneration [Bockhorn et al., 2007].

Bei den Ansätzen BR 10 und 11 wurde die Expression dieses Faktors im Medium über den gesamten Kulturzeitraum untersucht (5.6.5). Diese Ansätze waren mit den Zellen aus derselben Leberpräparation in der gleichen Zellzahl besiedelt. BR 11 hatte zusätzlich zur arteriellen Perfusion noch einen Medienkreislauf über 11 Kapillare durch das Matrixlumen. Beide Kurven zeigen in etwa einen Sättigungsverlauf, wobei die Sättigungskonzentration bei BR 11 doppelt so hoch liegt wie die bei BR 10 (Abb. 64).

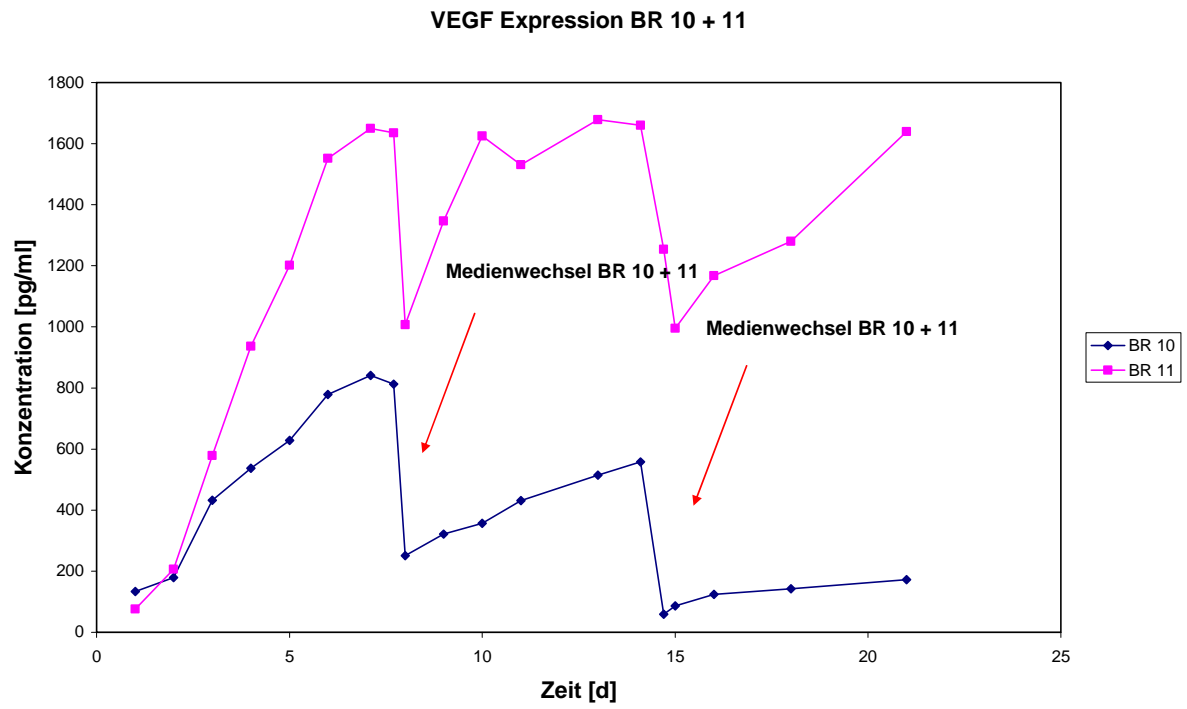


Abb. 64 VEGF Expression BR 10 + 11

## 7. Diskussion

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im menschlichen Körper. Sie erfüllt wichtige Entgiftungs- und Synthesefunktionen und ist der Hauptort für die Biotransformation von Fremdstoffen (Xenobiotika). Xenobiotika werden über das Blutkreislaufsystem zur Leber geleitet. Dort erfolgt der Transport der Stoffe durch die Endothelzellschicht der Sinusoide zu den Hepatozyten. Die Sinusoide bilden eine Gesamtoberfläche von ca. 150m<sup>2</sup> für den Austausch von Stoffen [Busse et al., 1999.] Während der para- oder transzellulären Passage durch die sinusoidalen Endothelzellen können Moleküle verändert [Irie et al., 1991] und dadurch ihr späterer Metabolismus beeinflusst werden. Die Verstoffwechslung der Xenobiotika erfolgt in den Hepatozyten in zwei Schritten (Phase-I- und Phase-II-Metabolismus) [Koolmann et al., 2003]. Die dabei entstehenden Metabolite können andere Wirkungen als der Ausgangsstoff haben. Bei der Umsetzung eines ursprünglich ungiftigen Wirkstoffs in den Hepatozyten der Leber können toxische Metabolite entstehen, die starke Nebenwirkungen hervorrufen. Aus diesen Gründen ist bei der Entwicklung neuer Medikamente die Durchführung zahlreicher teurer und zeitaufwendiger Tierversuche notwendig. Durch speziesspezifische Unterschiede im Stoffwechsel ist es jedoch möglich, dass ca. 30% der Nebenwirkungen im Tiermodell nicht auftreten, sondern sich erst in klinischen Studien und/oder nach der Zulassung zeigen, was dazu führt, dass Medikamente wieder vom Markt genommen werden müssen. Ab 2010 wird deshalb der Ausschluss toxischer Metabolite eine Voraussetzung für die Zulassung neuer Medikamente durch die „Food and Drug Agency“ (FDA) sein.

Es gibt für Metabolismusstudien verschiedene einfache *in vitro* Testsysteme basierend auf isolierten Leberenzymen, Primärzellkulturen oder Leberschnitten [Brandon et al., 2003]. Jedoch liegt noch kein kommerzielles, organoides (organähnliches) Lebermodell vor, das Langzeitstudien an primären Hepatozyten ohne Funktionsverlust ermöglicht. Die bisherigen Testsysteme zeigen oft nur Teilfunktionen der Leber und erlauben somit nur begrenzte Aussagen bezüglich zu erwartender *in vivo* Wirkungen. Die Medikamenteneinnahme lässt sich an ihnen nicht simulieren. Teilaspekte wie Zytotoxizität nach Mehrfacheinnahme eines Wirkstoffes können nur rudimentär untersucht werden.

Ein weiterer möglicher Einsatz für ein biologisches Leberersatzgewebe ist die Behandlung von akutem Leberversagen, da dieses durch den Ausfall der Entgiftungsfunktion der Leber zu toxinvermitteltem Organversagen und hepatischer Enzephalopathie führen kann. In den USA stehen >17.000 Menschen auf der Warteliste für eine Lebertransplantation [<http://www.optn.org/latestData/rptData.asp>;2007]. Die Statistik der letzten Jahre belegt, dass 30% davon während der Wartezeit versterben werden. Um die Zeit bis zu einer Transplantation oder möglichen Regeneration zu überbrücken, bedarf es der Leberersatzsysteme, die die Funktionen der Leber unterstützen oder ersetzen können.

Die bisher entwickelten und getesteten extrakorporalen, maschinellen Systeme können lediglich Detoxifikationsfunktionen [van der Kerhove et al., 2004] der Leber, nicht aber Synthese- oder Biotransformationsleistungen für den Patienten übernehmen. Bioartifizielle Lebermodule auf der Basis von in Bioreaktoren integrierten Hepatozyten sind generiert worden, um ein größeres Spektrum an Leberfunktionen zu unterstützen. Bei den bisher entwickelten Systemen wird jedoch meist nur ein Zelltyp (Hepatozyten) eingesetzt, wodurch sich die Leber nicht in ihrer Komplexität repräsentieren lässt; zudem ist die Bioaktivität der eingesetzten Zellen nicht standardisierbar.

Wesentlich für den Aufbau von Lebermodulen sowohl zur Verwendung als Testsystem für Metabolismusstudien, als auch für Ersatzsysteme, ist die Wahl der geeigneten Zellquelle [Busse et al.,1999]. Es gibt Leberersatzsysteme, die auf frisch isolierten, porcinen (z.B. BLSS- Bioartificial Liver Support System von Excorp Medical) oder humanen Hepatozyten (MELS- Modular Extracorporeal Liver System von der Charité und Humboldt Universität in Berlin) basieren oder Zelllinien (ELAD -Extracorporeal Liver Assist Device von Vitagen) verwenden [van der Kerhove et al., 2004].

Für die Entwicklung von Lebertestsystemen werden meist frisch isolierte Ratten- [Nüssler et al., 2001], Schweine- [Langsch et al. 2001] oder humane Hepatozyten [de Bartolo et al., 2006] verwendet.

Biopsiematerial für die Isolation humaner, primärer Hepatozyten ist rar, da nur Lebertumorbiopsate bzw. Lebergewebe, das nicht zur Transplantation geeignet ist, zur Verfügung stehen. Hepatozytenzelllinien oder transgene Zelllinien besitzen nur geringe oder eingeschränkte Enzymaktivitäten [Park et al., 2005]. Xenogene, primäre Hepatozyten wiederum zeigen zwar eine gute Funktionalität; der Metabolismus von

Wirkstoffen weist jedoch speziesspezifische Unterschiede zur humanen Biotransformation auf. Bis es geeignete, funktionelle Zelllinien gibt oder funktionelle Hepatozyten durch Stammzellendifferenzierung gewonnen werden können, sind jedoch xenogene Hepatozyten für die Forschung zur Entwicklung von Lebermodulen die Zellquelle der Wahl.

Die Zellmenge, die aus Rattenlebern isoliert werden kann, ist durch deren Größe stark limitiert. Porcine Hepatozyten sind gut verfügbar und in ausreichender Zahl zu isolieren. Sie haben zudem bemerkenswert ähnliche physiologische Charakteristika und Stoffwechselfunktionen im Vergleich zu humanen Hepatozyten [Tsiaoussis et al., 2001]. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit porcine Hepatozyten zur Etablierung von Methodik und Aufbau des Lebertestsystems verwendet. Es ließ sich am Schweinmodell ein Co-Kultursystem von Hepatozyten und Endothelzellen aufbauen, das eine Langzeitkultur der Zellen unter Erhalt von Differenzierung und zellspezifischer Funktionen ermöglichte. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse waren am Ende der Arbeit problemlos auf das humane Modell übertragbar.

Zum Aufbau eines funktionierenden Gewebes ist neben der Zellwahl auch die Wahl einer geeigneten Trägerstruktur wichtig. *In vivo* besteht ein Organ aus gewebetypspezifischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM). Dabei basieren Struktur und Funktion des Organs sowohl auf den komplexen Zell-Zellkontakten als auch auf Zell-Matrix-Interaktionen. Diese lassen sich in drei Typen von Mechanismen unterteilen: Typ-I-Mechanismen steuern Zelladhäsion und Migration, Typ-II-Mechanismen regulieren Zellproliferation, Differenzierung, Überleben und Absterben und Typ-III-Mechanismen induzieren Matrixumbauprozesse. Die ECM ist kein starres Gebilde, sondern wird von den Gewebszellen permanent umgebaut, abgebaut und aufgebaut. Ihre Hauptbestandteile sind Kollagene, elastische Fasern und Glykosaminoglykane; aus der Vielfalt der Interaktionen dieser Bestandteile ergeben sich die gewebetypspezifischen Eigenschaften einer Matrix, die beim Tissue Engineering die Charakteristika der Trägerstrukturen definieren [Martins-Green, 2001].

Damit isolierte Hepatozyten in der Kultur ihre Funktionalität behalten, ist die Bereitstellung einer möglichst *in vivo* ähnlichen Mikroumgebung wichtig. Dazu gehören neben einer geeigneten Matrix auch die Co-Kultur mit nicht-parenchymalen Leberzellen sowie die Gewährleistung der Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Wie in 3.2.3 beschrieben, ist es aufgrund der hohen Syntheseraten besonders bei Hepatozytenkulturen wichtig, die kontinuierliche Versorgung der Zellen sowie den Abtransport von Metaboliten zu gewährleisten.

Durch die Imitation von Gefäßstrukturen in Hohlfaserreaktoren können diese Bedingungen zum Teil erfüllt werden; die Flussdynamik des Blutes in den Lebersinusoiden und die riesige Oberfläche zum Stoffaustausch wird hierbei jedoch nicht erreicht. Nur ca. ein 100stel der natürlichen Oberfläche steht den Zellen für Stoffaustausch zur Verfügung.

Der Einsatz einer biologischen vaskularisierten Trägerstruktur (BioVaSc) kombiniert die Vorteile eines Gefäßsystems mit den Vorteilen der Verwendung einer nativen, azellularisierten Matrix aus natürlichen ECM Bestandteilen, wie Kollagen. Sie basiert auf einem 10 - 15 cm langen Stück porcinen Jejunums, welches sich unter Erhalt der Gefäßsystemstrukturen inklusive des arteriellen Zuflusses sowie des venösen Abflusses chemisch azellularisieren lässt. Das Gefäßsystem bietet durch ein venöses sowie ein arterielles System und zahlreiche Verästelungen eine sehr große Oberfläche zum Stoffaustausch.

Für den Aufbau von Co-Kultursystemen wurden bisher hauptsächlich Kupferzellen und Endothelzellen [Zichenko et al., 2006] herangezogen. Endothelzellen regulieren den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebszellen durch para- und transzellulären Transport von Molekülen und spielen über die Neoangiogenese und die Zytokinproduktion eine große Rolle bei der Leberregeneration [LeCouter et al., 2003]. Deshalb wurden die Hepatozyten in der vorliegenden Arbeit mit Endothelzellen co-kultiviert.

Bei der Co-Kultur von zwei Zelltypen ist es schwierig, geeignete Kulturbedingungen zu finden, die beiden Arten gerecht werden. Nicht nur bezüglich des Nährmediums, sondern auch in Hinsicht auf die Trägerstruktur und mechanische Stimuli während der *in vitro* Kultur stellen Zellen unterschiedliche Ansprüche. Eine Trägerstruktur muss die gewebetypspezifische

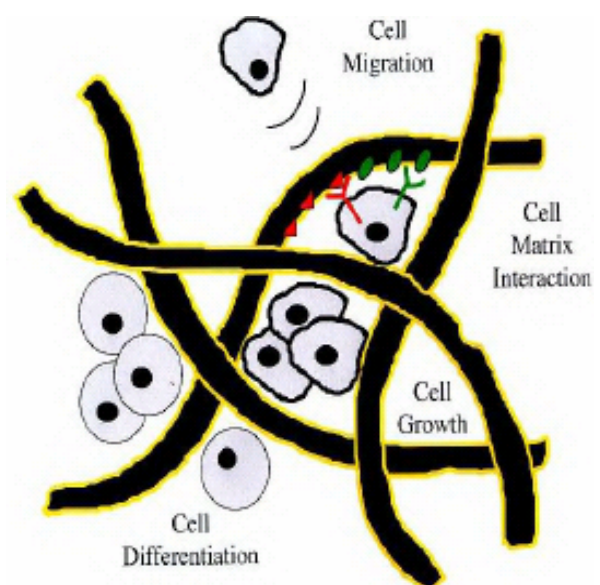


Abb. 65 Zell-Matrix-Wechselwirkungen [Mertsching et al., 2003]

Organisation der Zellen ebenso gestatten wie die spezifischen Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte und die mechanische Unterstützung, diese auszubilden und zu erhalten (Abb. 65). Deshalb kann es kein optimales Trägermaterial für alle Gewebe geben, sondern diese müssen gewebespezifisch optimiert werden.

Die Verwendung der BioVaSc erlaubt sowohl die physiologische Versorgung der Zellen über ein Gefäßsystem als auch in bisher nicht gezeigter Weise die räumlich getrennte Co-Kultur von Hepatozyten und Endothelzellen entsprechend ihrer unterschiedlichen Bedürfnisse.

