

Tissue Engineering einer Leber

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl. Ern. Wiss. Nicola Elena Maria Bühler
aus Göppingen

Tübingen
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	15.05.2018
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Schulze- Osthoff
2. Berichterstatter:	PD Dr. Martin Schenk

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE HUMANE LEBER	1
1.2 LEBERVERSAGEN	5
1.3 LEBERERSATZ.....	6
1.4 TISSUE ENGINEERING DER LEBER	8
1.5 ZIEL DER ARBEIT.....	12
MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIAL.....	13
2.1.1 Tiere.....	13
2.1.2 Allgemeine Materialien.....	13
2.1.3 Azellularisierung einer porcinen Leber.....	14
2.1.4 Evaluierung der azellularisierten Matrices	15
a. DNA Quantität.....	15
b. Kollagengehalt.....	15
c. Glykosaminoglykangehalt (GAGs).....	16
d. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E).....	16
2.1.5 Hepatozytenisolation.....	17
2.1.6 Zellkultur	18
2.1.7 Wiederbesiedelung einer azellularisierten porcinen Leber	18
2.1.8 Funktionstests in verschiedenen Zellkulturen	20
a. Albuminsekretion.....	20
b. Harnstoffbildung.....	20
c. Galaktoseelimination.....	20
d. 7-Hydroxycumarin-Deethylase (ECOD) Aktivität	21
e. Zellviabilitätstest	21
f. Aspartat-Aminotransferase (ASAT)	21
2.1.9 Immunhistologie	22
2.2 METHODEN	23
2.2.1 Azellularisierung einer porcinen Leber.....	23
2.2.2 Evaluierung der azellularisierten Matrices	27
a. DNA – Quantität	27
b. Kollagengehalt.....	28
c. Glykosaminoglykangehalt	29
d. Hämatoxylin – Eosin – Färbung	31
2.2.3 Hepatozytenisolation.....	32
2.2.4 Zellkulturen unter verschiedenen Bedingungen.....	33
2.2.5 Wiederbesiedelung einer azellularisierten porcinen Leber	34

2.2.6	<i>Funktionstests in verschiedenen Zellkulturen</i>	36
a.	<i>Albuminsekretion</i>	36
b.	<i>Harnstoffbildung</i>	37
c.	<i>Galaktoseelimination</i>	38
d.	<i>7-Hydroxycumarin-Deethylase Aktivität</i>	40
e.	<i>Zellviabilitätstest</i>	41
f.	<i>Aspartat – Aminotransferase</i>	42
2.2.7	<i>Immunhistochemie</i>	44
2.2.8	<i>Statistik</i>	46
ERGEBNISSE		47
3.1	<i>AZELLULARISIERUNG EINER PORCINEN LEBER</i>	47
3.1.1	<i>Der Azellularisierungsprozess</i>	47
3.1.2	<i>Evaluierung der gewonnenen Matrices</i>	50
a.	<i>Makroskopische Übersicht</i>	50
b.	<i>DNA-Quantität</i>	52
c.	<i>Kollagengehalt</i>	55
d.	<i>Glykosaminoglykangehalt</i>	57
e.	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	59
3.2	<i>ZELLKULTUREN</i>	61
3.2.1	<i>Albuminsekretion</i>	61
3.2.2	<i>Harnstoffbildung</i>	61
3.2.3	<i>Galaktoseelimination</i>	64
3.2.4	<i>7-Hydroxycumarin-Deethylase Aktivität</i>	64
3.2.5	<i>Zellviabilitätstest</i>	66
3.2.6	<i>Aspartat – Aminotransferase</i>	67
3.2.7	<i>Quotient aus ASAT und Zellviabilität</i>	67
3.3	<i>WIEDERBESIEDLUNG EINER AZELLULARISIERTEN PORCINEN LEBER</i>	68
3.3.1	<i>Computersteuerung</i>	69
3.3.2	<i>Makroskopische Auswertung</i>	70
3.3.3	<i>BGA Auswertung</i>	72
3.3.4	<i>Galaktoseelimination</i>	75
3.3.5	<i>H&E-Färbung</i>	75
3.3.6	<i>Immunhistochemie</i>	78
DISKUSSION		80
ZUSAMMENFASSUNG		88
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		90
TABELLENVERZEICHNIS		92

LITERATURVERZEICHNIS	93
DANKSAGUNG.....	98
LEBENS LAUF.....	99
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	101

Abkürzungsverzeichnis

7-HC	7-Hydroxycoumarin
A.	It.: Arteria
ASAT	Aspartat – Aminotransferase
BAL	Bioartificial Liver
BGA	Blutgasanalyse
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DASYLab	Data Acquisition System Laboratory
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	7-Ethoxycoumarin
ECOD	7-Hydroxycoumarin-Deethylase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal Calf Serum
GAGs	Glykosaminoglykane
HRP	Horseradish peroxidase
IU	engl.: international unit
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
MDH	Malatdehydrogenase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
mWS	Meter Wassersäule
NaOH	Natriumhydroxidlösung
NaSO ₄	Natriumsulfat
nm	Nanometer

OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
restitutio ad integrum	vollständige Ausheilung
RPM	engl.: revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SI	frz.: Système international d'unités
USB	Universal Serial Bus
V.	It.: Vena

Einleitung

1.1 Die humane Leber

Die Leber ist mit einem Gewicht von ca. 1500 g die größte exo- und endokrine Drüse im menschlichen Körper und das zentrale Stoffwechselorgan. Sie ist im rechten Oberbauch direkt unter dem Zwerchfell lokalisiert.

Die Leber lässt sich in 2 große Lappen, den Lobus hepatis sinister (linker Leberlappen) und den Lobus hepatis dexter (rechter Leberlappen) sowie 2 kleine Lappen (Lobus caudatus und Lobus quadratus) aufteilen [1]. Diese wiederum unterteilen sich in $1-1,5 \times 10^6$ winzige Leberläppchen mit einer Größe von 1-2 mm [2]. Diese Läppchen bilden mit ihrer hexagonalen Form die strukturelle Untereinheit der Leber. An den Ecken jedes Läppchens befindet sich das Portalfeld, bestehend aus dem Gallengang und jeweils einem Ast der Arteria hepatica und der Vena portae. Zusammen bilden die 3 Gefäßtypen die sogenannte Glisson-Trias. Im Zentrum jedes Leberläppchens verläuft die Zentralvene (Vena centralis). Zwischen den Lebersinusoiden, die sternenförmig vom Portalfeld zur Zentralvene hinlaufen, liegen, in Bälkchen angeordnet, die Hepatozyten und werden vom gemischten Blut aus der A. hepatica und V. portae umspült.

Die Gallenkanalikuli, die sich zwischen benachbarten Hepatozyten befinden, leiten die Galle dem Gallengang im Portalfeld zu. Das Leberläppchen bildet keine funktionelle Untereinheit, da produzierte Galle mehreren Portalfeldern zugeleitet wird und das zuströmende Blut aus mehreren Portalvenen- und Arterienästen stammt [2]. Die funktionelle Einheit bildet vielmehr der Leberazinus, der eine rhombische Struktur aufweist und jeweils 2 sich gegenüberliegende Vv. centrales und 2 periportale Felder an den Ecken besitzt (Abb. 1).

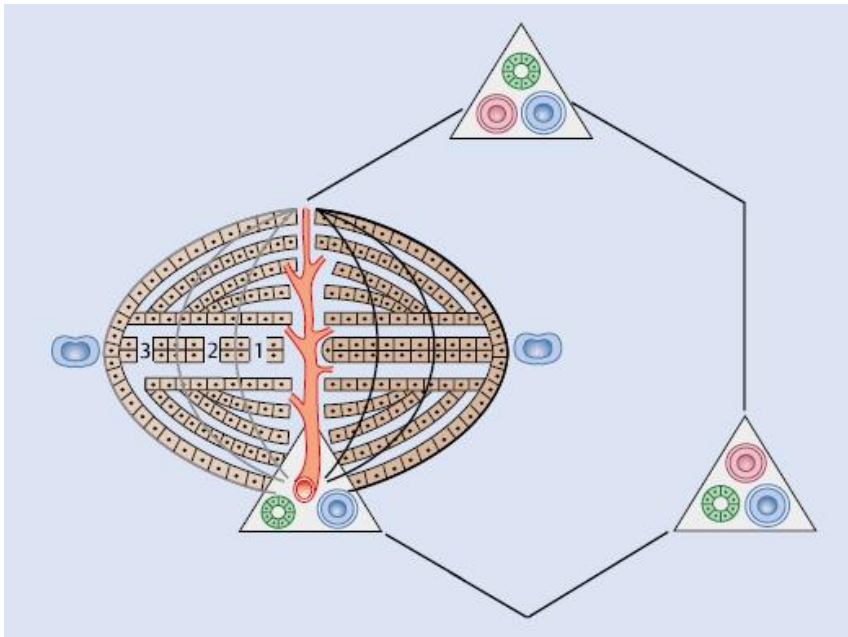


Abbildung 1. Struktureller und funktioneller Aufbau der Leber. Rechts ist das hexagonale Leberläppchen mit der Zentralvene im Zentrum und den Glisson-Trias in der Peripherie als strukturelle Einheit zu sehen. Links ist der Leberazinus als funktionelle Einheit mit zwei Zentralvenen in der Peripherie und einer Leberarterie als Achse dargestellt. Entnommen und angepasst von Siegenthaler et al [3].

Aufgrund der vielen verschiedenen Aufgaben, die die Leber erfüllen muss, besteht sie aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen (Abb. 2).

Hepatozyten machen insgesamt 60-65% der Gesamtzellzahl aus und haben als Parenchymzellen hauptsächlich metabolische Funktionen. So sind sie für die Metabolisierung der Nährstoffe verantwortlich, dienen dem Abbau von Hormonen und Signalstoffen, regulieren den Säure-Base Haushalt, synthetisieren Akutphaseproteine und verfügen über ein Biotransformationssystem.

Die Sinusendothelzellen gehören zu den nichtepithelialen Zellen und bilden ein gefenestertes Endothel. Diese Fenestrations ermöglichen den Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen den Sinusoiden und dem Dissé-Raum, wobei der Durchmesser variabel ist.

Bei den Kupferzellen handelt es sich um leberspezifische Makrophagen, die zum reticuloendothelialen System gehören. Sie adhären an den Sinusoiden und sind Teil des Immunsystems.

Einleitung

Sternzellen, auch bekannt als Ito- oder Fettspeicherzellen, liegen im Dissé-Raum und umwickeln das Endothel der Sinusoide mit ihren cytoplasmatischen Extensionen. Im nicht aktivierten Zustand sind sie mit perinukleären Vitamin-A-Speichertropfen gefüllt. Sie können durch Zytokine aktiviert werden und sind dann als Myofibroblasten für die Bindegewebsbildung verantwortlich.

Pit-Zellen sind leberspezifische große granuläre Lymphozyten, die zur Gruppe der Killerzellen gehören.

Progenitorzellen sind Leberstammzellen, die sich sowohl zu Hepatozyten als auch zu Cholangiozyten differenzieren können. Bei einer schweren Leberschädigung wird die Proliferation dieser Zellen stimuliert und sie tragen zur Leberregeneration bei [4].

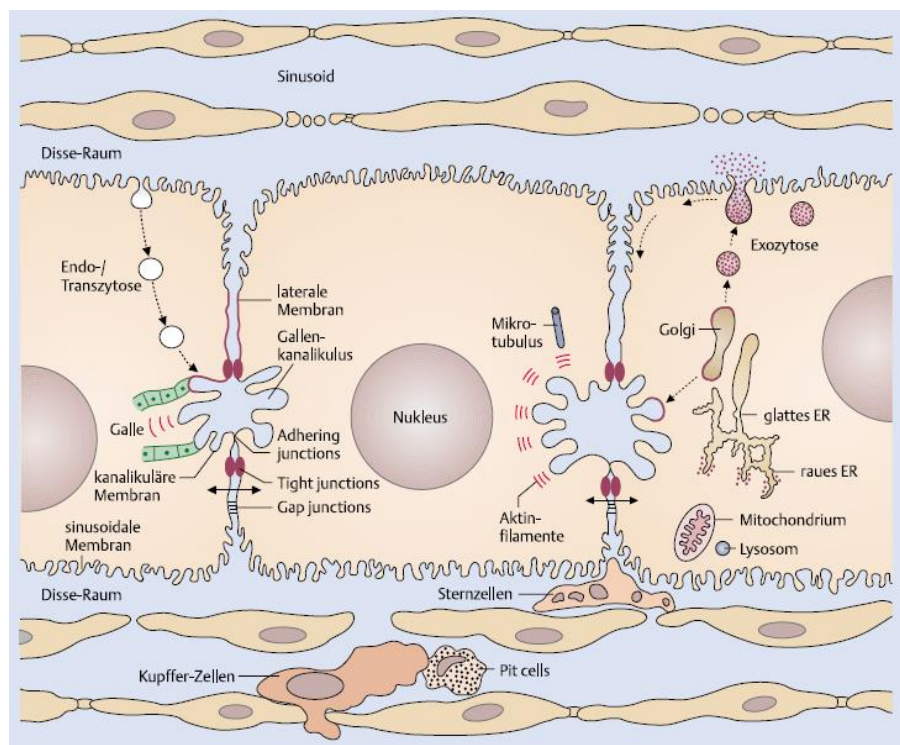


Abbildung 2. Ultrastruktur des Hepatozyten. Entnommen und angepasst von Siegenthaler et al [3].

Einleitung

Die Leber kann als das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels angesehen werden und hat vielfältige Aufgaben [5]. So hat sie wichtige Funktionen im Kohlenhydratstoffwechsel und ist für die Glukosehomöostase des Organismus verantwortlich. Sie nimmt Glukose und andere Monosaccharide auf, speichert sie in Form von Glykogen oder wandelt sie in Fettsäuren um. Wird vom Körper Glukose benötigt, spaltet sie gespeichertes Glykogen auf oder betreibt neben der Niere als einziges Organ die Glukoneogenese aus Laktat, Glycerin und glukogenen Aminosäuren.

Die wesentliche Funktion der Leber im Lipidstoffwechsel besteht im Abbau von Fettsäuren durch Betaoxidation und in der Synthese von Triglyzeriden, Phosphoglyzeriden und Sphingolipiden. Ebenfalls ist sie für die Synthese von VLDL-Lipoproteinen und die Bereitstellung von Cholesterin verantwortlich.

Im Rahmen des Protein- und Aminosäurestoffwechsels baut die Leber Aminosäuren ab und sorgt für die Bindung des giftigen Ammoniaks im Harnstoffzyklus. Des Weiteren synthetisiert sie den größten Teil der Plasmaproteine wie zum Beispiel Albumin oder die Akutphase-Proteine.

In der Leber werden nicht nur Glykogen und Triglyzeride gespeichert, sondern auch Vitamine und Spurenelemente. Neben dem fettlöslichen Vitamin A enthält die Leber große Mengen von wasserlöslichen Vitaminen wie Folsäure und Vitamin B. Als Spurenelemente sind Kupfer und Eisen zu nennen.

Eine der wichtigsten Aufgabe der Leber ist die Biotransformation und damit die Umwandlung von lipophilen Substanzen in wasserlösliche, ausscheidungsfähige Verbindungen. Endobiotika und Xenobiotika können somit über den Harn oder die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden.

Die Bildung der Gallenflüssigkeit erfolgt durch die Verarbeitung von überschüssigem Cholesterin zu primären Gallensäuren. Es erfolgt eine gerichtete Sekretion gallenpflichtiger Substanzen in die Gallencanaliculi, die sich zu immer größer werdenden Gallengängen vereinen bis letztendlich die Galle über den Ductus choledochus in den Darm abfließt.

1.2 Leberversagen

Aufgrund ihrer vielen Funktionen und ihrer zentralen Lage im menschlichen Funktionssystem kann die Leber von diversen Noxen getroffen werden. Ist dies nur über einen kurzen Zeitraum der Fall, ist eine *restitutio ad integrum* möglich, da die Leber über hohe Regenerationsfähigkeiten verfügt. Besteht diese Exposition jedoch dauerhaft, kann der kontinuierliche Leberzelluntergang zunächst zu einer Leberfibrose und im Anschluss zu einer Leberzirrhose führen.

Grundsätzlich wird zwischen einem akuten und einem chronischen Leberversagen unterschieden.

Eine akute Zellnekrose kann durch Sauerstoffmangel, Leberzellgifte, schwer verlaufende Infekte oder eine Vergiftung mit bakteriellen Endotoxinen hervorgerufen werden. Auslöser ist meistens eine schwere Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels mit Schädigung der Zellmembranen, wobei es zum Austritt zellulärer Bestandteile ins Blut kommt. Starke Gifteinwirkungen können einen nekrotischen Zelluntergang auslösen, wobei subkritische Schädigungen einen apoptotischen Zelltod hervorrufen. Die Übergänge sind hierbei fließend.

Die Regenerationsfähigkeit und somit Prognose nach einem akuten Leberversagen hängt vom Ausmaß des Leberzelluntergangs ab; ist dieser zu groß kann eine rasche Lebertransplantation nötig werden [4].

Häufige Ursachen einer chronischen Leberschädigung sind Alkoholabusus, chronische Virushepatitis, nichtalkoholische Steatohepatitis, Hämochromatose oder Morbus Wilson. Im Unterschied zu einer akuten Schädigung findet beim chronischen Leberversagen ein durch aktivierte Sternzellen ausgelöster fibrotischer Umbau der Leber statt. Diese Bindegewebeinlagerungen können zunächst als Wundheilungsantwort verstanden werden, jedoch führen sie bei Nichtbeendigung über eine Fibrose zu einer Zirrhose der Leber. Dies resultiert wiederum in einem Leberfunktionsverlust (z.B. Blutgerinnungsstörungen oder verminderte Albuminsynthese), einer Störung der Leberdurchblutung (portale Hypertension und Ausbildung von Varizen) und einer Einschränkung der Funktion anderer Organe (z.B. hepatische Enzephalopathie).

Da die Leber über eine große Reservekapazität zur Erfüllung ihrer vielfältigen Funktionen verfügt, ist erst eine Zerstörung von mehr als 80% der Parenchymzellen mit dem Leben nicht mehr vereinbar und eine Transplantation wird unumgänglich [4].

1.3 Leberersatz

Schafft es die Leber nicht durch Regeneration wieder einen funktionsfähigen Zustand zu erreichen, droht eine Leberinsuffizienz, die letztendlich für den Erkrankten letal verlaufen kann. Der Goldstandard bei der Therapie eines akuten oder chronischen Leberversagens ist nach wie vor die orthotope Lebertransplantation [6-9].

Ein großes Problem stellt jedoch der Organmangel dar. Die Organisation Eurotransplant meldete 14.560 aktive Patienten auf ihrer Warteliste zum Jahresanfang 2016. Im Jahr 2015 wurden aber nur knapp halb so viele Transplantationen durchgeführt [10]. Ähnliche Zahlen kommen auch aus den USA, wo das U.S. Department of Health 78.000 aktive Patienten auf der Warteliste verzeichnet denen 28.000 Transplantationen im Jahr 2015 gegenüber stehen [11].

Konnte ein Patient dennoch durch eine Transplantation eine neue Leber erhalten, so muss er lebenslang Medikamente zu sich nehmen, um in der Folge Komplikationen wie eine mögliche Abstoßungsreaktion zu unterbinden [12].

Aufgrund des Engpasses an Transplantationslebern wurden unterschiedliche Unterstützungssysteme entwickelt, die die Lebensdauer Betroffener verlängern sollen oder bei akutem Leberversagen sogar eine Ausheilung unterstützen können [13]. Derzeit gibt es diverse extrakorporale Systeme, die auf zwei Arten eine Leberdialyse durchführen können: zellfreie – artifizielle Verfahren oder zellbasierte – bioartifizielle Verfahren.

Klassische Dialyseverfahren, wie sie bei der Niereninsuffizienz zum Einsatz kommen, basieren auf der Entfernung von wasserlöslichen toxischen Stoffwechselprodukten aus dem Blut. Dies erfolgt meist im Hämodialyseverfahren unter der Verwendung von Aktivkohle, Kationentauschern oder Filtration und unterliegt dem Prinzip der Diffusion [14]. Da die Leber jedoch unter Normalfunktion eine Vielzahl von proteingebundenen Toxinen unschädlich

Einleitung

macht, wurden die Dialyseverfahren weiterentwickelt und um einen Albuminkreislauf ergänzt.

Etablierte Systeme sind unter anderem das Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS). Es verwendet ein Albumin-angereichertes Dialysat, das albumingebundene Toxine filtriert [15]. Während bei MARS das Albumin die eingesetzte Membran nicht passieren kann, basiert das Prometheus System auf einer Trennung von Albumin und Plasma [16]. Als weniger relevant sind noch die Systeme Single-Pass Albumin Dialysis (SPAD) und Open Albumin Dialysis (OPAL) zu nennen. Die genannten Systeme können zwar eine Unterstützung bieten, jedoch sind sie nicht fähig, Biotransformationsprozesse zu ersetzen.

Aufgrund dessen wird bereits seit einigen Jahren an der Entwicklung von bioartifiziellen Systemen (Bioartificial Liver – BAL) geforscht, die durch Einsatz von humanen oder xenogenen Hepatozyten die geschädigte Leber in metabolischen Funktionen und der Detoxifikation unterstützen sollen [13]. Im Gegensatz zu den zellfreien Verfahren, wird bei den BAL zum Teil mit frisch isolierten Hepatozyten gearbeitet, die mit Plasma oder Blut umspült werden. Damit die Hepatozyten sich möglichst natürlich ansiedeln und ihren Funktionen nachgehen, werden sie in einem Hohlfaser-Membran-Reaktor inkubiert. Trotz den verbesserten Überlebensraten sind die BAL ebenfalls nur für eine begrenzte Zeit einsetzbar.

Fand keine Restitution statt, sei es mit einem Dialyseverfahren oder mit einer BAL, bleibt für Patienten mit akutem und chronischem Leberversagen weiterhin nur eine Transplantation als Alternative übrig. Da die Organknappheit auch in Zukunft ein Problem darstellt, wird nach weiteren Wegen gesucht, um Patienten, die auf ein neues Organ warten, eine Lösung anzubieten. In diesem Zuge hat sich das Tissue Engineering entwickelt, „das als ein interdisziplinäres Feld gesehen werden kann, das die Prinzipien der Ingenieurskunst und der Naturwissenschaften anwendet, um biologische Substitute zu entwickeln, die eine Gewebefunktion ersetzen, wiederherstellen, erhalten oder verbessern“ [17].

