

Aus der

Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

**Wiederbesiedlung einer azellularisierten Lebermatrix
mit primären porcinen Hepatozyten sowie Kultivierung
in einem Bioreaktor**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sohl, Falk Ruven

2025

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. M. Schenk

2. Berichterstatter:

Professor Dr. A. Nüssler

Tag der Disputation:

13.03.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	8
1.1 Chronische Lebererkrankungen.....	8
1.2 Technische Voraussetzungen für Tissue Engineering.....	8
1.3 Bedingungen für die Kultivierung von Hepatozyten	9
1.3.1 Die Zusammensetzung des Mediums	10
1.3.2 Zell-Zell-Interaktionen.....	12
1.3.3 Die extrazelluläre Matrix.....	13
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	14
2. Materialien und Methoden.....	16
2.1 Versuchstiere.....	16
2.2 Organentnahme und Azellularisierung.....	16
2.3 Hepatozytenisolation.....	17
2.4 Wiederbesiedlung und Kulturphase	19
2.4.1 Aufbau des Bioreaktors	19
2.4.2 Zusammensetzung des Kulturmediums	20
2.4.3 Injektionsvorgang und Kultur.....	21
2.5 Evaluation der Zellfunktionen.....	22
2.5.1 Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT).....	22
2.5.2 Harnstoff.....	22
2.5.3 Proteine.....	23
2.5.4 Glucose und Laktat	23
2.5.5 Galactose	23

2.5.6 Cytochrom P450 Aktivität	23
2.6 Auswertung der Daten/Erstellung der Graphiken.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Azellularisierung	25
3.2 Hepatozytenisolation.....	27
3.3 Wiederbesiedlung und Kulturphase	27
3.4 Evaluation der Zellfunktionen.....	36
3.4.1 Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT).....	36
3.4.2 Harnstoff.....	37
3.4.3 Proteine	41
3.4.4 Glucose und Lactat	43
3.4.5 Galactose	46
3.4.6 Cytochrom P450 Aktivität	47
4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung	60
Materialien- und Herstellerverzeichnis	62
Azellularisierung	62
Hepatozytenisolation	63
Wiederbesiedlung und Kulturphase	64
Evaluation der Zellfunktionen.....	65
6. Literaturverzeichnis	67
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	78
Danksagung	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Stammlösungen, aus denen die Perfusionslösungen erstellt wurden.....	17
Tabelle 2: Zusammensetzung der Perfusionslösungen.....	18
Tabelle 3: Bezeichnung und Konzentration der Zusätze im Medium.....	20
Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wiederbesiedlungsvorgangs	27
Tabelle 5: Zellzahl, Kulturzeit sowie Messwerte aus dem Bioreaktor der wiederbesiedelten Lebern. Angabe von Temperatur, pH und Druck als Mittelwert \pm eine Standardabweichung.....	28
Tabelle 6: Harnstoffproduktion [μ g] pro 1 Mio. Zellen und Stunde über die Kulturdauer hinweg	40

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bioreaktor in Betrieb	19
Abbildung 2: Aufbau des Bioreaktors im Detail	20
Abbildung 3: Leber zu Beginn der Azellularisierung (A), nach der ersten Flasche SDS nach etwa 3,5 h (B) sowie zum Abschluss des Verfahrens (C). D zeigt einen Schnitt in HE-Färbung unter 40-facher Mikroskopvergrößerung.	25
Abbildung 4: Verlauf der Proteinkonzentration in der SDS-Lösung sowie des Perfusionsdrucks über den Zeitraum der Azellularisierung.	26
Abbildung 5: Druckverhältnisse im Pumpsystem über die Kulturdauer hinweg.	29
Abbildung 6: Leberläppchen aus Leber 80 mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt nach 69,5 Stunden Kulturdauer. 10-fache Vergrößerung.	30
Abbildung 7: Mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte von Leber 67 in 10-facher Vergrößerung (A) sowie Leber 80 in 20-facher Vergrößerung (B) zum Ende der Kulturphase nach 92 bzw. 69,5 Stunden.	31
Abbildung 8: Besiedelte Gefäßstrukturen in 20-facher Vergrößerung (A) sowie 40-facher Vergrößerung (B) bei Leber 67.	32
Abbildung 9: Schnitt aus Leber 80 in 40-facher Vergrößerung (A) sowie aus Leber 73 in 20-facher Vergrößerung (B).	33
Abbildung 10: Kanalikuläre Strukturen bei Leber 67 in 40-facher Vergrößerung.	34
Abbildung 11: Polymer und ZUC-Färbung bei Leber 80 unter 40-facher Vergrößerung.	35
Abbildung 12: Enzymaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert	36
Abbildung 13: Harnstoff im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert.	38
Abbildung 14: Harnstoff im Überstand des Monolayers über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert.	39
Abbildung 15: Proteine im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert.	41
Abbildung 16: Proteine sowie Enzymaktivität der GOT im Überstand der Monolayer Kultur über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert.	43

Abbildung 17: Glucose im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert.....	44
Abbildung 18: Lactat im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert	46
Abbildung 19: Galactoseproduktion / -verbrauch über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert.....	47
Abbildung 20: Produktion von 7-Hydroxycumarin aus 7-Ethoxycumarin	48

Abkürzungsverzeichnis

AST/GOT.....	<i>Aspartat-Aminotransferase/ Glutamat-Oxalacetat-Transaminase</i>
dH ₂ O.....	<i>Destilliertes Wasser</i>
ECM.....	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
EGF.....	<i>Epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor</i>
EGTA.....	<i>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure</i>
FCS.....	<i>fetales Kälberserum</i>
GAG.....	<i>Glykosaminoglykane</i>
HE-Färbung.....	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HEPES.....	<i>N-2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure</i>
mRNA.....	<i>Messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure</i>
PBS.....	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
SDS.....	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
TRIS.....	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>

1. Einleitung

1.1 Chronische Lebererkrankungen

Etwa 29 Millionen Menschen in der Europäischen Union leiden unter einer chronischen Lebererkrankung (Blachier et al. 2013). Alleine in deutschen Krankenhäusern wurden 2015 61.688 Fälle chronischer Lebererkrankungen vollstationär behandelt, rund 10 Prozent davon verstarben (Statistisches Bundesamt 2016). Faktoren wie virale Infektionen, Alkoholabusus oder das metabolische Syndrom können zu progressivem Parenchymverlust und damit zu Fibrose und Zirrhose der Leber führen. Im Endstadium der Leberzirrhose stellt die Lebertransplantation derzeit noch immer die einzige kausale Therapie dar. Während jedoch die Anzahl der Anmeldungen zur Lebertransplantation in Deutschland in den vergangenen Jahren nahezu konstant blieb, ist die Zahl tatsächlich transplantiert Organe seit Jahren rückläufig (Stand 2017). Trotz Verfahren wie der Teilleber-Lebendspende oder der Split-Lebertransplantation, bei welcher das Organ geteilt und auf zwei Patienten verteilt wird, standen 2016 in Deutschland den 1248 Neuanmeldungen auf der Warteliste nur 888 durchgeführte Lebertransplantationen gegenüber (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2017). Um den hohen Bedarf an Spenderlebern zu decken, sind daher neue Verfahren dringend erforderlich. Eine mögliche Lösung könnte hierbei das „Tissue Engineering“ darstellen, ein junger Bereich der Medizin, der sich mit der Züchtung von Gewebestrukturen aus isolierten Spenderzellen befasst. Vergleichsweise unkompliziert gebaute Organe wie Urethra oder Blutgefäße wurden bereits erfolgreich hergestellt und auch beim Menschen eingesetzt (Hibino et al. 2010; Raya-Rivera et al. 2011). Im Gegensatz dazu ist bis zur Transplantation einer funktionsfähigen in vitro erzeugten Leber noch sehr viel weitere Forschungsarbeit nötig.

1.2 Technische Voraussetzungen für Tissue Engineering

Vor der Transplantation eines durch Tissue Engineering generierten Organs muss dessen Funktionalität in ausreichendem Maße gewährleistet sein. Um die Anheftung und Anordnung der verschiedenen Zelltypen auf Trägermaterialien zu

ermöglichen, müssen die Zellen über mehrere Wochen ex vivo kultiviert werden. Die Kultivierungszeit für die Rekonstruktion einer implantierbaren Urethra betrug beispielsweise vier bis sieben Wochen (Raya-Rivera et al. 2011). Während dieser Zeit müssen Faktoren wie eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, ein physiologischer pH-Wert, ein Abtransport anfallender Stoffwechselprodukte sowie eine physiologische Temperatur gegeben sein. In der Zellkultur werden hierfür eigens konzipierte Bioreaktoren eingesetzt, welche durch kontinuierliche Messung und automatische Regelkreise physiologische Kulturbedingungen garantieren.

1.3 Bedingungen für die Kultivierung von Hepatozyten

Für die Erfüllung der wesentlichen Leberfunktionen sind die Leberepithelzellen (Hepatozyten) verantwortlich. Es handelt sich dabei um etwa 25 µm große, polar gebaute Zellen mit einem Blut- und einem Gallenpol über welche sie mit den Sinusoiden bzw. mit den Gallenkanälchen in Verbindung stehen. Im Verband formen die Hepatozyten radiär angeordnete Platten aus je einer Zellreihe, welche zu mehreren das Leberläppchen bilden. Zu den zentralen Funktionen gehören die Entgiftung vieler endogener und exogener Substanzen, die Konjugation von Bilirubin, die Galleproduktion, der Glucose- sowie Lipidstoffwechsel und die Synthese zahlreicher Serumproteine wie Albumin oder Gerinnungsfaktoren (Welsch und Deller 2011). Unter klassischen Kulturbedingungen unterliegen isolierte Hepatozyten jedoch bereits nach wenigen Tagen einer starken Abnahme ihrer zellspezifischen Funktionen (Fahl et al. 1979; Grieninger und Granick 1978) sowie einer Änderung ihrer Morphologie (Chapman et al. 1973). Clayton und Darnell (1983) untersuchten die Veränderungen auf Ebene der Transkription und stellten dabei eine schrittweise Konzentrationsabnahme bei einer Mehrheit der lebertypischen mRNA fest. Für die Reifung potenziell funktionsfähiger Organe brauchen die Zellen jedoch ausreichend Zeit, sich an entsprechende Trägermaterialien anzuheften und sich auf die entsprechende Anzahl benötigter Zellen zu vermehren. Eine längerfristige Kultivierung ex vivo ist daher unerlässlich. Studien, wie die von Dunn et al. (1989), bei der die Albuminproduktion in einer Monolayerkultur durch den Überzug mit einer

Kollagenschicht (Sandwichkultur) nach 7 Tagen wieder angehoben werden konnte, zeigten, dass es sich bei dem Abfall leberspezifischer Funktionen in den ersten Tagen nach Beginn der Kultur weniger um eine irreversible Dedifferenzierung als vielmehr um eine Anpassungsreaktion an insuffiziente Kulturbedingungen handelt. Inzwischen konnten durch neuere Kultivierungsmethoden leberspezifische Funktionen wie beispielsweise die Albuminproduktion über einen Zeitraum von 30 Tagen hinaus auf hohem Niveau erhalten werden (Shulman und Nahmias 2013). Optimale Kulturbedingungen sind daher ein unerlässlicher Faktor für die Langzeitkultivierung von Hepatozyten. LeCluyse et al. (1996) unterteilen drei Bereiche, die eine wichtige Rolle spielen:

1. Die Zusammensetzung des Mediums
2. Zell-Zell-Interaktionen
3. Die extrazelluläre Matrix

1.3.1 Die Zusammensetzung des Mediums

Tierisches Serum wird in vielen Zellkulturen aufgrund zahlreich enthaltener Stoffe, welche das Wachstum, den Metabolismus und die Proliferation von Zellen fördern (Brunner et al. 2010), dem Medium zugesetzt. Bei der Kultivierung primärer Hepatozyten hat sich jedoch die Verwendung von serumfreiem Medium, in welchem das Serum durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Spurenelemente ersetzt wurde, bewährt. Einerseits wirkt dieses im Gegensatz zu serumhaltigen Medium stabilisierend auf leberspezifische mRNA (Jefferson et al. 1984), andererseits wurde über inhibierende Effekte serumhaltigen Mediums auf die längerfristige Etablierung von Gallenkanälchen durch Hemmung der Polarisierung der Hepatozyten berichtet (Terry und Gallin 1994; Tuschl und Mueller 2006). Zwar spielt Serum für die Adhäsion der Leberzellen an Kulturplatten eine wichtige Rolle (Horiuti et al. 1982; Klaunig et al. 1981; Seglen und Fossa 1978), durch Kultivierung auf einer Biomatrix können jedoch äquivalente Adhäsionsraten in serumfreiem sowie serumhaltigem Medium erreicht werden (Jauregui et al. 1986). Darüber hinaus enthält Serum zahlreiche

Syntheseprodukte in unbekannter Konzentration, welche bei der Bestimmung von Syntheseleistungen zu Verzerrungen führen können. Für die serumfreie Kultivierung von Hepatozyten hat sich die Zugabe von epidermalem Wachstumsfaktor, Dexamethason, Insulin sowie Glukagon bewährt. Die mitogene Wirkung des Serums wird hierbei durch die Zugabe von epidermalem Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF) kompensiert. Durch die Perfusion mit Kollagenase bei der Zellisolation unterliegen die Hepatozyten unabhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren einem Übergang von der G₀ in die G₁ Phase, welche sie bis zu einem bestimmten Punkt durchlaufen. Ohne Stimulation durch Mitogene kann dieser Punkt, der sogenannte R Punkt, nicht überwunden werden und somit keine Zellteilung stattfinden. Die Zugabe von EGF ermöglicht es, diesen Punkt zu überschreiten und in die S-Phase einzutreten (Loyer et al. 1996). Weiterhin zeigten Rattenhepatozyten unter Einfluss von EGF eine verbesserte Überlebensrate sowie einen Erhalt von Morphologie und leberspezifischen Funktionen über mehrere Wochen hinweg (Jansing und Samsonoff 1984). Ein weiterer wichtiger Bestandteil für die Langzeitkultivierung von Leberzellen ist Dexamethason. Bailly-Maitre et al. (2001) konnten anhand von Versuchen mit Ratten- und humanen Hepatozyten demonstrieren, dass wenige Tage nach Einbringen dieser isolierten Zellen in Kultur eine spontane Apoptose einsetzt. Dexamethason vermittelt eine gesteigerte Expression anti-apoptotischer Proteine sowie eine verminderte Expression pro-apoptotischer Proteine (Bailly-Maitre et al. 2002) und trägt dazu bei, die polygonale Morphologie der Hepatozyten zu erhalten und ihre Lebensdauer deutlich zu verlängern (Bailly-Maitre et al. 2001; Laishes und Williams 1976). Auch beim Erhalt leberspezifischer Funktionen spielt das Glukokortikoid eine wichtige Rolle. So konnte in Zellkulturen die Enzymaktivität lebertypischer Enzyme wie beispielsweise der Glucokinase durch Zugabe von Dexamethason über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten und gleichzeitig der Aktivitätsanstieg der leberuntypischen Hexokinase verzögert werden (Felfu et al. 1982). Weiterhin wurde von begünstigenden Effekten auf die Genexpression bestimmter Vertreter der UDP-Glucuronosyltransferasen (Li et al. 1999), Sulfotferasen (Liu et al. 1996), Cytochrome P450 (Liddle et al. 1998)

sowie auf die Expression des Albumingens (Nawa et al. 1986) berichtet. Ein weiteres Hormon, welchem eine lebensverlängernde Wirkung auf Hepatozyten zugeschrieben wird, ist Insulin. Dieses nimmt positiven Einfluss auf zahlreiche Zellfunktionen, wie beispielsweise die Expression des Albumingens (Flaim et al. 1985) oder die DNA-Synthese (Richman et al. 1976). Insulin wird darüber hinaus zur Aufrechterhaltung der Fähigkeit zur Glykogenspeicherung (Bernaert et al. 1977) sowie zur Inhibition des intrazellulären Proteinabbaus benötigt (Ballard et al. 1980) und verstärkt den hemmenden Effekt von Aminosäuren auf den Abbau von mRNA (Balavoine et al. 1993).

Glukagon ist ein effektiver Stimulator aller fünf Enzyme der Harnstoffsynthese, dessen Effekt durch die Anwesenheit von Dexamethason noch weiter verstärkt wird (Lin et al. 1982). Darüber hinaus besitzt Glukagon alleine regulatorische Funktion für spezifische Enzyme beispielsweise aus Glucose-, Aminosäuren- und Lipidmetabolismus (Ichihara et al. 1982) sowie zusammen mit Insulin und Dexamethason unterstützende Wirkung auf den Erhalt leberspezifischer Funktionen wie beispielsweise die Albumin Genexpression (Nawa et al. 1986).

1.3.2 Zell-Zell-Interaktionen

In vivo sind die Hepatozyten der Leber von zahlreichen weiteren Zellen umgeben, die mit ihnen gemeinsam das Organ bilden. Obwohl die Hepatozyten letzten Endes für die Ausführung eines Großteils aller wesentlichen Leberfunktionen verantwortlich sind, spielen dennoch auch die nicht-parenchymatösen Zellen, wie Endothelzellen, Ito-Zellen, Kupffer-Zellen oder Cholangiozyten bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle. In einer Co-Kultur mit Leberepithelzellen zeigten Hepatozyten eine deutlich erhöhte Transkription leberspezifischer Gene, welche über mehrere Wochen aufrecht erhalten werden konnte (Fraslin et al. 1985) sowie eine ausgeprägtere Aktivität der Phase I und Phase II Schlüsselenzyme (Rogiers et al. 1990). Umgekehrt wurde ebenfalls ein stabilisierender Effekt der Hepatozyten auf die Funktion nicht-parenchymatöser Zellen beobachtet (Villafuerte et al. 1994). Weiterhin besteht eine stimulierende Wirkung von Co-Kulturen auf die DNA-Synthese und auf das Wachstum von Hepatozyten, welche auf Zell-Zell-Kontakten, unabhängig von sezernierten Faktoren, beruht

(Shimaoka et al. 1987). Auch der Zellkontakt der Hepatozyten untereinander spielt in Hinblick auf die Zelldichte eine wichtige Rolle: Nakamura et al. (1983a) beobachteten, dass Rattenhepatozyten bei hoher Dichte trotz Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht proliferieren konnten. Beim Aussähen der Zellen in geringerer Dichte fand hingegen eine Zellteilung statt. Nakamura et al. (1983b) beschreiben zwei gegenseitige Funktionsstadien von Hepatozyten, welche sich in Abhängigkeit von der Zelldichte verändern: Wachstumsbezogene Funktionen, welche durch geringe Zelldichte stimuliert werden und hepatozytenspezifische Funktionen, stimuliert durch hohe Zelldichte. Die Regulierung dieser Funktionsstadien wird durch Bestandteile der Zelloberfläche via Zell-Zell-Kontakt vermittelt (Nakamura et al. 1984; Nakamura et al. 1983b). Vergleichende Studien zwischen 2D- (Monolayer) und 3D-Zellkulturen (Sphäroide) belegen diese Notwendigkeit ausgeprägter Zell-Zell-Kontakte für die Erhaltung des differenzierten Zustands der Hepatozyten (Koide et al. 1989; Yuasa et al. 1993).

1.3.3 Die extrazelluläre Matrix

Als gängiges Verfahren zur Kultivierung primärer Hepatozyten hat sich die Herstellung von Zellaggregaten (Sphäroiden) etabliert. Als Leberersatzverfahren ist diese Kultivierungsform jedoch nur bedingt geeignet, da die unzureichende Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff zu den Zellen im Inneren den größtmöglichen Durchmesser von Zellaggregaten auf weniger als 200 µm limitiert (Landry et al. 1985; Török et al. 2001). Um einen Verbund aus mehreren Milliarden Hepatozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, ist daher ein mikrovaskuläres System unerlässlich (Folkman und Hochberg 1973). Ein in dieser Hinsicht besonders vielversprechendes Modell stellt die Azellularisierung ganzer Organe durch Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat oder Triton X-100 dar. Hierbei bleibt die Architektur des Gefäßbaumes sowie die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) größtenteils erhalten (Uygun et al. 2010). Die in der Matrix enthaltenen Glykosaminoglykane (GAG) sowie extrazellulären Proteine wie Laminin, Kollagen und Fibronectin spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Adhäsion (Hynes 1992; Miyamoto et al. 1998), der Differenzierung (Miyamoto et al. 1998) und dem Wachstum

(Kanematsu et al. 2004; Saksela et al. 1988) von Hepatozyten. Damit wird durch die Verwendung eines azellularisierten Organs nicht nur die Versorgung der Hepatozyten gewährleistet, sondern weiterhin eine optimale Umgebung für die Langzeitkultivierung der Zellen während der Wiederbesiedelung bereitgestellt. Darüber hinaus können die Hepatozyten bei der Injektion den erhaltenen Gefäßbaum nutzen, um eine effektive Wiederbesiedelung der Leberläppchen zu erreichen (Soto-Gutierrez et al. 2011). Die Azellularisierung ganzer Organe ist ein mittlerweile häufig angewandtes Verfahren, welches mit Lebern zahlreicher verschiedener Spezies, unter anderem der von Ratten, Mäusen und Schweinen, erfolgreich durchgeführt werden konnte (Chen et al. 2017; Cheng et al. 2013; Kajbafzadeh et al. 2013; Kock et al. 2011; Sabetkish et al. 2015; Soto-Gutierrez et al. 2011; Uygun et al. 2010; Verstegen et al. 2017; Wang et al. 2015). Durch Optimierung der Verfahren ist inzwischen eine standardisierte Azellularisierung einer porcinen Leber in weniger als 24 Stunden möglich (Bühler et al. 2015).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Gesamtziels „Entwicklung einer biotechnologisch hergestellten Leber“ durchgeführt. Ein zentraler Bestandteil ist dabei die Wiederbesiedlung einer azellularisierten Lebermatrix mit primären Hepatozyten mit dem langfristigen Ziel der Transplantation eines voll funktionsfähigen Organs. Die Wiederbesiedlung azellularisierter Lebermatrices wurde bereits in verschiedenen Variationen durchgeführt. Bei einem Großteil der Arbeiten lag der Fokus jedoch insbesondere auf den technischen Faktoren der Azellularisierung und der Wiederbesiedlung. Zur Funktionalität dieser wiederbesiedelten Lebermatrices in längerfristig perfundierter Kultur wurden nur wenig Daten veröffentlicht. Auf diesen Aspekten soll der Fokus dieser Arbeit liegen. Dabei sollen insbesondere folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Wie entwickeln sich Viabilität und Stoffwechselleistung der Hepatozyten über einen mehrere Tage umfassenden Kulturzeitraum ex vivo?
- 2) Ist der Bioreaktor für eine längerfristige Kultivierung primärer porciner Hepatozyten geeignet?

- 3) Anhand welcher Parameter lässt sich die Viabilität der Hepatozyten während der Kulturphase beurteilen?
- 4) Sind die angewendeten Verfahren zur Wiederbesiedlung und Kultivierung in Hinblick auf das Fernziel Organtransplantation geeignet?

2. Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die für die Azellularisierung genutzten Lebern stammten aus weiblichen Göttinger Minipigs. Die Entnahme erfolgte im Rahmen von Arbeiten anderer Forschungsabteilungen, wobei die Versuche durch das Ethik-Komitee Tübingen genehmigt wurden. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gemäß den nationalen Richtlinien gehalten.

Die Lebern für die Hepatozytenisolation entstammten Deutsche Landrasse Schweinen. Auch hier erfolgte die Entnahme im Rahmen von Arbeiten anderer Abteilungen, auch diese genehmigt durch das Ethik-Komitee Tübingen.

