

Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer

Hepatotoxizität definierter Plasmafraktionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
Tübingen

vorgelegt von
Steffen Endres
aus
Schweinfurt
2010

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. W. Steurer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Bitzer

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Definitionen des Leberversagens	1
1.2 Pathogenese des akuten Leberversagens	2
1.3 Stand der Therapieverfahren beim akuten Leberversagen	5
1.4 Toxizität des anhepatischen Plasmas auf Zellkulturen.....	12
1.5 Fragestellung	14
Material und Methoden.....	15
2.1 Material	15
2.1.1 Zellpräparation	15
2.1.2 Zellkultur.....	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Isolierung von Schweinehepatozyten.....	17
2.2.1.1 Zellkultur Schweinehepatozyten.....	17
2.2.1.2 Gewinnung des Schweineplasmas.....	18
2.2.1.3 Rekalzifizierung und Antikoagulation des Schweineplasmas	19
2.2.1.4 Fraktionierung des anhepatischen Plasmas.....	20
2.2.1.5 Versuchsaufbau Schweinehepatozyten in fraktioniertem Schweineplasma	22
2.2.1.6 Spülen der Zellen und Mediumwechsel.....	25
2.2.1.7 Bestimmung des Zeitpunktes des Versuchsbeginns.....	25
2.2.1.8 Zugabe der unterschiedlichen Testmedien	26
2.2.2 Humane Hepatozyten.....	26
2.2.2.1 Präparation humaner Hepatozyten.....	26
2.2.2.2 Einfrieren humaner Hepatozyten.....	29
2.2.2.3 Zellkultur Humane Hepatozyten	29
2.2.2.4 Humanes Serum	30
2.2.2.5 Fraktionierung des humanen Serums	30
2.2.2.6 Versuchsaufbau fraktioniertes Serum auf humane Hepatozyten	30
2.2.3 Bestimmung von Zellvitalität und Ausbeute.....	32
2.2.4 Lyse der Zellen.....	32

2.2.5	Bestimmung von LDH und GOT.....	32
2.2.6	Statistische Methode.....	33
	Ergebnisse.....	35
3.1	Zellkulturen mit Schweinehepatozyten.....	35
3.1.1	Bestimmung des Zeitpunktes der Plasmazugabe.....	35
3.1.2	Vergleich zwischen Fraktion und Rückstand.....	36
3.1.3	Vergleich filtriertes und nicht filtriertes anhepatisches Plasma.....	38
3.1.4	Vergleich filtriertes anhepatisches Plasma und Medium.....	41
3.1.5	Morphologie der Schweinehepatozyten.....	43
3.2	Zellkulturen mit humanen Hepatozyten.....	50
3.2.1	Humane Hepatozytenkultur in fraktioniertem humanem Serum.....	50
3.2.2	Vergleich filtriertes und unfiltriertes humanes Serum.....	51
	Diskussion.....	52
4.1	GOT- und LDH –Aktivität als Parameter.....	52
4.2	Zellkultur mit Schweinehepatozyten.....	53
4.2.1	Auswahl der Vergleichsgrößen zu den Filtraten.....	54
4.2.2	Ergebnis der Filtration des anhepatischen Schweineplasmas.....	55
4.3	Zellkultur mit humanen Hepatozyten.....	60
4.3.1	Ergebnisse fraktioniertes humanes Serum.....	61
4.4	Auswirkungen der Serum- und Plasmafiltration auf Zellen.....	61
	Zusammenfassung.....	63
	Literatur.....	64
	Abkürzungsverzeichnis.....	69
	Anhang.....	70

Einleitung

1.1 Definitionen des Leberversagens

Die klassische klinische Definition des Leberversagens stützt sich auf die Trias Koagulopathie, Ikterus und hepatische Enzephalopathie. Beim Leberversagen wird zwischen akutem, akut-auf-chronischem und chronischem Leberversagen unterschieden.

Das chronische Leberversagen tritt bei Patienten im Endstadium einer Zirrhose als Resultat des fortschreitenden Krankheitsprozesses auf.

Dagegen werden unter dem Begriff des akut-auf-chronischen Leberversagens diejenigen Patienten zusammengefasst, bei denen eine kompensierte chronische Lebererkrankung aufgrund einer Komplikation wie Sepsis, gastrointestinaler Blutung, Ischämie oder aufgrund von hepatotoxischen Substanzen wie Alkohol akut dekompenziert (24).

Das seltenere akute Leberversagen wurde 1970 durch Trey and Davidson näher definiert. Diese noch heute gebräuchliche Definition gibt einige wichtige Beobachtungen des akuten Leberversagens wieder: Es entwickelt sich bei Patienten ohne vorherige spezifische Erkrankung der Leber. Es tritt plötzlich auf, ist charakterisiert durch eine hepatisch bedingte Enzephalopathie und ist potenziell reversibel (54). Ursachen hierfür sind meist virale Erkrankungen wie Hepatitis A oder B, Medikamentenüberdosierung, hier vor allem die Überdosierung mit Paracetamol, andere Toxine, wie zum Beispiel eine Intoxikation mit dem Knollenblätterpilz, oder metabolische Funktionsstörungen, wie zum Beispiel das Reye's Syndrom.

O'Grady und Kollegen entwickelten 1993 die „King's classification“, entsprechend der das akute Leberversagen weiter in hyperakutes, akutes und subakutes Leberversagen unterteilt wird, je nachdem, ob die Enzephalopathie nach 7 Tagen, 8-28 Tagen oder mehr als 28 Tage nach Beginn des Ikterus auftritt (45).

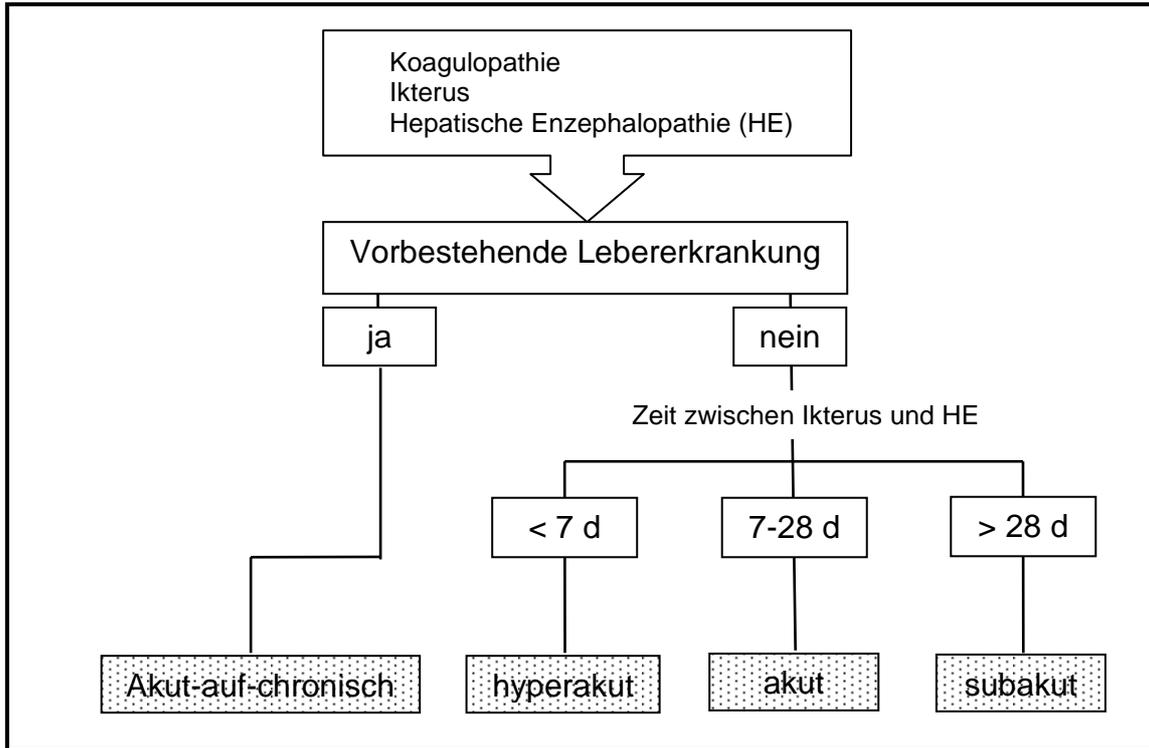


Abbildung 1 Differentialdiagnose bei Leberversagen. Das Zeitintervall zwischen Ikterus und hepatischer Enzephalopathie gibt Hinweise auf die Prognose; subakute Verlaufsformen haben eine höhere Letalität; d = Tage; HE= hepatische Enzephalopathie

Die Überlebensrate ohne Transplantation liegt zwischen 10% und bis zu 90%. Wird die Lebertransplantation und verbesserte interdisziplinäre Maßnahmen miteinbezogen, liegt die Überlebensrate bei 40% bis 90%, abhängig von der zugrunde liegenden Ursache (43). Dies stellt kein zufrieden stellendes Resultat dar.

Die assoziierte Enzephalopathie wird entsprechend der Schwere des Krankheitsbildes in 4 Stadien unterteilt: Stadium I ist durch Schlaf- und Konzentrationsstörungen sowie durch Veränderungen der Stimmungslage gekennzeichnet. In Stadium II kommen Desorientiertheit und Tremor dazu. In Stadium III besteht ein soporöser und in Stadium IV ein komatöser Bewusstseinszustand (29).

1.2 Pathogenese des akuten Leberversagens

Beim akuten Leberversagen sind, entsprechend der jeweiligen Ätiologie ausge dehnte Nekrosen und Zellfunktionsstörungen der Hepatozyten im histologischen Erscheinungsbild charakteristisch. Im Allgemeinen zählen zu den resultierenden klinischen Komplikationen hämodynamische Insuffizienz, hepatische

Enzephalopathie, Nierenversagen und Dysfunktion der Lebersynthese mit konsekutiver Einschränkung der plasmatischen Gerinnung (38).

Obwohl die Pathophysiologie nicht vollständig verstanden ist, werden zwei grundlegende Mechanismen für die Pathogenese des akuten Leberversagens diskutiert. Beide Mechanismen führen zu einer Veränderung des Plasmas bei akutem Leberversagen.

Zum einen aktivieren geschädigte Leberzellen im Rahmen einer Inflammation Immunzellen, eine entsprechende Zytokinantwort sowie die Produktion von Immunmodulatoren und verschiedener toxischer Substanzen.

Zum anderen resultiert eine Abnahme der Leberfunktionsleistung, die wiederum mit dem Verlust der Syntheseleistung, der metabolischen Leistung und der Detoxifikationsleistung einhergeht. Dieser Verlust der Detoxifikationsleistung führt zu einer Akkumulation zahlreicher wasserlöslicher Toxine wie Ammoniak und proteingebundener Toxine (2). Vor allem die proteingebundenen Toxine werden als Auslöser einer hepatischen Enzephalopathie, eines zerebralen Ödems, Komas, Nieren- und Kreislaufversagens in Zusammenhang gebracht. Multiorganversagen und Tod resultieren häufig ohne entsprechende Therapie (2). Es konnte nicht bei allen Substanzen nachvollzogen werden, über welchen Mechanismus es zur Zell- und Organschädigung kommt.

Es konnte aber gezeigt werden, dass Cholestase und hydrophobe Gallensalze bei Hepatozyten über Aktivierung des FAS-Rezeptor Apoptose induzieren können (14).

Das bedeutendste Transportprotein für hydrophobe Toxine im Plasma ist Albumin. Die physiologische Plasmakonzentration von Albumin liegt zwischen 3,4 - 4,5 g/dl, das Molekulargewicht beträgt 69 kDa. Die täglich synthetisierte Albuminmenge beträgt beim Mann 120-200 mg/kg Körpergewicht und bei der Frau 120-150 mg/kg Körpergewicht. Die physiologische Halbwertszeit von Albumin beträgt 17-27 Tage. Die Albuminsynthese ist aber bei eingeschränkter oder gar ausgefallener Lebersynthese entsprechend verringert. Im Leberversagen fallen nicht nur vermehrt Toxine an. Durch die verringerte Albuminsynthese ist somit zusätzlich die Transportkapazität für diese Toxine herabgesetzt. In Tabelle 2

sind einige an Albumin gebundene Toxine aufgeführt, die beim akuten Leberversagen pathophysiologisch relevant sind.

Tabelle 1 Albumingebundene Toxine mit pathophysiologischer Relevanz beim akuten Leberversagen (2;13).

<i>Albumingebundene Toxine</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Bilirubin • Fettsäuren • Tryptophan • Phenylalanin • Kupfer • Endogene Benzodiazepine • Kohlenwasserstoffe • Verschieden Peptide

Gewebeschäden, Infektionen und Traumata rufen bei Säugetieren eine Akut-Phase-Reaktion hervor. Durch diese Reaktion sollen weitere Gewebeschäden verhindert, eine potenzielle Infektion eingegrenzt und ein Prozess in Gang gebracht werden, der die Regeneration des Gewebes induziert. Am Beginn der Kaskade dieses Entzündungsprozesses stehen Gewebsmakrophagen oder Blutmonozyten. Mediatoren aus geschädigten Parenchymzellen, Mastzelldegranulation und Thrombozytenaktivierung bewirken eine Ausschüttung chemotaktischer Botenstoffe für Monozyten und Makrophagen, ähnlich wie bakterielle Toxine. Aktivierte Makrophagen wiederum schütten eine Vielzahl von Zytokinen aus, welche für die Pathogenese des Krankheitsbildes mitverantwortlich gemacht werden (4). Zytokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 9-54 kDa (6).

Bleibt diese Reaktion begrenzt auf den Gewebeschaden oder auf den Ort der Infektion, besteht eine Art Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Kräften. Erst bei einer Inbalance dieser zwei entgegen gerichteten Kräfte wirken diese Mediatoren toxisch (5). Hohe Serumkonzentrationen des Tumornekrose-Faktors (TNF)-alpha, Interleukin (IL)-1 beta und IL-6 im septischen Schock korrelieren mit der Schwere der Erkrankung und einer schlechten Prognose (17;40;56). Patienten im akuten Leberversagen weisen höhere Konzentrationen dieser Zytokine auf als Patienten mit einer entzündlichen Lebererkrankung.

kung oder im Vergleich zu Gesunden (23). Hohe Spiegel korrelieren signifikant mit der Schwere der hepatischen Enzephalopathie (46). Die Zytokine und die akkumulierten toxischen Substanzen schädigen nicht nur die Leber und andere Organe. Diese Zytokine und Substanzen scheinen zudem die Regeneration der Leber zu behindern (20;22)

1.3 Stand der Therapieverfahren beim akuten Leberversagen

Trotz der Fortschritte in der Therapie des akuten Leberversagens ist dieses Krankheitsbild für den Behandler nach wie vor eine Herausforderung mit hohen Mortalitätsraten.

In der Behandlung des akuten Leberversagens spielt die orthotope Lebertransplantation eine zentrale Rolle. Insgesamt 5%-12% aller Lebertransplantationen erfolgen aufgrund eines akuten Leberversagens (44). Vor einer Transplantation sollte jede Chance zu einer Erholung der Leberfunktion genutzt werden. Ist die Prognose jedoch infaust, muss schnellstmöglich eine Transplantation vor dem Auftreten lebensbedrohlicher Komplikationen wie Hirnödem, Blutungen oder Multiorganversagen angestrebt werden. Für diese Patienten wird von Eurotransplant in aller Regel innerhalb von 24-48 Stunden ein geeignetes Spenderorgan angeboten.

Limitierend für die Transplantation ist in zunehmendem Maße die mangelnde Verfügbarkeit von Spenderorganen (33). Dem steigenden Bedarf steht das knappe Angebot an Spenderorganen gegenüber. Welche Patienten sollten ein Transplantat bekommen?

Die Abschätzung der Transplantationsdringlichkeit erfolgt meist mittels der in den nachfolgenden Tabellen beschriebenen Prognosekriterien (11) (Clichy-Kriterien, Kings-College-Kriterien).

Tabelle 2: Kings-College-Kriterien zur Evaluierung der Transplantationsdringlichkeit bei akutem Leberversagen

<i>Kings-College-Kriterien bei akutem Leberversagen</i>	
Paracetamolintoxikation	Andere Ursachen
pH < 7.3	PTT>100s (INR > 6,5)
<i>Oder alle folgenden Kriterien:</i>	<i>Oder 3 der 5 folgenden Kriterien:</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Prothrombinzeit >100s (INR>6.5) • Kreatinin > 3.4 mg/dL • HE Grad III oder IV 	<ul style="list-style-type: none"> • Alter < 10 oder > 40 Jahre • HCV Infektion oder durch Medikamente induziert • Auftreten von Ikterus > 7 Tage vor HE • Bilirubin > 17.4 mg/dl • Prothrombinzeit > 50s

Der positive prädiktive Wert des Kings-College-Scores ist mit 85% hoch, der negative prädiktive Wert jedoch nur bei 65%. Das bedeutet, dass fast jeder zweite Patient, der nach dem Prognosescore *ohne* Transplantation überleben sollte, verstarb oder später doch transplantiert werden musste.

Tabelle 3 Clichy-Kriterien bei akutem Leberversagen viraler Genese zur Abschätzung der Transplantationsdringlichkeit

<i>Clichy – Kriterien bei akutem Leberversagen viraler Genese</i>
<p><i>Indikation zur Transplantation gegeben, wenn</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Faktor V < 20% (Alter < 30 Jahre) bzw. • Faktor V < 30% (Alter > 30 Jahre) <p><i>und</i></p> <p>hepatische Enzephalopathie (Verwirrtheit, Koma)</p>

Auch eine Bestimmung der Lebergröße durch Computertomographie (CT) wird als Kriterium zur Abschätzung der Transplantationsindikation eingesetzt. Eine Lebergröße unter 700 ml oder ein Ausmaß der Nekrose über 70% sind Zeichen einer schlechten Prognose und damit der Indikationen zur Lebertransplantation. Es wurde propagiert, dass Patienten mit einer Enzephalopathie Grad 3-4 bevorzugt lebertransplantiert werden sollten, da die Mortalitätsrate bei diesen Patienten gewöhnlich bei über 80% liegt. Jedoch nicht bei allen dieser Patienten

wäre tatsächlich eine Transplantation nötig. Patienten mit einer Enzephalopathie Grad 1-2 werden generell nicht gelistet, da hier die Mortalitätsrate bei unter 20% liegt. Manche dieser Patienten verschlechtern sich aber dennoch ohne eine Transplantation und versterben (8).

Ca. 40%-50% der Patienten mit akutem Leberversagen werden transplantiert. Bei bis zu 25% der Patienten werden Kontraindikationen für eine Transplantation festgestellt. Die übrigen Patienten versterben bereits aufgrund einer rapiden Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes, bevor ein Organ für eine Transplantation zur Verfügung steht (43).

Die Lebertransplantation nimmt als Therapieform des akuten Leberversagens trotz der aufgeführten Schwierigkeiten die wichtigste Stellung unter den Therapien ein. Gerade im Hinblick auf die Schwierigkeiten einer Lebertransplantation sind weitere Therapie- und Unterstützungsverfahren in Entwicklung und Erprobung.

Ein alternativer Therapieansatz stellt der komplette Plasmaaustausch dar, bei dem toxische Substanzen entfernt und die durch die eingeschränkte Syntheseleistung fehlenden Substanzen substituiert werden. Im Rahmen des kompletten Plasmaaustausches werden zwar die akkumulierten Toxine entfernt. Allerdings werden bei diesem Verfahren auch Substanzen entfernt, die eine Regeneration der Leber unterstützen könnten (19). Zudem sind große Mengen an Frischplasma erforderlich.

Weitere Therapiealternativen stellen zum einen *rein maschinelle, zellfreie, artifizielle* Verfahren wie die klassische Hämodialyse, oder das MARS[®]-(Molecular Adsorbent Recirculating System) oder das Prometheus[®]-System dar. Denen gegenüber stehen Bioreaktoren auf der Basis von *vitalen* Leberzellen und Verfahren zur extrakorporalen Leberperfusion.

Ziel dieser Verfahren ist es, möglichst selektiv diejenigen Substanzen aus dem Plasma zu entfernen, die für die Pathogenese des akuten Leberversagens verantwortlich gemacht werden. Dabei verfolgen diese Verfahren unterschiedliche Ansätze, auf die später genauer eingegangen wird. Ein wichtiges gemeinsames

Prinzip dieser Verfahren ist der Zeitgewinn. Durch eine gezielte Detoxifikation des Plasmas über einen bestimmten Zeitraum ließe sich die Zeit „überbrücken“, bis ein geeignetes Spenderorgan zur Verfügung steht (52).

Diesem Zeitfaktor kommt eine weitere wichtige Bedeutung zu. Die hohe Regenerationsfähigkeit der Leber ist bekannt, gerade bei der akuten Form des Leberversagens (30). Die Leberregeneration soll durch die Detoxifikation des Plasmas gefördert werden. Falls dennoch eine Lebertransplantation erforderlich werden sollte, könnte sich eine vorherige Detoxifikation des Plasmas positiv für das transplantierte Organ auswirken (31).

Die Entgiftung über eine Hämodialyse wie beim Nierenversagen ist beim Leberversagen nur eingeschränkt wirksam. Das liegt daran, dass hierbei Toxine, wie zum Beispiel Bilirubin, Gallensäuren und hydrophobe Aminosäuren, an Albumin gebunden sind und durch Hämodialyse oder Hämofiltration nur unzureichend aus dem Blut entfernt werden können. Es werden zwar Verbesserungen bestimmter Teilfunktionen der Leber erreicht. Die Mortalität wird durch eine Hämodialyse jedoch nicht gesenkt (15;27).

In der Pathogenese des akuten Leberversagens spielen Zytokine eine maßgebliche Rolle. Eine effiziente Elimination septischer Mediatoren ist mit den derzeit gängigen Verfahren der Hämodialyse nicht zu erzielen (10).

Artifizielle zellfreie Systeme, wie das erwähnte MARS- oder Prometheusverfahren, zielen vor allem auf eine Adsorption der an Albumin gebundenen, wasserunlöslichen Substanzen ab.

Bei dem *MARS[®]-Verfahren* wird die Methoden der Hämodiafiltration, der Adsorption und der konventionellen Hämodialyse miteinander kombiniert. Dafür wird venöses Blut des Patienten durch einen speziellen Dialysator geleitet, der so genannten *MARS[®]-Membran*. Auf der Dialysatseite der Membran zirkuliert eine fast 20-prozentige Albuminlösung, die so genannte „Waschlösung“. Aufgrund der speziellen Porengröße der Membran und des Konzentrationsgefälles zwischen der einen Seite der Membran und der anderen, gelangen eiweißgebundenen und wasserlöslichen Toxine von der Blut- auf die Dialysatseite. Die

„Waschlösung“ wird anschließend über eine Albuminpumpe an einem Low-Flux-Dialysator vorbei geleitet, wo wasserlösliche Giftstoffe entfernt werden. Danach wird die Albumin-Waschlösung gereinigt, indem das mit Toxinen „beladene“ Albumin über einen Kohleabsorber und einen Anionenaustauscher geleitet wird. Anschließend zirkuliert sie wieder zu der MARS®-Membran und kann so erneut Toxine aufnehmen (6;7).