1.4 Tissue Engineering der Leber

Im Bereich des Tissue Engineerings gibt es bereits große Erfolge in der Generierung von künstlich hergestellten Geweben auf der Basis von Kollagenen und humanen Zellen, wie zum Beispiel Haut, Knorpel, Luftröhren, Blutgefäße oder Harnblasen [18-20], die teilweise in der Klinik schon ihren Einsatz finden. Die künstliche Herstellung eines dreidimensionalen Organs erweist sich jedoch als deutlich schwieriger, da ein intaktes vaskuläres Netzwerk von Nöten ist, um einen Nährstoff- und Gasaustausch zu garantieren [21]. Als Alternative bieten sich hier tierbasierte Matrices an, aus denen bereits erfolgreich Blutgefäße und Darmschleimhäute durch Azellularisierung und Wiederbesiedelung hergestellt werden konnten [19, 22, 23]. Vor allem die Azellularisierung von ganzen Organen scheint eine vielversprechende Möglichkeit für die Generierung von extrazellulären Matrices (EZM) zu sein, die zur Organkonstruktion herangezogen werden können [24].

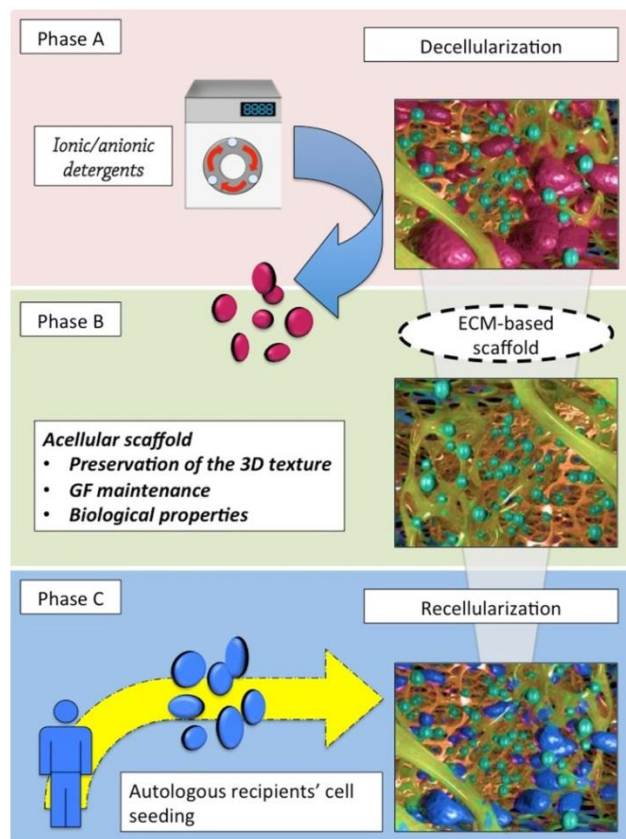


Abbildung 3. Grundlagen des Tissue Engineering. In Phase A werden native Zellen von der extrazellulären Matrix mit Hilfe von ionischen oder anionischen Detergenzien entfernt. Durch diesen Azellularisierungsprozess entstehen EZM basierte, dreidimensionale Gerüste unter Erhalt der organspezifischen Struktur. Ist das Gerüst intakt und somit verwendbar, findet eine Wiederbesiedelung mit Zellen des späteren Empfängers statt.

Gerüste, die direkt schon aus dem entsprechenden Organ, wie zum Beispiel der Leber gewonnen werden, sind eine ideale Umgebung für das Tissue Engineering, da sie die erforderliche Mikroarchitektur für eine Wiederbesiedelung bereits mitbringen. Des Weiteren können die vorhandenen vaskulären Strukturen zunächst zur Azellularisierung genutzt werden und anschließend für den Transport der Zellen zu allen Bereichen des Gerüsts dienen [25]. So können, in der Theorie, azellularisierte Lebern mit den autologen Zellen des Patienten wiederbesiedelt und transplantiert werden und damit die Gefahren von Immunreaktionen vermieden werden [26].

Den Grundstein für die Entwicklung einer künstlichen Leber aus Tierorganen legte die Gruppe um Uygun et al. mit der Azellularisierung einer kompletten Rattenleber und deren Wiederbesiedelung mit Hepatozyten [27]. Weitere Versuche der Azellularisierung von xenogenen Lebern erfolgten neben Ratten auch an Mäusen oder Frettchen [28-32]. Die erzielten Erfolge sind bereits beachtlich - um jedoch in der Zukunft ein transplantationsfähiges Organ für den Menschen zu erhalten, müssen die durch Tissue Engineering hergestellten Lebern von der Größe her der eines Menschen gleichen. Deswegen fokussieren sich in der neuesten Entwicklung die Forschergruppen auf Lebern, die vom Schwein oder Schaf stammen [26, 33-38]. Vor allem porcine Lebern bieten einen interessanten Ansatz, da das Hausschwein in großen Mengen zur Verfügung steht, es leicht zu züchten ist und genetische, anatomische und physiologische Übereinstimmungen mit dem Menschen herrschen [39]. Dazuhin wurde biologisches Material aus Schweinen bereits klinisch verwendet [40, 41]

Neben der Wahl des Tieres spielen die verschiedenen Azellularisierungsmöglichkeiten eine große Rolle. Für die Azellularisierung eines ganzen Organes, wie der Leber, haben sich vor allem Detergenzien wie das nichtionische Triton X-100 oder das ionische Natriumdodecylsulfat (SDS) bewährt [42]. Der Einsatz dieser Azellularisierungsmittel variiert jedoch sehr stark in Konzentration, Zeit und auch der Kombination (Tabelle 1).

Tabelle 1. Methoden zur Azellularisierung von Lebern aus verschiedenen Spezies.

Autor	Spezies	Zeit	Detergenzien
Uygun et al. [27]	Ratte, Leber	4 Tage	0,01% SDS 0,1% SDS 1% SDS 1% Triton X-100
Shupe et al. [43]	Ratte, Leber	6 h	1% Triton X-100 2% Triton X-100 3% Triton X-100 0,1% SDS
Bao et al. [28]	Ratte, Leberlappen	2 Tage	1% SDS 0,5% SDS 0,25% SDS 1% Triton X-100
Soto-Gutierrez et al. [29]	Ratte, Leber	2 Tage	3% Triton X-100 / 0,05% EGTA
Ren et al. [32]	Ratte, Leber	3,5 h	1% SDS 1% Triton X-100
Wang et al. [24]	Maus, Leber	6 h	1% SDS 1% Triton X-100
Baptista et al. [31]	Frettchen, Leber	-	1% Triton X-100
Barakat et al. [26]	Schwein, Leberlappen	> 4 Tage	0,25 % SDS 0,5% SDS
Park et al. [33]	Schwein, Leber	40 h	1% SDS
Yagi et al. [34]	Schwein, Leber	72 – 96 h	0,01% SDS 0,1% SDS 1% SDS 1% Triton X-100
Mirmalek-Sani et al. [44]	Schwein, Leber	-	1% Triton X-100 2% Triton X-100 3% Triton X-100 0,1% SDS
Kajbafzadeh et al. [38]	Schaf, Leber	Von 6 h bis zu 5 Tagen	0,5% Triton X-100 0,05% EDTA / 0,02% Trypsin 3% Triton X-100 4% SDS 0,1% Trypsin / 0,05% EDTA 0,5% Triton X-100 0,25% SDS 0,01% SDS 0,1% SDS 1% SDS

Tabelle 1 verdeutlicht, dass die Wahl und der Einsatz des Detergens komplett unterschiedlich sein können. Auch der zeitliche Aspekt variiert von Stunden bis zu Tagen, selbst innerhalb der gleichen Spezies.

Unabhängig von der Wahl des Detergens sollten nach der Azellularisierung vier Kriterien erfüllt sein, um ein potentielles Gerüst für das Tissue Engineering zu generieren [45]. So ist der Erhalt der EZM relevanten Bausteinen wie Kollagen und Glykosaminoglykane (GAGs) von großer Bedeutung. Des Weiteren darf kein mit H&E oder DAPI anzufärbendes, nukleäres Material mehr sichtbar sein. Ebenso sollte bei einer quantitativen Messung der DNA das Gewicht < 50 ng/mg Trockengewicht sein, wobei die Größe der DNA Fragmente unter 200 Basenpaare (bp) liegen muss.

Die Integrität der EZM ist von Bedeutung, da die verschiedenen Komponenten für das Zellüberleben sowie die Zelladhäsion und -differenzierung verantwortlich sind [46]. Das Beseitigen des nukleären Materials ist aufgrund einer sonst möglichen Immunreaktion des späteren Empfängers von Bedeutung [47, 48]. Sind all diese Kriterien erfüllt und konnte eine azellularisierte EZM einer porcinen Leber generiert werden, kann der nächste Schritt, die Wiederbesiedelung des Gerüsts mit Zellen, erfolgen.

Für das Tissue Engineering einer Leber können die Zellen aus drei unterschiedlichen Quellen stammen. Zum einen bieten sich primäre Zellen aus allogener oder xenogener Herkunft an. Zum anderen können Zelllinien herangezogen werden. Ebenfalls bieten sich Stammzellen für eine Wiederbesiedelung an.

Grundsätzlich können die Organgerüste in der Etablierungsphase zunächst mit den spezieeigenen Zellen wiederbesiedelt werden, bevor der Versuch gestartet wird, humane Zellen in xenogene Gerüste einzubringen. Da Hepatozyten 80% aller Leberzellen ausmachen, liegt es nahe, mit ihnen als primäre Zellen Wiederbesiedelungsversuche zu starten. Bleibt man innerhalb der Spezies, ist ihre Gewinnung auch weniger problematisch und besser planbar. Schwierig ist jedoch

die Proliferation von primären Zellen in in-vitro Kulturen [49]. Neben den Hepatozyten müssen zudem auch langfristig Nichtparenchymzellen in die Matrix eingebracht werden und die Gefäße sollten endothelialisiert werden. Zelllinien proliferieren zwar in-vitro, sind jedoch Tumorzellen und somit im späteren Verlauf für keine Transplantation geeignet.

Ein großes Potential könnten Progenitorzellen oder induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) mitbringen. Sie teilen sich in-vitro und können sich zudem weiter differenzieren. Schwierigkeiten könnten hier jedoch durch eine Hyperproliferation und somit Tumorbildung entstehen [50]. Ebenfalls rückt der ethische Konflikt in den Fokus, da Stammzellen oft aus Föten isoliert werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Azellularisierung von porcinen Lebern, sowie deren Wiederbesiedelung mit porcinen Hepatozyten.

Hierfür muss zunächst im ersten Schritt ein Azellularisierungsprotokoll mit dem Fokus auf einen kontrollierten, zeit- und ressourcensparenden Prozess etabliert werden.

Des Weiteren werden als Vorarbeit für die Wiederbesiedelung Zellkulturtests mit primären porcinen Hepatozyten in normalen Monolayern und mit EZM-Stücken durchgeführt und deren Zellfunktionen über verschiedene Parameter und Marker analysiert.

Im letzten Schritt erfolgt die Wiederbesiedelung von azellularisierten porcinen Lebergerüsten mit primären Hepatozyten und deren Langzeitkultur, sowie die Charakterisierung der Zellfunktionen über diverse Marker.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Minipigs	Ellegaard Göttingen Minipigs, Dalmose, DK
Deutsche Landrasse	Benz GbR, Bingen

2.1.2 Allgemeine Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterial

3-Wege-Hähne Discifix®	BBraun, Melsungen
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
BD Perfusion 50 ml Syringe	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA
Einmalhandschuhe	Hartmann AG, Heidenheim
Falcons (15 + 50 ml)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA
Glasgefäße	SCHOTT AG, Mainz
Injekt® 2 ml	BBraun, Melsungen
Laborflaschen	SCHOTT AG, Mainz
Mikroskop BH-2	Olympus, Tokio, JPN
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH&Co.KG, Staufen
Photometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
SpeedVac	Bachofer GmbH, Reutlingen
Vakuumfilter VacuCap	Pall Corporation, Port Washington, NY, USA
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zürich, CH

Wasserbad	BBraun, Melsungen
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
<u>Chemikalien</u>	
Aqua ad injectabilia, Ampuwa®	Fresenius, Bad Homburg
Ethanol reinst	Merck, Darmstadt
Isopropanol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn
Isotonische Kochsalzlösung (NaCl)	BBraun, Melsungen
Natriumhydroxidlösung (NaOH)	Merck, Darmstadt
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt

2.1.3 Azellularisierung einer porcinen Leber

Geräte und Verbrauchsmaterial

Analog-digital Wandler	Goldammer GmbH, Wolfsburg
Druckaufnehmer xtrans®	Codan pvb Medical GmbH, Lensahn
Gaze Streifen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glasaufsatz für Woulff'sche Flasche	Glasbläserei, Universität Tübingen
Infusionsleitung	BBraun, Melsungen
Infusionsverlängerung Astotube®	Stihler Electronic GmbH, Stuttgart
Infusionswärmer Astotherm® plus	Stihler Electronic GmbH, Stuttgart
Kristallisierschale 230 mm	VWR, Radnor, PA, USA
Ligaturfäden Silkam®	Aesculap AG&CO.KG, Tuttlingen
Nelatonkatheter	BBraun, Melsungen
Oliven	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
PC Programm DASyLab	Measurement Computing, Norton, MA, USA
Peristaltikpumpe Ismatec MCP	IDEX Health & Science, Wertheim
Peristaltikpumpe Ismatec IPC	IDEX Health & Science, Wertheim
Präparationsbesteck	Aesculap AG&CO.KG, Tuttlingen
Pumpenschlauch	IDEX Health & Science, Wertheim
Schraubkappen	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Material und Methoden

Schraubverschlusskappen	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Silikonschläuche	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Stuhlschachteln, Plastik	Büro & Papier, Korb
UV Messzelle, Single Path Monitor UV-1	Pharmacia, Stockholm, SWE
Verbindungsleitung CON-LINE	Oriplast GmbH, Neunkirchen
Verbindungsstücke Kunststoff	Maquet GmbH, Rastatt

Chemikalien

DNase	Sigma, St. Louis, MO, USA
Heparin, Liquemin	Hoffmann-La Roche, Basel, CH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tris HCl	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

2.1.4 Evaluierung der azellularisierten Matrices

a. DNA Quantität

Geräte und Verbrauchsmaterial

LPS Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Chemikalien

Tissue DNA Mini Kit	peqlab, Erlangen
---------------------	------------------

b. Kollagengehalt

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Shaker	Medgenix, Wevelgem, BEL

Chemikalien

Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
------------	---------------------------

Material und Methoden

Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Natriumchlorid (NaCl)	VWR, Radnor, PA, USA
Pepsin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Sirius Red Collagen Detection Kit	Chondrex, Redmond, WA, USA
Tris-Base	Sigma, St. Louis, MO, USA

c. Glykosaminoglykangehalt (GAGs)

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
---------------	--

Chemikalien

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, St. Louis, MO, USA
L-Cystein-hydrochlorid monohydrat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Papain	Sigma, St. Louis, MO, USA
Sulfated Glycosaminoglycan Assay	biocolor, Carrickfergus, UK

d. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)

Geräte und Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Einbettkassetten	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Färbekästen	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Urinbecher mit Schraubdeckel	Sarstedt, Nümbrecht

Chemikalien

Alkohol vergällt	Uniapotheke, Universität Tübingen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin-G-Lösung	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Formaldehyd 4%	Fischer GmbH & Co.KG, Saarbrücken
Mayers Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Pertex-Schnelleindeckmittel

Medite, Burgdorf

Xylol

Merck, Darmstadt

2.1.5 Hepatozytenisolation

Geräte und Verbrauchsmaterial

Analysesieb

neolab, Leonberg

Blasenfalle

Eigenbau, Universität Tübingen

Infusionsleitung

BBraun, Melsungen

Kristallisierschale

VWR, Radnor, PA, USA

Ligaturfäden Silkam®

Aesculap AG&CO.KG, Tuttlingen

Nelatonkatheter

BBraun, Melsungen

Nylon-Siebgewebe 100 µm

Roland Vetter Laborbedarf,
Ammerbuch

Peristaltikpumpe Ismatec MV

IDEX Health & Science, Wertheim

Präparationsbesteck

Aesculap AG&CO.KG, Tuttlingen

Pumpenschläuche

IDEX Health & Science, Wertheim

Zählkammer nach Neubauer

Karl Hecht GmbH & Co.KG,
Sondheim

Zellschaber

Costar, Cambridge, MA, USA

Chemikalien

Calciumchlorid (CaCl₂)

Merck, Darmstadt

Collagenase CLS II

Biochrom AG, Berlin

EGTA

Sigma, St. Louis, MO, USA

Heparin, Liquemin

Hoffmann-La Roche, Basel, CH

HEPES – Buffer (1M)

Biochrom AG, Berlin

Kaliumchlorid (KCl)

Merck, Darmstadt

MgCl₂·6H₂O

Merck, Darmstadt

NaCl

VWR, Radnor, PA, USA

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

Merck, Darmstadt

NaH₂PO₄·H₂O

Merck, Darmstadt

Natriumsulfat (Na₂SO₄)

Merck, Darmstadt

Trypanblau-Lösung

Biochrom AG, Berlin

2.1.6 Zellkultur

Geräte und Verbrauchsmaterial

Pasteur Pipetten	WU, Mainz
Mikroskop DM IRB	Leica, Bensheim
Multiwell 24 well	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA
CO ₂ Inkubator	Sanyo, Moriguchi, JPN

Chemikalien

Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Westfalen AG, Laichingen
Ceftriaxon	Dr. Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH, Ursensollen
Dexamethason	Sigma, St. Louis, MO, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin
Glucagon GlucaGen® HypoKit	Novo Nordisk, Bagsvaerd, DK
HEPES – Buffer (1M)	Biochrom AG, Berlin
Insulin Insuman® Rapid	Sanofi, Paris, F
N-Acetyl-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Williams` Medium E	Biochrom AG, Berlin

2.1.7 Wiederbesiedelung einer azellularisierten porcinen

Leber

Geräte und Verbrauchsmaterial

Analog-digital Wandler	Goldammer GmbH, Wolfsburg
Blutschlauch-Set für Dialyse	Gambro, Stockholm, SWE
DASYLab Version 11	Measurement Computing, Norton, MA, USA
Druckaufnehmer xtrans®	Codan pvb Medical GmbH, Lensahn
Glasaufsatz für Woulff'sche Flasche	Glasbläserei, Universität Tübingen
Infusomat® fmS	BBraun, Melsungen
Infusomat®-Leitung	BBraun, Melsungen
Kristallisierschale 230 mm	VWR, Radnor, PA, USA

Material und Methoden

Ligaturfäden Silkam®	Aesculap AG&CO.KG, Tuttlingen
Nelatonkatheter	BBraun, Melsungen
Oxygenator HILITE® 800 LT	medos Medizintechnik AG, Stolberg
PC Programm DASyLab	Measurement Computing, Norton, MA, USA
Peristaltikpumpe Ismatec IPN	IDEX Health & Science, Wertheim
Peristaltikpumpe Ismatec MCP	IDEX Health & Science, Wertheim
Pumpenschlauch	IDEX Health & Science, Wertheim
Silikonschläuche	Fisher Scientific, Schwerte
Stuhlschachteln, Plastik	Büro & Papier, Korb
Verbindungsleitung CON-LINE	Oriplast GmbH, Neunkirchen
Verbindungsstücke Kunststoff	Maquet GmbH, Rastatt

Chemikalien

Ceftriaxon	Dr. Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH, Ursensollen
Dexamethason	Sigma, St. Louis, MO, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin
Glucagon GlucaGen® HypoKit	Novo Nordisk, Bagsvaerd, DK
HEPES – Buffer (1M)	Biochrom AG, Berlin
Insulin Insuman® Rapid	Sanofi, Paris, F
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	Westfalen AG, Laichingen
N-Acetyl-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Williams` Medium E	Biochrom AG, Berlin

2.1.8 Funktionstests in verschiedenen Zellkulturen

a. Albuminsekretion

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen

Chemikalien

Albumin FS Kit DiaSys Diagnostic Systems GmbH,
Holzheim

Bovine Serum Albumin (BSA) Fraktion V Hoffmann-La Roche, Basel, CH

TruLab N DiaSys Diagnostic Systems GmbH,
Holzheim

b. Harnstoffbildung

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen

Chemikalien

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) Merck, Darmstadt

Urea Nitrogen Direct Stanbio, Boerne, TX, USA

c. Galaktoseelimination

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen

Chemikalien

Galaktose Sigma, St. Louis, MO, USA

Laktose/ D-Galaktose Kit Hoffmann-La Roche, Basel, CH

d. 7-Hydroxycumarin-Deethylase (ECOD) Aktivität

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Fluoreszenz Messer Cyto Fluor II	PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA

Chemikalien

7-Ethoxycumarin	Sigma, St. Louis, MO, USA
7-Hydroxycumarin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Glyzin	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumhydroxidplätzchen	Merck, Darmstadt

e. Zellviabilitätstest

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
---------------	--

Chemikalien

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn

f. Aspartat-Aminotransferase (ASAT)

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Ultraschall-Homogenisator	Branson, Heusenstamm

Chemikalien

ASAT FS Kit	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim
-------------	---

TruLab N
DiaSys Diagnostic Systems GmbH,
Holzheim

2.1.9 Immunhistologie

Geräte und Verbrauchsmaterial

Dako-Pen
Dako, Hamburg
SuperFrost® Plus Objektträger
R. Langenbrinck, Emmendingen
Dampfkochtopf

Chemikalien

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Substrate Kit Vector Laboratories, Burlingame,
CA, USA
Antibody Diluent
Dako, Hamburg
Bovine Serum Albumin Fraktion V
Hoffmann-La Roche, Basel, CH
Citronensäure-Monohydrat (C₆H₈O₇)
Merck, Darmstadt
Goat serum
Dako, Hamburg
Isotypcontrol mouse IgG1: X 0931
Dako, Hamburg
Mayers Hämalan-Lösung
Merck, Darmstadt
Monoklonal mouse anti human Ki-67
Dako, Hamburg
Antigen
Pertex-Schnelleindeckmittel
Medite, Burgdorf
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C₆H₅Na₃O₇x2H₂O) CarlRoth GmbH & Co.KG,
Karlsruhe
Tween® 20
Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)
AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylol
Merck, Darmstadt
ZytoChem Plus Horseradish Peroxidase
ZytoMed Systems GmbH, Berlin

2.2 Methoden

2.2.1 Azellularisierung einer porcinen Leber

Hepatektomie

Für die Azellularisierung von Schweinelebern wurde zunächst eine Hepatektomie bei weiblichen Göttinger Minipigs ($n = 10$, 24 ± 1 kg) durchgeführt, die im Rahmen eines Forschungsprojektes der urologischen Abteilung des Universitätsklinikums mit Ketamin (7 ml/kg Körpergewicht) und einer kombinierten Medikation von Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid (T 61 Injektionslösung, 6 ml/50 kg Körpergewicht) euthanasiert wurden. Um eine Blutgerinnung zu vermeiden, wurde den Tieren Heparin (100 IU/kg Körper Gewicht) injiziert. Für die Entnahme der Leber wurden die vordere und hintere Hohlvene, sowie die Pfortader, die Leberarterie und der Gallengang durchtrennt. In die Pfortader wurde ein Nelathon-Katheter eingeführt und fixiert, um das Organ direkt nach der Entnahme mit durchschnittlich 3 l einer isotonischen Kochsalzlösung spülen zu können. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lebern bei -80°C gelagert.