2.2 Organentnahme und Azellularisierung

Zur Entnahme der Lebern für die Azellularisierung wurden die Göttinger Minipigs mit Ketamin (7 ml/kg Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend erfolgte die Euthanasie mit T 61 Injektionslösung (Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid, Embutramid). Zusätzlich wurden 100 IE Heparin pro kg Körpergewicht injiziert, um einer Blutgerinnung während des Entnahmevorgangs vorzubeugen. Daraufhin erfolgte die Durchtrennung der vorderen und hinteren Hohlvene, Pfortader, Arteria hepatica sowie des Gallengangs durch Laparotomie in Linksseitenlage. Um das im Organ verbliebene Blut auszuspülen wurde ein Katheter in die Pfortader eingebracht und die Leber mit 3 l isotonischer Kochsalzlösung perfundiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung der Organe bei -80°C. Die Azellularisierung erfolgte nach der von Bühler et al. (2015) beschriebenen Methode: Die Lebern wurden zunächst für ca. 16 Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut und daraufhin bei einem Druck zwischen 20 und 25 mmHg mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für etwa eine Stunde durch den in die Pfortader eingebrachten Katheter gespült. Anschließend wurden die Organe mit 10 l einer einprozentigen Lösung aus Natriumdodecylsulfat (SDS) in steril filtriertem Wasser, welche mittels eines Infusionswärmers auf 37°C erwärmt wurde, rezirkulierend durchspült. Die Einstellung des Druckes auf 20 -

25 mmHg durch Anpassung der Pumpendrehzahl sowie die Aufzeichnung dieser Daten erfolgte automatisiert durch DasyLab. Die optische Dichte und damit der Proteingehalt der SDS-Lösung wurde spektrophotometrisch bei 280 nm bestimmt und ebenfalls durch DasyLab protokolliert. Sobald sich ein Sättigungsplateau einstellte, erfolgte eine zwischenzeitliche einstündige Spülung mit PBS und nachfolgend eine weitere rezirkulierende Perfusion mit einprozentiger SDS-Lösung bis deren Proteingehalt nicht weiter anstieg (etwa 22 h Gesamtdauer). Um verbliebenes SDS aus der Lebermatrix auszuspülen, wurden die Lebern im Anschluss mit 80 l steril filtriertem Wasser gespült.

Um bei der Wiederbesiedlung eine höhere Zelldichte zu erzielen, wurde ein Katheter retrograd (Leber 73 und 80) bzw. anterograd (Leber 67) in den Lobus hepatis dexter eingebracht und dieser von der übrigen Leber abgetrennt.

2.3 Hepatozytenisolation

Der Vorgang der Isolation basierte auf der Zwei-Stufen-Kollagenaseperfusion nach Seglen (1976). Vergleiche hierzu auch Bühler (2017). Zunächst wurden die folgenden Stammlösungen angesetzt (Tabelle 1):

Tabelle 1: Zusammensetzung der Stammlösungen, aus denen die Perfusionslösungen erstellt wurden.

Stammlösung A	NaCl (143,41 g/l) in dH ₂ O
Stammlösung B	NaHCO ₃ (42,01 g/l) in dH ₂ O
Stammlösung C	KCl (8,80 g/l) MgCl ₂ x 6H ₂ O (4,80 g/l) NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (3,39 g/l) Na ₂ SO ₄ (3,39 g/l) in dH ₂ O
Stammlösung D	CaCl ₂ (5,55 g/l) in dH ₂ O
EGTA-Lösung	38,4 g EGTA wurden auf 70 ml dH ₂ O gegeben und bis zur vollständigen Lösung mit Natriumhydroxid-Plätzchen versetzt. Anschließend

	wurde mittels dH ₂ O auf 100 ml aufgefüllt.
--	--

Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei Raumtemperatur (Stammlösung A-D) bzw. 4 °C (EGTA-Lösung) gelagert. Aus den Stammlösungen wurden die folgenden Perfusionslösungen hergestellt (Tabelle 2):

Tabelle 2: Zusammensetzung der Perfusionslösungen.

Perfusionslösung 1	0,5 ml EGTA-Lösung wurde mit 20 ml HEPES und je 50 ml der Stammlösungen A, B, C versetzt und mit dH ₂ O auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde der pH mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert.
Perfusionslösung 2	20 ml HEPES wurde mit je 50 ml der Stammlösungen A, B, C, D versetzt und mit dH ₂ O auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde der pH mit 1 M HCl auf 7,2 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

Vor Gebrauch wurden die Perfusionslösungen bei 41 °C im Wasserbad 60 Minuten mit Carbogen begast. Anschließend erfolgte nach Euthanasie die Entnahme des Lobus hepatis dexter aus den Deutsche Landrasse Schweinen wie oben für den Azellularisierungsvorgang beschrieben. Der Leberlappen wurde direkt nach Entnahme mit 1 Liter Perfusionslösung 1 über ein Infusionssystem gespült. Nach Einbringen eines Katheters in die Pfortader erfolgte die Perfusion ohne Rücklauf mit einem weiteren Liter Perfusionslösung 1 sowie 500 ml Perfusionslösung 2 über eine Rollerpumpe. Im weiteren Verlauf wurde auf rezirkulierende Perfusion mit 300 ml Kollagenaselösung umgestellt. Letztere wurde unmittelbar vor der Perfusion aus 300 µg Kollagenase und 300 ml auf 41 °C erwärmter sowie mit Carbogen begaster Perfusionslösung 2 hergestellt.

Nach etwa einer Stunde wurde der Leberlappen zerkleinert und die auslaufende Suspension unter Zugabe von Perfusionslösung 2 durch ein 100 µm Sieb gespült. Um Verunreinigungen und nicht-parenchymale Zellen zu entfernen, wurde die Suspension für 15 min bei 4 °C inkubiert, der Überstand abgenommen und mit Perfusionslösung 2 nachgefüllt. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3-mal durchgeführt. Zuletzt erfolgte die Überführung der Zellen in Kulturmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 3, Seite 20) sowie eine Zellzählung und Bewertung der Viabilität mit Trypanblau.

2.4 Wiederbesiedlung und Kulturphase

2.4.1 Aufbau des Bioreaktors

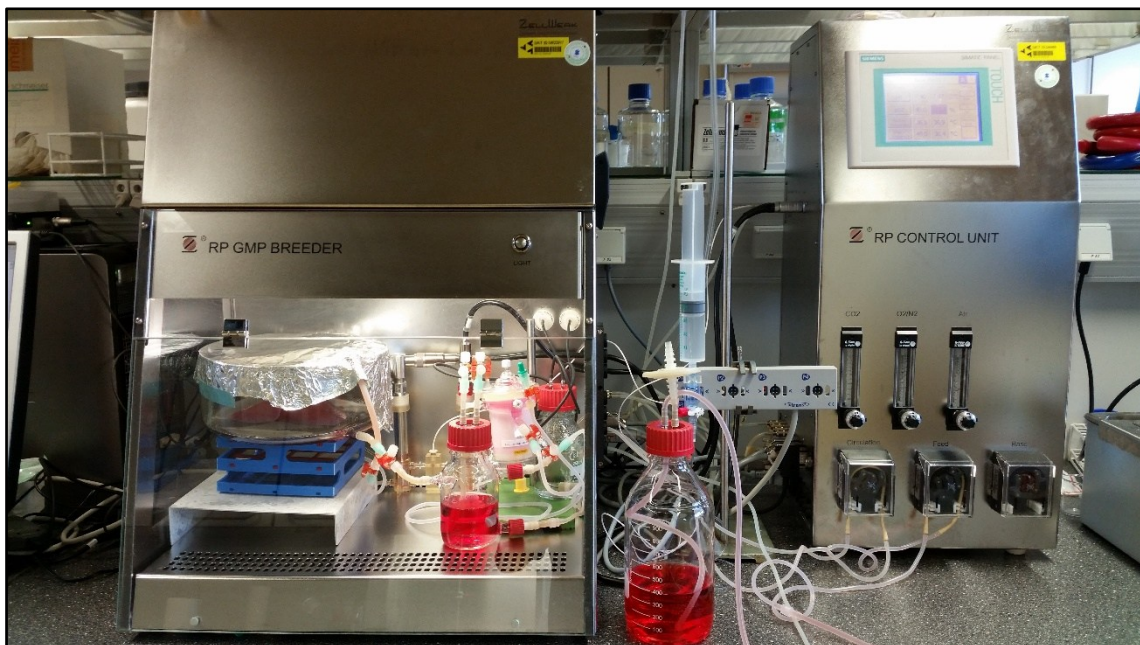


Abbildung 1: Bioreaktor in Betrieb

Die Entwicklung eines geeigneten Bioreaktors für die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte im Rahmen einer Masterarbeit durch Erich-Dirk Göllner. Der Aufbau ist in Abbildung 1 sowie Abbildung 2 dargestellt und wurde für diese Arbeit übernommen. Grundlage bildeten der Z[®] RP GMP Breeder sowie die Z[®] RP Kontroll-Einheit der Firma Zellwerk. Bei dem Z[®] RP GMP Breeder handelt es sich um eine sterile, temperierte Arbeitsumgebung auf Basis einer Laminar Flow Bank, in welcher der Aufbau des Systems erfolgte. Über die zugehörige Z[®] RP

Kontroll-Einheit wurden die aktuellen Kulturmesswerte erfasst und gegebenenfalls automatisiert dem Sollwert entsprechend angepasst. Die Perfusion der Lebermatrix erfolgte retrograd über die V. hepatica (Leber 73 und 80) bzw. über die Pfortader (Leber 67). Die Flussrate wurde auf einen effektiven Druck von etwa 15 mmHg angepasst. Über einen Hohlfaseroxygenator wurde das System mit wasserdampfgesättigter Luft versorgt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte CO₂-gesteuert durch die Z[®] RP Kontroll-Einheit. DasyLab protokollierte die Messwerte Temperatur, pH-Wert und Druck.

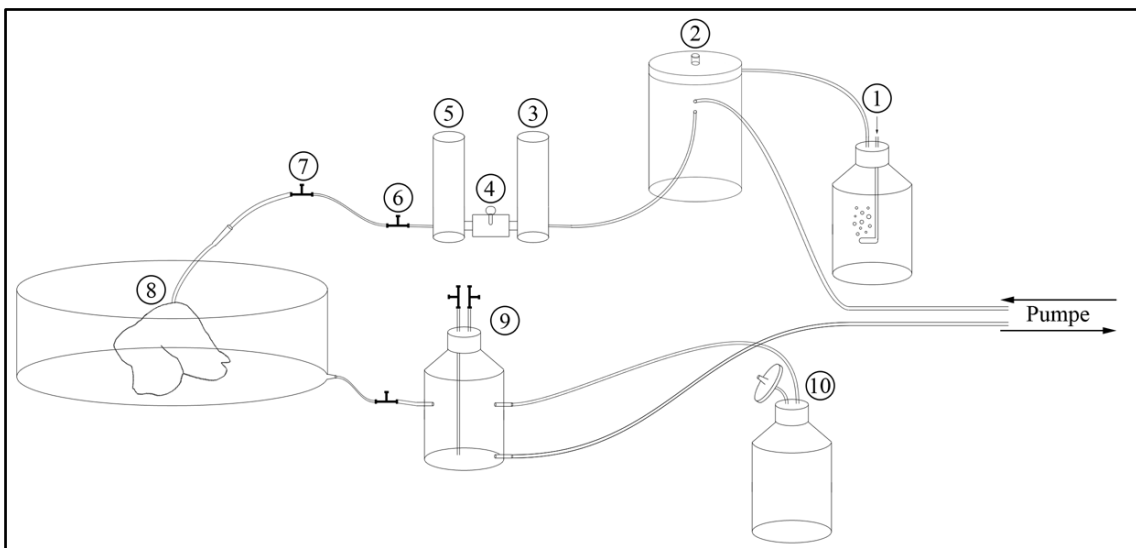


Abbildung 2: Aufbau des Bioreaktors im Detail: 1: Luftbefeuchter, 2: Oxygenator, 3: pH-Messsonde, 4: Temperaturfühler, 5: O₂-Messsonde, 6: Druckmesser, 7: Dreiwegehahn zur Hepatozyteninjektion, 8: Lobus hepatis dexter der azellularisierten Lebermatrix, 9: Vorratsgefäß für Probenentnahme, 10: Überlauf

2.4.2 Zusammensetzung des Kulturmediums

Grundlage bildete Williams' Medium E, modifiziert nach Nelson et al. (2013), ergänzt durch eigene Zugaben. Diese sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Bezeichnung und Konzentration der Zusätze im Medium. *= Zugabe von 7-Ethoxycumarin erfolgte nur am dritten Tag zusammen mit dem Mediumwechsel.

Substanz	Konzentration
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	20 mmol/l
N-Acetyl-Alanyl-L-Glutamin	2 mmol/l

Gentamycin	0,1 mg/ml
Amphotericin B	2,5 mg/l
Dexamethason	1 mmol/l
Insulin	10 µg/ml
Glukagon	9,1 pg/ml
Epidermal Growth Factor, human	50 ng/ml
Sorbitol	1 mg/ml
Galactose	1 mg/ml
Ammoniumchlorid	1 mmol/l
7-Ethoxycumarin*	50 mmol/l

2.4.3 Injektionsvorgang und Kultur

Die Injektion der Zellen erfolgte nach der „Multistep“ Methode von Soto-Gutierrez et al. (2011). Die isolierten Hepatozyten wurden in 4 x 50 ml Medium über Infusionsspritzen mit einer Flussrate von ca. 25 ml/min über einen Dreiwegehahn unmittelbar vor der Leber eingebracht. Zwischen den einzelnen Injektionen sowie nach der vierten Injektion folgten Ruhepausen ohne Perfusion für 10 bzw. 60 Minuten. Anschließend wurde etwa 15 Minuten mit frischem Medium perfundiert. Der Ausfluss wurde gesammelt und die darin enthaltenen ausgespülten Zellen mit Trypanblau gezählt, um die Retentionsrate zu ermitteln.

Während der Kulturphase erfolgten tägliche Entnahmen von Proben des Perfusats für Blutgasanalysen sowie spätere metabolische Untersuchungen. An jedem dritten Tag erfolgte ein Austausch des Mediums, wobei ausschließlich an Tag drei zur Evaluation der Cytochromaktivität 7-Ethoxycumarin zugesetzt wurde. Für den Mediumwechsel wurde dem System kontinuierlich frisches Medium zugeführt, wobei zeitgleich Medium mittels 50 ml Spritzen aus dem Überlauf abgezogen wurde. Die zugeführte bzw. abgezogene Menge entsprach dabei etwa der Gesamtmenge des im System befindlichen Perfusats. Um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten, wurde für 30 Minuten inkubiert und anschließend eine erneute Mediumprobe entnommen.

Sämtliche Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -40 °C gelagert. Nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (siehe Tabelle 5, Seite 28) erfolgte die Abkopplung vom Kreislauf mit anschließender Entnahme von Gewebeproben. Diese wurden nach Fixierung in 4%igem phosphatgepufferten Formalin zur weiteren Bearbeitung an das Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen versandt, welches 4 µm dicke, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte, histologische Schnitte anfertigte. Im weiteren Verlauf wurden von dicht besiedelten Schnitten KI-67 Färbungen zur Beurteilung einer möglichen Zellteilung angefertigt. Hierzu wurde mit dem ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit Kit und ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit gemäß Herstellerangaben verfahren.

Ein weiterer Teil der isolierten Zellen wurde in 6-Well-Platten über 170 h in einem CO₂-Brutschrank kultiviert. Dazu wurden je $1,3 \cdot 10^6$ Hepatozyten pro Well ausgesät (n=4) und 6 ml des in Tabelle 3 aufgeführten Mediums zugesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 48 h (mit Zugabe von 7-Ethoxycumarin), 73 h sowie 121 h (jeweils ohne 7-Ethoxycumarin). Proben des Überstands wurden täglich entnommen und bis zur späteren Verwendung bei -40 °C gelagert.

2.5 Evaluation der Zellfunktionen

2.5.1 Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT)

Die Konzentration der Aspartat-Aminotransferase im Überstand wurde mit dem ASAT (GOT) Assay von DiaSys Diagnostic Systems bestimmt. Eine Eichgerade wurde mithilfe von TrueLab N erstellt. Mit Proben und Eichgerade wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.5.2 Harnstoff

Der Harnstoffgehalt wurde mithilfe des QuantiChrom™ Urea Assay Kits bestimmt. Die Aufbereitung der Proben erfolgte wie vom Hersteller angegeben mit anschließender Messung mittels Photometer.

2.5.3 Proteine

Die Menge an Proteinen im Medium wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Es wurde zunächst eine Stammlösung aus 100 mg Coomassie® Brilliantblau Tabletten, 50 ml Ethanol 99% sowie 100 ml 85%-iger Phosphorsäure angesetzt und auf 250 ml mit dH₂O aufgefüllt. Die Stammlösung wurde anschließend 1:4 mit dH₂O verdünnt und dunkel im Kühlschrank gelagert. Mithilfe von bovinem Serumalbumin wurde eine Eichreihe erstellt. Je 50 µl der Eichreihe bzw. der entnommenen Proben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert, mit 200 µl der verdünnten Stammlösung versetzt und die Zunahme der Absorption bei 595 nm im Vergleich zu 450 nm im Photometer gemessen.

2.5.4 Glucose und Laktat

Der Glucose- und Laktatgehalt im Medium wurde mithilfe eines Blutgasanalysegerätes (ABL800 Flex) bestimmt. Dazu wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten zwischen 0,3 und 0,5 ml Probe vom Gerät analysiert.

2.5.5 Galactose

Die Bestimmung des Galactosegehalts erfolgte mit Hilfe des Lactose/D-Galactose Assay Kits. Die Proben wurden, wie vom Hersteller angegeben, aufbereitet und anschließend mittels Photometer ausgewertet.

2.5.6 Cytochrom P450 Aktivität

Die Cytochrom P450 Aktivität wurde mithilfe der von Donato et al. (1998) beschriebenen Methode bestimmt. Zunächst wurde aus 7-Hydroxycumarin und Medium (Tabelle 3, Seite 20) eine Verdünnungsreihe (0-20 µmol) für die Eichreihe erstellt. Anschließend wurden je 70 µl Probe der verschiedenen Versuche und Zeitpunkte bzw. der Eichreihe zusammen mit 15 Fishman-Einheiten β-Glucuronidase/Arylsulfatase, gelöst in 10 µl 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,5), in eine 96-Well-Platte pipettiert und anschließend bei 37 °C für 2 h auf einem Shaker inkubiert. Im Anschluss wurden 170 µl TRIS HCl (pH 9) hinzugegeben und die Fluoreszenz bei 360 nm Excitation und 460 nm

Emission mithilfe eines CytoFluor® Fluorescence Multi-Well Plate Readers bestimmt.

2.6 Auswertung der Daten/Erstellung der Graphiken

Die Verarbeitung der Daten sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte mithilfe von IBM SPSS Statistics®. Die Graphiken wurden mittels Adobe Photoshop CS5 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Azellularisierung

Durch die rezirkulierende Perfusion einer Schweineleber über die Portalvene mit einprozentiger SDS-Lösung konnte innerhalb von etwa 22 Stunden eine azellularisierte Lebermatrix gewonnen werden. Die Ergebnisse des Vorgangs sind in Abbildung 3 dargestellt. Bereits nach wenigen Stunden zeigten die Lebern makroskopisch ein großflächiges weißlich-transparentes Erscheinungsbild, wobei ihre Form vollständig erhalten blieb (Abbildung 3 B).

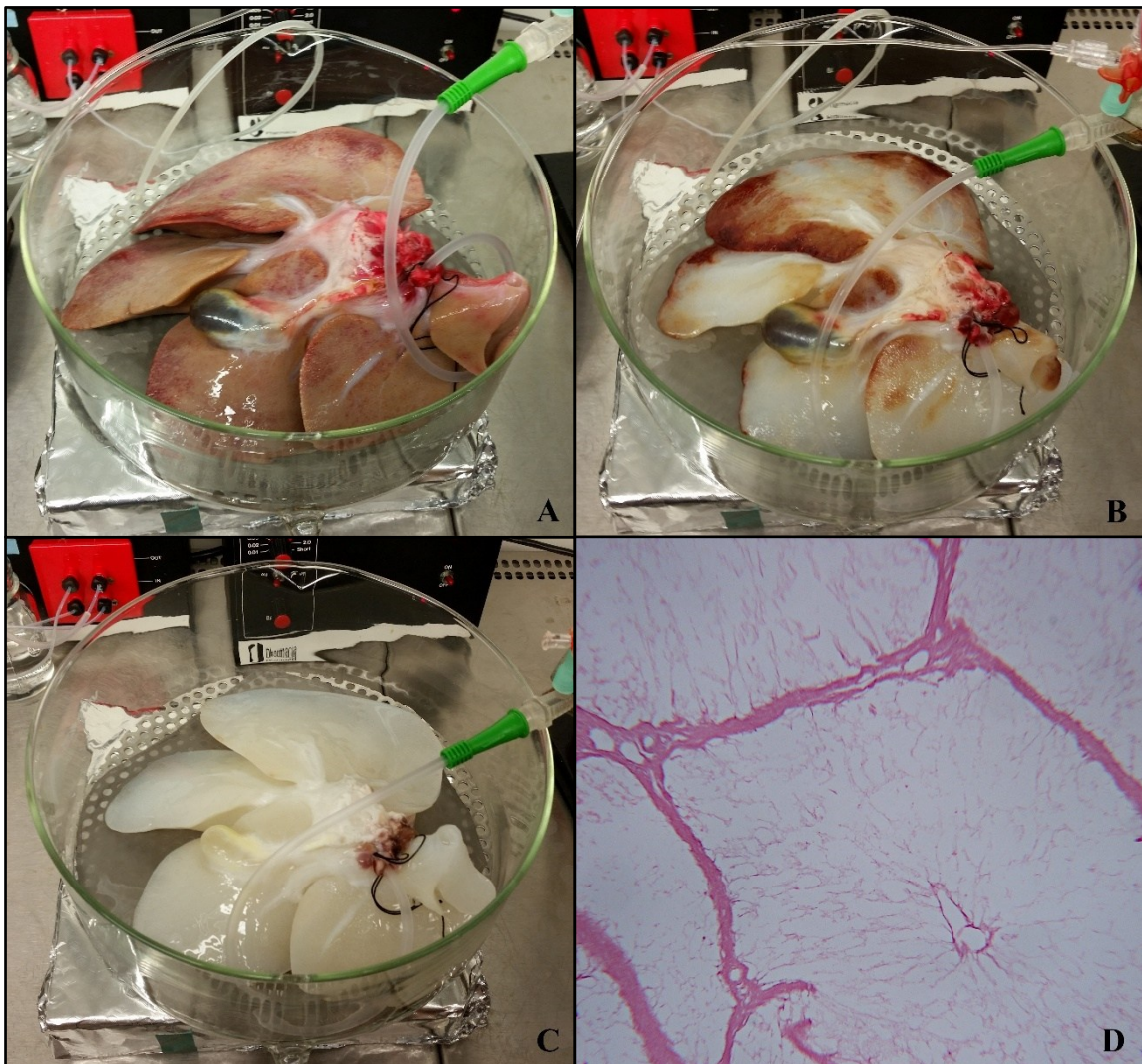


Abbildung 3: Leber zu Beginn der Azellularisierung (A), nach der ersten Flasche SDS nach etwa 3,5 h (B) sowie zum Abschluss des Verfahrens (C). D zeigt einen Schnitt in HE-Färbung unter 40-facher Mikroskopvergrößerung.

Nach etwa 22 Stunden waren auch die zuvor weniger gut azellularisierten braunen Areale, mit Ausnahme des bindegewebigen Leberhilus, vollständig azellularisiert (Abbildung 3 C). Weiterhin fiel makroskopisch eine signifikante Größenabnahme auf.

Mikroskopisch zeigten die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte eine erhaltene Mikroarchitektur mit den für Schweinelebern typischen, durch Bindegewebe begrenzten, Leberläppchen sowie der Zentralvene. Auch an den Eckpunkten der Lobuli blieben die Strukturen des periportalen Felds erhalten (Abbildung 3 D, Seite 25). Intakte Hepatozyten oder größere Zelltrümmer waren im Präparat nicht erkennbar. Vereinzelt zeigten sich jedoch im Rahmen der HE-Färbung blau kolorierte DNA-Rückstände.