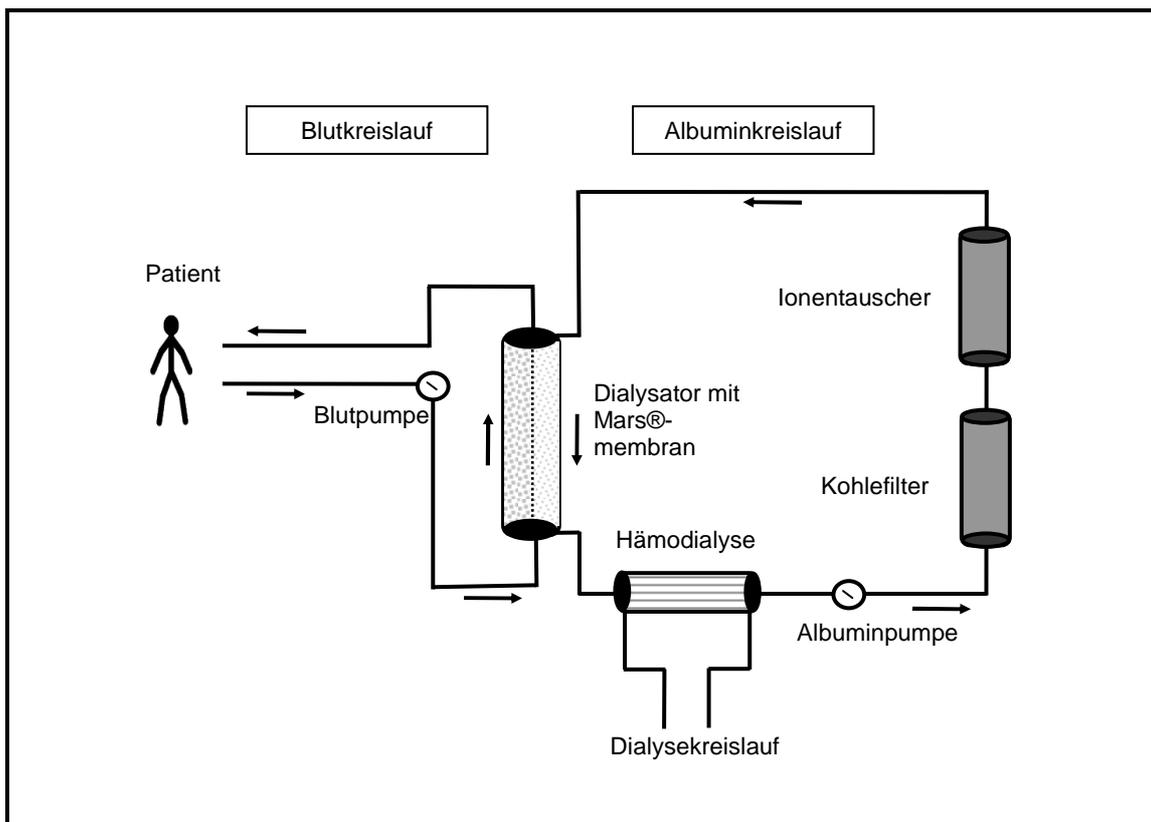


Abbildung 2 MARS®-Verfahren: In dem Mars®-Dialysator wird, abgetrennt durch die MARS-Membran, eine „Albuminwaschlösung“ am Patientenblut vorbei geleitet. Die im Patientenblut an Albumin gebundenen Toxine binden aufgrund des Konzentrationsgefälles an das Albumin der Waschlösung. Diese Lösung wird anschließend über einen Ionenaustauscher und Kohlefilter wieder aufgereinigt und steht danach dem erneuten Stoffaustausch zur Verfügung. Eine Hämodialyse zur Entfernung wasserlöslicher Toxine findet im Anschluss statt.

Das *Prometheus*[®]-Verfahren beruht auf dem Prinzip der fraktionierten Plasma Separation und Adsorption (FPSA). Dabei wird nach einer Separation des Plasmas durch einen albuminpermeablen Filter, diese Albuminfraktion direkt in einem Sekundärkreislauf aufgereinigt. Dazu passiert das separierte Albumin zwei Adsorber. Durch den direkten Kontakt mit den Adsorbentien gehen die albumin-gebundenen Toxine auf die Adsorbentien über. Anschließend wird noch zusätzlich eine „High-Flux“-Hämodialyse ergänzt, wodurch wasserlösliche Toxine entfernt werden (6). Eine Zuführung exogenen Albumins ist bei diesem Verfahren nicht notwendig.

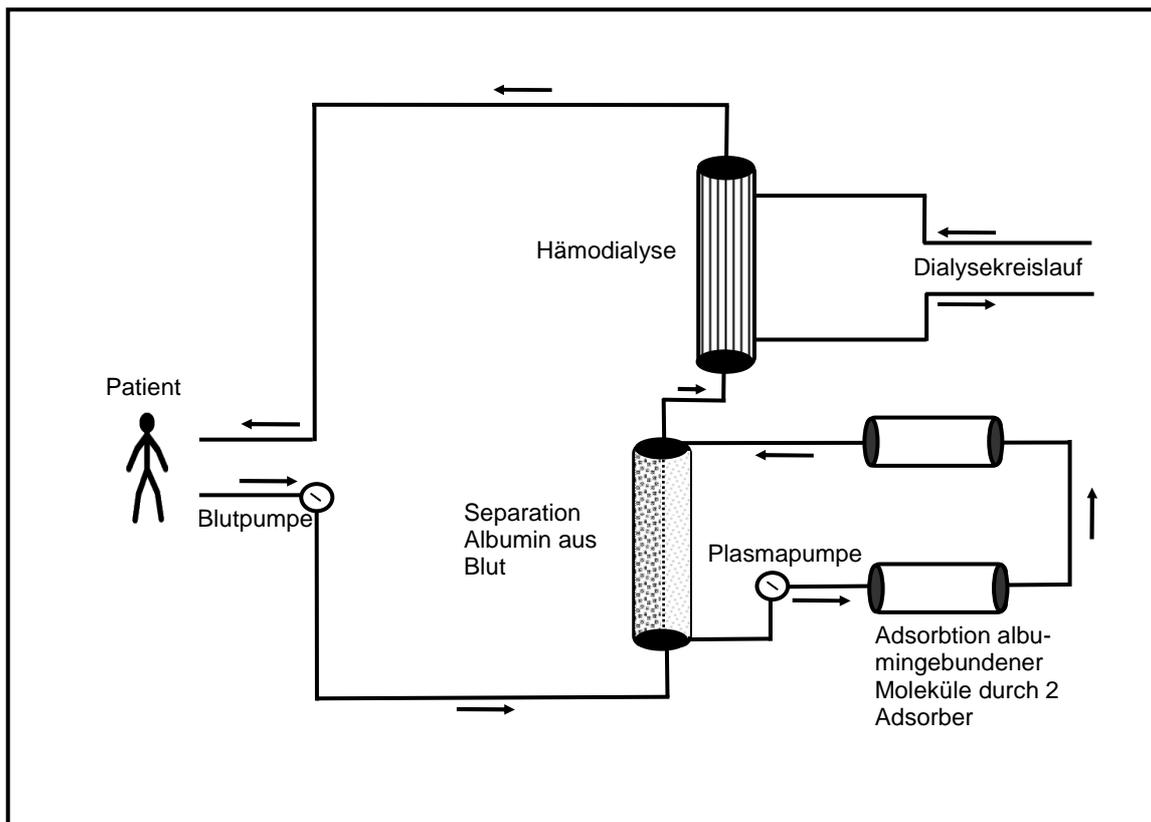


Abbildung 3 Prometheus[®]-Verfahren: Aus dem Blut wird Albumin separiert. Mittels zweier Adsorber werden die an das Albumin gebundenen Toxine entfernt. Anschließend erfolgt eine Hämodialyse zur Entfernung wasserlöslicher Toxine aus dem Blut.

Die beschriebenen artifiziiellen Systeme sind an die Dialyse angelehnt und sind vor allem auf eine Detoxifikation ausgerichtet.

Dagegen wird bei bioartifiziiellen Systemen eine biologische Komponente in Form vitaler Leberzellen integriert. Dadurch soll zum einen die Entgiftungsfunktion der Leber ersetzt werden. Zum anderen sollen diese Zellen einen Teil der Lebersynthese ersetzen (48).

Die Zellen für solche Systeme sind humanen oder tierischen Ursprungs. Bei xenogenen Hepatozyten werden meist Zellen von Schweinen verwendet. Porkine und humane Hepatozyten besitzen ähnliche physiologische Charakteristika und metabolische Funktionen. Aus diesem Grund gelten sie als am besten geeignet für einen Bioreaktor (9;26;36;41;50;57).

Grundsätzlich ergibt sich bei der Verwendung humaner Hepatozyten das Problem, diese in ausreichender Zellzahl zu erhalten. Transplantierbare Organe werden der konventionellen Lebertransplantation zugeführt. Die Zellen werden daher aus Leberresektaten, aus ungenutzten Spenderlebersegmenten, oder aus explantierten Organen gewonnen (49;52). In manchen Ländern wie Japan stehen ethische Grundsätze einer Verwendung von humanen Hepatozyten entgegen.

Bei Verwendung xenogener Hepatozyten steht die mögliche Übertragung von Zoonosen im Raum. Ein Beispiel hierfür ist das porkine endogene Retrovirus (PERV) (42). Zudem wird eine immunologische Reaktion mit einhergehender Immunisierung und Abstoßung bei Verwendung von Zellen dieses Ursprungs diskutiert. Trotz der Ähnlichkeiten porkiner und humaner Hepatozyten in ihrer Proteinbiosynthese wird diskutiert, ob tatsächlich die ausgefallene Syntheseleistung von porkinen Hepatozyten ersetzt werden kann.

Der Einsatz von Zellkulturreihen, wie den HepG2-Zellen, wird durch die eingeschränkte funktionelle Kapazität beschränkt (48).

Gegenstand intensiver Forschung ist es, möglichst funktionsfähige Hepatozyten in geeigneten Bioreaktoren zu kultivieren. Dabei kommen spezielle Matrices zum Einsatz, in welche die Zellen „gebettet“ werden. Eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung ist für die Funktionsfähigkeit der Zellen entscheidend

und wird durch den Aufbau des Bioreaktors mitbestimmt. Das Patientenblut wird über die Zellfraktion durch den Bioreaktor geleitet. Bei dem dabei stattfindenden Stoffaustausch soll das Plasma entgiftet und die fehlenden Syntheseprodukte ersetzt werden. Für viele Reaktormodelle stellt das umströmende Plasma gleichzeitig die einzige Nährstoffversorgung dar.

1.4 Toxizität des anhepatischen Plasmas auf Zellkulturen

Der Erhalt der hepatozellulären Funktion in einem Bioreaktor ist eine der größten Herausforderungen. Bei eingeschränkter Funktion der Zellen im Bioreaktor kann weder die Entgiftungs- noch die Syntheseleistung durch diese Zellen aufrechterhalten werden. Der Reaktor wäre ineffizient. Aus diesem Grund müssen möglichst optimale Kulturbedingungen für Hepatozyten geschaffen werden.

Dies gilt vor allem für die Nährstoffversorgung der Zellen. Diese Versorgung erfolgt, wie oben bereits erwähnt, bei vielen Reaktormodellen durch das anhepatische Patientenplasma selbst. Die Toxine und Zytokine in diesem Plasma sind aber potenziell zytotoxisch.

Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Toxizität von anhepatischem Plasma auf Zellkulturen sind uneinheitlich. Dies gilt sowohl für porkine als auch für humane Hepatozyten.

Porkine Hepatozyten waren der Arbeitsgruppe Uchino, Matsue et al. über einen Zeitraum von 3 und 5 Tagen weitgehend unempfindlich gegenüber einer Inkubation mit Plasma von Patienten mit Leberversagen (35;55). Beurteilt wurden Morphologie und metabolische Aktivität der Zellen. Die Zellen wurden sowohl in einem Bioreaktor als auch in Monoschicht kultiviert.

Dagegen waren porkine Hepatozyten in anhepatischem Schweineplasma in der Arbeitsgruppe Abrahamse SL et al. in ihrer metabolischen Aktivität bereits nach 24 Stunden eingeschränkt (1). Die Inkubation erfolgte in einem Bioreaktor. In der Arbeitsgruppe Cheng YB et al. konnte eine Schädigung der Zellkultur, die mit Plasma von Patienten mit schwerem Verlauf einer Hepatitis kultiviert wurde, bereits nach 5 Stunden beobachtet werden (9).

Die Ergebnisse zu den Auswirkungen des anhepatischen Plasmas auf humanen Hepatozytenkulturen sind ebenfalls uneinheitlich:

In der Arbeit von Mitry et al. wurden humane Hepatozyten in Monoschichtkultur mit Plasma von Patienten im akuten Leberversagen kultiviert. In dieser Arbeit waren die Zellen in ihrer Funktion und Aktivität nach 24 Stunden nicht beeinträchtigt (37).

Dagegen zeigte die Arbeit von Saich et al., dass anhepatisches humanes Plasma bei kultivierten humanen Hepatozyten bereits nach 4-6 Stunden Apoptose (51) induziert. Darüber hinaus konnten Unterschiede gezeigt werden, ob das Plasma von Patienten mit akutem oder akut-auf-chronischem Leberversagen stammte. Bei Kultivierung in Plasma eines akut-auf-chronischen Leberversagens zeigte sich die gleiche Apoptoserate wie bei Kultivierung in normalem Plasma. Zusätzlich wurde auch der Einfluss einer Detoxifikation des anhepatischen Plasmas untersucht. Dazu wurde vor die Zellkultur eine MARS-Dialyse geschaltet. Die Ergebnisse zeigten, dass dadurch zwar biochemische Parameter verbessert wurden, die Apoptoserate der Zellen blieb jedoch unbeeinflusst (51).

Zusammenfassend gilt der schädigende Einfluss anhepatischen Plasmas auf Zellkulturen als gesichert.

1.5 Fragestellung

Anhepatisches Plasma mit den darin enthaltenen Toxinen schädigt Hepatozytenkulturen. Für die Entwicklung eines Bioreaktors auf der Basis von Hepatozyten zur Therapie des akuten Leberversagens sind die Vitalität und die optimale Funktion der Leberzellen von zentraler Bedeutung.

Folgende Hypothese wurde in dieser Arbeit verfolgt: Freie oder an Proteine gebundene Toxine oder Entzündungsmediatoren lassen sich abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihren physikalischen Eigenschaften durch eine Filtration aus dem anhepatischen Plasma entfernen. Dadurch soll die Zellvitalität- und –aktivität der Hepatozyten in einem Bioreaktor auch in anhepatischem Plasma erhalten bleiben.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zum einen porcine Hepatozyten in Monoschichtkulturen in anhepatischem und filtriertem anhepatischem Schweineplasma kultiviert. Als zusätzliche Kontrolle diente ein Kompletmedium. Zur Herstellung der Filtrate wurde anhepatisches Schweineplasma mit Plasmafiltern filtriert (Fa Gambro®). Diese Filter besitzen unterschiedliche molekulare Ausschlussgrenzen (englisch: molecular weight cutoff). Durch diese Ausschlussgrenze sollen Moleküle nur bis zu dem jeweiligen, definierten Molekulargewicht in das Filtrat gelangen. Der cut-off point eines Filters gibt damit das Molekulargewicht an, bis zu welchem der Filter für Substanzen durchlässig ist.

Zudem wurden humane Hepatozyten ebenfalls in Monoschichtkulturen in gesundem, filtriertem, humanem Serum kultiviert.

Es soll dadurch gezeigt werden, durch welche cut-off-Grenze eines Filters die Toxizität des anhepatischen Plasmas auf Hepatozytenkulturen am effektivsten reduziert werden kann. Weiter soll gezeigt werden, in welchem dieser Filtrate die Zellvitalität und –aktivität der Hepatozyten am höchsten ist.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellpräparation

Geräte und Verbrauchsmaterial:

Blasenfalle	Eigenbau, Werkstatt Chirurgische Klinik
Edelstahlfilter	(200 µm) Weisse&Eschrich, Ludwigsstadt
Einfrierautomat Ice Cube	SY-LAB® 1800 D, Purkersdorf
Infusionssysteme	Braun, Melsungen
Mikroskop	Leico DM IRB, Bensheim
Rollerpumpe	Ismatec, Wertheim, Mondfeld
Venenverweilkanüle 18 G	Braun, Melsungen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zellschaber	Costar, Cambridge MA, USA

Chemikalien:

Aqua ad injectabilia	Ampuwa®, Fresenius, Bad Homburg
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Hans Mast, Tübingen
Collagenase CLS II	seromed®, Biochrom, Berlin
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma, Deisenhofen
HEPES-Stammlösung (1 M)	seromed®, Biochrom, Berlin
Kaliumchlorid	(KCl) Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	Merck, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat	(NaHCO ₃) Merck, Darmstadt
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1 M(NaOH)	Merck, Darmstadt
Percoll®	seromed®, Biochrom, Berlin Salzsäure
1 M (HCl)	Merck, Darmstadt
Trypanblau-Lösung	seromed®, Biochrom, Berlin

2.1.2 Zellkultur

Geräte und Verbrauchsmaterial:

Mikroskop	Olympus BH-2, Hamburg
Serum-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Vitalab Eclipse	Merck, Darmstadt
VivaspinnUltrafiltration	Vivascience, Hannover
Ultraschall-Homogenisator (Branson Sonifier B15)	Branson, Heusenstamm
Zellkulturplatten 3224	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten 3226	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg

Chemikalien:

Aqua dest.	Ampuwa®, Fresenius, Bad Homburg
BME Vitamin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Collagen CSP 0,3%	Pentapharm, Basel, Schweiz
Dexamethason	Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts
DMSO Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	seromed®, Biochrom, Berlin
2-Hydroxy-1,2,3-propantricarbonsäure	Merck, Darmstadt
Gentamycin-Stammlösung (10 mg/l)	seromed®, Biochrom, Berlin
Glucagon	Novo Nordisk, Mainz
GOT-Testsystem	Merck, Darmstadt
Heparin	Braun, Melsungen
Humanes Insulin 40 IE/ml	Insuman® Rapid Novo Nordisk, Mainz
HEPES-Stammlösung (1 M)	seromed®, Biochrom, Berlin
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt

L-Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
LDH-Testsystem	Merck, Darmstadt
L-Ornithin-HCL	Sigma, Deisenhofen
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (200 mM)	seromed®, Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
MEM Earle	seromed®, Biochrom, Berlin
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Williams E Medium	seromed®, Biochrom, Berlin

2.2 Methoden

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden an Schweinehepatozyten sowie an humanen Hepatozyten erarbeitet. Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen erfolgten unter sterilen Zellkulturbedingungen. Alle Zellmedien wurden steril filtriert.

2.2.1 Isolierung von Schweinehepatozyten

Die Bereitstellung der isolierten und kryokonservierten Schweinehepatozyten derselben Rasse (deutsche Landrasse), erfolgte durch den Tier-OP der Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Die Zellen stammten von gesunden Schweinen und wurden nach Hepatektomie im Rahmen einer Versuchsreihe isoliert. Die Zellen wurden in je 2 ml Röhrchen in einem Stickstofftank bei -165°C aufbewahrt.

2.2.1.1 Zellkultur Schweinehepatozyten

Als Zellkulturmedium wurde Williams E Medium verwendet. 500 ml Williams E Medium wurden supplementiert mit 10% FCS (Fetal Calve Serum), 20 mM HEPES-Lösung, 2 mM N-Acetyl-Alanyl-L-Glutamin, 0,01 mg/ml Gentamycin, 1,6 µg Dexamethason (Fortecortin), 9,1 pg/ml Glucagon und 0,125 U/ml Insulin. Die Zellkulturplatten mit je 24 Kavitäten wurden ohne ein Adhäsionssubstrat verwendet.

Die Röhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei ca. 37°C aufgetaut bis die Zellsuspension nur noch erbsengroße, gefrorene Stücke aufwies. Die aufgetauten Zellen wurden dann in 20 ml des auf 37°C vortemperier-

ten Zellkulturmediums resuspendiert. Nach dem Resuspendieren erfolgte die Zentrifugation über 10 Minuten bei 50·g und 4°C mit Bremse. Der Überstand wurde bis knapp über das Zellsediment abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Vor Aussaat der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellzahl entsprechend dem Versuchsaufbau verdünnt. Anschließend erfolgte die Aussaat der Hepatozyten auf die Zellkulturplatten, die im Brutschrank bei 37°C und 5% Co₂ inkubiert wurden.

2.2.1.2 Gewinnung des Schweineplasmas

Die Bereitstellung des Plasmas deutscher Landschweine erfolgte durch den Tier-OP der Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Das Plasma wurde aus anhepatischen Tieren gewonnen. Nach der Hepatektomie wurde zur Rekonstruktion des portalen Abflusses eine Y-Prothese eingesetzt. Über diese wurde die Vena cava mit der Vena portae End-zu-Seit und diese schließlich mit der thorakalen Vena cava anastomosiert. Die Schweine verstarben alle an Multiorganversagen (28).

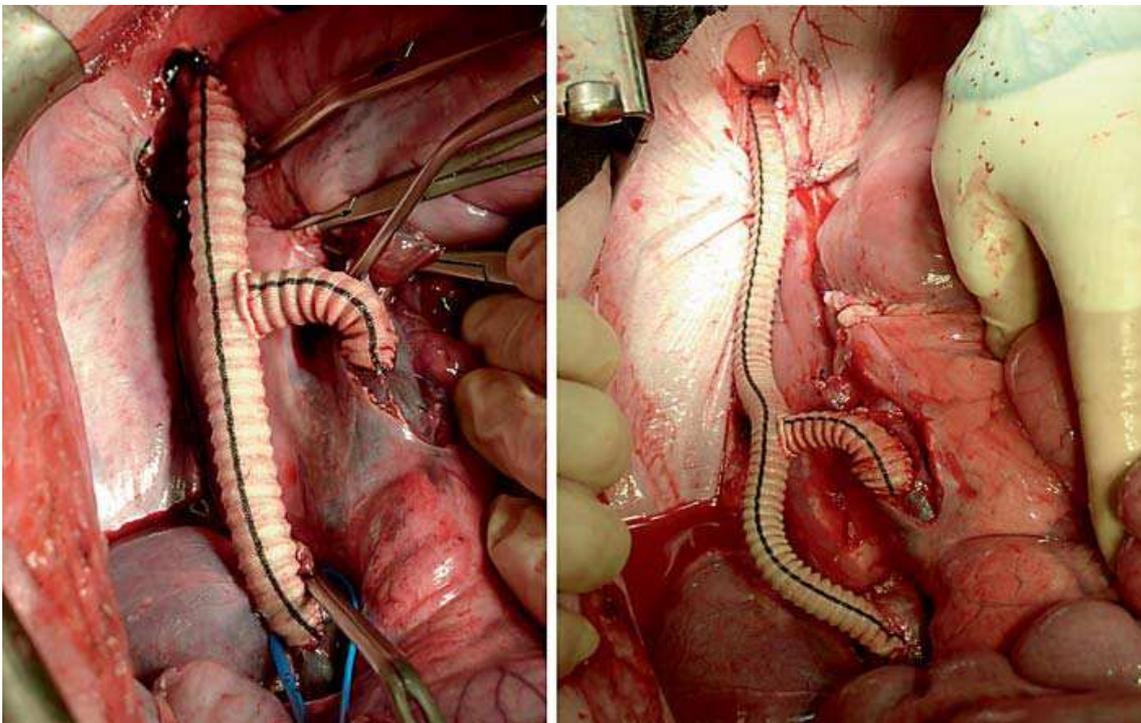


Abbildung 4 Intraoperativer Situs mit der Y-Prothese zur Rekonstruktion des portalen Abflusses. Über die Y-Prothese wird die Vena cava mit der Vena portae End-zu-Seit und diese schließlich mit der thorakalen Vena cava anastomosiert (28).

Zur Antikoagulation wurde jedem Plasmabeutel mit einem Gesamtvolumen von 500 ml insgesamt 70 ml einer kalziumbindenden Lösung zugegeben, mit einer Konzentration von Natriumcitrat 25,7g/l (Trinatriumcitrat Dihydrat, 2-Hydroxy-1,2,3-propantricarbonsäure, MG 294,1 g/Mol) und Zitronensäure 3,19 g/l (2-Hydroxy-1,2,3-propantricarbonsäure Monohydrat, MG 210,14 g/Mol)

Konzentration der Kalziumkomplexbildner gesamt:

$$\begin{array}{r} 0,087 \text{ Mol Natriumcitrat} \\ + 0,015 \text{ Mol Zitronensäure} \\ \hline = 0,102 \text{ Mol} \cdot 70/500 = \mathbf{14,3 \text{ mM}} \end{array}$$

Nach Zugabe von 70 ml Kalziumkomplexbildner wurde das Plasma bei -80°C gefroren.

2.2.1.3 Rekalzifizierung und Antikoagulation des Schweineplasmas

Vor der Zugabe des Plasmas auf die Zellkulturen musste das mit Kalziumkomplexbildnern versetzte Plasma äquivalent mit 15 mM CaCl₂ rekalzifiziert werden, um eine Schädigung der Zellkultur durch Entzug von Kalzium aus den Zellen zu vermeiden. Danach wurde es mit Heparin versetzt, um eine Gerinnung zu verhindern.