Die Endothelzellen können in den röhrenförmigen Strukturen des erhaltenen Gefäßsystems angesiedelt werden und sind dort über die Perfusion mit Medium unter Simulation des natürlichen Blutflusses mechanischem Stress ausgesetzt, den sie zum Erhalt ihrer Differenzierung und Funktionalität benötigen.

Die Hepatozyten, die empfindlich auf Scherstress reagieren, lassen sich im Lumen der Matrix (ehemaliger Darm) ansiedeln und haben dort die Kollagenstrukturen der azellularisierten Mucosa zur Adhäsion und Migration.

Die Entwicklung eines *in vitro* Lebertestsystems auf Basis der BioVaSc stellt die Möglichkeit in Aussicht, zum ersten Mal Wirkstoffe arteriell zu applizieren und anschließend Metabolite venös charakterisieren zu können. So kann die *in vivo* Applikation von Arzneimittel *in vitro* komplett simuliert werden. Auch der Transport des Ausgangsstoffes und der späteren Metabolite durch die sinusoidale Endothelzellschicht lässt sich *in vitro* darstellen. Ein solches System wäre Tierversuchen überlegen, da deren Ergebnisse durch speziesspezifische Unterschiede im Stoffwechsel nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind.

#### Rebesiedlung des Gefäßsystems mit Endothelzellen (EC) und endothelialen Vorläufern

Die Endothelzellen aus der Leber erwiesen sich als ungeeignet zur Besiedlung, da es nicht möglich war, nach der herkömmlichen Isolationsmethode Reinkulturen zu gewinnen. Differenzierte Endothelzellen ließen sich nach Versuchsende bei den durchgeführten Versuchen nicht detektieren.

Dies ist durch den geringen Anteil von Endothelzellen (< 10%) in den Zellsuspensionen vor der Besiedlung begründet. Durch fraktionierte Ablösemethoden oder Zellsortierung könnte dieses Problem zu lösen sein.

Alternative Zellquellen sind adulte EC aus anderen Geweben oder endotheliale Vorläuferzellen. Da adulte Endothelzellen eine heterogene Fraktion sind und sinusoidale EC sehr spezifische Funktionen übernehmen, wurden Vorläuferzellen verwendet, unter der Hypothese, dass diese das Potential haben in gewebetypspezifische EC zu differenzieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eindeutig belegt werden, dass **endotheliale Vorläuferzellen** aus Knochenmarksaspirat unter den entsprechenden Kulturbedingungen in EC differenzierbar sind. Sie wurden für die Rebesiedlung des Gefäßsystems eingesetzt. Mittels immunhistochemischer Methoden ließ sich eine **Differenzierung anhand der Expression endothelzellspezifischer Marker** nachweisen. Die Matrix ist demzufolge für Stammzelldifferenzierung geeignet.

Dies war jedoch nur möglich bei Ansätzen, bei denen auf eine Fluoreszenzmarkierung der Vorläuferzellen verzichtet wurde. Das lässt vermuten, dass die CDFA SE-Markierung der Zellen ihr Differenzierungspotential einschränkt. Fluoreszenzmarkierung eignet sich also nur zur Eruierung der Besiedlung, nicht aber für Differenzierungsversuche. In den ersten Versuchen war es wichtig, die Besiedlungsdichte der Zellen im Blutgefäßäquivalent zu überprüfen, um so Zellverteilung und Zelladhäsion zu kontrollieren; danach wurden die Studien zum Differenzierungsverhalten an unmarkierten Zellen durchgeführt.

**Die humanen, mikrovaskulären Endothelzellen** aus der Dermis einer Präputienbiopsie (Tab. 2) konnten ebenfalls erfolgreich zur Rebesiedlung des Gefäßsystems eingesetzt werden und **exprimierten auch nach 34-tägiger Kultur noch zellspezifische Marker**.

#### Rebesiedlung des Lumens mit Hepatozyten

Nach Versuchsende zeigte sich bei 10 Experimenten im Lumen der Trägerstruktur eine gewebeartige Masse. Eine solche Beobachtung konnte bisher weder bei Monolayer- noch Sandwichkulturen gemacht werden. Diese Zellmasse hatte mehr Volumen als die vorher eingesetzte Hepatozytensuspension. Im Kulturverlauf war bei diesen Ansätzen ein Anschwellen des Lumens zu beobachten. Dies unterschied sich deutlich von ausschließlich mit Flüssigkeit gefülltem Darmlumen, makroskopisch war eine gewebeähnliche Substanz erkennbar. Dieses „**Gewebe**“ ist **durch proliferierende Hepatozyten** entstanden, die sich jedoch in der HE-Übersichtsfärbung als nekrotisch



darstellten. Ein Indiz für die Zellvermehrung ist, dass sich in den Kulturen in der Anti-Ki 67-Färbung auch nach 20 Tagen noch proliferierende Zellen zeigten. Ursache für das Absterben der Zellen war wahrscheinlich die Unterversorgung im Inneren des Darms. Anhand der LDH-Kurven ist zu vermuten, dass die starke Proliferation und das anschließende Zellsterben am Anfang der Kultur stattfanden. In allen Ansätzen waren in diesem Bereich zwischen Besiedlung und erstem Medienwechsel die höchsten LDH-Konzentrationen zu messen. Im weiteren Versuchsverlauf war nur noch wenig LDH-Freisetzung zu beobachten.

In den letzten beiden durchgeführten Experimenten waren keine nekrotischen Bereiche in der Histologie erkennbar.

Zellsterben ist verursacht durch Versorgungsdefizite und zu große Diffusionsdistanzen zwischen Nährmedium und Zellen. Die maximale Diffusionsstrecke von Blut im Körper liegt bei 0,8 mm [Wallis et al., 2003]. Die beiden oben erwähnten Experimente wurden mit der geringsten Zellzahl an Hepatozyten ( $14$  bzw.  $19 \times 10^6$ ) besiedelt; alle Zellen befanden sich in unmittelbarer Nähe der in der Mucosa und Darmwand liegenden Gefäße. In der Leber *in vivo* ist jeder Hepatozyt direkt mit einem Sinusoid assoziiert [Schiebler et al., 1984]. Dadurch, dass die vaskulären Strukturen in der BioVaSc nur in Darmwand und Mucosa lokalisiert sind, kann durch die Perfusion über den arteriellen Zufluss nur eine begrenzte Menge Hepatozyten versorgt werden.

In den vorhergehenden Experimenten waren zu hohe Zellzahlen zur Besiedlung der Trägerstruktur gewählt, was zu lokaler Unterversorgung und daraus resultierendem Absterben der Zellen führte.

Eine verbesserte Versorgung der Hepatozyten (Zellzahl  $63 \times 10^6$ ) ließ sich in einem Experiment durch eine zusätzliche, luminale Perfusion der Matrix mit 11 Dialysekapillare gewährleisten. Sowohl im Bereich der Mucosa als auch in Nähe der Kapillaren waren hier vitale Zellen zu sehen, während die nekrotischen Bereiche zwischen diesen beiden Zonen vergleichsweise klein erschienen.

Drei weitere Ansätze verfügten ebenfalls über eine zusätzliche Perfusion durch das Lumen über einen perforierten Silikonschlauch bzw. ein Stück azellularisierten Dünndarm, wodurch sich histologisch keine Verbesserung bezüglich der Zellvitalität erkennen ließ.

Es ist grundsätzlich möglich, durch den Anschluss eines luminalen Kreislaufes die Versorgungskapazität der Matrix entscheidend zu erweitern. In späteren Arbeiten muß

die optimale Versorgung der Hepatozyten unmittelbar nach der Besiedlung durch zusätzliche Perfusionsmöglichkeiten weiter evaluiert und standardisiert werden.

Die immunhistochemische Bewertung der besiedelten Matrix nach Versuchsende zeigte, dass die **morphologisch vital aussehenden Hepatozyten** ein **intaktes Zytoskelett** aufwiesen, **hepatozytäre Mitochondrien** enthielten und **verschiedene Zell-Zellkontakte wie Tight-Junctions und Adherens-Junctions** aufwiesen. In den nekrotischen Bereichen war zu beobachten, dass die Zellen erst ihr Proliferationpotential verloren, dann die Zell-Zellkontakte und danach allmählich auch weniger Zytoskelettfilamente exprimierten, während die Anti-Hepatozyten-Färbung (Mitochondrien) konzentrierter erschien. Ähnliche Veränderung in der Ultrastruktur der Zellen wiesen Berry et al. bei Hepatozyten, die als Monolayer kultiviert wurden, nach. Diese Zellen begannen Zell-Zellkontaktkomplexe zu endozytieren, was Einfluss auf die Orientierung des Zytoskeletts und der Zellorganellen hat [Berry et al., 1991].

Die immunhistochemische Analyse der Experimente belegt weiterhin eine gewebetypspezifische Reorganisation der Zellen mit der Entwicklung von **Gallenkanälchenstrukturen und Neoangiogenese** in der Darmwand und den Gewebestrukturen im Lumen. Diese Neoangiogenese kann z.B. durch die Kommunikation zwischen Hepatozyten und Endothelzellen mittels von Hepatozyten gebildetem VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) induziert worden sein. Dieser Wachstumsfaktor konnte mit einem ELISA im Medienüberstand nachgewiesen und immunhistochemisch angefärbt werden. VEGF ist einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Neoangiogenese [Ferrara et al., 2003] und spielt auch bei der Leberregeneration eine zentrale Rolle [Bockhorn et al., 2007].

#### Erhalt gewebetypspezifischer Funktionen

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches in fast allen Körperzellen vorkommt und bei dem Absterben der Zellen freigesetzt wird. Die Auswertung der Laktatdehydrogenase-Konzentration in den Mediumproben ist eine zerstörungsfreie Methode, um Zellsterben während des Kulturverlaufes zu überwachen und dadurch Rückschlüsse auf Zellvitalität oder die Toxizität von zugesetzten Stoffen zu ziehen.

Die Analyse der Medienproben zeigte bei allen Experimenten die **größte Laktatdehydrogenasefreisetzung** und damit das größte Zellsterben **in den ersten**

**Tagen nach der Besiedlung der Matrix** vor dem ersten Medienwechsel. Mögliche Gründe für dieses Zellsterben sind die Umstellung der Zellen vom Aussaatmedium zum serumfreien Lebermedium, der durch den Trypsiniervorgang verursachte Stress sowie Nekrosen durch Unterversorgung. Für letzteres spricht die kaum messbare LDH-Freisetzung bei den beiden Ansätzen mit der geringsten Zellzahl und somit besten Versorgung sowie der Vergleich von zwei parallel aufgebauten Experimenten, die mit der gleichen Anzahl von Zellen aus derselben Leberpräparation besiedelt worden waren. Bei einem dieser Versuche ließ sich durch die zusätzliche Lumenperfusion eine verbesserte Zellversorgung gewährleisten, was sich in einer geringeren LDH-Freisetzung im Vergleich zum parallel aufgebauten Versuch ohne Lumenperfusion zeigte.

Die höchste LDH-Konzentration im Zellkulturmedium war im Ansatz mit der höchsten Zellzahl nachzuweisen.

Das **Zellsterben sowie die Zellvitalität** sind wie vermutet **abhängig von der aufgegebenen Zellzahl und der Versorgung dieser Zellen**. Zellzahlen bis zu  $20 \times 10^6$  lassen sich auf der Matrix ohne zusätzlichen Lumenfluss kultivieren und versorgen. Zellzahlen bis zu  $60 \times 10^6$  können durch eine zusätzliche luminale Versorgung mit integrierten Kapillaren versorgt werden. Bei größeren Zellzahlen ist mit Nekrose durch Unterversorgung zu rechnen.

Anhand der **Laktatbildung** im Kulturverlauf lassen sich Aussagen über die Stoffwechselaktivität der Zellen treffen. Bei 10 von 13 Experimenten waren die **Zellen bis zum Ende der Kulturzeit stoffwechselaktiv**, was sich durch wiederholtes Ansteigen der Laktatkonzentrationen nach den vorgenommenen Medienwechseln zeigte. Bei 6 Ansätzen stieg die Laktatkonzentration nach jedem Medienwechsel wieder auf ein gleichbleibendes Niveau an. Der Kurvenverlauf deutete dabei einen Sättigungsverlauf an.

Laktat entsteht im Körper bei der anaeroben Glykolyse, wird aber auch in Gegenwart von Sauerstoff neben Pyruvat gebildet. Um zu überprüfen, ob der Laktatspiegel auf ein Gleichgewicht von Laktat und Pyruvat bei einer bestimmten Zellstoffwechselrate zurückzuführen ist oder auf Sauerstoffmangel, müsste parallel die Pyruvatkonzentration im Medium gemessen werden. Durch exemplarische Messung der Sauerstoffsättigung des Mediums bei BR 10 ist ein Sauerstoffmangel als unwahrscheinlich anzusehen. Die Sauerstoffsättigung lag ohne Schwankungen kontinuierlich bei 98%. Ein zusätzliches

Indiz dafür ist der Vergleich des Laktatbildungs- und Albuminsyntheseraten eines weiteren Experiments. Die Laktatkurve zeigte hier nach dem ersten Medienwechsel den höchsten Peak von allen Versuchen. Fast den gleichen Verlauf zeigte die Albuminkonzentration desselben Ansatzes. Um Energie für die gesteigerte Albuminkonzentration zur Verfügung zu stellen, erfolgte in diesem Zeitraum wahrscheinlich eine gesteigerte Glykolyserate der Hepatozyten, was zu einer erhöhten Laktatkonzentration im Medium führte.

Die Detoxifikationsfunktion der Hepatozyten lässt sich anhand der Harnstoffsynthese überprüfen. Die Leber bildet aus dem hochtoxischen Ammoniak, das beim Abbau von Aminosäuren im Körper entsteht, Harnstoff (Urea), der über die Nieren oder Darmsekrete ausgeschieden werden kann [Siegenthaler et al., 2006].

Die **Harnstoffsyntheserate** zeigte bei 60% der Versuche einen klaren Sättigungsverlauf zwischen den einzelnen Medienwechseln. Dabei ist auffällig, dass die **Sättigungskonzentration** unabhängig von der kultivierten Zellzahl immer im gleichen Bereich bei 0,1 bis 0,14 mg/ml lag. Die Konzentration liegt damit nur **knapp unter dem Bereich der normalen Harnstoffkonzentration im Serum von adulten Tieren** dieser Schweinerasse (0,138 – 0,14 mg/ml [Kixmüller, 2004]).

Hepatozyten spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase des Blutes [Schiebler et al., 1984]. Es ist deshalb zu vermuten, dass Hepatozyten die Harnstoffkonzentration im Blut bzw. Medium messen können und entsprechend der gemessenen Werte Stickstoffabbauprodukte entweder in den Harnstoffzyklus einspeisen oder alternativ in Glutamin oder Glutamat umbauen, um so einer Akkumulation entgegenzuwirken. Diese Vermutung ist z.B. durch die Anreicherung des Mediums mit Ammonium zu belegen.

Dieser Sättigungsverlauf der Harnstoffkonzentration im Medium macht es möglich, in Langzeitstudien den Einfluss von Medikamenten auch bei Mehrfachapplikation auf Detoxifikations- und Homöostasefunktionen der Hepatozyten zu untersuchen.

Die **Albuminsynthese** war bei allen Experimenten mit Ausnahme von BR 8 **bis zum Ende des Kulturzeitraums nachweisbar** und zeigte ebenfalls bei 50% der Ansätze einen Sättigungsverlauf. Dieser lag jedoch bei unterschiedlichen Albuminkonzentrationen.

