

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Trans-  
plantationschirurgie Tübingen**

**Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**Evaluation des Cytochrom P<sub>450</sub>-Enzymsystems  
und anderer leberzellspezifischer Funktionen  
im Rahmen eines Leberersatzverfahrens**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Axel Schläger  
aus  
Stuttgart-Bad-Cannstatt

**2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Königsrainer
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg





# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung .....	1
1.1 Leberversagen .....	1
1.2 Systeme zur Unterstützung der Leberfunktion .....	4
1.3 Kryokonservierung von Hepatozyten.....	7
1.4 Ausgewählte hepatozytenspezifische Funktionen .....	8
1.5 Fragestellung .....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Tiere und Material .....	14
2.1.1 Zellpräparation.....	14
2.1.2 Zellkultur .....	15
2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.4 Proteinbestimmung.....	16
2.1.5 Kryokonservierung Hepatozyten.....	17
2.1.6 Produktbestimmungen.....	18
2.1.7 Kreislauf-Versuche .....	19
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Zellpräparation.....	21
2.2.2 Kryokonservierung.....	26
2.2.3 Bestimmung der EROD- und ECOD- Aktivität .....	30
2.2.4 Proteinbestimmung.....	35
2.2.5 Leberersatzverfahren.....	37
2.2.6 Messung der Proben aus den Kreislaufversuchen .....	39
2.2.7 Statistische Methoden .....	47

## Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse .....	48
3.1	Methodenevaluierung der Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin- und 7-Hydroxycoumarin-Deethylase (EROD und ECOD) Aktivität .....	48
3.1.1	Linearität der Methode .....	48
3.1.2	Präzision der Methoden .....	48
3.1.3	Haltbarkeit der Produkte .....	49
3.1.4	Linearität der ersten Stunde .....	50
3.1.5	Einfluss der Inkubationszeit .....	51
3.2	Präparation der Leberzellen .....	52
3.2.1	Leberzellpräparation aus Lewis-Ratten .....	52
3.2.2	Leberzellpräparation aus Schweinen .....	52
3.3	Kryokonservierung von Schweinehepatozyten .....	52
3.4	Ergebnisse der Zellkulturversuche .....	53
3.4.1	Protein in den Zellkulturversuchen .....	53
3.4.2	ECOD-Aktivität in den Zellkulturversuchen .....	53
3.4.3	EROD-Aktivität in den Zellkulturversuchen .....	54
3.4.4	Glucuronidierungsleistung in den Zellkulturversuchen .....	56
3.4.5	Einfluss von ER auf die ECOD-Aktivität .....	59
3.4.6	Einfluss von EC auf die EROD-Aktivität .....	60
3.5	Ergebnisse der Kreislaufversuche .....	62
3.5.1	ECOD-Aktivität in den Kreislaufversuchen .....	62
3.5.2	Glucuronidierungsleistung in den Kreislaufversuchen .....	63
3.5.3	Albuminproduktion in den Kreislaufversuchen .....	65
3.5.4	Ammoniakelimination in den Kreislaufversuchen .....	65
3.5.5	Harnstoffproduktion in den Kreislaufversuchen .....	66
3.5.6	Sorbitolelimination in den Kreislaufversuchen .....	66

## Inhaltsverzeichnis

3.5.7	Galaktoseelimination in den Kreislaufversuchen .....	67
3.5.8	LDH-Freisetzung in den Kreislaufversuchen .....	67
3.5.9	Glucose in den Kreislaufversuchen .....	68
3.5.10	Sauerstoffverbrauch in den Kreislaufversuchen .....	71
3.5.11	Perfusionsdruck in den Kreislaufversuchen .....	73
3.5.12	Vergleich der Ergebnisse der Kreislaufversuche .....	73
3.5.13	Korrelation der in den Kreislaufversuchen gemessenen Parameter 75	
4	Diskussion .....	78
4.1	Methodenevaluierung der EROD- und ECOD Aktivitätsbestimmung ..	78
4.2	Monolayerkultur .....	79
4.3	Leberzellreaktor .....	82
4.4	Kryokonservierung von Schweinehepatozyten .....	86
4.5	Verbesserungsmöglichkeiten und Probleme .....	89
4.6	Probleme bis zur klinischen Anwendung .....	90
5	Zusammenfassung .....	92
6	Abkürzungsverzeichnis .....	94
7	Literaturverzeichnis .....	95
8	Danksagung .....	105





# 1 Einleitung

## 1.1 Leberversagen

Das Leberversagen entsteht durch einen raschen Ausfall der verschiedenen Hepatozytenfunktionen. Bei zuvor lebergesunden Patienten spricht man vom akuten Leberversagen (ALV), bei Dekompensation der Leberfunktion von Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung, meist im Stadium der Leberzirrhose, spricht man von akut auf chronischem Leberversagen (ACLV), welches aufgrund des geringeren Regenerationspotentials der vorgeschädigten Leber mit einer schlechteren Prognose verbunden ist.

Die häufigsten Ursachen eines ALV in Deutschland sind virale Hepatitiden und Medikamente. Hierbei können sowohl Überdosierungen (z. B. Paracetamol) als auch idiosynkratische Medikamentenreaktionen (z. B. auf Halothan, Isoniazid, Amiodaron) zum Leberversagen führen. Seltener sind Toxine (v. a. organische Lösungsmittel, Amanitine) und Erkrankungen wie der Morbus Wilson, das Budd-Chiari-Syndrom oder die Schwangerschaftsfettleber Ursache für ein Leberversagen [76].

Im Zeitalter der Ressourcenknappheit und um den richtigen Zeitpunkt für ein eventuelles unterstützendes Verfahren festlegen zu können, ist die Determinierung prognostischer Faktoren, die eine Aussage darüber erlauben, ob ein Patient das Leberversagen ohne Leberunterstützungsverfahren oder Lebertransplantation überleben wird, wichtig. Die zwischen Beginn des Ikterus und den ersten Zeichen der hepatischen Enzephalopathie verstrichene Zeit wird für die Einteilung in akutes (< 2 Wochen) und subakutes (> 2 Wochen) Leberversagen herangezogen, wobei ein kurzes Intervall mit einer besseren Prognose verbunden ist [76]. Alter < 11 und > 40 Jahre, ist ebenfalls ein ungünstiger prognostischer Faktor [69]. Weitere prognosebeeinflussende Faktoren wie beispielsweise die Ätiologie des Leberversagens konnten identifiziert werden und fanden Einfluss in die King's College und die Clichy-Kriterien der Prognoseabschätzung und Indikationsstellung zur Lebertransplantation beim akuten Leberversagen [1,3,69,74]. Für Patienten mit chronischen Lebererkrankungen hat sich diesbe-

## Einleitung

zätzlich der Model for End-stage Liver Disease Score (MELD-Score) etabliert [41]. Bislang ist die prognostische Aussagekraft dieser Scores insbesondere für das ALV unbefriedigend, und neue Scores werden entwickelt, von denen der 2006 von Paláez-Luna vorgestellte acute liver failure in-hospital mortality prediction score (ALFIHMS) den besten prädiktiven Wert zu haben scheint [74]. Klinisch führt der Ausfall der vielfältigen Synthese-, Biotransformations-, Homöostase-, und Stoffwechsellleistungen der Leber zu einem komplexen Krankheitsbild, in dessen Verlauf es zu lebensbedrohlichen Hypoglykämien, Gerinnungsstörungen, und hypotonen, hyperdynamen Kreislaufregulationen kommt. Das im Rahmen der hepatischen Enzephalopathie entstehende Hirnödem bestimmt häufig die Prognose des Patienten. Daneben erschweren ein renales und pulmonales Pumpversagen sowie septische Komplikationen den Verlauf der Erkrankung [76,80]. Trotz der steten Weiterentwicklung der Intensivmedizin in den letzten 30 Jahren sind die Überlebensraten bei alleiniger konservativer Therapie niedrig – sie liegen je nach Patient und Ätiologie bei 20-40% [36,69], da vor allem der Progredienz der hepatischen Enzephalopathie bislang keine effektiven konservativen Therapiemaßnahmen gegenüber gestellt werden können.

Erst die Einführung der orthotopen Lebertransplantation führte zu Einjahresüberlebensraten von aktuell über 85% [77].

Neben den allgemeinen Operationsrisiken, die bei Patienten mit Leberinsuffizienz größer sind als bei gesunden Patienten, besteht direkt nach einer Lebertransplantation die Gefahr der Nicht- bzw. Dysfunktion des Spendeorgans und der perakuten oder akuten Abstoßungsreaktion [84,101] die mit den heute zur Verfügung stehenden immunsuppressiven Medikamenten, insbesondere seit der Einführung von Calcineurininhibitoren, Ciclosporin und Tacrolimus, aber gut zu kontrollieren sind [23]. Langfristig problematisch sind neben der Gefahr der chronischen Abstoßungsreaktion [84,101] die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie, insbesondere die erhöhte Infektanfälligkeit und die erhöhte Rate maligner Neoplasien [101]. Auch werden die nach einer Lebertransplantation überdurchschnittlich häufig beobachtete Beeinträchtigung der Nierenfunktion, arterielle Hypertonie, neurologische und psychiatrische Komplikationen,

## Einleitung

Übergewicht, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und Knochenerkrankungen [75] teilweise als Nebenwirkungen dieser Medikamente beschrieben. Die Lebenserwartung und bei einigen Patienten auch die Lebensqualität sind erniedrigt [34]. Außerdem verfügt die Leber zumindest beim akuten Leberversagen über ein großes Regenerationspotential mit der Möglichkeit der Restitutio ad integrum [100]. Mit Entfernung der körpereigenen Leber wird dem Patient diese Möglichkeit, und damit ein Leben ohne die Folgen der Lebertransplantation und der damit verbundenen Immunsuppression, genommen. Doch ist die orthotope Lebertransplantation bislang die wirksamste Therapie sowohl des ALF als auch ACLF [70].

Leider versterben angesichts der ausgeprägten Knappheit an Spenderorganen [64] trotz Anpassung der Vergabekriterien viele Patienten, da sie nicht rechtzeitig ein Spenderorgan bekommen [70,92].

Die Ansätze, ein Ausweg aus dieser Situation zu finden sind vielschichtig. Durch verbesserte Öffentlichkeitsarbeit kann die Spendebereitschaft erhöht werden. Vorhandene Spenderlebern können mit Erfolg geteilt und auf mehrere Patienten verteilt werden und es besteht die Möglichkeit der Leberlebendspende [62,88].

Die xenogene Lebertransplantation von tierischen Organen in den menschlichen Organismus bietet ein unerschöpfliches Reservoir an Spenderorganen und ist Gegenstand aktueller Forschung [10,11]. Gegenwärtig stellen die hyperakute Abstoßungsreaktion und die akute vaskuläre Abstoßung die größten Hindernisse dar [18]. Diese werden in erster Linie vermittelt durch präexistente xenogene Antikörper gegen Gal  $\alpha$ 1-3 Gal [51]. Durch die Schöpfung eines  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knock-out Schweines [47] sowie durch die Schaffung transgener Schweine mit humanen Komplementregulationsproteinen wie hCD46 und hCD55 [12] wurden entscheidende Schritte nach vorne getan. Aktueller Gegenstand der Forschung ist die Ausschaltung von Antikörpern gegen nicht-Gal  $\alpha$ 1-3 Gal-Epitope [8].

Weitere bislang ungelöste Probleme der Xenotransplantation sind zelluläre Abstoßungsreaktionen, die Aktivierung des Gerinnungssystems in xenogenen Organen, die zu einer Verbrauchskoagulopathie führen kann, und die Übertra-

gungsmöglichkeit tierischer Krankheiten, insbesondere endogener retroviraler Schweineviren [72].

Eine Strategie, die Probleme sowohl der allo- als auch der xenogenen Lebertransplantation zu umgehen ist der temporäre Einsatz eines extrakorporalen Leberunterstützungssystems bis zur Regeneration der körpereigenen Leber.

### **1.2 Systeme zur Unterstützung der Leberfunktion**

Eine aktuelle Übersichtsarbeit über die bislang verfolgten Strategien zur Unterstützung der Leberfunktion wurde 2005 von Demetriou publiziert [15]. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen nicht-biologischen und biologischen Systemen.

Nicht-biologische Systeme sorgen lediglich für die Entfernung von Giftstoffen und Metaboliten aus dem Plasma des Patienten, basierend auf der Theorie, dass im Rahmen des akuten Leberversagens in erster Linie diese Stoffe verantwortlich sind für die Genese der hepatischen Enzephalopathie und des Multiorganversagens [39,59,59,85]. Durch die Gabe von Albuminlösungen oder Frischplasma kann auch die Synthesefunktion der Leber teilweise ersetzt werden.

Die gesamten Erfahrungen mit Plasmapherese, Hämodialyse, Hämofiltration und Hämo-perfusion bleiben bislang den Wirksamkeitsnachweis schuldig [36]. Das von Stange et al 1993 eingeführte „molecular adsorbent recirculating system“ (MARS) [90], ermöglicht durch eine mit Albumin imprägnierte Dialysemembran und durch eine albuminhaltige Dialyseflüssigkeit die Elimination auch von albumingebundenen Stoffen und ist das momentan am besten untersuchte System seiner Art. In einer prospektiven kontrollierten klinischen Studie verbesserte MARS die Überlebensrate der Akutphase des hepatorenen Syndroms [61]. Bei Patienten mit ALF lässt sich durch den Einsatz von MARS eine Verbesserung der klinischen Situation, insbesondere Reduktion des Bilirubinspiegels, Verbesserung der hepatischen Enzephalopathie und Reduktion des intrakraniellen Druckes, Verbesserung der hämodynamischen Situation und der Nierenfunktion, feststellen. Während in einer, allerdings kleinen, prospektiven kontrollierten Studie gezeigt werden konnte, dass beim ACLF das 30-

## Einleitung

Tage Überleben signifikant verbessert wird [33], fehlen derartige Ergebnisse momentan noch für das ALF.

Neben den Entgiftungsfunktionen sind die biologischen Leberunterstützungssysteme durch den Einsatz von Hepatozyten in der Lage, auch Synthese- und metabolische Leistungen der Leber zu unterstützen bzw. zu ersetzen.

Darüber hinaus verfügt die Leber über ein großes Regenerationspotential, dessen Mechanismen zu entschlüsseln man gerade erst begonnen hat [25,73]. Während man mit den oben beschriebenen nicht-biologischen Entgiftungssystemen Gefahr läuft, für die Leberregeneration wichtige Mediatoren und Stoffe zu entfernen, könnten leberzellbasierte Unterstützungssysteme hier möglicherweise entscheidend zur Regeneration der Leber beitragen.

Biologische leberzellbasierte Systeme stecken noch in den Kinderschuhen. Im Wesentlichen werden dabei zwei Strategien verfolgt:

Als zunächst relativ simple Methode erscheint die extrakorporale Perfusion einer xenogenen (meist Schweine-) oder einer nicht für die Transplantation geeigneten humanen Spenderleber. Grundsätzlich bestehen die gleichen Probleme wie bei Transplantation xenogener Organe. Kurzzeitig brachte dieses Verfahren eine Verbesserung der klinischen Situation der Patienten, zeigte aber keinen Effekt auf die Langzeitüberlebensrate [5,20]. Eine hohe Komplikationsrate mit Blutungen, schnellem Funktionsverlust durch Mikrozirkulationsstörungen und Abstoßungsreaktionen in der xenogenen Leber (zwischen 6-12h bei porcinen Lebern und 35-51h bei humanen Lebern) sowie Blutungen und Hämolyse und dem dadurch hohen logistischen Aufwand machen die extrakorporale Leberperfusion bislang zu einer Methode für den Einzelfall [7,15,36].

Einen etwas anderen Ansatz verfolgen die hybriden Leberunterstützungssysteme. Unterschiedliche Modelle befinden sich in Entwicklung. Einen guten Überblick aktueller Systeme gibt ein 2005 von Park veröffentlichter Übersichtsartikel [71]. Das allen zugrunde liegende Prinzip ist die Hepatozytenkultur in einem Bioreaktor, der vom Patientenblut oder -plasma durchströmt wird. Frühe Modelle brachten keine messbaren klinischen Erfolge, so dass Weiterentwicklungen notwendig waren. 2003 konnte erstmals in einer Meta-Analyse von Kjaergard eine Verbesserung der Überlebensrate des ACLF um 33% gezeigt werden [43].

## Einleitung

Aktuelle Modelle versuchen insbesondere, die Kulturbedingungen zu optimieren. Dabei stehen im Vordergrund die unabhängige Nähr- bzw. Sauerstoffversorgung der in Kultur gehaltenen Hepatozyten und die Optimierung der Kulturbedingungen. Vielversprechende Ansätze sind die Mikroverkapselung von Hepatozyten in  $\text{Ca}^{++}$ -Alginat, Kokulturen mit Nichtparenchymzellen und Kollagensandwich-Monolayer-Kulturen von Hepatozyten, die bislang die beste Kulturform für Hepatozyten darstellen [14] sowie die Nachahmung der dreidimensionalen Läppchenstruktur der Leber [81]. Unterschiede zwischen den aktuell in Entwicklung befindlichen hybriden Leberunterstützungssystemen liegen vor allem im Vorhandensein bzw. Fehlen einer Immunbarriere, die aber gleichzeitig auch eine Diffusionsbarriere bildet, in der eingesetzten Zellmasse, in der Perfusion mit Vollblut oder mit Plasma sowie in der eingesetzten Zellart.

Erste Wahl für hybride Leberunterstützungssysteme sind aufgrund der guten Kompatibilität humane Leberzellen. Da es bislang nicht gelungen ist, diese in vitro zu vermehren und die meisten Spendeorgane zur Lebertransplantation herangezogen werden, ist man gezwungen über Alternativen nachzudenken.

Tierische Hepatozyten sind in beinahe unerschöpflichem Umfang verfügbar. Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität und der relativ hohen Ähnlichkeit gegenüber humanen Leberzellen bieten sich hier besonders Schweineleberzellen an und werden momentan auch von der Mehrheit der Arbeitsgruppen, die an der Entwicklung eines hybriden Leberersatzverfahrens arbeiten, eingesetzt [71]. Probleme beim Einsatz dieser Zellen sind, ähnlich wie bei der Xenotransplantation, die mögliche Infektion mit Xenozoonosen, insbesondere die Übertragung endogener retroviraler Schweineviren [72], die allerdings keine klinische Relevanz zu haben scheint [46], sowie, insbesondere bei Systemen ohne Immunbarriere, Komplikationen im Sinne einer Abstoßungsreaktion. Die Fortschritte aus dem Gebiet der Xenotransplantation mit der Schöpfung eines  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knock-out Schweines [47] sowie der Schaffung transgener Schweine mit humanen Komplementregulationsproteinen [12], die weniger immunogen sind, sind hier natürlich ebenfalls anwendbar. Problematisch ist auch, dass die von xenogenen Leberzellen synthetisierten Produkte wie

z. B. Albumin und Gerinnungsfaktoren nicht identisch mit den entsprechenden humanen Produkten sind, so dass auch hier eine Antikörperbildung möglich ist. Leberzelllinien, die ihre hepatozytenspezifischen Funktionen zumindest teilweise nicht verloren haben, sind weitere einsetzbare Alternativen. So verwendet z. B. das extracorporeal liver assist device (ELAD) die Hepatoblastom-Zelllinie C3A [22]. Die im Vergleich zu primären Hepatozyten niedrigere metabolische Aktivität [68] kann durch eine größere Zellmasse ausgeglichen werden. Allerdings besteht die Gefahr, dass Tumorzellen in den Patienten eingeschleust werden. Ein Ansatz, diesem Problem zu begegnen entwickelten Kobayashi et al. durch Entwicklung der mittels des Cre/Lox-Systems reversibel immortalisierten Zelllinie NKNT-3 [45]. Durch Transfektion mit dem Herpes simplex Thymidin-Kinase Gen können die eingesetzten Zellen sensibel für Ganciclovir gemacht werden [13]. Der Einsatz solcher Techniken wird es ermöglichen, nach Beendigung der Therapie mit dem Leberunterstützungsverfahren eventuell in den Körper gelangte Tumorzellen gezielt abzutöten. Ein aktueller Forschungsschwerpunkt ist die (Trans-) Differenzierung metabolisch aktiver Leberzellen aus humanen (Stamm-) Zellen, die im Idealfall vom Patienten selbst stammen, dann nicht von dessen Immunsystem als fremd erkannt werden und somit die immunologischen Probleme der nicht autologen Transplantation umgangen werden können [49].

### **1.3 Kryokonservierung von Hepatozyten**

Im Ernstfall ist es entscheidend, möglichst schnell ein einsatzfähiges Leberunterstützungssystem zur Verfügung zu haben. Eine Möglichkeit, dies sicherzustellen, liegt in der Verwendung kryokonservierter Hepatozyten, die dann nur noch aufgetaut zu werden brauchen.

In den letzten Jahrzehnten konnten einige Arbeitsgruppen Fortschritte bei der Kryokonservierung von nativen Hepatozyten verzeichnen [16,19,91,93,94,98]. Dabei kristallisierten sich einige für die Qualität der Kryokonservierung wichtige Punkte heraus:

Mit einem computergesteuerten Einfrierprotokoll mit einer langsamen Kühlungsrate unterbrochen von einer Schockkühlung bei Beginn der Eiskristallisation ließen sich die besten Überlebensraten erzielen [16].

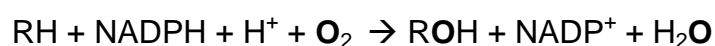
Die optimale Konzentration des Kryoprotektors Dimethylsulfoxid (DMSO) liegt bei 10% und sollte schrittweise erreicht und wieder reduziert werden [16].

Werden die Zellen nach dem Auftauen durch eine Percoll-Zentrifugation aufgereinigt, so sind deren enzymatische Aktivitäten nicht wesentlich niedriger als die nativer Hepatozyten [16].

Je geringer die Menge der in einem Gefäß eingefrorenen Zellen und je besser die Hepatozyten während des Einfriervorganges mit Nährstoffen und mit Sauerstoff versorgt sind, desto höher ist die Vitalität nach dem Auftauen [16].

### **1.4 Ausgewählte hepatozytenspezifische Funktionen**

Eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Hepatozyten spielen die Cytochrom P450 (CYP)-Enzyme. Der Name beruht auf der erstmals 1958 von Klingenberg beobachteten Tatsache, dass diese „Pigmente“ nach der Bindung von Kohlenmonoxid Licht der Wellenlänge 450nm absorbieren [44]. Ursächlich dafür ist der fünfte Ligand der in diesen Proteinen gebundenen Häm-Gruppe, der nicht, wie bei vielen hämhaltigen Enzymen, ein Stickstoffrest, sondern das Thiolat-Anion eines Cysteins ist [24]. Je nach Mechanismus des Elektronentransports von NADPH zum aktiven Zentrum werden vier verschiedene Gruppen der CYP450 Enzyme unterschieden [102]. Sie sind in der Lage, unterschiedliche Reaktionen wie Oxidation, Dealkylation, Dehydratation, Dehydrogenation, Isomerisation, Dimerisation, Spaltung von C-C Bindungen und Reduktion zu katalysieren [58]. Sie werden als mischfunktionelle Oxidasen oder Monooxygenasen bezeichnet, da sie im Rahmen des sog. Phase-I-Metabolismus ein Atom des molekularen Sauerstoffs in das Substratmolekül, das andere in Wasser einführen [102]. Dabei ergibt sich der prinzipielle Reaktionsmechanismus:



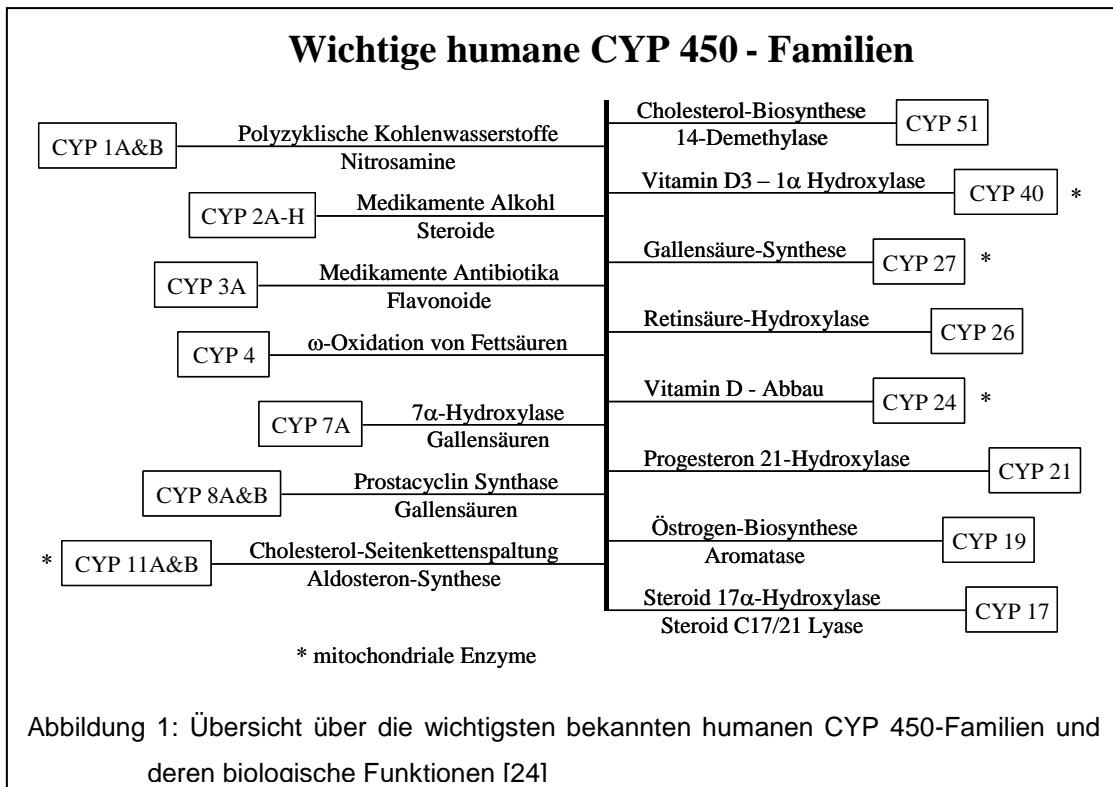
Im anschließenden sog. Phase-II-Metabolismus wird an diese eingeführte Hydroxylgruppe durch Enzyme wie z. B. Glucuronyltransferasen, Sulfatasen, N-



## Einleitung

acetyl-transferasen und Aminosäuretransferasen eine hydrophile Gruppe angehängt [37]. Das Molekül wird dadurch insgesamt wasserlöslicher und kann renal ausgeschieden werden. CYP 450-Enzyme werden in vielen Geweben, doch besonders zahlreich in der Leber exprimiert [24]. Die wichtigsten Reaktionen, die sie dort katalysieren sind in den Mitochondrien die Hydroxylierung am 27 C-Atom des Cholesterols (Vitamin D-Synthese), sowie in den Mikrosomen die Gallensäurebildung, die Epoxidierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren und der Metabolismus von Xenobiotica, z. B. durch N- und O- Dealkylierungen, Alkohol-Oxidation, Oxygenation von Alkanen und Arenen sowie Hydroxylierungen aromatischer Verbindungen [24]. Die CYP450-Enzyme sind eine sehr heterogene Proteingruppe, die im Laufe der Forschungen durch die zahlreichen Trivialnamen schnell sehr unübersichtlich geworden ist. Nebert et al. führten 1987 eine systematische Nomenklatur für das CYP450-Enzymsystem ein [65], die seither im Zweijahresrhythmus aktualisiert wird. Sie werden in Familien und Unterfamilien eingeteilt. Besteht eine Homologie von mehr als 40% der Aminosäuresequenz, so gehören die Enzyme zur gleichen Familie. Beträgt die Homologie mehr als 55%, so gehören sie zur selben Unterfamilie. Die Familie wird mit einer Zahl, die Unterfamilie mit einem Buchstaben benannt [65]. Eine aktuelle Übersicht über CYP 450-Enzymsysteme des Menschen und verschiedener Tiere sind im Internet unter <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> zu finden. Eine Übersicht der wichtigen bislang bekannten humanen CYP450-Familien und deren Funktionen ist in Abb. 1 dargestellt.

Bei sehr schweren Lebererkrankungen wie z. B. der akuten viralen Hepatitis oder der dekompensierten Leberzirrhose vermindert sich auch die Funktion des CYP 450 -Enzymsystems [82], so dass dessen Funktionen von einem Leberunterstützungsverfahren getragen werden müssen.



Marker für die CYP 450-Aktivität ist beispielsweise die Aktivität der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase (ECOD) und der 7-Ethoxyresorufin-O-Dealkylase (EROD). Das Verfahren zur Bestimmung der ECOD-Aktivität wurde erstmals 1972 von Ullrich [97], das Verfahren zur Bestimmung der EROD-Aktivität erstmals 1974 von Burke beschrieben [6]. Beide werden seither verbreitet als Parameter für die Aktivität der mikrosomalen O-Dealkylase-Reaktion verwendet. Beide Verfahren sind einfach und schnell durchzuführen, da die Produkte ohne Folgereaktion oder Extraktion direkt fluorometrisch nachgewiesen werden können. In humanen Leberzellen wird 7-Ethoxycoumarin (EC) von CYP 1A1/2, 2A6, 2B6, 2C9, 2E1 und 3A3/4/5 deethyliert, in Rattenleberzellen konnte dies für CYP 1A1/2, 2B1/2 und 2E1 nachgewiesen werden. Für Schweineleberzellen ist dies bislang nicht untersucht [17]. Die O-Dealkylation von Ethoxyresorufin (ER) erfolgt in den humanen, Ratten- und wahrscheinlich auch in Schweineleberzellen durch die CYP 1A1/2 [17].

Die Elimination von Ammoniak aus dem Kreislauf ist eine weitere zentrale Aufgabe des Leberstoffwechsels. Der seit langem bekannten Assoziation zwischen der Kumulation von Ammoniak und der Entwicklung einer hepatischen Enze-

## Einleitung

phalopathie konnte mittlerweile ein pathophysiologisches Modell zugrunde gelegt werden [54,85,86,89]. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass Hirndruck im Rahmen der hepatischen Enzephalopathie eine häufig zum Tode führende Komplikation darstellt ist die Elimination von Ammoniak eine essentielle Aufgabe eines Leberersatzverfahrens. Ammoniak kann vom Körper durch zwei Mechanismen entgiftet werden: Zum einen durch die in der nativen Leber in den perivenösen Bereichen, aber auch in nicht hepatischen Geweben, insbesondere im Gehirn, exprimierte Glutaminsynthetase, die aus Ammoniak und Glutamat unter ATP-Verbrauch Glutamin bildet, und zum anderen durch den in der nativen Leber in den periportalen Arealen lokalisierten Harnstoffzyklus, dessen Produkt Harnstoff leicht zu messen ist und einen funktionierenden Harnstoffzyklus anzeigt [56].

Neben zahlreichen anderen Proteinen wie beispielsweise den Blutgerinnungsfaktoren und zahlreichen akute-Phase Proteinen synthetisiert die Leber auch das Albumin. Albumin ist ein aus 584 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen Hauptaufgabe die Bindung von schlecht wasserlöslichen Metaboliten, Hormonen und sonstigen Substanzen ist und somit deren Transport im Blut sicherstellt. Zusätzlich ist die Albuminkonzentration im Blut die Regelgröße für den kolloidosmotischen Druck. Beim Leberversagen ist die Albuminkonzentration erniedrigt und es kann zu Ödemen und Aszitesbildung kommen [76]. Die Substitution von Albumin ist eine wichtige Funktion, die ein Leberunterstützungsverfahren zu leisten hat und die Albuminproduktion ein wichtiger Parameter für die Funktionstüchtigkeit der Hepatozyten.

Leberzellen leisten mit ihrer Fähigkeit zur Glukoneogenese und Glykogenbildung einen wichtigen Beitrag zur Glukosehomöostase. Doch sie benötigen neben einer ausreichenden Sauerstoffversorgung auch selbst Glukose als Energieträger, um die vielen teilweise sehr energieintensiven metabolischen und synthetischen Funktionen aufrecht erhalten zu können. Ein Leberersatzverfahren muss diese beim Patienten ausgefallene Funktion ersetzen können. In vitro gibt die Bestimmung der Glukosekonzentration im Medium in erster Linie Aufschluss über die Versorgung der Leberzellen mit energiereichen Substraten wie unter anderem auch der ausschließlich von der Leber

## Einleitung

metabolisierten Galaktose und Sorbitol. Der Galaktoseabbau findet im Wesentlichen in der Leber statt. Zunächst wird Galaktose von einer spezifischen Galaktokinase unter ATP-Verbrauch zu Galaktose-1-Phosphat phosphoryliert, das anschließend durch Katalyse der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase mit UDP-Glucose unter Bildung von UDP-Galaktose und Glucose-1-phosphat reagiert. Die dadurch aktivierte Galaktose wird durch die UDP-Galaktose-4-Epimerase durch Epimerisierung am C-Atom 4 zu UDP-Glucose umgebaut, welches in Glykogen eingebaut werden kann und über die Glykogenolyse dem Organismus als Glukose zur Verfügung steht [56]. Sorbitol wird fast vollständig von Hepatozyten aus dem Plasma extrahiert und eignet sich daher zum Beispiel auch zur Bestimmung der Plasmaflussrate in der Pfortader [63]. Sorbitol kann auch in extrahepatischen Geweben, die in einem hybriden Leberunterstützungssystem aber nicht vorkommen, durch die Aldosereduktase zu Glucose metabolisiert werden [56]

Ein wichtiger Parameter für die Zellvitalität *in vitro* ist die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH). Sie ist ein in verschiedenen Isoformen vorkommendes, in jeder Zelle exprimiertes Enzym der Glukoneogenese. Gehen Zellen zu Grunde, so wird LDH freigesetzt. Steigt die LDH-Aktivität im Medium der kultivierten Zellen an, so ist dies ein Parameter dafür, dass Zellen untergegangen sind.

