

**Untersuchungen zur Expansion, funktionellen
Charakterisierung und kontinuierlichen
Bereitstellung von Hepatocyten für die Anwendung
in bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen**

**Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld**

**zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegte
DISSERTATION**

**von
Dipl.-Biol. Kai Iding
aus Dingden
2001**

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Flaschel

Tag der Disputation: 17. Dezember 2001

“Grau is’ alle Theorie – entscheidend is’ auf’n Platz.”

Alfred “Adi” Preisler

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1999 bis November 2001 im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Verbundprojektes "Leberunterstützungs-Therapie auf Basis immortalisierter, humaner Leberzellen" (Förderkennzeichen 0311518) am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Jürgen Lehmann angefertigt.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Jürgen Lehmann danke ich für die Möglichkeit der Dissertation, die interessante Themenstellung und die ausgezeichnete Unterstützung im Verlauf der Arbeit. Weiterhin möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen an seinem Lehrstuhl bedanken.

Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Dr. Heino Büntemeyer möchte ich mich für die fachliche Betreuung der Arbeit und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Frau Dr. Katrin Zeilinger vom Virchow Klinikum in Berlin danke ich für den regen Informationsfluß zu allen Fragen der bioartifiziellen Leberunterstützung.

Für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführungen der Vielzahl von Aminosäureanalysen danke ich Frau Ute Bürstenbinder und Frau Gesche Rottmann.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Holger Fuchs für seinen enormen Einsatz bei den Analysen zur Bestimmung der Cytochrom-P450-Aktivitäten.

Herrn Dr. Andreas Werner danke ich für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit und seine hilfreichen Anregungen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Anke für ihre moralische Unterstützung während der Zeit, in der die Bedürfnisse von Hepatocyten die Freizeitgestaltung am Wochenende bestimmten.

Ansonsten möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zellkulturtechnik für das beispielhaft gute Arbeitsklima bedanken.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Medizinischer Hintergrund	3
1. Anatomie, Morphologie und Physiologie der Leber	3
1.1 Das Blutgefäßsystem.....	4
1.2 Feinanatomie.....	4
1.3 Funktionelle Gliederung.....	5
1.3.1 Das Portalläppchen.....	5
1.3.2 Der Leberazinus.....	6
1.4 Zelluläre Bestandteile der Leber.....	7
1.5 Funktionen und Aufgaben der Leber.....	8
1.5.1 Biotransformation und Cytochrom-P450-System.....	9
2. Lebererkrankungen und Leberversagen	10
2.1 Hepatitis A.....	12
2.2 Hepatitis B.....	12
2.3 Hepatitis C.....	13
2.4 Hepatitis E.....	13
2.5 Kryptogene Hepatiden.....	13
2.6 Medikamente und Drogen.....	14
2.7 Sonstige Ursachen.....	15
3. Lebertherapien	16
3.1 Lebertransplantation.....	16
3.2 Leberunterstützungssysteme und -verfahren.....	19
3.2.1 Artificielle Leberunterstützung.....	19
3.2.1.1 Hämodialyse.....	19
3.2.1.2 Hämofiltration und Hämodiafiltration.....	21
3.2.1.3 Adsorptionsverfahren (Hämodiaadsorption).....	21
3.2.1.4 Plasmaaustausch bzw. Plasmapherese.....	23

3.2.2 Bioartifizielle Leberunterstützung.....	23
3.2.2.1 Kreuzzirkulation und Kreuz-Heterohämodialyse.....	23
3.2.2.2 Isolierte Leberperfusion.....	24
3.2.2.3 Extrakorporale biohybride Perfusionssysteme.....	24
3.2.2.3.1 Zellressourcen.....	28
III. Aufgabenstellung.....	32
1. Vermehrung der Hepatocyten.....	32
2. Alternativen zur Bereitstellung der Hepatocyten.....	32
2.1 Direkter Transfer.....	32
2.2 Kontinuierliche Bereitstellung unter hypothermischen Bedingungen.....	33
2.2.1 Hypothermische Konservierung <i>versus</i> Kryokonservierung.....	35
IV. Material und Methoden.....	39
1. Zellkultivierung.....	39
1.1 Die Hepatocytelinien.....	39
1.1.1 HepT.....	39
1.1.2 K105.....	39
1.1.3 C3A.....	40
1.2 Die Kulturmedien.....	40
1.2.1 Mediumherstellung, Sterilisation und Lagerung.....	42
1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	42
1.4 Die Kultivierungssysteme.....	43
1.4.1 Kulturflaschen und Multiwell-Platten.....	43
1.4.1.1 Passagieren der Zellkulturen.....	44
1.4.2 Microcarrier.....	46
1.4.2.1 Silanisierung der Glasgeräte.....	46
1.4.2.2 Vorbehandlung der Microcarrier.....	47
1.4.3 Microcarrier-Kultivierungen in Spinnerflaschen.....	47
1.4.4 Microcarrier-Kultivierungen im Bioreaktor.....	48
1.4.4.1 Die pO ₂ -Elektrode: Aufbau und Funktionsprinzip.....	49
1.4.4.2 Der pO ₂ -Regler: Regelkreis und Regleroptimierung.....	52

1.5 Prozeßführungen.....	54
1.5.1 Der Batchprozeß.....	54
1.5.1.1 Wachstumsverlauf.....	54
1.5.1.2 Monod-Kinetik und zellspezifische Parameter.....	56
1.6. OTR, OUR und k_{La}	57
2. Analysen der Kultivierungen.....	59
2.1 Bildgebende Verfahren.....	59
2.1.1 Rasterelektronenmikroskopie.....	59
2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und -konzentration nach der Trypanblau- Ausschlußmethode.....	61
2.1.2.1 Probenvorbereitung.....	61
2.1.2.2 Auszählung im Hämocytometer.....	62
2.1.2.3 Automatische Auszählung im CEDEX [®] -System.....	62
2.2 Biochemische und physikalische Verfahren.....	63
2.2.1 Bestimmung der Konzentration von Glucose und Lactat.....	63
2.2.2 Bestimmung der Konzentration der Aminosäuren.....	64
2.2.3 Bestimmung der Konzentration von Ammonium.....	66
2.2.4 Bestimmung der extrazellulären Lactat-Dehydrogenase-(LDH-) Aktivität.....	67
2.2.5 Bestimmung der Cytochrom-P450-Aktivitäten.....	68
2.2.5.1 Coumarin-Hydroxylase-(CH-)Aktivität.....	69
2.2.5.2 7-Ethoxycoumarin- <i>o</i> -Deethylase-(ECOD)-Aktivität.....	71
2.2.5.3 7-Ethoxyresorufin- <i>o</i> -Deethylase-(EROD)-Aktivität.....	72
2.2.5.4 Untersuchung möglicher Substanzeffekte auf die Zellviabilität.....	74
2.2.6 Bestimmung der Osmolarität.....	74
2.3 Korrelationsverfahren.....	75
V. Ergebnisse und Diskussion.....	76
1. Charakterisierung von HepT,C3A und K105.....	76
1.1 Kultivierung der Hepatocytenlinien in T-Flaschen.....	76
1.1.1 Morphologie von HepT.....	77
1.1.2 Morphologie von C3A.....	77
1.1.3 Morphologie von K105.....	78
1.1.4 Kultivierungsverlauf und zellspezifische Parameter.....	79
1.1.5 Serumfreie Kultivierung.....	85

1.2 Cytochrom-P450-Aktivitäten.....	87
1.2.1 Effekte der Induktoren/Inhibitoren auf die Zellviabilität.....	87
1.2.2 CH-Aktivität.....	91
1.2.3 ECOD-Aktivität.....	92
1.2.4 EROD-Aktivität.....	94
1.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Cytochrom-P450-Aktivitätsmessungen.....	97
1.3 Kultivierung der Hepatocytelinien im 1-L-Bioreaktor.....	97
1.3.1 Kultivierung von HepT auf CultiSpher® G-Microcarriern.....	98
1.3.2 Sphäroidkultivierung von C3A.....	100
1.3.3 Kultivierung von K105 auf CultiSpher® G-Microcarriern.....	104
1.3.4 Vergleich der spezifischen Sauerstoffverbrauchsraten.....	106
1.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kultivierungen im 1-L-Bioreaktor	107
2. Hypothermische Lagerung von HepT, C3A und K105.....	108
2.1 Lagerung in T-Flaschen bei Raumtemperatur.....	108
2.2 Lagerung in T-Flaschen bei 4°C.....	112
2.3 Lagerung in Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur.....	113
2.4 Lagerung in Zentrifugenröhrchen bei 4°C.....	118
2.5 Lagerung im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.....	121
2.5.1 Effekt der Temperaturerniedrigung auf die pO ₂ -Elektrode.....	121
2.5.2 Allgemeine Vorgehensweise.....	124
2.5.3 Anoxische Lagerung bei 4°C.....	125
2.5.4 Normoxische Lagerung bei 4°C.....	127
2.5.5 Hyperoxische Lagerung bei 4°C.....	129
2.5.6 Modifiziert anoxische Lagerung bei 4°C.....	132
2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der hypothermischen Lagerung.....	134
VI. Zusammenfassung und Ausblick.....	136
1. Zusammenfassung	136
2. Ausblick.....	138
VII. Abkürzungsverzeichnis.....	I
VIII. Literaturverzeichnis.....	VI

I. Einleitung

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im menschlichen Körper. Durch sie werden eine Vielzahl essentieller Synthese- und Entgiftungsleistungen vollzogen. Die pathologischen Folgen des Ausfalls des Organs durch bestimmte Krankheiten oder Vergiftungen ziehen zwangsläufig den Tod des betroffenen Patienten nach sich, wenn nicht umgehend geeignete Behandlungsmaßnahmen getroffen werden. Die bisher einzig dauerhaft wirksame Behandlungsform bei einem Totalversagen der Leber ist der Ersatz des erkrankten durch ein gesundes Spenderorgan (Lebertransplantation). Da jedoch weltweit die Verfügbarkeit transplantierbarer Spenderorgane stagniert bzw. rückläufig ist und im Gegensatz dazu die Zahl transplantationsbedürftiger Patienten stetig steigt, müssen alternative Behandlungsformen angewendet werden, um dem Bedarf entsprechen zu können. Dieser Umstand hat insbesondere in den USA und in Deutschland zur Entwicklung sog. künstlicher Leberunterstützungssysteme geführt. Diese Systeme übernehmen gewissermaßen die Funktion des ausgefallenen Organs über die Zeit, bis ein geeignetes Transplantat zur Verfügung steht bzw. sich die so überbrückte Leber regenerieren kann. Letzteres führt zusätzlich dazu, daß die Zahl ansonsten notwendiger aber eigentlich überflüssiger Transplantationen zurückgeht. Grundsätzlich lassen sich definitionsgemäß artifizielle von bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen unterscheiden. Beide Systemtypen werden extrakorporal eingesetzt.

Die verschiedenen Formen der artifiziellen Unterstützungssysteme vollziehen eine rein physikalische Abreicherung giftiger endogener Leberstoffwechselmetabolite bzw. derjenigen exogenen Substanzen, die das Leberversagen verursachen. Allerdings ermöglicht der in diesen Systemen fehlende Ersatz der Syntheseleistungen der Leber nur sehr kurzfristige Therapieerfolge. Demgegenüber befinden sich in bioartifiziellen Systemen als biologische Komponente parenchymale Leberzellen (Hepatocyten), die neben der Entgiftungsleistung auch eine Synthese der für den Patienten essentiellen Substanzen gewährleisten.

Bisher wurden in den bioartifiziellen Systemen aufgrund der bequemen Verfügbarkeit und der guten Übereinstimmung mit dem Stoffwechsel der menschlichen Leber vorwiegend primäre porcine Hepatocyten verwendet, die unmittelbar aus der Leber des Hausschweins gewonnen werden. Der Einsatz solcher xenogenen Zellen am Menschen birgt jedoch Risiken, die die weitere Verwendung nachhaltig in Frage stellen: Porcine Hepatocyten sind Träger endogener Retroviren (engl. *porcine endogenous retrovirus*, PERV), deren Übertragung auf den Patienten während der Behandlung bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Ferner kann die Xenogenität der Zellen eine Immunantwort des Patienten hervorrufen. Diese Komplikationen könnten vermieden werden, wenn anstelle der porcinen Zellen humane Hepatocyten verwendet würden. Der Einsatz primärer humaner Hepatocyten ist jedoch von vornherein ausgeschlossen. Da eine ausreichende *in vitro* Vermehrung dieser Zellen bisher nicht gelungen ist, würden zu deren Gewinnung gesunde Spenderlebern benötigt. Damit stünde man jedoch wieder am Anfang des Gesamtproblems.

Die ideale Resource für die zelluläre Leberunterstützungstherapie wäre daher eine humane Hepatocytelinie mit hoher Teilungsfähigkeit bis hin zu hohen Zellkonzentrationen und einem normalen, d.h. nicht-malignen Phänotyp. Sie muß in Kultur über lange Zeit ausdifferenziert bleiben und dementsprechend die gleichen synthetisierenden und detoxifizierenden Eigenschaften aufweisen wie Hepatocyten *in vivo*.

Ziel der Arbeit

In einem Verbundprojektes des Lehrstuhls für Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld in Zusammenarbeit mit den Firmen Develogen (Göttingen) und Hybrid Organ (Berlin) wurde das Ziel formuliert, eine immortalisierte humane Hepatocytelinie zu entwickeln, die jene zuvor genannten Eigenschaften besitzt, diese Hepatocyten in geeigneten Kultivierungssystemen (Bioreaktoren) zu einer Zellmenge zu vermehren, wie sie für den Einsatz in einem bioartifiziellen Leberunterstützungssystem notwendig ist und schließlich das Gesamtsystem in klinischen Studien im Tiermodell bzw. nachfolgend an Patienten einzusetzen. Ein wichtiger Teilaspekt dieses Projekts war die Entwicklung von Strategien, die es ermöglichen, daß die Zellen im Leberunterstützungssystem dem Patienten "just in time" zur Verfügung stehen. Von mehreren Möglichkeiten erschien die folgende am vielversprechendsten: Nach einer Vermehrung (Expansion) der Zellen im Bioreaktor wird die metabolische Aktivität der Hepatocyten gezielt reduziert, wodurch sie über einen längeren Zeitraum gelagert werden können. Dies kann durch Temperatureniedrigung bis hin zum Einfrieren der Zellen erfolgen. Die Gefrier- bzw. Kryolagerung unter Tieftemperaturbedingungen (-196°C) ist eine in der Zellkulturtechnik bereits etablierte Methode für die Langzeitlagerung von Zellen, die jedoch der Verwendung z.T. giftiger kryoprotektiver Substanzen (z.B. Dimethylsulfoxid, DMSO) bedarf. Ferner sterben trotz der Kryoprotektiva ein nicht unerheblicher Teil der Zellen während des Einfrier- bzw. Auftauvorgangs ab. Eine sinnvolle Alternative ist daher die Lagerung bei niedrigen Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts, mit Hilfe derer die metabolische Aktivität der Zellen auf ein Minimum reduziert wird und der Einsatz kryoprotektiver Substanzen vermieden werden kann. Zusätzlich ist durch diese Form der Konservierung eine Überprüfung des Zustands der Zellen zu jedem Zeitpunkt der Lagerung möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die Lagerungsfähigkeit von Hepatocytelinien z.T. unterschiedlicher Spezies unter Niedrigtemperaturbedingungen im Bioreaktor untersucht. Besonderes Augenmerk galt dabei dem Einfluß des Sauerstoffs während der Abkühlungs- und der nachfolgenden Lagerungsphase.

II. Medizinischer Hintergrund

1. Anatomie, Morphologie und Physiologie der Leber

Mit einem Gewicht von durchschnittlich 1,8 kg beim erwachsenen Mann und 1,4 kg bei der erwachsenen Frau (BOYD 1933) ist die Leber nach der Haut das schwerste Organ und die größte (exokrine) Drüse im menschlichen Körper (FALLER 1995, S. 293). Sie liegt im rechten Oberbauch unmittelbar unter dem Zwerchfell und wird durch die unteren Rippen geschützt. Die konvexe Oberfläche (*Facies diaphragmatica*) ist mit dem Zwerchfell verwachsen. Die Unterfläche (*Facies visceralis*) liegt den Eingeweiden auf. Die embryonale Organogenese erfolgt - wie bei allen anderen Gastrointestinalorganen der Vertebraten - aus dem Entoderm (WEHNER, GEHRING 1990, S. 207). Im klassisch anatomischen Aufbau wird die Leber in zwei Hauptlappen (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*) sowie zwei weiteren den beiden ersten nebenliegenden und nur rückseitig sichtbaren Lappen (*Lobus caudatus* und *Lobus quadratus*) unterteilt (PSCHYREMBL 1998, S. 899).

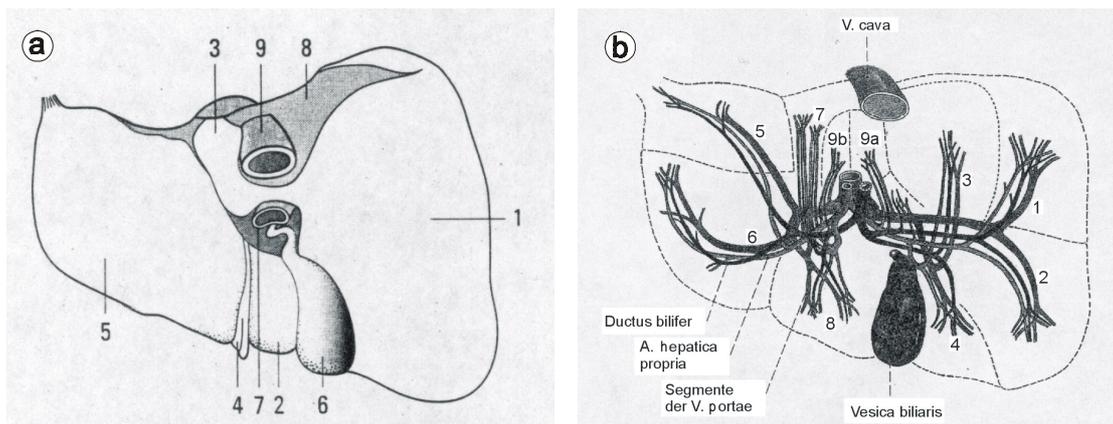


Abb. 2.1: Makroskopische Anatomie der Leber (Schema). **a:** Klassischer Aufbau. 1 = *Lobus dexter*, 2 = *Lobus quadratus*, 3 = *Lobus caudatus*, 4 = *Ligamentum teres hepatis*, 5 = *Lobus sinister*, 6 = *Vesica biliaris*, 7 = *Leberhilus mit V. portae*, A. *hepatica propria* und *Ductus choledocus*, 8 = *Area nuda*, 9 = *Vena cava*. **b:** Lebersegmente und Subsegmente. 1 = *Subsegmentum posterius superius*, 2 = *Subsegmentum posterius inferius*, 3 = *Subsegmentum anterius superius*, 4 = *Subsegmentum anterius inferius*, 5 = *Subsegmentum laterale inferius*, 6 = *Subsegmentum laterale superius*, 7 = *Subsegmentum mediale superius*, 8 = *Subsegmentum mediale inferius*. Der *Lobus caudatus* wird jeweils von dem rechten Ast der portalen Gefäße (9a) bzw. von ihrem linken Ast (9b) versorgt (nach PSCHYREMBL 1998 und DRENCKHAHN et al. 1994).

Die modernere funktional vaskuläre Anatomie nach Couinaud hingegen unterteilt die Leber in insgesamt acht Segmente. Diese Segmentierung entspricht nicht der äußeren Lappengliederung und ist charakterisiert durch die voneinander unabhängige afferente und efferente Blutversorgung der Segmente sowie Gallenkanäle ohne kollaterale Zirkulation zwischen den Segmenten (GUPTA 1981, DAWSON, TAN 1992). Die weitere Gefäßaufteilung führt zur Einteilung in Subsegmente (TÖNDURY 1981).

1.1 Das Blutgefäßsystem

Aus den venösen Zuflüssen der unpaaren Bauchorgane (Magen, Darm, Pankreas und Milz) gelangt 70-80% des afferenten Blutes über die Pfortader (*Vena portae*) zur Leber, die sich innerhalb des Organs in die *Venae interlobulares* aufspaltet. Hierüber werden der Leber alle durch den Gastrointestinaltrakt resorbierten Nähr- und Fremdstoffe zugeführt. Die restlichen 20-30% dienen der Sauerstoffversorgung des Organs und stammen aus der Leberarterie (*Arteria hepatica*) deren Verästelungen innerhalb der Leber als *Arteriae interlobulares* bezeichnet werden (FLEMING 1999). Das efferente Gefäßsystem setzt sich aus den zentralen Gefäßen (*Venae centralis*) der Leberläppchen (siehe II.1.2) zusammen, welche in die *Venae sublobulares*, von dort in die große Lebervene (*Vena hepatica*) und schließlich in die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) münden.

1.2 Feinanatomie

Die klassische strukturelle Untereinheit der Leber ist das polygonale Zentralvenenläppchen (Leberläppchen, *Lobulus hepaticus*). Das gesamte Organ besteht aus etwa 1-1,5 Mio. dieser Leberläppchen, von denen jedes neben weiteren Zelltypen (siehe II.1.4) aus je etwa 300.000 parenchymalen Zellen (Hepatocyten) aufgebaut ist.

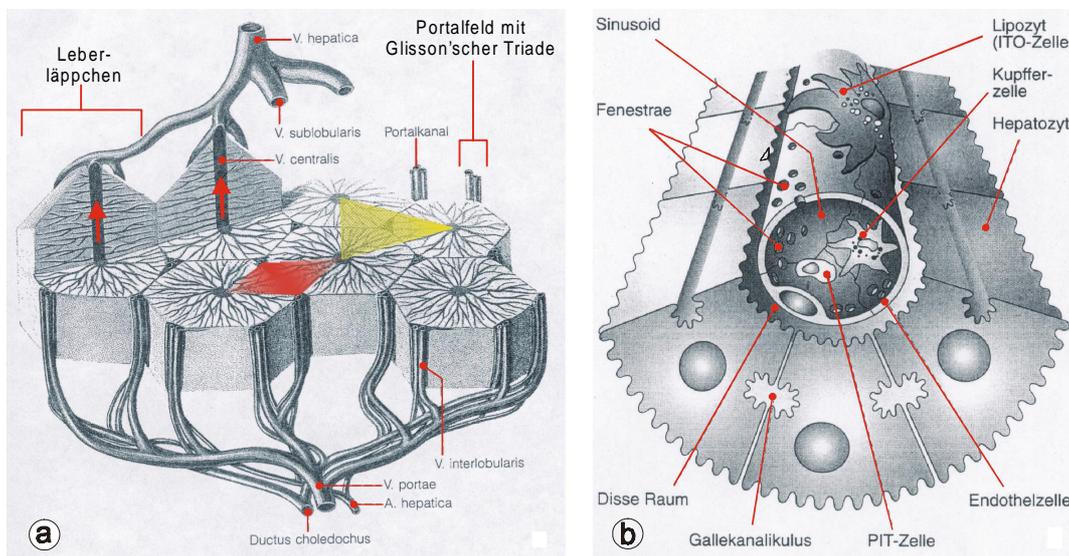


Abb. 2.2: Der innere Bau der Leber (Schema). **a:** Räumliche Anordnung der Leberläppchen mit den afferenten und efferenten Leitungsbahnen. Die farbigen Flächen geben die funktionelle Gliederung der Leber in Portalläppchen (gelbes Dreieck) und Azinus (rotes Viereck) wieder (vgl. II.1.3 und Abb. 2.3). Rote Pfeile = Strömungsrichtung des Blutes durch die Zentralvenen. **b:** Sinusoid mit benachbarten parenchymatischen Leberzellen (Hepatocyten) sowie den nicht-parenchymatischen Zelltypen (siehe II.1.4) (nach GEROK 1995).

Jedes Leberläppchen ist ca. 2 mm hoch, der Durchmesser beträgt 1-1,3 mm. An den "Ecken" des Polygons befinden sich die Portalfelder (auch als periportale Felder bezeichnet) mit je einer Glisson'schen Triade (*Trias hepatica*). Diese Gefäßstruktur besteht aus je einem Ast

der Pfortader, einem Ast der Leberarterie und einem Gallengang (*Ductus biliferus*). Im Zentrum des Polygons verläuft die terminale Zentralvene. Aus den blutführenden Gefäßen der Glisson'schen Triade strömt das arteriovenös vereinigte Blut über die radiären Sinusoide (*Vasa sinusoidea*) auf die Zentralvene (*Vena centralis*) zu (siehe Abb. 2.2a). Zwischen den Sinusoiden (siehe Abb. 2.2.b) liegt jeweils eine Schicht von Hepatocyten (Leberzellbalken), von denen benachbarte Zellen zwischen sich durch Einstülpung der Zellmembran Gallenkanälchen (*Canaliculi biliferi* oder *Canaliculi biliares*) bilden. Während das Blut durch die Sinusoide von den Portalfeldern zu den Zentralvenen strömt, fließt die Galle in entgegengesetzter Richtung durch die parallel zum Sinusoid verlaufenden Gallenkanälchen zu den Portalfeldern. Aus den Gallengängen wird die Galle in die beiden *Ductus hepatici dexter et sinister* abgeleitet, die sich zum *Ductus hepaticus communis* vereinigen. Von dort aus gelangt sie über den *Ductus choledocus* in den Zwölffingerdarm (*Duodenum*) bzw. über den *Ductus cysticus* zur Gallenblase (*Vesica biliaris*).

1.3 Funktionelle Gliederung

Die strukturelle Gliederung des Organs in Zentralvenenläppchen entspricht keiner funktionellen Untereinheit, da jede Zentralvene Blut aus mehreren Portalvenen und Arterien erhält und umgekehrt die in einem Läppchen produzierte Galle zu mehreren Portalfeldern fließt. Ferner besitzen die Hepatocyten aus verschiedenen Arealen des Leberläppchens ein unterschiedliches Enzymbesteck und können daher unter pathologischen Bedingungen unterschiedlich reagieren. Deshalb ist man bezüglich des funktionellen Charakters zur Gliederung in sog. Portalläppchen übergegangen, die mit der sonst in der Drüsenanatomie verwendeten Läppchenbegriff übereinstimmt (LEONHARDT et al. 1987, S. 379). In Anlehnung an diese Gliederung wurde durch die Arbeiten von Rappaport et al. das Konzept des Leberazinus entwickelt (RAPPAPORT et al. 1954).

1.3.1 Das Portalläppchen

Das Portalläppchen (auch Portalvenenläppchen genannt) ist eine trianguläre Struktur in dessen Zentrum ein Portalfeld mit Glisson'scher Triade liegt und deren Eckpunkte die terminalen Zentralvenen dreier benachbarter Leberläppchen bilden (siehe Abb. 2.3). In dieser Struktur werden also diejenigen Sinus und Leberzellbalken zusammengefaßt, die durch die blutführenden Gefäße (Äste der Leberarterie und der Pfortader) eines Portalfeldes versorgt bzw. durch den parallel dazu verlaufenden Gallengang entsorgt werden. Diese interlobulär verlaufende Gefäßstruktur wird auch als Anzinusachse oder Azinuszweig bezeichnet. In der funktionellen Einheit des Portalläppchens strömt das Blut von zentral zu den nun peripher liegenden terminalen Venen. Die Galle fließt dementsprechend von der Peripherie zum Zentrum.

1.3.2 Der Leberazinus

Ausgehend von der Portalläppchen-Struktur lassen sich mit zunehmender Entfernung von den interlobulär verlaufenden terminal afferenten Blutgefäßen (Azinusachse) drei Zonen voneinander abgrenzen, die sich insbesondere hinsichtlich der Konzentration der Metaboliten, die die darin befindlichen Hepatocyten umgeben, voneinander unterscheiden (siehe Abb. 2.3):

- Die periportale Zone 1 um die Azinusachse mit hohem Angebot an Sauerstoff und Substraten,
- die anschließende Zone 2 mit reduziertem Angebot,
- die Zone 3 um die terminale Vene, die von Blut durchströmt wird, das den Gas- und Metabolitenaustausch mit den vorausgehenden Zonen bereits weitgehend vollzogen hat.

Innerhalb des Azinus haben die Hepatocyten in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation unterschiedliche Funktionen. Diese metabolische Heterogenität der Hepatocyten ist für die Stoffwechselregulation des Gesamtorgans von großer Bedeutung. So findet bspw. die Biotransformation durch die Enzyme des Cytochrom-P450-Systems (siehe II.1.5.1) überwiegend in den perivenösen Hepatocyten der azinischen Zone 3 am Endteil der Sinusoide statt, während demgegenüber die Harnstoffsynthese in erster Linie in den periportalen Zellen der sauerstoffreicheren Zone 1 bis 2 vollzogen wird (JUNGERMANN, SASSE 1978, GEBHARDT 1992).

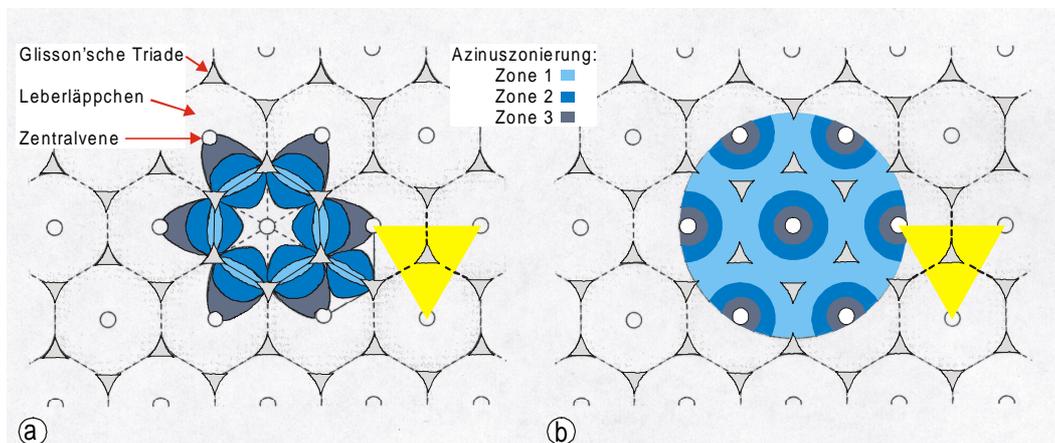


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Azinuszonierung. Die idealisierten Schnitte verlaufen in der Ebene der Azinusachsen und senkrecht zur Glisson'schen Triade. **a:** Rappaport'sches Modell. Die Azinuszonen umgeben die Azinusachse wie die Schalen einer Zwiebel. **b:** Modell nach Lamers et al.. Die Azinuszonen sind zirkulär um die Zentralvenen angeordnet. Gelbe Dreiecke = Bereiche jeweils eines Portalläppchens mit den Zentralvenen als Eckpunkten und der Glisson'schen Triade als Zentrum (nach GEROK 1995).

Im Rappaport'schen Azinusmodell (RAPPAPORT et al. 1954) umgeben die drei Zonen die Azinusachse wie die Schalen einer Zwiebel (siehe Abb. 2.3.a). Neuere Befunde weisen jedoch darauf hin, daß diese Zonen zirkulär um die terminalen Venen angeordnet sind (perizentraler Bereich), wobei sich die Zonen 1 mehrerer Portalläppchen in der Umgebung des Portalfeldes als periportaler Bereich überschneiden (LAMERS et al. 1989, siehe 2.3.b).

1.4 Zelluläre Bestandteile der Leber

Grundsätzlich lassen sich fünf Zelltypen in der Leber voneinander unterscheiden, von denen die *Hepatocyten* mit 60-65% an der Gesamtzellzahl der Leber und 77,8% am Lebervolumen den prominentesten Anteil bilden (siehe Tab. 2.1). Alle Zelltypen sind im Bereich der Sinusoide anzutreffen (siehe Abb. 2.1.b). Außer den Hepatocyten werden alle übrigen Typen als nichtparenchymale Zellen zusammengefaßt.

Tab. 2.1: Anteile der Zelltypen und der extrazellulären Kompartimente am Lebervolumen (nach GEROK 1995).

	Anteil an der Gesamtzellzahl (%)	Anteil am Lebervolumen (%)	
Zellen	100		84,1
Hepatocyten	60-65	77,8	
Sinusendothelzellen	15-20	2,8	
Kupffer'sche Zellen	8-12	2,1	
Ito-Zellen	3-8	1,4	
PIT-Zellen	<2		
extrazellulärer Raum			15,9
Sinusoide		10,6	
Disse-Raum		4,6	
Gallenkanalikuli		0,4	

Die Wand der 9-12 µm weiten Sinusoide wird von *Sinusendothelzellen* gebildet, deren Ausläufer fenestriert (DE LEEUW et al. 1990) und auf denen die *Kupffer'schen Sternzellen* (auch Kupffer'sche Zellen genannt, sessile Makrophagen) verankert sind. Wie die *Kupffer'schen Zellen* sind - wenngleich in geringerem Maße - auch die *Sinusendothelzellen* zur Phagozytose befähigt. Ferner finden durch sie rezeptorvermittelte Endocytosen unterschiedlicher im Blut befindlicher Substanzen (z.B. lysosomale Enzyme, Plasminogenaktivator) und die Bildung von Komponenten der extrazellulären Matrix statt (GEROK 1995, ARII, IMAMURA 2000). Neben den pino- und phagocytotischen Aufgaben von Makrophagen sind die *Kupffer'schen Zellen* u.a. für die Abgabe von Signalstoffen (z.B. Cytokine), der Abreicherung toxischer Substanzen, sowie auch für die Bildung von Matrixkomponenten und Enzymen zu deren Abbau verantwortlich (WAKE et al. 1989). Zwischen den *Hepatocyten* und dem Sinusendothel befindet sich der sogenannte Disse-Raum. Auf der dem Disse-Raum zugewandten Seite des Sinusoids befinden sich Fettspeicherzellen (Lipocyten bzw. *Ito-Zellen*), die neben ihrer Speicherfunktion für Vitamin A (WAKE 1980) aufgrund ihrer Anordnung auf den Sinusoiden vermutlich bei der Regulation der Weite des Sinusendothels von Bedeutung sind (KAWADA et al. 1992). Zudem spielen sie durch ihre Fähigkeit, Komponenten der extrazellulären Matrix (Faserproteine, Glykoproteine, Proteoglykane und Integrine) zu bilden und umzusetzen, bei der pathologischen Fibrosierung eine Rolle (BURT 1999). Ein weiterer Zelltyp mit Funktionen natürlicher Killerzellen befindet sich im Lumen des Sinusoids und vereinzelt auch im Disse-Raum: Diese granularen *PIT-Zellen* stammen vermutlich aus lymphatisch myelogenen

Vorläuferzellen und liegen in lockerer Verbindung auf dem Sinusendothel. In Kooperation mit den Kupffer'schen Zellen beseitigen sie Tumorzellen (WISSE et al. 1997).

In den *Hepatocyten* sind der weit überwiegende Teil der metabolischen Funktionen, die Biotransformation (siehe dazu II.1.5.1) und Exkretionsfunktionen der Leber lokalisiert. In ihnen werden Hormone und Signalstoffe abgebaut, vollzieht sich die Säure-Base-Regulation sowie die Synthese von Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteinen der Immunabwehr (siehe II.1.5). Es handelt sich um "(bi-)polare" Zellen, deren einer (basolaterale) Pol neben der Kontaktfläche zwischen benachbarten Hepatocyten die mikrovilli-bewehrte sinusoidale Membran darstellt, während der andere (apikale) Pol der Kanalikulus bildet, der von spezifischen Arealen der Leberzellmembran benachbarter Hepatocyten gebildet wird (DRENCKHAHN et al. 1994). Sinusoide Membran und kanalikulus-bildende Membran unterscheiden sich grundlegend durch ihren Bestand an Transport-, Rezeptor- und Kanalproteinen.

1.5 Funktionen und Aufgaben der Leber

Durch ihre besondere topographische Stellung zwischen den Organen der Resorption und den peripheren Organen ist die Leber für die primäre Verwertung der Nahrungsmittel verantwortlich. Die nach Verdauung durch das Darmepithel absorbierten niedermolekularen Bausteine der Nahrung werden über die Pfortader zur Leber transportiert, wo sie abgebaut, zur Synthese körpereigener Substanzen verwendet, ineinander umgewandelt oder gespeichert werden (VOET, VOET 1994, S. 739). Im Zuckerstoffwechsel des Körpers nimmt die Leber die Rolle eines sog. Glucostatens ein (JUNGERMANN 1986), in dem Glycolyse, Gluconeogenese sowie Glycogenauf- und abbau auf komplexe Weise unter besonderer Beteiligung von Insulin, Glucagon und Adrenalin hormonell gesteuert werden. Ferner übernimmt die Leber anabolische und katabolische Wege des Protein-, Lipid-, Aminosäure- und Stickstoffmetabolismus' sowie den Stoffwechsel der Vitamine und Spurenelemente. Da insbesondere die Vielzahl anabolischer Reaktionsschritte einen enormen ATP-Verbrauch darstellt, benötigt die Leber allein 20% des im Blut enthaltenen Sauerstoffs zur oxidativen mitochondrialen Energiegewinnung (GEBHARDT 1996).

Eine weitere Aufgabe der Leber besteht in der Bildung und Inaktivierung von (hormonalen) Signalstoffen. So werden hier Vorstufen der Hormone, die sog. Prohormone spezifischer endokriner Drüsen, in ihren aktiven Zustand umgewandelt (z.B. Iodierung des Schilddrüsenhormons Thyroxin zu Trijodthyronin, VISSER 1994). Unter Vorwegnahme ihrer exokrinen Funktion (s.u.) findet in der Leber zur Aufrechterhaltung der hormonalen Homöostase auch der Abbau der meisten Hormone (z.B. Steroidhormone der Nebenniere, Sexualhormone, Insulin, Glucagon und Somatotropin) statt (GEROK 1995).

Für die unspezifische Immunabwehr ist die Leber von großer Bedeutung, da 80-90% der sessilen phagocytotischen Makrophagen auf die in der Leber lokalisierten Kupffer'schen Zellen entfallen (siehe II.1.3). Zudem werden Akute-Phase-Proteine (proteaseinhibitorisch

wirksame Proteine) durch parakrine Stimulation der Hepatocyten (Sezernierung von Interleukin 6 aus den Kupffer'schen Zellen) freigesetzt (MACKIEWICZ 1997) und die Bestandteile des Komplementsystems überwiegend in der Leber synthetisiert (SEKI et al. 2000). Die Leber ist neben der Milz auch das Organ der Blutspeicherung, die über Sphinkteren an den zuführenden und abführenden sinusoidalen Gefäßabschnitten gesteuert wird (BARGMANN 1967, S. 480).

Ihrer Funktion als wichtigste exokrine Drüse neben der Niere wird die Leber durch den Metabolismus und die Ausscheidung von Endo- und Xenobiotika gerecht. Das Organ übernimmt die Aufgabe einer Detoxifizierung des Körpers, wobei es im Zuge dieses Metabolismus' auch zu einer Toxifizierung kommen kann. Die Detoxifizierung schließt die Aufnahme toxischer endogener Stoffe (z.B. das aus dem Hämoglobinabbau resultierende Bilirubin) und exogener Substanzen aus dem Plasma, die chemische Umwandlung (Biotransformation, siehe II.1.5.1) und die biliäre Ausscheidung ein. Zu den exogenen Substanzen gehören viele lipophile Substanzen, die mit der Nahrung, in Form von Genuß- und Arzneimitteln oder als Umweltschadstoffe nach Resorption durch die Schleimhautepithelien über das Blut zur Leber gelangen. Dort werden sie durch die Hepatocyten, in einigen Fällen auch durch Sinusendothel- und Kupffer' sche Zellen, umgewandelt und die Endprodukte in die Galle abgegeben oder über die Nieren ausgeschieden.

1.5.1 Biotransformation und Cytochrom-P450-System

Die Biotransformation umfaßt in der Regel zwei Phasen (Phase I+II). In den Reaktionen der Phase I werden die betreffenden Verbindungen durch Einfügen funktioneller Gruppen aktiviert. Chemisch betrachtet erfolgen diese Aktivierungen vor allem durch oxidierende, reduzierende und hydrolytische Reaktionen (GLUE, CLEMENT 1997). Enzymatisch daran beteiligt sind cytosolische Enzyme (z.B. Alkoholdehydrogenasen) und mikrosomale Flavinhaltige Monooxygenasen (FMO, WRIGHTON et al. 1993). Quantitativ spielen die FMO-Enzyme im Biotransformationsmetabolismus eher eine untergeordnete Rolle. Nichtsdestotrotz sind sie extrahepatisch z.B. im Metabolismus von Cysteinderivaten von Bedeutung (ZIEGLER 1988).

Die Häm-haltigen Cytochrom-P450-Enzyme, welche sowohl im rauhen endoplasmatischen Reticulum (ER) als auch in den Mitochondrien vorliegen (LINDROS 1997), stellen die bei weitem wichtigste Gruppe von Phase-I-Enzymen dar. Funktional gehören sie ebenfalls zu den Monooxygenasen (VOET, VOET 1994, S. 633) und haben auch extrahepatische Funktionen. So sind sie neben der Biotransformation auch an der Synthese von Steroiden, Cholesterin und Gallensäuren in den jeweils dafür spezifischen Geweben beteiligt (GONZALES 1995). Die Cytochrom-P450-Enzyme bilden eine weitverzweigte Protein- und Genfamilie (PAINE 1991). Im Regelfall codiert ein P450-Gen genau ein zugehöriges Enzym (NELSON et al. 1993) und unter physiologischer Substratkonzentration ist es auch offenbar so, daß ein jedes Enzym ein bevorzugtes Substrat hat (WRIGHTON, STEVENS 1992). Doch

unter pathologischen Bedingungen kann ein einziges Cytochrom-P450-Enzym unterschiedliche Substrate umsetzen und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit dieser Enzyme ergeben sich häufig Überschneidungen in der Substratspezifität (GUENGERICH 1989). Dies erschwert die Zuordnung der jeweiligen Enzymaktivität z.B. unter *in-vitro* Bedingungen. Die Verbreitung der einzelnen Cytochrom-P450-Enzyme ist nicht in allen Individuen gleich, sondern kann altersabhängig und geschlechtsspezifisch sehr unterschiedlich sein. Dieser *Polymorphismus* hat seine Ursachen in der unterschiedlichen Expressionsweise bzw. in Mutationen oder dem Verlust der zugehörigen Gene (CHOLERTON et al. 1992). Polymorphien treten z.T. auch bei der Expression cytosolischer Biotransformationsenzyme auf, auf die z.B. die individuell unterschiedliche Alkoholverträglichkeit zurückzuführen ist (KENNEDY, TIPTON 1990). Zudem gibt es eine ausgeprägte Heterogenität der Expression in Abhängigkeit der Lokalisation der Hepatocyten im Leberazinus (siehe II.1.3.2). Aufgrund der enormen Bandbreite hepatischer Cytochrom-P450-Enzyme wird nur ein Teil konstitutiv exprimiert, während die Expression anderer durch ihre jeweiligen Substrate und/oder davon verschiedenen Induktoren induziert werden kann. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Induktion sind in ihrer Vielfalt oft noch unbekannt, doch zumindest ist in einigen Fällen das Grundmuster in den wichtigsten Details aufgeklärt (BOCK et al. 1990).

In den Reaktionen der Phase II der Biotransformation werden die zuvor aktivierten Verbindungen mit Glucuronat-, Sulfat- oder Acetylresten konjugiert, wodurch sich die Hydrophilie der Substanzen erhöht und sie dann leichter aus dem Organismus entfernt werden können. Die daran enzymatisch beteiligten Transferasen (z.B. UDP-Glucuronosyltransferase, Glutathion-S-Transferase) sind ebenfalls nicht leberspezifisch, sondern kommen auch in anderen Organen vor (KRISHNA, KLOTZ 1994).

2. Lebererkrankungen und Leberversagen

Ein Organ mit einer solch enormen Fülle unterschiedlicher und überlebenswichtiger Aufgaben wie die Leber bietet dementsprechend eine große Angriffsfläche für Störungen verschiedenster Art dieser Funktionen mit häufig fatalen Konsequenzen für den Betroffenen. Insofern ist wichtig, daß die Leber als "pathobiologischer Puffer" mit äußerst hohem Regenerationspotential fungiert: Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, daß Versuchstiere eine Teilresektion von 68% der Ausgangsmasse des Organs schadlos überstehen. 90-95% der Hepatocyten replizieren sich bereits in den ersten 40 Stunden nach der Operation, wobei mit zunehmendem Alter der Tiere der Anteil nichtreplizierender Zellen von 5% auf ca. 25% steigt (KAY, FAUSTO 1997). Dabei ist der Befund interessant, daß offenbar nicht etwa adulte Stammzellen, sondern die ausdifferenzierten Hepatocyten selbst für diesen Regenerationsprozess verantwortlich sind (FAUSTO, WEBBER 1994). Patienten, bei denen massive tumorbedingte Teilresektionen durchgeführt wurden,

überlebten mit einer Restmasse von nur 10-30% des gesunden Organs und einer Regenerationszeit der Leber von 3-6 Monaten (NAGASUE et al. 1987).

Dennoch können eine Reihe von Faktoren zu einer Schädigung des Organs führen, bei der die Leber nicht mehr autonom zu einer Regeneration in der Lage ist und es dadurch zu einem Organversagen kommt. Der Begriff "akutes Leberversagen" bzw. "fulminant hepatic failure" wurde erstmals 1968 als Beschreibung einer unmittelbar einsetzenden Leberzellnekrose verwendet (TREY et al. 1968). Generell versteht man unter dieser Bezeichnung den Ausfall der Leberfunktionen bei Patienten, die vorher keine chronische Leberkrankheit hatten. Diese Definition trennt das akute Leberversagen von Endstadien chronischer Leberkrankheiten, bei denen es ebenfalls zum Leberausfall kommen kann (BÖKER 2001). Ein solch rasch progredienter terminaler Leberausfall bei chronischer Insuffizienz wird als "akut auf chronisches" Leberversagen bezeichnet. Zur primären Symptomatik gehören plötzliche Mattigkeit, Unwohlsein bis Übelkeit, Appetitlosigkeit und schließlich dunkler Harn und Ikterus (Gelbsucht) infolge des durch die Degeneration des Organs gestörten Bilirubinstoffwechsels. Die Entwicklung von Encephalopathien, d.h. die zunehmende Zerstörung von Hirngewebe, ist bei nicht-therapierten Leberversagen obligatorisch (SHAKIL et al. 1999). Begleitet werden die progressiven Stadien der Encephalopathie zumeist durch cerebrale Ödeme (GAZZARD et al. 1975) und weiteren Komplikationen (cardiorespiratorische Dysfunktionen, renale Störungen, Koagulopathien, Sekundärinfektionen, etc.), die in 80% der Fälle zum Tod durch Multiorganversagen führen. Unterschiede in der Zeitspanne zwischen dem Auftreten der Primärsymptome (insbesondere Ikterus) und dem Übergang zur Encephalopathie haben zur weiteren Untergliederung des akuten Lebersagens zunächst in "akut" (< 2 Wochen) und "subakut" (2-12 Wochen) (BERNUAU et al. 1986), später in "hyperakut" (0-7 Tage), "akut" (8-28 Tage) und "subakut" (29 Tage bis 12 Wochen) (O'GRADY et al. 1993) geführt. Ursachen für das Leberversagen sind virale Hepatiden, Intoxikationen durch bzw. Idiosynkrasien (angeborene Überempfindlichkeiten) gegenüber xenogenen Substanzen sowie Komplikationen infolge weiterer Lebererkrankungen. Die wichtigsten ätiologischen Faktoren sind im Folgenden dargestellt (siehe auch Tab. 2.2)

Tab. 2.2: Ursachen und Häufigkeiten des akuten Leberversagens (nach MATERN 1999).

Ursache	Häufigkeit
<i>entzündlich</i> - virale Hepatitis (A, B+D, C, E) - kryptogene Hepatiden	40-70%
<i>toxisch</i> - Paracetamol - Amantidin (Pilzvergiftung) - Halothan	30-50%
<i>vaskulär</i> - Ischämie - Budd-Chiari-Syndrom	5%
<i>weitere</i> - Schwangerschaftsfettleber, HELLP, Reye-Syndrom, Morbus Wilson	selten

2.1 Hepatitis A

Die Hepatitis A ist eine akut und meistens harmlos verlaufende, durch einen Picornavirus (Familie der kleinsten RNA-Viren) hervorgerufene Infektionserkrankung, die unter mangelnden hygienischen Bedingungen, zumeist durch fäkale Kontaminationen, auftritt (CUTHBERT 2001). Sie ist vor allem im Mittelmeerraum, in Südamerika und im Orient häufig anzutreffen, insgesamt kommt sie aber weltweit vor. Insbesondere in Entwicklungsländern ist die Durchseuchung sehr hoch. In Ländern mit einem hohen Lebensstandard verursacht die HAV-Infektion etwa 20-25% der klinisch manifesten Hepatiden (MATERN 1999). Der harmlose akute Verlauf führt weltweit nur in 0,1 bis 0,4% der Fälle zum akuten Leberversagen (O'GRADY 1992), während in nordeuropäischen Ländern bis zu 20% der Fälle akuten Leberversagens auf Infektionen mit dem Hepatitis A-Virus zurückzuführen sind (BÖKER, MANNS 1998). Bei Kindern in Indien soll sogar in 50% der Fälle HAV für das akute Leberversagen verantwortlich sein (BENDRE et al. 1999). Die genaue Pathogenese des akuten Leberversagens nach HAV-Infektion ist noch nicht bekannt, wenngleich das Virus selbst als cytopathogen angesehen werden kann. Offenbar wird die akute Zerstörung der Leber insbesondere durch einen durch cytotoxische T-Zellen vermittelten Immunprozeß infolge der Infektion verursacht (VALLBRACHT et al. 1986).

2.2 Hepatitis B

Die Hepatitis B ist die zweithäufigste Form der Virushepatitis und quasi ubiquitär anzutreffen. Der Durchseuchungsgrad der Allgemeinbevölkerung in Mitteleuropa liegt bei etwa 0,3-0,8%. In Teilen Afrikas, Chinas, Südostasiens und der Amazonasregion liegt die Endemierate hingegen bei bis zu 20% (MATERN 1999). Das HB-Virus gehört zur Gruppe der hepatotropen DNA-Viren (Hepadnaviren). Die Infektion erfolgt über Blut und Blutprodukte, durch ungeschützten Geschlechtsverkehr sowie von der Mutter auf das ungeborene Kind. Im Anfangsstadium ist der Verlauf meist mild, ähnlich der Hepatitis A. Die Gefahr besteht im Übergang in eine chronische Hepatitis, der in ca. 10% der Fälle erfolgt und nach langjährigem Verlauf zu einer Leberzirrhose oder zu Leberkrebs führen kann (HILLEMANN 2001). Das Risiko eines akuten Leberversagens liegt bei etwa 1% (HOOFNAGLE et al. 1995). Die meisten Fälle treten im Sinne eines akut auf chronischen Leberversagens bei sog. Delta-Superinfektion mit Hepatitis D im Verlaufe einer chronischen Hepatitis B auf. Hepatitis D Viren infizieren Hepatocyten ausschließlich nur in Verbindung mit HB-Viren, da sie zur Infektion deren Hüllprotein benötigen (POSS 1989). Nur etwa 25% der durch HBV verursachten Fälle akuten Leberversagens sind auf eine HBV/HDV-Coinfektion zurückzuführen (MENDEZ et al. 1991). Akut auf chronische Leberversagen wurden auch während spontaner Exazerbationen (d.h. Wiederauftreten) einer Hepatitis B infolge des Absetzens einer Immunsuppressionstherapie beobachtet (MEYER, DUFFY 1993). Da das Virus selbst nicht cytopathogen ist, geht die Leberschädigung im Wesentlichen auf eine

"überschießende" Immunantwort infolge der Infektion mit dem Virus zurück (BERNUAU et al. 1986).

2.3 Hepatitis C

Die Übertragung der Hepatitis C erfolgt in erster Linie über Blut und Blutprodukte. Sie ist die häufigste Form der Posttransfusionshepatitis, also einer Hepatitis als Folge einer Bluttransfusion. Etwa 95% der Non-A/Non-B-Virushepatiden gehen auf eine Infektion mit dem HC-Virus (RNA-Virus der Fam. *Flaviridae*) zurück. Nach einer Inkubationszeit von 4-12 Wochen kommt es in etwa 30% der Infektionen zu einer akuten Hepatitis. Die übrigen 70% resultieren in einem chronischen Verlauf und können langfristig zu Leberzirrhose oder Leberkrebs führen. Weltweit sind gegenwärtig schätzungsweise 170 Mio. Menschen infiziert und die häufigste Indikation für eine orthotope Lebertransplantation ist eine HCV-Infektion (STRADER, SEEFF 2001). Das Risiko eines akuten Leberversagens ist verschwindend gering: Bisher wurde lediglich von Einzelfällen berichtet (THEILMAN et al. 1992).

2.4 Hepatitis E

Diese Form der Hepatitis ist in Ländern mit hohem Hygienestandards äußerst selten. Die Seroprävalenz in Mitteleuropa beträgt weniger als 0,5% (MATERN 1999). Ähnlich wie bei HAV erfolgt die Infektion über fäkale Kontaminationen und dabei besonders über das Trinkwasser (AGGARWAL 2000). Hervorgerufen wird die Krankheit durch ein hüllenloses RNA-Virus der Gattung *Calicivirus*. Aufgrund der begrenzten Verbreitungstopographie der Krankheit stehen Daten über HEV als Ursache für akutes Leberversagen nur aus den Ländern der sog. Dritten Welt zur Verfügung. Hier liegt das Risiko für infizierte Männer bei etwa 3%, bei schwangeren infizierten Frauen (besonders im dritten Trimester der Schwangerschaft) sogar bei 10-20% (BÖKER 2001).

2.5 Kryptogene Hepatiden

In diese Kategorie fallen (chronische) Leberentzündungen, die in Symptomatik den anderen Hepatitisformen ähneln, sich jedoch nicht mit einer der bekannten Hepatitis-Virus-Infektionen erklären lassen. Hierzu zählt bspw. die chronisch aktive Autoimmunhepatitis (CAAH) (CZAJA et al. 1993, KAYMAKOGLU et al. 1998). In einzelnen Studien sind bis zu 90% der Fälle von protrahierten, subakuten Leberversagen auf kryptogene Hepatiden zurückzuführen (BÖKER 2001). Seltener ursächlich sind andere Virus-Infektionen, z.B. Herpes-Simplex (FAHY et al. 2000) oder Epstein-Barr (HART et al. 1984).

2.6 Medikamente und Drogen

Idiosynkratische Reaktionen mit Lebersversagen können durch eine ganze Reihe von Medikamenten ausgelöst werden. Dazu gehören Antibiotika, Anabolika, Tuberkulostatika, Antirheumatika und weitere Substanzklassen. Diese rufen, z.T. durch Überdosierung, massive Leberschäden in Form von Hepatitis, intrahepatischer Cholestase (Gallenstau), Fibrose, Zirrhose, etc. hervor (POHL 1990, STROHMEYER, WEIK 1999). Medikamentöse Idiosynkrasien gehören in Deutschland zu den häufigsten Ursachen für das Lebersversagen (WILLIAMS 1996). Als Prototyp einer solchen Überempfindlichkeitsreaktion gilt eine durch das Inhalationsanästhetikum Halothan hervorgerufene, rasch progrediente und hochikterische Hepatitis (NEUBERGER 1990). Als alternatives Narkosemittel wird daher inzwischen aufgrund seiner guten Verträglichkeit und weiterer vorteilhafter Eigenschaften das inerte Edelgas Xenon verwendet, wobei die Anwendungskosten jedoch bedeutend höher sind (Joyce 2000). Mit dem Beginn der 1990er Jahre wurde in der sog. "Techno-Szene" der Konsum aufputschender Amphetaminpräparate populär, die unter dem Sammelbegriff "Ecstasy" bekannt sind. Die übermäßige Einnahme dieser Drogen führt ebenfalls zum akuten Lebersversagen (DE MAN et al. 1993, HELLINGER et al. 1997).

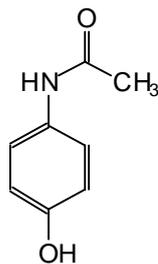


Abb. 2.4: Chemische Struktur von Paracetamol

Eine herausragende Position unter den Medikamenten, die für Lebersversagen verantwortlich sind, nimmt Acetaminophen (Paracetamol) ein (siehe Abb. 2.4). Weltweit sind rund 20% der Fälle auf den Mißbrauch dieses frei verfügbaren, analgetisch (schmerzlindernd) und antipyretisch (fiebersenkend) wirkenden Anilinderivats zurückzuführen. In Großbritannien und Dänemark beträgt die Zahl 50-70% (RIORDAN, WILLIAMS 1999).

Synergetische Effekte in therapeutischen Mengen wurden bei gleichzeitigem Alkoholkonsum und Verabreichung von Medikamenten beobachtet, die zu einer Cytochrom-P450-Induktion führen (BRAY et al. 1992). Paracetamol selbst wird durch das Cytochrom CYP2E1 abgebaut (WRIGHTON et al. 1996). Dabei entsteht ein instabiler hepatotoxischer Metabolit, der unter normalen Umständen durch Konjugation mit reduziertem Glutathion (GSH) inaktiviert wird (SLATTERY et al. 1987). Bei erschöpftem Glutathionpool kommt es zur Akkumulation dieses Metaboliten, der eine Zelldegeneration durch Lipidperoxidation hervorruft (HARRISON et al. 1990). Häufig kann bei rechtzeitiger Diagnose einer Acetaminophenintoxikation durch Verabreichung von *N*-Acetylcystein der Glutathionpool stabilisiert und eine Lebernekrose vermieden werden (O'GRADY 1997). Andernfalls entwickelt sich erst am dritten oder vierten Tag nach Acetaminopheneinnahme eine dann sich rasch verschlechternde Encephalopathie bei gleichzeitigem Rückgang der Lebersyntheseleistung und Anstieg des Bilirubintiters (PEREIRA et al. 1992).

2.7 Sonstige Ursachen

Die in diesem Kapitel aufgeführten Faktoren spielen statistisch eher eine untergeordnete Rolle, wenngleich die Manifestation eines durch sie verursachten Leberversagens mit den gleichen Konsequenzen verbunden ist, wie bei den zuvor genannten Faktoren.

In Mitteleuropa kommt es während der Pilzsaison im Spätsommer/Herbst durch Verwechslung mit dem ähnlichaussehenden Champignon (*Agaricus spec.*) häufiger zu Vergiftungen mit Knollenblätterpilzen (*Amanita spec.*). Die im äußeren Erscheinungsbild des Betroffenen symptomarme Beginnphase der Amanita-Intoxikation ist gekennzeichnet durch sich dramatisch verschlechternde Leberwerte (Abfall der Gerinnungsfaktoren, Anstieg der Transaminasenaktivität im Blut). Bei Früherkennung sind Therapiemaßnahmen in Form von Primärentgiftungen (Magenentleerung, forcierte Diarrhö), medikamentöse Behandlung mit Silibenin und Penicillin G und Plasmaaustausch möglich (KOPPEL 1993). Andernfalls entwickelt sich am 3.-5. Tag das Vollbild des akuten Leberversagens, wobei rasch ein Multiorganversagen eintritt.

Während des letzten Trimesters einer Schwangerschaft kann es spontan zu einer massiven, mikrovesikulären Verfettung der Leber kommen, die letztlich in ein Leberversagen mündet (AMON et al. 1991). Eine weitere Komplikation mit möglichem Leberversagen während einer Schwangerschaft ist das sog. HELLP-Syndrom (engl. *hemolysis, elevated enzymes, low platelet count*) (PEREIRA et al. 1997). Die sofortige Beendigung der Schwangerschaft führt bei rechtzeitiger Diagnose in beiden Fällen in der Regel zu einer raschen Erholung der Leberfunktionen.

Bei der Wilson-Krankheit (Morbus Wilson, hepatolentikuläre Degeneration) handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erberkrankung des Kupferstoffwechsels, die zwischen dem Kindesalter und dem 20.-30. Lebensjahr ausbrechen kann. Die Ursache liegt in einer erniedrigten bzw. fehlerhaften Expression des kupfertransportierenden Akute-Phase-Proteins Coeruloplasmin. Aufgrund dieses Eiweißdefekts kann Kupfer nicht auf dem normalen Weg über Leber und Galle ausgeschieden werden, so daß es sich im Körper ansammelt und in verschiedenen Organen ablagert. In der Leber führt die hohe Kupferbelastung über Jahre und Jahrzehnte zur chronischen Hepatitis (STERNLIEB 2000). Jedoch ist manchmal ausgerechnet das akute Leberversagen das erste Anzeichen dieser Krankheit (DEGENHARDT et al. 1994, HERRMANN et al. 1995).

Das Budd-Chiari-Syndrom ist eine Krankheit infolge eines Verschlusses oder einer Verengung der Lebervene mit Rückstau des Blutes in die Leber. Ausgelöst wird die Erkrankung z.B. durch Thrombosen (Blutgerinnselbildung) in der Lebervene, durch Tumore oder Entzündungen. Eine chronische Abflußstörung, z.B. wenn ein Tumor die Lebervene einengt, führt allmählich über eine gestaute, vergrößerte Leber zur Leberzirrhose (TILANUS 1995). Ein akutes Leberversagen tritt auf, wenn alle drei Lebervenenhauptäste gleichzeitig verschlossen sind (KUO et al. 1996). Weitere Ursachen für Leberversagen sind Hitzschlag (GIERCKSKY et al. 1999, BERGER et al. 2000), das Reye-Syndrom (LLOYD-STILL 1985) und septische Infektionen (NORTON et al. 1975, ANDERSON, JOHNSON 1993).

3. Lebertherapien

Zwar hat sich die Prognose des akuten Leberversagens mit der Weiterentwicklung der Intensivmedizin verbessert, jedoch ist die Überlebensrate bei alleiniger konservativer Therapie niedrig, da vor allem der hepatischen Enzephalopathie keine effektiven Therapiemaßnahmen gegenübergestellt werden können. In Abhängigkeit der zugrunde liegenden Ätiologie kann dem Patienten oft nur noch mit einem Austausch des funktionsuntüchtigen gegen ein gesundes Organ geholfen werden (WILLIAMS, WENDON 1994).

3.1 Lebertransplantation

Die Lebertransplantation gilt inzwischen als die erfolgsversprechendste Therapieform bei der Behandlung akuter Leberversagen. Zwischen 1984 und 1999 gingen ca. 9% der Lebertransplantationen in Deutschland auf akutes Leberversagen zurück. Den Löwenanteil mit etwa 59% bildeten jedoch die Zirrhosen. Als übrige Indikationen wurden lebertypische Stoffwechselerkrankungen (z.B. Morbus Wilson, siehe II.3.7), Leberkarzinome und sonstige Faktoren angegeben (Quelle: Selbsthilfe Lebertransplantierte Deutschland e.V.¹). Die gegenwärtige Überlebensrate liegt im ersten Jahr nach einer Operation bei 58-90% und nach 5-8 Jahren bei 75-80% (SIBIAL et al. 1999).

Die erste Lebertransplantation wurde 1963 durch Thomas E. Starzl von der Northwestern University of Chicago durchgeführt (STARZL et al. 1963). Der Patient, ein dreijähriger Junge mit Gallengangatresie (angeborenes Fehlen der Gallengänge mit intrahepatischem Rückstau der Galle), verstarb jedoch während der Operation an Blutverlust infolge unkontrollierbarer Koagulopathie (Gerinnungsstörungen). Erst 1967 konnte, ebenfalls durch Starzl, die erste wirklich erfolgreiche Transplantation mit einer Überlebensdauer des Patienten von mehr als einem Jahr vorgenommen werden (KEEFFE 2000). Zwei Jahre später transplantierte Alfred Gütgemann an der Chirurgischen Klinik der Universität Bonn die erste Leber in Deutschland (GÜTGEMANN et al. 1969). Jedoch lag die 1-Jahr-Überlebensrate bei den damals verwendeten Immunsuppressiva zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen des Organismus (Mercaptopurin, Azathioprin, Prednison, antilymphocytische Globuline) maximal bei 30% (STARZL et al. 1982). Der Durchbruch gelang erst mit der Einführung von Cyclosporin A, dessen immunsuppressive Effektivität Ende der 1970er experimentell nachgewiesen werden konnte (CALNE 1979). In den Folgejahren stieg dadurch die Kurzzeit-Überlebensrate (≤ 1 Jahr) nach Lebertransplantationen auf 80-90% (DENTON et al. 1999). Weitere Verbesserungen der Organverträglichkeit wurden durch die Verwendung von Tacrolimus (FK 506, STARZL et al. 1989), Mycophenolat Mofetil (MMF, KLUPP et al. 1997) und neuerdings Rapamycin (Sirolimus, WATSON 1999) erreicht. Ferner wurden spezielle

¹ Selbsthilfe Lebertransplantierte Deutschland e.V., Jutta Vierneusel, Brühl - <http://www.lebertransplantation.de>

Operationstechniken entwickelt, welche die Rate der Komplikationen nach einer Transplantation deutlich verminderten (STARZL et al. 1985, VERRAN et al. 1997).

Bis zum Jahr 2000 wurden in Deutschland 7.722 Lebertransplantationen an 25 Transplantationszentren durchgeführt. Allein in 2000 lag die Zahl transplantierte Lebern bei 780. Der Bedarf konnte aufgrund der Knappheit transplantierbarer Lebern jedoch nicht gedeckt werden: Die Zahl der Transplantationsneuanmeldungen lag zum selben Zeitpunkt bei fast 1.000 Patienten (Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation¹). Wesentlich dramatischer ist die Situation in den Vereinigten Staaten (siehe Abb. 2.5).

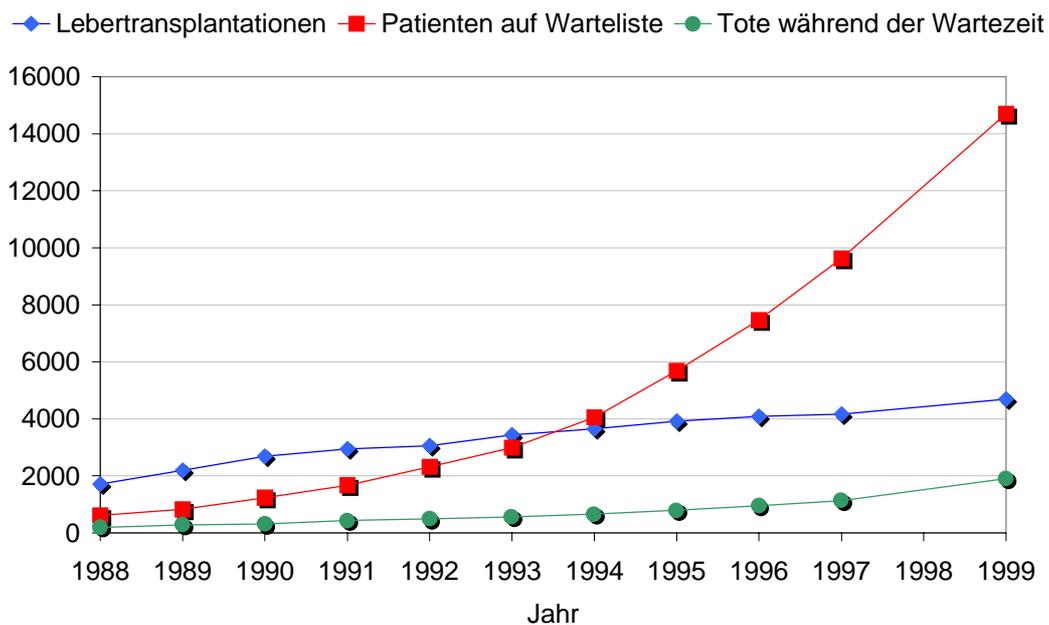


Abb. 2.5: Lebertransplantationen, Patienten auf der Warteliste und Tote während der Wartezeit in den USA zwischen 1988 und 1999 (nach KEEFFE 1998, ergänzt durch UNOS²-Daten von 1999).

Aus den statistischen Daten (siehe Abb. 2.5) geht hervor, daß sich die Zahl der Patienten auf der Warteliste alle 2,3 Jahre verdoppelt, die Zahl der Lebertransplantationen jedoch nur alle 6,7 Jahre. Bis Ende 1999 warteten in den Vereinigten Staaten 14.709 Patienten auf eine Lebertransplantation; aufgrund der Organknappheit wurden lediglich 4.696 Transplantationen durchgeführt. Die durchschnittliche Wartezeit bis zu einer Lebertransplantation beträgt in den USA in Abhängigkeit zur jeweiligen Indikation gegenwärtig zwischen 105 und 545 Tagen. Deshalb versterben etwa 13% der auf der Warteliste befindlichen Patienten pro Jahr (Quelle: United Network for Organ Sharing²).

Diese Entwicklung hat Bemühungen verstärkt, die Kriterien bei der Transplantatauswahl zu erweitern und Alternativen zum standardisierten orthotopen Organ austausch zu finden. So hat die Zahl transplantierte Lebern von Spendern mit einem Lebensalter von über 50 Jahren stetig zugenommen, obwohl solche Transplantate eine verminderte postoperative Funktionstüchtigkeit aufweisen (GRIDELLI, REMUZZI 2000). Sogar die Berücksichtigung von

¹ Deutsche Stiftung Organtransplantation – <http://www.dso.de>

² UNOS: United Network for Organ Sharing, Richmond, Virginia, USA – <http://www.unos.org>

Spendern im Alter zwischen 70 und 80 Jahren war erfolgreich (EMRE et al. 1996, JIMINEZ ROMERO et al. 1999). Damit wurde die Gesamtzahl zur Verfügung stehender Transplantate erhöht.

Inzwischen besteht auch die Möglichkeit, ein Transplantat auf zwei Empfänger zu verteilen. Dabei erhält ein erwachsener Empfänger den rechten Leberlobus, während der linke Lobus bzw. das linke laterale Segment in ein Kind transplantiert werden kann. Diese sog. "Split-liver-" Transplantation wurde erstmals 1988 durch Rudolf Pichlmayr an der Medizinischen Hochschule in Hannover durchgeführt (PICHLMAYR et al. 1988). Die anfänglich schlechten Prognosen in Reihenuntersuchungen mit Überlebensraten von nur 67% bei Erwachsenen und 20% bei Kindern (BROELSCH et al. 1990) besserten sich kontinuierlich: Durch die Technik des "*in vivo*-Splittings", bei dem das Transplantat noch im Spender in die zwei Segmente getrennt wird, werden inzwischen Überlebensraten erreicht, die mit denen der orthotopen Lebertransplantation vergleichbar sind (GHOBRIAL et al. 2000).

Eine weitere Methode ist die partielle Transplantation von Lebersegmenten von Lebendspendern. Dabei sind die Spender in der Regel unmittelbare Verwandte des Empfängers. Von einem derartigen Eingriff wurde erstmals 1989 berichtet (RAIA et al. 1989). In den letzten Jahren nahm die Zahl der Lebendspender-Transplantationen insbesondere in den USA und Japan mit sehr guten Prognosen für die Patienten kontinuierlich zu (LO et al. 1997, MARCOS et al. 2000). Dennoch hat der theoretische Vorteil einer hohen Histokompatibilität des Transplantats eines nahen Verwandten nicht zu einer Verringerung der Abstoßungsrate beim Empfänger geführt (KEEFFE 2001).