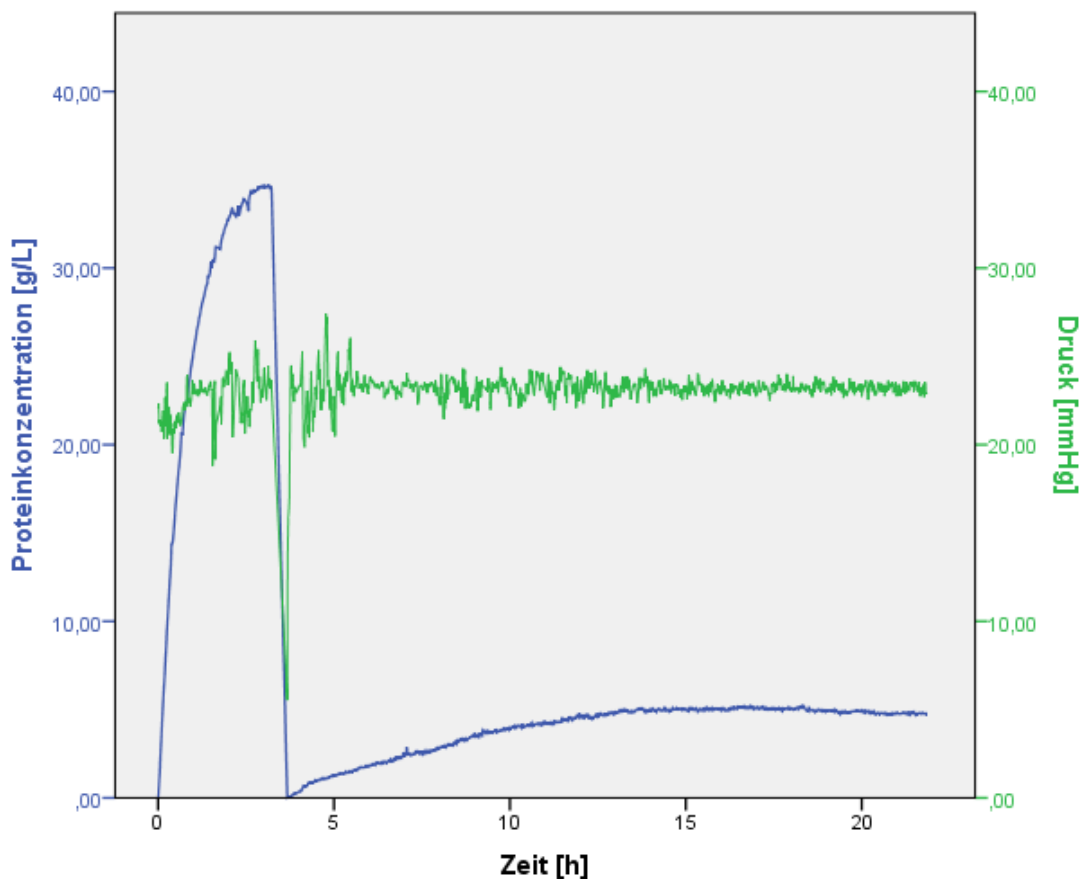


Abbildung 4: Verlauf der Proteinkonzentration in der SDS-Lösung sowie des Perfusionsdrucks über den Zeitraum der Azellularisierung. Nach 3,5 h erfolgte ein Wechsel der SDS-Lösung.

Abbildung 4 auf Seite 26 zeigt die Proteinkonzentration im Perfusat sowie die Druckverhältnisse während des Azellularisierungsvorgangs. Während der Perfusionsdruck zu Beginn noch stärkeren Schwankungen unterlag, blieb er im letzten Drittel der Azellularisierung etwa konstant bei etwa 23 mmHg. Die Proteinkonzentration stieg innerhalb der ersten Stunden nach Perfusion mit der ersten SDS-Lösung rasch auf etwa 35 g/l, woraufhin sich ein Plateau einstellte. Nach zwischenzeitlicher Spülung und Anschluss der zweiten Flasche SDS-Lösung stellte sich bereits bei etwa 5 g/l ein Plateau ein.

3.2 Hepatozytenisolation

Zur Optimierung des Einbringungsvorgangs sowie der Kulturphase wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 6 Lebern genutzt. Dabei wurden im Mittel $1,55 \cdot 10^9$ Hepatozyten isoliert, wobei die Viabilität bei durchschnittlich 94 % lag.

3.3 Wiederbesiedlung und Kulturphase

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wiederbesiedlungsvorgangs

Leber Nr.	Art der Einbringung	Eingebrachte vitale Zellen	Ausgespülte Zellen	Retentionsrate
67	Vena portae	$1,09 \cdot 10^9$	$0,41 \cdot 10^9$	62%
73	Vena hepatica	$2,07 \cdot 10^9$	Nicht nachweisbar	100%
80	Vena hepatica	$3,27 \cdot 10^9$	$1,24 \cdot 10^9$	62%

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse des Wiederbesiedlungsvorgangs. Drei der insgesamt 6 wiederbesiedelten Lebern wurden über mehrere Tage in Kultur genommen, wobei die Zahl der eingebrachten Hepatozyten $1,09 \cdot 10^9$ (Leber 67, Retentionsrate 62%), $2,07 \cdot 10^9$ (Leber 73, Retentionsrate 100%) sowie $3,27 \cdot 10^9$ (Leber 80, Retentionsrate 62%) betrug.

Tabelle 5: Zellzahl, Kulturzeit sowie Messwerte aus dem Bioreaktor der wiederbesiedelten Lebern. Angabe von Temperatur, pH und Druck als Mittelwert \pm eine Standardabweichung.

Leber Nr.	Zellzahl	Zeit in Kultur [h]	Temperatur [°C]	pH	Druck [mmHg]
67	0,67*10 ⁹	92	36,78 ($\pm 0,26$)	7,40 ($\pm 0,04$)	9,02 ($\pm 2,20$)
73	2,07*10 ⁹	187,5	37,00 ($\pm 0,10$)	7,40 ($\pm 0,04$)	15,42 ($\pm 0,87$)
80	2,03*10 ⁹	69,5	37,00 ($\pm 0,09$)	7,41 ($\pm 0,04$)	11,37 ($\pm 2,75$)

Die Kulturbedingungen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Temperatur im Reaktor bewegte sich während allen Versuchen im physiologischen Bereich um 37 °C. So betrug die durchschnittliche Reaktortemperatur 36,78 °C ($\pm 0,26$ °C) bei Leber 67, 37,00 °C ($\pm 0,10$ °C) bei Leber 73 sowie 37,00 °C ($\pm 0,09$ °C) bei Leber 80. Der pH-Wert betrug durchschnittlich 7,40 ($\pm 0,04$) bei Leber 67 und Leber 73 sowie 7,41 ($\pm 0,04$) bei Leber 80. Alle Angaben plus/minus eine Standardabweichung.

Wie in Abbildung 5 auf Seite 29 dargestellt, war der Druck im Pumpsystem im Gegensatz zu Temperatur und pH-Wert größeren Schwankungen unterworfen. Während sich der Druck bei Leber 73 relativ konstant im Bereich von 15 mmHg bewegte, fiel er bei Leber 67 innerhalb der ersten 48 h auf unter 7 mmHg. Nach manueller Erhöhung der Pumpendrehzahl lag der Druck zwischenzeitlich bei etwa 9 mmHg, sank dann jedoch wieder auf Werte unter 8 mmHg. Nach erneuter Erhöhung der Pumpendrehzahl nach 66 h blieb er über 10 mmHg. Bei Leber 80 fiel der Druck in den ersten 16 h auf 5 mmHg ab. Nach manueller Erhöhung der Drehzahl blieb er während der weiteren Kulturzeit im Bereich von 13 mmHg.

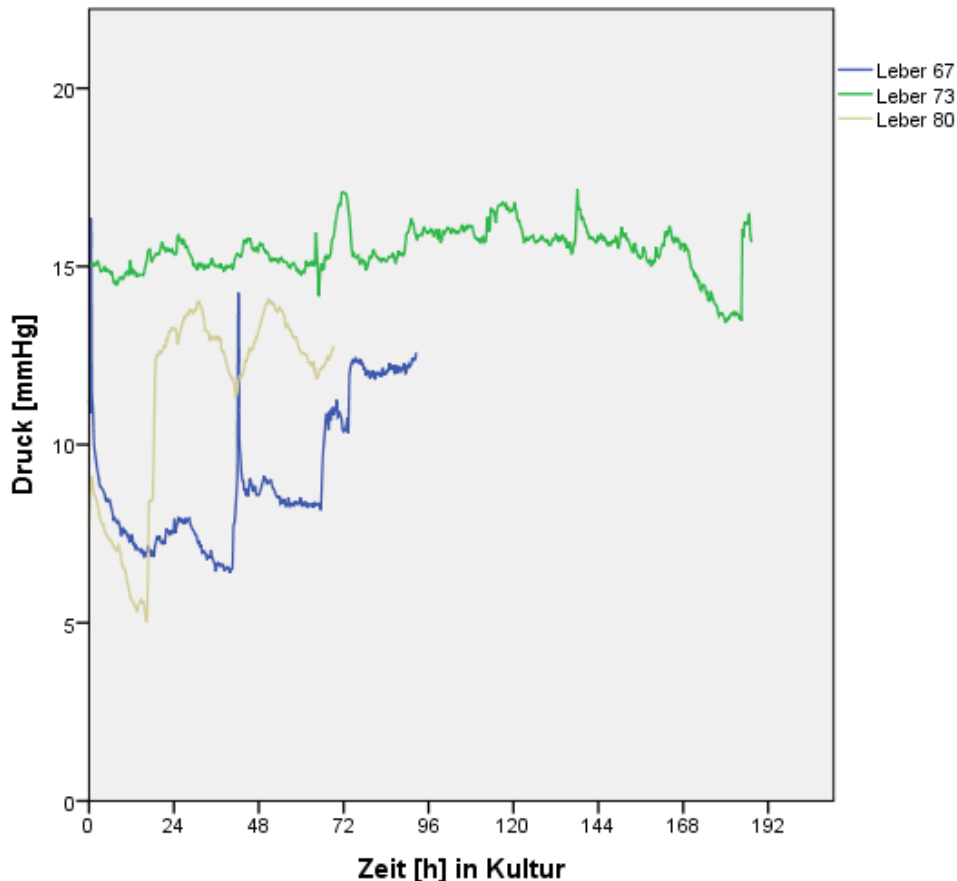


Abbildung 5: Druckverhältnisse im Pumpsystem über die Kulturdauer hinweg.

Die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitte zeigten bei Leber 67 und 80 überwiegend vitale Hepatozyten (Abbildung 6, Seite 30 sowie Abbildung 7, Seite 31). Bei Leber 73 waren nur noch vereinzelt lebende Zellen nachweisbar (Abbildung 9, Bild B, Seite 33). Bei allen drei Versuchen befand sich die überwiegende Anzahl der Hepatozyten in den Leberläppchen, wobei manche Areale bevorzugt besiedelt wurden, andere hingegen komplett leer blieben. Insbesondere bei Leber 67 hatten sich auch zahlreiche Hepatozyten in den Gefäßstrukturen angesiedelt (Abbildung 8, Seite 32).

Innerhalb der Läppchen fügten sich die Hepatozyten in die extrazelluläre Matrix der azellularisierten Leber ein (Abbildung 9, Bild A und B, Seite 33) oder bildeten voneinander abgegrenzte kleinere dicht gepackte Zellcluster (Abbildung 7 B, Seite 31 sowie Abbildung 9 A, Seite 33). Zwischen den Zellen der Cluster fanden sich kanalikuläre Strukturen (Abbildung 10 A und B, Seite 34).

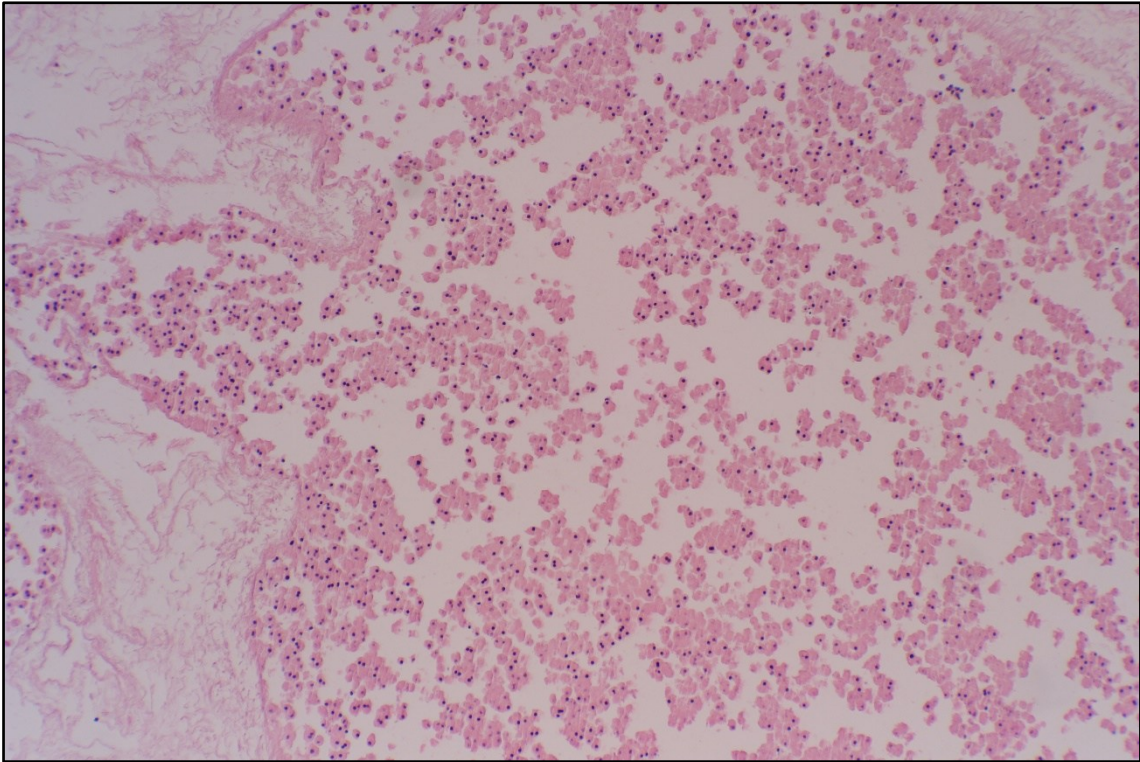


Abbildung 6: Leberläppchen aus Leber 80 mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt nach 69,5 Stunden Kulturdauer. 10-fache Vergrößerung.

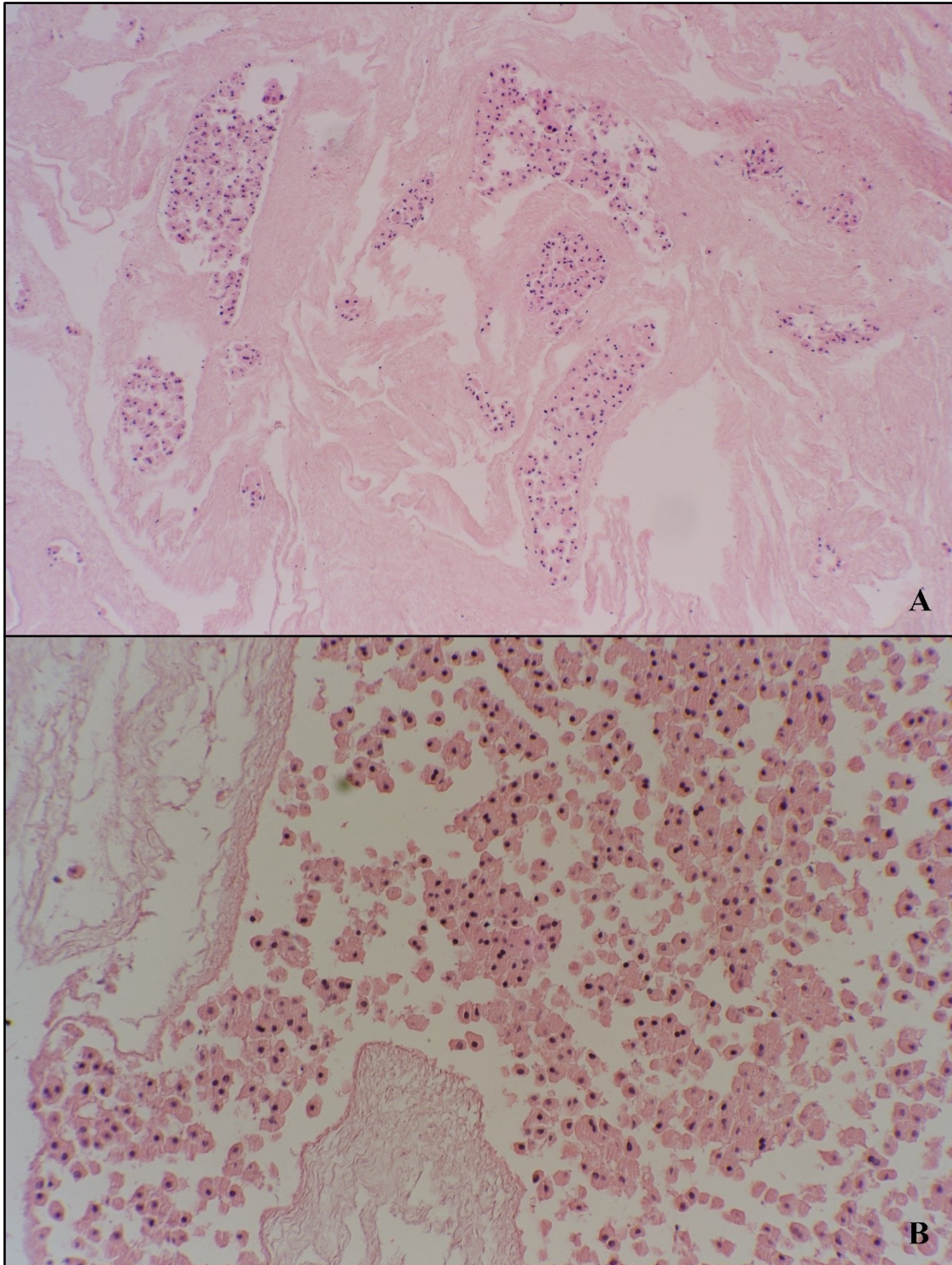


Abbildung 7: Mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte von Leber 67 in 10-facher Vergrößerung (A) sowie Leber 80 in 20-facher Vergrößerung (B) zum Ende der Kulturphase nach 92 bzw. 69,5 Stunden.

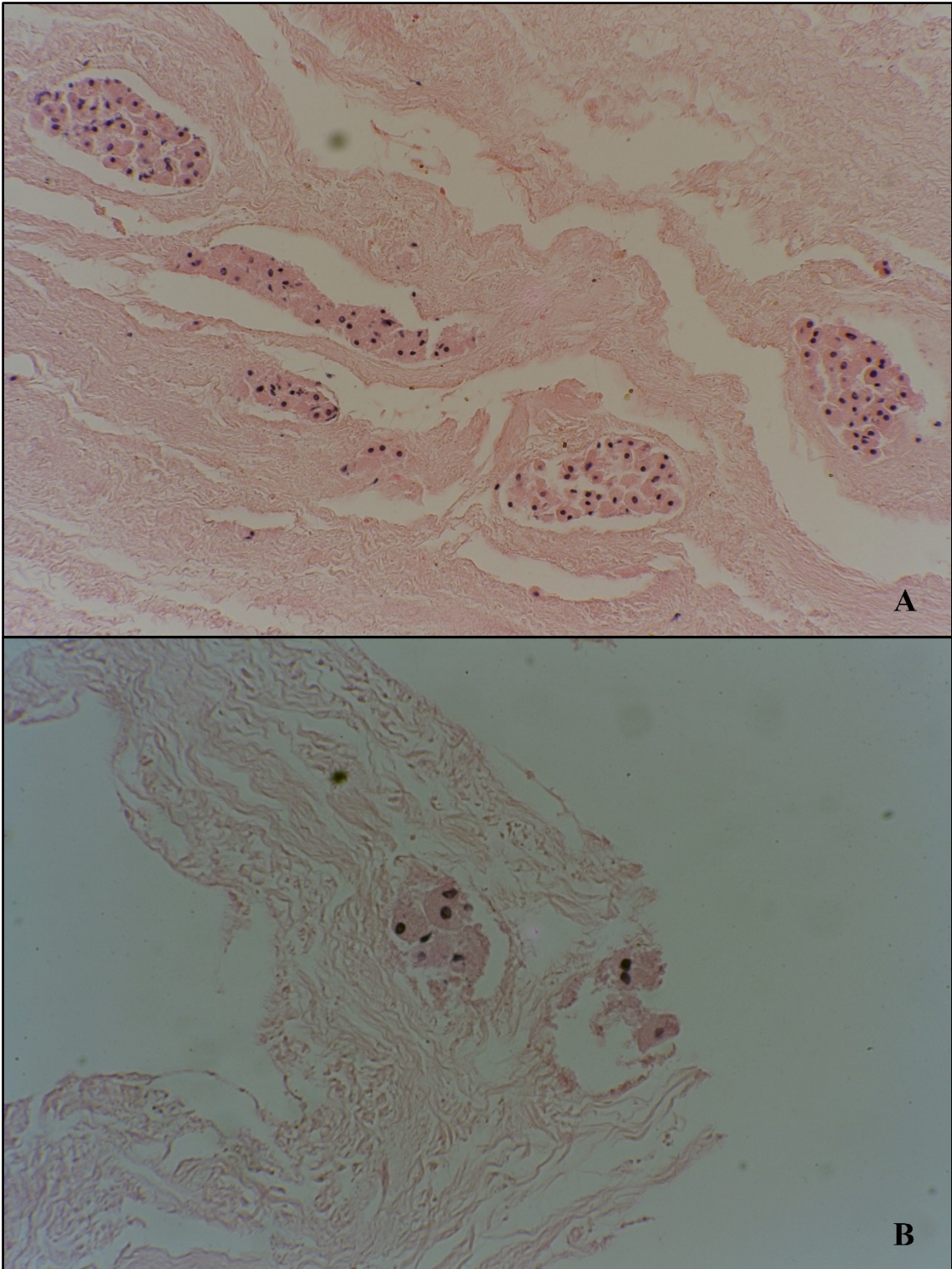


Abbildung 8: Besiedelte Gefäßstrukturen in 20-facher Vergrößerung (A) sowie 40-facher Vergrößerung (B) bei Leber 67.