Herstellung der Lösungen

- PBS Lösung: PBS Dulbecco Instamed 9,55 g/L in 10 l dH₂O lösen und anschließend in eine 10 l Flasche steril filtrieren.
- SDS Lösung: 100 g SDS Pellets in 10 l dH₂O lösen und anschließend in eine 10 l Flasche steril filtrieren.
- DNase Lösung: 50 mM Tris HCL und 10 mM MgCl₂x6H₂O in 2 l dH₂O, pH auf 7,5 einstellen und anschließend in eine 2 l Flasche steril filtrieren. Auf 37°C im Wasserbad erhitzen und kurz vor Verwendung 100 mg DNase I dazu geben.

Computersteuerung

Der gesamte Azellularisierungsprozess wurde mit Hilfe von DASyLab, einer Mess-, Steuer- und Regelungssoftware für Windows Betriebssysteme, gesteuert. Messsignale wurden an ein Messsystem weitergeleitet, das wiederum via USB an den Steuerungscomputer angebunden war. Die übermittelten Daten wurden mittels DAYSLab verarbeitet und ein Steuerungssignal wurde an die Pumpe

zurückgeschickt, deren Umdrehungsgeschwindigkeit so reguliert werden konnte. Ebenfalls wurden die minütlich erfassten Messwerte (Proteingehalt, Druck, Flussrate und Pumpenumdrehung) in ein Excel-Blatt übertragen.

Die Regelungskreisläufe wurden größtenteils bereits im Rahmen der Bachelorarbeit von David Ankele entwickelt und vorgestellt (Abb. 4) [51]. Veränderungen wurden lediglich bei der Protein- und Druckmessung vorgenommen, das Grundgerüst der Steuerungsmechanismen blieb erhalten.

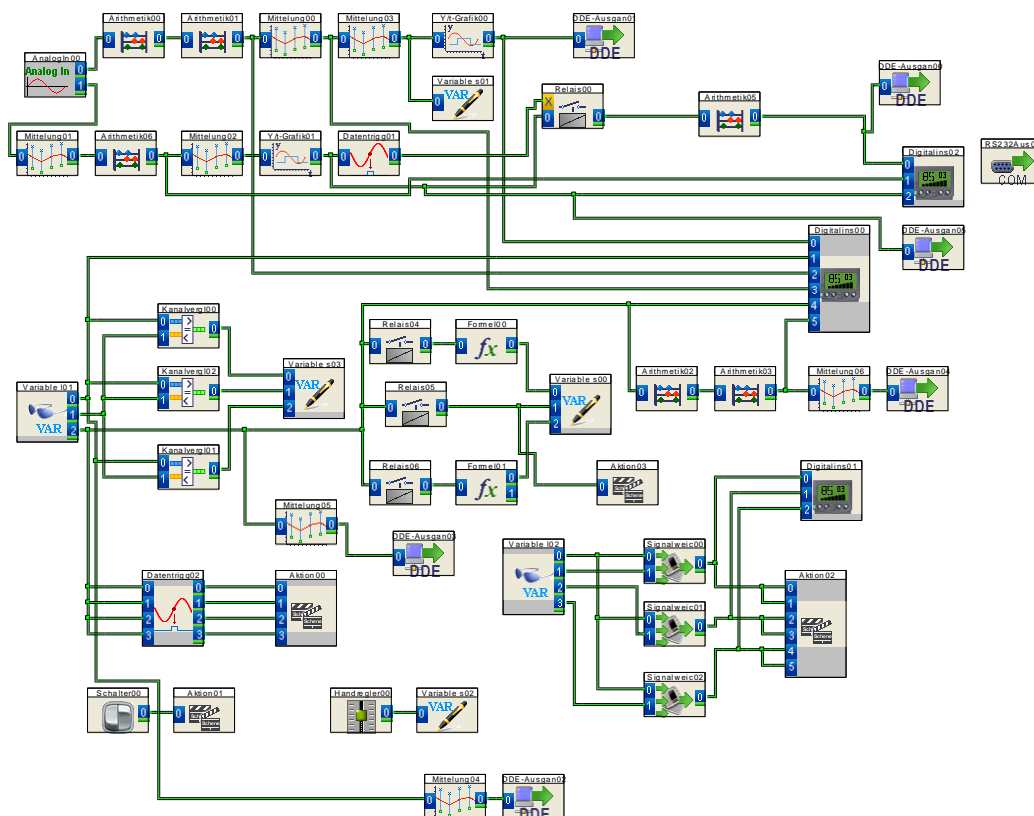


Abbildung 4. Regelungskreisläufe, die die Grundlage der Steuerungsmechanismen in DASyLab bilden.

Um den Azellularisierungsprozess entsprechend zu überwachen bietet die Software verschiedene Oberflächen, die Soll- und Ist-Werte aufzeigen sowie die Steuerung der Pumpe zulassen. Entscheidend ist hier die Möglichkeit, einen bestimmten Druck vorzugeben, der durch die Veränderung der Umdrehungszahl der Pumpe konstant über einen langen Zeitraum gehalten werden kann.



Abbildung 5. Überwachungs- und Steuerungsoberflächen von DASyLab, mit denen der portale Druck geregelt sowie Proteinkonzentration, Soll- und Ist-Druck und die Flussrate abgelesen werden kann.

Die grafische Darstellung des Proteingehaltes in Excel zeigte, wann eine Sättigung erreicht wurde und somit die SDS-Lösung erneuert werden musste.

Versuchsaufbau

Die folgende Skizze veranschaulicht den Aufbau für die Azellularisierung der porcinen Lebern.

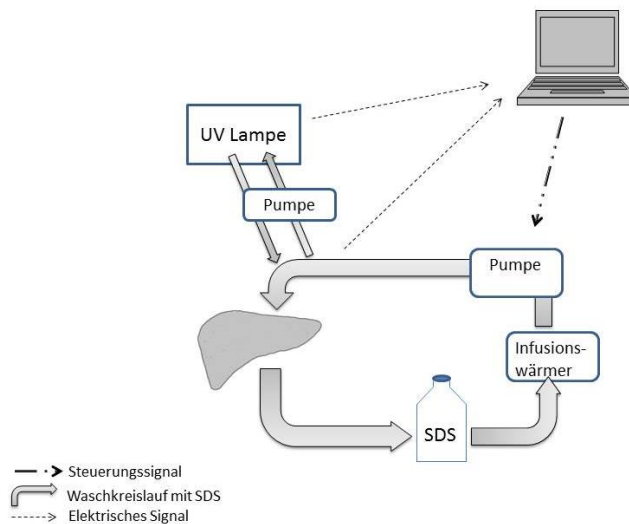


Abbildung 6. Versuchsaufbau zur Azellularisierung von porcinen Lebern. Durch einen zirkulierenden Kreislauf wird die Leber kontinuierlich und unter ständiger Kontrolle des Druckes mit einer 1%igen SDS-Lösung gespült. Die Proteinkonzentration der Spüllösung wird mittels einer UV-Lampe gemessen.

Für die Azellularisierung wurde die Leber zunächst bei 4°C und anschließend bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, bevor sie in eine Kristallisierschale gelegt und mit 10 l PBS gespült wurde. Anschließend wurde sie an einen zirkulierenden Waschkreislauf angeschlossen. Eine 10 l Glasflasche wurde als Vorlagenbehälter für die SDS Lösung verwendet, die mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe durch das gesamte System und die Leber gepumpt wurde. Um die SDS-Lösung auf 37°C zu erwärmen, wurde der Pumpe ein Infusionswärmer vorgeschaltet.

Um die Proteinmenge in der SDS Lösung zu bestimmen, wurde vor der Leber ein Bypass angelegt, durch den kleine Lösungsmengen mit Hilfe einer Pumpe durch eine UV-Zelle und wieder zurück in die Kristallisierschale gepumpt wurden. An dieser Abzweigstelle fand ebenfalls die Druckmessung durch einen an die Druckmesszelle angeschlossenen, mit Wasser gefüllten Schlauch in der nicht SI-konformen Einheit Meter Wassersäule (mWS) statt. Die ermittelte optische Dichte (OD) wurde als elektrisches Signal an den angeschlossenen Laptop übermittelt und dort mit Hilfe von hinterlegten BSA-Eichreihen in dem Programm DASYLab in mg Protein/ml SDS-Lösung umgerechnet. Ebenfalls wurde der Druck in Form eines elektrischen Signals über die Messzelle an den Laptop übermittelt und als mmHg in der Kontrolloberfläche wiedergegeben.

Grundsätzlich erfolgte die Spülung mit SDS in einem geschlossenen Kreislauf, wie auf Abb. 6 zu sehen ist. Für die Spülvorgänge mit PBS wurde die Flüssigkeit jedoch nach der Kristallisierschale in einem 5 l Erlenmeyerkolben aufgefangen und anschließend verworfen.

Nach folgendem Protokoll wurden die Lebern in dem vorgestellten System azellularisiert.

Tabelle 2. Azellularisierungsprotokoll für porcine Lebern

1 h mit PBS Spülen bei 20 mmHg
Kreislauf mit 37°C warmer, 1%-iger SDS Lösung für ca. 24 h bei 20 mmHg, unterbrochen von einem Waschschrift mit PBS beim Flaschenwechsel
Kreislauf mit 37°C warmer DNase Lösung für 2 h (n=5)
Nachspülen mit PBS und Konservierung bei -80°C

Von den 10 Lebern wurden nur 5 mit der DNase Lösung behandelt, um die Effektivität und den Nutzen dieses weiteren Schrittes vergleichen zu können.

2.2.2 Evaluierung der azellularisierten Matrices

Um die Effektivität des vorgestellten Azellularisierungsprotokolls, aber auch die Aggressivität in Bezug auf die Bausteine der EZM zu überprüfen, wurden die Lebermatrices auf ihren DNA-, Kollagen- und Glykosaminoglykgehalt untersucht, sowie eine histologische Zellfärbung durchgeführt, um eventuell nicht zerstörte Zellkerne und DNA zu erkennen.

Hierfür wurde neben den azellularisierten Lebern natives Lebergewebe mitverarbeitet. Zusätzlich wurden die Proben immer aus drei verschiedenen Regionen pro Leber entnommen.

a. DNA – Quantität

Das Ziel der Azellularisierung ist die komplette Entfernung von zellulären Bestandteilen. DNA Reste könnten bei einer späteren Transplantation eine Immunreaktion auslösen, weswegen ihre Elimination sehr wichtig ist.

Versuchsdurchführung

Pro Leber wurde aus drei verschiedenen Regionen 20 mg Gewebe von nativen und 200 mg Gewebe von azellularisierten Lebern in sterile 1,5 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit sterilem Besteck zerkleinert.

Zu den zerkleinerten Gewebeproben wurden jeweils 400 µl DNA Lysepuffer T, 20 µl Proteinase K und 15 µl RNase A (20 mg/ml) zugegeben und kurz gevortext. Es erfolgte eine Inkubation bei 50°C im Schüttelwasserbad für mindestens eine Stunde. Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 Sekunden bei 10.000 g wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 200 µl DNA-Bindepuffer zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde auf eine PerfectBind DNA Säule, die in einem 2 ml Sammelröhrchen steckte, geladen. Die Säule wurde im Röhrchen für zwei Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und der Säulendurchfluss wurde verworfen. Es erfolgten zwei Waschschritte mit jeweils 650 µl DNA Waschpuffer und einem Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 10.000 g. Die PerfectBind DNA Säule wurde anschließend in ein frisches 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gesteckt und 200 µl Elutionspuffer wurden auf die Matrix

pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten bei RT wurden die Säulen in den Röhrchen erneut für eine Minute bei 6.000 g zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde 1:10 mit dH₂O verdünnt und bei 260 und 280 nm mit dem Photometer gemessen.

b. Kollagengehalt

Kollagen ist ein wichtiger Baustein der EZM und für deren Stabilität und Struktur verantwortlich. Auf Grund dessen ist ein Erhalt von Kollagenfasern in der azellularisierten Matrix von großer Bedeutung.

Testprinzip

Der EZM-Baustein Kollagen wurde mit Hilfe einer angesäuerten Pepsinlösung in Lösung gebracht und mit Sirius Red angefärbt.

Herstellung der Lösungen

Pepsin-Lösung: 1 mg/ml in 0,05 M Essigsäure

FCS Puffer: 0,1 M Tris-Base und 0,15 M NaCl in FCS ansetzen, pH mit 6 N HCl auf 7,5 einstellen.

Versuchsdurchführung

Als Einsatz für die Kollagenextraktion wurden je 100 mg Gewebe von azellularisierten und nativen Lebern benötigt. Zu dem abgewogenen Gewebe wurden jeweils 1 ml 0,05 M Essigsäure und 100 µl Pepsinlösung zugegeben und für 48 Stunden auf einem Schüttler im Kühlschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Proben ab und zu gevortext. Nach den 48 Stunden wurden die Proben für drei Minuten bei 9.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, das für eine Stunde mit FCS-Puffer vorbehandelt wurde. Erneut wurden zu jeder Probe 1 ml 0,05 M Essigsäure und 100 µl Papainlösung zugegeben und für weitere 24 Stunden auf einem Schüttler im Kühlschrank inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von drei Minuten bei 9.000 g wurde der Überstand abgenommen und zu dem bereits einen Tag zuvor gewonnenen dazugeben.

Der mitgelieferte Standard wurde nach folgendem Schema verdünnt.

Tabelle 3. Pipettierschema für die Standardreihe der Kollagenbestimmung

	Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	
S1	500	500 μl Standard
S2	250	250 μl von S1 + 250 μl 0,05 M Essigsäure
S3	125	250 μl von S2 + 250 μl 0,05 M Essigsäure
S4	62,5	250 μl von S3 + 250 μl 0,05 M Essigsäure
S5	31,25	250 μl von S4 + 250 μl 0,05 M Essigsäure
S6	15,63	250 μl von S5 + 250 μl 0,05 M Essigsäure
S7	7,81	250 μl von S6 + 250 μl 0,05 M Essigsäure

Im Duplikat wurden nun 100 μl des Blanks (0,05 M Essigsäure), der Standards und der Proben in neue 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zugabe von 500 μl Sirius Red-Lösung wurden die Proben für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für drei Minuten bei 9.000 g. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, ohne das Pellet zu zerstören, und 500 μl Waschlösung wurden zugeben. Nach Resuspension des Pellets wurde erneut für drei Minuten bei 9.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und 250 μl Extraktionspuffer wurden jedem Pellet zugegeben. Sobald sich das Pellet gelöst hatte, wurden 200 μl in eine Vertiefung einer 96er-Lochplatte pipettiert und bei 520 nm im Photometer gemessen.

c. Glykosaminoglykangehalt

Neben Kollagen sind auch die Glykosaminoglykane wichtige Bausteine der EZM, weswegen ihr Erhalt in der azellularisierten Matrix ebenfalls von Bedeutung ist.

Testprinzip

Die GAGs aus den Leberstückchen wurden zunächst mit Hilfe von Papain in Lösung gebracht und anschließend mit 1,9-Dimethylmethylenblau angefärbt.

Herstellung der Lösungen

Papainextraktionsreagenz: 50 ml 0,2 M Natriumphosphatpuffer mit einem pH von 6,4 herstellen. Anschließend Zugabe von 400 mg Natriumacetat, 200 mg EDTA, 40 mg L-Cysteinhydrochlorid monohydrat und 250 μl Papain.

Versuchsdurchführung

Für die Bestimmung des GAGs Gehalt in azellularisierten und nativen Lebern wurden 20-50 mg Gewebe in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Zu jedem abgewogenen Gewebestückchen wurde 1 ml des hergestellten Papainreaktionsreagenzes gegeben und im Heizblock oder Wasserbad bei 65°C unter gelegentlichem Schütteln mindestens drei Stunden verdaut. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10.000 g für zehn Minuten wurde der Überstand in neue Zentrifugenröhrchen überführt und zum Assay eingesetzt.

Für die Standardreihe wurde der mitgelieferte Standard nach folgendem Schema verdünnt.

Tabelle 4. Pipettierschema für die Standardreihe der GAGs Bestimmung

	Konz	
S1	5 µg	50 µl Standard + 50 µl dH ₂ O
S2	4 µg	40 µl Standard + 60 µl dH ₂ O
S3	3 µg	30 µl Standard + 70 µl dH ₂ O
S4	2 µg	20 µl Standard + 80 µl dH ₂ O
S5	1 µg	10 µl Standard + 90 µl dH ₂ O

Der Überstand der nativen Proben wurde mit dH₂O 1:2 und 1:5 verdünnt, der der extrazellulären Matrices 1:15 und 1:20. Als Blank wurden 100 µl des Papainextraktionsreagenzes eingesetzt. Zu der Standardreihe, den Proben und dem Blank wurden 1000 µl Blyscan-Farbreagenz zugeben und anschließend unter regelmäßigem Invertieren 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von zehn Minuten bei 10.000 g wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, so dass die Pellets nicht verloren gingen. Überschüssige Flüssigkeitströpfchen konnten mit einem Wattestäbchen aufgenommen werden. Zu jedem Pellet wurden 500 µl Dissoziationsreagenz zugegeben und so lange gevortext, bis sich der gebundene Farbstoff vollständig gelöst hatte. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 10.000 g für fünf Minuten, um den Schaum zu entfernen.

Für den Assay wurden 200 µl Probe in Doppelbestimmung in je eine Vertiefung einer 96-Lochplatte pipettiert und bei 630 nm im Photometer gemessen.

d. Hämatoxylin – Eosin – Färbung

Der Erhalt der honigwabenartigen Struktur der Leberläppchen mit gleichzeitiger Entfernung alles zellulären Materials lässt sich mit einer H&E-Färbung nachweisen. Diese Färbung ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung, um Zellkerne und Zellbestandteile darzustellen.

Testprinzip

Der positiv geladene Farbstoff Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie Zellkerne und DNA blau, während der negativ geladene Farbstoff Eosin kationische Verbindungen wie das Zellplasma rot färbt.

Versuchsdurchführung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von nativen und azellularisierten Lebern verwendet. Zum Entparaffinieren und Rehydratisieren wurden folgende Schritte vorgenommen.

Tabelle 5. Entparaffinieren von Gewebeschnitten

3x Xylol	Jeweils drei Minuten
2x 100% Ethanol	Jeweils drei Minuten
1x 96% Ethanol	Drei Minuten

Für die Färbung wurden die Schnitte für zehn Minuten in eine 1:10 verdünnte Mayers Hämalaun-Lösung gegeben, anschließend für acht Minuten mit Leitungswasser gebläut und für maximal zwei Minuten in eine Eosin-G-Lösung getaucht. Zum Entwässern der Schnitte wurde eine aufsteigende Alkoholreihe nach folgendem Schema verwendet.

Tabelle 6. Entwässern von H&E gefärbten Gewebeschnitten

70% Ethanol	Zwei Minuten
96% Ethanol	Zwei Minuten
2x 100% Ethanol	Jeweils zwei Minuten
2x Xylol	Jeweils zwei Minuten

Nach dem Entwässern wurden die Schnitte mit Pertex eingedeckt.

2.2.3 Hepatozytenisolation

Die Präparation der Hepatozyten aus einem Schweineleberlappen wurde in Anlehnung an die Vorschrift zur Hepatozytenisolation aus Rattenlebern von Seglen [52] mit den Modifikationen von Sies [53] durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Zerstörung der extrazellulären Matrix mittels Perfusion mit Kollagenase und die damit verbundene Herauslösung der Hepatozyten aus dem Zellverband.

Herstellung der Lösungen

- Stammlösung A: 2,3 M NaCl in dH₂O
B: 0,5 M NaHCO₃ in dH₂O
C: 0,118 M KCl, 23,6 mM MgCl₂·6H₂O, 24,6 mM NaH₂PO₄·H₂O und 23,9 mM Na₂SO₄ in dH₂O
D: 50 mM CaCl₂ in dH₂O

Alle Stammlösungen werden steril filtriert

EGTA Lösung: 38,4 g EGTA in 70 ml dH₂O geben, solange NaOH Plätzchen dazugeben bis sich das EGTA löst, mit dH₂O auf 100 ml auffüllen und steril filtrieren

Perfusionslösung 1: Zu jeweils 50 ml der Stammlösungen A, B und C werden 2 ml EGTA-Lösung und 20 ml HEPES-Puffer gegeben. Anschließend mit dH₂O auf 1 l auffüllen, pH mit 1 M NaOH auf 7,4 einstellen und steril filtrieren

Perfusionslösung 2: Zu jeweils 50 ml der Stammlösungen A, B und C werden 20 ml HEPES-Puffer und 50 ml Stammlösung D gegeben. Anschließend mit dH₂O auf 1 l auffüllen, pH mit 1 M HCl auf 7,2 einstellen und steril filtrieren

Die Perfusionslösungen wurden eine Stunde im Wasserbad auf 41°C temperiert und während dieser Zeit mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

Verdauungslösung: 200 mg Kollagenase werden in 200 ml, mit Carbogen begast und auf 41°C erwärmter Perfusionslösung 2 gelöst. Herstellung sollte erst unmittelbar vor der Perfusion erfolgen.

Für die Isolierung von Hepatozyten wurde ein Leberlappen aus einem deutschen Landrasseschwein verwendet. Unmittelbar nach der Entnahme wurde ein Katheter in einen Portalvenenzweig eingeführt und mit Klemmen fixiert, um den Lappen mit 500 ml kalter Perfusionslösung 1 zu perfundieren und blutleer zu bekommen. Anschließend wurde der Lappen an einen zirkulierenden Kreislauf angeschlossen und mit der Verdauungslösung für ca. eine Stunde perfundiert. Die Perfusionszeiten variierten je nach Größe des Lappens.

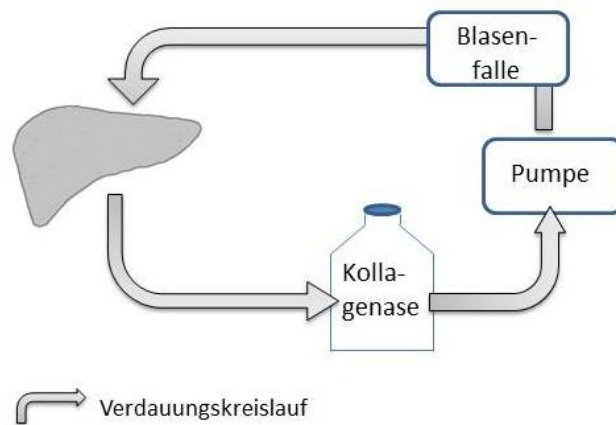


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Hepatozytenisolierung aus einem Leberlappen. Der Verdau des Gewebes wird durch eine zirkulierende Spülung mit einer Kollagenase-Lösung eingeleitet.