Ein Ansatz zeigte nach dem ersten Medienwechsel eine 2 – 4-fach erhöhte **Albuminkonzentration** im Medium im Vergleich zu den anderen Experimenten. Dies **korrelierte mit einer starken Phase-II-Metabolismusaktivität** bei diesem Versuch im selben Zeitraum. Da Albumin ein Transportprotein ist, könnte durch die Akkumulation des Phase-II-Metaboliten im Medium eine verstärkte Albuminsynthese induziert worden sein. In den anderen Versuchen, bei denen sich ein Dextrometorphanmetabolismus nachweisen ließ, war eine solche Korrelation nicht zu beobachten. Es konnten jedoch in diesen Experimenten auch weniger Phase-II-Metabolite detektiert werden.

Dextromethorphan ist ein Morphinabkömmling und wird zur Behandlung von Husten eingesetzt (Antitussivum). Seine Hauptmetabolite sind nach O- und N-Demethylierung durch das Enzym Cytochrom P450 2D6 in der Phase-I-Reaktion das pharmakologisch aktive Dextrorphan sowie nach der Phase-II-Reaktion dessen inaktives Glucuronid. Weitere Metabolite sind Methoxy-Morphinan und Hydroxy-Morphinan. CYP 2D6 ist ein pharmakologisch relevantes Isoenzym der CYP 450 Superfamilie. Es ist unter anderem am Abbau von Betablockern, Antidepressiva und Antipsychotika beteiligt [<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>].

**Dextrometorphan** wurde dem Medium in 8 Experimenten zugesetzt, eine **Metabolismusaktivität** ließ sich jedoch nur **in 3 Läufen messen**. Die mögliche Ursache dafür war, dass die Zellen bei der Zugabe von Dextrometorphan, welche frühestens ab Tag 6 nach der Zellisolation erfolgte, bereits in ihrer Enzymaktivität eingeschränkt waren. Eine andere mögliche Ursache stellte die Qualität der Zellen dar, die abhängig von Spendertier und Präparation stark variierte.

In den Experimenten mit humanenn Zellen konnte kein Dextrometorphanmetabolismus der Hepatozyten nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen vor der Besiedlung der BioVaSc durch den Transport gestresst und bereits 4 Tage als Monolayer kultiviert worden waren, was zu einem starkem Abfall der Enzymaktivität führt. Die mikroskopische Bewertung der Zellen vor der BioVaSc Besiedlung zeigte eine Bläschenbildung im Zytosol der Hepatozyten, was auf eine reversible Schädigung hinweist.

In anderen Arbeiten wird die Enzymaktivität der Hepatozyten durch die Zugabe verschiedener Stoffe induziert [Nüssler et al., 2001]. Im Falle des CYP 2D6 Enzyms, wäre Rifampecin ein möglicher Induktor.

In dieser Arbeit ließ sich zeigen, dass der Einsatz des hier erarbeiteten Lebermedium auch ohne die Zugabe von Hepatocyte Growth Factor (HGF) eine Langzeitkultur der Hepatozyten ermöglichte, ohne bei den co-kultivierten Endothelzellen zu Differenzierungsverlust zu führen. Des Weiteren konnte belegt werden, dass das ebenfalls am IGB in der Abteilung Zellsysteme entwickelte Bioreaktorsystem für die Kultur eines Lebertestsystems auf Basis der BioVaSc geeignet ist. Durch die Perfusion der BioVaSc unter möglichst physiologischen Bedingungen konnte die Hepatozytenversorgung gewährleistet und eine Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen induziert werden.

Die in dieser Arbeit generierten Daten lassen sich nur schwer mit den Daten von anderen bioartifiziellen Lebersystemen vergleichen, da die meisten Gruppen die Synthese- und Metabolismusraten in g/Tag bzw. g Zellmasse pro Tag angeben und das Nährmedium in den Bioreaktoren täglich komplett gewechselt wird. Dadurch sind absolute Syntheseraten bis zum Ende des Kulturzeitraumes kontrollierbar, aber es ist keine Untersuchung an den Konzentrationsverläufen und eventuellen Sättigungsraten möglich, wie es das in dieser Arbeit entwickelte System erlaubt.

Es ist jedoch auch in anderen Arbeiten gelungen, primäre Hepatozyten aus dem Schwein [Zeilinger et al., 2004], dem Menschen [Pless et al., 2006] oder der Ratte über mehr als zwei Wochen unter Erhalt wichtiger Zellfunktionen zu kultivieren.

In der Arbeit von Pless et al. wurden anhand verschiedener Stoffwechselfparameter wie LDH-Freisetzung, Laktatproduktion, Harnstoff- und Albuminsynthese Experimente in Hohlfaserbioreaktoren über einen Kulturzeitraum von 21 Tagen analysiert. Es zeigt sich bei allen gemessenen Parametern ein starker Abfall der Konzentrationen ab Tag 2 und danach das Einpendeln auf relativ konstante Raten. Dies war bei dem vorliegenden Lebermodell nicht zu beobachten; die Anfangskonzentrationen von Albumin, Laktat und Harnstoff konnten im Lauf der Kultur in der zweiten und dritten Kulturwoche wieder erreicht und teilweise überboten werden.

In der Arbeit von Zeilinger et al. ließen sich porcine Hepatozyten in einem Hohlfaserreaktor 30 Tage unter Erhalt leberspezifischer Funktionen und Lidocainmetabolismus durch CYP 3A4 kultivieren. Die LDH-Konzentration und somit das Zellsterben stieg in diesen Ansätzen am Anfang und im letzten Drittel der Kulturzeit an, während sich die Ureasynthese vom Anfang bis zum Ende der Kultur halbierte. Diese Syntheseraten im vorliegenden BioVaSc Lebermodell waren über den Kulturzeitraum gesehen konstanter; vermehrtes Zellsterben war jeweils nur am Anfang der Kulturen kurz nach der Besiedlung zu beobachten.

### **Zusammenfassung**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die BioVaSc als Grundlage für ein Lebertestsystem eignet. Porcine sowie humane Hepatozyten und Endothelzellen ließen sich unter Erhalt ihrer Differenzierung auf der Matrix co-kultivieren. Die Endothelzellen konnten durch die Kulturbedingungen zur Neoangiogenese angeregt werden und exprimierten zellspezifische Marker wie FLK-1 und CD 31.

Hepatozyten bildeten wichtige Zell-Zellkontakte, wie Tight Junctions und Adherens Junctions aus und exprimierten ebenfalls zellspezifische Marker. Die Proliferation der Zellen war bis zu Tag 22 nach der Isolation über eine Anti-Ki 67 Färbung nachweisbar. Zwischen den Hepatozyten ließen sich Gallenkanälchenstrukturen erkennen. Die Expression von VEGF wies auf eine Kommunikation zwischen Endothelzellen und Hepatozyten hin.

Der Erhalt der Stoffwechselfunktion der Hepatozyten konnte über Medientests nachgewiesen werden. Eine Synthese von Harnstoff und Albumin ließ sich bis Tag 22 nach der Isolation nachweisen, ebenso die Bildung von Laktat.

Der Phase-I- und Phase-II-Metabolismus von Dextrometorphan war im porcinen Modell bis Tag 22 ohne Enzyminduktion nachweisbar.

Fazit: Mit diesem Modell sollen zukünftig nunmehr erstmals Hepatozyten und Endothelzellen über einen längeren Zeitraum kultiviert und ihre spezifischen Funktionen sowie Reorganisationprozesse induziert werden.

### **Ausblick**

Das in dieser Arbeit generierte Lebertestsystem auf Basis der biologischen vaskularisierten Trägerstruktur (BioVaSc) ermöglicht die Langzeitkultur von porcinen und

humanen Hepatozyten unter Erhalt ihrer Stoffwechselfunktionen. Das System kann jedoch hinsichtlich der Versorgung der Hepatozyten und der Erhalt ihrer Enzymaktivität weiter optimiert werden.

Die Funktionalität der Hepatozyten auf der BioVaSc im Bioreaktor im Vergleich zu einfachen, statischen Kultursystemen wie Sandwich- oder Monolayerkultur ist zu testen, um z.B. eine Zertifizierung als Testsystem zu erreichen. Dabei sollte das Panel der zu überprüfenden CYP 450 Enzyme durch Zugabe von z.B. Ethoxycoumarin oder Lidocain als Standards erweitert werden.

Die eingesetzten Endothelzellen sind z.B. über die VEGF-Rezeptor-Expression genauer zu charakterisieren.

Ergänzende Tests zum Vergleich von Pyruvat und Laktat im Medium sowie zur Überprüfung der hepatozytären Gallensekretion sind zu etablieren.

Die Co-Kultur könnte durch die Integration von Kupfferzellen erweitert werden.

Einen ersten Anhaltspunkt dafür, dass das System sich für Regenerationsstudien eignet, bietet die VEGF - Expression der Hepatozyten auf der Matrix. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Modul könnten Therapien zur Unterstützung von Leberregeneration *in vitro* entwickelt werden.

In den weiterführenden Arbeiten könnte die Möglichkeit der Verbindung des Gefäßsystems der BioVaSc mit den neugebildeten, vaskulären Strukturen durch gerichtete Neoangiogenese untersucht werden, um eine verbesserte Zellversorgung und ein eventuelles Up-Scaling des Modells zu ermöglichen.

Zudem sind Untersuchungen zur Differenzierung von Stammzellen in funktionelle Hepatozyten ein möglicher Einsatzbereich, da die BioVaSc sich als geeignete Trägerstruktur zur Stammzellendifferenzierung und Hepatozytenkultur erwies.

Durch die Variabilität bei der Explantation und Azellularisierung ergeben sich unterschiedliche Qualitäten für die einzelnen Matrices. Für die weitere Etablierung eines Lebertestsystems wäre es deshalb eventuell sinnvoll, die BioVaSc durch ein strukturell vergleichbares, artifizielles, synthetisches Pendant zu ersetzen.



## 8. Literaturverzeichnis

**Bader** A, Schilling T, Teebken O E et al. (1998): Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves – Eur. J. Cardiothorac. Surg. 14, 279-284

**Beck** T. Zur Anatomie des Menschen: Aufbau und Funktion der Leber. Pharmazeutische Zeitung 13: 11-18, 1998

**Berry** M N, Edwards A M, Barrit G J (1991): Isolated hepatocytes preparation, properties and applications – in Burden R H, van Knippenberg PH: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Amsterdam

**Bockhorn** M, Goralski M, Prokofiev D, Dammann P, Grünewald P, Trippler M, Biglarnia A, Kamler M, Niehues E M, Frilling A, Broelsch C E, Schlaak J F (2007): VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. J Surg Res. 2007 April; 138(2):291-9.

**Brandon** E F A, Raap C D, Meijerman I, Beijnen J H, Schellens H M: An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons (2003) Toxicology and applied Pharmacology 189; 233-246

**Busse** B, Smith M D, Gerlach J C: Treatment of acute liver failure: hybrid liver support – Langenbeck's Arch Surg (1999) 384:588-599 Springer Verlag 1999

**Chen** Y, Dong X J, Zhang G R, Shao J Z, Xiang L X: In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes – J Cell Biochem. 2007 Mar 5;102(1):53-63

**De Bartolo** L, Salerno S, Morelli S, Giorno L, Rende M, Memoli B, Procino A, Andreucci V E, Bader A, Drioli E: Long-term maintenance of human hepatocytes in oxygen-permeable membrane bioreactor – Biomaterials 2006 Sep;27(27):4794-803

**Dohmen** P M, Ozaki S, Nitsch R, Yperman J, Flameng W, Konertz W (2003): A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model - Med Sci Monit. 9(4): BR97-BR104

**Ferrara** N, Gerber H-P und LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors – Nature Medicine 9, 669-676

**Gerlach** J C: Bioreactors for extracorporeal liver support – Cell Transplant. 2006;15 Suppl 1:p91-103

**Gerlach** J C, Encke O, Hole O, Müller C, Courtney J M, Neuhaus P (1994): Hepatocyte culture between three dimensionally arranged biomatrix-coated independent artificial capillary systems and sinusoidal endothelial cell co-culture compartments – int J Artif Organs. 1994 May; 17(5):301-6

**Gutmann** I, Bergmeyer H U (1974): Methoden der enzymatischen Analyse 3.Aufl., Bd. 2, S.1842-1845, Verlag Chemie, Weinheim

**Irie** S und Tavassoli M (1991): Transendothelial transport of macromolecules: the concept of tissue-blood barriers. Cell Biol Rev. 25 (4):317-33, 340-1

**Jacobs** D S, Kasten B L, Demott W R und Wolfson W L (1990): Laboratory Test Handbook, Lexi COMP. Inc., Ohio,p.245

**Kadohama** T, Nishimura K, Hoshino Y, Sasajima T, Sumpio B E (2007): Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival.- J Cell Physiol. Jul;212(1):244-51]

**Kalka** C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll W M, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahar T (2000): Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3422-3427

**Kern A**, Bader A, Pichlmayer R, Sewing K F (1997): Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans – biochem Pharmacol. 1997 Oct 1;54(7):761-72

**Kixmoeller Marion** (2004): Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie, Doktorarbeit der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Klein T**, Lang T, Saussele T, Barbosa-Sicard E, Schunck W H, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger U M: Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz.[2005] Pharmacogenet Genomics 15[12]:861-73

**Kojima K**, Bonassar L J, Roy A K, Mizuno H, Cortiella J, Vacanti C A (2003): A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells - FASEB J. 17(8), 823-8]

**Koolmann J**, Röhm, K-H (2003): Taschenatlas der Biochemie; 3.Auflage, S. 276 u. 306, Georg Thieme Verlag

**Langer, R.** und Vacanti, J. P. (1993): Tissue Engineering – Science 20, 920-926

**Langsch A**, Bader A (2001): Longterm Stability of Phase I and Phase II Enzymes of Porcine Liver Cells in Flat Membrane Bioreactors – Biotechnology and Bioengineering, Vol. 76, No.2 p. 115-125

**LeCouter J**, Moritz D R, Li B, Phillips G L, Liang X H, Gerber H P, Hillan K J, Ferrara N: Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1- Science. 2003 Feb 7;299(5608):890-3

**Luttmann W**, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2004): Der Experimentator Immunologie, 1. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

**Martins-Green M:** Dynamics of cell-ECM interactions – Lanza RP, Principles of Tissue Engineering, 2nd edn. New York: Academic Press 2001. 33-45

**Mertsching H,** Puschmann C. Impact of proteases in tissue engineering and regeneration;. In: Proteases in Tissue Remodelling of Lung and Heart. Editor: U Lendeckel U, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany and Hooper NM, University of Leeds, UK. Kluwer Academic Publishers ISBN: 0-306-47910-9, November 2003.