### 1.5 Fragestellung

Da ein akutes Leberversagen ein sehr schnell einsetzendes und fortschreitendes Geschehen ist, muss im Ernstfall innerhalb sehr kurzer Zeit ein Unterstützungssystem zur Verfügung stehen. Dann erst mit der zeitaufwändigen Zellpräparation zu beginnen ist bei der Verwendung von Schweinleberzellen kritisch und bei dem Fernziel humane oder aus Stammzellen differenzierte Hepatozyten zu verwenden unmöglich. Eine Möglichkeit, schnell ein Unterstützungssystem in Betrieb nehmen zu können, bietet unter anderem die Verwendung von kryokonservierten Hepatozyten.

Im ersten Versuchsteil sollte in Zellkulturversuchen untersucht werden, mit welchem Funktionsverlust des Phase-I- und Phase-II-Metabolismus der Hepatozyten durch die Kryokonservierung zu rechnen ist und wie die Funktion des CYP450 Enzymsystems von Schweinehepatozyten im Vergleich zu den besser untersuchten Rattenhepatozyten steht. Als Marker hierzu wurden die CYP450 abhängig metabolisierten Substrate EC und ER sowie die Glucuronidierung der jeweiligen Produkte verwendet.

In einem zweiten Versuchsteil sollten dann die hepatozytenspezifischen Aktivitäten der Leberzellen in dem von der Arbeitsgruppe für ein Leberersatzverfahren entwickelten Bioreaktor, sowohl mit nativen als auch mit kryokonservierten Hepatozyten besiedelt, untersucht werden. Als Marker für das CYP450 Enzymsystem diente EC. Darüber hinaus wurden weitere Marker für Syntheseleistungen, metabolische Aktivität und Zellvitalität bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Material

#### 2.1.1 Zellpräparation

##### 2.1.1.1 Tiere

Männliche Lewis (LEW)-Ratten CharlesRiver, Sulzfeld

Schweine Züchter NN

##### 2.1.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Präparationsbesteck	Aesculab, Tuttlingen
Infusionsysteme	Braun, Melsungen
Ligaturfäden Dexon II	Braun Dexon, Spangenberg
Kanülen 20G	Braun, Melsungen
Venenverweilkanülen	18G Braun, Melsungen
Glas-Gefäße	Schott, Mainz
Peristaltische Pumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Wasserbad	Haake, Berlin-Lichterfelde
Zellschaber	Costar, Cambridge MA, USA
Nylon-Siebewebe 50µm	Roland Vetter Laborbedarf, Ammerbuch
Auffanggefäß	Eigenbau, Vetter, Ammerbuch
Reaktionsgefäße 50ml	Falcon, Becton, Dickinson, Lincoln Park, USA
Blasenfalle	Eigenbau, Universität Tübingen
Mikroskop ID 03	Zeiss, Jena
Zählkammer nach Neubauer	Karl Hecht, Sondheim/Röhn
Sterilfilter 0,22µm	Millex® GP, Malsheim, France
Sterilfilter Minisart 0,45µm	Sartorius AG, Göttingen
Blasen katheter Foley Tiemann CH14FR	Porgès S.A., Robinson, Cedex France
Spritze 5ml	Braun, Melsungen
3-Wege-Hähne Discofix®	Braun, Melsungen

## Material und Methoden

Pumpenschläuche SC 0081                      Ismatec, Wertheim-Mondfeld

### 2.1.1.3 Chemikalien

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Dinatriumschwefeltetroxid (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia, Ampuwa®	Fresenius, Bad Homburg
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES-Stammlösung (1M)	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Carbogen (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Hans Mast, Tübingen
Salzsäure 1M (HCl)	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1M (NaOH)	Merck, Darmstadt
Pentobarbital-Natrium (Nembutal®)	WDT, Hannover
Phosphatgepufferte Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Heparin, Liquemin	Roche, Basel
Kollagenase CLS II	Biochrom AG, Berlin
Sauerstoff O <sub>2</sub>	Hans Mast, Tübingen
N-Acetyl-L-alanyl-L-Glutamin (200nM)	Biochrom AG, Berlin
Williams' Medium E	Biochrom AG, Berlin

### 2.1.2 Zellkultur

### 2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Mikroskop ID 03	Zeiss, Jena
Zellkulturplatten 3226	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg
Pipetten 10ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Bottle Top Filter 0,22µm	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg
Pasteur-Pipette	WU, Mainz

## Material und Methoden

### 2.1.3.1 Chemikalien

L-15 Leibowitz instamed	Biochrom AG, Berlin
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Rinderserumalbumin	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin (10mg/dl)	Biochrom AG, Berlin
Dexamethason	Biochrom AG, Berlin
Collagen R	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Biochrom AG, Berlin
Aqua ad injectabilia	Ampuwa <sup>®</sup> , Fresenius, Bad Homburg
Williams' Medium E	Biochrom AG, Berlin
HEPES-Stammlösung (1M)	Biochrom AG, Berlin
N-Acetyl-L-alanyl-L-Glutamin (200nM)	Biochrom AG, Berlin
Insulin Actrapid <sup>®</sup> HM 40I.E./ml (ge)	Novo Nordisk Pharma GmbH, Bagsvaerd, DK
Glucagen <sup>®</sup> HypoKit	Novo Nordisk Pharma GmbH, Bagsvaerd, DK

### 2.1.4 Proteinbestimmung

#### 2.1.4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Pasteur-Pipette	WU, Mainz
Reaktiongefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Mikroplatte 96K F-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhsen
ELISA-Reader	SLT, Crailsheim

#### 2.1.4.2 Chemikalien

Coomassie Brillantblau G250	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia	Ampuwa <sup>®</sup> , Fresenius, Bad Homburg
PBS-DULBECCO	Biochrom AG, Berlin



## 2.1.5 Kryokonservierung Hepatozyten

### 2.1.5.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Einfriergerät IceCube 1800D	SY-LAB GmbH, Purkersdorf, Austria
Wasserbad	Haake, Berlin-Lichterfelde
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen
Reaktionsgefäße 50ml	Falcon, Becton, Dickinson, Lincoln Park, USA
Bottle Top Filter 0,22µm	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg

### 2.1.5.2 Chemikalien

Glucose	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
L-Alanin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Citrullin	Merck, Darmstadt
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Histidin	Merck, Darmstadt
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glycin	Merck, Darmstadt
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Leucin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Serin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Threonin	Merck, Darmstadt
L-Tryptophan	Merck, Darmstadt
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Material und Methoden

L-Valin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kalziumchlorid Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Biochrom AG, Berlin
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Williams' Medium E	Biochrom AG, Berlin
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin (10mg/dl)	Biochrom AG, Berlin
Dexamethason	Biochrom AG, Berlin
HEPES-Stammlösung (1M)	Biochrom AG, Berlin
N-Acetyl-L-alanyl-L-Glutamin (200nM)	Biochrom AG, Berlin
Insulin Actrapid <sup>®</sup> HM 40I.E./ml (ge)	Novo Nordisk Pharma GmbH, Bagsvaerd, DK
Glucagon	Novo Nordisk Pharma GmbH, Bagsvaerd, DK
Percoll Separating Solution ( $\rho = 1,124$ )	Biochrom AG, Berlin
Stickstoff	Hans Mast, Tübingen

### 2.1.6 Produktbestimmungen

#### 2.1.6.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Mikroplatten 96K F-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Klebefolie	Hornbach, Tübingen
Fluoreszenz-Reader Cytofluor II	PerSeptive Biosystems GmbH, Freiburg
Pasteur-Pipette	WU, Mainz
VitaLab eclipse	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.6.2 Chemikalien

Ethoxyresorufin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
7-Ethoxycoumarin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Material und Methoden

Dicumarol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Resorufin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
7-Hydroxycoumarin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Ampuwa <sup>®</sup> , Fresenius, Bad Homburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Williams' Medium E	Biochrom AG, Berlin
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin (10mg/dl)	Biochrom AG, Berlin
Dexamethason	Biochrom AG, Berlin
HEPES-Stammlösung (1M)	Biochrom AG, Berlin
N-Acetyl-L-alanyl-L-Glutamin (200nM)	Biochrom AG, Berlin
Insulin Actrapid <sup>®</sup> HM 40I.E./ml	Novo Nordisk Pharma GmbH, Bagsvaerd, DK
Glucagon	Novo Nordisk Pharma GmbH, Bagsvaerd, DK
L-15 Leibowitz instamed	Biochrom AG, Berlin
Rinderserumalbumin	Biochrom AG, Berlin
$\beta$ -Glucuronidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LDH-Kit	Merck, Darmstadt
Glucose-Kit	Merck, Darmstadt
Albumin-Kit	Merck, Darmstadt
Harnstoff-Kit	Merck, Darmstadt
Ammoniak-Kit	Greiner, Flacht
Galactose-Kit	Boehringer, Mannheim
Sorbitol-Kit	Boehringer, Mannheim

### 2.1.7 Kreislauf-Versuche

#### 2.1.7.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

3-Wege-Hähne Discofix <sup>®</sup>	Braun, Melsungen
Infusions-Verlängerung	Oriplast, Neunkirchen-Saar
LS 2-Luer-Lock	Braun, Melsungen
Heizschlauch	Horst, Lorsch

## Material und Methoden

Pumpenschläuche SC 0081	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Sauerstoffmesssonden	WTW, Weilheim
Reaktor	Eigenbau, Universitätsklinik Tübingen
Vlies	ITV, Denkendorf
Reaktionsgefäß 200ml	Falcon, Becton, Dickinson, Lincoln Park, USA
Venenverweilkanüle 14G	Braun, Melsungen
Spinalkanüle 20G	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Peristaltische Pumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Reaktionsgefäß 14ml	Falcon, Becton, Dickinson, Lincoln Park, USA
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,8µm; 0,45µm	Minisart®, Sartorius, Göttingen
Bottle Top Filter 0,22µm	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg

### 2.1.7.2 Chemikalien

7-Ethoxycoumarin (EC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Williams' Medium E	Biochrom AG, Berlin
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin (10mg/dl)	Biochrom AG, Berlin
Dexamethason	Biochrom AG, Berlin
HEPES-Stammlösung (1M)	Biochrom AG, Berlin
N-Acetyl-L-alanyl-L-Glutamin (200nM)	Biochrom AG, Berlin
Insulin Actrapid® HM 40I.E./ml	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz
Glucagon	Novo Nordisk Pharma GmbH, Bagsvaerd, DK
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D(+)-Galactose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Heparin, Liquemin	Roche, Basel
Sauerstoff (O <sub>2</sub> )	Hans Mast, Tübingen
Carbogen (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Hans Mast, Tübingen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellpräparation

Die Präparation sowohl der Ratten- als auch der Schweineleberzellen erfolgte nach der von Seglen et al eingeführten [83] und von Sies modifizierten zwei Schritt Perfusionstechnik [31]. Dafür wurde im Einzelnen wie folgt vorgegangen.

#### 2.2.1.1 Präparation von Hepatozyten aus Rattenleber

##### *2.2.1.1.1 Herstellung der Präparationslösungen*

Perfusionslösung I: 105mM NaCl, 5,9mM KCl, 1,18mM  $\text{Cl}_2$ , 1,23mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2mM  $\text{NaSO}_4$ , 0,5mM EGTA, 20mM HEPES-Puffer in 500ml Aqua ad injectabilia

Perfusionslösung II: 105mM NaCl, 5,9mM KCl, 1,18mM  $\text{Cl}_2$ , 1,23mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2mM  $\text{NaSO}_4$ , 2,5mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 20mM HEPES-Puffer, 30mg Collagenase CLS II in Aqua ad injectabilia

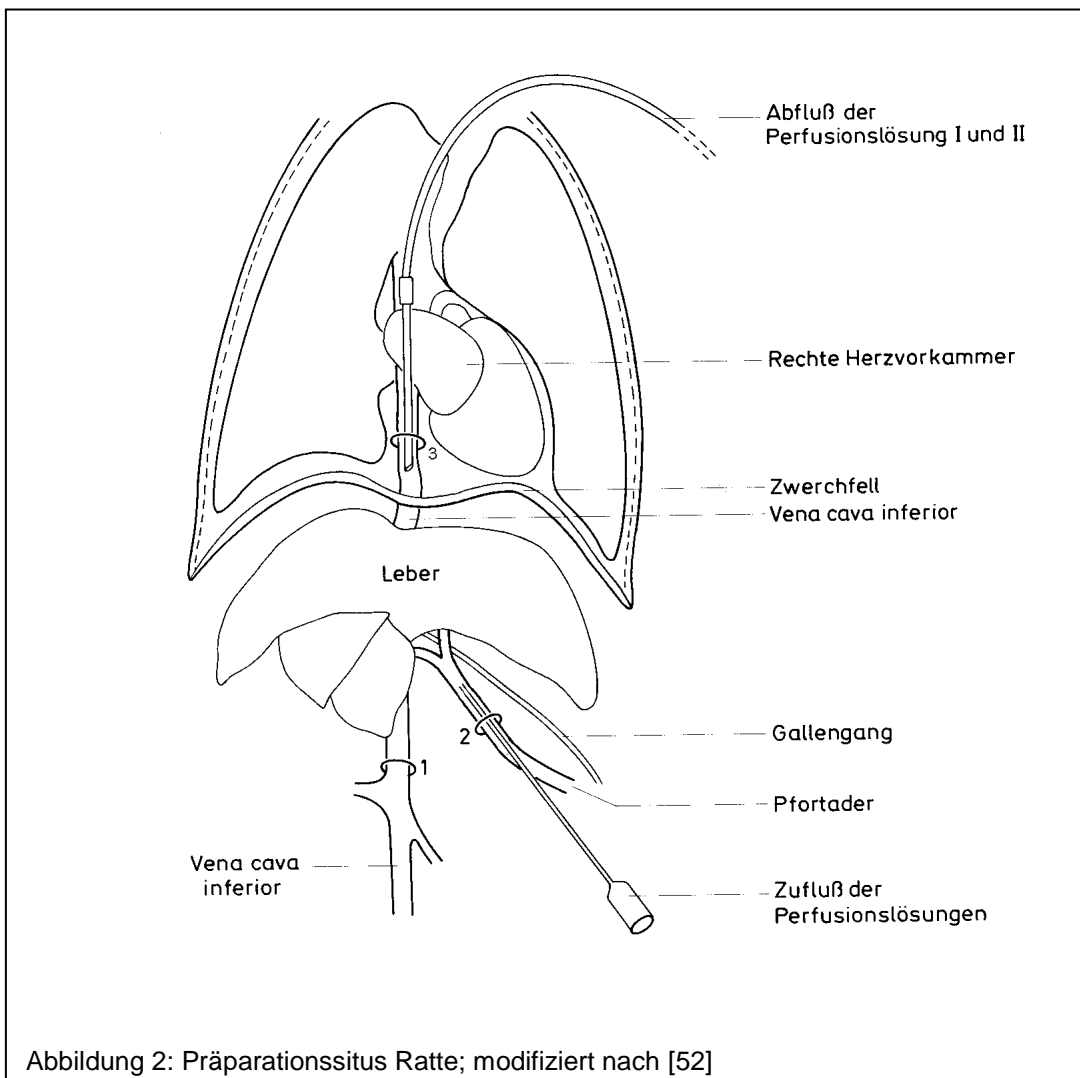
Vor Gebrauch wurden die Perfusionslösungen 60min mit 5% Carbogen äquilibriert

##### *2.2.1.1.2 Präparation der Zellen*

Die Ratte wurde zunächst durch intraperitoneale Injektion von 60mg/kg Körpergewicht Pentobarbital narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe, Fixierung der Ratte und Desinfektion erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes durch einen Medianschnitt. Dieser wurde durch Schnitte unterhalb der Rippenbögen links und rechts erweitert und der Verdauungstrakt nach rechts verschoben. Anschließend wurde eine lose Ligatur um die Pfortader (2) gelegt. Mit einer Venenverweilkanüle der Größe 18 G wurde die Portalvene punktiert. Nach Entfernung des Stahlmandrins wurde die Venenverweilkanüle fixiert und an das durch eine Peristaltikpumpe mit nachgeschalteter Blasenfalle betriebene Perfusionssystem angeschlossen. Zunächst wurde mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Perfusionslösung I und einer Flussrate von 12ml/min perfundiert und blutfrei gespült.

## Material und Methoden

Sofort nach Anschluss des Perfusionssystems erfolgte ein Entlastungsschnitt in die untere Hohlvene. Durch Schließen der Ligatur (2) um die Pfortader wurde die Kanüle fest mit der Pfortader verbunden. Als nächster Schritt wurde der Brustraum eröffnet. Eine lose Ligatur (3) wurde um die untere Hohlvene zwischen Herz und Zwerchfell platziert. Anschließend wurde in die untere Hohlvene über den rechten Vorhof eine weitere Venenverweilkanüle gelegt. Nach Schließen dieser Ligatur wurde die untere Hohlvene zwischen der Leber und dem Entlastungsschnitt mit einer Klemme abgeklemmt (1). Danach wurde ein Schlauch für den Rückfluss des Perfusionsmediums an die Venenverweilkanüle in der unteren Hohlvene angeschlossen.



Nach Anschluss des Rückflusses wurde die Leber mit weiteren ca. 100ml Perfusionslösung I gespült, dann wurde auf die kollagenasehaltige Perfusionslö-

sung II umgestellt. Nachdem das gesamte Perfusionssystem nach ca. 45 Sekunden mit der Lösung II gefüllt war, wurde ein rezirkulierender Medienfluss hergestellt. Die Leber wurde insgesamt für 9 Minuten mit der Lösung II perfundiert. Anschließend wurde sie freipräpariert, entnommen und in einer Petrischale, die 50ml Krebs-Henseleit-Puffer enthielt mit einem Zellschaber ausgestrichen. Um Bindegewebsreste zu entfernen, erfolgte eine Filtration durch ein Nylonfilter mit 50µm Porenweite. Anschließend ließ man die Zellen absitzen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Krebs-Henseleit II-Lösung ohne Kollagenase resuspendiert. Zur Bestimmung der Zelldichte, der Zellausbeute und der Vitalität wurden 100µl der Zellsuspension mit 500µl Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach einem weiteren Mal Absitzen der Zellen wurde die Zelldichte auf  $8 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.2.1.2 Präparation von Hepatozyten aus Schweineleber

#### 2.2.1.2.1 Herstellung der Präparationslösungen

Perfusionslösung 1: Ein Liter PBS enthielt 0,5mM EGTA und 5000IE Heparin.

Perfusionslösung 2: 500ml PBS enthielten 0,5mM EGTA und 5000IE Heparin.

Perfusionslösung 3: 500ml PBS ohne Zusätze

Perfusionslösung 4: Zu 400ml Williams' Medium E enthielten: 25mM HEPES-Puffer, 2,5mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 250µg Gentamycin (50µg/ml), 400mg Kollagenase CLS II

Vor Gebrauch wurden die Perfusionslösungen 60min mit Carbogen äquilibriert.

Kulturmedium: 500ml Williams' Medium E enthielten: 50ml FCS (konz), 20mM HEPES-Puffer, 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 200µg Gentamycin (50µg/ml), 196µg Dexamethason (100µl von 196mg/100ml), 5µg Glukagon, 62,5I.E. Insulin

#### 2.2.1.2.2 Präparation von Hepatozyten aus der Schweineleber

Die Entnahme der Schweinelebern erfolgte im Großtier OP der Universität Tübingen. Durch eine mediane Laparatomie wurde das Abdomen des Schweines eröffnet. Die Pfortader wurde aufgesucht und mit einer Klemme abgeklemmt

aber noch nicht durchtrennt. Anschließend wurde die Leber vorsichtig mobilisiert, die Lebervenen und zuletzt die Pfortader durchtrennt. In einer Metallschüssel wurde die Pfortader aufgesucht, ein Blasenkatheeter eingebracht und mit 5ml Aqua ad injectabilia geblockt. An den Blasenkatheeter wurde die Perfusionslösung 1 angeschlossen und die Leber perfundiert. Die so präparierte Leber wurde zum Transport vom OP in das Labor in ein Plastikgefäß gegeben. Im Labor angekommen wurde die Leber in ein speziell angefertigtes Glasgefäß mit Metallgitter und Ablauf transferiert, so dass eine rezirkulierende Perfusion möglich war.

Die Leber wurde mit dem Rest der Perfusionslösung 1 und anschließend mit Perfusionslösung 2, 3 und zuletzt 60min rezirkulierend mit der Kollagenasehaltigen Perfusionslösung 4 perfundiert. Die so „verdaute“ Leber wurde nach Entfernung der Gallenblase auf ein Metallsieb mit 100µm Maschenweite gegeben und mit dem Zellschaber ausgestrichen. Die durch das Sieb getretene Zellsuspension wurde aufgefangen. 50ml davon wurden in ein 50ml Reaktionsgefäß gegeben und stehen gelassen, bis sich die Zellen am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. 100µl der Zellsuspension wurden in 500µl Trypan-Blau-Lösung gegeben und mittels einer Zählkammer nach Neubauer Zelldichte, Vitalität und Ausbeute bestimmt. Nach einem weiteren Mal Absitzenlassen der Hepatozyten wurde die Zelldichte auf  $8 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die so hergestellte Zellsuspension wurde zum Einfrieren oder direkt zur Herstellung von Leberzellkulturen verwendet oder in die Vliese für das Leberersatzverfahren eingebracht.

### 2.2.1.3 **Zellkultur**

#### 2.2.1.3.1 *Rattenleberzellkulturen*

#### 2.2.1.3.2 *Herstellung des Kulturmediums*

L-15 Leibowitz Instamed wurde in 4 Liter Aqua ad injectabilia gelöst, mit 1,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> versetzt und der pH-Wert mit Natriumhydroxid und Salzsäure auf



7,36-7,37 eingestellt. Anschließend wurde mit Aqua ad injectabilia auf 5 Liter aufgefüllt. Das so erhaltene Medium wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Zu 500ml dieses L-15 Leibowitz Mediums enthielten: 750mg Glucose, 500mg BSA, 196µl Dexamethason (196mg/100ml) und 250µg Gentamycin (50µg/ml).

### *2.2.1.3.3 Herstellen der Rattenleberzellkulturen*

Für die Kultivierung von Hepatozyten wurden Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten verwendet. Um die Anheftung der Rattenhepatozyten zu verbessern wurden die Zellkulturplatten mit Kollagen-R beschichtet. In jede Kavität wurde 1ml vorgewärmtes Kulturmedium und anschließend 40µl Zellsuspension (entsprechend  $3,2 \times 10^5$  Zellen) gegeben und anschließend die Platten vorsichtig geschüttelt, damit sich die Zellen gleichmäßig in den Wells verteilten. Nach 60min Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch je 1ml Hanks' Salt Solution w/o Ca<sup>++</sup> ersetzt. Nach kräftigem aber trotzdem vorsichtigen Schütteln der Platte wurde das Hanks' abgesaugt und die Zellen wieder mit je 1ml/Well frischem Medium versorgt. Dieser Vorgang diente zum Abspülen geschädigter Hepatozyten. Anschließend wurden die Zellkulturen weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und täglich das Medium gewechselt. Da die Messungen des Cytochrom P450 Enzymsystems an sechs verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen wurden und für jeden Zeitpunkt eine ganze Zellkulturplatte benötigt wurde, wurden jeweils sechs Zellkulturplatten besiedelt.

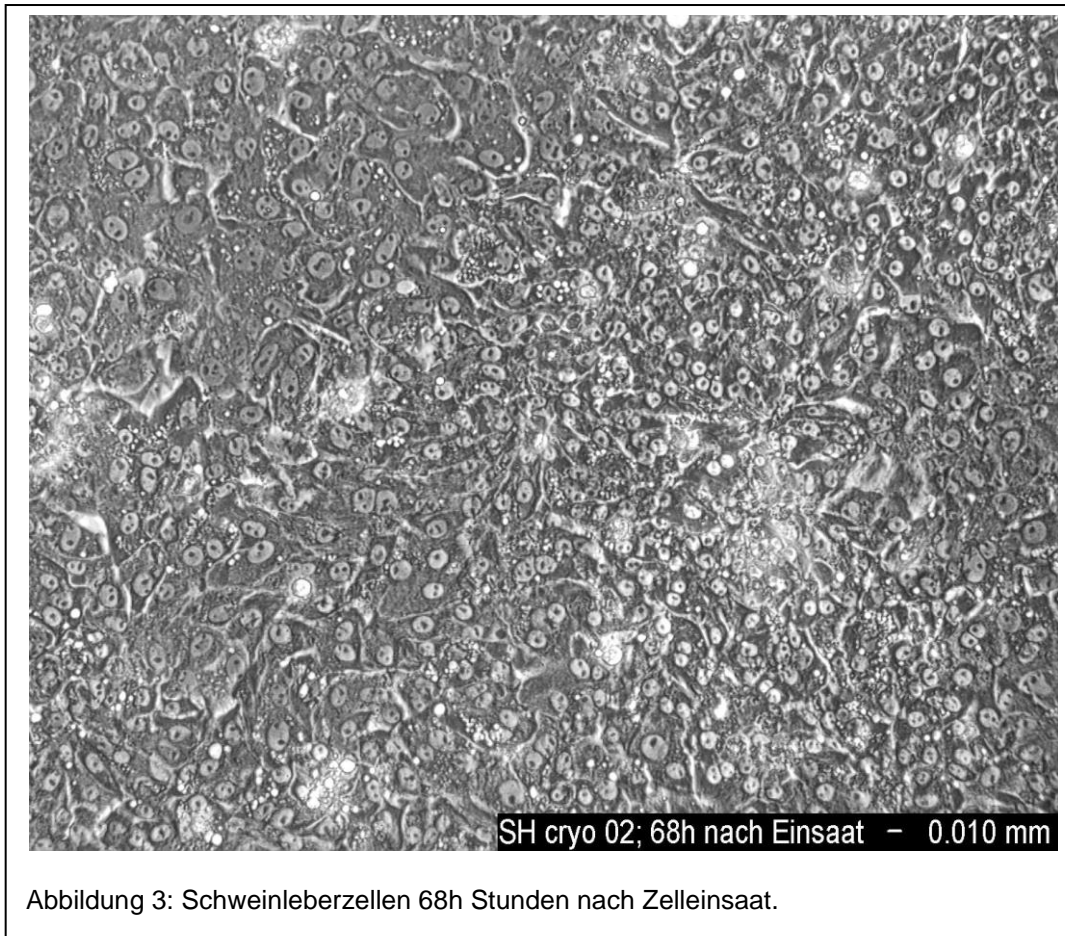
### **2.2.1.4 Schweineleberzellkulturen**

#### *2.2.1.4.1 Herstellung des Kulturmediums*

Zu 500ml Williams' Medium E enthielten: 50ml FCS, 20mM HEPES-Puffer, 1mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 50mg Gentamycin (5ml von 10mg/ml), 196µg Dexamethason, 5µg Glukagon, 62,5IE Insulin

#### *2.2.1.4.2 Herstellung von Schweineleberzellkulturen*

Die Kultivierung von Schweinehepatozyten erfolgte analog der Kultivierung von Rattenhepatozyten. Allerdings wurden die Zellkulturplatten nicht mit Kollagen beschichtet und die Zellkulturen erst nach vier Stunden gespült.



## 2.2.2 Kryokonservierung

### 2.2.2.1 Einfrieren von Hepatozytensuspensionen

#### 2.2.2.1.1 Herstellung der Einfrierlösungen

Medium: Williams Medium E wurde wie zur Herstellung von Schweineleberzellkulturen supplementiert.

Suspensionspuffer: Bestand aus: 620ml Glukose-Lösung (9g/l); 100ml KH-Puffer (60g/l NaCl, 1,75g/l KCl, 1,6g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit NaOH auf pH 7,6 eingestellt); 100ml HEPES-Puffer (1 M) pH 7,6; 150ml Aminosäuren-Lösung (0,27g/l L-Alanin, 0,14g/l L-Asparaginsäure, 0,4g/l L-Asparagin, 0,27g/l L-Citrullin, 0,14g/l L-Cystein, 1g/l L-Histidin, 1g/l Glutaminsäure, 1g/l L-Glycin, 0,4g/l L-Isoleucin, 0,8g/l L-Leucin, 1,3g/l L-Lysin, 0,55g/l L-Methionin, 0,65g/l L-Ornithin, 0,55g/l L-Phenylalanin, 0,55g/l L-Prolin, 0,65g/l L-Serin, 1,35g/l L-Threonin, 0,65g/l L-

## Material und Methoden

Tryptophan, 0,55g/l L-Tyrosin, 0,8g/l L-Valin, Lösung der Aminosäuren durch Zugabe von NaOH und Einstellen des pH auf 7,6 mit HCl); 10ml Glutamin-Lösung (7g/l); 5ml Insulin-Lösung (2g/l); 8ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (19g/l CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O); 4ml MgSO<sub>4</sub>-Lösung (24,6g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O); 2g/l Rinderserumalbumin.

Lösung I: Zu 8,8ml Suspensionspuffer wurden 1,2ml DMSO gegeben (= 12%v/v).

Lösung II: Zu 25,2ml Suspensionspuffer wurden 4,8ml DMSO gegeben (= 16%v/v).

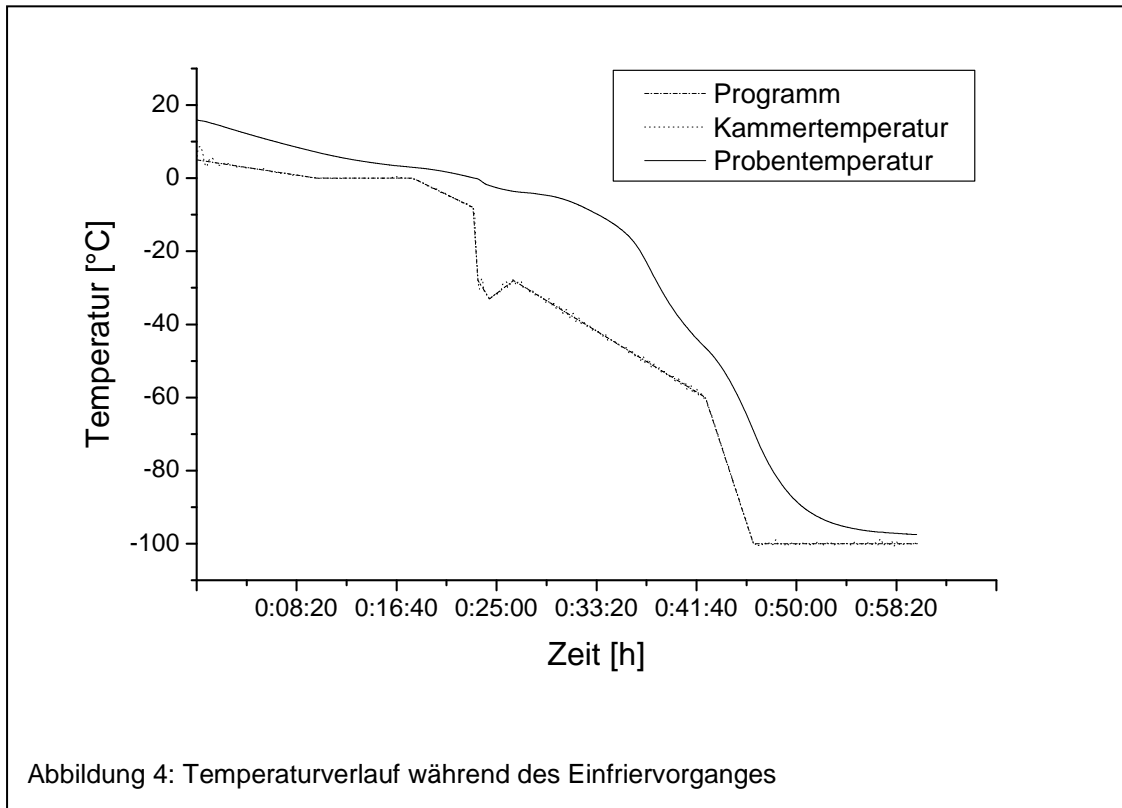
Lösung III: Zu 300ml Suspensionspuffer wurden 24ml DMSO gegeben (= 7,4%v/v).

Lösung IV: Zu 300ml Suspensionspuffer wurden 32ml DMSO gegeben (= 9,6%v/v).