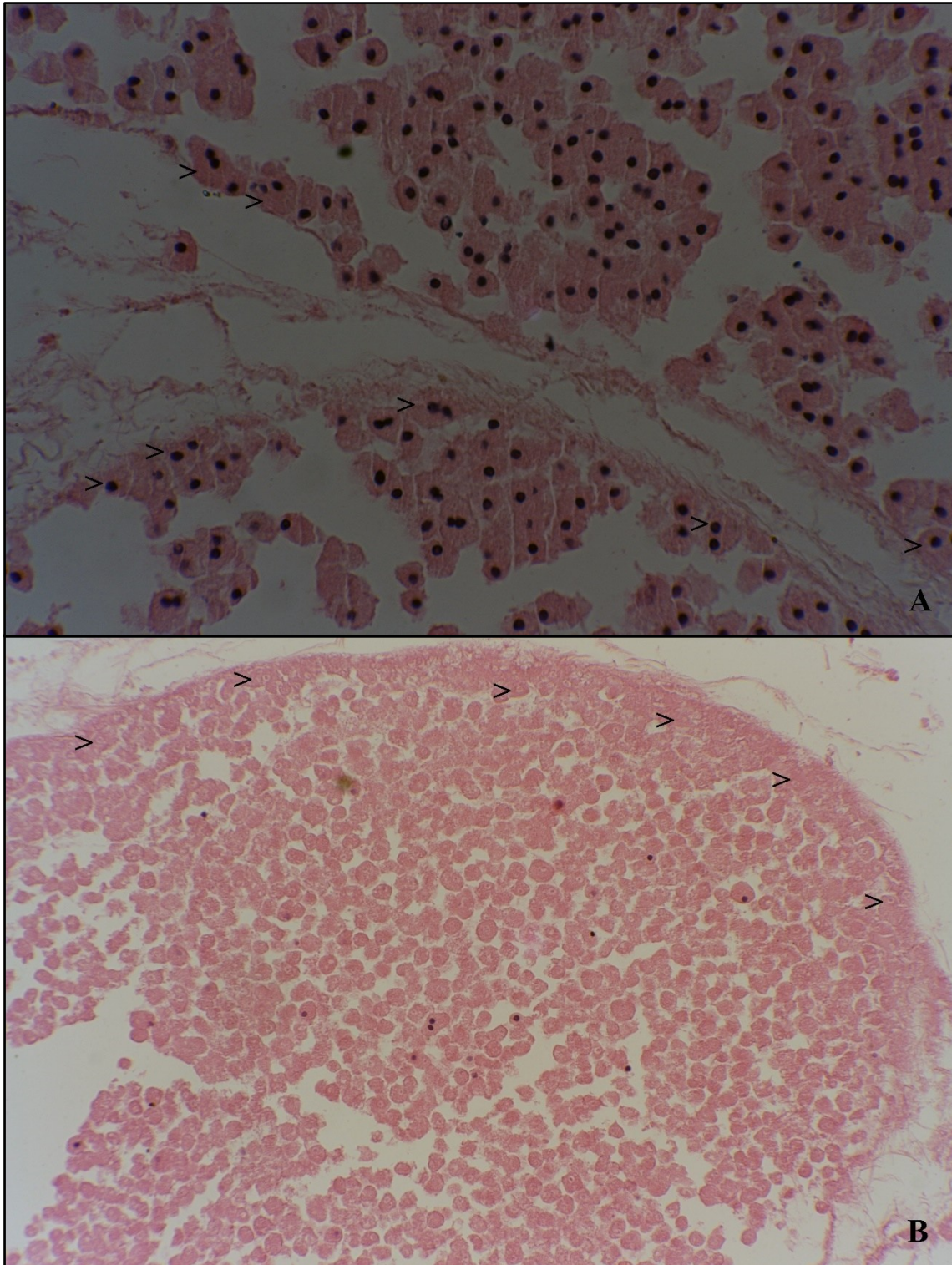


Abbildung 9: Schnitt aus Leber 80 in 40-facher Vergrößerung (A) sowie aus Leber 73 in 20-facher Vergrößerung (B). Einige in die Umgebung eingebettete Zellen wurden exemplarisch per Pfeilspitze markiert.

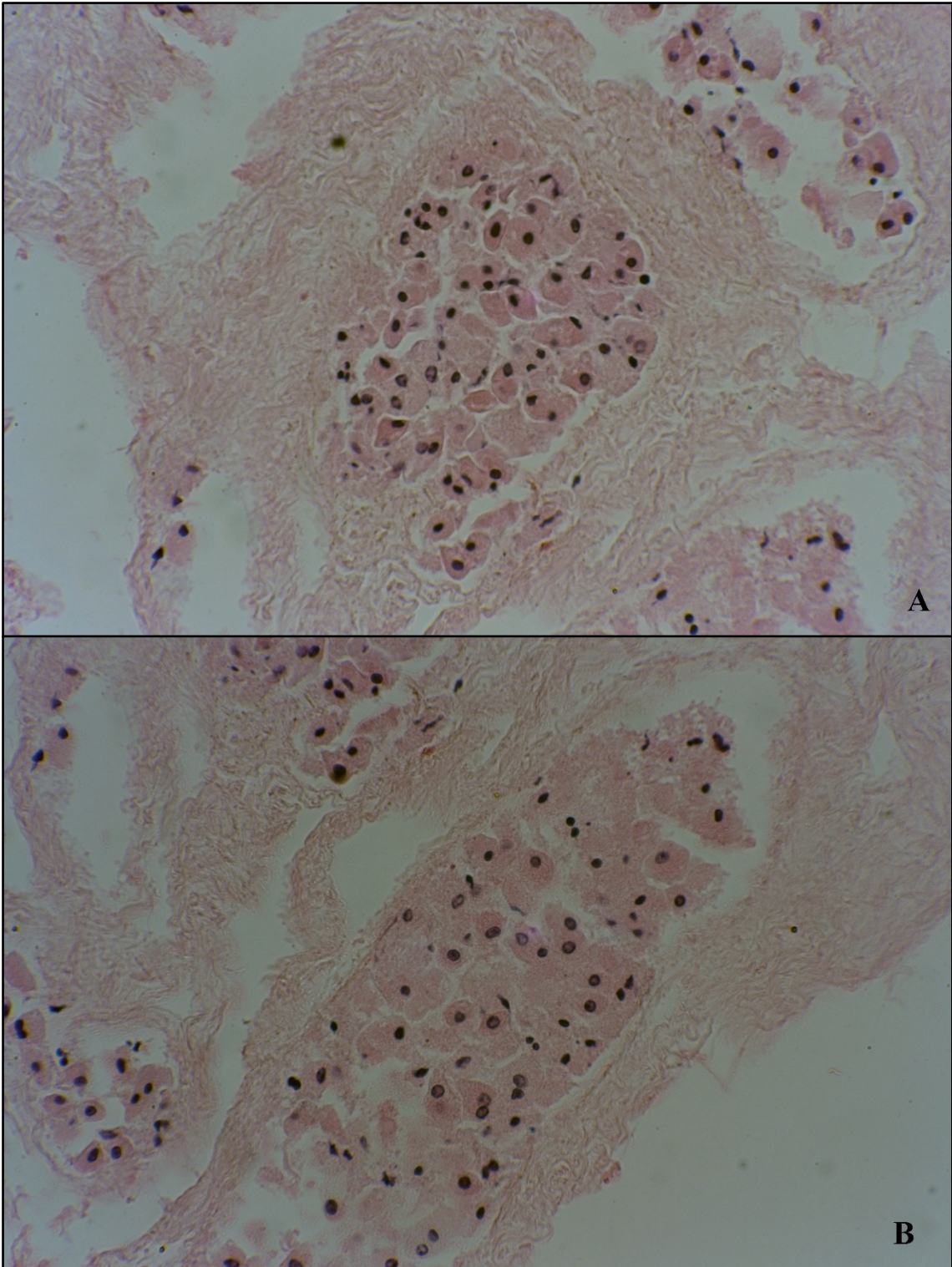


Abbildung 10: Kanalikuläre Strukturen bei Leber 67 in 40-facher Vergrößerung.

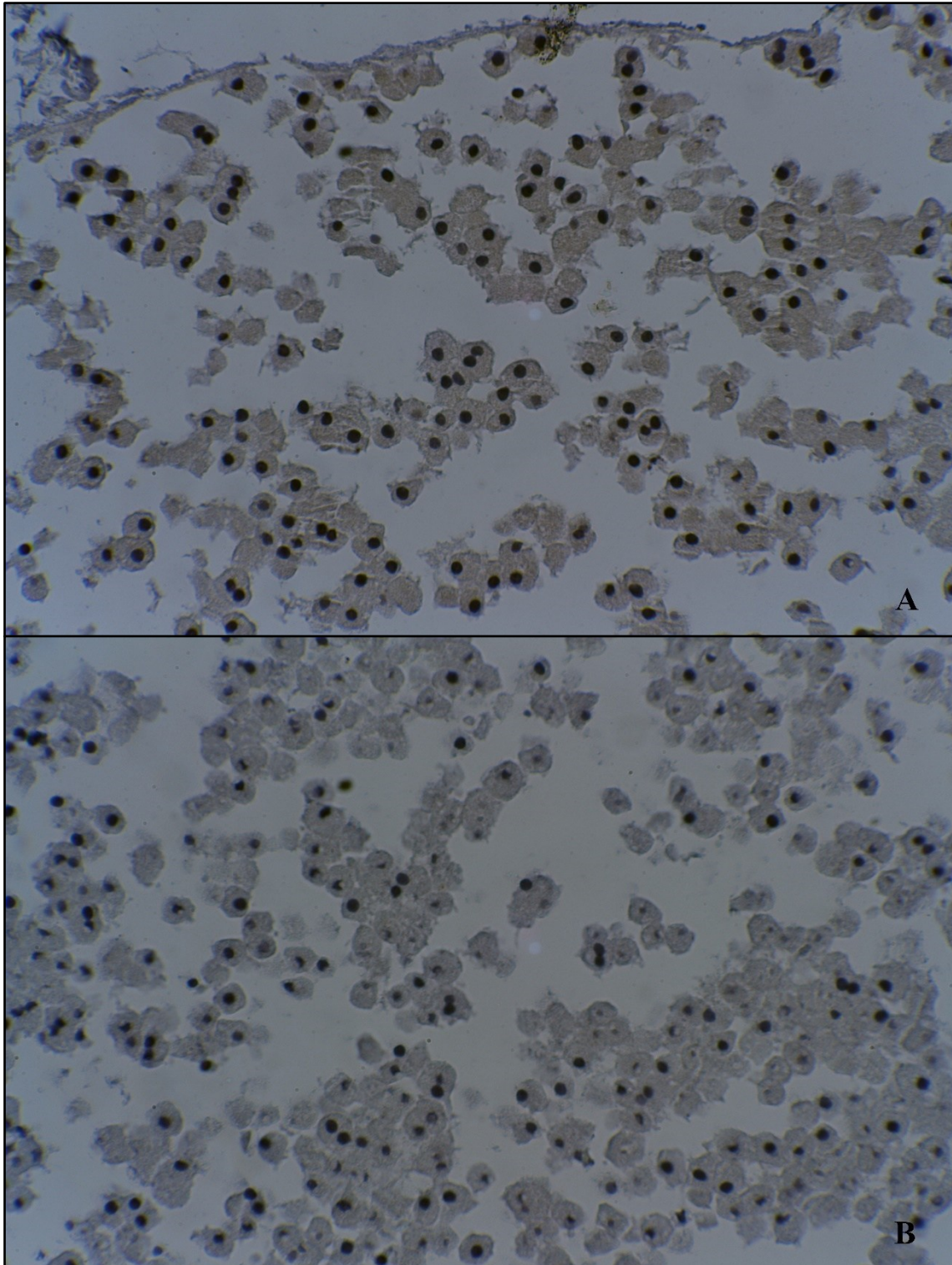


Abbildung 11: Polymer und ZUC-Färbung bei Leber 80 unter 40-facher Vergrößerung.

Die immunhistochemische Färbung des Proteins KI-67 zeigte weder bei Leber 67 (nur HRP One-Step Polymer) noch bei der in Abbildung 11 auf Seite 35

dargestellten Leber 80 (HRP One-Step Polymer und HRP Polymer-Kit) teilungsaktive Zellen.

3.4 Evaluation der Zellfunktionen

3.4.1 Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT)

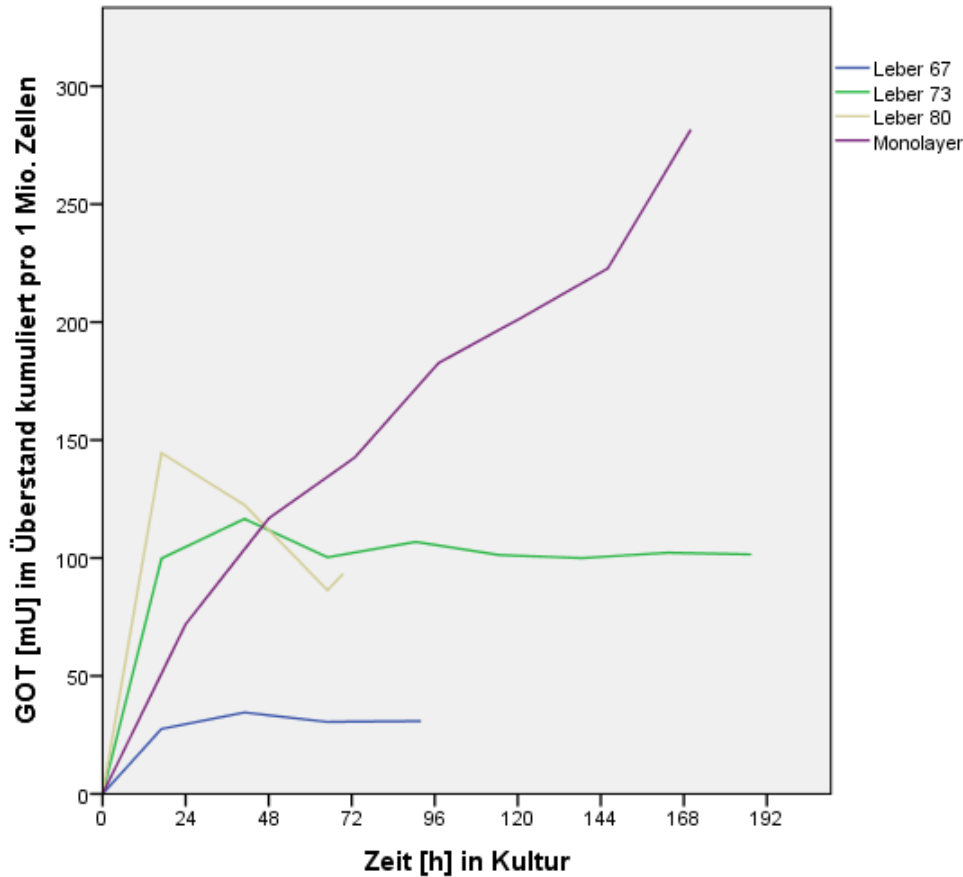


Abbildung 12: Enzymaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Million Hepatozyten in Kultur umgerechnet.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, zeigte sich bei allen drei Lebern in der ersten entnommenen Probe nach 17 Stunden ein starker Anstieg der Enzymaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) im Überstand auf 27,57 mU pro 1 Mio. Zellen bei Leber 67, 99,80 mU pro 1 Mio. Zellen bei Leber 73 sowie 144,52 mU pro 1 Mio. Zellen bei Leber 80. Mit fortschreitender Kulturdauer blieb die kumulierte Menge mit 34,51 mU/1 Mio. Zellen (nach 41 h), 30,52 mU/1 Mio. Zellen (nach 65 h) und 30,86 mU/1 Mio. Zellen (nach 92 h) bei Leber 67 sowie

116,64 mU/1 Mio. Zellen (nach 41h), 100,28 mU/1 Mio. Zellen (nach 65 h), 106,83 mU/1 Mio. Zellen (nach 90,5 h), 101,27 mU/1 Mio. Zellen (nach 114,5 h), 99,98 mU/1 Mio. Zellen (nach 138,5 h), 102,25 mU/1 Mio. Zellen (nach 163,5 h), 101,53 mU/1 Mio. Zellen (nach 187,5 h) bei Leber 73 relativ konstant. Bei Leber 80 nahm die Enzymaktivität der GOT im Überstand auf 122,47 mU/1 Mio. Zellen (nach 41 h) und weiter auf 86,30 mU/1 Mio. Zellen (nach 65 h) ab. Nach 65,5 h betrug sie 93,31 mU/1 Mio. Zellen.

Im Monolayer stieg die kumulierte Menge der Enzymaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase mit fortschreitender Kulturdauer kontinuierlich an: 71,93 mU/1 Mio. Zellen nach 24 h, 116,77 mU/1 Mio. Zellen nach 48 h, 142,78 mU/1 Mio. Zellen nach 73 h, 182,58 mU/1 Mio. Zellen nach 97 h, 201,82 mU/1 Mio. Zellen nach 121 h sowie 222,71 mU/1 Mio. Zellen nach 146 h. Bei Kulturende nach 170 h war die Menge auf 281,59 mU/1 Mio. Zellen angestiegen.

3.4.2 Harnstoff

Alle drei Lebern produzierten über die Kulturdauer hinweg Harnstoff (Abbildung 13, Seite 38). Nach 17 Stunden betrug die gemessene Menge Harnstoff im Überstand 4,80 µg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 67, 4,76 µg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 73 sowie 7,69 µg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 80. In den darauffolgenden 24 Stunden nahm die Harnstoffproduktion bei Leber 73 und 80 mit einem Zuwachs von 0,63 µg pro 1 Mio. Zellen bzw. 2,55 µg pro 1 Mio. Zellen ab, während sie bei Leber 67 mit 5,59 µg pro 1 Mio. Zellen etwa konstant blieb. In weiteren 24 Stunden fiel die Harnstoffproduktion bei allen drei Lebern ab. So betrug die kumulierte Menge Harnstoff im Überstand 11,79 µg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 67 (+ 1,4 µg pro 1 Mio. Zellen), 5,78 µg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 73 (+ 0,39 µg pro 1 Mio. Zellen) sowie 11,66 µg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 80 (+ 1,42 µg pro 1 Mio. Zellen). Nach Austausch des Mediums nach 65 Stunden Kulturdauer konnte bei allen Lebern ein Anstieg der Harnstoffproduktion beobachtet werden. Bei Leber 67 stieg die kumulierte Menge Harnstoff innerhalb von 24 h um 3,62 µg pro 1 Mio. Zellen auf insgesamt 15,41 µg pro 1 Mio. Zellen. Bei Leber 73 betrug die kumulierte Menge Harnstoff 7,76 µg pro 1 Mio. Zellen, was einem Zuwachs von 1,98 µg pro 1 Mio. Zellen entspricht. Leber 80 wurde

nach 69,5 h vom Kreislauf genommen. Bis dahin war die kumulierte Menge Harnstoff innerhalb von 3,5 h um weitere 1,76 μg pro 1 Mio. Zellen auf insgesamt 13,42 μg pro 1 Mio. Zellen angewachsen. Mit fortschreitender Kulturdauer stagnierte der Zuwachs an Harnstoff bei Leber 73, sodass insgesamt nach 114,5 h 7,85 μg pro 1 Mio. Zellen sowie nach 138,5 h 7,83 μg pro 1 Mio. Zellen an Harnstoff produziert worden waren. Nach erneutem Wechsel des Mediums betrug der Zuwachs in den folgenden 24 Stunden 1,76 μg pro 1 Mio. Zellen, sodass sich die Gesamtmenge an produziertem Harnstoff bei Leber 73 auf 9,59 μg pro 1 Mio. Zellen belief.

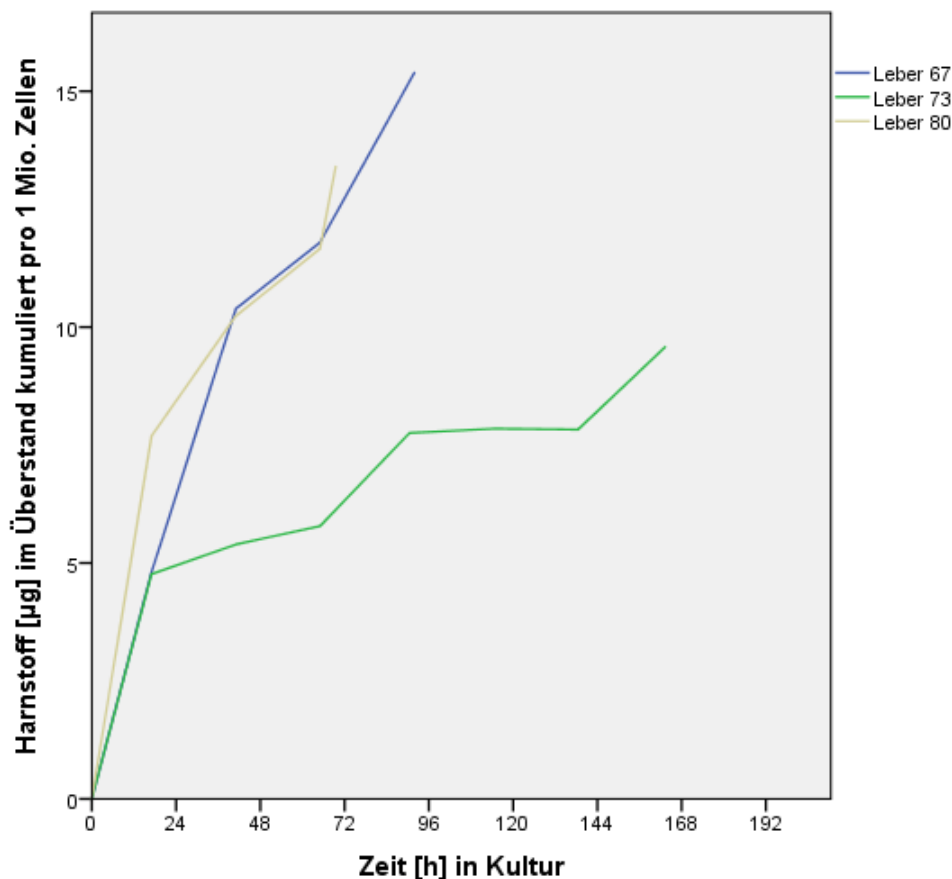


Abbildung 13: Harnstoff im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Millionen Hepatozyten in Kultur umgerechnet. Ein Austausch des Mediums erfolgte nach 65 Stunden (Leber 67, 73, 80) sowie 138,5 Stunden (nur Leber 73).

Im Monolayer (aufgrund der besseren Übersicht separat in Abbildung 14 auf Seite 39 dargestellt) betrug die Menge an Harnstoff im Überstand nach 24 h

48,58 μg pro 1 Mio. Zellen und erhöhte sich in den folgenden 24 h auf 95,62 μg pro 1 Mio. Zellen. Nach Austausch des Mediums erfolgte ein Anstieg um 57,92 μg pro 1 Mio. Zellen auf insgesamt 153,54 μg pro 1 Mio. Zellen nach 73 h. Nach erneutem Mediumwechsel stieg die Gesamtmenge nach 97 h um weitere 74,88 μg pro 1 Mio. Zellen auf 228,42 μg pro 1 Mio. Zellen. Nach 121 h betrug sie 256,93 μg pro 1 Mio. Zellen, nach 146 h 300,20 μg pro 1 Mio. Zellen (hier war zuvor ein erneuter Wechsel des Mediums erfolgt) sowie 333,65 μg pro 1 Mio. nach 170 h.

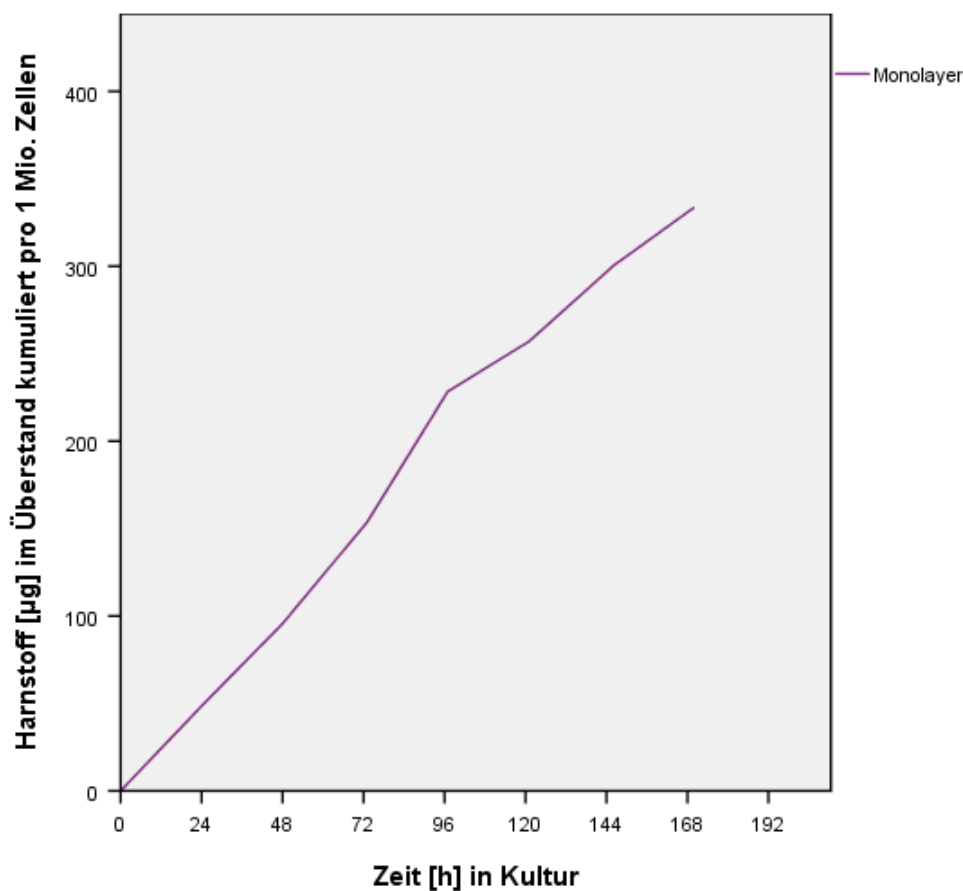


Abbildung 14: Harnstoff im Überstand des Monolayers über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Millionen Hepatozyten in Kultur umgerechnet. Ein Austausch des Mediums erfolgte nach 48, 73 sowie 121 Stunden.