**Mertsching H,** Walles T, Hofmann M, Schanz J, Knapp WH: Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. Biomaterials 2005;26(33):6610-6617

**Mertsching H,** Hansmann J, Schanz J, Linke K, Brenner M, Michaelis J, Walles T: Vaskularisierte Trägersysteme für in vitro Testsysteme. In: D. Beckmann, M. Meister. 13. Heiligenstätter Kolloquium. Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt. Heiligenstadt. Inst. F. Bioprprozess- und Analysetechnik; 2006; ISBN-10: 3-00-018621-2; 47 - 55

**Nüssler A,** Wang A, Neuhaus P, Fischer J, Yuan J, Liu L, Zeilinger K, Gerlach J, Arnold P, Albrecht W (2001): The Suitability of Hepatocyte Culture models to Study Various Aspects of Drug Metabolism – Altex 18, 2/01,p. 91-101

**Pascher A,** Sauer I M, Hammer C, Gerlach J C, Neuhaus P: Extracorporeal liver perfusion as hepatic assist in acute liver failure: a review of world experience – Xenotransplantation. 2002 Sep;9(5):309-24

**Park J-K,** Lee D-H: Bioartificial Liver Systems: Current Status and Future Perspective – J of Bioscience and Bioengineering 2005 Vol.99 No.4, 311-319

**Pless G,** Steffen I, Zeilinger K, Sauer I M, Katenz E, Kehr D C, Roth S, Mieder T, Schwartlander R, Muller C, Wegner B, Hout M S, Gerlach J C: Evaluation of primary

human liver cells in bioreactor cultures for extracorporeal liver support on the basis of urea production – Artif. Organs. 2006 Sep;30(9):686-94

**Ratcliffe** A und Niklason L E (2002): Bioreactors and Bioprocessing for Tissue Engineering – Ann. N. Y. Acad. Sci. 961, 210-215

**Richard** L, Velasco P, Detmar M: A simple immunomagnetic protocol for the selective and long-term cultivation of human dermal microvascular endothelial cells. Experimental cell research 240; 1 – 6, 1996

**Rifai** K, Ott M, Bahr M J, Schneider A, Manns M P: Leberersatztherapie (2003), Internist 2003, 44, 1485-1490

**Robotin-Johnson** M C, Swanson P E, Johnson D C et al. (1998): An experimental model of small intestinal submucosa as a growing vascular graft – J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 116, 805-811

**Schanz** J (2004): Differenzierung von Stamm-/Progenitorzellen für das thoracovaskuläre Tissue Engineering, Diplomarbeit im Studiengang Biologie an der Universität Hannover

**Schiebler** T H, Peiper U, Schneider F: HISTOLOGIE (1984) 2. Auflage, p.473, Springerverlag

**Shimizu** H, Mitsuhashi N, Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M (2005): Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats – World J Gastroenterol.2005 Dec 14; 11(46):7254-60

**Siegenthaler**, Blum: Klinische Pathophysiologie (2006), p. 860, Georg Thieme Verlag KG

**Skalak** R und Fox C (1988): Preface - Tissue engineering, New York: AR Liss

**Soto-Gutiérrez** A, Kobayashi N, Rivas-Carillo J D, Navarro-Álvarez N, Zhao D, Okitsu T, Noguchi H, Basma H, Tabata Y, Chen Y, Tanaka K, Narushima M, Miki A, Ueda T, Jun H-S, Yoon J-W, Lebkowski J, Tanaka N, Fox I J (2006): Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes. *Nature biotechnology* Vol. 24, Number 11, p. 1412-1419

**Sternberg** S S: *Histology for Pathologists* (1992), p. 626, Raven Press, LTD., New York

**Tsiaoussis** J, Newsome P N, Nelson L J, Hayes P C, Plevris J N: Which Hepatocyte Will It Be? Hepatocyte Choice for Bioartificial Liver Support (2001)– *Liver Transplantation*, Vol 7, No 1: pp2-10

**Walgenbach** K J, Voigt M, Riabikhin A W, Andree C, Schaefer D J, Galla T J und Stark G B (2001): Tissue engineering in plastic reconstructive surgery - *The Anatomical Record*. 263: 372-378

**van de Kerkhove** M P, Hoekstra R, Chamuleau R A, van Gulik T M: Clinical Application of Bioartificial Liver Support Systems (2004) *Ann Surg*. 2004 August; 240(2): 216–230

**Walles T**, Herden T, Haverich A, Mertsching H. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials* 2003; 24:1233-1239

**Walles T**, Schanz J, Salehi N, Bindeballe T, Mertsching H: Bioartificial vascular grafts based on a biological matrix and mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2004; 6 (3), 258

**Zeilinger** K, Holland G, Suaer I M, Efimova E, Kardassis D, Obermayer N, Liu M, Neuhaus P, Gerlach J C: Time course of primary liver cell reorganization in three-dimensional high-density bioreactors for extracorporeal liver support: an immunohistochemical and ultrastructural study – *Tissue Eng*. 2004 Jul-August 10(7-8):1113-24

**Zhang Y**, Bachmeier C, Miller DW: In vitro and in vivo models for assessing drug efflux transporter activity (2003) *Adv. Drug Delivery Rev.* 55, 31-51

**Zinchenko** Y S, Schrum L W, Clemens M, Coger R N: Hepatocytes and kupffer cells co-cultured on microplatterned surfaces to optimize hepatocyte function – Tissue Eng. 2006 Apr;12(4):751-61

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

#### Einleitung

- Abb. 1 Aufbau der Leber S. 16
- Abb. 2 Ultrastruktur des Hepatozyten als polarisierte, sekretorische Epithelzelle mit basolateraler und apikaler Plasmamembran S. 18
- Abb. 3 BioVaSc - azellularisierter Schweinedünndarm mit arteriellem Zufluss (rosa Braunüle) und venösem Abfluss (grüne Braunüle) S. 23
- Abb. 4 a) Bioreaktorsystem mit mobilem Brutschrank, b) Bioreaktorwagen mit Inkubationskammer, Pumpen und Temperatur sowie CO<sub>2</sub> Überwachung, c) Bioreaktor mit BioVaSc und d) Beispiele für Druckkurven S. 27
- Abb. 5 Regelung des Druckverlaufs S. 28

#### Methoden

- Abb. 6 Biorektoraufbau zur Azellularisierung mit BioVaSc a) am Anfang der Perfusion mit AZ-Lösung und b) nach der Perfusion S. 53
- Abb. 7 Zellaufgabe mittels Spritze in die Arterie S. 54
- Abb. 8 Streptavidin- Biotin-Methode S. 61
- Abb. 9 EnVision System S. 62
- Abb. 10 Schematische Darstellung der LDH- katalysierten Reaktion gekoppelt mit der Farbreaktion zur Detektion der LDH-Aktivität S. 66

#### Ergebnisse

- Abb. 11 Endothelzellen aus Leberpräparation S. 75
- Abb. 12 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen S. 75
- Abb. 13 Mononucleäre Zellen aus Knochenmarksaspirat S. 76
- Abb. 14 Gefäßstrukturen mit markierten Zellen besiedelt (Bild 1 und 2); Beleg für die Kapillarsprossung aus bestehenden Gefäßen in der BioVaSc (Bild 2) S. 79
- Abb. 15 Gefäße mit fluoreszenzmarkierten Zellen im Querschnitt S. 79
- Abb. 16 Lebend-Tot-Färbung von Kryoschnitt mit vitalen Zellen in Gefäß-Querschnitten S. 79
- Abb. 17 Cytospot- endotheliale Vorläufer zur Besiedlung von BR 10 und 11 Anti-CD 31 Färbung S. 80
- Abb. 18 Matrix nach Co-Kultur in Zonen eingeteilt S. 80



Abb. 19 BR 11 Gefäßquerschnitte im Bereich der „Darmwand“ mit angefärbten Endothelzellen; Anti-CD 31 Färbung auf Kryoschnitt	S. 81
Abb. 20 BR 10 Gefäßquerschnitte im Bereich der zu- und abführenden Gefäße mit angefärbten Endothelzellen, Anti-FLK-1 Färbung auf Paraffinschnitt	S. 81
Abb. 21 Hepatozytenkultur Tag 1 nach der Isolation in der Zellkulturflasche mit vitalen Hepatozyten und Zelldebris	S. 83
Abb. 22 Anti-CD 31 Färbung von Cytospot der LP301006 – 6% der isolierten Zellen Endothelzellen sind positiv für CD 31	S. 84
Abb. 23 Anti-Hepatozytenfärbung von Cytospot der LP041206 – 81% der isolierten Zellen sind Hepatozyten	S. 84
Abb. 24 Anti-CKLP 34 Färbung von Chamberslide der LP041206- Intermediätfilamente klar erkennbar, 80% der Zellen sind Hepatozyten	S. 84
Abb. 25 Anti-CKLP 34 Färbung von Cytospot der LP041206- Intermediärfilamente klar erkennbar, 88% der Zellen sind Hepatozyten	S. 84
Abb. 26 Matrixlumen im Querschnitt bei Versuchsende mit gewebeartigem Inhalt. (BR 5)	S. 85
Abb. 27 HE -Färbung BR 4: vitale Hepatozyten, die sich in einer Gewebetasche im Bereich der Darmwand um eines größeres Gefäß angesiedelt haben	S. 86
Abb. 28 HE -Färbung von BR 12- Querschnitt des ehemaligen Darmlumens mit vitalen Hepatozyten im Mucosabereich	S. 87
Abb. 29 HE -Färbung BR 9 mit vitalen Hepatozyten im Mucosabereich und abgestorbenen in tieferen Lumenbereichen	S. 87
Abb. 30 HE -Färbung BR 9- migrierte Hepatozyten zwischen den Zotten der Mucosa (x200)	S. 87
Abb. 31 HE-Färbung BR 12 –vitale, humane Hepatozyten im Lumen der BioVaSc; Hohlräume zwischen den Zellen sind vaskuläre Strukturen im Querschnitt	S. 87
Abb. 32 AntiCKLP 34-Färbung von BR 12 Hepatozyten im Lumen	S. 88
Abb. 33 AntiCKLP 34-Färbung von BR 9- Vitale Hepatozyten mit gefärbtem Cytoskelett	S. 88
Abb. 34 Anti-Hepatocyte-Färbung BR 12- Hepatozyten im Lumen	S. 89
Abb. 35 Anti-Hepatocyte-Färbung BR 11- Hepatozyten mit gefärbten Mitochondrien	S. 89

Abb. 36 Anti-ZO-1-Färbung BR 11- Kapillarzygewandte Seite mit Gallenkanälchenstruktur	S. 90
Abb. 37 Porcine Leber nativ - Gallenkanälchenfärbung mit Anti-ZO-1	S. 90
Abb. 38 Anti-ZO-1-Färbung BR 2- Gallenkanälchenstrukturen zwischen den Hepatozyten	S. 90
Abb. 39 Anti-panCadherin-Färbung vitaler Hepatozyten BR 12	S. 90
Abb. 40 Anti-panCadherin-Färbung geschrumpfter Zellen- BR 9	S. 90
Abb. 41 AntiKi 67-Färbung BR 10- proliferierende Hepatozyten im Matrixlumen	S. 91
Abb. 42 AntiVEGF-Färbung BR 11 - VEGF exprimierender Hepatozytenverband	S. 91
Abb. 43 Anti-alpha1-Na <sup>+</sup> Ka <sup>+</sup> ATPase – Fluoreszenzfärbung BR 9 (rot= positive Bereiche, blau= Zellkerne)	S. 91
Abb. 44 Anti-alpha1-Na <sup>+</sup> Ka <sup>+</sup> ATPase – Färbung BR 13	S. 91
Abb. 45 Anti-CD 31-Färbung BR 12 – Endothelzellen in Co-Kultur mit Hepatozyten im Matrixlumen	S. 92
Abb. 46 Anti-CD 31-Färbung BR 12 – Endothelzellen haben ein neues Gefäß Gebildet	S. 92
Abb. 47 Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 3, 4, 7, 8, 10 und 11 im Vergleich	S. 94
Abb. 48 Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 12 + 13	S. 94
Abb. 49 Laktatbildung BR 1+2	S. 96
Abb. 50 Laktatbildung BR 10+11	S. 96
Abb. 51 Laktatbildung BR 12 +13	S. 97
Abb. 52 Harnstoffsynthese BR 3 + 4	S. 98
Abb. 53 Harnstoffsynthese BR 7 + 8	S. 98
Abb. 54 Harnstoffsynthese BR 10 + 11	S. 99
Abb. 55 Harnstoffsynthese BR 12 + 13	S. 99
Abb. 56 Albuminsynthese BR 3 + 4	S. 100
Abb. 57 Albuminsynthese BR 7 + 8	S. 101
Abb. 58 Albuminsynthese BR 9	S. 101
Abb. 59 Albuminsynthese BR 12 + 13	S. 102
Abb. 60 Dextrorphanbildung aus Detrometorphan BR 4	S. 103
Abb. 61 Dextrometorphanmetabolite BR 4	S. 104
Abb. 62 Dextrometorphanmetabolite BR 7	S. 104
Abb. 63 Dextrometorphanmetabolite BR 9	S. 105

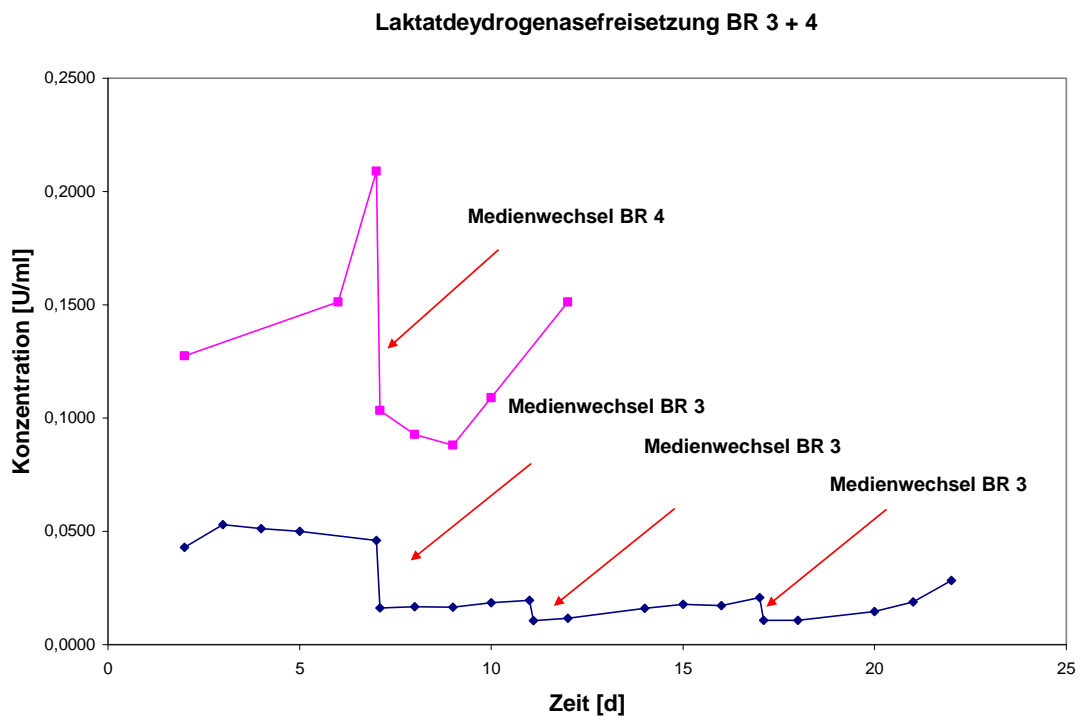
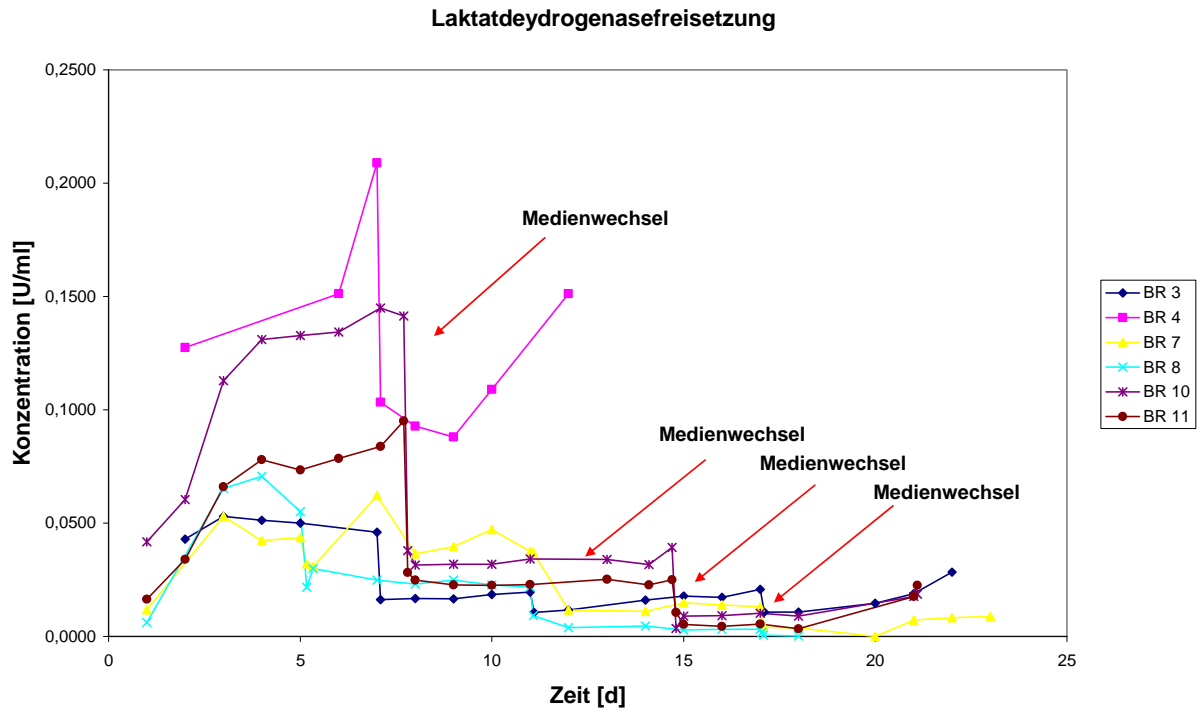
Abb. 64 VEGF Expression BR 12 + 13	S. 106
Abb. 65 Zell-Matrix-Wechselwirkungen	S. 110