### *2.2.2.1.2 Einfrieren der Hepatozytensuspensionen*

Die bei der Präparation gewonnene Zellsuspension wurden mit eisgekühltem Suspensionspuffer auf eine Zelldichte von  $3 \times 10^6$  lebende Hepatozyten/ml verdünnt und das Volumen (Ausgangsvolumen) bestimmt. Diese Suspension wurde für 10min bei 15g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 60% des Ausgangsvolumens als Überstand entfernt und das Zellsediment in dem verbliebenen Suspensionspuffer durch leichtes Schwenken resuspendiert. Bis zur Hälfte des Ausgangsvolumens wurde das Röhrchen mit eisgekühlter Lösung I aufgefüllt. Dies ergab eine Zellsuspension von  $6 \times 10^6$  lebenden Hepatozyten/ml in Suspensionspuffer mit 4% (v/v) DMSO. Diese Suspension wurde für 5min im Eisbad stehen gelassen. Danach wurde mit eisgekühlter Lösung II das Röhrchen bis zum Ausgangsvolumen aufgefüllt. Dies ergab eine eisgekühlte Zellsuspension mit  $3 \times 10^6$  lebenden Hepatozyten/ml in Suspensionspuffer mit 10% (v/v) DMSO. Je 1,5ml dieser Zellsuspensionen wurden in sterile Kryo-Röhrchen pipettiert. Das Pipettieren der Zellsuspensionen wurde innerhalb < 5min abgeschlossen. Die Kryo-Röhrchen wurden in Einfrierautomaten überführt und das Einfrierprogramm gestartet. Das Einfrierprogramm wurde so programmiert, dass die Temperatur, besonders im kritischen Bereich des Aggregatzustandübergangs, kontinuierlich sank (Abb. 4). Direkt nach Beendi-

gung des Einfriervorgangs wurden die Kryo-Röhrchen in der Gasatmosphäre über flüssigem Stickstoff gelagert.



### 2.2.2.1.3 Einfrieren der Hepatozyten-Vliese

Ein Vlies wurde unter sterilen Bedingungen in einen Reaktor eingebaut. Anschließend wurde der Reaktor mit Medium gefüllt und im Kühlraum auf eine Temperatur von 4°C gekühlt. 50ml der Hepatozytensuspension mit  $8 \times 10^6$  Zellen/ml (=  $4 \times 10^8$  Zellen) wurden mit einer Flussrate von 4ml/min in das Vlies eingespült und anschließend mit 20ml Medium nachgespült. Danach wurden mit jeweils einer Flussrate von 8ml/min zuerst 50ml des Suspensionspuffers, danach 50ml der Lösung 3 und zuletzt 50ml der Lösung IV durch das Vlies gespült. Anschließend wurde der Reaktor so schnell wie möglich abgebaut, das Vlies unter sterilen Bedingungen in Wundverschlussfolien verpackt und in den Einfrierautomaten transferiert.

### 2.2.2.2 Auftauen cryokonservierter Schweinehepatozyten

#### 2.2.2.2.1 Herstellen des Lösungen

Medium: Williams' Medium E wurde wie bei der Herstellung von Schweinleberzellkulturen supplementiert.

Separationslösung: Zu 40ml PBS w/o  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  wurden 40ml Percoll ( $\rho = 1,124$ ) gegeben und kräftig vertiert.

#### 2.2.2.2.2 Auftauen von kryokonservierten Schweinehepatozyten-Suspensionen

In vier 50ml Reaktionsgefäße wurden in der Sterilbank je 20ml Medium gegeben und diese anschließend bei 37°C mindestens 15 Minuten im Wasserbad inkubiert. In vier weitere 50ml Reaktionsgefäße wurden jeweils 20ml der Separationslösung gefüllt und bei 4°C im Kühlschrank gekühlt. 16 aus der Stickstofftonne entnommene Hepatozytenaliquots wurden im Wasserbad bei 37°C so angetaut, dass noch ein Eiskern übrig blieb. In der Sterilbank wurden je vier der Aliquots in eines der mit Medium vorbereiteten 50ml Reaktionsgefäße gegeben. Danach wurden die so erhaltenen Zellsuspensionen vorsichtig auf die vorbereiteten Separationslösungen geschichtet, und 10min bei 300g und 21°C ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit den avitalen Zellen abgesaugt, das Zellpellet in 20ml Medium resuspendiert und 10min bei 50g und 21°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die in kleinem Volumen resuspendierten Zellen in einem 50ml Reaktionsgefäß vereinigt und die Vitalität, Zelldichte und Ausbeute bestimmt. Anschließend wurde die Zelldichte auf  $8 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und die Zellen in Zellkulturen eingebracht.

#### 2.2.2.2.3 Auftauen kryokonservierter Schweinehepatozyten-Vliese

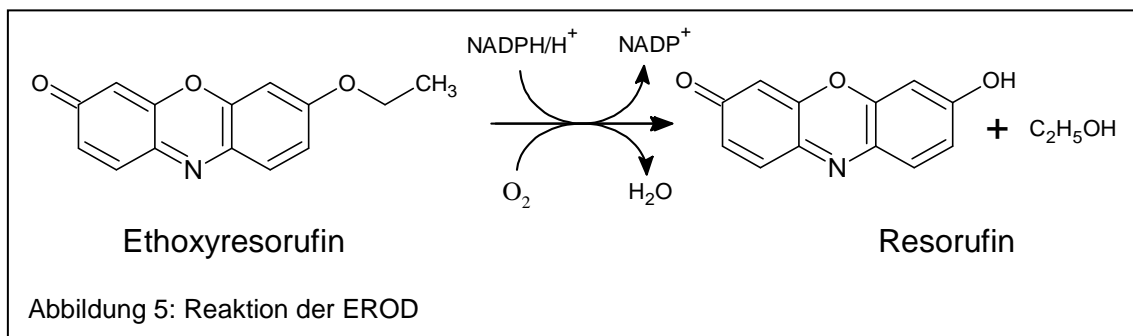
Vorgehen siehe Kreislaufversuche mit kryokonservierten Schweinehepatozyten Kap. 2.2.5.2.3.

## 2.2.3 Bestimmung der EROD- und ECOD- Aktivität

### 2.2.3.1 Messprinzipien

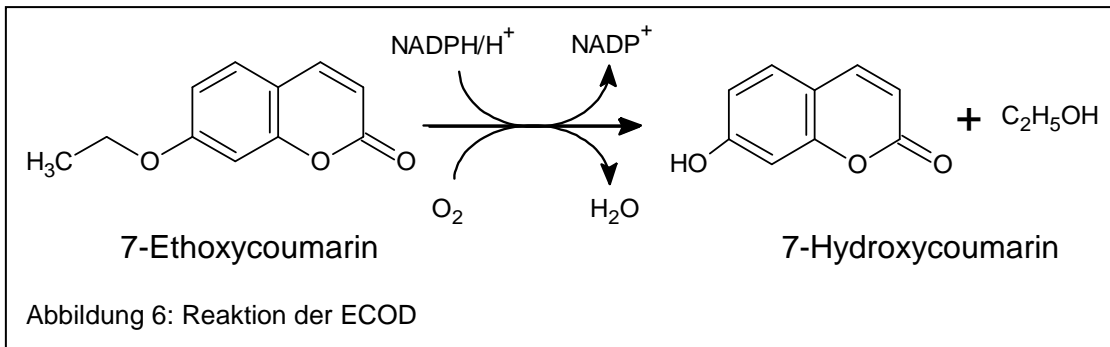
#### 2.2.3.1.1 Bestimmung der EROD- Aktivität

Ethoxyresorufin (ER) wird unter Oxidation von NADPH und Sauerstoffverbrauch von der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) zu Resorufin (R) abgebaut (Abb. 5). ER und R sind intensiv fluoreszierende Stoffe. Die Exzitationsmaxima liegen bei 456nm für ER und 560nm für Resorufin, die Emissionsmaxima bei 570nm für ER und 586nm für Resorufin. Daher lassen sich die beiden Stoffe durch ihr unterschiedliches Exzitationsmaximum unterscheiden [6]. Durch die zytosolische Diaphorase kann Resorufin zu nicht fluoreszierenden Stoffen abgebaut werden. Um dies zu verhindern wurde dem Inkubationsmedium Dicumarol zugegeben [66].



#### 2.2.3.1.2 Bestimmung der ECOD- Aktivität

7-Ethoxycoumarin (EC) wird von der Ethoxycoumarin-O-Deethylase (ECOD) unter NADPH und Sauerstoffverbrauch zu 7-Hydroxycoumarin (7-HC) abgebaut (Abb. 6). 7-HC ist ein fluoreszierender Stoff mit einem breiten Exzitationsmaximum zwischen 330 und 380nm und einem Emissionsmaximum bei 460nm und kann somit fluorometrisch einfach nachgewiesen werden [97]. Die Fluoreszenz ist pH-abhängig mit einem Maximum bei pH > 9,5 [30].



### 2.2.3.1.3 Bestimmung der Glucuronidierungsleistung

Resorufin und 7-HC können im Phase II Metabolismus durch die Konjugation mit einem wasserlöslichen Molekül wie der Glucuronsäure konjugiert werden und entziehen sich dann dem fluorometrischen Nachweis. Durch Inkubation der Überstände mit einer Glucuronidase in einem Puffer mit deren pH-Optimum (pH 4,5) wird diese Reaktion rückgängig gemacht und bereits glucuronidiertes Produkt wieder nachweisbar.

### 2.2.3.2 Reagenzien

Stammlösungen: EC und DC wurden mit einer Konzentration von 10mg /ml, ER in einer Konzentration von 1mg /ml in DMSO gelöst. Diese Stammlösungen wurden aliquotiert bei -20°C gelagert.

β-Glucuronidase wurde mit 10.000U/ml In Ammoniumazetat-Puffer (s.u.) gelöst und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Substrathaltige Medien: L-15 Leibowitz Medium bzw. Williams' Medium E wurden wie zur Herstellung von Zellkulturen supplementiert.

Medium 1: Zu 9ml des Mediums wurden 12µl der EC zugegeben, so dass das Medium EC in einer Konzentration von 70µmol/l enthielt.

Medium 2: Zu 9ml des Mediums wurden 12µl der EC-Stammlösung, 21,6µl der ER-Stammlösung und 3µl der DC-Stammlösung zugegeben, so dass das Medium EC in einer Konzentration von 70µmol/l, ER und DC in einer Konzentration von 10µmol/l enthielt.

## Material und Methoden

Medium 3: Zu 9ml des Mediums wurden 21,6µl der ER-Stammlösung und 3µl der DC-Stammlösung zugegeben, so dass das Medium ER und DC in einer Konzentration von 10µmol/l enthielt.

### Inkubationspuffer:

Ammoniumazetatpuffer: 15,416g Ammoniumazetat wurden abgewogen und in 900ml Aqua ad injectabilia gelöst. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 4,5 eingestellt. Anschließend wurde mit Aqua ad injectabilia auf einen Liter aufgefüllt. Der so hergestellte Puffer enthielt Ammoniumazetat in einer Konzentration von 200mmol/l und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Ammoniumazetatpuffer mit Glucuronidase: Zu 9,9ml des Ammoniumazetatpuffers wurden 100µl der β-Glucuronidase Stammlösung gegeben. Der so hergestellte Puffer enthielt β-Glucuronidase mit einer Aktivität von 100U/ml und wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Glycinpuffer: 120,112g Glycin wurden abgewogen und in 800ml Aqua ad injectabilia gelöst. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid-Plätzchen auf 10,3 eingestellt. Anschließend wurde mit Aqua ad injectabilia auf einen Liter aufgefüllt. Der so angesetzte Puffer enthielt Glyzin in einer Konzentration von 1,6mol/l und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

### Standards:

7-HC: Zur Erstellung der Stammlösung mit einer Konzentration von 100mmol/l wurden 187mg 7-Hydroxycoumarin in 11,536ml DMSO gelöst. 20µl dieser Stammlösung wurden mit dem entsprechenden Medium auf 2ml aufgefüllt. Aus der so hergestellten Lösung wurden im entsprechenden Medium die einzelnen Standards hergestellt. Die Eichreihe für die Zellkulturversuche umfasste folgende Konzentrationen: 0, 1, 3, 5, 10 und 30µmol/l. Die Eichreihe für die Kreislaufversuche bestand aus folgenden Konzentrationen: 0,10, 20, 30, 40 60, 80, 100µmol/l.

Resorufin: Zur Herstellung der Stammlösung mit einer Konzentration von 100mmol/ml wurden 89,4mg Resorufin abgewogen und in 3,801ml DMSO gelöst. 20µl dieser Stammlösung wurden mit dem entsprechenden Medium auf 2ml aufgefüllt. Aus der so hergestellten Lösung wurden im entspre-



chenden Medium die einzelnen Standards mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 0, 100, 300, 500, 1000, 3000nm.

### 2.2.3.3 Durchführung der Messungen

#### 2.2.3.3.1 Cytochrom P450-Aktivitätsbestimmung in den Zellkulturen

Bestimmt wurde die Cytochrom P450 Aktivität zu sechs verschiedenen Zeitpunkten nach der Zelleinsaat in die Zellkulturplatten (Tab. 1)

Zeitpunkt	Rattenleberzellkulturen		Schweineleberzellkulturen	
	Zeit [h]	SD	Zeit [h]	SD
1	2,35	1,1	4,71	0,9
2	19,68	1,3	18,85	1,7
3	26,79	1,8	27,94	2,5
4	43,23	1,5	43,36	1,7
5	51,93	2	51,44	2,2
6	70,08	0,34	68,52	1,6

Tabelle 1: Messzeitpunkte in den Zellkulturversuchen

Verwendet wurde zu jedem Zeitpunkt immer eine ganze Zellkulturplatte.

Es wurden drei Gruppen gebildet. Eine Gruppe erhielt ausschließlich 7-EC als Substrat, eine Gruppe ER und DC und die dritte Gruppe erhielt die Kombination aus EC, ER und DC. Jede Gruppe wurde nochmals in 2 Pools unterteilt, so dass auf einer Platte mit jeder Substratkombination zwei unabhängige Versuche durchgeführt wurden.

Zu Beginn wurde das Kulturmedium vorsichtig aus den Kavitäten abgesaugt und durch 1ml substrathaltiges Medium ersetzt, dessen Rest als Nullwert aufgehoben wurde. Nach 60min Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Zellkulturplatte aus dem Brutschrank genommen und das Pooling der Proben durchgeführt: Je 200µl Probenvolumen pro Kavität wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vereinigt.

Die Fluoreszenz-Messung erfolgte auf Mikroplatten mit 96 Kavitäten. Auf diese Platten aufgetragen wurden je 60µl der Eichreihen mit 7-HC bzw. Resorufin in Doppelbestimmung sowie pro Pool je sechsmal die Null- und die 60min-Proben. Zu je drei dieser Null- und 60min-Proben wurden anschließend je 60µl des Ammoniumazetat-Puffers ohne Glucuronidase, zu den anderen drei je 60µl des Ammoniumazetat-Puffers mit Glucuronidase zugegeben. Zu den Standard-Proben wurde Ammoniumazetat-Puffer ohne Glucuronidase zugegeben. Die Mikroplatte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden in jede Kavität je 180µl des Glycinpuffers gegeben und die Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen (Resorufin: Ex. 530nm, Em: 590nm; 7-HC: Ex: 360nm, Em: 460nm) mit dem Cytofluor II-Gerät gemessen.

### *2.2.3.3.2 EROD- und ECOD-Aktivitätsbestimmung in den Kreislaufversuchen*

Die nach Protokoll aus dem Kreislauf entnommen Proben wurden direkt nach der Entnahme geteilt. Aus jedem Teil wurden drei Mal 60µl Probenvolumen auf eine Mikroplatte mit 96 Kavitäten aufgetragen. Zusätzlich wurden die Standardwerte im jeweiligen Medium in Dreifachbestimmung aufgetragen. Zu den Standardwerten und zu je einem der drei Probenvolumina wurden je 60µl Ammoniumazetat-Puffer ohne Glucuronidase zugegeben. Zu den verbliebenen Probenvolumina wurden je 60µl Ammoniumazetat-Puffer mit Glucuronidase zugegeben. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Proben somit doppelt ohne Glucuronidase und vierfach mit Glucuronidase bestimmt. Die Mikroplatte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden in jede Kavität je 180µl des Glycin-Puffers gegeben und die Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen (Resorufin: Ex. 530nm, Em: 590nm; 7-HC: Ex: 360nm, Em: 460nm) mit dem Cytofluor II-Gerät gemessen.

### *2.2.3.3.3 Auswertung*

Aus den Standardwerten wurde eine Standardkurve erstellt und die Geradengleichung zur Berechnung der Konzentrationen der Proben bestimmt.

### 2.2.3.3.4 Auswertung Zellkulturversuche

Die mittels Standardkurve ermittelte Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ] des Nullwertes wurde von der des 60-minuten-Wertes abgezogen, zur Bestimmung der Menge des umgesetzten Produktes durch 1000 geteilt (Inkubationsvolumen war 1ml) und angesichts der Inkubationszeit von einer Stunde zur Darstellung des Ergebnisses in U ( $\mu\text{mol/min}$ ) noch einmal durch 60 geteilt. Dieses Ergebnis wurde durch die in der entsprechenden Kavität gemessene Proteinmenge dividiert und so die proteinbezogene Aktivität berechnet.

### 2.2.3.3.5 Auswertung der Kreislaufversuche

Unter Berücksichtigung des Kreislaufvolumens und der durch die Probennahme aus dem Kreislauf entfernten Produktmenge wurde für jeden Messpunkt die bis dahin produzierte Menge 7-HC berechnet. Weiterhin wurde die jeweils zwischen zwei Zeitpunkten produzierte Menge 7-HC berechnet und durch die zwischen diesen Messpunkten verstrichene Zeit dividiert und so die ECOD-Aktivität für diesen Zeitraum bestimmt.

## 2.2.4 Proteinbestimmung

### 2.2.4.1 Testprinzip

In der erstmals 1976 von Bradford beschriebenen Färbemethode werden als Coomassie-Brillantblau bezeichnete blaue Säurefärbstoffe verwendet. In der Gegenwart von Proteinen verschiebt sich deren Absorptionsmaximum von 465 zu 595nm [4].

### 2.2.4.2 Reagenzien

Bradford-Reagenz: 100mg Coomassie Blue G wurden in 50ml Ethanol gelöst. Anschließend wurden 100ml Phosphorsäure zugegeben und mit Aqua ad injectabilia auf 250ml aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung des eigentlichen Bradford-Reagenz' wurde dieser Stamm 1:4 mit Aqua ad injectabilia verdünnt.

Standards: Zur Herstellung der Standards wurden 4,3mg BSA abgewogen und mit PBS auf 43ml aufgefüllt. Aus diesem Stamm der Konzentration 100 $\mu\text{g}$

BSA/ml wurden durch weitere Verdünnung mit PBS Standards mit folgenden BSA-Konzentrationen erstellt: 0µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 60µg/ml, 80µg/ml, 100µg/ml. Diese Standards wurden bei -18°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

### 2.2.4.3 **Vorgehen**

#### 2.2.4.3.1 *Vorbereiten der Proben*

Unmittelbar nach Durchführung der Versuche mit den Zellkulturen wurde das Medium aus den Zellkulturplatten abgesaugt und in jedes Well 500µl PBS gegeben und kräftig geschüttelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die Zellen sorgfältig unter Vermeidung von Aerosolbildung mit dem Ultraschallstab lysiert. Analog zum Pooling der EROD- und ECOD- Aktivitätsbestimmung wurden aus jeder Kavität 200µl Probenvolumen entnommen und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die so erhaltenen Proben wurden bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Zur Messung wurden die Proben nach Bedarf, meist 1:5 mit PBS verdünnt.

#### 2.2.4.3.2 *Messung*

Auf einer 96-Well Platte wurden aufgetragen: 50µl der einzelnen Standards in Dreifachbestimmung und in entsprechender Verdünnung 50µl der Proben aus den Zellkulturen in Doppelbestimmung aufgetragen. In jedes Well wurden 250µl Bradford-Reagenz zugegeben und die Platte 5-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595nm im Photometer (ELISA-Reader) bestimmt.

#### 2.2.4.4 **Auswertung**

Aus den Werten der Standards wurde eine Geradengleichung ermittelt, wobei klar nicht im linearen Bereich liegende Messwerte ausgeblendet wurden. Mittels dieser Gerade und dem Probenvolumen wurde die in einem Welle enthaltene Proteinmenge berechnet. War der Variationskoeffizient >20% oder die Messwerte außerhalb der Standardkurve, so wurde die Messung bei Bedarf in einer höheren Verdünnung wiederholt.

## 2.2.5 Leberersatzverfahren

### 2.2.5.1 Herstellung der Medien

Medium: Williams' Medium E wurde wie für die Zellkulturen supplementiert (Kap. 2.2.1.4.1)

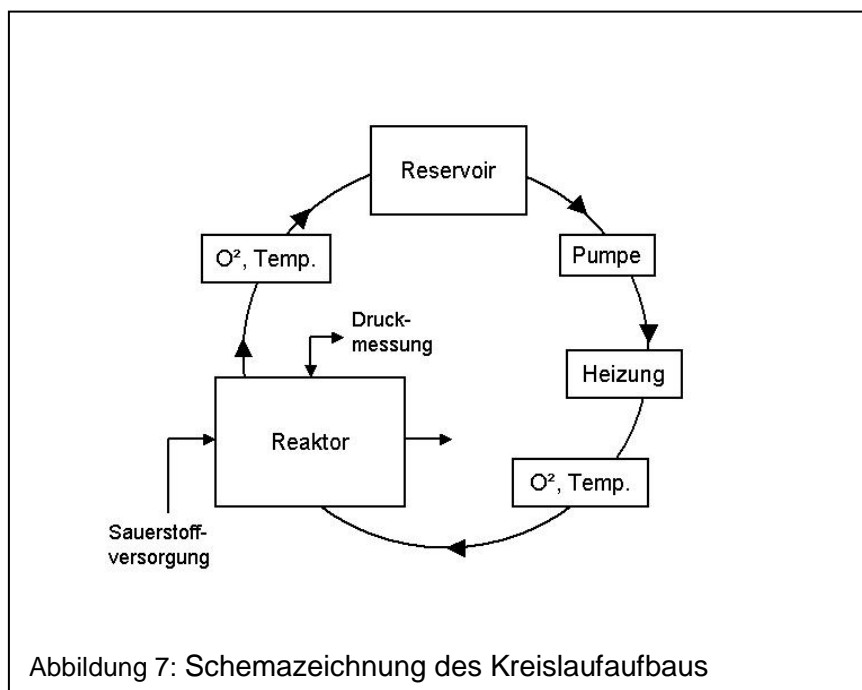
Plasma: Vollheparinisiertes Schweineplasma wurde zentrifugiert, der Überstand als Plasma abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zu 500ml dieses Plasmas wurden zugegeben: 2,5ml Heparin und 5ml Gentamycin.

Substrate: In 10ml Medium bzw. Plasma wurden gelöst: 25mg Sorbitol, 250mg Galaktose, 10mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $266\mu\text{l}$  7-Ethoxycoumarin ( $70\mu\text{mol/l}$ ).

### 2.2.5.2 Kreislaufversuche

#### 2.2.5.2.1 Aufbau des Kreislaufes

Folgender Kreislauf wurde aufgebaut: Von einem Reservoir aus es ging durch eine Peristaltikpumpe und durch einen Heizschlauch, dessen Temperatur so eingestellt war, dass die Temperatur im Leberzellreaktor  $37^{\circ}\text{C}$  betrug. Es folgte die Sauerstoffmesssonde 1 und danach der Leberzellreaktor. Aus diesem heraus ging es vorbei an der Sauerstoffmesssonde 2 wieder zurück in das Reservoir (Abb.7)



### *2.2.5.2.2 Kreislaufversuche mit nativ präparierten Hepatozyten*

Der Kreislauf wurde zunächst mit 200ml Medium gefüllt. Der eigentliche Versuch begann mit der Zugabe von 10ml der Schweinehepatozytensuspension entsprechend  $8 \times 10^7$  Zellen. Von diesem Zeitpunkt ab wurden nach Protokoll Proben genommen (bis 15min alle 3min, bis 1 h alle 5min, bis 2 h alle 10min, bis 4 h alle 30min, anschließend Pause über Nacht und ab 21 h jede Stunde). Das Probenvolumen betrug jeweils 1ml. Direkt nach der Probenname wurde das Probenvolumen geteilt um möglichst unabhängige Doppelbestimmung zu ermöglichen und die Proben bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Nach 12 Minuten wurden die Substrate in Medium zugegeben. Nach 22 Stunden wurde das Medium aus dem Kreislauf entfernt und durch 100ml Plasma ersetzt. Direkt danach wurden die Substrate in 10ml Plasma zugegeben. Anschließend wurden bis Versuchszeit 26 Stunden alle 30 Minuten, danach stündlich Proben entnommen. Versuchsende war nach einer weiteren Nacht bei 44 Stunden Versuchszeit.

### *2.2.5.2.3 Kreislaufversuche mit kryokonservierten Hepatozyten*

Der Kreislauf wurde zunächst ohne den Reaktor aufgebaut, mit 100ml Plasma gefüllt und die in 10ml Plasma gelösten Substrate zugegeben. Das bereits vor dem Einfrieren mit Hepatozyten besiedelte kryokonservierte Vlies wurde aus der Stickstofftonne genommen und zum antauen 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Folien entfernt und das Vlies unter sterilen Bedingungen in den Reaktor eingebaut. Manuell wurde mit einer 50ml Spritze Hanks' leicht Druck auf das noch gefrorene Vlies ausgeübt bis es durchgängig war. Die ersten durchgeflossenen 20ml wurden in Milliliterportionen in 1,5ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und daraus später die LDH-Aktivität bestimmt. Nachdem der Reaktor mit 50ml Hanks' gespült worden war wurde er in den Kreislauf eingebaut, womit der eigentliche Versuch begann. Bis Versuchszeit 6 Stunden wurden alle 30 Minuten Proben genommen, danach alle 60 Minuten. Zwischen 10 und 21 Stunden Versuchszeit war Nachtpause. Versuchsende war nach 24 Stunden Versuchszeit.

### 2.2.6 Messung der Proben aus den Kreislaufversuchen

Nach Protokoll wurden dem Kreislauf zu jedem Zeitpunkt 1ml Probe entnommen. Diese Probe wurde, um möglichst unabhängige Doppelbestimmungen zu ermöglichen sofort nach der Entnahme geteilt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Gemessen wurde die 7-HC-Konzentration wie unter 2.2.4.4. beschrieben. Außerdem wurden bestimmt: Die LDH-Aktivität, die Glucose-Konzentration, die Albumin-Konzentration, die Harnstoff-Konzentration, die Ammoniak-Konzentration, die Galaktose-Konzentration und die Sorbitol-Konzentration

#### 2.2.6.1 Bestimmung der LDH-Aktivität

##### 2.2.6.1.1 Testprinzip

LDH katalysiert folgende Reaktion:



Die Geschwindigkeit der NADH Abnahme wird photometrisch bestimmt und ist der LDH-Aktivität direkt proportional.

##### 2.2.6.1.2 Reagenzien

Verwendet wurde der LDH-Kit 1.14869.0001 der Firma Merck, Darmstadt.

Der Versuchsansatz enthielt folgende Endkonzentrationen: 50mM Phosphatpuffer pH 7,5, 0,6mM Natriumpyruvat und 0,18mM NADH.

##### 2.2.6.1.3 Durchführung

Die Bestimmung der LDH-Aktivität wurde automatisiert mit dem Vitalab-Eclipse Gerät durchgeführt.

Zu 500µl Reagenzlösung wurden 10µl Probe pipettiert, gemischt und nach einer Minute über zwei Minuten die Extinktionsabnahme bei 340nm und 37°C gemessen.

### 2.2.6.1.4 Auswertung

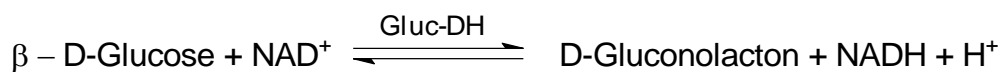
Die LDH Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Enzymaktivität [U/l]} = [\Delta E/\text{min}] \times F \quad (\text{F für 340nm} = 8095)$$

### 2.2.6.2 Bestimmung der Glucose-Konzentration

#### 2.2.6.2.1 Testprinzip

Glucose-Dehydrogenase (Gluc-DH) katalysiert die Oxidation von Glucose nach folgender Gleichung:



Die Menge des gebildeten NADH ist der Glucose-Konzentration proportional.

#### 2.2.6.2.2 Reagenzien

Verwendet wurde der Glucose-Kit 1.14853.0001 der Firm Merck, Darmstadt.

Der Versuchsansatz enthält folgende Endkonzentrationen:  $\geq 144\text{mM}$  Hespuffer pH 7,6,  $\geq 720\text{mM}$  Kaliumchlorid,  $\geq 792\text{U/l}$  Gluc-DH,  $\geq 3,6\text{mM}$   $\text{NAD}^+$ .

#### 2.2.6.2.3 Durchführung

Die Bestimmung der Glucose-Konzentration wurde automatisiert mit dem Vitalab-Eclipse Gerät durchgeführt.

Zu  $400\mu\text{l}$  Reagenzlösung wurden  $5\mu\text{l}$  Standard bzw. Probe gegeben, gemischt und nach einer Minute über 2 Minuten die Extinktionszunahme bei  $340\text{nm}$  und  $37^\circ\text{C}$  gemessen.

#### 2.2.6.2.4 Auswertung

Die Glucose-Konzentration wurde wie folgt berechnet:

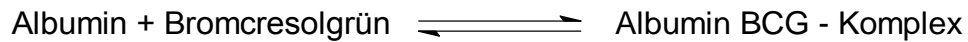
$$\text{Glucose - Konzentration} = \frac{\text{Standardkonzentration}}{\Delta E(\text{St})} \times \Delta E(\text{P})$$



### 2.2.6.3 Bestimmung der Albumin-Konzentration

#### 2.2.6.3.1 Prinzip

Bromcresylgrün reagiert bei pH 4,2 mit Albumin quantitativ zu einem intensiv blauefärbten Farbstoff:



Die Extinktion des gebildeten Farbstoffes bei 578nm ist proportional zur Albuminkonzentration der Probe.

#### 2.2.6.3.2 Reagenzien

Verwendet wurde der Albumin-Kit 1.14819.0001 der Firma Merck, Darmstadt.

Der Versuchsansatz enthielt folgende Endkonzentrationen: 100mM Bernsteinsäure-

Puffer pH 4,2 und 0,21mM Bromcresolgrün.

#### 2.2.6.3.3 Durchführung

Die Bestimmung der Albumin-Konzentration wurde automatisiert mit dem Vitalab-Eclipse Gerät durchgeführt.

Zu 500µl wurden 5µl Standard bzw. Probe gegeben, vermischt, fünf Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 578nm gemessen.

#### 2.2.6.3.4 Auswertung

Zunächst wurde von den Extinktionswerten der Probe und des Standards der Reagenzienleerwert abgezogen:

$$DE_{St} = E_{St} - E_{RLW}$$

$$DE_P = E_P - E_{RLW}$$

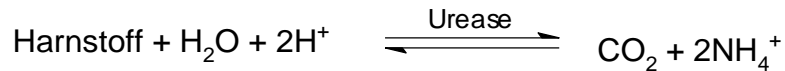
Anschließend wurde Albuminkonzentration wie folgt berechnet:

$$\text{Albuminkonzentration } (c) = \text{Standardkonzentration} \times \frac{\Delta E_P}{\Delta E_{St}}$$

### 2.2.6.4 Bestimmung der Harnstoffkonzentration

#### 2.2.6.4.1 Testprinzip

Harnstoff wird vollautomatisch entsprechend folgenden zwei Teilschritten umgesetzt:



Die Abnahme der NADH-Extinktion pro Zeiteinheit ist proportional der Harnstoffkonzentration.

#### 2.2.6.4.2 Reagenzien

Verwendet wurde Harnstoff-Kit 1.14855.0001 der Firma Merck, Darmstadt.

Der Versuchsansatz enthielt folgende Endkonzentrationen: 9mM 2-Oxoglutarat, 0,3mM NADH, 0,8mM ADP,  $\geq 1,2\text{kU/l}$  GIDH,  $\geq 4,5\text{kU/l}$  Urease.

#### 2.2.6.4.3 Durchführung

Die Bestimmung der Harnstoff-Konzentration wurde automatisiert mit dem Vitalab Eclipse Gerät unter folgenden Konditionen durchgeführt: Reagenztemperatur: 25°C, Wellenlänge 340nm, Schichtdicke: 1cm, Messtemperatur: 25°C.

Zu 2000 $\mu\text{l}$  Reaktionslösung wurden 10 $\mu\text{l}$  Standard bzw. Probenvolumen oder gegeben und gemischt, als Reagenzienleerwert wurden 2000 $\mu\text{l}$  Reaktionslösung verwendet. Nach einer Minute wurden die  $E_1$  Werte und nach fünf weiteren Minuten die  $E_2$  Werte gemessen.