Tabelle 6 (Seite 40) zeigt die Harnstoffproduktion in μg pro 1 Mio. Zellen und Stunde über die Kulturdauer hinweg. Hierbei zeigte sich am ersten Tag bei Leber 67 und 73 mit 0,283 bzw. 0,280 μg pro 1 Mio. Zellen und Stunde der höchste, bei

Leber 80 mit 0,452 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde der zweithöchste Wert der gesamten Kulturdauer. Am zweiten Tag fiel die Harnstoffproduktion bei allen drei Leber ab, wobei Leber 73 sowie 80 mit 0,026 bzw. 0,106 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde deutlich geringere Werte aufwiesen als Leber 67 mit 0,233 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde. An Tag 3 nahm die Harnstoffproduktion weiter ab auf 0,059 µg (Leber 67 und Leber 80) bzw. 0,016 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde (Leber 73). Nach dem Mediumwechsel zeigte sich ein Anstieg an Tag 4 auf 0,151 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde bei Leber 67, 0,082 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde bei Leber 73 (jeweils der zweithöchste Wert der gesamten Kulturdauer) sowie 0,502 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde bei Leber 80 (höchster Wert der Kulturdauer). Im weiteren Kulturverlauf sank die Produktion bei Leber 73 an Tag 5 auf 0,004 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde, an Tag 6 war kein weiterer Zuwachs an Harnstoff messbar (-0,001 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde). Nach erneutem Mediumwechsel stieg die Produktion mit 0,073 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde wieder an.

Tabelle 6: Harnstoffproduktion [µg] pro 1 Mio. Zellen und Stunde über die Kulturdauer hinweg. Sternchen kennzeichnen Messwerte, vor denen ein Mediumwechsel erfolgte.

Tag	Leber 67	Leber 73	Leber 80	Monolayer
1	0,283*	0,280*	0,452*	2,024*
2	0,233	0,026	0,106	1,960
3	0,059	0,016	0,059	2,413*
4	0,151*	0,082*	0,502*	3,120*
5		0,004		1,188
6		-0,001		1,803*
7		0,073*		1,393

Im Monolayer zeigte sich die Harnstoffproduktion mit 2,024 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde an Tag 1 sowie 1,960 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde an Tag 2 nahezu unverändert hoch. Im Verlauf stieg sie mit 2,413 µg an Tag 3 weiter an. An Tag 4 wurde nach erneutem Mediaustausch das Maximum der Kulturdauer mit 3,120 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde erreicht. An Tag 5 zeigte sich mit 1,188 µg pro 1 Mio. Zellen und Stunde der bisherige Tiefpunkt. Nach erneutem Mediumwechsel ließ sich die Harnstoffproduktion nochmals auf 1,803 pro 1 Mio.

Zellen und Stunde steigern, um dann am 7 Tag auf 1,393 μg pro 1 Mio. Zellen und Stunde abzufallen.

3.4.3 Proteine

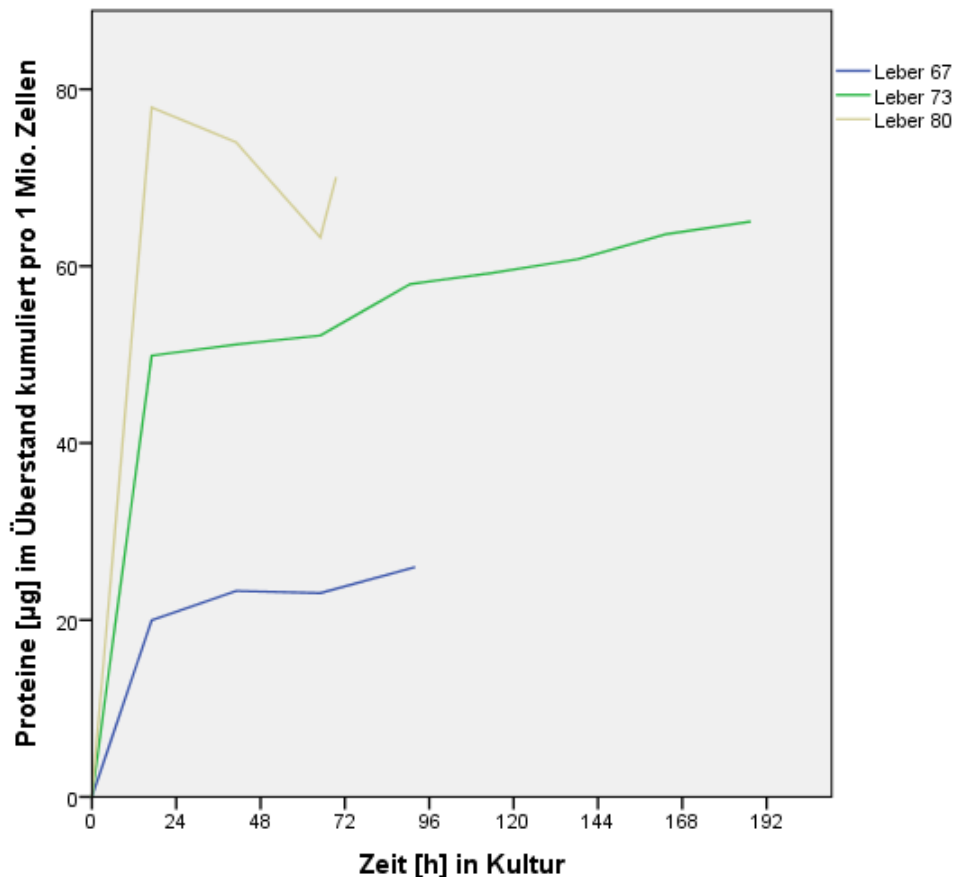


Abbildung 15: Proteine im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Millionen Hepatozyten in Kultur umgerechnet. Ein Austausch des Mediums erfolgte nach 65 Stunden (Leber 67, 73, 80) sowie 138,5 Stunden (nur Leber 73).

In Abbildung 15 ist die Proteinproduktion dargestellt. Innerhalb der ersten 17 Stunden nach Kulturbeginn zeigte sich bei allen drei Lebern ein starker Anstieg der Proteine im Überstand um 19,96 μg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 67, 49,88 μg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 73 sowie 77,94 μg pro 1 Mio. Zellen bei Leber 80. Nach 41 Stunden war die freigesetzte Proteinmenge bei Leber 67 und 73 weiter auf 23,28 μg pro 1 Mio. Zellen bzw. 51,15 μg pro 1 Mio. Zellen angestiegen. Bei Leber 80 zeigte sich ein effektiver Rückgang auf 74,01 μg pro 1 Mio. Zellen. Innerhalb der nächsten 24 Stunden stagnierte die Proteinfreisetzung bei Leber

67 mit effektiv 23,04 µg pro 1 Mio. Zellen. Während Leber 73 einen leichten Zuwachs von 1 µg pro 1 Mio. Zellen auf insgesamt 52,15 µg pro 1 Mio. Zellen verzeichnete, fiel die kumulierte Menge bei Leber 80 weiter ab auf 63,25 µg pro 1 Mio. Zellen. Nach dem anschließend erfolgten Austausch des Mediums verzeichneten alle Lebern einen Anstieg der kumulierten Proteine auf 25,99 µg pro 1 Mio. Zellen (+ 2,59 µg pro 1 Mio. Zellen in 24 Stunden) bei Leber 67, 57,97 µg pro 1 Mio. Zellen (+ 5,82 µg pro 1 Mio. Zellen in 24 Stunden) bei Leber 73 sowie 70,06 µg pro 1 Mio. Zellen (+ 6,81 µg pro 1 Mio. Zellen in 3,5 Stunden) bei Leber 80. Bei Leber 73 zeigte sich auch in der weiteren Kulturdauer ein kontinuierlicher Anstieg der freigesetzten Proteine auf 59,26 µg pro 1 Mio. Zellen nach 114,5 Stunden, 60,80 µg pro 1 Mio. Zellen nach 138,5 h, 63,63 µg pro 1 Mio. Zellen nach 163,5 Stunden sowie 65,05 µg pro 1 Mio. Zellen nach 187,5 Stunden.

Auch in der Monolayerkultur konnte ein Proteinanstieg nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 16 auf Seite 43). Nach 24 h belief sich die Menge an Proteinen im Überstand auf 44,95 µg pro 1 Mio. Zellen. Innerhalb weiterer 24 h wuchs sie um 30,67 µg auf 75,62 µg pro 1 Mio. Zellen an. Nach Austausch des Mediums erfolgte ein Anstieg um 15,23 µg pro 1 Mio. Zellen auf nun insgesamt 90,85 µg pro 1 Mio. Zellen nach 73 h Kultur. Nach erneutem Mediumwechsel sowie weiteren 24 h betrug die Gesamtmenge an Proteinen im Überstand 116,73 µg pro 1 Mio. Zellen (+ 25,88 µg pro 1 Mio. Zellen). Nach 121 h waren 142,40 µg, nach 146 h 158,87 µg (hier war zuvor ein Austausch des Mediums erfolgt) sowie nach 170 h 233,72 µg pro 1 Mio. Zellen an Proteinen freigesetzt worden.

Betrachtet man simultan die Proteinproduktion sowie die Enzymaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase im Überstand des Monolayers, so fällt auf, dass ein Anstieg der Proteinmenge stets mit einem GOT-Anstieg einherging (Abbildung 16 Seite 43).

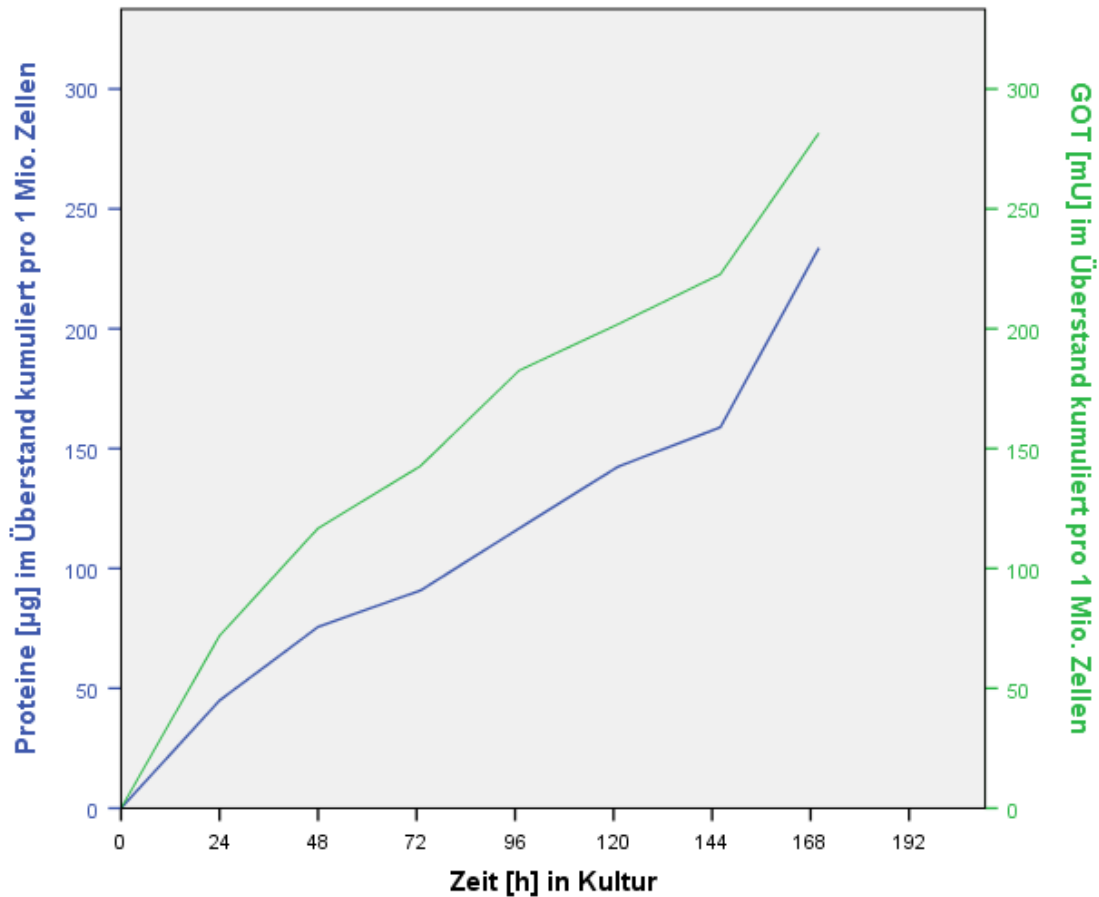


Abbildung 16: Proteine sowie Enzymaktivität der GOT im Überstand der Monolayer Kultur über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Millionen Hepatozyten in Kultur umgerechnet. Ein Austausch des Mediums erfolgte nach 48, 73 sowie 121 Stunden.

3.4.4 Glucose und Lactat

Die Glucosewerte waren sowohl im Bioreaktor als auch in der Monolayer Kultur größeren Schwankungen unterlegen (Abbildung 17, Seite 44). Während sich bei Leber 67 und 80 in den ersten 17 h ein Verbrauch von 32,60 bzw. 46,67 µg pro 1 Mio. Zellen zeigte, wurden bei Leber 73 23,13 µg pro 1 Mio. Zellen freigesetzt. Bei Leber 80 wurde auch mit fortlaufender Kulturdauer Glucose verbraucht: 8,89 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 2 sowie 3,44 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 3. Die Gesamtmenge belief sich nach 69,5 h auf -64,44 µg pro 1 Mio. Zellen. Bei Leber 67 war nach anfänglichem Verbrauch ein kontinuierlicher Zuwachs feststellbar: 15,61 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 2, 18,99 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 3, 16,24 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 4. Effektiv bedeutete dies einen Zuwachs von 18,24 µg Glucose pro 1 Mio. Zellen über die gesamte Kulturdauer. Bei Leber 73 blieb

der Wert an Tag 2 unverändert. Die weiteren Werte betragen 3,69 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 3, -7,50 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 4, 11,03 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 5, -23,36 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 6 sowie 0 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 7. Insgesamt bedeutete dies einen Zuwachs um 7 µg pro 1 Mio. Zellen über die bisherige Kulturdauer. An Tag 8 wurde ein Abfall um 87,88 µg pro 1 Mio. Zellen registriert.

In der Monolayer Kultur wurden in den ersten 24 h 219,23 µg sowie in den nächsten 24 h weitere 253,08 µg Glucose pro 1 Mio. Zellen freigesetzt. An Tag 3 und 4 wurden 69,23 bzw. 137,50 µg Glucose pro 1 Mio. Zellen verbraucht. Die weiteren Werte lauteten 16,51 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 5, -46,15 µg pro 1 Mio. Zellen an Tag 6 sowie 72,30 µg pro 1 Mio. Zellen am 7. Tag. Effektiv wurden somit in der Monolayer Kultur 307,88 µg Glucose pro 1 Mio. Zellen freigesetzt.

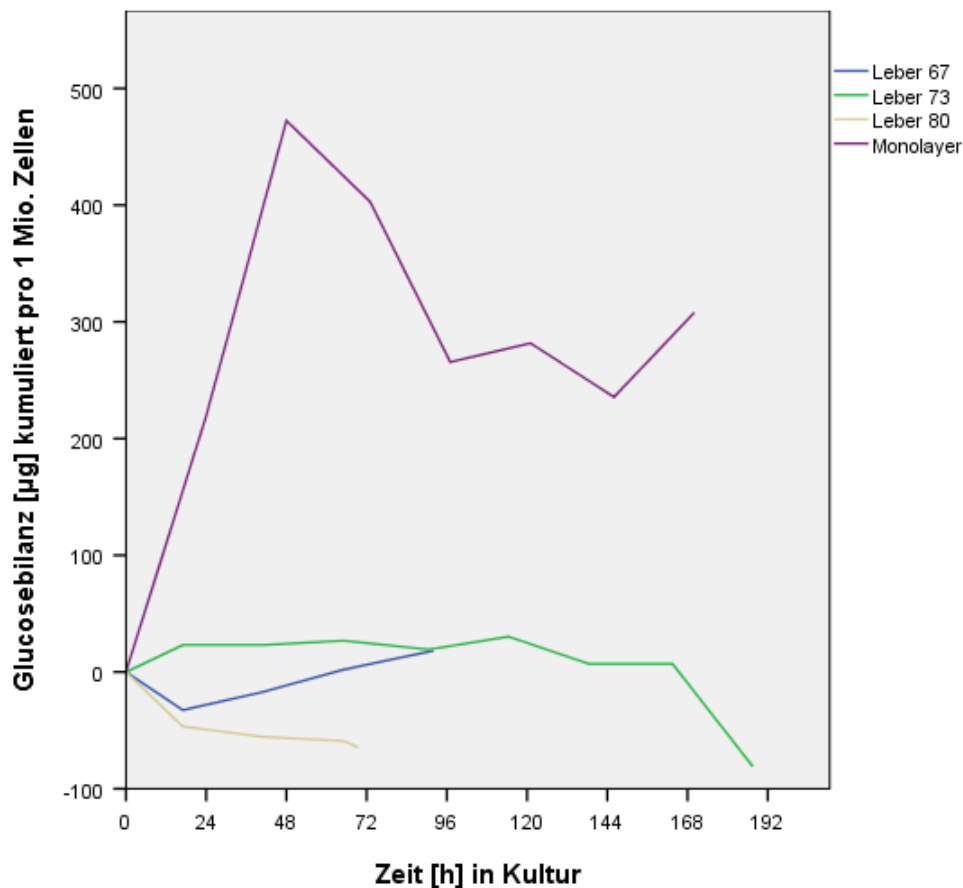


Abbildung 17: Glucose im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Millionen Hepatozyten in Kultur umgerechnet.

Während der gesamten Kulturdauer waren im Bioreaktor lediglich geringe Lactatwerte nachweisbar (Abbildung 18 auf Seite 46). Der größte Zuwachs fand in den ersten 17 h statt und belief sich auf 0,081 μmol pro 1 Mio. Zellen bei Leber 67, 0,135 μmol pro 1 Mio. Zellen bei Leber 73 sowie 0,112 μmol pro 1 Mio. Zellen bei Leber 80. In den folgenden 24 h stiegen die Werte nur bei Leber 73 sowie Leber 80 nur geringfügig auf 0,172 bzw. 0,148 μmol pro 1 Mio. Zellen. Bei Leber 67 wurde der Wert mit 0,160 μmol pro 1 Mio. Zellen nahezu verdoppelt. Nach 48 Stunden betragen die kumulierten Lactatwerte 0,160 μmol pro 1 Mio. Zellen bei Leber 67 (kein Zuwachs), 0,190 μmol pro 1 Mio. Zellen bei Leber 73 (+ 0,018 μmol) sowie 0,182 μmol pro 1 Mio. Zellen bei Leber 80 (+ 0,034 μmol). Nach dem Mediumwechsel betragen die Lactatwerte bei Leber 67 und 73 am 4. Tag 0,241 bzw. 0,210 μmol pro 1 Mio. Zellen. Bei Leber 80 betrug die insgesamt freigesetzte Menge an Lactat bei Versuchsende nach 69,5 h 0,218 μmol pro 1 Mio. Zellen. Die weiteren Werte bei Leber 73 betragen 0,210 μmol pro 1 Mio. Zellen (+ 0 μmol) nach 114,5 h, 0,228 μmol pro 1 Mio. Zellen (+ 0,018 μmol) nach 138,5 h, 0,246 μmol pro 1 Mio. Zellen (+ 0,019 μmol) nach 163,5 h sowie 0,246 μmol pro 1 Mio. Zellen (+ 0 μmol) nach 187,5 h.

Im Monolayer wurde ein kontinuierlicher Lactatanstieg registriert. Der größte Zuwachs wurde dabei an Tag 6 verzeichnet, an Tag 2 war er am geringsten. Die Werte betragen 2,307 μmol pro 1 Mio. Zellen nach 24 h, 3,754 μmol pro 1 Mio. Zellen nach 48 h (+ 1,446 μmol), 6,369 μmol pro 1 Mio. Zellen nach 73 h (+ 2,615 μmol), 9,246 μmol pro 1 Mio. Zellen nach 97 h (+ 2,877 μmol), 11,798 μmol pro 1 Mio. Zellen nach 121 h (+ 2,552 μmol), 16,506 μmol pro 1 Mio. Zellen nach 146 h (+ 4,708 μmol) sowie 19,435 μmol pro 1 Mio. Zellen nach 170 h (+ 2,928 μmol).

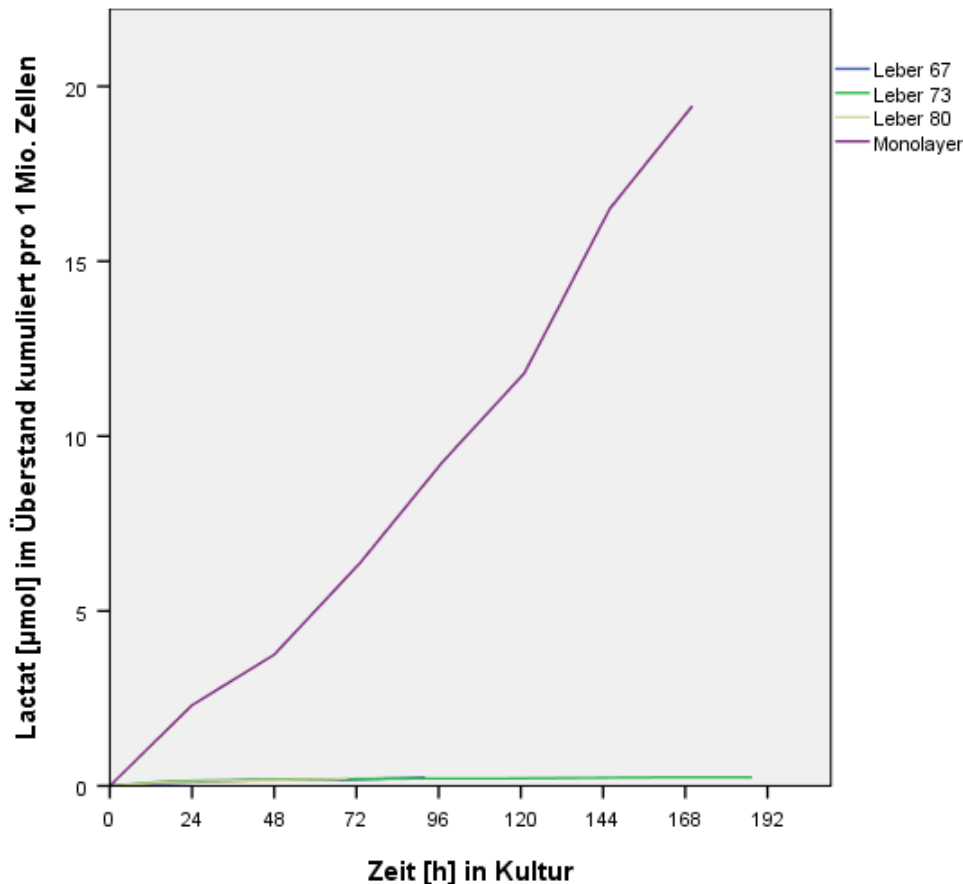


Abbildung 18: Lactat im Überstand über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Millionen Hepatozyten in Kultur umgerechnet.