In einem 1. Vorversuch wurde in einer ansteigenden Verdünnungsreihe 1M CaCl₂ zu dem Plasma gegeben und jeweils die Gerinnbarkeit des Plasmas überprüft. Dazu wurden aus einer Serummonovette je 3 Kugeln des Polystyrol-Granulats in 2 ml Eppendorf-Gefäße gegeben. Anschließend wurde entsprechend der Verdünnungsreihe Plasma und CaCl₂ zugegeben und geschüttelt. Die Gerinnungszeit wurde für die jeweiligen Verdünnungsschritte erfasst.

Damit das rekalzifizierte Plasma nicht koaguliert, erfolgte die Zugabe von Heparin.

In einem zweiten Vorversuch wurde getestet, ob die Heparinisierung des rekalzifizierten Plasmas ausreichend ist. In drei 2 ml Eppendorf-Gefäße wurden je drei Kugeln des Polystyrol-Granulats aus einer Serummonovette gegeben. Anschließend wurden 985 µl Plasma, 15 µl CaCl₂ und 3 µl Heparin zugegeben und geschüttelt. In allen drei Versuchsansätzen war keine Gerinnungsaktivität feststellbar.

Für den Versuch wurden somit zu jeweils 9,85 ml Plasma 0,15 ml 1M CaCl₂ und 3 µl Heparin gegeben und anschließend geschüttelt.

2.2.1.4 Fraktionierung des anhepatischen Plasmas

Um Unterschiede zwischen filtriertem und nicht filtriertem anhepatischen Plasma zu untersuchen, wurde das Plasma von Schweinen im akuten Leberversagen mit drei Plasmafiltern unterschiedlicher molekularer Ausschlussgrenzen (englisch: molecular weight cut off; Einheit: Dalton) filtriert (Firma Gambro®). Vor der Filtration wurde das tiefgefrorene, anhepatische gepoolte Schweineplasma im Wasserbad bei ca. 37°C aufgetaut.

Tabelle 4 Filterbezeichnung und Filtergrößen für die Filtration des anhepatischen Schweineplasmas

<i>Filterbezeichnung</i>	<i>Versuchsbezeichnung</i>	<i>Filtergröße (cut-off)</i>
14L	F ₁	10 kDa
P1SH	F ₂	45 kDa
ProSep	F ₃	100 kDa

Der Filter mit kleinen Membranporen (low flux) und der Bezeichnung 14L hat einen niedrigen molekularen Cut-Off von 10.000 Da. Der Filter mit größeren Membranporen (high flux) und der Bezeichnung P1SH hat einen Cut off von 45.000 Da. Der Filter mit den größten Membranporen und der Bezeichnung Prosep hat eine Ausschlussgrenze von 100.000 Da.

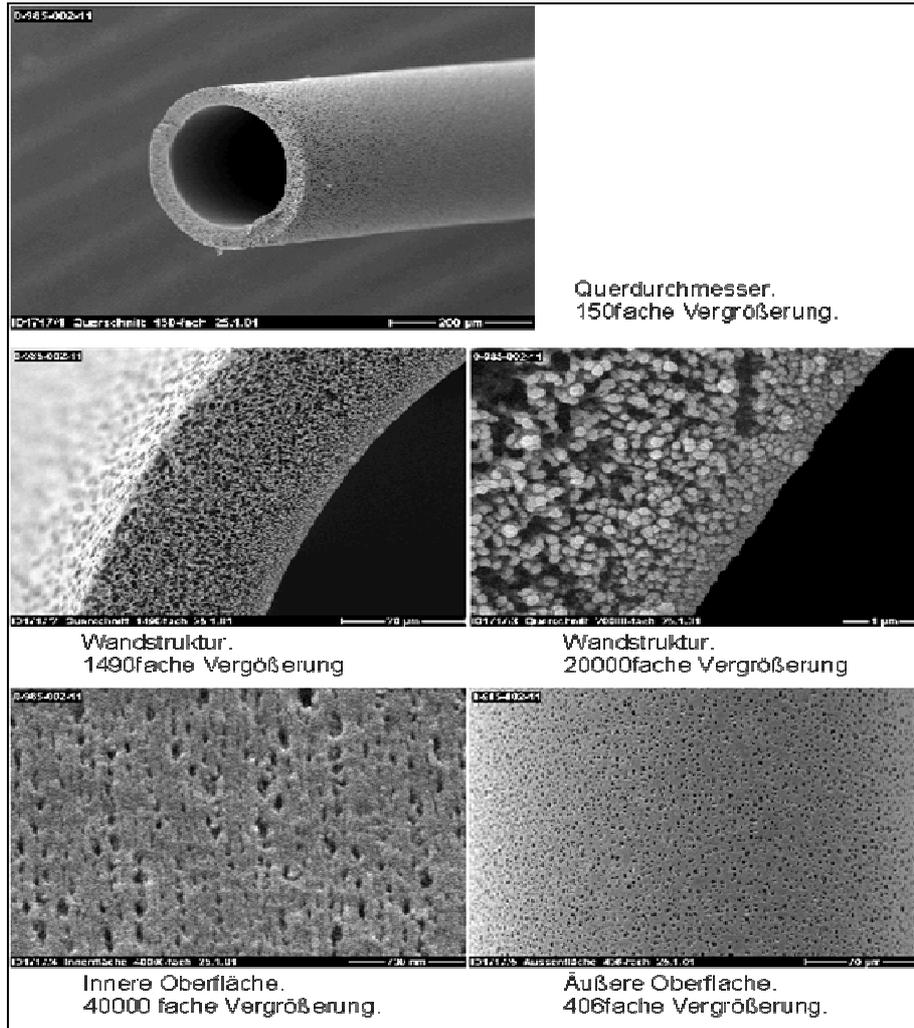


Abbildung 5 Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 2 zeigen den Querschnitt einer Kapillare sowie dessen Wandstruktur des P1SH-Filters (39).

Vor dem Filtrieren wurden jeweils 10 ml Fraktionen des anhepatischen Plasmas aliquotiert. Dieses Volumen wurde unter der Reinraumwerkbank über eine Pumpe durch den Filter geleitet. Das erhaltene Filtrat und der Rückstand wurden separat aufgefangen. Der verbleibende Rückstand (Pool) wurde aufbewahrt. Die Rückstände wurden analog zu der Bezeichnung des Filtrats im Versuch mit P₁, für den Rückstand aus dem 14L Filter, mit P₂ für den aus dem P1SH Filter und mit P₃, für den Rückstand aus dem Prosep Filter bezeichnet.

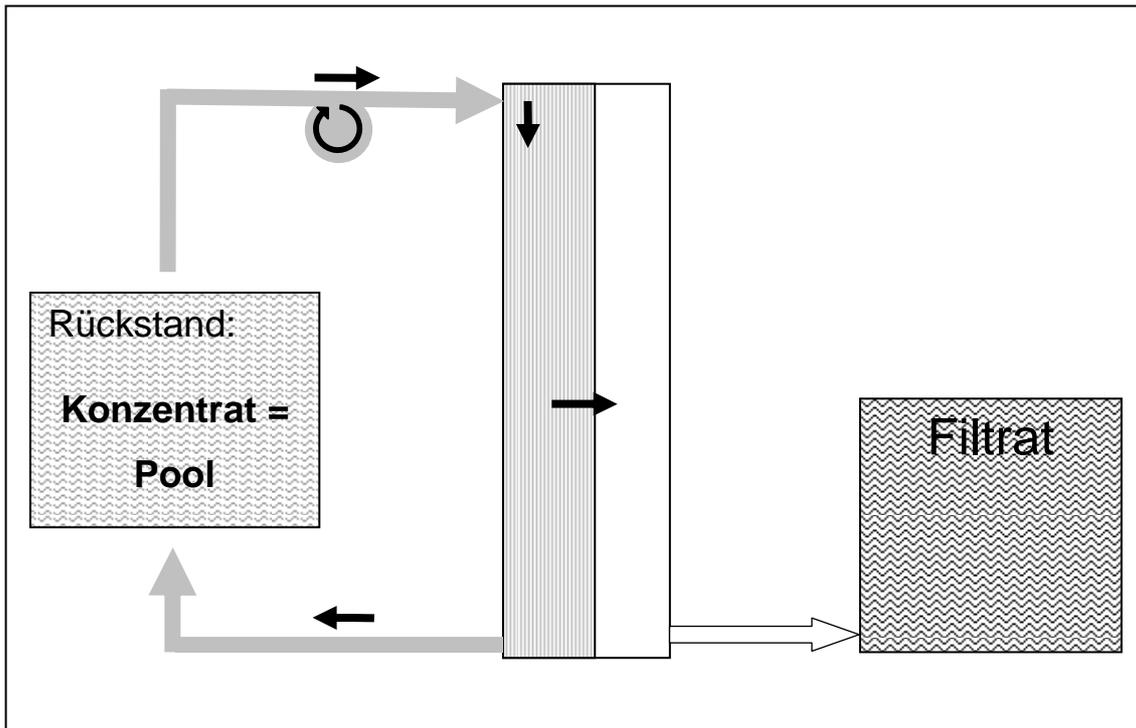


Abbildung 6 Schema der Filtration des anhepatischen porkinen Plasmas

2.2.1.5 Versuchsaufbau Schweinehepatozyten in fraktioniertem Schweineplasma

Es wurden Hepatozyten aus zwei Isolierungen verwendet. Innerhalb einer Versuchsanordnung stammten die Leberzellen von demselben Tier. Die Hepatozytenkulturen wurden mit den drei unterschiedlichen Filtraten des anhepatischen Plasmas beschichtet. Als Vergleich dienten unfiltriertes anhepatisches Plasma, die jeweiligen Rückstände (Pools) der Filtrate und Williams E Medium Vollmedium.

Der Vergleich Filtrat vs. anhepatisches Plasma dient der Beantwortung der zentralen Frage dieser Untersuchung. Durch ihn soll gezeigt werden, ob eine Filtration des anhepatischen Plasmas toxische Substanzen entfernen kann und somit die Zellvitalität einer Zellkultur verbessert wird.

Die weiteren Vergleichsparameter dienen der genaueren Untersuchung der unterschiedlichen Plasmafraktionen und ihren Einflüssen auf das Zellwachstum. In dem Vergleich Filtrat vs. Medium sollen Unterschiede zwischen filtriertem, anhepatischem Plasma und einem optimierten Komplettmedium gezeigt wer-

den. Das verwendete Williams E Medium gilt als ein „optimales Nährmedium“ für porkine Hepatozyten.

Durch den Vergleich Filtrat vs. entsprechendem Rückstand soll untersucht werden, inwieweit Toxine durch den jeweiligen Filter zurückgehalten werden und im Pool konzentriert werden, bzw. inwieweit sie durch den Filter in das Filtrat übergehen.

Ausgesät wurden Zellkulturplatten mit jeweils 24 Kavitäten. Das Volumen pro Kavität betrug nach dem Aussäen 1ml/Vertiefung, die Zellzahl der Suspension wurde auf $3,2 \cdot 10^5$ Zellen/ml titriert. Die Lyse- und Messzeitpunkte waren nach 4, 24 und 48 Stunden. Pro Lysestunde wurden jeweils zwei Zellkulturplatten (Platten Nummer 1-6) ausgesät. Zur Ermittlung des Null-Stundenwertes wurde eine Zellkulturplatte (Nummer 7) ausgesät, die vor Beginn der Plasmazugabe lysiert wurde (0h). Eine weitere Platte (Nummer 8) wurde zur Bestimmung des Zeitpunktes des Versuchsbeginns ausgesät (siehe Abbildung).

Für jede Plasmafraktion und jedes Vergleichssubstrat wurden zu jeder Lysestunde jeweils 3 Wells angelegt. Der komplette Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte über die LDH- und GOT-Enzymaktivität sowie über die Morphologie der Hepatozyten.

Platten 1-6

	Lysestunde 4, 24, 48					
	1	2	3	4	5	6
A	F ₁	F ₁	F ₁	F ₂	F ₂	F ₂
B						
C	P ₁	P ₁	P ₁	P ₂	P ₂	P ₂
D						

	Lysestunde 4, 24, 48					
	1	2	3	4	5	6
A	F ₃	F ₃	F ₃	Medium _____		
B						
C	P ₃	P ₃	P ₃	Anhepat. Plasma _____		
D						

Platte 7

	1	2	3	4	5	6
I	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
II	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
II	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
D						

Platte 8

	1	2	3	4	5	6
A						
B	Tag 0 Lyseplatte					
C						
D						

Abbildung 7 Versuchsanordnung auf den Zellkulturplatten: Platten 1-8: Anordnung der Testmedien auf den Kulturplatten; F=Filtrat; P=Pool; Nummer 1=14L; Nummer 2= P1SH; Nummer 3=Prosep; Platte 1-6: Lyseplatte der Filtrate und der Kontrollen nach 4, 24, 48 Stunden; Platte 7: Ermittlung des Null-Stundenwertes; Platte 8: Ermittlung des Versuchsbegins;

2.2.1.6 Spülen der Zellen und Mediumwechsel

Bis zum Zeitpunkt der Zugabe der zu testenden Filtrate wurden nach jeweils 24 Stunden nicht adhärenz oder tote Zellen durch dreimaliges Spülen mit je 1 ml PBS entfernt und frisches Williams E Vollmedium zugegeben.

2.2.1.7 Bestimmung des Zeitpunktes des Versuchsbegins

Um eine möglichst stabile Zellkultur für die Versuchsdurchführung zu erhalten, wurden die Zellen zuerst in Williams E Vollmedium kultiviert, bis sich die Zellkul-

tur stabilisiert hatte. Um diesen Zeitpunkt zu ermitteln, wurden jeden Tag aus Platte 8 die LDH- und GOT-Werte bestimmt, bis die Enzymaktivität nach einem initialen Anstieg ein Plateau erreicht hatte.

2.2.1.8 Zugabe der unterschiedlichen Testmedien

Am 6. Tag der Kultur wurden die unterschiedlichen Plasmafraktionen und die Vergleichsmedien auf die Hepatozyten gegeben. Dazu wurde das vorhandene Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit je 1ml PBS gespült und dann pro Vertiefung 500 µl des entsprechenden Testmediums gegeben.

2.2.2 Humane Hepatozyten

Humanes Lebergewebe verschiedener Patienten wurde freundlicherweise von der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Eberhard-Karls-Universität zur Verfügung gestellt. Die Gewebeentnahme erfolgte nach Zustimmung der Patienten und Genehmigung durch das lokale Ethikkomitee. Humane Hepatozyten wurden aus Gewebeproben isoliert, die im Rahmen von Leberteilresektionen bzw. -transplantationen reseziert wurden. Das Probengewicht der Leberresektate betrug zwischen 400g und 600g. Ein möglichst großer Teil der Oberfläche sollte von der Glisson'schen Kapsel umgeben sein. Tumore oder bekannt virusinfiziertes Material wurde ausgeschlossen. Die Gewebeproben wurden zum Transport in ein steriles Transportgefäß überführt und unmittelbar nach der Gewebeentnahme aufbereitet.

2.2.2.1 Präparation humaner Hepatozyten

Die Hepatozytenisolierung aus Leberresektaten erfolgte mittels einer Enzymlösung, die sowohl arteriell als auch portal injiziert wurde. Die Perfusion wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die eingesetzten Glaswaren und das chirurgische Besteck wurden 2 Stunden bei 180°C, die Kunststofffilter 5 Stunden bei 130°C sterilisiert.

Herstellung der Perfusionslösungen:

Stammlösung A enthielt 2,3 M NaCl und Stammlösung B 0,5 M NaHCO₃.

Stammlösung C bestand aus 0,118 M KCl, 23,6 mM MgCl₂·6H₂O, 24,6 mM

NaH₂PO₄ und 23,9 mM Na₂SO₄. Stammlösung D enthielt 50 mM CaCl₂. Außerdem wurde eine 1 M EGTA-Stammlösung hergestellt.

Perfusionslösung 1 bestand aus je 50 ml Stammlösung A, B und C sowie 2 ml der EGTA-Stammlösung und 20 ml der HEPES-Stammlösung ad 1 l Aqua ad injectabilia. Der pH-Wert wurde gegebenenfalls mit 1 M NaOH auf 7,4 korrigiert. Perfusionslösung 2 bestand aus je 50 ml Stammlösung A, B, C und D sowie 20 ml der HEPES-Stammlösung ad 1 l Aqua ad injectabilia. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,2 eingestellt.

Beide Lösungen wurden über eine Zellulose-Azetat-Membran mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm sterilfiltriert, eine Stunde im Wasserbad auf 41°C temperiert und während dieser Zeit mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Erst unmittelbar vor der Perfusion wurde die Kollagenase mit 1mg/ml Kollagenase CLS II (282 U/mg) in der Perfusionslösung 2 aufgelöst und sterilfiltriert.

Aufbau des Perfusionssystems:

Die Perfusionslösungen wurden auf 41°C konstant erwärmt. Über eine Rollerpumpe wurde die Perfusionslösung zuerst über eine Blasenfalle geleitet. Von dort führte ein weiterer Silikonschlauch, an dessen Ende sich eine sterile Spitze eines peripheren Venenverweilsystems befand, zum Resektat. Das Leberresektat wurde in einer sterilen Kristallierschale gelagert. Die in der Schale aufgefangene Perfusionslösung wurde über eine Rollerpumpe wieder zu der im Wasserbad befindlichen Perfusionslösung (KH II) zurückgeleitet.

Zur Injektion der Enzymlösung wurde ein großes, möglichst zentral gelegenes Gefäß mit einem Venenverweilsystem mit einem Durchmesser von 14G kanüliert. Über diese Vene sollte durch die Perfusion ein möglichst großer Teil des Resektates erfasst werden. Dies wurde durch die Abblassung des erfassten Gewebes erkennbar.

Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 74 ml/min. Zuerst wurde das Gewebe mit 1 Liter der Perfusionslösung 1 Krebs-Henseleit Puffer I (KH I) perfundiert. Anschließend erfolgte eine zirkulierende Perfusion mit 300-500 ml der Perfusionslösung 2 KH II (mit Ca²⁺) mit 1 mg/ml Kollagenase (Biochrom CLSII, 282 U/mg).

Die Perfusionsdauer betrug, je nach Konsistenz des Resektates, ungefähr eine Stunde.

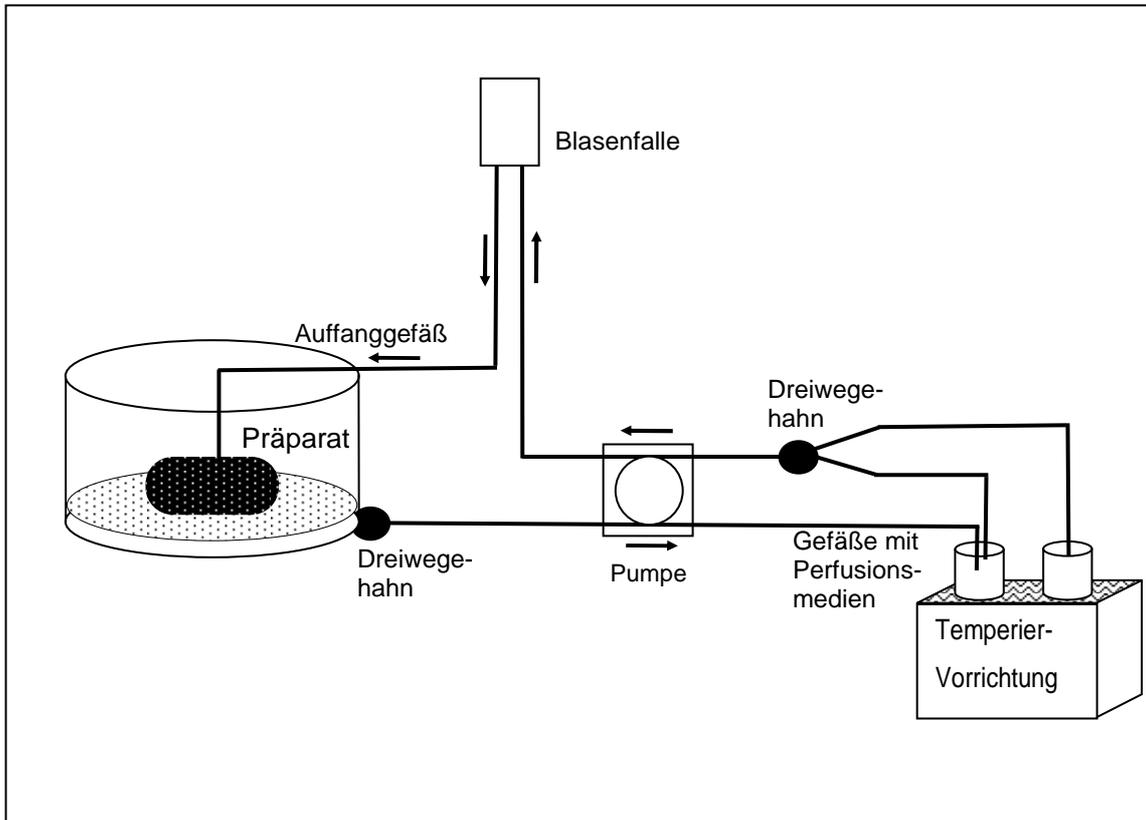


Abbildung 8 Aufbau der Perfusionsapparatur für die Isolierung humaner Hepatozyten aus humaner Leber.

Nach der enzymatischen Andauung der Gewebeprobe wurde die umgebende Kapsel mit einem Skalpell inzidiert. Die Leber wurde mit einem Zellschaber über einen Edelstahlfilter (Porengröße: 200 μm) ausgestrichen, das Bindegewebe entfernt und die ausgeschabten Zellen mit warmer Perfusionslösung 2 gespült. Das verbliebene Bindegewebe bzw. ungenügend lysierte Gewebe wurde verworfen. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt. Diese wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, bis sich die Zellen unter Sichtbarwerden einer Trennlinie abgesetzt hatten. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in neuem KH II resuspendiert. Auf diesem Weg ließ man die Zellsuspension dreimal sedimentieren. Bei schlechter Sedimentation der Zellen wurde die Zellsuspension vorsichtig über ein 40% Percoll[®]-Dichtekissen mit der Dichte 1,065 g/ml (Fa Biochrom) überschichtet und zehn Minuten bei

300g zentrifugiert. Die Zentrifuge ließ man ungebremst auslaufen, um eine Verwirbelung der Zellen beim Abbremsen zu vermeiden. Nicht vitale Hepatozyten sowie nicht-parenchymatöse Zellen verblieben dabei im Überstand, während vitale Hepatozyten als Niederschlag abschieden. Der erhaltene Zellschlag wurde in Zellkulturmedium für humane Hepatozyten resuspendiert und erneut bei 50g 7-10 Minuten gewaschen, um die zelltoxische Percoll[®]-Lösung zu entfernen. Die in diesen Versuchen verwendeten Zellen sedimentierten ohne Percoll[®].

2.2.2.2 Einfrieren humaner Hepatozyten

Zum Einfrieren der Zellen wurde eine 12%ige DMSO- und eine 16%ige DMSO-Lösung in MEM-Vollmedium hergestellt. Beide Lösungen wurden auf Eis gelagert.

Die Zellsuspension wurde auf die gewünschte Zellzahl ($3 \cdot 10^6$ Zellen/2ml Tube) verdünnt und daraufhin bei 15·g, 10 Minuten, gekühlt, mit Bremse zentrifugiert. 66% des entstandenen Überstandes wurden abgesaugt, die Zellen im Restmedium resuspendiert. Mit der 12%igen DMSO wurde langsam auf die Hälfte des Ausgangsvolumens aufgefüllt, die Zellen darin resuspendiert und 5 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde mit der 16%igen DMSO-Lösung auf das totale Ausgangsvolumen wieder aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde mit je 2 ml und $8 \cdot 10^6$ Zellen über den Ice Cube Einfrierautomat eingefroren und nach 24 Stunden bei -165°C im Stickstofftank weiter gelagert.