### 2.2.6.4.4 Auswertung

Zunächst wurden wie folgt die Veränderungen der Extinktionen für Standard und Proben berechnet:

$$\Delta E_{St} = (E_1 - E_2)_{St} - (E_1 - E_2)_{RLW}$$

$$\Delta E_P = (E_1 - E_2)_P - (E_1 - E_2)_{RLW}$$

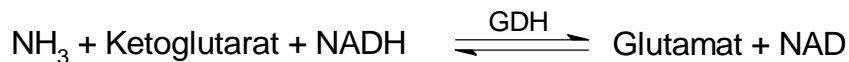
Anschließend wurde die Harnstoff-Konzentration berechnet:

$$\text{Harnstoff - Konzentration} = \text{Standardkonzentration} \times \frac{\Delta E_P}{\Delta E_{St}}$$

### 2.2.6.5 Bestimmung der Ammoniak-Konzentration

#### 2.2.6.5.1 Testprinzip

Ammoniak wird von Glutamat-Dehydrogenase (GDH) entsprechend folgender Reaktion umgesetzt:



Die Abnahme der Extinktion bei 340nm ist dabei der Konzentration von NH<sub>3</sub> proportional.

#### 2.2.6.5.2 Reagenzien

Verwendet wurde der Ammoniak-Kit der Firma Rolf Greiner BioChemica, Flacht.

Der Versuchsansatz enthielt folgende Endkonzentrationen: 1mM ADP, 0,25mM NADH, 4U/ml GDH, 4U/ml LDH, 40mM Triethanolamin pH 7,9, 1,5mM EDTA, 10mM Ketoglutarat.

#### 2.2.6.5.3 Durchführung

Die Bestimmung der Ammoniak-Konzentration wurde automatisiert mit dem Vitalab Eclipse Gerät mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Wellenlänge: 340nm, Temperatur: 37°C.

Als Reagenzienleerwert wurde Aqua bidest., verwendet Direkt nach Zugabe von Ketoglutarat zum Start der Bestimmungsreaktion wurde  $E_1$  gemessen, sechs Minuten später, als die Reaktion zu 100% abgelaufen war, wurde  $E_2$  gemessen.

### 2.2.6.5.4 Auswertung

Zunächst wurden die Extinktionsveränderungen wie folgt berechnet:

$$E_{Probe} = [(E_{1Probe} \times 0,85) - E_{2Probe}] - [E_{1RLW} \times 0,85] - E_{2RLW}$$

$$E_{Standard} = [(E_{Standard} \times 0,85) - E_{Standard}] - [E_{1RLW} \times 0,85] - E_{2RLW}$$

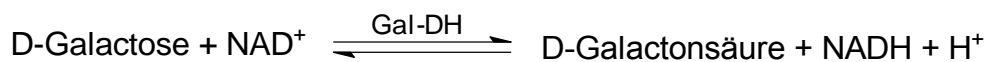
Anschließend wurde die Ammoniak-Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{Ammoniak - Konzentration} = E_{Probe} \times \frac{\text{Konz. Standard}}{E_{Standard}}$$

### 2.2.6.6 Bestimmung der Galactose-Konzentration

#### 2.2.6.6.1 Testprinzip

D-Galactose wird durch NAD von  $\beta$ -Galactose -Dehydrogenase (Gal-DH) bei pH 8,6 zu D-Galactonsäure oxidiert.



Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Galactose-Menge äquivalent und kann photometrisch bei 340nm bestimmt werden.

#### 2.2.6.6.2 Reagenzien

Verwendet wurde ein Kit der Firma Böhlinger Mannheim. Es wurden folgende Endkonzentrationen erreicht: 5mg /l  $\text{NAD}^+$ , 2,3U/l Gal-DH. Zusätzlich waren enthalten: Citrat-Puffer pH 6,6, Magnesiumsulfat, Kaliumdiphosphat-Puffer pH 8,6.

### 2.2.6.6.3 Durchführung

Die Messung der Galactose-Konzentration wurde automatisiert mittels des Vitalab-Eclipse Gerätes mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Wellenlänge: 340nm, Schichtdicke: 1cm, Temperatur: 25°C.

Die Reaktionlösung wurde mit der Probe bzw. Lactosestandard vermischt,  $E_1$  gemessen, anschließend die Reaktion durch Zugabe von Gal-DH gestartet. Nach Stillstand der Reaktion nach ca. 15 Minuten wurde  $E_2$  gemessen. Als Leerwert wurde Aqua bidest. verwendet.

### 2.2.6.6.4 Auswertung

Zunächst wurde wie folgt die Extinktionsänderung berechnet:

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{Probe} - (E_2 - E_1)_{Leerwert}$$

Anschließend wurde die Galactose-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E [g/l]$$

V = Testvolumen, v = Probenvolumen, mg = Molekulargewicht (180,16),

d = Schichtdicke (1cm),  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient von NADH (6,3 bei 340nm)

### 2.2.6.7 Bestimmung der Sorbitol-Konzentration

#### 2.2.6.7.1 Testprinzip

D-Sorbit wird in Gegenwart des Enzyms Sorbit-Dehydrogenase (SDH) durch NAD zu D-Fructose oxidiert, wobei reduziertes NADH entsteht. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weitgehend auf der Seite von NAD und D-Sorbit. Es wird auf die Seite von Fructose verschoben, indem das gebildete NADH in einer nachfolgenden Reaktion in Jodnitro-tetrazoliumchlorid (INT) reagiert. Es bildet sich in einer irreversiblen Reaktion in Gegenwart von Diaphorase ein Formazan mit einem Absorptionsmaximum bei 492nm.

## Material und Methoden

### 2.2.6.7.2 Reagenzien

Verwendet wurde ein Kit der Firma Böhlinger (Mannheim) mit folgenden Lösungen:

Lösung 1: Kaliumphosphat/Triethanolamin-Puffer, pH 8,6, Triton X 100

Lösung 2: in Aqua bidest. gelöste Diaphorase (1600U/l), NAD (11,2g/l), Stabilisatoren

Lösung 3: in Aqua bidest. gelöstes INT

Lösung 4: in Aqua bidest gelöste SDH ( $4,2 \times 10^4$ U/l)

### 2.2.6.7.3 Vorgehen

Der Test wurde auf einer 96-Well-Platte durchgeführt. Pro Well wurden 40µl Lsg. 1, 13µl Lsg. 2, 13µl Lsg. 3 und 127µl Ampuwa gemischt, danach 7µl Probe zugegeben. Für eine Platte (gerundet 100 Wells) wurden also 4ml Lsg. 1, 1,33ml Lsg. 2, 1,33ml Lsg. 3 und 12,67ml Ampuwa angesetzt.

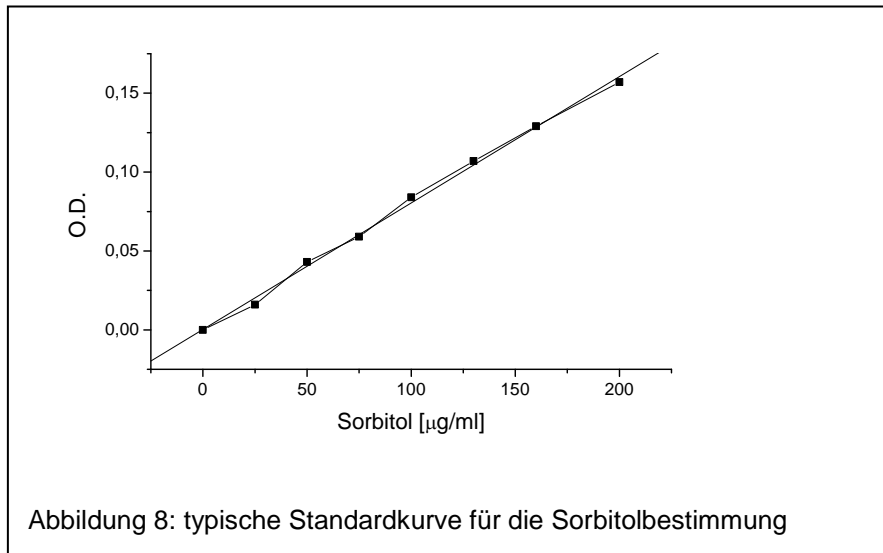
Die Proben wurden 1:4 verdünnt eingesetzt (5µl Ampuwa, 1,7µl Probe)

Eine Standardkurve bestehend aus 0, 25, 50, 75, 100, 130, 160, 200µg/ml Sorbitol wurde ebenfalls auf die Platte pipettiert.

Wenn Reagenz und Proben bzw. Standards auf der Platte waren, kam die Lösung 4 (da Enzym), ebenfalls 1:4 verdünnt (150µl Lösung 4 + 450µl Ampuwa), dazu. Pro Well wurde 5µl des verdünnten Enzyms dazugegeben und rasch der Nullwert im Photometer gemessen (492nm). Die zweite Messung erfolgte nach 30 Minuten.

### 2.2.6.7.4 Auswertung

Aus den Standards wurde eine Standardkurve erstellt (Abb. 8) und mittels einer daraus berechneten Geradengleichung die Werte der Proben bestimmt.



### 2.2.7 Statistische Methoden

Um von der Annahme einer Normalverteilung der Messergebnisse frei zu sein, wurden in dieser Arbeit ausschließlich nicht-parametrische Tests zur Signifikanzprüfung eingesetzt. Zur Auswertung wurde das Programm Jump in der Version 3.1.2 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) benutzt.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Der Lagevergleich zweier Stichproben wurde mit dem Vorzeichen-Rangsummentest nach WILCOXON durchgeführt [27].

Bei Berechnungen von Korrelationen wurde zur Vermeidung vermeintlicher Korrelationen durch einzelne stark abweichende Messwerte der nonparametrische Test nach SPEARMAN verwendet [103].

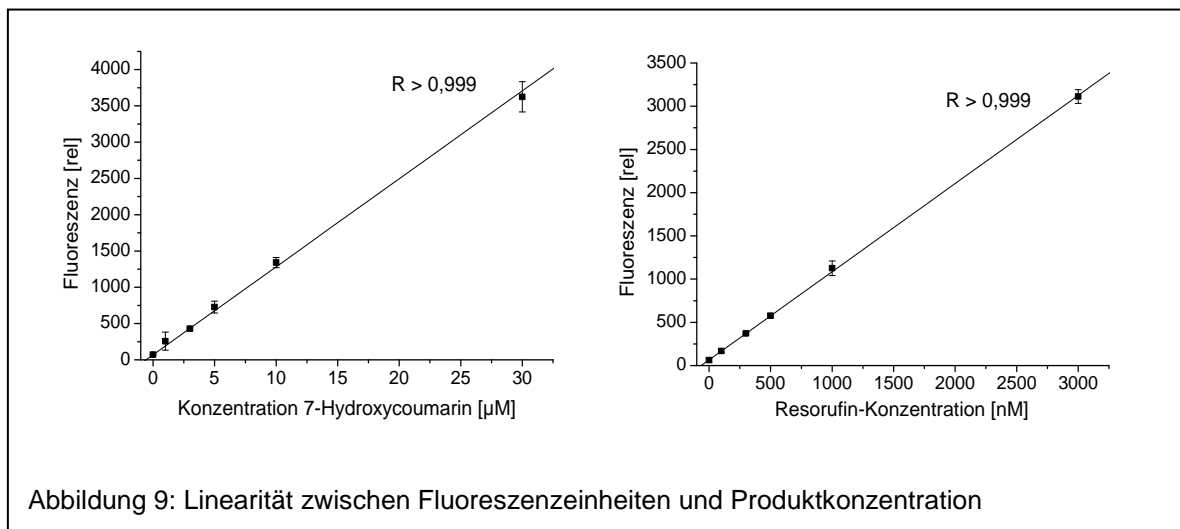
Die Fehlerbalken in den Grafiken repräsentieren den Standardfehler des arithmetischen Mittelwerts; die im Text und in Tabellen angegebenen Abweichungen sind Standardabweichungen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Methodenevaluierung der Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin- und 7-Hydroxycoumarin-Deethylase (EROD und ECOD) Aktivität

##### 3.1.1 Linearität der Methode

Um zu zeigen, dass die Fluoreszenz der Produktkonzentration linear ansteigt wurde je eine Eichreihe mit 7-Hydroxycoumarin (7-HC) und mit Resorufin hergestellt. Die Korrelationskoeffizienten beider Eichreihen waren größer 0,999 (Abb. 9).



##### 3.1.2 Präzision der Methoden

Um die Präzision der Methode zu bestimmen wurden die Messwerte der Eichreihen mit jeweils 648 Einzelmessungen auf Reproduzierbarkeit überprüft (Abb. 10)

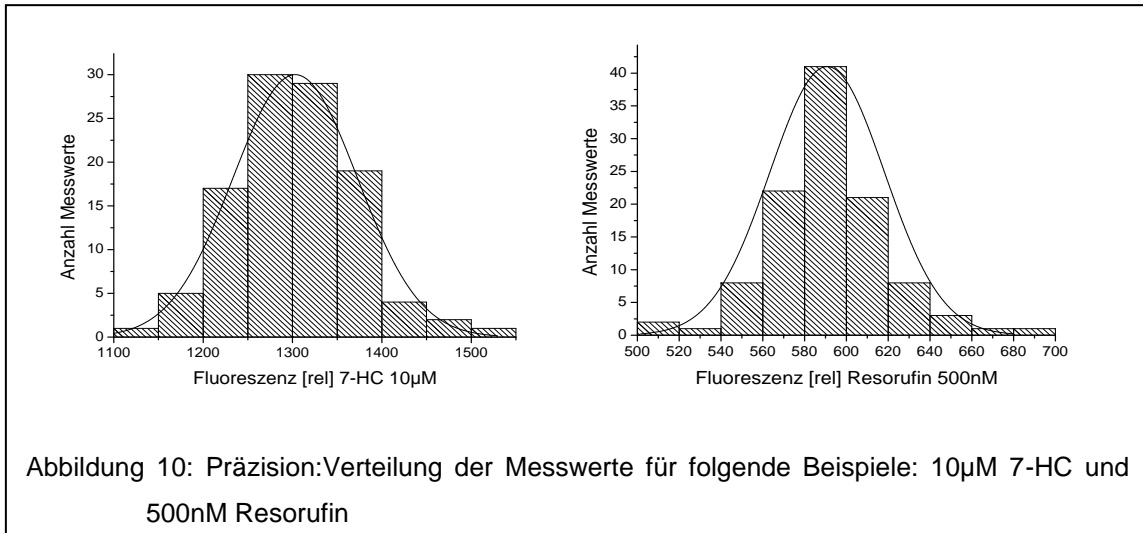
Die Varianzen der Methoden betragen:

Eichreihe 7-Hydroxycoumarin: 9%

Eichreihe Resorufin: 5%



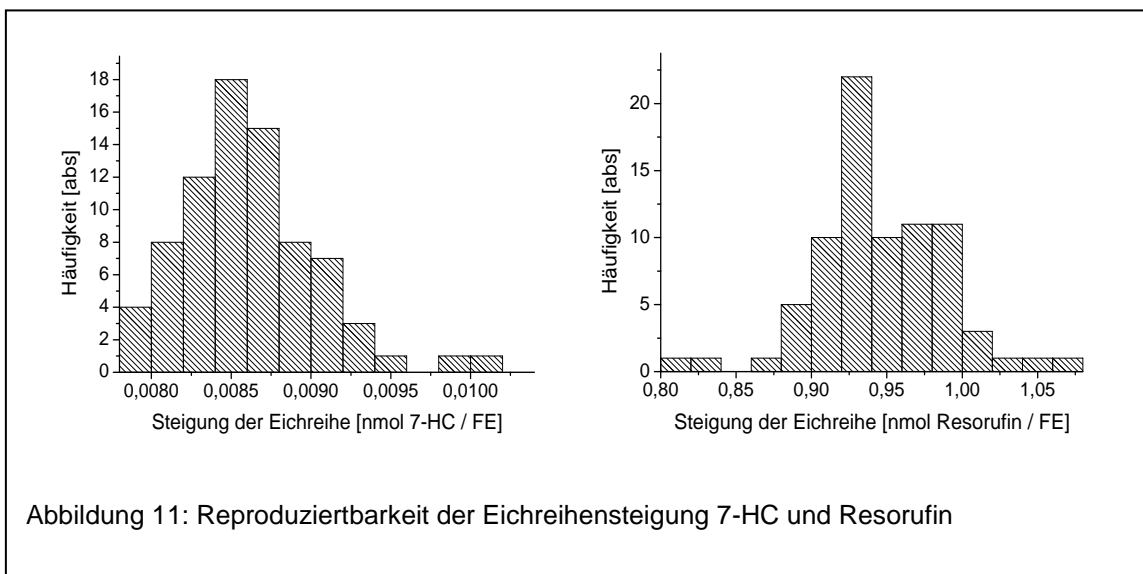
## Ergebnisse



Die Steigungen der Eichreihen (in Williams' Medium E für die Versuche mit den Schweineleberzellen) variierten folgendermaßen (Abb. 11):

7-HC:  $8,6 \pm 0,4$  nmol/Fluoreszenzeinheit

Resorufin:  $946 \pm 44$  fmol/Fluoreszenzeinheit.



### 3.1.3 Haltbarkeit der Produkte

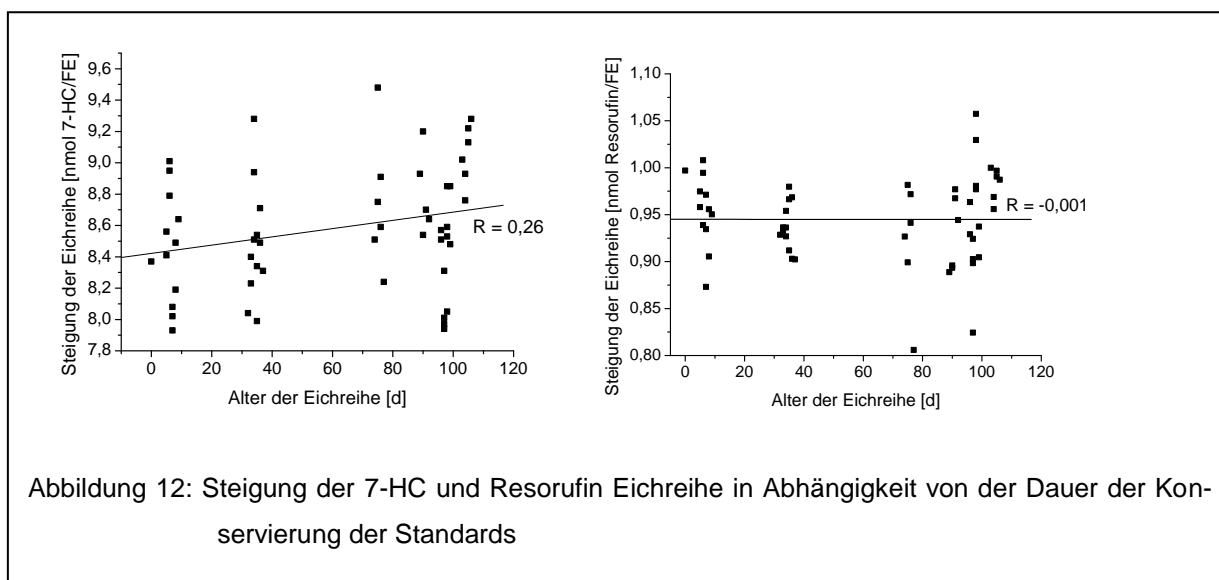
Die Eichreihen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei jedem Versuch mitgemessen. Hier sollte gezeigt werden, dass die Eichreihen auch nach einer längeren Lage-

## Ergebnisse

rung noch die gleiche Steigung haben und entsprechend die Produkte der Versuche lagerungsstabil sind.

Die Steigungen der über 60 Tage alten 7-HC-Eichreihen waren um den Faktor 1,026 höher als die der weniger als 20 Tage alten 7-HC-Eichreihen.

Die Steigungen der über 60 Tage alten Resorufin-Eichreihen waren um den Faktor 0,988 niedriger als die der weniger als 20 Tage alten Resorufin-Eichreihen (Abb. 12).



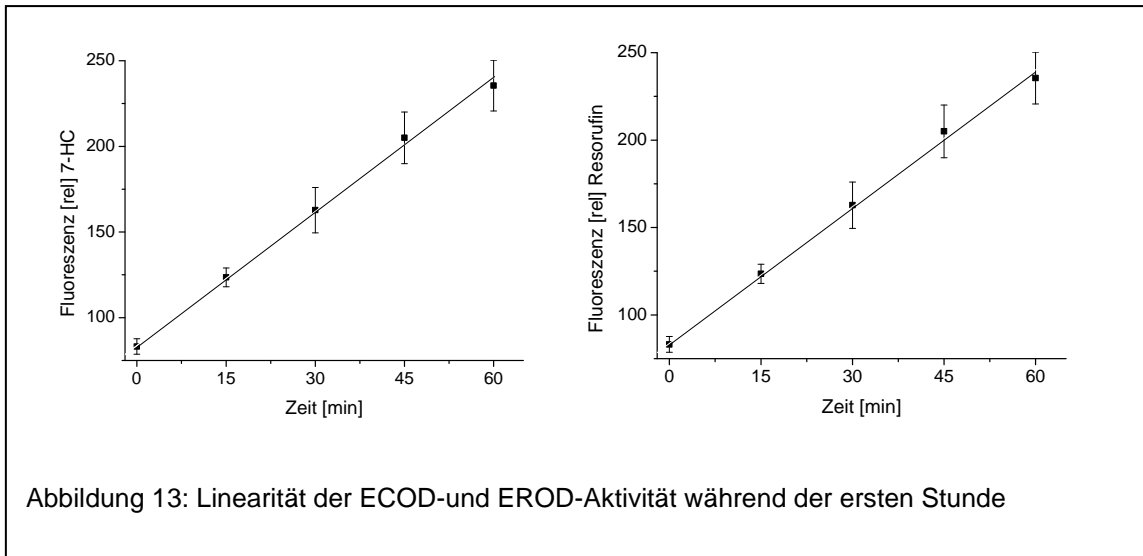
### 3.1.4 Linearität der ersten Stunde

Hier sollte gezeigt werden, dass innerhalb der ersten Stunde die Produktkonzentration linear zunimmt und somit die Reaktionsgeschwindigkeit konstant und nicht von der Substratkonzentration abhängig ist.

Zwei Mal wurden Rattenleberzellen mit EC bzw. mit ER über zwei Stunden inkubiert. Zu Beginn, sowie nach 15, 30, 45, und 60min wurden Proben genommen und ohne bzw. mit Glucuronidase über Nacht inkubiert. Ammoniumacetatpuffer wurde dazugegeben und die Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen.

Sowohl für die Produktion von 7-HC als auch für Resorufin zeigte sich ein linearer Anstieg der Produktkonzentration innerhalb der ersten Stunde mit einem Korrelationskoeffizienten zwischen Zeit und Fluoreszenzzunahme von  $>0,99$  (Abb. 13).

## Ergebnisse

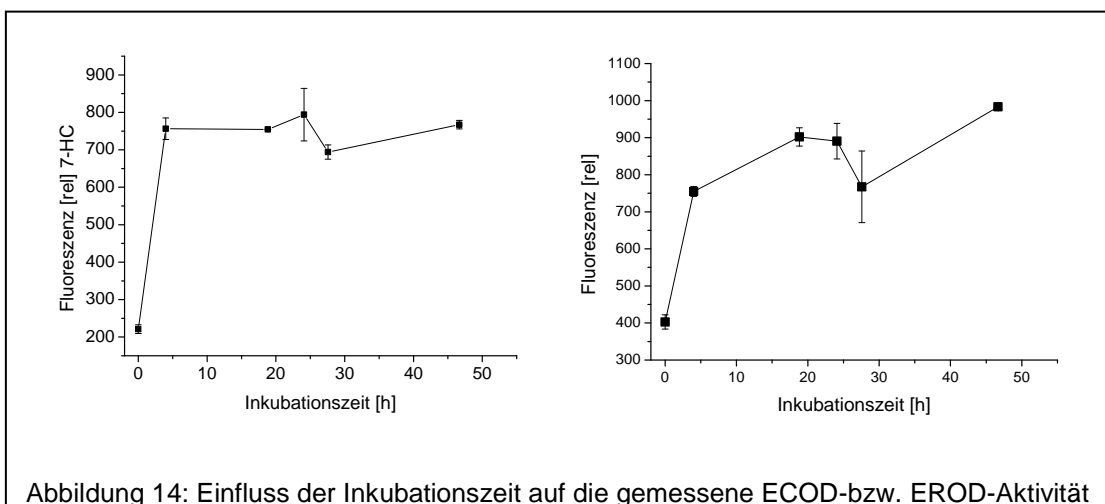


### 3.1.5 Einfluss der Inkubationszeit

Der Überstand aus den Versuchen wurde bis zum nächsten Tag mit Ammoniumazetatpuffer inkubiert. Ob die Länge dieser Inkubationszeit einen Einfluss hat wurde in folgendem Versuch untersucht:

Um hohe Produktkonzentrationen zu erreichen und somit auch kleine Unterschiede deutlicher darstellen zu können wurden die Zellen fünf Stunden mit ER bzw. EC inkubiert. Die Überstände wurden auf sechs Platten verteilt und unterschiedlich lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die gemessene Konzentration von 7-HC war nach einer Inkubationszeit von vier Stunden mit Schwankungen um den Faktor 0,1 konstant während die gemessene Konzentration von Resorufin nach einer Inkubationszeit von vier Stunden zwar langsamer aber dennoch weiter stieg und zwischen 19 und 47 Stunden Inkubationszeit Schwankungen um den Faktor 0,21 zeigte (Abb. 14).



## **3.2 Präparation der Leberzellen**

### **3.2.1 Leberzellpräparation aus Lewis-Ratten**

Präpariert wurden die Lebern von sechs Ratten. Die Ratten hatten ein mittleres Gewicht von  $235 \pm 56$ g (130g bis 280g). Die durchschnittliche Ausbeute an Hepatozyten betrug  $3,6 \pm 1,7 \times 10^8$  Zellen. Die Vitalität der Zellen betrug im Mittel  $87 \pm 9\%$ .

### **3.2.2 Leberzellpräparation aus Schweinen**

#### **3.2.2.1 Für die Leberzellkulturen**

Präpariert wurden die Lebern von sieben Schweinen. Die Schweine hatten ein mittleres Gewicht von  $9,8 \pm 1,4$ kg (8,0kg bis 11,5kg). Die durchschnittliche Ausbeute an Hepatozyten betrug  $1,3 \pm 0,5 \times 10^{10}$  Zellen. Die Vitalität der Zellen betrug im Mittel  $96 \pm 2\%$ .

#### **3.2.2.2 Für das Leberersatzverfahren**

Präpariert wurden die Lebern von acht Schweinen. Die Schweine hatten ein mittleres Gewicht von  $31 \pm 42$ kg (8,9kg bis 95kg). Die durchschnittliche Ausbeute an Hepatozyten betrug  $8,8 \pm 6,3 \times 10^9$  Zellen. Die Vitalität der Zellen betrug im Mittel  $96 \pm 2\%$ .

## **3.3 Kryokonservierung von Schweinehepatozyten**

Sieben Mal wurden kryokonservierte Schweinehepatozytensuspensionen aufgetaut und in Zellkulturen eingebracht. Von maximal möglichen  $9,6 \times 10^7$  Zellen betrug die mittlere Ausbeute  $4,7 \pm 2,4 \times 10^7$  Zellen. Der Verlust an Zellen durch die Kryokonservierung betrug somit nach Dichtegradientenzentrifugation mit 30-40% Percoll  $51 \pm 25\%$ . Die Vitalität der aufgetauten Zellen betrug  $95 \pm 4\%$ .

### 3.4 Ergebnisse der Zellkulturversuche

#### 3.4.1 Protein in den Zellkulturversuchen

Die Proteinmenge in den nativen Schweineleberzellkulturen stieg fast kontinuierlich von  $71 \pm 20 \mu\text{g}/\text{Well}$  nach 4,7 Stunden auf  $102 \pm 20 \mu\text{g}/\text{Well}$  nach 68,5 Stunden (Abb. 15).

Die Proteinmengen in den Kulturen mit den kryokonservierten Schweineleberzellen stiegen kontinuierlich von  $39 \pm 24 \mu\text{g}/\text{Well}$  nach 4,7 Stunden auf  $57 \pm 30 \mu\text{g}/\text{Well}$  nach 68,5 Stunden (Abb. 15).

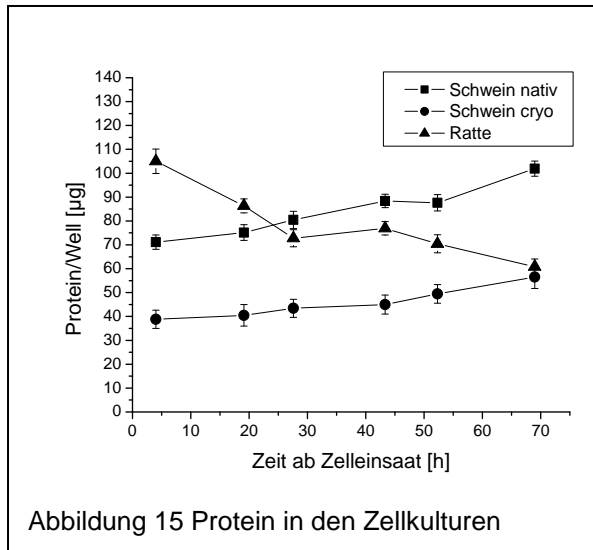


Abbildung 15 Protein in den Zellkulturen

In den Kulturen der kryokonservierten Schweinehepatozyten war die Proteinmenge/Well bei gleicher eingesäter Zellzahl durchschnittlich um den Faktor  $0,46 \pm 0,02$  niedriger als in den Kulturen der nativen Schweinehepatozyten.

Die Proteinmenge in den nativen Rattenleberzellkulturen sank fast kontinuierlich von  $105 \pm 30 \mu\text{g}/\text{Well}$  nach 2,4 Stunden auf  $60,8 \pm 20 \mu\text{g}/\text{Well}$  nach 70 Stunden (Abb. 15).

#### 3.4.2 ECOD-Aktivität in den Zellkulturversuchen

Als Grundlage für die Auswertung wurden die Versuche genommen, in denen dem Kulturmedium nur EC und kein ER zugegeben wurde.

Sowohl bei den nativen und kryokonservierten Schweinehepatozyten als auch bei den Rattenhepatozyten ging die ECOD-Aktivität besonders bei Betrachtung der proteinbezogenen Werte im Verlauf zurück (Abb. 16). Im Einzelnen war folgender Verlauf zu beobachten:

## Ergebnisse

### 3.4.2.1 Native Schweinehepatozyten

Zwischen Zeitpunkt eins und sechs sank die ECOD-Aktivität um den Faktor 0,6 von  $150 \pm 88 \text{ mU/g Protein}$  bei vier Stunden auf  $60 \pm 20 \text{ mU /g Protein}$  69 Stunden nach Zelleinsaat.

### 3.4.2.2 Kryokonservierten Schweinehepatozyten

Nach einem Anstieg der proteinbezogenen ECOD-Aktivität von  $130 \pm 68 \text{ mU/g Protein}$  vier Stunden nach Zelleinsaat auf  $138 \pm 39 \text{ mU /g Protein}$  nach 19 Stunden kam es zu einem fast kontinuierlichem Abfall der ECOD-Aktivität um den Faktor 0,72 auf  $36 \pm 21 \text{ mU /g Protein}$  nach 69 Stunden.

### 3.4.2.3 Rattenhepatozyten

Die proteinbezogene ECOD-Aktivität wies mit einem Plateau bei ca.  $102 \text{ mU /g Protein}$  zwischen 19 und 52 Stunden nach Zelleinsaat qualitativ einen ähnlichen Verlauf wie die der nativen Schweinehepatozyten auf. Dabei zeigte sich eine Aktivitätsabnahme um den Faktor 0,54 von  $152 \pm 60 \text{ mU /g Protein}$  vier Stunden nach Zelleinsaat auf  $70 \pm 25 \text{ mU /g Protein}$  nach 69 Stunden.

### 3.4.2.4 Vergleich der ECOD-Aktivitäten

Die absolute ECOD-Aktivität war bei den kryokonservierten Schweinehepatozyten im Mittel um den Faktor  $0,6 \pm 0,1$  niedriger als bei den nativen Schweinehepatozyten. Bei einer Versuchszahl von 14 (native Schweinehepatozyten) bzw. 13 (kryokonservierte Schweinehepatozyten) war dieser Unterschied an den Zeitpunkten zwei bis sechs signifikant.

Die proteinbezogene Aktivität der nativen Schweinehepatozyten war im Mittel um den Faktor  $0,1 \pm 0,2$  niedriger als die der kryokonservierten Schweinehepatozyten. Dieser Unterschied war bei einer Versuchszahl von 14 (native Schweinehepatozyten) bzw. 13 (kryokonservierte Schweinehepatozyten) an den Zeitpunkten vier und sechs signifikant.

### 3.4.3 EROD-Aktivität in den Zellkulturversuchen

Als Grundlage für die Auswertung wurden die Versuche genommen, in denen dem Kulturmedium nur ER und kein EC zugegeben wurde.

## Ergebnisse

Die proteinbezogene EROD-Aktivität war bei allen drei untersuchten Zellen ungefähr gleich groß und zeigte einen besonders bei den nativen und kryokonservierten Schweinehepatozyten ausgeprägten wellenförmigen, tendenziell abnehmenden Verlauf. Im einzelnen war folgender Verlauf zu beobachten (Abb. 16).