Die xenogene Transplantation, bei der Lebern übertragen werden, die aus transgenen Spendertieren mit Expression von humanen komplementregulierenden Molekülen stammen, erscheint aufgrund der langfristigen Exposition des Empfängers gegen metabolisch und immunologisch potentiell inkompatible Xenoproteine und der Gefahr möglicher viraler Zoonosen klinisch nicht realisierbar (WINKLER, SCHLITT 1999). Auch der Therapieansatz, die Regeneration des Organs durch Transplantation isolierter humaner Leberzellen zu erreichen, ist bisher über eine Einzelfallstudie nicht hinausgekommen (STROM et al. 1997). Gegenwärtig nur rein theoretische Möglichkeiten für zukünftige Therapieformen könnten sich aus der Forschung mit adulten und embryonalen Stammzellen ergeben (FARIS et al. 2001, FELDMANN 2001).

In der Gesamtbetrachtung ist festzustellen, daß die Lebertransplantation ein irreversibler Eingriff bleibt, der bei lebenslanger Immunsuppression mit einer stark eingeschränkten Lebenserwartung verbunden ist. Die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie, die initiale Nicht- bzw. Dysfunktion des Spenderorgans, die chronische Abstoßung sowie die dargestellte Knappheit geeigneter Spenderorgane führte bereits sehr früh zur Entwicklung von temporären Unterstützungsverfahren. Diese sollten helfen, das Überleben des Patienten während der Wartezeit auf ein Spenderorgan zu gewährleisten bzw. die Regeneration des erkrankten Organs zu ermöglichen, um so eine Transplantation zu vermeiden.

3.2 Leberunterstützungssysteme und -verfahren

Seit Beginn der 1950er Jahre wurden eine ganze Reihe unterschiedlicher extrakorporaler Leberunterstützungssysteme und -verfahren entwickelt. Diese lassen sich in die nicht-biologische (artifizielle) und die biologische (bioartifizielle) Kategorie unterteilen. Während die Therapie mit artifiziellen Systemen auf rein physikalische Art durchgeführt wird, beinhalten die bioartifiziellen Systeme bzw. Verfahren eine biologische Komponente. Dies können Leberzellen, Leberfragmente, ganze Organe oder gar komplette Individuen sein.

3.2.1 Artifizielle Leberunterstützung

In diese Kategorie gehören Hämodialyse, Hämofiltration und Hämodiafiltration, Adsorptionsverfahren wie z.B. die Hämodiaadsorption, sowie Plasmaaustausch bzw. Plasmapherese.

3.2.1.1 Hämodialyse

Lange Zeit war die medizinische Wissenschaft der Überzeugung, daß das hepatische Koma durch die Akkumulation von sehr kleinen (5 kDa) toxischen Substanzen verursacht wird (HUI et al. 2000). Daher verwendete man das Verfahren der Hämodialyse, das bereits seit den frühen 1950er Jahren erfolgreich bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt wurde, schon bald bei der Behandlung des Leberkoma (KILEY et al. 1957). Bei der Hämodialyse trennt eine hydrophile semipermeable Membran aus Cellophan oder Cuprophan das zugeführte Patientenblut von der Dialyseflüssigkeit. Der Transport der im Blut gelösten niedermolekularen Substanzen durch die Membran in die Dialyseflüssigkeit erfolgt allein durch Diffusion. Jedoch erbrachte erst die Verwendung von Polyacrylnitril-Membranen, die aufgrund ihrer höheren Permeabilität die Abreicherung von Substanzen mit Molekülgrößen von mehr als 15 kDa ermöglichen, eine Steigerung der Überlebensrate auf 33% (SILK et al. 1977) bzw. eine Wiedererlangung des Bewußtseins bei bis zu 43,6% zuvor hepatokomatöser Patienten (DENIS et al. 1978).

Hepatische Encephalopathien werden zumeist begleitet durch ein vermindertes Verhältnis der Konzentration aliphatischer zu aromatischen Aminosäuren im Blut des Patienten (Fischer Ratio, SCHÖN et al. 1999). Die orale Applikation aliphatischer Aminosäuren kann dabei zu einer Erholung des Patienten führen (CHALASANI, GITLIN 1996). In Anlehnung daran wurde das Konzept der "reziproken Dialyse" entwickelt, bei dem der Dialyseflüssigkeit aliphatische Aminosäuren zugesetzt werden, die durch Diffusion ins Patientenblut gelangen (KNELL, DUKES 1976). Jedoch ist das Verfahren über diese Einzelstudie nicht hinausgekommen. Die beschränkten Möglichkeiten der Behandlung hepatischer Encephalopathien mittels Hämodialyse sind in erster Linie dadurch begründet,

daß nur wasserlösliche Substanzen aus dem Patientenblut entfernt werden können. Das Diffusionsprinzip führt zudem ungewollt dazu, daß neben hydrophilen Toxinen (z.B. Ammonium) auch physiologische Substanzen (z.B. Elektrolyte, Glucose, Hormone) abgereichert werden. Ferner ist bekannt, daß eine Reihe giftiger Substanzen an Blutproteine gekoppelt werden (z.B. Bilirubin an Albumin) und somit nicht über einen reinen Dialysevorgang abgereichert werden können.

Eine innovative Weiterentwicklung der Hämodialyse ist daher das Molecular Adsorbents Recirculating System (MARS[®]) der Firma Teraklin in Rostock-Warnemünde, das erstmals 1993 vorgestellt wurde (STANGE 1993). Dieses System besteht aus insgesamt drei Flüssigkeitskreisläufen (siehe Abb. 2.6): 1. extrakorporaler Blutkreislauf des Patienten, 2. Albumin-Kreislauf mit 10-20%iger Albumin-Lösung und 3. Dialysatkreislauf.

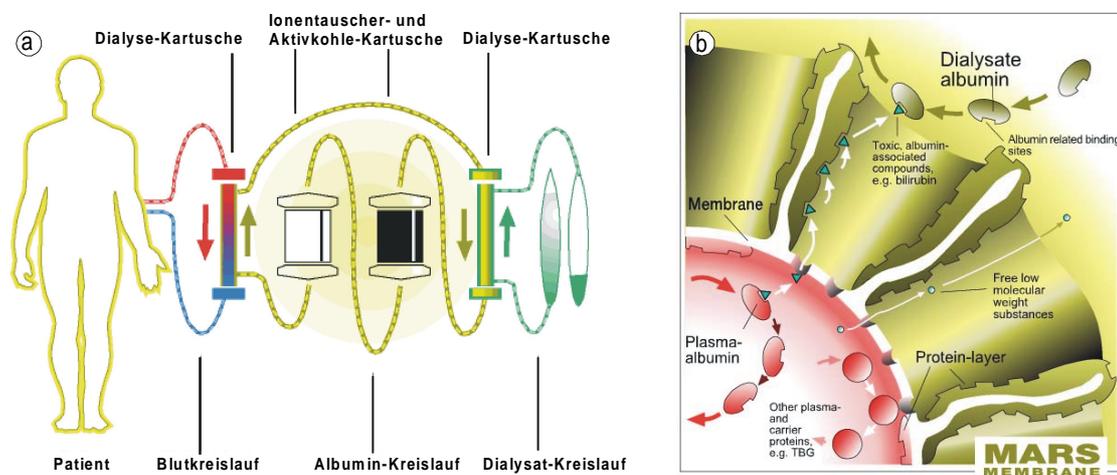


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des MARS[®]-Systems. **a:** Extrakorporaler Blutkreislauf, Albumin-Kreislauf und zusätzlicher Dialysat-Kreislauf. **b:** Transportvorgänge an der Dialysemembran zwischen Blut- und Albumin-Kreislauf.¹

Die eigentliche Blutwäsche findet zwischen dem Blutkreislauf und dem Albumin-Kreislauf statt, die innerhalb einer Dialysekartusche durch eine Polysulphon-Membran voneinander getrennt sind. Durch einen komplexen physikochemischen Prozeß werden durch trilaterale Interaktion die an das Patientenalbumin gebundenen Toxine zunächst an das Membranmaterial abgegeben und auf der gegenüberliegenden Seite (Albumin-Kreislauf) durch das Albumin abgegriffen. Zudem können wasserlösliche niedermolekulare Substanzen die Membran frei passieren. Die Abreicherung physiologischer Substanzen wird durch die isotone Lösung des Albuminkreislaufs verhindert. Die Albumin-Lösung wird während der Blutwäsche durch Perfusion in Reihe geschalteter adsorptiver Aktivkohle- bzw. Ionentauscherharz-Säulen im Albumin-Kreislauf kontinuierlich regeneriert. Zusätzlich findet eine Abreicherung der wasserlöslichen Toxine über eine weitere Dialysekartusche in den Dialysat-Kreislauf statt.

¹ mit freundlicher Genehmigung durch Dr. W. Gerike, Teraklin, Rostock-Warnemünde

Neuere Studien mit diesem System haben gezeigt, daß sich der Allgemeinzustand (Blutdruck, Leber- und Nierenfunktion) der Patienten bei Encephalopathie, renaler und hepatischer Insuffizienz durch die Abreicherung von Bilirubin, Gallensäuren, Harnstoff und aromatischer Aminosäuren verbessert (MITZNER et al. 2001). Dennoch konnte durch diese Form der Hämodialyse bisher in keinem Fall von akutem Leberversagen eine Verbesserung der Überlebensrate erzielt werden.

3.2.1.2 Hämofiltration und Hämodiafiltration

Mit der Einführung der Hämofiltration wurde die Hämodialyse als Standardtherapie bei renaler Insuffizienz abgelöst (KRAMER et al. 1977). Insbesondere bei erhöhtem Intracranialdruck infolge hepatischer oder renaler Funktionsstörungen hat sich dieses Verfahren aufgrund besserer cardiovaskulärer Stabilität der Patienten während der Behandlung bewährt (DAVENPORT et al. 1993). Die Hämofiltration ist ein Ultrafiltrationsverfahren, bei dem in einer konvektiven Überströmung einer Ultrafiltrationsmembran im Blut gelöste Substanzen kleiner und mittlerer Molekülgrößen bis ca. 15 kDa entlang eines transmembranen Druckgefälles durch die Filterkapillaren gepreßt werden. Der Flüssigkeits- und Elektrolytverlust über das Ultrafiltrat wird durch eine Substitutionslösung ersetzt. Besonders geeignet ist die Hämofiltration bei der Behandlung von Komplikationen, die das Leberversagen begleiten bzw. Folge des Leberversagens sind. Dazu gehören z.B. Sepsis, inflammatorische Reaktionen und Multi-Organversagen. Die Auslöser dieser Komplikationen (z.B. Interleukine, Endotoxine) werden durch die Hämofiltration aus dem Blut abgereichert (HOFFMANN, FAIST 2001). Doch auch hier gibt es keinen Hinweis auf durchschlagende Erfolge bei der Verbesserung der Überlebensrate unter Leberversagen leidender Patienten.

In einer Einzelstudie konnte eine Überlebensrate von 55,2% durch die Kombination von Hämodialyse und Hämofiltration in der Therapie akuten Leberversagens und akuter Hepatitis erreicht werden (YOSHIBA et al. 1996). Bei dieser als Hämodiafiltration bezeichnete Therapieform traten jedoch verschiedene Komplikationen wie z.B. Komplementaktivierung und Koagulationen auf.

3.2.1.3 Adsorptionsverfahren (Hämodiaadsorption)

Eine ganze Reihe unterschiedlicher adsorptiver Substanzen wurden im Laufe der Zeit auf ihre Fähigkeiten untersucht, Substanzen aus dem Blut zu entfernen, die für das Leberversagen verantwortlich sind. Die meisten Arbeiten wurden diesbezüglich mit Aktivkohle, synthetischen Neutralharzen und Ionentauscher-Harzen durchgeführt.

Bei der Verwendung von Aktivkohlepartikeln traten in Tierversuchen häufig Probleme bezüglich der Biokompatibilität des Materials auf. Man versuchte dieses Problem bspw. durch Mikrokapulierung der Partikel (CHANG 1990) oder Beschichtung des Materials zu

umgehen (GELFRAND et al. 1976). Die größte bisher durchgeführte medizinische Studie auf diesem Gebiet hat jedoch gezeigt, daß die Hämo-perfusion von Aktivkohle keinen signifikant positiven Einfluß auf den Patientenstatus hinsichtlich cerebraler Ödeme und renaler Insuffizienz hat (O'GRADY et al. 1988). Eine Überlebensrate von immerhin 42% wurde bei der Verwendung von Kationenaustauscher-Harzen erzielt (BIHARI et al. 1983).

Die neueste Entwicklung auf diesem Gebiet ist das BioLogic-DT™ System der Firma Hemocleanse in San Diego, USA (ASH et al. 1998). Dieses System besteht aus zwei Kreisläufen: 1. Extrakorporaler Blutkreislauf des Patienten und 2. Adsorptionskreislauf. Die Kreisläufe werden innerhalb eines Dialysators durch eine flexible Cellulosemembran voneinander getrennt (siehe Abb. 2.7.b). Im Adsorptionskreislauf befinden sich pulverisierte Aktivkohle- und Kationenaustauscherpartikel, die in einer mit Nährstoffen angereicherten und gepufferten Elektrolytlösung suspendiert sind. Beide Kreisläufe werden durch eine im Adsorptionskreislauf installierte Vakuumpumpe getrieben. Erzeugt die Pumpe einen Unterdruck, überträgt sich dieser über die flexible Cellulosemembran auf den Blutkreislauf. Durch diesen Vorgang wird bei entsprechender Ventilstellung Blut in den Dialysator eingeleitet. Ferner wird dadurch der für den forcierten Substanzübergang notwendige transmembrane Druck erzeugt, so daß niedermolekulare Substanzen in den Adsorptionskreislauf abgereichert werden. Diese binden nachfolgend an die Aktivkohle- und Kationenaustauscherpartikel. Im relaxierten Zustand der Membran können Elektrolyte und Nährstoffe aus dem Adsorptionskreislauf in den Blutkreislauf diffundieren.

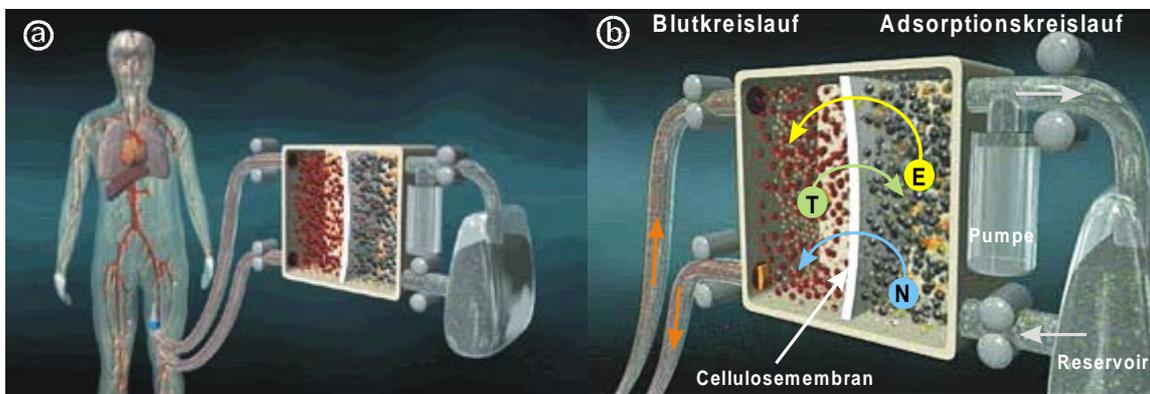


Abb. 2.7: Hämodiaadsorptions-System BioLogic-DT™. **a:** Schematische Übersicht mit veno-venösem Anschluß des Patienten an das System. **b:** Flüssigkeitsströme und Transportvorgänge im Dialysator (funktionale Einheit des Systems). T = Toxine, E = Elektrolyte, N = Nährstoffe.¹

In einer repräsentativen klinischen Studie mit Patienten, die unter akutem Leberversagen litten, konnte eine Verbesserung des neurologischen Status erzielt werden. Dennoch gab es in dieser Untersuchung eine Reihe von Komplikationen (z.B. Blutplättchenverlust, etc.), die nach Meinung der Autoren eine Verbesserung des Systems erforderlich machen (HUGHES et al. 1994).

¹ mit freundlicher Genehmigung durch S. Mazepink, Hemocleanse/HemoTherapies, San Diego (CA), USA

3.2.1.4 Plasmaaustausch bzw. Plasmapherese

Bei der Plasmapherese werden Blutplasma und -zellen apparativ (z.B. durch entsprechende Zentrifugen) extrakorporal separiert. Gewöhnlich dient dieses Verfahren der Gewinnung von Spenderplasma. Bei der Anwendung der Plasmapherese im Rahmen der Lebertherapie wird das toxische Patientenplasma nach Abtrennung der Blutzellen durch frisches Spenderplasma ersetzt. Nach anfänglichen Mißerfolgen (SABIN, MERRIT 1968, LEPORE, MATEL 1970) konnten durch mehrfachen Plasmaaustausch ("High Volume Plasmapheresis") eine Überbrückung der Patienten bis zur Transplantation bzw. Regeneration des Organs erzielt werden (KONDRUP et al. 1992). Problematisch bleibt allerdings die Verfügbarkeit ausreichender Mengen Spenderplasma: In Deutschland besteht gegenwärtig ein Defizit von etwa 200.000 Liter pro Jahr ¹.

3.2.2 Bioartifizielle Leberunterstützung

In der Summe der klinischen Untersuchungen hat der Einsatz artifizieller Leberersatzsysteme gezeigt, daß sie für die Detoxifizierung der Patienten und die Substitution selektiver Leberfunktionen geeignet sind (MALCHESKY 1994). Isoliert betrachtet stellen sie jedoch keine wirkliche Alternative zum funktionstüchtigen Organ dar, da durch sie eine Vielzahl überlebenswichtiger Leberfunktionen nicht nachgeahmt werden können. Dies führte parallel zu den artifiziellen Systemen zur Entwicklung von bioartifiziellen Verfahren, bei denen körperfremde Leberzellen (Hepatocyten) in unterschiedlicher Anordnung die Aufgaben des insuffizienten Organs übernehmen sollten.

3.2.2.1 Kreuzzirkulation und Kreuz-Heterohaemodialyse

In wenigen Studien wurde versucht, Leberversagen durch ein bestimmtes extrakorporales Zirkulationsverfahren zu therapieren. In diesem als Kreuzzirkulation oder Kreuz-Heterohaemodialyse bezeichneten Verfahren wird das Blut bzw. Plasma des Patienten über den Blutkreislauf eines zweiten Individuums zurückgeführt. 1957 wurde diese Methode erstmals mit Hunden erprobt (KIMOTO 1957), später auf Paviane und humane Zirkulationspartner übertragen (BURNELL et al. 1967, HUME et al. 1969). Es wurden jedoch keine Ergebnisse erzielt, die eine Etablierung dieses Verfahrens rechtfertigen. Dies und die relativ große Gefahr, daß der gesunde Zirkulationspartner durch die Behandlung ebenfalls erkrankt, hat weiterführende Untersuchungen unterbunden.

¹ Quelle: Bundeszentrale für Gesundheitliche Aufklärung, Köln - <http://www.blutplasma.de>

3.2.2.2 Isolierte Leberperfusion

Bei dieser Technik wird Blut oder Plasma des Patienten durch eine explantierte Leber perfundiert. Seit der ersten Anwendung (EISEMAN et al. 1965) wurden bereits zahlreiche Patienten auf diese Weise therapiert. Dabei kamen Lebern von Schweinen, Affen und verstorbenen Menschen zum Einsatz. In den meisten Fällen führte die Anwendung zu einer vorübergehenden Besserung des neurologischen Status, doch konnte nie ein Langzeitüberleben der Patienten erreicht werden. Bei der Verwendung xenogener Lebern traten insbesondere immunologische Komplikationen auf, die einen Funktionsverlust bzw. die Zerstörung des Organs zur Folge hatten (CHARI et al. 1994). Unlängst wurden erfolgreich Spenderlebern eingesetzt, die für eine Transplantation nicht verwendet werden konnten (FOX et al. 1993). Dennoch bleibt dieses Verfahren ungeeignet, solange Spenderlebern generell nicht in ausreichendem Maß zur Verfügung stehen.

3.2.2.3 Extrakorporale biohybride Perfusionssysteme

Die Probleme der vorangestellten Konzepte bioartifizieller Leberunterstützung beruhten in erster Linie auf dem unmittelbaren Kontakt zwischen Patientenblut bzw. -plasma und dem körperfremden Gewebe. Die immunologischen Komplikationen zu umgehen und dennoch das Stoffwechsellpotential gesunder, körperfremder Zellen für die Lebertherapie zu nutzen, war Ziel der Entwicklung extrakorporaler Perfusionssysteme. Die Betriebsweise ist mit der isolierten Leberperfusion vergleichbar (siehe II.3.2.2.2), jedoch werden in diesen Systemen (Bioreaktoren) Leberfragmente bzw. Leberzellen in hoher Dichte immobilisiert und durch eine semipermeable, biokompatible Barriere vom Blutkreislauf des Patienten getrennt.

Das erste am Patienten eingesetzte System dieser Art enthielt ein Leberhomogenat sowie Leberfragmente und gefriergetrocknetes Lebergewebe aus Hunden. Einige leberspezifische Parameter des Patienten verbesserten sich während der Behandlung. Jedoch scheiterte eine weiterführende Anwendung an der geringfügigen Diffusibilität der Celluphan-Membran als biokompatible Barriere (NOSE et al. 1963).

Einen Quantensprung vollzogen die bioartifiziellen Systeme mit der Entwicklung enzymatischer Isolationsmethoden zur Gewinnung primärer Leberzellen (BERRY, FRIEND 1969). In den 1980er Jahren wurden so erstmals isolierte Hepatocyten aus Schweinen bzw. Kaninchen in bioartifiziellen Systemen klinisch am Patienten eingesetzt (MATSUMURA et al. 1987, MARGULIS et al. 1989). Deutliche Verbesserungen erfolgten mit der Einführung synthetischer Kapillarmembranen beim Bioreaktordesign (KNAZEK et al. 1972, WOLF, MUNKELT 1975). Hierdurch wurde die Austauschfläche und damit der Interaktionsraum zwischen den Zellen und dem Patientenplasma um ein Vielfaches erhöht. Das grundsätzliche Konstruktionsprinzip solcher Hohlfasermembranreaktoren (engl. Kurzform: *hollow fiber*, siehe Abb. 2.8) blieb seither in der Mehrzahl der neuentwickelten Systeme unverändert. Die Versorgung und Immobilisierung der Zellen im Bioreaktor wurde allerdings durch eine Reihe neuer Verfahren und Materialien modifiziert.

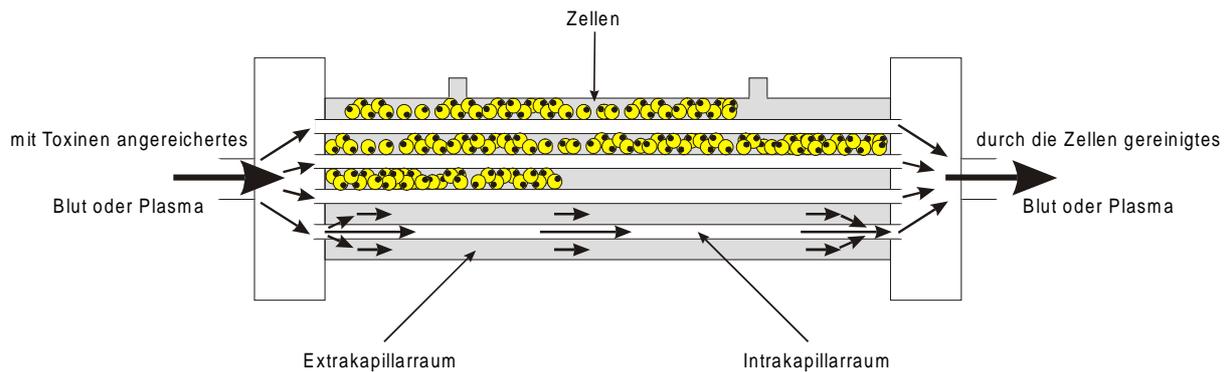


Abb. 2.8: Prinzipieller Aufbau eines Hohlfasermembranreaktors mit Zellen im Extracapillarraum¹.

Zwar gab und gibt es Anstrengungen, bioartifizielle extrakorporale Leberunterstützungssysteme auch in Abweichung vom Hollow-Fiber-Prinzip zu entwickeln (BADER et al. 1995, FLENDRIG et al. 1997, SHI et al. 2000), doch haben diese das reine Versuchsstadium bisher nicht verlassen. Gegenwärtig gibt es weltweit sechs Unternehmen (5 in USA, 1 in Deutschland), die an der Entwicklung derartiger bioartifizieller Leberunterstützungssysteme arbeiten und sich in unterschiedlichen Erprobungsphasen der klinischen Anwendung befinden (siehe Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Unter Firmenbeteiligung entwickelte bioartifizielle Leberunterstützungssysteme.

Firma	System	Zellressource	Zulassungsphase
Circe Biomedical Lexington (MA), USA	HepatAssist™ (ROZGA et al. 1993)	primäre porcine Hepatocyten auf collagenbeschichteten Microcarriern	Phase II-III
VitaGen La Jolla (CA), USA	ELAD™ (SUSSMAN et al. 1994)	humane Hepatoblastomzelllinie C3A	Phase II
Algenix Shoreview (MN), USA	LIVERx-2000™ (SIELAFF et al. 1997)	intracapillar mit Kollagen überschichtete primäre porcine Hepatocyten	Phase I
Excorp Medical Oakdale (MN), USA	BAL MK 2.0™ (PATZER et al. 1999)	primäre porcine Hepatocyten	Phase I-II
Exten/Xenogenics San Diego (CA), USA	Sybiol™ (http://www.exten.com)	geplant: porcine Hepatocytenlinie	präklinische Phase
Hybrid Organ Berlin, Deutschland	MELS® (GERLACH 1996)	primäre porcine Hepatocyten	Phase I-II

Trotz des konzeptionellen Konsens über die Verwendung von Hollow-Fiber-Reaktoren als funktionelle Einheit besteht bislang keine Einigkeit über die Gesamtgestaltung der Systeme (KOEBE, SCHILDBERG 1998). Die hier genannten Systeme weichen nicht nur hinsichtlich der in Tabelle 2.3 dargestellten Zellressourcen voneinander ab. Deutliche Unterschiede gibt es

¹ mit freundlicher Genehmigung durch Dr. A. Werner, Lehrstuhl für Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld

insbesondere bezüglich der eingesetzten Zellmenge und zusätzlich im Kreislauf installierter Apparaturen. So besitzen die Systeme der Firmen Excorp und Exten keine Vorrichtung zur Plasmaseparation, d.h. hier wird Vollblut anstelle von Plasma durch den Bioreaktor perfundiert. Die eingesetzten Zellmengen reichen von 30-40 g (Circe Biomedical) über 100 g (Excorp Medical) bis hin zu mehreren 100 g (VitaGen und Hybrid Organ). Im Kreislauf des HepatAssist™-Systems ist vor dem kapillaren Zellkompartiment ein Aktivkohleabsorber zur Abreicherung cytotoxischer Substanzen installiert, um eine Vergiftung der Hepatocyten im Hollow-Fiber zu vermeiden. Beim ELAD™-System sind vier Hohlfasermembranreaktoren parallel im Kreislaufsystem platziert; im LIVERx-2000™-System sind es zwei und bei den anderen Systemen nur jeweils einer. Im Gegensatz zu allen weiteren Systemen sind die Zellen im Sybiol™-System nicht unmittelbar immobilisiert, sondern werden in einem weiteren Kreislauf in Form suspendierter Aggregate kontinuierlich durch den interkapillaren Raum des Hollow-Fibers transportiert (LI et al. 1993).

Der hexagonale Hollow-Fiber-Reaktor der Firma Hybrid Organ (MELS®¹, GERLACH 1996, siehe Abb. 2.9) gilt als das mit Abstand am besten untersuchte bioartifizielle Leberunterstützungssystem (KOEBE, SCHILDBERG 1998).

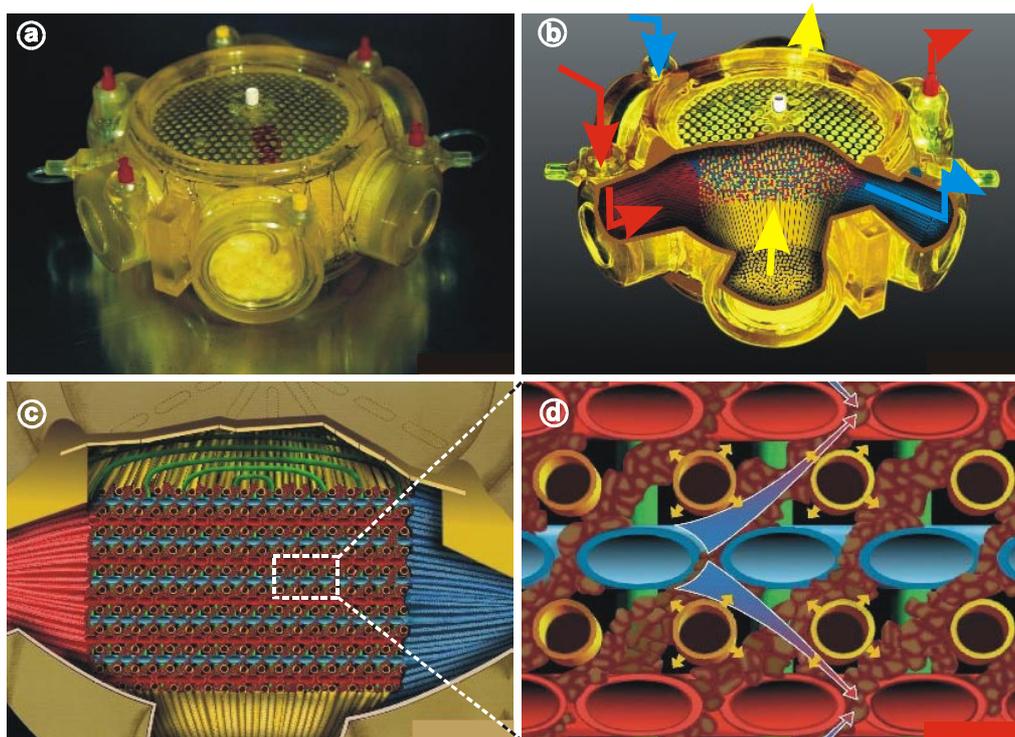


Abb. 2.9: Der MELS®-Reaktor. **a:** Gesamtansicht des Systems. **b:** Schematische Ansicht des teilgeöffneten Systems. Die Pfeile geben die Strömungsrichtungen durch das System im *Konvektionsbetrieb* wieder (rot, blau = Flüssigkeitsströme, gelb = Gasstrom). **c:** Schematischer Querschnitt durch das Membrannetzwerk. **d:** Vergrößerter Ausschnitt des Membrannetzwerks und interkapillar angeordneten Leberzellen (braun). Die Pfeile geben die Strömungsrichtungen durch das System im *direkten Perfusionsbetrieb* wieder: Die durch die blauen Kapillaren zugeführte Flüssigkeit gelangt über die Membranporen in den mit Zellen besetzten Interkapillarraum. Von dort aus wird die Flüssigkeit über die roten Kapillaren aus dem System entfernt. (gelbe Pfeile = Gasdifffusion, grün = Stützgewebe (*engl. spacer*)).²

¹ MELS = Modular Extracorporeal Liver System (vormals BELS = Berlin Extracorporeal Liver System)

² mit freundlicher Genehmigung durch Dr. J. Gerlach, Virchow-Klinikum, Berlin

Der MELS[®]-Reaktor enthält ein Membrannetzwerk aus drei miteinander verflochtenen unabhängigen Membranbündeln, die die Ausbildung leberzelltypischer dreidimensionaler Mikrostrukturen mit geringen Metabolitengradienten ermöglicht (GERLACH et al. 1995). Zwei dieser Membranbündel sind flüssigkeitsführend und hydrophil. Das dritte, hydrophobe Membranbündel dient der Oxygenierung der interkapillar angeordneten Zellen. U. a. in diesem Punkt unterscheidet sich der MELS[®]-Reaktor von den übrigen Systemen, bei denen das zugeführte Blut bzw. Plasma durch einen zentralen Oxygenator mit Sauerstoff angereichert wird. Die Verwendung zweier flüssigkeitsführender Membranbündel erlaubt zwei unterschiedliche Perfusionsmodi: 1. Die *Konvektion* über eines der Membranbündel, bei der der Flüssigkeitsstrom durch die Kapillarporen entlang eines durch die Volumenvergrößerung entstehenden Druckgradienten erfolgt. Dies entspricht auch dem Flüssigkeitsstrom der übrigen bioartifiziellen Systeme, in denen konventionelle Hollow-Fiber verwendet werden (vgl. Abb. 2.8). 2. Die *direkte Perfusion*, bei der die Flüssigkeitszuführung über das eine Membranbündel und die -abführung über das andere erfolgt. Durch die statische Filtration (engl. *dead end*) wird der Fluß im Interkapillarraum und damit der Stoffaustausch gegenüber dem Konvektionsbetrieb gesteigert. In den ersten klinischen Anwendungen wurden bis zu 680 g primäre porcine Leberzellen eingesetzt (GERLACH 1998). Dies entspricht bis zu 48% der Masse eines gesunden Organs beim Menschen und übertrifft die Kapazität der anderen Systeme bei weitem.

Die klinische Anwendung bioartifizieller Leberunterstützungssysteme, soweit bisher durchgeführt, beschränkte sich auf die Behandlung akuter bzw. akut auf chronischer Leberversagen unterschiedlicher Ätiologie über einen Zeitraum von bis zu mehreren Tagen. Die Therapie wurde als erfolgreich bewertet, wenn die Patienten anschließend einer Lebertransplantation zugeführt werden konnten (ELLIS et al. 1996, WATANABE et al. 1997, GERLACH 1998). Somit sind die Systeme offenkundig geeignet, die Zeit bis zum Eintreffen eines Spenderorgans zu überbrücken (engl. *bridging to transplant*). Um jedoch die Frage zu beantworten, ob der Ersatz einzelner Leberfunktionen durch entsprechende Systeme einen therapeutischen Vorteil für Patienten mit Leberversagen bewirken kann, müssen randomisierte Studien durchgeführt werden. Jedoch ist bislang kein Konzept vorstellbar, das einer solchen Fragestellung genügen würde (HUGHES, WILLIAMS 1996). Dennoch wird diesem Therapieansatz anhand der bisher erzielten Teilerfolge in der Behandlung des Leberversagens das größte Potential für eine dauerhafte klinische Etablierung zugesprochen (ROSENTHAL 2000).

3.2.2.3.1 Zellressourcen

Die Wirksamkeit bioartifizieller Leberunterstützungssysteme bei der therapeutischen Behandlung eines Organversagens ist essentiell abhängig von der leberspezifischen Aktivität der in den Systemen angesiedelten Zellen, die idealer Weise der Aktivität *in vivo* entsprechen sollte (JAUREGUI 1999). Zumindest müssen diejenigen Leistungen erbracht werden, die das Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie als folgenreichste Komplikation eines Leberversagens unterbinden. Jedoch ist bislang noch unklar, welche Faktoren im Detail in der Pathogenese hepatischer Enzephalopathien eine Rolle spielen (MUSSEAU, BUTTERWORTH 1994). Ein weiterer Aspekt ist die notwendige unlimitierte Verfügbarkeit der jeweiligen Zellressource.

Primäre humane Hepatocyten wären eine ideale Basis für die therapeutische Anwendung bioartifizieller Leberunterstützungssysteme. Jedoch proliferieren diese Zellen *in vitro* kaum und ihre mit der Knappheit von Spenderorganen verbundene begrenzte Verfügbarkeit schließt sie für eine dauerhafte Anwendung als potentielle Quelle von vornherein aus.

Xenogene primäre Hepatocyten

In der Mehrzahl der kommerziellen Systeme werden primäre porcine Hepatocyten eingesetzt (siehe Tab. 2.3). Diese Zellen zeigen auch nach mehrtägiger *in vitro*-Kultivierung konstante Aktivitäten im Ammonium- und Cytochrom-P450-Stoffwechsel (NAIK et al. 1996). Leberspezifische Funktionen und die Viabilität der Hepatocyten können darüber hinaus durch Co-Kultivierung mit nichtparenchymalen Zellen gesteigert werden (KIM et al. 1998, OKAMOTO et al. 1998). Die Gewinnung von Hepatocyten aus Schweinen, die unter kontrollierten Quarantänebedingungen gehalten werden, gestaltet sich allerdings ökonomisch schwierig. Der infrastrukturelle, personelle und zeitliche Aufwand für die Aufzucht sowie für die operative Entnahme des Organs und Isolierung der Zellen erzeugen hohe Betriebs- und Personalkosten, die in keinem vertretbaren Verhältnis zu der vergleichsweise kostengünstigen Produktion von Zellen in Bioreaktoren stehen. Da aber primäre porcine wie primäre humane Hepatocyten *in vitro* eine sehr geringe Proliferationsaktivität aufweisen und deshalb für eine Expansion in Bioreaktoren nicht in Frage kommen, wurde die Verwendung von Schweinelebern aus Schlachthöfen vorgeschlagen (KOEBE et al. 1995). Äußerst schwer wiegt jedoch die Gefahr einer potentiellen Zoonose, die von den porcinen Hepatocyten als Träger endogener Retroviren (PERV¹) ausgeht (PATIENCE et al. 1997). Die genomische Insertion der Virus-DNA kann zur Oncogenaktivierung und damit zur Entstehung von Krebs führen (ALLAN 1997). Entsprechende Arbeitsgruppen betonen, daß in der klinischen Anwendung bioartifizieller Lebererunterstützungssysteme auf Basis porciner Hepatocyten bisher keinerlei Virusinfektionen bei den Patienten festgestellt werden konnte (PITKIN, MULLON 1999). Gleiches gilt für die Empfänger von porcinen Xenotransplantaten (HERRING et al. 2001). Dem steht jedoch der Nachweis von *in vitro*-Virustransfers in humane Primärzellen und

¹ PERV = porcine endogenous retrovirus

Zelllinien gegenüber (SPECKE et al. 2001). Das Risiko einer möglichen Infektion könnte durch den Einsatz bioartifizieller Leberersatzsysteme mit Hohlfasermembranen, deren Ausschlußgrenze unterhalb der Größe infektiöser Viruspartikel liegt, reduziert werden (NYBERG et al. 1999). Allerdings wurden bspw. in Großbritannien durch die unklare Sachlage alle klinischen Untersuchungen mit xenogenem Material bis auf weiteres untersagt (ALLAN 1997).

Tumorzelllinien

Tumorzellen haben den Vorteil, unbegrenzt teilungsfähig zu sein. Die Verfügbarkeit ausreichender Zellmengen durch Kultivierung von Zelllinien, die aus Lebertumoren generiert werden können, wäre damit kein Problem. Die patentierte Zelllinie C3A (ATCC¹ CRL-10741, KELLY 1994), die aus der etablierten Hepatoblastom-Zelllinie Hep G2 hervorgegangen ist (ATCC¹ HB-8065, KNOWLES, ADEN 1983), wird im ELADTM-System der Firma VitaGen eingesetzt (siehe Tab. 2.3). Der Zelllinie wird ein hoher Differenzierungsgrad für verschiedene leberspezifische Parameter (z.B. Albuminproduktion) zugesprochen. Vergleiche zwischen C3A bzw. der Vorläuferlinie Hep G2 und primären Hepatocyten bescheinigen der Tumorzelllinie allerdings deutlich niedrigere Aktivitäten (z.B. Harnstoffsynthese, Cytochrom-P450-Aktivität) (STANGE, MITZNER 1995, WANG et al. 1998). Bei einer Untersuchung mit Hep G2 in einem System, das dem LIVERx 2000TM-System entspricht (siehe Tab. 2.3), migrierten die Zellen aktiv durch die Kapillarporen in den Patientenkreislauf (NYBERG et al. 1994). Ein solches, für den Patienten möglicherweise fatales Migrationsverhalten konnte auch bei C3A im MELS[®]-System beobachtet werden.² Zudem sind gegenüber primären Hepatocyten häufig variierte Proteinexpressionsmuster bei Hepatomazelllinien zu verzeichnen (ZEINDL-EBERHART, RABES 1992).

SV40-immortalisierte Hepatocytelinien

Die limitierte Verfügbarkeit primärer humaner Zellen und die Gefahren, die von xenogenen Leberzellen bzw. Tumorzelllinien ausgeht, schließen derartige Zellquellen für die langfristige Etablierung der bioartifiziellen Leberunterstützung aus. Die ideale Ressource wäre daher eine humane Zelllinie mit nicht-malignem Phänotyp, die sich schnell bis zu hohen Zellkonzentrationen kultivieren läßt, über einen langen Zeitraum einen hohen Differenzierungsgrad behält und dadurch synthetisierende und detoxifizierende Eigenschaften besitzt wie humane Hepatocyten *in vivo* (HOOFNAGLE et al. 1995). Eine Strategie zur Entwicklung derartiger Zelllinien ist die gezielte genetische Manipulation zur Immortalisierung primärer Leberzellen (engl. *genetic engineering*). Seit einigen Jahren werden Hepatocyten unterschiedlicher Spezies mit dem für das sog. large T-antigen codierenden Oncogens des *Simian Virus 40* (Kurzform: SV40) immortalisiert. Dieses SV40-Gen wird nach erfolgter Transfektion in das Genom der Zielzelle integriert. Das daraufhin in der Zielzelle exprimierte large T-antigen (T-Ag) inhibiert die zentralen Tumorsuppressorpro-

¹ ATCC = American Type Culture Collection, Manassas (VA), USA - <http://www.attc.org>

² Mitteilung durch Dr. K. Zeilinger beim Arbeitsgruppentreffen vom 7.5. 2001 in Rostock-Warnemünde

teine Retinoblastomprotein (pRB) und p53 durch Bindung an diese im Zellkern befindlichen Eiweißmoleküle (LUDLOW 1993). Dies verhindert die Arretierung ausdifferenzierter Zellen in der G₀-Phase (Ruhephase) des Zellzyklus. Statt dessen durchlaufen die so manipulierten Zellen einen kontinuierlich fortlaufenden Wechsel zwischen DNA-Synthese (G₁ und S-Phase) und Mitose (G₂- und M-Phase), wodurch sie proliferieren.

In Japan wurden auf diese Weise immortalisierte humane Hepatocytelinien aus foetalen Leberzellen entwickelt, die Cytochrom-P450-Aktivitäten auf mRNA-Ebene aufwiesen (OUMS-29, FUKAYA et al. 2001) und bei denen leberspezifische Proteinsynthesen (Albumin, Cytokeratin 7 im Immunoblot) nachgewiesen werden konnten (NFL/T, ISHIDA et al. 1995). Da leberspezifische Aktivitäten bei Hepatocyten insbesondere während der G₀-Phase stark ausgeprägt sind, wurden Versuche unternommen, transient induzierbare T-Ag-Konstrukte in humane Leberzellen zu klonieren. Durch diese Maßnahme ist es theoretisch möglich, selektiv vom proliferierenden Stadium zur G₀-Phase zu wechseln. Bei einer ersten thermisch induzierbaren humanen Hepatocytelinien zeigte sich bei der notwendigen Induktionstemperatur (33,5°C) ein nur sehr schwaches Wachstum mit einer Verdopplungsdauer von bis zu 14 Tagen. Weder während der Proliferationsphase noch nach Wachstumsarretierung der Zellen durch Temperaturerhöhung auf 39,5°C waren Cytochrom-P450-Aktivitäten meßbar. Besonders bemerkenswert ist, daß selbst bei Nicht-Induktion T-Ag exprimiert wurde (SMALLEY et al. 2000).

Das Hauptproblem von SV40 T-Ag immortalisierten Zellen als Ressource für bioartifizielle Leberunterstützungssysteme ist die Gefahr, daß durch vesikulären Transport - z.B. infolge apoptotischer Vorgänge - die virale DNA auf Körperzellen des Patienten übertragen wird und damit Krebs hervorrufen kann. Ferner kann T-Ag - unabhängig von der Inhibition der Tumorsuppressorproteine - auf bisher noch unbekannte Weise eine unerwünschte Transformation der Hepatocyten zu Krebszellen verursachen (SACHSENMEIER, PIPAS 2001).

Reversibel immortalisierte Hepatocytelinien

Ein neuer Ansatz geht zwar ebenfalls von T-ag immortalisierten Hepatocyten aus. Allerdings ist hier das genomisch integrierte Virus-Gen von spezifischen Restriktionsschnittstellen (LoxP-sites) flankiert. Durch eine zweite, zur ersten zeitlich versetzte Transfektion wird in den Zellen transient das Enzym Cre-Rekombinase exprimiert, welches das T-Ag-Konstrukt an den LoxP-sites aus dem Genom ausschneidet. Von einer etablierten humanen Zelllinie (NKNT-3) mit diesen Eigenschaften wurde bereits berichtet (KOBAYASHI et al. 2000). NKNT-3 zeigte nach Cre/Lox-site spezifischer Rekombination leberspezifische Aktivitäten auf mRNA-Ebene (Harnstoffsynthese-Enzyme, Albumin, Phase-II-Enzyme, etc.) und ermöglichte im Tiermodell durch zellulärer Transplantation das Überleben von Ratten nach 90%iger Hepatectomie. Während 100% der nicht-transplantierten hepatectomierten Ratten innerhalb der ersten vier Tage starben, lebten nach 30 Tagen Beobachtungszeitraum noch 60% der mit Tacrolimus immunsuprimierten Transplantatempfänger.

Derartigen Ansätzen werden gegenwärtig die größten Chancen eingeräumt, dauerhaft das Problem der Bereitstellung geeigneter Zellen für bioartifizielle Leberersatzsysteme zu lösen (TSIAOUSSIS et al. 2001). Im Rahmen des in der Einleitung aufgeführten Verbundprojektes (siehe Kapitel I) wurden daher vergleichbare Immortalisierungsstrategien bei der Firma Develogen in Göttingen (bzw. HepaVec, Berlin-Buch) verfolgt. Die aus diesen Arbeiten generierten Zelllinien wurden für die hier vorgestellten Untersuchungen herangezogen.

III. Aufgabenstellung

1. Vermehrung der Hepatocyten

Die Expansion der Hepatocyten mit den geforderten Eigenschaften zur Erzeugung geeigneter Zellmengen für die Applikation in bioartifiziellen Leberersatzsystemen geschieht idealerweise in Rührkesselreaktoren und nicht im Hollow-Fiber (Anwendungsreaktor). In solchen Bioreaktoren werden im Vergleich zu Hollow-Fiber-Systemen durch homogene Durchmischung lokale Substratlimitierungen der Zellen vermieden. Ferner können durch die implementierte Meß- und Regeleinheit einige wichtige Parameter (Sauerstoffkonzentration, pH-Wert) im für die Hepatocyten optimalen Bereich konstant gehalten werden. Die Beobachtung der Zellproliferation sowie die biochemische Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen ist durch eine komfortable und steriltechnisch sichere Entnahme von Proben aus dem Reaktor möglich. Hierdurch sind Informationen über den jeweils aktuellen Kulturzustand gewährleistet, die ggf. notwendige manuelle Eingriffe in das System ermöglichen. Daher sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die zumeist strikt adhärent wachsenden Hepatocyten in gerührten Bioreaktorsystemen zu hohen Zellkonzentrationen zu expandieren.

2. Alternativen zur Bereitstellung der Hepatocyten

Für die klinische Anwendung ist es notwendig, Strategien zu entwickeln, die die zeitlich bedarfsgerechte Bereitstellung der Zellen ermöglichen, d.h. die Zellen sollten unmittelbar zum individuellen Beginn der Therapie zur Verfügung stehen. Dazu gehört ein Transfer der expandierten Zellen vom Bioreaktor in den Anwendungsreaktor (z.B. MELS[®]).

2.1 Direkter Transfer

Die einfachste Methode, Expansion der Zellen, Zelltransfer und klinische Anwendung miteinander zu verbinden ist nachfolgend dargestellt.



Abb. 3.1: Direkter Transfer der Zellen zur klinischen Anwendung bioartifizieller Leberunterstützungssysteme.

Nach der Expansion der Zellen in Gewebekulturflaschen (T-Flaschen) und Bioreaktor erfolgt der Transfer in den Anwendungsreaktor. Dieser wird dann an den Patienten angeschlossen. Ein Teil der Zellen aus dem Bioreaktor kann zudem einer erneuten Expansion zugeführt werden. Jedoch erweist sich dieser Weg für eine Anwendung im Bedarfsfall als unrealistisch, da eine schnelle Einsatzbereitschaft durch den mehrwöchigen Zeitaufwand für die Expansion und die notwendige interkapillare Anordnung der Zellen im Anwendungsreaktor nicht gewährleistet werden kann. Aus diesem Grund müssen Expansion der Zellen und Zelltransfer von der klinischen Anwendung entkoppelt werden. Dies kann durch eine kontinuierliche Bereitstellung der Zellen - entweder nach Expansion im Bioreaktor oder nach anschließendem Transfer in den Anwendungsreaktor - erfolgen. Die Aufrechterhaltung der erwünschten hohen Stoffwechselaktivität der Zellen unter physiologischen Bedingungen ist jedoch mit einem hohen Umsatz von Kulturmedium und dementsprechenden Verbrauchskosten verbunden.

Die Unvorhersehbarkeit einer notwendigen therapeutischen Anwendung macht die Kosten für eine solche Bereitstellung unkalkulierbar. Deshalb ist eine steuerbare Rate des Metabolismus der Zellen wünschenswert, die den Medienverbrauch auf ein Minimum reduziert. Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Bedingungen für eine reduzierte Rate des Zellmetabolismus zu finden, bei der die Zellen möglichst nicht geschädigt werden und der Stoffwechsel jederzeit auf ein Maximalniveau gebracht werden kann.

2.2 Kontinuierliche Bereitstellung unter hypothermischen Bedingungen

Eine Reihe einheimischer Kleinsäuger wie Bilche (lat. *Gliridae*, z.B. Siebenschläfer, Haselmaus), Wühler (lat. *Cricetidae*, z.B. Hamster), Hörnchen (lat. *Sciuridae* z.B. Ziesel, und Murmeltier) und Fledermäuse (lat. *Microchiroptera*) übersteht die Wintermonate, indem sie in einen Zustand der Lethargie verfallen, den man als Winterschlaf (*Hibernation*) bezeichnet (PENZLIN 1991, S. 397-401). Während dieser Zeit beträgt der Stoffwechsel nur etwa 1-5% der normothermischen Ausgangsrate, wodurch eine beachtliche Menge Energie eingespart wird (ALIOA, RAISON 1989). Die Körpertemperatur der Tiere sinkt dabei auf einen Wert, der etwa der Umgebungstemperatur entspricht und beim Erdhörnchen (lat. *Spermophilus sp.*) auf bis zu 1°C abfallen kann (LYMAN, O'BRIAN 1974). Im Gegensatz zu poikilothermen Tieren (z.B. Reptilien), die in eine Winterstarre (*Torpor*) übergehen, ist dieser Prozeß nicht das Ergebnis der simplen Einstellung normothermer Aktivität. Vielmehr sind diese homoiothermen Tiere in der Lage, durch adaptive Hypothermie, in der die Sollwerttemperatur auf ein niedriges Niveau reguliert wird (NEDERGAARD, CANNON 1990), die metabolische Balance enzymatischer Prozesse aufrecht zu erhalten (HELLER, HAMMEL 1972). Besondere Kennzeichen dieses Status ist die Arretierung der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und die verstärkte Expression von Proteaseinhibitoren zur Minderung der Proteindegradation (KOLAEVA et al. 1980, SRERE et al. 1992).

In der Transplantationsmedizin werden durch kurzfristige Temperaturniedrigungen Organe über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden konserviert. Für die Konservierung wurden eigens Präservationslösungen entwickelt, deren Rezeptur insbesondere auf die Verhinderung anoxischer Zelldegeneration unter ischämischer Hypothermie und Zellschädigung nach normothermischer Reperfusion abzielt. Die Ende der 1960er Jahre für die Nierentransplantation entwickelte Euro-Collins-Lösung¹ (COLLINS et al. 1992) wurde in den 1980er Jahren durch die University-of-Wisconsin-Lösung (UWS²) abgelöst (BELZER, SOUTHARD 1988). Die UWS basiert auf einer phosphatgepufferten Elektrolytlösung mit einer intrazellulären Kationenzusammensetzung, sowie weiteren osmotisch, kolloidal und antioxidativ wirkenden Substanzen (SOUTHARD et al. 1990). Inzwischen wird die UWS erfolgreich in der Leber-, Nieren und Pankreaskonservierung eingesetzt (D'ALLESSANDRO et al. 1994). Doch auch mit deutlich simpler komponierten Lösungen wie die Histidin-Tryptophan- α -Ketoglutarat-Lösung (Bretschneiders HTK-Lösung³) und die CelsiorTM-Lösung⁴ ist eine erfolgreiche hypotherme Präservierung abdominaler Organe vor der Transplantation möglich (DE BOER et al. 1999, NARDO et al. 2001).

Die hypothermische Lagerung könnte daher eine sinnvolle Strategie für die kontinuierliche Bereitstellung von Hepatocyten zur Applikation in bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen sein. Die Präservierung von Lebertransplantaten führt unter diesen Bedingungen allerdings häufig zu ultrastrukturellen Veränderungen der Kupffer'schen Zellen. Durch normothermische Reperfusion mit den zuvor genannten Präservationslösungen unmittelbar vor der Transplantation werden diese nicht-parenchymalen Zellen (siehe II.1.4) aktiviert und entlassen dabei eine Reihe potentiell cytotoxischer Substanzen (u.a. TNF- α), die die Degradation des parenchymalen Gewebes hervorrufen können (CALDWELL-KENKEL et al. 1991, ARII et al. 1994). Weiterhin werden durch die Reperfusion Sinusendothelzellen zerstört, wodurch vermehrt Leucocyten und Trombocyten an die Wandung der Sinusoide adhären. Dies führt zur nachhaltigen Störungen der Microcirculation des Organs. Schließlich kulminieren diese Ereignisse in Entzündungsreaktionen, Nekrosen und einem dadurch verursachten Transplantatversagen (LEMASTERS et al. 1995). Die Carolina-Rinse-Lösung⁵ wurde mit dem Ziel entwickelt, diese Reperfusionsschäden zu vermeiden (CURRIN et al. 1990). Sie enthält u.a. vasodilatativ wirkende Substanzen (Adenosin und Nicardipin), die Störungen der hepatischen Microcirculation verhindern, und wurde bereits klinisch erfolgreich eingesetzt (BACHMANN et al. 1997). Positiv synergetische Effekte wurden im Tiermodell in Kombination mit UWS festgestellt (POST et al. 1993).

Die Problematik der *in vivo*-Situation entfällt bei der hypothermischen Konservierung isolierter Hepatocyten. Deshalb erschien eine direkte Übertragung der Methoden der Organkonservierung auf die Konservierung von Hepatocyten wenig sinnvoll.

¹ EuroCollins, Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH, Fresenius AG, Oberursel

² UWS = University of Wisconsin solution = ViaspanTM, DuPont Pharmaceuticals, Wilmington (DE), USA

³ HTK solution, Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein

⁴ CelsiorTM cold storage solution, SangStat, Fremont (CA), USA

⁵ US-Patent 5,145,771 (LEMASTERS, THURMAN 1992)

Viel zweckmäßiger versprach daher die Lagerung der Zellen unter Verwendung von Standardmedium zu sein. Die Möglichkeiten von Standardmedium als Präservationslösung für die hypothermische Konservierung von Hepatocysten wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht. Eine Lagerung im Bioreaktor erschien dabei vorteilhaft, da im Gegensatz zum Anwendungsreaktor hier eine effektive Überwachung und Kontrolle essentieller zellspezifischer Parameter zum Zeitpunkt der hypothermischen Lagerung und auch der Rethermierung gewährleistet ist. Weiterhin ist hierdurch eine Abreicherung von toten Zellen und damit eine Erhöhung der Viabilität der Zellen vor der Applikation in den Anwendungsreaktor möglich. In Anlehnung daran sähe die Strategie für die kontinuierliche Bereitstellung der Zellen wie folgt aus (siehe Abb. 3.2).

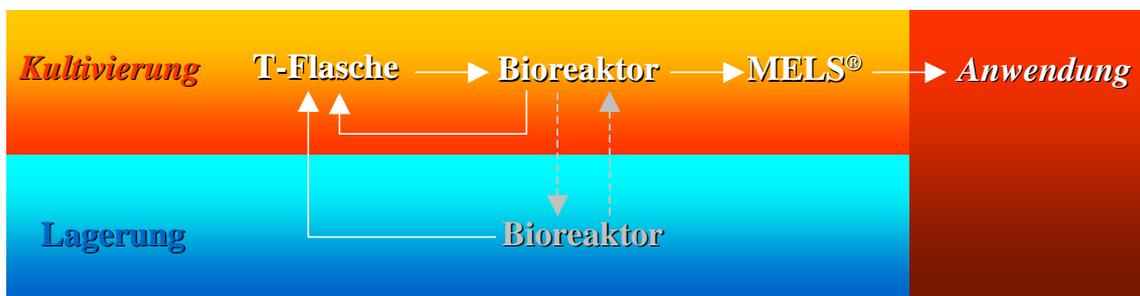


Abb. 3.2: Kontinuierliche Bereitstellung der Hepatocysten durch hypothermische Lagerung im Bioreaktor.

Nach einer Expansion der Zellen in T-Flaschen und Bioreaktor wird der Bioreaktor zur Konservierung der Zellen abgekühlt. Bei Anwendungsbedarf wird zur Reaktivierung der Zellen der Bioreaktor wieder auf die normothermische Temperatur erwärmt. Anschließend erfolgt der Transfer der Zellen in das bioartifizielle Leberersatzsystem und kann dadurch der Anwendung am Patienten zugeführt werden. Wenn die Bedingungen für eine optimale Konservierung und Reaktivierung der Zellen im Bioreaktor bekannt sind, wäre eine Übertragung dieser Bedingungen auf den Anwendungsreaktor denkbar. Dies hätte zeitliche, finanzielle und logistische Vorteile, da die parallele Bereitsstellung mehrerer Anwendungsreaktoren deutlich einfacher zu bewerkstelligen ist als die mehrerer Bioreaktoren und ferner zum Zeitpunkt des Anwendungsbedarfs ein ansonsten notwendiger Zelltransfer entfällt.

2.2.1 Hypothermische Konservierung *versus* Kryokonservierung

Die Kryokonservierung, d.h. das Einfrieren bei -196°C in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff, ist eine bereits seit langem etablierte Methode zur Konservierung von Zellen oder Geweben. Bereits 1866 untersuchte der Italiener Mantegazza das Einfrieren und Auftauen

von Spermien mit dem Ziel, diese Technik bei der Tierzucht anzuwenden (DOYLE et al. 1988), doch Versuche mit somatischen Säugerzellen blieben lange Zeit erfolglos. Wässrige Lösungen können auf wenige Grad unterhalb ihres Gefrierpunkts abgekühlt werden (engl. *supercooling*), bis durch sog. heterogene Nucleation die Kristallisation des Wassers einsetzt und Eiskristalle gebildet werden. Die Bildungsgeschwindigkeit ist dabei direkt proportional zur Temperaturerniedrigung. Da wässrige Lösungen ein sog. eutektisches Gemisch darstellen, werden die in der Ausgangslösung enthaltenen Salze nicht in die Kristalle eingebunden. Folgerichtig steigt proportional zur Temperaturerniedrigung die Konzentration dieser Salze in der verbleibenden Flüssigphase und damit das osmotische Potential. Es gibt Hinweise darauf, daß dieser Prozeß *in vitro* im Cytosol von Säugerzellen nur sehr zögerlich abläuft (FRANKS et al. 1983). Dadurch findet die Eisbildung zunächst fast ausschließlich in dem die Zellen umgebenden Medium statt. Der Ausgleich des höheren extrazellulären osmotischen Potentials vollzieht sich, indem Wasser durch die semipermeable Zellmembran aus den Zellen in das umgebende Medium strömt. Die Permeabilität der Zellmembran entscheidet in Relation zum Anstieg der extrazellulären Salzkonzentration während der Temperaturerniedrigung, ob der isoosmotische Zustand durch Wasserausstrom (Efflux) oder intrazellulärer Eisbildung stattfindet (MAZUR 1970). Da Permeabilität der Zellmembran und Eisbildung Funktionen der Temperatur sind, ergibt sich in Abhängigkeit zur Abkühlungsgeschwindigkeit beim Einfriervorgang folgendes Bild (siehe Abb. 3.3).

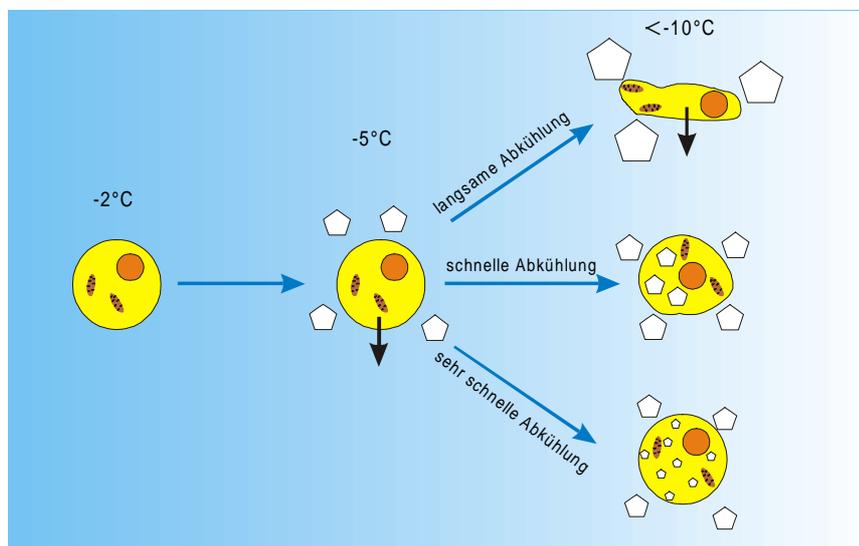


Abb. 3.3: Reaktion eukaryontischer Zellen auf das Einfrieren. *Langsame Abkühlung:* Die Einstellung des isoosmotischen Zustands erfolgt durch Efflux (schwarzer Pfeil). Dadurch schrumpft die Zelle und nur extrazelluläres Eis wird gebildet. *Schnelle Abkühlung:* Die Zelle verliert nicht genug Wasser, um ein isoosmotisches Gleichgewicht zur Umgebungslösung herzustellen. Dies geschieht durch die intrazelluläre Bildung größerer Eiskristalle. *Sehr schnelle Abkühlung:* Das isoosmotische Gleichgewicht wird durch die intrazelluläre Bildung kleiner Eiskristalle hergestellt (nach MAZUR 1977).

Die Anwesenheit intrazellulärer Eiskristalle führt insbesondere beim Auftauvorgang zu einer mechanischen Schädigung der Zellen (FARRANT 1977). Beschleunigt wird dieser Vorgang durch Aggregation kleiner zu großen Eiskristallen während des Auftaus (VANDERZWALMEN et al. 1998). Beim langsamen Einfriervorgang verursacht offenbar der schnelle Wasserausstrom eine Zerstörung des Cytoskeletts, wodurch der Gesamtmetabolismus der Zellen erlahmt (CLEGG et al. 1982). Ferner wird durch das Schrumpfen und die hohen Salzkonzentrationen die Zellmembran direkt geschädigt (MERYMAN 1971, LOVELOCK 1953).

Aufgrund dieser Umstände ist die Modifizierung der intra- bzw. extrazellulären Flüssigkeitskomposition durch Verwendung kryoprotektiver Substanzen für eine erfolgreiche Kryokonservierung von Zellen unumgänglich. Glycerin und Dimethylsulfoxid (DMSO) erwiesen sich als vorteilhafte niedermolekulare Kryoprotektiva. Die Wirkung des Glycerins scheint dabei auf einer "Pufferung" der extrazellulären Salzkonzentration zu beruhen, wodurch direkte Membranschädigungen vermieden werden (LOVELOCK 1953). Eine entsprechende Wirkung wird auch für DMSO angenommen (FARRANT 1965). Auf Grund ihrer geringen Molekülgröße können beide Substanzen in die Zellen eindringen und einen Teil des ausströmenden Wassers ersetzen. Gleichzeitig bewirken sie eine Gefrierpunktniedrigung der Lösung. Da sie zusätzlich die Eiskristallisationskinetik verlangsamen, wird auch die Neigung zur intrazellulären Eisbildung geringer (DILLER 1979).

Alternative Kryoprotektiva sind makromolekulare Substanzen wie z.B. Hydroxyethylstärke (HES), die auch in der UW-Lösung (siehe III 2.2) enthalten ist. Diese Kryoprotektiva sind aufgrund ihrer Größe auf den Extrazellulärraum beschränkt. Sie reduzieren den extrazellulären Anstieg der Salzkonzentration und verringern in Verbindung mit der höheren Lösungsviskosität die Zellschrumpfung. Gleichzeitig bewirken sie, daß ein Teil des Wassers kinetisch am Auskristallisieren gehindert wird. Zwar wurde HES erfolgreich bei der Kryokonservierung von Erythrocyten eingesetzt (THOMAS et al. 1996), doch ist offenbar die Anwendung derartiger Schutzadditive auf diesen Zelltypus beschränkt. So ist DMSO das bisher erfolgreichste Kryoprotektivum. Durch Lagerung der Zellen bei -196°C in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff können Zellen so über Jahre konserviert werden (HALLE 1975, S. 29).

Untersuchungen zur Kryokonservierbarkeit primärer Hepatocyten unterschiedlicher Spezies mit DMSO haben jedoch gezeigt, daß die Überlebensrate (Viabilität) nach dem Auftauen selbst bei nur kurzer Lagerungsdauer (24 Stunden) und optimierten Abkühlungs- und Auftaugeschwindigkeiten häufig gering ist. Die Viabilität unmittelbar nach dem Auftauen war gegenüber den frisch isolierten Zellen durchschnittlich um 10-25% reduziert (GUILLOUZO et al. 1999), doch auch Verluste von fast 40% zur viablen Ausgangszellmenge wurden registriert (MAGANTO et al. 1990). Durch die nachfolgende normothermische Reaktivierung der Zellen nach Abreicherung von DMSO können weitere Verluste auftreten. Von einer Gesamtreduktion der Viabilität durch Lagerung, Auftauen und Reaktivierung von bis zu 78% wurde berichtet (UTESCH et al. 1992).

Ein generell gravierender Nachteil niedermolekulärer Kryoprotektiva ist, daß sie in den notwendigen Konzentrationen in der Regel toxisch sind und daher nach dem Auftauen kosten- und zeitaufwendig aus den Zellen ausgewaschen werden müssen. Auch die Zugabe der Additive muß sehr schonend erfolgen, um eine zu große osmotische Zellbelastung bereits vor dem Einfrieren zu vermeiden. Zudem wird die Sensitivität gegenüber Schädigungen bei Temperaturerniedrigungen durch DMSO erhöht (BRAIN et al. 1990). Der Verlust vitaler primärer Hepatocyten nach Kryokonservierung und Reaktivierung, die Cytotoxizität der Kryoprotektiva und der Aufwand beim Einfrieren und Wiederauftauen, der sich bei der Handhabung der für den bioartifiziellen Leberersatz notwendigen Zellmengen potenziert, rechtfertigt die Suche nach Alternativmethoden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich durch hypothermische Konservierung gegenüber der Kryokonservierung bessere Ergebnisse erzielen lassen.

IV. Material und Methoden

In dem folgenden Kapitel werden die Materialien und die Methoden näher beschrieben, die den vorliegenden Untersuchungen zugrunde lagen. Das Kapitel gliedert sich in zwei Abschnitte. Der erste Abschnitt behandelt die Materialien und Methoden, die für die Kultivierung, Expansion, Niedrigtemperaturlagerung und Kryokonservierung angewendet wurden. Im zweiten Abschnitt werden diejenigen bildgebenden und biochemisch analytischen Verfahren vorgestellt, die der Vorbereitung der Experimente dienten bzw. auf deren Grundlage die einzelnen Experimente ausgewertet wurden. Experimentspezifische Anwendungen der einzelnen Methoden werden in den einzelnen Unterpunkten des Kapitels V (Ergebnisse und Diskussion) eingehend erläutert.

1. Zellkultivierung

1.1 Die Hepatocytelinien

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit drei unterschiedlichen Hepatocytelinien durchgeführt. Von diesen waren zwei murinen und eine humanen Ursprungs.

1.1.1 HepT

HepT ist eine murine Hepatocytelinie, die durch adenovirale T-Ag Immortalisierung primärer Hepatocyten aus weiblichen Mäusen generiert wurde (PAUL et al. 1988, KIRILLOVA 1996). Diese Zelllinie wurde durch die Firma HepaVec, Berlin-Buch (jetzt DeveloGen, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

1.1.2 K105

Wie HepT ist auch K105 eine murine Hepatocytelinie und als sog. ELS-Linie (engl. *extended life span*) charakterisiert. Als Ausgangsmaterial dienten transgene Mäuse, die durch retrovirale Transfektion und Inzucht-Kreuzungen homozygote Träger eines genomisch integrierten und von loxP-Sequenzen flankierten Exons 19 des Retinoblastom-Gens waren (sog. Rblox-Mäuse). Aus diesen Mäusen isolierte Hepatocyten wurden mit den beiden Plasmiden pCMVCre-puro und pCMVT-Ag-ori cotransfiziert. Durch Selektion mit Puromycin erhielt man Hepatocyten, bei denen durch Cre-Exzision des loxP-flankierten Exons 19 die Expression des Tumorsuppressorproteins Retinoblastom ausgeschaltet war und die zeitgleich durch Expression des large T-Ag einen weiteren Proliferationsstimulus erhielten. Durch fortlaufende Zellteilungen wurde das plasmidär vorliegende und nicht

replizierbare T-Ag-Gen ausverdünnt. Durch entsprechende Subklonierung entstanden Klone, die nachweislich keine T-Ag-Präsenz mehr aufwiesen und dennoch teilungsfähig waren. Dieses wurde auf die Akkumulation unbestimmter Mutationen zurückgeführt. Einer dieser Klone mit der Bezeichnung K102 zeigt eine deutliche Hepatocytenmorphologie, wuchs jedoch serumfrei und auch tumorigen in Weichagar.

Um den Effekt des entfernten Rb-Proteins in K102 zu beurteilen, wurden Hepatocyten des Rblox-Mäusestammes allein mit dem Plasmid pCMVT-Ag-ori transfiziert, ohne das Gen für den Tumorsuppressor Retinoblastom auszuschalten. Eine auf diese Weise erfolgreich klonierte Linie wurde durch ein anhaltendes Wachstum bei längerer Kultivierungsdauer identifiziert. Diese Linie mit der Bezeichnung K105 besitzt ein funktionsfähiges Retinoblastom-Protein und exprimiert durch Ausverdünnung des Plasmids pCMVT-Ag-ori kein large T-Ag mehr. Die Zellen dieser Linie sind demnach auf bisher noch unbekannte Weise immortalisiert. K105 wächst serumabhängig und zeigt Kontaktinhibition bei Konfluenz. Diese Zelllinie wurde ebenfalls durch die Firma HepaVec, Berlin-Buch (jetzt DeveloGen, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

1.1.3 C3A

C3A ist eine humane Hepatocytenlinie, die aus der etablierten Hepatoblastomzelllinie Hep G2 hervorgegangen ist (vgl. II.3.2.2.3.1) Subklonierungskriterien für die Generierung von C3A waren eine starke Kontaktinhibition des Wachstums, eine hohe Produktionsrate für Albumin und α -Fetoprotein, sowie die Fähigkeit, in glucosedefizientem Medium zu wachsen. Trotz ihres carcinomalen Ursprungs zeigte die Zelllinie keine Tumorgenität in immundefizienten Mäusen (KELLY 1994). C3A wird als biologische Komponente des ELAD™-Systems der Firma VitaGen bereits klinisch eingesetzt (siehe Tab. 2.1) und wurde für die vorliegenden Untersuchungen von der American Type Culture Collection (ATCC Number CRL-10741) bezogen.