3.4.5 Galactose

Bei keinem der drei Versuche im Bioreaktor zeigten die Hepatozyten eine Galactoseelimination (Abbildung 19 Seite 47). Die kumulierten Messwerte im Überstand betrugen -0,025 mg (17 h), 0,042 mg (41 h), 0,012 mg (65 h) sowie 0,052 mg (92 h) pro 1 Mio. Zellen bei Leber 67, 0,006 mg (17 h), 0,024 mg (41 h), 0,019 mg (65 h), 0,028 (90,5 h), 0,038 mg (114,5 h), 0,040 mg (138,5 h), 0,035 mg (163,5 h), 0,026 mg (187,5 h) pro 1 Mio. Zellen bei Leber 73 sowie 0,001 mg (17 h), -0,004 mg (41 h), -0,007 mg (65 h) und -0,001 mg (69,5 h) pro 1 Mio. Zellen bei Leber 80.

Im Monolayer hingegen zeigte sich innerhalb der ersten 24 h ein Galactoseverbrauch von 1,72 mg pro 1 Mio. Zellen. Nach einem zwischenzeitlichen Anstieg der Galactose im Überstand um 0,82 mg pro 1 Mio.

Zellen wurde im weiteren Verlauf kontinuierlich Galactose abgebaut: 0,26 mg an Tag 3, 0,36 mg an Tag 4, 0,01 mg an Tag 5, 0,56 mg an Tag 6 sowie 0,23 mg pro 1 Mio. Zellen an Tag 7.

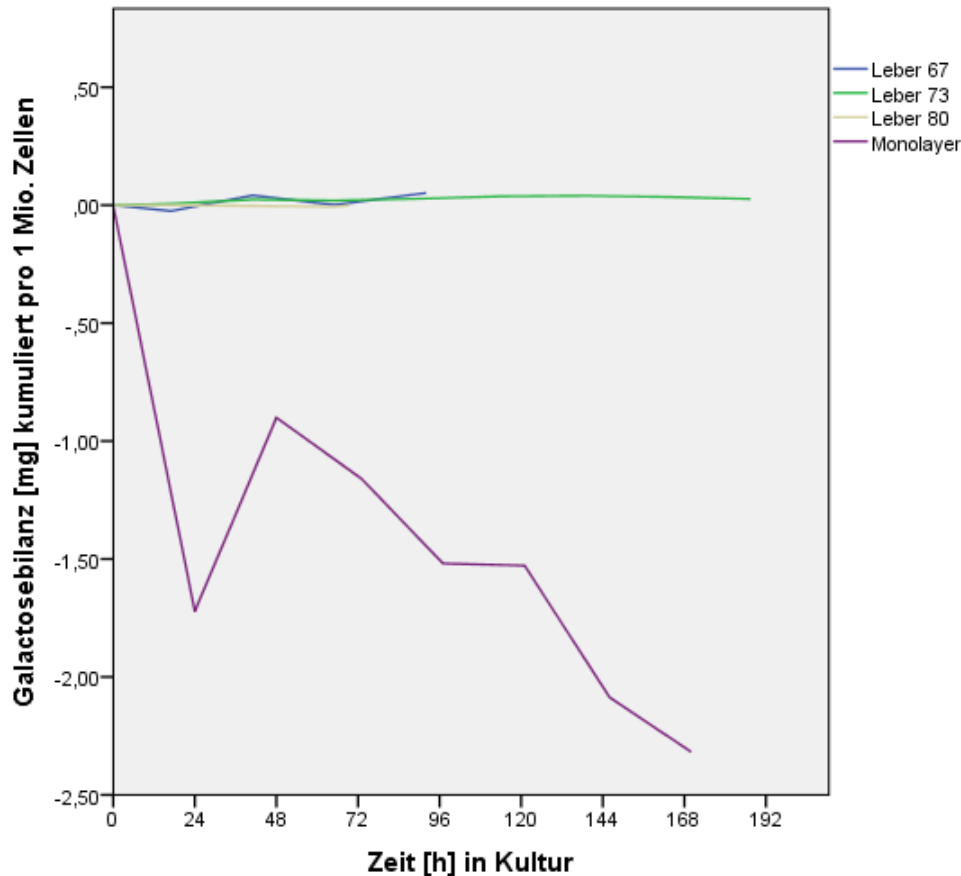


Abbildung 19: Galactoseproduktion / -verbrauch über den gesamten Kulturzeitraum kumuliert und aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf die Anzahl von 1 Millionen Hepatozyten in Kultur umgerechnet.

3.4.6 Cytochrom P450 Aktivität

In allen drei Lebern zeigte sich eine Produktion von 7-Hydroxycumarin. Diese ist in Abbildung 20 auf Seite 48 dargestellt. Im Vergleich zum Monolayer (0,297 nmol pro 1 Mio. Zellen und Stunde) fiel diese im Bioreaktor mit 0,020 nmol pro 1 Mio. Zellen und Stunde (Leber 67), 0,012 nmol pro 1 Mio. Zellen und Stunde (Leber 73) sowie 0,007 nmol pro 1 Mio. Zellen und Stunde (Leber 80) jedoch deutlich geringer aus.

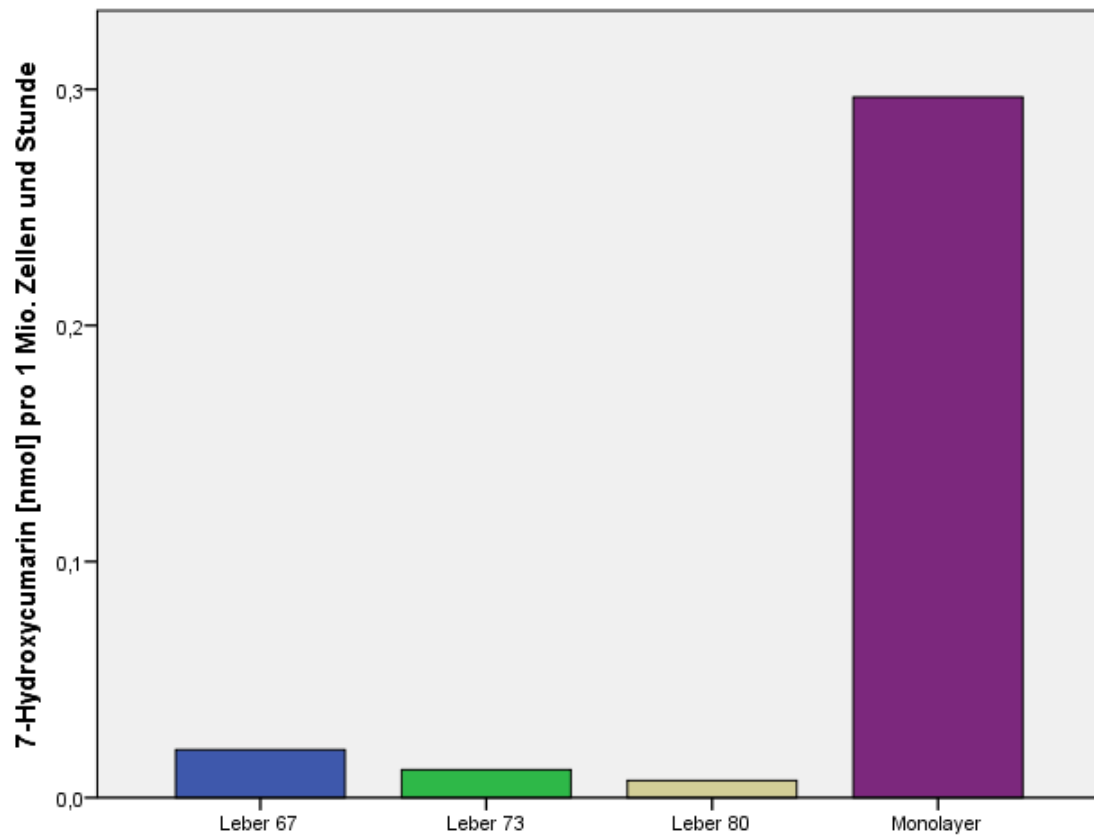


Abbildung 20: Produktion von 7-Hydroxycumarin aus 7-Ethoxycumarin. Messung nach 3 h (Leber 67, Leber 73 sowie Monolayer) bzw. 3,5 h (Leber 80). Werte zur besseren Vergleichbarkeit in Produktion pro 1 Mio. Zellen und Stunde umgerechnet.

4. Diskussion

Mit dem von Bühler et al. (2015) entwickelten Verfahren gelang es, innerhalb von weniger als 24 h eine azellularisierte Lebermatrix zu gewinnen. Die von Bühler et al. (2015) beschriebenen Veränderungen wie das weißlich-transparente Erscheinungsbild des Endprodukts, die progrediente Größenabnahme, die erhaltene Mikroarchitektur, die Abwesenheit von vitalen Hepatozyten oder größeren Zelltrümmern sowie das Vorkommen vereinzelter DNA-Rückstände konnten in den für diese Arbeit vorgenommenen Versuchen bestätigt werden.

Die HE-gefärbten mikroskopischen Präparate zeigten vitale, in die Umgebung eingebetteten Zellen. Dies bestätigt die Ergebnisse vorausgegangener Studien, wonach eine azellularisierte Leber als Grundgerüst für Kultivierung von Hepatozyten geeignet ist (Baptista et al. 2011; Bühler et al. 2015; Sabetkish et al. 2015; Uygun et al. 2010). Zur Detektion von Zellteilung in diesen Präparaten wurden KI-67 Antikörper eingesetzt. Das Protein KI-67 findet sich während der Mitose an Chromosomen angelagert und kann mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen werden. Obwohl in den HE-gefärbten Schnitten zahlreiche vitale Zellen nachweisbar waren, konnte trotz Anwendung zweier unterschiedlicher Antikörper in keinem der Versuche im Bioreaktor eine Zellteilung nachgewiesen werden. Rana et al. (1994) zeigten, dass Zell-Matrix-Interaktionen den Wechsel von Hepatozyten zwischen „Zellwachstum“ auf der einen sowie „Differenzierung“ auf der anderen Seite beeinflussen. Bei Einbettung in eine Gel Matrix blieben die Hepatozyten in der G0 Phase und zeigten eine hohe Expression leberspezifischer Transkriptionsfaktoren. Auch Zell-Zell-Interaktionen können diesen Wechsel beeinflussen: Bei hoher Zelldichte konnten Ben-Ze'ev et al. (1988) lediglich eine gering ausgeprägte DNA Synthese feststellen, während reichlich leberspezifische mRNA nachweisbar war. Bei niedriger Zelldichte zeigte sich das Gegenteil. Die Ergebnisse aus oben genannten Arbeiten legen nahe, dass die Interaktionen mit der extrazellulären Matrix sowie Zell-Zell-Interaktionen die Hepatozyten im Bioreaktor in der G0 Phase hielten und somit zwar eine Reihe leberspezifischer Funktionen ausgeführt wurden (s. unten), jedoch keine Zellteilung stattfand. Die Arbeit von

Bühler et al. (2015) zeigt, dass Hepatozyten in der azellularisierten Leber dennoch proliferieren können. In ihren Versuchen verwendeten sie Wachstumsfaktoren in Form von fetalem Kälberserum statt isoliertem epidermalem Wachstumsfaktor. Die Rolle von fetalem Kälberserum sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, beispielsweise indem man der serumfreien Kultur nach einigen Tagen FCS zusetzt und anschließend die Proliferation beurteilt. Weiterhin gilt es zu klären, ob die Hepatozyten nach der möglicherweise durch fetales Kälberserum induzierten Teilung nach erneuter Umstellung auf serumfreies Medium ähnliche Syntheseraten wie zu Kulturbeginn aufweisen.

Die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase im Überstand gilt in Zellkulturen als sensitiver Parameter für Zellzerfall (Feutren et al. 1984). Ein starker Anstieg bei den Versuchen im Bioreaktor wurde in den ersten 17 Stunden verzeichnet. Der Einbringungsvorgang geht mit einer großen mechanischen Belastung für die Hepatozyten einher. Es ist daher davon auszugehen, dass ein Großteil der AST aus bei der Wiederbesiedlung lysierten Hepatozyten stammt. Da jedoch unmittelbar nach der Einbringung keine Probe entnommen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Stunden danach weitere Hepatozyten zugrunde gegangen sind. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Verlegung von Gefäßstrukturen und die damit einhergehende Mangelversorgung von dahinter liegenden Hepatozyten sein. Weiterhin könnten primär in der Matrix verbliebene Zellen im Verlauf doch noch ausgespült und vom Pumpsystem lysiert worden sein. Mit fortschreitender Kulturdauer stiegen die Werte im Gegensatz zu denen im Monolayer nicht weiter an, was auf suffiziente Kulturbedingungen im Bioreaktor schließen lässt. Dies deckt sich mit Studien wie beispielsweise von Ise et al. (1999) oder Nguyen et al. (2016), laut denen die 3-D Kultur der 2-D Kultur hinsichtlich Viabilität der Hepatozyten deutlich überlegen ist. Während bei Leber 67 und Leber 73 die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase nahezu konstant blieb, fiel sie bei Leber 80 von 144,52 mU pro 1 Mio. Zellen nach 17 Stunden auf 86,30 mU/1 Mio. Zellen nach 65 h ab. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine mangelnde Stabilität der AST in der Zellkultur, jedoch stellten

Beránek et al. (2002) keine Aktivitätsabnahme während der mehrtägigen Lagerung porciner AST bei 37 °C fest. Als Ursache scheint daher ein falsch hoch gemessener Wert nach 17 h am wahrscheinlichsten. Die Probeentnahme erfolgte aus dem Vorratsgefäß unmittelbar hinter der Leber (vergleiche Abbildung 2 auf Seite 20), wo die Konzentration zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Vergleich zum restlichen System erhöht gewesen sein könnte. Mit fortschreitender Kulturdauer könnte dann durch die Pumpenzirkulation eine zunehmende Vermischung und damit eine messbare Abnahme der Konzentration erfolgt sein.

Obwohl bei Leber 73 in den histologischen Schnitten kaum mehr lebendige Zellen nachgewiesen werden konnten, zeigte sich abgesehen von den ersten Stunden kein weiterer Anstieg der AST-Aktivität. Da es sich bei der Aspartat-Aminotransferase um ein überwiegend mitochondrial vorliegendes Enzym handelt, wäre es möglich, dass die Zellschädigung zum Zeitpunkt der Abkopplung vom Kreislauf noch nicht allzu lange zurück lag und dadurch die Zellintegrität noch erhalten war. So zeigten Zang et al. (2000) im Mausmodell, dass ein markanter AST-Anstieg erst nach 9 h auftrat, während unter dem Lichtmikroskop apoptotische Veränderungen der Hepatozyten bereits nach 6 Stunden sehr ausgeprägt waren. Dass in den Tagen zuvor noch Harnstoff und Proteine von den Hepatozyten sezerniert wurden, lässt ebenfalls darauf schließen, dass zu diesen Zeitpunkten noch vitale Zellen vorlagen. Dies schränkt die Aussagekraft der AST-Aktivität hinsichtlich der Viabilität der Hepatozyten deutlich ein. Zwar kann damit der Zelltod zuverlässig nachgewiesen werden, jedoch ist der Wert für ein Live-Monitoring aufgrund des verzögerten Anstiegs nicht geeignet.

Harnstoff entsteht als wasserlösliches Endprodukt des Harnstoffzyklus im Rahmen der Ammoniakentgiftung. Da die Harnstoffbildung in vivo größtenteils in den Hepatozyten abläuft, ist sie ein geeigneter Indikator zur Beurteilung der Funktionalität der Leberzellen und essenzieller Bestandteil bei der Entwicklung eines Leberersatzverfahrens. Sowohl im Bioreaktor als auch im Monolayer war, abgesehen von Tag 6 bei Leber 73, eine stetige Harnstoffproduktion messbar.

Diese war nach der Zugabe frischen Mediums besonders ausgeprägt. Grund hierfür dürfte vor allem das im Medium enthaltene Ammoniumchlorid sein, welches zu Harnstoff umgesetzt wurde. Auch Lardner et al. (1994) stellten bei in vivo Versuchen mit Ratten eine erhöhte Harnstoffkonzentration nach Zufuhr von Ammoniumchlorid fest. Weiterhin wurde publiziert, dass Glukagon (Triebwasser und Freedland 1977) sowie insbesondere die Kombination aus Glukagon und Dexamethason die Enzyme des Harnstoffzyklus stimulieren (Gebhardt und Mecke 1979; Lin et al. 1982). Dass mit dem Mediumwechsel diese beiden Stoffe aufgefrischt wurden, könnte daher ebenfalls zur erhöhten Harnstoffbildung beigetragen haben. Die geringeren Werte zwischen Medienwechseln sind durch vollständige Verstoffwechslung von Ammoniumchlorid sowie Verlust von Glukagon (Pohl et al. 2015) und Dexamethason (Good et al. 2004) mit fortlaufender Kulturdauer erklärbar. Aufgrund der oben genannten Gründe sind zu Vergleichen mit anderen Studien oder Aussagen über eine potenzielle Dedifferenzierung nur die Werte nach unmittelbar erfolgtem Mediumwechsel heranzuziehen (vergleiche die mit Sternchen markierten Werte in Tabelle 6 auf Seite 40). Die im Monolayer gemessenen Werte liegen hier im Bereich der von Lazar et al. (1995) publizierten Ergebnisse. Diese stellten ebenfalls einen Peak an Tag 3 (in dieser Arbeit an Tag 4) fest. Der in dieser Arbeit an Tag 6 gemessene Wert entspricht noch 89% des Wertes von Tag 1 sowie 58% des Maximums von Tag 4, was auf eine Funktionsabnahme der Hepatozyten in der 2-D Kultur hinweist. Bei Leber 67 betrug die Harnstoffproduktion an Tag 4 nur noch 54% des Wertes von Tag 1. Bei Leber 73 betrug die Produktion an Tag 7 26% des Wertes von Tag 1 bzw. 89% des Wertes von Tag 4. Bei Leber 80 entsprach die Harnstoffmenge 111% des Wertes von Tag 1. Da nur jeden dritten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt wurde, ist aufgrund von wenigen Messpunkten eine Aussage über einen möglichen Funktionsverlust schwierig. Während die Ergebnisse aus Leber 67 und 73 auf einen Funktionsverlust hindeuten, lassen die Werte aus Leber 80 gar auf eine Zunahme schließen. Hier ist allerdings zu beachten, dass die gemessene Harnstoffproduktion an Tag 4 bei Leber 80 auf einem Messzeitraum von 3,5 h basiert (vgl. 24 h bei Leber 67 und 70). Ergebnisse von Bühler (2017) deuten darauf hin, dass nach Zugabe von Ammoniumchlorid

ein Großteil der Umsetzung zu Harnstoff in den ersten Stunden stattfindet. Dies könnte zu einem falsch hohen Ergebnis bei Leber 80 beigetragen haben und dessen Aussagekraft relativieren. Auffällig ist die im Vergleich zum Bioreaktor um ein Vielfaches größere Harnstoffproduktion in der 2-D Kultur. In vielen Studien wurde bisher gegenteilig von einer höheren Stoffwechselaktivität in 3-D Kulturen berichtet (Lazar et al. 1995; Lin et al. 2004; Nyberg et al. 2005). Auch bei Wiederbesiedlungsversuchen mit Hepatozyten aus Rattenlebern wurden wesentlich höhere Harnstoffwerte als in dieser Arbeit erzielt. (Uygun et al. 2010; Wu et al. 2015). Ein Grund für die geringeren Harnstoffwerte in der 3-D Kultur könnte eine falsch-hoch ermittelte Zellzahl im Bioreaktor sein. Aufgrund des Versuchsdesigns konnten nur die in das System eingebrachten sowie die unmittelbar nach dem Einbringungsvorgang ausgespülten Zellen erfasst werden. Aus der Differenz ergab sich die Zellzahl im Reaktor, aus welcher dann die Harnstoffproduktion berechnet wurde. Hepatozyten, welche beim Einbringungsvorgang sowie in den ersten 17 h zugrunde gingen, konnten dabei nicht berücksichtigt werden. Weiterhin könnten im Bioreaktor durch die Verlegung von Gefäßen sowie die Bildung von Clustern und der damit einhergehenden Verkleinerung der Oberfläche vergleichsweise weniger Hepatozyten am Stoffaustausch teilgenommen haben als im Monolayer. Auch die abweichende Harnstoffproduktion von Leber 73 im Vergleich zu der von Leber 67 und 80 wäre durch obige Gründe erklärbar.

Die Produktion von Plasmaproteinen ist ein weiterer Indikator vitaler Hepatozyten. So werden unter anderem im Menschen täglich etwa 160 mg Albumin pro Kilogramm Körpergewicht freigesetzt (Ballmer et al. 1990). Der größte Zuwachs an Proteinen im Überstand wurde im Bioreaktor innerhalb der ersten 17 h verzeichnet und betrug ein Vielfaches des Wertes von Tag 2. Aufgrund des simultanen AST-Anstiegs dürfte der hohe Wert vor allem auf Zelluntergang zurückzuführen sein. Hepatozyten enthalten 1280 µg Proteine pro 10^6 Zellen (Knook und Sleyster 1980), welche bei der Lyse freigesetzt werden. Zu dieser Theorie passen auch die Werte aus dem Monolayer, dessen Zellen nicht mechanischen Belastung des Einbringungsvorgangs unterliegen. Dort lag

sowohl der Anstieg der Proteinmenge als auch die Zunahme der AST-Aktivität an Tag 1 im Bereich der über die weitere Kulturdauer gemessenen Werte. Aufgrund des Anstiegs der Proteinwerte mit fortschreitender Kulturdauer bei Leber 67 und 73 ohne Anstieg der AST kann auf sekretorische Aktivität der Hepatozyten geschlossen werden. Die bei Leber 80 beobachteten, im Verlauf fallenden Werte sind vermutlich auf die bereits bei der AST-Aktivität diskutierte falsch-hohe Messung mit anschließender Verdünnung zurückzuführen. Da im Monolayer AST-Aktivität und Proteinmenge simultan anstiegen, kann dort nicht zwischen bei der Lyse freigesetzten und von intakten Hepatozyten sezernierten Proteinen unterschieden werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein Großteil der Proteine im Überstand aus lysierten Zellen stammt. Dies erklärt auch die deutlich höheren Proteinwerte im Monolayer obwohl zahlreiche Autoren von größerer Sekretion in 3-D Kultur berichten (Debnath et al. 2020; Sakai et al. 1996; Uygun et al. 2010; Wu et al. 1996). Weiterhin dürften auch hier die bereits bei der Harnstoffproduktion erwähnte Verlegung von Gefäßen und Clusterbildung mit der damit einhergehenden kleineren Austauschoberfläche sowie die falsch-hoch ermittelte Zellzahl in der 3-D Kultur eine Rolle gespielt haben.

Die Bereitstellung von Glukose stellt einen weiteren zentralen Bestandteil der Hepatozytenfunktion dar. In vivo stellt die Leber bei niedrigen Plasmakonzentrationen Glukose bereit, während sie bei hohen Konzentrationen selbst Glukose aufnimmt und in Form von Glykogen einspeichert. Bei Werten von über 10 mmol/l wäre daher eine Abnahme der Glukosekonzentration im Überstand zu erwarten. Sowohl im Bioreaktor bei Leber 67 sowie 73 als auch im Monolayer war dies jedoch nicht der Fall. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Katz et al. (1975), welche zeigten, dass in Zellkulturen auch bei Konzentrationen über 7 mM keine Aufnahme von Glukose in die Hepatozyten stattfindet. So lange Ausgangsstoffe wie Laktat oder Fructose vorhanden sind, kann die Konzentration durch Gluconeogenese gar weiter ansteigen. Auch für ihren eigenen Stoffwechsel benötigen die Hepatozyten unter den o.g. Kulturbedingungen keine Glukose: Takagi et al. (2000) zeigten, dass Glutamin die primäre Energiequelle darstellt, wohingegen die Glukosekonzentration in

ihren Zellkulturen konstant blieb. Bei Leber 80 war dennoch eine Abnahme der Glukosekonzentration zu beobachten. Da die Hepatozyten beim Isolationsvorgang vorübergehend in PBS gelagert werden, wäre die Auffüllung der Glykogenvorräte eine mögliche Erklärung für den Glukoseverbrauch. Dass dies jedoch weder bei den anderen Versuchen im Bioreaktor noch im Monolayer beobachtet werden konnte, spricht gegen diese Theorie. Insgesamt scheint daher die Glukosekonzentration kein geeigneter Parameter zu sein, um die Viabilität der Hepatozyten zu beurteilen, da sie während der Kulturdauer großen Schwankungen unterliegt, wobei keine klare Tendenz erkennbar ist. Um den Glukosemetabolismus dennoch beurteilen zu können, wäre der Entzug aller anderen Substrate eine Option, beispielsweise indem man das Medium vorübergehend durch eine glukosehaltige PBS-Lösung ersetzt. Auffällig ist der Abfall der Glukosekonzentration bei Leber 70 zum Ende der Kultur. In dem nach Versuchsende über mehrere Tage weiter kultivierten Medium zeigte sich kein Wachstum von Bakterien oder Pilzen, sodass eine Kontamination als Ursache unwahrscheinlich erscheint. Mailloux und Appanna (2007) zeigten in Versuchen mit HepG2 Zellen, dass toxische Schädigung die anaerobe Glykolyse fördern kann. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den abrupten Abfall sein, allerdings wäre in diesen Fall auch ein Anstieg der Laktatkonzentration zu erwarten gewesen, welche jedoch konstant blieb. Auch die protokollierten Werte des Bioreaktors wie pH, O₂-Sättigung, Temperatur und Druck zeigten ebenso wie die Elektrolyte in der Blutgasanalyse keine Auffälligkeiten. Die endgültige Ursache bleibt daher unklar und müsste in weiteren Versuchen überprüft werden.