### 3.4.3.1 Native Schweinehepatozyten

Wellenförmiger Verlauf der EROD-Aktivität mit durchschnittlichen Schwankungen um den Faktor 0,35 zwischen vier und 52 Stunden nach Zelleinsaat. Die proteinbezogene EROD-Aktivität betrug vier Stunden nach Zelleinsaat  $19 \pm 18 \text{ mU /g Protein}$ . Das Maximum lag mit  $20 \pm 4 \text{ mU /g Protein}$  bei 52 Stunden. Nach 69 Stunden betrug die Aktivität  $8 \pm 7 \text{ mU /g Protein}$ . Innerhalb der Beobachtungsdauer kam es zu einer Abnahme der EROD-Aktivität um den Faktor 0,58.

### 3.4.3.2 Kryokonservierte Schweinehepatozyten

Vier Stunden nach Zelleinsaat betrug die proteinbezogene EROD-Aktivität  $19 \pm 13 \text{ mU /g Protein}$ . Anschliessend kam es zu einem Abfall der Aktivität auf ein Plateau von durchschnittlich  $11 \text{ mU /g Protein}$  zwischen 19 und 43 Stunden nach Zelleinsaat, danach zu einem Anstieg auf  $23 \pm 10 \text{ mU /g Protein}$  bei 52 Stunden nach Zelleinsaat und zu einem Wiederabfall der Aktivität auf  $3 \pm 4 \text{ mU /g Protein}$  nach 69 Stunden. Somit kam es innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu einem Abfall der proteinbezogenen EROD-Aktivität um den Faktor 0,85.

### 3.4.3.3 Rattenhepatozyten

Die proteinbezogene EROD-Aktivität betrug vier Stunden nach Zelleinsaat  $18 \pm 14 \text{ mU /g Protein}$ . Anschließend zeigte sich ein leichte etwas wellenförmige Aktivitätsabnahme auf  $15 \pm 8 \text{ mU /g Protein}$  69 Stunden nach Zelleinsaat. Im Verlauf der Beobachtungsdauer kam es zu einer Abnahme der proteinbezogenen EROD-Aktivität um den Faktor 0,21.

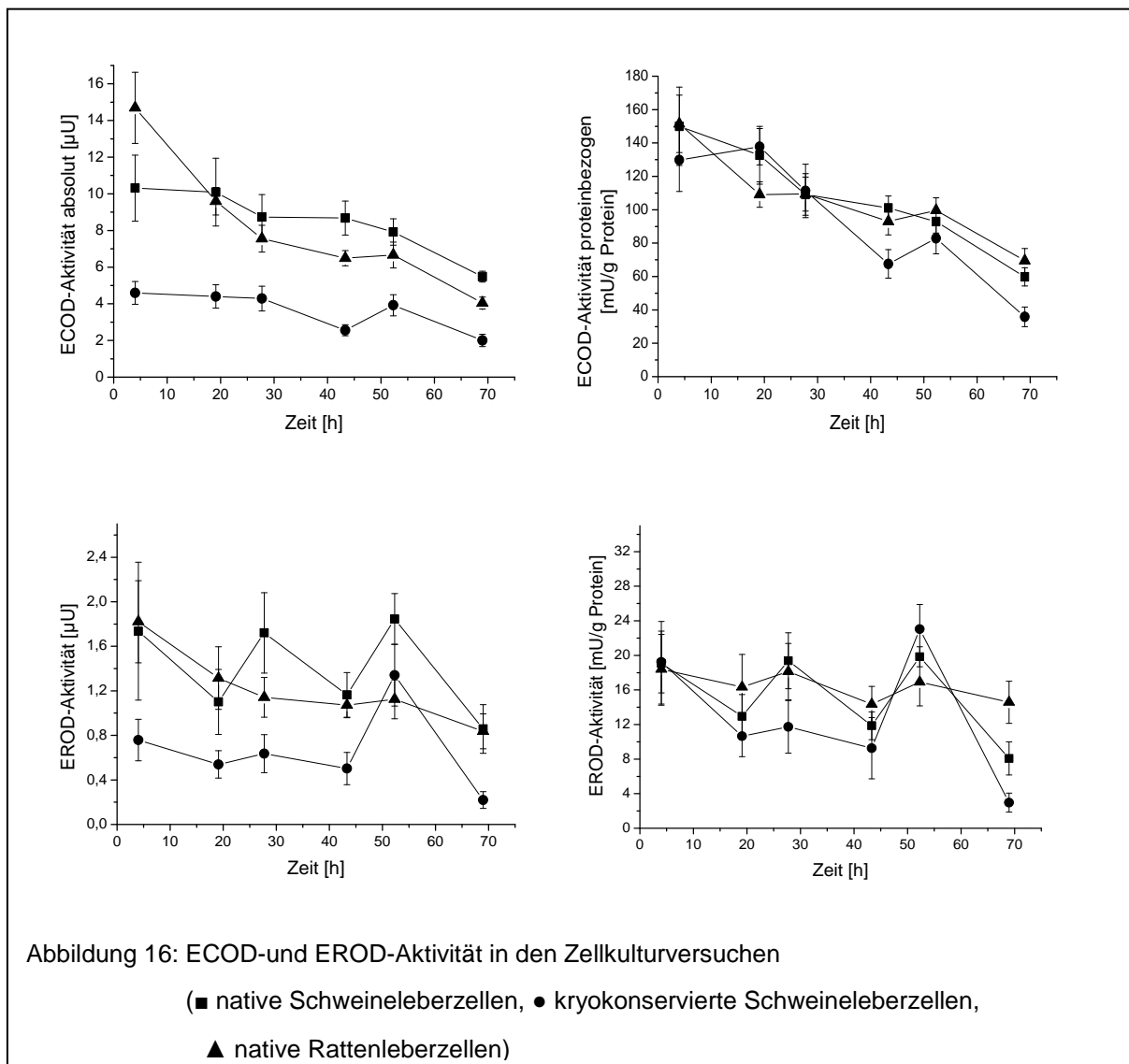
### 3.4.3.4 Vergleich der EROD-Aktivität

Die nicht proteinbezogene EROD-Aktivität war bei den kryokonservierten Schweinehepatozyten im Mittel um den Faktor  $0,55 \pm 0,16$  geringer als bei den na-

## Ergebnisse

tiven Schweinehepatozyten. Dieser Unterschied war bei einer Versuchszahl von 14 (native Schweinehepatozyten) bzw. 13 (kryokonservierte Schweinehepatozyten) bei den Zeitpunkten drei, vier und sechs signifikant.

Die proteinbezogene EROD-Aktivität war bei den kryokonservierten Schweinehepatozyten im Mittel um den Faktor  $0,21 \pm 0,26$  niedriger als bei den nativen Schweinehepatozyten. Dieser Unterschied war bei Zeitpunkt sechs bei o. g. Probenumfang signifikant.



### 3.4.4 Glucuronidierungsleistung in den Zellkulturversuchen

Durch die Zugabe von Glucuronidase konnte durch die Glucuronidierung nicht mehr fluoreszierendes 7-HC bzw. Resorufin deglucuronidiert werden und somit



## Ergebnisse

wieder dem fluoremtrischen Nachweis zugänglich gemacht werden. Durch den Vergleich der Produktmenge mit und ohne Glucuronidase konnte die Glucuronidierungsleistung berechnet werden.

Für die Auswertung wurden die Versuche herangezogen, in denen dem Kulturmedium entweder EC oder ER (also nicht beides gleichzeitig) als Substrat zugegeben wurde. Die Glucuronidierungsleistung für 7-HC war sowohl in den Rattenleberzellkulturen als auch in den Zellkulturen der nativen und kryokonservierten Schweineleberzellen relativ konstant bzw. zeigte im Verlauf eine geringe Abwärtstendenz, während sich die Glucuronidierungsleistung für Resorufin in allen drei Zellkulturreihen von sehr niedrigem Niveau kurz nach Zelleinsaat steigerte.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse beobachtet (Abb. 16).

### 3.4.4.1 **Native Schweinehepatozyten**

Die Glucuronidierungsleistung für 7-HC betrug vier Stunden nach Zelleinsaat  $17 \pm 13\%$  und blieb bis 52 Stunden nach Zelleinsaat mit leichten Schwankungen ungefähr konstant. Nach 69 Stunden war die Glucuronidierungsleistung für 7-HC auf  $1 \pm 34\%$  abgefallen. Die Glucuronidierungsleistung sank innerhalb des Beobachtungszeitraumes um den Faktor 0,93.

Die Glucuronidierungsleistung für Resorufin der nativen Schweinehepatozyten betrug vier Stunden nach Zelleinsaat  $-4 \pm 32\%$ , erreichte zwischen 19 und 52 Stunden ein Plateau bei ca. 9% und erreichte 69 Stunden nach Zelleinsaat  $48 \pm 32\%$ . Bei der negativen Anfangsaktivität ließ sich der Steigerungsfaktor der Glucuronidierungsleistung nicht berechnen.

### 3.4.4.2 **Kryokonservierte Schweinehepatozyten**

Die Glucuronidierungsleistung für 7-HC betrug vier Stunden nach Zelleinsaat  $58 \pm 111\%$ , sank  $22 \pm 32\%$  nach 27 Stunden und stieg dann wieder auf  $54 \pm 85\%$  nach 69 Stunden. Die Glucuronidierungsleistung für 7-HC reduzierte sich im Beobachtungszeitraum um den Faktor 0,08.

Die Glucuronidierungsleistung für Resorufin der kryokonservierten Schweinehepatozyten betrug vier Stunden nach Zelleinsaat  $-13 \pm 84\%$  und blieb

## Ergebnisse

bis 28 Stunden nahe Null Prozent oder negativ. Danach kam es zu einer Steigerung der Glucuronidierungsleistung für Resorufin auf ein Plateau bei ca. 31% nach 43 Stunden. Bei der negativen Anfangsaktivität ließ sich der Steigerungsfaktor der Glucuronidierungsleistung nicht berechnen.

### 3.4.4.3 Vergleich native und kryokonservierte Schweinehepatozyten

Im Mittel war die Glucuronidierungsleistung für 7-HC in den Kulturen der kryokonservierten Schweinehepatozyten um den Faktor  $10 \pm 18$  höher als in den Kulturen der nativen Schweinehepatozyten. Dieser Unterschied war bei einer Versuchszahl von 14 (native Schweinehepatozyten) bzw. 13 (kryokonservierte Schweinehepatozyten) zu den Zeitpunkten eins, zwei, vier und sechs signifikant (Abb. 17).

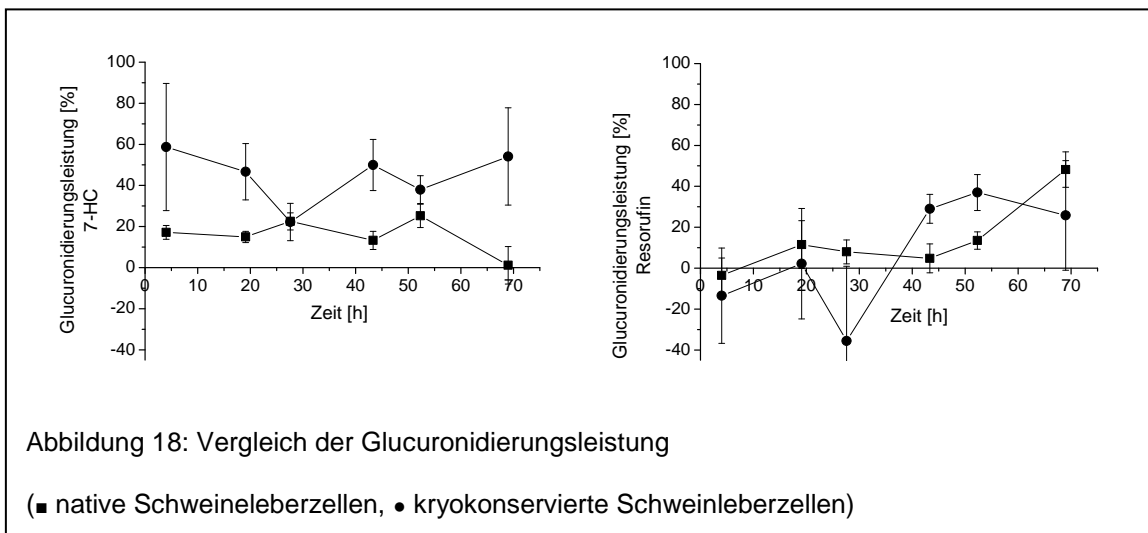
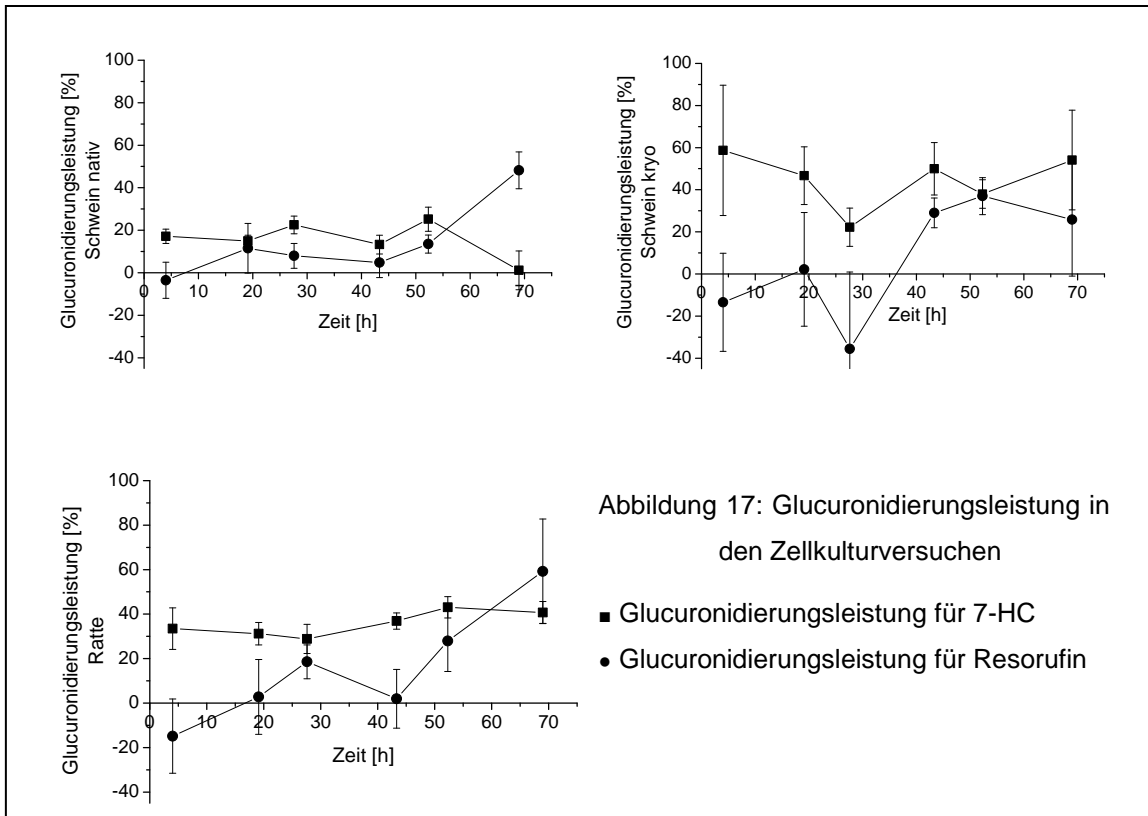
Die Glucuronidierungsleistung für Resorufin war in den Kulturen der kryokonservierten Schweinehepatozyten im Mittel um den Faktor  $1,5 \pm 3,6$  höher als in den Kulturen mit den nativen Schweinehepatozyten. Dieser Unterschied war bei einer Versuchszahl von 14 (native Schweinehepatozyten) bzw. 13 (kryokonservierte Schweinehepatozyten) zu den Zeitpunkten vier und fünf signifikant.

### 3.4.4.4 Rattenhepatozyten

Die Glucuronidierungsleistung für 7-HC blieb über den Beobachtungszeitraum relativ konstant. Vier Stunden nach Zelleinsaat betrug sie  $33 \pm 32\%$ , sank auf  $29 \pm 23\%$  nach 28 Stunden. Das Maximum lag mit  $43 \pm 17\%$  bei 52 Stunden nach Zelleinsaat. Nach 69 Stunden betrug die Glucuronidierungsleistung  $41 \pm 17\%$ . Im Beobachtungszeitraum kam es zu einer Steigerung der Glucuronidierungsleistung für 7-HC um den Faktor 1,21.

Die Glucuronidierungsleistung für Resorufin zeigte wie bei den Schweineleberzellkulturen eine steigende Tendenz. Vier Stunden nach Zelleinsaat betrug sie  $-15 \pm 58\%$  und erreichte nach schwankendem Verlauf  $59 \pm 81\%$  nach 69 Stunden. Bei der negativen Anfangsaktivität lässt sich der Steigerungsfaktor der Glucuronidierungsleistung nicht berechnen.

## Ergebnisse



### 3.4.5 Einfluss von ER auf die ECOD-Aktivität

Bei den Versuchen mit den nativen Schweinehepatozyten zeigte sich durch die Anwesenheit von ER im Kulturmedium eine Verminderung der ECOD-Aktivität um den Faktor  $0,3 \pm 0,1$ . Diese Verminderung war bei 14 unabhängigen Versuchen an den Zeitpunkten eins, zwei, drei und fünf signifikant (Abb. 18).

Bei den Versuchen mit den kryokonservierten Schweinehepatozyten zeigte sich durch die Anwesenheit von ER im Kulturmedium eine Verminderung der ECOD-

## Ergebnisse

Aktivität um den Faktor  $0,5 \pm 0,1$ . Diese Verminderung war bei 13 unabhängigen Versuchen an den Zeitpunkten eins, zwei, vier, fünf und sechs signifikant (Abb. 18).

Bei den Versuchen mit den Rattenhepatozyten zeigte sich durch die Anwesenheit von ER im Kulturmedium eine Verminderung der ECOD-Aktivität um den Faktor  $0,6 \pm 0,1$ . Diese Verminderung war an allen Zeitpunkten statistisch auf dem  $p < 0,001$ -Niveau signifikant (Abb. 18).

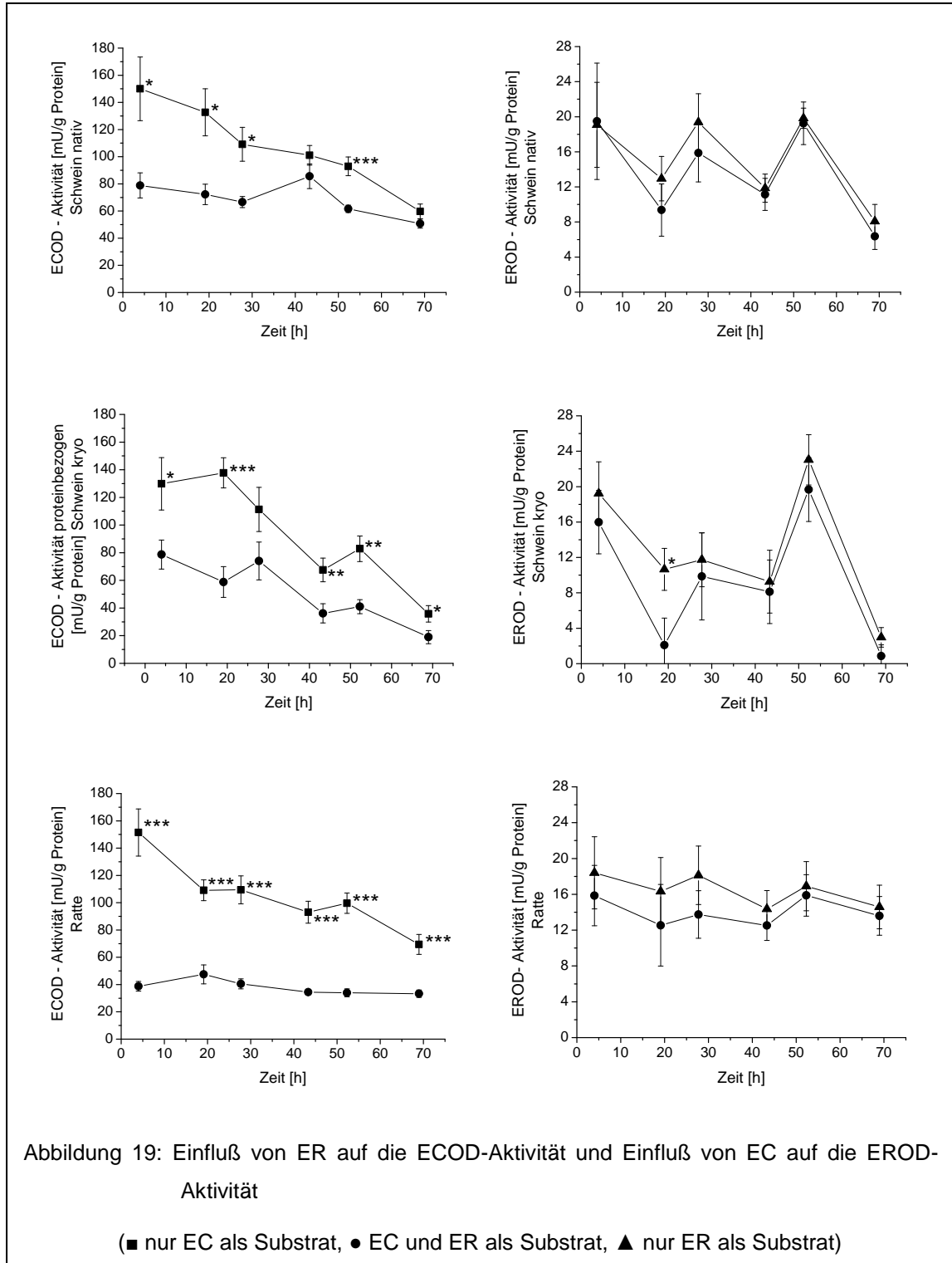
### 3.4.6 Einfluss von EC auf die EROD-Aktivität

Bei den Versuchen mit den nativen Schweinhepatozyten zeigte sich durch die Anwesenheit von EC im Kulturmedium eine Verminderung der EROD-Aktivität um den Faktor  $0,12 \pm 0,1$ . Diese Verminderung war bei 14 unabhängigen Versuchen an keinem Zeitpunkt signifikant (Abb. 18).

Bei den Versuchen mit den kryokonservierten Schweinhepatozyten zeigte sich durch die Anwesenheit von EC im Kulturmedium eine Verminderung der EROD-Aktivität um den Faktor  $0,3 \pm 0,3$ . Diese Verminderung war bei 13 unabhängigen Versuchen am Zeitpunkt zwei signifikant (Abb. 18).

Bei den Versuchen mit den Rattenhepatozyten zeigte sich durch die Anwesenheit von EC im Kulturmedium eine Verminderung der EROD-Aktivität um den Faktor  $0,2 \pm 0,1$ . Diese Verminderung war bei 12 unabhängigen Versuchen an keinem Zeitpunkt signifikant (Abb. 18).

# Ergebnisse



### 3.5 Ergebnisse der Kreislaufversuche

Ein Versuch mit kryokonservierten Schweineleberzellen wurde nach 7 Stunden wegen Okklusion des Vlieses abgebrochen und wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Werte, die mehr als 4 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt waren, wurden ebenfalls nicht berücksichtigt.

Bei den Versuchen mit den *nativen* Schweineleberzellen wurden 10ml einer Zellsuspension mit  $8 \times 10^6$  Zellen/ml entsprechend  $8 \times 10^7$  Zellen in den Reaktor eingesät, bei den Versuchen mit den *kryokonservierten* Schweineleberzellen wurden 50ml einer Zellsuspension mit  $8 \times 10^6$  Zellen/ml entsprechend  $4 \times 10^8$  Zellen in den Reaktor eingesät.

Unter Berücksichtigung der durch die Probennahmen aus dem Kreislauf entfernten Volumina wurden die seit Versuchsbeginn bzw. Wechsel der Perfusion von Medium auf Plasma produzierten bzw. eliminierten Stoffmengen berechnet. Bei Stoffen, die zu Versuchsbeginn zugegeben wurden (Sorbitol, Galactose, Ammoniumchlorid) wurde dafür als Referenz die errechnete Stoffmenge nach abgeschlossener Verteilung des Substrates im Kreislauf genommen.

Aufgrund der strukturellen Unterschiede hinsichtlich Perfusionsmedium und eingesetzter Zellzahl wurde auf statistische Tests zum Vergleich der Aktivitäten zwischen nativen und kryokonservierten Schweineleberzellen verzichtet

#### 3.5.1 ECOD-Aktivität in den Kreislaufversuchen

Den Kreislaufversuchen wurde EC in einer Konzentration von  $70 \mu\text{mol/l}$  zugegeben, so dass die maximal erreichbare 7-HC-Konzentration  $70 \mu\text{mol/l}$  betrug.

##### 3.5.1.1 native Schweinehepatozyten

Die ECOD-Aktivität in den Kreislaufexperimenten mit den nativen Schweineleberzellen war heterogen und ließ sich in zwei Gruppen aufteilen (Abb. 19):

In den Versuchen mit vergleichsweise hoher ECOD-Aktivität wurde während der Perfusion mit Medium eine 7-HC Konzentration von  $27,8 \pm 13 \mu\text{mol/l}$  und während der anschließenden Perfusion mit Plasma eine Konzentration von

## Ergebnisse

28,2±10µmol/l erreicht. Das entsprach unter Berücksichtigung des Kreislaufvolumens und dem durch die Probennahme aus dem Kreislauf entfernten Produkt einer 7-HC-Produktion von 4,6±2,3µmol während der Perfusion mit Medium und von 2,6±1,2µmol während der Perfusion mit Plasma.

In den Versuchen mit vergleichsweise niedriger ECOD-Aktivität wurden während der Perfusion mit Medium eine 7-HC Konzentration von 2,1±1µmol/l und während der anschließenden Perfusion mit Plasma eine 7-HC Konzentration von 1,1±0,6µmol/l erreicht. Das entsprach unter Berücksichtigung des Kreislaufvolumens und dem durch die Probenentnahme aus dem Kreislauf entfernten Produkt einer 7-HC-Produktion von 0,35±0,2µmol und während der Perfusion mit Medium und von 0,17±0,1µmol während der Perfusion mit Plasma.

### 3.5.1.2 kryokonservierte Schweinhepatozyten

Innerhalb der während 24 Stunden durchgeführten Perfusion mit Plasma wurde eine 7-HC-Konzentration von 1,43±0,8µmol/l (0,63 bis 2,43µmol/l) erreicht. Das entsprach unter Berücksichtigung des Kreislaufvolumens und dem durch die Probennahme aus dem Kreislauf entfernten Produkt 0,15±0,09µmol (0,07 bis 0,26µmol) umgesetztem EC.

## 3.5.2 Glucuronidierungsleistung in den Kreislaufversuchen

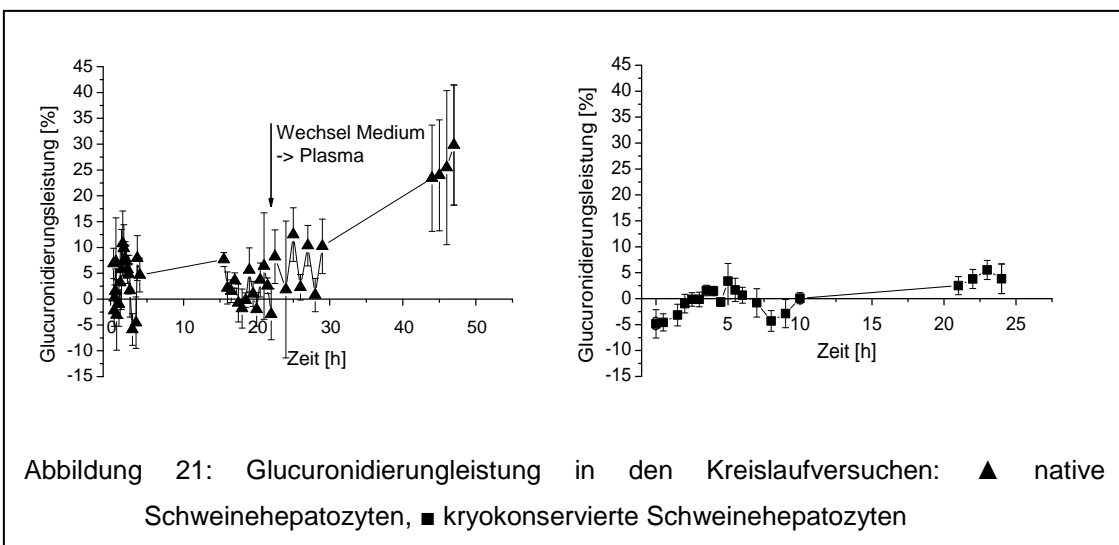
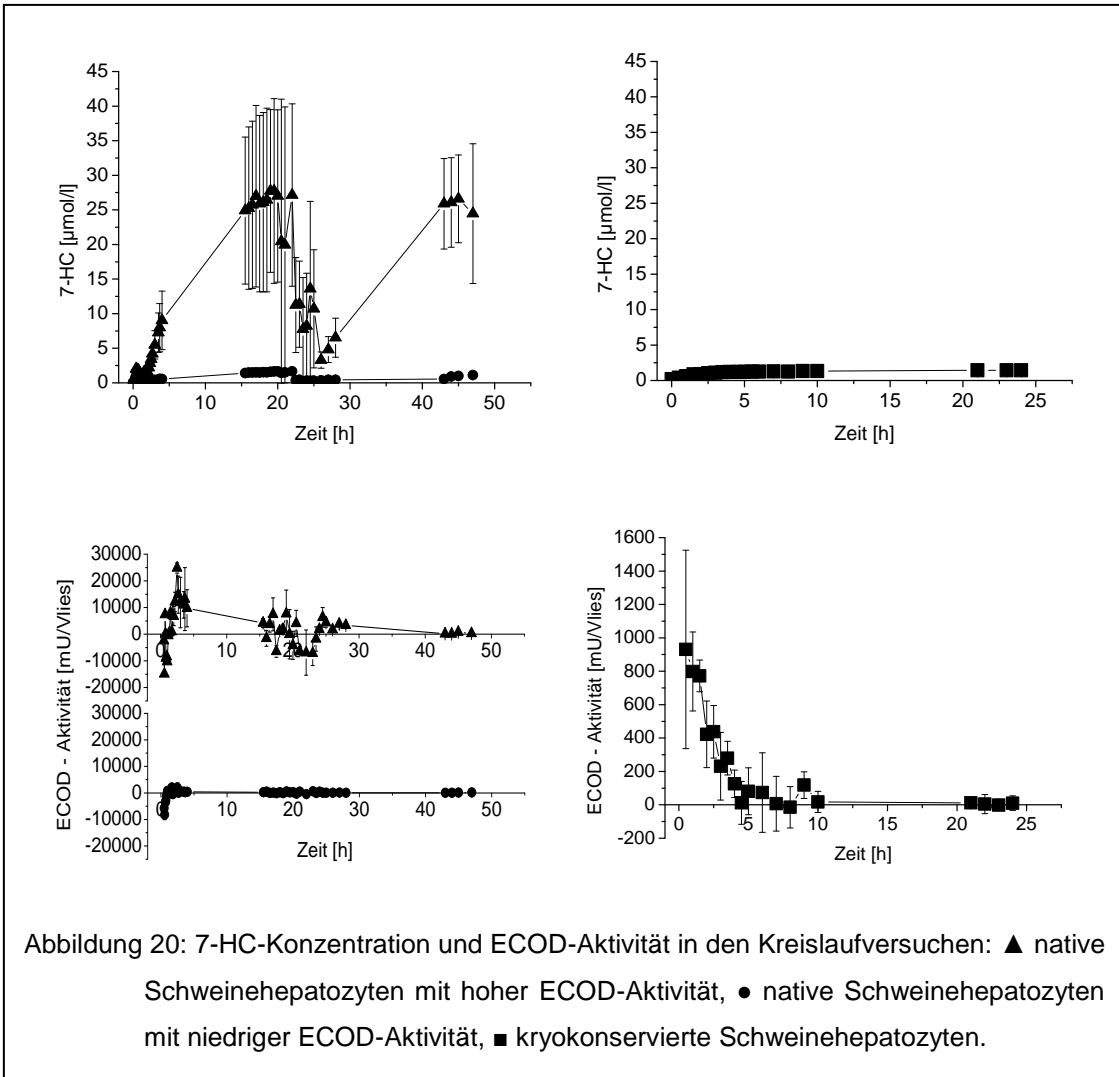
### 3.5.2.1 native Schweinehepatozyten

In drei der sieben Versuche wurden gegen Ende der Perfusion mit Plasma mit bis zu 68% relevante Mengen 7-HC glucuronidiert. In den übrigen Versuchen war die Glucuronierungsleistung auf niedrigem Niveau annähernd konstant und betrug zwischen während der Perfusion mit Medium 2,5±12%. Während der Perfusion mit Plasma 12±21% (Abb 20).