2.2.2.3 Zellkultur Humane Hepatozyten

Als Zellkulturmedium wurde MEM Earle (FA Biochrom) verwendet. 500 ml MEM Earle wurden supplementiert mit 0,2 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,02 g/l L-Ornithin-HCL, 1% BME Vitamin-Lösung, 1% Humanes Serum, 4 mIU/ml Humanes Insulin, 0,05 g/l L-Ascorbinsäure, 20 mM HEPES-Lösung, 50 µg/ml Gentamycin-Lösung, 8 µg/ml Dexamethason (Fortecortin) und 2 mM N-Acetyl-Alanyl-L-Glutamin.

Für die Zellkultur wurden Zellkulturplatten mit je 24 Kavitäten verwendet, die mit Collagen CSP als Zelladhäsionssubstrat beschichtet wurden. Zur Beschichtung wurde in jede Vertiefung etwa 1 ml Collagen CSP 0,06 % pipettiert, das dann

10 Minuten lang einwirkte und nach dem Absaugen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur trocknete. Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von $3,2 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät.

2.2.2.4 Humanes Serum

Das für den Versuch verwendete humane Serum wurde aus dem Blut eines gesunden Erwachsenen gewonnen. 125 ml humanes Blut und die Kugeln des Polystyrol-Granulates aus zwei Serummonovetten wurden in 50 ml Röhrchen überführt. Das Blut ließ man 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln stehen. Anschließend wurde es bei $150 \cdot g$ 20 Minuten zentrifugiert, das entstandene Serum entnommen.

2.2.2.5 Fraktionierung des humanen Serums

Zur Fraktionierung des Serums wurden Falcon Vivaspin Filtrations Tubes mit den molekularen Trennschärfen von 5, 10, 50 und 100 kDa verwendet. In jedes der so genannten Filtrations-Tube wurden 13 ml Serum gegeben und 60 Minuten bei $250 \cdot g$ zentrifugiert. Pro Fraktion konnten etwa 3,5 ml Filtrat gewonnen werden, zu denen jeweils 20 μ l Gentamycin zugesetzt wurde.

2.2.2.6 Versuchsaufbau fraktioniertes Serum auf humane Hepatozyten

Für die Hepatozyten-Kulturen wurden zwei Zellkulturplatten mit je 24 Kavitäten mit Collagen CSP als Zelladhäsionssubstrat beschichtet. Die kryokonservierten Hepatozyten stammten alle aus demselben Leberresektat. Die Zellen wurden zunächst auf beiden Platten für 24 Stunden in dem Zellkulturmedium MEM Earle kultiviert.

Auf der Zellkulturplatte 1 wurden danach alle Zellen gespült und die Zellen für den Lysetag 0 lysiert. In die verbleibenden Vertiefungen für die Lysetage 1-7 wurden 0,66 ml der unterschiedlichen Serumfraktionen zu den Zellen gegeben. In der Reihe 1A-D der Zellkulturplatte wurden die Zellen ausgesät, die für den 0-Stunden Wert lysiert wurden. In den Reihen 2-5A-D wurde das fraktionierte humane Serum nach 24 Stunden in Zellkultur auf die Hepatozyten gegeben. P_5 steht für die molekulare Trennschärfe 5 kDa, P_{10} für 10 kDa, P_{50} für 50 kDa und P_{100} für 100 kDa. Die Reihen 6A-D der Zellkulturplatte dienten zur Reserve.

Die Zellen wurden an den Tagen 0, 1, 3, 5 und 7 lysiert und die LDH-Enzymaktivität gemessen.

Auf der Zellkulturplatte 2 wurden ebenfalls nach 24 Stunden alle Zellen gespült und die Zellen für den Lysetag 0 lysiert. In die verbleibenden Vertiefungen für die Lysetage 1-7 wurde je 0,8 ml humanes, unfraktioniertes Serum desselben Spenders zu den Zellen gegeben. Für jeden Lysetag wurden zwei Vertiefungen angelegt.

	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Reserve
	1	2	3	4	5	6
A		P ₅				
B		P ₁₀				
C		P ₅₀				
D		P ₁₀₀				

Abbildung 9 Zellkulturplatte 1: Anordnung der zu testenden Serumfraktionen auf der Zellkulturplatte; Molekulare Trennschärfen: P₅=5kDa; P₁₀=10kDa; P₅₀=50 kDa; P₁₀₀=100kDa

	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Reserve
	1	2	3	4	5	6
A		HS	HS	HS	HS	HS
B						
C		HS	HS	HS	HS	HS
D						

Abbildung 10 Zellkulturplatte 2: Anordnung auf der Zellkulturplatte; HS=humanes Serum

2.2.3 Bestimmung von Zellvitalität und Ausbeute

Die Zellvitalität und Zellausbeute wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit der Trypanblau-Methode analysiert. Tote Zellen färben sich bei dieser Methode blau an, da der Farbstoff wegen eines Membrandefektes die Zellmembran passieren kann. Vitale Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Dazu wird eine Zellsuspension mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung versetzt. Der Verdünnungsfaktor von Zellsuspension und Trypanblau betrug 1:10 bis 1:100, je nach erwarteter Zellkonzentration in der Suspension. Zur Zellzahlbestimmung wurden vier Quadranten mit einem Einzelvolumen von jeweils 0,1 µl ausgezählt. Die Zellausbeute ließ sich dann wie folgt aus dem Volumen der Zählkammer berechnen:

$$\frac{\text{Zellzahl in 4 Quadranten}}{4} \cdot 10 \cdot 10^4 = \text{Zellzahl/ ml}$$

Die relative Zellaktivität ließ sich dann errechnen als das Verhältnis:

$$\frac{\text{Vitale Zellen}}{\text{Tote + Vitale Zellen}} \cdot 100 = \text{Vitalität in Prozent}$$

2.2.4 Lyse der Zellen

Zu den Lysestunden wurde das jeweilige Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS pro Vertiefung gespült. Daraufhin wurde in jede Vertiefung 500 µl PBS gegeben und die Zellen darin mit dem Lysestab durch Ultraschall lysiert. Die unterschiedlichen Proben wurden bis zur Auswertung in 0,5 ml Eppendorf Gefäßen im Kühlschrank bei 7°C aufbewahrt.

2.2.5 Bestimmung von LDH und GOT

Als Beurteilungsparameter diente neben der Beurteilung der Zellmorphologie die LDH- und GOT-Enzymaktivität. Im Zelllysate wurden die Aktivitäten der Lactatdehydrogenase und der Aspartat- Aminotransferase enzymologisch im Laboranalysegerät „Vitalab Eclipse“ bestimmt.

Die Aktivität dieser Enzyme ist proportional zum Anteil des Zellzytosols. Die GOT ist ein leberspezifisches Enzym. Die Aktivität ist nur von den Hepatozyten

abhängig und nicht durch äußere Einflüsse beeinflussbar. Damit können über diese Parameter die Zellzahl und –aktivität beurteilt werden.

Die Messung der Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT/ASAT) erfolgte im zusammengesetzten optischen Test, bei dem L- Aspartat und 2-Oxalglutarat durch die GOT zu Oxalacetat und L-Glutamat umgesetzt werden. Im nächsten Schritt, einer Malat- Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion, reagieren Oxalacetat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Malat und NAD^+ . Der NADH_2 -Verbrauch in der Zeiteinheit wird photometrisch gemessen.

Die Lactatdehydrogenase (LDH) wird nach der Reaktion:



photometrisch über die Abnahme der Extinktion des NADH_2 quantitativ mit Hilfe des LDH-Testsystems im Laboranalysegeräte bestimmt.

2.2.6 Statistische Methode

Verwendet wurden SPSS 16.0, Microsoft Word[®] und Microsoft Excel[®] zur Erstellung dieser Arbeit.

Zur Berechnung der Relationen der Enzymaktivitäten wurde bei dem Versuch mit dem fraktionierten Schweineplasma bei beiden Versuchsdurchläufen separat der Mittelwert aus den pro Lysestunde erhaltenen drei Messergebnissen gebildet. Die Ausgangsaktivität zur Stunde 0, das heißt, der Wert vor Zugabe der unterschiedlichen Testmedien, wurde gleich „eins“ gesetzt.

Um eine direkte Aussage über das Verhalten der unterschiedlichen Plasmafraktionen gegenüber den Vergleichsparametern treffen zu können, wurde der Quotient aus den jeweiligen Filtraten zu den jeweiligen Vergleichsparametern für jeden der beiden Versuchsdurchläufe getrennt gebildet. Aus den erhaltenen Relationen beider Läufe wurden der Mittelwert und der SEM (englisch: Standard Error Of The Mean) berechnet. Die erhaltene relative Enzymaktivität wurde in Abhängigkeit zur Zeit aufgetragen.

Für den Vergleich der unterschiedlichen Plasmafraktionen auf humane Hepatozytenkulturen wurde zum einen die absolute LDH-Enzymaktivität über die Zeit aufgetragen. Zum anderen wurde für den Vergleich mit dem unfraktionierten humanen Serum der Quotient aus der Enzymaktivität der unterschiedlichen Se-

rumfraktionen und der Enzymaktivität des unfiltrierten Serums gebildet und über die Zeit aufgetragen.

Zum Vergleich der LDH- bzw. GOT-Quotienten Filtrat/anhep. Plasma, Filtrat/Medium und Filtrat/Konzentrat (4h, 24h, 48h) wurde eine univariate Varianzanalyse mit Bonferroni post hoc Tests verwendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant betrachtet. Die Rechnung wurde mit SPSS 16.0 durchgeführt.

Ergebnisse

3.1 Zellkulturen mit Schweinehepatozyten

3.1.1 Bestimmung des Zeitpunktes der Plasmazugabe

Zur Testung des Einflusses unterschiedlicher Plasmafraktionen ist eine stabile Zellkultur notwendig. Änderungen der Enzymaktivitäten oder der Vitalität der Zellen sollten allein auf die Einflüsse des Plasmas zurückzuführen sein. Vor der Zugabe der Plasmafraktionen wurden die Schweinehepatozyten deshalb zuerst in Williams E Vollmedium kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch tägliches Spülen entfernt. Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Plasmazugabe wurde täglich die LDH- und GOT-Enzymaktivität bestimmt.

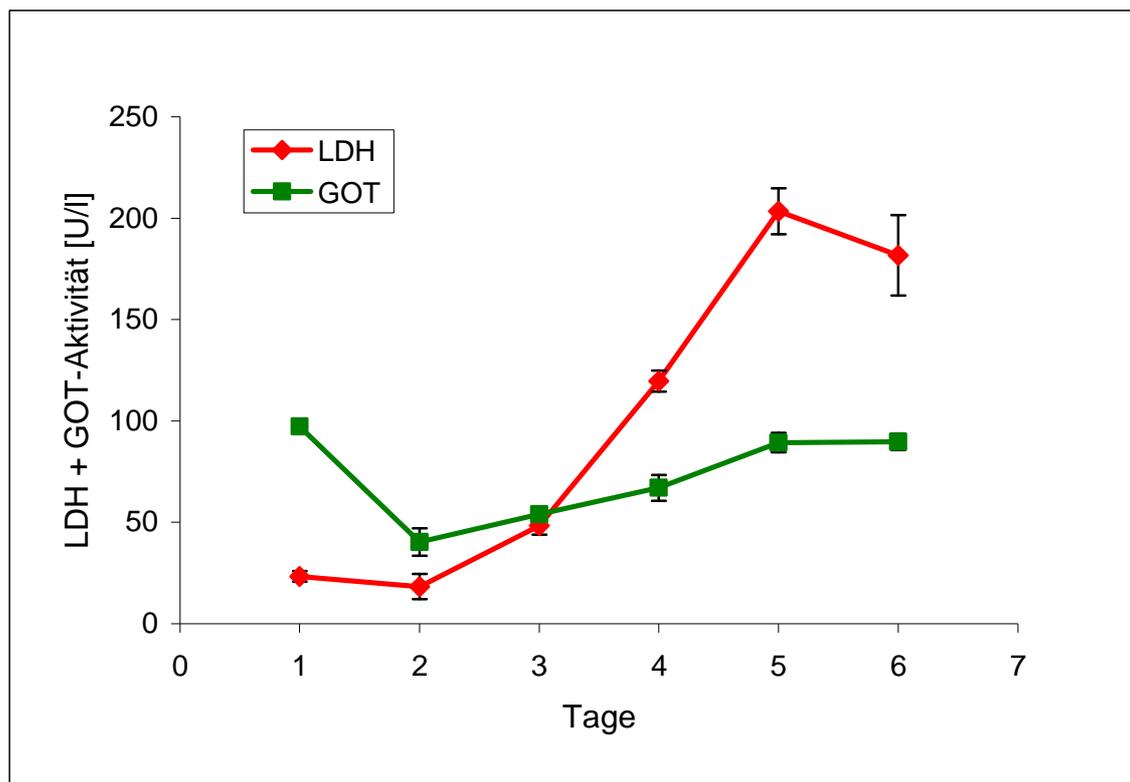
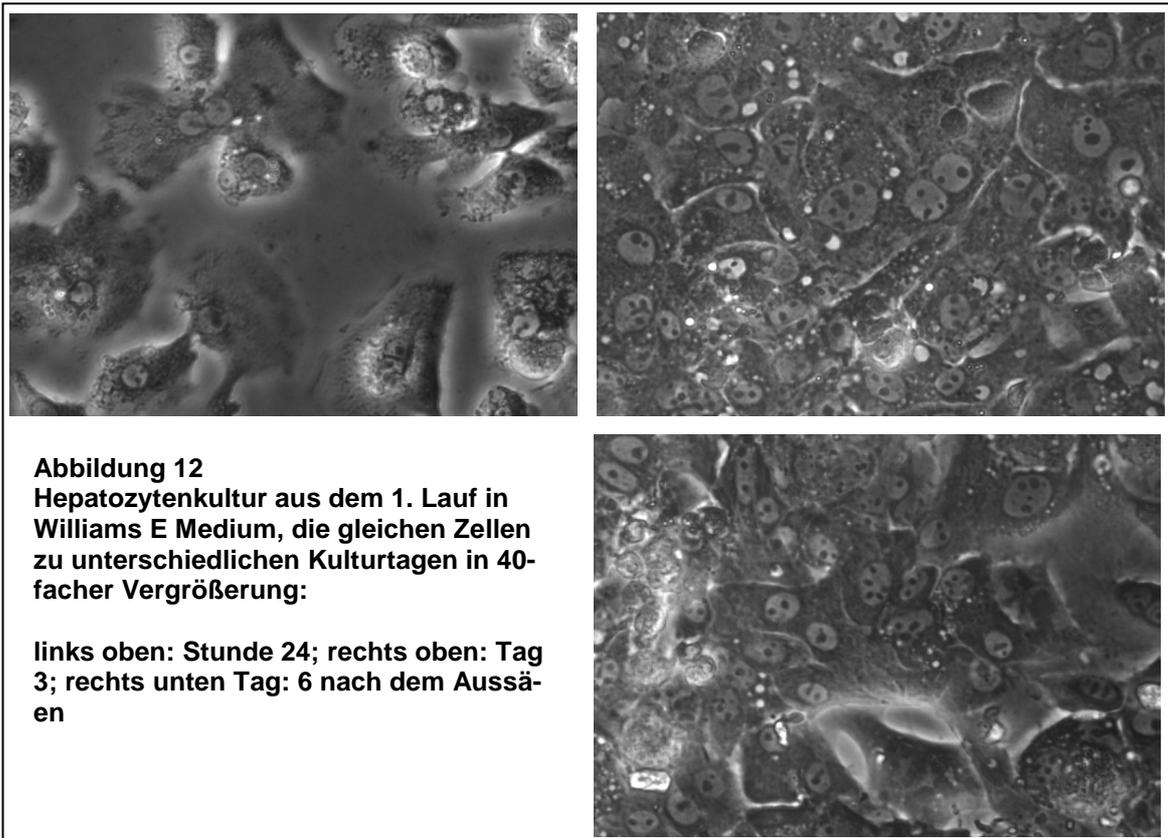


Abbildung 11: Verhalten der LDH- und GOT-Enzymaktivität in Williams-E-Kulturmedium bis zur Zugabe des filtrierten Plasmas und den Vergleichssubstanzen.

Nach einem initialen Abfall der Enzymaktivität am 2. Kulturtag stieg die Aktivität beider Enzyme an. Am 6. Tag der Zellkultur erreichte die Aktivität des leberspe-

zifischen Enzyms GOT in seiner Aktivität ein Plateau. Auch die Aktivität der LDH stieg nicht mehr weiter an und zeigte rückläufige Tendenz.

Morphologisch breiteten sich die Hepatozyten nach 24 Stunden aus und bildeten Zell-Zell-Kontakte. Am 3. Kulturtag war mehr als 90% der Zellkulturplatte mit Zellen besiedelt. Die Zellen zeigten leichte Vakuolenbildung. Am 6. Kulturtag erreichte der Hepatozyten-Zellrasen seine größte Dichte.



Der 6. Kulturtag in Williams E Vollmedium wurde daher in beiden Versuchsläufen als Zeitpunkt gewählt, um die Wirkung unterschiedlicher Plasmafraktionen und der Kontrollmedien in Kultur zu testen.

3.1.2 Vergleich zwischen Fraktion und Rückstand

Erfasst wurde die Enzymaktivität vor der Zugabe der zu testenden Plasmafraktionen (0 Stunden) sowie zu einem frühen (nach 4 Stunden) und zu zwei späten Messzeitpunkten (nach 24 und 48 Stunden).

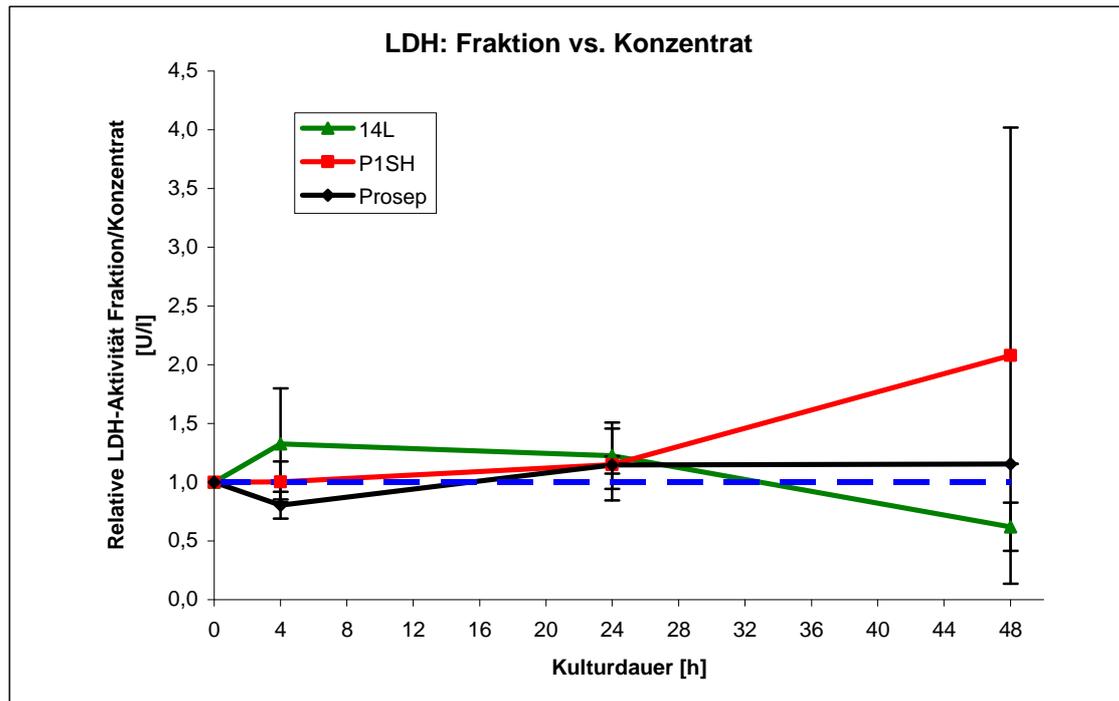


Abbildung 13: Relative LDH-Aktivität Filtrat vs. Konzentrat; 14L cut-off= 10 kDa; P1SH cut-off= 45 kDa; Prosep cut-off=100 kDa

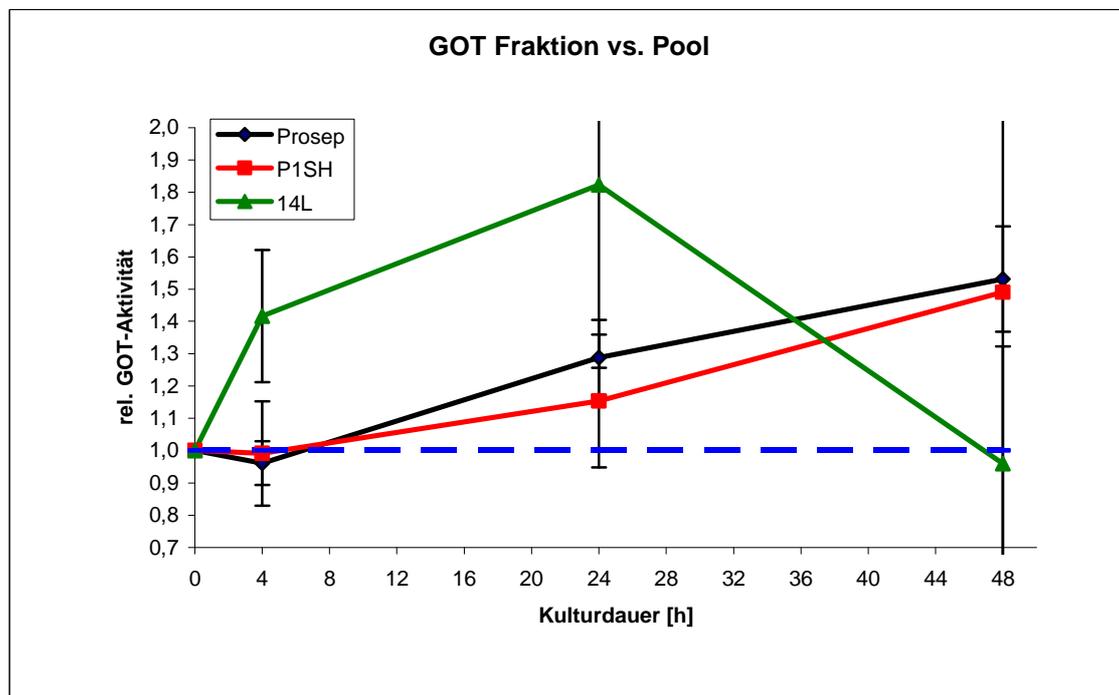


Abbildung 14: Relative GOT-Aktivität Filtrat vs. Pool; 14L cut-off= 10 kDa; P1SH cut-off= 45 kDa; Prosep cut-off= 100 kDa

In der Relation Filtrat vs. Konzentrat zeigte sich nach 4 Stunden eine um den Faktor 1,3 höhere LDH-Enzymaktivität im 14L-Filtrat als im korrespondierenden

Konzentrat (Pool). Im P1SH-Filtrat war die LDH in Filtrat und Rückstand gleich. In dem Prosep-Filtrat lag die LDH-Aktivität unter der des Rückstandes. Nach 24 Stunden waren die LDH-Enzymaktivitäten bei allen drei Filtraten geringfügig höher als bei ihren jeweiligen Rückständen. Nach 48 Stunden fielen die LDH-Werte im 14L-Filtrat unter die des entsprechenden Rückstandes ab. Dagegen stieg die LDH im Prosep- und noch stärker im P1SH-Filtrat an. In beiden Filtraten lag die LDH höher als in den entsprechenden Rückständen. Die p-Werte lagen nach 4 Stunden bei 0,488, nach 24 Stunden bei 0,988, nach 48 Stunden bei 0,694.

Die GOT-Aktivität war im 14L-Filtrat nach 4 Stunden und nach 24 Stunden höher als im 14L-Konzentrat. Nach 48 Stunden fiel die Aktivität dann allerdings, wie auch schon bei der LDH-Aktivität, unter die des Rückstandes ab.