1.2 Die Kulturmedien

In vorangestellten Experimenten wurde untersucht, ob die Zelllinien unter serumfreien Bedingungen wachsen. Dazu wurde zum einen ein für die Hybridom-Kultivierung komponiertes Medium mit Rinderinsulin und Humantransferrin als Proteinkomponenten (IDING et al. 2001) sowie ein eigens für die serumfreie Kultivierung von primären Hepatocyten entwickeltes Medium, welches den Hepatocytenwachstumsfaktor (HGF = hepatocyte growth factor) enthielt (ALFONSO et al. 1995), benutzt.

Alle Versuche zur Expansion der Zellen, für Vergleichskultivierungen und Niedrigtemperaturlagerungsexperimente wurden mit einem Standardmedium durchgeführt, das sich aus einer 1:1-Mischung der beiden Basalmedien DMEM (DULBECCO,

FREEMANN 1959) und Ham's F12 (HAM 1965) der Fa. GIBCO BRL (Invitrogen, Karlsruhe) zusammensetzte. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) zeichnet sich durch seinen hohen Gehalt an Aminosäuren aus, Ham's F12 ist besonders reichhaltig an Spurenelementen. Aufgrund prinzipieller Serumabhängigkeit der eingesetzten Zelllinien wurde dem Medium 5% (v/v) foetales Kälberserum (FCS, Seromed[®] Lot No. 654S, Biochrom, Berlin) zugesetzt. Die Verwendung von Serum bei der Niedrigtemperaturlagerung erschien vorteilhaft, da enthaltene Schutzsubstanzen generell toxische Effekte vermindern können (THORPE et al. 1987). Ferner konnte so die Praxis der Firma VitaGen verifiziert werden, im Bedarfsfall das ELAD[™]-System samt C3A-Zellfracht mit serumhaltigen Medium bei 4°C zu konservieren¹.

Die Konzentrationen von Glucose, Glutamin, Prolin, Pyruvat im Standardmedium wurden durch Supplementierung der Einzelsubstanzen erhöht (siehe Tab. 4.1). Als Pufferungssystem wurde in Kombination mit CO₂-Begasung Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) eingesetzt (LINDL, BAUER 1994, S. 77f.).

Tab. 4.1: Zusammensetzung des Standardmediums für die Kultivierung und Niedrigtemperaturlagerung.

Substanz	Mr (g/mol)	Bezugsquelle	Einwaage/Liter	Einheit	Konzentration im Medium
DMEM		Invitrogen, Karlsruhe	5,75	g	
Ham's F12		"	5,75	g	
FCS		Biochrom, Berlin	50	ml	5 % (v/v)
Glucose	180,2	Sigma, Steinheim	3	g	18 mM
Na-Pyruvat	110	Serva, Heidelberg	220	mg	3 mM
NaHCO ₃	84,01	J.T.Baker, Deventer (NL)	2,44	g	29 mM
Glutamin	146,15	Merck, Darmstadt	292	mg	4,5 mM
Prolin	115,13	"	20	mg	0,3 mM

Das Standardmedium enthielt Phenolrot als pH-Indikator. Da dies jedoch einen störenden Einfluß bei der biochemischen Bestimmung der Cytochrom-P450-Aktivitäten im ultravioletten Wellenlängenbereich hat (siehe Abschnitt IV.2.2.5) wurde hier ein phenolrotfreies Medium mit der Bezeichnung T002 verwendet. Dieses Medium war bereits in anderem Zusammenhang Bestandteil vorangegangener Arbeiten (HAWERKAMP 1999) und wurde durch Dr. C. Wallerius (Roche Diagnostics, Penzberg) zur Verfügung gestellt. Durch entsprechende Substanzzugaben wurde das Medium so aufsupplementiert, daß die jeweiligen Nährstoffkonzentrationen denen des Standardmediums entsprachen. Die FCS-Konzentration lag hier allerdings bei 10% (v/v).

¹ schriftliche Mitteilung auf Anfrage durch Dr. P. Maguire, VitaGen, La Jolla (CA), USA vom 9.2. 2000

1.2.1 Mediumherstellung, Sterilisation und Lagerung

Die Mediumkomponenten wurden in Chargen von 10 Litern mit Reinstwasser aus Milli-Q Anlagen (Millipore, Bedford, USA) in Borosilikatflaschen (Duran[®], Schott Glas, Mainz) angesetzt. Zur Sterilisation wurde das Medium mit Flachmembran-Einwegfiltern aus SFCA-Material (Sartolab[®] P, Sartorius AG, Göttingen) und Mehrwegkartuschenfiltern (Sartobran[®] 300, Sartorius) mit jeweils einer Porenweite von 0,2 µm filtriert. Für Steriltests (Temperierung bei 37°C für 4 Tage) wurden anschließend pro Charge fünf Aliquots zu je 10 ml entnommen. Die Lagerung erfolgte je nach Verbrauch des Mediums für maximal 3 Wochen pro Charge in einem Kühlraum bei 4°C.

1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Hintergründe der Kryokonservierung wurden bereits in Kapitel III, Punkt 2.2.1 beschrieben. Für die vorliegenden Arbeiten war es notwendig, über den gesamten Zeitraum auf Zellressourcen mit konsistenten Eigenschaften zurückgreifen zu können. Deshalb wurde für jede der verwendeten Hepatocytelinien eine sog. Zellbank (engl. *working cell bank*) angelegt. Für die Zellbank einer jeden Hepatocytelinie wurden gleich zu Beginn aller übrigen Untersuchungen Zellen aus jeweils einer Expansionskultivierung verwendet. Hierdurch konnte gewährleistet werden, daß die Zellen zu Beginn der Untersuchungen die selben Eigenschaften aufwiesen wie zum Ende der Arbeiten.

Tab. 4.2: Arbeitsschritte zum Einfrieren der Hepatocyten.

Arbeitsschritt	Durchführung
Bereitstellen des Einfriermediums	DMEM/F12-Medium mit DMSO und FCS (je 10% (v/v)) auf 4°C kühlen
Bereitstellen der Zellen	Kultur mit $2,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml (Viabilität: ca. 90%) für 5 min bei $100 \cdot g$ abzentrifugieren; Überstand verwerfen
Zellsediment resuspendieren	Tropfenweise Zugabe des Einfriermedium unter vorsichtigem Schütteln bis zu einer Zelldichte von $2-3 \cdot 10^6$ Zellen/ml
Aliquotierung	zu 1,0 ml in Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark)
Einfrieren	24 h bei -80°C in einem Styroporbehälter
Langzeitlagerung	in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff (-187°C) im Cryotank (Chronos [®] Biosafe 350, Messer Gießheim, Euteneuen)

Wie bereits erwähnt ist eines der Hauptprobleme beim Einfrieren von Zellen die Bildung intrazellulärer Kristalle, die zur Zerstörung der Zellmembran führen können. Umgangen wurde dieses Problem durch eine maßvolle Einfriergeschwindigkeit von ca. $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ und Zugabe der gefrierpunktserniedrigenden Substanz DMSO ins Einfriermedium in Verbindung mit foetalem Kälberserum (FCS). Eine langsame Einfriergeschwindigkeit wurde durch ein Styroporgefäß mit einer Wandstärke von etwa zwei Zentimetern erreicht, in dem die Kryoröhrchen vor der Überführung in den Kryotank in einer Kühltruhe bei -80°C aufbewahrt wurden. Das Verfahren gemäß Lindl, Bauer (1994) wurde in vereinfachter Form durchgeführt und ist im Detail in Tabelle 4.2 beschrieben.

Beim Auftauen ist das schnelle und vollständige Entfernen des DMSO durch Abzentrifugieren des Einfriermediums wichtig, bevor beim Erreichen physiologischer Temperaturen der Zellstoffwechsel einsetzt. Dazu wird nach dem Zentrifugieren ein Waschschrift durchgeführt.

Tab. 4.3: Arbeitsschritte zum Auftauen von Zellen.

Arbeitsschritt	Durchführung
Bereitstellen des Auftaumediums	pro 1,0 ml- Kryogefäß je 19 ml DMEM/F12 plus Supplemente bei 20°C (RT) in Zentrifugenröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark), zusätzlich weiteres Medium bei 37°C
Auftauen der Zellen	Kryogefäß unmittelbar aus dem Kryotank in ein Wasserbad (37°C) bis Erreichen des Auftaupunkts halten
Waschschrift	Zellen aus dem Kryogefäß in ein mediumgefülltes Zentrifugenröhrchen überführen, abzentrifugieren (5 min, 100^*g), Überstand verwerfen
Einsaat	Pellet in 37°C -warmem Medium resuspendieren und mit einer Zelldichte von ca. $1\text{-}3 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2 in eine Kulturflasche einsäen; Kultivierung im Brutschrank

1.4 Die Kultivierungssysteme

1.4.1 Kulturflaschen und Multiwell-Platten

Die Kultivierung in Gewebekulturflaschen (engl. *tissue flask*, T-Flaschen) dient in erster Linie der Expansion der Kultur, wenn die Menge aufgetauter Zellen für größere Kultivierungssysteme nicht ausreicht. Gleichzeitig sind sie ein geeignetes Kultivierungssystem bei der Adaption von Zellen an serumfreie Bedingungen und der Kultivierung besonders scherspannungsempfindlicher Zellen. Bis zur Maßstabsvergrößerung

(engl. *upscaling*) in gerührte Kultivierungssysteme wurden die Hepatocytelinien daher in Flaschen mit einer patentierten Zelladhäsionsoberfläche (Nunclon™ Δ) von 25, 75 und 175 cm² (Nunc, Roskilde, Dänemark) in einem Brutschrank (Biocenter 2001, Tecnorama, Fernwald) bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einer Begasung aus 95% Luft und 5% CO₂ kultiviert. Daneben wurden in den 75 cm²-Flaschen Experimente zur Lagerungsfähigkeit der Hepatocyten bei 4°C und Raumtemperatur durchgeführt. Untersuchungen zur Cytochrom-P450-Aktivität der Zellen (siehe IV.2.1.5) wurden hingegen in 12-Well-Platten aus Polystyrol (Cluster¹², Costra, Bodenheim) vorgenommen. Die dazu notwendige Kultivierung der Zellen in diesen Platten fand ebenfalls im Brutschrank statt.

1.4.1.1 Passagierung der Zellkulturen

Die verwendeten Hepatocytelinien wachsen in statischen Kultivierungssystemen (z.B. Gewebekulturflaschen) adhärent, d.h. sie benötigen für ihr Wachstum *in vitro* ein Substrat, an das sie sich anheften können. Vermutlich ist die Adhäsion der Zellen Voraussetzung für die ordnungsgemäße Organisation des Cytoskeletts und beeinflusst damit einen großen Teil des Zellstoffwechsels. So ist bekannt, daß für den Ablauf der Proteinbiosynthese ein intaktes Aktinfilamentgerüst vonnöten ist (STAPOULIONIS et al. 1997). Das Wachstum der Zellen ist bei optimaler Nährstoffzufuhr unter diesen Bedingungen durch die zur Verfügung stehende Oberfläche begrenzt. Nicht-tumorigen wachsende Zellen proliferieren aufgrund der Kontaktinhibition nur solange, bis die gesamte Substratoberfläche durch eine zusammenhängende, einschichtige Zelllage (engl. *monolayer*) bedeckt ist. Für eine weitere Zellvermehrung müssen die Zellen daher nach Erreichen des konfluenten Stadiums subkultiviert werden. Dazu werden sie von der ihrer Unterlage abgelöst und unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues überführt.

Adhäsionsvorgänge von Zellen erfolgen durch eine Reihe von Zelladhäsionsproteinen (engl. *cell adhesion molecules*, CAMs) die sich in Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie (ICAMs), Selektine, Cadherine und Integrine unterscheiden lassen (JOSEPH-SILVERSTEIN, SILVERSTEIN 1998; HYNES 1999). ICAMs und Selektine sind an heterologen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt, die z.B. bei Entzündungsreaktionen und vasculären Transmigrationsvorgängen infolge einer zellulären Immunantwort stattfinden (ETZIONI et al. 1999). Bei der Adhäsion an eine Substratoberfläche *in vitro* spielen sie daher keine Rolle. Die transmembranen Integrine hingegen finden ihre Liganden in den Bestandteilen der extrazellulären Matrix und sind somit für die Bindung der Zellen an ein unmittelbares Substrat verantwortlich (DARNELL et al. 1994). Cadherine sind calciumabhängige Adhäsionsmoleküle, die an der homologen Bindung der Zellen untereinander beteiligt sind (TAKEICHI 1991).

Die Subkultivierung adhärenter Zellen wird als Passagieren bezeichnet. Durch die Anzahl der Passagen kann auf die Zeit rückgeschlossen werden, in der sich die Zellen in Kultur befinden. Das am häufigsten verwendete Verfahren zur Ablösung der Zellen von ihrer Substratoberfläche ist das Trypsinieren. Die Zellen werden dazu mit Hilfe einer Trypsin-

Lösung von der Substratoberfläche proteolytisch abgelöst. Die Serinprotease Trypsin (EC 3.4.21.4) katalysiert dabei die Hydrolyse der in den Adhäsionsproteinen ansässigen Lysin- und Argininethylester (PURDIE et al. 1972). Der in der Trypsinlösung enthaltene Chelatbildner EDTA (Ethyldiamintetraacetat) komplexiert zweiwertige Kationen. Hierdurch werden die durch die Ca^{2+} -abhängigen Cadherine vermittelten Zell-Zell-Adhäsionen aufgehoben.

Da lange Einwirkzeiten des Trypsins während der Ablösung auch zur Degenerierung weiterer Oberflächenproteine der Zellen (Rezeptoren) führen können, wurde die Trypsinbehandlung durch folgende Vorgehensweise zeitlich verkürzt:

- Verwendung vortemperierter und pH-konditionierter Lösungen (Trypsin hat sein Wirkungsoptimum bei 37°C und pH 7-9).
- Entfernung des Kulturüberstands und nachfolgendes Waschen des Monolayers mit calcium- und magnesiumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (CMF-PBS). Hierdurch wird die substratkompetitive Wirkung der im Kulturüberstand enthaltenen Serumproteine gegenüber den Adhäsionsmolekülen der Zellen herabgesetzt. Ferner werden die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren entfernt und dadurch Aktivität des Trypsins für das Ablösen der Zellen erhöht.
- Kontrolle des Ablösevorgangs in den Kulturflaschen unter einem Inversmikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena)
- Beendigung der Trypsinwirkung durch Zugabe serumhaltigen Mediums

Nach Entfernung des CMF-PBS und Zugabe der Trypsinlösung lösten sich die Zellen in einem Zeitraum von höchstens einer Minute vollständig vom Boden der Kulturflaschen ab. Der Vorgang ließ sich zudem durch vorsichtiges Aufklopfen der Flaschen auf eine harte Unterlage beschleunigen. Nach Zugabe des serumhaltigen Mediums wurde der Inhalt der Flaschen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Nunc) überführt und bei 100*g abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Osterode). Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in neuem Kulturmedium resuspendiert und in einer Dichte von $2\text{-}3 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in neue Kulturflaschen eingesät bzw. für entsprechende Versuche ohne Kulturflaschen verwendet. Alle Arbeiten mit geöffneten Kulturgefäßen wurden unter Reinraumwerkbänken der Klasse 2 (z.B. HERAsafe[®], Heraeus, Osterode) durchgeführt.

Tab. 4.4: Übersicht der eingesetzten Volumina der jeweiligen Lösungen für das Passagieren von Hepatocysten in Gewebekulturflaschen.

Zelladhäsionsoberfläche (cm ²)	CMF-PBS ¹ (ml)	Trypsin-EDTA ² (ml)	Medium (ml)
25	5	1	9
75	10	3	17
175	20	5	15

¹ 8 g/l NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g/l Na₂HPO₄*2H₂O + 0,2 g/l KH₂PO₄; auf pH 7,2 eingestellt

² gebrauchsfertige Lösung (0,25% Trypsin + 1mM EDTA*4Na in Hank's gepufferter Salzlösung; Invitrogen)

1.4.2 Microcarrier

Eine Aufgabe der Arbeit bestand darin, eine Methode für die Expansion der Hepatocyten zur Erzeugung geeigneter Zellmengen im Hinblick auf die Anwendung in bioartifiziellen Leberersatzsystemen zu entwickeln (siehe III.1). Statische Kultivierungssysteme sind dafür aufgrund des mit der beschränkten Wachstumsfläche verbundenen hohen Materialverbrauchs, der nur bedingten Kontrollierbarkeit einzelner wichtiger Parameter (O_2 -Konzentration, pH-Wert) und der Vielzahl notwendiger Handlungsschritte ungeeignet.

Die 1967 in der Zellkulturtechnik eingeführten Microcarrier (VAN WEZEL 1967) stellen einen entscheidenden Fortschritt bei der Massenzellkultur adhärent wachsender Zelllinien in Suspensionskulturen dar (HIMES, HU 1987). Durch sie bietet sich die Möglichkeit einer starken Vergrößerung der Kulturoberfläche bei gleichzeitiger Verringerung des Kulturvolumens. Microcarrier (MC) sind kleine, mehr oder weniger kugelförmige Partikel, die als Anheftungssubstrat für die Zellen dienen. Im Prinzip entsprechen sie den aus der Proteinaufarbeitung bekannten Ionenaustauschergelen oder Gelfiltrationsmatrices. Unabhängig vom Material und Ladungsmuster unterscheidet man zwischen zwei- und dreidimensionalen MC. Die erstgenannten haben eine glatte Oberfläche. Dreidimensionale MC hingegen sind porös. Im Vergleich zu den zweidimensionalen MC besitzen die dreidimensionalen Carrier eine höhere Biomassekapazität, da die Zellen durch die Poren auch in die Carrier hineinwachsen können (LOOBY, GRIFFITH 1990). In dieser Arbeit wurden CultiSpher[®] G-Microcarrier der Firma Percell (Åstorp, Schweden) verwendet. Diese makroporösen Carrier bestehen aus einer stark quervernetzten und dadurch (mechanisch und thermisch) stabilen porcinen Gelatinematrix, die für die pharmazeutische Anwendung zugelassen ist. Neben den bereits genannten Vorteilen poröser Carrier haben Gelatinecarrier noch weitere günstige Eigenschaften: Die Gelatinematrix ist frei diffusibel für die im Medium enthaltenen Substrate (Nährstoffe, Sauerstoff), so daß auch die Zellen im Innern der Carrier gut versorgt werden können.

1.4.2.1 Silanisierung der Glasgeräte

Durch elektrostatische Wechselwirkung neigen die Microcarrier dazu, irreversibel an Glasoberflächen zu adhären. Gleichzeitig zeigen Hepatocyten die unerwünschte Eigenschaft, solche Oberflächen zu bewachsen. Um die Ladungen an den Oberflächen der Glasgeräte zu maskieren, wurden diese im trockenen und sauberen Zustand mit einer gebrauchsfertigen Silanlösung (PlusOne[®] Repel-Silane ES, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) benetzt. Nach 20-minütiger Einwirkzeit wurde die überschüssige Silanlösung entfernt und restliches Lösungsmittel für etwa 1 Stunde abgedampft. Danach erfolgte zunächst eine Reinigung mit Ethanol (p.a.) und anschließend mit deionisiertem Wasser.

1.4.2.2 Vorbehandlung der Microcarrier

Die CultiSpher® G-Microcarrier lagen pulverförmig vor. 1 g dieser Trockensubstanz enthielt rund 1 Mio. Carrier. Diese wurden mit Phosphatpuffer für 1-2 Stunden inkubiert (50 ml CMF-PBS pro g Trockengewicht), wodurch sie quellen. Im gequollenen Zustand beträgt der Partikeldurchmesser 130-380 µm und die durchschnittliche Porengröße 20 µm. Durch Hitzesterilisation (45 min.) im gespannten Dampf (Autoklavieren) werden die Carrier nebenbei entgast und sedimentieren zu Boden. Nach Abkühlung bei Raumtemperatur wurde der überstehende Phosphatpuffer unter einer Reinraumwerkbank entfernt und zur Equilibrierung der Carrier zwei Mal durch eine entsprechende Menge Kultumedium ersetzt. Die so vorbehandelten Microcarrier wurden für maximal 3 Tage bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt. Das überstehende Kulturmedium wurde unmittelbar vor der Verwendung der Microcarrier steril abgesaugt.

1.4.3 Microcarrier-Kultivierung in Spinnerflaschen

Spinnerflaschen sind gerührte Systeme, die analog zu den statischen Systemen im Brutschrank betrieben werden. Es wurden Spinnerflaschen mit einem Arbeitsvolumen von 100-300 ml benutzt. Als Rührer dient ein am zentralen Deckel des Gefäßes befestigter Glasstab, der im kugelförmigen Endteil einen Magneten enthält (HIRTENSTEIN et al. 1982). Dieser wird über eine magnetische Kopplung durch ein unter dem Spinner befindliches Magnetrührwerk mit externer Steuereinheit (Variomag® Elektronikrührer Biosystem und Biomodul 40 B, H+P Labortechnik, München) angetrieben. Neben den Standardfunktionen enthält das Magnetrührwerk einen Intervall-Rührmodus mit Soft-Startautomatik, der über die Steuereinheit eingestellt werden kann. Das Rührsystem gewährleistet einen scherspannungsarmen Betrieb bei homogener Durchmischung. Dies ist insbesondere bei Microcarrierkulturen von Bedeutung, da Zellen auf der Oberfläche der Carrier im Vergleich zu echten Suspensionskulturen höheren hydrodynamischen Belastungen ausgesetzt sind (CROUGHAN et al. 2000).

Die Kultivierung in silanisierten Spinnerflaschen diente lediglich der Initiation, d.h. der Adhäsion der Zellen auf die Microcarrier vor der Überführung in den Bioreaktor (siehe IV.1.4.4). Um den Anheftungsprozeß der Zellen an die Microcarrier zu beschleunigen, wurde der räumliche Abstand zwischen Microcarriern und Zellen verringert, indem nur mit 10% des Bioreaktorendvolumens kultiviert wurde. Eine weitere Verbesserung der Initiation wurde durch ein intermittierende Rührverfahren erzielt. Hierbei fand ein kontinuierlicher Wechsel zwischen 15-minütigen Rührintervallen bei 40 rpm und 30-minütigen Ruhepausen ohne Rühren über einen Zeitraum von 12-14 Stunden statt. Zur Initiation wurden 100 ml einer aus T-Flaschen-Vorkulturen gewonnene Hepatocytenkultur einer Passage ($2-3 \cdot 10^6$ Zellen/ml) mit 3 g (Trockengewicht!) vorbehandelten und equilibrierten Microcarriern in der Spinnerflasche vereinigt.

1.4.4 Microcarrier-Kultivierung im Bioreaktor

Die Versuche zur Expansion der Zellen auf Microcarriern und der Niedrigtemperaturlagerung im dynamischen System fanden in einem geregelten Bioreaktorsystem mit einem Kulturvolumen von 1 Liter statt (siehe Abb. 4.1). Grundsätzlich entspricht der Aufbau dieses Systems einem (doppelwandigen) SuperSpinner[®] (LEHMANN et al. 1992) mit einer angeschlossenen Regelungsperipherie (Gasmischstation, Wasserbad, Steuerschrank) zur dauerhaften Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen wie pH, pO₂ und Temperatur. Zentrales Element ist ein doppelwandiges Glasgefäß (Isotherm[®], KGW, Karlsruhe). Der Doppelmantel dieses Gefäßes wird über zwei Anschlüsse durch ein externes Wasserbad (Kälte-Umwälzthermostat F12, Julabo, Seelbach) temperiert. Das Gefäß ist durch einen Edelstahldeckel über die Verschraubung mit einem Kontering fest verschlossen.

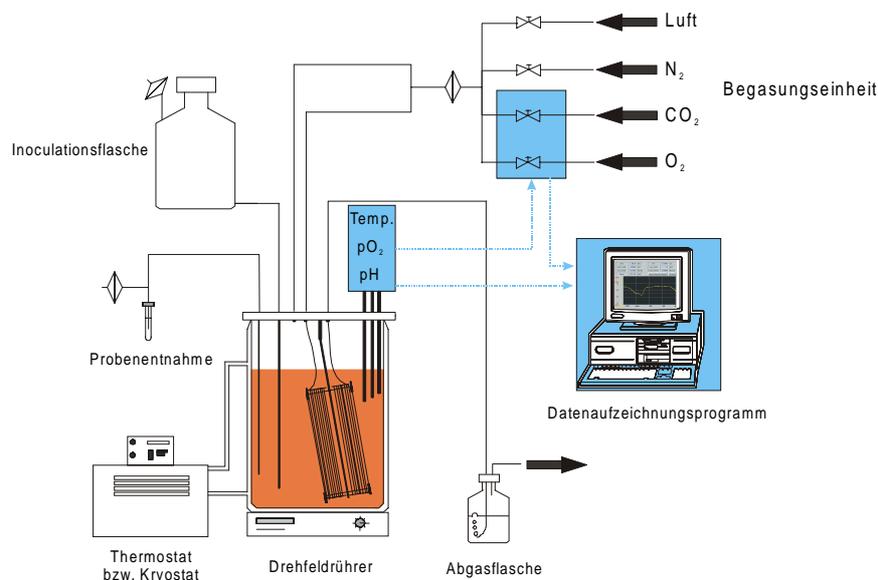


Abb. 4.1: Übersicht des eingesetzten 1-Liter-Bioreaktors zur Microcarrierkultivierung der Hepatocyten.

Die blasenfreie Begasung erfolgt über einen auf den zentral taumelnden Magnetrührer aufgewickelten mikroporösen und hydrophoben Polypropylenschlauch (Accurel[®], Akzo Nobel, Wuppertal). Hierdurch wird neben dem Oberflächeneintrag bei der Durchmischung das gesamte Volumen zur Gasversorgung genutzt. Gleichzeitig ermöglicht die blasenfreie Begasung einen scherspannungsarmen und schaumvermeidenden Betrieb (LEHMANN et al. 1985). Der Magnetrührer wird analog zu den Spinner-Systemen durch einen unter dem Glasgefäß befindlichen Drehfeldrührer bewegt. Die taumelnde Bewegung sorgt für eine ständige Änderung des Anströmwinkels, wodurch ein Bewachsen der Hohlfasermembran durch Zellen weitgehend verhindert wird. Eine Blasenbildung wird durch eine Gleichdruckbegasung zwischen Kopfraum und Membranschlauch vermieden.

Im Deckel befinden sich eine Reihe von Durchführungen für den Anschluß von pH- und pO₂-Elektroden (Ingold Messtechnik GmbH, Steinbach/Ts) sowie einer Temperatursonde (B. Braun International, Melsungen); weitere Stutzen dienen dem Anschluß der Gaszu- bzw. -abfuhr, dem Tauchrohr für die Inoculationsflasche und der Probennahme. Die Probennahmeverrichtung aus Silikonschlauch ermöglicht die Entnahme einer Probe, ohne den Bioreaktor unter eine Reinraumwerkbank bewegen und das Gefäß öffnen zu müssen. Dazu wird zunächst der Abluftweg geschlossen. Durch den sich aufbauenden Druck im Gefäß wird die Kulturflüssigkeit nach Öffnen der Probennahmestrecke hinausbefördert. Nach der Probennahme läßt sich durch Abklemmen des gefäßfernen Teils der Probennahmestrecke nach Öffnen des Abluftwegs durch Druckluft über den angeschlossenen Filter mittels einer Spritze die Flüssigkeitssäule im gefäßseitigen Abschnitt in den Bioreaktor entleeren. Entsprechend erfolgt danach die Entleerung des gefäßfernen Abschnitts in ein Abfallgefäß bei abgeklemmter gefäßseitiger Strecke der Probennahme. Zwischen den Probennahmen befindet sich der gefäßferne Abschnitt zur Kontaminationsvermeidung in einem mit 70%igem Ethanol gefüllten Schraubgefäß (4,5 ml-Kryoröhrchen).

Auf den Magnettaumelrührer wurden für eine ausreichende Gasversorgung pro Liter Kulturvolumen zwei Meter Membranschlauch aufgewickelt. Die Begasung über die Gasmischstation erfolgte durch einen kontinuierlichen Luft/N₂-Grundstrom (2,4/3,6 NI/h), der mit Hilfe eines externen Gasdurchflußmessers (Digital GC FlowmeterTM, Jour Research, Onsala, Schweden) eingestellt wurde. Dem wurde gemäß des Sauerstoffbedarfs der Zellen zur Regelung des pO₂ ein geregelter Sauerstoffstrom zugefügt. Die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Werts erfolgte durch einen geregelten CO₂-Eintrag. Die Online-Daten (pH, pO₂, Temperatur, Gasvolumenströme zur Aufrechterhaltung von pH und pO₂) wurden mit Hilfe eines Datenaufzeichnungsprogramms (MFCS, B.Braun) erfaßt.

Die thermische Sterilisation des Bioreaktors, der Microcarrier und aller Glasflaschen erfolgte im gespannten Dampf (60 min, 121°C, 1 bar) in einem Großraumautoklaven (Typ GE 66, Getinge AB, Getinge, Schweden).

1.4.4.1 Die pO₂-Elektrode im Bioreaktor: Aufbau und Funktionsprinzip

Die Messung des Sauerstoffpartialdrucks und die dadurch mögliche Umrechnung zur im Kulturüberstand enthaltenen Sauerstoffkonzentration war insbesondere für die Durchführung und Auswertung der Experimente zur Niedrigtemperaturlagerung im Bioreaktor essentiell. Die Sauerstoffelektrode leitet sich von einem galvanischen Element ab. Das Prinzip der galvanischen Messung beruht auf der Wechselbeziehung zwischen einem festen Körper und der ihn umgebenden Flüssigkeit. Taucht man einen Metallstab in eine Salzlösung, so entsteht durch Reduktions- und Oxidationsvorgänge ein Potential an der Phasengrenzschicht, das gemäß der Nernst'schen Gleichung abhängig ist von der Elektroaffinität des Metalls, der Konzentration der Lösung und der Temperatur (MORTIMER 1987, S. 335f.). Polarisiert man nun eine Edelmetallelektrode aus Platin

gegenüber einem Referenzsystem (Ag/AgCl) mit einer negativen Spannung, dann wird der im Elektrolyten (KCl) befindliche Sauerstoff an der Oberfläche der Kathode (Platin) reduziert. In Abhängigkeit zur O₂-Konzentration im Elektrolyten erhält man charakteristische Stromspannungskurven (COBBOLD 1974).

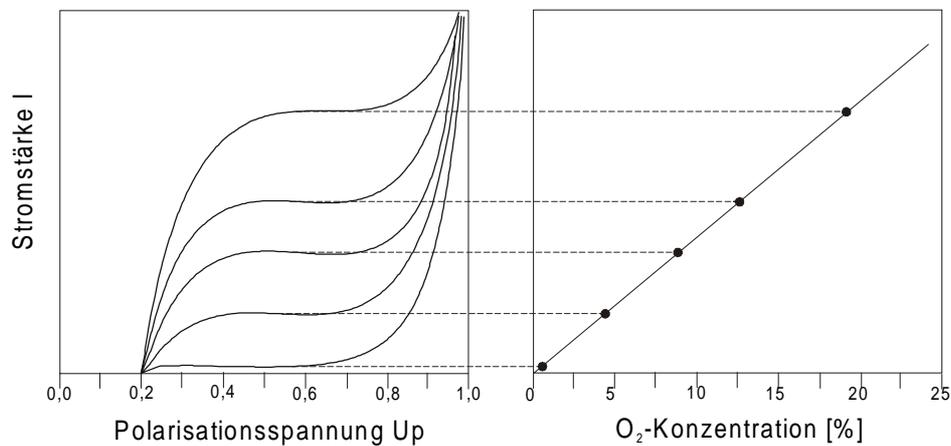


Abb. 4.2: pO₂-abhängiges Stromspannungsdiagramm (Polarogramm) (nach COBBOLD 1974).

In einem Spannungsbereich von 0,6-0,8 Volt (Arbeitsspannung) wird bei vorgegebener Konzentration der Sauerstoff vollständig reduziert. Wie die Abbildung zeigt, ist hier der in der Elektrode zu verzeichnende Stromfluß der O₂-Konzentration proportional. Unterhalb dieses Spannungsbereichs verhält sich das System wie ein Ohm'scher Widerstand, oberhalb erfolgt bereits eine Elektrolyse des Lösungsmittels (Wasser). Für die Reaktionen an Anode und Kathode ergeben sich daraus folgende stöchiometrische Reaktionsgleichungen:

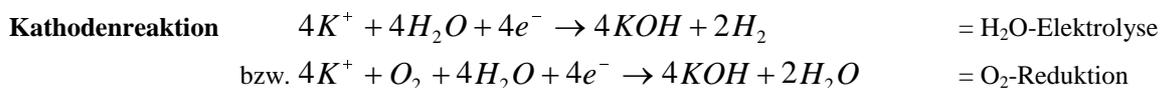


Abb. 4.3: Stöchiometrische Reaktionsgleichungen der Anoden-/Kathodenreaktion im galvanischen Element.

Gemessen wird letztlich der sog. Sauerstoffpartialdruck (pO₂ = C_i) in der Flüssigphase. Dieser wiederum ist abhängig vom Partialdruck (p_i) in der über der Flüssigphase befindlichen Gasphase. Für den O₂-Transport an der Phasengrenze gilt das Henry-Gesetz (C_i = H * p_i). H ist der sog. Henry-Koeffizient. H beeinflusst die Löslichkeit eines Gases durch Temperatur, Salzkonzentration, Druck, Viskosität, etc.. So verringert sich bspw. die O₂-Löslichkeit mit steigender Temperatur und Salzkonzentration. Die Löslichkeit läßt sich über den sog. Bunsenkoeffizienten (α) ausdrücken. α entspricht dem Gasvolumen mit 0°C

und 1 bar, das sich in ein Flüssigkeitsvolumen mit 1 bar lösen läßt. Der graphische Auftrag von α gegen die Temperatur verläuft asymptotisch, d.h. bei niedrigen Temperaturen nimmt die Löslichkeit bei einem geringfügigem Temperaturanstieg stärker ab, als bei höheren Temperaturen.

In dieser Arbeit wurde eine Elektrode nach dem Clark-Prinzip verwendet (Ingold Messtechnik, GmbH, Steinbach/Ts), bei der das Meßgut durch eine gasdurchlässige Membran (Silikon) von der eigentlichen Elektrode getrennt wird. Dies verhindert im Prozeß die Vergiftung der Kulturlösung und auch der Elektrode. Die Funktion der Elektrode ist abhängig vom Diffusionskoeffizienten (D) und der Löslichkeit (a) von O_2 in der Membran, der Kathodenoberfläche (A), dem O_2 -Partialdruck (pO_2) in der Kulturlösung und der Dicke der Membran (X). Nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz ergibt sich daraus folgende Beziehung:

$$i = k \cdot D \cdot A \cdot a \cdot pO_2 \cdot X^{-1} \quad (k = \text{Proportionalitätskonstante}) \quad \text{Gleichung 4.1}$$

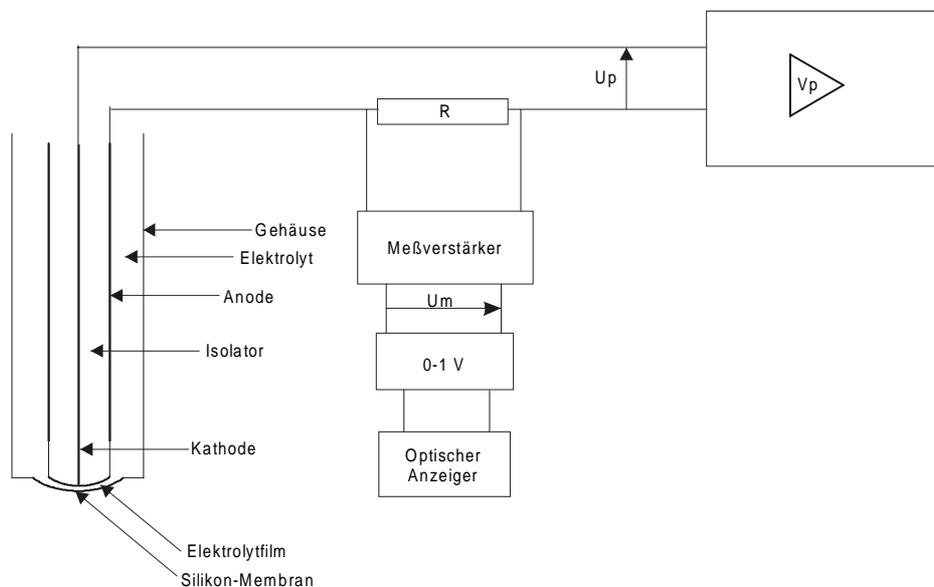


Abb. 4.4: Aufbau und Funktionseinheiten der pO_2 -Elektrode.

Die für den Betrieb der pO_2 -Elektrode benötigte Polarisationsspannung (U_p) wird durch einen Verstärker (V_p) erzeugt. Der aus der Reduktion des Sauerstoffs entstehende Elektrodenstrom erzeugt am Widerstand (R) einen Spannungsabfall. Da Elektrodenstrom und Spannungsabfall sehr gering sind, wird letzterer durch einen Meßverstärker in eine meßbare Spannung (U_m) zwischen 0 und 1 Volt umgewandelt. Das Ausgangssignal dieses Verstärkers wiederum wird auf einen optischen Anzeiger (z.B. Schreiber) projiziert. Dieses Signal ist auch Eingangsgröße für den pO_2 -Regler. Dieser Regler steuert ein Ventil (Massflow-Meter), das in Anlehnung an den jeweiligen O_2 -Verbrauch der Zellen einen kontinuierlichen O_2 -Strom in den Bioreaktor zur Aufrechterhaltung eines konstanten pO_2 erzeugt.

1.4.4.2 Der pO₂-Regler: Regelkreis und Regleroptimierung

Für die Aufrechterhaltung eines konstanten Sauerstoffpartialdrucks im Bioreaktor war es notwendig, ein genaues und stabiles Signal des pO₂-Reglers, der im Steuerschrank eingebaut ist, zu erhalten. Eine Regelung ist dann optimal, wenn eine möglichst geringe dauernde Regelabweichung auftritt und das Schwingen des Ist-Wertes (aktueller pO₂ in der Kulturlösung) um den Soll-Wert (physiologischer pO₂) möglichst verschwindet. Die Optimierung wird dadurch erreicht, daß die Art und Weise, wie der Regler auf eine Reglerabweichung reagiert, dem Zeitverhalten der Regelstrecke angepaßt wird.

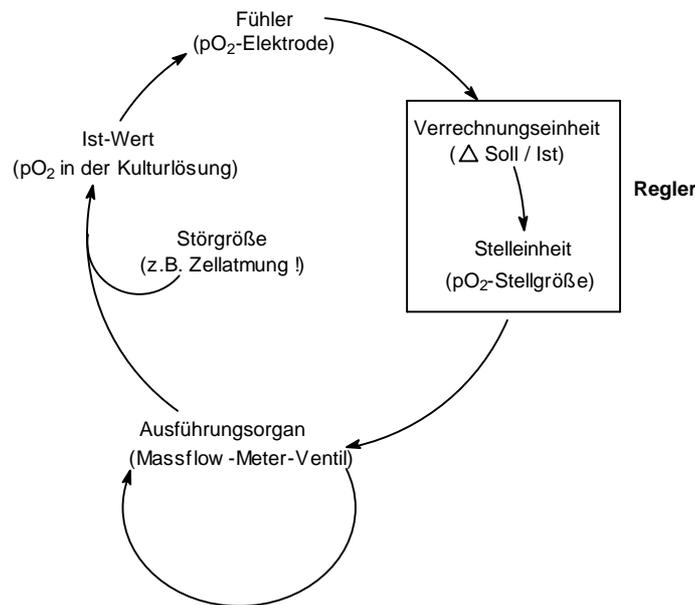


Abb. 4.5: Der Regelkreis am Beispiel der pO₂-Regelung in der Zellkultivierung. Die 'interne Regelung' des Massflow-Meters ist hier miteinbezogen.

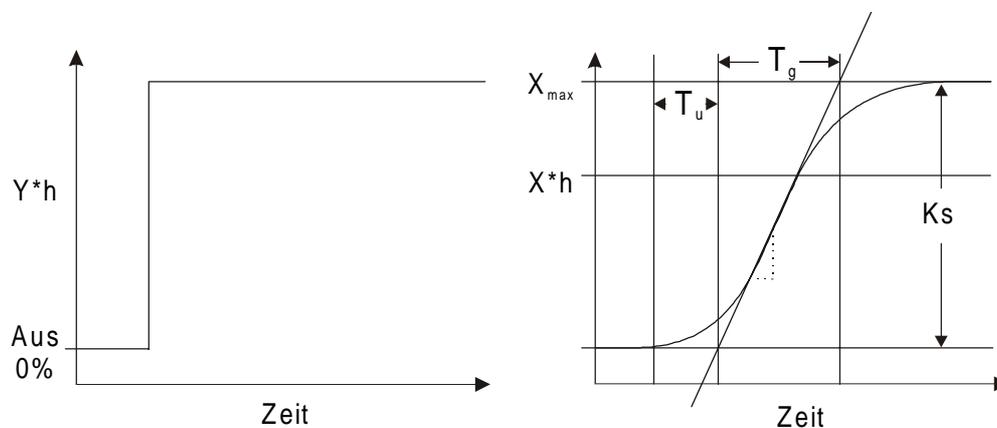


Abb. 4.6: Zeitverhalten einer Regelstrecke.

Die Regelstrecke umfaßt im Regelkreis das Ausführungsorgan und die sich an ihm anschließenden Zuleitungen in den Reaktor. Eine sprunghafte, andauernde Veränderung der Stellgröße Y (pO_2 -Stellgröße) um den Betrag h bewirkt fast nie eine sofortige, sondern eine erst nach einer Totzeit eintretende, allmähliche Veränderung des Ist-Wertes, der dann bei sog. 'Strecken mit Ausgleich' irgendwann einen Maximalwert erreicht. Jede Regelstrecke zeigt ein für sie charakteristisches Zeitverhalten (siehe Abb. 4.6).

Um die notwendigen Parameter zur Regleroptimierung zu bestimmen, wird an die Meßkurve eine Tangente mit maximaler Steigung angelegt, die bei T_u die Gerade $X = 0$ und bei $T_u + T_g$ die Gerade $X = X_{\max}$ schneidet. Daraus lassen sich folgende Parameter ablesen:

K_s ist der Übertragungsbeiwert der Regelstrecke. Er gibt die maximale Änderung des Ist-Wertes bei einer bestimmten Veränderung der Stellgröße an: $K_s = X_{\max} \cdot Yh^{-1}$.

T_u ist die Verzugszeit, die die Totzeit miteinschließt.

T_g ist die Ausgleichszeit. Sie ist ein Maß dafür, wie schnell bei einer bestimmten Veränderung der Stellgröße die maximale Änderung des Ist-Wertes erreicht ist.

λ ist der Quotient, der sich aus dem Verhältnis von T_u zu T_g ergibt.

Ausgehend von diesen Daten gelten nach Ziegler und Nichols (MERZ, JASCHEK 1993, S. 238f.; ZIEGLER, NICHOLS 1942) für eine optimale Anpassung eines sog. PID-Reglers an eine bestimmte Regelstrecke mit Totzeit folgende einfache Faustregeln:

$$x_p = 0,83 \cdot K_s \cdot \lambda \quad \text{Gleichung 4.2}$$

$$T_D = 0,42 \cdot T_u \quad \text{Gleichung 4.3}$$

$$T_i = 2 \cdot T_u \quad \text{Gleichung 4.4}$$

Dabei ist x_p der Proportionalitätsbereich des Reglers. Er gibt in Prozent des Meßbereichs den Bereich an, in dem eine Regelabweichung eine Veränderung der Stellgröße von 0 bis 100% bewirkt. T_D ist die sog. Vorhaltezeit. Sie ist ein Maß dafür, wie stark der Regler auf eine Regelabweichung differentiell reagiert. T_i ist die sog. Nachstellzeit und ein Maß dafür, wie stark der Regler integral reagiert. Im Rahmen dieser Arbeit war das Differentialglied des Reglers abgeschaltet. Die Einbehaltung des Differentialglieds ist dann zweckmäßig, wenn schnelle Änderungen des Ist-Wertes gegenüber dem Soll-Wert kompensiert werden sollen. Ein stabiles und gleichmäßiges Signal wurde aber schon mit einer PI-Konfiguration erreicht. Dadurch verschieben sich die Einstellungsparameter des Reglers ein wenig:

$$x_p = 1,25 \cdot K_s \cdot \lambda \quad \text{Gleichung 4.5}$$

$$T_D = 0 \quad \text{Gleichung 4.6}$$

$$T_i = 3 \cdot T_u \quad \text{Gleichung 4.7}$$

Verwendet wurde ein Universalregler (Teleperm[®] D, Siemens). Das sich im Regelkreis anschließende Ausführungsorgan ist ein sog. Massflow-Meter (5850 TR, 0-16 NI/h, Brooks, Veenendaal, Holland). Dieses Ventil besitzt quasi eine interne Regelung, indem es das vom Regler ausgehende Signal (pO_2 -Stellgröße) einem O_2 -Strom pro Zeiteinheit gleichsetzt. Es ermöglicht im Gegensatz zu Digitalventilen, die im Betrieb entweder offen

oder geschlossen sind, eine kontinuierliche Zuführung von Sauerstoff in den Reaktor. Damit werden kurzzeitige Schwankungen des pO_2 in der Kulturlösung aufgrund der Ventiltätigkeit vermieden, wodurch die Stabilität der pO_2 -Stellgröße weiter erhöht wird. Auf den pH-Regler, dessen funktionelles Prinzip dem des pO_2 -Reglers entspricht, wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen.

1.5 Prozeßführung

In der Biotechnologie unterscheidet man zwischen geschlossenen, teiloffenen und offenen Systemen (CHMIEL 1991, S. 146f.).

In einem geschlossenen System werden Zellen zusammen mit dem Medium und allen notwendigen Supplementen zu Anfang in das Kulturgefäß eingebracht. Es folgt während der Kultivierung weder eine Zuführung von weiteren Nährstoffen, noch werden Zellen aus dem System entfernt. Das System ist allerdings nur bezüglich der Flüssigphase geschlossen; zum Zweck des Gasaustausches muß das System, wie bei allen weiteren Prozeßführungen auch, für gasförmige Substrate (O_2) und Produkte (CO_2) offen sein. Nach Verbrauch der Substrate der Flüssigphase wird der Prozeß beendet und die Produkte geerntet. Einen solchen Prozeß bezeichnet man als Satzbetrieb (engl. *batch*).

In einem teiloffenen System werden die Zellen zunächst nur in einem Teil des Maximalvolumens kultiviert. Anschließend erfolgt mit einer bestimmten Rate die Zugabe von Medium bis zum Erreichen des Maximalvolumens. Einen solchen Prozeß bezeichnet man auch als Satzbetrieb mit Zufütterung (engl. *fedbatch*). Eine weitere Möglichkeit besteht in einem Satzbetrieb mit Maximalvolumen, bei dem mit Erreichen der maximalen Zelldichte ein Teil der Flüssigphase durch neues Medium ersetzt wird. Diese Prozeßführung bezeichnet man als wiederholten Satzbetrieb (engl. *splitbatch* oder *repeated batch*).

Kennzeichen eines offenen Systems sind die kontinuierliche Zu- und Abführung von Medium. Man unterscheidet einen Chemostaten, bei dem der Mediumfluß durch das System Substratkonzentration(en) und Zelldichte konstant hält, von Perfusionssystemen, bei denen nach Abtrennung des verbrauchten Mediums die Zellen im Reaktor zurückgehalten bzw. bei externer Abtrennung in den Reaktor zurückgeführt werden. Die Kultivierung in den statischen Kultivierungssystemen und dem geregelten 1-Liter-Bioreaktor erfolgten im Verfahren des *batch* oder *repeated batch*.

1.5.1 Der Batchprozeß

1.5.1.1 Wachstumsverlauf

Der Batchprozeß stellt das Kultivierungsverfahren geschlossener Systeme dar. Der Prozeß verläuft mit einem Kulturvolumen, das über die gesamte Kultivierungsdauer konstant

gehalten wird, wenn man eine Volumenreduktion durch Probenahmen vernachlässigt. Gestartet wird der Prozeß durch Beimpfen des Mediums mit einer Mindestmenge an Zellen, dem sog. Inokulum. Nachfolgend ändert sich zeitlich mit fortschreitendem Wachstum und Stoffwechsel der Zellen die Zellkonzentration sowie die Konzentration der Substrate und Produkte. Wachstum und Substratverbrauch durchlaufen unter den Bedingungen des Batchprozesses mehrere charakteristische Phasen:

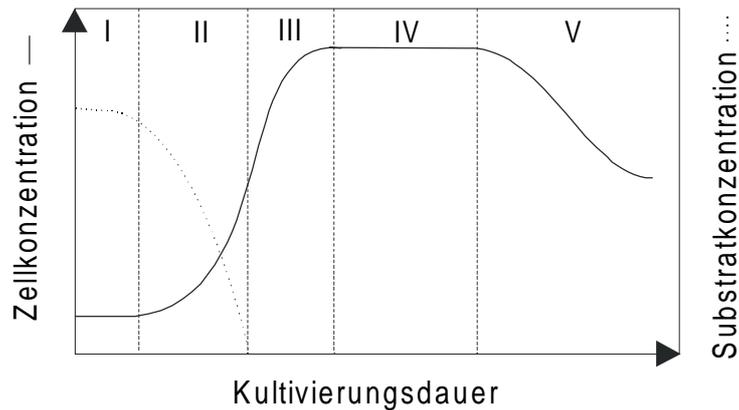


Abb. 4.7: Die typischen Phasen einer Batchkultivierung.

Phase I bezeichnet man als *lag*-Phase. In dieser Zeit adaptieren die Zellen an die Startbedingungen des Prozesses, zeigen daher kaum Proliferation und verbrauchen entsprechend wenig Substrat. Es schließt sich die *log*-Phase an (II), in der das Zellwachstum und entsprechend auch der Substratverbrauch sehr rasch verläuft. Die Zellzahl nimmt exponentiell zu, da das Substrat unlimitiert vorliegt.

In einem geschlossenen System können sich die Zellen jedoch nicht beliebig vermehren. Zu einem bestimmten Zeitpunkt ist den Zellen das Substrat aufgrund einer Transportlimitierung durch niedrige Substratkonzentration und später aufgrund eines vollständigen Verbrauchs nicht mehr zugänglich. Daher folgt nach einer Übergangsphase (III) die stationäre Phase (IV). Zu diesem Zeitpunkt hat die Kultur ihre maximale Zellkonzentration erreicht; sie wächst nicht mehr. An dieser Stelle würde folgerichtig der Prozeß abgebrochen, da ansonsten die Zellen in die Absterbephase (V) übergängen.

In diesen Betrachtungen geht man von der Population der Zellen als eine Funktionseinheit aus. Es ist aber leicht zu verstehen, daß sich einzelne Zellen nicht gemäß den Bedingungen der jeweiligen Wachstumsphase verhalten (Inhomogenität der Kultur; CHMIEL 1991, S. 156). Zellen sterben durchaus in der Exponentialphase. In der stationären Phase wiederum wird nicht nur einfach die Teilungsaktivität eingestellt, sondern während sich ein Teil der Zellen noch vermehrt, stirbt ein anderer Teil bereits ab. Durch Zellyse freigesetzte Nährstoffe können den anderen Zellen zudem als Substrat dienen.

Für den Start jeder Art von Kultivierung empfiehlt sich ein Inokulum, das vorzugsweise aus einer Backup-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase entnommen wird. Weiterhin

sollte die zu beimpfende Nährlösung bezüglich Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert möglichst den Bedingungen des Inokulums entsprechen (BAILEY, OLLIS 1986, S. 439ff.). Im Idealfall wird dadurch die *lag*-Phase so kurz (wenige Minuten bis Stunden), daß sie in der Auswertung der Probenahmen nicht erscheint.

Auf die Darstellung der Theorie des *fedbatch*-Verfahrens und der kontinuierlichen Verfahren wird an dieser Stelle verzichtet, da das Verfahren für die Auswertung der Versuchsergebnisse unerheblich waren.

1.5.1.2 Monod-Kinetik und zellspezifische Parameter

Die Monod-Kinetik ist ein mathematisches Modell, welches in Anlehnung an die Enzymkinetik nach Michaelis und Menten das Zellwachstum als eine autokatalytische Reaktion beschreibt, bei dem das Produkt des Umsatzes eine neue Umsatzeinheit ('Enzym') ergibt. Unter der Bedingung, daß die zeitliche Änderung der Zelldichte proportional zur augenblicklichen Zelldichte ist, ergibt sich aus der Integration des Differentials $dx/dt = \mu * x$ (μ ist die spezifische Wachstumsrate):

$$x(t) = x_0 * e^{\mu * t} \quad \text{Gleichung 4.8}$$

Mit den sich aus ihr hergeleiteten mathematischen Gleichungen lassen sich das Wachstum, die Verdopplungszeit, die Produktivität, Substratumsatz und Produktbildung der Zellen sowie die Ausbeute berechnen. Diese ermöglichen es, die Physiologie der Zellen zu charakterisieren, um so Vergleiche zwischen verschiedenen Zelllinien oder -klonen zu ziehen. In einer vorangegangenen Arbeit wurde indirekt darauf hingewiesen, daß mit den Standardverfahren zur Prozeßüberwachungen beim Berechnen der Umsatzraten nicht die intrazellulären Metabolisierungsraten (Verbrauchs- und Bildungsraten), sondern Raten des In- und Efflux durch die Zellmembran bestimmt werden (SEEWÖSTER 1995). Die Terminologie für diese Parameter wird ungeachtet dessen in dieser Arbeit beibehalten. Für den Batchprozeß lauten die Gleichungen wie folgt (nach PIRT 1985, S. 4ff.):

spezifische Wachstumsrate:

$$\mu = \frac{1}{x} * \frac{dx}{dt} \quad [d^{-1}] \quad \text{Gleichung 4.9}$$

Dabei entspricht x der mittleren Zelldichte im Zeitintervall dt .

Verdopplungszeit:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad [d] \quad \text{Gleichung 4.10}$$

spezifische Substratverbrauchsrate:

$$q_s = \frac{1}{x} * \frac{dc_s}{dt} \quad [\text{mol} * \text{Zellen}^{-1} * \text{d}^{-1}] \quad \text{Gleichung 4.11}$$

spezifische Produktbildungsrate:

$$q_p = \frac{1}{x} * \frac{dc_p}{dt} \quad [\text{mol} * \text{Zellen}^{-1} * \text{d}^{-1}] \quad \text{Gleichung 4.12}$$

Ausbeute:

$$Y = \frac{dx}{ds} = \mu * x * \frac{1}{q_s} \quad [\text{Zellen} * \text{mol}^{-1}] \quad \text{Gleichung 4.13}$$

Die zellspezifischen Parameter wurden in der Phase unlimitierten Wachstums (*log*-Phase) bestimmt.

1.6 OTR, OUR und $k_L a$

Der O_2 -Bedarf der Zellen kann nur durch den in der wässrigen Phase (Kulturlösung) gelösten Sauerstoff gedeckt werden. Da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser aber sehr gering ist ($6,87 \text{ mg} * \text{l}^{-1}$, 37°C), muß O_2 ständig aus der Gasphase in die Lösung eingetragen werden. Geschwindigkeitsbestimmend für die gesamte Sauerstofftransportfolge ist der O_2 -Übergang aus der Gasphase in die Flüssigkeit.

Die Sauerstoffeintragsrate (Oxxygen Tranfer Rate, OTR) ist ein wichtiger Parameter für die Charakterisierung eines Reaktorsystems. Nur wenn der Sauerstoffeintrag den -verbrauch (Oxxygen Uptake Rate, OUR) der Zellen decken kann, wird die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) der Zellen aufrecht erhalten. Für die Änderung der gelösten Sauerstoffmenge gilt daher folgende Beziehung:

$$\frac{dc_L}{dt} = OTR - OUR \quad \text{Gleichung 4.14}$$

Gemäß der allgemeinen Stoffübergangsgleichung gilt für die OTR:

$$OTR = k_L * a * (c^* - c_L) \quad \text{Gleichung 4.15}$$

O₂ kann wie z.B. Glucose und Aminosäuren als Substrat betrachtet werden. Daher gilt für die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate:

$$OUR = qO_2 * x \Leftrightarrow qO_2 = \frac{OUR}{x} = \frac{1}{x} * \frac{dc_L}{dt} \quad \text{Gleichung 4.16}$$

Aus Gleichung 4.14 und Gleichung 4.16 erhält man für die zeitliche Änderung der O₂-Konzentration:

$$\frac{dc_L}{dt} = OTR - OUR = k_L * a * (c^* - c_L) - qO_2 * x \quad \text{Gleichung 4.17}$$

Durch Auflösen von Gleichung 4.17 nach c_L ergibt sich schließlich:

$$c_L = -\left(\frac{1}{k_L * a}\right) * \left(\frac{dc_L}{dt} + qO_2 * x\right) + c^* \quad \text{Gleichung 4.18}$$

mit:

- c_L: Sauerstoffkonzentration in der Lösung (mg*h⁻¹)
- k_L: Stoffübergangsgeschwindigkeit (cm*h⁻¹)
- a: Phasengrenzfläche (cm²*ml⁻¹)
- qO₂: spezifische Sauerstoffverbrauchsrate (mg*Zellen⁻¹* h⁻¹)
- x: Zelldichte (Zellen*ml⁻¹)
- c^{*}: Sauerstoffsättigungskonzentration an der Phasengrenze (mg*h⁻¹)

Die beiden Faktoren k_L und a werden als volumetrischer Übergangskoeffizient **k_La** mit der Einheit h⁻¹ zusammengefaßt. Er wird beeinflusst durch die Art der Belüftungseinrichtung. So haben membranbegaste Systeme einen niedrigeren k_La als blasenbegaste Reaktoren. Da jedoch der Gesamtmetabolismus tierischer Zellen sehr viel langsamer abläuft als der von Mikroorganismen, ist die blasenfreie Membranbegasung zur Sauerstoffversorgung der Zellen bis zum Pilotmaßstab zumeist ausreichend.

OTR, OUR und k_La wurden nach der dynamischen Methode ermittelt (DORAN 1995, S. 210ff.; MUTTZALL 1993, S. 123), bei der durch Abschalten der Begasung in einer laufenden Kultivierung die OUR als zeitliche Änderung von c_L aufgenommen wird. Bei bekannter Zelldichte läßt sich aus Gleichung 4.16 die spezifische O₂-Verbrauchsrate berechnen.

Die apparente OTR (OTR-OUR) ergibt sich als zeitliche Änderung von c_L durch Wiedereinschalten der Begasung. Die graphische Darstellung von Gleichung 4.18 ergibt einen Graphen mit k_La als den negativen Kehrwert der Steigung und c^{*} als Ordinatenabschnitt.

Zellfragmente, durch Zellyse und Kernfragmentierung freigesetzte DNA und Proteine verursachen durch Auflagerung eine Gelbildung auf der Membranoberfläche

(Membranfouling, BÖHME 1993) - ein besonderes Problem bei Mikrofiltrations- aber auch mikroporösen Begasungsmembranen. Das Membranfouling kann im Verlauf einer Kultivierung die OTR deutlich verschlechtern.

2. Analysen der Kultivierungen

Mit der Hilfe der im Folgenden dargestellten Methoden wurden die Morphologie, Wachstumsrate und Stoffwechselaktivität der Hepatocyten analysiert bzw. bestimmt. Zudem diente ein Teil der biochemischen Methoden der Analytik der eingesetzten Substanzen (z.B. Kulturmedium), der sich weitere hier dargestellte Methoden anschlossen.

2.1 Bildgebende Verfahren

Es wurden zwei grundlegende bildgebende Methoden zur Untersuchung der Zellen angewendet. Zur optischen Auswertung der Zellkonzentration wurde ein Durchlicht-Mikroskop (Zeiss) verwendet. Ein entsprechendes Mikroskop ist auch im CEDEX[®]-System (Innovatis, Bielefeld) eingebaut. Dieses Gerät wurde ebenfalls zur Auswertung der Zellkonzentration herangezogen und ist nachfolgend näher beschrieben (siehe IV.2.1.2.3). Die Morphologie der Zellen in den statischen Systemen wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops (vgl. IV.1.4.1.1) untersucht. Untersuchungen von Feinstrukturen der Oberflächen der Microcarrier bzw. der an sie adhärierenden Zellen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt.

2.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie werden metallbedampfte Präparate (Zellen, Microcarrier) mit Elektronen, die durch eine Spannung von bis zu 100.000 Volt beschleunigt und durch ein elektromagnetisches Spulensystem mit 2-3 Linsen gebündelt werden, im Vakuum beschossen (Abbildung in ALBERTS et al. 1998, S. 5). Ein Ablenkgenerator sorgt für die zeilenförmige Abrasterung des Präparates durch den Elektrodenstrahl. Die vom Präparat emittierten Sekundärelektronen oder rückgestreuten Elektronen werden von geeigneten Detektoren erfaßt und nach Passieren eines Videoverstärkers auf eine Bildröhre projiziert (REIMER, PFEFFERKORN 1973, S. 1). Im Gegensatz zu Photonen, die eine konstante Wellenlänge haben, variiert die Wellenlänge eines Elektrons mit ihrer spannungsabhängigen Geschwindigkeit nach folgender Gleichung:

Gleichung 4.19: $\lambda = \sqrt{150/U}$ mit: λ : Wellenlänge (nm)
U: Spannung (Volt)

Aufgrund der kürzeren Wellenlänge der Elektronen gegenüber den Photonen werden bei der Rasterelektronenmikroskopie im Vergleich zur Lichtmikroskopie deutlich höhere Auflösungen erzielt (KARP 1999, S. 776).

Die Microcarrier und die an sie adhärenierten Zellen wurden fixiert, getrocknet und mit einer Goldschicht bedampft. Die dazu notwendigen Arbeitsschritte wurden in Anlehnung an eine etablierte Methode zur Rasterelektronenmikroskopie von Microcarriern durchgeführt (CANTU-CROUCH et al. 1995) und sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tab. 4.5: Vorbereitung der Präparate für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen: siehe Tab. 4.6.

Fixierung der Präparate	
Waschen	2x mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer
Fixieren	in 2,5% Glutaraldehydlösung über Nacht (→ kovalente Vernetzung der Proteine)
Waschen	4x in 20 mM K-Phosphatpuffer für je 10 min (→ Entfernung überschüssigen Glutaraldehyds)
Entwässern der Präparate (Acetongradient)	
1x 30 min	30% Aceton p.a./ H ₂ O reinst
1x 30 min	60% Aceton p.a./ H ₂ O reinst
1x 30 min	90% Aceton p.a./ H ₂ O reinst
1x 60 min	100% Aceton p.a./ H ₂ O reinst

Nachfolgend wurden die fixierten und entwässerten Präparate einer Kritischpunkttrocknung (Critical Point Dryer, Balzer Union) mit CO₂ bei 31,1°C und 73,85 bar unterzogen. Anschließend wurden die so getrockneten Präparate mit doppelseitigem Klebeband auf Metalltischchen fixiert und die Leitfähigkeit zwischen Probe und Tischchen mit kolloidalem Leitsilber hergestellt. Dem schloß sich eine Goldbedampfung an (Hummer VII Sputtering System, Anatech, Springfield (VA), USA). Hierdurch wurde eine Goldschicht von 30 nm Schichtdicke auf die Präparate aufgetragen, die die zur Bilddarstellung notwendigen Sekundärelektronen liefert.

Tab. 4.6: Lösungen für das Waschen und Fixieren der Präparate in Vorbereitung auf die REM-Aufnahmen.

K-Phosphatpuffer (20 mM)	1,36 g KH ₂ PO ₄ in 500 ml H ₂ O reinst (Lösung 1) 2,26 g K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O in 500 ml H ₂ O reinst (Lösung 2) 97 ml Lsg. 1 + 153 ml Lsg. 2 → 20 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,2
Glutaraldehyd	25%ige Lösung in H ₂ O für Elektronenmikroskopie (Serva)

Die Aufnahmen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV in der Vakuumkammer des Elektronenmikroskops (Hitachi S-450 Scanning Electron Microscope, Nissei Sangyo, Ratingen) durchgeführt.

2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und -konzentration nach der Trypanblau-Ausschlußmethode

Die Bestimmung der Zellkonzentration (auch als Zelldichte bezeichnet) ist die wichtigste Analyse zur Überwachung eines Kultivierungsprozesses. Der zeitliche Verlauf dieser Größe erlaubt Aussagen über das Wachstumsverhalten der Zellen. Aus der Zelldichte lassen sich die Viabilität ('Lebendigkeit') der Kultur, d.h. der Anteil lebender Zellen an der Gesamtzelldichte, ablesen, ferner in Verbindung mit den anderen analysierten Parametern die zellspezifischen Aktivitäten ermitteln.

Der Gebrauch von synthetischen Farbstoffen zur Vitalfärbung von Zellgewebe geht auf Arbeiten von Paul Ehrlich zurück (1902). Trypanblau (siehe Abb. 4.8) wurde erstmals etwa zur selben Zeit synthetisiert (EVANS, SCHULEMANN 1914).

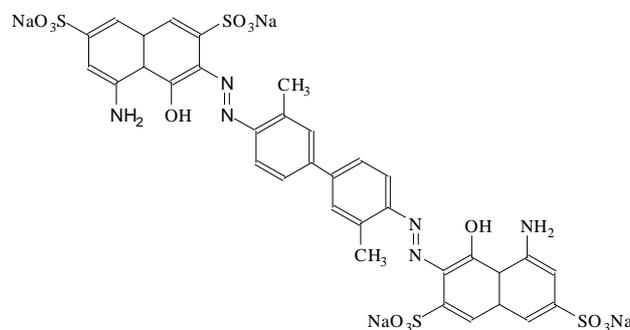


Abb. 4.8: Strukturformel des Azofarbstoffs Trypanblau [$C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$]

Dieser Farbstoff hat die Eigenschaft, selektiv tote (d.h. nekrotische) Zellen anzufärben, während er die intakte Membran lebender Zellen nicht durchdringen kann (TENNANT 1964, BOIADJIEVA et al. 1984).

2.1.2.1 Probenvorbereitung

Die Bestimmung der Zellkonzentration bzw. -zahl in statischen Kultivierungssystemen fand nach erfolgter Trypsinbehandlung (vgl. IV.1.4.1.1) und Resuspendierung durch eine Probenentnahme statt. Bei bekannten Volumina konnte dabei im Falle der statischen Systeme auf die Besiedlungsdichte zurückgeschlossen werden.

Aus den Bioreaktorkultivierungen wurden pro Probenentnahme je 2 ml Kultursuspension entnommen. Nach homogener Resuspendierung der darin befindlichen zellhaltigen Microcarrier bzw. Zellaggregate (Sphäroide) wurden 1 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 100*g abzentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Anschließend wurden 900 µl des nun zellfreien Kulturüberstands durch Trypsinlösung ersetzt und das Eppendorfgefäß für 5 min bei 37°C und 1000 U/min in einen temperierten Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) platziert. Das Trypsin löste dabei Sphäroide bzw. die Gelatinematrix

der Microcarrier auf. Die so vereinzelt Zellen konnten danach einer Zählung zugeführt werden.

2.1.2.2 Auszählung im Hämocytometer

Die Auszählung in einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Zeiss) bei 100facher Vergrößerung (Doppelbestimmung; Auszählung gemäß LINDL, BAUER 1994, S. 94f.). Dazu wurde die zellhaltigen Probe mit Trypanblau (0,4% (w/v), Sigma) in Verdünnungen von 1:1 (je 100 µl Zellsuspension und Trypanblau) bzw. 1:4 (50 µl Zellsuspension in 150 µl Trypanblau) im Well einer Mikrotiterplatte vermischt und ein Aliquot in die beiden Kammern des Hämocytometers appliziert. Unter dem Mikroskop erscheinen lebende Zellen leuchtend gelb, blau gefärbte Zellen können dagegen als tot definiert werden.

Tote Zellen, die ihre Membranintegrität völlig verloren haben und im mikroskopischen Bild stark aufgebläht und hellblau erscheinen (*ghosts*), wurden nicht berücksichtigt. Gleiches gilt für angefärbte Zelltrümmer (Membranfragmente) und Zellkompartimente (Mitochondrien, Zellkerne). Unberücksichtigt blieben auch vermeintlich lebende Zellen, deren Durchmesser in der zweidimensionalen Aufsicht deutlich kleiner ist als der anderer lebender Zellen. Dies sind sog. Apoptosekörperchen (engl. *apoptotic bodies*), die beim 'programmierten Zelltod' (Apoptose) durch Fragmentierung der Zelle in membranumhüllte Untereinheiten entstehen (COLLINS, LOPEZ RIVAS 1993, ABASTADO 1996).

2.1.2.3 Automatische Auszählung im CEDEX[®]-System

Für die automatische Bestimmung der Zellkonzentration wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Analysesysteme entwickelt. Diese basieren jedoch nur auf der Messung indirekter und vielfach nur eindimensionaler Parameter wie die elektrische Kapazität der Zellsuspension (FEHRENBACH et al. 1992, NEVES et al. 2001), der elektrische Widerstand und die Pulsflächenanalyse (WINKELMEIER et al. 1993) sowie die Trübung oder die Lichtbeugung (WU et al. 1994). Hierdurch unterliegen die gemessenen Daten bei der Auswertung stets der benutzerabhängigen Interpretation, so daß die manuelle Auswertung des mikroskopischen Bilds einer Zellprobe den anderen Methoden noch immer bevorzugt wird.

Beim CEDEX[®]-System (Cell Density Examination-System) der Firma Innovatis aus Bielefeld wird die bewährte mikroskopische Auswertung der Trypan-Ausschlußmethode automatisch bewerkstelligt. Das System wurde im Rahmen einer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld entwickelt (GUDERMANN 1998).

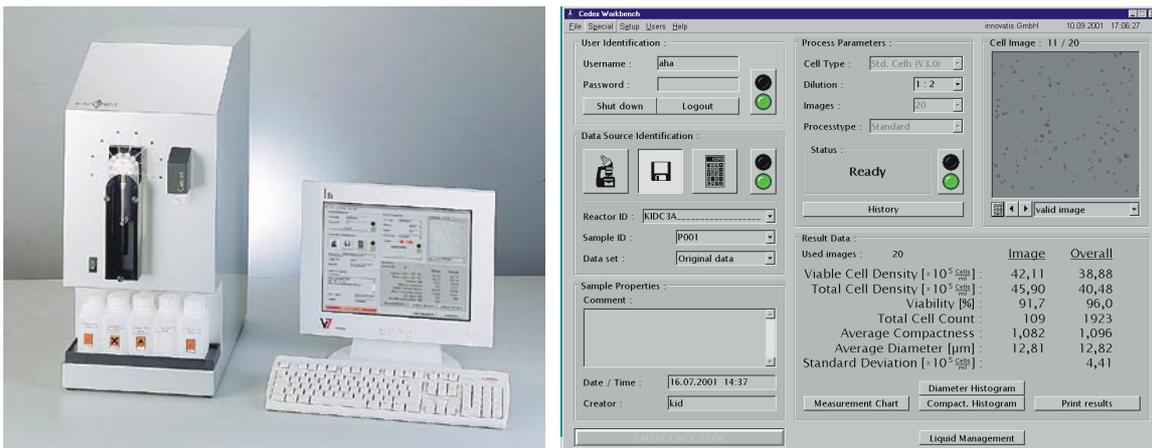


Abb. 4.9: Gesamtansicht des CEDEX®-Systems (links). Benutzeroberfläche des zugehörigen Auswertungsprogramms (Ced-OS = CEDEX®-Operating system) (rechts).