### 3.5.2.2 kryokonservierte Schweinehepatozyten

In allen fünf Versuchen war die Glucuronidierungsleistung konstant auf niedrigem Niveau. 0,1±5% des produzierten 7-HC wurden glucuronidiert (Abb. 20).

# Ergebnisse





### 3.5.3 Albuminproduktion in den Kreislaufversuchen

#### 3.5.3.1 native Schweinehepatozyten

Während der Perfusion mit Medium kam es in fünf von sieben Versuchen zu einer Reduktion der Albuminmenge im Kreislauf. Die Albuminmenge veränderte sich um  $-0,07 \pm 0,08\text{g}$  ( $-0,22$  bis  $+0,01\text{g}$ ).

Während der Perfusion mit Plasma stieg in 3 Versuchen die Albuminmenge, in drei Versuchen kam es zu einem Abfall. Dabei veränderte sich die Albuminmenge im Mittel um  $-0,18 \pm 0,5\text{g}$  ( $-1,44$  bis  $+0,27\text{g}$ ) (Abb. 21).

#### 3.5.3.2 Kryokonservierte Schweinehepatozyten

In allen Versuchen zeigte sich besonders während der ersten drei Stunden eine Reduktion der sich im Kreislauf befindlichen Menge an Albumin. Die Veränderung der Albuminmenge während der Versuchszeit betrug im Mittel  $-0,61 \pm 0,24\text{g}$  ( $-1,02$  bis  $-0,39\text{g}$ ) (Abb. 21).

### 3.5.4 Ammoniakelimination in den Kreislaufversuchen

Den Kreislaufversuchen wurden bei Versuchsbeginn bzw. Perfusionswechsel von Medium auf Plasma jeweils 10mg Ammoniumchlorid, entsprechend  $187\mu\text{mol}$  Ammoniak, zugegeben.

#### 3.5.4.1 native Schweinehepatozyten

Während der Perfusion mit Medium kam es in allen Versuchen zu einer Reduktion des im Kreislauf vorhandenen Ammoniak. Diese Veränderung betrug im Mittel  $-136 \pm 79\mu\text{mol}$  ( $-211$  bis  $-4,7\mu\text{mol}$ ).

Auch während der anschließenden Perfusion mit Plasma kam es in allen Versuchen zu einer Reduktion des im Kreislauf vorhandenen Ammoniak. Diese Veränderung betrug im Mittel  $-32 \pm 17\mu\text{mol}$  ( $-62$  bis  $-7,1\mu\text{mol}$ ) (Abb. 21).

#### 3.5.4.2 kryokonservierte Schweinehepatozyten

Bei den Versuchen mit den kryokonservierten Schweineleberzellen kam es in den ersten drei Stunden zu einer Reduktion des sich im Kreislauf befindlichen Ammoniak. Diese Veränderung betrug im Mittel  $-27 \pm 24\text{mg}$  ( $-70$  bis  $-2,1\text{mg}$ ).

Danach blieb die im Kreislauf vorhandene Ammoniak-Menge im Wesentlichen konstant (Abb. 21).

### 3.5.5 Harnstoffproduktion in den Kreislaufversuchen

#### 3.5.5.1 native Schweinhepatozyten

Während der Perfusion mit Medium kam es in allen Versuchen zu einer Zunahme des im Kreislauf vorhandenen Harnstoffs mit einem Maximum bei durchschnittlich 18 Stunden nach Versuchsbeginn. Zu diesem Zeitpunkt waren im Mittel  $11,4 \pm 4\text{mg}$  (1,9 bis 15,8mg) Harnstoff produziert worden.

Während der Perfusion mit Plasma kam es in allen bis auf einen Versuch innerhalb der ersten vier Stunden zu einem leichten Anstieg der sich im Kreislauf befindlichen Harnstoffmenge um  $3,3 \pm 5\text{mg}$  (-6,4 bis 8,6mg) (Abb. 21).

#### 3.5.5.2 kryokonservierte Schweinehepatozyten

In den Versuchen mit den kryokonservierten Schweineleberzellen kam es besonders innerhalb der ersten 3,5 Stunden in allen Versuchen zu einem Abfall der Harnstoffmenge um  $5,8 \pm 3\text{mg}$  (3 bis 11mg). Anschließend blieb die Harnstoffmenge im Wesentlichen konstant (Abb. 21).

### 3.5.6 Sorbitolelimination in den Kreislaufversuchen

Bei Versuchsbeginn und beim Wechsel der Perfusion von Medium auf Plasma bei den Versuchen mit den nativen Schweinehepatozyten wurden 25mg Sorbitol zugegeben.

#### 3.5.6.1 native Schweinehepatozyten

Während der Perfusion mit Medium kam es in allen Versuchen zu einer in den ersten vier Stunden schnelleren Reduktion des im Kreislauf vorhandenen Sorbitols. Dabei wurden in 22 Stunden im Mittel  $16,7 \pm 10\text{mg}$  (1,3 bis 28,3mg) Sorbitol eliminiert.

Während der anschließenden Perfusion mit Plasma kam es in allen Versuchen zu einer weiteren relativ gleichmäßigen Reduktion der Sorbitolmenge. 22 Stun-

den nach Perfusionsbeginn mit Plasma Betrag diese Reduktion im Mittel  $9\pm 9\text{mg}$  (0,2 bis 22,7mg) (Abb. 22).

### 3.5.6.2 **kryokonservierte Schweinehepatozyten**

In einem der Versuche mit den kryokonservierten Schweineleberzellen zeigte sich nach 22 Stunden eine Reduktion des sich im Kreislauf befindlichen Sorbitols um 10,1mg . In den anderen Versuchen zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Sorbitolmenge (Abb. 22).

### 3.5.7 **Galaktoseelimination in den Kreislaufversuchen**

Bei Versuchsbeginn bzw. beim Wechsel von Medium auf Plasma wurden 250mg Galaktose zugegeben.

#### 3.5.7.1 **native Schweinehepatozyten**

Während der Perfusion mit Medium kam es in allen Versuchen besonders zu Beginn zu einer Reduktion der sich im Kreislauf befindlichen Galaktosemenge. Während der Perfusion mit Medium wurden im Mittel  $36,1\pm 17\text{mg}$  (5,4 bis 54,3mg) Galaktose eliminiert.

Während der Perfusion mit Plasma kam es zu einer Reduktion der sich im Kreislauf befindlichen Galaktose um durchschnittlich  $14,6\pm 18\text{mg}$  (1,6 bis 46,3mg) (Abb. 22).

#### 3.5.7.2 **kryokonservierte Schweinehepatozyten**

In allen Versuchen kam es zu einer im Verlauf immer langsamer werdenden Reduktion der im Kreislauf vorhandenen Galaktose-Menge. Während der Versuche wurden im Mittel  $9,6\pm 2\text{mg}$  (5,7 bis 11,9mg) Galaktose eliminiert (Abb. 22).

### 3.5.8 **LDH-Freisetzung in den Kreislaufversuchen**

#### 3.5.8.1 **native Schweinehepatozyten**

Während der Perfusion mit Medium kam es in allen Versuchen zu einer relativ kontinuierlichen LDH-Freisetzung von im Mittel  $33,8\pm 26\text{U}$  (14 bis 126U) LDH.

## Ergebnisse

Während der Perfusion mit Plasma wurden durchschnittlich  $6,1 \pm 4U$  (-0,8 bis 9,6U) LDH freigesetzt (Abb. 22).

### 3.5.8.2 kryokonservierte Schweinehepatozyten

In den Versuchen mit den kryokonservierten Schweineleberzellen kam es besonders innerhalb der ersten 2,5 Stunden zu einem starken LDH-Anstieg. Innerhalb der 24 Stunden Versuchsdauer wurden im Mittel  $84,7 \pm 20U$  (52,4 bis 107,5U) LDH freigesetzt (Abb. 22).

### 3.5.9 Glucose in den Kreislaufversuchen

#### 3.5.9.1 native Schweinehepatozyten

Während der Perfusion mit Medium lag die Glucosekonzentration bei Versuchsbeginn bei im Mittel  $223 \pm 32\text{mg/dl}$  (184 bis 156mg/dl). Im Verlauf kam es in allen Versuchen zu einer Abnahme der Glucosekonzentration um  $47 \pm 41\text{mg/dl}$  (138 bis 18mg/dl) auf  $174 \pm 62\text{mg/dl}$  (40 und 213mg/dl).

Bei Wechsel der Perfusion von Medium auf Plasma betrug die Glucosekonzentration  $77 \pm 12\text{mg/dl}$  (52 bis 89mg/dl), sank im Verlauf um  $17 \pm 27\text{mg/dl}$  (77 bis -7mg/dl) auf  $49 \pm 41\text{mg/dl}$  (0 bis 101mg/dl). Bei den beiden Versuchen mit der höchsten ECOD-Aktivität war die Glucosekonzentration auf 0mg/dl gefallen (Abb. 23).

#### 3.5.9.2 kryokonservierte Schweinehepatozyten

Zu Beginn der Versuche betrug die Glucosekonzentration  $86 \pm 17\text{mg/dl}$  (66 bis 109mg/dl). Im Verlauf kam es zu einem leichten Anstieg der Glucosekonzentration um  $2 \pm 7\text{mg/dl}$  auf  $88 \pm 15\text{mg/dl}$  (72 bis 111mg/dl) (Abb. 23).

# Ergebnisse

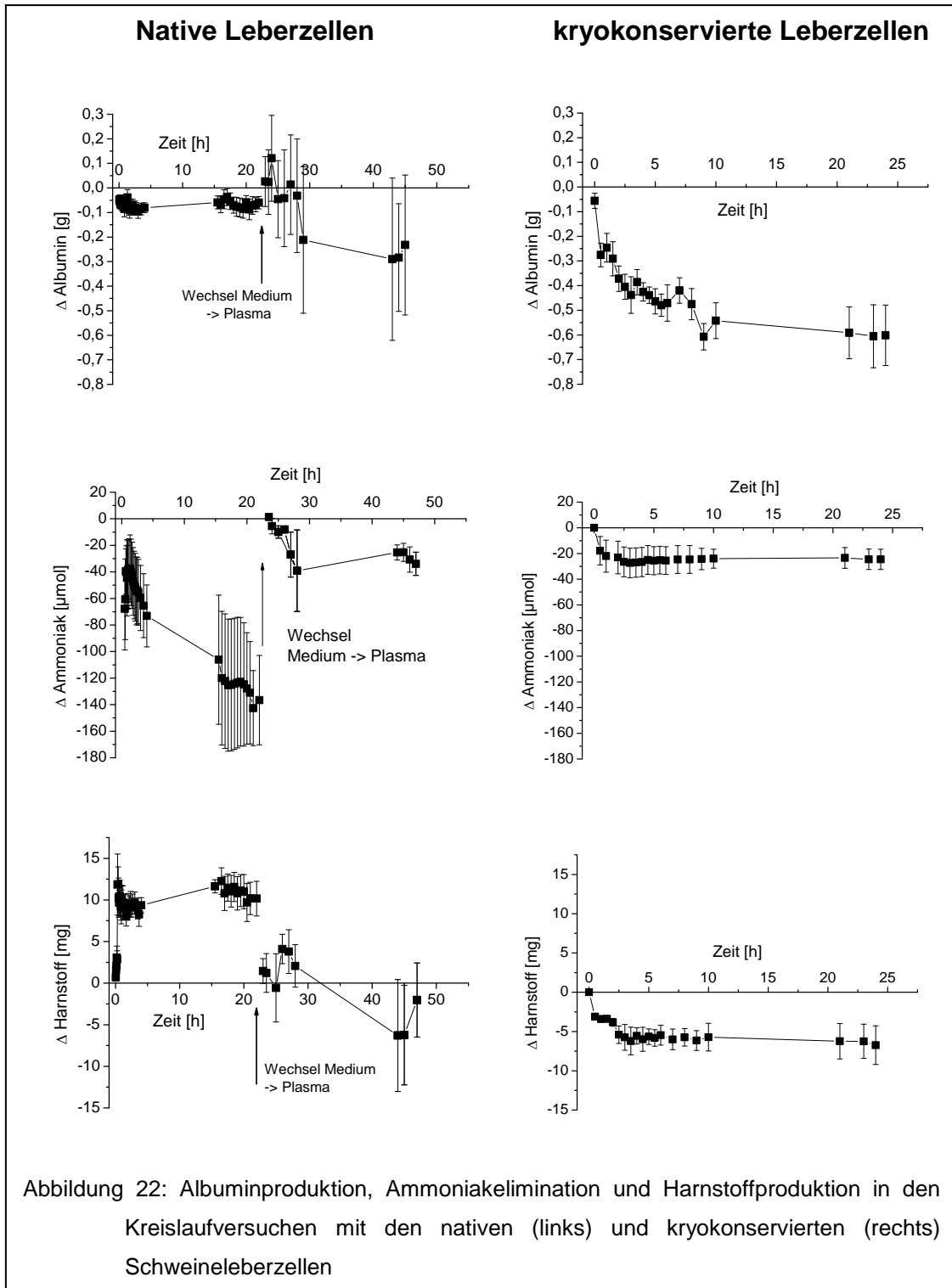
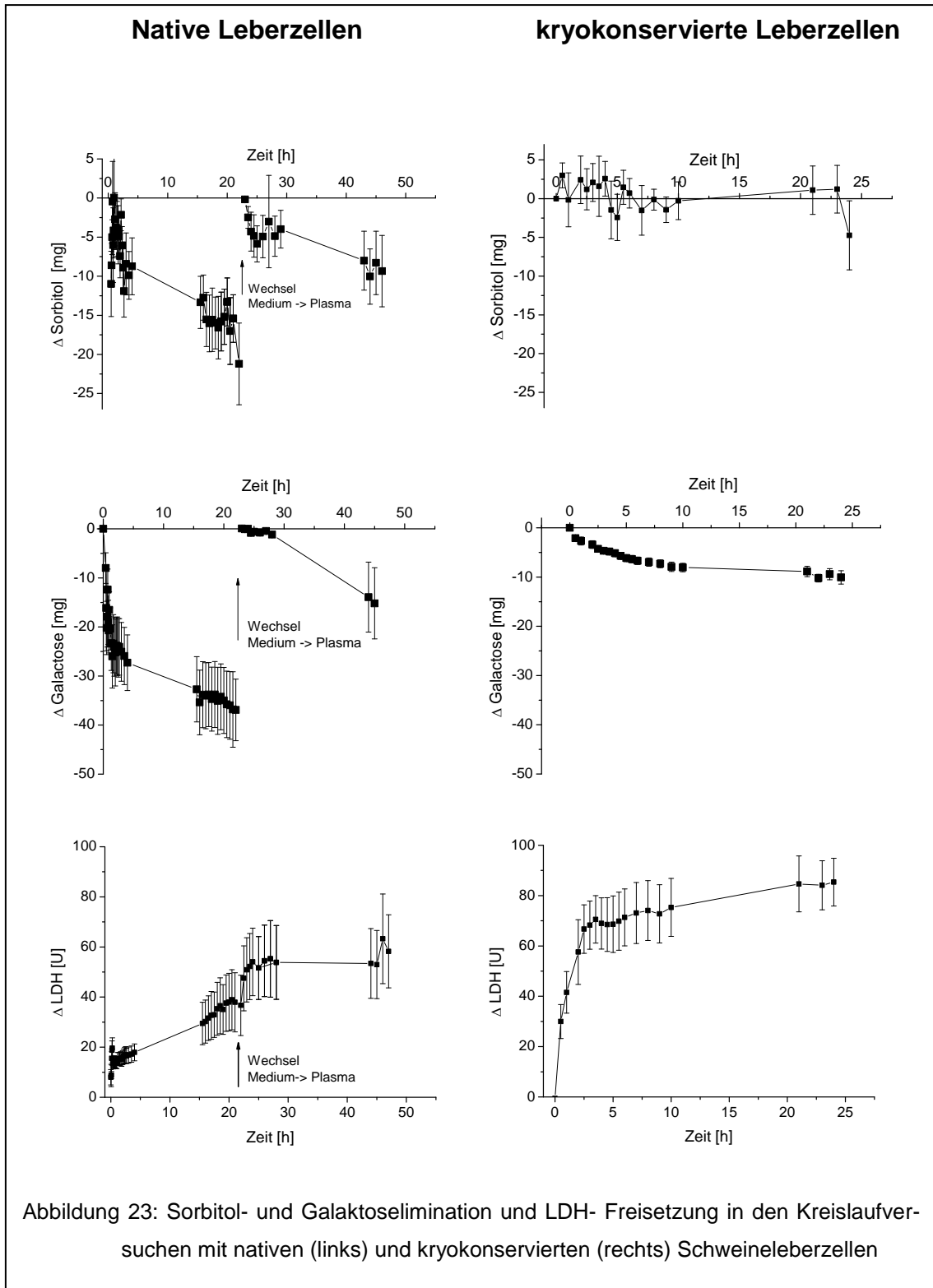
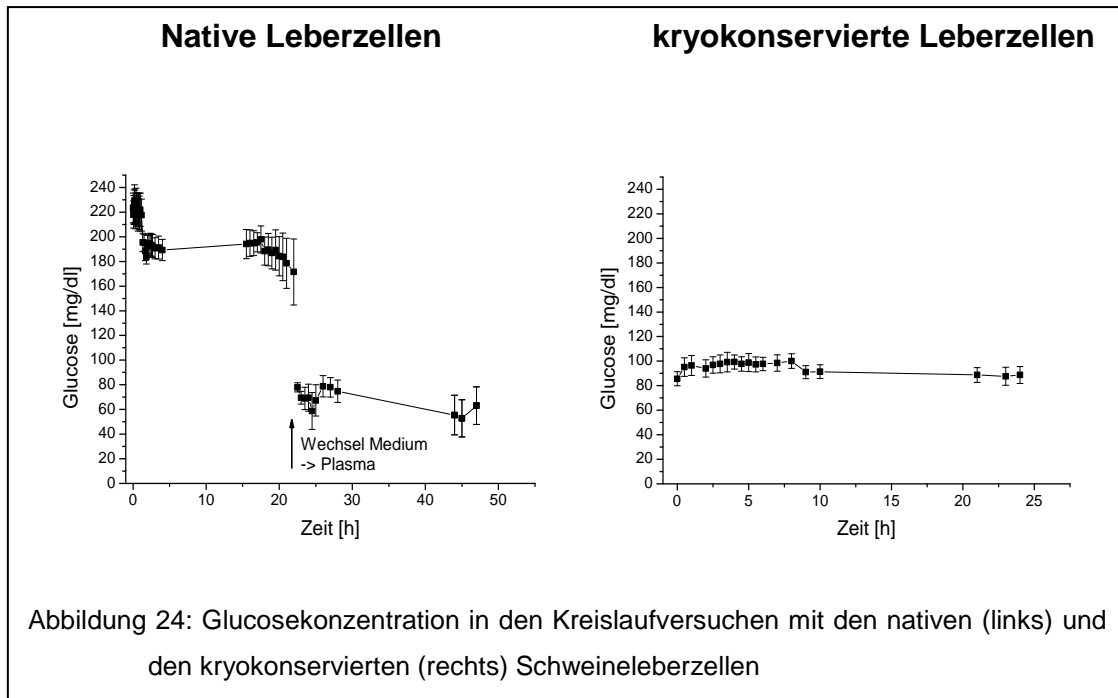


Abbildung 22: Albuminproduktion, Ammoniakelimination und Harnstoffproduktion in den Kreislaufversuchen mit den nativen (links) und kryokonservierten (rechts) Schweineleberzellen

# Ergebnisse



## Ergebnisse



### 3.5.10 Sauerstoffverbrauch in den Kreislaufversuchen

Vor und nach dem Vlies war jeweils eine Sauerstoffsonde in den Kreislauf eingebaut. Durch die in das Vlies eingewebten Kapillaren wurden das Vlies und damit die Hepatozyten mit Sauerstoff versorgt. Sauerstoffzufuhr und Verbrauch fanden somit an der derselben Stelle statt und sind nicht eindeutig voneinander zu trennen. Insbesondere lässt sich keine Aussage über den absoluten Sauerstoffbedarf treffen. Davon ausgehend, dass die Sauerstoffzufuhr konstant war, ließ sich zumindest ein Trend beobachten.

Davon ausgehend, dass der Sauerstoffverlust im Rest des Kreislaufs prozentual konstant war wurde um insbesondere durch Flaschenwechsel aufgetretene Schwankungen der Sauerstoffzufuhr ansatzweise auszugleichen die Differenz aus der dem Vlies nach- mit der dem Vlies vorgeschalteten Messelektrode gebildet.

Je mehr Sauerstoff die Hepatozyten verbrauchen, desto weniger Sauerstoff gelangt in den Kreislauf und desto niedriger sind dementsprechend die von den Elektroden gemessenen Werte und desto niedriger entsprechend auch die graphisch dargestellte Differenz der beiden Elektroden (Abb .25).

## Ergebnisse

Bei den Versuchen mit den nativen Hepatozyten zeigte sich während der Perfusion mit Medium eine kontinuierlich steigende Differenz entsprechend einem initial schnellen, im Verlauf immer langsamer werdendem Rückgang des Sauerstoffverbrauchs. Beim Wechsel der Perfusion von Medium auf Plasma kam es zu einem deutlichen Abfall der Differenz. Während der folgenden Perfusion mit Plasma blieb der Sauerstoffverbrauch qualitativ konstant (Abb. 25).

Bei den Versuchen mit kryokonservierten Hepatozyten, die direkt in den nicht voroxygenierten Kreislauf eingebaut wurden kam es zu Versuchsbeginn mit Beginn der Oxygenierung zu einem schnellen Anstieg der Differenz. Nach Erreichen der Homöostase zeigte sich bis Stunde vier nach Versuchsbeginn eine leichte Zunahme der Differenz entsprechend einem rückläufigen Sauerstoffverbrauch, bis Stunde sieben nach Versuchsbeginn war die Differenz aber wieder auf das Ausgangsniveau rückläufig und blieb dort bis zum Ende auf dem gleichen Niveau konstant (Abb. 25).

Ein wesentlicher Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen der Versuchen mit nativen Hepatozyten in Perfusion mit Medium und den kryokonservierten Hepatozyten bestand nicht (Abb. 25).

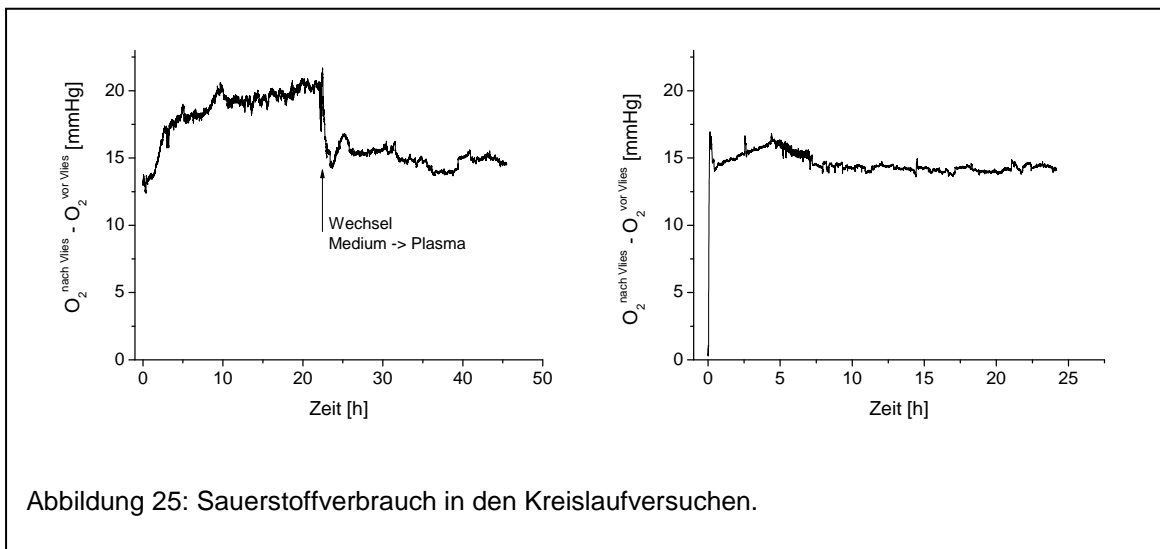


Abbildung 25: Sauerstoffverbrauch in den Kreislaufversuchen.



### 3.5.11 **Perfusionsdruck in den Kreislaufversuchen**

In den Kreislaufversuchen mit den nativen Schweineleberzellen betrug der mittlere Perfusionsdruck 27,9mmHg (15,6 bis 81,8mmHg) und es traten Druckspitzen von im Mittel 143,7mmHg (47 bis 211mmHg) auf.

In den Kreislaufversuchen mit den kryokonservierten Schweineleberzellen betrug der mittlere Perfusionsdruck des Reaktors 30,5mmHg (17,6 bis 55,4mmHg) und es traten Druckspitzen von durchschnittlich 63mmHg (31 bis 102mmHg) auf.

### 3.5.12 **Vergleich der Ergebnisse der Kreislaufversuche**

Die gemessenen Stoffwechselfunktionen waren mit Ausnahme der Glucuronidierungsleistung bei den Versuchen mit nativen Hepatozyten in Perfusion mit Medium durchweg höher als in Perfusion mit Plasma: Die ECOD-Aktivität in den ersten vier Stunden lag um den Faktor 2,2, in den folgenden Zeit um den Faktor 3 höher. Die Glucuronidierungsleistung war um den Faktor 0,2, der Albuminverbrauch war um den Faktor 0,3 niedriger, Ammoniakelimination und Harnstoffproduktion waren um den Faktor 1,5 bzw. 3,5, Sorbitol- und Galaktoseelimination um den Faktor 1,9 bzw. 2,4 höher. Zudem reduzierte sich die Glucosekonzentration während der Perfusion mit Medium 1,9 Mal stärker als während der Perfusion mit Plasma. Außerdem zeigte sich während der Perfusion mit Medium eine 6,25 fach höher LDH-Freisetzung als während der Perfusion mit Plasma (Tab. 2).

Auch im Vergleich mit den kryokonservierten Hepatozyten zeigten die nativen Leberzellen in allen getesteten Funktionen eine bessere Leistung:

Die nativen Hepatozyten in Perfusion mit Medium zeigten innerhalb der ersten vier Stunden eine 7,7fach, in der restlichen Versuchszeit eine 33,3fach höhere ECOD-Aktivität. Ebenso zeigten sie eine 100fach erhöhte Glucuronidierungsleistung, einen um den Faktor 0,1 niedrigeren Albuminverbrauch, eine 5,9fach höhere Ammoniakelimination, eine 20fach höhere Sorbitol- und eine 3,8fach höhere Galaktoseelimination, eine um den Fak-

## Ergebnisse

tor 0,44 niedrigere LDH-Freisetzung und eine 20fach höhere Glucosereduktion. Da es in den Versuchen mit den nativen Leberzellen zu einem Anstieg der Harnstoffkonzentration kam, sank diese in den Versuchen mit den kryokonservierten Hepatozyten. Ein aussagekräftiger Quotient lässt sich daher nicht bilden (Tab. 2).

Letztlich zeigten auch die nativen Leberzellen in die an die Perfusion mit Medium angeschlossene Perfusion mit Plasma eine durchweg bessere Stoffwechsellistung als die kryokonservierten Hepatozyten:

Die ECOD-Aktivität in den ersten vier Stunden war 3,6fach, in der folgenden Versuchszeit 11,1fach höher, die Glucuronidierungsleistung war 20fach höher, der Albuminverbrauch um den Faktor 0,4 niedriger, die Ammoniakelimination um den Faktor 1,3, die Sorbitol- und Galaktoseelimination um den Faktor 10 bzw. 1,6 höher. Albumin wurde um den Faktor 0,4 weniger verbraucht, die Glucosereduktion war 11,1fach höher. Harnstoff wurde in beiden Versuchen verbraucht, von nativen Hepatozyten in Perfusion mit Plasma aber um den Faktor 1,76 weniger als von den kryokonservierten Leberzellen (Tab. 2).

	ECOD Aktivität der ersten vier Stunden	ECOD Aktivität nach 4h bis Ende	Glucuronidierungsleistung	Verbrauchtes Albumin	eliminiertes Ammoniak	produzierter Harnstoff	eliminiertes Sorbitol	eliminierte Galaktose	freigesetzte LDH	Glucosereduktion
Schwein <sub>nativ</sub> Medium / Schwein <sub>nativ</sub> Plasma	2,2	3	0,2	0,3	1,5	3,5	1,9	2,4	6,25	1,9
Schwein <sub>nativ</sub> Medium / Schwein <sub>cryo</sub>	7,7	33,3	100	0,1	5,9	*	20	3,8	0,44	20
Schwein <sub>nativ</sub> Plasma / Schwein <sub>cryo</sub>	3,6	11,1	20	0,4	1,3	0,6**	10	1,6	0,07	11,1

Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse der Kreislaufversuche ( \* Ergebnisse mit unterschiedlichen Vorzeichen, \*\* in beiden Versuchen negative Ergebnisse)

### 3.5.13 Korrelation der in den Kreislaufversuchen gemessenen Parameter

Die in den Kreislaufversuchen gemessenen Parameter wurden miteinander korreliert, die Ergebnisse sind in den Tabellen 3-5 dargestellt.

Bei den Versuchen mit nativen Hepatozyten in Perfusion mit Medium zeigten die Versuche mit einer hohen ECOD-Aktivität eine niedrige Galaktoseelimination und eine überdurchschnittliche LDH-Freisetzung, die Versuche mit einer hohen Glucuronidierungsleistung ebenfalls eine niedrige Galaktoseelimination, die Versuche mit einer hohen Albuminproduktion eine hohe Harnstoffproduktion, die Versuche mit einer hohen Ammoniakelimination eine hohe Sorbitolelimination, die Versuche mit einer hohen Galactoseelimination eine niedrige LDH-Freisetzung (Tab. 3).

ECOD 4-22h	Glucuronidierungsleistung	produziertes Albumin	eliminiertes Ammoniak	produzierter Harnstoff	eliminiertes Sorbitol	eliminierte Galaktose	Glucosereduktion	Freigesetzte LDH [U]	
0,9	0,5	0	-0,1	0	-0,3	-0,9	0,3	0,8	ECOD <4h
	0,7	0,3	-0,2	0,3	-0,4	-0,9	0,3	0,7	ECOD 4-22h
		0,4	-0,6	0,1	-0,6	-0,7	0	0,3	Glucuronidierungsleistung
			0,1	0,9	0	-0,2	0,4	0,1	produziertes Albumin
				0,3	0,9	0,3	0	0,3	eliminiertes Ammoniak
					0,2	-0,1	0,5	0	produzierter Harnstoff
						0,5	0,1	0,2	eliminiertes Sorbitol
							-0,1	-0,7	eliminierte Galactose
								0,1	Glucosereduktion

Tabelle 3: Korrelationskoeffizienten nach Spearman der in den Kreislaufversuchen mit den nativen Schweineleberzellen in Perfusion mit Medium gemessenen Parameter (Korrelationskoeffizienten > |0,7| sind grau hinterlegt)

## Ergebnisse

Bei den Versuchen mit nativen Hepatozyten in die an die Perfusiom mit Medium angeschlossene Perfusion mit Plasma zeigten die Zellen mit einer hohen ECOD-Anfangsaktivität eine niedrige Albuminproduktion und eine niedrige LDH-Freisetzung, die Versuche mit einer hohen ECOD-Aktivität ab vier Stunden nach Wechsel auf Plasma bis Versuchsende zeigten eine hohe Glucuronidierungsleistung und eine hohe Sorbitolelimination. Versuche mit einer hohen Albuminproduktion zeigten auch eine hohe Harnstoffproduktion, Versuche mit einer hohen Galactoseelmination zeigten eine hohe Glucosereduktion (Tab. 4).

ECOD 28h bis Ende	Glucuronidierungsleistung	produziertes Albumin	eliminierter Ammoniak	produzierter Harnstoff	elimiertes Sorbitol	eliminierte Galactose	freigesetzte LDH	Glucosereduktion	
0,1	0,1	-0,7	0,3	-0,6	0,0	0,7	-0,7	0,5	ECOD-Aktivität 23-27h
	0,7	-0,3	0,0	-0,3	0,7	0,4	0,0	0,3	ECOD-Aktivität 28h bis Ende
		0,0	0,1	0,5	0,6	0,2	-0,4	0,1	Glucuronidierungsleistung
			-0,1	0,8	0,2	-0,5	0,1	-0,4	produziertes Albumin
				0,1	0,3	0,5	-0,4	0,3	eliminierter Ammoniak
					0,1	-0,2	-0,3	-0,1	produzierter Harnstoff
						0,4	-0,3	0,2	elimiertes Sorbitol
							-0,6	0,9	eliminierte Galactose
								-0,5	freigesetzte LDH

Tabelle 4: Korrelationskoeffizienten nach Spearman der in den Kreislaufversuchen mit den nativen Schweineleberzellen an die Perfusion mit Medium angeschlossene Perfusion mit Plasma gemessenen Parameter (Korrelationskoeffizienten > |0,7| sind grau hinterlegt)

## Ergebnisse

Bei den Versuche mit den kryokonsevierten Hepatozyten zeigten die Versuch mit einer hohen ECOD-Aktivität eine hohe Galaktoseelimination und insbesondere die Versuche mit einer hohen ECOD-Aktivität über vier Stunden hinaus eine niedrige Sorbitolelimination. Versuche mit einer hohen Glucuronidierungsleistung zeigten eine hohe Albuminproduktion, eine niedrige Harnstoffproduktion, eine hohe Sorbitolelimination und eine hohe LDH-Freisetzung, Versuche mit einer hohen Albuminproduktion zeigten eine niedrige Harnstoffproduktion und eine hohe LDH-Freisetzung, Versuche mit einer hohen Sorbitolelimination zeigten eine niedrige Galactoseelimination und eine hohe LDH-Freisetzung, Versuche mit einer hohen Glucosereduktion zeigten eine niedrige Reduktion der Glucosekonzentration (Tab. 5).