Die Enzymaktivität der Zellen nach Zugabe der Filtrate des P1SH (F₂)- und Prosep- (F₃) Filters stieg in Relation zu den Rückständen nach initial niedrigen Werten nach der Stunde 4 und 24 bei weiterer Kulturdauer an und zeigte nach 48 h deutlich höhere Werte als bei dem 14L-Filter (F₁). Die p-Werte lagen nach 4 Stunden bei 0,257, nach 24 Stunden bei 0,422, nach 48 Stunden bei 0,834.

3.1.3 Vergleich filtriertes und nicht filtriertes anhepatisches Plasma

Für den direkten Vergleich der Enzymaktivitäten von Hepatozyten in filtriertem und unfiltriertem anhepatischen Plasma, wurde jeweils die LDH- und GOT-Aktivität der Zellen im Filtrat in Relation mit der LDH- und GOT-Aktivität im anhepatischen Plasma gesetzt.

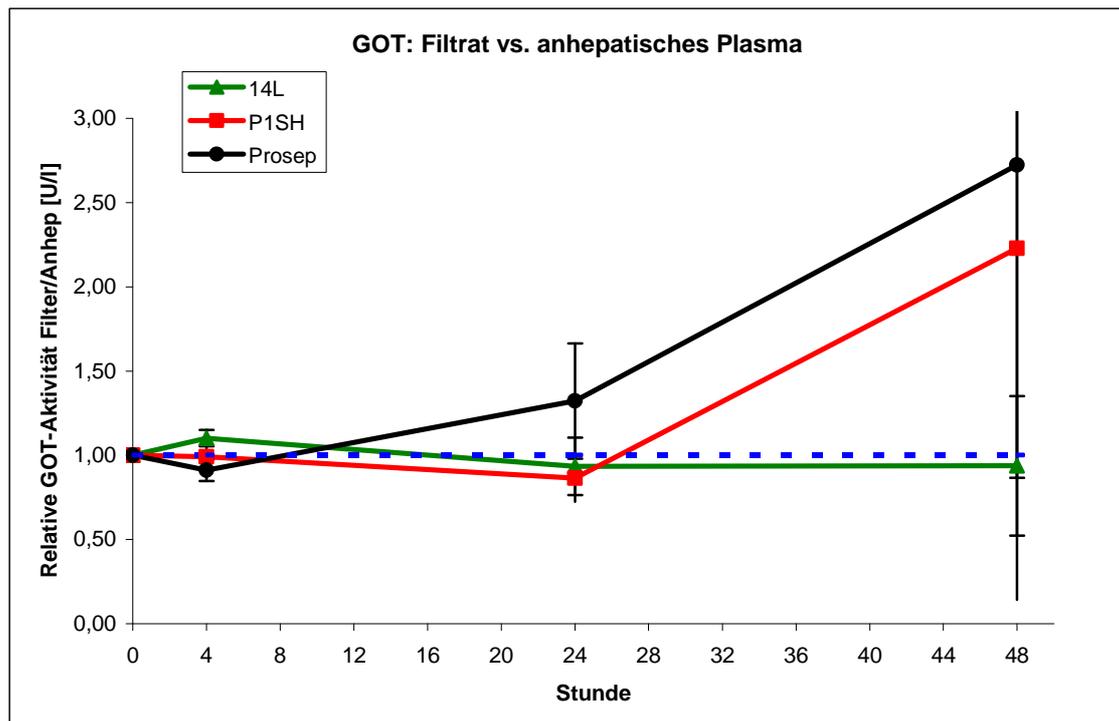


Abbildung 15: Relative GOT-Aktivität Filtrat zum anhepatischen Plasma; 14Lcut-off= 10 kDa; P1SH cut-off= 45 kDa; Prosep cut-off= 100 kDa

Die gemessene GOT-Enzymaktivität der Zellen zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei dem Vergleich Filtrat vs. Konzentrat: Im Filtrat des Filters mit der niedrigen molekularen Ausschlussgrenze von 10 kDa (14L) war die GOT-Enzymaktivität der Hepatozyten zum frühen Messzeitpunkt nach 4 Stunden höher als im anhepatischen Plasma und in den beiden anderen Filtraten Prosep (45 kDa) und P1SH (100 kDa).

Nach 24 Stunden konnte jedoch keine höhere Enzymaktivität in den Filtraten des 14L- und P1SH-Filters gegenüber dem anhepatischen Plasma gezeigt werden: Die GOT-Enzymaktivität war gering rückläufig. Dagegen hatten die Zellen im Filtrat des Prosep-Filters nach 24 Stunden keine höhere Enzymaktivität als im anhepatischen Plasma. Dies wurde noch deutlicher nach 48 Stunden. Hier konnte im Filtrat des Prosep-Filters die höchste Enzymaktivität gemessen werden, gefolgt von dem Filtrat des P1SH-Filters. Die Hepatozyten im Filtrat des 14L-Filters hatten nach 48 Stunden etwa dieselbe Aktivität wie die Zellen im unfiltrierten anhepatischen Plasma. Die p-Werte lagen nach 4 Stunden bei 0,438, nach 24 Stunden bei 0,439, nach 48 Stunden bei 0,748.

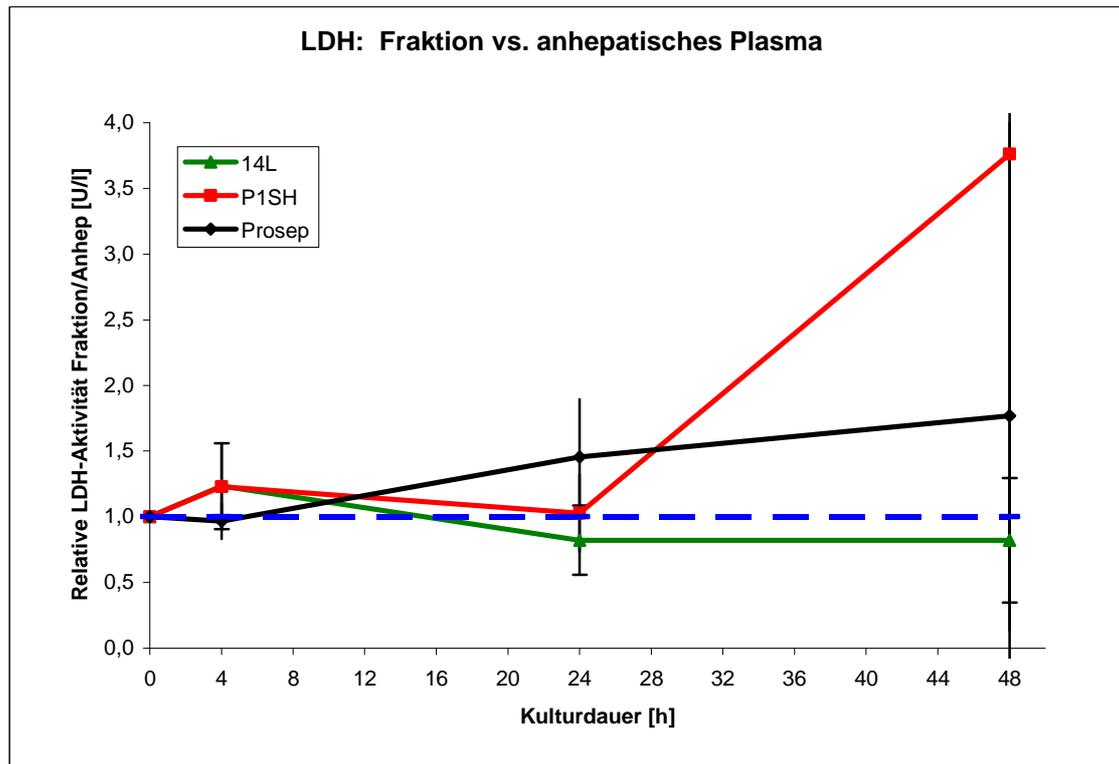


Abbildung 16: Relative LDH-Aktivität Filtrat zum anhepatischen Plasma; 14Lcut-off= 10 kDa; P1SH cut-off= 45 kDa; Prosep cut-off= 100 kDa

Die LDH-Enzymaktivität der Hepatozyten war nach 4 Stunden im 14L Filtrat und im P1SH-Filtrat höher als im anhepatischen Plasma und im Prosep-Filtrat. Wie auch bei der GOT-Aktivität waren die LDH-Werte im 14L-Filtrat nach 24 und 48 Stunden rückläufig. Die LDH-Enzymaktivität in diesem Filtrat war damit zu diesen Zeitpunkten niedriger als im anhepatischen Plasma. Die gemessene LDH im P1SH Filtrat war nach 24 Stunden rückläufig. Nach 48 Stunden stieg die LDH-Enzymaktivität im P1SH-Filtrat deutlich an und war um das 3,5-fache höher als im Vergleich zur LDH-Aktivität der Zellen im anhepatischen Plasma. Im Prosep-Filtrat war die LDH nach 24 Stunden bei dem 1,5-fachen und nach 48 Stunden beim 1,8-fachen Wert im Vergleich zur LDH-Aktivität im anhepatischen Plasma. Die p-Werte lagen nach 4 Stunden bei 0,797, nach 24 Stunden bei 0,435, nach 48 Stunden bei 0,706.

3.1.4 Vergleich filtriertes anhepatisches Plasma und Medium

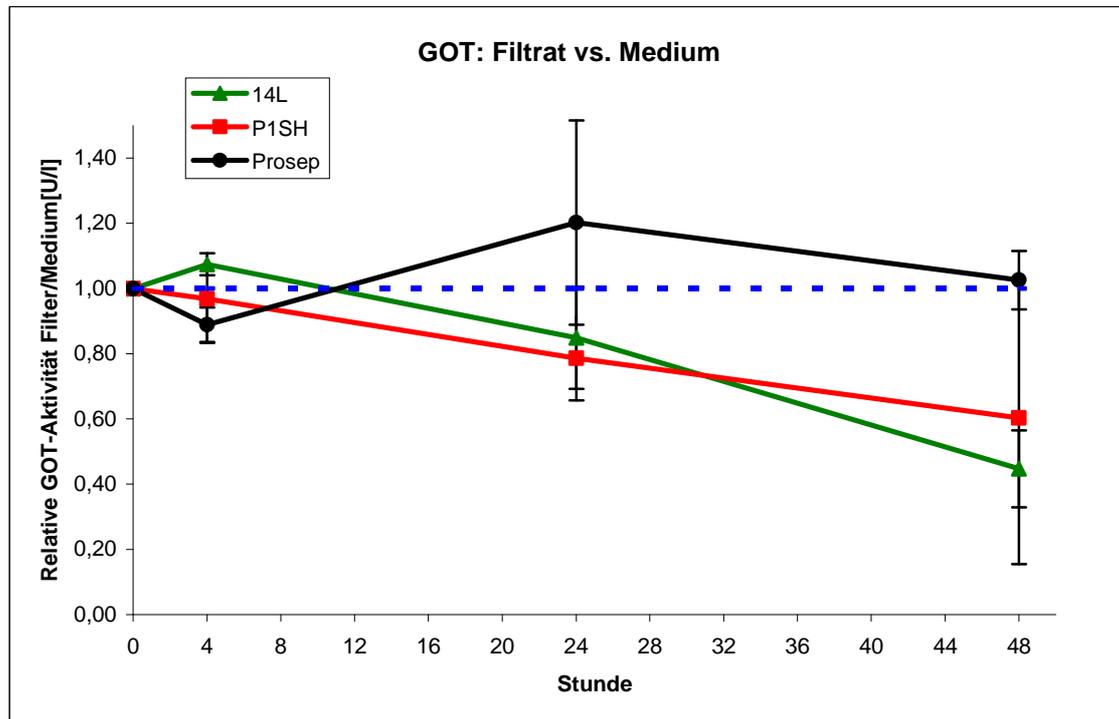


Abbildung 17: Relative GOT-Aktivität Filtrat vs. Williams E Vollmedium; 14Lcut-off= 10 kDa; P1SH cut-off= 45 kDa; Prosep cut-off= 100 kDa

Die Hepatozyten in der 14L-Fraktion des anhepatischen Plasmas zeigten nach 4 Stunden gleiche GOT-Werte wie die Zellen im Williams E Vollmedium. Die Enzymaktivität war nur minimal gegenüber den Werten im Medium erhöht. Nach 24 Stunden und 48 Stunden fiel dagegen die GOT-Aktivität der Zellen im 14L-Filtrat deutlich unter die des Vollmediums ab. Nach 48 Stunden war die GOT-Aktivität in diesem Filtrat von allen drei Fraktionen am niedrigsten. Ähnliche GOT-Werte ergaben sich auch beim P1SH-Filtrat. Nach 4 Stunden hatten die Hepatozyten in diesem Filtrat noch etwa die gleiche GOT-Enzymaktivität wie im Medium. Nach 24 und 48 Stunden fiel diese jedoch deutlich unter die GOT-Werte des Mediums. Die GOT-Aktivität im Prosep-Filtrat lag nach 4 Stunden leicht unter der des Mediums und unter der Aktivität der beiden anderen Filtrate. Nach 24 Stunden stieg die Aktivität deutlich an. Nach 48 Stunden waren die GOT-Aktivitäten im Medium und Prosep-Filtrat nahezu identisch. Die p-Werte lagen nach 4 Stunden bei 0,418, nach 24 Stunden bei 0,447, nach 48 Stunden bei 0,412.

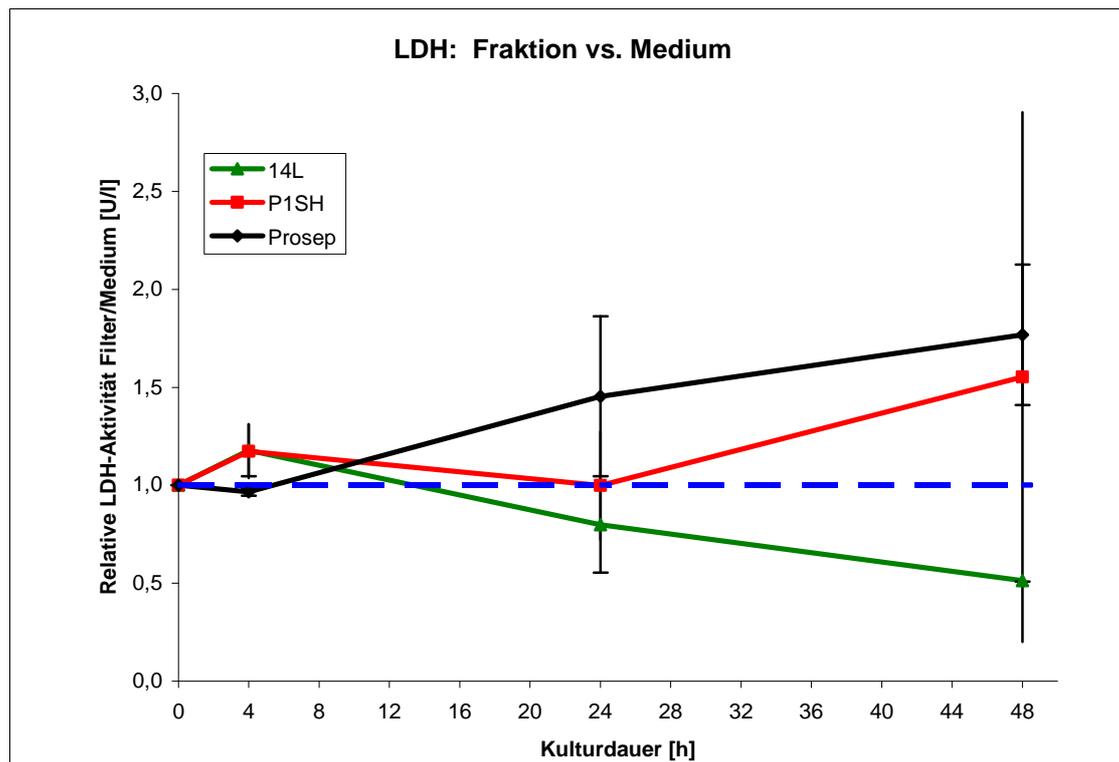


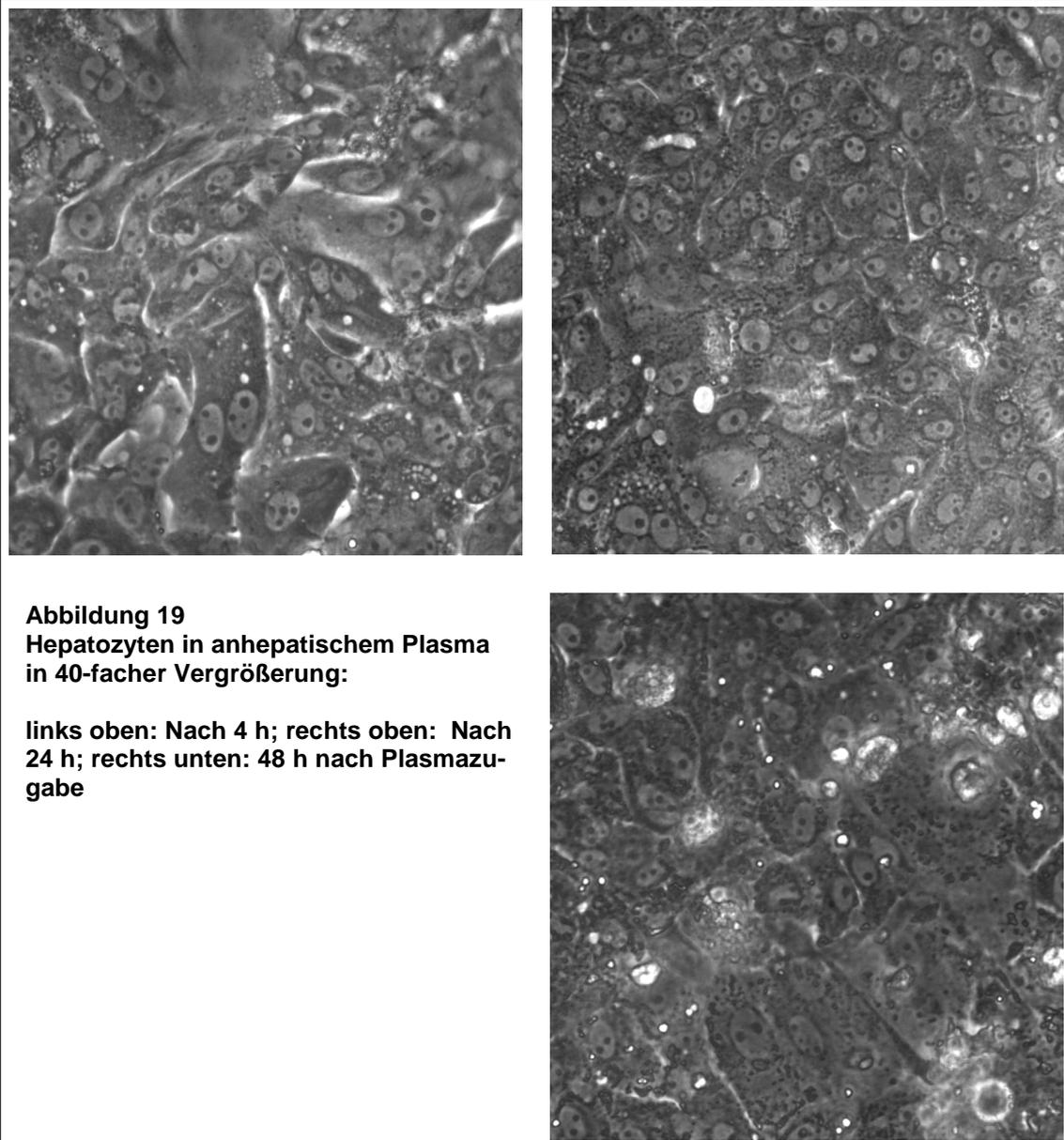
Abbildung 18: Relative LDH-Aktivität Filtrat vs. Williams E Vollmedium; 14Lcut-off= 10 kDa; P1SH cut-off= 45 kDa; Prosep cut-off= 100 kDa

Die LDH-Enzymaktivität im Vergleich Filtrate vs. Medium zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die beschriebene GOT-Enzymaktivität. Im Gegensatz zur GOT waren die LDH-Werte im P1SH-Filtrat nach 4 Stunden höher als im Medium. Nach 24 Stunden fiel die LDH-Aktivität weniger stark ab und zeigte die gleichen Werte wie im Medium.

Des Weiteren stieg die LDH nach 48 Stunden im P1SH- und im Prosep-Filtrat an. Im P1SH-Filtrat lag die LDH bei dem 1,5-fachen und im Prosep-Filtrat bei dem 1,8-fachen Wert im Vergleich zum LDH-Aktivität im Medium. Die p-Werte lagen nach 4 Stunden bei 0,513, nach 24 Stunden bei 0,465, nach 48 Stunden bei 0,565.

3.1.5 Morphologie der Schweinehepatozyten

Hepatozytenkultur im anhepatischem Plasma



Die in anhepatischem Plasma kultivierten Zellen zeigten über die Zeit einen geschlossenen Zellverband in Kultur. Zu den Stunden 24 und 48 verloren zunehmend apoptotische Zellen ihre Adhäsion und erschienen als helle, abgestorbene Zellen im Überstand.

Hepatozytenkultur im 14L- Filtrat

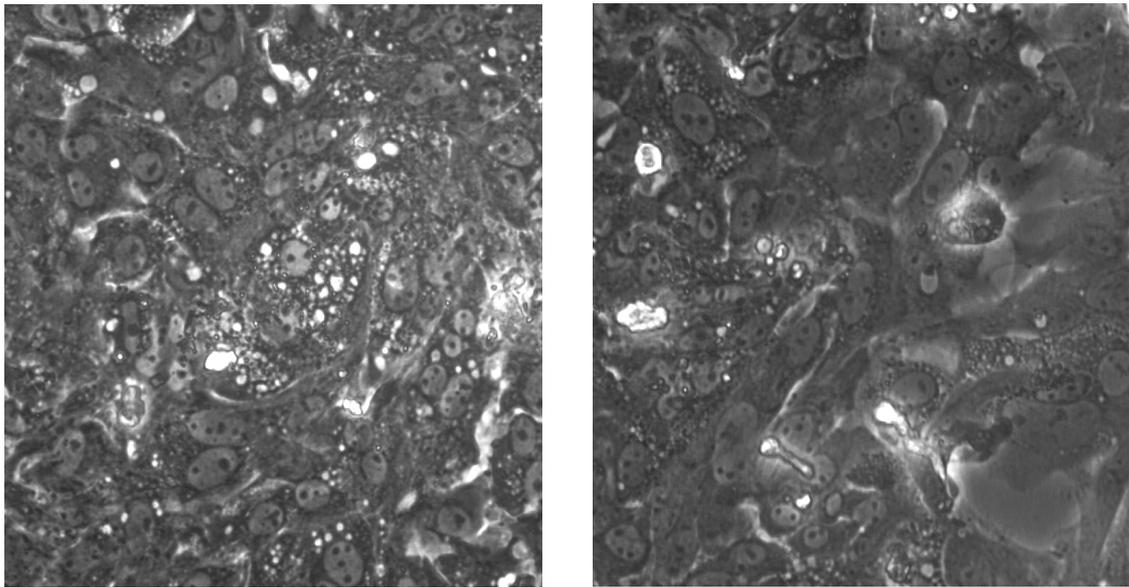
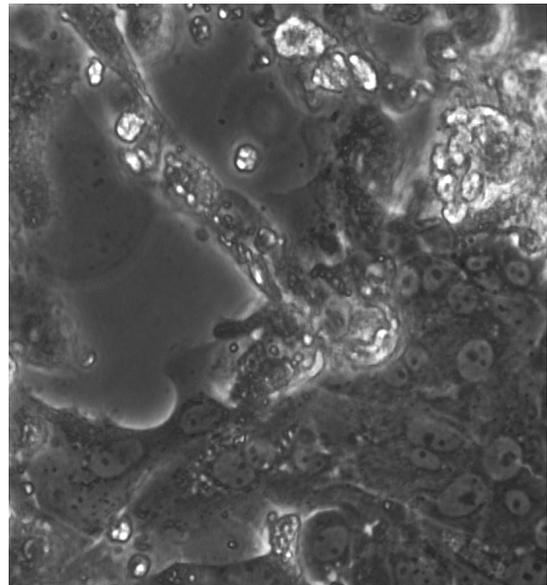


Abbildung 20
Hepatozyten in mit 14L-Filter filtriertem Plasma in 40-facher Vergrößerung:

links oben: Nach 4 h; rechts oben: Nach 24 h; rechts unten: 48 h nach Plasmazugabe



Der Hepatozyten-Zellrasen zeigte im 14L-Plasma zu den späteren Erfassungszeitpunkten Stunde 24 und 48 größer werdende, unbesiedelte Areale. Apoptotische Zellen lösten sich aus dem Zellverband, die verbliebenen Zellen bildeten eine teilweise scharfe Abgrenzung zu diesen frei gewordenen Flächen. Die Zellkerne und die Nukleoli waren bei den verbliebenen Zellen weiter abgrenzbar.