Laktat entsteht im Rahmen der anaeroben Glykolyse aus Pyruvat. Bei Sauerstoffmangel fällt es vermehrt an und ist damit ein Indikator für die Perfusion eines Gewebes. Unter physiologischen Bedingungen werden 70 % des im Körper anfallenden Laktats durch die Leber im Rahmen der Gluconeogenese eliminiert. (Phypers und Pierce 2006). Im Bioreaktor erfolgte der größte Anstieg zu Beginn der Kulturphase. Wie bereits im oberen Abschnitt der GOT-Aktivität diskutiert, kommt es im Rahmen des Einbringungsvorgangs zur Verlegung von Gefäßen sowie zur Clusterbildung, was eine Minderperfusion sowie auch einen Untergang

der Hepatozyten zur Folge hat. Der Laktatanstieg zu Beginn der Kultur ist als Folge dieser Minderperfusion zu werten. Im weiteren Verlauf kommt es zu keinem nennenswerten Anstieg der Laktatwerte, wodurch auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Hepatozyten im Bioreaktor geschlossen werden kann. Im Monolayer zeigte sich hingegen ein kontinuierlich hoher Zuwachs an Laktat im Überstand und damit eine mangelhafte Versorgung der Zellen. Am ehesten ist dies auf eine Überlagerung der Zellen in der 6-Well-Platte sowie auf die statischen Kulturbedingungen zurückzuführen, im Rahmen derer der Sauerstoffaustausch vermindert ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Jasmund et al. (2002) sowie Schmitmeier et al. (2006). Diese beobachteten signifikant niedrigere Laktatwerte bei porcinen Hepatozyten, welche in Bioreaktoren mit Oxygenatoren kultiviert wurden im Vergleich zur Kultivierung als 2D-Kultur. Bei Linke et al. (2007) zeigten sich ebenfalls signifikant niedrigere Laktatwerte bei der Verwendung einer vaskularisierten Biomatrix anstelle einer Monolayer Kultur.

Bei allen drei Versuchen im Bioreaktor war keine Galactoseelimination messbar. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Monolayerkultur, in welcher, abgesehen vom Zeitraum zwischen 24 und 48 h, kontinuierlich Galactose eliminiert wurde. Auch Flendrig et al. (1997) sowie Iwata et al. (1999) beobachteten in ihren mit porcinen Hepatozyten besiedelten Bioreaktoren eine Abnahme der Galactosekonzentration, wobei in beiden Versuchen Hohlfasersysteme anstatt Biomatrices als Träger für die Hepatozyten fungierten. Daten über die Galactoseelimination in wiederbesiedelten Lebermatrix liegen bisher nur von Bühler (2017) vor. Wie in dieser Arbeit konnte auch dort keine Verstoffwechslung von Galactose im Bioreaktor nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der HE-Färbung sowie der anderen metabolischen Assays legen nahe, dass sich ausreichend vitale Hepatozyten im System befanden. Da das Verhältnis von Hepatozyten zur beigefügten Menge Galactose in den drei Versuchen im Bioreaktor deutlich größer war als im Monolayer, kann auch eine unzureichende Empfindlichkeit des angewendeten Assay-Kits ausgeschlossen werden. Es ist daher zu vermuten, dass in der wiederbesiedelten Lebermatrix

eine Inhibition des Galactosestoffwechsels stattfand, während andere Stoffwechselwege, wie beispielsweise der Harnstoffzyklus, unberührt blieben.

Die Verstoffwechslung endogener und exogener Substanzen durch Cytochrome P450 sind essenzieller Bestandteil der Leberfunktion. Die Umsetzung von 7-Ethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin erfolgt durch CYP2A6 und kann somit als Marker für dessen Aktivität genutzt werden (Yun et al. 1991). Bei allen Versuchen im Bioreaktor war diese nur sehr gering ausgeprägt. Dies widerspricht den Ergebnissen von Sakai et al. (1999), die bei porcinen Hepatozyten in 3-D Kultur eine deutliche Verstoffwechslung nachweisen konnten. Bei der in Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in der Monolayer-Kultur fand diese Umsetzung, wie bereits von Donato et al. (1998) berichtet, ebenfalls statt. Die Verstoffwechslung von 7-Ethoxycumarin in einer mit porcinen Hepatozyten wiederbesiedelten sowie perfundierten Lebermatrix untersuchte bisher nur Bühler (2017), wobei dort keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Da sich im System vitale, stoffwechselaktive Hepatozyten befanden, wäre eine Cytochrom P450 Aktivität zu erwarten. Die mangelnde Verstoffwechslung könnte daher auf den Versuchsansatz zurückzuführen sein, der sich möglicherweise nicht von einer Monolayerkultur auf eine komplexe Kultur in einem Bioreaktor übertragen lässt. Dies gilt es in weiteren Versuchen mit anderen Substraten, welche über Cytochrome verstoffwechselt werden, zu prüfen.

Aufgrund des Nachweises vitaler Hepatozyten in den histologischen Schnitten von Leber 80 nach 69,5 Stunden sowie von Leber 67 nach 92 Stunden sowie den Ergebnissen aus den metabolischen Untersuchungen ist der Bioreaktor für die längerfristige Kultivierung von Hepatozyten geeignet. Der starke Anstieg des Harnstoffes im Überstand an Tag 7 bei Leber 73 lässt darauf schließen, dass selbst am 7. Tag in Kultur noch zahlreiche stoffwechselaktive Zellen vorlagen. Bei vergleichbaren Versuchen waren bereits nach 96 h keine vitalen Hepatozyten mehr nachweisbar (Bühler 2017). In den Versuchen erwiesen sich die Aktivität der AST sowie die Menge an Harnstoff im Überstand als geeignete Marker für intakte Hepatozyten, wobei eine Verzögerung im Falle eines Zelltods in Kauf

genommen werden muss. Die Laktatkonzentration im Überstand lässt Rückschlüsse auf die Sauerstoffversorgung der Hepatozyten zu, veränderte sich im Rahmen des Zellularuntergang bei Leber 73 jedoch nicht. Die Proteinmenge, bestimmt nach Bradford, eignete sich aufgrund der Freisetzung bei Zelllyse nur in Betrachtung mit der Enzymaktivität der AST. Galaktoseelimination, 7-Ethoxycumarin sowie Glucosekonzentration erwiesen sich zumindest in diesem Versuchsansatz im Bioreaktor als nicht aussagekräftig. Ob ein Abfall der Glucosekonzentration ein aussagekräftiger Parameter für bevorstehenden Zellularuntergang ist, gilt es weiter zu untersuchen.

Hinsichtlich des Fernziels Organtransplantation gilt es bei Wiederbesiedlung und Kultivierung noch etliche Anpassungen vorzunehmen. Bei der Wiederbesiedlung wurden zwischen 1,09 und 3,27 Milliarden Hepatozyten aus dem rechten Leberlappen isoliert und in die Biomatrix eingebracht. Da ein gewisser Anteil wieder ausgespült wurde, belief sich die Anzahl der Hepatozyten im System auf 0,67 – 2,07 Milliarden. Gemäß gängiger Meinung ist zur Gewährleistung einer ausreichenden Leberfunktion ein Mindestanteil von etwa 25 % der Zellmasse einer gesunden Leber notwendig, bei Transplantationen sogar bis zu 40 % (Clavien et al. 2010). Ausgehend vom niedrigeren Wert entspräche dies einer Gesamtzahl von ungefähr 52,5 Milliarden Hepatozyten (Sohlenius-Sternbeck 2006). Selbst bei Verwendung des gesamten Organs sowie Optimierung des Isolationsvorgangs wären mehrere Organe notwendig gewesen, um diese Zellzahl für eine Wiederbesiedlung zu isolieren. Auch eine längerfristige Kultur mit Vermehrung der Hepatozyten im Bioreaktor scheint im oben verwendeten Versuchsansatz aufgrund der Ergebnisse aus der KI-67 Färbung nicht möglich. In Hinblick auf das Fernziel „Entwicklung einer biotechnologisch hergestellten Leber“ stellen primäre Hepatozyten daher zwar einen Zwischenschritt dar, als Ausgangspunkt sind sie jedoch nicht geeignet. Die praktikablere Lösung könnten induzierte pluripotente Stammzellen darstellen, welche im Bioreaktor zunächst vermehrt und abschließend in primäre Hepatozyten ausdifferenziert werden. Einige Studien mit Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs wurden bereits erfolgreich durchgeführt (Bao et al. 2016; Harper et al. 2020; Wang et al. 2014).

Die histologische Betrachtung zeigte, dass sich bei Wiederbesiedlung über die Portalvene zahlreiche Zellen im Gefäßsystem angesiedelt hatten und nicht wie gewünscht im Parenchym. Diese Beobachtung wurde auch von Ogiso et al. (2016) beschrieben, wobei diese den Anteil der im Parenchym befindlichen Zellen bei Wiederbesiedlung über die Portalvene auf lediglich 20 % bezifferten. Passend dazu ist auch der Abfall der Druckkurve bei Leber 67: Durch die Verlegung der Gefäße stieg der Druck im Gefäßbaum, sodass bereits geringe Flussraten für den effektiven Druck von 15 mmHg ausreichten. Im Verlauf wurden einige Zellen doch noch aus dem Gefäßbaum in das Parenchym gespült (Uygun et al. 2010), wodurch der Druck in den Gefäßen sank, was wiederum höhere Flussraten erforderte. Eine deutlich bessere Verteilung der Hepatozyten im Parenchym wurde bei Wiederbesiedlung über die Vena hepatica erreicht. Wie bereits von Baptista et al. (2011) publiziert, siedelten sich die Zellen insbesondere im Bereich um die Zentralvene an, während im Gefäßbaum weniger Hepatozyten beobachtet wurden. Dies zeigte sich auch anhand der Druckkurven. Bei Wiederbesiedlung über die Vena hepatica waren kaum Anpassungen der Flussrate notwendig. Auch in Hinblick auf eine mögliche Co-Kultivierung mit Endothelzellen ist die retrograde Wiederbesiedlung mit Hepatozyten vorteilhaft. Hierbei werden die Endothelzellen anterograd über die Pfortader eingebracht. Die Hepatozyteninjektion erfolgt in einem späteren Durchgang. Eine Injektion von anterograd ist dann aufgrund der Endothelauskleidung nicht mehr möglich.

5. Zusammenfassung

Die kausalen Behandlungsmöglichkeiten einer Leberinsuffizienz sind aktuell aufgrund eines Mangels an Spenderorganen immer noch stark limitiert. Eine mögliche Lösung könnte das Tissue Engineering darstellen, wobei transplantierfähige Lebern ex vivo erzeugt und im Verlauf den Patienten transplantiert werden. Bei einem Großteil der bisher zu diesem Thema durchgeführten Arbeiten lag der Fokus insbesondere auf den technischen Faktoren der Azellularisierung und der Wiederbesiedlung. Im Gegensatz dazu liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Funktionalität dieser wiederbesiedelten Lebermatrices in längerfristig perfundierter Kultur. Dabei wird gezeigt, wie sich Viabilität und Stoffwechsellistung der Hepatozyten über einen mehrere Tage umfassenden Kulturzeitraum ex vivo entwickeln, ob der Bioreaktor für eine längerfristige Kultivierung geeignet ist, über welche Parameter sich die Viabilität der Hepatozyten während der Kulturphase beurteilen lässt und ob die angewendeten Verfahren zur Wiederbesiedlung und Kultivierung in Hinblick auf das Fernziel Organtransplantation geeignet sind. Hierfür wurden Göttinger Minipiglebern mittels einer 1%-igen SDS-Lösung azellularisiert, in einen Bioreaktor eingebracht und über die Pfortader oder Vv. hepaticae mit primären Hepatozyten wiederbesiedelt. Über den gesamten Kulturzeitraum hinweg wurden Mediumproben entnommen, um die Stoffwechselaktivität zu beurteilen. Nach Versuchsende wurden histologische Schnitte angefertigt. In den Versuchen zeigten die Hepatozyten über einen Kulturzeitraum von bis zu 7 Tagen eine kontinuierliche Produktion von Harnstoff sowie Proteinen. Stabile GOT- sowie Laktatwerte im Perfusat deuteten auf suffiziente Kulturbedingungen hin. Beim Glucosestoffwechsel zeigte sich hingegen keine klare Tendenz. Eine Verstoffwechslung von Galactose wurde nicht beobachtet, eine Cytochromaktivität war nur geringfügig nachweisbar. In den histologischen Schnitten zeigten sich die Hepatozyten auch nach 92 Stunden Kulturdauer noch vital. In den Zellclustern kam es zur Ausbildung kanalikulärer Strukturen. Mittels Ki-67 Färbung konnte bei sämtlichen Versuchen jedoch keine Zellteilung nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Entwicklung einer Leber ex vivo mittels Tissue Engineering durch Kultivierung in einem geeigneten Bioreaktor möglich sein könnte. Die Hepatozyten führen auch ex vivo lebertypische Funktionen über mehrere Tage hinweg aus. Limitierend in dieser Arbeit ist die fehlende Teilungsfähigkeit der verwendeten primären Hepatozyten. Um eine ausreichend große Zellzahl für ein transplantationsfähiges Organ zu erreichen, besteht daher noch weiterer Optimierungsbedarf. Beispielsweise durch den Einsatz teilungsfähiger Stammzellen.

Diese Arbeit stellt einen weiteren Zwischenschritt auf dem Weg zur Transplantation einer biotechnologisch erzeugten Leber dar, wobei zum Erreichen dieses Ziels noch etliche weitere Schritte und Anpassungen notwendig sind.

Materialien- und Herstellerverzeichnis

Azellularisierung

Bezeichnung	Hersteller
Nelaton-Katheter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
VacuCap® Flaschenaufsatzfilter	Pall Corporation, Port Washington, NY, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Pulver für 10 L)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Peristaltikpumpe MCP	Cole-Parmer GmbH, Wertheim
Peristaltikpumpe IPC	Cole-Parmer GmbH, Wertheim
Pumpenschläuche	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Astotherm® Plus Blut- und Infusionswärmer	Stihler Electronic GmbH, Stuttgart
Astotube® Verlängerungsleitung	Stihler Electronic GmbH, Stuttgart
Verlängerungsleitungen für Infusionssysteme	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kristallisierschale	VWR International, Radnor, PA, USA
Connection Line	Oriplast GmbH, Neunkirchen
DISCOFIX® C Dreiwegehahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
CODAN Xtrans® Druckmesser	CODAN Medizinische Geräte GmbH & Co. KG
Analog-Digital-Umsetzer	Goldammer GmbH, Wolfsburg
PicoScope 2000 Oszilloskop	dataTec AG, Reutlingen
DasyLab 11.0	Measurement Computing Corporation, Norton, MA, USA
UV-1 FPLC Detektor	Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
Schraubverschlüsse, Kunststoff-Oliven	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Silkam® Nahtmaterial	Aesculap AG, Tuttlingen
----------------------	-------------------------

Hepatozytenisolation

Bezeichnung	Hersteller
Nelaton-Katheter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
EGTA	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR International, Radnor, PA, USA
Natriumhydroxid Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES Puffer	Biochrom GmbH, Berlin
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Westfalen AG, Laichingen
Collagenase Typ II	Biochrom GmbH, Berlin
Wasserbad	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Peristaltikpumpe MF-Pumpsystem	Cole-Parmer GmbH, Wertheim
Verlängerungsleitungen für Infusionssysteme	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kristallisierschale	VWR International, Radnor, PA, USA
DISCOFIX® C Dreiwegehahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Blasenfalle	Universitäre Hauswerkstatt, Tübingen
Falcon® Zentrifugenröhrchen	Corning Inc., Corning, NY, USA
Trypanblau 0,5%	Biochrom GmbH, Berlin
C-Chip Hämozytometer	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt

Wiederbesiedlung und Kulturphase

BD Perfusions-Spritze, 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
6-Well-Platte	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CO ₂ -Brutschrank	Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
Z® RP GMP Breeder	Zellwerk GmbH, Eichstätt
Z® RP control unit	Zellwerk GmbH, Eichstätt
Messturm, Temperaturfühler	Zellwerk GmbH, Eichstätt
Hilite® 800 LT Hohlfaseroxygenator	Medos Medizintechnik AG, Heilbronn
Kristallisierschale	VWR International, Radnor, PA, USA
Midisart 2000 PTFE® 0.2µm Filter	Sartorius AG, Göttingen
pH-Elektrode	Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
pO ₂ -Sensor	Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
DISCOFIX® C Dreiwegehahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schraubverschlüsse, Kunststoff- Oliven	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CODAN Xtrans® Druckmesser	CODAN Medizinische Geräte GmbH & Co. KG
HEPES Puffer	Biochrom GmbH, Berlin
N-Acetyl-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Gentamycin	Biochrom GmbH, Berlin
Amphotericin B	Biochrom GmbH, Berlin
Dexamethason	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Insulin Insuman® Rapid	Sanofi-Aventis, Paris, Frankreich
Glukagon GlucaGen® HypoKit®	Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dänemark
Epidermal Growth Factor human	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Galactose	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
7-Ethoxycumarin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Williams' Medium E	Biochrom GmbH, Berlin
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe
Injekt®-F Spritzen (1 mL, 2 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
DasyLab 11.0	Measurement Computing Corporation, Norton, MA, USA

Evaluation der Zellfunktionen

Formaldehyd 4%	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
96-Well-Microplatte	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe
NaCl für Injektionszwecke	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe
ASAT (GOT) Assay	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim
TruLab N	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim
QuantiChrom™ Urea Assay Kit	Bioassay Systems LLC, Hayward, CA, USA
Lactose/D-Galactose Assay Kit	R-Biopharm AG, Darmstadt
BGA-Gerät ABL800 Flex	Radiometer Medical ApS, Kopenhagen, Dänemark
Coomassie® Brillantblau G 250	Merck KGaA, Darmstadt

Ethanol 99%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn
Phosphorsäure 85%	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin Fraction V	Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA
β -Glucuronidase/Arylsulfatase	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
TRIS Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
7-Hydroxycumarin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat-Trihydrat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Laborschüttler Easia Shaker	Medgenix Benelux NV, Wevelgem, Belgien
Multiskan Ascent Platereader	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
CytoFluor® Fluorescence Multi-Well Plate Reader	PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA, USA
Mikroskop BH-2	Olympus K.K., Tokio, Japan
ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit	Zytomed Systems GmbH, Berlin
ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen (Concentrate) Clone MIB-1	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Control Reagent, Mouse IgG1, X 0931	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
IBM SPSS Statistics 24	IBM Corporation, Armonk, NY, USA

6. Literaturverzeichnis

- Bailly-Maitre, B.; Sousa, G. de; Boulukos, K.; Gugenheim, J.; Rahmani, R. (2001): Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. In: *Cell death and differentiation* 8 (3), S. 279–288. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400815.
- Bailly-Maitre, B.; Sousa, G. de; Zucchini, N.; Gugenheim, J.; Boulukos, K. E.; Rahmani, R. (2002): Spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes. Molecular mechanisms and regulation by dexamethasone. In: *Cell death and differentiation* 9 (9), S. 945–955. DOI: 10.1038/sj/cdd/4401043.
- Balavoine, S.; Feldmann, G.; Lardeux, B. (1993): Regulation of RNA degradation in cultured rat hepatocytes: effects of specific amino acids and insulin. In: *Journal of cellular physiology* 156 (1), S. 56–62. DOI: 10.1002/jcp.1041560109.
- Ballard, F. J.; Wong, S. S.; Knowles, S. E.; Partridge, N. C.; Martin, T. J.; Wood, C. M.; Gunn, J. M. (1980): Insulin inhibition of protein degradation in cell monolayers. In: *Journal of cellular physiology* 105 (2), S. 335–346. DOI: 10.1002/jcp.1041050216.
- Ballmer, P. E.; McNurlan, M. A.; Milne, E.; Heys, S. D.; Buchan, V.; Calder, A. G.; Garlick, P. J. (1990): Measurement of albumin synthesis in humans: a new approach employing stable isotopes. In: *The American journal of physiology* 259 (6 Pt 1), E797-803. DOI: 10.1152/ajpendo.1990.259.6.E797.
- Bao, Ji; Wu, Qiong; Wang, Yujia; Li, Yi; Li, Li; Chen, Fei et al. (2016): Enhanced hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in spheroidal aggregate culture on a decellularized liver scaffold. In: *International journal of molecular medicine* 38 (2), S. 457–465. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2638.
- Baptista, Pedro M.; Siddiqui, Mohummad M.; Lozier, Genevieve; Rodriguez, Sergio R.; Atala, Anthony; Soker, Shay (2011): The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (2), S. 604–617. DOI: 10.1002/hep.24067.
- Ben-Ze'ev, A.; Robinson, G. S.; Bucher, N. L.; Farmer, S. R. (1988): Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (7), S. 2161–2165.
- Beránek, Martin; Drsata, Jaroslav; Palicka, Vladimír (2002): In vitro glycation of aminotransferases: a process closely depending on the employed experimental conditions. In: *Acta medica (Hradec Kralove)* 45 (3), S. 89–92.

- Bernaert, D.; Wanson, J. C.; Drochmans, P.; Popowski, A. (1977): Effect of insulin on ultrastructure and glycogenesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. In: *The Journal of cell biology* 74 (3), S. 878–900.
- Blachier, Martin; Leleu, Henri; Peck-Radosavljevic, Markus; Valla, Dominique-Charles; Roudot-Thoraval, Françoise (2013): The burden of liver disease in Europe. A review of available epidemiological data. In: *Journal of hepatology* 58 (3), S. 593–608. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.12.005.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Brunner, Daniel; Frank, Jürgen; Appl, Helmut; Schöffl, Harald; Pfaller, Walter; Gstraunthaler, Gerhard (2010): Serum-free cell culture. The serum-free media interactive online database. In: *ALTEX* 27 (1), S. 53–62.
- Bühler, Nicola Elena Maria (2017): Tissue Engineering einer Leber. Dissertation. Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen.
- Bühler, Nicola Elena Maria; Schulze-Osthoff, Klaus; Königsrainer, Alfred; Schenk, Martin (2015): Controlled processing of a full-sized porcine liver to a decellularized matrix in 24 h. In: *Journal of bioscience and bioengineering* 119 (5), S. 609–613. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.019.
- Chapman, G. S.; Jones, A. L.; Meyer, U. A.; Bissell, D. M. (1973): Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. II. Ultrastructural studies. In: *The Journal of cell biology* 59 (3), S. 735–747.
- Chen, Yibin; Geerts, Sharon; Jaramillo, Maria; Uygun, Basak E. (2017): Preparation of Decellularized Liver Scaffolds and Recellularized Liver Grafts. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. DOI: 10.1007/7651_2017_56.
- Cheng, Yuan; Wang, Yan; Kang, Yu Zan; Hu, Peng Yun; Gao, Yi; Pan, Ming Xin (2013): In vitro culture of tumour-derived hepatocytes in decellularised whole-liver biological scaffolds. In: *Digestion* 87 (3), S. 189–195. DOI: 10.1159/000349949.
- Clavien, Pierre-Alain; Oberkofler, Christian E.; Raptis, Dimitri A.; Lehmann, Kuno; Rickenbacher, Andreas; El-Badry, Ashraf Mohammad (2010): What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality? In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (2), S. 715–729. DOI: 10.1002/hep.23713.
- Clayton, D. F.; Darnell, J. E. (1983): Changes in liver-specific compared to common gene transcription during primary culture of mouse hepatocytes. In: *Molecular and cellular biology* 3 (9), S. 1552–1561.