ECOD >4h	Glucuronidierungsleistung	produziertes Albumin	eliminierter Ammoniak	produzierter Harnstoff	eliminiertes Sorbitol	eliminierte Galactose	freigesetzte LDH	Glucose-reduktion	
0,8	0,2	0,1	0,3	-0,1	-0,5	0,8	-0,3	0,2	ECOD <4h
	-0,2	-0,1	0,3	0,4	-0,7	1	-0,3	-0,2	ECOD >4h
		0,9	0,3	-0,9	0,7	-0,2	0,7	-0,2	Glucuronidierungsleistung
			0,1	-0,8	0,6	-0,1	0,9	-0,5	produziertes Albumin
				0,1	0,3	0,3	0	-0,3	eliminierter Ammoniak
					-0,6	0,4	-0,6	-0,1	produzierter Harnstoff
						-0,7	0,7	-0,3	eliminiertes Sorbitol
							-0,3	-0,2	eliminierte Galactose
								-0,7	freigesetzte LDH

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten nach Spearman der in den Kreislaufversuchen mit den kryokonservierten Schweineleberzellen gemessenen Parameter (Korrelationskoeffizienten > |0,7| sind grau hinterlegt)

## 4 Diskussion

Auf dem Weg zum zellbasierten Leberersatzverfahren sollte in dieser Arbeit in erster Linie untersucht werden, wie weit native und kryokonservierte Leberzellen im konkret getesteten System in der Lage sind hepatozytenspezifische Funktionen mit besonderem Schwerpunkt auf dem Xenometabolismus auszubilden bzw. zu erhalten.

Nach der Etablierung der EROD- und ECOD-Aktivitätsbestimmung wurde im ersten Schritt unter den gut etablierten Bedingungen der Zellkultur [2,17,78] untersucht, welche Aktivität Leberzellen *in vitro* zu leisten im Stande sind. Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob die Leberzellen unter den Kulturbedingungen im Reaktor eine ähnliche Leistung erreichen können. Zuletzt wurde untersucht, welchen Einfluss die Kryokonservierung auf die Funktionen der Leberzellen unter den Bedingungen der Zellkultur und im Reaktor hat.

### 4.1 Methodenevaluierung der EROD- und ECOD Aktivitätsbestimmung

Dass die Methode das misst, was sie zu messen vorgibt, nämlich die CYP450-abhängige Umsetzung von Ethoxyresorufin und Ethoxycoumarin, sowie die Eignung der Ethoxyresorufin- und Ethoxycoumarin-O-Deethylase (EROD und ECOD) als Marker für die CYP-450-Aktivität sind in der Literatur hinlänglich beschrieben [6,29,66,97].

Somit wurde bei der Etablierung der EROD- und ECOD-Aktivitätsbestimmung ein besonderes Augenmerk auf wichtige technischen Parameter gelegt:

Es konnte gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den Fluoreszenz und der Konzentration von Resorufin bzw. 7-Hydroxycoumarin (7-HC) besteht. Dadurch wird die Bestimmung der Resorufin bzw. 7-HC Konzentration einer Probe mittels einer Eichreihe möglich.

Die mittels jeweils 648 Einzelmessungen untersuchten Präzisionen liegen für die Bestimmung einer 7-HC-Konzentration mit 9% und für die Bestimmung einer Resorufin-Konzentration mit 5% unter dem für eine gute Methode etablierten Grenzwert von 10%.

Insbesondere die Eichreihen wurden über einen Zeitraum von mehreren Monaten aufbewahrt. Es konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Lagerung von der gemessenen Fluoreszenz unabhängig ist.

Für die Bestimmung der EROD- und ECOD-Aktivität konnte gezeigt werden, dass es während der während der genutzten Inkubationszeit von 60 Minuten zu einem linearen Anstieg der Produktkonzentration kommt. Dies bedeutet, dass das Enzym während der Inkubationszeit konstant mit Substrat gesättigt ist und die gemessene Aktivität somit von der Substratkonzentration unabhängig ist.

Vor der eigentlichen Fluoreszenzmessung stand ein unterschiedlich langer Inkubationsschritt in einem Glycinpuffer bei 37°C. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Bestimmung einer 7-HC-Konzentration die gemessene Fluoreszenz von der Länge dieser Inkubationsdauer unabhängig ist. Für die Bestimmung einer Resorufin-Konzentration zeigte sich eine mit zunehmender Inkubationsdauer steigende Fluoreszenz.

### **4.2 Monolayerkultur**

Da es nach wie vor große Schwierigkeiten bereitet, Leberzellen in vitro zu vermehren, ist man auf Zellen aus der Direktpräparation angewiesen. Hier sind die Methoden inzwischen ziemlich ausgereift: Sowohl in unseren Versuchen, als auch in denen anderer Arbeitsgruppen kann die gesamte Leber verarbeitet werden. Anschließend steht reproduzierbar fast die gesamte Zellmasse mit einer sehr guten Vitalität von meistens mehr als 95% zur Verfügung [26,38,87].

Monolayerkulturen sind ein etabliertes Modell zur Untersuchung hepatozytenspezifischer Funktionen, insbesondere bei der Untersuchung des Metabolismus von Xenobiotica [2,35]. Als Marker der Funktion des im Phase-I-Metabolismus dieser Stoffe wichtigen CYP-450 Enzymsystems sind neben anderen Methoden die Bestimmung der EROD- und ECOD-Aktivität etabliert [6,97]

Für Rattenleberzellen wurde unter Kulturbedingungen von mehreren Autoren eine zu Kulturbeginn schnelle und im Verlauf langsamere Abnahme leberzell-spezifischer Funktionen beschrieben. Auch für Schweineleberzellen wurde gleiches vereinzelt berichtet [35,60].

## Diskussion

Diese Ergebnisse konnten im Wesentlichen in dieser Arbeit bestätigt werden:

Insbesondere passend fand sich die fast kontinuierliche Abnahme der ECOD-Aktivität.

Auch die EROD- Aktivität nahm mit zunehmender Kulturdauer tendenziell ab. Interessanterweise kam es jedoch zu Aktivitätsschwankungen von ca. 50% mit systematisch abends höheren Aktivitäten als morgens. Einziger tageszeitabhängiger Faktor während der Zellkultur war der Mediumwechsel morgens, der möglicherweise über eine Induktion des CYP 450 Enzymsystems Ursache dieser Schwankungen sein kann [50].

Andere Arbeitsgruppen erzielten meist etwas niedrigere Aktivitäten, qualitativ jedoch vergleichbare Ergebnisse:

Behnia et al. bestimmten die ECOD-Aktivität in primären Schweineleberzellkulturen [2]. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Versuchen befand sich EGF im Medium, betrug die EC-Konzentration im Medium  $4\mu\text{M}$ , die Inkubationszeit 4 Stunden, wurden die Zellen vor der Messung mittels Ultraschall zerkleinert und verblieben in den zu messenden Proben. Sie fanden eine nicht-induzierte ECOD-Aktivität von ca.  $160\mu\text{U}/10^6$  Zellen am Tag der Präparation, die sich nach vier Tagen auf  $63\mu\text{U}/10^6$  Zellen reduziert hatte.

Korrigiert man die längere Inkubationszeit (einen lineare Kinetik vorausgesetzt) und die höhere Zellzahl, so betrug die ECOD-Aktivität  $13,3\mu\text{U}$  am Tag der Präparation und  $5,3\mu\text{U}$  vier Tage nach Präparation und liegen im selben Bereich wie die Aktivitäten in unseren Untersuchungen ( $10,3\mu\text{U}$  am Tag der Präparation und  $5,5\mu\text{U}$  vier Tage nach Präparation).

Donato et al. fanden in einer 1999 veröffentlichten Arbeit mit fast gleichem Versuchsaufbau wie bei den in dieser Arbeit gewonnenen Daten eine ECOD- Aktivität von  $29,1\text{mU} /\text{g}$  Protein bei frisch präparierten Rattenhepatozyten und  $79,2\text{mU} /\text{g}$  Protein bei frisch präparierten Schweineleberzellen jeweils 24 Stunden nach Präparation [17]. Die in dieser Arbeit gemessenen Aktivitäten liegen mit  $109\text{mU} /\text{g}$  Protein sowohl für Ratten- wie auch für Schweinehepatozyten am entsprechenden Zeitpunkt deutlich höher.



## Diskussion

Für die EROD beschrieben Donato et al eine Aktivität von 6,03mU /g Protein bei frisch präparierten Ratten- und von 1,94mU /g Protein bei frisch präparierten Schweineleberzellen 24 Stunden nach Präparation. Die Aktivitäten unserer Kulturen lagen mit 18,1 bzw. 19,4mU /g Protein ebenfalls deutlich höher.

Bader et al. beschrieben 1997 in Sandwichkulturen mit Rattenleberzellen eine über die ersten drei Tage konstante EROD Aktivität von umgerechnet ca.  $12,8\mu\text{U}/3,2 \cdot 10^5$  Zellen, wobei sie mit der HPLC eine genauere Methode zur Bestimmung der konjugierten Anteile verwendeten [42]. Trotzdem sind die in unserer Arbeit gefundenen Aktivitäten direkt nach Präparation mit  $14,7\mu\text{U}/3,2 \cdot 10^5$  Zellen sogar etwas größer, fallen aber nach drei Tagen deutlich auf  $6,7\mu\text{U}/3,2 \cdot 10^5$  Zellen ab, was die stabileren Kulturbedingungen der Sandwichkultur, in der auch über Wochen eine stabile leberzellspezifische metabolische Aktivität aufrecht erhalten werden kann [48], unterstreicht.

In der gleichen Studie wurde auch die EROD-Aktivität untersucht. Diese sank von  $2,24\mu\text{U}/3,2 \cdot 10^5$  Zellen direkt nach Präparation auf  $1,76\mu\text{U}/3,2 \cdot 10^5$  Zellen drei Tage später und sind damit etwas höher als die in dieser Arbeit gefundenen Aktivitäten:  $1,82\mu\text{U}/3,2 \cdot 10^5$  Zellen direkt nach Präparation und  $1,12\mu\text{U}/3,2 \cdot 10^5$  Zellen drei Tage später.

Zur Untersuchung des Phase-II-Metabolismus wurde eine indirekte und daher recht fehleranfällige Methode angewendet. Dies spiegelt sich wieder in einer großen Streubreite der Messwerte. Die Ergebnisse sind daher nur eingeschränkt zu verwenden.

Anders als bei den Reaktionen des Phase I Metabolismus zeigte sich eine im Verlauf weitgehend konstante Funktion der exemplarisch getesteten UGT (UDP-Glucuronidyltransferase).

Auch Langsch et al konnten eine nahezu konstante Aktivität mehrere Enzyme des Phase II Metabolismus sogar über 3 Wochen zeigen [48].

*Zusammenfassend* lässt sich sagen: Mit den aktuellen Methoden der Leberzellkultur besteht die Möglichkeit, hepatozytenspezifische Funktionen auch

über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten. Im Verlauf kommt es jedoch zunehmend zu einem Verlust vor allem der Funktionen des Phase-I-Metabolismus während die Funktionen des Phase-II-Metabolismus wahrscheinlich auch über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden können.

### 4.3 Leberzellreaktor

Dass Leberzellen in der Lage sind, in vitro hepatozytenspezifische Funktionen wahrzunehmen, konnte somit in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit zahlreichen Vorarbeiten gezeigt werden. Auf dem Weg zum Leberersatzverfahren müssen im nächsten Schritt in einem Reaktor, der dann mit Patientenkreislauf gekoppelt wird, ähnliche oder möglichst bessere Bedingungen geschaffen werden.

Der im Rahmen dieser Arbeit getestete Leberzellreaktor wurde 2002 von Linti et al. beschrieben. Besondere Merkmale, die den Reaktor auch wesentlich von den von anderen Arbeitsgruppen getesteten Reaktoren unterscheidet ist in erster Linie die zusätzliche Sauerstoffversorgung [53].

Herrschen in diesem Reaktor also Bedingungen, unter denen die Leberzellen sich wohlfühlen und spezifische Funktionen wahrnehmen? Um diese Frage zu beantworten wurden nicht wie in den Versuchen der Zellkultur nur der Stoffwechselweg des CYP-450 Enzymsystems untersucht sondern auch zusätzliche Parameter aus dem Bereich der Synthesefunktionen (Albumin, Harnstoffzyklus), Kohlenhydratstoffwechsel (Glucose, Sorbitol, Galactose) sowie Marker für Zelluntergang (LDH) bestimmt. Das CYP-450 Enzymsystem betreffend wurde wegen der im Rahmen der Zellkulturversuche festgestellten Hemmung der ECOD durch ER sowie der Hemmung der EROD durch EC lediglich der Bestimmung der ECOD-Aktivität durchgeführt, da diese eine größere Zahl der CYP 450 Enzyme repräsentiert [17] und valider als die EROD-Messung zu sein scheint, bei welcher die Inkubationszeit der Proben vor der Messung das Ergebnis beeinflussen kann (Kap. 3.1.5) und unterschiedliche Ergebnisse ver-

schiedener Labors für die gleiche Probe zu einer schlechteren Vergleichbarkeit der Ergebnisse führt [79].

### Xenometabolismus

Betrachtet man die Aktivität der ECOD als Marker für das CYP-450 Enzymsystem so fällt eine deutliche Zweiteilung der Versuche auf. In knapp der Hälfte der Versuche zeigte sich eine hohe Aktivität, die mit ca.  $50\mu\text{U}/10^5$  Zellen während der ersten vier Stunden mehr als zehnmals so hoch wie in den Zellkulturversuchen war (ca.  $3,2\mu\text{U}/10^5$  Zellen). In den restlichen Versuchen zeigte sich allerdings im gleichen Zeitraum mit  $0,4\mu\text{U}/10^5$  Zellen eine mehr als hundertfach niedrigere Aktivität, also auch bei weitem niedriger als in den Zellkulturversuchen. Das gibt einen ersten Hinweis darauf, dass Hepatozyten sich im getesteten Leberzellreaktor grundsätzlich wohlfühlen können. Dies aber möglicherweise nicht immer tun.

Einzig Bader et al testeten die ECOD-Aktivität in den von ihnen entwickelten Sandwichkulturen, die zum Gebrauch in einem Leberersatzverfahren gedacht sind. Sie fanden mit  $4\mu\text{U}/10^5$  Zellen eine mehr als zehnfach niedrigere Aktivität als die, die in den optimalen Versuchen dieser Arbeit gemessen wurden [42].

Andere Arbeitsgruppen testeten jedoch die CYP-450-Aktivität anhand von Lidocain-Metaboliten. Dieser Test ist nicht mehr erhältlich. Aktivitätsunterschiede zwischen einzelnen Versuchen wie in dieser Arbeit werden in der Literatur nicht berichtet [9,28,40,99].

Um zu klären, ob in den Versuchen mit niedriger ECOD-Aktivität die Zellen möglicherweise zu Grunde gegangen waren wurde als Marker für Zelluntergang die LDH gemessen, die beim Zusammenbruch der Zellmembran aus dem Zellinneren freigesetzt wird. Ein Zusammenhang zwischen hoher LDH-Freisetzung und niedriger ECOD Aktivität fand sich nicht. Im Gegenteil fand sich mit einem Korrelationskoeffizient von 0,8 nach Spearman eher eine Korrelation zwischen hoher ECOD-Aktivität und hoher LDH-Freisetzung. Da die LDH Freisetzung sich zwischen den einzelnen Versuchen nicht wesentlich unterschied dürfte diese Korrelation am ehesten Zufall sein. Allerdings wurden während aller Versuche kontinuierlich LDH freigesetzt. Erst später während der

## Diskussion

Perfusion mit Plasma nach 22,5 stagnierte die LDH Freisetzung. Die Leberzellen scheinen also in den ersten ca. 24 Stunden im Leberzellreaktor einen Anpassungsprozess mit Verlusten zu durchlaufen.

Auch der Sauerstoffverbrauch der Versuche mit den hohen ECOD-Aktivitäten unterschied sich nicht von dem der Versuche mit den niedrigen ECOD-Aktivitäten, was als weiteres Argument gegen die These, die Leberzellen in den Versuchen mit der niedrigen ECOD-Aktivität seien in ihrer Vitalität eingeschränkt, zu werten ist.

### Synthesefunktionen

Albumin wurde während der meisten Versuche nicht produziert sondern mit einer Rate von durchschnittlich ca.  $400\mu\text{g}/(\text{min} \times 10^7 \text{ Zellen})$  verbraucht. Angesichts der stetigen LDH Freisetzung ist davon auszugehen, dass die Ansiedelung im Leberzellreaktor für die Hepatozyten Stress bedeutet und sie sich in einer katabolen Stoffwechsellage befinden, in der Proteine abgebaut werden. Eine Korrelation zwischen niedriger ECOD-Aktivität und hohem Albuminverbrauch bestand nicht.

Andere Arbeitsgruppen fanden eine Albuminproduktion zwischen 5,3 bis  $14\mu\text{g}/(\text{h} \times 10^7 \text{ Zellen})$  [9,14,28,40].

Ein funktionierender Harnstoffzyklus mit der Elimination von Ammoniak und der Synthese von Harnstoff wurde in allen Versuchen gefunden. Diese war mit  $79\mu\text{g}/(\text{h} \times 10^7 \text{ Zellen})$  höher als in den Leberzellreaktoren anderer Arbeitsgruppen, welche Syntheseraten zwischen 17 und  $60\mu\text{g}/(\text{h} \times 10^7 \text{ Zellen})$  erreichten [26,28,40]. Die erwartete Korrelation zwischen Ammoniakelimination und Harnstoffproduktion zeigt sich mit einem Korrelationskoeffizient von 0,3 allerdings nicht. Vielmehr wurde in den Versuchen mit hohem Albuminverbrauch viel Harnstoff gebildet (Korrelationskoeffizient 0,9), so dass die vergleichsweise hohe Harnstoffproduktion zwar einerseits einen funktionierenden Harnstoffzyklus, auf der anderen Seite aber auch die katabole Stoffwechsellage der Hepatozyten im Leberzellreaktor widerspiegelt.

Galactose und Sorbitol werden in der Leber in Glucose umgewandelt und somit aus dem Plasma entfernt. Beides konnte in allen Versuchen zuverlässig repro-

duziert werden. Für die Elimination von Sorbitol gibt es keine Vergleichsdaten in der Literatur. Iwata et al fanden in einem Leberzellreaktor ohne eigene Sauerstoffversorgung eine Galactoseeliminationsrate von  $78\mu\text{g}/(\text{h} \times 10^7 \text{ Zellen})$  [38]. In dem in dieser Arbeit getesteten System war die Elimination mit  $201\mu\text{g}/(\text{h} \times 10^7 \text{ Zellen})$  fast drei Mal so hoch.

*Zusammenfassend* lässt sich sagen, dass im Leberzellreaktor unter den getesteten Bedingungen eine katabole Stoffwechsellage zu herrschen scheint. Hepatozytenspezifische Funktionen wie der Harnstoffzyklus und der Metabolismus von Galactose und Sorbitol sind im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die mit Leberzellreaktoren ohne eigene Sauerstoffversorgung arbeiten besser erhalten. Für das CYP-450 Enzymsystem trifft dies für die Versuche mit den hohen Aktivitäten ebenfalls zu. Hier werden auch wesentlich höhere Aktivitäten als in den Monolayerkulturen erreicht. Warum aber in mehr als der Hälfte der Versuche eine mehr als zehnfach niedrigere Aktivität gemessen wurde, bleibt unklar. Nachdem die anderen getesteten Funktionen davon unbeeindruckt teils hohe Aktivitäten zeigten scheint ein Vitalitätsproblem auszuschließen. Ein wesentliche Rolle spielen sehr wahrscheinlich unterschiedliche Induktionszustände des CYP-450 Enzymsystems [67].

### Stabilität der Zellkultur

Im Anschluss an die Perfusion mit Medium folgte nach 22,5 Stunden die Perfusion mit Plasma, so wie dies am Patient nach Plasmaseparation vor dem Reaktor auch statt finden würde. Während des Betriebs mit Plasma traten keine Komplikationen auf, so dass dies technisch möglich scheint.

Die gemessenen Funktionen gingen insgesamt deutlich zurück. So verringerte sich die ECOD-Aktivität um den Faktor 2,2, die Harnstoffproduktion um den Faktor 3,4, der Albuminverbrauch steigerte sich um den Faktor 2,6. Die dann erzielten Werte liegen in etwa im Bereich der oben zitierten Werte anderer Arbeitsgruppen oder leicht darunter. Das getestete System hat zu diesem Zeitpunkt seinen funktionellen Vorsprung vor anderen Systemen verloren, welche zum Teil fast konstante leberzellspezifische Funktionen über bis zu drei Wochen zeigen konnten [26,40]. Zwei Faktoren spielen hier wahrscheinlich eine

wesentliche Rolle. Zum einen schafft es nicht jede Zelle, sich dauerhaft im Reaktor anzusiedeln, so dass es passend zur steigenden LDH zu einem Verlust an Zellmasse kommt. Zweitens verlieren die Hepatozyten aber auch langsam ihre spezifischen Funktionen [21].

### **4.4 Kryokonservierung von Schweinehepatozyten**

Ein Leberersatzverfahren muss im Ernstfall schnell Einsatzbereit sein. Da man beim Betrieb des getesteten Leberzellreaktors auf humane Zellen angewiesen ist (Kap. 1.2) wird eine Methode der Konservierung der Zellen benötigt. Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, wie stark die leberzellspezifischen Funktionen, insbesondere das CYP-450 Enzymsystem, Funktionseinbußen durch die Kryokonservierung erleiden.

Im ersten Schritt wurde dies unter den Bedingungen der Zellkultur untersucht.

Nach Auftauen und Percoll-Zentrifugation zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [35,94] ein Zellverlust von ca. 50%. Betrachtet man weiterhin die Ergebnisse der Proteinbestimmungen aus den Zellkulturversuchen, so fällt auf, dass der Proteingehalt der kryokonservierten Schweineleberzellkulturen um knapp 50% niedriger ist als der Proteingehalt der nativen Schweineleberzellkulturen. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: (a) entweder die kryokonservierten Leberzellen exprimieren weniger Protein als die nativen, oder (b) es sind weniger Zellen in der Kultur.

In einer Arbeit von Diener et al. von 1993 zeigten kryokonservierte Rattenleberzellen einen um 10% niedrigeren Proteingehalt. Nach Percoll-Zentrifugation lag dieser aber bei gleicher Zellzahl sogar 20% über dem von frisch isolierten Zellen [16]. Daher scheint ein niedrigerer Proteingehalt kryokonservierter Leberzellen nicht die Ursache zu sein. Andererseits ist bekannt, dass Leberzellen durch die Kryokonservierung ihre Fähigkeiten an Oberflächen zu haften teilweise verlieren [94,96] und dann beim Spülen und Medienwechsel der Zellkulturen heruntergespült werden. Von den 50% Leberzellen, die die Kryokonservierung überstanden haben, haben also noch einmal die Hälfte die Anheftungsfähigkeit verloren und stünden dann auch in einem Leberersatzver-

fahren nicht zur Verfügung. Die effektive Ausbeute betrug somit ca. 25% und entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [57,94].

### *Xenometabolismus kryokonservierter Leberzellen in der Monolayerkultur*

Um die Aktivitäten der kryokonservierten Hepatozyten trotzdem mit denen der nativen Leberzellen vergleichen zu können wurden die Aktivitäten auf das in der Kultur vorhandene Protein bezogen.

Hier zeigt sich ein Rückgang der ECOD-Aktivität um 12% sowie der EROD-Aktivität um 21%. Das bedeutet, dass man durchaus eine Funktionseinbuße durch die Kryokonservierung in Kauf nehmen muss, diese aber einem tolerablen Rahmen liegt und somit die Kryokonservierung prinzipiell für die Bereithaltung von Hepatozyten zur Verwendung in einem Leberersatzverfahren geeignet ist.

Praxistauglich ist der Einsatz derartig kryokonservierter Hepatozyten allerdings nicht. Zum einen ist bereits das Aufteilen auf Einzelportionen von 1ml Zellsuspension beim Einfrieren sehr arbeitsaufwändig. Die entscheidenden Nachteile liegen aber im Auftauvorgang. Dieser gestaltet sich vor allem durch die Percoll-Zentrifugation sehr zeitaufwändig. Zeit, die man bei der Versorgung eines Patienten im akuten Leberversagen unter Umständen nicht hat.

### *Einsatz kryokonservierter Leberzellen im Leberzellreaktor*

Auf der Suche nach einer praktikablen Lösung wurde im Rahmen dieser Arbeit folgender Ansatz getestet: Hepatozyten (fünf Mal so viele wie bei den Versuchen mit den nativen Leberzellen-um die Verluste durch die Kryokonservierung in etwa auszugleichen) wurden in ein Vlies eingesät und dieses dann nach dem gleichen Protokoll wie in Leberzellsuspensionen für die Zellkultur computergesteuert eingefroren. Nach dem Auftauen wurden sie direkt in den Kreislauf eingebaut, der dieses Mal von Beginn an mit Plasma perfundiert wurde, um so den „Ernstfall“ möglichst gut zu simulieren.

Insgesamt zeigten die so kryokonservierten Leberzellen eine enttäuschende metabolische Aktivität. Auf statistische Tests zum Vergleich mit den nativen Hepatozyten wurde wegen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen (mehr

Zellen, Perfusion mit Plasma) verzichtet. Im direkten Vergleich war die ECOD-Aktivität in den ersten vier Stunden nach Inbetriebnahme fast acht Mal niedriger als die gemittelte Aktivität bei den nativen Hepatozyten. Der Albuminverbrauch war neun Mal höher, die Harnstoffsynthese aber nur halb so hoch. Die Galactoseelimination war vier Mal, die Sorbitolelimination 20 Mal niedriger als bei den nativen Hepatozyten. In den ersten 4 Stunden kam es zu einer deutlichen LDH-Freisetzung, die danach stagnierte. Nach diesem Zeitraum war die ECOD-Aktivität erloschen und auch alle anderen metabolischen Funktionen fast nicht mehr nachweisbar, so dass man davon ausgehen muss, dass die Leberzellen im Reaktor avital oder zumindest auf den Strukturstoffwechsel reduziert waren.

### Ursachen für die schlechte Performance kryokonservierter Vliese

Als Ursache für die schlechte metabolische Aktivität der in den Vliesen kryokonservierten Schweineleberzellen scheidet die Perfusion mit Plasma aus, da die nativen Hepatozyten auch in Plasma deutlich bessere metabolische Aktivitäten zeigten. Außerdem behielten Schweineleberzellen in einem Einzelexperiment in Kultur mit Plasma über Tage ihre spezifische Morphologie. Die Ursache für die niedrige metabolische Aktivität muss daher direkt im Prozess der Kryokonservierung zu suchen sein.

Hengstler et al. bestimmten für eine gute Kryokonservierung von Leberzellen wichtige Parameter [16,35,91], welche soweit möglich berücksichtigt wurden: Ein langsames, kontrolliertes Absinken der Temperatur wurde durch den computergesteuerten Einfrierprozess erreicht. Ebenso wurden die Hepatozyten vor dem Einfrieren auf die empfohlene Konzentration des Kryoprotektors DMSO von 10% eingestellt. Zwei zentrale Punkte waren aber versuchsaufbaubedingt nicht erfüllt: Das Einfrieren in kleinen Portionen von optimaler Weise  $4 \times 10^6$  Zellen und wahrscheinlich noch wichtiger: Die Percoll-Zentrifugation nach dem Auftauen.

Analog zu den Zellkulturversuchen haben wahrscheinlich ca. die Hälfte der Hepatozyten die Kryokonservierung nicht überlebt, verblieben aber höchstwahrscheinlich teilweise im Vlies. Ca. ein weiteres Viertel hat die Anheftungs-



fähigkeit verloren und war somit auch geschädigt. Nekrotische, geschädigte und gestresste Leberzellen übertragen diesen Stress mittels Zytokinen an ihre gesunden Nachbarzellen [32] und führen dadurch zu einer schlechteren Funktion der Gesamtzellmasse bis hin zum raschen Tod sämtlicher Zellen. Dies erklärt die nach dem Auftauen in allen gemessenen Funktionen reduzierte und nach 3,5 Stunden fast nicht mehr nachweisbare Aktivität der in den Vliesen kryokonservierten Leberzellen.

Angesichts dieser Ergebnisse stellt sich die Frage ob es überhaupt sinnvoll ist, kryokonservierte Vliese im getesteten Leberersatzverfahren zu verwenden. Dabei ist zu bedenken, dass Patienten mit einem akuten Leberversagen abhängig vom Verlauf auf eine sehr rasche Unterstützung angewiesen sein können und ein Leberunterstützungssystem entsprechend schnell einsatzbereit sein muss. Die Zeit zwischen Leberentnahme und Einsaat der Hepatozytensuspension in den Reaktor betrug etwas mehr als drei Stunden und stellt eine akzeptable Zeit bis zur Einsatzbereitschaft dar. Angesichts der erheblich besseren Aktivität wäre momentan also der Verwendung frisch präparierter Leberzellen der Vorzug zu geben. Diese ist allerdings verbunden mit einem erheblich größeren materiellen und personellen Aufwand, und müsste bei klinischer Anwendung rund um die Uhr und auch am Wochenende zur Verfügung stehen. Außerdem stellen Schweineleberzellen für die Anwendung am Mensch gerade auch vor dem Hintergrund der im getesteten System fehlenden Immunbarriere nur die zweite Wahl dar. Humane Leberzellen stehen in viel zu geringer Menge und schon gar nicht zum benötigten Zeitpunkt zur Verfügung und auch die Differenzierung von Hepatozyten aus Stammzellen wird nicht in vier Stunden geschehen können. Der Einsatz dieser Zellen macht ein Konservierungsverfahren notwendig.

### **4.5 Verbesserungsmöglichkeiten und Probleme**

Was kann also getan werden um das im Rahmen der Zellkulturversuche in dieser Arbeit gezeigte Potential der Kryokonservierung auszuschöpfen? Zentraler Punkt hierbei ist in Analogie zu den oben genannten Ursachen für die schlechte Aktivität die Durchführung einer Percoll-Zentrifugation der Leberzellen nach

dem Auftauen und die Kryokonservierung in kleineren Einheiten. Zum Beispiel könnten jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen [35] in Medium suspendiert in einem Röhrchen eingefroren und erst nach der nach dem Auftauen durchgeführten Percoll-Zentrifugation in den Reaktor eingesät werden. Dies bedeutet aber auf der anderen Seite wieder einen erheblichen materiellen, personellen und auch zeitlichen Aufwand.

Zwei weitere Probleme traten bei den Versuchen mit den kryokonservierten Vliesen auf: (a) kam es während der Perfusion mit Plasma zu einer Erhöhung des Flusswiderstandes im Leberzellreaktor und (b) wurde eine beträchtliche Menge an Zellen aus dem Leberzellreaktor heraus gespült.

Zirkulationsprobleme durch ein Verstopfen des Leberzellreaktors traten nur bei den Versuchen mit den kryokonservierten Vliesen auf. Eine Aktivierung des Gerinnungssystems erscheint bei der eingesetzten Menge an Heparin unwahrscheinlich, zumal eine weitere Zugabe von Heparin direkt vor das Vlies keine Verbesserung brachte. Denkbar ist, dass Leberzellen sich verklumpen und dann als „Pfropfen“ die Strombahn verschließen. Setzt man mehrere Vliese in Reihe hintereinander, wie für das hier getestete System geplant, so wird man hohe Perfusionsdrücke benötigen, die physiologischerweise in einer Leber nicht auftreten und zu Zellschäden führen können. Eine Parallelschaltung der einzelnen Vliese könnte dieses Problem in Grenzen halten.

Dass Zellen aus dem Reaktor heraus gespült werden entspricht der Tatsache, dass ein Teil der Leberzellen nach dem Auftauen ihre Anheftungsfähigkeit verlieren. Bei der Verwendung von über Percoll zentrifugierten Hepatozyten wird die Zahl der ausgespülten Zellen geringer sein. Bei Verwendung einer Zelllinie ist dies als besonders kritisch anzusehen. Aber auch sonst sollte dies insbesondere aus immunologischen Gründen durch einen nachgeschalteten Filter unterbunden werden.