Hepatozytenkultur im 14L- Filterkonzentrat

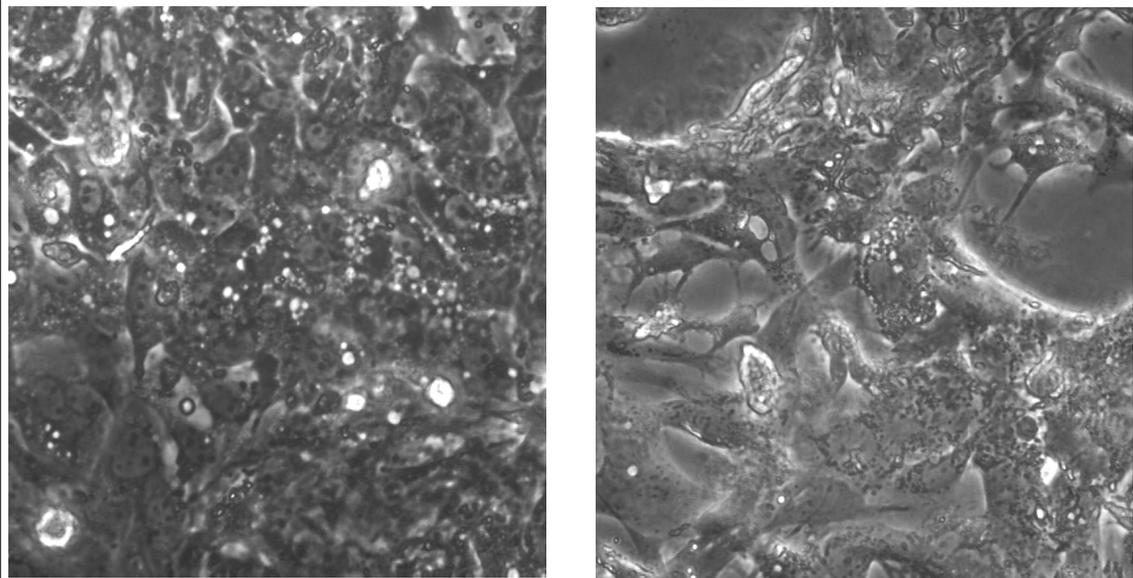
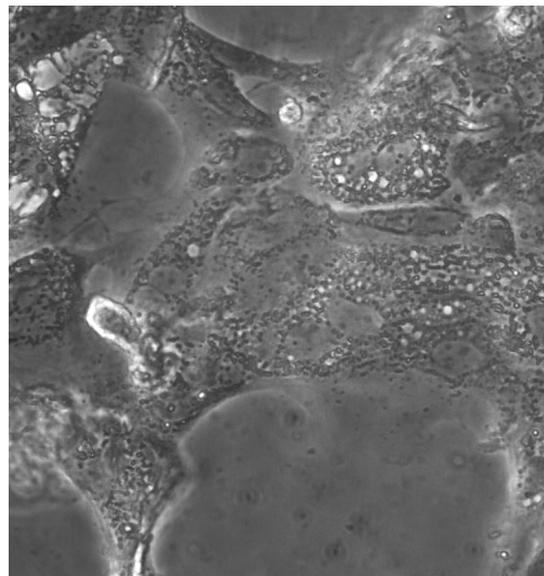


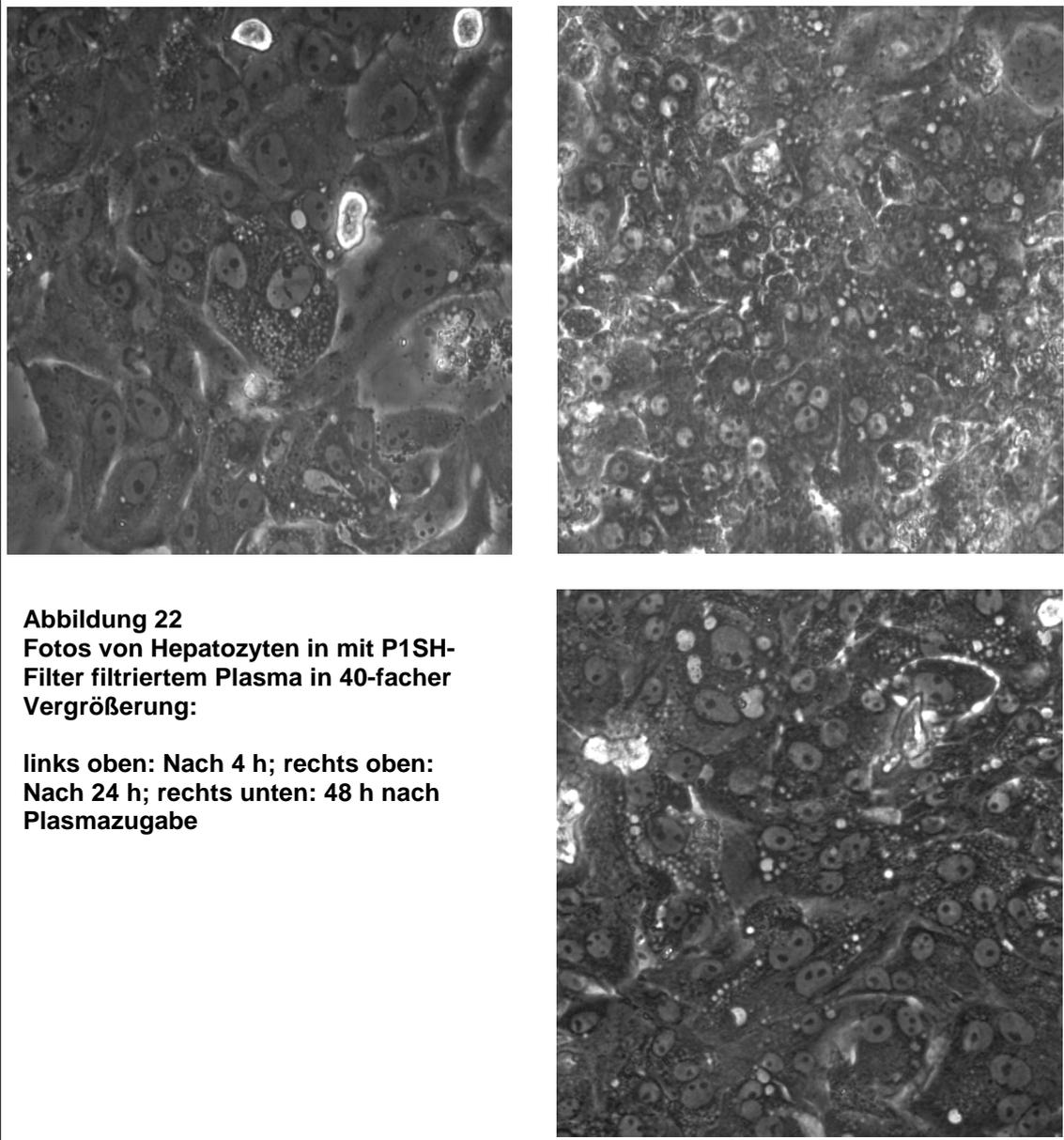
Abbildung 21
Hepatozyten kultiviert im Rückstand
des 14L-Filters in 40-facher Vergröße-
rung:

links oben: Nach 4 h; rechts oben:
Nach 24 h; rechts unten: 48 h nach
Plasmazugabe



Ähnlich wie bei der 14L-Fraktion gingen auch in der Kultur mit dem Rückstand des Filters nach 24 und 48 Stunden zunehmend die interzellulären Adhäsionen verloren, so dass größere, unbesiedelte Areale in dem Zellrasen entstanden. Die verbliebenen Zellen grenzten sich scharf von diesen Arealen ab. Die Zellgrenzen und Zellkerne ließen sich nur noch schwer identifizieren. Hepatozyten bildeten vermehrt feine Vakuolen aus.

Hepatozytenkultur im P1SH- Filtrat



Nach 4 Stunden zeigten sich mehr abgelöste, apoptotische Zellen als zu den späteren Stunden. Die Zelldichte nahm dagegen im zeitlichen Verlauf zu. Die Zahl der apoptotischen Zellen stabilisierte sich. Die Zellkerne waren auch zu den späteren Untersuchungszeitpunkten klar abgrenzbar.

Hepatozytenkultur im P1SH- Filterkonzentrat

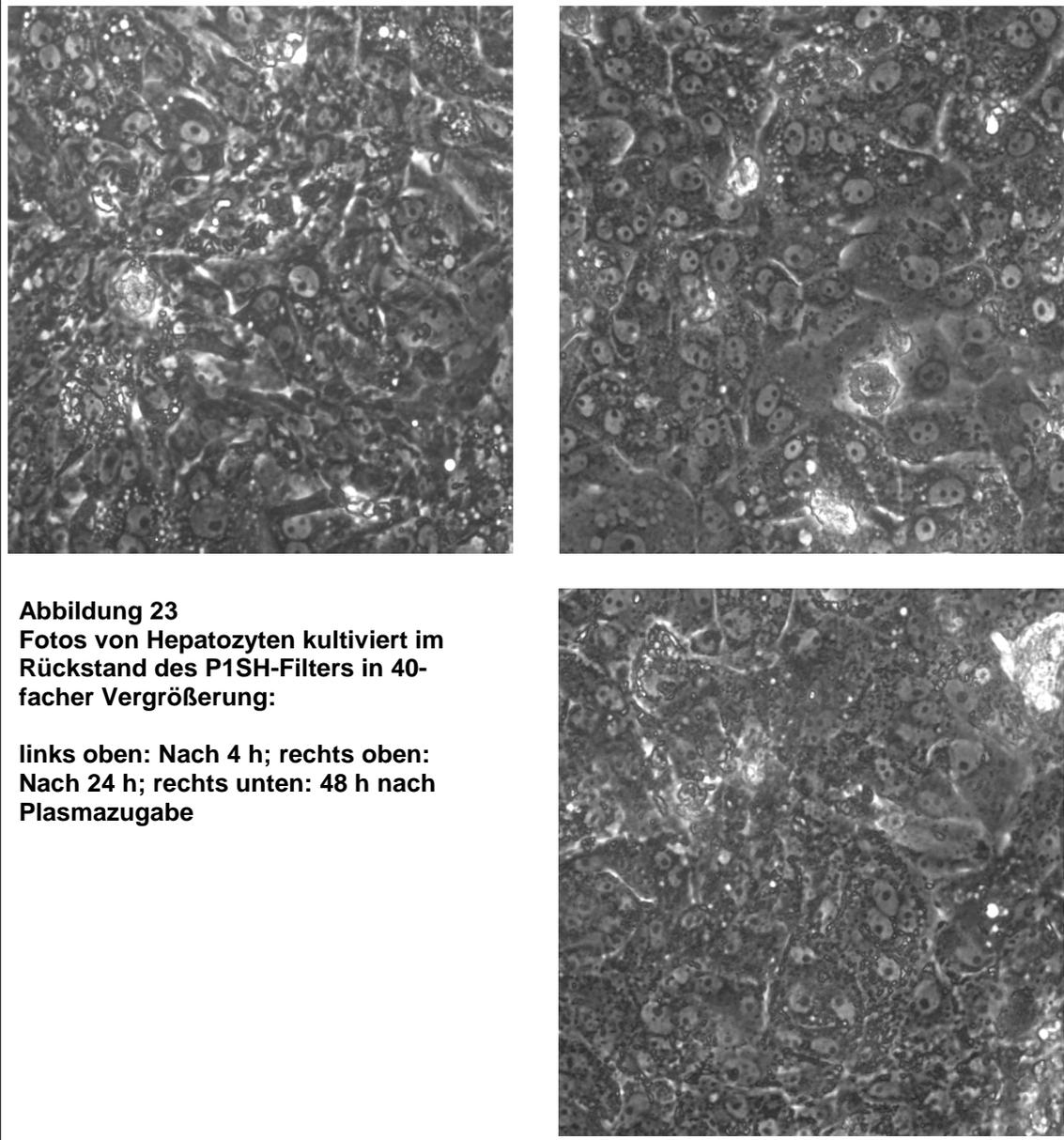


Abbildung 23
Fotos von Hepatozyten kultiviert im Rückstand des P1SH-Filters in 40-facher Vergrößerung:

links oben: Nach 4 h; rechts oben:
Nach 24 h; rechts unten: 48 h nach
Plasmazugabe

Die Apptoserate im Rückstand aus dem P1SH-Filter blieb im zeitlichen Verlauf sehr gering. Der Zellrasen blieb in seiner Dichte unverändert. Nach 48 Stunden wurden die Zellgrenzen etwas undeutlich und die Zellen bildeten feine Granulationen aus.

Hepatozytenkultur im Prosep- Filtrat

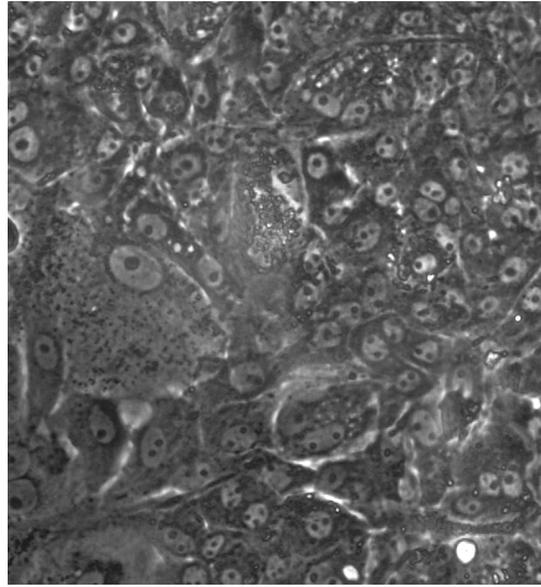
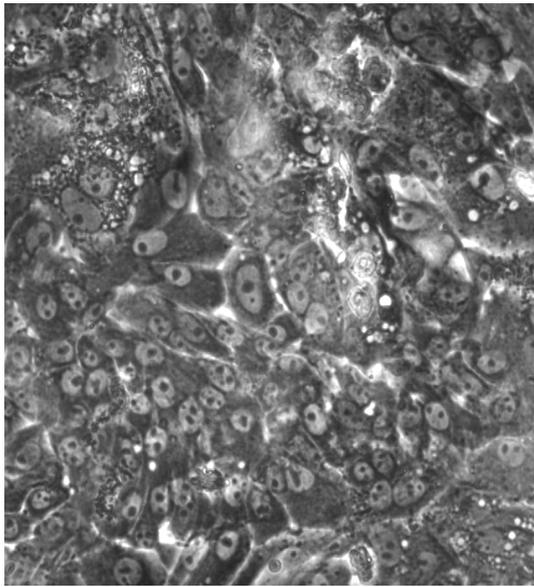
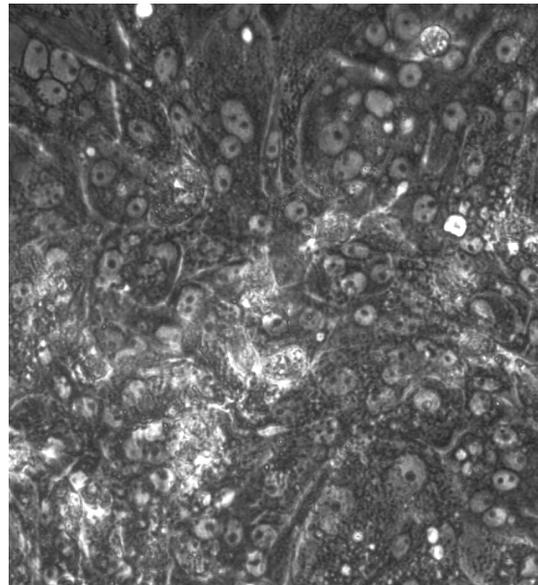


Abbildung 24
Fotos von Hepatozyten in mit Prosep-
Filter filtriertem Plasma in 40-facher
Vergrößerung:

links oben: Nach 4 h; rechts oben:
Nach 24 h; rechts unten: 48 h nach
Plasmazugabe



Der Zellrasen blieb im zeitlichen Verlauf im fraktionierten Plasma des Prosep-
Filters dicht. Nach 48 Stunden wirkte der Zellrasen dichter als nach 24 Stunden.
Bei der Anzahl apoptotischer Zellen zeigten sich keine Unterschiede zwischen
den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten.

Hepatozytenkultur im Prosep- Filterkonzentrat

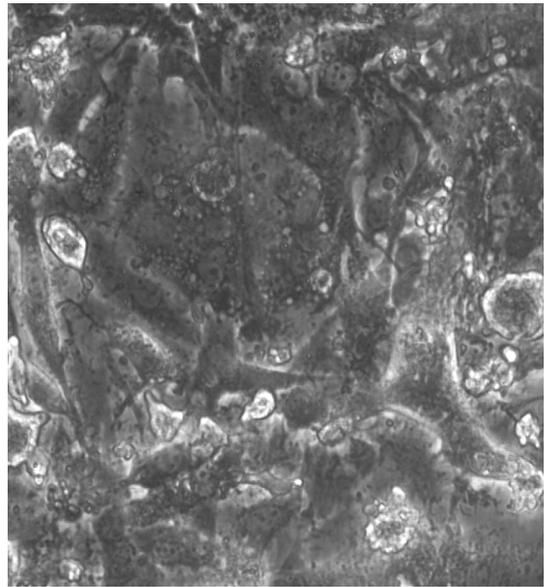
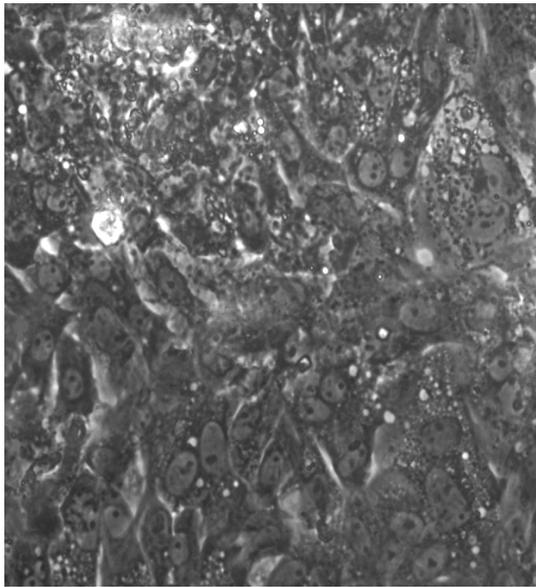
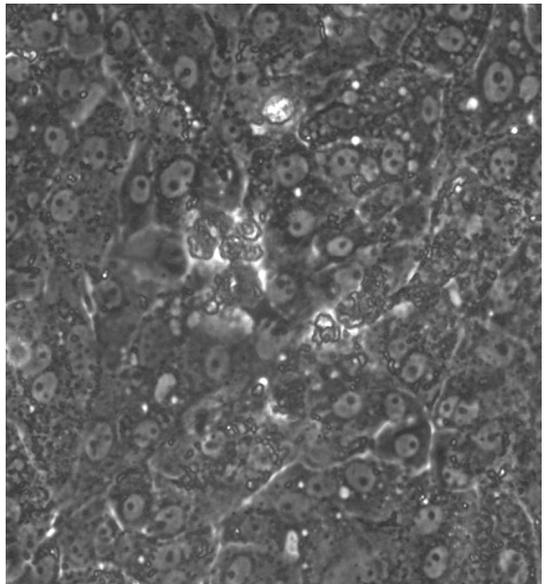


Abbildung 25
Fotos von Hepatozyten kultiviert im Rückstand des Prosep-Filters in 40-facher Vergrößerung:

links oben: Nach 4 h; rechts oben: Nach 24 h; rechts unten: 48 h nach Plasmazugabe



Vier Stunden nach Zugabe des Prosep- Filterkonzentrates zeigten sich vereinzelt apoptotische Zellen. Der Zellrasen blieb jedoch dicht. Nach 24 Stunden schienen vermehrt Zellen abzusterben. Die Zellgrenzen waren nicht mehr gut zu erkennen. Nach 48 Stunden zeigten sich ein dichter Zellrasen und wenig apoptotische Zellen. Die Zellen wiesen feine Granulationen auf.

3.2 Zellkulturen mit humanen Hepatozyten

3.2.1 Humane Hepatozytenkultur in fraktioniertem humanem Serum

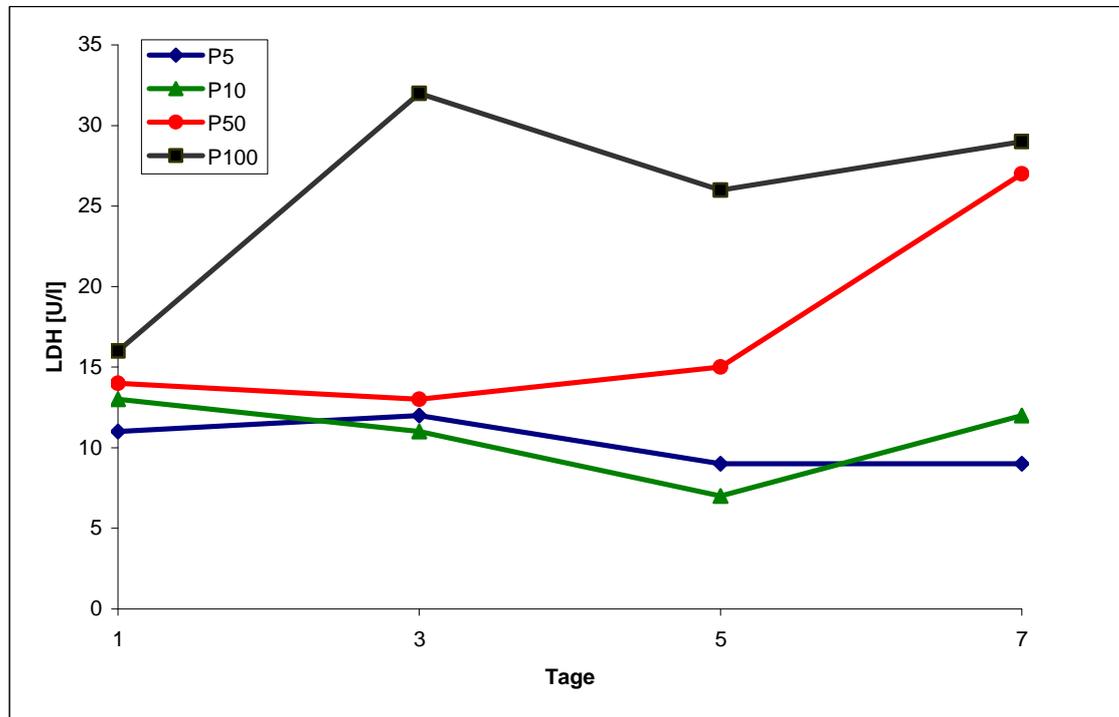


Abbildung 26: LDH-Enzymaktivität humaner Hepatozyten in fraktioniertem, gesundem humanem Serum; cut-offs: P5=5 kDa; P10 = 10 kDa; P50=50 kDa; P100=100kDa

Nach 24 Stunden im fraktionierten, gesunden, humanen Serum zeigten sich bei der LDH-Aktivität der Zellen in den unterschiedlichen Filtraten nur geringe Unterschiede. Im P100-Filtrat, mit der molekularen Ausschlussgrenze von 100kDa, zeigte sich dabei die noch höchste Enzymkonzentration. Danach folgten in Reihenfolge das P50-, das P10- und das P5-Filtrat, mit den Ausschlussgrenzen 50, 10 und 5 kDa.