#### Tabellen

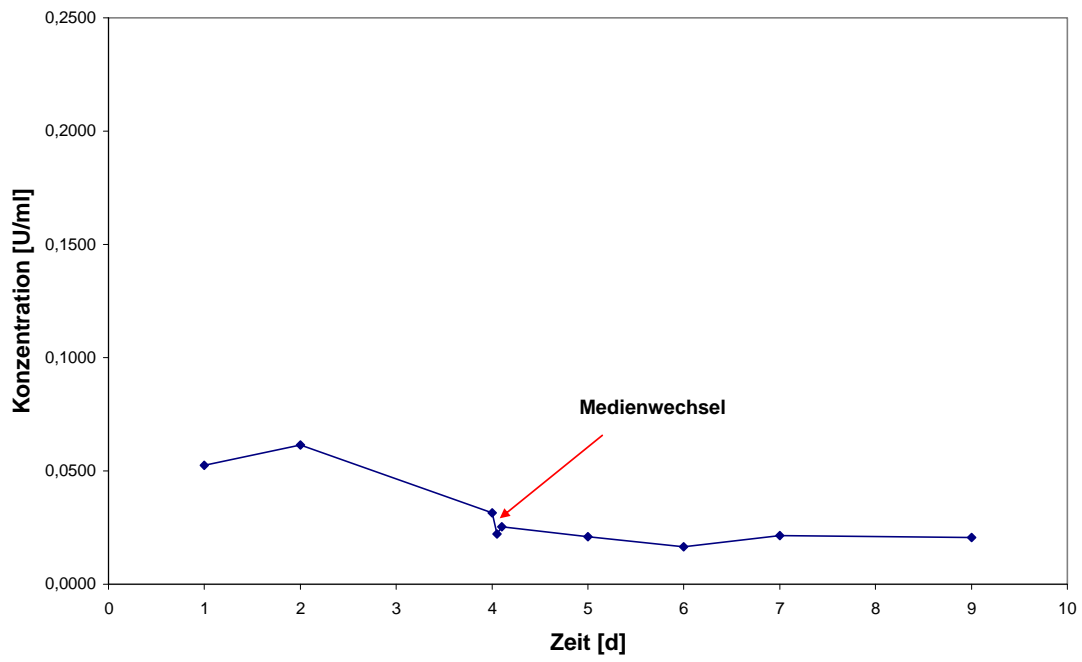
Tab. 1 Überblick über verschiedene <i>in vitro</i> Modelle, ihre Vorteile und Nachteile	S. 31
Tab. 2 Gefäßsystembesiedlung Bioreaktor 1- 13	S. 77
Tab. 3 Mikroskopische Bewertung der Besiedlung der Gefäßsysteme BR 1-11	S. 78
Tab. 4 Besiedlung des Matrixlumens mit Hepatozyten BR 1-13	S. 82
Tab. 5 Bewertung der Besiedlung mit Hepatozyten	S. 86

# 10. Anhang

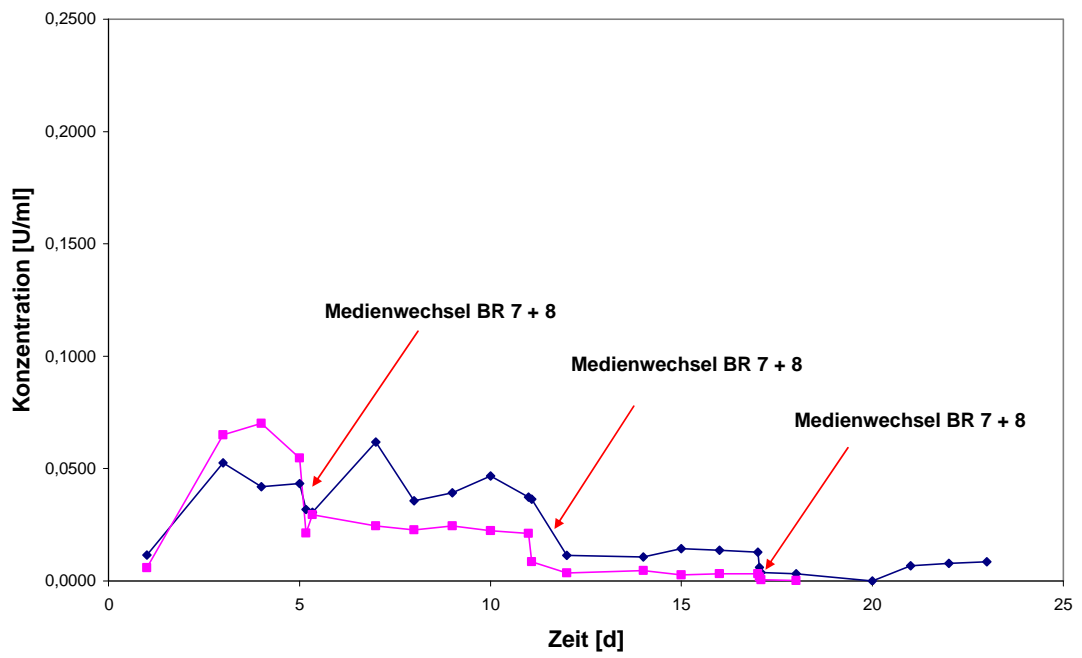
## Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 3 - 13



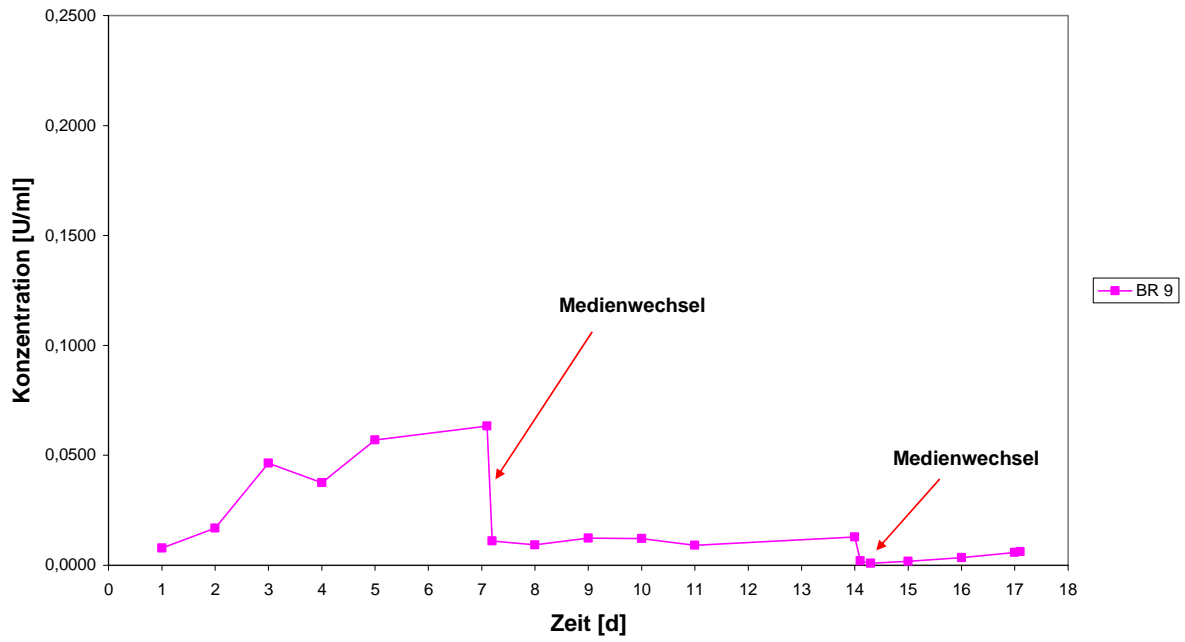
Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 5



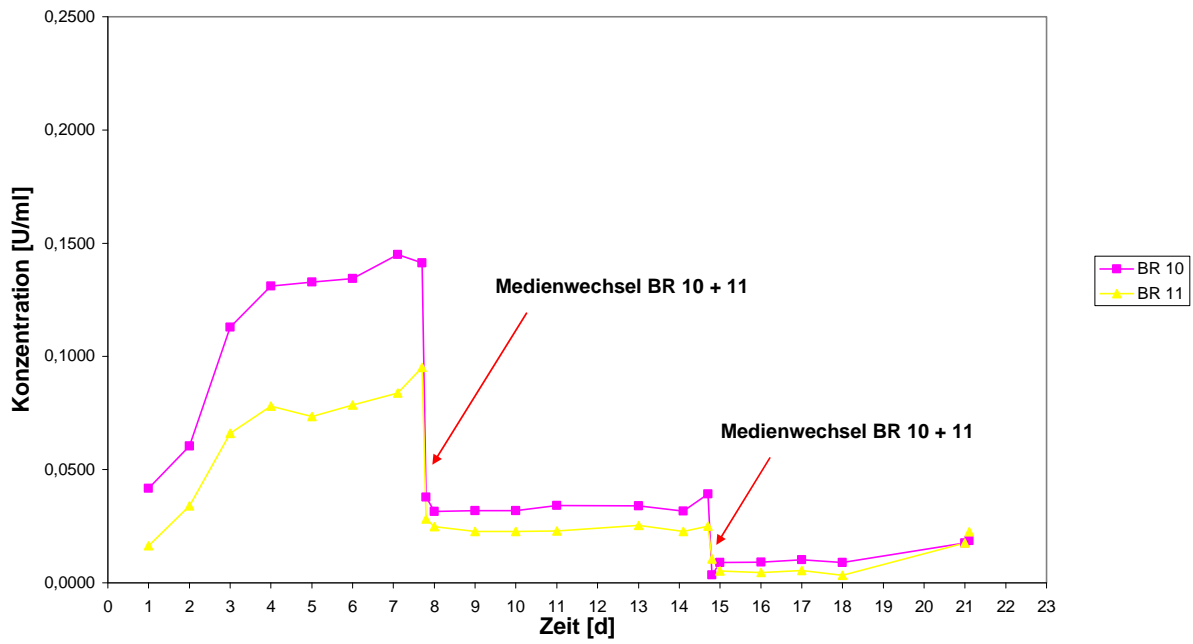
Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 7 + 8



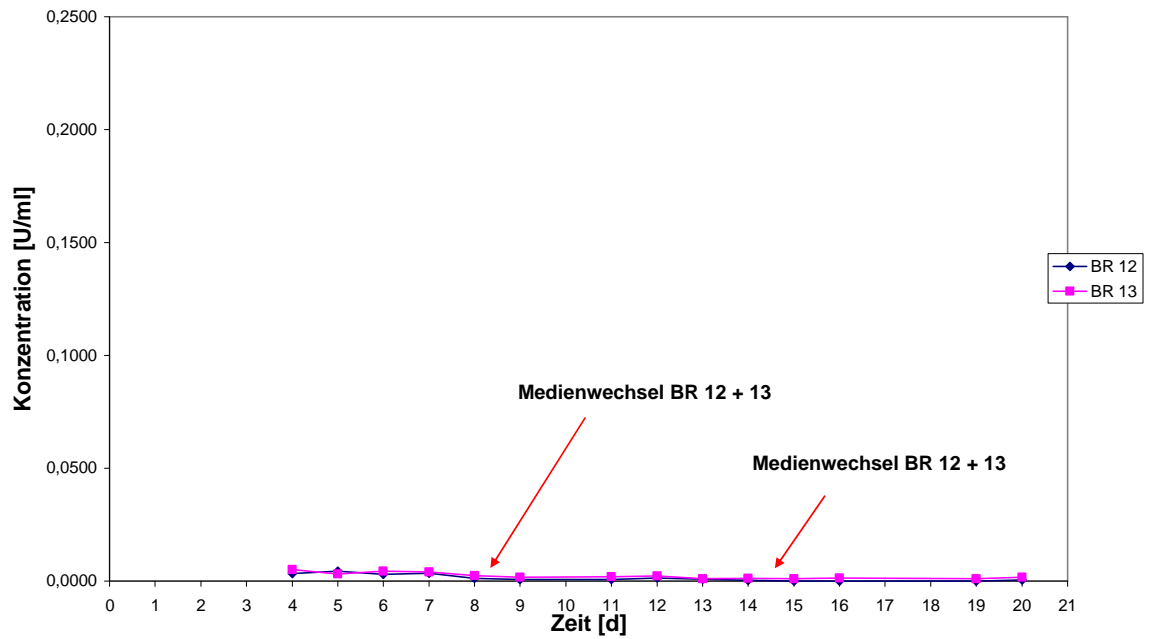
### Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 9



### Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 10 + 11

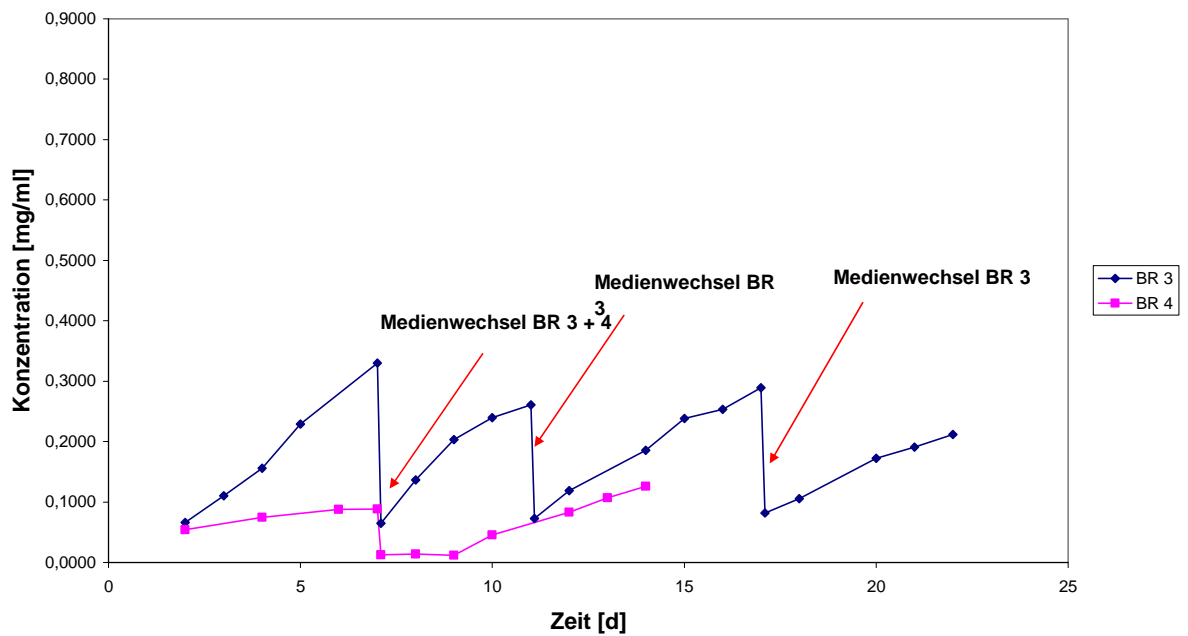


### Laktatdehydrogenasefreisetzung BR 12 + 13

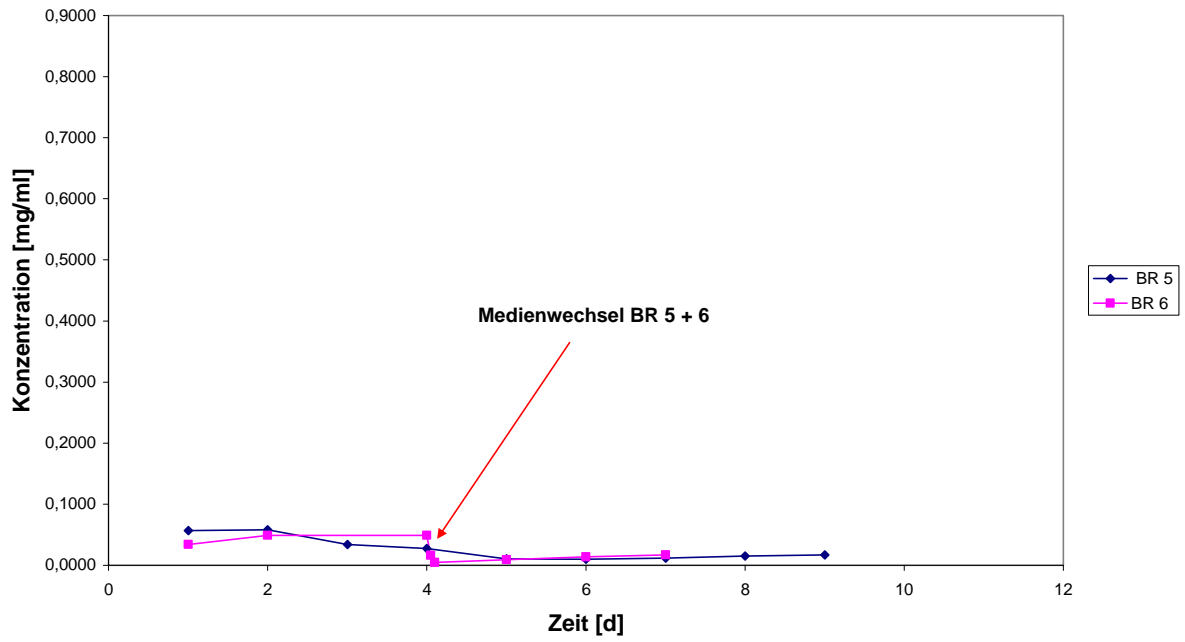


### Laktatbildung BR 3 – 13

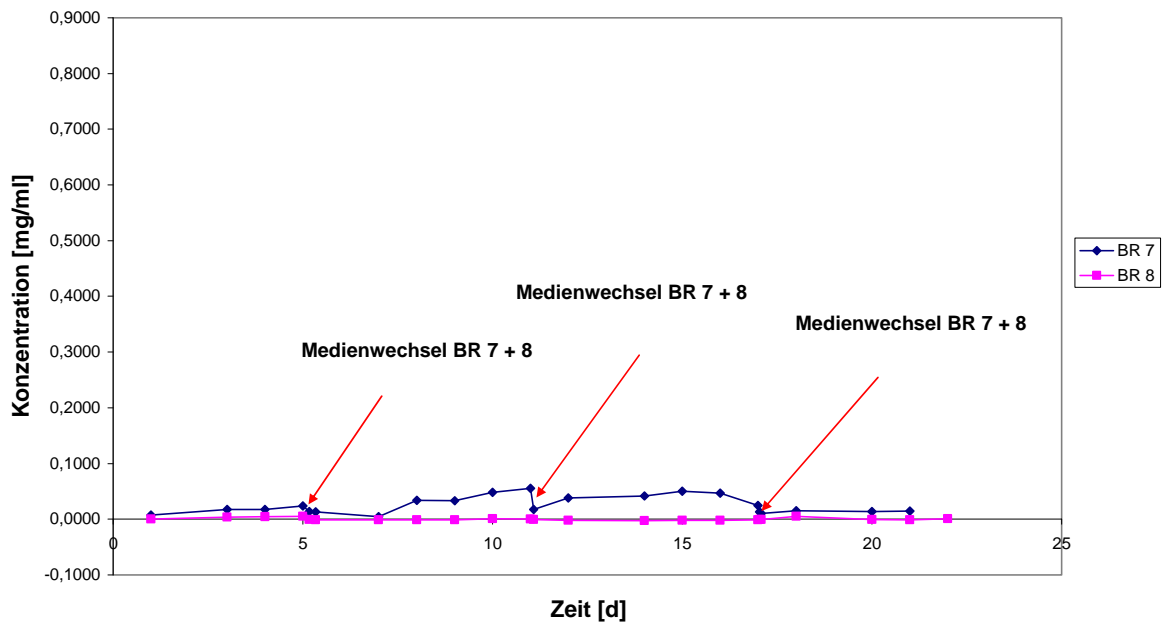
#### Laktatbildung BR 3 + 4



### Laktatbildung BR 5 + 6

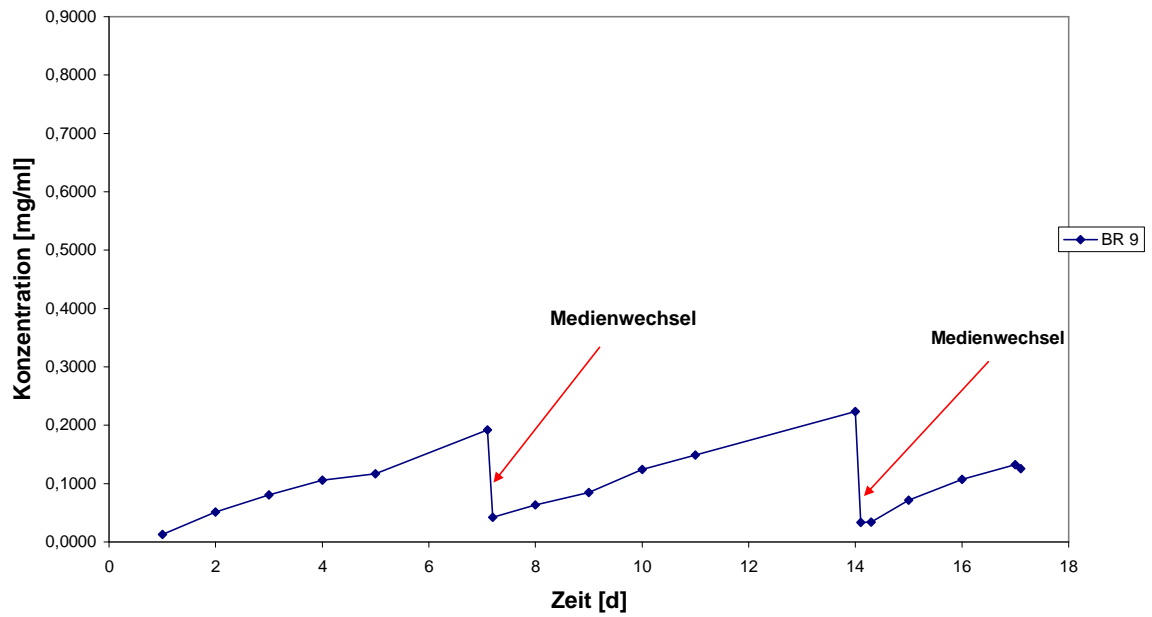


### Laktatbildung BR 7 + 8

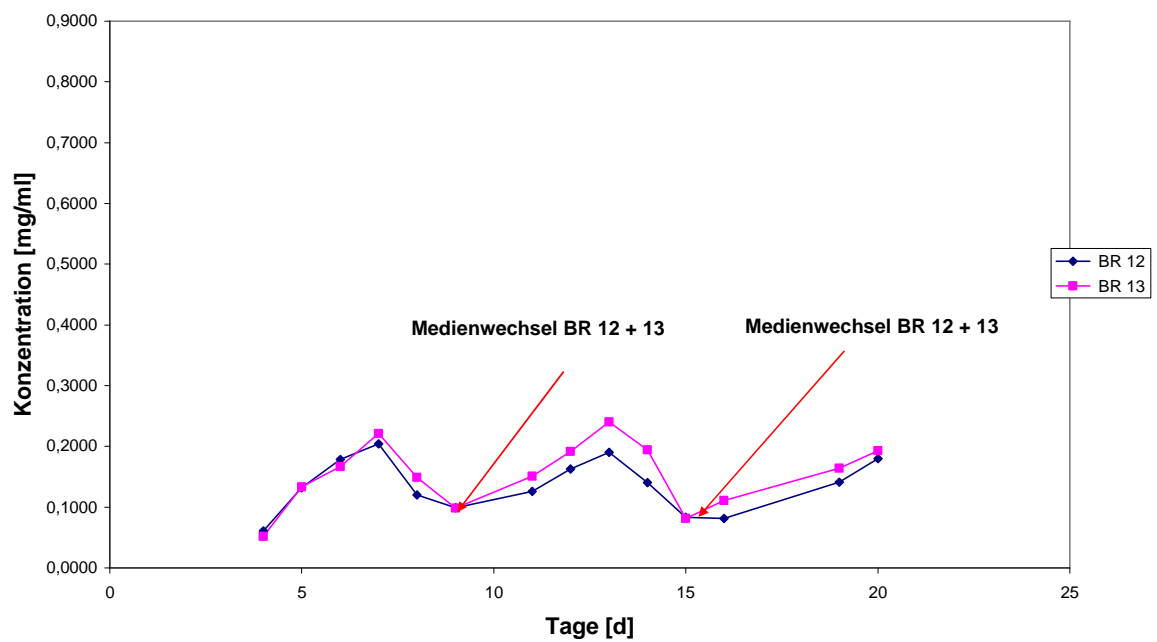




### Laktatbildung BR 9

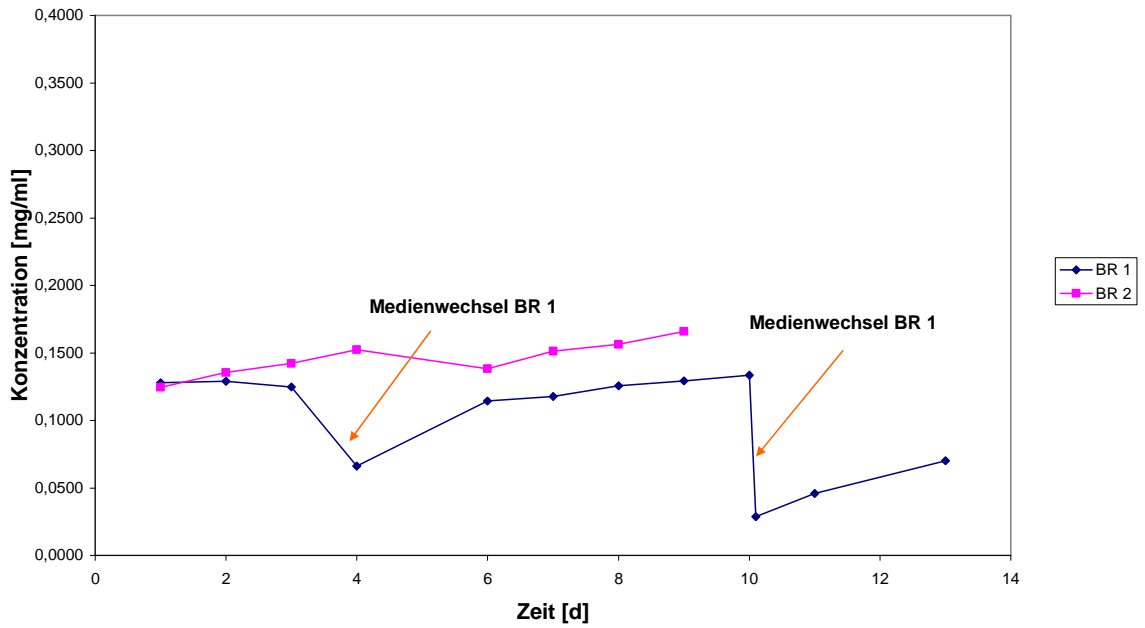


### Laktatbildung BR 12 + 13

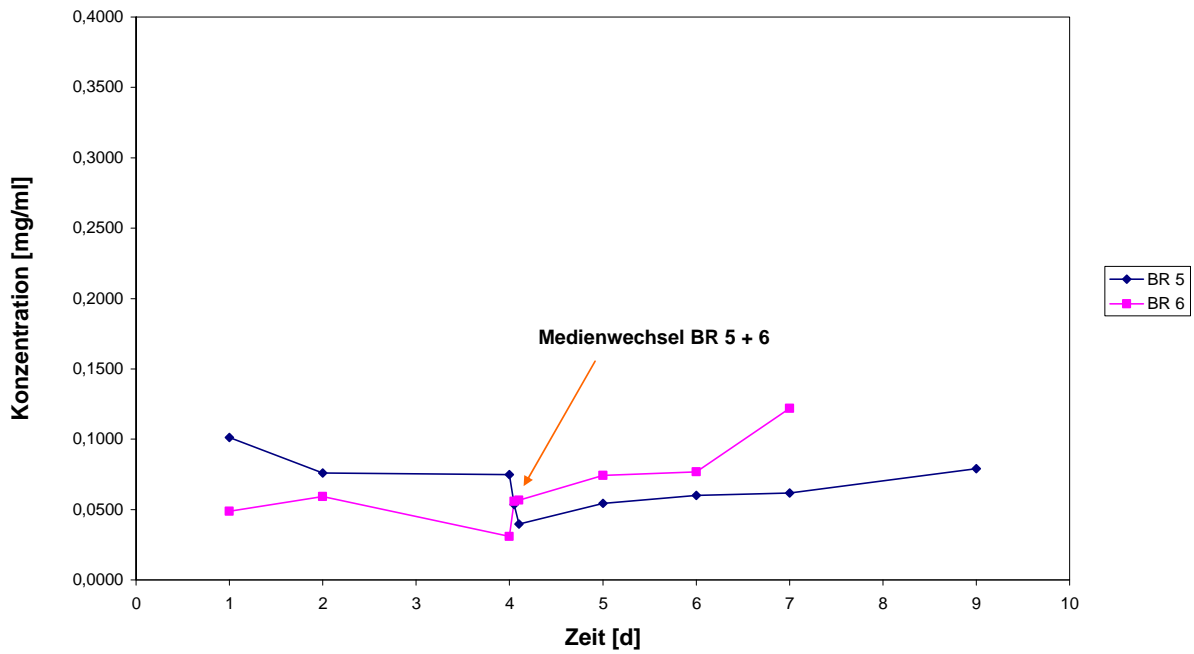


# Ureasyntese BR 1 - 13

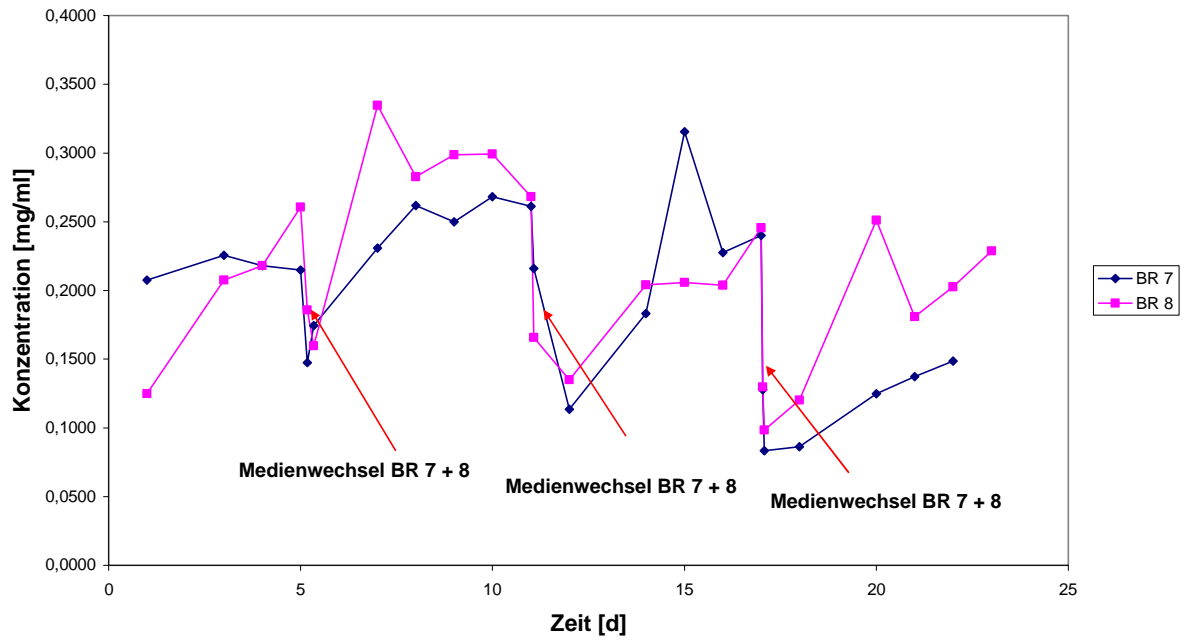
## Ureasyntese BR 1 + 2



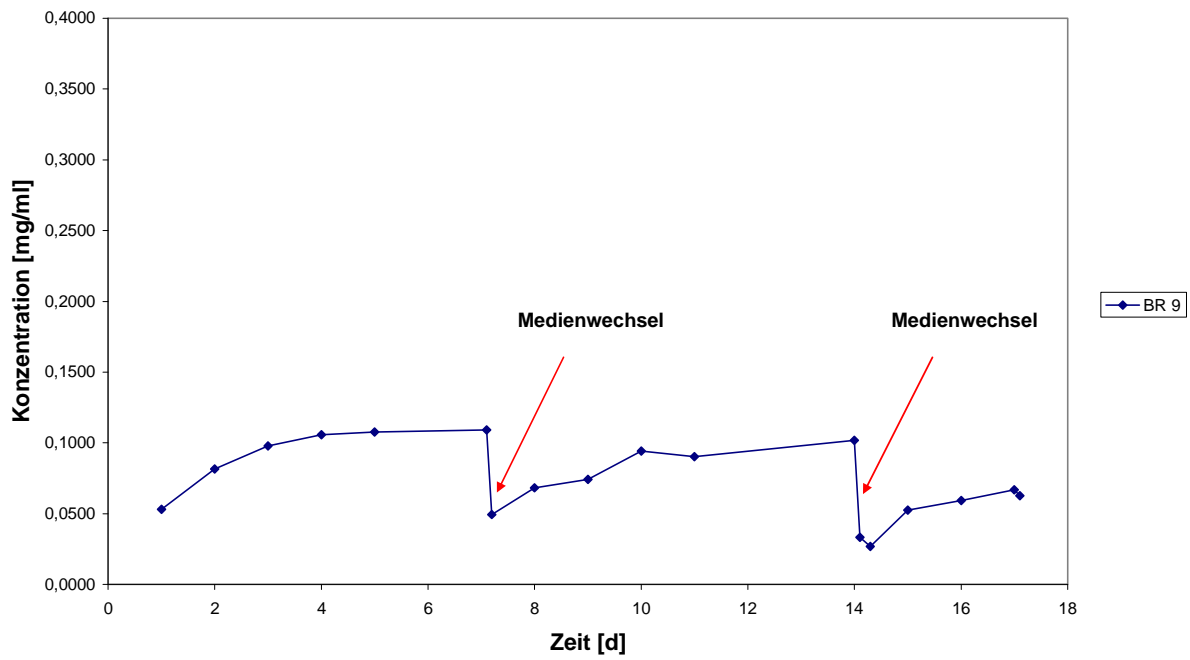
## Ureasyntese BR 5 + 6



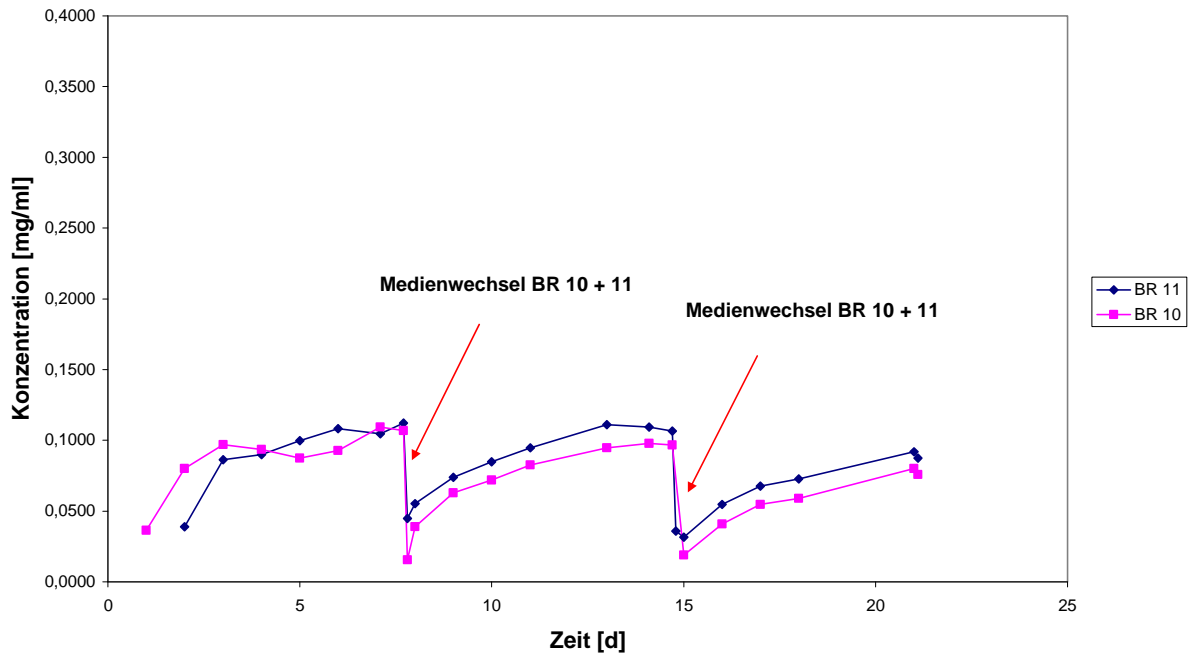
### Ureasesynthese BR 7 + 8



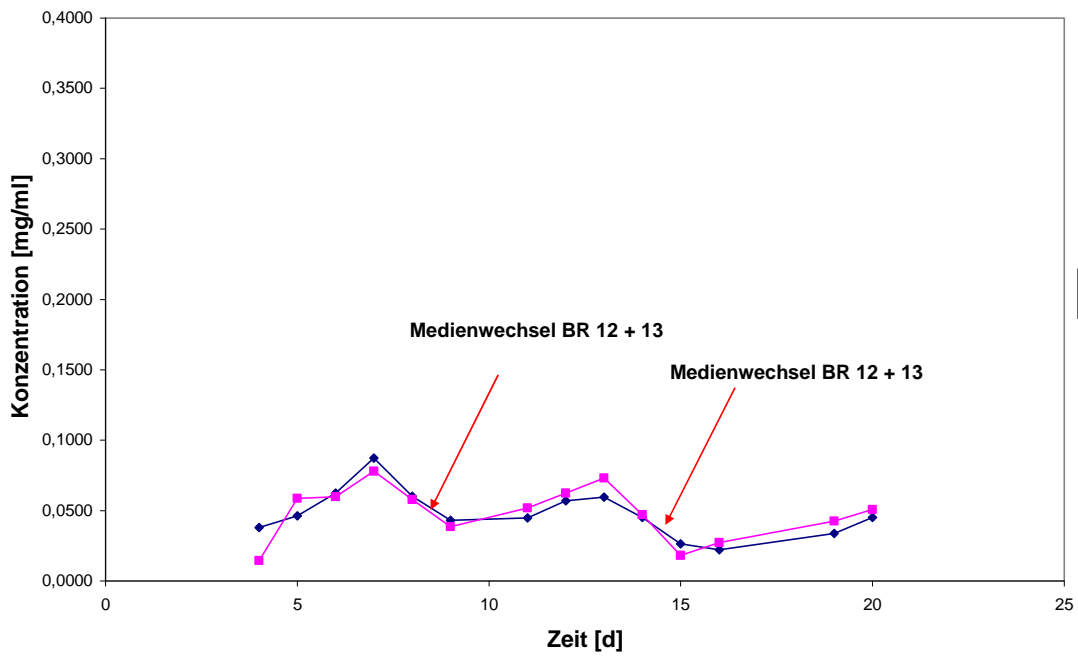
### Ureasesynthese BR 9



### Ureasyntese BR 10 + 11

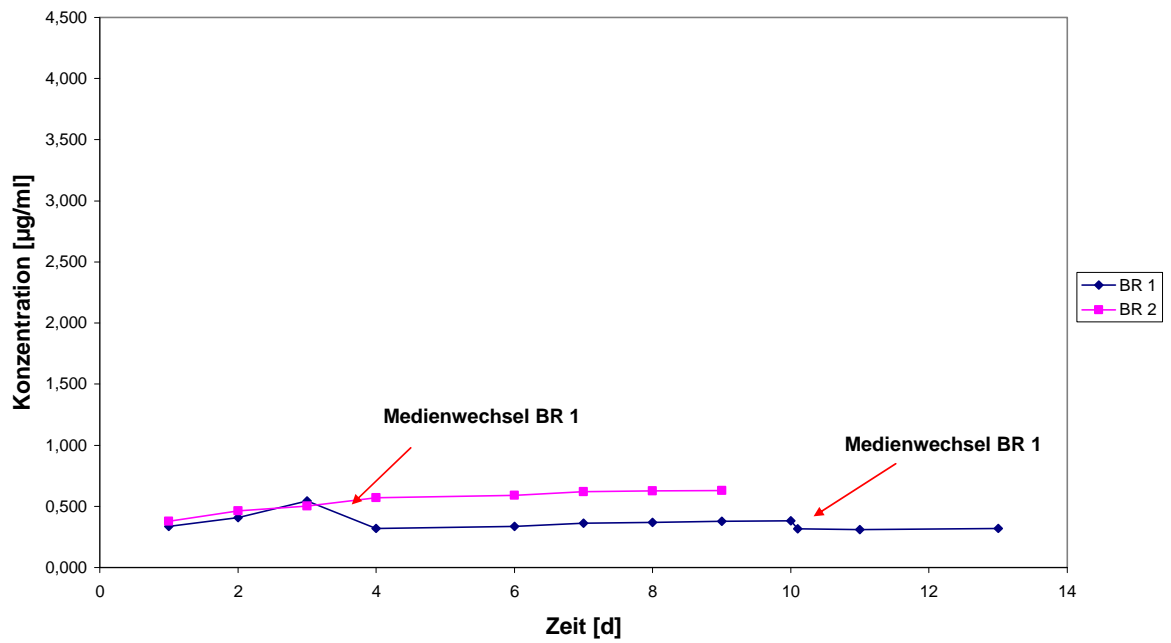


### Ureasyntese BR 12 + 13

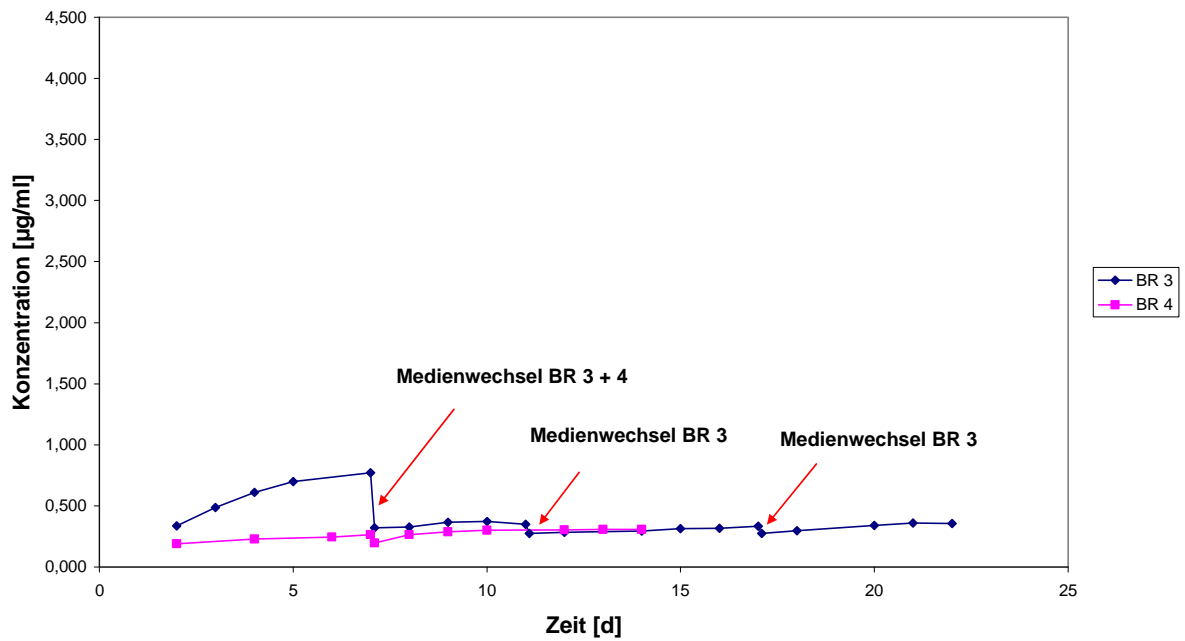


# Albuminsynthese BR 1 -13

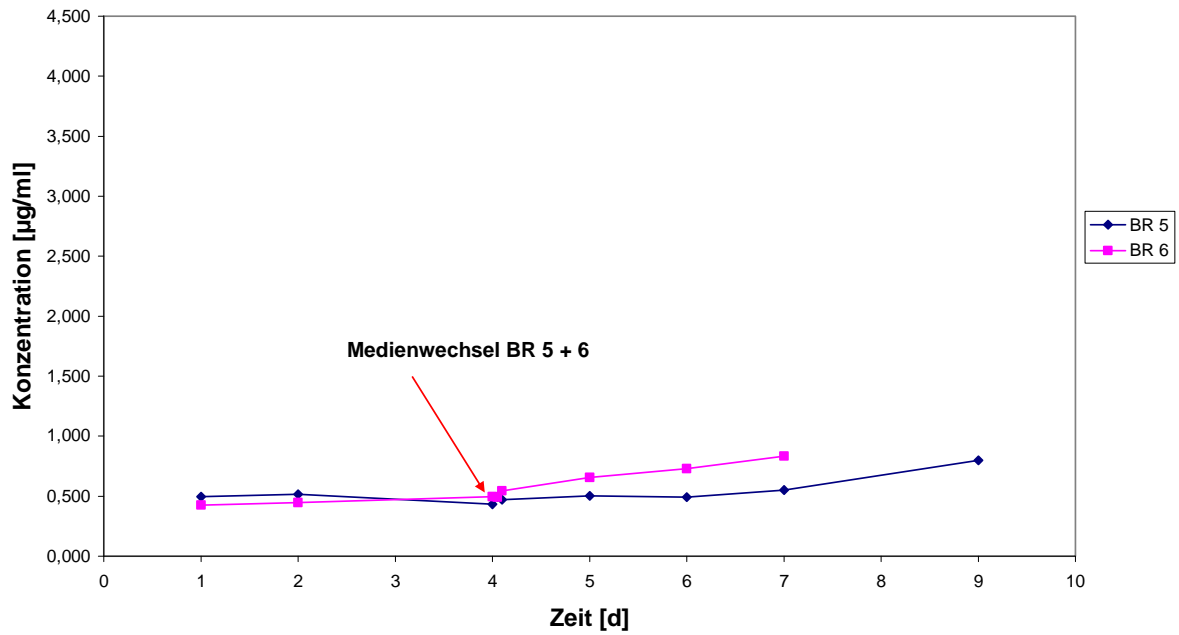
## Albuminsynthese BR 1 + 2



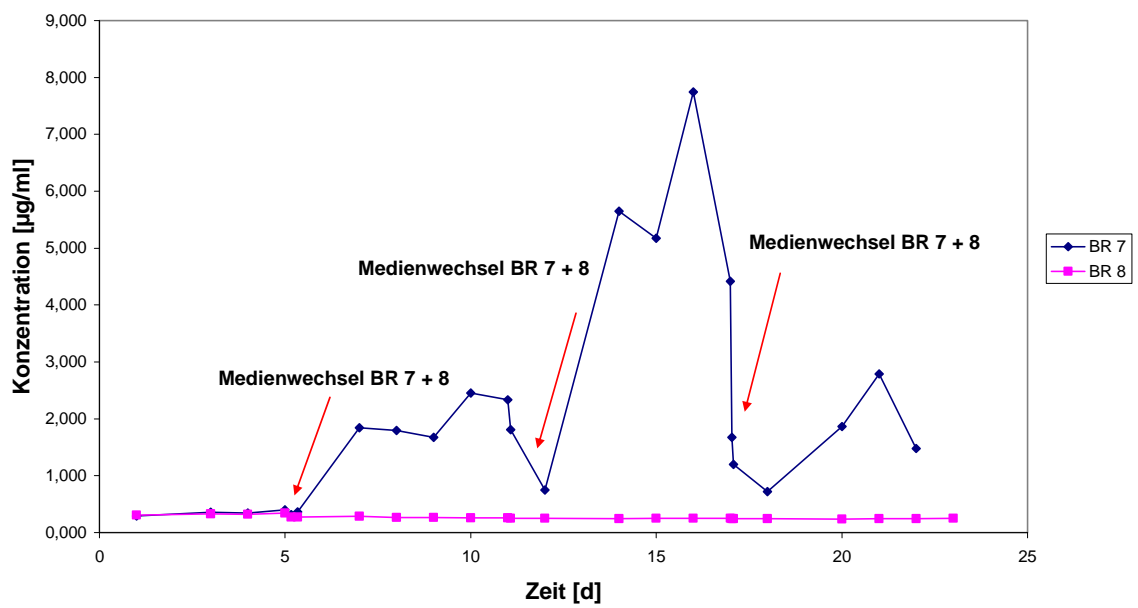
## Albuminsynthese BR 3 + 4



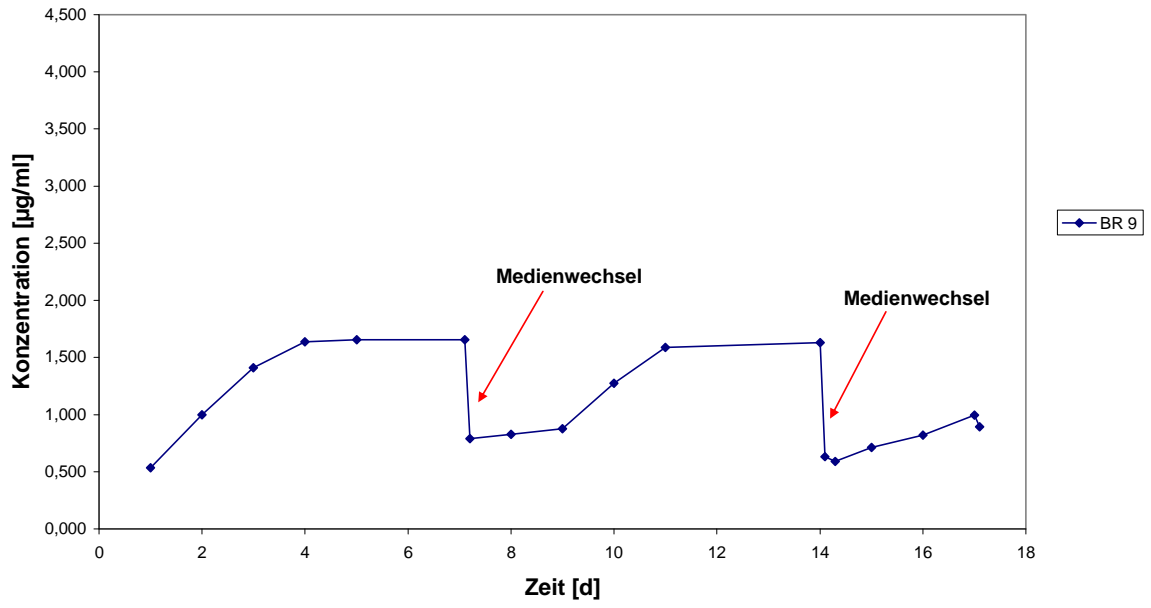
### Albuminsynthese BR 5 + 6



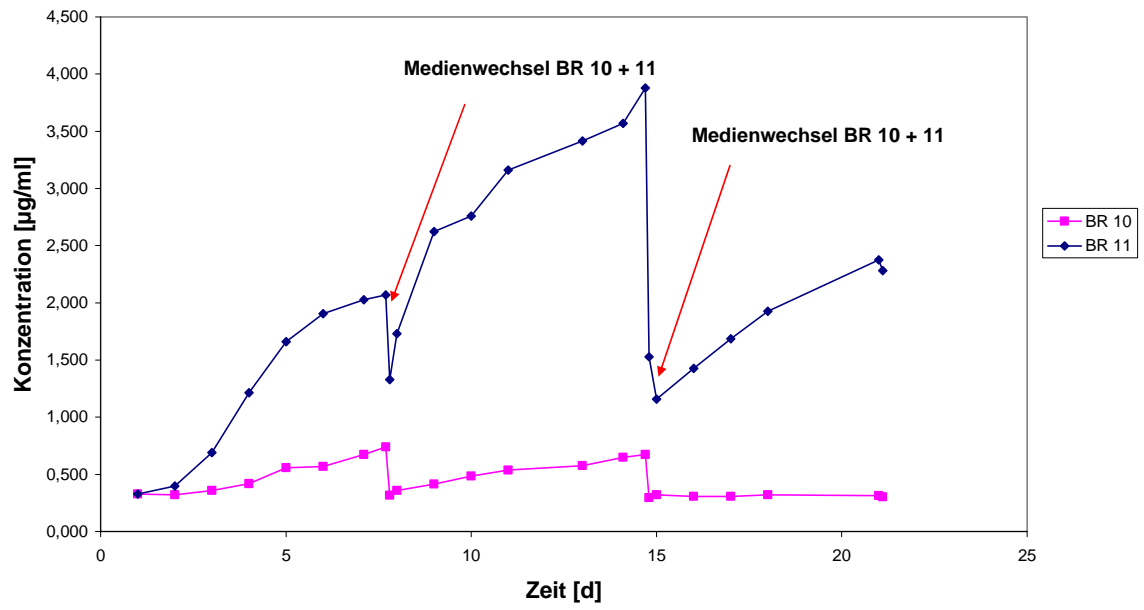
### Albuminsynthese BR 7 + 8



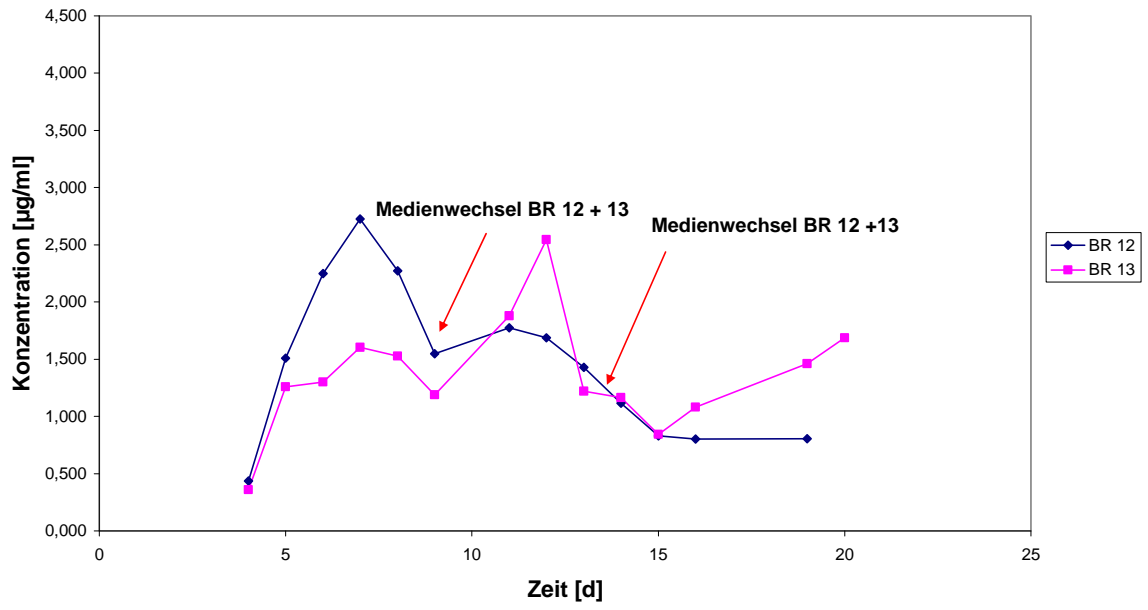
### Albuminsynthese BR 9



### Albuminsynthese BR 10 + 11



### Albuminsynthese BR 12 + 13





# 11. Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Johanna Elisabeth Schanz  
Geburtstag: 16.01.1979  
Hannover  
Beruf: Diplom-Biologin  
Nationalität: Deutsch  
Adresse: Dobelstr. 16  