### **4.6 Probleme bis zur klinischen Anwendung**

Für den Einsatz am Patienten gilt es nach wie vor einige Probleme zu lösen. Die nativ eingesetzten Hepatozyten können schon jetzt mit guter metabolischer

## Diskussion

Aktivität überzeugen. Allerdings wurde diese nur in etwas weniger als 50% der Versuche erreicht. Hier ist die Entwicklung von Leberzellreaktoren mit zuverlässig hohen hepatozytenspezifischen Funktionen noch nicht abgeschlossen. Wollte man zum Beispiel die Harnstoffsynthese eines 70kg schweren Patienten von ca. 30g/d [55] komplett ersetzen, bräuchte man mit dem hier getesteten System fast 2000 Vliese.

Vor diesem Hintergrund wird die optimale Therapie des akuten Leberversagens möglicherweise in der Kombination von Substitutions- und physikalischen Maßnahmen wie sie beispielweise das MARS verwendet [95] mit dem Einsatz von vitalen Leberzellen zu suchen sein.

Um im Bedarfsfall zügig eine Leberersatztherapie beginnen zu können sind Methoden der Konservierung unerlässlich. Dass die Kryokonservierung von Hepatozyten dazu prinzipiell geeignet ist konnte gezeigt werden. Allerdings ist der für ein gutes Ergebnis benötigte Aufwand noch nicht zu rechtfertigen und deutlich zu zeitintensiv. Methoden mit denen man größere Mengen Leberzellen ohne relevanten Funktionsverlust konservieren kann werden dringend benötigt.

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten mit Hepatozyten besiedelten kryokonservierten Vliese sind zur praktischen Anwendung nur mit deutlichen Funktionseinbußen und nur innerhalb der ersten maximal vier Stunden nach dem Auftauen in geeignet.

## 5 Zusammenfassung

Das akute Leberversagen und das akute Leberversagen auf dem Boden einer chronischen Leberinsuffizienz stellen eine vitale Bedrohung für den Patienten dar. Einzig die allogene Lebertransplantation ist bislang in der Lage, die Überlebensrate signifikant zu verbessern. Angesichts der Knappheit an Spenderorganen sowie um die langfristigen Folgen der Immunsuppression zum Umgehen werden aktuell Leberersatzverfahren entwickelt, um die Leberfunktion bis zur Restitution der körpereigenen Leber zu überbrücken.

Auf der Suche nach einem schnell einsetzbaren zellbasierten Leberersatzverfahren wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Kryokonservierung auf leberzell-spezifische Aktivitäten von Hepatozyten *in vitro* untersucht.

Zunächst wurde die Bestimmung der EROD- und ECOD-Aktivität als Marker für die CYP-450-Aktivität im Labor etabliert und diese in Monolayerkulturen mit frisch präparierten Ratten- und Schweine-, sowie mit kryokonservierten Schweineleberzellen gemessen. Dabei zeigten alle Versuche während der Versuchsdauer von 3 Tagen eine rückläufige EROD- und ECOD-Aktivität, die leicht über den in der Literatur beschriebenen Aktivitäten lag. Nebenbefundlich zeigte sich eine Inhibition der EROD und der ECOD durch das jeweils gegenseitige Substrat mit einer Aktivitätsreduktion um bis zu 60%.

Der Zellverlust durch die Kryokonservierung betrug ca. 75%: 50% der Zellen gingen bei der Percollzentrifugation nach dem Auftauen verloren, weitere 25% verloren die Anheftungsfähigkeit. Die Funktionsreduktion durch die Kryokonservierung bei den verbliebenen Zellen betrug ca. 21% für die EROD- und ca. 10% für die ECOD-Aktivität.

Im zweiten Schritt wurde versucht, die Ergebnisse auf ein von der Arbeitsgruppe entwickeltes Leberersatzverfahren, basierend auf einem Leberzellreaktor, in *in-vitro* Versuchen mit nativ präparierten und kryokonservierten Schweineleberzellen zu übertragen. Dabei wurden neben der ECOD-Aktivität als Marker für die CYP-450-Aktivität auch andere hepatozytenspezifische Funktionen gemessen. Die ECOD-Aktivität der nativen Leberzellen in den Kreislaufversuchen war heterogen: In drei von sieben Versuchen zeigte sich eine deutlich höhere, in den

## Zusammenfassung

restlichen vier eine etwas niedrigere Aktivität als in den Versuchen mit den Monolayerkulturen, was am ehesten auf einen unterschiedlichen Induktionszustand des CYP-450-Enzymsystems zurückzuführen ist. Dagegen zeigte sich in den Versuchen mit kryokonservierten Zellen homogen ein deutlicher Funktionsverlust der ECOD-Aktivität, am ehesten zurückzuführen auf Schäden im Rahmen des Einfrier- und Auftauvorgangs.

Auch die Testung anderer hepatozytenspezifischer Funktionen zeigt ein ähnliches Bild: Während in den nativ präpariert eingesetzten Leberzellen ein funktionierender Harnstoffzyklus, eine deutliche Sorbitol- und Galactose-Elimination als Marker für einen funktionierenden Kohlenhydratstoffwechsel sowie eine nur leichtgradige Albuminreduktion als Anhalt für eine leicht katabole Stoffwechsellage zeigt, so fand sich in den Versuchen mit den kryokonservierten Zellen insgesamt eine enttäuschende Aktivität: Die ECOD-Aktivität war fast acht Mal niedriger, der Albuminverbrauch neun Mal höher, die Harnstoffsynthese aber nur halb so hoch. die Galactoseelimination war vier Mal, die Sorbitolelimination 20 Mal niedriger als bei den nativen Hepatozyten. Nach vier Stunden ließen sich keine relevanten hepatozytenspezifischen Funktionen mehr nachweisen.

Aktuell lässt sich mit dem getesteten System in Teilbereichen, insbesondere CYP-450- und Kohlenhydratstoffwechsel eine ausreichende Funktion erzielen, wobei, wie die katabole Stoffwechsellage der Zellen zeigt, dass die Kulturbedingungen im Leberzellreaktor verbessert werden können. Durch die Kryokonservierung kommt es zu einem relevanten Verlust der hepatozytenspezifischen Funktionen, welche vier Stunden nach Auftauen komplett erloschen sind. Da für die zeitintensive Zellpräparation jedoch in der Akutsituation keine Zeit bleibt, sind zellbasierte Leberersatzverfahren auf konservierte, schnell aktivierbare Zellen angewiesen. Dass die Kryokonservierung sich hierzu prinzipiell eignet, konnte in den Zellkulturversuchen gezeigt werden. Das hier getestete Verfahren zur Kryokonservierung für das von der Arbeitsgruppe entwickelte Leberersatzverfahren eignet sich dazu jedoch nicht.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

7-HC	7-Hydroxycoumarin
ACLV	akut auf chronischem Leberversagen
ALFIHMS	acute liver failure in-hospital mortality prediction score
ALV	akutes Leberversagen
ATP	Adenosintriphosphat
CYP	Cytochrom P450
DC	Dicumarol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	7-Ethoxycoumarin
ECOD	7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'- Tetraessigsäure
ELAD	extracorporeal liver assist device
ER	Ethoxyresorufin
EROD	Ethoxyresorufin-O-Dealkylase
FCS	Fetales Kälberserum
FE	Fluoreszenzeinheit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)- ethansulfonsäure
IE	internationale Einheit
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
MARS	molecular adsorbent recirculating system
MELD – Score	Model for End-stage Liver Disease-Score
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
PBS	phosphate buffered saline
R	Resorufin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDP	Uridindiphosphat

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bauer, M., Paxian, M., and Kortgen, A.; [Acute Liver Failure. Current Aspects of Diagnosis and Therapy]; *Anaesthesist*; 2004; 53; 511-530
2. Behnia, K., Bhatia, S., Jastromb, N., Balis, U., Sullivan, S., Yarmush, M., and Toner, M.; Xenobiotic Metabolism by Cultured Primary Porcine Hepatocytes; *Tissue Eng*; 2000; 6; 467-479
3. Bernuau, J., Goudeau, A., Poynard, T., Dubois, F., Lesage, G., Yvonnet, B., Degott, C., Bezeaud, A., Rueff, B., and Benhamou, J. P.; Multivariate Analysis of Prognostic Factors in Fulminant Hepatitis B; *Hepatology*; 1986; 6; 648-651
4. Bradford, M. M.; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding; *Anal.Biochem.*; 7-5-1976; 72; 248-254
5. Bruzzone, P., Rossiord, M., and Berloco, P. B.; Extracorporeal Liver Perfusion As Hepatic Assist in Acute Liver Failure: a Review of World Experience; *Xenotransplantation.*; 2003; 10; 477-
6. Burke, M. D. and Mayer, R. T.; Ethoxyresorufin: Direct Fluorimetric Assay of a Microsomal O-Dealkylation Which Is Preferentially Inducible by 3-Methylcholanthrene; *Drug Metab Dispos.*; 1974; 2; 583-588
7. Chari, R. S., Collins, B. H., Magee, J. C., DiMaio, J. M., Kirk, A. D., Harland, R. C., McCann, R. L., Platt, J. L., and Meyers, W. C.; Brief Report: Treatment of Hepatic Failure With Ex Vivo Pig-Liver Perfusion Followed by Liver Transplantation; *N.Engl.J.Med.*; 28-7-1994; 331; 234-237
8. Chen, G., Qian, H., Starzl, T., Sun, H., Garcia, B., Wang, X., Wise, Y., Liu, Y., Xiang, Y., Copeman, L., Liu, W., Jevnikar, A., Wall, W., Cooper, D. K., Murase, N., Dai, Y., Wang, W., Xiong, Y., White, D. J., and Zhong, R.; Acute Rejection Is Associated With Antibodies to Non-Gal Antigens in Baboons Using Gal-Knockout Pig Kidneys; *Nat.Med.*; 2005; 11; 1295-1298
9. Chen, Z. and Ding, Y. T.; Functional Evaluation of a New Bioartificial Liver System in Vitro and in Vitro; *World J.Gastroenterol.*; 28-2-2006; 12; 1312-1316
10. Cox, A. and Zhong, R.; Current Advances in Xenotransplantation; *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.*; 2005; 4; 490-494

## Literaturverzeichnis

11. Cozzi, E., Bosio, E., Seveso, M., Vadori, M., and Ancona, E.; Xenotransplantation--Current Status and Future Perspectives; *Br.Med.Bull.*; 2006; 75-76; 99-114
12. Cozzi, E., Tucker, A. W., Langford, G. A., Pino-Chavez, G., Wright, L., O'Connell, M. J., Young, V. J., Lancaster, R., McLaughlin, M., Hunt, K., Bordin, M. C., and White, D. J.; Characterization of Pigs Transgenic for Human Decay-Accelerating Factor; *Transplantation*; 27-11-1997; 64; 1383-1392
13. Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H., and Blaese, R. M.; In Vivo Gene Transfer With Retroviral Vector-Producer Cells for Treatment of Experimental Brain Tumors; *Science*; 12-6-1992; 256; 1550-1552
14. De Bartolo, L., Jarosch-Von Schweder, G., Haverich, A., and Bader, A.; A Novel Full-Scale Flat Membrane Bioreactor Utilizing Porcine Hepatocytes: Cell Viability and Tissue-Specific Functions; *Biotechnol.Prog.*; 2000; 16; 102-108
15. Demetriou, A. A.; Hepatic Assist Devices; *Panminerva Med.*; 2005; 47; 31-37
16. Diener, B., Utesch, D., Beer, N., Durk, H., and Oesch, F.; A Method for the Cryopreservation of Liver Parenchymal Cells for Studies of Xenobiotics; *Cryobiology*; 1993; 30; 116-127
17. Donato, M. T., Castell, J. V., and Gomez-Lechon, M. J.; Characterization of Drug Metabolizing Activities in Pig Hepatocytes for Use in Bioartificial Liver Devices: Comparison With Other Hepatic Cellular Models; *J.Hepatol.*; 1999; 31; 542-549
18. Dorling, A.; Clinical Xenotransplantation: Pigs Might Fly?; *Am.J.Transplant.*; 2002; 2; 695-700
19. Dou, M., de Sousa, G., Lacarelle, B., Placidi, M., Lechene, de la Porte, Domingo, M., Lafont, H., and Rahmani, R.; Thawed Human Hepatocytes in Primary Culture; *Cryobiology*; 1992; 29; 454-469
20. Eiseman, B., Liem, D. S., and Raffucci, F.; Heterologous Liver Perfusion in Treatment of Hepatic Failure; *Ann.Surg.*; 1965; 162; 329-345
21. Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., and Rogiers, V.; Molecular Mechanisms Underlying the Dedifferentiation Process of Isolated Hepatocytes and Their Cultures; *Curr.Drug Metab*; 2006; 7; 629-660
22. Ellis, A. J., Hughes, R. D., Wendon, J. A., Dunne, J., Langley, P. G., Kelly, J. H., Gislason, G. T., Sussman, N. L., and Williams, R.; Pi-



- lot-Controlled Trial of the Extracorporeal Liver Assist Device in Acute Liver Failure; *Hepatology*; 1996; 24; 1446-1451
23. Encke, J., Uhl, W., Stremmel, W., and Sauer, P.; Immunosuppression and Modulation in Liver Transplantation; *Nephrol.Dial.Transplant.*; 2004; 19 Suppl 4; iv22-iv25
  24. Estabrook, R.; An Introduction to the Cytochrome P450s; *Mol.Aspects Med.*; 1999; 20; 5-137
  25. Fausto, N., Campbell, J. S., and Riehle, K. J.; Liver Regeneration; *Hepatology*; 2006; 43; S45-S53
  26. Flendrig, L. M., la Soe, J. W., Jorning, G. G., Steenbeek, A., Karlsen, O. T., Bovee, W. M., Ladiges, N. C., te Velde, A. A., and Chamuleau, R. A.; In Vitro Evaluation of a Novel Bioreactor Based on an Integral Oxygenator and a Spirally Wound Nonwoven Polyester Matrix for Hepatocyte Culture As Small Aggregates; *J.Hepatol.*; 1997; 26; 1379-1392
  27. Gehan, E. A.; A Generalized Two-Sample Wilcoxon Test for Doubly Censored Data; *Biometrika.*; 1965; 52; 650-653
  28. Gerlach, J. C.; Development of a Hybrid Liver Support System: a Review; *Int.J.Artif.Organs*; 1996; 19; 645-654
  29. Greenlee, W. F. and Poland, A.; An Improved Assay of 7-Ethoxycoumarin O-Deethylase Activity: Induction of Hepatic Enzyme Activity in C57BL/6J and DBA/2J Mice by Phenobarbital, 3-Methylcholanthrene and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin; *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; 1978; 205; 596-605
  30. Greenlee, W. F. and Poland, A.; An Improved Assay of 7-Ethoxycoumarin O-Deethylase Activity: Induction of Hepatic Enzyme Activity in C57BL/6J and DBA/2J Mice by Phenobarbital, 3-Methylcholanthrene and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin; *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; 1978; 205; 596-605
  31. Greenlee, W. F. and Poland, A.; An Improved Assay of 7-Ethoxycoumarin O-Deethylase Activity: Induction of Hepatic Enzyme Activity in C57BL/6J and DBA/2J Mice by Phenobarbital, 3-Methylcholanthrene and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin; *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; 1978; 205; 596-605
  32. Hatano, E.; Tumor Necrosis Factor Signaling in Hepatocyte Apoptosis; *J.Gastroenterol.Hepatol.*; 2007; 22 Suppl 1; S43-S44
  33. Heemann, U., Treichel, U., Looock, J., Philipp, T., Gerken, G., Malago, M., Klammt, S., Loehr, M., Liebe, S., Mitzner, S., Schmidt, R., and Stange, J.; Albumin Dialysis in Cirrhosis With Superimposed

Acute Liver Injury: a Prospective, Controlled Study; *Hepatology*; 2002; 36; 949-958

34. Hellgren, A., Berglund, B., Gunnarsson, U., Hansson, K., Norberg, U., and Backman, L.; Health-Related Quality of Life After Liver Transplantation; *Liver Transpl. Surg.*; 1998; 4; 215-221
35. Hengstler, J. G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K. L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., Bottger, T., and Oesch, F.; Cryopreserved Primary Hepatocytes As a Constantly Available in Vitro Model for the Evaluation of Human and Animal Drug Metabolism and Enzyme Induction; *Drug Metab Rev.*; 2000; 32; 81-118
36. Horn, N., Unger, J., and Rossaint, R.; [Extracorporeal Liver Assist Devices in Acute Liver Failure]; *Anaesthesist*; 1999; 48; 387-394
37. Hoyumpa, A. M. and Schenker, S.; Is Glucuronidation Truly Preserved in Patients With Liver Disease?; *Hepatology*; 1991; 13; 786-795
38. Iwata, H., Sajiki, T., Maeda, H., Park, Y. G., Zhu, B., Satoh, S., Uesugi, T., Ikai, I., Yamaoka, Y., and Ikada, Y.; In Vitro Evaluation of Metabolic Functions of a Bioartificial Liver; *ASAIO J.*; 1999; 45; 299-306
39. Jalan, R. and Williams, R.; Improvement in Cerebral Perfusion After MARS Therapy: Further Clues About the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy?; *Liver Transpl.*; 2001; 7; 713-715
40. Jasmund, I., Langsch, A., Simmoteit, R., and Bader, A.; Cultivation of Primary Porcine Hepatocytes in an OXY-HFB for Use As a Bioartificial Liver Device; *Biotechnol. Prog.*; 2002; 18; 839-846
41. Kamath, P. S., Wiesner, R. H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T. M., Kosberg, C. L., D'Amico, G., Dickson, E. R., and Kim, W. R.; A Model to Predict Survival in Patients With End-Stage Liver Disease; *Hepatology*; 2001; 33; 464-470
42. Kern, A., Bader, A., Pichlmayr, R., and Sewing, K. F.; Drug Metabolism in Hepatocyte Sandwich Cultures of Rats and Humans; *Biochem. Pharmacol.*; 1-10-1997; 54; 761-772
43. Kjaergard, L. L., Liu, J., Als-Nielsen, B., and Gluud, C.; Artificial and Bioartificial Support Systems for Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure: a Systematic Review; *JAMA*; 8-1-2003; 289; 217-222
44. Klingenberg, M.; Pigments of Rat Liver Microsomes; *Arch. Biochem. Biophys.*; 1958; 75; 376-386

## Literaturverzeichnis

45. Kobayashi, N., Fujiwara, T., Westerman, K. A., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Noguchi, H., Miyazaki, M., Cai, J., Tanaka, N., Fox, I. J., and Leboulch, P.; Prevention of Acute Liver Failure in Rats With Reversibly Immortalized Human Hepatocytes; *Science*; 18-2-2000; 287; 1258-1262
46. Kobayashi, N., Okitsu, T., and Tanaka, N.; Cell Choice for Bioartificial Livers; *Keio J.Med.*; 2003; 52; 151-157
47. Kolber-Simonds, D., Lai, L., Watt, S. R., Denaro, M., Arn, S., Augenstein, M. L., Betthausen, J., Carter, D. B., Greenstein, J. L., Hao, Y., Im, G. S., Liu, Z., Mell, G. D., Murphy, C. N., Park, K. W., Rieke, A., Ryan, D. J., Sachs, D. H., Forsberg, E. J., Prather, R. S., and Hawley, R. J.; Production of Alpha-1,3-Galactosyltransferase Null Pigs by Means of Nuclear Transfer With Fibroblasts Bearing Loss of Heterozygosity Mutations; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 11-5-2004; 101; 7335-7340
48. Langsch, A. and Bader, A.; Longterm Stability of Phase I and Phase II Enzymes of Porcine Liver Cells in Flat Membrane Bioreactors; *Biotechnol.Bioeng.*; 2001; 76; 115-125
49. Lavon, N. and Benvenisty, N.; Study of Hepatocyte Differentiation Using Embryonic Stem Cells; *J.Cell Biochem.*; 15-12-2005; 96; 1193-1202
50. Li, A. P., Rasmussen, A., Xu, L., and Kaminski, D. L.; Rifampicin Induction of Lidocaine Metabolism in Cultured Human Hepatocytes; *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; 1995; 274; 673-677
51. Lin, S. S., Hanaway, M. J., Gonzalez-Stawinski, G. V., Lau, C. L., Parker, W., Davis, R. D., Byrne, G. W., Diamond, L. E., Logan, J. S., and Platt, J. L.; The Role of Anti-Galalpha1-3Gal Antibodies in Acute Vascular Rejection and Accommodation of Xenografts; *Transplantation*; 27-12-2000; 70; 1667-1674
52. Lindl, T. and Bauer, J.; *Zell- Und Gewebekultuer*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 1994;
53. Linti, C., Zipfel, A., Schenk, M., Dauner, M., Doser, M., Viebahn, R., Becker, H. D., and Planck, H.; Cultivation of Porcine Hepatocytes in Polyurethane Nonwovens As Part of a Biohybrid Liver Support System; *Int.J.Artif.Organs*; 2002; 25; 994-1000
54. Lockwood, A. H., McDonald, J. M., Reiman, R. E., Gelbard, A. S., Laughlin, J. S., Duffy, T. E., and Plum, F.; The Dynamics of Ammonia Metabolism in Man. Effects of Liver Disease and Hyperammonemia; *J.Clin.Invest*; 1979; 63; 449-460

## Literaturverzeichnis

55. Löffler, G; Biochemie Und Pathobiochemie; 1998;
56. Löffler, G; Biochemie Und Pathobiochemie 6. Auflage, Springer Verlag; 1998;
57. Mahler, S., Desille, M., Fremond, B., Chesne, C., Guillouzo, A., Campion, J. P., and Clement, B.; Hypothermic Storage and Cryopreservation of Hepatocytes: the Protective Effect of Alginate Gel Against Cell Damages; Cell Transplant.; 2003; 12; 579-592
58. Mansuy, D.; The Great Diversity of Reactions Catalyzed by Cytochromes P450; Comp Biochem.Physiol C.Pharmacol.Toxicol.Endocrinol.; 1998; 121; 5-14
59. Mas, A.; Hepatic Encephalopathy: From Pathophysiology to Treatment; Digestion; 2006; 73 Suppl 1; 86-93
60. Mitaka, T.; The Current Status of Primary Hepatocyte Culture; Int.J.Exp.Pathol.; 1998; 79; 393-409
61. Mitzner, S. R., Stange, J., Klammt, S., Risler, T., Erley, C. M., Bader, B. D., Berger, E. D., Lauchart, W., Peszynski, P., Freytag, J., Hickstein, H., Looock, J., Lohr, J. M., Liebe, S., Emmrich, J., Korten, G., and Schmidt, R.; Improvement of Hepatorenal Syndrome With Extracorporeal Albumin Dialysis MARS: Results of a Prospective, Randomized, Controlled Clinical Trial; Liver Transpl.; 2000; 6; 277-286
62. Miwa, S., Hashikura, Y., Mita, A., Kubota, T., Chisuwa, H., Nakazawa, Y., Ikegami, T., Terada, M., Miyagawa, S., and Kawasaki, S.; Living-Related Liver Transplantation for Patients With Fulminant and Subfulminant Hepatic Failure; Hepatology; 1999; 30; 1521-1526
63. Molino, G., Avagnina, P., Belforte, G., and Bircher, J.; Assessment of the Hepatic Circulation in Humans: New Concepts Based on Evidence Derived From a D-Sorbitol Clearance Method; J.Lab Clin.Med.; 1998; 131; 393-405
64. Nashan, B., Luck, R., Becker, T., Grannas, G., Strassburg, C., Schneider, A., Melter, M., Strassburg, A., and Klempnauer, J.; Expansion of the Donor Pool in Liver Transplantation: the Hannover Experience 1996-2002; Clin.Transpl.; 2002; 221-228
65. Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., and .; The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature; DNA; 1987; 6; 1-11

## Literaturverzeichnis

66. Nims, R. W., Prough, R. A., and Lubet, R. A.; Cytosol-Mediated Reduction of Resorufin: a Method for Measuring Quinone Oxidoreductase; *Arch.Biochem.Biophys.*; 1984; 229; 459-465
67. Nishibe, T., Miyazaki, K., Kudo, F., Flores, J., Miyazaki, K., Nagato, M., Kumada, T., and Yasuda, K.; Induction of Angiotensin Converting Enzyme in Neointima After Intravascular Stent Placement; *Int.Angiol.*; 2002; 21; 250-255
68. Nyberg, S. L., Rimmel, R. P., Mann, H. J., Peshwa, M. V., Hu, W. S., and Cerra, F. B.; Primary Hepatocytes Outperform Hep G2 Cells As the Source of Biotransformation Functions in a Bioartificial Liver; *Ann.Surg.*; 1994; 220; 59-67
69. O'Grady, J. G., Alexander, G. J., Hayllar, K. M., and Williams, R.; Early Indicators of Prognosis in Fulminant Hepatic Failure; *Gastroenterology*; 1989; 97; 439-445
70. Ostapowicz, G., Fontana, R. J., Schiodt, F. V., Larson, A., Davern, T. J., Han, S. H., McCashland, T. M., Shakil, A. O., Hay, J. E., Hynan, L., Crippin, J. S., Blei, A. T., Samuel, G., Reisch, J., and Lee, W. M.; Results of a Prospective Study of Acute Liver Failure at 17 Tertiary Care Centers in the United States; *Ann.Intern.Med.*; 17-12-2002; 137; 947-954
71. Park, J. K. and Lee, D. H.; Bioartificial Liver Systems: Current Status and Future Perspective; *J.Biosci.Bioeng.*; 2005; 99; 311-319
72. Patience, C., Takeuchi, Y., and Weiss, R. A.; Infection of Human Cells by an Endogenous Retrovirus of Pigs; *Nat.Med.*; 1997; 3; 282-286
73. Pawlowski, R. and Jura, J.; ALR and Liver Regeneration; *Mol.Cell Biochem.*; 12-5-2006;
74. Pelaez-Luna, M., Martinez-Salgado, J., and Olivera-Martinez, M. A.; Utility of the MAYO End-Stage Liver Disease Score, King's College Criteria, and a New in-Hospital Mortality Score in the Prognosis of in-Hospital Mortality in Acute Liver Failure; *Transplant.Proc.*; 2006; 38; 927-929
75. Reich, D., Rothstein, K., Manzarbeitia, C., and Munoz, S.; Common Medical Diseases After Liver Transplantation; *Semin.Gastrointest.Dis.*; 1998; 9; 110-125
76. Rifai, K. and Bahr, M. J.; [Acute Liver Failure]; *Internist (Berl)*; 2003; 44; 585-588
77. Roberts, M. S., Angus, D. C., Bryce, C. L., Valenta, Z., and Weissfeld, L.; Survival After Liver Transplantation in the United States: a Dis-

- ease-Specific Analysis of the UNOS Database; Liver Transpl.; 2004; 10; 886-897
78. Runge, D., Michalopoulos, G. K., Strom, S. C., and Runge, D. M.; Recent Advances in Human Hepatocyte Culture Systems; Biochem.Biophys.Res.Commun.; 21-7-2000; 274; 1-3
79. Rutten, A. A., Falke, H. E., Catsburg, J. F., Wortelboer, H. M., Blaauboer, B. J., Doorn, L., van Leeuwen, F. X., Theelen, R., and Rietjens, I. M.; Interlaboratory Comparison of Microsomal Ethoxyresorufin and Pentoxyresorufin O-Dealkylation Determinations: Standardization of Assay Conditions; Arch.Toxicol.; 1992; 66; 237-244
80. Sass, D. A. and Shakil, A. O.; Fulminant Hepatic Failure; Liver Transpl.; 2005; 11; 594-605
81. Sauer, I. M., Obermeyer, N., Kardassis, D., Theruvath, T., and Gerlach, J. C.; Development of a Hybrid Liver Support System; Ann.N.Y.Acad.Sci.; 2001; 944; 308-319
82. Schoene, B., Fleischmann, R. A., Remmer, H., and von Oldershausen, H. F.; Determination of Drug Metabolizing Enzymes in Needle Biopsies of Human Liver; Eur.J.Clin.Pharmacol.; 1972; 4; 65-73
83. Seglen, P. O.; Preparation of Isolated Rat Liver Cells; Methods Cell Biol.; 1976; 13; 29-83
84. Shah, V., Friedman, A. L., and Navarro, V. J.; Immunology of Liver Transplantation: Clinical Management Aspects; Gastroenterologist.; 1997; 5; 137-147
85. Shawcross, D. and Jalan, R.; The Pathophysiologic Basis of Hepatic Encephalopathy: Central Role for Ammonia and Inflammation; Cell Mol.Life Sci.; 2005; 62; 2295-2304
86. Sherlock, S.; Pathogenesis and Management of Hepatic Coma; Am.J.Med.; 1958; 24; 805-813
87. Shinoda, M., Tilles, A. W., Wakabayashi, G., Takayanagi, A., Harada, H., Obara, H., Suganuma, K., Berthiaume, F., Shimazu, M., Shimizu, N., Kitajima, M., Tompkins, R. G., Toner, M., and Yarmush, M. L.; Treatment of Fulminant Hepatic Failure in Rats Using a Bioartificial Liver Device Containing Porcine Hepatocytes Producing Interleukin-1 Receptor Antagonist; Tissue Eng; 1-5-2006;
88. Slooff, M. J.; Reduced Size Liver Transplantation, Split Liver Transplantation, and Living Related Liver Transplantation in Relation to the Donor Organ Shortage; Transpl.Int.; 1995; 8; 65-68

## Literaturverzeichnis

89. Stahl, J.; Studies of the Blood Ammonia in Liver Disease. Its Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Significance; *Ann.Intern.Med.*; 1963; 58; 1-24
90. Stange, J., Mitzner, S., Ramlow, W., Gliesche, T., Hickstein, H., and Schmidt, R.; A New Procedure for the Removal of Protein Bound Drugs and Toxins; *ASAIO J.*; 1993; 39; M621-M625
91. Steinberg, P., Fischer, T., Kiulies, S., Biefang, K., Platt, K. L., Oesch, F., Bottger, T., Bulitta, C., Kempf, P., and Hengstler, J.; Drug Metabolizing Capacity of Cryopreserved Human, Rat, and Mouse Liver Parenchymal Cells in Suspension; *Drug Metab Dispos.*; 1999; 27; 1415-1422
92. Strassburg, C. P., Becker, T., Klempnauer, J., and Manns, M. P.; [Liver Transplantation: Deciding Between Need and Donor Allocation]; *Internist (Berl)*; 2004; 45; 1233-1245
93. Swales, N. J., Johnson, T., and Caldwell, J.; Cryopreservation of Rat and Mouse Hepatocytes. II. Assessment of Metabolic Capacity Using Testosterone Metabolism; *Drug Metab Dispos.*; 1996; 24; 1224-1230
94. Swales, N. J., Luong, C., and Caldwell, J.; Cryopreservation of Rat and Mouse Hepatocytes. I. Comparative Viability Studies; *Drug Metab Dispos.*; 1996; 24; 1218-1223
95. Tan, H. K.; Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS); *Ann.Acad.Med.Singapore*; 2004; 33; 329-335
96. Terry, C., Hughes, R. D., Mitry, R. R., Lehec, S. C., and Dhawan, A.; Cryopreservation-Induced Nonattachment of Human Hepatocytes: Role of Adhesion Molecules; *Cell Transplant.*; 2007; 16; 639-647
97. Ullrich, V. and Weber, P.; The O-Dealkylation of 7-Ethoxycoumarin by Liver Microsomes. A Direct Fluorometric Test; *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.*; 1972; 353; 1171-1177
98. Utesch, D., Diener, B., Molitor, E., Oesch, F., and Platt, K. L.; Characterization of Cryopreserved Rat Liver Parenchymal Cells by Metabolism of Diagnostic Substrates and Activities of Related Enzymes; *Biochem.Pharmacol.*; 22-7-1992; 44; 309-315
99. van de Kerkhove, M. P., Poyck, P. P., van Wijk, A. C., Galavotti, D., Hoekstra, R., van Gulik, T. M., and Chamuleau, R. A.; Assessment and Improvement of Liver Specific Function of the AMC-Bioartificial Liver; *Int.J.Artif.Organs*; 2005; 28; 617-630

## Literaturverzeichnis

100. Viebahn, C. S. and Yeoh, G. C.; What Fires Prometheus? The Link Between Inflammation and Regeneration Following Chronic Liver Injury; *Int.J.Biochem.Cell Biol.*; 2008; 40; 855-873
101. Washington, K.; Update on Post-Liver Transplantation Infections, Malignancies, and Surgical Complications; *Adv.Anat.Pathol.*; 2005; 12; 221-226
102. Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R.; Cytochromes P450: a Success Story; *Genome Biol.*; 2000; 1; REVIEWS3003-
103. Wissler, C.; THE SPEARMAN CORRELATION FORMULA; *Science*; 8-9-1905; 22; 309-311



## 8 Danksagung

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Martin Schenk, der mir das wissenschaftliche Arbeiten beigebracht hat, der für alle Fragen ein offenes Ohr und für alle Probleme eine Lösung hatte.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. Annette Zipfel für die tatkräftige Unterstützung und insbesondere für viele wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen.

Danke auch an Maria Seitzer, die mir die Laborarbeit beigebracht hat und deren gute Laune stets ansteckend war.

Zuletzt ein großes Dankeschön an PD Dr. Silvio Nadalin, der gerne diese Doktorarbeit betreut hätte und nach zeitintensiver Korrektur feststellen musste, dass er es nicht darf.