Sobald die EZM des Leberlappens auf Druck nachgab, konnte der Lappen zerschnitten und das Zellmaterial vorsichtig mit einem Zellschaber aus dem Verband ausgestrichen und in Perfusionslösung 2 aufgenommen werden. Die isolierten Hepatozyten wurden durch Filtration (Durchmesser: 100 μm) von Bindegewebsresten befreit. Je nach weiterer Verwendung wurden sie drei- oder achtmalig im Kühlschrank sedimentiert und erneut in Perfusionslösung 2 aufgenommen. Die Ausbeute und der Anteil vitaler Hepatozyten wurden durch Trypanblauausschluss bestimmt.

2.2.4 Zellkulturen unter verschiedenen Bedingungen

Für die Zellkulturen wurden zwei verschiedene Umwelten und Bedingungen für die Hepatozyten geschaffen. Neben einem normalen Monolayer auf unbeschichteten 24-Lochplatten wurde eine 3-D-Struktur herangezogen. Dafür wurden ca. 1 cm^2 große Stücke der azellularisierten Matrices verwendet.

Herstellung der Lösungen

Nährmedium: Das Williams' Medium E mit 0,01 mg/ml Gentamycin, 1,6 µg Dexamethason, 9,1 pg/ml Glucagon, 0,125 U/ml Insulin, 20 mM HEPES, 10% FCS und 0,8 mg/ml Ceftriaxon Hexal versetzen.

Die EZM wurde für eine Nacht mit Nährmedium im CO₂-Inkubator inkubiert, bevor eine Aussaat der Zellen stattfand.

Für die Aussaat wurden die frisch isolierten porcinen Hepatozyten nach dreimaligem Absetzen verwendet. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde für die verschiedenen Kulturbedingungen jeweils eine Zellzahl von $3,2 \times 10^5$ pro ml verwendet. Da der Monolayer und die EZM in 24-Lochplatten kultiviert wurden, wurde hier jeweils 1 ml Medium mit entsprechender Zellzahl zugegeben. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach 24 h, dann in regelmäßigen Abständen von 72 h.

Neben den unter 2.2.6 beschriebenen Funktionstests, die in den Zellkulturen durchgeführt wurden, wurde zusätzlich in bestimmten Abständen eine mit Zellen inkubierte EZM in 4% Formalin fixiert und eine H&E Färbungen (s. 2.2.2 d) durchgeführt.

2.2.5 Wiederbesiedelung einer azellularisierten porcinen Leber

Für die Wiederbesiedelung wurde eine Lebermatrix verwendet, die nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode azellularisiert wurde. Die verwendeten Hepatozyten wurden für diesen Versuchsteil achtmal abgesetzt, um mögliche Rückstände von Kollagenase, die die extrazelluläre Matrix andauern könnten, zu vermeiden.

Herstellung der Lösungen

PBS Lösung: PBS Dulbecco Instamed 9,55 g/l in 10 l dH₂O lösen und anschließend in eine 10 l Flasche steril filtrieren.

Nährmedium: Das Williams' Medium E mit 0,01 mg/ml Gentamycin, 1,6 µg Dexamethason, 9,1 pg/ml Glucagon, 0,125 U/ml Insulin, 20 mM HEPES, 10% FCS und 0,8 mg/ml Ceftriaxon Hexal versetzen.

Versuchsdurchführung

Die extrazelluläre Matrix wurde nach einem schonenden Auftauprozess in die Kristallisierschale gelegt, bevor ein weiterer Katheter in die vordere Vena cava eingeführt und fixiert wurde. Über diesen Zugang erfolgte zunächst eine Spülung mit 10 l PBS, um mögliche Überreste des Detergens aus dem Azellularisierungsprozess zu beseitigen. Anschließend erfolgte eine zirkulierende Perfusion mit Nährmedium mit einem Portaldruck von 20 mmHg. Damit die Perfusion mit einem konstanten Druck ablief, wurde wie bereits bei der Azellularisierung das Programm DASyLab verwendet (s. Abschnitt 2.2.1). Um eine ausreichende Oxygenierung des Mediums zu erreichen, wurde das Medium durch einen Oxygenator geleitet, in dem es ebenfalls mit Hilfe eines Wasserdurchflusses auf 38°C erwärmt wurde. Die Oxygenierung erfolgte mit Druckluft und CO₂, was gleichzeitig zur Regulierung des pH-Wertes diente.

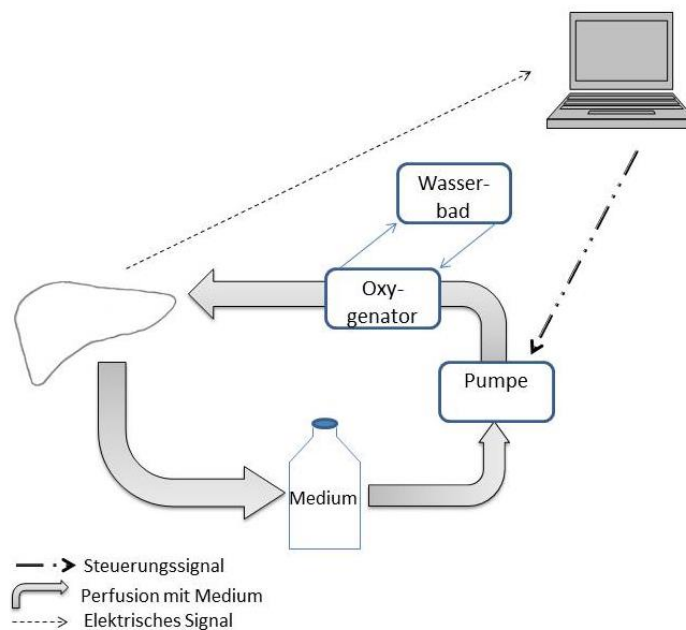


Abbildung 8. Aufbau zur Wiederbesiedelung einer azellularisierten porcinen Matrix. Die EZM wird kontinuierlich, bei gleichbleibendem Druck mit oxygeniertem, temperiertem Medium perfundiert.

Nach einer Perfusionsdauer von ca. einer Stunde und einer korrekten Einstellung des pH-Wertes mit Hilfe der CO₂ Zufuhr, konnten die isolierten Hepatozyten injiziert werden. Hierfür wurden sie in 200 ml Medium aufgenommen und nach dem Infusionsprotokoll von Soto-Gutierrez et al. [29] in vier Schritten mit Intervallen von jeweils zehn Minuten dem Kreislauf kurz vor der Leber zugegeben. Nach der Infusion der Zellen wurde der portale Druck auf 12-15 mmHg reduziert. Mit Hilfe einer Blutgasanalyse (BGA) wurden regelmäßig die Wachstumsbedingungen überwacht und gegebenenfalls optimiert. Nach einer Laufzeit von je 48, 72 und 96 Stunden wurden Schnitte der wiederbesiedelten Regionen entnommen und für eine H&E-Färbung oder Immunhistologie in Formalin fixiert.

2.2.6 Funktionstests in verschiedenen Zellkulturen

Um die Zellaktivität von isolierten Hepatozyten in Zellkulturen oder in einer wiederbesiedelten Extrazellulären Matrix zu überprüfen, wurden die folgenden sechs Funktionstests durchgeführt. Da im Rahmen der Wiederbesiedelung nur ein Test durchgeführt werden konnte, lag hier der Fokus auf der Galaktoseelimination und der Albuminsekretion. Grundsätzlich wurden die Tests in den Zellkulturen an den Tagen 3, 6, 12 und 21 nach Einsaat durchgeführt.

a. Albuminsekretion

Jede aktive Leberzelle sezerniert Albumin, ein zentral wichtiges Blutplasma Protein. Die Synthese von Albumin ist insofern ein interessanter Marker für die Zellaktivität.

Testprinzip

Um Albumin zu detektieren, wird Bromkresolgrün verwendet, das in der Anwesenheit von Albumin einen Farbwechsel von gelb-grün nach grün-blau vollzieht. Dieser Farbwechsel lässt sich bei 570 nm im Photometer messen.

Versuchsdurchführung

Für die Albuminbestimmung wurden den drei verschiedenen Zellkulturen bzw. der wiederbesiedelten Matrix jeweils 500 µl Medium entnommen.

Für den Standard wurde eine 1 g/dl BSA/PBS Lösung angesetzt und nach folgendem Schema für eine Standardreihe verdünnt.

Tabelle 7. Pipettierschema für die Standardreihe der Albuminbestimmung

Konzentration in mg/dl	Menge Standard in μl	Menge Medium in μl
400	400	600
200	200	800
100	100	900
75	75	925
50	50	950
25	25	975
20	20	980
15	15	985
10	10	990
5	5	995
0	0	1000

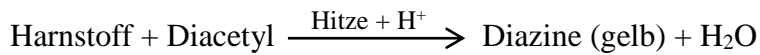
In eine 96-Lochplatte wurden in Doppelbestimmung 40 μl Probe oder Standard pipettiert und 200 μl Reagenz zugegeben. Die Platte wurde für eine Minute auf den ELISA-Shaker gestellt und weitere zehn Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Photometer bei 570 nm.

b. Harnstoffbildung

Der Nachweis einer aktiven Harnstoffsynthese ist ein weiterer wichtiger Funktionsparameter in einer Hepatozytenkultur. Durch den Abbau von Aminosäuren entsteht toxischer Ammoniak, der von Hepatozyten zu Harnstoff umgewandelt wird und so als wasserlösliches Produkt mit dem Urin ausgeschieden werden kann.

Testprinzip

Da das Substrat unseres Versuches Ammoniumchlorid ist, darf bei dem Test als Zwischenprodukt kein Ammoniak entstehen, da es sonst zu verzerrten Ergebnissen kommen würde. Mit dem Testkit von Stanbio wird die Harnstoffkonzentration über die direkte Diacetylmonoxime-Methode bestimmt.



Versuchsdurchführung

1 ml einer 2 mM Ammoniumchlorid-Lösung wurde den zwei unterschiedlichen Zellkulturen zugegeben. Nach zwei und vier Stunden wurde den Zellkulturen jeweils 50 µl Probe entnommen.

Der mitgelieferte Standard mit der Konzentration 25 mg/dl wurde mit NaCl verdünnt, woraus sich folgende Konzentrationen ergeben.

Tabelle 8. Pipettierschema für die Standardreihe der Harnstoffbestimmung

Konzentration in mg/dl	Menge Standard in µl	Menge NaCl in µl
S1 25	50 µl	0
S2 12,5	50 µl von S1	50 µl
S3 6,25	50 µl von S2	50 µl
S4 3,125	50 µl von S3	50 µl
S5 1,5625	50 µl von S4	50 µl
0	0	50 µl

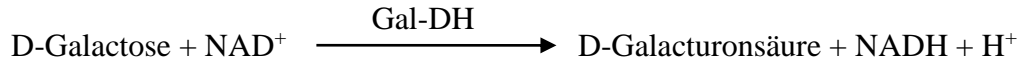
Von jeder Probe und Standard wurden in Doppelbestimmung 20 µl in eine 96-Lochplatte pipettiert. Zu jeder Vertiefung wurden 50 µl von Reagenz 1 und 100 µl von Reagenz 2 zugegeben. Die Platte wurde anschließend für 20 Minuten bei 100°C im Wärmeschrank inkubiert, für drei Minuten auf Eis gestellt und bei 520 nm im Photometer gemessen. Von den gemessenen Werten wurde der Hintergrundwert abgezogen.

c. Galaktoseelimination

Hepatozyten können Galaktose zu Uridindiphosphat-Glukose umwandeln und sie so aus dem Blutkreislauf entfernen. Die Glaktoseelimination ist somit ein Nachweis für die Hepatozytenaktivität.

Testprinzip

Galaktose wird bei einem pH-Wert von 8,6 in der Anwesenheit von β -Galactose Dehydrogenase (Gal-DH) zu Galacturonsäure oxidiert.



Die Menge des gebildeten NADH ist stöchiometrisch zu der Menge von Galaktose. Der Anstieg von NADH wird durch seine Absorption bei 340 nm gemessen.

Versuchsdurchführung

Für den Test wurde den Zellkulturen und der wiederbesiedelten Matrix eine 1 mM Galaktoselösung zugegeben. Nach vier Stunden wurden den Zellkulturen 100 μ l Probe entnommen. Bei der Wiederbesiedelung wurde der Versuch über 24 h durchgeführt und es wurden im Durchschnitt 5 Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen.

Aus der 1 mM Galaktoselösung wurde durch die Verdünnung mit Medium folgende Standardreihe hergestellt.

Tabelle 9. Pipettierschema für die Standardreihe zur Bestimmung der Galaktosekonzentration im Medium

Konzentration	Menge 1 mM Galaktoselösung in μ l	Menge Medium in μ l
Blank	-	100
0,25 mM	25	75
0,5 mM	50	50
1 mM	100	-

Nachdem 10 μ l der Probe bzw. des Standards in Dreifachbestimmung in eine 96-Lochplatte pipettiert wurden, wurde nach folgendem Schema weitergearbeitet.

Tabelle 10. Versuchsablauf der Galaktosebestimmung

Lösung 1	Zugabe von 10 µl in jedes Loch	Inkubation für 20 Minuten bei RT auf dem ELISA Shaker
Lösung 3 und dH ₂ O	Zugabe von 50 µl in jedes Loch Zugabe von 92,5 µl in jedes Loch	Inkubation für 3 Minuten bei RT auf dem ELISA Shaker; Messung bei 340 nm → Extinktion 1
Lösung 4	Start der Reaktion durch Zugabe von 5 µl in jedes Loch	Inkubation für 20 Minuten bei RT auf dem ELISA-Schüttler; Messung bei 340 nm → Extinktion 2

Für die Bestimmung der Galaktosekonzentration wurde zunächst die Extinktionsdifferenz aller Proben und Standards bestimmt und anschließend die Extinktionsdifferenz des Blanks von den korrespondierenden Proben abgezogen.

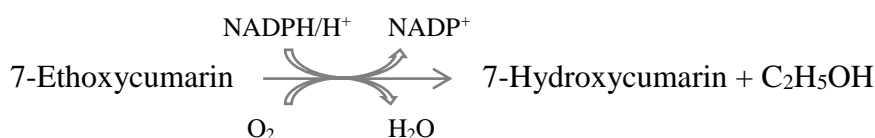
$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Blank}}$$

d. 7-Hydroxycumarin-Deethylase Aktivität

Eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Hepatozyten spielen die Cytochrom P450 Enzyme, die in der Lage sind, unterschiedliche Reaktionen zu katalysieren. Ihre Aktivität zeugt von gesunden Hepatozyten.

Testprinzip

Um die Aktivität des Cytochrom P450 Komplexes zu analysieren, wird die Umwandlung von 7-Ethoxycumarin (EC) unter NADPH- und Sauerstoffverbrauch durch die 7-Hydroxycumarin-Deethylase (ECOD) zu 7-Hydroxycumarin (7-HC) bestimmt, ein fluoreszierender Stoff mit einem Exzitationsmaximum zwischen 330 und 380 nm und einem Emissionsmaximum bei 460 nm [54]. Eine maximale Fluoreszenz kann bei pH > 9,5 nachgewiesen werden [55].



Herstellung der Lösungen

7-Hydroxycumarin: 93,5 mg 7-Hydroxycumarin in 0,577 ml

Standard: DMSO lösen → 100 mM Stocklösung
20 µl der Stocklösung mit 1980 µl Medium verdünnen →
1000 µM Standard

Glycinpuffer: 120,112 g Glycin in 800 ml dH₂O lösen und pH-Wert mit
NaOH Plätzchen auf 10,3 einstellen. Anschließend auf 1 l
mit dH₂O auffüllen.

Versuchsdurchführung

Hierfür wurde 1 ml einer 70 µM 7-Ethoxycumarin-Lösung den verschiedenen Zellkulturtypen zugegeben und über einen Zeitraum von vier Stunden stündlich 130 µl Probe abgenommen. Ein Rest des substrathaltigen Mediums wurde als Nullwert aufgehoben.

Die hergestellte Stammlösung des 7-Hydroxycumarin-Standards wurde folgendermaßen mit Medium verdünnt.

Tabelle 11. Pipettierschema für die Standardreihe von 7-Hydroxycumarin

Konzentration in µM	Menge Standard in µl	Menge Medium in µl
20	20	980
15	15	985
10	10	990
5	5	995
Blank	0	1000

In eine 96-Lochplatte werden nun im Duplikat 50 µl vom Standard oder der Probe pipettiert und je 150 µl Glycinpuffer dazugegeben. Anschließend erfolgt die Messung der Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen (Exzitation 360 nm; Emission 460 nm) mit dem Cytoflour II Gerät.

e. Zellviabilitätstest

Neben den Funktionstest ist es ebenfalls von Interesse, die Lebensfähigkeit der Zellen bzw. den Anteil lebender Zellen über den Versuchszeitraum zu bestimmen.

Hierfür eignet sich das membrangängige Tetrazoliumsalz MTT, das durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem wasserunlöslichen dunkelblauen Formazan reduziert wird.

Testprinzip

Das wasserunlösliche Produkt der MTT Spaltung, das Formazan, kann durch Isopropanol in Lösung gebracht und photometrisch bei 570 nm bestimmt werden. Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Herstellung der Lösungen

MTT-Lösung: 5 mg MTT pro ml Medium, steril filtrieren (0,2 µm Filter)

Isopropanol-HCl

Lösung: Zu 10 ml absolutem Isopropanol 0,7 ml 1 M HCl zugeben

Versuchsdurchführung

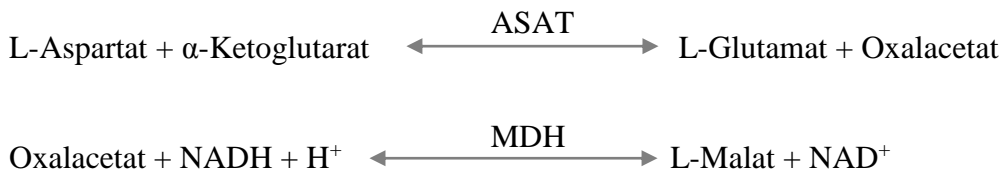
Zu jedem Zellkulturtyp wurde in Doppelbestimmung 1 ml der MTT-Lösung zugegeben. Die Platten wurden für zwei Stunden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden 1.000 µl der Isopropanol-HCl-Lösung zugegeben und die Platten wurden für weitere 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Vertiefung durch manuelles Rütteln der Platten gut gemischt und 200 µl wurden für die Bestimmung in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte überführt. Die Messung erfolgte nun bei 570 nm, wobei eine Hintergrundsubtraktion bei 630 nm durchgeführt wurde.

f. Aspartat – Aminotransferase

Die Aspartat – Aminotransferase ist ein Enzym, das sowohl im Skelettmuskel als auch in der Leber vorkommt. Sie ist essentiell für den Malat – Aspartat – Shuttle und somit für die Nutzung des NADH aus der Glykolyse. Erhöhte ASAT – Werte lassen auf eine Lebererkrankung und den Untergang von Hepatozyten schließen. Ebenfalls kann sie als ein housekeeping enzyme der Leber angesehen werden.

Testprinzip

ASAT katalysiert den Transfer einer Aminogruppe zwischen L-Aspartat und α -Ketoglutarat, wobei Oxalacetat und Glutamat entsteht. Das Oxalacetat reagiert wiederum mit NADH und bildet im Beisein der Malatdehydrogenase (MDH) L-Malat und NAD^+ . Die Oxidationsrate von NADH zu NAD^+ wird durch eine Abnahme der Extinktion bestimmt, die wiederum proportional zur ASAT-Aktivität ist.



Herstellung der Lösungen

Gebrauchsreagenz: 4 Teile Reagenz 1 und 1 Teil Reagenz 2 mischen und im Wasserbad bei 37°C erwärmen.

Versuchsdurchführung

Für die quantitative Bestimmung der ASAT müssen die Zellen lysiert werden, da das Enzym hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Hierfür wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, um jegliche Mediumreste zu entfernen, anschließend in 1 ml PBS aufgenommen und lysiert.

Der Trulab N Standard mit der Konzentration 48,5 U/l wurde für die Standardreihe folgendermaßen mit NaCl verdünnt.

Tabelle 12. Pipettierschema für die Standardreihe der ASAT-Aktivitätsbestimmung

Konzentration in U/l	Standard in μl	NaCl in μl
S1 48,5 U/l	400 μl Stammlösung	0
S2 24,25 U/l	200 μl S1	200 μl
S3 12,125 U/l	200 μl S2	200 μl
S4 6,062 U/l	200 μl S3	200 μl
S5 3,031 U/l	200 μl S4	200 μl
S6 0 U/l	0	400 μl

Von den lysierten Zellen wurden 100 µl in Doppelbestimmung in eine 96-Lochplatte pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl Gebrauchsreagenz und eine sofortige Messung bei 340 nm im Photometer.

2.2.7 Immunhistochemie

Eine Möglichkeit, eine Proliferation der Zellen nachzuweisen, ist die Färbung von Formalin fixierten Schnitten mit dem Antikörper Ki-67. Da das Protein Ki-67 nur während der aktiven Phasen (G₁, S, G₂) des Zellzyklus sichtbar ist, in der Ruhephase G₀ jedoch nicht, ist es ein idealer Marker der Zellteilung [54].

Testprinzip

Die immunhistochemische Färbung beruht auf der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen, in diesem Fall das Protein Ki-67 und dessen Detektierung mittels eines Detektionssystems. Für die Ki-67-Detektierung wird eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) verwendet, die H₂O₂ zu H₂O und H⁺ reduziert. Die entstehenden Protonen oxidieren das farblose Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Endprodukt.

Herstellung der Lösungen

Citrat-Puffer: Lösung A: 4,2 g Zitronensäure Monohydrat (C₆H₈O₇ x H₂O) in 200 ml dH₂O lösen
 Lösung B: 14,7 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O) in 500 ml dH₂O lösen
 Arbeitslösung: Lösung A 9 ml, Lösung B 41 ml, dH₂O ad 500 ml

Waschpuffer: PBS + 0,1% Tween20

Blocklösung: 1,5% Ziegen Serum in PBS, mit 1% BSA

Versuchsdurchführung

Vor der immunhistochemischen Färbung müssen die Schnitte zunächst entparaffiniert werden, um Bindungsstellen für Antikörper freizulegen. Hierfür wurde eine absteigende Alkoholreihe bei RT verwendet.