Im zeitlichen Verlauf blieben die LDH-Konzentrationen an den Tagen 3, 5 und 7 im P100-Filtrat am höchsten. Ab dem 5. Tag stieg auch in dem P50-Filtrat die Konzentration an und erreichte am 7. Tag ähnliche LDH-Werte wie im P100-Filtrat.

Die geringste LDH-Aktivität zeigten die Zellen über den gesamten Messzeitraum in den Filtraten P5 und P10. Die LDH-Enzymaktivitäten der Zellen in diesen beiden Filtraten waren über diesen Zeitraum nahezu gleich.

3.2.2 Vergleich filtrierte und unfiltriertes humanes Serum

Für den direkten Vergleich zwischen filtriertem und unfiltriertem gesundem humanem Serum wurde das Filtrat in Relation zum unfiltrierten Serum gesetzt und über die Zeit aufgetragen. Die LDH-Aktivität im unfiltrierten, gesunden, humanen Serum wurde gleich 1 gesetzt.

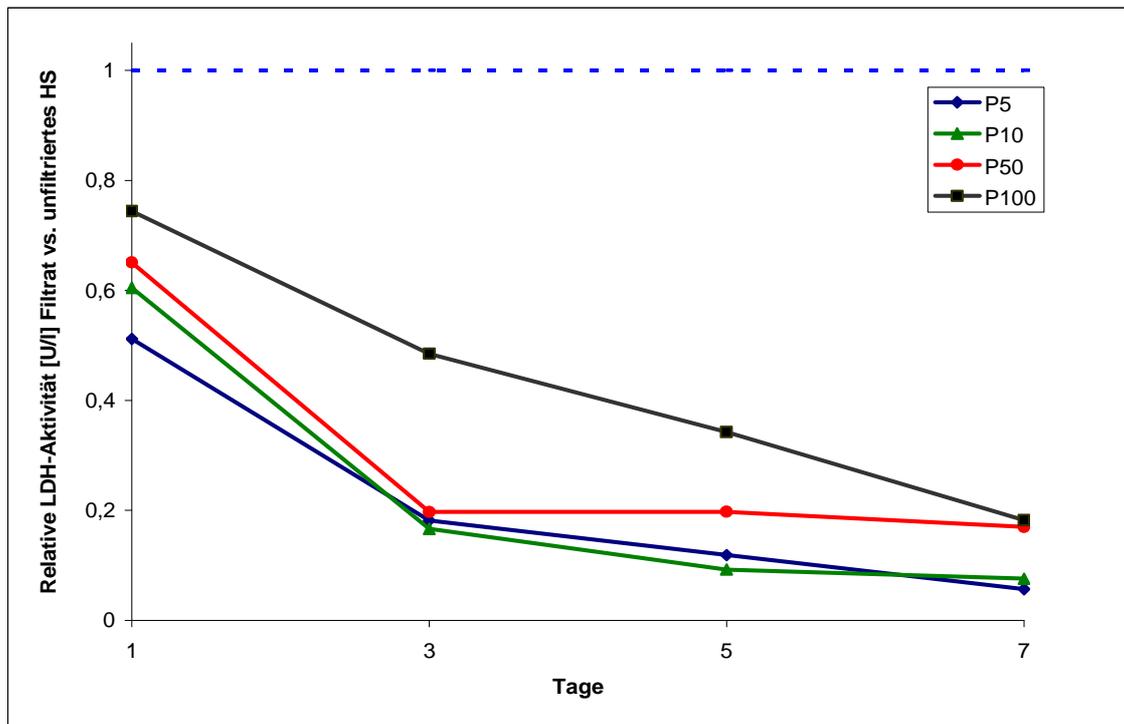


Abbildung 27: Relative LDH-Enzymaktivität Filtrat vs. unfiltriertes Serum; cut-offs: P5=5 kDa; P10 = 10 kDa; P50=50 kDa; P100=100kDa

In dieser Relation zeigten alle Filtrate niedrigere Enzymaktivitäten als das unfiltrierte Serum. Nach 24 Stunden war der Unterschied zwischen den einzelnen Filtraten gering ausgeprägt. Am 3. Tag fielen die Werte aller Filtrate ab. Der Abfall der LDH-Aktivität war im P5-, P10- und P50-Filtrat am stärksten. Die Werte der P100-Fraktion fielen am geringsten ab und blieben bis zum 7. Tag höher als die der anderen Filtrate.

Das P50-Filtrat blieb nach dem starken Abfall am 3. Tag in seinen Werten nahezu konstant und war am 7. Tag auf dem Niveau des P100-Filtrats.

Die beiden Filtrate des Filters mit der niederen molekularen Ausschlussgrenze zeigten beide vergleichbare Enzymaktivitäten und hatten über den gesamten Messzeitraum die niedrigsten Werte.

Diskussion

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob durch eine Filtration die Toxinkonzentration in anhepatischem Plasma reduziert werden kann und welche Auswirkungen definierte Plasmafraktionen auf Hepatozytenkulturen haben. Dadurch sollte geklärt werden, ob eine vor den Leberzellreaktor geschaltete Filtration des anhepatischen Plasmas die Zellvitalität der Zellen im Reaktor erhalten kann.

4.1 GOT- und LDH –Aktivität als Parameter

Die Enzyme LDH und GOT werden häufig in Untersuchungen zur Hepatotoxizität als Indikator für eine intakte Zellmembran verwendet (34).

Die Aktivität dieser Enzyme ist proportional zum Anteil des Zellzytosols. Die GOT ist ein leberspezifisches Enzym. Die GOT-Aktivität ist nur von den Hepatozyten abhängig und nicht durch andere Faktoren modifizierbar. Damit können über die Aktivität der Enzyme LDH und GOT die Zellzahl und –aktivität beurteilt werden.

Fehlinterpretationen der Hepatozyten-Enzymaktivitäten sind durch Kultivierung in Plasma bzw. Serum möglich. Das liegt daran, dass im Plasma bzw. Serum immer LDH- und GOT-Aktivitäten messbar sind. Diese Aktivität würde zu einer Fehlbeurteilung der Zellzahl und Zellaktivität führen.

Diese Fehlbestimmung der Enzymaktivität würde zusätzlich beeinflusst, wenn durch die Plasma-/Serumfiltration diese Enzyme ebenfalls filtriert würden. In den unterschiedlichen Serum-/Plasmafiltraten sind dann unterschiedliche Enzymaktivitäten messbar. Das Molekulargewicht der GOT beträgt ca. 91-93 kDa. Das Molekulargewicht der LDH beträgt ca. 130 kDa. Durch die Filtration würde demnach die Enzymkonzentration in denjenigen Filtraten niedriger sein, deren molekularer cut-off unter dem Molekulargewicht der Enzyme liegt.

Da nur die intrazelluläre Aktivität in die Beurteilung eingehen soll, wurde deshalb vor dem Lysieren der Zellen das Plasma bzw. das Serum im Überstand abgezogen und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Danach wurden die Zellen in PBS lysiert und die Aktivität der Enzyme aus dem Lysat bestimmt.

4.2 Zellkultur mit Schweinehepatozyten

Hepatozyten aus Schweinen wurden in diesem Versuch verwendet, weil sie eine der wichtigsten Alternativen zur Verwendung humaner Hepatozyten in Bioreaktoren darstellen. Porkine Hepatozyten besitzen ähnliche physiologische Charakteristika und metabolische Funktionen wie humane Hepatozyten. Aus diesem Grund gelten sie als wichtigste Alternative zu humanen Zellen im Bioreaktor (9;26;36;41;50;57).

Das hier für die Zellkultur verwendete mit Serum versetzte Williams E Medium ist ein bewährtes und häufig verwendetes Medium für die Kultivierung von Schweinehepatozyten (25).

Am 6. Tag in Kultur wurde eine stabile Hepatozyten-Kultur erreicht. Dies zeigte sich an dem Plateau der gemessenen LDH- und GOT-Werte. Dieses Ergebnis deckte sich mit dem einer anderen Arbeit (25). Dieser Zeitpunkt wurde als Startpunkt für den Versuchsbeginn mit fraktioniertem Plasma ausgewählt. Allerdings zeigten sich am 6. Kulturtag vereinzelt apoptotische Zellen in der Zellkultur. Die LDH-Enzymaktivität war nach diesem Plateau rückläufig. Die GOT-Aktivität war jedoch nicht rückläufig. Es stellt sich die Frage, ob nach diesem Zeitraum die Vitalität der Zellen bereits abnahm.

Die hier verwendeten Zellen waren nach Kryokonservierung möglicherweise sensitiver gegenüber toxischen Plasmabestandteile als es frisch isolierte Zellen gewesen wären (25). Das kryokonservierte anhepatische Plasma stammte ebenfalls aus Schweinen. In anderen Untersuchungen wurde meist humanes anhepatisches Plasma zur Untersuchung des Einflusses auf Schweinehepatozyten-Kulturen verwendet (35;55), oder Schweine im Leberversagen direkt an Leberzellgeneratoren angeschlossen (1).

In Hinblick auf die Verwendung in einem Leberzellreaktor erschien ein kürzerer Untersuchungszeitraum für den Einfluss des anhepatischen Plasmas auf die Hepatozyten aussagekräftiger. Aus diesem Grund wurden die Enzymaktivitäten nach 4, 24 und 48 Stunden bestimmt. Möglicherweise könnte eine längere Kulturdauer in fraktioniertem bzw. unfraktioniertem anhepatischem Plasma die Auswirkungen auf die Zellvitalität weiter verdeutlichen.

4.2.1 Auswahl der Vergleichsgrößen zu den Filtraten

Das filtrierte anhepatische Plasma wurde mit unfiltriertem anhepatischem Plasma, mit den konzentrierten Rückständen aus den Filtern und mit einem Komplettmedium verglichen.

Der Vergleich zwischen Filtrat und anhepatischem Plasma dient zur Klärung der zentralen Frage, ob das filtrierte anhepatische Plasma eine geringere Toxizität besitzt als das unfiltrierte anhepatische Plasma.

In dem Vergleich Filtrat vs. Medium wird das Zellwachstum der Hepatozyten in filtriertem Plasma mit dem in einem „optimierten Nährmedium“ untersucht.

Der Vergleich Filtrat vs. Rückstand soll anhand der einzelnen Filtergrößen zeigen, inwieweit Toxine entsprechend der unterschiedlichen Filter-Cutt-offs im Pool konzentriert werden, bzw. inwieweit sie in das Filtrat gelangen. Aber nicht nur die Filtration der Toxine ist bei diesem Vergleich von Interesse. Durch Unterschiede des Zellwachstums der Hepatozyten im Filtrat bzw. Konzentrat sollen weitere Aufschlüsse über die Auswirkungen des fraktionierten Plasmas auf die Zellkulturen gewonnen werden.

Durch die geringe Durchlässigkeit des 14L-Filters mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 10 kDa ist zu erwarten, dass dieses Filtrat am stärksten von Proteinen und proteingebundenen Toxinen im Vergleich zu den anderen Filtern depletiert ist. Eine stärkere Anreicherung ist im P1SH (F₂)-Filtrat, mit einer Ausschlussgrenze von 45 kDa und die stärkste beim Prosep-Filtrat, mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa, zu erwarten. Im Gegensatz dazu kann man eine abnehmende Toxizität der Konzentrate mit der höchsten Konzentration im 14L-Rückstand, bis hin zur niedrigsten Konzentration im Prosep-Rückstand vermuten (siehe Abbildung).

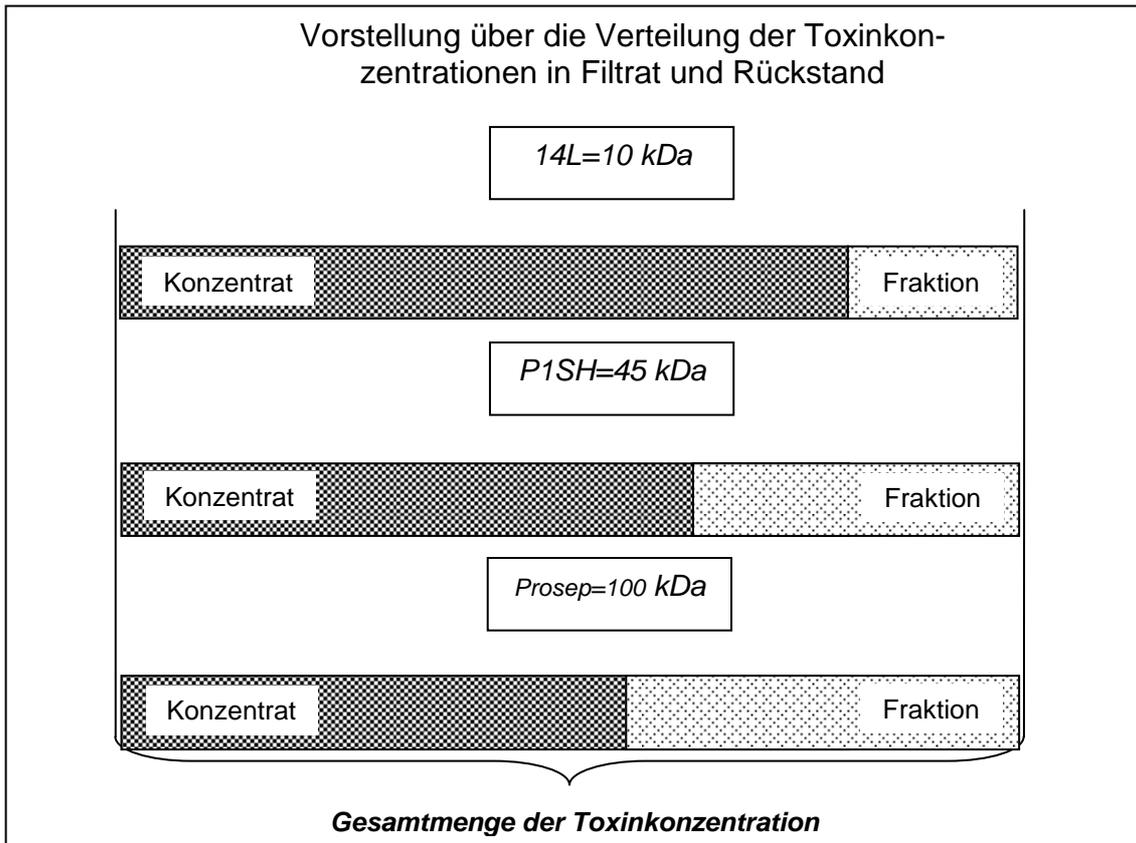


Abbildung 28 Vorstellung über die Verteilung der Toxinkonzentrationen der unterschiedlichen Filter. Im 14L-Filtrat ist die Toxinkonzentration im Konzentrat am höchsten, während sie im Filtrat am geringsten ist. Umkehr dieser Konzentrationsverhältnisse bis zum Prosep-Filter

4.2.2 Ergebnis der Filtration des anhepatischen Schweineplasmas

Für die Plasmafiltration wurden drei Filter mit unterschiedlichen molekularen Ausschlussgrenzen verwendet. Die Permeabilität eines Hämofilters für ein bestimmtes Molekül ist abhängig vom Molekulargewicht, der Porengröße und der Porengestalt, der Porenanzahl, der Membrandicke und der sterischen Molekülform. Weitere Faktoren, welche die Eliminierbarkeit gelöster Stoffe bestimmen, sind elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Hämofilter sowie ihre Wasser- bzw. Fettlöslichkeit und damit ihr Bindungsgrad an höhermolekulare Proteine (18).

Die Messzeitpunkte wurden zu einem frühen Zeitpunkt nach 4 Stunden und nach zwei späten Zeitpunkten nach 24 und 48 Stunden gelegt. Entsprechend dieser Zeiteinteilung erfolgte die Analyse der Ergebnisse.

Der Vergleich der GOT-/ LDH-Aktivität Filtrat vs. Rückstand zeigte, dass nach 4 Stunden die Enzymaktivität im am stärksten „aufgereinigten“ Plasma des 14L-

Filtrats deutlich höher war als im Konzentrat mit der höchsten Toxizität aus dem 14L-Filter (Pool). Die Unterschiede zwischen der Toxizität des fraktionierten Plasmas und des Rückstandes waren also anfänglich wie vermutet beim 14L-Filter am größten.

Im Vergleich mit dem unfiltrierten anhepatischen Plasma nach 4 Stunden waren auch im 14L-Filtrat höhere LDH- und GOT-Enzymaktivitäten messbar. Der Unterschied fiel aber deutlich geringer aus als bei dem Vergleich 14L-Filtrat vs. Rückstand. Es bestätigte sich damit die Hypothese, dass der Rückstand eine größere Toxizität besitzt als das anhepatische Plasma selbst. Durch den niedrigen molekularen cut-off des 14L-Filters mit 10 kDa wurden erfolgreich Proteine und proteingebundene Toxine in dem Rückstand zurückgehalten. Andere Untersuchungen zeigen eine signifikante Albuminelimination bis 45 kDa. Dabei wurden diese Filter in Untersuchungen für Nierenersatzverfahren verwendet (39). Hier war der Albuminverlust im Filtrat dagegen eine unerwünschte Folge der Filtration.

Die durch die Filtration erzielte unphysiologisch hohe Konzentration in dem 14L-Rückstand ist in der Praxis nicht von Bedeutung. Dieses Konzentrat beweist jedoch, dass sich proteingebundene Toxine durch diesen Filter effektiv entfernen lassen. Zudem bestätigt der Vergleich mit den Konzentraten die theoretischen Überlegungen über die zu erwartende Toxinelimination durch die unterschiedlichen Filtergrößen.

Zu diesem frühen Zeitpunkt der Kultur bewirkte die Entfernung von Proteinen und den daran gebundenen Toxinen durch den 10kDa cut-off-Filter eine höhere Zellvitalität und -aktivität.

Die LDH- und GOT-Enzymaktivität war im Vergleich zum P1SH-Filtrat vs. seinem Konzentrat nach 4 Stunden in Filtrat und Konzentrat gleich. Auch im Vergleich mit dem anhepatischen Plasma zeigten sich die gleichen GOT-Werte wie im unfiltrierten anhepatischen Plasma. Die LDH-Messwerte lagen dagegen im Filtrat höher als im anhepatischen Plasma. Das Filtrat aus dem 45 kDa cut-off-Filter (P1SH) bot demnach gegenüber dem unfiltrierten, anhepatischen Plasma für die Hepatozyten zu diesem Messzeitpunkt hinsichtlich Zellvitalität und –aktivität keinen Vorteil. In dem Konzentrat mit den darin enthaltenen, durch den

Filter „zurückgehaltenen“ Toxinen, zeigten die Zellen ebenfalls die gleiche Enzymaktivität wie im Filtrat. Bei diesem P1SH-Filter ist eine signifikante Albumin-elimination vorbeschrieben (39) und wird auch aufgrund des Filter-cut-offs erwartet. Zytokine wie IL-6 werden durch diesen Filter ebenfalls effektiv eliminiert (39). Die eigenen Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Toxinkonzentration im P1SH-Filtrat höher ist als im 10 kDa cut-off-Filtrat. Es konnte jedoch im Vergleich zum anhepatischen Plasma keine höhere Zellvitalität nach 4 Stunden durch die P1SH-Filtration erreicht werden.

Das Filtrat mit der höchsten Ausschlussgrenze und der damit wahrscheinlich höchsten Konzentration an proteingebundenen Toxinen, Prosep (100 kDa), brachte gegenüber seinem Rückstand keinen Vorteil nach 4 Stunden. In diesem Filtrat waren auch beide gemessene Enzymaktivitäten niedriger als im anhepatischen Plasma.

Es zeigte sich, dass mit höherem molekularem cut-off die Toxinkonzentration im Filtrat steigt und gleichzeitig im korrespondierenden Konzentrat abnimmt. Die durch den 45 bzw. 100 kDa cut-off-Filter passierbaren Proteine und Toxine beeinträchtigen die Zellvitalität nach 4 Stunden.

Zu diesem Messzeitpunkt zeigte sich, dass eine Plasmafiltration die Toxizität des anhepatischen Plasmas für die Zellen verringert. Filter mit niedriger cut-off-Grenze ließen am wenigsten Toxine in das Filtrat und konzentrierten sie deutlich in dem Filtrerrückstand.

24 Stunden nach Zugabe der unterschiedlichen Plasmafraktionen war die GOT- und in geringerem Ausmaß die LDH-Enzymaktivität im 14L-Filtrat weiterhin höher als im 14L-Konzentrat. Auffallend war jedoch, dass ebenfalls nach 24 Stunden die GOT-Enzymaktivität der Zellen im 14L-Filtrat auf die Werte des anhepatischen Plasmas abfiel. Die LDH lag bereits unter den Werten der Zellen im anhepatischen Plasma.

Dies verdeutlicht, dass der niedrige Toxingehalt des am stärksten „aufgereinigten“ 14L-Filtrats im Vergleich mit der unphysiologisch hohen Toxinkonzentration im 14L-Konzentrat die Vitalität und Aktivität der Hepatozyten erhält. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Toxinkonzentration im anhepatischen Plasma

geringer ist als im 14L-Konzentrat. Gegenüber dieser niedrigeren Konzentration des unfiltrierten anhepatischen Plasmas verschwand nach 24 Stunden der „Vorteil“ des 14L-Filters für die Hepatozyten. Nach 48 Stunden lagen die LDH- und GOT-Enzymaktivität im 14L-Filtrat sogar niedriger als im toxischen 14L-Konzentrat und niedriger als im anhepatischen Plasma. Das 14L-Filtrat hatte nach dieser Zeit etwa die gleichen Auswirkungen auf die Zellen wie das toxische anhepatische Plasma. Diese Entwicklung konnte anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellen bestätigt werden. Sowohl im Filtrat als auch im Konzentrat wurden die Zellen apoptotisch. Diese Entwicklung war so nicht erwartet worden und wird durch die Ergebnisse der anderen Filtrate weiter erklärt.

Die Enzymaktivität in den 45 und 100 kDa-cut-off Filtraten stieg dagegen nach 24 Stunden an. Sowohl im Vergleich mit den jeweiligen Rückständen, als auch im Vergleich mit dem unfiltrierten anhepatischen Plasma. Morphologisch zeigten sich weiter vitale Zellen. Auch hier konnte anhand der Vergleiche mit den Filtrerrückständen verdeutlicht werden, dass Toxine durch diese beiden Filter entfernt werden können.

Diese Ergebnisse zeigten mit zunehmender Kulturdauer (24 und 48 Stunden) eine umso größere Abnahme der Zellvitalität und Aktivität, je niedriger der Filter-cut-off wurde. Der anfängliche „Nutzen“ der Filtration für die Hepatozyten verschob sich von dem Filter mit dem niedrigen cut-off hin zu den Filtern mit den höheren molekularen Ausschlussgrenzen. Hier stellt sich die Frage nach möglichen Gründen:

Aufgrund der Größe des Albumins mit einem Molekulargewicht von ca. 66,3 kDa und einem Durchmesser von 5-15 nm, wird dieses Protein mit den daran gebundenen Toxinen, signifikant durch eine Filtration mit dem 14L- und P1SH-Filter eliminiert (39). Wie eingangs beschrieben, sind zudem Zytokine wie IL-6 und TNF- α mit an der Pathogenese des akuten Leberversagens verantwortlich. Das Molekulargewicht von Entzündungsmediatoren beträgt 9–54 kDa und das freier Leichtketten 25–50 kDa (6). In der Arbeitsgruppe Morgera et al. wurde gezeigt, dass eine großporige Filtration in der Lage ist, eine effektive

Elimination von IL-6 und anderen inflammatorischen Mediatoren zu erzielen (6). Die Eliminationskapazität für TNF- α war jedoch begrenzt, eine signifikante Filtration von TNF- α konnte nicht nachgewiesen werden (39).

Durch diese Plasmafiltration werden neben diesen Toxinen alle Moleküle bis zu dem entsprechenden Molekulargewicht durch die Filtration entfernt. Die Zellviabilität und -aktivität nahm mit zunehmender Kulturdauer umso mehr ab, je mehr Moleküle aus dem Plasma durch den Filter entfernt wurden. Das Entfernen von Molekülen ab einem Molekulargewicht von 10 kDa wirkte sich im zeitlichen Verlauf so nachteilhaft auf die Zellen aus, dass sogar mehr Zellen als im toxischen 14L-Rückstand zugrunde gingen.