70184 Stuttgart  
Tel.: 0711-2597394 mobil: 0177-3317816  
e-mail: johanna.schanz@igb.fraunhofer.de

## Ausbildung

Grundschule: 1985-1989 Luthe  
Orientierungsstufe: 1989-1991 Orientierungsstufe Nord Wunstorf  
Gymnasium: 1991-1998 Hölty Gymnasium Wunstorf  
Universität: 1998-2004 Universität Hannover  
**(Diplomstudiengang Biologie)**

## Berufserfahrung

seit 01.04.2005 Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik,  
Stuttgart  
Abteilung Zellsysteme  
Doktorandin  
Thema:  
"Etablierung einer biologischen vaskularisierten Matrix als  
Grundlage für ein Lebertestsystem"

23.04.2004 -28.02.2005 Medizinische Hochschule Hannover  
Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie and Artifizelle  
Organe (LEBAO)  
Abteilung Tissue Engineering  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

## Praktika/ Seminare

1. „Recommendations on the education and training of persons for directing animal experiences“  
(Prof. Dr. Joachim Hackbarth; Tiermedizinische Hochschule Hannover (2002))
2. “Biosafety”  
( Dr. Jürgen Mertsching; Medizinische Hochschule Hannover (13.09. -14.09.2004))
3. „Schriftliche Dokumente richtig formulieren“  
(Corinne Ullrich; Typetrain (25.02. -26.02.2005))
4. „Akquisitionsseminar“ (Dr. C. Hunert (14.-15-10.05))
5. „GMP Basistraining“ (APV (24.-25.10.05))
6. „Rhetorik und Präsentation“ (cum-Training; Ulrich Mosener (03.-04.11.06))

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Brunner und Prof. Dr. P. Scheurich für die Übernahme des Referats bzw. Koreferats.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. H. Mertsching für die Vergabe der Aufgabenstellung, die Betreuung und Förderung sowie ihre nachdrückliche Überzeugungskraft in Sachen Bundeslandwechsel.