Tabelle 13. Entparaffinieren von Histologieschnitten für eine Ki-67 Färbung

3x Xylol	Jeweils 5 Minuten
2x 100% Ethanol	Jeweils 2 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
70% Ethanol	3 Minuten
dH ₂ O	5 Minuten

Anschließend erfolgte eine Antigendemaskierung, wofür der Citrat-Puffer im Dampfkochtopf auf 95-100°C vorgeheizt wurde. Die Objektträger wurden für 20 Minuten in dem kochenden Puffer inkubiert. Nach einer Abkühlungsphase im Topf, wurden die Schnitte fünfmal in dH₂O gespült.

Auf die Antigendemaskierung folgte die eigentliche immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper, wobei nach folgendem Schema vorgegangen wurde.

Tabelle 14. Immunhistochemische Färbung mit einem Ki-67 Antikörper

Peroxidblock in 3% H ₂ O ₂	10 Minuten
2x Waschen mit Waschpuffer	5 Minuten
Umkreisen der Schnitte mit einem Fettstift	
Blockierung mit 1,5% Ziegenserum in PBS mit 1% BSA, abklopfen	30 Minuten
Inkubation 1. Antikörper: MiB-1 Ki-67, 1:20 verdünnt mit Antikörperverdünnungsmittel Dako	Über Nacht bei 4°C
3 x Waschen mit Waschpuffer	Jeweils 5 Minuten
Inkubation 2. Antikörper: ZytoChem Plus HRP	45 Minuten
3 x Waschen mit Waschpuffer	Jeweils 5 Minuten
DAB-Substrat	10 – 20 Minuten
Waschen mit dH ₂ O	1 Minute

Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung wurde noch eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Pertex eingedeckt.

2.2.8 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde mit den Programmen GraphPad Prism Version 5.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA), JMP Version 10 (SAS Institute GmbH, Cary, NC, USA), und Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) gearbeitet.

Die statistische Auswertung der Gruppen erfolgte mittels des nichtparametrischen Wilcoxon-Krusal-Willis-Test in JMP. Einzelwerte wurden mit dem unpaired, two-tailed Student's T-Test analysiert. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

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

Ergebnisse

3.1 Azellularisierung einer porcinen Leber

3.1.1 Der Azellularisierungsprozess

Ein Ziel dieser Arbeit war die Azellularisierung von porcinen Lebern unter kontrollierten Bedingungen. Hierfür wurde mit dem System DasyLab gearbeitet, mit dessen Hilfe der portale Druck gesteuert und die Proteinkonzentration der SDS-Lösung bestimmt und aufgezeichnet werden konnte.

Für die Azellularisierung wurde grundsätzlich mit einem konstanten Druck von 20mmHg gearbeitet. Um einen zu hohen Druck am Anfang und damit mögliche Schäden zu vermeiden, startete die Pumpe mit 5 Umdrehungen pro Minute und wurde nach und nach durch DasyLab nach oben reguliert, bis letztendlich die nötige Umdrehungszahl für einen Druck von 20 mmHg erreicht wurde. Abb. 9 zeigt beispielhaft den Druckkurvenverlaufen während einer Azellularisierung.

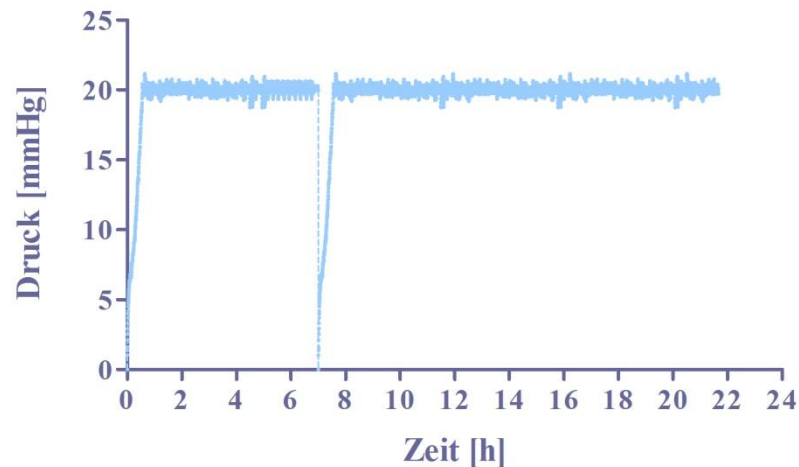


Abbildung 9. Beispielhafte Druckregulation während eines Azellularisierungsprozesses

Der eingestellte Druck konnte konstant über den gesamten Prozess gehalten werden. Der Abfall der Kurven zwischen der 6. und 8. Stunde steht für den Wechsel des SDS-Gefäßes und den Neustart von DasyLab.

Um den gewünschten Druck konstant über den gesamten Prozess halten zu können, wurde die Umdrehungszahl der Pumpe und damit auch die Flussrate

angepasst. Die Flussraten variierten sehr während der 10 durchgeführten Azellularisierungsvorgänge, wie in Abb. 10 zu sehen ist.

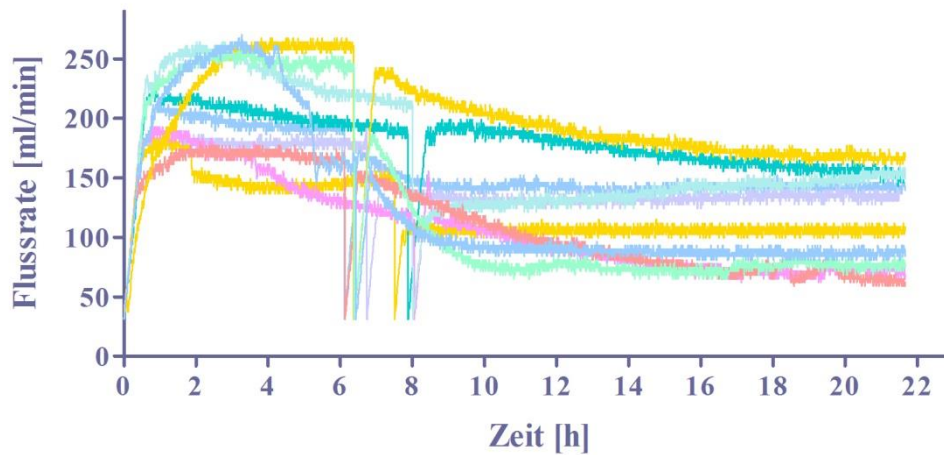


Abbildung 10. Flussraten der zehn Azellularisierungsprozesse

Alle Prozesse zeigten zunächst einen Anstieg der Flussrate, verzeichneten jedoch im weiteren Verlauf eine Abnahme. Vor allem nach dem Wechsel der Spüllösung war die Reduktion der Flussrate deutlich zu erkennen.

Im Mittel wurde während aller Azellularisierungsvorgänge ein Maximalwert von 207 ± 13 ml/min erreicht, wobei im zweiten Teil die Werte stetig unter 150 ml/min blieben. In Abb. 11 ist deutlich zu sehen, dass der Flaschenwechsel verbunden mit langen Spülzeiten die Flussrate vermindert.

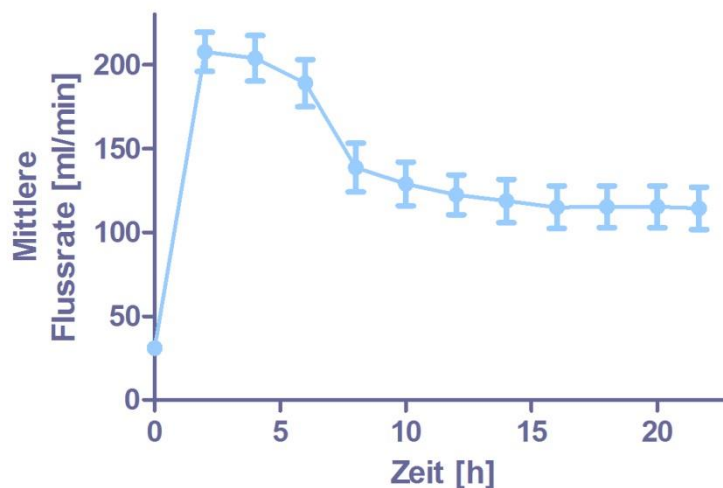


Abbildung 11. Mittlere Flussrate aller Azellularisierungsprozesse

Neben der Aufzeichnung der Druck- und Flussratenentwicklung wurde mit Hilfe einer UV-Lampe die Proteinkonzentration in der verwendeten SDS-Spüllösung

gemessen. Abb. 12 veranschaulicht die Entwicklung der Proteinkonzentration über den gesamten Prozess für alle 10 durchgeführten Azellularisierungen.

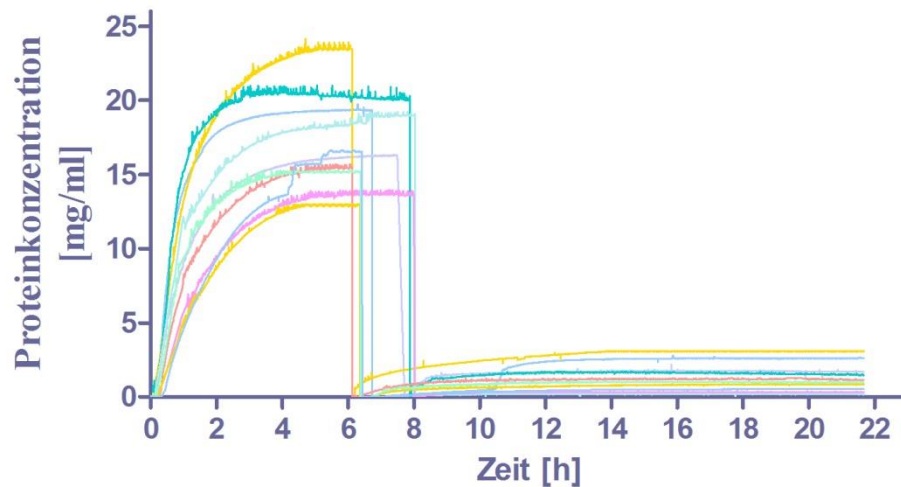


Abbildung 12. Entwicklung der Proteinkonzentration während des Azellularisierungsvorgangs.

Deutlich zu erkennen sind die Plateaus der einzelnen Kurven, die eine Sättigung der SDS-Lösung nach ca. 6 – 8 Stunden darstellen. Bei Erreichen des Plateaus wurden die SDS-Lösungen ausgetauscht und ein zweiter Zyklus gestartet. Die Grafik zeigt ebenfalls, dass während der ersten Phase der Großteil des Proteins bereits herausgelöst wurde. Dies lässt sich auch makroskopisch an den Lebern erkennen, wie die im 24 h Verlauf aufgenommenen Fotos zeigen. Im Mittel erreichte die Proteinkonzentration während des ersten Durchlaufs Maximalwerte

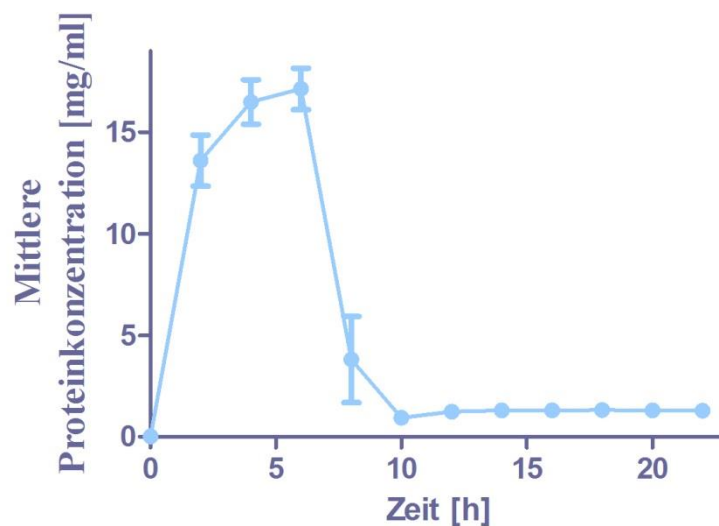


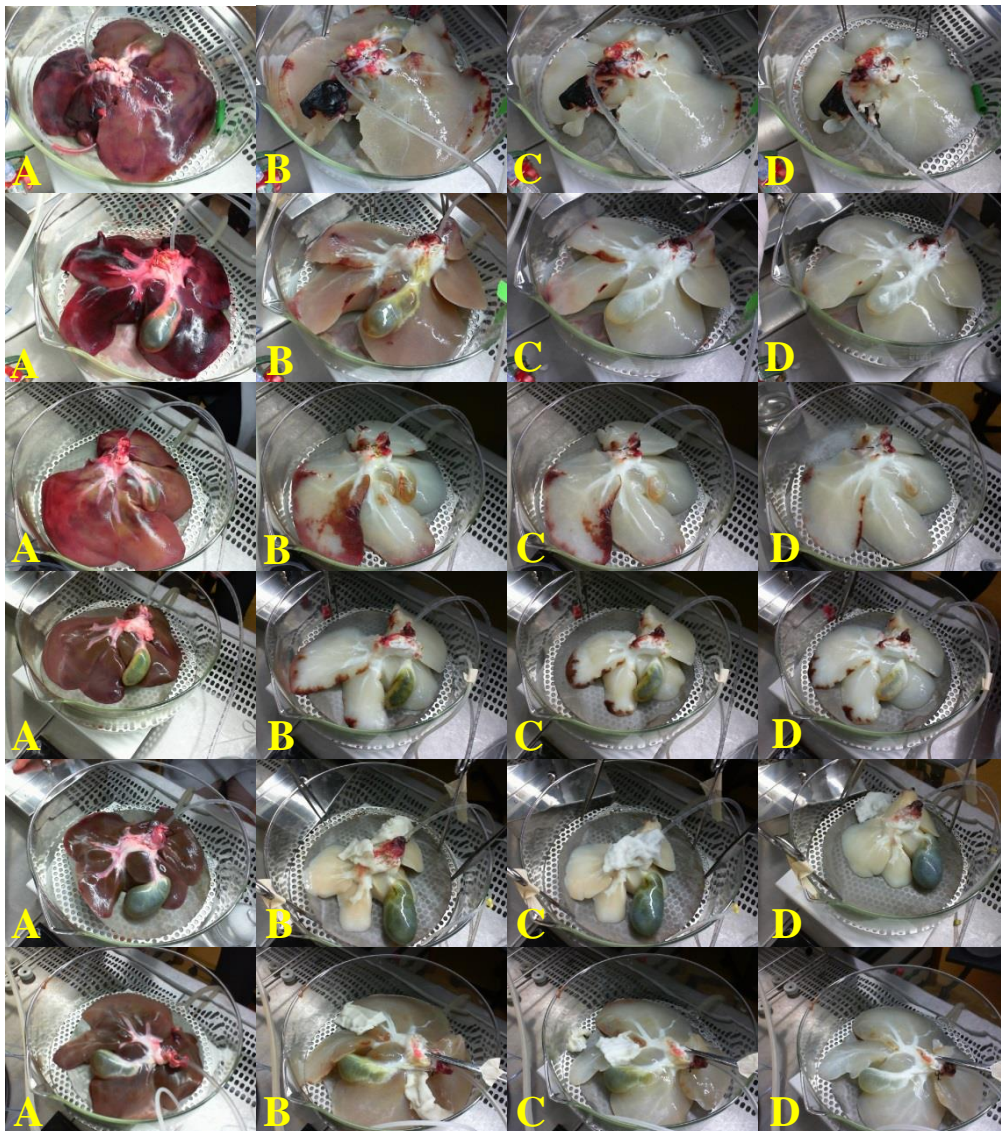
Abbildung 13. Mittlere Proteinkonzentration aller Azellularisierungsprozesse.

von 17 ± 1 mg Protein pro ml SDS Lösung. In den anschließenden 12-14 h wurden nur noch Proteinkonzentrationen von durchschnittlich $1,3 \pm 0,3$ mg/ml erreicht (Abb. 13).

3.1.2 Evaluierung der gewonnenen Matrices

a. Makroskopische Übersicht

Während der kompletten Azellularisierungsvorgänge wurden minütlich Fotos der Lebern aufgenommen, um den Verlauf zu dokumentieren. In Abb. 14 sind von allen 10 Lebern die verschiedenen Azellularisierungszustände zu den Zeitpunkten 0, 8, 16 und 24 h dargestellt.



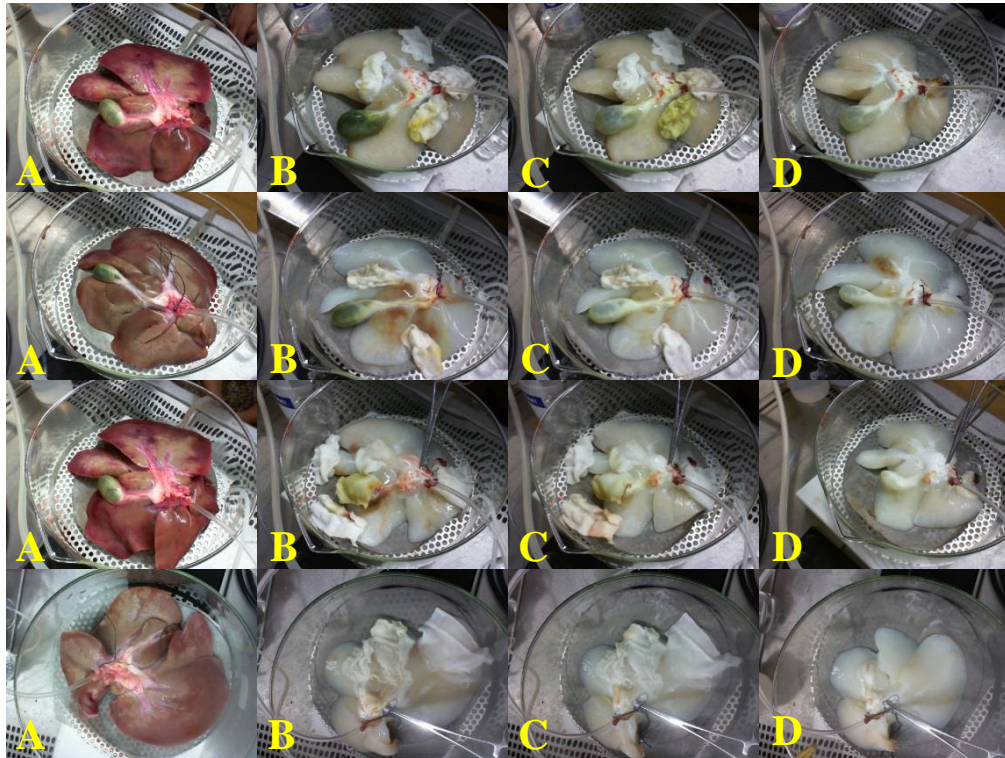


Abbildung 14. Azellularisierungsverlauf zu den Zeitpunkten A: 0 h, B: 8 h, C: 16 h und D: 24 h

Die Übersichtsbilder unterstreichen, was bereits der Verlauf des Proteingehaltes gezeigt hat. Die größte Veränderung ist makroskopisch innerhalb der ersten 8 Stunden zu erkennen, wobei die folgenden 16 Stunden trotzdem von Bedeutung sind. Die Matrices werden deutlich weißer und kleine Ränder verschwinden.

Neben der optischen Veränderung wurde auch die Gewichtsveränderung der Lebern durch den Azellularisierungsprozess dokumentiert.

Tabelle 15. Gewichtsverläufe der porcinen Lebern im Azellularisierungsprozess

	Gewicht in [g]	
	Vor Azellularisierung	Nach Azellularisierung
Leber 1	801	589
Leber 2	709	479
Leber 3	630	424
Leber 4	473	355
Leber 5	712	286
Leber 6	451	335
Leber 7	431	305
Leber 8	409	401
Leber 9	431	221
Leber 10	488	291

Die Gewichte vor der Azellularisierung lagen durchschnittlich bei 553 ± 45 g und bei 368 ± 34 g nach der Azellularisierung. Dies entspricht einem mittleren Gewichtsverlust von 33 Prozent.

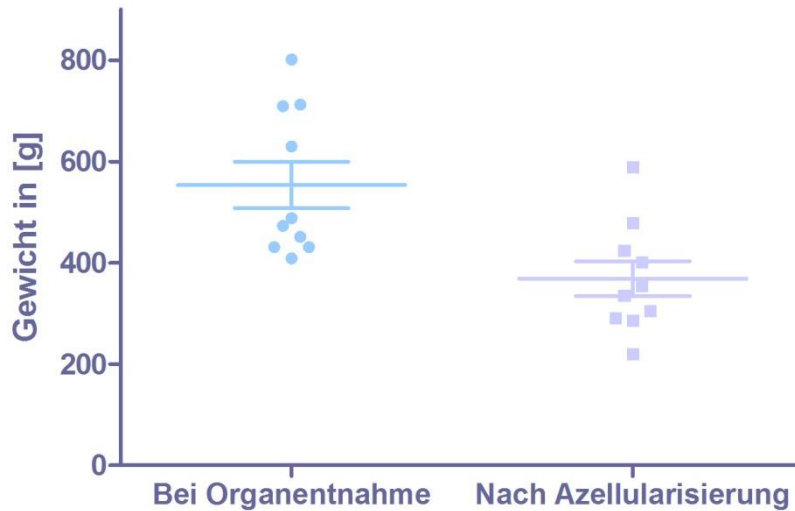


Abbildung 15. Gewichte der porcinen Lebern vor und nach der Azellularisierung. Bei Organentnahme lag das mittlere Gewicht bei 553 ± 45 g. Nach der Azellularisierung lag das mittlere Gewicht bei 368 ± 34 g.

b. DNA-Quantität

Von allen gewonnenen azellularisierten Matrices sowie von nativen Lebern wurden an 3 verschiedenen Stellen Proben entnommen, für die Trockengewichtsbestimmung lyophilisiert und auf ihren DNA Gehalt analysiert.

Trotz identischer Durchführung der Azellularisierung innerhalb der Gruppen (SDS und SDS+DNase) variierten die DNA-Rückstände in den einzelnen Matrices deutlich, wie in Tabelle 16 und in Abbildung 16 zu sehen ist. Vor allem die Azellularisierung mit reinem SDS führte zu Unterschieden von bis zu 800 ng/mg Trockengewicht EZM.

Tabelle 16. DNA Rückstände in den azellularisierten Matrices.

	DNA [ng/mg Trockengewicht EZM]	
	SDS	SDS + DNase
Leber 1	318	
Leber 2	371	
Leber 3	639	
Leber 4	79	
Leber 5	875	
Leber 6		0
Leber 7		119
Leber 8		234
Leber 9		273
Leber 10		93

Im Mittel konnte in den Lebern, die mit reinem SDS azellularisiert wurden, DNA-Rückstände von 359 ± 89 ng/mg Trockengewicht EZM gemessen werden. In der Gruppe der kombinierten Behandlung mit SDS und DNase betrug die mittlere Konzentration der Rückstände 135 ± 44 ng/mg Trockengewicht EZM.