Die angefärbten Zellen werden mittels einer speziellen Bildbearbeitungssoftware über ihre zweidimensionalen Bildinformationen identifiziert und so von Verunreinigungen, Zellbruchstücken oder -organellen differenziert. Ferner wird über die Verteilung der Grauwerte eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen vorgenommen. Damit liegen der Auswertung einer Zellprobe vielfältigere und aussagekräftigere Parameter zugrunde, als bei den vorangestellten Verfahren. Neben der Auswertung der Messung ist auch die komplette Probenvorbehandlung, das Befüllen der Meßzelle und die Reinigung des Systems über ein entsprechendes Flüssigkeitsmanagement automatisiert. Bei den Messungen wurden 1 ml einer im Probengefäß vorgelegten Zellprobe im Gerät mit 1 ml einer 0,2%igen (v/v) Trypanblaulösung (1 Teil 0,4%ige (w/v) Stammlösung + 1 Teil CMF-PBS) vermischt. Eine Messung bestand aus 20 Einzelzählungen in den unterschiedlichen Bereichen der Meßzelle. Das Endergebnis entsprach dem arithmetischen Mittel dieser Einzelzählungen.

2.2 Biochemische Verfahren

2.2.1 Bestimmung der Konzentration von Glucose und Lactat

Glucose ist einer der wichtigsten Energieträger tierischer Zellen. Lactat als Abbauprodukt des Glucose- und Aminosäurestoffwechsels im Rahmen der Glycolyse und sich anschließender Milchsäuregärung kann in höheren Konzentrationen - häufig in Verbindung mit einem sinkenden pH-Wert - für die Zellen schädlich sein (MARX et al. 1988, CATAPANO et al. 1996, PATEL et al. 2000).

Die Bestimmung dieser beiden Parameter wurde mit dem Analyzer YSI 2700 S (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs (OH), USA) durchgeführt. Das Meßprinzip ist amperometrisch und beruht auf dem selektiven Umsatz von Glucose und Lactat durch

membranimmobilisierte Enzyme in zwei getrennten Meßketten, die an eine gemeinsame Probenkammer angeschlossen sind (BUCSIS 1995).

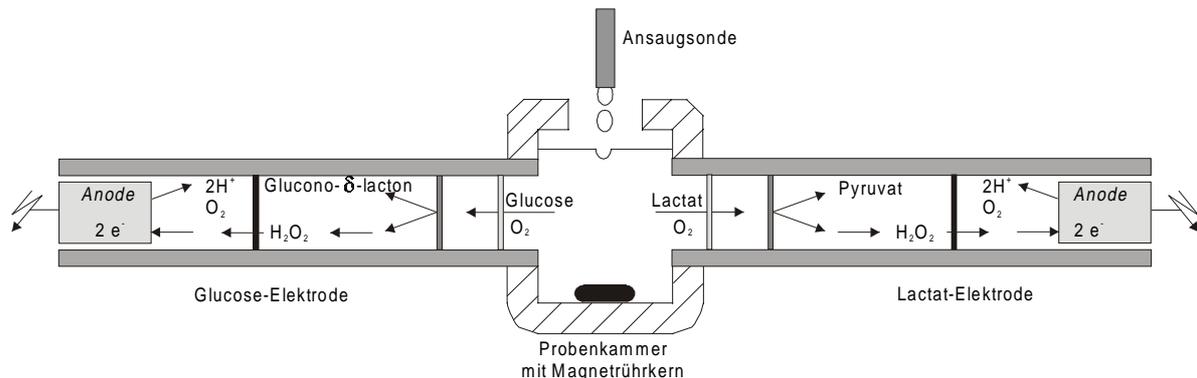


Abb. 4.10: Probenkammer und Enzymelektroden zur Bestimmung von Glucose und Lactat im YSI-Analyzer.

In der Kammer erfolgt die Vermischung eines Aliquots (20 μ l) der (zellfreien) Probe mit dem YSI-Puffer. In den Meßketten muß die so konditionierte Probe drei Membranen passieren: Die erste (aus Polycarbonat) hält Partikel aus der Probe zurück. An der zweiten sind die Enzyme (Glucose- bzw. Lactatoxidase) immobilisiert. Die dritte Membran (aus Celluloseacetat mit einer Ausschlußgrenze von 200 Da) ist für andere anodisch reduzierbare Substanzen als H_2O_2 nicht durchlässig. Das aus der jeweiligen Enzymreaktion neben Glucono- δ -lacton bzw. Pyruvat ebenfalls entstehende H_2O_2 kann dagegen die dritte Membran passieren und wird an der dahinter befindlichen Platin-Anode oxidiert. Im linear-amprometrischen Meßverfahren mit einem Ag/AgCl-Bezugssystem ist der dadurch entstehende Stromfluß der lokalen H_2O_2 -Konzentration und somit der Glucose- bzw. Lactatkonzentration proportional. Der Betrieb des Gerätes (Ansaugen der Probe, Vermischen der Probe mit Puffer in der Kammer, Reinigung von Kammer und Ansaugsonde und die Kalibrierung mit Eichlösungen) erfolgt programmgesteuert und automatisch. Die Meßdauer beträgt ca. 1 min. Das Ergebnis der Messung in der Einheit g/l kann auf der Display-Anzeige des Gerätes abgelesen werden.

2.2.2 Bestimmung der Konzentration der Aminosäuren

Im Stoffwechsel tierischer Zellen übernehmen Aminosäuren eine Vielzahl von Aufgaben. Sie sind Energielieferanten, Stickstoffdonatoren, Vorstufen anderer Biomoleküle (z.B. Nucleinsäuren) und Bausteine der zelleigenen Strukturproteine und Enzyme. Für die Bewertung des metabolischen Zustandes einer Kultur ist ihre Konzentrationsbestimmung immanant wichtig, da eine sinkende Produktivität häufig eher mit einer im Medium limitierten Aminosäure einhergeht als mit einem Sinken der Glucosekonzentration (BÜNTEMEYER 1988).

Für die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen wurde die Umkehrphasen- (engl. *reversed phase*) HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) mit der Methode

einer Vorsäulenderivatisierung durchgeführt (LIM 1987). Dazu wurden die Aminosäuren in der (zellfreien) Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (50 mg ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in 1 ml Methanol p.a. + 100 μ l 3-Mercaptopropionsäure + 9 ml 0,6 M Boratpuffer, pH 10,4) behandelt.

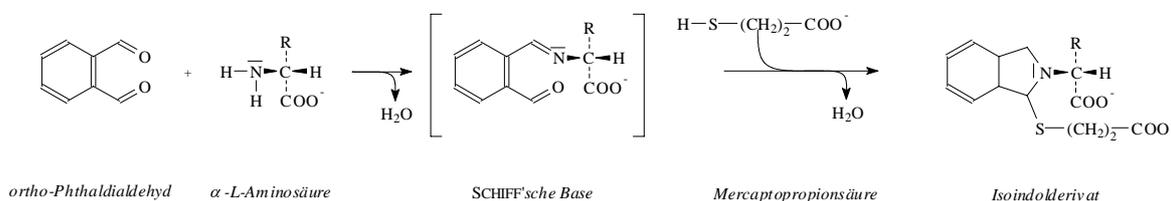


Abb. 4.11: Derivatisierung primärer Amine (Aminosäuren) mit OPA und Mercaptopropionsäure.

OPA kondensiert unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 9$) in einem ersten Reaktionsschritt mit den α -Aminogruppen der Aminosäuren. Dabei entstehen instabile Schiff'sche Basen. Weiche Reduktionsmittel wie 3-Mercaptopropionsäure wandeln die leicht hydrolysierbare C-N-Doppelbindung durch eine Cyclisierungsreaktion unter Wassereliminierung zu Isoindolderivaten um.

Anschließend erfolgte der Auftrag auf eine chromatographische Säule (Ultrasphere[®] ODS C18, 5 μ m, Länge: 150 mm, \varnothing : 4,6 mm, Beckmann, USA). Die stationäre Phase bildete ein Silikatmaterial, an das über Organo-Siliziumbindungen lange Kohlenwasserstoffketten gebunden waren (Octadodecylsilikat), wodurch die Phase vollkommen unpolar wurde. Als mobile Phase diente ein binäres Puffersystem, das durch stetige Veränderung des Mischungsverhältnisses von einem polaren zu einem unpolaren Charakter wechselte. Die HPLC-Anlage (D 450, Kontron Instruments, Neufarn) stellte dabei die Mischung des polaren Puffer A (89% 0,1 M Na-Acetat, pH 7,5 + 10% Methanol p.a. + 1% Tetrahydrofuran p.a.) zum unpolaren Puffer B (15% 0,1 M Na-Acetat, pH 5,2 + 85% Methanol p.a.) in einem Gradientenprofil vollautomatisch ein. Die Trennung erfolgte über hydrophobe Interaktionen der Isoindolderivate mit der unpolaren Matrix.

Das konjugierende π -Elektronensystem machte diese Reaktionsprodukte über Fluoreszenzspektrometrie bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektierbar (Fluoreszenzdetektor SFM 25, Kontron). Die EDV-gestützte Auswertung (KromaSystem 3000, Kontron) anhand der Retentionszeiten und basisliniengetrennten Peakflächenberechnung erfolgte durch Vergleich zu Aminosäurestandards und einem sog. internen Standard (δ -Aminovaleriansäure).

Vorbehandlung der Proben:

50 μ l einer (zellfreien) Probe wurden einer Proteinfällung mit 50 μ l 10%iger Perchlorsäure plus 300 μ M δ -Aminovaleriansäure unterzogen. Nach Abzentrifugieren der ausfallenden Proteine (3 min, 15.000*g) wurden 50 μ l des Überstandes mit 100 μ l Natriumboratpuffer (0,6 M; pH 10,4) versetzt. 20 μ l davon wurden in ein Probegefäß abgefüllt, versiegelt und in den Autosampler (Modell 460, Kontron) der HPLC-Anlage gestellt.

2.2.3 Bestimmung der Konzentration von Ammonium

Im Stoffwechsel tierischer und humaner Zellen entsteht Ammonium durch Desaminierungsreaktionen beim Abbau von Aminosäuren. NH_4^+ -Konzentrationen von bereits 2 mM können die Viabilität und metabolischen Funktionen von primären Hepatocyten reduzieren (CATAPANO et al. 1996). Ein besonderes Problem in der Kultivierung ist der temperaturabhängige Spontanzerfall von Glutamin durch eine intramolekulare Cyclisierungsreaktion zu Pyroglutamat und Ammonium bzw. Ammoniak (TRITSCH, MOORE 1962).

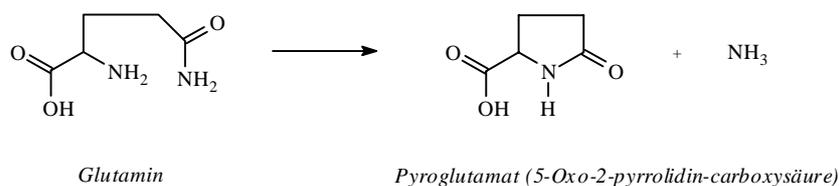


Abb. 4.12: Temperaturabhängiger Spontanzerfall von Glutamin in Lösung.

Abgesehen vom Glutaminverlust kann neben der Akkumulation von Ammonium auch die Anreicherung von Pyroglutamat für die Zellen schädlich sein (BÜNTEMEYER et al. 1998).

Das Meßprinzip der Ammoniumbestimmung beruht auf der aus der Aminosäureanalytik bekannten Reaktion primärer Amine mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) und Thiolverbindungen zu Isoindolderivaten und wurde zur Bestimmung von NH_4^+ in Zellkulturüberständen in der AG Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld entwickelt (BÜNTEMEYER 2000). 20 μl (zellfreie) Meßlösung werden mit 1,3 ml Derivatisierungsreagenz (250 mg OPA + 500 mg Thioglycolat + 2 ml Methanol p.a. + 100 ml 0,4 M Na-Boratpuffer pH 10,4) in einer Micro-Quarzküvette vermischt und in einen spektrofluorimetrischen Detektor (RF-551, Shimadzu, Kyoto, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 415 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm gestellt. Die maximale Emission wurde nach ca. 1-minütiger Meßdauer erreicht. Die Auswertung fand durch eine Zweipunkt-Eichung mit einem NH_4^+ -Standard (100 mg/l) statt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen liegt im geringen Volumen der Meßlösung und dem geringen Zeitaufwand.

2.2.4 Bestimmung der extrazellulären Lactatdehydrogenase-(LDH-)Aktivität

Lactatdehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) ist ein aus vier globulären Untereinheiten (M- und H-Monomere) bestehender, cytosolischer Enzymkomplex. Die stöchiometrische Zusammensetzung der Monomere ist gewebspezifisch (BELL et al. 1972, S. 37f.).

LDH ist dasjenige Enzym, das unter sauerstofflimitierenden Bedingungen die ATP-Versorgung tierischer Zellen innerhalb der Glykolyse im Umsatz von Pyruvat zu Lactat durch Regeneration der Reduktionsäquivalente aufrechterhält. Daher bezeichnet man die durch LDH katalysierte Reaktion auch als Reaktion Nr. 11 der Glykolyse (VOET, VOET 1992, S. 440).

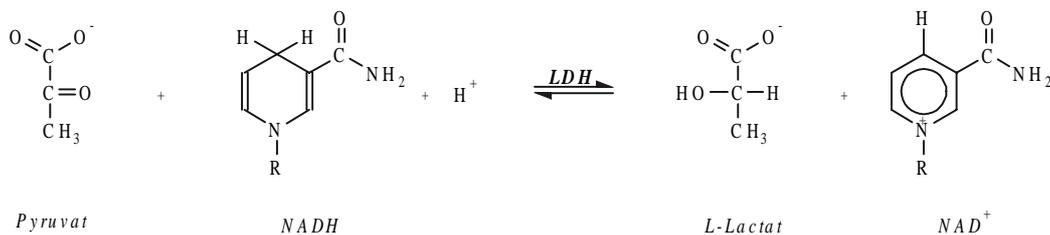


Abb. 4.13: Reaktionsgleichung des enzymatischen Umsatzes durch Lactatdehydrogenase (LDH).

Die Oxidation von NADH zu NAD⁺ verändert die optischen Eigenschaften des Moleküls: Während die reduzierte Form bei 339 nm ein Absorptionsmaximum hat, absorbiert NAD⁺ bei dieser Wellenlänge kein Licht. Unter den idealisierten Bedingungen der Enzymkinetik nach Michaelis und Menten (LEHNINGER 1994, S. 243ff.) ist demzufolge die Enzymaktivität als Maß für die Enzymkonzentration linear proportional zur zeitlichen Extinktionsabnahme durch den Umsatz von NADH zu NAD⁺.

Als cytosolisches Enzym deutet ein Nachweis von LDH im Kulturüberstand auf Zellschädigung durch Membrandefekte bzw. Zellyse hin. Daher wird es als Markerenzym verwendet, um das Absterben der Zellen in der Kultur zu bestimmen.

Im Meßansatz wurden 100 µl zellfreier Kulturüberstand mit 700 µl Reaktionspuffer (Na₂HPO₄*12 H₂O + NaH₂PO₄*2 H₂O, 30 mM, pH 7,4) und 100 µl Pyruvatlösung (Na-Pyruvat in Reaktionspuffer, 10 mM) sowie 100 µl NADH-Lösung (NADH in Reaktionspuffer, 2,7 mM) in einer Micro-Quarzküvette vermischt. Die Messung der linearen Extinktionsabnahme erfolgte in einem EDV-gestützten Spektrophotometer (Uvicon 930, Software 8939, Kontron Instruments, Neufarn) mit temperiertem Küvettenhalter (37°C) für zwei Minuten mit einer Datenaufnahmefrequenz von 50 Messungen pro Minute bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Extinktion proportional zur Schichtdicke der Lösung und zur Konzentration der in ihr befindlichen, absorbierenden Substanz(en).

Unter Berücksichtigung, daß die zeitliche Konzentrationsänderung des Substrats der Aktivität des Enzyms entspricht, ergibt sich folgende Gleichung zur Berechnung der Enzymaktivität (WILSON, GOULDING 1991, S. 124 u. 339):

$$v = \frac{\Delta E}{d * \epsilon * \Delta t} * \frac{V_{gesamt}}{V_{Probe}} \quad \text{Gleichung 4.20}$$

mit:

- v : Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} = \text{kat} \cdot \text{l}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$)
- ΔE : Extinktionsdifferenz
- d : Schichtdicke der Lösung (cm)
- ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm ($6300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- Δt : Meßdauer (s)
- V_{gesamt} : Gesamtvolumen des Meßansatzes (ml)
- V_{Probe} : Volumen der Probe (ml)

2.2.5 Bestimmung der Cytochrom-P450-Aktivitäten

Eine der Hauptaufgaben der Hepatocyten in der Leber besteht darin, endogene und exogene toxische Verbindungen unschädlich zu machen. Die dem zugrunde liegenden Detoxifizierungsreaktionen finden unter besonderer Beteiligung der Enzyme des Cytochrom-P450-Systems statt (vgl. II.1.5.1). Das Reaktionsschema einer beliebigen CYP-P450-Reaktion sieht wie folgt aus (siehe Abb. 4.14).

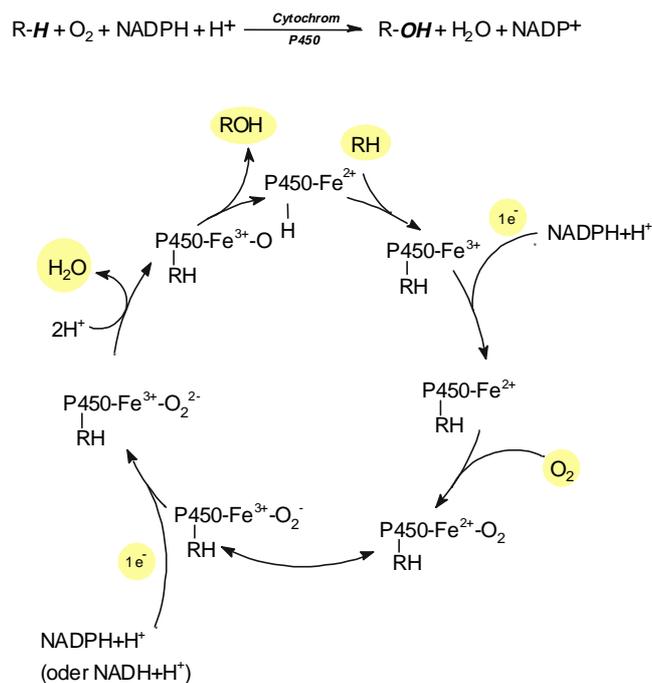


Abb. 4.14: Oxidation durch Cytochrom P450. R-H = Substrat, R-OH = oxidiertes Substrat (modifiziert nach DERELANKO, HOLLINGER 1995, S. 550 und MARQUARDT, SCHÄFER 1994, S. 69).

Die für die Gesamtreaktion erforderlichen Reduktionsäquivalente liefert zum einen die Cytochrom-P450-Reduktase (Reaktionsschritt 2 in Abb. 4.14) bzw. neben erstgenanntem Enzym die Cytochrom-b₅-Reduktase (Reaktionsschritt 4 in Abb. 4.14). Die Wirkung der Cytochrom-P450-Enzyme lässt sich durch Zugabe sog. Induktoren (z.B. planar-polycyclische Kohlenwasserstoffe) steigern. Bekanntes Beispiel ist die durch den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor) vermittelte Induktion humaner Cytochrome der CYP1A-Subfamilie. Durch Bindung des Induktors an den Ah-Rezeptor wird der Rezeptor in den Zellkern transloziert und bindet an sein Partnerprotein Arnt. Dieser Komplex führt durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen (sog. XRE-Motive) zur transkriptionellen Aktivierung von Genen, die z.B. für CYP1A1 codieren (HAHN 1997).

In dieser Arbeit wurden mittels biochemischer Modellreaktionen die Aktivitäten von drei Cytochrom-P450-Systemen und deren Induzierbarkeit in konfluenten Monolayer-Kulturen der Hepatocytelinien HepT, K105 und C3A nach etablierten Verfahren untersucht.

2.2.5.1 Coumarin-Hydroxylase-(CH-)Aktivität

Zur Cytochrom-P450-Superfamilie (EC 1.14.14.1) gehören u.a. drei heptospezifisch detoxifizierende Familien (CYP1, CYP2 und CYP3) (WRIGHTON et al. 1996, GLUE, CLEMONT 1999). Die der CYP2-Familie zugeordnete humane CYP2A-Subfamilie besteht allein aus dem Enzym CYP2A6. Die katalytische Hydroxylierung von Coumarin zu 7-Hydroxycoumarin (syn. Umbelliferon, siehe Abb. 4.15) wird fast ausschließlich durch dieses Enzym bewerkstelligt. Deshalb ist die Coumarinhydroxylierung die selektivste Methode zur Detektion einer spezifischen humanen Cytochrom-Aktivität (MILES et al. 1990, PELKONEN et al. 2000).

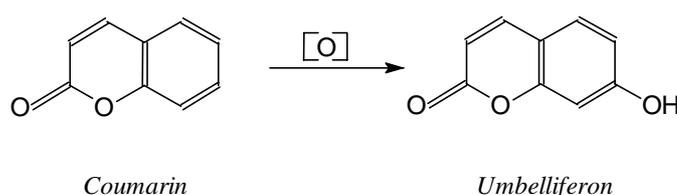


Abb. 4.15: Katalytische Hydroxylierung von Coumarin zu 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon).

Coumarin wird als Riechstoff oder Fixateur in der Parfümindustrie verwendet. Verschiedene Coumarinderivate (z.B. Warfarin) haben antikoagulative Wirkung und werden deshalb in der Thrombosetherapie eingesetzt. Während die Gefahren durch eine unmittelbare Coumarinintoxikation beim Menschen aufgrund der niedrigen Dosisexposition verschwindend gering sind (LAKE 1999), besteht bei falscher Verabreichung der Coumarinantikoagulantien ein hohes Risiko innerer Blutungen (BAGLIN 1998). Die Aktivität der Cytochrom-P450-Enzyme lässt sich durch eine Reihe therapeutischer Substanzen induzieren bzw. verstärken (PRICE et al. 2000). Beim humanen CYP2A6 gelingt dies durch

Zugabe des Alkoholdehydrogenasehemmers Pyrazol, während das Antiepileptikum Phenobarbital eher schwach wirksam ist (DONATO et al. 2000). Auch bei der Maus wird die Coumarinhydroxylierung durch eine singuläre Monooxygenase (CYP2A5) katalysiert. Deren Aktivität läßt sich sowohl durch Pyrazol als auch Phenobarbital steigern (SALONPÄÄ et al. 1994, GOKHALE et al. 1997).

Die CH-Aktivität der drei Hepatocytelinien wurde anhand des Umsatzes von Coumarin (Substrat) zu 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon, Produkt) gemessen. Pro Zelllinie wurden zwei Versuchsreihen aufgestellt. In der ersten Versuchsreihe wurde neben dem Grundumsatz die Induzierbarkeit des zugrunde liegenden Enzyms durch Phenobarbital untersucht. In der zweiten Versuchsreihe war der Induktor Pyrazol Gegenstand der Untersuchung. Pro Versuchsreihe ergeben sich aus den vier eingesetzten Induktorkonzentrationen (siehe Tab. 4.7) sechs Ansätze. Pro Ansatz wurden sechs Parallelen untersucht, die den jeweiligen Probenahmezeitpunkten entsprechen. Eine Parallele entspricht dabei einem Well (= ein Monolayer). Pro Versuchsreihe ergeben sich daraus 24 Parallelen, welches zwei 12-Well-Platten entspricht. Somit wurden für beide Versuchsreihen pro Zelllinie vier 12-Wellplatten verbraucht. Da die Versuchsreihen zudem zweimal wiederholt wurden, ergibt sich ein Gesamtverbrauch von zwölf 12-Well-Platten pro Zelllinie, d.h. pro Zelllinie wurden insgesamt 144 Monolayer erzeugt.

Vor der Zugabe des Substrats wurden die Zellen zweimal für je 24 Stunden mit den unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Induktors behandelt. Nach Entfernung des Induktors und Zugabe des Substrats (50 μ M Coumarin) wurden über einen Zeitraum von 0-10 Stunden alle zwei Stunden der Kulturüberstand des zum jeweiligen Probenahmezeitpunkts gehörigen Wells entnommen und zunächst bei -20°C eingefroren. Nach vier Stunden wurde zudem durch Trypsinierung und Trypanblaufärbung die Zellzahl des zugehörigen Monolayers ermittelt. Hierdurch wurde die Bestimmung einer zellspezifischen Umsatzrate möglich. Es wurde dabei idealisierter Weise angenommen, daß sich die Zellzahl pro konfluentem Monolayer während des Versuchszeitraums von zehn Stunden nicht entscheidend verändert.

Tab. 4.7: Versuchsübersicht der Untersuchung auf CH-Aktivität pro Hepatocytelinie. Pro Induktorkonzentration (= Ansatz) wurden zu sechs Zeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h) Proben aus jeweils unterschiedlichen Wells pro Ansatz entnommen. Hierdurch ergeben sich pro Ansatz sechs Parallelansätze. Die Konzentrationen entsprechen den jeweiligen Endkonzentrationen pro Well.

Phenobarbital (mM)		Pyrazol (μ M)	
6x Ansatz 1	0	6x Ansatz 5	0
6x Ansatz 2	0,1	6x Ansatz 6	1
6x Ansatz 3	0,5	6x Ansatz 7	5
6x Ansatz 4	1	6x Ansatz 8	10

Das konjugierende π -Elektronensystem von Umbelliferon (Produkt des enzymatischen Umsatzes von Coumarin) macht dieses Molekül fluoreszenzspektrometrisch detektierbar. Bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm wird dabei hauptsächlich Licht einer

Wellenlänge von 460 nm emittiert (CREAVEN et al. 1965). Diese Emission wurde nach dem Auftauen der Proben mit Hilfe des spektrofluorimetrischen Detektors (vgl. IV.2.1.3) gemessen. Die Konzentration des in den Proben enthaltenen Produkts wurde durch eine entsprechende Eichgerade mit Standards zwischen 0 und 1000 nM Umbelliferon ermittelt. Beide Induktoren (Pyrazol und Phenobarbital, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und das Substrat (Coumarin, Sigma-Aldrich) wurden unter DMSO-Vermittlung jeweils in T002-Medium mit einer DMSO-Endkonzentration von 0,5% (v/v) (vgl. IV.1.2) gelöst. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde mit dem Produkt (Umbelliferon, Sigma-Aldrich) in gleicher Weise verfahren. Die Kultivierung der Hepatocyten zur Erzeugung der Monolayer in den 12-Well-Platten fand ebenfalls mit T002-Medium statt. Das Kulturvolumen und das Volumen der Induktorzugabe (Induktionsvolumen) betrug je 2 ml pro Well, die Substratzugabe erfolgte durch 1 ml coumarinhaltigen Mediums pro Well (Substratvolumen).

2.2.5.2 7-Ethoxycoumarin-*o*-Deethylase-(ECOD-)Aktivität

Die CYP1-Familie humaner Cytochrom-P450-Enzyme besteht lediglich aus der CYP1A-Subfamilie. Diese wiederum umfaßt die beiden Enzyme CYP1A1 und CYP1A2. Während CYP1A1 nahezu in allen Organen vorkommt, ist CYP1A2 streng leberspezifisch (WRIGHTON et al. 1993). CYP1A2 ist das prominenteste Enzym des leberspezifischen Umsatzes von 7-Ethoxycoumarin zu 7-Hydroxycoumarin (syn. Umbelliferon) (ECOD-Aktivität, siehe Abb. 4.16), an dem jedoch auch eine Reihe weiterer Cytochrom-P450-Enzyme (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A3/A4 und eben CYP1A1) beteiligt sein können (DONATO et al. 1999). Deshalb kann der ECOD-Aktivität keine Wirkung eines spezifischen Cytochrom-P450-Enzymes zugeordnet werden. CYP1A2 wird zwar in der Leber konstitutiv exprimiert (GONZALES 1989), dennoch kann die Aktivität durch verschiedene Induktoren verstärkt werden. Als besonders wirksame Induktoren für CYP1A2 haben sich die planar-polycyclischen Kohlenwasserstoffe 3-Methylcholantren (QUATTROCHI et al. 1994) und β -Naphthoflavon (MEUNIER et al. 2000) herausgestellt, die auch die Induktion von CYP1A1 bewirken können. Die Deethylierung des Substrats 7-Ethoxycoumarin erfolgt durch Angriff des am Cytochrom P450 aktivierten Sauerstoffs am α -C-Atom unter Bildung eines Halbacetals, welches wegen seiner geringen Stabilität zu Acetaldehyd und Umbelliferon gespalten wird (JOSEPHY 1997, S. 211, MÜHLENFELD 1999).

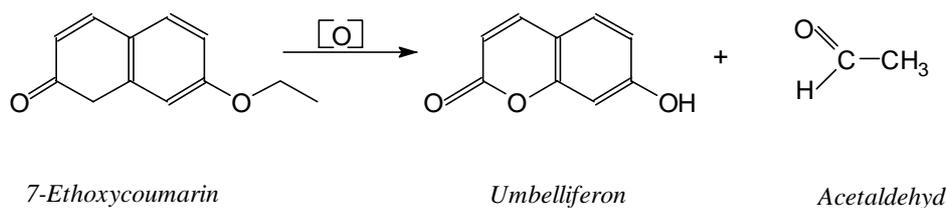


Abb. 4.16: Katalytische Deethylierung von 7-Ethoxycoumarin zu 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon).

An der ECOD-Aktivität in Maushepatocyten sind ebenfalls mehrere Cytochrom-P450-Enzyme (CYP1A1/A2, CYP2A5 und CYP2B1) beteiligt (YAMAZAKI et al. 1996), so daß auch hier keine spezifische Zuordnung möglich ist. Aufgrund der großen Homologie zwischen dem humanen und murinen CYP1A1/A2-System ist 3-Methylcholantren auch hier ein effektiver Induktor (BERNDTSON, CHEN 1994). Die Induktion durch β -Naphthoflavon ist demgegenüber eher fraglich (GHOKHALE ET AL 1997). Durch die Beteiligung der Enzyme CYP2A5 und CYP2B1 ist eine Induktion durch Phenobarbital möglich (GREENLEE, POLAND 1978, LUBET et al. 1990).

Die Messung der ECOD-Aktivität von HepT, K105 und C3A fand entsprechend dem Versuchsaufbau zur CH-Aktivitätsmessung statt (vgl. IV.2.2.5.1). Neben dem Grundumsatz durch die Zellen wurde die Induzierbarkeit der Aktivität durch drei Substanzen (3-Methylcholantren, Phenobarbital und β -Naphthoflavon) untersucht (siehe Tab. 4.8). Jede Versuchsreihe wurde auch hier zweimal wiederholt. Deshalb war pro Zelllinie die Erzeugung von insgesamt 216 Monolayern in 18 12-Well-Platten erforderlich.

Tab. 4.8: Versuchsübersicht der Untersuchungen zur ECOD-Aktivität pro Hepatocytelinie. Der grundlegende Versuchsaufbau entspricht dem der Untersuchungen zur CH-Aktivität (vgl. Tab. 4.7).

3-Methylcholantren (μM)		Phenobarbital (mM)		β -Naphthoflavon (μM)	
6x Ansatz 1	0	6x Ansatz 5	0	6x Ansatz 9	0
6x Ansatz 2	10	6x Ansatz 6	0,1	6x Ansatz 10	10
6x Ansatz 3	50	6x Ansatz 7	0,5	6x Ansatz 11	50
6x Ansatz 4	100	6x Ansatz 8	1	6x Ansatz 12	100

Zur Berechnung der spezifischen ECOD-Aktivität wurden auch hier pro Ansatz zum Zeitpunkt 4 h das entsprechende Well trypsiniert und die Zellen nach Trypanblaufärbung ausgezählt. Da das Produkt (7-Hydroxycoumarin = Umbelliferon) aus ECOD- und CH-Aktivität dasselbe ist, wurde die Ermittlung der Konzentration von Umbelliferon auf die entsprechende Weise durchgeführt (vgl. IV.2.2.5.1).

Die drei Induktoren und das Substrat 7-Ethoxycoumarin (alle Sigma) wurden DMSO-vermittelt in T002-Medium mit einer DMSO-Endkonzentration von 0,5% (v/v) gelöst. Das Induktionsvolumen betrug je 1 ml/Well. Das Kulturvolumen zur Erzeugung der Monolayer (T002-Medium) und das Substratvolumen lagen bei je 2 ml/Well. Die Substratkonzentration betrug dabei 2,4 μM 7-Ethoxycoumarin/Well.

2.2.5.3 7-Ethoxyresorufin-o-Deethylase-(EROD-)Aktivität

Die EROD-Aktivität, d.h. die enzymatische Umsetzung von 7-Ethoxyresorufin zu 7-Hydroxyresorufin (siehe Abb. 4.17), ist in der menschlichen Leber neben CYP1A1 hauptsächlich auf die Wirkung von CYP1A2 zurückzuführen (ROBERTS et al. 1993). Bei der Maus ist daran vorwiegend CYP1A1 beteiligt (NERURKAR et al. 1993). Da beide Enzyme

auch Bestandteile der ECOD-Aktivität sind (vgl. IV.2.2.5.2), läßt sich ihre Wirkung auch hier durch die entsprechenden Induktoren verstärken. Allerdings variiert im Falle der murinen Hepatocyten die Induktionsfähigkeit je nach verwendetem Maus-Stamm, so daß diese Angaben nicht absolut zu bewerten sind (GHOKALE et al. 1997). Im Gegensatz zur Induzierbarkeit ist α -Naphthoflavon ein effektiver Inhibitor dieser Enzyme in beiden Spezies (BURKE et al. 1983, WRIGHTON et al. 1996). Der Deethylierungsmechanismus entspricht demjenigen der ECOD-Aktivität (siehe IV 2.2.5.2).

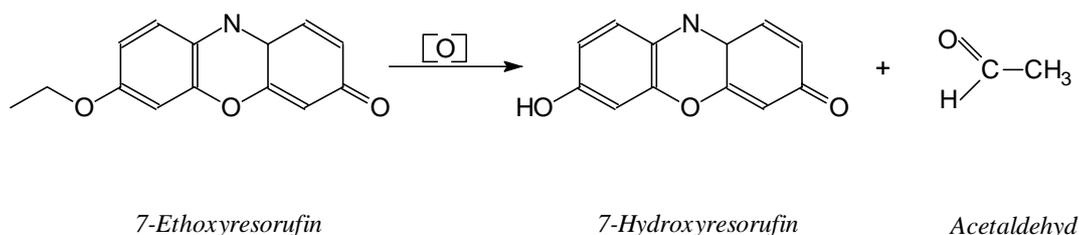


Abb. 4.17: Katalytische Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin zu 7-Hydroxyresorufin

Entsprechend den zuvor beschriebenen Versuchsanordnungen zur Bestimmung von Cytochrom-P450-Aktivitäten in den drei Hepatocytelinien wurde hier neben der Grundaktivität im Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zu 7-Hydroxyresorufin die Induzierbarkeit durch 3-Methylcholantren, β -Naphthoflavon und Phenobarbital untersucht. Ferner wurde die Inhibition der Grundaktivität mittels α -Naphthoflavon überprüft (siehe Tab. 4.9). Pro Zelllinie ergeben sich daraus vier Versuchsreihen, die - wie bei den anderen Cytochrom-P450-Aktivitätsuntersuchungen auch - zweimal wiederholt wurden. Deshalb wurden hier pro Zelllinie insgesamt 288 Monolayer in 24 12-Well-Platten erzeugt.

Tab. 4.9: Versuchsübersicht der Untersuchungen zur EROD-Aktivität pro Hepatocytelinie. Der grundlegende Versuchsaufbau den vorangestellten Untersuchungen zur CH- und ECOD-Aktivität (vgl. Tab. 4.7 und 4.8).

3-Methylcholantren (μM)		Phenobarbital (mM)	
6x Ansatz 1	0	6x Ansatz 5	0
6x Ansatz 2	10	6x Ansatz 6	0,1
6x Ansatz 3	50	6x Ansatz 7	0,5
6x Ansatz 4	100	6x Ansatz 8	1
β -Naphthoflavon (μM)		α -Naphthoflavon (μM)	
6x Ansatz 9	0	6x Ansatz 13	0
6x Ansatz 10	10	6x Ansatz 14	10
6x Ansatz 11	50	6x Ansatz 15	50
6x Ansatz 12	100	6x Ansatz 16	100

Das Produkt der EROD-Aktivität (7-Hydroxyresorufin) wurde ebenfalls mit Hilfe des spektrofluorimetrischen Detektors bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm gemessen (BURKE et al. 1985). Zur Quantifizierung des

Substratumsatzes durch die Zellen diene ein Eichstandard zwischen 0 nM und 1000 nM Resorufin in T002-Medium. Zur Berechnung der spezifischen EROD-Aktivität wurden auch hier pro Ansatz zum Zeitpunkt 4 h das entsprechende Well trypsinisiert und die Zellen nach Trypanblaufärbung ausgezählt. Substrat, Induktoren und der Inhibitor α -Naphthoflavon (allesamt Sigma) wurden DMSO-vermittelt in T002-Medium mit einer DMSO-Endkonzentration von 0,5% (v/v) gelöst. Kultur-, Substrat- und Induktionsvolumina entsprachen denjenigen der anderen Cytochrom-P450-Untersuchungen. Als Substrat wurden 2,4 μ M Ethoxyresorufin/Well eingesetzt.

2.2.5.4 Untersuchung möglicher Substanzeffekte auf die Zellviabilität

Die eingesetzten Induktoren bzw. Inhibitoren sind potentiell cytotoxische Substanzen. Deshalb wurde untersucht, in welchem Umfang die Zellen innerhalb der 2x 24stündigen Exposition mit diesen Substanzen geschädigt werden, da dies wiederum die Aktivität im Umsatz mit den nachfolgend zugeführten Substraten negativ beeinflussen könnte. Insgesamt wurden die vier Induktoren (3-Methylcholanthren, Phenobarbital, β -Naphthoflavon, Pyrazol) und der Inhibitor (α -Naphthoflavon) in je vier unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (siehe Tab. 4.10). Die Substanzkonzentrationen entsprachen dabei denjenigen der Aktivitätsuntersuchungen (vgl. Tab. 4.7, Tab. 4.8 und Tab. 4.9). Pro Zelllinie ergaben sich daraus fünf Versuchsreihen mit je vier Ansätzen. Dies wiederum entsprach pro Zelllinie 20 Monolayern. Da jede Versuchsreihe zweimal wiederholt wurde, war die Erzeugung von insgesamt 60 Monolayern pro Zelllinie in fünf 12-Well-Platten erforderlich.

Tab. 4.10: Versuchübersicht über die Untersuchung möglicher Substanzeffekte auf die Zellviabilität pro Hepatocytelinie. Die Zellen wurden den jeweiligen Substanzkonzentrationen für 2x 24 Stunden ausgesetzt.

	3-Methylcholanthren (μ M)	Phenobarbital (mM)	β -Naphthoflavon (μ M)	Pyrazol (mM)	α -Naphthoflavon (μ M)
3x Ansatz 1	0	0	0	0	0
3x Ansatz 2	10	0,1	10	1	10
3x Ansatz 3	50	0,5	50	5	50
3x Ansatz 4	100	1	100	10	100

Die Substanzen wurden wie in den zuvor aufgeführten Untersuchungen der Cytochrom-P450-Aktivitäten eingesetzt. Nach insgesamt 48 Stunden wurden nach Entfernung des Überstandes die im jeweiligen Monolayer verbliebenen Zellen durch Trypsinierung und Trypanblaufärbung ausgezählt.

2.2.6 Bestimmung der Osmolalität

Die cytosolischen Ionen stehen über die für Wasser permeable Zellmembran in physikochemischer Interaktion mit den im Medium gelösten Ionen. In Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis der Ionen zu beiden Seiten der Membran entsteht innerhalb der Zelle ein osmotischer Druck. Ein isomolares Verhältnis sorgt dafür, daß die Zellen weder plasmolysieren noch durch erhöhte Wasseraufnahme platzen. Der osmotische Wert einer Lösung wird durch die Osmolalität bestimmt. Diese sollte im Kulturmedium von Säugerzellen zwischen 270 (RPMI-Medium) und 340 mOsmol/kg H₂O (DMEM) betragen (LINDL, BAUER 1994, S. 63).

Der Gefrierpunkt einer Lösung wird durch den gelösten Stoff gegenüber dem des reinen Lösungsmittels stets erniedrigt. Das Raoult'sche Gesetz besagt, daß bei gleicher molarer Konzentration c_M die Gefrierpunktserniedrigung ΔT_F für ein bestimmtes Lösungsmittel F unabhängig vom gelösten Stoff ist (STUART, KLAGES 1992, S. 104). Die molare Gefrierpunktserniedrigung $\Delta T_F/c_M$ ist für jedes Lösungsmittel eine charakteristische Konstante. Sie beträgt für Wasser 1,83°C, wenn c_M in mol/l angegeben wird (Kryoskopische Konstante). Eine solche Lösung besitzt eine Osmolalität von 1000 mOsmol/kg.

Die Osmolalität der eingesetzten Lösungen (Medien, Puffer) wurde mit einem automatischen Halbmikro-Osmometer (Knauer, Bad Homburg) überprüft. Dazu wurde das Gerät vor einer Messung mit Reinstwasser und einer NaCl-Lösung (12,687 g NaCl/kg H₂O) auf 0 bzw. 400 mOsmol/kg geeicht. Das Probevolumen betrug je 150 µl.

2.3 Korrelationsverfahren

Für eine Reihe von Untersuchungen war es notwendig, die Steigung eines Graphen zu berechnen. Die Berechnung erfolgte jeweils nach der Geradengleichung in der Form:

$$y = m * x + b \qquad \text{Gleichung 4.21}$$

mit:

- y: abhängige Variable
- m: Steigung (dy/dx)
- x: unabhängige Variable
- b: Schnittpunkt des Graphen mit der Ordinate

Es handelt sich also um eine lineare Regression, zu der auch das Bestimmtheitsmaß r^2 angegeben wird. Das Bestimmtheitsmaß ist das Quadrat des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r und ein Maß dafür, inwieweit zwischen zwei Datensätzen eine lineare Abhängigkeit besteht. Es kann nur Werte zwischen 0 (keine lineare Abhängigkeit) und 1 (100% lineare Abhängigkeit) annehmen. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel[®] '97 (Microsoft) durchgeführt.

V. Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel ist in zwei große Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt werden die Ergebnisse der morphologischen und funktionalen Charakterisierung der Hepatocytelinien in den unterschiedlichen Kultivierungssystemen vorgestellt. Schwerpunkte sind hier die Aufnahme der zellspezifischen Parameter unter den "Normbedingungen" der Kultivierungssysteme, die Untersuchung der Funktionseigenschaften spezifischer Cytochrom-P450-Enzymsysteme der Zellen und der Übergang von den statischen Kultivierungssystemen (T-Flaschen) in den Bioreaktor. Die Ergebnisse werden unter der Fragestellung bewertet, ob eine effiziente Vermehrung der verwendeten Hepatocyten möglich ist und ob diese Zellen Eigenschaften besitzen, die ihren Einsatz in bioartifiziellen Leberersatzsystemen rechtfertigt.

Dem schließt sich der zweite Abschnitt an, in dem das Verhalten der Zellen unter hypothermischen Bedingungen betrachtet wird. Die Fragestellung lautete hier, ob durch eine Erniedrigung der Umgebungstemperatur der Stoffwechsel der Hepatocyten herabgesetzt werden kann und dabei gleichzeitig ein Überleben der Zellen gewährleistet ist, um sie so langfristig für die kontinuierliche Bereitstellung in bioartifiziellen Leberersatzsystemen lagern zu können.

1. Charakterisierung von HepT, C3A und K105

1.1 Kultivierung der Hepatocytelinien in T-Flaschen

Die Untersuchungen fanden in 25 cm²-T-Flaschen unter "Normbedingungen" statt, d.h. die Zellen wurden unter den Bedingungen der Brutschrankparameter (siehe IV.1.4.1) und unter Verwendung von Standardmedium (siehe Tab. 4.1) kultiviert. Pro Zelllinie wurden acht parallele T-Flaschen mit einer Zellkonzentration von je 1*10⁴ Zellen/cm² und einem Kulturvolumen von je 5 ml inokuliert. Nach einer 24-stündigen Adhäsionsphase wurde der jeweilige Kulturüberstand in den Flaschen durch eine entsprechende Menge neuen Standardmediums ersetzt. Mit diesem Zeitpunkt (t₀) als Ausgangssituation beginnend wurde nachfolgend pro Tag eine T-Flasche wie folgt behandelt (= Probenentnahme):

1. Bestimmung der Konzentrationen der im Kulturüberstand enthaltenen Substrate und Produkte.
2. Bestimmung der Zellkonzentration durch Trypsinierung und Trypanblaufärbung der Zellen.

Auf diese Weise wurde mit sieben der acht T-Flaschen pro Zelllinie verfahren. Die achte Flasche diente der mikroskopischen Betrachtung der Zellen unter dem Inversmikroskop zu den Probenentnahmezeitpunkten. Das jeweilige Proliferationsstadium der Zellen zu den Probenentnahmezeitpunkten wurde zudem fotografisch festgehalten.

1.1.1 Morphologie von HepT

Nach der 24-stündigen Adhäsionsphase waren nur noch vereinzelt nicht-adhärirte Zellen zu erkennen. Im mikroskopischen Bild waren sie durch ihre kugelige Form leicht von den adhärirten Zellen zu unterscheiden. Diese zeigten eine auffällige morphologische Struktur mit dendritischen Fortsätzen ("Pseudopodien"). Vereinzelt war der große Zellkern zu erkennen, der den überwiegenden Teil des intrazellularen Raums einnahm (siehe Abb. 5.1.a).

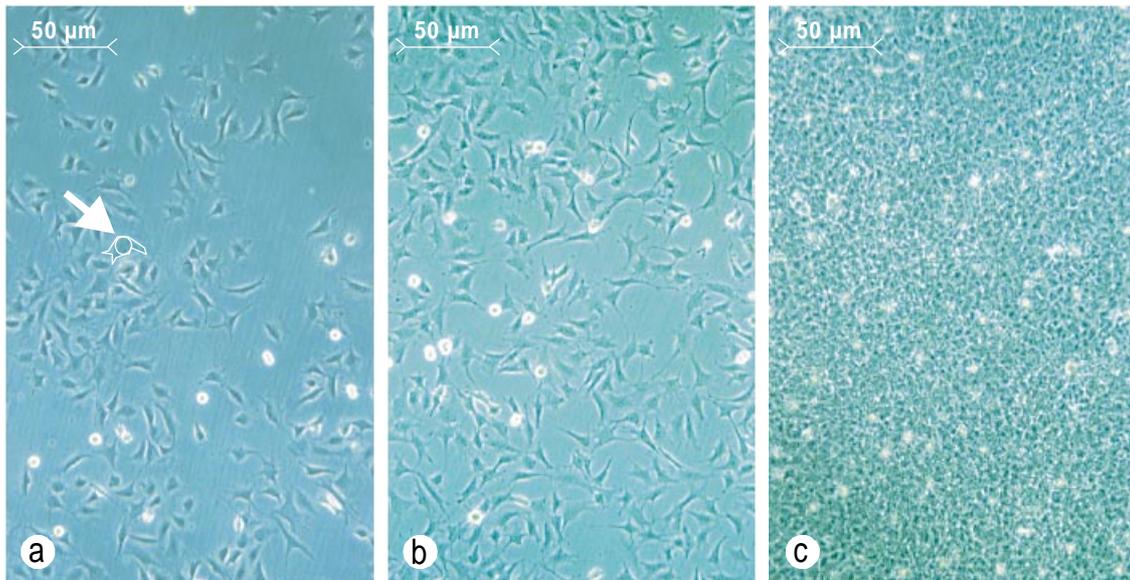


Abb. 5.1: Photographische Dokumentation des Kultivierungsverlaufs von HepT in 25 cm²-T-Flaschen (lichtmikroskopische Aufnahmen). **a:** Zellen nach der 24-stündigen Adhäsionsphase (Zeitpunkt t_0). Der Pfeil markiert den Zellkern einer Zelle, deren Zellgrenzen hier weiß umrissen sind. **b:** subkonfluentes Stadium nach 1,1 Tagen. **c:** konfluentes Stadium nach 4,1 Tagen.

Nach einer Kultivierungszeit von 1,1 Tagen waren im gleichen Bildausschnitt deutlich mehr Zellen enthalten. Besonders auffällig war die Gleichverteilung der Zellen über die gesamte Adhäsionsoberfläche, von der schätzungsweise 50-60% durch die Zellen bedeckt wurde. Wie bereits zu Beginn sind auch hier einige kugelige Einzelzellen zu erkennen (siehe Abb. 5.1.b), von denen jedoch nur ein Teil frei im Kulturüberstand flotierte. Eine Trypanblaufärbung des Kulturüberstands ergab, daß die flotierenden Zellen allesamt tot waren. Nach weiteren 3 Tagen waren die Zellen zu einem vollständig konfluenten Zellrasen zusammengewachsen, wobei die Zellgrenzen nur noch sehr schwer zu erkennen waren (siehe Abb. 5.1.c).

1.1.2 Morphologie von C3A

Im Vergleich zur Morphologie von HepT waren bei der humanen Hepatoblastomzelllinie C3A deutliche Unterschiede zu erkennen. Nach der Adhäsionsphase waren gemäß

mikroskopischer Betrachtung etwa die Hälfte der Zellen adhärirt. Die adhärirten Zellen wiesen keine dendritenförmige Strukturen auf wie HepT; C3A erschien vielmehr in einem in der Form zwar uneinheitlichen, aber eher kompakten Habitus. Vereinzelt waren bei besonders ausgespreiteten Zellen der im Vergleich zu HepT deutlich kleinere Zellkern zu erkennen. Teilweise enthielten die Zellen sogar zwei Zellkerne (siehe Abb. 5.2.a). Nach 1,1 Tagen konnte man eine Proliferation der Zellen in Form sich ausbreitender "Kolonien" erkennen. Zwischen zwei und fünf Zellen bildeten eine solche "Kolonie", in der die Zellgrenzen noch gut zu erkennen waren. Kugelförmige Einzelzellen flotierte nicht im Kulturüberstand, sondern saßen der Wachstumsoberfläche der T-Flasche fest auf bzw. waren auf den "Kolonien" verankert (siehe Abb. 5.2.b).

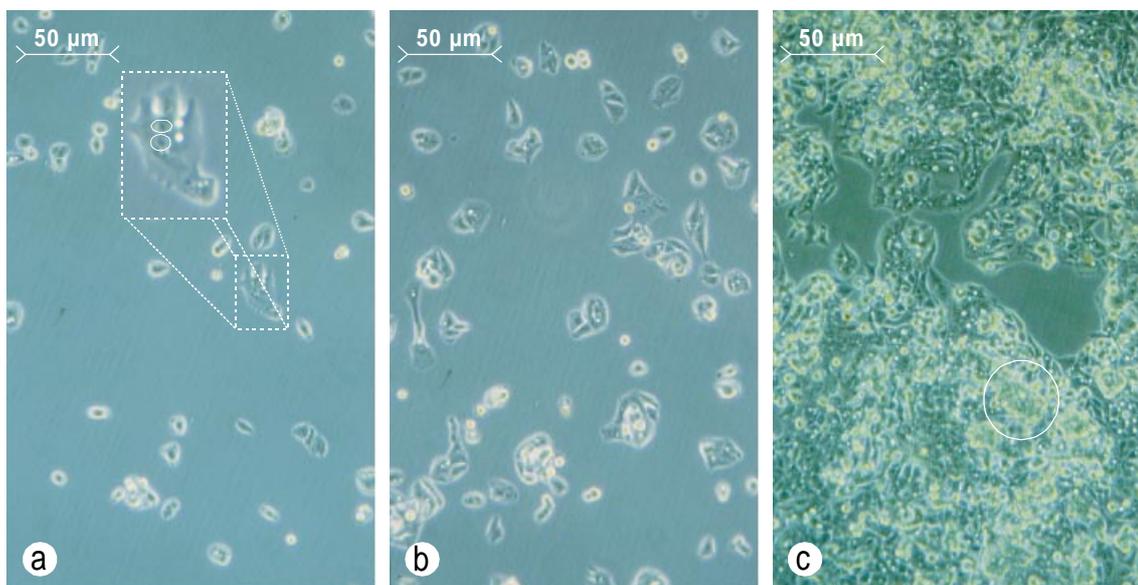


Abb. 5.2: Fotografische Dokumentation des Kultivierungsverlaufs von C3A in 25 cm²-T-Flaschen (lichtmikroskopische Aufnahmen). **a:** Zellen nach der 24-stündigen Adhäsionsphase (Zeitpunkt t_0). Im vergrößerten Fenster sind die zwei (hier weiß umrahmten) Zellkerne einer Zelle zu erkennen. **b:** subkonfluentes Stadium nach 1,1 Tagen. **c:** subkonfluentes Stadium nach sechs Tagen. Der Kreis markiert eines von vielen Zellaggregaten, die den an der Adhäsionsoberfläche adhärirten Zellen fest aufsaßen.

Das charakteristische Proliferationsverhalten von C3A setzte sich nachfolgend fort. Im Gegensatz zu HepT war nach 4,1 Tagen noch kein konfluentes Stadium erreicht. Selbst nach einer Kultivierungsdauer von sechs Tagen waren einige Bereiche der Adhäsionsoberfläche noch nicht durch die Zellen besetzt (siehe Abb. 5.2.c). Statt dessen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine dreidimensionale Proliferation, bei der Einzelzellen oder ganze Zellaggregate den an der Wachstumsoberfläche adhärirten Zellen fest aufsaßen. Zellgrenzen waren in den Aggregaten nicht erkennbar.

1.1.3 Morphologie von K105

Auch die murine Hepatocytelinie K105 zeigte eine im Vergleich zu den übrigen Zelllinien deutlich unterschiedliche Morphologie. Nach der Adhäsionsphase konnte man kugelige und

kompakt adhärierte Zellen von solchen mit einem sehr großen Cytoplasmaraum unterscheiden. Die Umrißlinien in Abb. 5.3.a begrenzen eine solche Zelle, deren Durchmesser hier etwa 70 μm beträgt. Nach 1,1 Tagen Kultivierungsdauer waren derartige Zellen nicht mehr anzutreffen. Es überwogen die kompakt adhärierten Zellen, die z.T. ähnlich wie bei C3A in "Kolonien" zusammengefaßt waren (siehe Abb. 5.3.b). Nach weiteren 3 Tagen zeigte sich das Bild eines vollständig konfluenten Monolayers, dem nur sehr vereinzelt Einzelzellen fest aufsaßen. Am Ende der Datenaufnahme nach sechs Tagen zeigte der Monolayer von K105 im äußeren Erscheinungsbild eine ausgeprägte Heterogenität. Besonders auffällig war zu diesem Zeitpunkt die Bildung von blasenförmigen Strukturen die aus dem Monolayer hervortraten (siehe Abb. 5.3.c).

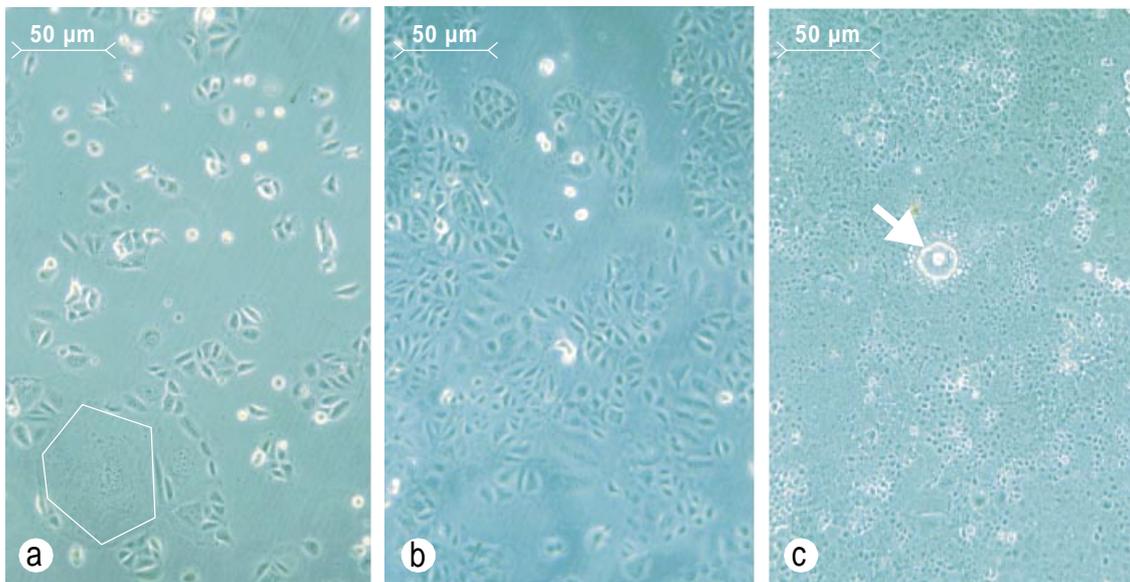


Abb. 5.3: Fotografische Dokumentation des Kultivierungsverlaufs von K105 in 25 cm^2 -T-Flaschen (lichtmikroskopische Aufnahmen). **a:** Zellen nach der 24-stündigen Adhäsionsphase (Zeitpunkt t_0). Die weißen Umrißlinien markieren eine Zelle mit besonders großem Cytoplasmanteil. **b:** subkonfluentes Stadium nach 1,1 Tagen. **c:** konfluentes Stadium nach sechs Tagen mit ausgeprägter morphologischer Heterogenität der Zellen. Der Pfeil markiert eine blasenförmige Struktur, die aus dem Monolayer hervortritt.

1.1.4 Kultivierungsverlauf und zellspezifische Parameter

Die durch die Proliferation der Zellen bedingte Zunahme der Zellkonzentration in den T-Flaschen ergab für HepT zwischen 0-2,9 Tagen einen exponentiellen Wachstumsverlauf der Kultur mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 1,1 \text{ d}^{-1}$. Dies entspricht einer Verdopplungszeit t_d von 15,1 Stunden. Im Falle von K105 durchliefen die Zellen zunächst eine *lag*-Phase zwischen 0-1,1 Tagen, in der die Zellkonzentration lediglich um etwa 10% zunahm ($\mu = 0,1 \text{ d}^{-1}$, $t_d = 165,6$ Stunden). Nachfolgend proliferierte K105 mit $\mu_{\text{max}} = 1,3 \text{ d}^{-1}$ ($t_d = 12,8$ Stunden) bis zum Tag 2,9 der Datenaufnahme (wie HepT). Zwischen Tag 2,9 und 4,1 verlangsamte sich mit zunehmender Konfluenz die Proliferation beider Zelllinien mit Verdopplungszeiten von $t_d = 57,6$ Stunden (HepT) bzw. $t_d = 43,2$

Stunden (K105). Nach 4,1 Tagen war bei beiden Zelllinien die maximale Zellkonzentration mit $4,2 \cdot 10^5$ Zellen/cm² (HepT) bzw. $3,8 \cdot 10^5$ Zellen/cm² (K105) erreicht. Bis zum Ende der Datenaufnahme (Tag 6) nahm die Zellkonzentration um je etwa 10% ab (siehe Abb. 5.4).

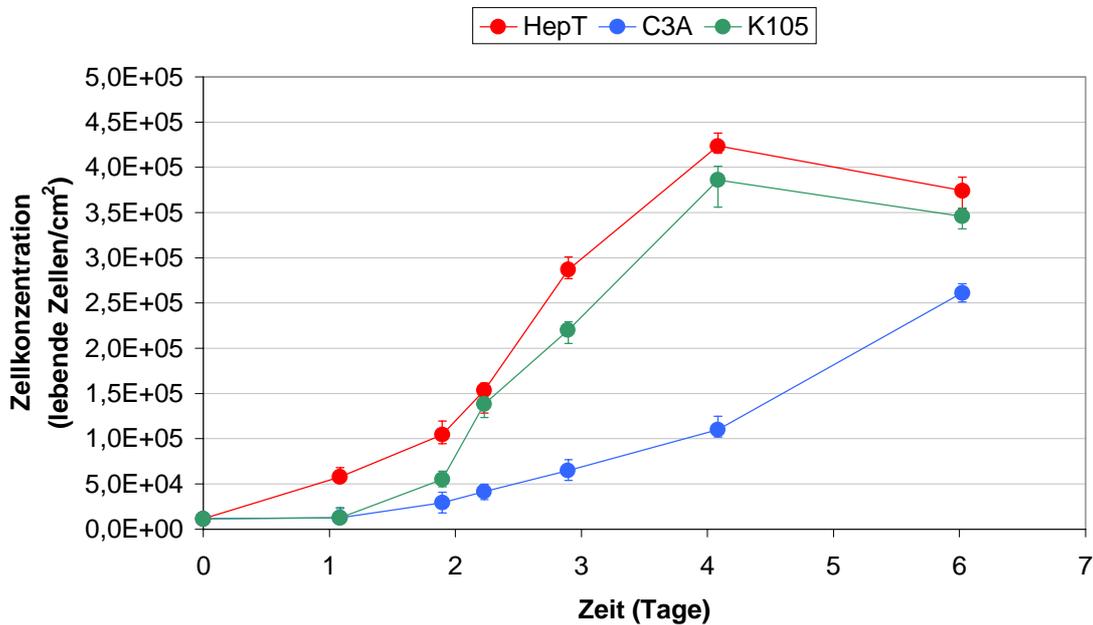


Abb. 5.4: Zeitlicher Verlauf der Zellkonzentration von HepT, C3A und K105 bei Kultivierungen in 25 cm²-T-Flaschen.

C3A proliferierte dagegen nur mit etwa der Hälfte der maximalen Wachstumsrate von HepT und K105. Allerdings blieb diese über den gesamten Zeitraum der Datenaufnahme konstant bei $\mu_{\max} = 0,6 \text{ d}^{-1}$ ($t_d = 27,7$ Stunden). Die nach sechs Tagen erreichte Zellkonzentration lag bei $2,6 \cdot 10^5$ Zellen/cm² (siehe Abb.5.4).

Eine direkte Bestimmung der Konzentration toter Zellen war nur über eine Trypanblaufärbung und Auszählung derjenigen Zellen möglich, die im Kulturüberstand flotierten. Dies galt sowohl für die hier vorgestellten T-Flaschen-Kultivierungen als auch speziell für die späteren Kultivierungen auf Microcarriern im Bioreaktorsystem (siehe V.1.3). Dabei konnte jedoch jeweils nicht ausgeschlossen werden, daß tote Zellen auch im adhärirten Zellverband enthalten waren. Diese konnten allerdings bei einer Zählung nicht erfaßt werden, da die für die Auszählung notwendige Vereinzelung der Zellen durch Trypsinierung zu einer Desintegration toter Zellen führte.

Diese Problematik zeigte sich im Fall von HepT und K105 gegen Ende der T-Flaschen-Kultivierung, bei denen ein Rückgang der Konzentration lebender Zellen zu beobachten war (siehe Abb. 5.4). Der Rückgang hätte zu einer Erniedrigung der Viabilität durch den Anstieg toter Zellen führen müssen. Statt dessen lag die Viabilität im Vergleich der letzten beiden Probenentnahmezeitpunkte ($t_5 = 4,1$ Tage und $t_6 = 6$ Tage) konstant bei 96% (HepT) bzw. 97% (K105). Gleichzeitig betrug die Wiederfindungsrate der Zellen bei t_6 im Vergleich zu t_4 nur 87% (HepT) bzw. 89% (K105), d.h. bis zu 13% der Zellen wurden entweder aufgrund von Zählchwankungen oder Desintegration toter Zellen nicht erfaßt. Die

Zählschwankungen lagen hier im Mittel bei $\pm 3,9\%$, d.h. 9% der Differenz in der Wiederfindungsrate entfallen auf nicht-erfaßte desintegrierte Zellen. Aus diesem Grund erschien die direkte Bestimmung der Totzellkonzentration als wenig sinnvoll. Als geeigneter Parameter für die Beurteilung des Zustand der Kultur wurde daher neben der Bestimmung der Lebendzellkonzentration die extrazelluläre LDH-Aktivität ermittelt (siehe IV.2.2.4).

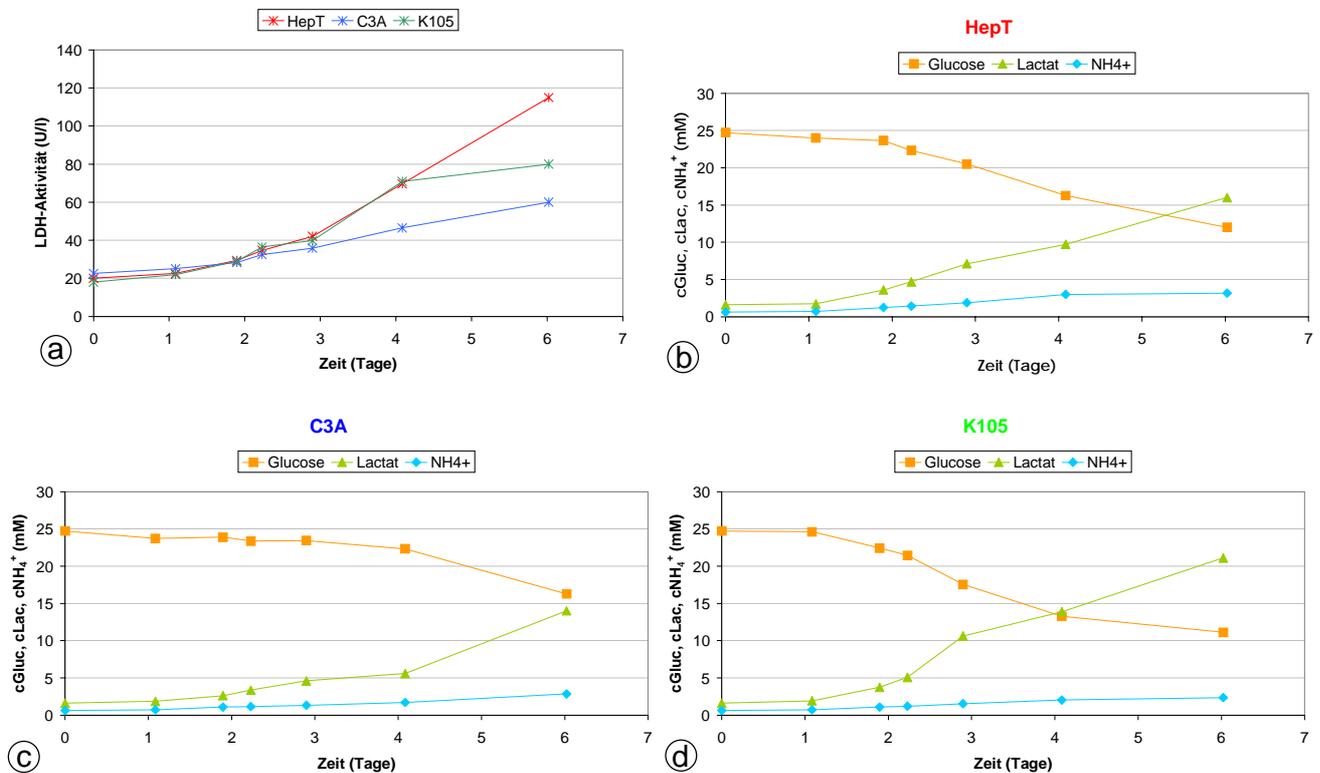


Abb. 5.5: Zeitlicher Verlauf einiger Kultivierungsparameter der Hepatocytelineagen in 25 cm²-T-Flaschen. **a:** Extrazelluläre LDH-Aktivitäten. **b:** Glucose-, Lactat- und Ammoniumkonzentrationen bei der Kultivierung von HepT. **c:** Glucose-, Lactat- und Ammoniumkonzentrationen bei der Kultivierung von C3A. **d:** Glucose-, Lactat- und Ammoniumkonzentrationen bei der Kultivierung von K105.

Die zeitliche Änderung der extrazellulären LDH-Aktivität während der Kultivierung ist in Abb. 5.5.a dargestellt. In der Phase des exponentiellen Wachstums der Kultur stieg bei HepT die LDH-Aktivität direkt proportional zur Proliferation der Zellen mit einer Rate von $3,3 \text{ mU}/10^6$ lebende Zellen an ($r^2 = 0,96$), bei K105 mit $3,9 \text{ mU}/10^6$ lebende Zellen ($r^2 = 0,9$) und bei C3A lag dieser Wert etwas höher bei $5,8 \text{ mU}/10^6$ lebende Zellen ($r^2 = 0,94$). Da die LDH-Aktivität bei HepT und K105 auch während der stationären Phase nach Erreichen des konfluenten Stadiums zunahm und nachfolgend ein Rückgang der Zellkonzentration festzustellen war, ist dieser Anstieg offenbar auf ein gegenüber der exponentiellen Wachstumsphase vermehrtes Absterben von Zellen zurückzuführen.

Die Glucosekonzentration in den drei Hepatocytenkultivierungen nahm über den Kulturverlauf ab, während die Lactatkonzentration reziprok dazu anstieg. Gleichzeitig nahm auch die Ammonium-(NH₄⁺-)konzentration kontinuierlich zu (siehe Abb. 5.5.b-d). Eine Substratlimitierung durch vollständigen Glucoseverbrauch als mögliche Ursache für das Absterben von K105 und HepT scheidet aus, da zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung

ausreichend Glucose im Kulturüberstand enthalten war. *In vivo* entsteht Lactat bei Säugetieren durch anaeroben Abbau von Glucose durch Reduktion von Pyruvat. *In vitro* kann dies - z.B. bei Tumorzelllinien (siehe C3A) - auch bei optimaler Sauerstoffversorgung geschehen (LAZO 1981). Bei Hybridomalinen hat man herausgefunden, daß hierfür eine weitgehende Inaktivität des tetrameren Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes ursächlich ist, so daß die oxidative Decarboxylierung und der nachfolgende Umsatz im Tricarbonsäurezyklus nur gedrosselt ablaufen kann (FITZPATRICK et al. 1993).