Für Anleitung und fachliche Betreuung danke ich Kirstin Linke, deren gewissenhafte Vorarbeiten meine Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Großen Dank an Herrn Prof. Dr. Nüssler von der Charité Berlin für die Bereitstellung humaner Hepatozyten.

Großen Dank auch an Frau Dr. Saussele vom Institut für klinische Pharmakologie (IKP) Stuttgart für die HPLC Analysen der Dextrometorphanmetaboliten.

Für den Beistand bei technischen Fragen und die tolle Zusammenarbeit bei allen Bioreaktor betreffenden Tätigkeiten möchte ich Jan Hansmann danken.

Dank auch an Brigitte für die schönen Paraffinschnitte und Steffi, Esther und Agnes für Arbeitserleichterungen aller Art.

All den anderen in unserer jungen innovativen Arbeitsgruppe sei ebenfalls herzlichst gedankt für nette Pläuschchen (insbesondere Jacqueline, Petra und Martina), einen freundlichen Empfang (Markus) und eine wirklich nette Arbeitsatmosphäre (danke an Anja, Iz, Kai, Karsten, Michaela, Sibylle, Steffen, Silvia, Uli etc.) sowie ganz viel Unterstützung.

Das Beste was mir hier passieren konnte war und ist Thomas, der einfach dafür gesorgt hat, dass ich hier glücklich bin. Danke!

Ein letzter Dank geht an meine Eltern, die mich unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben und den Rest der Familie, die sich ständig vergrößert und für mich einfach die beste ist. Danke Ama für ganz viel Förderung und Liebe.

Und weil ich nicht wäre, was ich bin ohne Freunde: Dank auch an Maïke und Anna, die mein Herz immer an Hannover binden werden und Mirij und Alex, die dafür gesorgt haben, dass mir auch Stuttgart gefällt.