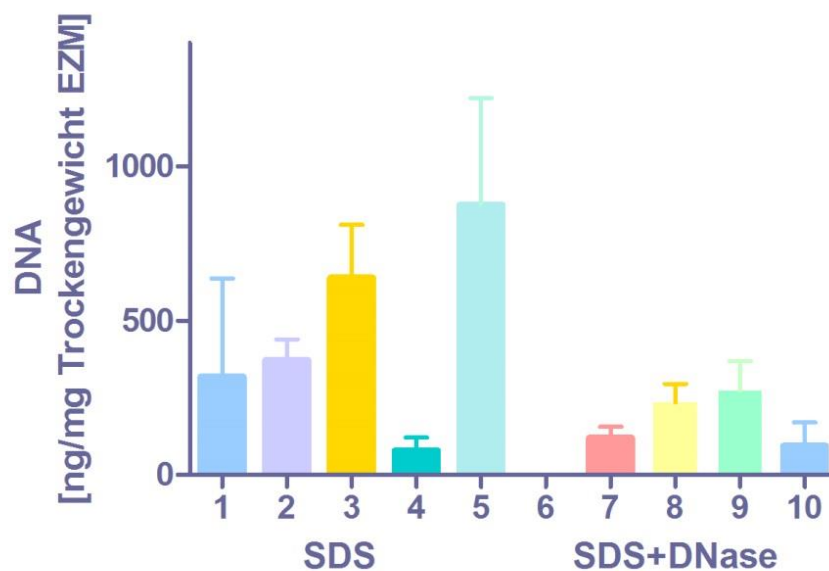


Abbildung 16. DNA-Rückstände in den azellularisierten Matrices. Balken 1-5 entsprechen der Azellularisierung mit reinem SDS, Balken 6-10 entsprechen der Azellularisierung mit SDS und DNase.

Vergleicht man den DNA-Gehalt der Lebern, die ausschließlich mit SDS azellularisiert wurden, mit den kombiniert behandelten Lebern (SDS + DNase), so wurden zwar durchschnittlich weniger DNA Rückstände gemessen, allerdings in keinem signifikanten Ausmaß ($p=0,05$).

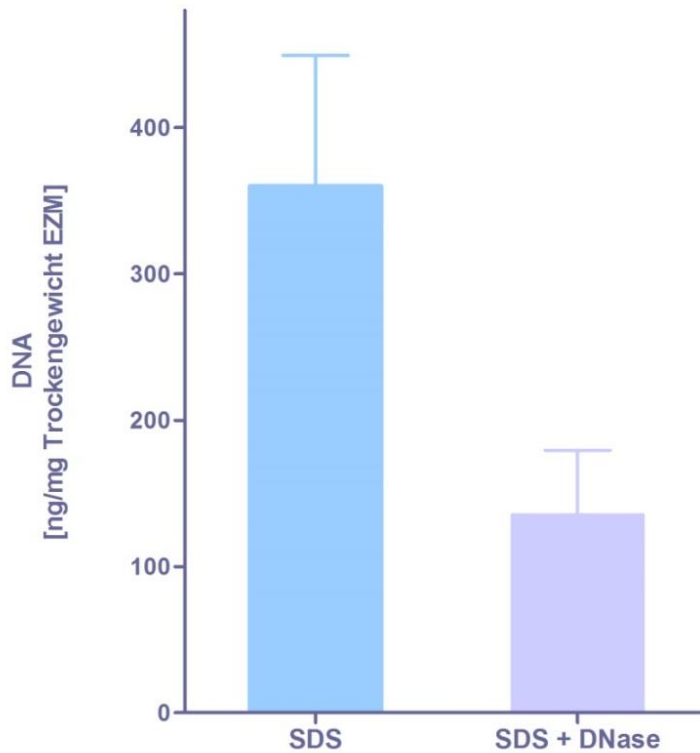


Abbildung 17. Vergleich des DNA-Gehaltes in den Gruppen SDS und SDS+DNase, $p=0,05$.

Wesentlich deutlicher sind die Unterschiede zwischen den nativen Lebern und den azellularisierten Matrices. Der DNA Gehalt konnte durch die Azellularisierung sowohl mit reinem SDS als auch mit der Kombination aus SDS und DNase vom mittleren Ausgangswert von 10654 ± 562 ng/mg Trockengewicht EZM signifikant reduziert werden ($p < 0,001$, Abb 18.)

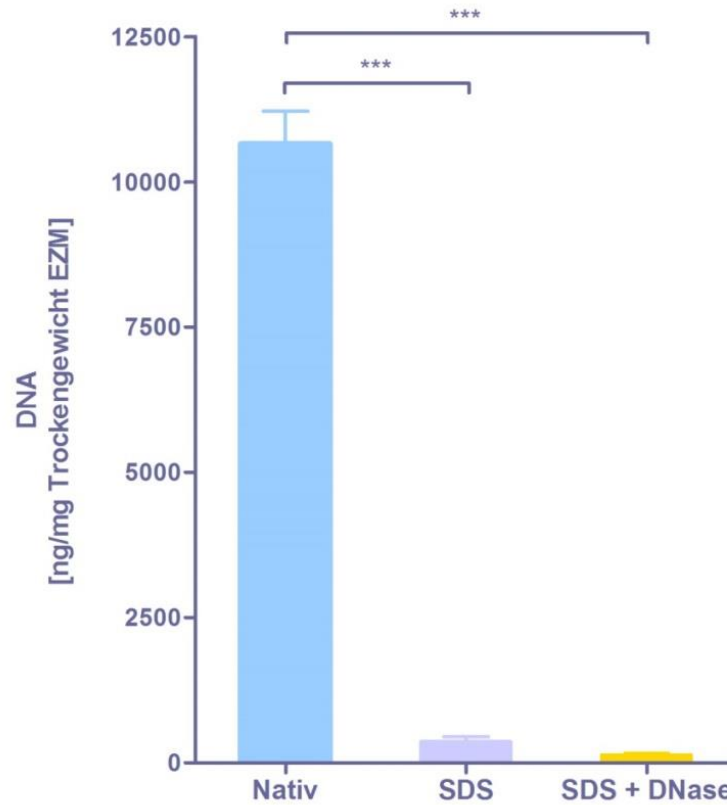


Abbildung 18. DNA-Gehalt der nativen und azellularisierten Matrices im Vergleich (***) $p < 0,001$.

Durch den Einsatz von SDS oder SDS + DNase konnte der DNA Gehalt auf 3% bzw. 1% des Ausgangswertes der nativen Lebern reduziert werden.

c. Kollagengehalt

Für die Erfassung des Kollagengehaltes wurden ebenfalls an 3 verschiedenen Stellen der azellularisierten Matrices und der nativen Lebern Proben entnommen, in einer Pepsinextraktionslösung über Nacht inkubiert und das extrahierte Kollagen mit einer Sirius Red-Färbung bestimmt.

Wie schon bei der DNA Bestimmung variierten auch hier die Werte, vor allem in der SDS + DNase Gruppe. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die ermittelten Kollagenwerte. Im Mittel konnten in der SDS Gruppe 428 ± 92 und in der SDS + DNase Gruppe 503 ± 112 $\mu\text{g/mg}$ Trockengewicht EZM gemessen werden.

Tabelle 17. Kollagengehalt der azellularisierten Matrices

	Kollagen [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht EZM]	
	SDS	SDS + DNase
Leber 1	688	
Leber 2	112	
Leber 3	412	
Leber 4	484	
Leber 5	447	
Leber 6		911
Leber 7		503
Leber 8		349
Leber 9		256
Leber 10		498

Ein Blick auf die Durchschnittswerte der beiden Gruppen zeigt, dass durch die reine SDS Behandlung etwas mehr Kollagen verloren ging. Allerdings wird diese Beobachtung durch keine Signifikanzen untermauert (Abb. 19).

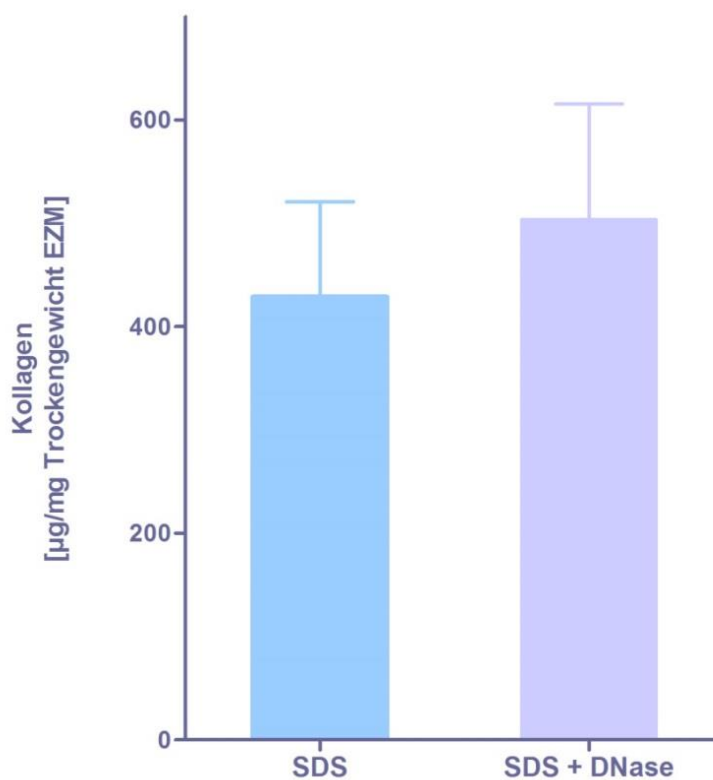


Abbildung 19. Vergleich des Kollagengehaltes in den Gruppen SDS und SDS+DNase.

Ergebnisse

Der mittlere Kollagengehalt der nativen Lebern lag bei 745 ± 146 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht EZM. Das heißt, dass durch die Azellularisierung in der SDS Gruppe 43% und in der SDS + DNase Gruppe 32% Kollagen verloren gingen. Dies sind zwar deutliche Verluste, aber ebenfalls nicht signifikant.

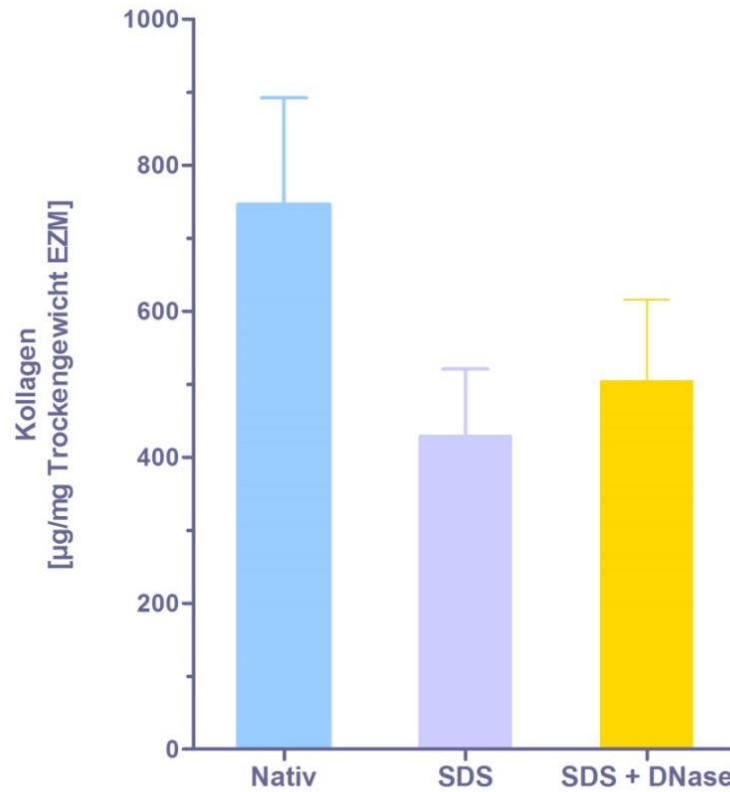


Abbildung 20. Kollagengehalt der nativen und azellularisierten Matrices im Vergleich.

d. Glykosaminoglykangehalt

Neben dem Kollagen wurden auch die GAGs aus 3 verschiedenen Proben der nativen und azellularisierten Lebern bestimmt. Die Extraktion erfolgte hier mithilfe von Papain und die Färbung mit 1,9-Dimethylmethylenblau.

Im Vergleich konnten in der SDS+DNase-Gruppe deutlich höhere Werte gemessen werden als in der SDS-Gruppe. Tabelle 18 veranschaulicht die ermittelten Ergebnisse.

Tabelle 18. Glykosaminoglykangehalt der azellularisierten Matrices.

	GAGs [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht EZM]	
	SDS	SDS + DNase
Leber 1	3,24	
Leber 2	2,51	
Leber 3	4,49	
Leber 4	0,94	
Leber 5	4,92	
Leber 6		5,90
Leber 7		9,54
Leber 8		3,02
Leber 9		4,52
Leber 10		3,54

Durchschnittlich lag der GAGs Gehalt bei $3,2\pm 0,7$ in der SDS-Gruppe und bei $5,3\pm 1,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht EZM in der SDS+DNase-Gruppe. Trotz des fast doppelten GAG-Gehaltes sind die Unterschiede nicht signifikant.

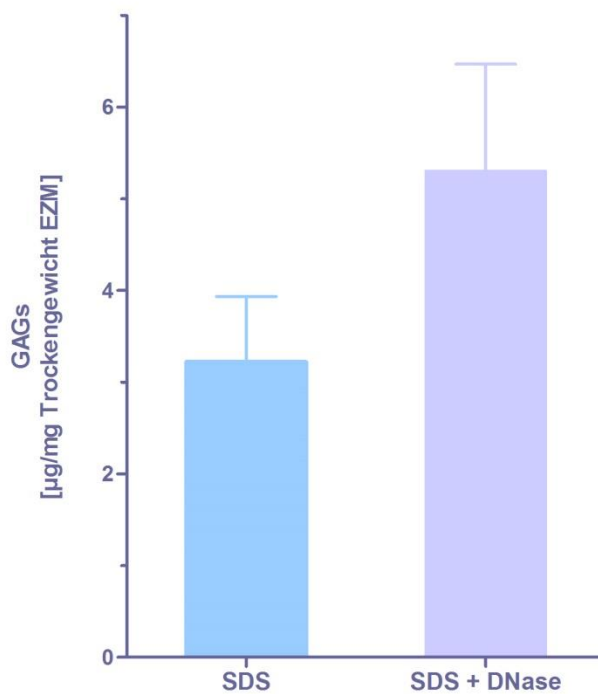


Abbildung 21. Vergleich des Glykosaminoglykangehaltes in den Gruppen SDS und SDS+DNase.

Erheblich deutlicher sind allerdings die Unterschiede zwischen den nativen Lebern und den azellularisierten Matrices. Der mittlere Ausgangswert der GAGs lag bei $0,67 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht EZM im nativen Gewebe. Dies bedeutet, dass sich die Werte in der SDS-Gruppe fast verfünffacht und in der SDS+DNase Gruppe versiebenfacht haben. Diese Ergebnisse können auch als signifikant eingestuft werden ($p=0,007$ bzw. $p=0,004$, Abb. 22).

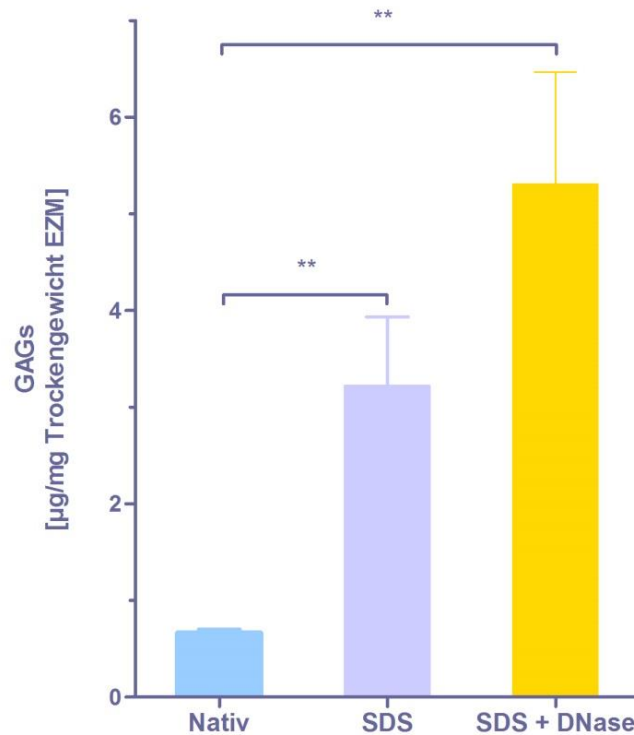


Abbildung 22. Glykosaminoglykangehalt der nativen und azellularisierten Matrices im Vergleich (** SDS vs. Nativ $p < 0,01$ und ** SDS+DNase vs. Nativ $p < 0,01$).

e. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die Struktur der EZM zu überprüfen und eventuelle Rückstände von DNA in ihr zu detektieren, wurden Paraffinschnitte der azellularisierten Matrices einer H&E-Färbung unterzogen. Für einen Vergleich wurden ebenfalls Paraffinschnitte einer nativen porcinen Leber angefärbt.

Die meisten H&E-Färbungen zeigten den Erhalt der EZM und freie Leberläppchen. Auch wichtige Strukturen wie die Glisson Trias wurden durch den Azellularisierungsvorgang nicht zerstört. (Abb. 23-25) Es ließ sich kein nukleäres Material sowie sonstige Zellüberreste mehr erkennen.

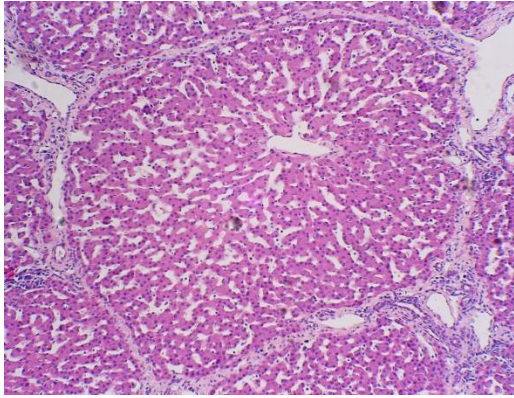


Abbildung 23. Natives porcines Leberläppchen in H&E-Färbung (x10).

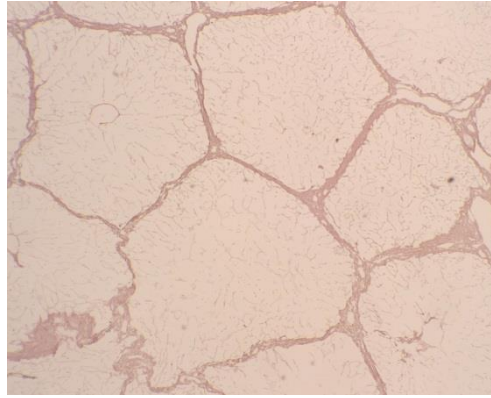


Abbildung 24. Azellularisierte Leberläppchen mit Erhalt der Ultrastruktur (x4).

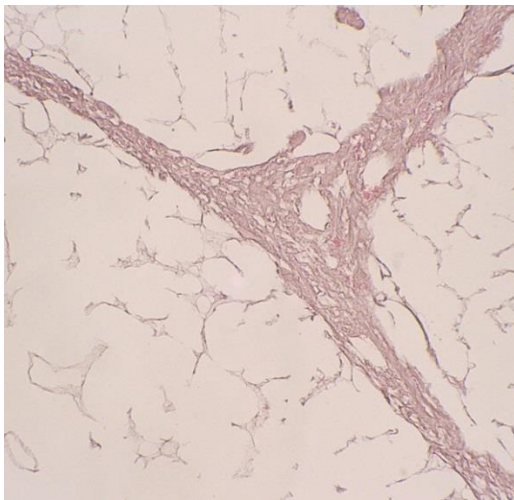


Abbildung 25. Glisson Trias in einer azellularisierten Matrix (x40).

Neben den Präparaten, die keine DNA Rückstände zeigten, konnten vereinzelt auch solche mit blauen Schlieren identifiziert werden. Es waren zwar keine intakten Zellkerne mehr zu erkennen, aber dennoch waren ohne Zweifel DNA Bruchstücke im Gewebe vorhanden.

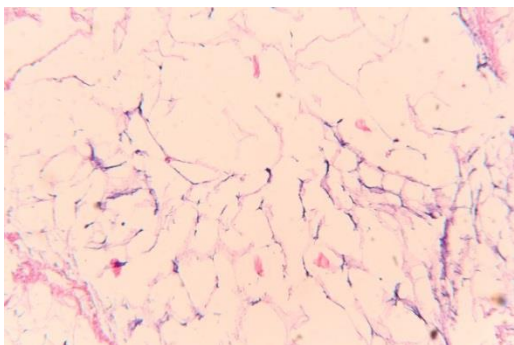


Abbildung 26. Azellularisierte Matrix mit blauem DNA Schleier nach H&E-Färbung (x20).

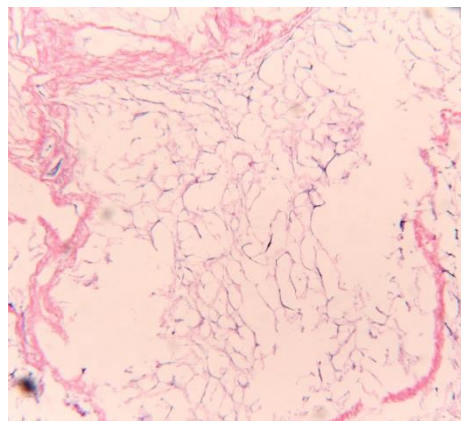


Abbildung 27. Azellularisierte Matrix mit blauem DNA Schleier nach H&E-Färbung (x10).

3.2 Zellkulturen

Bei zwei verschiedenen Hepatozytenzellkulturen, einem Monolayer und einer 3-D-Struktur wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 12 und 21 Tage diverse Funktionstests durchgeführt. Insgesamt wurden von jeder Bedingung 5 Kulturen für die Auswertung herangezogen.