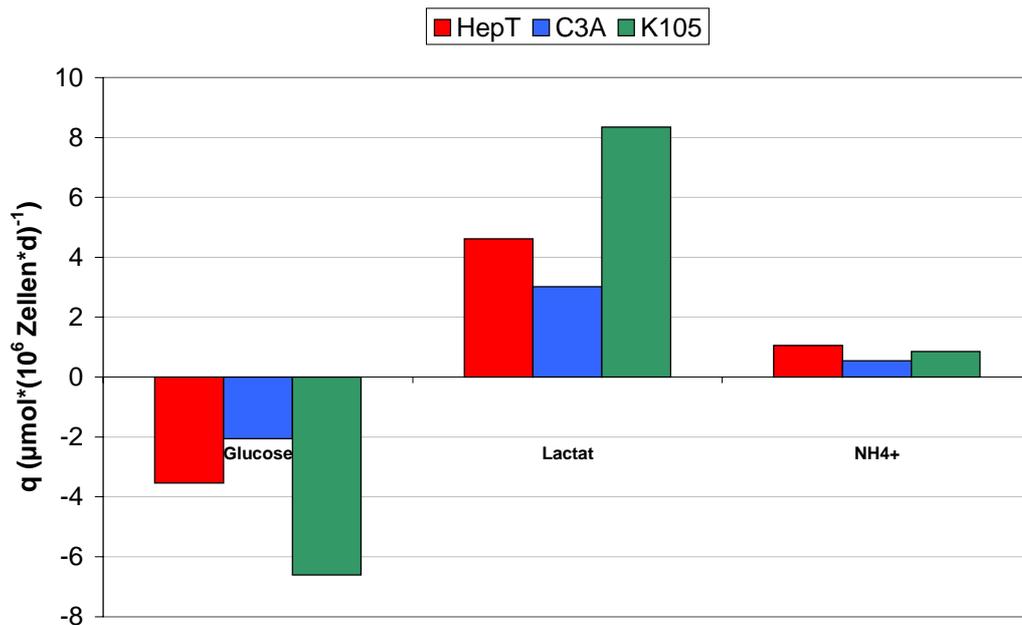


Abb. 5.6: Spezifische Verbrauchs -bzw. Bildungsraten (q) der Hepatocytelinien für Glucose, Lactat und Ammonium bei der Kultivierung in 25 cm²-T-Flaschen.

Die sich aus der zeitlichen Änderung der Glucose-, Lactat- und NH₄⁺-Konzentration ergebenden maximalen spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsraten sind in Abb. 5.6 dargestellt. K105 wies dabei die höchsten Metabolisierungsraten für Glucose ($q_{\text{Gluc}} = -6,6 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$) und Lactat ($q_{\text{Lac}} = +8,3 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$) auf. In einer direkten Massenbilanz wurden demnach bei K105 63% der Glucose zu Lactat umgesetzt. Anhand der Metabolisierungsraten ergibt sich für HepT hier ein Wert von 65%, bei C3A gar ein Wert von 73%. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß auch eine Reihe von Aminosäuren (Alanin, Cystein, Glycin, Serin, Threonin, Tryptophan) glucogen zu Pyruvat abgebaut werden können (VOET, VOET 1992, S. 689-690), so daß sich die Bilanzierung insgesamt zu Gunsten des aeroben Abbaus verschiebt.

Am Ende der Kultivierungen wurden Lactatkonzentrationen von 14 mM (C3A), 16 mM (HepT) und 21 mM (K105) erreicht (siehe Abb. 5.5.b-d). Zwar wurde in einer vorangegangenen Untersuchung bei primären Ratten-Hepatocyten durch Lactatkonzentrationen oberhalb von 10 mM ein Rückgang der Harnstoffsynthese der Zellen festgestellt, jedoch konnte dort selbst bei Konzentrationen von mehr als 100 mM keine Reduzierung der Viabilität beobachtet werden (CATAPANO et al. 1996). Angesichts dieser

Ergebnisse ist eine Schädigung der Zellen durch Lactat bei den Hepatocytelinien eher unwahrscheinlich. Gleichzeitig wurde in der selben Untersuchung bei den Rattenhepatocyten durch NH_4^+ -Konzentrationen von 2 mM ein Rückgang der Viabilität um 40% beobachtet. Die Endkonzentrationen von NH_4^+ in den hier vorgestellten Kultivierungen erreichten Werte von 2,3 mM (K105), 2,9 mM (C3A) und 3,2 mM (HepT) (siehe Abb. 5.5.b-d). Offenbar sind die Hepatocytelinien gegenüber NH_4^+ deutlich weniger sensibel als die primären Zellen, wenngleich eine Schädigung durch NH_4^+ im Fall von HepT und K105 aufgrund des beobachteten Rückgangs der Zellkonzentration nicht ausgeschlossen werden kann. Demgegenüber blieb das exponentielle Wachstum der C3A-Kultur - wie aus der konstanten spezifischen Wachstumsrate hervorgeht - selbst bei einer NH_4^+ -Konzentration oberhalb von 2 mM unbeeinflusst.

Ammonium entsteht durch den Abbau der Aminosäuren, die nach Desaminierung an unterschiedlichen Stellen des oxidativen Hauptabbauweges glucogen oder ketogen eingeschleust werden. Etwa 10-15% des Gesamtenergiebedarfs von Säugetierzellen werden auf diese Weise gedeckt (VOET, VOET 1992; S. 689). In der Leber wird das dabei entstehende Ammonium in den Hepatocyten - nach ATP-abhängiger mitochondrialer Kondensation mit Hydrogencarbonat zu Carbamylphosphat - durch die cytosolischen Enzyme des Ornithincyclus' zu Harnstoff abgebaut (VOET, VOET 1992; S. 686). Allerdings ist die NH_4^+ -Affinität für diesen Abbauweg sehr gering ($K_M = 2$ mM). Der alternative Abbauweg ist die ATP-abhängige Kondensation von Glutamat und NH_4^+ zu Glutamin. Die NH_4^+ -Affinität des dafür zuständigen Enzyms Glutaminsynthetase ist deutlich höher ($K_M = 0,3$ mM). Dabei wird die Glutaminsynthetase durch ein Intermediat des Tricarbonsäurecyclus (α -Ketoglutarat) aktiviert (JUNGERMANN, KATZ 1989). Aufgrund des kontinuierlichen Anstiegs von Ammonium in den Kulturen von HepT, C3A und K105 spielten diese Abbauwege offenbar eher eine untergeordnete Rolle.

Die durch die Hepatocyten hervorgerufene zeitliche Veränderung der Aminosäurekonzentrationen in den Kulturüberständen ist in Abb. 5.7 dargestellt. Keine der Aminosäuren war am Ende der Kultivierung vollständig verbraucht, so daß der beobachtete Rückgang der Zellkonzentration bei HepT und K105 zwischen 4,1 und sechs Tagen Kulturdauer nicht mit einer Aminosäurelimitierung begründet werden kann. Aus den Daten geht hervor, daß alle Aminosäuren bis auf Alanin (ALA) und Glutamat (GLU) verbraucht wurden. Bei Glycin (GLY) konnte weder ein eindeutiger Verbrauch noch eine eindeutige Produktion festgestellt werden. Die spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsraten der Aminosäuren für alle drei Zelllinien sind in Abb. 5.8 aufgeführt. Dabei ragt besonders die hohe Glutaminverbrauchsrate mit Werten von bis zu $775 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ (HepT) hervor.

Die Alanin- und Glutamatproduktion kann durch das Zusammenwirken einer gestört ablaufenden oxidativen Decarboxylierung (s.o.) in Verbindung mit dem hohen Glutaminverbrauch erklärt werden: Glutamin wird nach Desaminierung in Form von α -Ketoglutarat in den TCC eingeschleust und schließlich zu Oxalacetat umgesetzt. Die z.T. inaktive Pyruvatdecarboxylase führt zu einer Akkumulation dieses Intermediats. Dabei stellt

sich ein Gleichgewicht zwischen Oxalacetat und Malat ein. Malat liefert über eine durch das Malat-Enzym katalysierte Decarboxylierung schließlich Pyruvat.

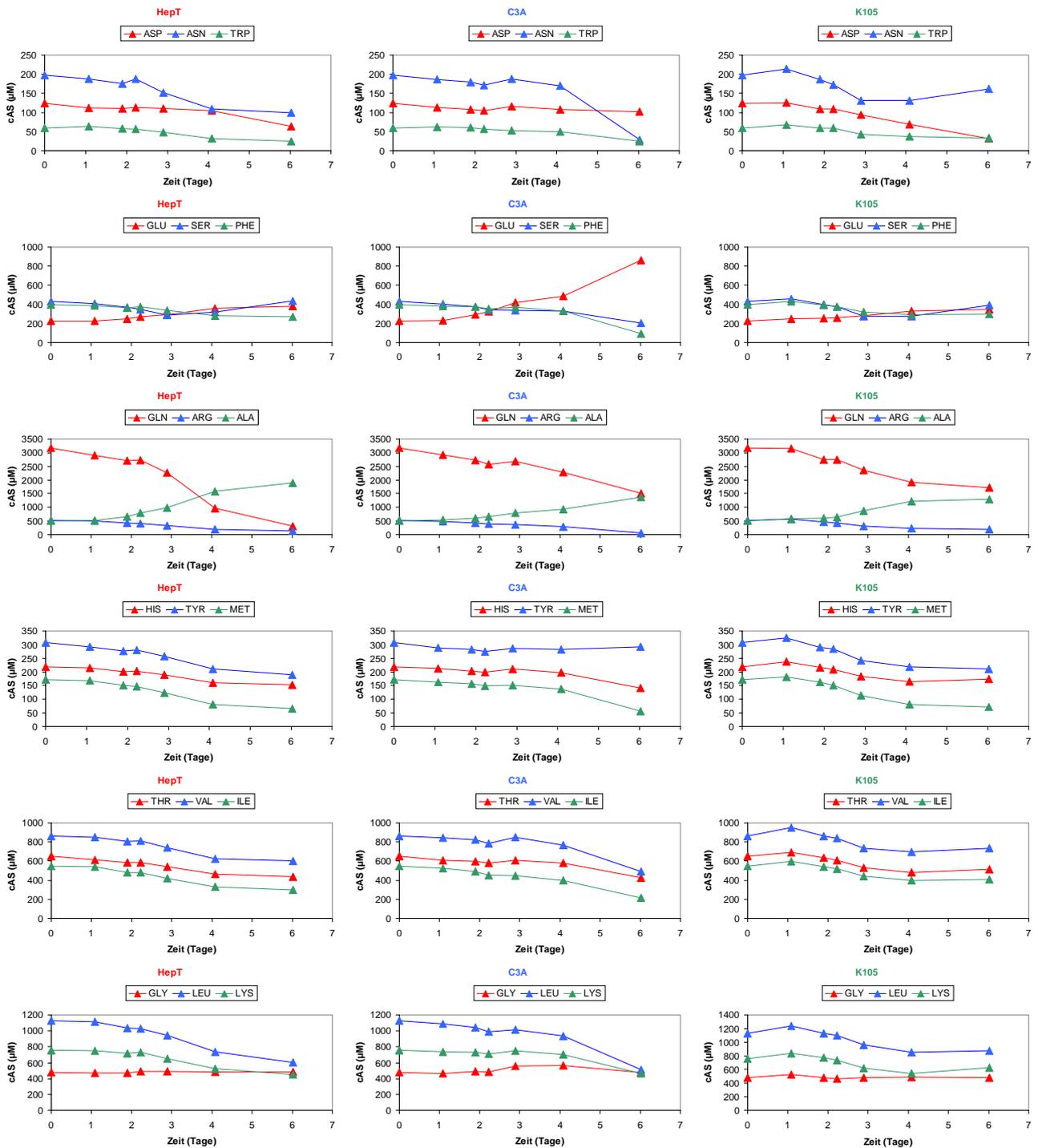


Abb. 5.7: Profile der zeitlichen Änderung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen (cAS) in den 25 cm²-T-Flaschenkultivierungen mit HepT (links), C3A (Mitte), und K105 (rechts).

Für Pyruvat gibt es dabei neben dem Umsatz zu Lactat einen alternativen Abbauweg: Durch den Aminosäureabbau zur Energiegewinnung wird ein Teil der Aminogruppen durch Transaminierungen in Form von Glutamat gesammelt. Über das Enzym Alanin-Aminotransferase werden diese Aminogruppen auf Pyruvat übertragen und es entstehen α -Ketoglutarat und Alanin (LEHNINGER 1994, S. 597 f.)

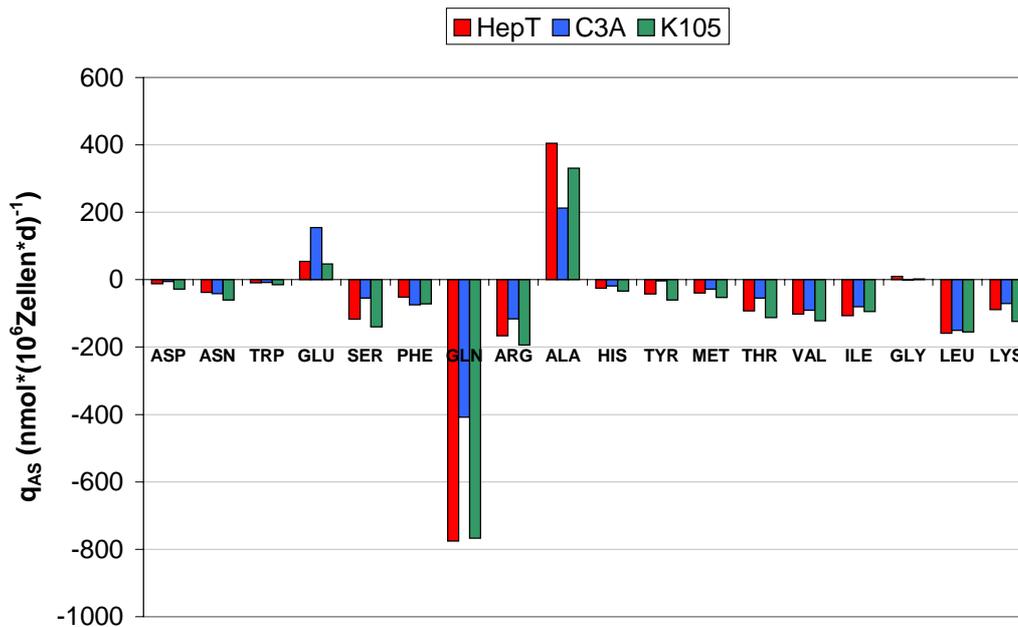


Abb. 5.8: Spezifische Aminosäure-Verbrauchs- und Bildungsraten (q_{AS}) von HepT, C3A und K105 in 25 cm^2 -T-Flaschen-Kultivierungen

1.1.5 Serumfreie Kultivierung

Seren enthalten eine Vielzahl bereits nachgewiesener Inhaltsstoffe, deren Konzentration von Charge zu Charge stark schwanken kann. Hinzu kommt eine Fülle bisher nicht bekannter Komponenten (z.B. Wachstumsfaktoren), deren Zahl auf mehr als 1000 geschätzt wird (LINDL, BAUER 1994, S. 67). Zur Vermeidung qualitativer und quantitativer Schwankungen der Nährmedienbestandteile und zur Gewährleistung definierter und kontrollierter Kultivierungsbedingungen ist daher die Verwendung eines serumfreien Mediums wünschenswert. Für viele Zellarten haben sich Insulin, Transferrin und Selenit als geeigneter Serumersatz erwiesen (BARNES, SATO 1980). Diese Stoffe waren auch Bestandteil der beiden hier eingesetzten serumfreien Medien. Zudem enthielt das kommerziell erhältliche Medium den Hepatocyten-Wachstumsfaktor (HGF). Von proliferationsstimulierenden und die Albuminsynthese steigernden Eigenschaften von HGF wurde bereits berichtet (EGUCHI et al. 2000).

Die Untersuchungen wurden in 75 cm^2 -T-Flaschen auf zwei unterschiedlichen Wegen durchgeführt. Bei der ersten Methode wurden die Zellen, die durch Expansion in Standardmedium zu konfluenten Monolayern gewonnen wurden, nach Trypsinierung unmittelbar in das serumfreie Medium resuspendiert und mit einer Zellkonzentration von $2 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2 und einem Kulturvolumen von 20 ml in neue T-Flaschen eingesät. Die Einsaatdichte entsprach der doppelten Menge der sonst üblichen Zellzahl (Verfahren nach LINDL, BAUER 1994, S. 71). Bei der zweiten Methode bestand das Ziel darin, die Zellen an zunehmend niedrigere Serumkonzentrationen zu gewöhnen. Dazu wurde nach Erzeugung konfluenten Monolayer in Standardmedium über einen Zeitraum von fünf Tagen täglich 50%

des Kulturüberstands durch serumfreies Medium ersetzt und dadurch der Serumanteil kontinuierlich gesenkt, so daß nach insgesamt sechs Tagen die Zellen für 24 h der niedrigsten Serumkonzentration von 0,016% (v/v) ausgesetzt waren. Danach wurden die Zellen ebenfalls trypsiniert und in gleicher Weise wie bei der ersten Methode in neue T-Flaschen eingesät.

Durch die unmittelbare Überführung vom serumhaltigen in das jeweilige serumfreie Medium kam es zu keiner Adhäsion der Zellen an der Wachstumsoberfläche der T-Flaschen. Statt dessen flotierten die Zellen auch 24 Stunden nach Einsaat noch im Kulturüberstand. Dies gilt sowohl für das selbst entwickelte Medium als auch das eigens für die serumfreie Kultivierung von Hepatocyten entworfene Medium. Die Auszählung nach Trypanblaufärbung ergab in beiden Fällen Viabilitäten von jeweils $12 \pm 2\%$ (HepT), bzw. $10 \pm 2\%$ (K105) und $10 \pm 1\%$ (C3A).

Auch die Gewöhnung der Zellen an serumfreie Bedingungen führte nicht zum erhofften Erfolg. Zwar konnte in der Phase der kontinuierlichen Reduzierung des Serumanteils bei der mikroskopischen Betrachtung der Monolayer keine unmittelbare Zellschädigung bspw. in Form sich von der Wachstumsoberfläche ablösender Zellen festgestellt werden, doch führte die sich an diese Phase anschließende Resuspendierung der trypsinierten Zellen ebenfalls dazu, daß die Zellen auch 24 Stunden nach Einsaat noch im Kulturüberstand flotierten. Die hier ermittelten Viabilitäten entsprachen den Werten, die bei der Methode der unmittelbaren Überführung erzielt wurden.

Hieraus folgt, daß alle drei verwendeten Hepatocytenlinien unter den gewählten Bedingungen strikt serumabhängig sind. Für alle weiterführenden Untersuchungen zur Expansion und hypothermischen Konservierung wurde daher auf das serumhaltige Standardmedium zurückgegriffen. Dies muß aber nicht unbedingt als Nachteil gewertet werden. Ein Gegenargument für die Verwendung serumfreier Nährmedien ist der Umstand, daß es häufig weniger zu einer Adaptation der gesamten Zellpopulation an die serumfreien Bedingungen kommt, sondern vielmehr eine Selektion bestimmter Zellen stattfindet (CHIANG et al. 1985). Diese besitzen vielfach nicht mehr diejenigen Eigenschaften der ursprünglich serumabhängigen Zellen. Zudem können Unterschiede in der Medienzusammensetzung bei den Hepatocyten zu reduzierten Biotransformationsleistungen führen (DOOSTDAR et al. 1988). Ferner entspricht die Verwendung serumhaltiger Medien eher den Bedingungen im Anwendungsfall, bei dem die Hepatocyten als biologische Komponente in bioartifiziellen Leberersatzsystemen dem Patientenblut bzw. -plasma ausgesetzt sind.

1.2 Cytochrom-P450-Aktivitäten

1.2.1 Effekte der Induktoren/Inhibitoren auf die Zellviabilität

Die Untersuchungen wurden in 12-Well-Platten durchgeführt. Nach Erzeugung konfluenter Monolayer der Hepatocytelinien wurden die Zellen zwei Mal für je 24 Stunden mit jeweils einer der Substanzen in einem für die sich daran anschließenden Aktivitätsuntersuchungen relevanten Konzentrationsbereich inkubiert.

3-Methylcholantren (3-MC)

3-Methylcholantren diente als Induktor bei der Bestimmung der ECOD- und EROD-Aktivität der Hepatocytelinien. Es wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 0-100 μM eingesetzt.

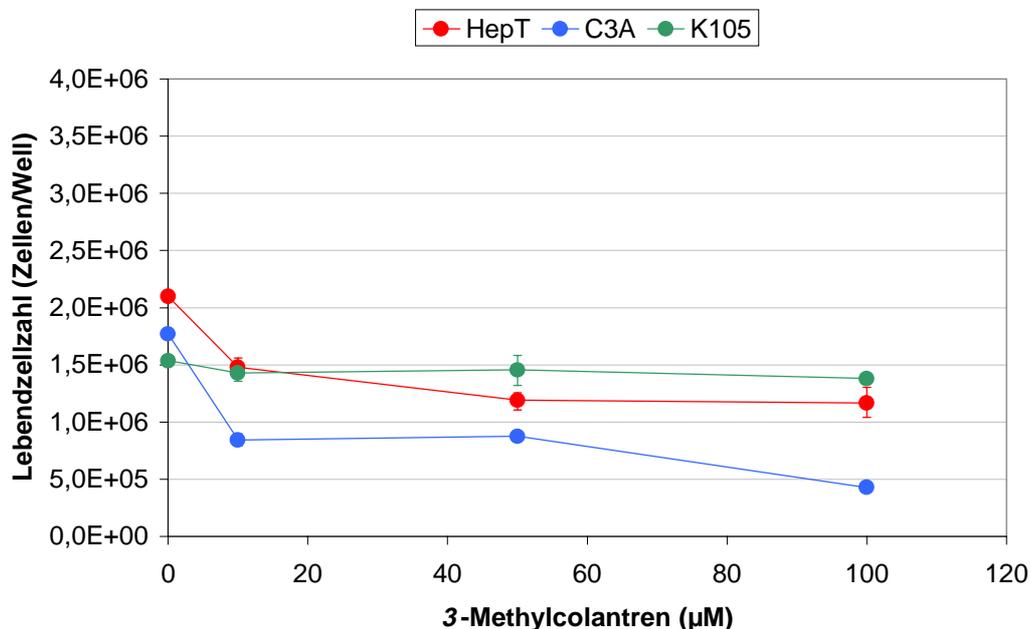


Abb. 5.9: Änderung der Lebendzellzahl der Hepatocytelinien HepT, C3A und K105 unter dem Einfluß von 3-Methylcholantren in 12-Well-Platten.

Bei der K105 zeigten sich geringfügig negative Effekte auf die Viabilität der Zellen durch die Einwirkung von 3-Methylcholantren. Die Zellzahl in den Monolayern nahm linear um durchschnittlich $1,1 \cdot 10^4$ Zellen pro 10 μM Konzentrationserhöhung des Induktors ab (siehe Abb. 5.9). Der Verlust bei der Maximalkonzentration von 100 μM zur Ausgangszellmenge (0 μM) betrug dabei ca. 10%. HepT und C3A zeigten demgegenüber eine deutlich höhere Sensibilität gegenüber diesem Induktor. Bereits bei einer 3-MC-Konzentration von 10 μM nahm die Zellmenge um 30% (HepT) bzw. 52% (C3A) ab. Bei weiterer Konzentrationserhöhung verlangsamte sich dieser Negativtrend in beiden Fällen. Bei K105 betrug der Gesamtverlust bei der 3-MC-Maximalkonzentration 44% zur Ausgangszellmenge. C3A zeigte im Vergleich zu den übrigen Hepatocytelinien die höchste Sensitivität gegenüber 3-MC. Hier betrug der Gesamtverlust 76%.

Phenobarbital

Phenobarbital wird medizinisch als Antiepileptikum, Hypnotikum und Sedativum verabreicht. In dieser Untersuchung diente es als Induktor bei der Bestimmung aller drei untersuchten Cytochrom-P450-Aktivitäten und wurde in einem Konzentrationsbereich von 0-1 mM eingesetzt.

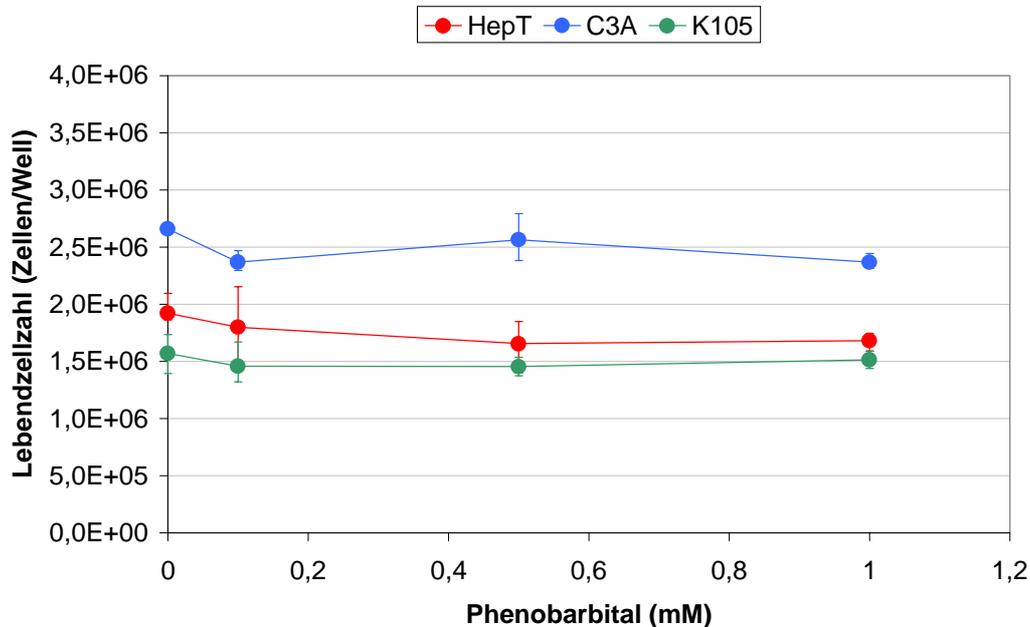


Abb. 5.10: Änderung der Lebendzellzahl der Hepatocyteline HepT, C3A und K105 unter dem Einfluß von Phenobarbital in 12-Well-Platten.

Die Einwirkung von Phenobarbital hatte bei allen drei Hepatocyteline einen geringfügig negativen Effekt (siehe Abb. 5.10). K105 erwies sich auch hier als widerstandsfähigste Linie. Die Zellzahl nahm bei der PB-Maximalkonzentration von 1 mM lediglich um 3% zur Ausgangszellmenge (0 mM PB) ab. Bei C3A betrug dieser Wert 6%, bei HepT 11%.

β -Naphthoflavon (*beta-Naphthoflavon*, β -NF)

β -Naphthoflavon wurde wie 3-MC als Induktor bei der Bestimmung der ECOD- und EROD-Aktivität in einem Konzentrationsbereich von 0-100 μ M eingesetzt.

Ähnlich wie PB hat auch β -Naphthoflavon in den eingesetzten Konzentrationen kaum cytotoxische Wirkung bei der Mehrzahl der Hepatocyteline. Die Zellmenge von K105 blieb über den gesamten Konzentrationsbereich stabil (siehe Abb. 5.11). Bei C3A mußte man bei der höchsten β -NF-Konzentration von 100 μ M einen geringfügigen Verlust von 8% zur Ausgangszellmenge (0 μ M β -NF) hinnehmen. HepT erwies sich hier als die empfindlichste Zelllinie: 36% der Zellen starben bei der höchsten β -NF-Konzentration ab.

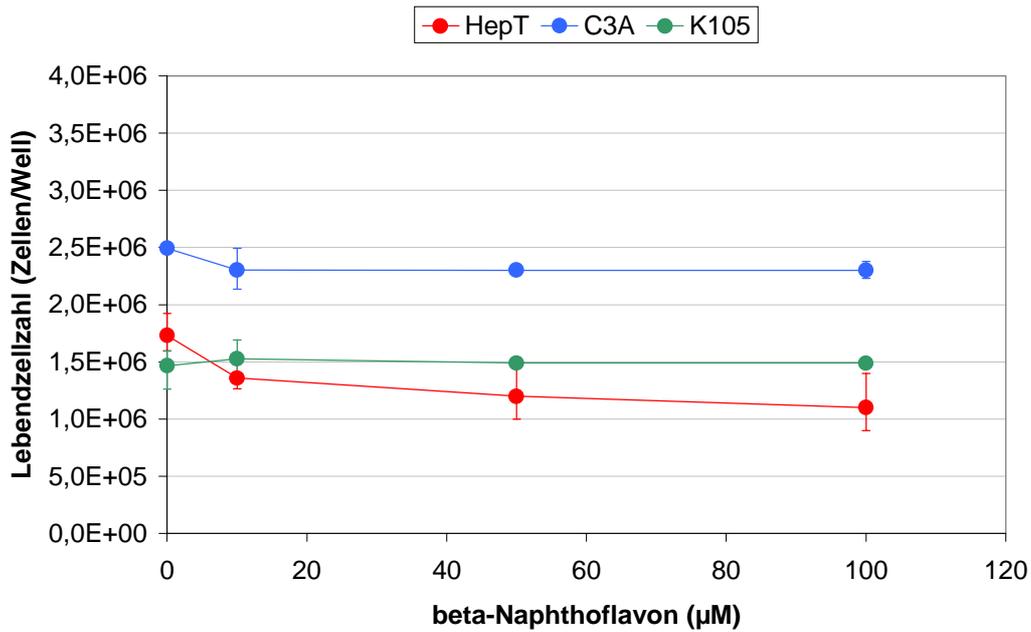


Abb. 5.11: Änderung der Lebendzellzahl der Hepatocyteline HepT, C3A und K105 unter dem Einfluß von β -Naphthoflavin in 12-Well-Platten.

Pyrazol

Diese Substanz diente als Induktor bei der CH-Aktivitätsbestimmung und wurde den Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0-10 mM verabreicht.

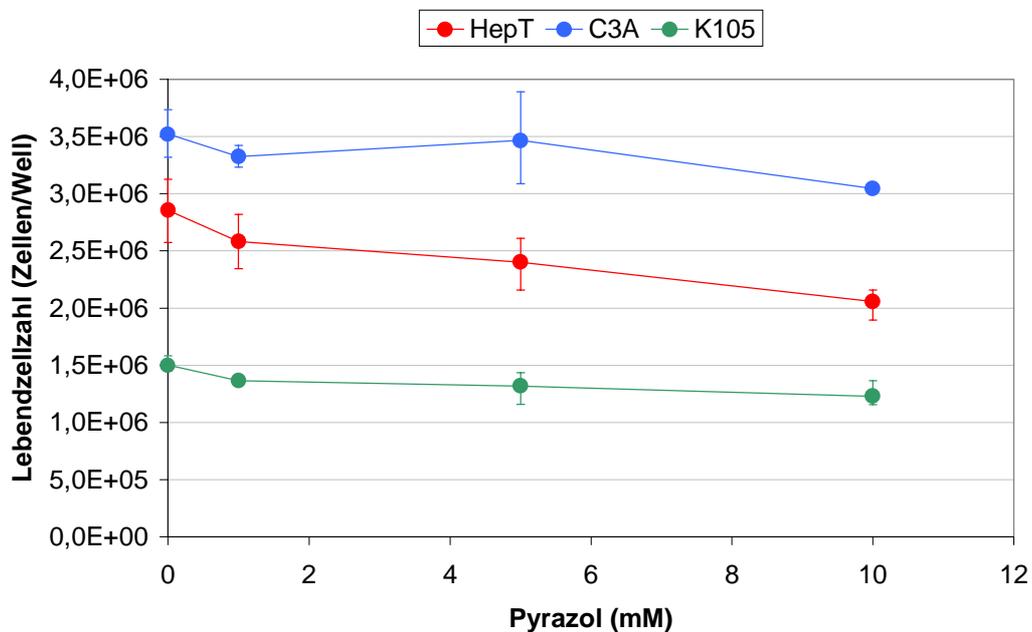


Abb. 5.12: Änderung der Lebendzellzahl der Hepatocyteline HepT, C3A und K105 unter dem Einfluß von Pyrazol in 12-Well-Platten.

Mit steigender Pyrazolkonzentration starben bei allen drei Hepatocytelinien zunehmend Zellen ab (siehe Abb. 5.12). Der höchste Verlust bei der Maximalkonzentration von 10 mM zur Ausgangszellmenge bei 0 mM war bei HepT mit 28% zu verzeichnen. Bei C3A und K105 betrug dieser Wert ca. 14% bzw. ca. 18%.

α -Naphthoflavin (α -NF, alpha-Naphthoflavin, alpha-NF)

α -Naphthoflavin gilt als effektiver Inhibitor u.a. der Cytochrom-P450-Enzyme der Subfamilie CYP1A (siehe IV.2.2.5.3). Deshalb wurde diese Substanz zur Bewertung der Grundaktivität der Zellen im Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zu 7-Hydroxyresorufin (EROD-Aktivität) herangezogen.

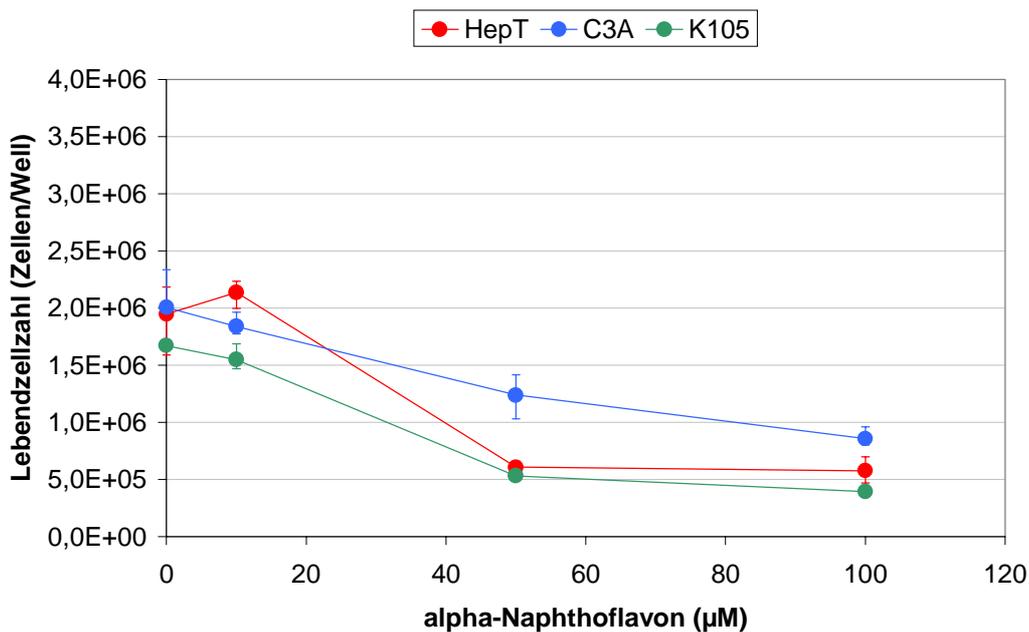


Abb. 5.13: Änderung der Lebendzellzahl der Hepatocytelinien HepT, C3A und K105 unter dem Einfluß von Pyrazol in 12-Well-Platten.

α -Naphthoflavin führte bei allen Hepatocytelinien insbesondere im mittleren und hohen Konzentrationsbereich (50-100 µM) zu einer Reduktion der Lebendzellzahl (siehe Abb. 5.13). Im Vergleich zu den anderen eingesetzten Substanzen konnte hier die höchste Cytotoxizität verzeichnet werden. So waren bei der Maximalkonzentration von 100 µM Verluste von ca. 57% (C3A) über 70% (HepT) bis hin zu 76% (K105) zur jeweiligen Ausgangszellmenge bei 0 µM zu verzeichnen.

Zusammenfassung

Die Substanzen hatten im Vergleich eine unterschiedlich ausgeprägte cytotoxische Wirkung auf die Zellen. Diese Wirkung war konzentrationsabhängig, d.h. die höchste Schädigung war bei der höchsten eingesetzten Konzentration einer jeden Substanz feststellbar (siehe Abb. 5.14). Jedoch bestand in der Mehrzahl der Versuchsergebnisse kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration und dem Absterben der Zellen.

1.2.3 ECOD-Aktivität

Abb. 5.15 soll exemplarisch den Verlauf einer Reihe der zahlreichen ECOD-Messungen verdeutlichen, deren Einzeldarstellung an dieser Stelle zu weit führen würde. Häufig konnte über den gesamten Versuchszeitraum (10 Stunden) keine kontinuierliche Zunahme der Umbelliferonkonzentration in den Kulturüberständen festgestellt werden. Nach einem anfänglichen Anstieg über die ersten Stunden der Datenaufnahme fiel die Konzentration nachfolgend wieder ab. Ursächlich hierfür ist das Einsetzen von Phase II-Reaktionen der Biotransformation, bei dem das Produkt der Cytochrom-P450-Aktivität (hier Umbelliferon) weiter umgesetzt wird (vgl. II.1.5.1). Allerdings war für eine bestimmte Hepatocytelinie kein definierter Zeitpunkt für den Beginn der Phase-II-Reaktionen feststellbar. Bspw. stieg bei C3A nach 3-MC-Induktion die Umbelliferonkonzentration kontinuierlich an, nach β -NF-Induktion nahm die Konzentration nach vier Stunden und nach PB-Induktion bereits nach zwei Stunden wieder ab. Nebenbei geht aus Abb. 5.15 hervor, daß nach einer Induktion mit $10\ \mu\text{M}$ β -NF bei C3A eine deutlich höhere ECOD-Aktivität gemessen werden konnte als für HepT und K105. Die spezifischen ECOD-Aktivitäten sind in den nachfolgenden Abbildungen (siehe Abb. 5.16.a-c) im Detail dargestellt und wurden jeweils nur über den Zeitraum einer kontinuierlichen Zunahme der Umbelliferonkonzentration ermittelt.

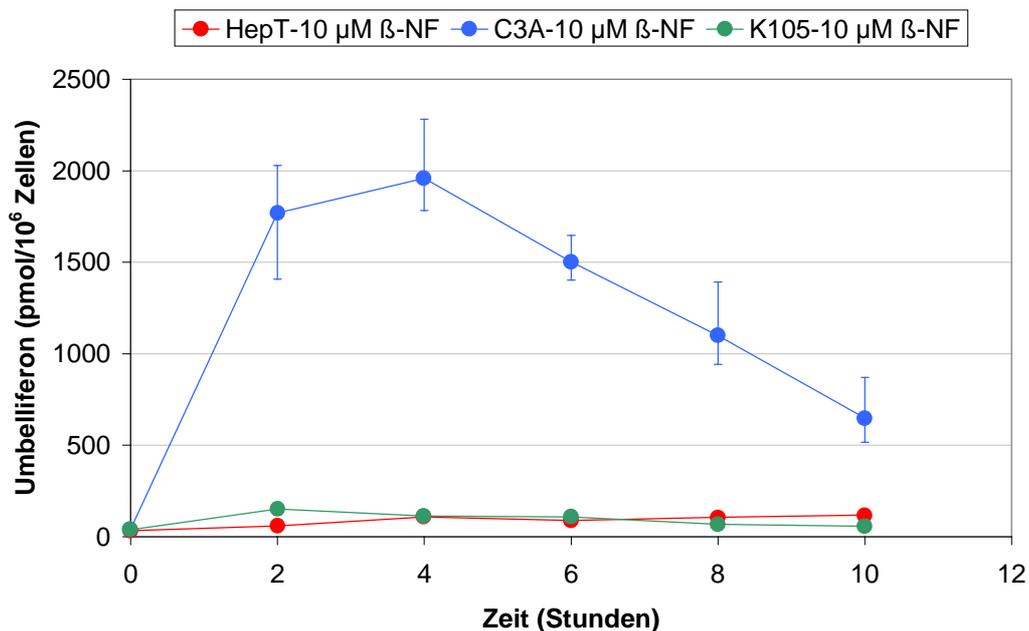


Abb. 5.15: Zeitliche Änderung der Konzentration von Umbelliferon als Produkt der ECOD-Aktivität in den Kulturüberständen von HepT, C3A und K105 nach Induktion mit $10\ \mu\text{M}$ β -Naphthoflavon (β -NF).

Die ECOD-Grundaktivität der Hepatocytelinien entsprach jeweils der spezifischen Umbelliferonproduktionsrate, ohne daß zuvor die Zellen mit einem der Induktoren inkubiert wurde. Diese betrug im arithmetischen Mittel der drei Versuchsreihen bei K105 $1,7 \pm 1,1\ \text{pmol} \cdot (10^6\ \text{Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$, bei HepT $6,6 \pm 1,0\ \text{pmol} \cdot (10^6\ \text{Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ und bei

C3A $18,2 \pm 6,8 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$. Diese Grundaktivität konnte durch vorherige Induktion gesteigert werden (siehe Abb. 5.16).

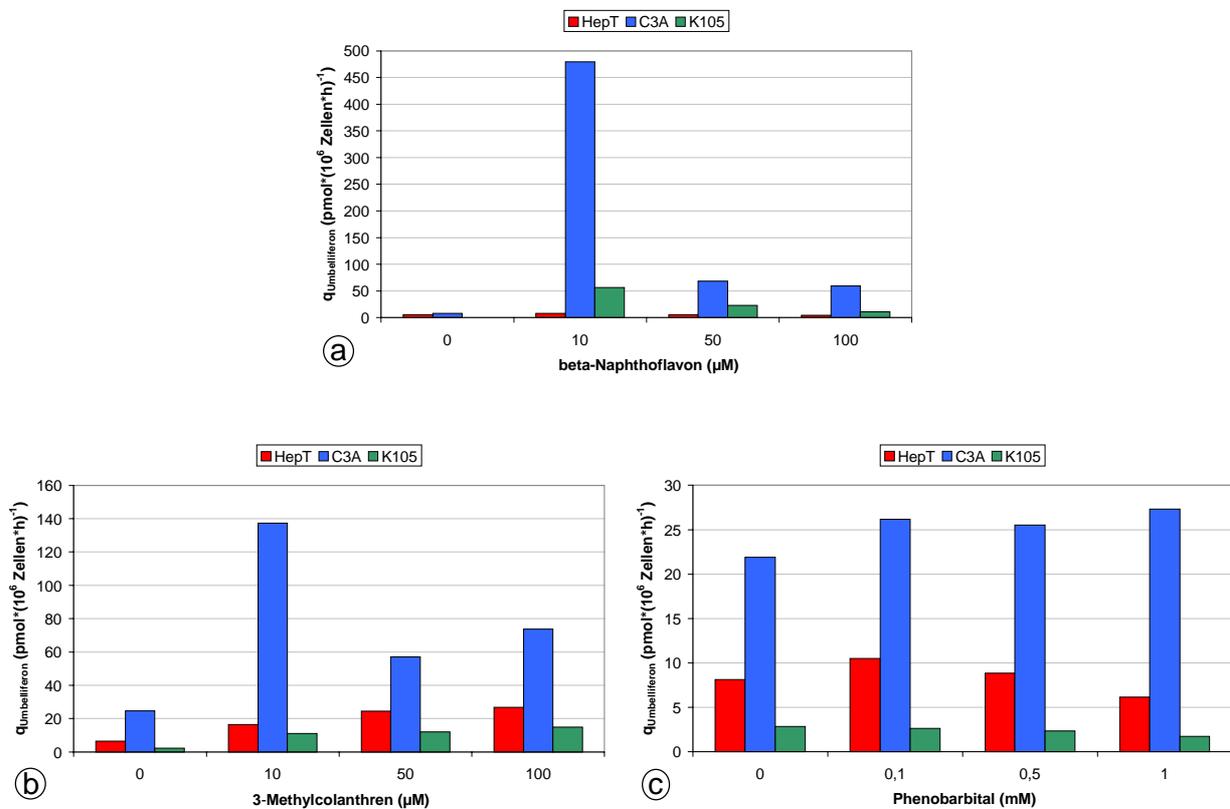


Abb. 5.16: Spezifische Umbelliferonproduktionsraten in der ECOD-Aktivität von HepT, C3A und K105 in Abhängigkeit zu den eingesetzten Induktoren und deren Konzentrationen.

Die im gesamten Versuch höchste ECOD-Aktivität besaß C3A nach einer Induktion mit 10 μM β -Naphthoflavon (siehe Abb. 5.16.a), bei der mit $479 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ die Grundaktivität um mehr als das 26fache gesteigert werden konnte. Begünstigt wurde dies sicherlich durch den Umstand, daß die Inkubation mit β -Naphthoflavon bei C3A im Gegensatz zu den anderen hier eingesetzten Induktoren eine geringere Schädigung der Zellen verursachte (siehe Abb. 5.14).

Im Fall der Induktion mit 10 μM 3-Methylcholanthren konnte bei C3A die Grundaktivität um das 5,6fache gesteigert werden (siehe Abb. 5.16.b). Hier erwies sich in vorangegangenen Untersuchungen die Vorläuferzelllinie Hep G2 allerdings als deutlich aktiver. Unter Verwendung von Kulturmedium RPMI 1640 mit 5% (v/v) FCS konnte nach einer Induktion mit 5 μM 3-Methylcholanthren die bereits im Vergleich zu C3A höhere Grundaktivität von $50 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ um das 26fache auf $1300 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ erhöht werden (DAWSON et al. 1985). Durch Erhöhung der FCS-Konzentration im Medium auf 10% (v/v) ließ sich die 3-MC-induzierte Aktivität auf bis zu $1875 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ steigern (MÜHLENFELD 1999). C3A erreichte nur 7,5% dieser Aktivität.

Durch die hier insgesamt erzielten Ergebnisse wird deutlich, daß die Induzierbarkeit im gewählten Konzentrationsbereich nicht direkt mit der Induktorkonzentration korrelierte, sondern bereits bei geringen Konzentrationen eine Sättigung der Induzierbarkeit erreicht wurde bzw. eine weitere Erhöhung der Induktorkonzentration die ECOD-Aktivität reduzierte. Letzteres könnte auf die cytotoxische Wirkung der Mehrzahl der Induktoren bei höheren Konzentrationen zurückzuführen sein.

Auffällig ist auch, daß sich die ECOD-Aktivität durch Zugabe von Phenobarbital bei keiner der eingesetzten Hepatocytelinien nachhaltig steigern ließ. Während dies im Fall der humanen Linie C3A dem Ergebnis früherer Untersuchungen mit humanen Hepatocyten entsprach (DAWSON et al. 1985), wäre im Fall der murinen Linien durch die Beteiligung der phenobarbitalinduzierbaren Cytochrom-P450-Enzyme CYP2A5 und CYP2B1 an der EROD-Aktivität eine Steigerung zu erwarten gewesen (GREENLEE POLAND 1978, LUBET et al. 1990). Allerdings konnte die Inaktivität von CYP2A5 in den murinen Linien bereits bei der Coumarinhydroxylierung nachgewiesen werden (siehe V.1.3.2). Die fehlende Induzierbarkeit durch Phenobarbital weist hier auf eine Inaktivität von CYP2B6 hin. Insgesamt bleibt festzuhalten, daß C3A in allen Versuchsanordnungen die im Vergleich zu HepT und K105 höchste ECOD-Aktivität besaß.

In Relation zur ECOD-Aktivität primärer porciner Hepatocyten sind die hier erzielten Aktivitäten der Hepatocytelinien vergleichsweise gering. Von einer Grundaktivität von mehr als $2500 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ wurde in einer anderen Untersuchung berichtet (HANSEN et al. 2000). Diese ließ sich zudem durch eine Induktion mit $50 \mu\text{M}$ 3-Methylcholantren auf einen Wert von über $17.500 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ steigern. Damit war die induzierte ECOD-Aktivität bei den Schweinehepatocyten im Vergleich zu C3A mehr als 36mal höher. Dies bestätigt einmal mehr die im Vergleich zu primären porcinen Hepatocyten allgemein geringere leberspezifische Aktivität solcher Hepatoblastomlinien (NYBERG 1994, STANGE, MITZNER 1995, WANG 1998) Ein Vergleich der zellspezifischen Aktivität mit primären humanen Hepatocyten gestaltet sich demgegenüber schwierig. In der Literatur findet man lediglich Angaben zu Cytochrom-P450-Aktivitäten in Mikrosompräparaten, die aus primären Zellen gewonnen wurden, wobei die spezifische Aktivität dann auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen wurde.

1.2.4 EROD-Aktivität

Auch beim Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zu 7-Hydroxyresorufin konnte in den einzelnen Versuchreihen z.T. nach einem anfänglich kontinuierlichen Anstieg der Produktmenge nachfolgend ein Rückgang beobachtet werden. Ein exemplarischer zeitlicher Verlauf ist in Abb. 5.17 dargestellt. Ursächlich ist wie bei der Bestimmung der ECOD-Aktivität ein weiterer Umsatz des Reaktionsprodukts durch die Enzyme der Phase-II-Reaktionen der Biotransformation. Bei 7-Hydroxyresorufin findet dies durch eine cytosolische Diaphorase (NAD(P)H-Chinon Oxireduktase, EC 1.6.99.2) statt (NIMS et al. 1984). Ein effektiver Inhibitor dieses Enzyms ist Dicumarol. Allerdings ergaben Voruntersuchungen, daß die

Zugabe von Dicumarol in den für die Inhibition notwendigen Konzentrationen von 2,4-10 μM z.T. unmittelbar zu einem massiven Absterben der Zellen führte¹. Aus diesem Grund wurde hier auf den Einsatz von Dicumarol verzichtet und die spezifische Aktivität im Zeitraum eines kontinuierlichen Anstiegs der 7-Hydroxyresorufin ermittelt.

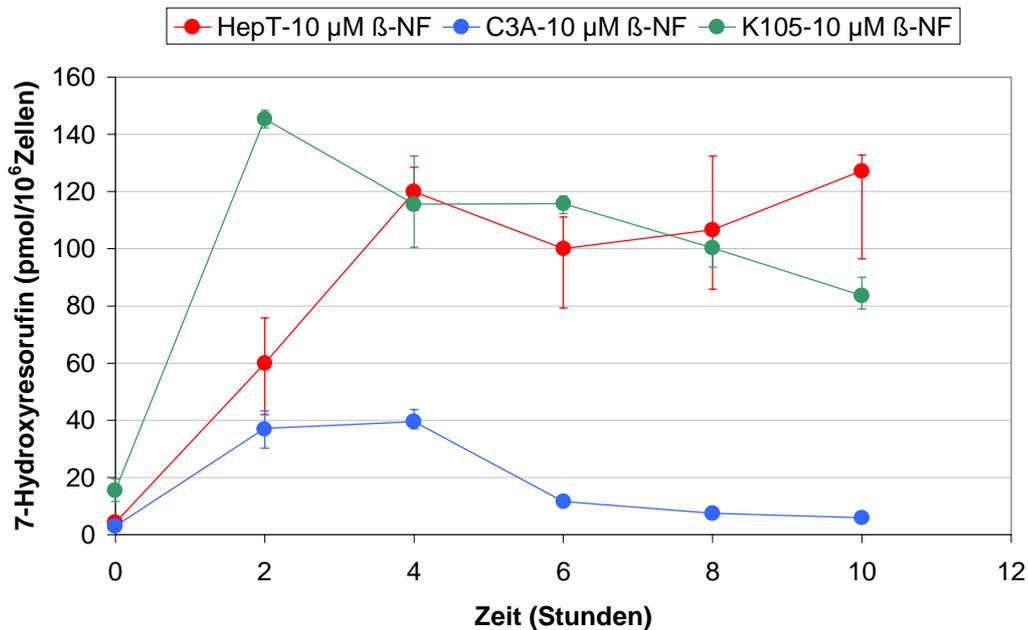


Abb. 5.17: Zeitliche Änderung der Konzentration von 7-Hydroxyresorufin als Produkt der EROD-Aktivität in den Kulturüberständen von HepT, C3A und K105 nach Induktion mit 10 μM β -Naphthoflavon ($\beta\text{-NF}$).

Die EROD-Grundaktivitäten der Hetocytenlinien wurden analog zu den ECOD-Grundaktivitäten anhand der spezifischen Produktbildungsrate (hier 7-Hydroxyresorufin) ohne Zugabe der einzelnen Induktoren ermittelt. Diese betrug bei C3A $1,9 \pm 1,6 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$, bei K105 $6,3 \pm 2,0 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ und bei HepT $6,9 \pm 1,5 \text{ pmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$. Damit übertraf im Gegensatz zur ECOD-Aktivität die EROD-Aktivität der murinen Hepatocytelinien diejenige der humanen Hepatoblastomlinie. Die Induktoren hatten sehr unterschiedlichen Einfluß auf die jeweilige Grundaktivität. Während durch Vorbehandlung mit 3-Methylcholantren bei C3A eine zur Konzentration des Induktors korrelierende Verstärkung der Aktivität festzustellen war, wirkte derselbe Induktor bei HepT und K105 überraschender Weise als Inhibitor (siehe Abb. 5.18.a). Bei einer Konzentration von 100 μM Methylcholantren sank die EROD-Aktivität auf 22% (HepT) bzw. 3,8% (K105) der Grundaktivität. Bei C3A wurde die in dieser Versuchsreihe sehr niedrige Grundaktivität bei der selben Induktorkonzentration dagegen um das 260fache gesteigert.

Durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital konnte bei HepT und C3A eine konzentrationsabhängige Steigerung der Grundaktivität festgestellt werden. Diese Steigerung lag aber auf einem sehr geringen Niveau (siehe Abb. 5.18.b). Phenobarbital wirkte bei K105 weder induzierend noch hemmend.

¹ persönliche Mitteilung durch Dr. Andreas Werner, Lehrstuhl für Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld

Zellspezifische Daten von primären humanen Hepatocyten liegen aus den in Abschnitt V.1.1.4 bereits genannten Gründen leider nicht vor.

1.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Cytochrom-P450-Aktivitätsmessungen

Weder die bereits klinisch in bioartifziellen Leberersatzsystemen eingesetzte humane Hepatoblastomlinie C3A noch die murinen Linien HepT und K105 zeigten eine CH-Aktivität. Im Vergleich zu primären porcinen Hepatocyten, die ebenfalls Bestandteil mehrerer bioartifzieller Leberersatzsysteme sind, ist die ECOD-bzw. EROD Aktivität aller drei Hepatocytenlinien deutlich geringer.

Alle drei untersuchten Zelllinien sind aus mehreren Gründen als biologische Komponente eines bioartifziellen Leberersatzsystems für den klinischen Einsatz ungeeignet. HepT und K105 sind murine Zellen, die neben einer hier nachgewiesenen geringen Biotransformationsleistung alle bereits zuvor aufgelisteten negativen Eigenschaften xenogener Zellen mit sich führen (siehe II.3.2.2.3.1). C3A zeigte hier ebenfalls vergleichsweise geringe leberspezifische Eigenschaften, die die Effizienz dieser Zellen in der klinischen Anwendung des ELAD™-Systems fragwürdig erscheinen lassen. Zudem ist die Verwendung solcher Tumorzellen mit bereits dargestellten Risiken verbunden (siehe II.3.2.2.3.1). In Ermangelung einer alternativen Zelle, die die erforderlichen Eigenschaften besitzt, wurden alle weiterführenden Arbeiten zur Expansion und Kühlung mit HepT, C3A und K105 als Modellzelllinien durchgeführt.

1.3 Kultivierung der Hepatocytenlinien im 1-L-Bioreaktor

1 g Lebermasse enthalten rund $1,7 \cdot 10^8$ Hepatocyten (KASAI et al. 1994). Ausgehend von Ergebnissen aus tumorbedingten Teilresektionen benötigt der erwachsene Mensch etwa 10-30% der Masse der gesunden Leber (= ca. 160-480 g) zum Überleben (NAGASUE et al. 1987), welches umgerechnet einer Zellmenge von etwa $2,7-8,2 \cdot 10^{10}$ Hepatocyten entspricht.

Bei einer durchschnittlich erreichbaren Zellkonzentration von etwa $4,0 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in T-Flaschen (siehe Abb. 5.4) würde daher zur Erzeugung einer ausreichenden Zellmenge für bioartifizielle Leberersatzsysteme eine Wachstumsfläche von 6,8-20,4 m² benötigt. Dies wiederum entspricht einer Menge von ca. 390-1200 T-Flaschen mit einer Wachstumsfläche von je 175 cm². Da die parallele Handhabung einer solch großen Zahl von Gewebekulturflaschen einen enormen Aufwand darstellt, wurde untersucht, ob mit Hilfe der Microcarrier-Technik durch Vergrößerung der Wachstumsfläche bei gleichzeitiger Reduktion des Kulturvolumens ein ökonomisch sinnvollerer Weg beschritten werden kann.

1.3.1 Kultivierung von HepT auf CultiSpher® G-Microcarriern

HepT zeigte eine sehr gute Affinität zu den verwendeten Microcarriern. Nach der Initiationsphase in Spinnerflaschen lag die Wiederfindungsrate der auf den Carriern adhären Zellen gegenüber der ursprünglich eingesetzten Zellmenge jeweils bei über 90%.

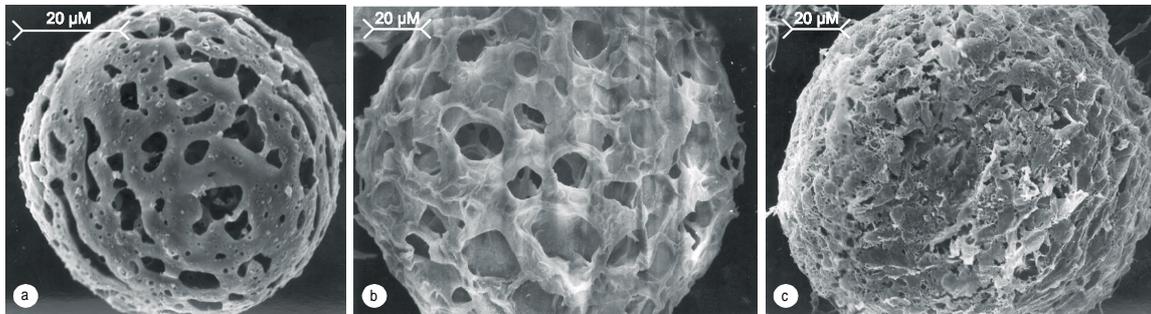


Abb. 5.19: REM-Aufnahmen von CultiSpher® G-Microcarriern. **a:** Unbehandelter trockener Microcarrier. **b:** Microcarrier nach Inkubation in CMF-PBS und Hitzesterilisation. **c:** Durch HepT besiedelter Microcarrier bei einer Zellkonzentration von $4,9 \cdot 10^6$ Zellen/ml nach 4,2 Tagen Kultivierung im geregelten 1-L-Bioreaktor.

Nach Überführung der besiedelten Microcarrier von der Spinnerflasche in den geregelten 1-L-Bioreaktor und Auffüllen des Reaktors auf ein Kulturvolumen von 1 Liter zeigte HepT im ausgewählten Beispiel innerhalb der ersten 2,8 Tage der Kultivierung ein exponentielles Proliferationsverhalten bis zu einer Zellkonzentration von $3,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml (siehe Abb. 5.20). Die maximale spezifische Wachstumsrate betrug in diesem Zeitraum $\mu_{\max} = 0,8 \text{ d}^{-1}$ ($t_d = 20,8$ Stunden). Die Proliferationsaktivität der Zellen war hier demnach niedriger als in den T-Flaschen (vgl. V.1.1.4). Ein direkter Vergleich ergibt eine um 27% reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur.

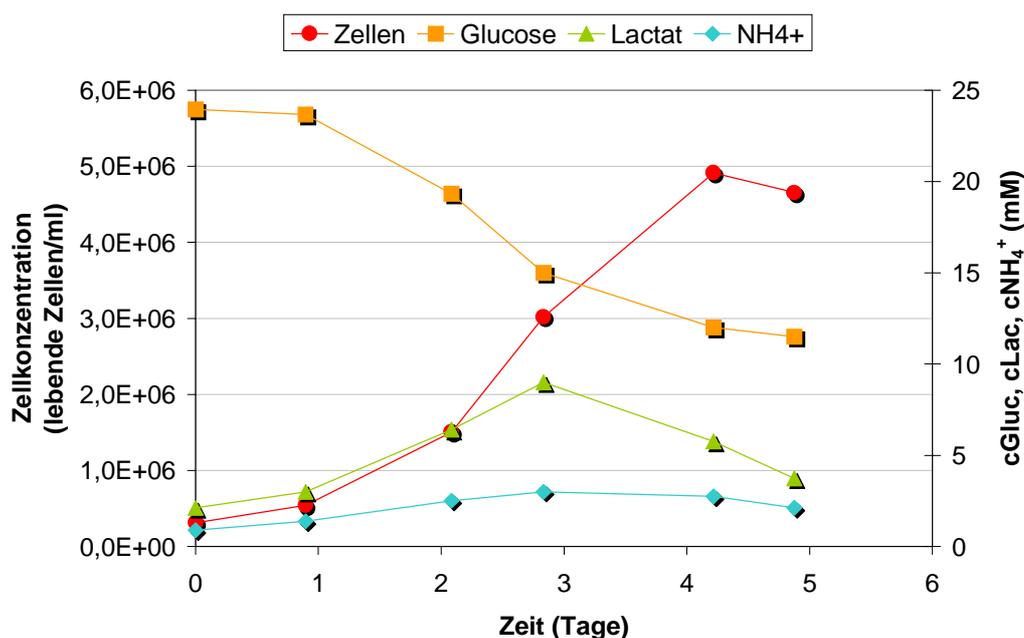


Abb. 5.20: Zeitlicher Verlauf der Kultivierung von HepT auf 3 g/l CultiSpher® G-Microcarriern im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

Zwischen Tag 2,8 und Tag 4,2 nahm die Zellkonzentration mit einer im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase geringeren Rate von $\mu = 0,34 \text{ d}^{-1}$ ($t_d = 48,9$ Stunden) zu, bis schließlich zwischen 4,2-4,9 Tagen die nach 4,2 Tagen maximal erreichte Zellkonzentration von $4,9 \cdot 10^6$ Zellen/ml (siehe auch Abb. 5.18.c) geringfügig um 4% zurückging.

Innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase korrelierten der Glucoseverbrauch sowie die Lactat- und NH_4^+ -Produktion sehr gut mit der Proliferation der Zellen ($r^2 = 0,89-0,99$). Gleiches gilt für die Zunahme der extrazellulären LDH-Aktivität, die allerdings mit einer Rate von $52,8 \text{ mU}/10^6$ lebende Zellen ($r^2 = 0,95$) im Vergleich zur T-Flaschenkultivierung 16mal höher war. Mit dem Übergang zur stationären Phase zwischen 2,8-4,2 Tagen traten Veränderungen im Metabolismus auf. Die Zellen begannen nun, das ursprünglich produzierte Lactat und Ammonium zu verbrauchen, während sich gleichzeitig der Glucoseverbrauch reduzierte. Aus der Analyse der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen wurde ersichtlich, daß zu diesem Zeitpunkt Tryptophan (TRP) und Glutamin (GLN) vollständig verbraucht waren. Zum Ende der Kultivierung kam ferner der vollständige Verbrauch von Methionin (MET) hinzu. Mit der einsetzenden Limitierung von Tryptophan und Glutamin konnte zudem eine verstärkte Produktion von Glycin (GLY) und ein verstärkter Verbrauch von Asparagin (ASN) beobachtet werden (siehe Abb. 5.21).

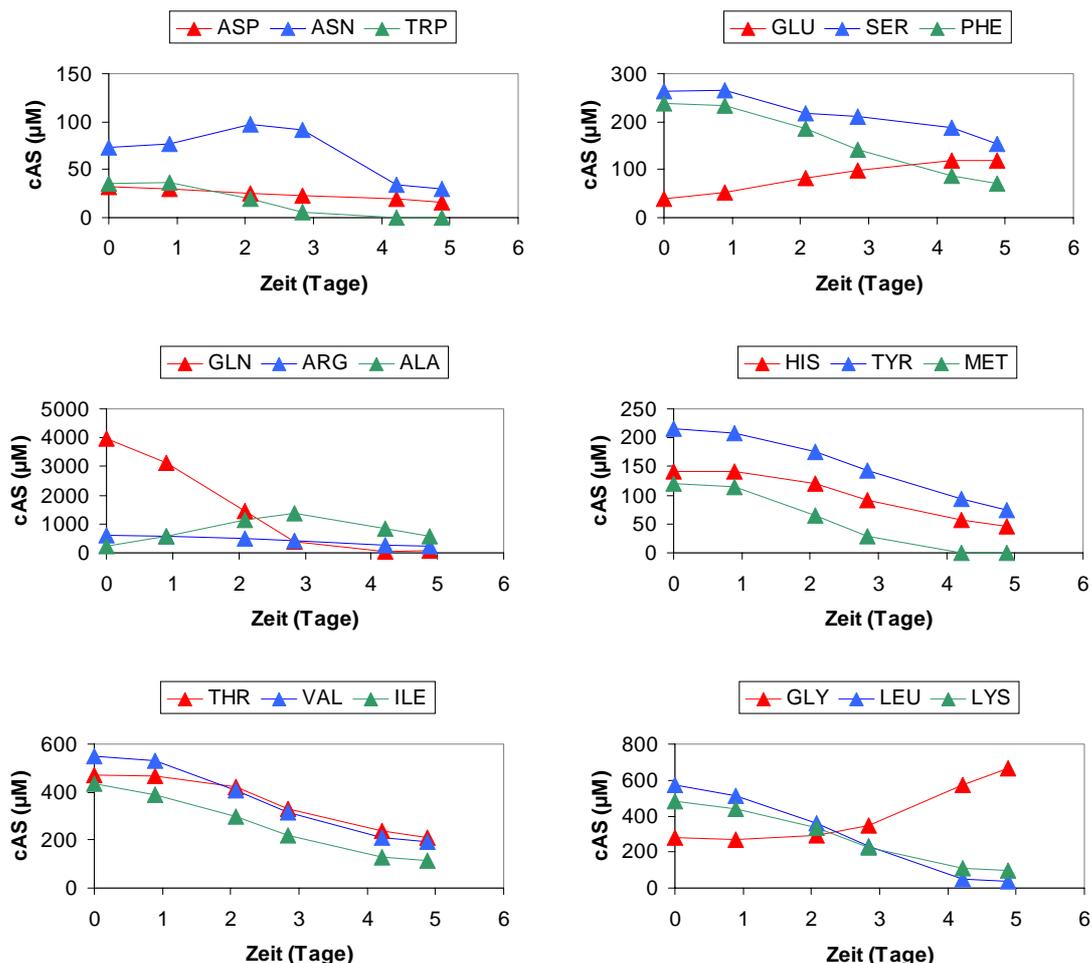


Abb. 5.21: Profile der zeitlichen Änderung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen bei der Kultivierung von HepT im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

Die Limitierung der Aminosäuren war offensichtlich Ursache für das nach der exponentiellen Phase reduzierte Wachstum der Kultur und die Veränderung des Glucose-, Lactat-, Ammonium-, Glycin- und Asparaginstoffwechsels. Das Absterben der Zellen am Ende der Kultivierung könnte zudem durch einen nach 4,2 Tagen Kultivierungsdauer einsetzenden Abfall des pH-Wertes im Kulturmedium von pH 7,2 auf schließlich bis zu pH 6,7 verursacht worden sein.

Der abfallende pH-Wert war ein grundsätzliches Problem der Kultivierung der Zellen unter Verwendung des mikroporösen Polypropylenschlauchs zur Gasver- und -entsorgung. Durch den vorgegebenen Gasvolumenstrom konnte bei Zellkonzentrationen oberhalb von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml das durch die Zellen produzierte CO_2 nicht mehr in ausreichendem Maße aus dem Kulturüberstand abgereichert werden. Ursache dafür war offenbar eine zunehmend schlechtere Diffusibilität des Membranschlauchs in Folge von z.B. Proteinauflagerungen (engl. *fouling*) im Verlauf der Kultivierung. Eine mögliche Lösung dieses Problems durch Erhöhung des Gasvolumenstroms über einen vermehrten Lufteinstrom führte aufgrund des hohen Stickstoffanteils in der Luft zu einer Erniedrigung des pO_2 , der auch bei maximalem geregeltem O_2 -Eintrag nicht mehr auf dem Sollwert von 40% SAT gehalten werden konnte. Dies hätte durch einen O_2 -Grundstrom statt des Luftgrundstroms verhindert werden können. Da die pO_2 -Messung mittels Clark-Elektrode druckabhängig ist, hätte die mit dem vermehrten Gaseinstrom verbundene Druckerhöhung im Bioreaktor jedoch zusätzliche Meßungenauigkeiten verursacht.

Trotz dieser Umstände wurde innerhalb von 4,2 Tagen eine Zellmenge von $4,9 \cdot 10^9$ Zellen erzeugt, welches etwa 10% der für ein bioartifizielles Leberersatzsystem erforderlichen Menge entspricht. Unter Aufrechterhaltung der maximalen spezifischen Wachstumsrate wäre diese Menge bereits nach 3,5 Tagen zu erreichen. Demzufolge könnte durch Maßstabsvergrößerung in einer einzigen 10-Liter-Kultivierung eine ausreichende Zellmenge generiert werden, sofern eine Hepatocytelinie die Proliferationseigenschaften von HepT und die Biotransformationsleistungen primärer humaner Hepatocyten *in vivo* aufweist. Durch eine verbesserte Gasver- bzw. -entsorgung und weitere Aminosäuresupplementierung des Standardmediums bzw. durch einen Mediaumaustausch ließe sich über eine verlängerte Kultivierungsdauer zudem eine noch größere Zellmenge erzeugen. Die Kapazität der CultiSpher® G-Microcarrier liegt offenbar auch deutlich über dem hier erreichten Wert mit $1,7 \cdot 10^3$ Zellen/Microcarrier. Mit CHO-Zellen wurden Konzentrationen von bis zu $4,5 \cdot 10^3$ Zellen/Microcarrier erzielt (MIGNOT et al. 1990).

1.3.2 Sphäroidkultivierung von C3A

Die Adhäsionsneigung von C3A an die Gelatinematrix der CultiSpher® G-Microcarrier war deutlich geringer als bei HepT. Maximal ein Drittel der Zellen wurde nach der Initiationsphase auf den Carriern wiedergefunden. Der Großteil der Zellen war statt dessen zu Zellhaufen (Sphäroide) aggregiert, wobei etwa 5-20 Zellen einen solchen Sphäroid

bildeten (siehe Abb. 5.22.a). Die weitere Microcarrier-Kultivierung von C3A gestaltete sich schwierig. Nach einer Kulturdauer von zwei Tagen im 1-L-Bioreaktor konnte eine zunehmende Verklumpung der Carrier beobachtet werden, die sich auch durch eine kurzfristige Erhöhung der Rührergeschwindigkeit nicht auflösen ließ. Zudem führte die Verklumpung und eine hierdurch verursachte Sedimentation der Carrier zu einer Ungleichverteilung der Zellen im Kulturmedium. Eine repräsentative Probenentnahme zur Bestimmung der Zellkonzentration war aufgrund dieser Umstände nicht möglich. Deshalb wurden die Sphäroide statt der auf den Microcarriern adhärenierten Zellen für die Expansion im Bioreaktor weiterverwendet. Zur Erzeugung der Sphäroide während der Initiationsphase in Spinnerflaschen wurde auf den Einsatz der Microcarrier verzichtet, ansonsten aber bezüglich des intermittierenden Rührverfahrens auf die gleiche Weise vorgegangen.

Nach einer Kultivierungsdauer von 4,8 Tagen wiesen die C3A-Sphäroide eine im Vergleich zum Beginn der Kultivierung kompaktere Form auf (siehe Abb. 5.22.b). Der Durchmesser der hier dargestellten Zellaggregate betrug zwischen 50-100 μm . Am Ende der Kultivierung nach 7,8 Tagen enthielt die Kultur vereinzelt Sphäroide mit einem Durchmesser von bis zu 340 μm (siehe Abb. 5.22.c), welches in etwa dem Durchmesser der größten CultiSpher[®] G-Microcarrier entspricht.