Debnath, Tanya; Mallarpu, Chandra Shekar; Chelluri, Lakshmi Kiran (2020): Development of Bioengineered Organ Using Biological Acellular Rat Liver Scaffold and Hepatocytes. In: *Organogenesis* 16 (2), S. 61–72. DOI: 10.1080/15476278.2020.1742534.

Deutsche Stiftung Organtransplantation (2017): Jahresbericht. Organspende und Transplantation in Deutschland 2016. Online verfügbar unter www.dso.de, zuletzt geprüft am 08.08.2017.

Donato, M. T.; Castell, J. V.; Gómez-Lechón, M. J. (1998): The coumarin 7-hydroxylation microassay in living hepatic cells in culture. In: *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 26 (2), S. 213–223.

Dunn, J. C.; Yarmush, M. L.; Koebe, H. G.; Tompkins, R. G. (1989): Hepatocyte function and extracellular matrix geometry. Long-term culture in a sandwich configuration. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3 (2), S. 174–177.

Fahl, William E.; Michalopoulos, George; Sattler, Gerald L.; Jefcoate, Colin R.; Pitot, Henry C. (1979): Characteristics of microsomal enzyme controls in primary cultures of rat hepatocytes. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 192 (1), S. 61–72. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90071-7.

Felíu, J. E.; Coloma, J.; Gómez-Lechón, M. J.; García, M. D.; Báguena, J. (1982): Effect of dexamethasone on the isozyme pattern of adult rat liver parenchymal cells in primary cultures. In: *Molecular and cellular biochemistry* 45 (2), S. 73–81.

Feutren, Gilles; Lacour, Bernard; François Bach, Jean (1984): Immune lysis of hepatocytes in culture: Accurate detection by aspartate aminotransferase release measurement. In: *Journal of Immunological Methods* 75 (1), S. 85–94. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90227-8.

Flaim, K. E.; Hutson, S. M.; Lloyd, C. E.; Taylor, J. M.; Shiman, R.; Jefferson, L. S. (1985): Direct effect of insulin on albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. In: *The American journal of physiology* 249 (5 Pt 1), E447-53.

Flendrig, Leonard M.; La Soe, John W.; Jörning, George G.A.; Steenbeek, Arie; Karlsen, Ole T.; Bovée, Wim M.M.J. et al. (1997): In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. In: *Journal of hepatology* 26 (6), S. 1379–1392. DOI: 10.1016/S0168-8278(97)80475-8.

Folkman, J.; Hochberg, M. (1973): Self-regulation of growth in three dimensions. In: *The Journal of experimental medicine* 138 (4), S. 745–753.

Fraslin, J. M.; Kneip, B.; Vaulont, S.; Glaise, D.; Munnich, A.; Guguen-Guillouzo, C. (1985): Dependence of hepatocyte-specific gene expression on cell-cell interactions in primary culture. In: *The EMBO journal* 4 (10), S. 2487–2491.

- Gebhardt, R.; Mecke, D. (1979): Permissive effect of dexamethasone on glucagon induction of urea-cycle enzymes in perfused primary monolayer cultures of rat hepatocytes. In: *European journal of biochemistry* 97 (1), S. 29–35.
- Good, Phillip D.; Schneider, Jennifer J.; Ravenscroft, Peter J. (2004): The compatibility and stability of midazolam and dexamethasone in infusion solutions. In: *Journal of pain and symptom management* 27 (5), S. 471–475. DOI: 10.1016/j.jpainsymman.2004.02.002.
- Grieninger, G.; Granick, S. (1978): Synthesis and secretion of plasma proteins by embryonic chick hepatocytes. Changing patterns during the first three days of culture. In: *The Journal of experimental medicine* 147 (6), S. 1806–1823.
- Harper, Simon; Hoff, Mekhola; Skepper, Jeremy; Davies, Susan; Huguet, Emmanuel (2020): Portal venous repopulation of decellularised rat liver scaffolds with syngeneic bone marrow stem cells. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. DOI: 10.1002/term.3117.
- Hibino, Narutoshi; McGillicuddy, Edward; Matsumura, Goki; Ichihara, Yuki; Naito, Yuji; Breuer, Christopher; Shinoka, Toshiharu (2010): Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 139 (2), 431-6, 436.e1-2. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.09.057.
- Horiuti, Y.; Nakamura, T.; Ichihara, A. (1982): Role of serum in maintenance of functional hepatocytes in primary culture. In: *Journal of biochemistry* 92 (6), S. 1985–1994.
- Hynes, Richard O. (1992): Integrins. Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. In: *Cell* 69 (1), S. 11–25. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90115-S.
- Ichihara, A.; Nakamura, T.; Tanaka, K. (1982): Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. In: *Molecular and cellular biochemistry* 43 (3), S. 145–160.
- Ise, Hirohiko; Takashima, Seiji; Nagaoka, Masato; Ferdous, Anwarul; Akaike, Toshihiro (1999): Analysis of cell viability and differential activity of mouse hepatocytes under 3D and 2D culture in agarose gel. In: *Biotechnology Letters* 21 (3), S. 209–213. DOI: 10.1023/A:1005412129500.
- Iwata, H.; Sajiki, T.; Maeda, H.; Park, Y. G.; Zhu, B.; Satoh, S. et al. (1999): In vitro evaluation of metabolic functions of a bioartificial liver. In: *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)* 45 (4), S. 299–306. DOI: 10.1097/00002480-199907000-00009.
- Jansing, R.; Samsonoff, W. A. (1984): Effect of epidermal growth factor on cultured adult rat hepatocytes. In: *Tissue & cell* 16 (2), S. 157–166.
- Jasmund, Inka; Langsch, Angelika; Simmoteit, Robert; Bader, Augustinus (2002): Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. In: *Biotechnology progress* 18 (4), S. 839–846. DOI: 10.1021/bp025501y.
- Jauregui, H. O.; McMillan, P. N.; Driscoll, J.; Naik, S. (1986): Attachment and long term survival of adult rat hepatocytes in primary monolayer cultures. Comparison of different substrata and

tissue culture media formulations. In: *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 22 (1), S. 13–22.

Jefferson, D. M.; Clayton, D. F.; Darnell, J. E.; Reid, L. M. (1984): Posttranscriptional modulation of gene expression in cultured rat hepatocytes. In: *Molecular and cellular biology* 4 (9), S. 1929–1934.

Kajbafzadeh, Abdol-Mohammad; Javan-Farazmand, Niloufar; Monajemzadeh, Maryam; Baghayee, Arash (2013): Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 19 (8), S. 642–651. DOI: 10.1089/ten.TEC.2012.0334.

Kanematsu, Akihiro; Yamamoto, Shingo; Ozeki, Makoto; Noguchi, Tetsuya; Kanatani, Isao; Ogawa, Osamu; Tabata, Yasuhiko (2004): Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. In: *Biomaterials* 25 (18), S. 4513–4520. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.035.

Katz, J.; Wals, P. A.; Golden, S.; Rognstad, R. (1975): Recycling of glucose by rat hepatocytes. In: *European journal of biochemistry* 60 (1), S. 91–101. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb20979.x.

Klaunig, J. E.; Goldblatt, P. J.; Hinton, D. E.; Lipsky, M. M.; Trump, B. F. (1981): Mouse liver cell culture. II. Primary culture. In: *In vitro* 17 (10), S. 926–934.

Knook, Dick L.; Sleyster, Elisabeth Ch. (1980): Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content. In: *Biochemical and biophysical research communications* 96 (1), S. 250–257. DOI: 10.1016/0006-291X(80)91207-3.

Kock, Joery de; Ceelen, Liesbeth; Spiegelaere, Ward de; Casteleyn, Christophe; Claes, Paul; Vanhaecke, Tamara; Rogiers, Vera (2011): Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool? In: *Archives of toxicology* 85 (6), S. 607–612. DOI: 10.1007/s00204-011-0706-1.

Koide, N.; Shinji, T.; Tanabe, T.; Asano, K.; Kawaguchi, M.; Sakaguchi, K. et al. (1989): Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. In: *Biochemical and biophysical research communications* 161 (1), S. 385–391.

Laishes, B. A.; Williams, G. M. (1976): Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology. In: *In vitro* 12 (12), S. 821–832.

Landry, J.; Bernier, D.; Ouellet, C.; Goyette, R.; Marceau, N. (1985): Spheroidal aggregate culture of rat liver cells. Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. In: *The Journal of cell biology* 101 (3), S. 914–923.

- Lardner, A.; Mooney, P.; O'Donovan, D. J. (1994): Effect of urea cycle intermediates on urea formation from ammonium chloride in rats fed protein-free diet. In: *Biochemical Society transactions* 22 (1), 27S. DOI: 10.1042/bst022027s.
- Lazar, A.; Mann, H. J.; Remmel, R. P.; Shatford, R. A.; Cerra, F. B.; Hu, W. S. (1995): Extended liver-specific functions of porcine hepatocyte spheroids entrapped in collagen gel. In: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 31 (5), S. 340–346. DOI: 10.1007/BF02634282.
- LeCluyse, Edward L.; Bullock, Peter L.; Parkinson, Andrew (1996): Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 22 (1-2), S. 133–186. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00418-8.
- Li, Y. Q.; Prentice, D. A.; Howard, M. L.; Mashford, M. L.; Desmond, P. V. (1999): The effect of hormones on the expression of five isoforms of UDP-glucuronosyltransferase in primary cultures of rat hepatocytes. In: *Pharmaceutical research* 16 (2), S. 191–197.
- Liddle, C.; Goodwin, B. J.; George, J.; Tapner, M.; Farrell, G. C. (1998): Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83 (7), S. 2411–2416. DOI: 10.1210/jcem.83.7.4877.
- Lin, Paul; Chan, Warren C. W.; Badylak, Stephen F.; Bhatia, Sangeeta N. (2004): Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. In: *Tissue engineering* 10 (7-8), S. 1046–1053. DOI: 10.1089/ten.2004.10.1046.
- Lin, R. C.; Snodgrass, P. J.; Rabier, D. (1982): Induction of urea cycle enzymes by glucagon and dexamethasone in monolayer cultures of adult rat hepatocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (9), S. 5061–5067.
- Linke, Kirstin; Schanz, Johanna; Hansmann, Jan; Walles, Thorsten; Brunner, Herwig; Mertsching, Heike (2007): Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. In: *Tissue engineering* 13 (11), S. 2699–2707. DOI: 10.1089/ten.2006.0388.
- Liu, L.; LeCluyse, E. L.; Liu, J.; Klaassen, C. D. (1996): Sulfotransferase gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. In: *Biochemical pharmacology* 52 (10), S. 1621–1630.
- Loyer, Pascal; Cariou, Sandrine; Glaise, Denise; Bilodeau, Marc; Baffet, Georges; Guguen-Guillouzo, Christiane (1996): Growth Factor Dependence of Progression through G and S Phases of Adult Rat Hepatocytes in Vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (19), S. 11484–11492. DOI: 10.1074/jbc.271.19.11484.
- Mailloux, Ryan J.; Appanna, Vasu D. (2007): Aluminum toxicity triggers the nuclear translocation of HIF-1 α and promotes anaerobiosis in hepatocytes. In: *Toxicology in Vitro* 21 (1), S. 16–24. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.07.013.

- Miyamoto, S.; Katz, B. Z.; Lafrenie, R. M.; Yamada, K. M. (1998): Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 857, S. 119–129.
- Nakamura, T.; Nakayama, Y.; Ichihara, A. (1984): Reciprocal modulation of growth and liver functions of mature rat hepatocytes in primary culture by an extract of hepatic plasma membranes. In: *The Journal of biological chemistry* 259 (13), S. 8056–8058.
- Nakamura, T.; Tomita, Y.; Ichihara, A. (1983a): Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. In: *Journal of biochemistry* 94 (4), S. 1029–1035.
- Nakamura, T.; Yoshimoto, K.; Nakayama, Y.; Tomita, Y.; Ichihara, A. (1983b): Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (23), S. 7229–7233.
- Nawa, K.; Nakamura, T.; Kumatori, A.; Noda, C.; Ichihara, A. (1986): Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (36), S. 16883–16888.
- Nelson, Leonard J.; Treskes, Philipp; Howie, A. Forbes; Walker, Simon W.; Hayes, Peter C.; Plevris, John N. (2013): Profiling the impact of medium formulation on morphology and functionality of primary hepatocytes in vitro. In: *Scientific reports* 3, S. 2735. DOI: 10.1038/srep02735.
- Nguyen, Deborah G.; Funk, Juergen; Robbins, Justin B.; Crogan-Grundy, Candace; Presnell, Sharon C.; Singer, Thomas; Roth, Adrian B. (2016): Bioprinted 3D Primary Liver Tissues Allow Assessment of Organ-Level Response to Clinical Drug Induced Toxicity In Vitro. In: *PLoS one* 11 (7), e0158674. DOI: 10.1371/journal.pone.0158674.
- Nyberg, Scott L.; Hardin, Joseph; Amiot, Bruce; Argikar, Upendra A.; Remmel, Rory P.; Rinaldo, Piero (2005): Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. In: *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 11 (8), S. 901–910. DOI: 10.1002/lt.20446.
- Ogiso, Satoshi; Yasuchika, Kentaro; Fukumitsu, Ken; Ishii, Takamichi; Kojima, Hidenobu; Miyauchi, Yuya et al. (2016): Efficient recellularisation of decellularised whole-liver grafts using biliary tree and foetal hepatocytes. In: *Scientific reports* 6, S. 35887. DOI: 10.1038/srep35887.
- Phypers, Barrie; Pierce, J. TomM (2006): Lactate physiology in health and disease. In: *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 6 (3), S. 128–132. DOI: 10.1093/bjaceaccp/mkl018.

- Pohl, Roderike; Li, Ming; Krasner, Alan; Souza, Errol de (2015): Development of stable liquid glucagon formulations for use in artificial pancreas. In: *Journal of diabetes science and technology* 9 (1), S. 8–16. DOI: 10.1177/1932296814555541.
- Rana, B.; Mischoulon, D.; Xie, Y.; Bucher, N. L.; Farmer, S. R. (1994): Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. In: *Molecular and cellular biology* 14 (9), S. 5858–5869. DOI: 10.1128/mcb.14.9.5858-5869.1994.
- Raya-Rivera, Atlantida; Esquiliano, Diego R.; Yoo, James J.; Lopez-Bayghen, Esther; Soker, Shay; Atala, Anthony (2011): Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction. An observational study. In: *The Lancet* 377 (9772), S. 1175–1182. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62354-9.
- Richman, R. A.; Claus, T. H.; Pilakis, S. J.; Friedman, D. L. (1976): Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (10), S. 3589–3593.
- Rogiers, V.; Vandenberghe, Y.; Callaerts, A.; Verleye, G.; Cornet, M.; Mertens, K. et al. (1990): Phase I and phase II xenobiotic biotransformation in cultures and co-cultures of adult rat hepatocytes. In: *Biochemical pharmacology* 40 (8), S. 1701–1706.
- Sabetkish, Shabnam; Kajbafzadeh, Abdol-Mohammad; Sabetkish, Nastaran; Khorramirouz, Reza; Akbarzadeh, Aram; Seyedian, Sanam Ladi et al. (2015): Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 103 (4), S. 1498–1508. DOI: 10.1002/jbm.a.35291.
- Sakai, Y.; Naruse, K.; Nagashima, I.; Muto, T.; Suzuki, M. (1996): Large-scale preparation and function of porcine hepatocyte spheroids. In: *The International journal of artificial organs* 19 (5), S. 294–301.
- Sakai, Y.; Naruse, K.; Nagashima, I.; Muto, T.; Suzuki, M. (1999): A new bioartificial liver using porcine hepatocyte spheroids in high-cell-density suspension perfusion culture: in vitro performance in synthesized culture medium and in 100% human plasma. In: *Cell transplantation* 8 (5), S. 531–541. DOI: 10.1177/096368979900800508.
- Saksela, O.; Moscatelli, D.; Sommer, A.; Rifkin, D. B. (1988): Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. In: *The Journal of cell biology* 107 (2), S. 743–751.
- Schmitmeier, Stephanie; Langsch, Angelika; Jasmund, Inka; Bader, Augustinus (2006): Development and characterization of a small-scale bioreactor based on a bioartificial hepatic culture model for predictive pharmacological in vitro screenings. In: *Biotechnology and bioengineering* 95 (6), S. 1198–1206. DOI: 10.1002/bit.21089.

- Seglen, P. O. (1976): Preparation of isolated rat liver cells. In: *Methods in cell biology* 13, S. 29–83.
- Seglen, P. O.; Fossa, J. (1978): Attachment of rat hepatocytes in vitro to substrata of serum protein, collagen, or concanavalin A. In: *Experimental cell research* 116 (1), S. 199–206.
- Shimaoka, S.; Nakamura, T.; Ichihara, A. (1987): Stimulation of growth of primary cultured adult rat hepatocytes without growth factors by coculture with nonparenchymal liver cells. In: *Experimental cell research* 172 (1), S. 228–242.
- Shulman, Maria; Nahmias, Yaakov (2013): Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 945, S. 287–302. DOI: 10.1007/978-1-62703-125-7_17.
- Sohlenius-Sternbeck, Anna-Karin (2006): Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 20 (8), S. 1582–1586. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.06.003.
- Soto-Gutierrez, Alejandro; Zhang, Li; Medberry, Chris; Fukumitsu, Ken; Faulk, Denver; Jiang, Hongbin et al. (2011): A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 17 (6), S. 677–686. DOI: 10.1089/ten.TEC.2010.0698.
- Statistisches Bundesamt (2016): Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). Fachserie 12 Reihe 6.2.1 - 2015. Wiesbaden. Online verfügbar unter www.destatis.de, zuletzt geprüft am 08.08.2017.
- Takagi, M.; Kojima, N.; Yoshida, T. (2000): Analysis of the ammonia metabolism of rat primary hepatocytes and a human hepatocyte cell line Huh 7. In: *Cytotechnology* 32 (1), S. 9–15. DOI: 10.1023/A:1008165027319.
- Terry, T. L.; Gallin, W. J. (1994): Effects of fetal calf serum and disruption of cadherin function on the formation of bile canaliculi between hepatocytes. In: *Experimental cell research* 214 (2), S. 642–653. DOI: 10.1006/excr.1994.1302.
- Török, E.; Pollok, J. M.; Ma, P. X.; Kaufmann, P. M.; Dandri, M.; Petersen, J. et al. (2001): Optimization of hepatocyte spheroid formation for hepatic tissue engineering on three-dimensional biodegradable polymer within a flow bioreactor prior to implantation. In: *Cells, tissues, organs* 169 (1), S. 34–41.
- Triebwasser, K. C.; Freedland, R. A. (1977): The effect of glucagon on ureagenesis from ammonia by isolated rat hepatocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 76 (4), S. 1159–1165. DOI: 10.1016/0006-291X(77)90977-9.

- Tuschl, Gregor; Mueller, Stefan O. (2006): Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes-cell morphology and differential gene expression. In: *Toxicology* 218 (2-3), S. 205–215. DOI: 10.1016/j.tox.2005.10.017.
- Uygun, Basak E.; Soto-Gutierrez, Alejandro; Yagi, Hiroshi; Izamis, Maria-Louisa; Guzzardi, Maria A.; Shulman, Carley et al. (2010): Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. In: *Nature medicine* 16 (7), S. 814–820. DOI: 10.1038/nm.2170.
- Verstegen, Monique M. A.; Willemse, Jorke; van den Hoek, Sjoerd; Kremers, Gert-Jan; Luider, Theo M.; van Huizen, Nick A. et al. (2017): Decellularization of Whole Human Liver Grafts Using Controlled Perfusion for Transplantable Organ Bioscaffolds. In: *Stem cells and development*. DOI: 10.1089/scd.2017.0095.
- Villafuerte, B. C.; Koop, B. L.; Pao, C. I.; Gu, L.; Birdsong, G. G.; Phillips, L. S. (1994): Coculture of primary rat hepatocytes and nonparenchymal cells permits expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in vitro. In: *Endocrinology* 134 (5), S. 2044–2050. DOI: 10.1210/endo.134.5.7512496.
- Wang, Xiaojun; Cui, Jing; Zhang, Bing-Qiang; Zhang, Hongyu; Bi, Yang; Kang, Quan et al. (2014): Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 102 (4), S. 1017–1025. DOI: 10.1002/jbm.a.34764.
- Wang, Yujia; Bao, Ji; Wu, Qiong; Zhou, Yongjie; Li, Yi; Wu, Xiujuan et al. (2015): Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. In: *Xenotransplantation* 22 (1), S. 48–61. DOI: 10.1111/xen.12141.
- Welsch, Ulrich; Deller, Thomas (2011): Sobotta Lehrbuch Histologie. Unter Mitarbeit von Thomas Deller. 3. Aufl. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1722830>.
- Wu, F. J.; Friend, J. R.; Lazar, A.; Mann, H. J.; Remmel, R. P.; Cerra, F. B.; Hu, W. S. (1996): Hollow fiber bioartificial liver utilizing collagen-entrapped porcine hepatocyte spheroids. In: *Biotechnology and bioengineering* 52 (1), S. 34–44. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19961005)52:1<34::AID-BIT4>3.0.CO;2-#.
- Wu, Qiong; Bao, Ji; Zhou, Yong-jie; Wang, Yu-jia; Du, Zheng-gui; Shi, Yu-jun et al. (2015): Optimizing perfusion-decellularization methods of porcine livers for clinical-scale whole-organ bioengineering. In: *BioMed research international* 2015, S. 785474. DOI: 10.1155/2015/785474.
- Yuasa, C.; Tomita, Y.; Shono, M.; Ishimura, K.; Ichihara, A. (1993): Importance of cell aggregation for expression of liver functions and regeneration demonstrated with primary cultured hepatocytes. In: *Journal of cellular physiology* 156 (3), S. 522–530. DOI: 10.1002/jcp.1041560311.

Yun, C. H.; Shimada, T.; Guengerich, F. P. (1991): Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. In: *Molecular pharmacology* 40 (5), S. 679–685.

Zang, G. Q.; Zhou, X. Q.; Yu, H.; Xie, Q.; Zhao, G. M.; Wang, B. et al. (2000): Effect of hepatocyte apoptosis induced by TNF- α on acute severe hepatitis in mouse models. In: *WJG* 6 (5), S. 688–692. DOI: 10.3748/wjg.v6.i5.688.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Institut für Experimentelle Chirurgie unter Betreuung von Privatdozent Dr. Martin Schenk durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Privatdozent Dr. Martin Schenk.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder Privatdozent Dr. Martin Schenk, Dr. Roland Klaffschenkel, Maria Seitzer sowie Erich-Dirk Göllner) von mir eigenständig durchgeführt.

Die Entnahme der Lebern wurde von Privatdozent Dr. Martin Schenk durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 11.08.2024

Falk Sohl

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denjenigen Personen meinen Dank aussprechen, durch deren Unterstützung diese Arbeit erst möglich wurde.

Zunächst gilt mein Dank in besonderem Maße PD Dr. Martin Schenk für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Experimentelle Chirurgie durchführen zu dürfen sowie für die stets angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung während der Erstellung. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Andreas Nüssler für die Betreuung als Zweitgutachter danken.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Instituts für Experimentelle Chirurgie namentlich insbesondere Dr. Roland Klaffschenkel, Frau Maria Seitzer sowie Herrn Erich-Dirk Göllner für die stetige Unterstützung in allen Phasen sowie Ratschläge, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Letzten Endes möchte ich meiner Familie danken, welche mich durch Höhen und Tiefen während des experimentellen Teils begleitet hat. Eure Unterstützung war entscheidend dafür, dass ich diese Arbeit fertigstellen konnte.