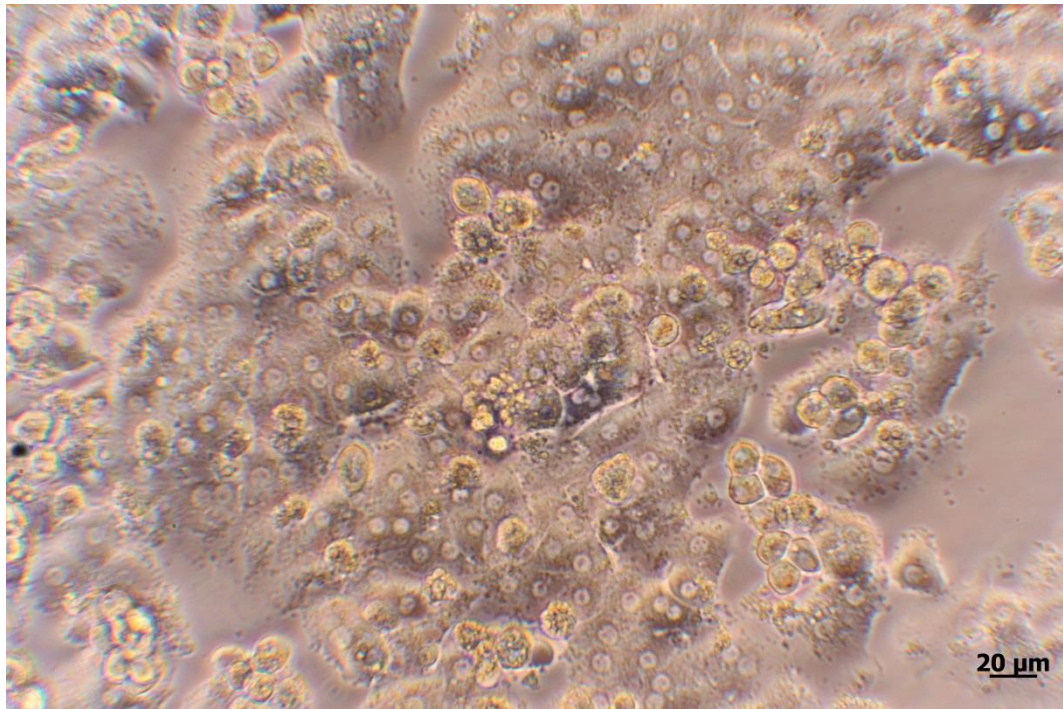


Abbildung 28. Hepatozytenkultur im Monolayer, Tag 1 nach Einsaat.

3.2.1 Albuminsekretion

Eine Albuminmessung fiel in allen Zellkulturen negativ aus. Weder in den Monolayern noch in der 3-D-Struktur konnte mit unserer Messmethode eine Sekretion nachgewiesen werden.

3.2.2 Harnstoffbildung

Nach der Zugabe einer 2 mM Ammoniumchloridlösung wurde in einem Zeitverlauf von 2 und 4 h die Konzentration von Harnstoff in beiden Zellkulturen gemessen. Um die tatsächliche Konzentration an Harnstoff zu erhalten, wurden die Werte jeweils um den gemessenen Hintergrund bereinigt.

Betrachtet man die Harnstoffkonzentrationen isoliert in den einzelnen Zellkulturen, so ist zu erkennen, dass die größte Zunahme nach 2 h erfolgt. In den folgenden Stunden ist nur noch ein geringer Anstieg messbar (Abb. 29 und 30).

In den Monolayern bewegte sich die gemessene Harnstoffkonzentration nach 4 h in einem Bereich von $2,4 \pm 0,3$ und $2,9 \pm 0,5$ mg/dl. Anzumerken ist, dass der höchste Wert nach einer Zellkulturdauer von 21 Tagen erreicht wurde.



Abbildung 29. Harnstoffkonzentration nach 2 und 4 h im Monolayer.

Etwas niedriger gestalten sich die Werte in der 3-D-Matrix, die sich zwischen $1,9 \pm 0,6$ und $2,2 \pm 0,4$ mg/dl bewegen. Im Gegensatz zum Monolayer werden hier die höchsten Werte zu Beginn der Kulturzeit erreicht.

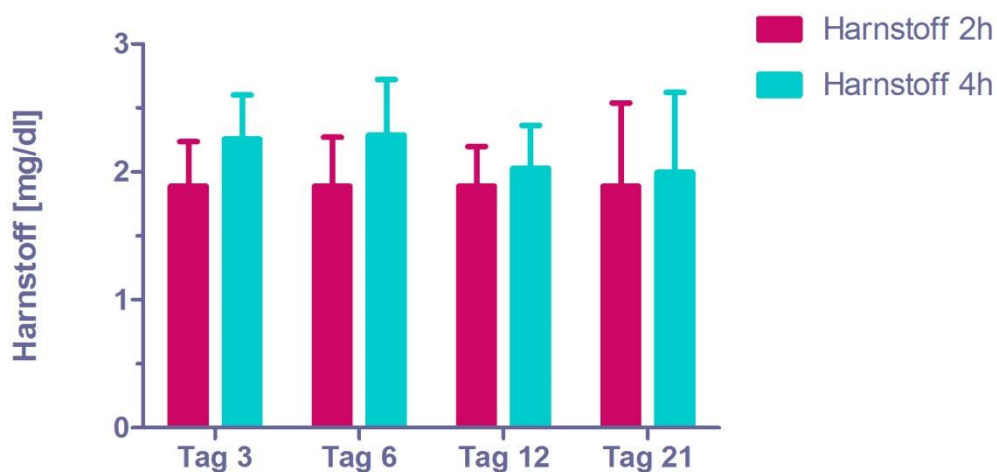


Abbildung 30. Harnstoffkonzentration nach 2 und 4 h in der 3-D-Matrix.

Ergebnisse

Die Gegenüberstellung der beiden Kulturen zeigt leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante Harnstoffkonzentrationen im Monolayer über die komplette Kulturdauer.

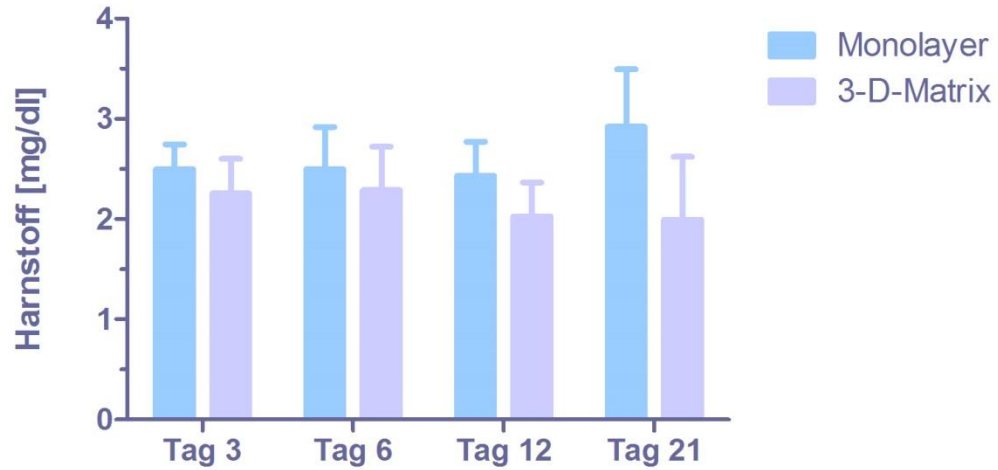


Abbildung 31. Harnstoffkonzentration im Monolayer und der 3-D-Matrix nach 4 h. Keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

Aufgrund der gemessenen Harnstoffkonzentrationen kann beispielhaft berechnet werden, wie viel Ammoniak in den Zellkulturen zu Harnstoff verstoffwechselt wurde:

$$\frac{\text{Harnstoffkonzentration}}{\text{Molare Masse Harnstoff}} = x \text{ mM Harnstoff}$$

Um diese Harnstoffkonzentration x zu erreichen, muss doppelt so viel Ammoniak aufgewendet werden.

$$x \text{ mM Harnstoff} * 2 = x \text{ mM verbrauchter Ammoniak}$$

Tabelle 19. Ammoniakverbrauch in den jeweiligen Zellkulturen.

	Monolayer nach 4 h	3-D-Matrix nach 4 h
Tag 3	0,832 mM	0,751 mM
Tag 6	0,832 mM	0,762 mM
Tag 12	0,810 mM	0,675 mM
Tag 21	0,973 mM	0,665 mM

Vernachlässigt man den Ammoniak, der im Aminosäurestoffwechsel freigesetzt wird, so wurden zwischen 33 und 48% des zugebenen Ammoniumchlorids zu Harnstoff umgesetzt.

3.2.3 Galaktoseelimination

In beiden Zellkulturen wurde der Verbrauch von Galaktose durch die Hepatozyten bestimmt. Die Unterschiede zwischen dem Monolayer und der dreidimensionalen Struktur waren signifikant an Tag 3, 6 und 12 der Probenentnahme (Abb. 32). Während in der 3-D-Matrix ca. 25% der zugegebenen Galaktose verbraucht wurden, konnten die Hepatozyten im Monolayer nur ca. 6% verstoffwechseln. Lediglich am Tag 21 stieg die prozentuale Abnahme auf ca. 16% im Monolayer.

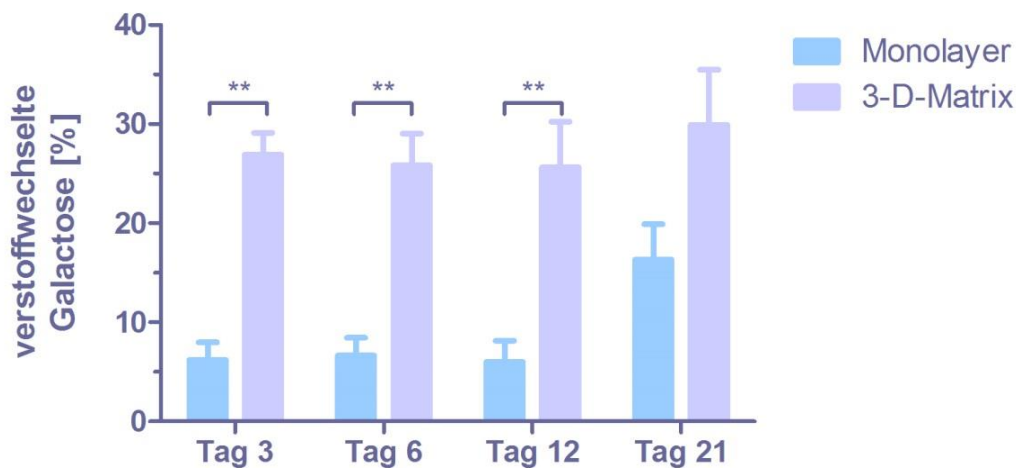


Abbildung 32. Prozentuale Abnahme der Galaktose im Monolayer und in der 3-D-Matrix. An den Tagen 3, 6 und 12 lag der Galaktoseverbrauch in der 3-D-Matrix signifikant (** $p < 0,01$) über dem des Monolayers.

3.2.4 7-Hydroxycumarin-Deethylase Aktivität

Um die Aktivität des Cytochrom P450 Komplexes zu analysieren, wurde die Umwandlung von 7-Ethoxycumarin (EC) zu 7-Hydroxycumarin (7-HC) bestimmt. Die Messungen verliefen hier über 3 h, wobei für die Auswertung nur der Startwert und der 3 h-Wert herangezogen wurden.

Im Monolayer konnte vor allem an den Tagen 3 und 6 eine nennenswerte 7-HC Produktion nachgewiesen werden (Abb. 33). An den darauffolgenden Tagen 12 und 21 stockte die Aktivität der ECOD und die Fluoreszenz des 3 h Wertes gleich sich dem des Startwertes an.

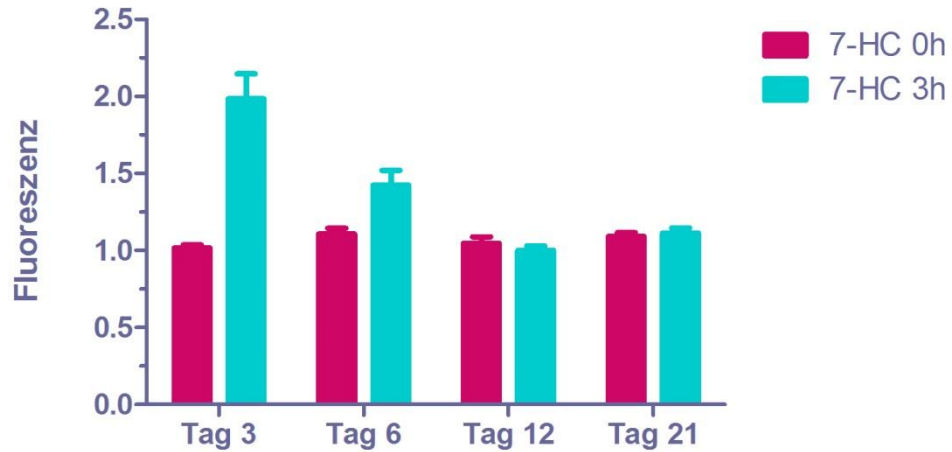


Abbildung 33. Verlauf der 7-HC Bildung im Monolayer.

Anders als im Monolayer konnte in der 3-D-Matrix an keinem der Versuchstage eine höhere Fluoreszenz nach 3 h und somit eine 7-HC Produktion nachgewiesen werden (Abb. 34.).

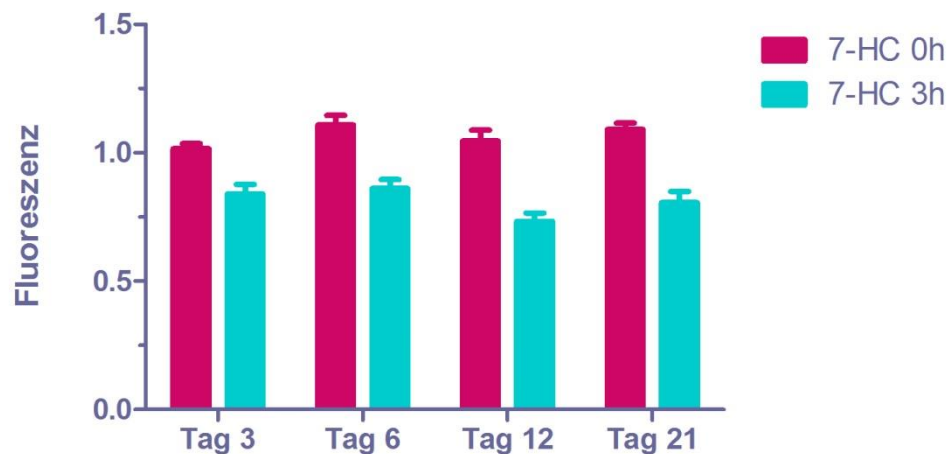


Abbildung 34. Verlauf der 7-HC Bildung in der 3-D-Matrix.

In Abb. 35 stellt sich die unterschiedliche 7-HC Bildung noch deutlicher dar. Vom 3 h Wert wurde der Startwert abgezogen, um die tatsächliche Fluoreszenzerhöhung abzubilden. Hier lässt sich erneut erkennen, dass in der 3-D-Matrix keine Fluoreszenzzunahme nach 3 h erfolgte und somit auch kein 7-HC gebildet wurde. Die negativen Werte können durch Schwankungen während der Messung auftreten.

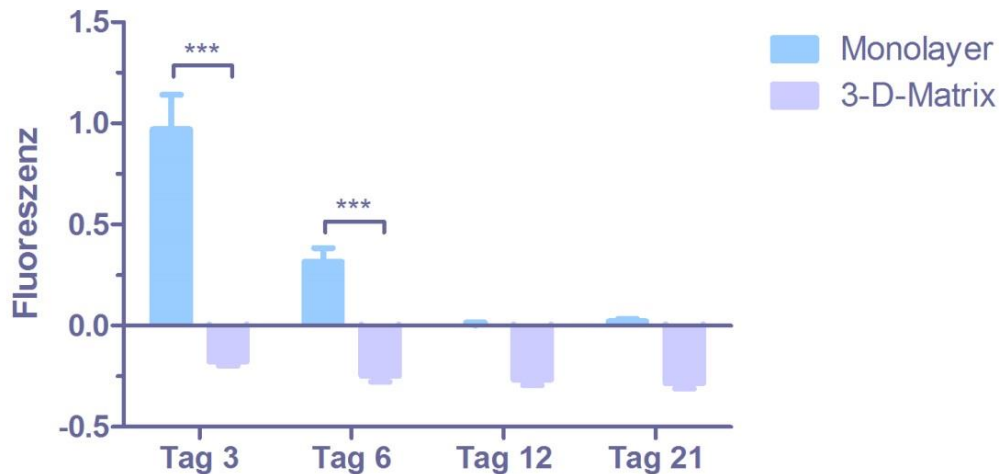


Abbildung 35. 3 h Wert der 7-HC Fluoreszenz abzüglich des Startwertes. Signifikante Unterschiede (** $p < 0,001$) zwischen dem Monolayer und der 3-D-Matrix waren an den Tagen 3 und 6 zu sehen.

3.2.5 Zellviabilitätstest

Um die Anzahl der noch lebenden Zellen in den Zellkulturen zu bestimmen, wurde ein Zellviabilitätstest an den Tagen 3, 6, 12 und 21 durchgeführt. Das Endprodukt des Tests, das blaue Formazan, wurde photometrisch bestimmt und steht in direkter Relation zum Anteil noch lebender Zellen.

Das Testergebnis zeigte deutlich, dass der Anteil lebender Zellen zunächst im Monolayer überwiegt ($p < 0,05$). Nachdem sich beide Populationen an Tag 6 angeglichen haben, gehen ab Tag 12 die Zellen im Monolayer nach und nach zu Grunde während in der 3-D-Matrix eine Zunahme an lebenden Zellen zu verzeichnen ist ($p < 0,001$).

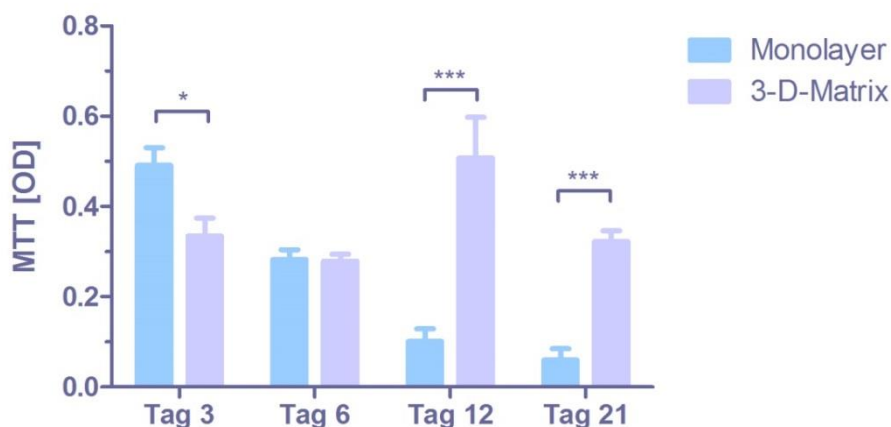


Abbildung 36. Kolorimetrische Messung des gebildeten Formazans im Monolayer und der 3-D-Matrix. Signifikante Unterschiede sind an Tagen 3, 12 und 21 zu erkennen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.2.6 Aspartat – Aminotransferase

Das Ziel dieses Tests war die intrazelluläre Bestimmung der ASAT sowohl im Monolayer als auch in der 3-D-Matrix. Die Menge an ASAT lässt wiederum auf die Menge von intakten Hepatozyten in den Zellkulturen schließen.

Die Konzentration der ASAT im Monolayer nahm im Verlauf der Versuchsreihe stetig ab. In der 3-D-Matrix waren die Werte zum Tag 3 schon signifikant ($p < 0,001$) niedriger als im Monolayer, stiegen jedoch zum Tag 12 an, um dann letztendlich über der Konzentration der ASAT im Monolayer zu liegen.

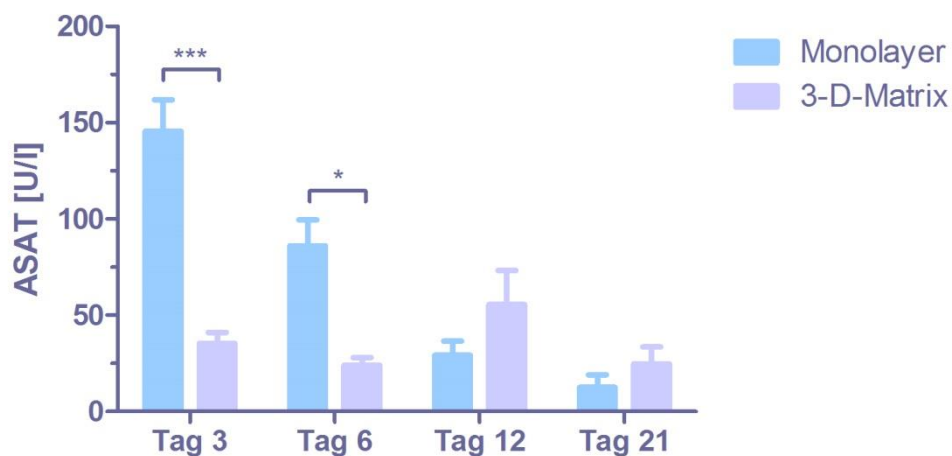


Abbildung 37. Bestimmung der intrazellulären ASAT. Die Konzentration im Monolayer war an den Tagen 3 und 6 signifikant (***) ($p < 0,001$, *) ($p < 0,05$) höher als in der 3-D-Matrix.

3.2.7 Quotient aus ASAT und Zellviabilität

Der mit MTT durchgeführte Zellviabilitätstest zeigt lediglich, ob sich noch lebende Zellen in den Kulturen befinden, definiert jedoch nicht, welche Art von Zellen. Um den Anteil von lebenden, ausdifferenzierten Hepatozyten zu bestimmen, kann ein Quotient aus der Konzentration der ASAT, ein konstitutives Enzym von Hepatozyten, und der ermittelten OD im Zellviabilitätstest gebildet werden. Ein großer Quotient lässt auf einen hohen Anteil an ausdifferenzierten Hepatozyten schließen während ein niedriger Quotient auf andere Zelltypen hindeutet.

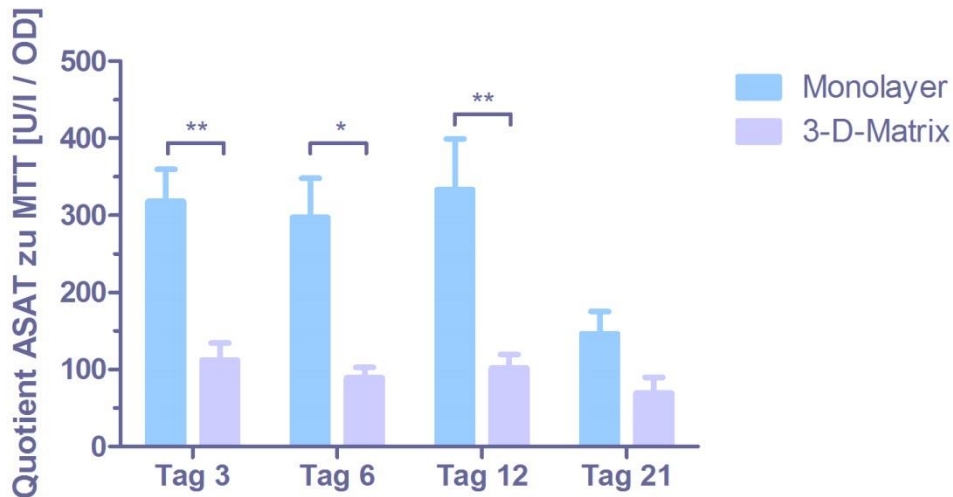


Abbildung 38. Quotient aus ASAT-Konzentration und Zellviabilität. Signifikante Unterschiede (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) sind an den Tagen 3, 6 und 12 zu erkennen.