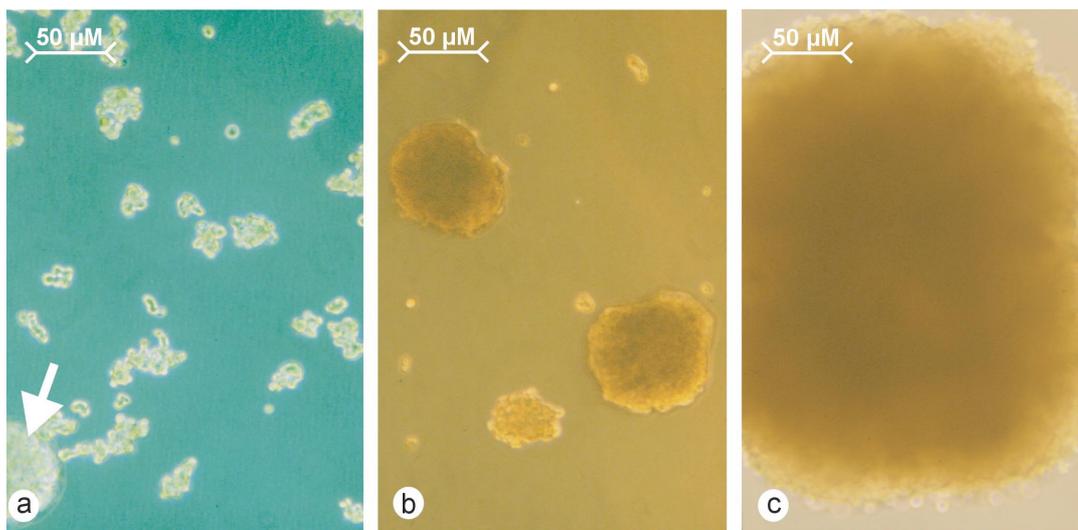


Abb. 5.22: Sphäroidbildung von C3A während der Kultivierung im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem (lichtmikroskopische Aufnahmen). **a:** Sphäroide nach der Initiationsphase. Der Pfeil markiert einen Microcarrier. **b:** Sphäroide nach einer Kultivierungsdauer von 4,8 Tagen. **c:** Einzelner Sphäroid nach einer Kultivierungsdauer von 7,8 Tagen.

Die Erzeugung einer Zellkonzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml bedurfte einer Kultivierungsdauer von 7,8 Tagen und einem zweimaligen Mediumwechsel (= MW, 90% des Reaktorvolumens) nach 4,8 und 6,8 Tagen (siehe Abb. 5.23). Medienwechsel wurden durchgeführt, indem durch Ausschalten der Taumelrührung die Sphäroide über einen Zeitraum von ca. 20 Minuten auf den Boden des Bioreaktors sedimentierten. Hierdurch konnte der Kulturüberstand unter Rückhaltung der lebenden Zellen abgehoben und durch eine entsprechende Menge frischen Mediums ersetzt werden. Durch das Wiederauffüllen des

Bioreaktors bei gleichzeitigem Einschalten der Taumelrührung konnten die Sphäroide vollständig resuspendiert werden.

Die maximale spezifische Wachstumsrate betrug $\mu_{\max} = 0,46 \text{ d}^{-1}$, welches einer Verdopplungszeit der Zellen von 36 Stunden entspricht. Wie HepT zeigte auch C3A eine im Vergleich zur T-Flaschenkultivierung verminderte Proliferationsaktivität. Ein direkter Vergleich ergab hier ein um 24% reduziertes Wachstum der Kultur. Aus den Analysen der im Kulturüberstand enthaltenen extrazellulären Aminosäuren geht hervor, dass zum Zeitpunkt des ersten Mediumwechsels die Aminosäuren Tryptophan (TRP) und Phenylalanin (PHE) vollständig verbraucht waren (siehe Abb. 5.24). Dies erklärt das zwischen 3,8 und 4,8 Tagen herabgesetzte Wachstum der Kultur. Ferner verursachte dies nach dem Mediumwechsel eine *lag*-Phase von etwa 22 Stunden. Zum Zeitpunkt des zweiten Mediumwechsels kam neben der Limitierung der erstgenannten Aminosäuren ein vollständiger Verbrauch von Methionin (MET) hinzu. Allerdings konnte hier kein Rückgang der Proliferationsaktivität von C3A beobachtet werden.

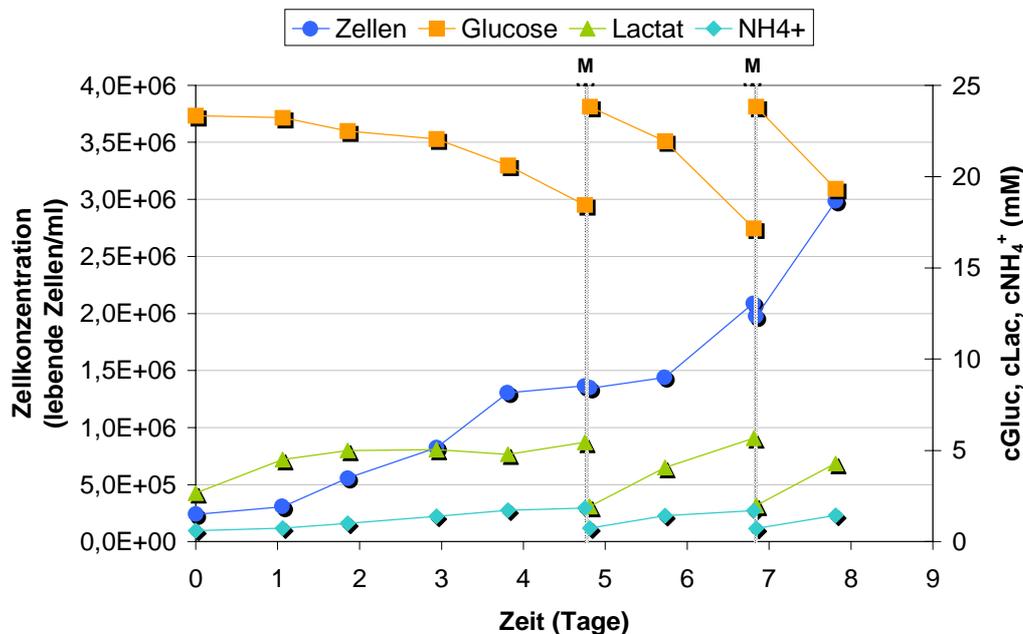


Abb. 5.23: Zeitlicher Verlauf der Sphäroidkultivierung von C3A im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

Die auffälligen Veränderungen im Glucose-, Lactat-, Ammonium- und Aminosäurestoffwechsel von HepT zum Zeitpunkt der Aminosäurelimitierungen (vgl. Abb. 5.20 und Abb. 5.21) konnten bei C3A nicht beobachtet werden. Innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase vor dem ersten Mediumwechsel korrelierte das Proliferationsverhalten von C3A sehr gut mit dem Glucoseverbrauch sowie der Lactat- und Ammoniumproduktion ($r^2 = 0,98-0,99$). Entsprechendes gilt auch für die Zunahme der extrazellulären LDH-Aktivität mit einer Rate von $35,7 \text{ mU}/10^6$ lebende Zellen ($r^2 = 0,97$). Dieser Wert lag im Vergleich zur T-Flaschenkultivierung 6mal höher. Mit dem Erreichen einer Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml setzte der schon bei HepT zu beobachtende Abfall des pH-Wertes ein.

Die Erzeugung einer ausreichenden Zellmenge für bioartifizielle Leberersatzsysteme mit C3A als Modellzelllinie gestaltet sich aufwändiger als mit HepT. Eine effiziente Kultivierung auf Microcarriern war aufgrund der geringen Affinität der Zellen zur Gelatinematrix und dem nachfolgenden Verklumpen der Carrier während der Kultivierung nicht möglich. Während bei HepT im 1-Liter-Maßstab unter Aufrechterhaltung der maximalen spezifischen Wachstumsrate nach 3,5 Tagen 10% der benötigten Zellmenge erzeugt werden könnten, würde dies bei C3A aufgrund der geringeren Wachstumsrate bei gleichzeitig höherem Mediumverbrauch schon 6,2 Tage dauern. Dennoch würde hierzu gemäß der erzielten Daten eine Sphäroidkultivierung im 10-Liter-Maßstab ausreichen. Sinnvoll wäre eine Trypsinbehandlung der Sphäroide vor der Applikation ins bioartifizielle Leberersatzsystem, die einer Trypsinbehandlung der auf den Microcarriern immobilisierten Hepatocyten gleichkäme. Hierdurch könnte eine bessere Verteilung der Zellen im System und damit eine größere Austauschfläche zwischen Patientenblut bzw. -plasma und den Zellen erreicht werden.

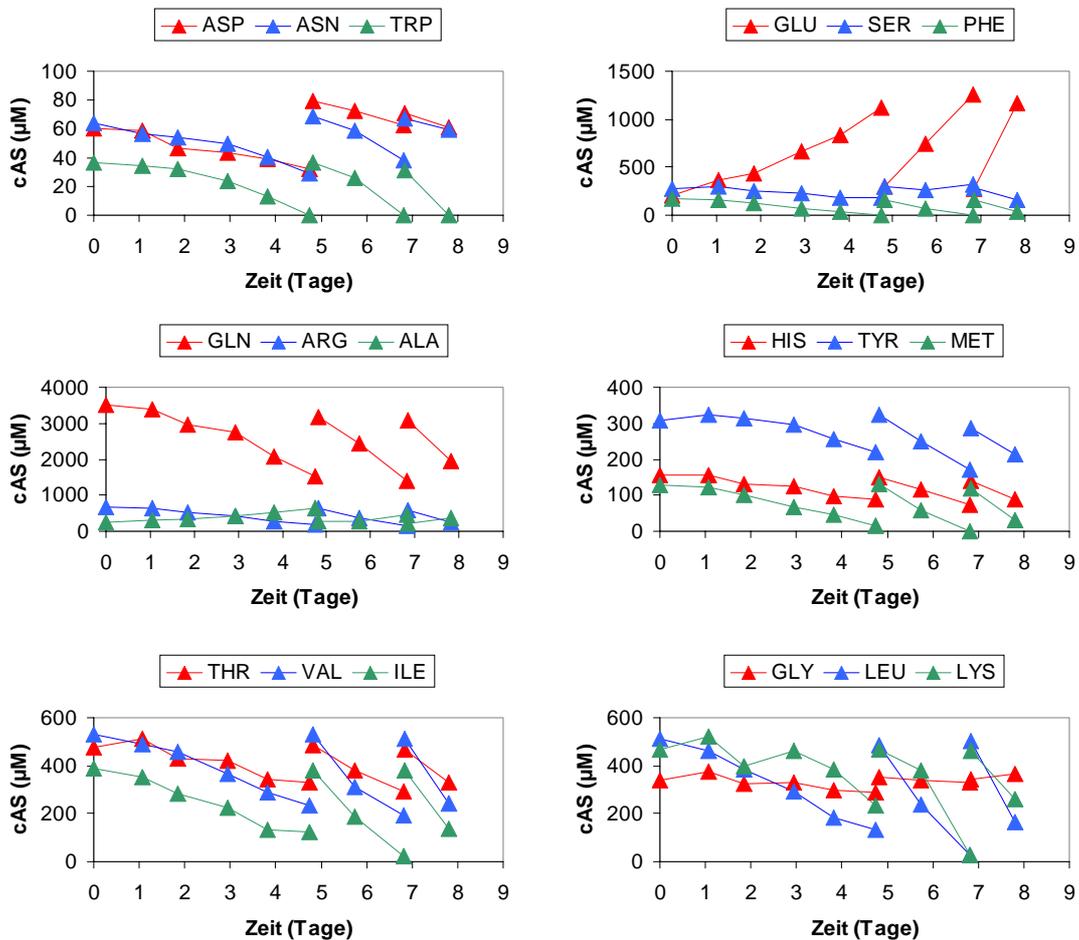


Abb.5.24: Profile der zeitlichen Änderung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen (cAS) bei der Kultivierung von C3A im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

1.3.3 Kultivierung von K105 auf Cultispher G[®]-Microcarriern

K105 zeigte wie HepT eine sehr gute Affinität zur Gelatinematrix der Carrier. Die Wiederfindungsrate nach der Initiationsphase in Spinnerflaschen lag hier ebenfalls jeweils bei über 90%. Nach Überführung der besiedelten Microcarrier in den 1 Liter Reaktor und Auffüllen des Reaktors auf 1 Liter proliferierte K105 ohne eine erkennbare *lag*-Phase mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,4 \text{ d}^{-1}$ ($t_d = 41,6$ Stunden). Im Vergleich zu HepT und C3A zeigte K105 damit die niedrigste Proliferationsaktivität bei der Kultivierung im geregelten 1-L-Bioreaktor. Diese Aktivität war zudem in Relation zur T-Flaschenkultivierung um fast 70% reduziert. Innerhalb eines Kultivierungszeitraums von 5,9 Tagen wurde so eine Zellkonzentration von $2,7 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht (siehe Abb. 5.25). Ein durch Limitierungen verursachten Rückgang der Proliferationsaktivität konnte dabei durch einen jeweils rechtzeitigen Mediumwechsel vermieden werden. Die Vorgehensweise entsprach dabei derjenigen des Mediumwechsels bei der Sphäroidkultivierung von C3A. So war stets eine ausreichende Menge Glucose im Kulturüberstand enthalten (siehe Abb. 5.25). Gleiches gilt für die Konzentration der extrazellulären Aminosäuren (siehe Abb. 5.26).

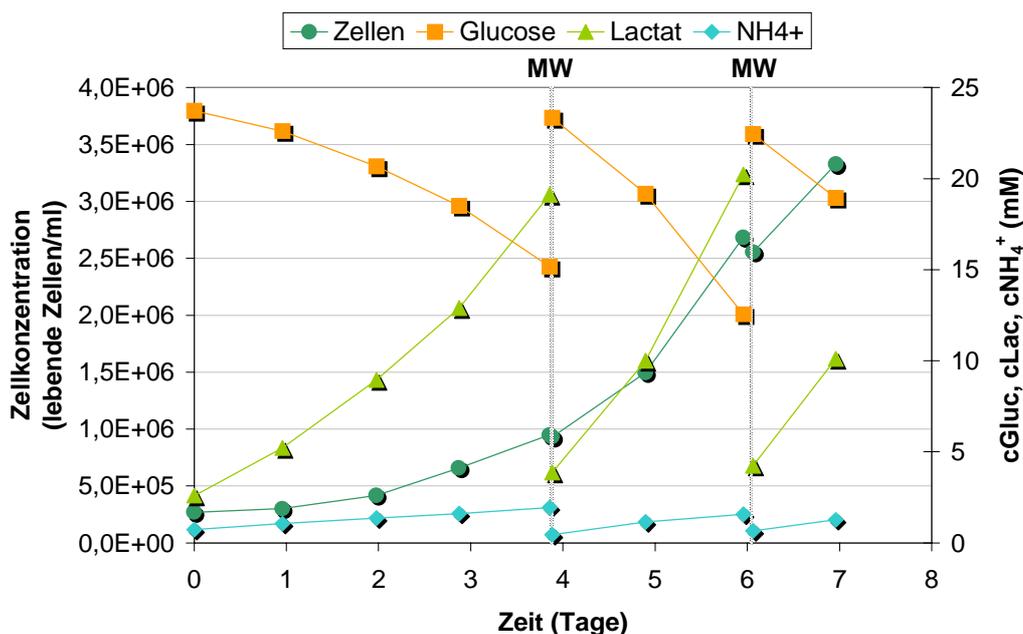


Abb. 5.25: Zeitlicher Verlauf der Kultivierung von K105 auf 3 g/l Cultispher G-Microcarriern im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem (MW = Mediumwechsel, 90% des Reaktorvolumens).

Der Glucoseverbrauch sowie Lactat- und Ammoniumproduktion korrelierten in diesem Zeitraum sehr gut mit dem Wachstum der Kultur ($r^2 = 0,9-0,98$). Gleiches gilt auch für die Zunahme der extrazellulären LDH-Aktivität ($r^2 = 0,99$). Die Rate lag hier bei $33,9 \text{ mU}/10^6$ lebende Zellen und war damit fast 9mal höher als bei der Kultivierung von K105 in T-Flaschen.

Trotz ausreichender Substratversorgung nahm die Proliferationsaktivität nach dem zweiten Mediumwechsel ab. Zwischen 6,1-7 Tagen der Kultivierung ging die spezifische

Wachstumsrate auf $\mu = 0,26 \text{ d}^{-1}$ ($t_d = 63,1$ Stunden) zurück. Zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme der Kultivierung war der pH-Wert geringfügig von pH 7,2 auf pH 7,1 abgefallen und könnte demzufolge eine mögliche Ursache für das reduzierte Wachstum der Kultur sein.

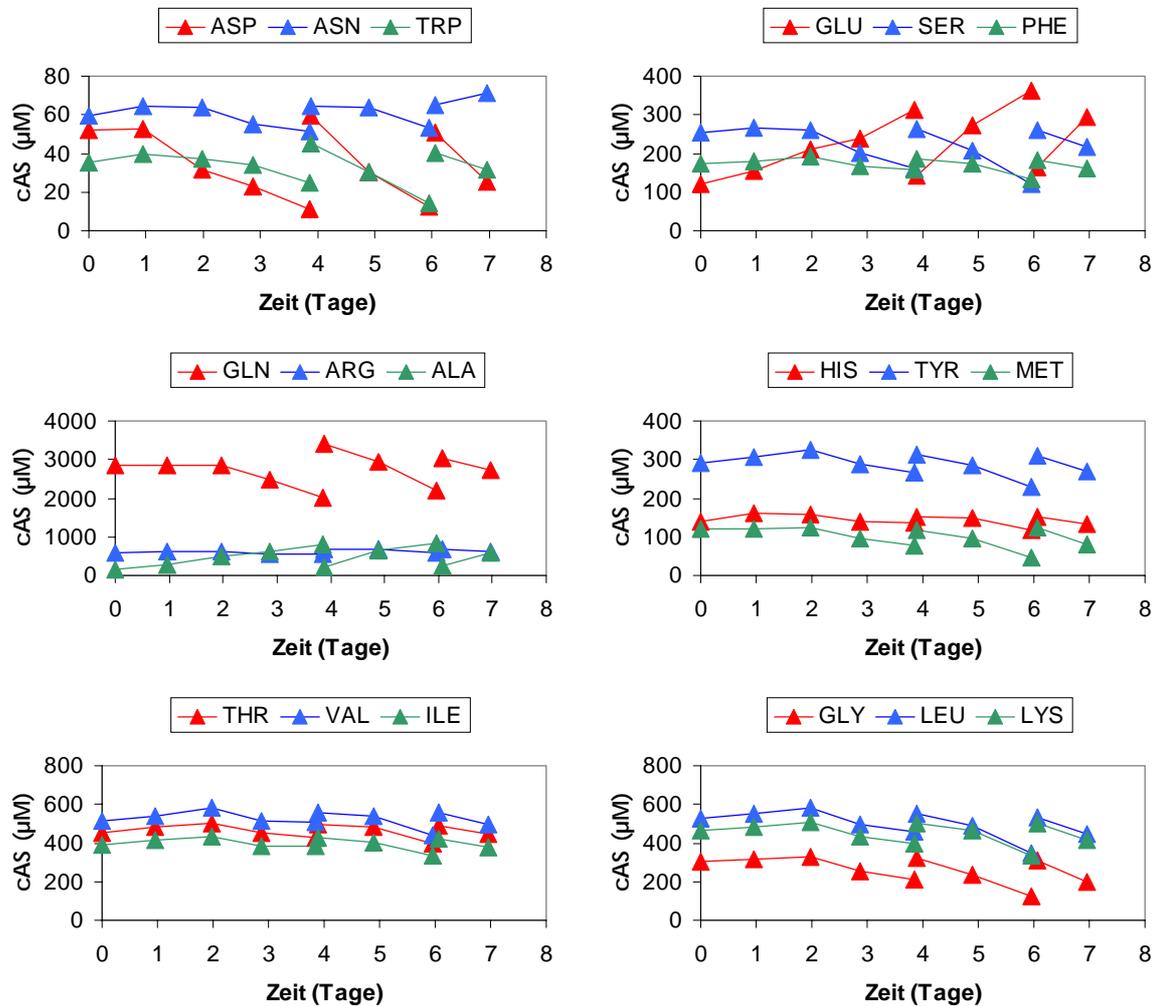


Abb. 5.26: Profile der zeitlichen Änderung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen (cAS) bei der Kultivierung von K105 im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

Ausgehend vom theoretischen Ziel, 10% der Zellmenge für bioartifizielle Leberersatzsysteme im 1-L-Bioreaktor zu erzeugen, würden mit K105 als Modellzelllinie unter Aufrechterhaltung der maximalen spezifischen Wachstumsrate 7,1 Tage benötigt. Hierzu wäre allerdings - wie bei den anderen Hepatocytelinien auch - eine Verbesserung der Gasver- und -entsorgung notwendig, um die Sollwerte für pO_2 und insbesondere pH aufrechterhalten zu können. Gemäß der hier erzielten Ergebnisse wäre auch mit K105 durch Kultivierungen im 10-Liter-Maßstab die Generierung einer entsprechenden Zellmenge, wie sie für die Anwendung bioartifizieller Leberersatzsysteme notwendig ist, möglich. Die Zahl notwendiger Mediumwechsel könnte dabei durch Supplementierung des Standardmediums mit Tryptophan (TRP) und Methionin (MET) herabgesetzt werden. Die Konzentration

dieser beiden Aminosäuren näherte sich in der K105-Kultivierung am schnellsten dem vollständigen Verbrauch (siehe Abb. 5.26).

1.3.4 Vergleich der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate

Die Sauerstoffaufnahme der Zellen (OUR) wurde durch Abschalten der Begasung und nachfolgender Aufnahme der zeitlichen Änderung des pO_2 während der exponentiellen Wachstumsphase einer Kultur bestimmt. Die Änderung wurde dabei in einem Bereich zwischen 40%SAT und 5%SAT aufgenommen. Zum Zeitpunkt des Abschaltens der Begasung wurde zudem die jeweilige Zellkonzentration ermittelt, die zur Bestimmung der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate qO_2 notwendig war. Die Zellkonzentration lagen dabei zwischen $0,8-1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Für jede Hepatocytelinie wurde diese Messung insgesamt dreimal in voneinander unabhängigen Kultivierungen durchgeführt.

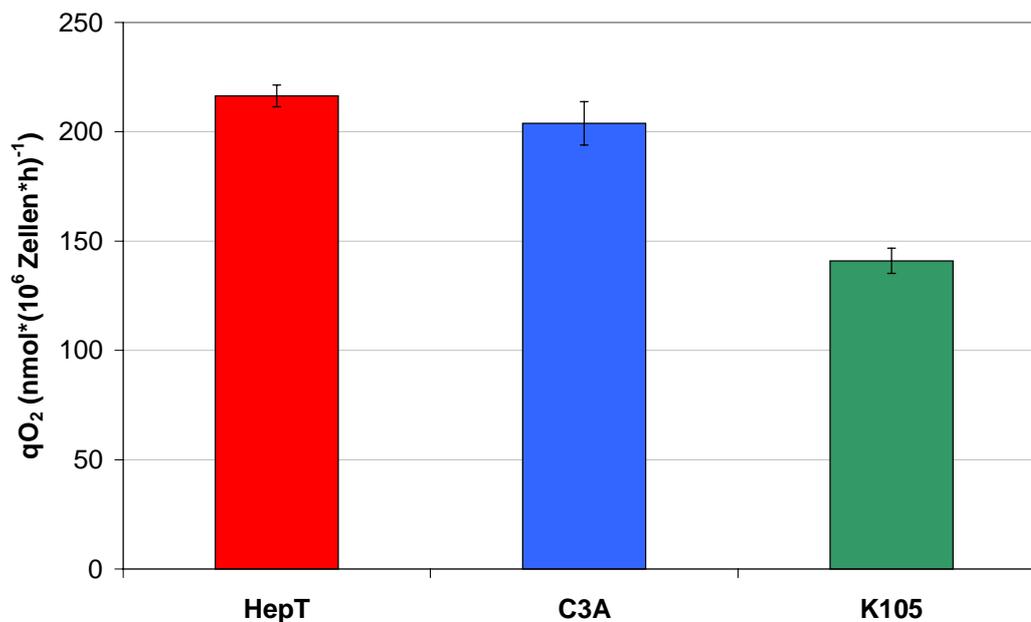


Abb. 5.27: Spezifische Sauerstoffverbrauchsrate (qO_2) von HepT, C3A und K105 während der Kultivierung im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

Die spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate von HepT und C3A übertrafen diejenige von K105 deutlich. Mit Werten von $216,4 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ (HepT) bzw. $203,8 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ (C3A) verbrauchten diese Zelllinien um bis zu 35% mehr Sauerstoff als K105, bei denen eine Verbrauchsrate von $140 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})^{-1}$ ermittelt wurde (siehe Abb. 5.27). Die Verbrauchsrate von HepT und K105 lagen damit in einer Größenordnung, die auch bei Hybridomalinen (z.B. MAK 33) erreicht werden (IDING 1998). Auf eine Bestimmung des k_{La} -Werts zur Charakterisierung des Bioreaktorsystems wurde aufgrund der sich durch z.B. Proteinauflagerung auf die Begasungsmembran zunehmend verschlechternden Eintragsrate verzichtet.

1.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kultivierungen im 1-L-Bioreaktor

Alle hier verwendeten Hepatocytelinien eigneten sich für die Expansion im gerührten System. Eine effiziente Microcarrierkultivierung mit C3A war aufgrund der geringen Affinität der Zellen zur Gelatinematrix und dem zunehmenden Verklumpen der Carrier im Verlauf der Kultivierung nicht möglich. Alternativ ließ sich C3A durch Sphäroidkultivierung expandieren. Sphäroidbildungen bei HepT und K105 konnten nicht beobachtet werden.

Ausgehend vom Proliferationsverhalten der Zellen wäre die Erzeugung einer für die Applikation in bioartifiziellen Leberersatzsystemen notwendigen Zellmenge im 10-Liter-Maßstab innerhalb eines Zeitraums von 3,5 Tagen (HepT) bis 7,1 Tagen (K105) unter Verwendung eines optimierten Kulturmediums und einer verbesserten Gasver- und -entsorgung möglich. Unter Berücksichtigung notwendiger Vorkulturen in T-Flaschen und im 1-Liter-Bioreaktor würde sich der Zeitbedarf auf etwa 12-17 Tage verlängern. Alle Hepatocytelinien zeigten eine im Vergleich zur T-Flaschenkultivierung herabgesetzte Proliferationsaktivität. Dieses ist offenbar auf eine erhöhte Schädigung der Zellen im gerührten System zurückzuführen, da die spezifische Zuwachsrates der extrazellulären LDH-Aktivität gegenüber der T-Flaschen-Kultivierung deutlich erhöht war. Ein weiteres Indiz dafür ist die bei der 1-L-Kultivierung erniedrigte Stoffwechselaktivität der Zellen. Es wurden hier größtenteils geringere spezifische Metabolisierungsraten für Glucose, Lactat, Ammonium und Aminosäuren ermittelt als in den T-Flaschen-Kultivierungen (siehe Abb. 5.28).

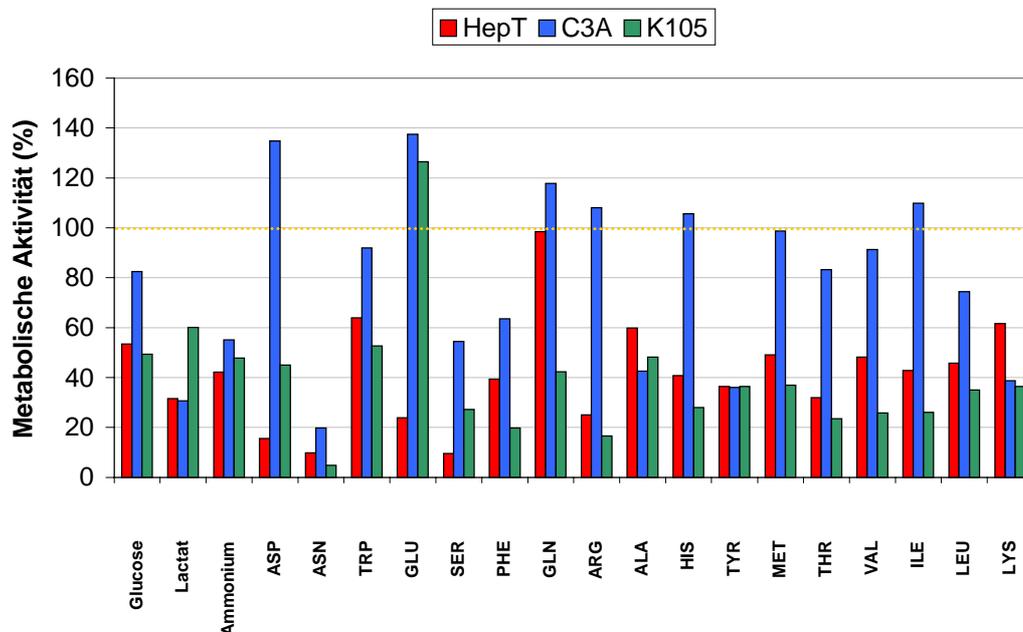


Abb. 5.28: Relation zwischen den spezifischen Metabolisierungsraten aus T-Flaschenkultivierungen (= 100%) und 1-L-Bioreaktorkultivierungen von HepT, K105 und C3A als Maß der metabolischen Aktivität.

So erreichte bspw. die spezifische Glucoseverbrauchsrate von K105 mit einem Wert von $q_{\text{Gluc}} = -3,3 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ gerade einmal 50% der Verbrauchsrate in T-Flaschen.

Nur vereinzelt konnte insbesondere bei C3A für einige Aminosäuren eine höhere Verbrauchs- (ASP, GLN, ARG, HIS, ILE) bzw. Bildungsrate (GLU) ermittelt werden. Eine besondere Stellung nimmt in diesem Zusammenhang die Glycin-Metabolisierung der Zellen ein: Während bei der T-Flaschenkultivierung kein eindeutiger Verbrauch oder eine eindeutige Produktion von Glycin ermittelt werden konnte, lagen die spezifischen Verbrauchsrate im Bioreaktor bei $q_{\text{GLY}} = -14 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ (C3A) bzw. $q_{\text{GLY}} = -52,8 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ (K105). HepT hingegen produzierte Glycin mit einer Produktionsrate von $q_{\text{GLY}} = +14,6 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$.

2. Hypothermische Lagerung von HepT, C3A und K105

Neben der funktionellen Charakterisierung und Expansion der hier verwendeten Hepatocytelinien bestand eine weitere Aufgabe in dieser Arbeit darin, die Lagerungsfähigkeit der Zellen bei erniedrigten Umgebungstemperaturen zu untersuchen. Hierzu wurden insgesamt drei verschiedene Versuchsanordnungen unter Verwendung des Standardmediums gewählt: 1. Monolayer in T-Flaschen, 2. Vereinzelt Zellen als lockeres Sediment in Zentrifugenröhrchen. 3. Microcarrier- bzw. Sphäroidkulturen im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem. Die Untersuchungen wurden bei Temperaturen von 4°C bzw. Raumtemperatur durchgeführt.

2.1 Lagerung in T-Flaschen bei Raumtemperatur

In dieser Versuchsanordnung wurden unter Verwendung von Standardmedium Monolayer von HepT, C3A, und K105 in 15 parallelen 75 cm²-T-Flaschen pro Zelllinie erzeugt. Nachfolgend wurde der Kulturüberstand pro Flasche (20 ml) durch eine entsprechende Menge frischen Mediums ersetzt und alle Flaschen zur Einstellung eines physiologischen pH-Wertes für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer der T-Flaschen bei geschlossenem Deckel auf eine Ablage des Zellabors. Die im Zellabor installierte Klimaanlage sorgte über den Versuchszeitraum für gleichbleibend stabile Temperaturen von 19,1-21,3°C (Raumtemperatur, RT). Beginnend mit der ersten T-Flasche zum Zeitpunkt t_0 (keine Lagerung) wurde pro Tag der Monolayer einer T-Flasche trypsiniert und die Zellen nach Trypanblaufärbung einer Zählung im Hämocytometer bzw. CEDEX[®]-System zugeführt. Der Kulturüberstand jeder Flasche wurde neben der Analyse der metabolischen Parameter (Glucose, Lactat, NH₄⁺, LDH und Aminosäuren) einer Überprüfung des pH-Wertes unterzogen.

Bei allen Hepatocytelinien war unmittelbar mit dem Beginn der Lagerung ein kontinuierlicher Rückgang der Zellkonzentration zu beobachten (siehe Abb. 5.29). Der stärkste Rückgang wurde bei K105 mit 6,9% pro Tag zur Ausgangszellkonzentration ermittelt. Bei HepT war diese Absterberate deutlich geringer (2,9%/Tag) und auch C3A

erwies sich im Vergleich mit K105 als robuster (2,7%/Tag). Das Absterben der Zellen spiegelte sich im Anstieg der LDH-Aktivität in den Kulturüberständen mit spezifischen Zuwachsraten von $514 \text{ mU} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ (HepT), $201 \text{ mU} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ (C3A) und $371 \text{ mU} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ (K105) wieder (siehe Abb. 5.30). Aus diesen Werten wird ersichtlich, daß die Lactatdehydrogenase von Hepatocytelinie zu Hepatocytelinie zellspezifisch unterschiedlich stark exprimiert wurde.

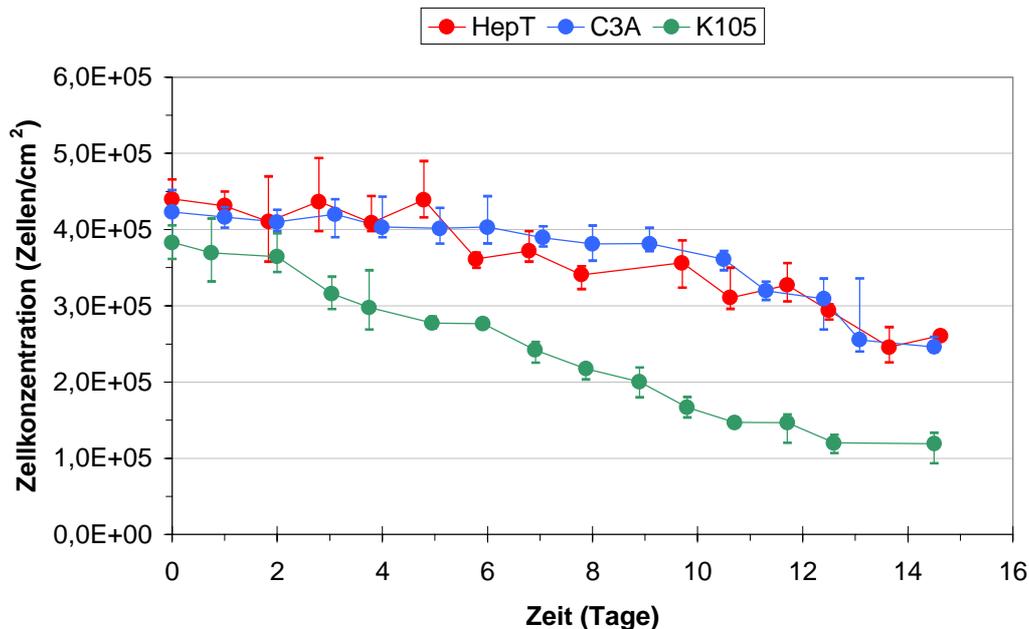


Abb. 5.29: Zeitlicher Verlauf der Zellkonzentration während der Lagerung von HepT, C3A und K105 als konfluente Monolayer in 75 cm^2 -T-Flaschen mit pH-konditioniertem Standardmedium bei Raumtemperatur.

Wie aus Abbildung 5.30 zu ersehen ist, war der Stoffwechsel der Zellen durch die Temperaturniedrigung von 37°C auf Raumtemperatur keineswegs vollständig unterbunden. Trotz der damit verbundenen CO_2 -Produktion der Zellen reichte die Pufferkapazität des Mediums aus, um in den drei Versuchsreihen den pH-Wert jeweils konstant auf $\text{pH } 7,19 \pm 0,1$ zu halten.

Es traten speziesspezifische Besonderheiten im Metabolismus der Zellen auf. Insgesamt waren die metabolischen Umsatzraten durch die Temperaturniedrigung bei den murinen Hepatocytelinien im Vergleich zur normothermischen Kultivierung stärker herabgesetzt als bei C3A (siehe Abb. 5.31). Dies führte dazu, daß bei C3A nach 8 Tagen der Lagerung Tryptophan (TRP) und nach weiteren 2,5 Tagen Asparagin (ASN), Phenylalanin (PHE) und Methionin (MET) limitiert waren (siehe Abb. 5.30). Hierdurch wurde die Reduktion der Zellkonzentration geringfügig beschleunigt. Allerdings schlug sich dieser Trend nicht im Anstieg der extrazellulären LDH-Aktivität nieder. Eine Limitierung von Asparagin war nach 11,7 Tagen auch bei K105 zu erkennen, ohne daß dadurch ein unmittelbarer Effekt auf die Zellen registriert werden konnte. Bei C3A wurde im Gegensatz zu HepT und K105 nach einer anfänglichen Produktion von Lactat ab Tag 2 der Lagerung ein leichter Rückgang der Lactatkonzentration im Kulturüberstand gemessen. Weiterhin zeigte C3A eine verstärkte Produktion von Glutamat, die bei HepT und K105 deutlich schwächer ausgeprägt war.

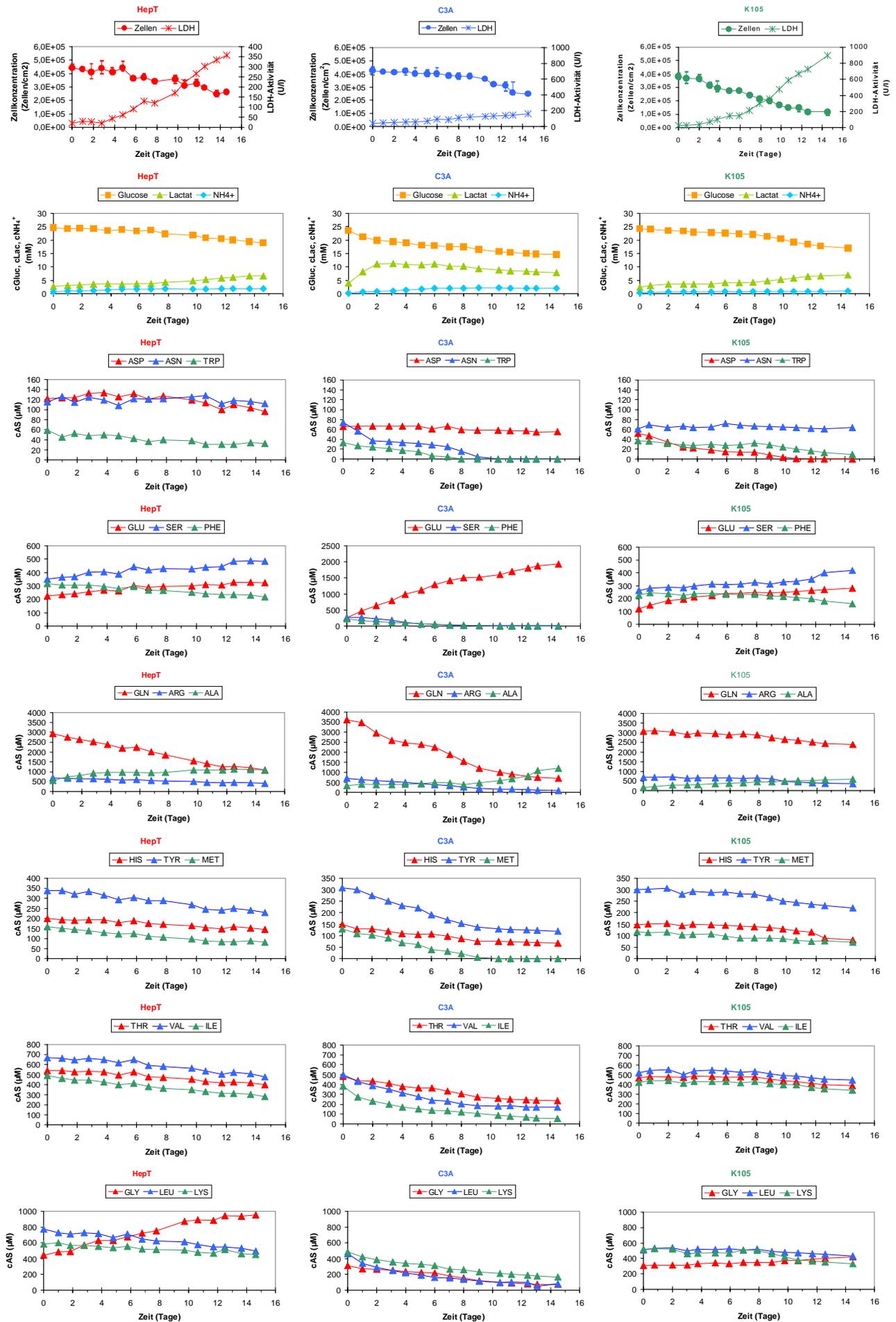


Abb. 5.30: Gesamtdarstellung der Parameter aus der T-Flaschen-Lagerung von HepT, C3A und K105 bei RT.

Sehr eindeutig war auch die Veränderung des Metabolismus von Serin (SER) bei HepT und K105. Während Serin unter normothermischen Kultivierungsbedingungen verbraucht wurde, produzierten die murinen Hepatocytelinien diese Aminosäure hier kontinuierlich. Bei C3A konnte eine solche Veränderung des Serinmetabolismus nicht beobachtet werden.

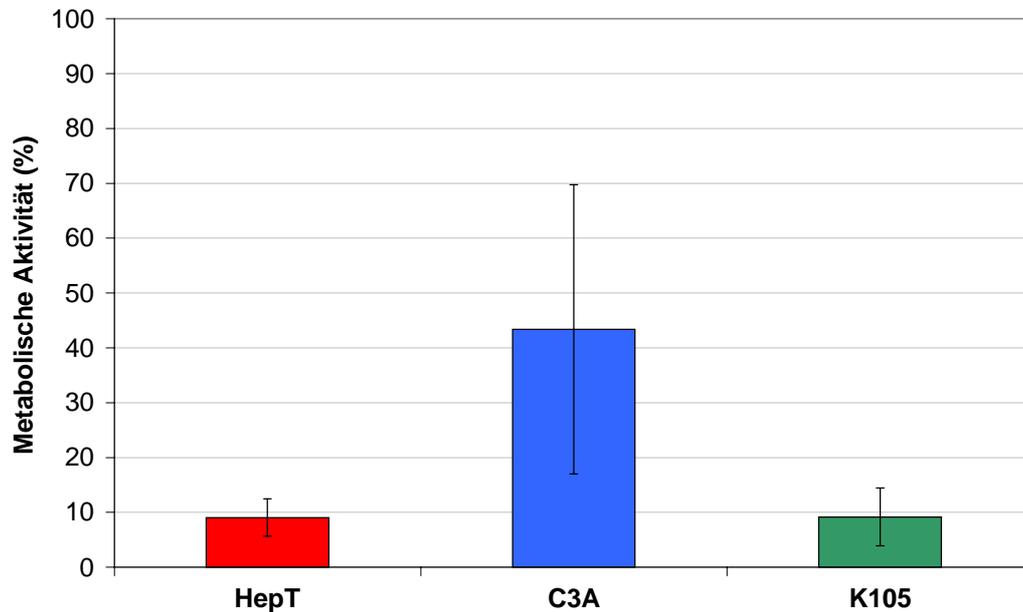


Abb. 5.31: Metabolische Restaktivität von HepT, C3A und K105 während der T-Flaschenlagerung bei Raumtemperatur in Relation zur metabolischen Aktivität der Zellen während der Kultivierung in T-Flaschen unter Normbedingungen. Grundlage zur Berechnung der hier dargestellten Werte waren die spezifischen metabolischen Umsatzraten (q_{Gluc} , q_{Lac} , $q_{\text{NH}_4^+}$ und q_{AS}) aller gemessenen Substrate und Produkte mit Ausnahme der im Text herausgestellten metabolischen Besonderheiten (z.B. Lactatverbrauch und Serinproduktion).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das Ziel einer Reduktion des Metabolismus durch eine Temperaturerniedrigung von 37°C auf Raumtemperatur in dieser Versuchsanordnung erreicht wurde. Allerdings ist für eine Lagerungsdauer von mehr als einer Woche ein Austausch des Konservierungsmediums erforderlich, da ansonsten durch den Reststoffwechsel bedingte Limitierungen auftreten.

Zwar wurde der pH-Wert während des gesamten Versuchszeitraums auf einem konstanten physiologischen Wert gehalten, doch können über die Sauerstoffverhältnisse in den Kulturüberständen zu den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten keine exakten Aussagen gemacht werden. Aus den zeitlichen Änderungen der Glucose- und Lactatkonzentration wurden die spezifischen Glucoseverbrauchs- bzw. Lactatproduktionsraten der Hepatocytelinien ermittelt. In einer direkten Massenbilanz gemäß dieser Werte wurde Glucose vollständig zu Lactat umgesetzt. Dies weist auf eine Sauerstofflimitierung der Kulturen hin, die eine vermehrte Milchsäuregärung verursacht hat. Da sogar mehr Lactat produziert wurde, als aus der Glucose hätte umgesetzt werden können, ist die Lactatproduktion neben dem Glucoseverbrauch durch eine Beteiligung des Verbrauchs glucogener Aminosäuren begründet.

In Relation zu Ergebnissen, die bei der Kryokonservierung primärer Hepatocyten erzielt wurden (siehe III.2.2.1), ist die hier vorgestellte Form der Niedrigtemperaturlagerung angesichts der hiermit verbundenen Verluste lebender Zellen über einen Zeitraum von 1-3 Wochen eine Alternative. Allerdings ist eine Strategie, die Hepatocyten nach Expansion zu einer für die Anwendung bioartifizieller Leberersatzsysteme erforderlichen Menge für eine anschließende Konservierung in Monolayern anzuordnen, kaum realisierbar.

2.2. Lagerung in T-Flaschen bei 4°C

Die grundlegende Versuchsanordnung entsprach derjenigen der T-Flaschen-Lagerung bei Raumtemperatur (siehe V.2.2). Nach Einstellung des physiologischen pH-Wertes im Brutschrank wurden die T-Flaschen bei geschlossenem Deckel in einem Kühlraum mit einer Umgebungstemperatur von 4°C aufbewahrt. Beginnend mit der ersten Flasche (Zeitpunkt t_0 = keine Lagerung) wurde nachfolgend pro Tag eine T-Flasche analysiert.

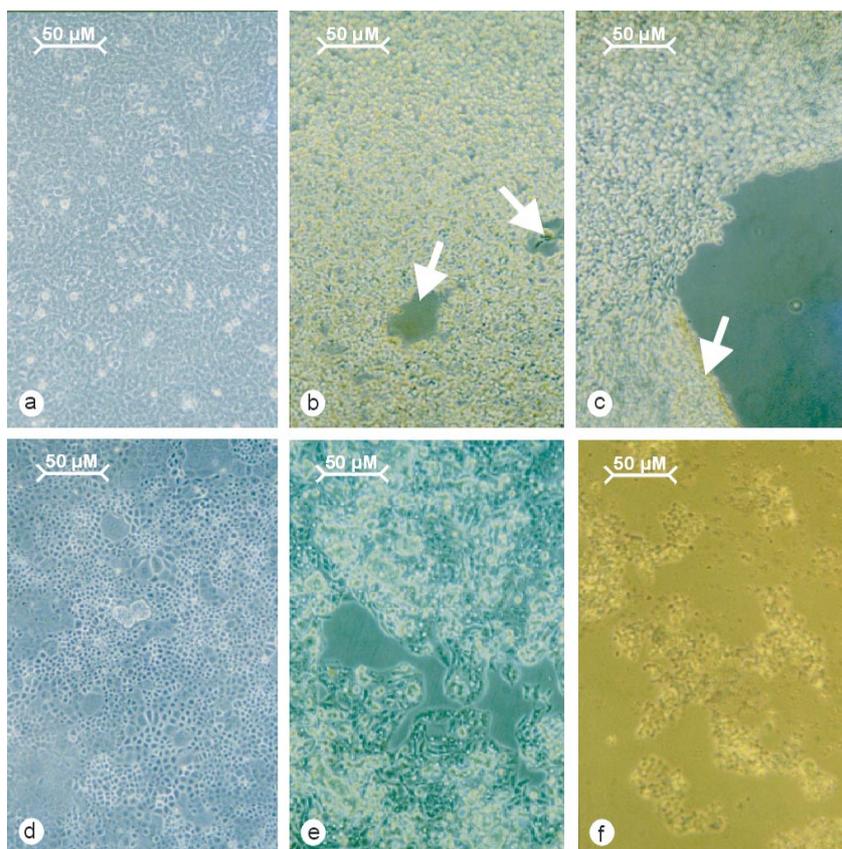


Abb. 5.32: Verlauf der Lagerung von HepT, C3A und K105 als Monolayer in 75 cm²-T-Flaschen bei 4°C (lichtmikroskopische Aufnahmen) **a:** HepT-Monolayer zu Beginn der Lagerung (t_0). **b:** HepT-Monolayer nach 24 Stunden bei 4°C. Die Pfeile markieren Läsionen im Zellrasen. **c:** HepT nach 48 Stunden bei 4°C. Der Pfeil markiert den umgeschlagenen Rand des sich von der Unterlage ablösenden Zellrasens. **d:** K105-Monolayer zu Beginn der Lagerung (t_0). **e:** C3A-Monolayer zu Beginn der Lagerung (t_0). **f:** K105-Monolayer nach 24 Stunden bei 4°C nach Entfernung der im Kulturüberstand flotierenden Zellen (ein entsprechendes Bild zu diesem Zeitpunkt zeigte sich auch bei C3A).

Nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden waren bei HepT deutlich morphologische Veränderungen zu erkennen. Die Zellen waren nicht mehr flach ausgespreitet, sondern nahmen eine kugelige Form ein. Durch diese Veränderung entstanden Läsionen im Monolayer (siehe Abb. 5.32.b). Ein Teil der Zellen flotierte zudem im Kulturüberstand. Diese Effekte verstärkten sich nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Zellen in großflächigen Matten den Kontakt mit der Unterlage verloren (siehe Abb. 5.32.b). Durch zusätzliches Schwenken des Kulturüberstands in den T-Flaschen ließen sich die Zellen nahezu komplett von der Unterlage ablösen. Die Auszählung der Zellen ergab in Relation zur Menge lebender Zellen im Ausgangsmonolayer (siehe Abb. 5.32.a) Verluste von 9,4% nach 24 Stunden und 19,4% nach 48 Stunden. Da das ursprüngliche Vorhaben, die Zellen in Form von konsistenten Monolayern zu konservieren, durch das Ablösen der Zellen nicht mehr beibehalten werden konnte, wurde der Versuch an dieser Stelle abgebrochen.

Noch drastischere Effekte waren bei HepT und K105 zu beobachten. Nach 24 Stunden Lagerungsdauer flotierte der überwiegende Teil der Zellen bereits im Kulturüberstand. Die Auszählung dieser Zellen ergab, daß sie zur Gänze abgestorben waren. Das gleiche gilt allerdings auch für die noch adhärenierten Zellen (siehe Abb. 5.32.f am Beispiel von K105), die nach Trypsin- und anschließender Trypanblaubehandlung ausgezählt wurden.

Die Lagerung der Hepatocytenlinien bei 4°C ist in dieser Anordnung offenkundig ungeeignet. Während bei HepT in erster Linie morphologische Veränderungen beobachtet werden konnten, führte bei C3A und K105 die Abkühlung auf 4°C zu einem unmittelbaren Absterben der Zellen. Das Abkugeln der Zellen, wie es bei HepT zu erkennen war, scheint ein allgemeingültiges Phänomen zu sein, wenn Zellen einer Umgebungstemperatur von 4°C ausgesetzt werden (FUJITA 1999, SERRAR et al. 1999). Ursächlich dafür ist offenbar ein Abbau des Cytoskeletts, der mit den Mikrotubuli beginnt und sich dann auf die Mikrofilamentstrukturen ausdehnt (WEISENBERG 1972, PORTER, TUCKER 1981). Das Absterben von Zellen bei 4°C erfolgt hauptsächlich durch Nekrose und weniger durch Apoptose. Für die Einleitung apoptotischer Vorgänge ist die Synthese eines spezifischen Proteins (engl. *apoptosis specific protein*, ASP) notwendig (GRAND et al. 1995). Bei 4°C ist jedoch jegliche Produktion makromolekularer Substanzen unterbunden (FUJITA 1999).

2.3 Lagerung in Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur

In dieser Versuchsanordnung wurden zunächst Monolayer der drei Hepatocytenlinien in 175 cm²-T-Flaschen unter Verwendung von Standardmedium erzeugt. Nach Trypsinierung der Zellen wurden diese in Standardmedium resuspendiert. Das Standardmedium wurde zuvor im Bioreaktor vorkonditioniert (37°C, pH 7,2, pO₂ = 95% SAT). In Portionen von 30 ml mit einer Menge von je $7 \cdot 10^7$ Zellen wurden die resuspendierten Hepatocyten in 15 parallele Zentrifugenröhrchen (V = 50 ml) pro Hepatocytenlinie überführt, d.h. in einem Röhrchen befand sich über der Zellsuspension eine Luftsäule von 20 ml. Die Lagerung der

in einem entsprechenden Ständer aufrecht stehenden und fest verschlossenen Zentrifugenröhrchen erfolgte analog zu den T-Flaschen auf einer Ablage im klimatisierten Zellabor.

Pro Tag wurde pro Hepatocytelinie ein Zentrifugenröhrchen analysiert. Dabei wurde zunächst der pH-Wert des Kulturüberstands bestimmt. Anschließend wurden die während der Lagerung zu einem lockeren Pellet absedimentierten Zellen mit Hilfe einer Pipette ($V = 20 \text{ ml}$) homogen resuspendiert. Es folgte eine Auszählung der Zellen nach Trypanblaufärbung im Hämocytometer bzw. mit Hilfe des CEDEX[®]-Systems. Ein weiterer Teil des Kulturüberstand wurde nach Zellabtrennung einer Analyse der metabolischen Parameter (Glucose, Lactat, NH_4^+ , LDH, Aminosäuren) unterzogen.

Zwar kann durch Auszählung der Zellen ermittelt werden, in welchem Umfang die Zellen eine bestimmte Lagerungsdauer überlebt haben, jedoch ist dadurch keine Aussage über den Vitalitätszustand möglich. Deshalb wurde als Maß des Vitalitätszustands quantitativ untersucht, wie hoch die Affinität der Hepatocyten nach einer bestimmten Lagerungsdauer ist, an eine Substratoberfläche zu adhären. Dieser Parameter erhielt die Bezeichnung *plating efficiency* (PE) und entspricht dem prozentualen Anteil adhärerter Zellen an der Gesamtzellmenge. Zur Bestimmung der PE wurden 25 ml des zellhaltigen Kulturüberstands pro Röhrchen in eine 175 cm^2 -T-Flasche ausplattiert und anschließend für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden zum einen die im Kulturüberstand verbliebenen Zellen und zum anderen (nach Trypsinierung) die an der Wachstumsoberfläche der T-Flasche adhärerten Zellen einer Auszählung im Hämocytometer bzw. CEDEX[®]-System zugeführt. Mit Hilfe der ermittelten Werte der ausplattierten Zellmenge und der Zahl adhärerter bzw. noch nicht adhärerter Zellen nach Inkubation konnte zudem die prozentuale Wiederfindungsrate (WFR) bestimmt werden. Die WFR war ein Maß für die Zählgenauigkeit bzw. gab Hinweise auf ein vermeintliches Absterben der Zellen durch die mit der Inkubation verbundene Rethermierung von der Lagerungstemperatur auf 37°C . In Vorversuchen hatte sich herausgestellt, daß bei C3A selbst ohne Lagerung nur ca. 20% der Zellen während der zweistündigen Inkubation adhärerten. Deshalb wurde bei dieser Hepatocytelinie die Inkubationszeit auf vier Stunden erhöht.

In dieser Versuchsanordnung nahm die Zahl der lebenden Zellen bei den drei Hepatocytelinien zunächst rascher ab, als bei der Lagerung in T-Flaschen unter den selben Temperaturverhältnissen (siehe Abb. 5.33). Innerhalb der ersten sieben Tage der Lagerung betrug der tägliche Verlust bei HepT 8,8% der Ausgangszellmenge (t_0). Bei C3A lag dieser Wert bei 7,8% und bei K105 wurde innerhalb dieses Zeitraums ein täglicher Verlust von 11,7% ermittelt. Im Vergleich zur entsprechenden T-Flaschen-Lagerung war die Absterberate hiermit 1,5-3mal höher. Im Verhältnis der Hepatocytelinien zueinander waren HepT und C3A auch hier widerstandsfähiger als K105. Nach einer Lagerungsdauer von etwa sieben Tagen verlangsamte sich die Abnahme lebender Zellen. Dennoch mußte im gleichen Versuchszeitraum von 14 Tagen bei der Lagerung in Zentrifugenröhrchen mit Werten von 81-97% bei allen Hepatocytelinien deutlich höhere Gesamtverluste hingenommen werden, als bei der Lagerung in T-Flaschen. Bei letzterer lagen die

Gesamtverluste bei 41-70%. Die Temperaturverhältnisse waren in dieser Versuchsanordnung mit 18,9-21,2°C ähnlich konstant wie bei der T-Flaschen-Lagerung.

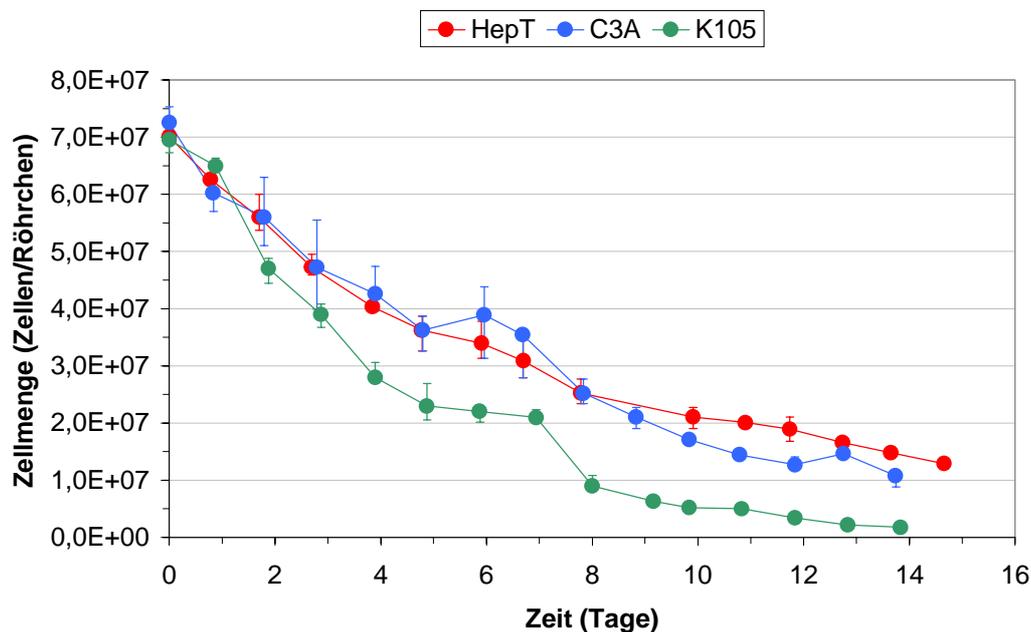


Abb. 5.33: Zeitliche Änderung der Menge lebender Zellen während der Lagerung von HepT, C3A und K105 in 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit vorkonditioniertem Standardmedium bei Raumtemperatur.

Während der Lagerung konnte ein zunehmender Farbumschlag des phenolrothaltigen Kulturüberstands im oberen Drittel der Zentrifugenröhrchen von orange nach rot beobachtet werden. Dieser kam durch einen CO_2 -Konzentrationsausgleich zwischen der Flüssig- und der darüber befindlichen unkonditionierten Gasphase zustande. Der damit verbundene CO_2 -Ausstrag aus dem Kulturüberstand führte zu einer zunehmenden Alkalisierung des Kulturüberstandes, die allerdings die auf den Boden des Zentrifugenröhrchens absedimentierten Zellen zu keinem Zeitpunkt der Datenaufnahme erreichte. Die Messung des pH-Wertes im oberen Drittel des Zentrifugenröhrchens ergab einen kontinuierlichen Anstieg von pH 7,2 auf pH 7,57 nach 14 Tagen. Eine zuverlässige Messung des pH-Wertes auf Höhe des Zellsediments war nicht möglich, da das tiefere Eintauchen der pH-Elektrode zu einer Durchmischung des Kulturüberstands führte.

Die Hepatocytelinien zeigten in dieser Versuchsanordnung die gleichen Besonderheiten im Metabolismus wie zuvor bei der T-Flaschenlagerung: Die murinen Zellen produzierten Serin und bei C3A wurde nach einer anfänglicher Lactatproduktion ein leichter Rückgang der Lactatkonzentration im Kulturüberstand ermittelt. Allerdings waren die spezifischen Metabolisierungsraten niedriger als bei der Lagerung in T-Flaschen, so daß keine der Kulturen zu irgendeinem Zeitpunkt der Lagerung bezüglich eines Substrats limitiert war (siehe Abb. 5.34). Eine mögliche Ursache hierfür war sicherlich die Anordnung der Zellen in Form eines Sediments. Die fehlende Durchmischung hat offenbar eine ausreichende Versorgung aller Zellen innerhalb eines Sediments verhindert, wodurch offensichtlich auch das raschere Absterben der Zellen begründet ist.

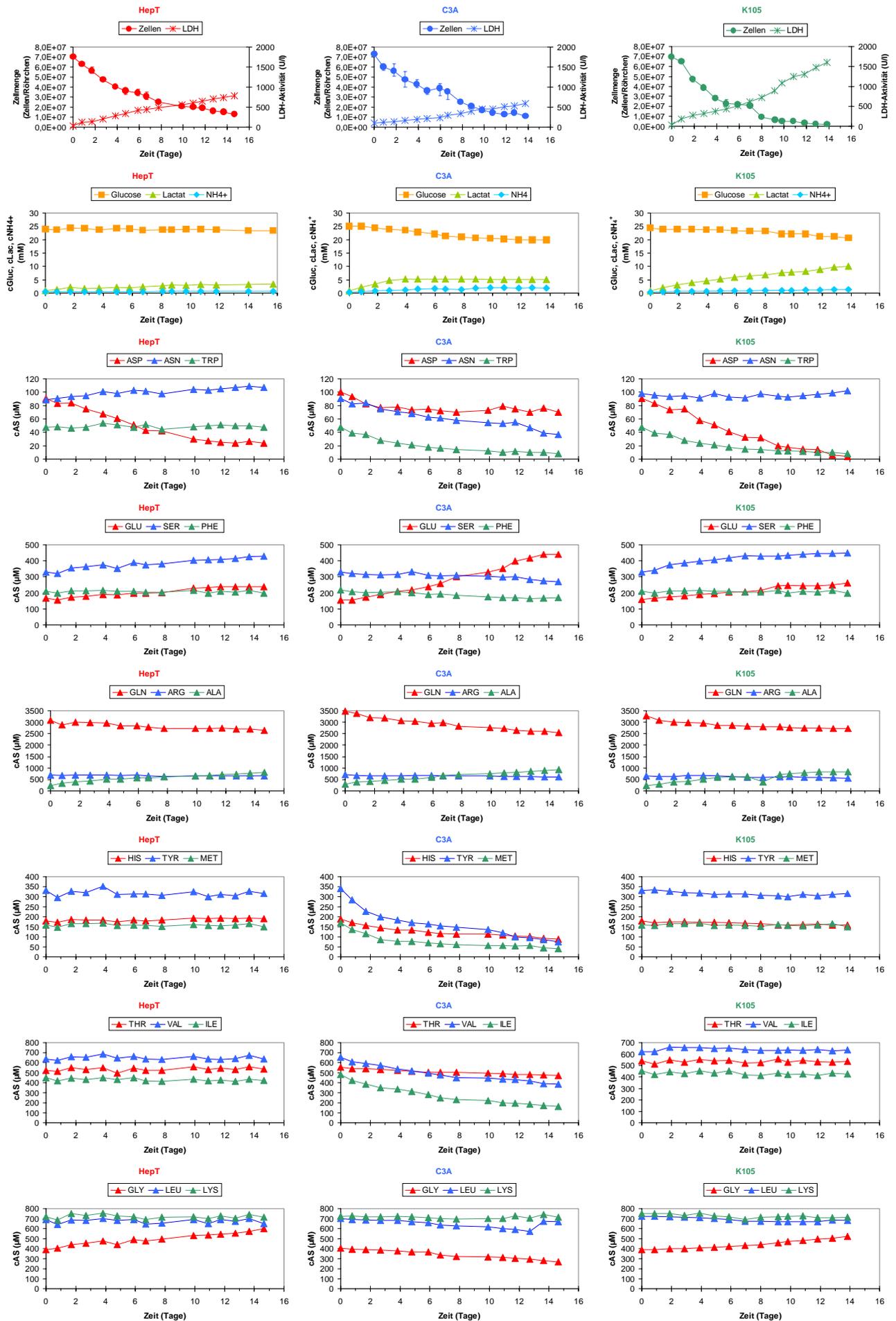


Abb. 5.34: Gesamtdarstellung der Parameter der Lagerung von HepT, C3A und K105 in Röhrcchen bei RT.

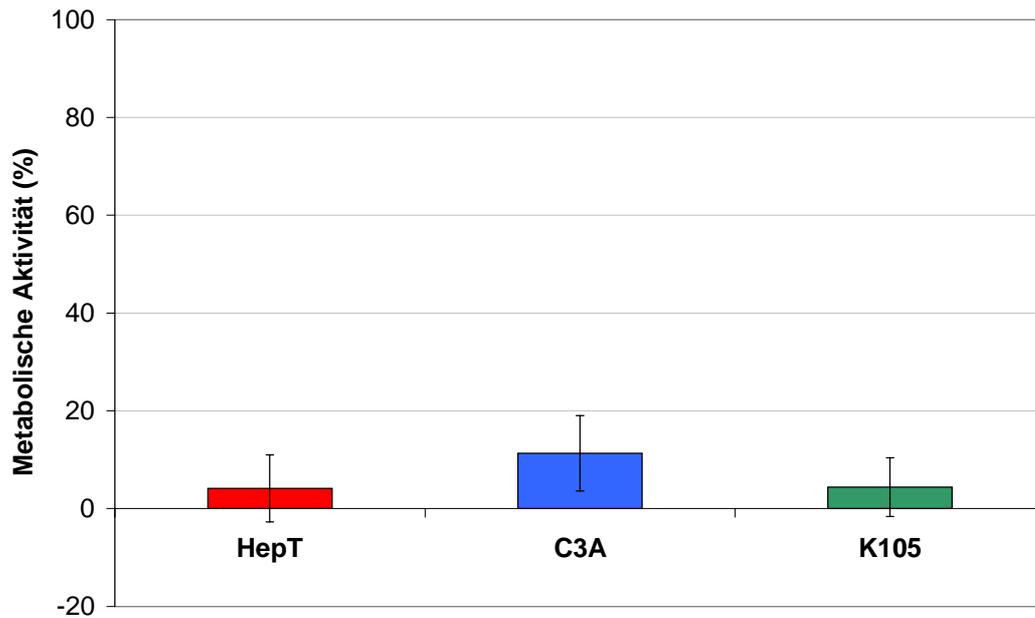


Abb. 5.35: Metabolische Restaktivität von HepT, C3A und K105 während der Lagerung in Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur in Relation zur metabolischen Aktivität der Zellen während der Kultivierung in T-Flaschen unter Normbedingungen. Grundlage zur Berechnung der hier dargestellten Werte waren die spezifischen metabolischen Umsatzraten (q_{Gluc} , q_{Lac} , $q_{\text{NH}_4^+}$ und q_{AS}) aller gemessenen Substrate und Produkte mit Ausnahme der im Text herausgestellten metabolischen Besonderheiten (z.B. Lactatverbrauch und Serinproduktion).

Die Bestimmung der Vitalität der Zellen nach Lagerung und Rethermierung anhand der *plating efficiency* ergab bei allen Hepatocytelinien einen deutlichen Rückgang der Adhäsionsaffinität bei einer Lagerungsdauer zwischen 0-3 Tagen (siehe Abb. 5.36)

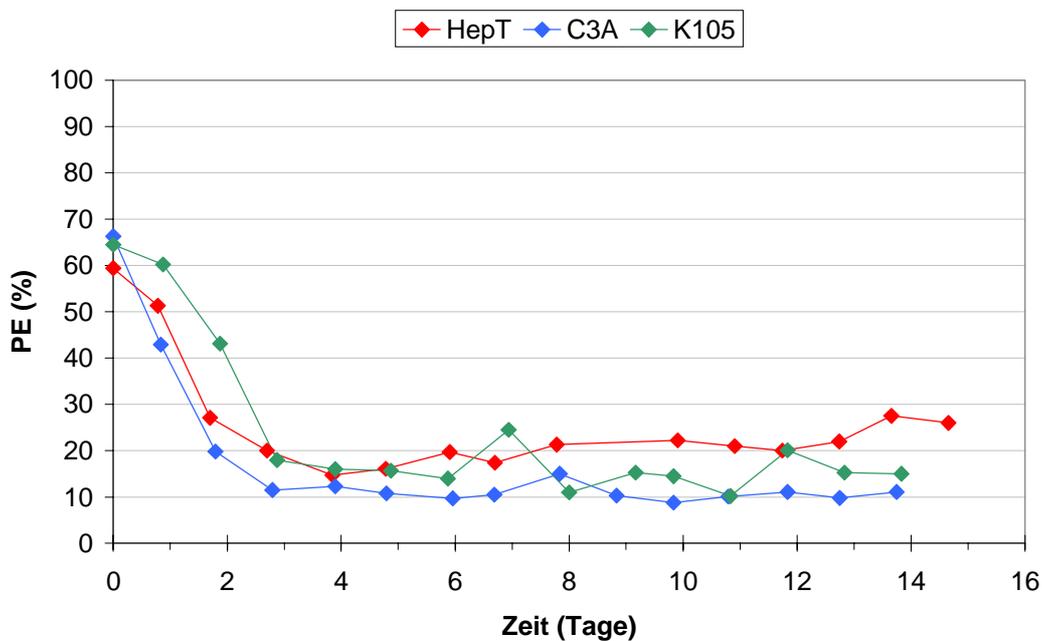


Abb. 5.36: Veränderung der *plating efficiency* (PE) nach Rethermierung in Abhängigkeit zur Lagerungsdauer von HepT, C3A und K105 in Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur.

Bei C3A war dieser Rückgang am stärksten ausgeprägt. Die PE fiel bei dieser Hepatocytelinie von anfänglich 66% auf 11%. Bei einem Lagerungszeitraum über 3 Tage hinaus stabilisierte sich die PE bei allen Hepatocytelinien, d.h. ein weiterer "Funktionsverlust" der Zellen konnte bei längerer Lagerungsdauer nicht festgestellt werden. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate (WFR) lag bei $94,7 \pm 3,1\%$, d.h. zu den während der Lagerung abgestorbenen Zellen kamen während der 2-4stündigen Rethermierungsphase kaum weitere hinzu.