Der Vergleich mit anderen Arbeiten bekräftigt dieses Ergebnis. Durch die Filtration kommt es zu einem Verlust von Aminosäuren (16) bzw. essentieller Proteine (39). Diese Ergebnisse stammen aus Untersuchungen zur Verwendung der 14L- und P1SH-Filter bei Hämodialyse. Dabei wurde der Verlust an Proteinen noch deutlicher. Ein kumulativer Proteinverlust von 10g pro Tag kann bei einem intensivpflichtigen Patienten, vor allem bei Einsatz der großporigen Hämofiltrationstherapie über Tage, zu einem nicht unerheblichen Proteindefizit führen (39).

Der Vergleich der Plasmafraktionen mit dem Medium sollte zusätzlich Aufschluss darüber bringen, wie sich im Vergleich zum Standardkulturmedium für Schweinehepatozyten die Zellen in den jeweiligen Filtraten entwickeln. Das Filtrat Prosep zeigte hier ein ähnliches Verhalten wie das Medium. Wie schon bei den vorangegangenen Vergleichen entwickelten sich die Zellen in den beiden anderen Filtraten vor allem zu den späteren Zeitpunkten schlechter. Dieser Vergleich bekräftigt damit die negativen Eigenschaften des niedrig filtrierte Plasmas auf die Zellen über einen längeren Zeitraum.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Filtration von anhepatischem Plasma mit Filtern unterschiedlicher Filtergrößen die Zellen vor den Toxinen im unfiltrierten anhepatischen Plasma schützte. Dieser Nutzen war jedoch davon abhängig, wie lange die Zellen in den Filtraten kultiviert wurden. Zu einem frü-

hen Kulturzeitpunkt besteht demnach ein geringer Vorteil bei einem Filter mit geringer Durchlässigkeit. Nach 24 bzw. 48 Stunden ist die Zellvitalität und Zellfunktion in den Filtraten mit höherer Filterdurchlässigkeit höher. Das liegt an der höheren Konzentration von Aminosäuren, essenziellen Proteinen etc., die durch den 10 kDa-Filter in hohem Maß durch Filtration entfernt wurden. Der grundsätzliche Nachteil dieses Filters wurde anfänglich zu dem Messzeitpunkt nach 4 Stunden am ehesten durch die breiteste Toxinreduktion kompensiert.

Es konnte in diesem Versuch aber auch bestätigt werden, dass die im unfiltrierten anhepatischen Plasma kultivierten Schweinehepatozyten ihre Zellfunktion über den Messzeitraum aufrecht erhalten konnten (1;35;55). Morphologisch ließen sich jedoch nach 48 Stunden zunehmend apoptotische Zellen nachweisen.

Nach Analyse der p-Werte waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Dennoch zeigen die Ergebnisse des Versuches einen Vorteil der Filtration für die Zellvitalität und –aktivität, worauf noch näher eingegangen wird.

4.3 Zellkultur mit humanen Hepatozyten

Verwendet wurden kryokonservierte humane Hepatozyten. Die Zellfunktionalität der Hepatozyten wird dadurch nicht beeinträchtigt. Dies zeigte die Kultivierung frischer und kryokonservierter humaner Hepatozyten in Vorversuchen und deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (3).

Der Versuch wurde mit fraktioniertem, humanem Serum eines gesunden Spenders durchgeführt. Aus ethischen Gründen wurde auf die Verwendung von anhepatischem, humanem Blut zu Versuchszwecken verzichtet. Dieses könnte nur im akuten Leberversagen, oder während der anhepatischen Phase einer Lebertransplantation gewonnen werden. In dem Versuch mit filtriertem humanem Plasma geht es daher nicht um die Toxinelimination. Hier werden nur die Einflüsse untersucht, die das fraktionierte Plasma selbst auf Hepatozyten hat. Die Ergebnisse wurden anhand der LDH-Enzymaktivität ermittelt. Durch die Bestimmung weiterer Zellaktivitäts- und Zellvitalitäts-Parameter würden die Einflüsse besser abschätzbar sein. Bedingt durch Filtereigenschaften konnte nur 0,66 ml Filtratvolumen pro Kavität der Zellkulturplatte gewonnen werden, während für das unfraktionierte Plasma 0,8 ml Volumen verwendet wurden. Da-

durch ergaben sich für den Vergleich fraktioniertes Serum zu unfraktioniertem Serum etwas unterschiedliche Serumvolumina.

4.3.1 Ergebnisse fraktioniertes humanes Serum

Über den gesamten Zeitraum waren die LDH-Enzymaktivitäten der Zellen in den Filtraten mit höheren molekularen Ausschlussgrenzen P100 und P50 höher als bei den Zellen, die in den Filtraten mit niederen molekularen Ausschlussgrenzen P5 und P10 kultiviert wurden. Dabei konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Filtraten P5 und P10 gesehen werden. Aufgrund des sehr geringen Unterschiedes der molekularen Ausschlussgrenzen zwischen diesen beiden Filtern war dieses Ergebnis zu erwarten. Im unfiltrierten humanen Plasma entwickelten sich die Zellen am besten. Die Enzymaktivität der Zellen im fraktionierten Serum nahm mit abnehmender Durchlässigkeit der Filter von P100 zu P5 ab.

Es war damit gezeigt, dass die Filtration des gesunden Serums dem Zellwachstum über eine längere Kulturdauer schadet. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Filtration anhepatischen Schweineplasmas. Die anfänglich höhere Zellvitalität durch das 10 kDa-cut-off-Filtrat war bei der Untersuchung mit gesundem humanem Serum nicht erkennbar. Da keine Toxine in dem gesunden Serum vorhanden waren, fehlte auch der „Nutzen“ der Filtration. Aminosäuren, essentielle Proteine etc. wurden in Abhängigkeit der Filterdurchlässigkeit entfernt (3;39). Dies erklärt das schlechtere Zellwachstum in diesen Filtraten.

4.4 Auswirkungen der Serum- und Plasmafiltration auf Zellen

Durch die hier verwendete Methode der Plasmafiltration können Toxine und Entzündungsmediatoren aus anhepatischem Plasma eliminiert werden. Dies geschieht, wie bereits dargelegt, in Abhängigkeit vom Molekulargewicht und der physikalischen Eigenschaften der Moleküle. Dieses Verfahren unterscheidet sich von anderen Eliminationsverfahren wie dem MARS[®]- oder dem Prometheus[®]-System. Primär soll durch diese Verfahren das mit Toxinen beladene Albumin aufgereinigt werden und Gallensäuren aus dem Plasma eliminiert werden (6). Entzündungsmediatoren können teilweise (12), aber nicht in signifikantem Maß durch diese Verfahren eliminiert werden (21;22;53).

Eine Toxinelimination mittels des in dieser Arbeit verwendeten Verfahrens reduziert die Toxizität auf Hepatozytenkulturen. Dadurch konnte die Zellvitalität erhalten bleiben. Allerdings ergab sich das Problem, dass den Zellen durch eine Filtration mit hohem molekularem Ausschluss essenzielle Aminosäuren und Proteine für ein optimales Zellwachstum fehlten. Dies machte sich nach längerer Kulturdauer bemerkbar. In einer Weiterführung des Versuches könnten Aminosäuren der Kultur beigegeben werden. Damit könnte gezeigt werden, ob dadurch der nachteilige Effekt des niederen Cut-Offs aufzuheben ist.

Im Vergleich der unterschiedlichen Verfahren hat eine vor einen Bioreaktor geschaltete MARS[®]-Filtration auf die Apoptoserate der Zellen keinen Einfluss (15). Dabei muss berücksichtigt werden, dass in einem Leberzellreaktor die Zellen unter optimaleren Bedingungen kultiviert sind als es in der hier verwendeten Monoschichtkultur der Fall war. Dies betrifft vor allem die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie die Anordnung der Zellen in der Kultur. Möglicherweise sind dadurch die Zellen in einem solchen optimierten System unempfindlicher gegenüber toxischen Bestandteilen des anhepatischen Plasmas. Allerdings besteht in einem Bioreaktor ein kontinuierlicher Fluss des anhepatischen Plasmas. Die Belastung für die Zellen könnte dadurch wiederum größer sein.

Wie gezeigt werden konnte, ist die Dauer der Exposition in anhepatischem Plasma entscheidend. Es kommt also auch darauf an, wie lange ein Leberzellreaktor an einen Patienten im Leberversagen eingesetzt sein wird. In der klinischen Verwendung von Leberzellreaktoren betrug die Expositionsdauer der Schweinehepatozyten zwischen 6 und 8 Stunden (22;32;47;58). Die Schädigung der Zellen durch das Fehlen essenzieller Aminosäuren und Proteine war vor allem nach 24 und 48 Stunden zu beobachten. Wenn ein Leberzellreaktor nur 6-7 Stunden mit anhepatischem Plasma perfundiert wird, käme dieser Effekt gar nicht zum Tragen.

Zusammenfassung

Hintergrund: Für die Entwicklung eines praxistauglichen Bioreaktors auf Basis von kultivierten Hepatozyten zur überbrückenden Therapie beim akuten Leberversagen, ist die Funktionalität der Zellen im anhepatischen Plasma von zentraler Bedeutung. Anhepatisches Plasma enthält freie und proteingebundene Toxine sowie Zytokine, welche diese Hepatozytenkulturen schädigen können. Daher wurde geprüft, ob sich diese Toxine und Zytokine, abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihren physikalischen Eigenschaften, durch eine Filtration mit Plasmafiltern der Firma Gambro® aus anhepatischem Plasma entfernen lassen.

Material und Methodik: Anhepatisches, porkines Plasma wurde mit unterschiedlichen Plasmafiltern (10, 45, 100 kDa, Fa Gambro®) fraktioniert und porkine Hepatozyten in Monoschichtkultur in diesen Plasmafraktionen kultiviert. Als Parameter wurden die GOT-/LDH-Aktivität und die Zellmorphologie nach 0, 4, 24, 28 h beurteilt. Weiter wurden humane Hepatozyten in fraktioniertem (5, 10, 50, 100 kDa-Filter) gesundem, humanem Serum kultiviert und die LDH-Aktivität nach 1, 3, 5 und 7 Tagen bestimmt.

Ergebnis: Bei porkinen Hepatozyten waren zum frühen Beobachtungszeitpunkt (4 h) die Enzymaktivitäten im 10 kDa-Filtrat höher als im anhepatischen Plasma und höher als bei den anderen Filtraten. Nach 24 und 48 h war dagegen die Hepatozytenvitalität in den Filtraten der 45- und 100kDa-Filter am höchsten. Im 10 kDa-Filtrat waren die Hepatozyten hinsichtlich Zellvitalität- und Aktivität nach diesem Zeitraum deutlich eingeschränkt. Die Enzymaktivität der im humanen, fraktionierten Plasma kultivierten humanen Hepatozyten war umso geringer, je niedriger die molekulare Ausschlussgrenze des jeweiligen Filtrats war.

Schlussfolgerung: Eine Filtration des toxischen, anhepatischen Plasmas kann die Zellvitalität und -aktivität verbessern. Sowohl bei porkinen als auch bei humanen Hepatozyten zeigte sich jedoch mit zunehmender Kulturdauer eine Abnahme der Zellvitalität und -aktivität bei den Plasmafiltern mit niedriger molekularer Ausschlussgrenze. Dieser Effekt ist auf den Entzug von essenziellen Aminosäuren und Proteinen zurückzuführen.

Literatur

Reference List

- (1) Abrahamse SL, van de Kerkhove MP, Sosef MN, Hartman R, Chamuleau RA, van Gulik TM. Treatment of acute liver failure in pigs reduces hepatocyte function in a bioartificial liver support system. *Int J Artif Organs* 2002; 25(10):966-974.
- (2) Awad SS, Swaniker F, Magee J, Punch J, Bartlett RH. Results of a phase I trial evaluating a liver support device utilizing albumin dialysis. *Surgery* 2001; 130(2):354-362.
- (3) Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz M, Adani GL, Lorenzin D et al. Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: in vitro function and clinical application. *Transplant Proc* 2005; 37(1):256-259.
- (4) Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15(2):74-80.
- (5) Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125(8):680-687.
- (6) Bouchard J, Khosla N, Mehta RL. Emerging therapies for extracorporeal support. *Nephron Physiol* 2008; 109(4):85-91.
- (7) Campli CD, Gaspari R, Mignani V, Stifano G, Santoliquido A, Verme LZ et al. Successful MARS treatment in severe cholestatic patients with acute on chronic liver failure. *Artif Organs* 2003; 27(6):565-569.
- (8) Caraceni P, Van Thiel DH. Acute liver failure. *Lancet* 1995; 345(8943):163-169.
- (9) Cheng YB, Wang YJ, Zhang SC, Liu J, Chen Z, Li JJ. Response of porcine hepatocytes in primary culture to plasma from severe viral hepatitis patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11(48):7585-7590.
- (10) De Vriese AS, Colardyn FA, Philippe JJ, Vanholder RC, De Sutter JH, Lameire NH. Cytokine removal during continuous hemofiltration in septic patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(4):846-853.
- (11) Dhiman RK, Jain S, Maheshwari U, Bhalla A, Sharma N, Ahluwalia J et al. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure: an assess-

ment of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) and King's College Hospital criteria. *Liver Transpl* 2007; 13(6):814-821.

- (12) Di Campli C, Zocco MA, Gaspari R, Novi M, Candelli M, Santoliquido A et al. The decrease in cytokine concentration during albumin dialysis correlates with the prognosis of patients with acute on chronic liver failure. *Transplant Proc* 2005; 37(6):2551-2553.
- (13) Falkenhagen D, Strobl W, Vogt G, Schrefl A, Linsberger I, Gerner FJ et al. Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif Organs* 1999; 23(1):81-86.
- (14) Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999; 103(1):137-145.
- (15) Freeman JG, Matthewson K, Record CO. Plasmapheresis in acute liver failure. *Int J Artif Organs* 1986; 9(6):433-438.
- (16) Gil HW, Yang JO, Lee EY, Lee EM, Choi JS, Hong SY. The effect of dialysis membrane flux on amino acid loss in hemodialysis patients. *J Korean Med Sci* 2007; 22(4):598-603.
- (17) Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology* 1992; 76(1):20-23.
- (18) Gohl H, Buck R, Strathmann H. Basic features of the polyamide membranes. *Contrib Nephrol* 1992; 96:1-25.
- (19) Ho DWY, Fan ST, To J, Woo YH, Zhang Z, Lau C et al. Selective plasma filtration for treatment of fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine in a pig model. *Gut* 2002; 50(6):869-876.
- (20) Hughes RD, Yamada H, Gove CD, Williams R. Inhibitors of hepatic DNA synthesis in fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36(6):816-819.
- (21) Ilonen I, Koivusalo AM, Hockerstedt K, Isoniemi H. Albumin dialysis has no clear effect on cytokine levels in patients with life-threatening liver insufficiency. *Transplant Proc* 2006; 38(10):3540-3543.
- (22) Isoniemi H, Koivusalo AM, Repo H, Ilonen I, Hockerstedt K. The effect of albumin dialysis on cytokine levels in acute liver failure and need for liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(2):1088-1090.
- (23) Iwai H, Nagaki M, Naito T, Ishiki Y, Murakami N, Sugihara J et al. Removal of endotoxin and cytokines by plasma exchange in patients with acute hepatic failure. *Crit Care Med* 1998; 26(5):873-876.

- (24) Jalan R, Williams R. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif* 2002; 20(3):252-261.
- (25) Jasmud I, Schwientek S, Acikgoz A, Langsch A, Machens HG, Bader A. The influence of medium composition and matrix on long-term cultivation of primary porcine and human hepatocytes. *Biomolecular Engineering* 2007; 24(1):59-69.
- (26) Khalili TM, Navarro A, Ting P, Kamohara Y, Arkadopoulos N, Solomon BA et al. Bioartificial liver treatment prolongs survival and lowers intracranial pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Artif Organs* 2001; 25(7):566-570.
- (27) Knell AJ, Dukes DC. Dialysis procedures in acute liver coma. *Lancet* 1976; 2(7982):402-403.
- (28) Knubben K, Thiel C, Schenk M, Etspuler A, Schenk T, Morgalla MH et al. A new surgical model for hepatectomy in pigs. *Eur Surg Res* 2008; 40(1):41-46.
- (29) Kramer L. Acute liver failure. *Wien Klin Wochenschr* 2004; 116(3):67-81.
- (30) Ladurner R, Traub F, Schenk M, Konigsrainer A, Glatzle J. Cellular liver regeneration after extended hepatic resection in pigs. *HPB Surg* 2009; 2009:306740.
- (31) Lahdenpera A, Koivusalo AM, Vakkuri A, Hockerstedt K, Isoniemi H. Value of albumin dialysis therapy in severe liver insufficiency. *Transpl Int* 2005; 17(11):717-723.
- (32) Lai WK, Haydon G, Mutimer D, Murphy N. The effect of molecular adsorbent recirculating system on pathophysiological parameters in patients with acute liver failure. *Intensive Care Med* 2005; 31(11):1544-1549.
- (33) Linti C, Zipfel A, Schenk M, Dauner M, Doser M, Viebahn R et al. Cultivation of porcine hepatocytes in polyurethane nonwovens as part of a bio-hybrid liver support system. *Int J Artif Organs* 2002; 25(10):994-1000.
- (34) Ma M, Xu J, Purcell WM. Biochemical and functional changes of rat liver spheroids during spheroid formation and maintenance in culture: I. morphological maturation and kinetic changes of energy metabolism, albumin synthesis, and activities of some enzymes. *J Cell Biochem* 2003; 90(6):1166-1175.
- (35) Matsue H. [Metabolic evaluation of cultured porcine hepatocyte monolayers in human plasma from hepatic failure patients--basic study on development of a bioreactor in hybrid artificial liver.]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1996; 71(4):543-555.

- (36) Mears DC, Stewart G, Sun J, Woodman K, Bourne R, Wang L et al. Experience with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver support system. *Transplant Proc* 2003; 35(1):441-442.
- (37) Mitry RR, Hughes RD, Bansal S, Lehec SC, Wendon JA, Dhawan A. Effects of serum from patients with acute liver failure due to paracetamol overdose on human hepatocytes in vitro. *Transplant Proc* 2005; 37(5):2391-2394.
- (38) Mitzner SR. Albumin dialysis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16(6):589-595.
- (39) Morgera S, Rocktaschel J, Haase M, Lehmann C, von Heymann C, Zimmer S et al. Intermittent high permeability hemofiltration in septic patients with acute renal failure. *Intensive Care Med* 2003; 29(11):1989-1995.
- (40) Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 2000; 182(4):1103-1108.
- (41) Nagaki M, Miki K, Kim YI, Ishiyama H, Hirahara I, Takahashi H et al. Development and characterization of a hybrid bioartificial liver using primary hepatocytes entrapped in a basement membrane matrix. *Dig Dis Sci* 2001; 46(5):1046-1056.
- (42) Nyberg SL, Hibbs JR, Hardin JA, Germer JJ, Platt JL, Paya CV et al. Influence of human fulminant hepatic failure sera on endogenous retroviral expression in pig hepatocytes. *Liver Transpl* 2000; 6(1):76-84.
- (43) O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J* 2005; 81(953):148-154.
- (44) O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342(8866):273-275.
- (45) O'Grady JG, Williams R. Classification of acute liver failure. *Lancet* 1993; 342(8873):743.
- (46) Odeh M. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(4):291-304.
- (47) Papadimitriou D, Arkadopoulos N, Kouskouni E, Tsarouxa N, Demesticha T, Kousi T et al. Hepatocyte function during experimental use of a bioartificial liver. *Transplantation Proceedings* 2004; 36(6):1741-1743.
- (48) Rifai K, Bahr MJ, Schneider A, Ott M, Manns MP. [New devices in liver replacement therapy]. *Med Klin (Munich)* 2003; 98(12):750-753.
- (49) Riordan S, Williams R. Bioartificial liver support: developments in hepatocyte culture and bioreactor design. *Br Med Bull* 1997; 53(4):730-744.

- (50) Rozga J, Williams F, Ro MS, Neuzil DF, Giorgio TD, Backfisch G et al. Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology* 1993; 17(2):258-265.
- (51) Saich R, Selden C, Rees M, Hodgson H. Characterization of pro-apoptotic effect of liver failure plasma on primary human hepatocytes and its modulation by molecular adsorbent recirculation system therapy. *Artif Organs* 2007; 31(9):732-742.
- (52) Sauer IM, Zeilinger K, Obermayer N, Pless G, Grunwald A, Pascher A et al. Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support--a preliminary report. *Int J Artif Organs* 2002; 25(10):1001-1005.
- (53) Stadlbauer V, Krisper P, Aigner R, Haditsch B, Jung A, Lackner C et al. Effect of extracorporeal liver support by MARS and Prometheus on serum cytokines in acute-on-chronic liver failure. *Crit Care* 2006; 10(6):R169.
- (54) Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970; 3:282-298.
- (55) Uchino J, Matsue H, Takahashi M, Nakajima Y, Matsushita M, Hamada T et al. A hybrid artificial liver system. Function of cultured monolayer pig hepatocytes in plasma from hepatic failure patients. *ASAIO Trans* 1991; 37(3):M337-M338.
- (56) Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med* 1989; 169(1):333-338.
- (57) Watanabe FD, Mullon CJ, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S et al. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg* 1997; 225(5):484-491.
- (58) Xue YL, Zhao SF, Luo Y, Li XJ, Duan ZP, Chen XP et al. TECA hybrid artificial liver support system in treatment of acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001; 7(6):826-829.

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alaninaminotransferase
ALV	Akutes Leberversagen
AST	Aspartataminotransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl Ether) N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
FPSA	fraktionierten Plasma Separation und Adsorption
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HE	hepatische Enzephalopathie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
PBS	engl.: Phosphate buffered saline
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α

Anhang

Danksagungen

Bedanken möchte ich mich bei

Herrn Prof. Dr. A. Königsrainer, für die Bereitstellung des gesamten Umfelds und den Leberresektaten aus dem Zentral-OP für diese Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Steurer, für die konstruktive Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. M. Schenk für das umfangreiche vermittelte Wissen, die gute Betreuung während dieser Arbeit mit den sehr konstruktiven und kritischen Vorschlägen und für die Bereitstellung der Schweineleber und des Schweineplasmas aus dem Tier-OP.

Frau A. Hunder, für die Zusammenarbeit im Labor und für die Vermittlung vieler Präparations- und Zellkulturtechniken.

Herrn H.-R. Drieschmann für die gute Zusammenarbeit und die Filtration des Schweineplasmas.

Frau M. Seitzer, die mir mit ihrer großen und wertvollen Erfahrung während der Labortätigkeit motivierend und unterstützend zur Seite stand.

Herrn M. Niyazi, für die moralische und fachliche Unterstützung bei sämtlichen Fragen und Problemen, vor allem bei statistischen Unklarheiten.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin und zukünftigen Frau.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

NAME

Steffen Endres

GEBURTSDATUM

10. Februar 1982 in Schweinfurt

Vater: Bruno Endres, Dipl. Ingenieur Elektrotechnik

Mutter: Brigitte Endres, geborene Popp, Dipl. Pflegepädagogin

SCHULBILDUNG

1988-1992	Besuch der Johann–Brücker-Grundschule Schönaich
1992-2001	Besuch des Max-Planck-Gymnasium in Böblingen
19.06.2001	Abschluss mit Abitur

Zivildienst

09/2001-06/2002	Zivildienst im Marienhospital Stuttgart im Pflegebereich
-----------------	---

UNIVERSITÄT

10/2002-10/2004	Studium der Humanmedizin, Vorklinischer Abschnitt, Universität Tübingen
09/2004	Ärztliche Vorprüfung
10/2004-08/2007	Studium der Humanmedizin, Klinischer Abschnitt, Universität Tübingen
08/2007-07/2008	Studium der Humanmedizin, Praktisches Jahr, Klinikum Böblingen/Sindelfingen
13.11.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

01.12.2008	Assistenzarzt Innere Medizin, Krankenhaus Sindelfingen
------------	--

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig gefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Aidlingen, den 11. Juni 2009