2.4 Lagerung in Zentrifugenröhrchen bei 4°C

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie zuvor (siehe V.2.3). Die Zentrifugenröhrchen wurden in einem Kühlraum bei 4°C Umgebungstemperatur aufbewahrt.

Auch hier führte die Überführung von C3A und K105 in den Kühlraum sehr rasch zu einem Absterben der Zellen. Nach einer Lagerungsdauer von 20 Stunden (C3A) bzw. 22 Stunden (K105) waren nur noch 3% (C3A) bzw. 4,5% (K105) der Ausgangszellmenge viabel. Auf eine Funktionskontrolle anhand der *plating efficiency* wurde aufgrund dieser Ergebnisse bei diesen beiden Hepatocytelinien verzichtet und die weitere Lagerung abgebrochen. Bei HepT hingegen nahm die Zahl lebender Zellen zwar kontinuierlich, aber vergleichsweise nur geringfügig ab (siehe Abb. 5.37).

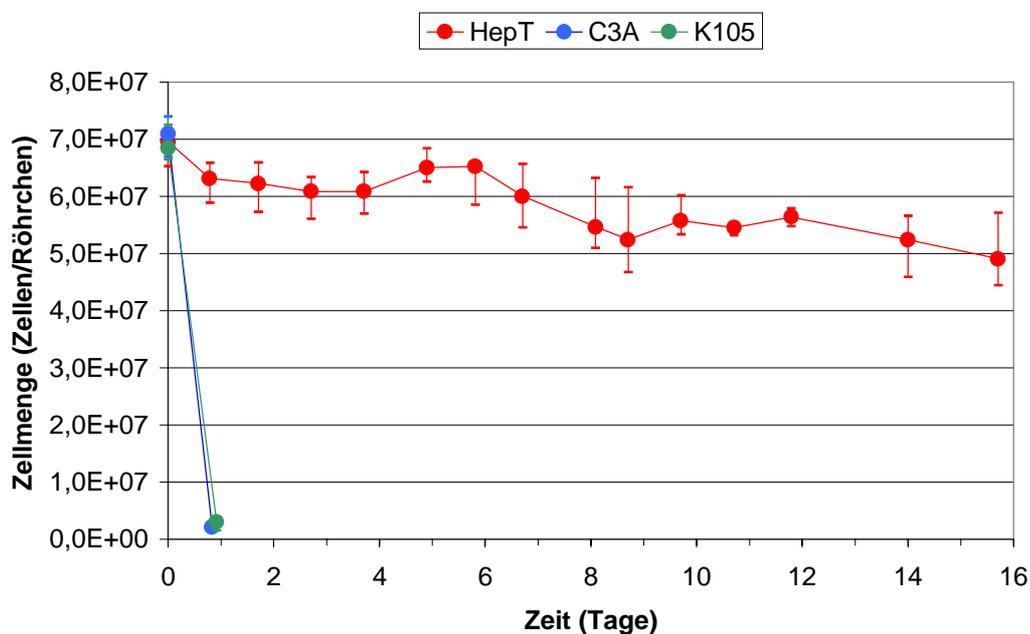


Abb. 5.37: Zeitliche Änderung der Menge lebender Zellen während der Lagerung von HepT, C3A und K105 in 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit vorkonditioniertem Standardmedium 4°C. Nach einem massiven Absterben der Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden wurde die Lagerung bei C3A und K105 abgebrochen.

Der Verlust lebender Zellen betrug bei HepT 1,6% pro Tag zur Ausgangszellmenge. Der Metabolismus der Zellen war in dieser Versuchsanordnung soweit gedrosselt, daß

Veränderungen in den Konzentrationen der metabolischen Parameter nicht eindeutig festgestellt werden konnten (siehe Abb. 5.38). Lediglich ein leichter Anstieg der Lactatkonzentration von anfänglich 1 mM auf schließlich 3,4 mM deutete auf eine vorhandene Restaktivität hin.

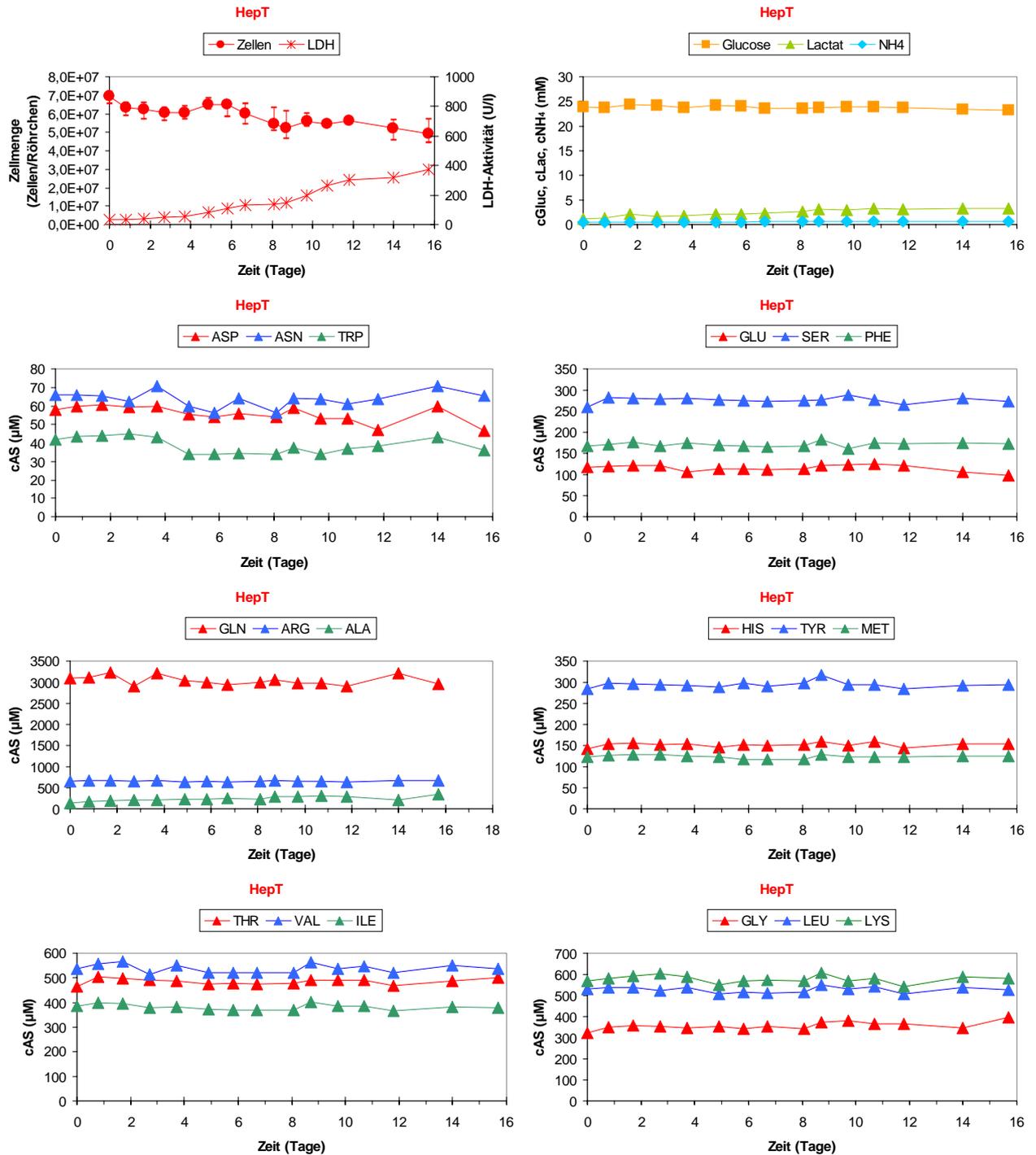


Abb. 5.38: Gesamtdarstellung der Parameter aus der Lagerung von HepT in Zentrifugenröhrchen bei 4°C.

Wie zuvor während der Lagerung in Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur, so war auch hier anhand des Farbumschlags des pH-Indikators von orange nach rot eine zunehmende Alkalisierung des Kulturüberstands im oberen Drittel der Zentrifugenröhrchen erkennbar.

Die Messung mittels pH-Elektrode ergab einen kontinuierlichen Anstieg von pH 7,2 auf schließlich pH 7,67. Dennoch waren auch hier die sedimentierten Zellen von dieser Alkalisierung zu keinem Zeitpunkt der Datenaufnahme betroffen.

Mit zunehmender Lagerungsdauer wurde für HepT ein kontinuierlicher Rückgang der *plating efficiency* ermittelt, der jedoch nicht so rasch verlief wie während der Lagerung bei Raumtemperatur (siehe Abb. 5.39)

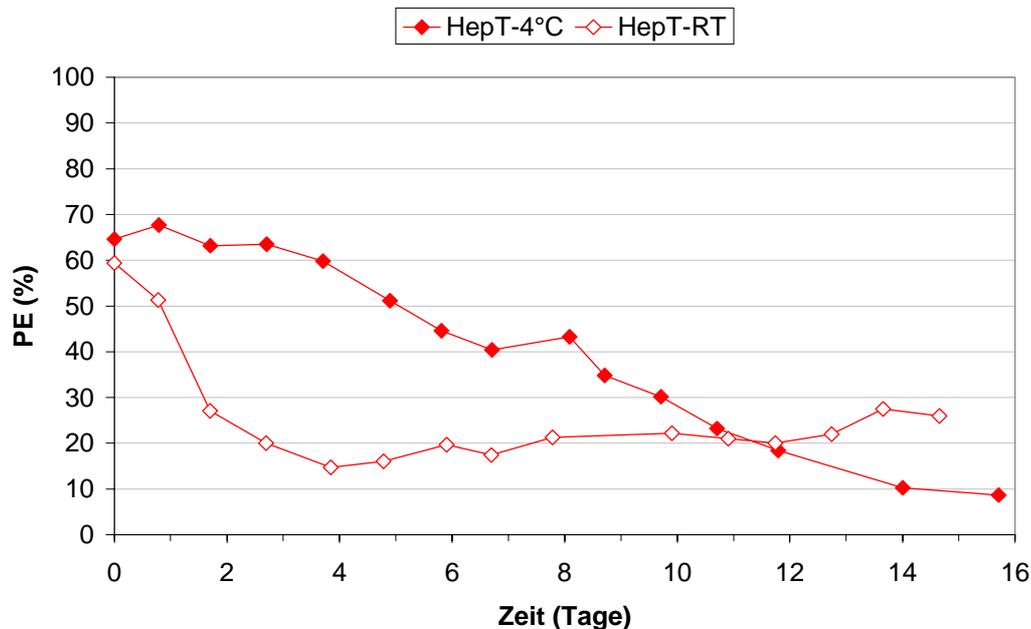


Abb. 5.39: Vergleich der Veränderung der *plating efficiency* (PE) nach Rethermierung in Abhängigkeit zur Lagerungsdauer von HepT in Zentrifugenröhrchen bei 4°C bzw. Raumtemperatur (RT).

Im Gegensatz zur Lagerung bei Raumtemperatur stabilisierte sich die PE nach einer Lagerung von HepT bei 4°C nicht auf einen konstanten Wert. Der "Funktionsverlust" setzte sich statt dessen unvermindert fort. Insgesamt war hier pro Tag der Lagerung ein Rückgang der PE von 4% zum Ausgangswert zu verzeichnen. Nach einer Lagerungsdauer von 12 Tagen wurde für HepT bei den beiden Temperaturbedingungen eine nahezu identische PE von 20% ermittelt. Die Wiederfindungsrate (WFR) lag in dieser Versuchsanordnung bei durchschnittlich $92 \pm 2,9\%$, d.h. die zweistündige Rethermierung der Zellen führte nur geringfügig zu einem weiteren Absterben von Zellen.

Das Ziel einer Reduktion des Metabolismus der Zellen wurde durch die hier gewählten Bedingungen erreicht. Ferner waren kaum Schädigungen durch eine nachfolgende Rethermierung zu verzeichnen, wenngleich die Vitalität der Zellen – ermittelt anhand der *plating efficiency* – mit zunehmender Dauer der Lagerung zumindest für den Beobachtungszeitraum von zwei Stunden zurückging. In Relation zur Kryokonservierung primärer Hepatocyten (siehe III 2.2.1) ist diese Form der Niedrigtemperaturlagerung unter Berücksichtigung der Verluste lebender Zellen über einen Zeitraum von bis zu 25 Tagen eine Alternative. Allerdings gilt dies nur für Hepatocyten mit den Lagerungseigenschaften von HepT. Das massive Absterben von C3A und K105 in dieser Versuchsanordnung macht deutlich, daß die Strategie zur Entwicklung von allgemeingültigen Konservierungsmethoden

anhand einer einzelnen Modellzelllinie nicht aufgeht. Die Konservierung muß statt dessen für jede Zelllinie evaluiert und individuell angepaßt werden.

2.5. Lagerung im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem

Die Kontrolle der physiologischen Parameter war während der Lagerung in den statischen Systemen (T-Flaschen, Zentrifugenröhrchen) nur bedingt möglich. Durch Vorkonditionierung des Standardmediums in Verbindung mit einer ausreichenden Kapazität des enthaltenen Bicarbonat-Puffersystems waren Veränderungen des pH-Wertes während der Lagerung nur geringfügig. Andernfalls sorgte bei der Lagerung in Zentrifugenröhrchen die Positionierung der Zellen dafür, daß diese durch eine Alkalisierung des Mediums nicht betroffen waren. Allerdings blieb in diesen Versuchsanordnungen die Bedeutung des Sauerstoffs für eine effektive hypothermische Lagerung der Hepatocyten unklar, da die O₂-Konzentration hier weder gemessen noch kontrolliert werden konnte.

Das Meß- und Regelsystem des bereits für die Expansion der Hepatocyten verwendeten Bioreaktorsystems erlaubt dagegen eine genaue Kontrolle und Modifikation des pH-Wertes und der Sauerstoffkonzentration. Deshalb wurde in diesem System untersucht, wie sich die Zellen bei erniedrigter Temperatur und konstantem physiologischen pH-Wert unter bestimmten Sauerstoffbedingungen verhalten bzw. ob sich das Absterben der Zellen durch modifizierte Sauerstoffverhältnisse verringern oder unterbinden läßt.

Wie sich in den statischen Systemen gezeigt hatte, ist die metabolische Aktivität der Hepatocyten während einer Lagerung bei Raumtemperatur gegenüber einer Kultivierung bei 37°C erniedrigt. Jedoch traten im Verlauf der Lagerungen Limitierungen einzelner Substrate auf, die bei einer längerfristigen Lagerung eine zusätzliche Versorgung der Zellen mit diesen Substraten notwendig macht. Zumindest bei HepT konnte gezeigt werden, daß eine weitere Reduktion der Umgebungstemperatur auf 4°C die metabolische Aktivität soweit erniedrigt, daß über Wochen hinweg mit keiner Substratlimitierung zu rechnen ist. Zudem war während der Lagerung von HepT in Zentrifugenröhrchen bei 4°C mit 1,6%/Tag die insgesamt geringste Absterberate zu verzeichnen. Aus diesen Gründen wurde im Bioreaktor ausschließlich die hypothermische Lagerung bei 4°C weiterverfolgt. Von besonderem Interesse war dabei auch, ob sich durch Modifizierung der Sauerstoffverhältnisse das bei C3A und K105 in statischen Systemen aufgetretene massive Absterben der Zellen verhindern läßt.

2.5.1 Effekt der Temperaturerniedrigung auf die pO₂-Elektrode

Die Einstellung einer exakten Sauerstoffkonzentration im Kulturüberstand durch das Regelungssystem des Bioreaktors ist unmittelbar abhängig von der Meßgenauigkeit der

pO₂-Elektrode. Deshalb wurde zunächst untersucht, welche Auswirkungen die Abkühlung des Bioreaktors auf die Meßgenauigkeit der pO₂-Elektrode hat.

Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser erhöht sich mit der Verringerung der Temperatur des Wassers. So beträgt die Sauerstoffsättigung bei einem Gesamtdruck der wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 760 mm Hg bei 4°C 13,13 mg/l, während bei 37°C nur maximal 6,87 mg/l gelöst werden können. Der resultierende Elektrodenstrom einer Sauerstoffelektrode nach Clark (pO₂-Elektrode) ist abhängig vom Sauerstoffpartialdruck (pO₂) und von der Löslichkeit des O₂ in der zugehörigen Membran, aber nicht von der veränderten O₂-Löslichkeit in der Meßlösung (z.B. Kulturüberstand). Um über einen mittels Clark-Elektrode gemessenen Sauerstoffpartialdruck eine Sauerstoffkonzentration zu berechnen, muß demnach die temperaturabhängige Veränderung der O₂-Löslichkeit berücksichtigt werden. Ferner kommt eine Meßabweichung hinzu, die durch den Temperaturkoeffizienten der gaspermeablen Membran der Elektrode bestimmt wird. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Clark-Elektroden der Fa. Ingold beträgt dieser Koeffizient ca. 3%/°C, der laut Hersteller durch einen eingebauten Termistor kompensiert wird.

Die Funktionsgenauigkeit des Termistors zweier pO₂-Elektroden (Nr. 1 und Nr. 2) wurde überprüft. Hierzu wurde jede Elektrode im 1-L-Bioreaktorsystem unter Verwendung von Standardmedium bei 37°C zunächst mit N₂ (pO₂ = 0% SAT) bzw. Luft (pO₂ = 100% SAT) geeicht (Volumenstrom: je 6 NI/h). Anschließend wurde der Reaktor kontinuierlich mit 2,4 NI/h Luft und 3,6 NI/ N₂ begast, wodurch sich ein konstanter pO₂ von 40% SAT (= 2,75 mg O₂/l) einstellte. Danach folgte mit Hilfe des am Bioreaktor angeschlossenen Kälte-Umwälzthermostaten eine Temperaturenniedrigung des Mediums von 37°C auf 4°C. Die Temperatur wurde durch eine im Bioreaktor eingebaute Temperatursonde kontrolliert.

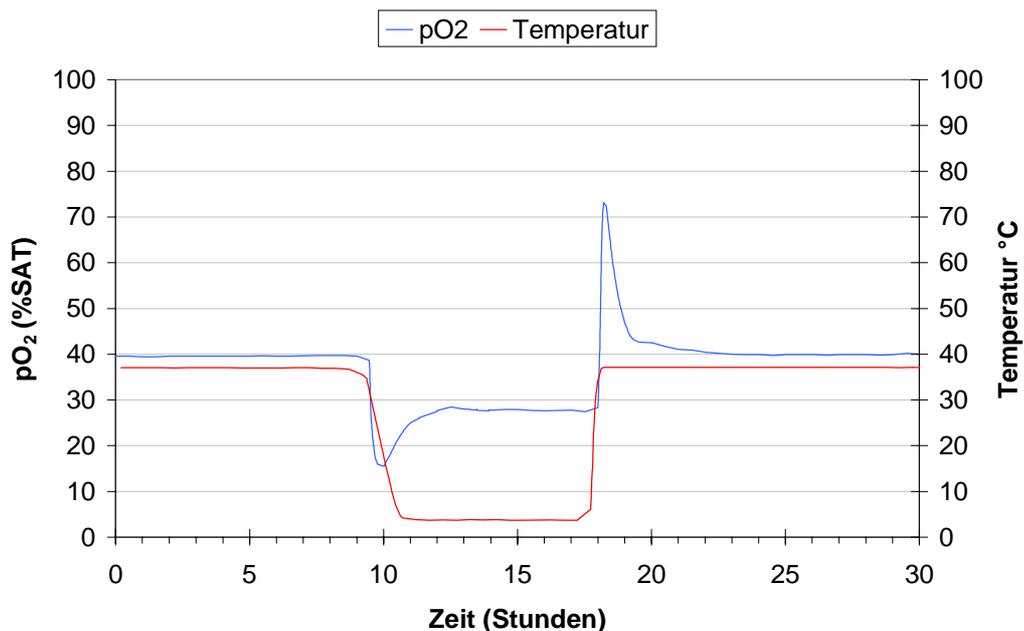


Abb. 5.40: Zeitliche Änderung der pO₂-Anzeige der bei 37°C geeichten pO₂-Elektrode Nr. 1 bei einer Temperaturenniedrigung von 37°C auf 4°C und einer nachfolgenden Rethermierung von 4°C auf 37°C im 1-L-Bioreaktorsystem unter Verwendung von Standardmedium als Meßlösung und einer konstanten Begasung von 2,4 NI/h Luft und 3,6 NI/h N₂.

Der Verlauf des mit der Temperaturveränderung durch eine der beiden Elektroden gemessenen pO_2 ist in Abb. 5.40 dargestellt. Für die Abkühlung des Bioreaktors benötigte der Thermostat drei Stunden. In dieser Zeit fiel die pO_2 -Anzeige zunächst rasch ab und stabilisierte sich dann etwa 4,5 Stunden nach Beginn der Abkühlung auf einen konstanten Wert. Dieser lag mit 28%SAT deutlich unter dem eigentlichen pO_2 von 40%SAT. Die Temperaturkompensation durch den eingebauten Termistor war demzufolge unzureichend. Demgegenüber zeigte die Elektrode eine gute Meßstabilität, da etwa fünf Stunden nach Beginn der Rethermierung des Reaktors auf 37°C, für die der Thermostat eine Stunde benötigte, der Ausgangswert von 40%SAT wieder erreicht wurde.

Die Systematik der temperaturabhängigen Meßabweichung der pO_2 -Elektroden wurde nach Erhalt dieses Ergebnisses in einem Temperaturbereich zwischen 4°C und 45°C und zwei unterschiedlichen Begasungsmodi untersucht. Ausgehend von 37°C wurde dazu zunächst nach Eichung der Elektroden ein pO_2 von 40%SAT (Luft/N₂ = 2,4/3,6 NI/h = Reihe 1) bzw. in einer weiteren Versuchsreihe ein pO_2 von 60%SAT (Luft/N₂ = 3,6/2,4 NI/h = Reihe 2) eingestellt. Danach folgte die Änderung der Temperatur auf die jeweilige Zieltemperatur.

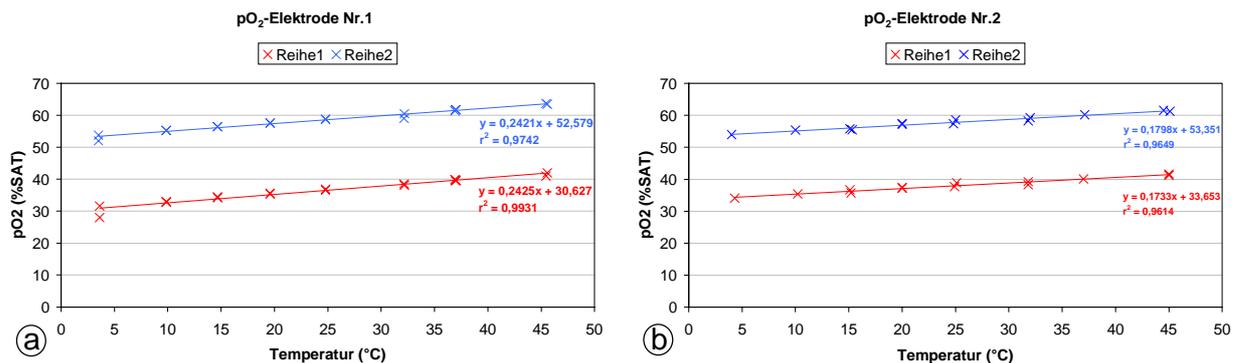


Abb 5.41: Temperaturabhängige Meßabweichung der verwendeten pO_2 -Elektroden. **a:** Meßabweichung der Elektrode Nr.1. **b:** Meßabweichung der Elektrode Nr. 2. Reihe 1: Luft/N₂ = 2,4/3,6 NI/h. Reihe 2: Luft/N₂ = 3,6/2,4 NI/h.

In beiden Versuchreihen korrelierte die Meßabweichung linear mit der Temperaturveränderung. Die Meßabweichung war demnach systematisch und unabhängig vom Begasungsmodus. So wurde für die pO_2 -Elektrode Nr. 1 eine konstante Meßabweichung von 0,24%/°C ermittelt (siehe Abb. 5.41.a). Bei der pO_2 -Elektrode Nr. 2 war diese Abweichung mit 0,17-0,18%/°C etwas niedriger (siehe Abb. 5.41.b).

Die Meßabweichungen der Elektroden wurden für die Erzeugung einer definierten Sauerstoffkonzentration bei erniedrigten Temperaturen berücksichtigt. Dazu mußte der pO_2 -Sollwert, der am pO_2 -Regler eingestellt wurde, an die Meßabweichung der jeweiligen Elektrode angepaßt werden. Die dazu notwendige Berechnung soll an einem Beispiel unter der bei 37°C kalibrierten pO_2 -Elektrode Nr. 1 verdeutlicht werden:

Ziel sei es, den Bioreaktor von 37°C auf 4°C abzukühlen und dabei eine Sauerstoffkonzentration von 2,75 mg/l zu erzeugen. Die Maximallöslichkeit von O₂ bei 4°C beträgt 13.13 mg/l, d.h. 2,75 mg/l entsprechen bei dieser Temperatur einem

Sauerstoffpartialdruck von $pO_2 = 20,9\%SAT$. Die Temperaturdifferenz beträgt im gewählten Beispiel $33^\circ C$. Gemäß der ermittelten Geradengleichung der Meßabweichung von pO_2 -Elektrode Nr.1 (siehe Abb. 5.42.a) führt diese Temperaturdifferenz zu einer pO_2 -Anzeige, die gegenüber dem eigentlichen Sauerstoffparitaldruck von $pO_2 = 20,9\%SAT$ um $8\%SAT$ verringert ist. Demnach muß ein pO_2 -Sollwert von $28,9\%SAT$ eingestellt werden, um eine Sauerstoffkonzentration von $2,75\text{ mg/l}$ zu erzeugen.

Die Berücksichtigung der temperaturabhängigen Meßabweichung der pO_2 -Elektrode ermöglichte die im Folgenden vorgestellte hypothermische Lagerung der Zellen unter definierten Sauerstoffbedingungen im geregelten Bioreaktorsystem. Allerdings bleibt festzuhalten, daß in einem Zeitraum von $4,5$ Stunden während der Abkühlung auf die Zieltemperatur bzw. fünf Stunden während der Rethermierung auf die Ausgangstemperatur aufgrund der Schwankungen in der Anzeige der pO_2 -Elektrode eine exakte Kontrolle der Sauerstoffkonzentration nicht möglich war. In diesen beiden Zeiträumen verändert sich zudem kontinuierlich die Menge gelösten Sauerstoffs und der jeweilige Sauerstoffbedarf der Zellen. Diese beiden Faktoren kommen neben den Schwankungen der pO_2 -Anzeige als weitere Störgrößen hinzu.

Veränderungen des pH-Wertes unter dem Einfluß von Temperaturänderungen konnten dagegen bei den verwendeten pH-Elektroden nicht festgestellt werden. Deshalb mußten für die pH-Regelung keine gesonderten Maßnahmen getroffen werden.

2.5.2 Allgemeine Vorgehensweise

Für die Untersuchungen der Lagerungsfähigkeit von HepT, C3A und K105 unter Niedrigtemperaturbedingungen und deren Verhalten nach Rethermierung im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem wurden die Hepatocyten zunächst unter Normbedingungen ($37^\circ C$, pH $7,2$, $pO_2 = 40\%SAT = 2,75\text{ mg O}_2/l$) zu Zellkonzentrationen expandiert, bei der die Aufrechterhaltung der physiologischen Sollwerte von pH und pO_2 durch die geregelte blasenfreie Begasung noch problemlos bewerkstelligt werden konnte. Die Expansion von HepT und K105 fand dabei unter Verwendung der CultiSpher[®] G-Microcarrier statt, währenddessen C3A durch Sphäroidkultivierung vermehrt wurde. Bei Erreichen einer Zellkonzentration von rund $3-4,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml folgte unter Rückhaltung der Zellen ein Mediumwechsel, bei der 90% des zellfreien Kulturüberstands durch frisches Medium ersetzt wurden. Gegebenenfalls waren Medienwechsel bereits während der Expansionsphase notwendig, um die Zellen ohne Substratlimitierungen zur entsprechenden Zellkonzentration vermehren zu können. Nachdem die physiologischen Sollwerte von pH und pO_2 durch die geregelte Begasung wieder erreicht waren, wurde der Bioreaktor auf die Zieltemperatur von $4^\circ C$ abgekühlt. Die Bedingungen des Abkühlvorgangs werden jeweils in den im Folgenden dargestellten Einzeluntersuchungen näher erläutert. Nach einer Lagerungsdauer von mehreren Tagen wurden die Hepatocyten auf die Normbedingungen (s.o.) rethermiert. Die

Rethermierung diente u.a. der erneuten Expansion der Zellen, der sich eine zweite und ggf. dritte Lagerungs- und Rethermierungsphase anschlossen.

2.5.3 Anoxische Lagerung bei 4°C

Nach Expansion der Hepatocyten, dem sich daran anschließenden Mediumwechsel und der Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen wurde zunächst der Sauerstoff aus dem Kulturüberstand entfernt, um bereits beim Abkühlvorgang für anoxische (d.h. sauerstofffreie) Bedingungen zu sorgen. Hierzu wurde die Begasung geändert. Unter Beibehaltung der pH-Regelung wurde die pO_2 -Regelung abgeschaltet und der Grundstrom auf $N_2 = 6$ NI/h umgestellt. Durch den Stickstoff- bzw. CO_2 -Strom und den Sauerstoffverbrauch der Hepatocyten fiel der pO_2 innerhalb von 15-20 Minuten auf 0%SAT. Nachfolgend wurde die Abkühlung auf 4°C eingeleitet. Der Verlauf einer Untersuchung zur Lagerungsfähigkeit von HepT unter diesen Bedingungen ist in Abb. 5.42 dargestellt.

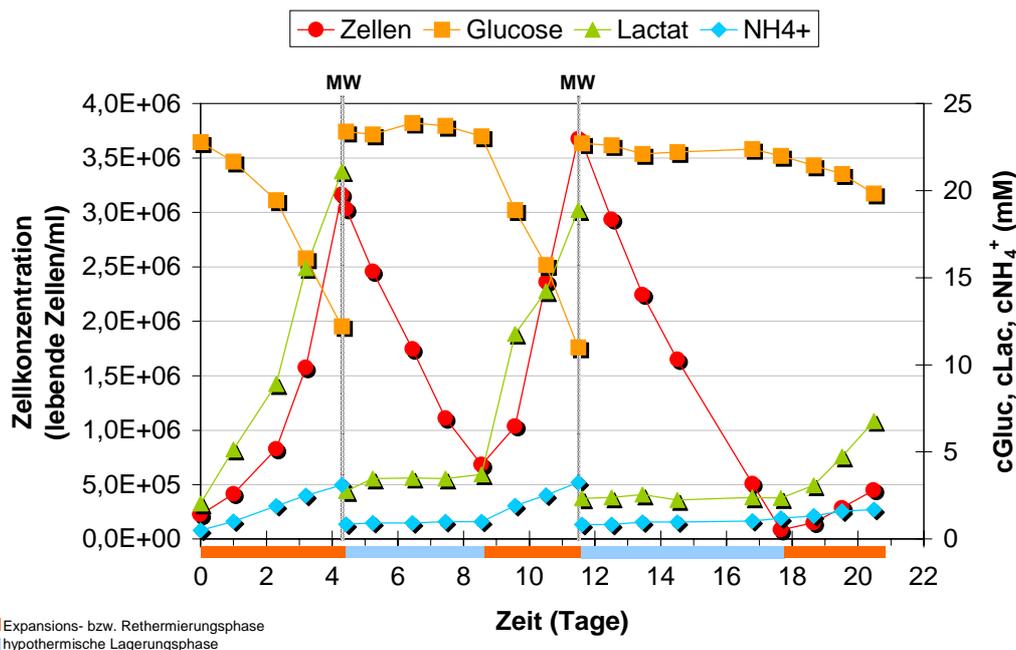


Abb. 5.42: Zeitlicher Verlauf einer Kultivierung von HepT zur anoxischen (sauerstofffreien) Lagerung bei 4°C im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem (MW = Zeitpunkt eines Mediumwechsels).

In der Expansionsphase wurden die Hepatocyten über 4,4 Tage zu einer Zellkonzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml vermehrt. Nach einem Mediumwechsel und der Abkühlung des Bioreaktors auf 4°C wurde HepT zwischen Tag 4,4 und Tag 8,6 anoxisch gelagert (erste hypothermische Lagerungsphase). In dieser Zeit nahm die Konzentration lebender Zellen kontinuierlich von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml ab.

Nach 8,6 Tagen folgte die Rethermierung auf 37°C. Mit dem Beginn der Rethermierung wurde die Begasung wieder auf den Modus während der Expansionsphase umgestellt (Luft/ $N_2 = 2,4/3,6$ NI/h) und gleichzeitig die pO_2 -Regelung wieder eingeschaltet, um nach

Erreichen einer Temperatur von 37°C eine physiologische Sauerstoffkonzentration von 2,75 mg/l (pO_2 -Sollwert = 40%SAT) zu erhalten. Die Zellkonzentration stieg in den 2,9 Tagen dieser ersten Rethermierungsphase auf $3,7 \cdot 10^6$ Zellen/ml an. Nach einem weiteren Mediumwechsel wurde nach insgesamt 11,6 Tagen die zweite hypothermische Lagerungsphase eingeleitet. Die Bedingungen entsprachen dabei denjenigen der ersten Lagerungsphase. Auch hier nahm die Konzentration lebender Zellen kontinuierlich ab und betrug nach insgesamt 17,7 Tagen $8,3 \cdot 10^4$ Zellen/ml. Durch die nachfolgende Rethermierung setzte die Proliferationsaktivität der Zellen wieder ein, bis schließlich nach 20,5 Tagen der Kultivierung eine Konzentration von $4,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml erreicht war.

Der Rückgang der Konzentration lebender Zellen war in beiden hypothermischen Lagerungsphasen nahezu identisch. Eine Selektion von Zellen, die besonders unempfindlich gegenüber einer anoxischen Temperaturniedrigung auf 4°C sind, hat demnach nicht stattgefunden. Die mittlere Absterberate von HepT lag bei $19,6 \pm 0,5\%$ zur Ausgangszellmenge (siehe Abb. 5.43.a) und damit deutlich höher als in Zentrifugenröhrchen. Da bei der Lagerung in den Zentrifugenröhrchen zumindest beim Abkühlvorgang Sauerstoff vorhanden war, ist folglich eine O_2 -Versorgung dieser Hepatocyten während des Abkühlvorgangs und/oder der hypothermischen Lagerungsphase notwendig. In T-Flaschen konnte gezeigt werden, daß bei HepT die Zellen eine kugelige Form einnahmen, wenn sie einer Umgebungstemperatur von 4°C ausgesetzt wurden. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß eine hierdurch verursachte Kontaktminderung der Zellen mit der Microcarriermatrix durch die im Bioreaktor auftretenden Scherkräfte zu einer Ablösung der Zellen von den Microcarriern geführt hat und hierdurch das Absterben der Zellen zusätzlich verstärkt wurde. In den Rethermierungsphasen nahm die Zellzahl mit spezifischen Wachstumsraten von $\mu = 0,4 \text{ d}^{-1}$ (erste Rethermierungsphase) bzw. $\mu = 0,49 \text{ d}^{-1}$ (zweite Wachstumsphase) zu. Die maximale spezifische Wachstumsrate bei der Kultivierung von HepT im Bioreaktor lag dagegen bei $\mu_{\max} = 0,8 \text{ d}^{-1}$, d.h. die Proliferationsaktivität der Zellen nach der Lagerung war um durchschnittlich $44,4 \pm 8\%$ herabgesetzt (siehe Abb. 5.43.b). Offenbar waren dies die Auswirkungen der Schädigung während der hypothermen Bedingungen.

Bei C3A und K105 ging die Konzentration lebender Zellen im Vergleich zu HepT wesentlich schneller zurück. Bei diesen Hepatocytelinien wurden Absterberaten von $86 \pm 4,3\%$ pro Tag (K105) bzw. $95,2 \pm 3,1\%$ pro Tag (C3A) ermittelt (siehe Abb. 5.43.a). Aufgrund dieser massiven Verluste lebender Zellen wurde bei C3A und K105 die Rethermierungen bereits nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden eingeleitet. Bei K105 zeigte sich trotz der hypothermalen Schädigung ein sehr schnelles Wiederanwachsen der Kultur. Die spezifischen Wachstumsraten in der Rethermierungsphase lagen bei $\mu = 0,85 \text{ d}^{-1}$ (erste Rethermierungsphase) und $\mu = 0,77 \text{ d}^{-1}$ (zweite Rethermierungsphase). Die maximale spezifische Wachstumsrate bei Kultivierungen von K105 im Bioreaktor unter Normbedingungen lag bei $\mu_{\max} = 0,4 \text{ d}^{-1}$, d.h. die Proliferationsaktivität der Zellen hatte sich infolge der Lagerung etwa verdoppelt. Bei C3A hingegen war die Proliferationsaktivität nach der anoxischen Hypothermie wie bei HepT herabgesetzt. Die anhand der Zunahme der

Konzentration lebender Zellen ermittelte spezifische Wachstumsrate lag bei $\mu = 0,37 \text{ d}^{-1}$ bzw. $0,35 \text{ d}^{-1}$. Dies entspricht 80,4% bzw. 76,1% der maximalen spezifischen Wachstumsrate von C3A bei Kultivierungen im Bioreaktor, die bei $\mu_{\text{max}} = 0,46 \text{ d}^{-1}$ lag (siehe Abb. 5.43.b). Aufgrund des massiven Absterbens von C3A und der insgesamt geringen Proliferationsaktivität war eine effektive Vermehrung dieser Zellen zur Ausgangskonzentration für eine zweite hypothermischen Lagerungsphase innerhalb einer einzelnen Kultivierung nicht möglich. Deshalb wurde bei dieser Hepatocytelinie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in voneinander unabhängigen Kultivierungen untersucht.

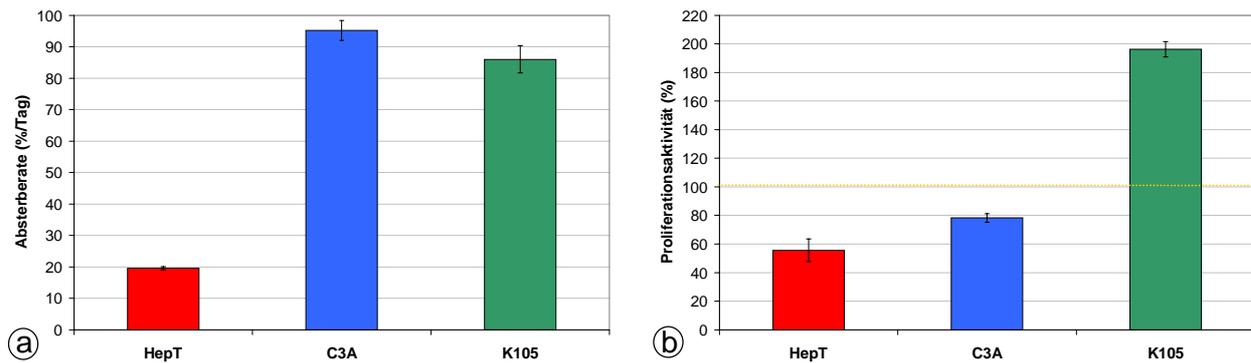


Abb. 5.43: Vergleich der Lagerungsfähigkeit und Reaktivierung von HepT, C3A und K105 bei der anoxischen (sauerstofffreien) Lagerung bei 4°C im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem. **a:** Vergleich der prozentualen Absterberate in Relation zur Ausgangszellmenge. **b:** Veränderung der Proliferationsaktivität infolge der Lagerung. Prozentuales Verhältnis der spezifischen Wachstumsrate während der Rethermierungsphase zur maximalen spezifischen Wachstumsrate unter Normbedingungen.

Auch bei der anoxischen Lagerung im Bioreaktor stellten sich die Unterschiede im Verhalten der Zellen aus den vorangegangenen Untersuchungen bei 4°C ein. C3A und K105 waren deutlich empfindlicher als HepT. Demgegenüber verlief die Reaktivierung von C3A und insbesondere K105 schneller als bei HepT. Besonders bemerkenswert ist, daß K105 offenbar einen Proliferationsstimulus durch die hier vorliegenden Lagerungsbedingungen erhielt. Allerdings wurde darauf verzichtet, zu untersuchen, ob dieser Stimulus dauerhaft erhalten blieb, oder nur ein unmittelbarer Effekt der hypothermischen Lagerung war.

2.5.4 Normoxische Lagerung bei 4°C

Nach der Expansion der Hepatocytin, dem sich daran anschließenden Mediumwechsel und der Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen wurde die Abkühlung auf 4°C eingeleitet. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde der $p\text{O}_2$ -Sollwert so eingestellt, daß nach Erreichen der Zieltemperatur von 4°C und Stabilisierung der $p\text{O}_2$ -Elektrode eine O_2 -Konzentration von 2,75 mg/l im Kulturüberstand vorlag. Diese O_2 -Konzentration entsprach genau derjenigen, die während der Expansion der Hepatocytin unter Normbedingungen eingehalten wurde.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß durch die Abkühlung der Sauerstoffbedarf der Zellen aufgrund der stark herabgesetzten metabolischen Aktivität soweit sank, daß bei

einem Grundstrom von Luft/N₂ = 2,4/3,6 NI/h mehr Sauerstoff eingetragen wurde, als die Zellen benötigten (OTR > OUR). Hierdurch stieg der pO₂ im Kulturüberstand über den pO₂-Sollwert. Da jedoch bei dem Bioreaktorsystem eine Regelung des pO₂ allein durch Sauerstoffeintrag stattfand, wurde mit dem Beginn der Abkühlung bezüglich des Grundstroms nur noch mit Stickstoff (N₂ = 6 NI/h) begast, dem zur Aufrechterhaltung der normoxischen O₂-Konzentration ein geregelter Sauerstoffstrom und zur pH-Regelung ein geregelter CO₂-Strom zugefügt wurde.

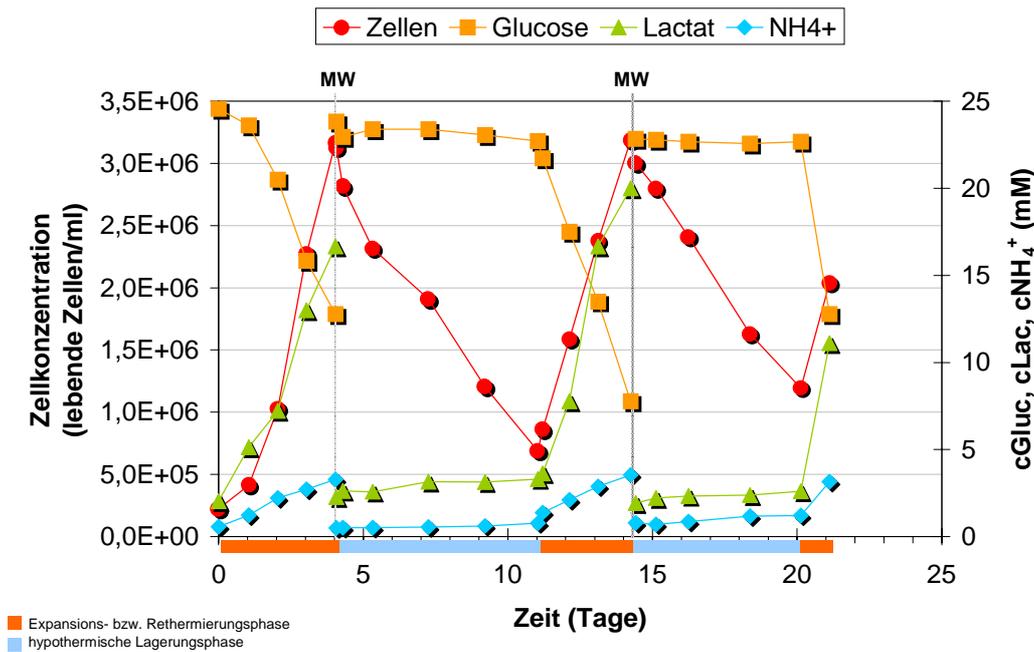


Abb. 5.44: Zeitlicher Verlauf einer Kultivierung von HepT zur normoxischen (physiologische O₂-Konzentration) Lagerung bei 4°C im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

In Abb. 5.44 ist der Verlauf einer Untersuchung von HepT unter diesen Bedingungen dargestellt. Die Konzentrationen lebender Zellen während der hypothermischen Lagerungsphasen nahm hier in ähnlicher Weise ab wie unter anoxischen Bedingungen. Die Absterberate war mit $11,1 \pm 0,2\%$ pro Tag zur Ausgangszellmenge allerdings deutlich geringer als bei der anoxischen Lagerung. Offenbar verlangsamt die Sauerstoffversorgung während der Abkühlung und/oder der nachfolgenden hypothermischen Lagerungsphase bei HepT das Absterben der Zellen.

Mit dem Beginn der jeweiligen Rethermierung auf 37°C wurde wieder mit dem ursprünglichen Grundstrom (Luft/N₂ = 2,4/3,6 NI/h) begast und der pO₂-Regler wieder auf einen Sollwert von 40%SAT eingestellt. In den Rethermierungsphasen war die Proliferationsaktivität der Zellen gegenüber der maximalen spezifischen Wachstumsrate in gleichem Maße herabgesetzt wie bei der anoxischen Lagerung. HepT proliferierte mit spezifischen Wachstumsrate von $\mu = 0,4 \text{ d}^{-1}$ (erste Rethermierungsphase) und $\mu = 0,52 \text{ d}^{-1}$ (zweite Rethermierungsphase). Die Sauerstoffversorgung während der hypothermischen Lagerungsphase hatte offenbar keinen Effekt auf die Reaktivierung der Zellen.

Bei C3A und K105 konnten hier im Vergleich zu den anoxischen Bedingungen bei der Lagerung und der Rethermierung nahezu keine Unterschiede festgestellt werden. Die Absterberate lag bei $87,3 \pm 5,8\%$ (K105) bzw. $93,8 \pm 4,9\%$ (C3A) (siehe Abb. 5.45.a). Die Sauerstoffversorgung hat demnach das massive Absterben dieser beiden Hepatocytelinien nicht verhindert. Mit spezifischen Wachstumsraten von $\mu = 0,8 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$ (K105) und $0,33 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ (K105) wurden ähnliche Werte erreicht wie bei der anoxischen Lagerung. Während bei K105 die Proliferationsaktivität infolge der hypothermischen Lagerung etwa doppelt so hoch war wie bei der Kontrollkultivierung unter Normbedingungen, sank die Aktivität von C3A auf einen Wert von durchschnittlich 71,7% (siehe Abb. 5.45.b).

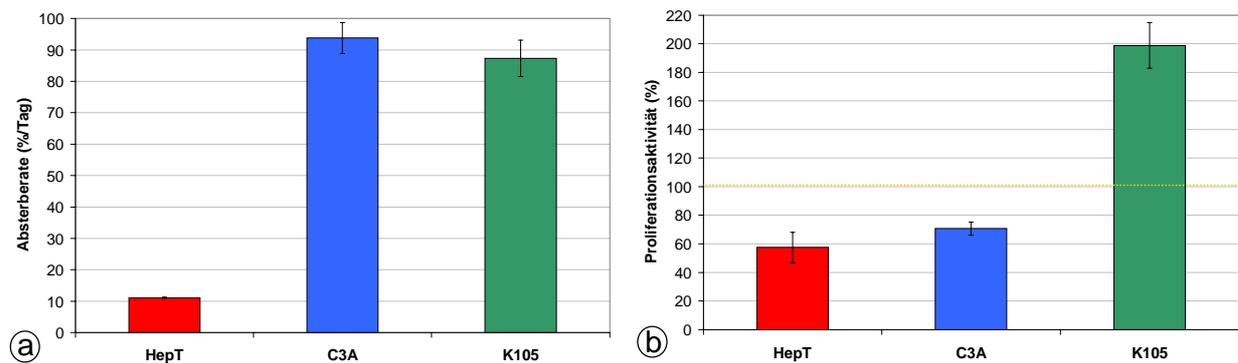


Abb. 5.45: Vergleich der Lagerungsfähigkeit und Reaktivierung von HepT, C3A und K105 bei der normoxischen ($cO_2 = 2,75 \text{ mg/l}$) Lagerung bei 4°C im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem. **a:** Vergleich der prozentualen Absterberate in Relation zur Ausgangszellmenge. **b:** Veränderung der Proliferationsaktivität infolge der Lagerung. Prozentuales Verhältnis der spezifischen Wachstumsrate während der Rethermierungsphase zur maximalen spezifischen Wachstumsrate unter Normbedingungen.

Während bei HepT durch die normoxische Sauerstoffversorgung das Absterben der Zellen gegenüber den Verhältnissen bei der anoxischen Hypothermie vermindert werden konnte, hatte der Sauerstoff bei C3A und K105 praktisch keinen Einfluß. Das massive Absterben dieser beiden Hepatocytelinien bei 4°C stellte sich auch hier ein. Bei der Reaktivierung der Hepatocyten in der Rethermierungsphase war weder bei HepT noch bei C3A oder K105 eine Veränderung durch das Vorhandensein von Sauerstoff während der vorherigen Lagerungsphase festzustellen: Während sich bei HepT und C3A gegenüber den Normbedingungen die Proliferationsaktivität verringerte, erfuhr K105 einen Proliferationsstimulus.

2.5.5 Hyperoxische Lagerung bei 4°C

In den beiden zuvor vorgestellten Untersuchungen hatte sich herausgestellt, daß zumindest bei HepT das Vorhandensein von Sauerstoff während der Abkühlung und/oder der Lagerungsphase das Absterben der Zellen reduziert. Dies warf die Frage auf, ob sich dieses Ergebnis durch eine weitere Erhöhung der Sauerstoffkonzentration verbessern ließ.

Deshalb wurde mit dem Beginn der Abkühlung auf 4°C der pO₂-Sollwert am Regler so eingestellt, daß nach Erreichen der Zieltemperatur eine Sauerstoffkonzentration von 8,76 mg/l vorlag. Dies entspricht dem 3,2fachen der Sauerstoffkonzentration unter normoxischen Bedingungen. Der Grundstrom von Luft/N₂ = 2,4/3,6 l/h wurde unter diesen Bedingungen beibehalten.

Wie aus Abb. 5.46 hervorgeht, führten diese Maßnahmen im Fall von HepT dazu, daß sich während der ersten 48 Stunden in den hypothermischen Lagerungsphase die Konzentration lebender Zellen praktisch nicht veränderte. Zu Beginn der zweiten Lagerungsphase ab Tag 14,9 war ein nur sehr geringer Rückgang von 3*10⁶ Zellen/ml auf 2,95 *10⁶ Zellen/ml zu beobachten. Nachfolgend nahm die Zellkonzentration jedoch rasch ab. Die mittlere Absterberate beider Lagerungsphasen lag bei 20,1 ±0,5% pro Tag zur jeweiligen Ausgangszellmenge. Damit starben die Zellen im weiteren Verlauf der hyperoxischen Hypothermie schneller ab als unter anoxischen und normoxischen Bedingungen.

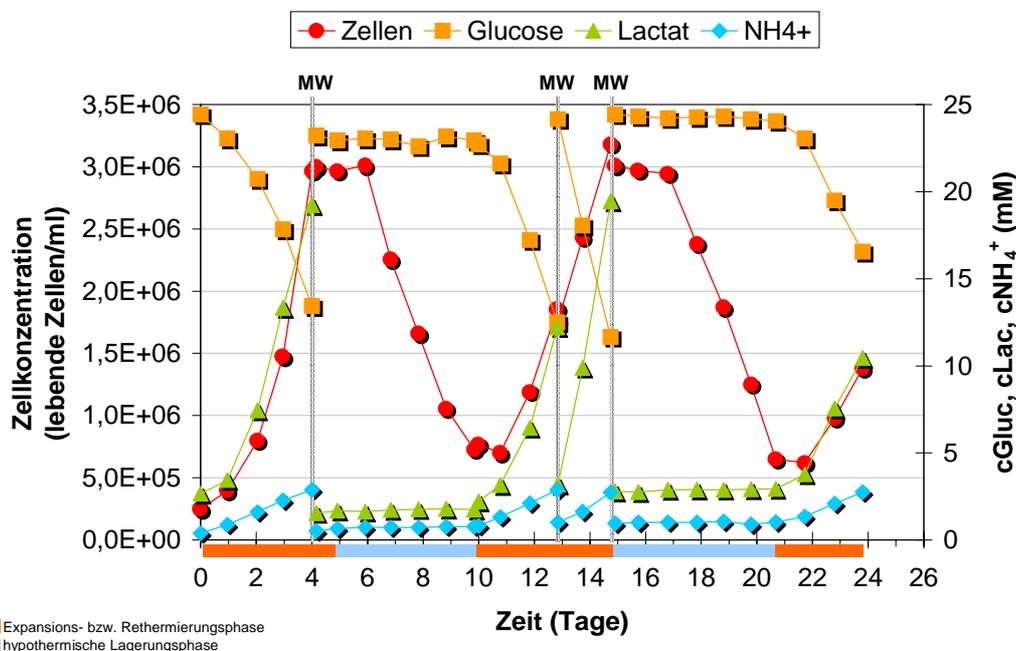


Abb. 5.46: Zeitlicher Verlauf einer Kultivierung von HepT zur hyperoxischen (sauerstoffreichen) Lagerung bei 4°C im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem (MW = Zeitpunkt eines Mediumwechsels).

Die Rethermierungen wurden hier in gleicher Weise eingeleitet, wie in den zuvor vorgestellten Untersuchungen zur hypothermischen Lagerung im Bioreaktor. Auch bei den Rethermierungen traten bei HepT Veränderungen auf. Ein unmittelbares Einsetzen der Proliferationsaktivität war nicht festzustellen. Stattdessen nahm die Zellkonzentration innerhalb der ersten 22,5 bzw. 25 Stunden der Rethermierung jeweils geringfügig ab. Erst danach stieg die Zellkonzentration mit einer spezifischen Wachstumsrate von $\mu = 0,34 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$, welches 42,5% der maximalen spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 0,8 \text{ d}^{-1}$ entspricht (siehe Abb. 5.47.b).

Bei C3A führten die hyperoxischen Bedingungen dazu, daß nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden bereits alle Zellen abgestorben waren. Die Schädigung der Zellen war demnach größer als unter anoxischen oder normoxischen Bedingungen. In einer weiteren Kultivierung waren nach einer Lagerungsdauer von 21 Stunden mit $6 \cdot 10^4$ Zellen/ml noch 2% der Ausgangskonzentration vor der Abkühlung von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml nachzuweisen. In der sich daran unmittelbar anschließenden Rethermierungsphase wurde kein weiteres Absterben der Zellen ermittelt. Statt dessen stieg die Zellkonzentration über einen Zeitraum von 2,1 Tagen auf $1,4 \cdot 10^5$ Zellen/ml an. Dies entspricht einer spezifischen Wachstumsrate von $0,37 \text{ d}^{-1}$. Damit lag die Proliferationsaktivität von C3A trotz der massiven Schädigung immer noch bei 80,4% der maximalen spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 0,46 \text{ d}^{-1}$ (siehe Abb. 5.47.b).

Bei K105 waren hier im Vergleich zu den anderen Lagerungsbedingungen praktisch keine Veränderungen feststellbar. Die mittlere Absterberate während der hyperoxischen Hypothermie lag bei $87 \pm 1,4\%$ zur Ausgangszellmenge vor der Abkühlung (siehe Abb. 5.47.a). Demgegenüber proliferierte K105 in den Rethermierungsphasen mit einer mittleren spezifischen Wachstumsrate von $0,79 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$, welches etwa dem Doppelten der maximalen spezifischen Wachstumsrate unter Normbedingungen von $\mu = 0,4 \text{ d}^{-1}$ entspricht (siehe Abb. 5.47.b).

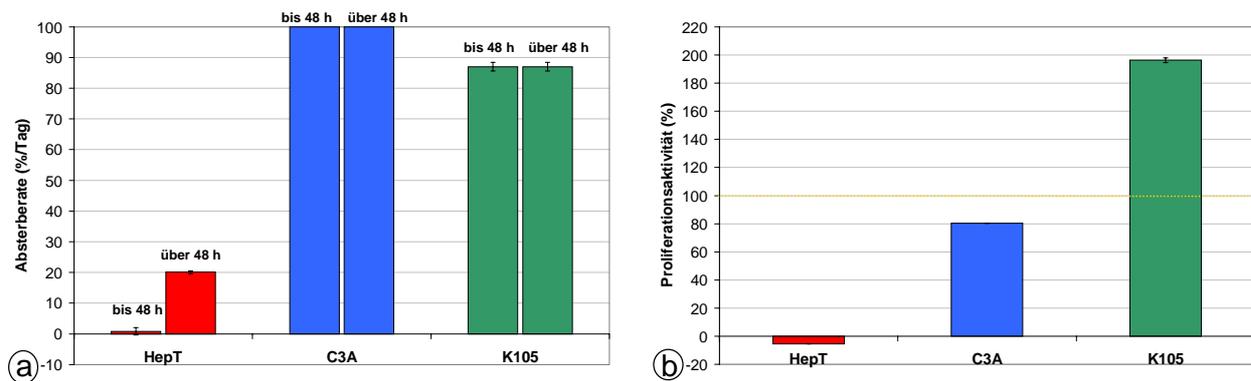


Abb. 5.47: Vergleich der Lagerungsfähigkeit und Reaktivierung von HepT, C3A und K105 bei der hyperoxischen (sauerstoffreichen) Lagerung bei 4°C im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem. **a:** Vergleich der prozentualen Absterberate in Relation zur Ausgangszellmenge. **b:** Veränderung der Proliferationsaktivität infolge der Lagerung. Prozentuales Verhältnis der spezifischen Wachstumsrate während der ersten 24 Stunden der Rethermierungsphase zur maximalen spezifischen Wachstumsrate unter Normbedingungen.

Durch die hohe Sauerstoffkonzentration konnte bei HepT das Absterben der Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden praktisch vollständig unterbunden werden. Demgegenüber starben die Zellen nachfolgend schneller ab, als während der anoxischen und hyperoxischen Lagerung. Zudem verhinderte die hohe Sauerstoffkonzentration während der hypothermischen Phase offenbar eine schnelle Reaktivierung der Zellen in den Rethermierungsphasen. Dieses Ergebnis ließ den Schluß zu, daß bei HepT hohe Sauerstoffkonzentrationen bei der Abkühlung förderlich für das Überleben der Zellen sind, dagegen während der Lagerungsphase eher Schädigungen bei den Zellen hervorrufen, die zudem eine Reaktivierung der überlebenden Zellen verzögern.

2.5.6 Modifiziert anoxische Lagerung bei 4°C

Ausgehend von den Ergebnissen der hyperoxischen Lagerung wurden Abkühlung und nachfolgende Lagerung unterschiedlich gestaltet. Mit dem Beginn der Abkühlung wurde der pO_2 -Sollwert auf die Bedingungen der hyperoxischen Lagerung eingestellt (siehe V.2.5.5). Hierdurch waren die Zellen während des Abkühlungsvorgangs einer hohen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt. Die genaue Konzentration konnte aufgrund der durch die Temperaturveränderung bedingten Schwankung der pO_2 -Elektrode nicht determiniert werden. Nach der dreistündigen Abkühlung des Bioreaktors auf 4°C erfolgte die Umstellung der Begasung, um den Sauerstoff aus dem Kulturüberstand zu entfernen. Dazu wurde die pO_2 -Regelung abgeschaltet und der Grundstrom von Luft/ N_2 = 2,4/3,6 NI/h auf N_2 = 6 NI/h umgestellt. Mit Hilfe des Stickstoffgrundstroms und des geregelten CO_2 -Eintrags wurde zudem der Kopfraum des Bioreaktors für 5 Minuten gespült. Hierdurch wurde der in der Gasphase über dem Kulturüberstand verbliebene Sauerstoff entfernt. Durch diese Maßnahmen sank der pO_2 innerhalb der ersten zwei Stunden der hypothermischen Lagerungsphase auf 0% SAT (anoxische Bedingungen).

Wie Abb. 5.48 zeigt, wurde durch die getroffenen Maßnahmen das Absterben von HepT nachhaltig reduziert. Die mittlere Absterberate in den beiden modifizierten hypothermischen Lagerungsphasen betrug $2,3 \pm 0,3\%$ pro Tag zur jeweiligen Ausgangszellmenge.

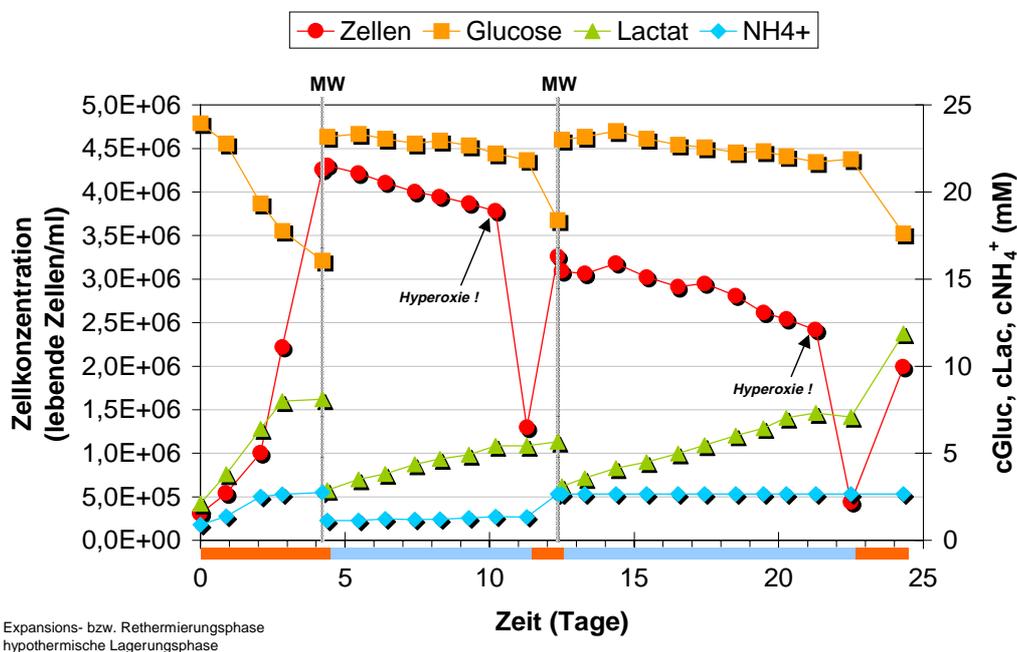


Abb. 5.48: Zeitlicher Verlauf einer Kultivierung zur modifiziert anoxischen Lagerung von HepT bei 4°C (MW = Zeitpunkt eines Mediumwechsels).

Am Tag 10,2 (erste Lagerungsphase) und Tag 21,3 (zweite Lagerungsphase) wurde durch Einschalten der pO_2 -Regelung der Sauerstoffgehalt des Kulturüberstands auf 8,76 mg/l erhöht (hyperoxische Bedingungen). Nachfolgend konnte jeweils eine rasche Abnahme der Konzentration lebender Zellen beobachtet werden. Dies beweist die cytotoxische Wirkung

des Sauerstoffs, wenn die Zellen längerfristig einer Umgebungstemperatur von 4°C ausgesetzt sind. Auffällig ist auch, daß trotz kurzzeitiger Hyperoxie die Zellen nach Einleitung der Rethermierung unmittelbar ihre Proliferationsaktivität wieder aufnahmen. Offenbar wird die Reaktivierung der Zellen erst nachhaltig gehemmt, wenn sie bei 4°C ebenfalls längerfristig einer hohen O₂-Konzentration ausgesetzt sind. Die mittlere spezifische Wachstumsrate lag hier nach nur kurzzeitiger Hyperoxie bei $\mu = 0,76 \pm 0,07 \text{ d}^{-1}$ und damit bei 95% der maximalen spezifischen Wachstumsrate unter den Normbedingungen der Bioreaktorkultivierung.

Bei keiner der vorangegangenen Lagerungsexperimenten im Bioreaktor konnte eine nennenswerte Stoffwechselaktivität bei HepT beobachtet werden. Um so bemerkenswerter ist, daß HepT während der modifiziert anoxischen Lagerung Lactat produzierte (siehe Abb. 5.48). Gleichzeitig konnte ein leichter Rückgang der Glucosekonzentration im Kulturüberstand ermittelt werden. Allerdings produzierte HepT mehr Lactat als aus dem Glucoseverbrauch hätte resultieren können. Die Analyse der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen ergab, daß HepT neben Glucose auch eine beträchtliche Menge bestimmter Aminosäuren verbrauchte (siehe Abb. 5.49). Somit resultierte die Lactatmenge offensichtlich insbesondere aus dem Verbrauch glucogener Aminosäuren.

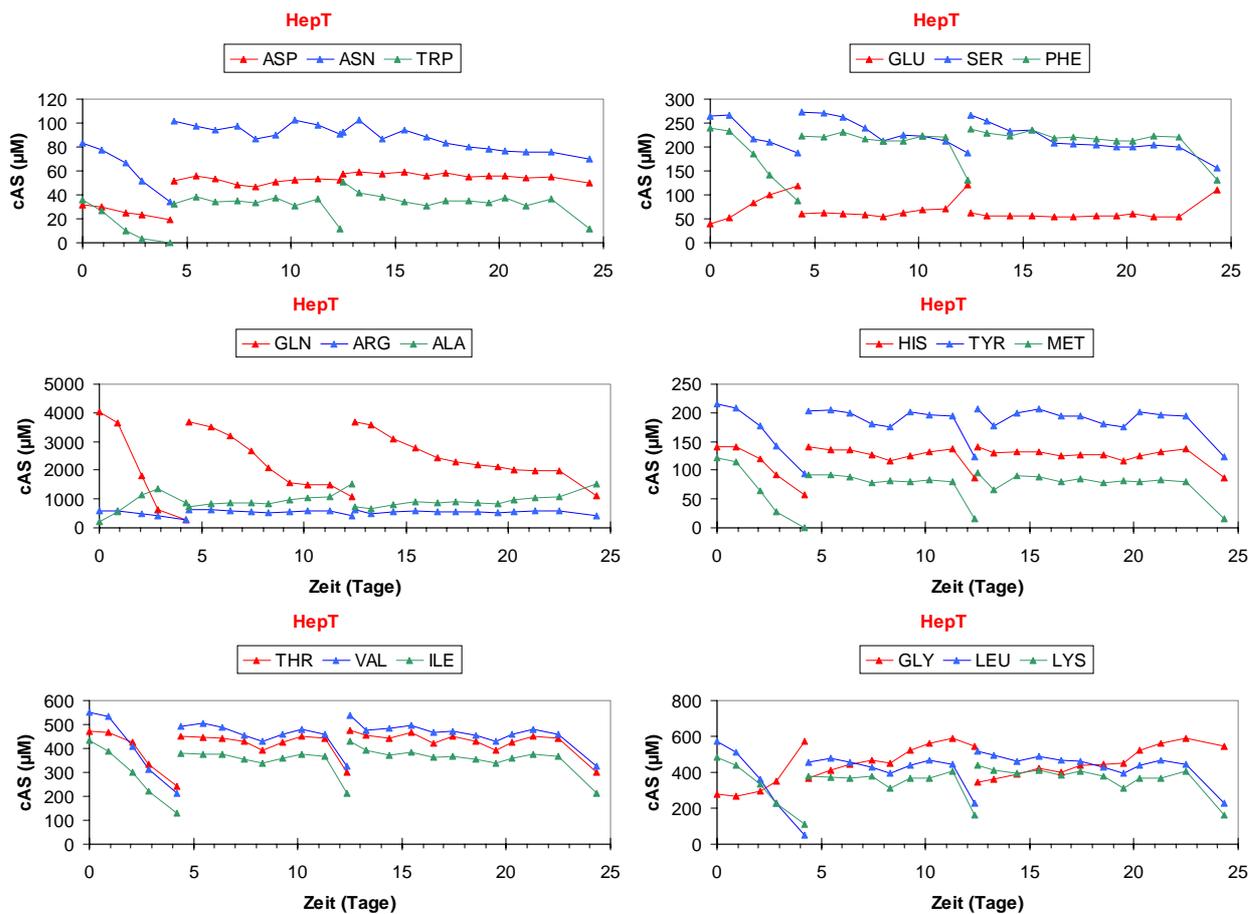


Abb. 5.49: Profile der zeitlichen Änderung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen bei der Kultivierung von HepT zur modifiziert anoxischen Lagerung bei 4°C.

Besonders auffällig war diesbezüglich der Verbrauch von Glutamin (GLN). Mit einer spezifischen Verbrauchsrate von $q_{\text{GLN}} = 59,5 \text{ nmol} \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})^{-1}$ erreichte HepT hier 7,8% der maximalen Glutaminverbrauchsrate unter den Normbedingungen der Bioreaktorkultivierung. Eine Restaktivität im Metabolismus von HepT war also selbst bei einer Umgebungstemperatur von 4°C noch vorhanden.

Bei C3A konnte durch die modifizierte anoxische Lagerung das massive Absterben der Zellen nicht verhindert werden. Sowohl die mittlere Absterberate von $94,1 \pm 2,9\%$ pro Tag (siehe Abb. 5.50.a) als auch die spezifische Wachstumsrate nach Rethermierung (ohne kurzfristige Hyperoxie!) von $\mu = 0,36 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ entsprachen den Werten, die bei der anoxischen Lagerung (siehe V.2.5.3) erreicht wurden.

Bei K105 hingegen wurde die Absterberate durch die modifizierte anoxische Lagerung auf einen Wert von $25,8 \pm 4,8\%$ pro Tag zur jeweiligen Ausgangszellmenge reduziert (siehe Abb. 5.50.a). Die durch die hypothermischen Bedingungen offensichtlich stimulierte Proliferationsaktivität blieb mit einer mittleren spezifischen Wachstumsrate von $0,78 \pm 0,07 \text{ d}^{-1}$ (ohne kurzfristige Hyperoxie!) erhalten (siehe Abb. 5.50.b).

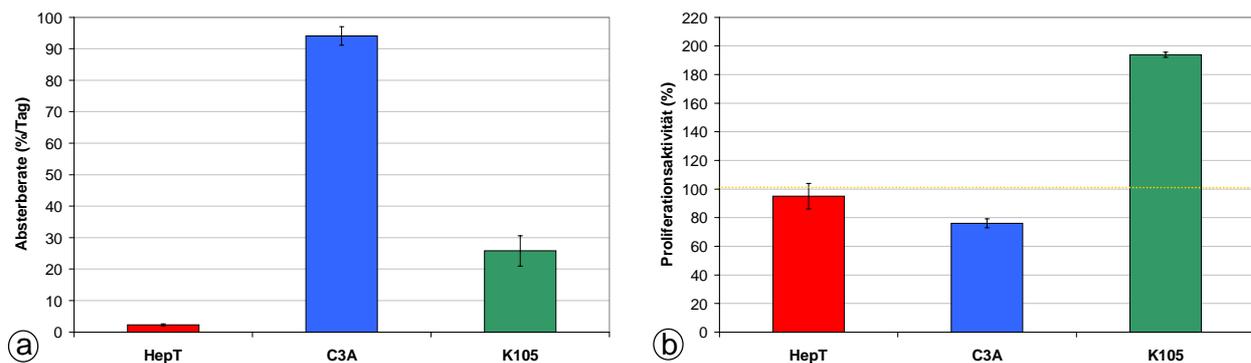


Abb. 5.50: Vergleich der Lagerungsfähigkeit und Reaktivierung von HepT, C3A und K105 bei der modifiziert anoxischen Lagerung (sauerstoffreiche Abkühlung, sauerstofffreie Lagerung) bei 4°C im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem. **a:** Vergleich der prozentualen Absterberate in Relation zur Ausgangszellmenge. **b:** Veränderung der Proliferationsaktivität infolge der Lagerung. Prozentuales Verhältnis der spezifischen Wachstumsrate während der Rethermierungsphase zur maximalen spezifischen Wachstumsrate unter Normbedingungen.

2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der hypothermischen Lagerung

Die Erniedrigung der Umgebungstemperatur führte bei allen verwendeten Hepatocytelinien zu einer erwünschten Reduktion des Metabolismus. Bei einer Temperatur von 19-21°C (Raumtemperatur) war die Restaktivität allerdings noch so hoch, daß innerhalb von einigen Tagen der Lagerung einzelne Substrate durch die Hepatocyten vollständig verbraucht waren. Im Fall von HepT konnte durch eine weitere Temperaturerniedrigung auf 4°C der Stoffwechsel der Zellen so weit gedrosselt werden, daß selbst nach Wochen keine Substratlimitierungen auftreten würden. Offenbar ist dies jedoch neben der Temperaturerniedrigung abhängig von weiteren Umgebungsparametern: Während im

statischen System (Zentrifugenröhrchen) bei HepT als Restaktivität nur noch eine geringe Lactatproduktion ermittelt werden konnte, zeigte die selbe Hepatocytelinie im gerührten System unter modifiziert anoxischen Bedingungen einen deutlich ausgeprägten Glucose-, Lactat- und Aminosäuremetabolismus. Hierdurch wären bei entsprechend längerfristiger Lagerung Eingriffe in das System erforderlich, um Schädigungen der Zellen insbesondere durch Substratlimitierungen zu vermeiden.

Aus den Ergebnissen von insgesamt 24 Kultivierungsexperimenten mit HepT, C3A und K105 stellte sich die modifiziert anoxische Lagerung bei 4°C als wirksamste Methode für ein längerfristiges Überleben der Zellen unter pH- und pO₂-kontrollierten Bedingungen heraus (siehe Tab. 5.1). Im Fall von HepT konnte hierdurch der Verlust lebender Zellen auf 2,3% pro Tag zur Ausgangszellmenge reduziert werden. Bei K105 wurde durch diese Maßnahme daß unter den anderen Bedingungen sehr rasche Absterben der Zellen mit Verlusten von über 80% pro Tag zur Ausgangszellmenge deutlich begrenzt. Die Verlustrate betrug hier allerdings immer noch fast 26% pro Tag zur Ausgangszellmenge. Bei C3A zeigten sich dagegen nahezu keine Unterschiede in Abhängigkeit zur jeweiligen Sauerstoffkonzentration. In jeder Versuchsanordnung führte bei dieser Hepatocytelinie die Abkühlung auf 4°C über 24 Stunden hinaus immer zu einem Totalverlust lebender Zellen.

Tab. 5.1: Prozentuale Absterberaten von HepT, C3A und K105 bei verschiedenen Sauerstoffverhältnissen während der hypothermischen Lagerung im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem.

	HepT	C3A	K105
anoxisch	19,6 ±0,5%	95,2 ±3,0%	86 ±4,3%
normoxisch	11,2 ±0,2%	93,8 ±4,9%	87,3 ±5,8%
hyperoxisch	bis 48 h: 0,8 ±1,2% über 48 h: 20,1 ±0,5%	100 ±0%	87 ±1,4%
modifiziert anoxisch	2,3 ±0,3%	94,1 ±2,9%	25,8 ±4,8%

VI. Zusammenfassung und Ausblick

1. Zusammenfassung

Das akute bzw. akut auf chronische Leberversagen ist eine äußerst schwerwiegende Erkrankung, dem bisher in der etablierten medizinischen Praxis nur mit dem Austausch des funktionsuntüchtigen gegen ein neues Organ begegnet werden kann. Da jedoch eine zunehmende Knappheit an geeigneten Spenderorganen besteht, wird weltweit intensiv nach therapeutischen Alternativen gesucht. Die vielversprechendste Maßnahme ist die temporäre Überbrückung der ausgefallenen Leber durch ein extrakorporales bioartifizielles Leberunterstützungssystem. Hierdurch kann das Überleben des Patienten bis zum Eintreffen eines Spenderorgans gesichert werden. Zudem besteht durch diese Therapie eine reelle Chance, daß sich die Leber des Patienten wieder erholt und so eine Transplantation vermieden werden kann. Die funktionelle Einheit dieser Systeme sind immobilisierte Hepatocyten, die bei der Perfusion des Systems mit dem Blut bzw. Plasma des Patienten die Funktionen des ausgefallenen Organs übernehmen. Xenogene (primäre) Hepatocyten scheidern als mögliche Zellressource aus, da mit ihrer Anwendung die Gefahr möglicher Zoonosen besteht und die Fremdartigkeit der Zellen und der durch sie sezernierten Proteine bei dauerhafter Exposition zu Immunreaktionen beim Patienten führt. Zudem verlieren sie *in vitro* rasch ihre leberspezifischen Funktionseigenschaften und zeigen kaum Proliferationsaktivität. Funktionsverluste und geringe Proliferationsneigung sind leider auch bei primäre humanen Hepatocyten zu verzeichnen, die *per se* die ideale Zellressource für bioartifizielle Leberunterstützungssysteme darstellen würden.

Um ausreichende Zellmengen zu erzeugen, ist daher die Entwicklung einer humanen Hepatocytenlinie erforderlich. Diese sollte einen nicht-malignen Phänotyp besitzen, dennoch eine hohe Teilungsfähigkeit aufweisen, dauerhaft ausdifferenziert bleiben und die gleichen synthetisierenden und detoxifizierenden Eigenschaften aufweisen wie die Hepatocyten *in vivo*. Dies war eines der Ziele im Verbundprojekt zwischen dem Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld und den Firmen DeveloGen, Göttingen und Hybrid Organ in Berlin, welches allerdings im Zeitrahmen des Projekts noch nicht umgesetzt werden konnte. Dennoch wurde beim Projektpartner DeveloGen mit der Entwicklung der murinen ELS-Hepatocytenlinie K105 ein neues Verfahren zur Immortalisierung primärer Hepatocyten etabliert. In Ermangelung alternativer Hepatocytenlinien wurden K105 sowie die SV 40 large T-Ag immortalisierte murine Hepatocytenlinie HepT und die bereits in einem bioartifiziellem Leberunterstützungssystem eingesetzte humane Hepatoblastomlinie C3A im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten als Modellzelllinien für die Entwicklung geeigneter Methoden zur Expansion, funktionellen Charakterisierung und kontinuierlichen Bereitstellung benutzt.

Für die funktionelle Charakterisierung der Hepatocyten wurden mit der Bestimmung der CH-, der ECOD und EROD-Aktivität drei Methoden etabliert, die eine zellspezifische Bewertung der leberspezifischen Funktionseigenschaften der verwendeten Hepatocytelinien zuließ. Es konnte gezeigt werden, daß die leberspezifischen Metabolisierungsleistungen weder von HepT, noch von K105 oder C3A an diejenigen primärer Hepatocyten heranreichen. Die nicht vorhandene CH-Aktivität aller drei Hepatocytelinien stach dabei besonders hervor. Die ECOD-Aktivität betrug maximal 7,5% der Aktivität primärer Hepatocyten, bei der EROD Aktivität wurden maximal 16,2% der Aktivität primärer Hepatocyten erreicht. Im Fall von C3A stellen diese und weitere Ergebnisse (STANGE et al. 1995, WANG et al. 1998) die Wirksamkeit dieser Zellen bei der Anwendung in bioartifiziellen Leberersatzsystemen ernsthaft in Frage.

Mit Hilfe der Microcarrier-Technik wurde eine Methode entwickelt, welche die Expansion von Hepatocyten zu Zellmengen für die Anwendung im bioartifiziellen Leberersatzsystem innerhalb eines ökonomisch vertretbaren Zeitraums ermöglicht. Gemäß der mit den Hepatocytelinien gewonnenen Daten dauert eine solche Expansion im 10-L-Maßstab inklusive der notwendigen Vorkulturen bei optimiertem Kulturmedium und verbesserter Gasver- und -entsorgung etwa 12-17 Tage. Im Fall von C3A konnte gezeigt werden, daß mit der Sphäroidkultivierung eine mögliche alternative Expansionsmöglichkeit besteht, bei der zudem die Kosten für die Anschaffung der Microcarrier und der zusätzliche Aufwand bei der Anwendung dieser Träger entfallen.

Aus den Ergebnissen zur kontinuierlichen Bereitstellung geht eindeutig hervor, daß die Entwicklung einer allgemeingültigen hypothermischen Konservierungsmethode mit Hilfe von Modellzelllinien, die dann auf beliebige andere Hepatocytelinien übertragen werden kann, nicht möglich ist. HepT, C3A und K105 verhielten sich untereinander je nach Versuchsanordnung sehr unterschiedlich. Bei HepT konnte das Absterben der Zellen durch eine modifiziert anoxische Lagerung im geregelten 1-L-Bioreaktorsystem auf Verluste von 2,3% pro Tag zur Ausgangszellmenge begrenzt werden. Danach wäre die modifiziert anoxische Lagerung der Zellen bei 4°C über einen Zeitraum von etwa 2-3 Wochen eine Alternative zur Kryokonservierung, wenn man beim Einfrieren und Wiederauftauen einen Gesamtverlust von bis zu 40% der Zellmenge primärer Hepatocyten als Berechnungsgrundlage annimmt (siehe MAGANTO et al. 1990). Nach der Rethermierung auf 37°C erreichte HepT 95% der maximalen Proliferationsaktivität der Kontrollkultivierung unter Normbedingungen, d.h. eine schnelle Reaktivierung der Zellen nach einer hypothermischen Lagerung wurde erreicht.

Während bei HepT das Überleben der Zellen unter hypothermischen Bedingungen durch die gesamte Bandbreite der Modifizierungen der Sauerstoffverhältnisse entscheidend beeinflußt wurde, konnte das massive Absterben von K105 lediglich unter modifiziert anoxischen Bedingungen erkennbar reduziert werden. Noch dramatischer war die Situation bei C3A. In keiner der gewählten Versuchsanordnungen wurde das Absterben der Zellen auch nur ansatzweise unterbunden. Offenbar führt bei dieser Hepatoblastomzelllinie eine

VII. Abkürzungsverzeichnis

Allgemein

A.	Arteria (lat.)
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bioartificial Liver (engl.)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CA	Kalifornien
ca.	circa (lat.)
CEDEX-System	Cell-Density-Examination-System
CHO	Chinese Hamster Ovarian
CYP	Cytochrom-P450-Enzym
DE	Delaware
Dr.	Doktor
EC	Enzyme Commission (engl.)
ELAD	Extracorporeal Liver Assist Device (engl.)
ELS	extended life span (engl.)
engl.	englisch
et al.	et alii (lat)
etc.	et cetera (lat.)
e.V.	eingetragener Verein
f.	folgend
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HAV	Hepatitis A-Virus
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HDV	Hepatitis D-Virus
HELLP	hemolysis, elevated enzymes, low platelet count (engl.)
KGW	Karlsruher Glaswerke
lat.	lateinisch
MA	Massachusetts
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
MC	Microcarrier
MELS	Modular Extracorporeal Liver System
MN	Minnesota
MW	Mediumwechsel

NL	Niederlande
No.	Number (engl.)
OTR	oxygen transfer rate (engl.)
OUR	oxyten uptake rate (engl.)
p.a.	pro analysis (lat.)
PE	plating efficiency (engl.)
PERV	porcine endogenous retrovirus (engl.)
pH	Wasserstoffionenkonzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (engl.)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SAT	Saturation
sog.	sogeananter, sogeanante, sogeananntes
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SV 40	Simian Virus 40 (engl.)
Tab.	Tabelle
Ts.	Taunus
UNOS	United Network for Organ Sharing
USA	United States of America (engl.)
V.	Vena (lat.)
VA	Virginia
vgl.	vergleiche
YSI	Yellow Springs Instruments
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Substanzen

3-MC	3-Methylcholantren
α -NF	α -Naphthoflavon
Ag ⁺	Silberkation
AgCl	Silberchlorid
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
β -NF	β -Naphthoflavon
Ca ²⁺	Calciumkation
Cl ⁻	Chloridanion
CH	Coumarin-Hydroxylase

CMF-PBS	calcium- and magnesiumfree, phosphate buffert saline (engl.)
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (engl.)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (engl.)
ECOD	Ethoxycoumarin- <i>o</i> -Deethylase
EROD	Ethoxyresorufin- <i>o</i> -Deethylase
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fetal Calf Serum (engl.)
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase(n)
Gluc	Glucose
H ⁺	Wasserstoffkation, Proton
HES	Hydroxyethylstärke
HGF	Hepatocyte Growth Factor (engl.)
H ₂	molekularer Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HTK	Histidin-Tryptophan- α -Ketoglutarat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
Lac	Lactat
LDH	Lactatdehydrogenase
MMF	Mycophenolat Mofetil
N ₂	molekularer Stickstoff
Na-...	Natrium-...
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NAD ⁺ +H ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ ⁺	Ammonium
O ₂	molekularer Sauerstoff
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
pRB	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonucleic Acid (engl.)
T-Ag	T-Antigen
TNF	Tumor Necrosis Factor (engl.)

UWS University of Wisconsin Solution (engl.)

Aminosäuren

ALA	Alanin
ARG	Arginin
ASN	Asparagin
ASP	Aspartat (Asparaginsäure)
CYS	Cystein
GLN	Glutamin
GLU	Glutamat (Glutaminsäure)
GLY	Glycin
HIS	Histidin
ILE	Isoleucin
LEU	Leucin
LYS	Lysin
MET	Methionin
PHE	Phenylalanin
PRO	Prolin
SER	Serin
THR	Threonin
TRP	Tryptophan
TYR	Tyrosin
VAL	Valin

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
kat	Katal
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L, l	Liter
M	molar
m ²	Quadratmeter

min	Minute(n)
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mM	millimolar
mOsmol	Milliosmol
mU	Milli-Units
mV	Millivolt
μg	Mykrogramm
μl	Mykroliter
μm	Mykrometer
μM	mykromolar
Nl	Normliter
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
pmol	Pikomol
rpm	revolutions per minute (engl.)
s	Sekunde(n)
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	volume/volume (engl.)
%	Prozent

Symbole

α	Bunsenkoeffizient
a	Löslichkeit
A	Kathodenoberfläche
b	Ordinatenschnittpunkt
c	Konzentration
c^*	Sauerstoffsättigungskonzentration
c_i	Konzentration einer Substanz i
c_L	Sauerstoffkonzentration in Lösung
c_M	molare Konzentration
c_P	Produktkonzentration
c_S	Substratkonzentration
d	Schichtdicke
D	Diffusionskoeffizient
ΔE	Extinktionsdifferenz
Δt	Meßdauer

ΔT_F	Gefrierpunktserniedrigung
e	Euler'sche Zahl
e^-	Elektron
ε	molarer Extinktionskoeffizient
F	Lösungsmittel
g	Erdbeschleunigung
H	Henry-Koeffizient
i	Diffusionsgeschwindigkeit
k_{La}	volumetrischer Übergangskoeffizient
K_s	Übertragungsbeiwert
λ	Wellenlänge
m	Graphensteigung
M_r	Molekulargewicht
μ	spezifische Wachstumsrate
n	Rührerdrehzahl
v	Reaktionsgeschwindigkeit
\varnothing	Durchmesser
p_i	Partialdruck eines Gases i
q_{O_2}	spezifische Sauerstoffverbrauchsrate
q_P	spezifische Produktbildungsrate
q_S	spezifische Substratbildungsrate
r	Pearson'scher Korrelationskoeffizient
R	Ohm'scher Widerstand
t	Zeit
t_d	Verdopplungszeit
T_D	Vorhaltezeit
T_i	Nachstellzeit
T_g	Ausgleichszeit
T_u	Verzugszeit
U_m	meßbare Spannung
U_P	Polarisationsspannung
V	Volumen
V_P	Verstärker
x	Zellkonzentration
X	Membrandicke
x_0	Startzellkonzentration
x_P	Proportionalitätsbereich
y	abhängige Variable
Y	Ausbeute
u	Luftvolumenstrom

VIII. Literaturverzeichnis

Abastado JP (1996)

Apoptosis: function and regulation of cell death.

Research in Immunology 147: 443-456

Aggarwal R, Krawczynski K (2000)

Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research.

Journal of Gastroenterology and Hepatology 15: 9-20

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1998)

Essential cell biology.

Garland Publishing, New York

Alfonso JL, Samrock R, Price P (1995)

Isolation and culture of hepatocytes.

*Focus*¹ 17: 6-9

Allan J (1997)

Silk purse or sow's ear.

Nature Medicine 3: 275-276

Aloia RC, Raison JK (1989)

Membrane function in mammalian hibernation.

Biochimica et Biophysica Acta 988: 123-146

Anderson GL, Johnson DJ (1993)

Splanchnic resuscitation: a strategy for preventing liver failure in sepsis.

New Horizons 1: 353-359

Amon E, Allen SR, Petrie RH, Belew JE (1991)

Acute fatty liver of pregnancy associated with preeclampsia: management of hepatic failure with postpartum liver transplantation.

American Journal of Perinatology 8: 278-279

Arii S, Monden K, Adachi Y, Zhang W, Higashitsuji H, Furutani M, Mise M, Fujita S, Nakamura T, Imamura M (1994)

Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver.

Transplantation 58: 1072-1077

¹ Wissenschaftsmagazin der Fa. Life Technologies (<http://www.invitrogen.com>)

Arii S, Imamura M (2000)

Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury.

Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery 7: 40-48

Ash SR, Blake DE, Carr DJ, Harker KD (1998)

Push-pull sorbent based pheresis for treatment of acute hepatic failure: the BioLogic-detoxifier/plasma filter System.

American Society of Artificial Internal Organs (ASAIO) Journal 44: 129-139

Bachmann S, Bechstein WO, Keck H, Lemmens HP, Brandes N, John AK, Lemasters JJ, Neuhaus P (1997)

Pilot study: Carolina Rinse Solution improves graft function after orthotopic liver transplantation in humans.

Transplantation Proceedings 29: 390-392

Bader A, Knop E, Boker K, Frühauf N, Schüttler W, Odhafer K, Burkhard R, Pichlmayer R, Sewing KF (1995)

A novel bioreactor design for in vitro reconstruction of in vivo liver characteristics.

Artificial Organs 19: 368-374

Baglin T (1998)

Management of warfarin (coumarin) overdose.

Blood Reviews 12: 91-98

Bailey JE, Ollis DF (1986)

Biochemical engineering fundamentals.

McGraw-Hill, New York

Bargmann W (1967)

Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.

6. Aufl., Georg Thieme, Stuttgart

Barnes D, Sato G. (1980)

Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.

Analytical Biochemistry 102: 255-270

Bell GH, Davidson JN, Emslie-Smith D (1972)

Textbook of Physiology & Biochemistry.

Churchill Livingstone, Edinburgh

Belzer FO, Southard JH (1988)

Principles of solid-organ preservation by cold storage.

Transplantation 45: 673-676

Bendre SV, Bavdekar AR, Bhawe SA, Pandit AN, Chitambar SD, Arankalle VA (1999)

Fulminant hepatic failure: etiology, viral markers and outcome.

Indian Pediatrics 36: 1107-1112

Berger J, Hart J, Millis M, Baker AL (2000)

Fulminant hepatic failure from heat stroke requiring liver transplantation.

Journal of Clinical Gastroenterology 30: 429-431

Berndtson AK, Chen TT (1994)

Two unique CYP1 genes are expressed in response to 3-methylcholanthrene treatment in rainbow trout.

Archives of Biochemistry and Biophysics 310: 187-195

Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP (1986)

Fulminant and subfulminant hepatic failure: definitions and causes.

Seminars in Liver Diseases 6: 97-106

Berry MN, Friend DS (1969)

High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study.

Journal of Cell Biology 43: 506-520

Bihari D, Hughes RD, Gimson AE, Langley PG, Ede RJ, Eder G, Williams R (1983)

Effects of serial resin hemoperfusion in fulminant hepatic failure.

International Journal of Artificial Organs 6: 299-302

Bock KW, Lipp HP, Bock-Hennig BS (1990)

Induction of drug metabolizing enzymes in xenobiotics.

Xenobiotica 20: 1101-1111

Böhme C (1993)

Untersuchungen zum Filtrationsverhalten von Perfusionmembranen im Bioreaktor.

Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Böker KHW, Manns MP (1998)

Akutes Leberversagen.

Der Internist 39: 442-452

Böker KHW (2001)

Akutes Leberversagen.
Der Internist 42: 545-563

Boiadjieva S, Hallberg C, Høgstrøm M, Busch C (1984)

Methods in laboratory investigation. Exclusion of trypan blue from microcarriers by endothelial cells: An in vitro barrier function test.
Laboratory Investigations 50: 239-246

Boyd E (1933)

Normal variability in weight of the adult human liver and spleen.
Archives of Pathology 16: 350

Brain G, Morris J, McLellan M (1990)

Cryopreservation and the maintenance of cell lines.
Trends in Biotechnology 8: 293-297

Bray GP, Harrison PM, O'Grady JG, Tredger JM, Williams R (1992)

Long-term anticonvulsant therapy worsens outcome in paracetamol-induced fulminant hepatic failure.
Human and Experimental Toxicology 11: 265-270

Broelsch CE, Emond JC, Whittington PF, Thistlewaite JR, Baker AL, Lichtor JL (1990)

Application of reduced size liver transplants, split grafts, auxiliary orthotopic grafts and living related segmental transplants.
Annals of Surgery 212: 368-375

Bucsis L (1995)

Analytik mit Biosensoren.
LaborPraxis (September 1995): 56-60

Büntemeyer H (1988)

Entwicklung eines Perfusionssystems zur kontinuierlichen Kultivierung tierischer Zellen in Suspension.
Dissertation, Universität Hannover

Büntemeyer H, Iding K, Lehmann J (1998)

The influence of pyroglutamic acid on the metabolism of animal cells.
Poster Abstracts, Cell Culture Engineering VI, Engineering Foundation, San Diego, USA: 4

Büntemeyer H (2000)

Off-line analysis in animal cell culture, methods.

In: Spier RE (ed.). Encyclopedia of cell technology. Vol. 2. Wiley, New York: 945-959

Burke MD, Murray GI, Lees GM (1983)

Fluorescence-microscopic measurement of intracellular cytochrome P-450 enzyme activity (ethoxyresorufin O-de-ethylation) in unfixed liver section.

Biochemical Journal 212: 15-24

Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT (1985)

Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxy-phenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450.

Biochemical Pharmacology 34: 3337-3345

Burnell JM, Dawborn JK, Epstein MD, Gutman RA, Leinbach GE, Thomas ED, Volwiler W (1967)

Acute hepatic coma treated by cross-circulation of exchange transfusion.

New England Journal of Medicine 276: 935-943

Burt (1999)

Pathobiology of hepatic stellate cells.

Journal of Gastroenterology 34: 299-304

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ (1991)

Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion.

Hepatology 13: 83-95

Calne RY (1979)

Immunosuppression for organ grafting - observations on cyclosporin A.

Immunological Reviews 46:113-124

Cantu-Crouch D, Howe WE, McCartney MD (1995)

Comparison of SEM processing methods for cultured human lens epithelial cells grown on flat and microcarrier bead substrates.

Microscopy Research and Technique 30: 419-426

Catapano G, De Bartolo L, Lombardi CP, Drioli E (1996)

The effect of catabolite concentration on the viability and functions of isolated rat hepatocytes.

International Journal of Artificial Organs 19: 245-250

Chalasan N, Gitlin N (1996)

Severe recurrent hepatic encephalopathy that responded to oral branched chain amino acids.
American Journal of Gastroenterology 91: 1266-1268

Chang TM (1990)

Biotechnological and medical applications based on immobilization of hepatocytes, microorganisms, or enzyme systems by microencapsulation in artificial cells.
Annals of the New York Academy of Science 613: 109-115

Chiang LC, Silnutzer J, Pipas JM, Barnes DW (1985)

Selection of transformed cells in serum-free media.
In Vitro Cellular Development Biology Animal 21: 707-712

Chmiel H (1991)

Bioprozeßtechnik 1.
UTB Gustav Fischer, Stuttgart

Cholerton S, Daly AK, Idle, JR (1992)

The role of individual human cytochrome P450 in drug metabolism and clinical response.
Trends in Pharmacological Science 13: 434-439

Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, Harland RC, McCann RL, Platt JL, Meyers WC (1994)

Brief report: treatment of hepatic failure with *ex vivo* pig-liver perfusion followed by liver transplantation.
New England Journal of Medicine 331: 234-237

Clegg JS, Seitz P, Seitz W, Hazlewood CF (1982)

Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis.
Cryobiology 19: 306-316

Cobbold RSC (1974)

Transducers for Biomedical Measurements.
Wiley, New York

Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI (1969)

Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage.
Lancet 2(7632): 1219-1222

Collins MK, Lopez Rivas A (1993)

The control of apoptosis in mammalian cells.
Trends in Biochemical Sciences 18: 307-309

Creaven PJ, Parke DV, Williams RT (1965)

A spectrofluorimetric study of the 7-hydroxylation of coumarin by liver microsomes.
Biochemical Journal 96: 390-398

Croughan MS, Hamel JF, Wang DI. (2000)

Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures.
Biotechnology and Bioengineering 67: 841-852

Currin RT, Toole JG, Thurman RG, Lemasters JJ (1990)

Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver.
Transplantation 50: 1076-1078

Cuthbert JA (2001)

Hepatitis A: old and new.
Clinical Microbiology Reviews 14: 38-51

Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB, Homburger HA (1993)

The nature and prognosis of severe cryptogenic chronic active hepatitis.
Gastroenterology 104: 1755-1761

D'Alessandro AM, Southard JH, Love RB, Belzer FO (1994)

Organ preservation.
Surgical Clinics of North America 74: 1083-1095

Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1994)

Vielzellige Organismen: Wechselwirkungen zwischen den Zellen sowie zwischen Zelle und Matrix.
In: Darnell J, Lodish H, Baltimore D (eds.), *Molekulare Biologie der Zelle*. Aus dem Englischen übersetzte 2. Aufl., de Gruyter, Berlin: 1031-1083

Davenport A, Will EJ, Davidson AM (1993)

Improved cardiovascular stability during continuous modes of renal replacement therapy in critically ill patients with acute hepatic and renal failure.
Critical Care Medicine 21: 328-338

Dawson JR, Adams DJ, Wolf CR (1985)

Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2.
Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters 183: 219-222

Dawson JL, Tan KC (1992)

Anatomy of the liver.

In: Millward-Sadler GH, Wright R, Arthur MJP (eds.). Wright's liver and biliary disease. Pathophysiology, diagnosis and management. Vol. 1, 3rd ed., WB Saunders, London: 3-11

de Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, van der Velde O, Doxiadis II, Persijn GG (1999)

Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins.

Transplant International 12: 447-453

Degenhardt S, Blomhard G, Hefter H, Kreuzpaintner G, Lindemann W, Lobeck H, Schnaith E, Stremmel W, Grabensee B (1994)

Hämolytische Krise mit Leberversagen als Erstmanifestation eines Morbus Wilson.

Deutsche Medizinische Wochenschrift 21: 1421-1426

de Leeuw AM, Brouwer A, Knook DL (1990)

Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age.

Journal of Electron Microscopy Technique 14: 218-236

de Man RA, Wilson JH, Tjen HS (1993)

Acute liver failure caused by methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy').

Nederlandse Tijdschrift voor Geneeskunde 137: 727-729

Denis J, Opolon P, Nusinovici V, Granger A, Darnis F (1978)

Treatment of encephalopathy during fulminant hepatic failure by hemodialysis with high permeability membrane.

Gut 29: 787-793

Denton MD, Magee CC, Sayegh MH (1999)

Immunosuppressive strategies in transplantation.

Lancet 353(9158): 1083-1091

Derelanko MJ, Hollinger MA (1995)

CRC Handbook of Toxicology.

CRC Press, Boca Raton

Diller KR (1979)

Intracellular freezing of glycerolized red cells.

Cryobiology 16: 125-131

Donato MT, Castell, Gomez-Lechon MJ (1999)

The coumarin-7-hydroxylation microassay in living hepatic cells in culture.

Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 26: 213-223

Donato MT, Castell JS, Gomez-Lechon MJ (1999)

Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic models.

Journal of Hepatology 31: 542-549

Donato MT, Viitala P, Rodriguez-Antona C, Lindfors A, Castell JV, Raunio H, Gomez-Lechon MJ, Pelkonen O (2000)

CYP2A5/CYP2A6 expression in mouse and human hepatocytes treated with various in vivo inducers.

Drug Metabolism and Disposition 28: 1321-1326

Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1988)

The influence of medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line.

Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters 241: 15-18

Doran PM (1995)

Bioprocess Engineering Principles.

Academic Press, London

Doyle A, Morris CB, Armitage JW (1988)

Cryopreservation of animal cells.

Advances in Biotechnology Processes 7: 2-13

Drenckhahn D, Fahimi D, Fleischhauer K (1994)

Leber und Gallenblase.

In: Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.). Benninghoff Anatomie, Band I. Urban & Schwarzenberg, München: 901-925

Dulbecco R, Freemann G (1959)

Plaque production by the polyoma virus.

Virology 8: 396-397

Eguchi S, Kawazoe Y, Sugiyama N, Kawashita Y, Fujioka H, Furui J, Sato M, Ishii T, Kanematsu T (2000)

Effects of recombinant human hepatocyte growth factor on the proliferation and function of porcine hepatocytes.

American Society of Artificial Internal Organs (ASAIO) Journal 46: 56-59.

Eiseman B, Liem DS, Raffucci F (1965)

Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure.

Annals of Surgery 162: 329-345

Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R (1996)

Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure.

Hepatology 24: 1446-1451

Emre S, Schwartz ME, Altaca G, Sethi P, Fiel MI, Guy SR, Kelly DM, Sebastian A, Fisher A, Eickmeyer D, Sheiner PA, Miller CM (1996)

Safe use of hepatic allografts from donors older than 70 years.

Transplantation 62: 62-65

Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM (1999)

Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies.

Blood 94: 3281-3288

Evans HM, Schulemann W (1914)

The action of vital stains belonging to the benzidine group.

Science 39: 443-454

Fahy RJ, Crouser E, Pacht ER (2000)

Herpes simplex type 2 causing fulminant hepatic failure.

Southern Medical Journal 93: 212-216

Faller A (1995)

Der Körper des Menschen.

Georg Thieme, Stuttgart

Faris RA, Konkin T, Halpert G (2001)

Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease.

Artificial Organs 25: 513-521.

Farrant J (1965)

Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention.

Nature 205: 1284-1287

Farrant J (1977)

Water transport and cell survival in cryobiological procedures.

Philosophical Transactions of the Royal Society London B 278: 191-205

Fausto N, Weber E (1994)

Liver regeneration.

In: Arias IW (ed.). *The liver: biology and pathobiology*. 3rd edition. Raven Press, New York: 1059-1084

Fehrenbach R, Comberbach M, Pêtre JO (1992)

On-line biomass monitoring by capacitance measurement.

Journal of Biotechnology 23: 303-314

Feldmann G (2001)

Liver transplantation of hepatic stem cells: potential use for treating liver diseases.

Cell Biology and Toxicology 17: 77-85

Fleming KA (1999)

The anatomy of the normal liver and the hepatic lymphocyte.

In: Crispe NI (ed.). *T-lymphocytes in the liver*. Wiley-Liss, John Wiley & Sons, New York: 1-13

Flendrig LM, la Soe JW, Jorning GG, Steenbeek A, Karlsen OT, Bovee WM, Ladiges NC, te Velde AA, Chamuleau RA (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.

Journal of Hepatology 26: 1379-1392

Fox IJ, Langnas AN, Fristoe LW, Shaefer MS, Vogel JE, Antonson DL, Donovan JP, Heffron TG, Markin RS, Sorrell MF, Shaw BW Jr (1993)

Successful application of extracorporeal liver perfusion: a technology whose time has come.

American Journal of Gastroenterology 88: 1876-1881

Franks F, Mathias SF, Galfre P, Webster SD, Brown D (1983)

Ice nucleation and freezing in undercooled cells.

Cryobiology 20: 298-309

Fujita J (1999)

Cold shock response in mammalian cells.

Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 1: 243-255

Fukaya K, Asahi S, Nagamori S, Sakaguchi M, Gao C, Miyazaki M, Namba M (2001)

Establishment of a human hepatocyte line (OUMS-29) having CYP 1A1 and 1A2 activities from fetal liver tissue by transfection of SV40 LT.

In Vitro Cellular Development Biology Animal 37: 266-269

Gazzard BG, Portmann B, Murray-Lyon IM, Williams R (1975)

Causes of death in fulminant hepatic failure and relationship to quantitative histological assessment of parenchymal damage.

Quarterly Journal of Medicine 44: 615-644

Gebhardt R (1992)

Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function.

Pharmacology and Therapy 53: 275-354

Gebhardt R (1996)

Funktionen der Leber und ihre Regulation.

In: Hahn G, Riemann JF (eds.). Klinische Gastroenterologie. Band II.

Georg Thieme, Stuttgart: 1437-1462

Gelfand MC, Kneppshield JH, Cohan S, Ramirez B, Schreiner GE (1976)

Treatment of hepatic coma with hemoperfusion through polyacrylamide hydrogel-coated charcoal.

Kidney International (Suppl.): S239-S243

Gerlach JC, Schnoy N, Encke J, Smith MD, Muller C, Neuhaus P (1995)

Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies.

Hepatology 22: 546-552

Gerlach JC (1996)

Development of a hybrid liver support system: a review.

International Journal of Artificial Organs 19: 645-654

Gerlach JC (1998)

Entwicklung eines hybriden Systems für die Leberunterstützung - erste klinische Fallberichte.

Habilitationsschrift, Humboldt-Universität, Berlin

Gerok W (1995)

Funktion und Struktur der Leber. Grundlagen zum Verständnis der Leberkrankheiten.

In: Gerok W, Blum HE (Hrsg.). Hepatologie. Urban & Schwarzenberg, München: 3-45

Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Amersi F, Goss J, Chen P, Dawson S, Lerner S, Nissen N, Imagawa D, Colquhoun S, Arnout W, MCDiarmid SV, Busuttil RW (2000)

Predictors of survival after in vivo split liver transplantation: analysis of 110 consecutive patients.

Annals of Surgery 232: 312-323

Giercksky T, Boberg KM, Farstad IN, Halvorsen S, Schrumpf E (1999)

Severe liver failure in exertional heat stroke.

Scandinavian Journal of Gastroenterology 34: 824-827

Glue P, Clement RP (1997)

Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism - basic concepts and methods of assessment.

Cellular and Molecular Neurobiology 19: 309-323

Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, Yager JD (1997)

Cytochrome P450 isoenzyme activities in cultured rat and mouse liver slices.

Xenobiotica 27: 341-355

Gonzales FJ (1989)

The molecular biology of cytochrome P450's.

Pharmacological Reviews 40: 243-288

Gonzales FJ (1995)

Cytochrome P450 evolution and nomenclature.

In: Ortiz de Montellano PR (ed.). Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. Plenum Press, New York: 212-219

Grand RJ, Milner AE, Mustoe T, Johnson GD, Owen D, Grant ML, Gregory CD (1995)

A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis.

Experimental Cell Research 218: 439-451

Greenlee WF, Poland A (1978)

An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapy 205: 596-605

Gridelli B, Remuzzi G (2000)

Strategies for making more organs available for transplantation.

New England Journal of Medicine 343: 404-410

Gudermann F (1998)

Entwicklung eines Substratzugabeverfahrens für tierische Zellkulturen auf der Basis einer Analyse des zugeführten Gasmisches.

Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Guengerich, FP (1989)

Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes.
Annual Review of Pharmacology and Toxicology 29: 241-264

Gütgemann A, Schiefers KH, Esser G, Lee TS, Paquet KJ, Kaufer C (1969)

Erfahrungsbericht über eine homologe Lebertransplantation.
Deutsche Medizinische Wochenschrift 94: 1713-1717

Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, Guyomard C (1999)

Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation.
Chemico-Biological Interactions 121: 7-16

Gupta SC, Gupta CD, Gupta SB (1981)

Hepatovenous segments in the human liver.
Journal of Anatomy 133: 1-6

Hahn ME (1997)

The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective.
Comparative Biochemistry and Physiology Part C 121: 23-53

Halle W (1975)

Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren.
Gustav Fischer, Stuttgart

Ham RG (1965)

Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium.
Proceedings of the National Academy of Science (USA) 53: 288-293

Hansen T, Borlak J, Bader A (2000)

Cytochrome P450 enzyme activity and protein expression in primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures.
Xenobiotica 30: 27-46

Harrison PM, Keays R, Bray GP, Alexander GJ, Williams R (1990)

Improved outcome of paracetamol-induced fulminant hepatic failure by late administration of acetylcysteine.
Lancet 335(8705): 572-1573

Hart GK, Thompson WR, Schneider J, Davis NJ, Oh TE (1984)

Fulminant hepatic failure and fatal encephalopathy associated with Epstein-Barr virus infection.
Medical Journal of Australia 141: 112-113

Hawerkamp A (1999)

Zellwachstumsinhibitorische Effekte in Hybridomzellkultivierungen: Die Rolle endogener Retroviren.

Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Heller HC, Hammel HT (1972)

CNS control of body temperature during hibernation.

Comparative Biochemistry and Physiology - Part A - 41: 349-359

Hellinger A, Rauen U, de Groot H, Erhard J (1997)

Auxiliäre Lebertransplantation bei akutem Leberversagen durch "Ecstasy".

Deutsche Medizinische Wochenschrift 122: 716-720

Herrmann S, Hofmann W, Theilmann L (1995)

Akutes Leberversagen als Erstmanifestation eines Morbus Wilson.

Medizinische Klinik 90: 456-461

Hillemann MR (2001)

Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeutics of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications.

Vaccine 19: 1837-1848

Himes VB, Hu WS (1987)

Attachment and growth of mammalian cells on microcarriers with different ion exchange capacities.

Biotechnology and Bioengineering 29: 1155-1163

Hirtenstein MD, Clark JM, Gebb C (1981)

A comparison of various laboratory scale culture configurations for microcarrier culture of animal cells.

Developments in Biological Standardization 50: 73-80

Hoffmann JN, Faist E (2001)

Removal of mediators by continuous hemofiltration in septic patients.

World Journal of Surgery 25: 651-659

Hoofnagle JH, Carithers RL Jr, Shapiro C, Ascher N (1995)

Fulminant hepatic failure: summary of a workshop.

Hepatology 21: 240-252

Hughes RD, Pucknell A, Routley D, Langley PG, Wendon JA, Williams R (1994)

Evaluation of the BioLogic-DT sorbent-suspension dialyser in patients with fulminant hepatic failure.

International Journal Artificial Organs 17: 657-662

Hughes RD, Williams R (1996)

Use of bioartificial and artificial liver support devices.

Seminars in Liver Diseases 16: 435-444

Hui T, Rozga J, Demetriou AA (2000)

Bioartificial liver support.

Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery 8: 1-15

Hume DM, Gayle WE Jr, Williams GM (1969)

Cross circulation of patients in hepatic coma with baboon partners having human blood.

Surgery, Gynecology and Obstetrics 128: 495-517

Hynes RO (1999)

Cell adhesion: old and new questions.

Trends in Cell Biology 9: M33-M37

Iding K (1998)

Entwicklung eines Testverfahrens zur Bewertung komplexer Mediumzusätze unter Kultivierungsbedingungen in tierischen Zellkulturen.

Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Iding K, Büntemeyer H, Gudermann F, Deutschmann SM, Kionka C, Lehmann J (2001)

An automatic system for the assessment of complex medium additives under cultivation conditions.

Biotechnology and Bioengineering 73: 442-448

Ishida T, Ando H, Nomura S, Ishikawa K, Kurauchi O, Mizutani S, Kobayashi M, Eguchi G, Tomada Y (1995)

Establishment and characterization of human fetal liver epithelial cell line transfected with SV40 T antigen.

Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 209: 251-256

Jauregui HO (1999)

Cellular component of bioartificial liver support systems.

Artificial Organs 23: 889-893

Jiminez Romero C, Moreo Gonzales E, Collin Ruiz F, Palma Carazo F, Loinaz Seguroia C, Rodriguez Gonzales F, Gonzalez Pinto I, Garcia Garcia I, Rodriguez Romano D, Moreno Sanz C (1999)

Use of octogenarian livers safely expand the donor pool.

Transplantation 68: 572-575

Joseph-Silverstein J, Silverstein RL (1998)

Cell adhesion molecules: an overview.

Cancer investigation 16: 176-182

Josephy PD (1997)

Molecular Toxicology.

Oxford University Press, New York

Joyce JA (2000)

Xenon: anesthesia for the 21st century.

American Association of Nurse Anesthetists Journal 68: 259-264

Jungermann K, Sasse D (1978)

Heterogeneity of the liver parenchym cells.

Trends in Biochemical Science 3: 198-202

Jungermann K (1986)

Dynamics of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptive alterations during regeneration after partial hepatectomy, starvation and diabetes.

Acta Histochemica, Suppl. 32: 89-98

Jungermann K, Katz N (1989)

Functional specialization of different hepatocyte populations.

Physiological Reviews 69: 708-64

Karp G (1999)

Cell and molecular biology. Concepts and experiments.

2nd edition. Wiley, New York

Kasai S, Sawa M, Mito M (1994)

Is the biological artificial liver clinically applicable? A historic review of biological artificial liver support systems.

Artificial Organs 18: 348-354

Kawada N, Klein H, Decker K (1992)

Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells.

Biochemical Journal 285: 367-371

Kay MA, Fausto N (1997)

Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies.

Molecular Medicine Today 3: 108-115

Kaymakoglu S, Cakaloglu Y, Demir K, Turkoglu S, Badur S, Gurel S, Besisik F, Cevikbas U, Okten A (1998)

Is severe cryptogenic chronic hepatitis similar to autoimmune hepatitis?

Journal of Hepatology 28: 78-83

Keeffe EB (1998)

Summary of guidelines on organ allocation and patient listing for liver transplantation.

Liver Transplantation and Surgery 4: S108-S114

Keeffe EB (2000)

Liver transplantation at the millenium. Past, present, and future.

Clinics in Liver Disease 4: 241-255

Keeffe EB (2001)

Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement.

Gastroenterology 120: 749-762

Kelly JH (1994)

Permanent human hepatocyte cell line and its use in a liver assist device (LAD).

U.S.-Pat. 5,290,684

Kennedy NP, Tipton KF (1990)

Ethanol metabolism and alcoholic liver disease.

Essays in Biochemistry 25: 137-195

Kiley JE, Pender JC, Welch HF, Welch CS (1957)

Treatment of hepatic coma by hemodialysis.

Transactions of the American Society of Artificial Internal Organs 3: 86-88

Kim SS, Utsunomiya H, Koski JA, Wu BM, Cima MJ, Sohn J, Mukai K, Griffith LG, Vacanti JP (1998)

Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels.

Annals of Surgery 228: 8-13

Kimoto S (1957)

The artificial liver. Experiments and clinical application.

Transactions of the American Society of Artificial Internal Organs 5: 102-112

Kirillova I (1996)

Etablierung teilungsfähiger differenzierter Hepatocyten der Maus und des Menschen durch genetische Beeinflussung der Zellteilungsregulation.

Dissertation, Institut für Biologie, Humboldt-Universität, Berlin

Klupp J, Bechstein WO, Platz KP, Keck H, Lemmens HP, Knoop M, Langehr JM, Neuhaus R, Pratschke J, Neuhaus P (1997)

Mycofenolate Mofetil added to immunosuppression after liver transplantation - first results.

Transplantation International 10: 223-228

Knazek RA, Gullino PM, Kohler PO, Decrick RL (1972)

Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro.

Science 178: 65-67

Knell AJ, Dukes DC (1976)

Dialysis procedures in acute liver failure.

Lancet 2(7982): 402-403

Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakagushi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox IJ, Leboulch P (2000)

Prevention of acute liver failure with reversibly immortalized human hepatocytes.

Science 287: 258-262

Knowles BB, Aden DP (1983)

Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor.

US-Pat. 4,393,133

Koebe HG, Pahernik SA, Sproede M, Thasler WE, Schildberg FW (1995)

Porcine hepatocytes from slaughterhouse organs. An unlimited resource for bioartificial liver devices.

American Society of Artificial Internal Organs (ASAIO) Journal 41: 189-193

Koebe HG, Schildberg FW (1998)

Die künstliche Leber - ein Zwischenbericht.

Wiener Klinische Wochenschrift 110: 551-563

Kolaeva SG, Kramarova LI, Ilyasova EN, Ilyasov FE (1980)

The kinetics and metabolism of the cell of hibernating animals during hibernation.
International Review of Cytology 66: 147-170

Koppel C (1993)

Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning.
Toxicon 31: 1513-1540

Krishna DR, Klotz U (1994)

Extrahepatic metabolism of drugs in humans.
Clinical Pharmacokinetics 26: 144-160

Kuo PC, Johnson LB, Hastings G, Pais SO, Plotkin JS, Orens JB, Howell CD, Lewis WD, Bartlett ST (1996)

Fulminant hepatic failure from the Budd-Chiari syndrome. A bridge to transplantation with transjugular intrahepatic portosystemic shunt.
Transplantation 62: 294-296

Lake BG (1999)

Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment.
Food and Chemical Toxicology 37: 423-453

Lamers WH, Hilberts A, Furt E, Smith J, Jonges GN, van Noorden CJ, Gaasbeek Janzen JW, Charles R, Moorman AFM (1989)

Hepatic enzymic zonation: A reevaluation of the concept of the liver acinus.
Hepatology 10: 72-76

Lazo PA (1981)

Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumor cells.
European Journal of Biochemistry 117: 19-25

Lehmann J, Piel GW, Schulz R (1985)

Blasenfreie Zellkulturbegasung mit bewegten, porösen Membranen.
Biotech-Forum 2: 112-117

Lehmann J, Heidemann R, Riese U, Lütkemeyer D, Büntemeyer H (1992)

Der SuperSpinner. Ein 'Brutschrankfermenter' für die Massenkultur tierischer Zellen.
BioEngineering 5/6: 112-117

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1994)

Prinzipien der Biochemie.
Spektrum, Heidelberg

Lemasters JJ, Thurman RG (1992)

Rinse solution for organs and tissues.

U.S.-Pat. 5,145,771

Lemasters JJ, Peng XX, Bachmann S, Currin RT, Gao W, Thurman RG (1995)

Dual role of Kupffer cell activation and endothelial cell damage in reperfusion injury to livers stored for transplantation surgery.

Journal of Gastroenterology and Hepatology 10 (Suppl. 1): S84-S87

Leonhardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K (1987)

Anatomie des Menschen, Band II.

Georg Thieme, Stuttgart

Lepore MJ, Martel AJ (1970)

Plasmapheresis with plasma exchange in hepatic coma. Methods and results in five patients with acute fulminant hepatic necrosis.

Annals of Internal Medicine 72: 165-174

Li AP, Baker G, Beck D (1993)

Culturing of primary hepatocytes as entrapped aggregates in a packed bed bioreactor. A potential bioartificial liver.

In Vitro Cellular and Developmental Biology 29A: 249-254

Lim CK (1987)

HPLC of small molecules - a practical approach.

IRL Press, Oxford

Lindl T, Bauer J (1994)

Zell- und Gewebekultur.

3. Auflage, Gustav Fischer, Stuttgart

Lindros KO (1997)

Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver.

General Pharmacology 28: 191-196

Lloyd-Still JD (1985)

Mortality from liver disease in children. Implications for hepatic transplantation programs.

American Journal of Diseases of Children 139: 381-384

Lo CM, Fan ST, Liu CL, Wie WI, Lo RJ, Lai CL, Chan JK, Ng IO, Fung A, Wong J (1997)

Adult-to-adult donor live transplantation using extended right lobe grafts.

Annals of Surgery 226: 261-269

Looby D, Griffiths B (1990)

Immobilization of animal cells in porous carrier culture.

Trends in Biotechnology 8: 204-209

Lovelock JE (1953)

The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing.

Biochimica et Biophysica Acta 11: 28-36

Lubet RA, Syi JL, Nelson JO, Nims RW (1990)

Induction of hepatic cytochrome P-450 mediated alkoxyresorufin O-dealkylase activities in different species by prototype P-450 inducers.

Chemico-Biological Interactions 75: 325-339

Ludlow JW (1993)

Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53.

FASEB Journal 7: 866-871

Lyman CP, O'Brien RC (1974)

Comparison of temperature regulation in hibernating rodents.

American Journal of Physiology 227: 218-223

Mackiewicz A (1997)

Acute phase proteins and transformed cells.

International Review of Cytology 170: 225-300

Maganto P, Cienfuegos JA, Santamaria L, Rodriguez V, Eroles G, Andres S, Castillo-Olivares JL, Municio AM (1990)

Auxiliary liver by transplanted frozen-thawed hepatocytes.

Journal of Surgical Research 48: 24-32

Malchesky PS (1994)

Nonbiological liver support: historic overview.

Artificial Organs 18: 342-347

Marcos A, Ham JM, Fisher RA, Olzinski AT, Posner MP (2000)

Single-center analysis of the first 40 adult-to-adult living donor liver transplants using the right lobe.

Liver Transplantation 6: 296-301

Margulis MS, Erukhimov EA, Andreiman LA, Viksna LM (1989)

Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency.

Resuscitation 18: 85-94

Marquardt H, Schäfer SG (1994)

Lehrbuch der Toxikologie.

B·I Wissenschaftsverlag, Mannheim

Matsumura KN, Guevara GR, Huston H, Hamilton WL, Rikimaru M, Yamasaki G, Matsumura MS (1987)

Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report.

Surgery 101: 99-103

Marx E, Mueller-Klieser W, Vaupel P (1988)

Lactate-induced inhibition of tumor cell proliferation.

International Journal of Radiation Oncology · Biology · Physics 14: 947-956

Matern S (1999)

Hepatologie

In: Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M (Hrsg.). Thiemes Innere Medizin. Georg Thieme, Stuttgart: 659-790

Mazur P (1970)

Cryobiology: the freezing of biological systems.

Science 168: 939-949

Mazur P (1977)

The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates.

Cryobiology 14: 251-272

Mendez L, Reddy KR, Di Prima RA, Jeffers LJ, Schiff ER (1991)

Fulminant hepatic failure due to acute hepatitis B and delta co-infection: probable bloodborne transmission associated with a spring-loaded fingerstick device.

American Journal of Gastroenterology 86: 895-897

Meryman HT (1971)

Osmotic stress as a mechanism of freezing injury.

Cryobiology 8: 489-500

Merz L, Jaschek H (1993)

Grundkurs der Regelungstechnik.

Oldenbourg, München

Meunier V, Bourrie M, Julian B, Marti E, Guillou F, Berger Y, Fabre G (2000)

Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up.

Xenobiotica 30: 589-607

Meyer RA, Duffy MC (1993)

Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B infection leading to fulminant hepatic failure. Report of two cases and review of literature.

Journal of Clinical Gastroenterology 17: 231-234

Mignot G, Faure T, Ganne V, Arbeille B, Pavirani A, Romet-Lemonne JL (1990)

Production of recombinant Von Willebrand factor by CHO cells cultured in macroporous microcarriers.

Cytotechnology 4: 163-171

Miles JS, McLaren AW, Forrester LM, Glancey MJ, Lang MA, Wolf CR (1990)

Identification of the human liver cytochrome P-450 responsible for coumarin 7-hydroxylase activity.

Biochemical Journal 267: 365-371

Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Peszynski P, Schmidt R, Noldge-Schomburg G (2001)

Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure.

Journal of the American Society of Nephrology 12(Suppl 17) : S75-S82

Mortimer CE (1987)

Chemie - Das Basiswissen der Chemie.

Georg Thieme, Stuttgart

Mousseau DD, Butterworth RF (1994)

Current theories on the pathogenesis of hepatic encephalopathy.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 206: 329-344

Mühlenfeld KI (1999)

Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie Hep G2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistarratte.

Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Humboldt-Universität Berlin

Muttzall K (1993)

Einführung in die Fermentationstechnik.

Behr's, Hamburg

Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T (1987)

Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis.

Annals of Surgery 206: 30-39

Naik S, Trenkler D, Santangini H, Pan J, Jauregui HO (1996)

Isolation and culture of porcine hepatocytes for artificial liver support.

Cell Transplantation 5: 107-115

Nardo B, Catena F, Cavallari G, Montalti R, Di Naro A, Faenza A, Cavallari A (2001)

Randomized clinical study comparing UW and Celsior solution in liver preservation for transplantation: preliminary results.

Transplantation Proceedings 33: 870-872

Nedergaard J, Cannon B (1990)

Mammalian hibernation.

Philosophical Transactions of the Royal Society London B326: 669-686

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzales FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW (1993)

The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature.

DNA and Cell Biology 12: 1-51

Nerurkar PV, Park SS, Thomas PE, Nims RW, Lubet RA (1993)

Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P450 1A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse.

Biochemical Pharmacology 46: 933-943

Neuberger JM (1990)

Halothane and hepatitis. Incidence, predisposing factors and exposure guidelines.

Drug Safety 5: 28-38

Neves AA, Pereira DA, Vieira LM, Menezes JC (2001)

Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe.

Journal of Biotechnology 84: 45-52.

Nims RW, Prough RA, Lubet RA (1984)

Cytosol-mediated reduction of resorufin: a method for measuring quinone oxireductase.

Archives of Biochemistry and Biophysics 229: 459-465

Norton L, Moore G, Eiseman B (1975)

Liver failure in the postoperative patient: the role of sepsis and immunologic deficiency.

Surgery 78: 6-13

Nose Y, Mikami J, Kasay Y, Sasaki E, Agishi T, Danjyo Y (1963)

An experimental artificial liver utilizing extracorporeal metabolism with slices or granulated canine liver.

Transaction of the American Society of Artificial Internal Organs 9: 358-362

Nyberg SL, Remmel RP, Mann HJ, Peshwa MV, Hu WS, Cerra FB (1994)

Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver.

Annals of Surgery 220: 59-67

O'Grady JG, Gimson AE, O'Brien CJ, Pucknell A, Hughes RD, Williams R (1988)

Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure.

Gastroenterology 94: 1186-1192

O'Grady JG (1992)

Management of acute and fulminant hepatitis A.

Vaccine 10 (Suppl. 11): S21-S23

O'Grady JG, Schalm SW, Williams R (1993)

Acute liver failure: redefining the syndromes.

Lancet 342(8866): 273-275

O'Grady JG (1997)

Paracetamol hepatotoxicity: how to prevent.

Journal of the Royal Society of Medicine 90: 368-370

Okamoto M, Ishida Y, Keogh A, Strain A (1998)

Evaluation of the function of primary human hepatocytes co-cultured with the human hepatic stellate cell (HSC) line LI90.

International Journal of Artificial Organs 21: 353-359

Paine (1991)

Current status review: cytochrome P450 gene superfamily.

International Journal of Experimental Pathology 72: 349-363

Patel SD, Papoutsakis ET, Winter JN, Miller WM (2000)

The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures.

Biotechnology Progress 16: 885-892

Patience C, Takeushi Y, Weiss RA (1997)

Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs.

Nature Medicine 3: 282-286

Patzer JF, Mazariegos GV, Lopez R, Molmenti E, Gerber D, Riddervold F, Khanna A, Yin WY, Chen Y, Scott VL, Aggarwal S, Kramer DJ, Wagner RA, Zhu Y, Fulmer ML, Block GD, Amiot BP (1999)

Novel bioartificial liver support system: preclinical evaluation.

Annals of the New York Academy of Science 875: 340-352

Paul D, Höhne M, Pinkert C, Piasecki A, Ummelmann E, Brinster RL (1988)

Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-Antigen Genes.

Experimental Cell Research 175: 354-362

Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Pasanen M (2000)

CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase.

Toxicology 144: 139-147

Penzlin H (1991)

Lehrbuch der Tierphysiologie.

5. Auflage, Gustav Fischer, Jena

Pereira LM, Langley PG, Hayllar KM, Tredger JM, Williams R (1992)

Coagulation factor V and VIII/V ratio as predictors of outcome in paracetamol induced fulminant hepatic failure: relation to other prognostic indicators.

Gut 33: 98-102

Pereira SP, O'Donohue J, Wendon J, Williams R (1997)

Maternal and perinatal outcome in severe pregnancy-related liver disease.
Hepatology 26: 1258-1262

Pichlmayer R, Ringe B, Gernatis G, Hauss J, Bunzendahl H (1988)

Transplantation einer Spenderleber auf zwei Empfänger (Splitting-Transplantation): Eine neue Methode in der Weiterentwicklung der Lebersegment-Transplantation.
Langenbecks Archiv für Chirurgie 373: 127-130

Pirt JS (1985)

Principles of microbe and cell cultivation.
Blackwell Scientific Publications, London

Pitkin Z, Mullon C (1999)

Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system.
Artificial Organs 23: 829-833.

Porter KR, Tucker JB (1981)

The ground substance of the living cell.
Scientific American 244: 56-67

Poss JE (1989)

Hepatitis D virus infection.
Nurse Practitioner 14: 12, 14-15, 18

Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD (1993)

Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation.
Hepatology 18: 1490-1497

Price RJ, Surry D, Renwick AB, Meneses-Lorente G, Lake BG, Evans DC (2000)

CYP isoform induction screening in 96-well plates: use of 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin as a substrate with rat hepatocytes.
Xenobiotica 30: 781-795

Pschyrembl W (1998)

Klinisches Wörterbuch.
258. Aufl., de Gruyter, Berlin

Purdie JE, Demayo RE, Seely JH, Benoiton NL (1972)

The trypsin-catalysed hydrolysis of D-lysine and D-arginine ethyl esters.

Biochimica et Biophysica Acta 268: 523-526

Quattrochi LC, Vu T, Tukey RH (1994)

The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. A region of DNA that supports AH-receptor binding and promoter-specific induction.

Journal of Biological Chemistry 269: 6949-6954

Raia S, Nery JR, Mies S (1989)

Liver transplantation from live donors.

Lancet 2(8661): 497-498

Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN (1954)

Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit.

Anatomical Record 119: 11-33

Reimer L, Pfefferkorn G (1973)

Raster-Elektronenmikroskopie.

Springer, Berlin

Riordan SM, Williams R (1999)

Cause and prognosis in acute liver failure.

Liver Transplantation and Surgery 5: 86-89

Roberts EA, Xie ZW, Yang S, Lipa J (1993)

Inducibility of enzyme activities associated with the cytochrome P-450 1A family, ethoxyresorufin O-deethylase, and methoxyresorufin O-demethylase in human hepatocyte lines derived from normal liver tissue.

Drug Metabolism and Disposition 21: 56-61

Rosenthal P (2000)

Is there a future for liver-assist devices?

Current Gastroenterology Reports 2: 55-60

Rozga J, Holzman MD, Ro MS, Griffin DW, Neuzil DF, Giorgio T, Moscioni AD, Demetriou AA (1993)

Development of a hybrid bioartificial liver.

Annals of Surgery 217: 502-511

Sabin S, Merritt JA (1968)

Treatment of hepatic coma in cirrhosis by plasmapheresis and plasma infusion (plasma exchange).

Annals of Internal Medicine 68: 1-7

Sachsenmeier KF, Pipas JM (2001)

Inhibition of Rb and p53 is insufficient for SV40 T-antigen transformation.

Virology 283: 40-48

Salonpää P, Pelkonen O, Kojo A, Pasanen M, Negishi M, Raunio H (1994)

CYP2A5 expression and inducibility by phenobarbital is modulated by cAMP in mouse primary hepatocytes.

Biochemical and Biophysical Research Communications 205: 631-637

Schön MR, Heil W, Lemmens HP, Padval D, Matthes M, Puhl G, Neuhaus P, Hammer C (1999)

Xenogeneic, extracorporeal liver perfusion in primates improves the ratio of branched-chain amino acids to aromatic amino acids (Fischer's ratio).

European Surgery Research 31: 230-239

Seewöster T (1995)

Einfluß nichtessentieller Aminosäuren auf die Transkriptionsaktivität tierischer Zellkulturen.

Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, Hiraide H (2000)

The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses.

Immunological Reviews 174: 35-46

Serrar H, El-Kadi A, Du Souich P, Haddad P (1999)

Cytochrome P-450 content and activity after cold storage of rat hepatocytes in University of Wisconsin and sodium-lactobionate-sucrose solutions.

Liver Transplantation and Surgery 5: 119-125

Shakil AO, Mazariegos GV, Kramer DJ (1999)

Fulminant hepatic failure.

Surgical Clinics of North America 79: 77-108

Shi Q, Mitteregger R, Falkenhagen D, Yu YT (2000)

A novel configuration of bioartificial liver support system based on circulating microcarrier culture.

Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology 28: 273-291

Sibal A, Rajasekar MR, Soim AS (1999)

Liver transplantation in the developing world.

Indian Journal of Pediatrics 66(1 Suppl.): S120-S123

Sielaff TD, Nyberg SL, Rollins MD, Hu MY, Amiot B, Lee A, Wu FJ, Hu WS, Cerra FB (1997)

Characterization of the three-compartment gel-entrapment porcine hepatocyte bioartificial liver.

Cell Biology and Toxicology 13: 357-364

Silk DB, Trewby PN, Chase RA, Mellon PJ, Hanid MA, Davies M, Langley PG, Wheeler PG, Williams R. (1977)

Treatment of fulminant hepatic failure by polyacrylnitrile-membrane hemodialysis.

Lancet 2(8027): 1-3

Slattery JT, Wilson JM, Kalhorn TF, Nelson SD (1987)

Dose-dependent pharmacokinetics of acetaminophen: evidence of glutathione depletion in humans.

Clinical Pharmacology and Therapeutics 41: 413-418

Smalley M, Leiper K, Tootle R, and Hodgson H (2000)

Immortalization of human hepatocytes by temperature-sensitive SV40 large-T antigen.

In vitro Animal Cellular and Developmental Biology 37: 166–168.

Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL, Belzer FO (1990)

Important components of the UW solution.

Transplantation 49: 251-257

Specke V, Rubant S, Denner J (2001)

Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses.

Virology 285: 177-180

Srere HK, Wang LC, Martin SL (1992)

Central role for differential gene expression in mammalian hibernation.

Proceedings of the National Academy of Science (USA) 89: 7119-7123

Stange J, Mitzner S, Ramlow W, Gliesche T, Hickstein H, Schmidt R (1993)

A new procedure for the removal of protein bound drugs and toxins.

American Society of Artificial Internal Organs (ASAIO) Journal 39: M621-M625

Stange J, Mitzner S, Strauss M, Fischer U, Lindemann S, Peters E, Holtz M, Drewelow B, Schmidt R (1995)

Primary or established liver cells for a hybrid liver? Comparison of metabolic features.

American Society of Artificial Internal Organs (ASAIO) Journal 41: M310-M315

Stapulionis R, Kolli S Deutscher MP 1997

Efficient mammalian protein synthesis requires an intact F-actin system.

Journal of Biological Chemistry 272: 24980-24986

Starzl TE, Marchioro TL, von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddel WR (1963)

Homotransplantation of the liver in humans.

Surgery, Gynecology and Obstetrics 117: 659-676

Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, Schade RR, Shaw BW Jr, Hakala TR, Rosenthal JT, Porter KA (1982)

Evolution of liver transplantation.

Hepatology 2: 614-636

Starzl TE, Iwatsuki S, Esquivel CO, Todo S, Kam I, Lynch S, Gordon RD, Shaw BW Jr. (1985)

Refinements in the surgical technique of liver transplantation.

Seminars in Liver Disease 5: 349-356

Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A (1989)

FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation.

Lancet 28(8670): 1000-1004

Sternlieb I (2000)

Wilson's disease.

Clinics in Liver Disease 4: 229-239

Strader DB, Seeff LB (2001)

Hepatitis C: a brief clinical overview.

Institute of Laboratory Animal Resources Journal 42: 107-116

Strohmeyer G, Weik C (1999).

Leberschädigung durch Medikamente.
Zeitschrift für Gastroenterologie 37: 367-378

Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP (1997)

Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure.
Transplantation 63: 559-569

Stuart HA, Klages G (1992)

Kurzes Lehrbuch der Physik.
Springer, Berlin

Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH (1994)

The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience.
Artificial Organs 18: 390-396

Takeichi M (1991)

Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.
Science 251: 1451-1455

Tennant JR (1964)

Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability
Transplantation 2: 685-694

Theilmann L, Solbach C, Toex U, Muller HM, Pfaff E, Otto G, Goeser T (1992)

Role of hepatitis C virus infection in German patients with fulminant and subacute hepatic failure.
European Journal of Clinical Investigation 22: 569-571

Thomas MJ, Parry ES, Nash SG, Bell SH (1996)

A method for the cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch as a cryoprotectant.
Transfusion Science 17: 385-396

Thorpe JS, Murdin AD, Spier RE (1987)

Investigation of potential toxic products in mammalian cell culture.
In: Spier RE, Griffiths JB (eds.), *Modern Approaches to Animal Cell Technology*. Butterworth, Oxford: 420-436

Tilanus HW (1995)

Budd-Chiari syndrome.

British Journal of Surgery 82: 1023-1030

Töndury G (1981)

Angewandte und topographische Anatomie.

5. Aufl., Georg Thieme, Stuttgart

Trey C, Lipworth L, Chalmers TC, Davidson CS, Gottlieb LS, Popper H, Saunders SJ (1968)

Fulminant hepatic failure. Presumable contribution to halothane.

New England Journal of Medicine 279: 798-801

Tritsch GL, Moore GE (1962)

Spontaneous decomposition of glutamin in cell culture media.

Experimental Cell Research 28: 360-364

Tsiaoussis J, Newsome PN, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN (2001)

Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for bioartificial liver support systems.

Liver Transplantation 7: 2-10

Utesch D, Diener B, Molitor E, Oesch F, Platt KL (1992)

Characterization of cryopreserved rat liver parenchymal cells by metabolism of diagnostic substrates and activities of related enzymes.

Biochemical Pharmacology 44: 309-315

Vallbracht A, Gabriel P, Maier K (1986)

Cell mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection.

Hepatology 6: 1308-1314

Vanderzwalmen P, Stecher A, Riedler I, Zech N, Zech H (1998)

Vitrifikation von humanen Embryonen in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium.

Journal für Fertilität und Reproduktion 8: 20-26.

van Wezel (1967)

Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogenous culture.

Nature 216: 64-65

Verran DJ, Asfar SK, Ghent CN, Grant DR, Wall WJ (1997)

Biliary reconstruction without T tubes or stents in liver transplantation: report of 502 consecutive cases.

Liver Transplantation and Surgery 3: 365-373

Visser TJ (1994)

Role of sulfation in thyroid hormone metabolism.

Chemico-Biological Interactions 92: 293-303

Voet D, Voet JG (1994)

Biochemie.

VCH, Weinheim

Wake K (1980)

Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs.

International Reviews of Cytology 66: 303-353

Wake K, Decker K, Kirn A (1989)

Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver.

International Review of Cytology: 173-192

Wang L, Sun J, Li L, Mears D, Horvat M, Sheil AG (1998)

Comparison of porcine hepatocytes with human hepatoma (C3A) cells for use in a bioartificial liver support system.

Cell Transplantation 7: 459-468

Watanabe FD, Mullon CJ, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S, Khalili T, Arnaout W, Shackleton CR, Rozga J, Solomon B, Demetriou AA (1997)

Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial.

Annals of Surgery 1997 225: 484-494

Watson CJ, Friend PJ, Jamieson NV, Frick TW, Alexander G, Gimson AE, Calne R (1999)

Sirolimus: a potent new immunosuppressant for liver transplantation.

Transplantation 67:505-9

Wehner R, Gehring W (1990)

Zoologie.

22. Aufl., Thieme, Stuttgart

Weisenberg RC (1972)

Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations.

Science 177: 1104-1105

Williams R, Wendon J (1994)

Indications for orthotopic liver transplantation in fulminant hepatic failure.
Hepatology 20: 5-10

Williams R (1996)

Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure.
Seminars in Liver Disease 16: 343-348

Wilson K, Goulding KH (1991)

Methoden der Biochemie.
Georg Thieme, Stuttgart

Winkelmeier P, Glauner B, Lindl T (1993)

Quantification of cytotoxicity by cell volume and cell proliferation.
Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 21: 269-280

Winkler M, Schlitt HJ (1999)

Xenotransplantation der Leber.
Zentralblatt für Chirurgie 124: 621-627

Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R, Braet F (1997)

On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells.
Seminars in Liver Disease 17: 265-286

Wolf CF, Munkelt BE (1975)

Bilirubin conjugation by an artificial liver composed of cultured cells and synthetic capillaries.
Transactions of the American Society Artificial Internal Organs 21: 16-27

Wrighton SA, Stevens JC (1992)

The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism.
Critical Reviews in Toxicology 22: 1-21

Wrighton SA, Vandenbranden M, Stevens JC, Shipley LA, Ring BJ (1993)

In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development.
Drug Metabolism Reviews 25: 453-484

Wrighton SA, Vandenbranden M, Ring BJ (1996)

The human drug metabolizing cytochromes P450.
Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics 24: 461-473

Wu P, Ozturk SS, Blackie JD, Thrift JC, Figueroa C, Naveh D (1994)

Evaluation and application of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors.
Biotechnology and Bioengineering 45: 495-502

Yamazaki H, Inoue K, Mimura M, Oda Y, Guengerich FP, Shimada T (1996)

7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes.
Biochemical Pharmacology 51: 313-319

Yoshida M, Inoue K, Sekiyama K, Koh I (1996)

Favorable effect of new artificial liver support on survival of patients with fulminant hepatic failure.
Artificial Organs 20: 1169-1172

Zeindl-Eberhart E, Rabes HM (1992)

Variant protein patterns in hepatomas and transformed liver cell lines as determined by high resolution two-dimensional gel electrophoresis (2DE).
Carcinogenesis 13: 1177-1183

Ziegler JG, Nichols NB (1942)

Optimum settings for automatic controllers.
Transaction of the ASME 64: 759-786

Ziegler DM (1988)

Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities.
Drug Metabolism Reviews 19: 1-32

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kai Iding
Anschrift: Roggenkamp 24
33605 Bielefeld
Geburtsdatum: 04.07.1970
Geburtsort: Dingden
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: ledig

Schulbildung und Zivildienst

08/1977-07/1981 Ludgeri-Grundschule in Dingden
08/1981-05/1990 Mariengymnasium in Bocholt
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
10/1990-09/1991 Zivildienst an der Akademie Klausenhof in Dingden

Hochschulstudium

10/1991 Beginn des Diplomstudiengangs Biologie an der Universität Bielefeld
07/1994 Vordiplom
08/1996-10/1996 wissenschaftliches Industriepraktikum bei der Fa. Novo-Nordisk
in Kopenhagen, Dänemark
10/1996-07/1998 Diplomarbeit in der AG Zellkulturtechnik, Technischen Fakultät,
Universität Bielefeld, unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Jürgen
Lehmann. Thema: Entwicklung eines Testverfahrens zur Bewertung
komplexer Mediumzusätze unter Kultivierungsbedingungen in
tierischen Zellkulturen
08/1998-12/1998 Industriekooperationsprojekt mit Fa. B. Braun, Melsungen
Thema: Untersuchungen zum Einsatz von Spinfiltersystemen bei der
kontinuierlichen Kultivierung von CHO-Zellen im 100-L-Pilotmaßstab

Promotion

01/1999 – 12/2001 Dissertation an der Universität Bielefeld, Technische Fakultät,
Lehrstuhl für Zellkulturtechnik, Leitung Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet habe und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Kai Iding