Die Ermittlung der Quotienten zeigt signifikante Unterschiede zwischen dem Monolayer und der 3-D-Matrix (Abb. 38). Vor allem an den Tagen 3, 6 und 12 sind die Werte fast dreifach so hoch (durchschnittlich 316 ± 52 im Monolayer vs. 101 ± 17 U/I / OD in der 3-D-Matrix). An Tag 21 nimmt der Quotient auch deutlich im Monolayer ab, während die Werte in der 3-D-Matrix konstant bleiben.

3.3 Wiederbesiedelung einer azellularisierten porcinen Leber

Insgesamt wurden 15 azellularisierte Lebern für den Versuch der Wiederbesiedelung herangezogen (Daten nicht gezeigt), um schließlich optimale Versuchsbedingungen zu erreichen. Hierzu zählten der Bau einer geeigneten Kammer, die Temperaturjustierung, ideale Begasungsverhältnisse, Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes durch Verdampfen sowie das optimale Zugeben der isolierten Hepatozyten. Im Laufe der Versuchszeiten konnte ein standardisiertes Protokoll erarbeitet werden (s. 2.2.5), welches für die 3 Wiederbesiedelungen, deren Daten hier präsentiert werden, herangezogen wurde.

Im Mittel wurden den Matrices 2×10^9 Hepatozyten mit einer Zellviabilität von 98% zugegeben. Das klar bleibende, zirkulierende Medium zeigte keine Zellreste, sodass davon auszugehen ist, dass die injizierten Zellen in der Matrix verblieben.

3.3.1 Computersteuerung

Um die Wiederbesiedelung unter kontrollierten Bedingungen durchführen zu können, wurde wie bei der Azellularisierung die Software DASyLab verwendet. Hier diente die gleiche Oberfläche zur Steuerung des Drucks in der Leber, wobei keine parallele Proteinmessung stattfand. Wie schon bei der Azellularisierung startete die Pumpe zunächst mit wenigen Umdrehungen und wurde im Laufe der Zeit nach oben reguliert. Abb. 39 zeigt den beispielhaften Verlauf der Druckkurve bei der Wiederbesiedelung.

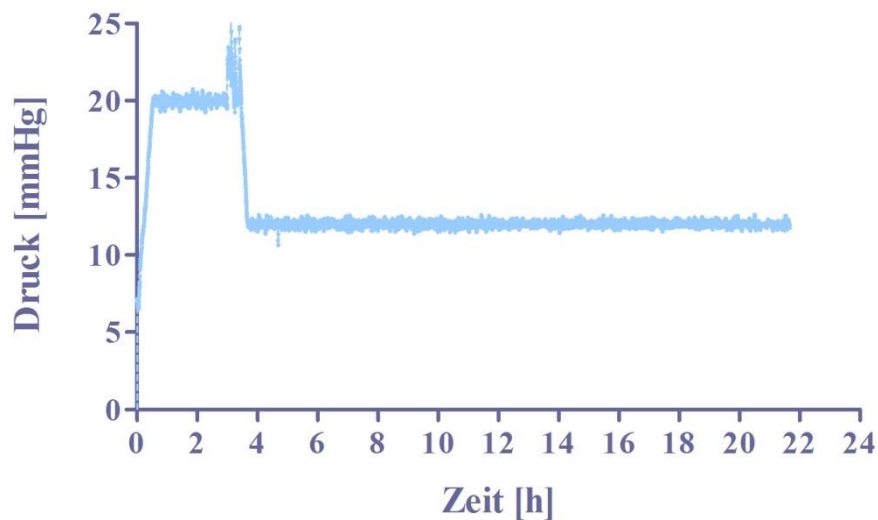


Abbildung 39. Druckverlauf bei Wiederbesiedelung einer azellularisierten Matrix.

Für die Injektion der Hepatozyten wurde ein Druck von 20 mmHg verwendet, um durch die erhöhte Flussrate die Zellen möglichst tief in das Organ zu spülen. Die Druckspitzen um Stunde 4 zeigen die veränderten Druckverhältnisse nach der Eingabe der Zellen. Anschließend erfolgte eine Druckregulation auf 12 mmHg, um möglichst lebensnahe Bedingungen für die Zellkultur zu schaffen.

3.3.2 Makroskopische Auswertung

Während den Wiederbesiedelungsversuchen wurde mit Hilfe einer Kamera jede Minute eine Aufnahme der Lebern gemacht. Dies erlaubt nun einen Vergleich der einzelnen Lebern und deren Entwicklung.

Laufzeit 48 h



Abbildung 40. Wiederbesiedelungsverlauf über 48 h zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h und 48 h

Laufzeit 72 h

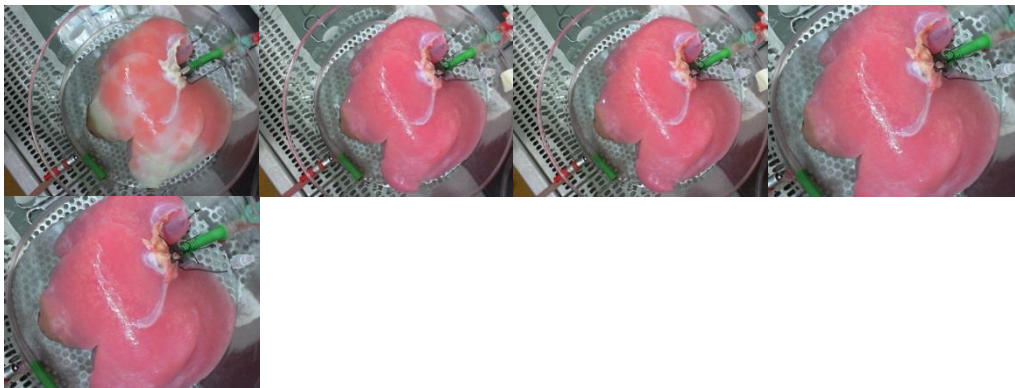


Abbildung 41. Wiederbesiedelungsverlauf über 72 h zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h

Laufzeit 96 h

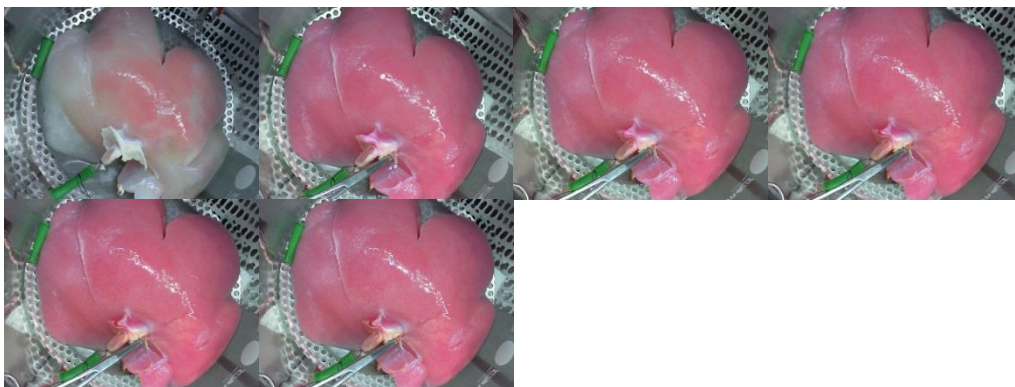


Abbildung 42. Wiederbesiedelungsverlauf über 96 h zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h

Deutlich zu erkennen ist die konstant rosa Farbe des Mediums, was auf keine gravierenden pH-Wert Änderungen hinweist. Ebenfalls sehr schön zu sehen, vor

Ergebnisse

allein im 48 h Verlauf, sind Zellverbände, die sich bräunlich an der Oberfläche des besiedelten abzeichnen (Abb. 40 und 43).

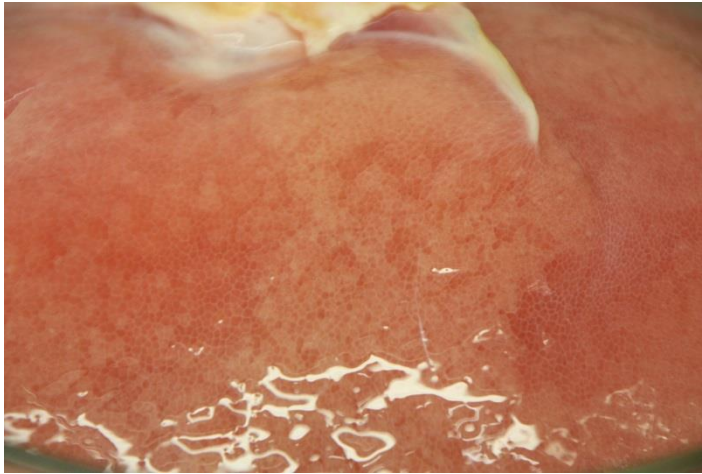


Abbildung 43. Detailaufnahme bei Wiederbesiedelungsversuch nach 48 h.

Während der Entnahme der Histologieschnitte wurde das Gewebe nochmals fotografiert, um makroskopische Veränderungen zu sehen. Die folgenden Abbildungen zeigen deutlich Zellverbände, die sich in der Matrix ausgebildet haben.

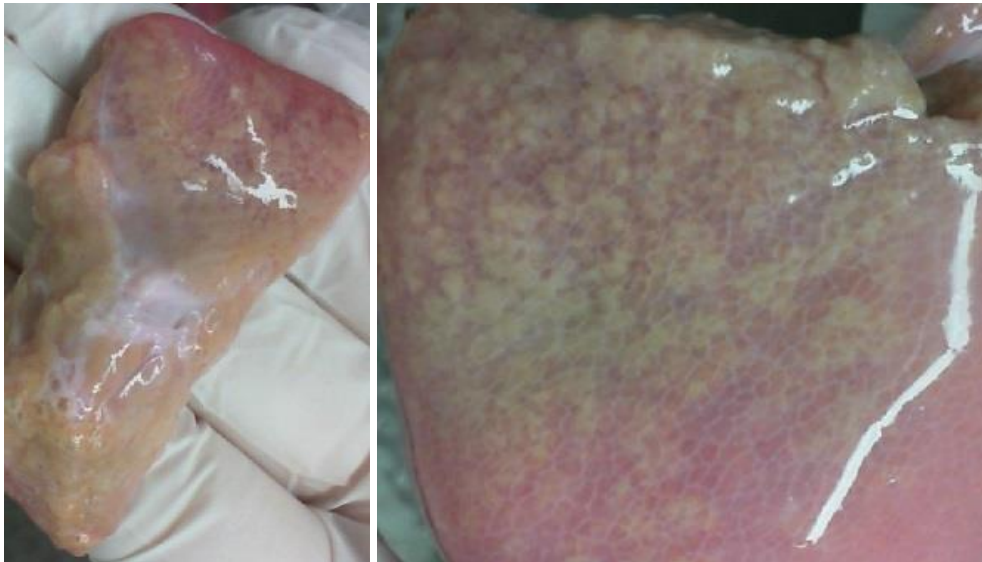


Abbildung 44. Detailaufnahme nach Entnahme der Histologieproben.

3.3.3 BGA Auswertung

Zur Überprüfung der Kulturbedingungen fanden regelmäßige BGA Tests statt. Von großer Bedeutung waren hier der pH-Wert, die Oxygenierung, der Natriumgehalt sowie die Glukosekonzentration.

Der pH-Wert konnte mit Hilfe der richtigen CO₂ Zufuhr während allen 3 Wiederbesiedelungen relativ konstant gehalten werden (Abb. 45). Im Normalfall sollten Werte von 7,35 nicht unterschritten und 7,45 nicht überschritten werden. Größere Abweichungen schaden den Zellen und führen unter Umständen zu deren Untergang.

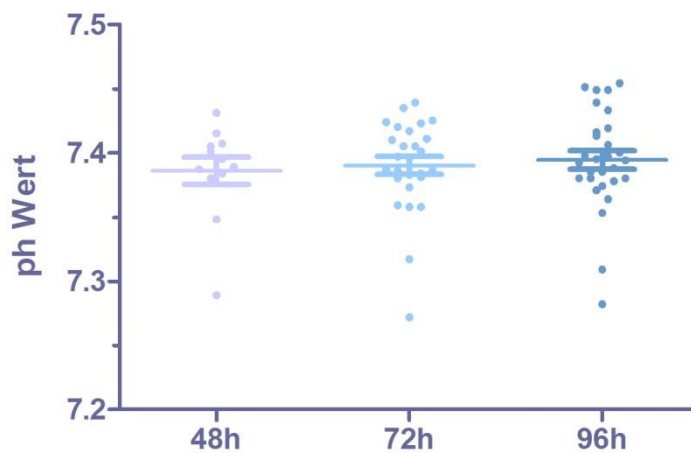


Abbildung 45. Gemessene pH-Werte im Laufe der 3 Versuchsdurchläufe.

Bei allen 3 Versuchen waren pH-Werte in kritischen Bereichen von unter 7,35 messbar. Allerdings tauchten diese Werte nur am Anfang der Versuche auf und wurden durch entsprechende CO₂ Zugabe korrigiert bevor die Injektion der Zellen erfolgte. Die mittleren pH-Werte lagen bei $7,38 \pm 0,01$ (48 h Verlauf), 7,39 (72 h Verlauf) und 7,39 (96 h Verlauf).

Als weiterer Marker wurde der partielle Druck des Sauerstoffs gemessen und überprüft. Dieser liegt im Normalfall zwischen 75 und 105 mmHg. In den gezeigten Versuchen waren diese Werte konstant über dem normalen Mittel (Abb. 46). Der mittlere Sauerstoffpartialdruck lag bei 145 ± 1 mmHg (48 h Verlauf), 145 ± 1 mmHg (72 h Verlauf) und 146 ± 1 mmHg (96 h Verlauf).

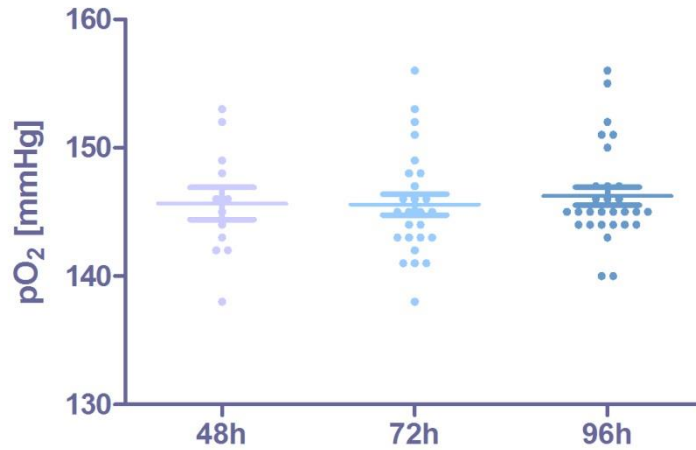


Abbildung 46. Partieller Sauerstoffdruck während der 3 Versuchsdurchläufe.

Gegenteilig verhielt sich der Kohlendioxid-Partialdruck, dessen Normbereich von 35-46 mmHg konstant unterschritten wurde (Abb. 47). Da jedoch der pH-Wert im Normalbereich lag, wurden die verschobenen Partialdrücke in Kauf genommen, um eine Azidose oder Alkalose zu vermeiden.

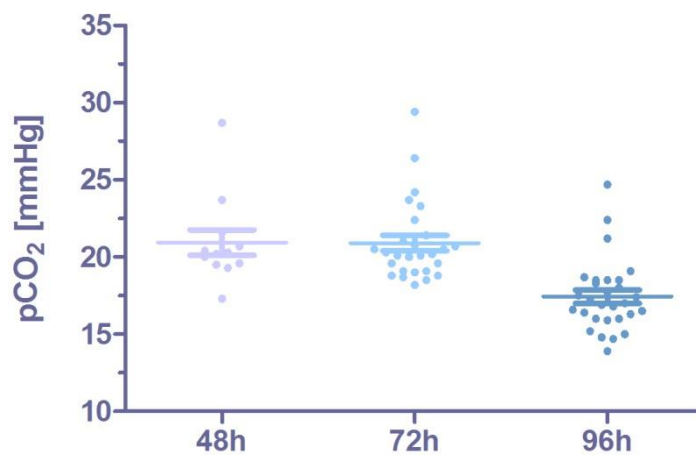


Abbildung 47. Partieller Kohlendioxiddruck während der 3 Versuchsdurchläufe.

Ein weiteres Augenmerk wurde auf den Natriumgehalt der Lösung gerichtet. Dieser sollte zwischen 135 und 145 mmol/l liegen. Diese Werte konnten größtenteils eingehalten werden (Abb. 48).

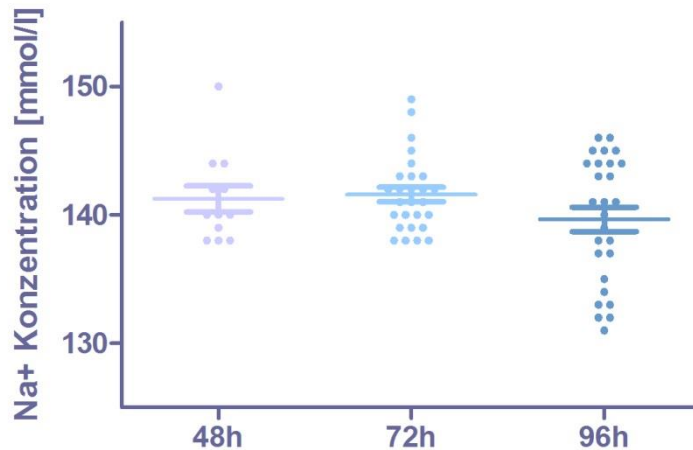


Abbildung 48. Na⁺-Konzentration im Medium während der 3 Versuchsdurchläufe.

Die Mittelwerte der Na⁺ Konzentration lagen bei 141±1 mmol/l (48 h Verlauf), 141 mmol/l (72 h Verlauf) und 139±1 mmol/l (96 h Verlauf). Erhöhte Natriumwerte waren bedingt durch eine Verdunstung des Mediums und unzureichender Zugabe von H₂O.

Neben den bereits genannten Werten wurde noch die Glukosekonzentration über den Verlauf beobachtet deren Normwerte bei 75–150 mg/dl liegen. Bei der Beurteilung der gemessenen Werte ist jedoch zu beachten, dass die Startkonzentration des verwendeten Mediums bereits bei 200 mg/dl lag. Dennoch zeigte die BGA Werte zwischen 130 und 180 mg/dl. Vor allem während des letzten Versuches über 96 h schwankten die Werte stark (Abb. 49).

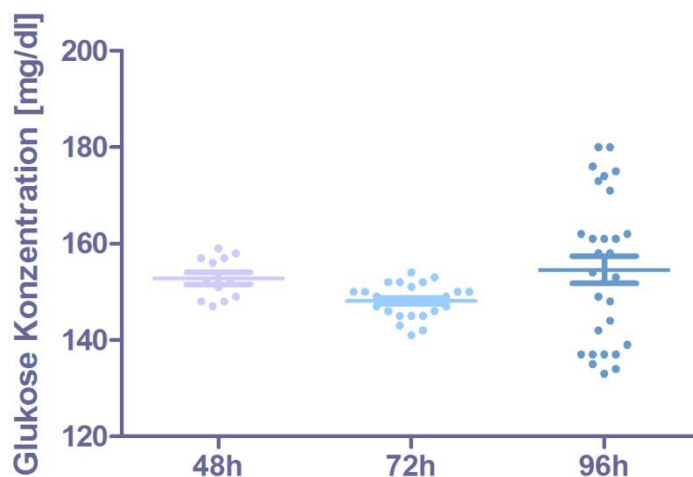


Abbildung 49. Glukosekonzentration im Medium während der 3 Versuchsdurchläufe

Im Mittel wurden Konzentration von 152 ± 1 (48 h Verlauf), 148 (72 h Verlauf) und 154 ± 2 (96 h Verlauf) gemessen. Somit lagen die Glukosewerte in leicht erhöhten Bereichen, was jedoch durch den hohen Anfangswert bedingt sein kann.

3.3.4 Galaktoseelimination

Für den Nachweis einer Hepatozytenaktivität in der wiederbesiedelten Matrix wurde wie bei den Zellkulturen eine 1 mM Galaktoselösung dem Medium zugegeben. Allerdings konnte in keinem der 3 Versuchsabläufe eine Konzentrationsabnahme der Galaktose nachgewiesen werden. Auch die unterschiedlichen Zeitpunkte (Zugabe nach 24 h, 48 h und 72 h) hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis.

3.3.5 H&E-Färbung

Nach einem Zeitraum von 48, 72 und 96 h wurde die Zellkultur in der kompletten Lebermatrix gestoppt und Schnitte für eine H&E Färbung entnommen. Ziel war es, zu erkennen, ob nach einem gewissen Zeitraum die Hepatozyten noch leben und sich eventuell sogar in Zellverbänden organisieren. Auch ist von großem Interesse, ob sie die leeren Leberläppchen erreichen und nicht in den Gefäßen hängen bleiben.

Besiedelung nach 48 h Versuchsdauer

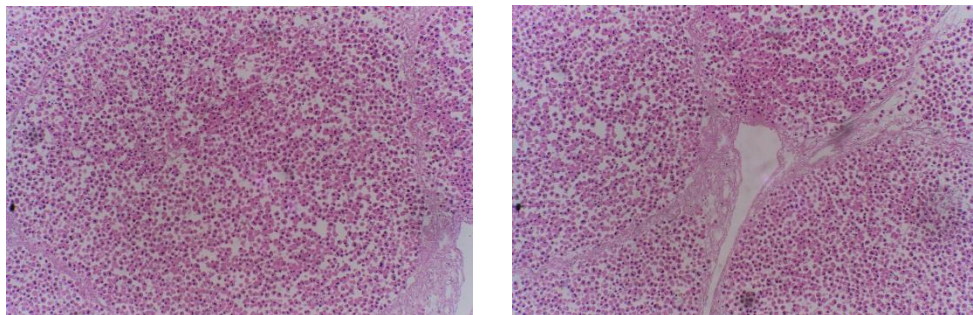


Abbildung 50. H&E Färbung nach 48 h, 10x Vergrößerung.

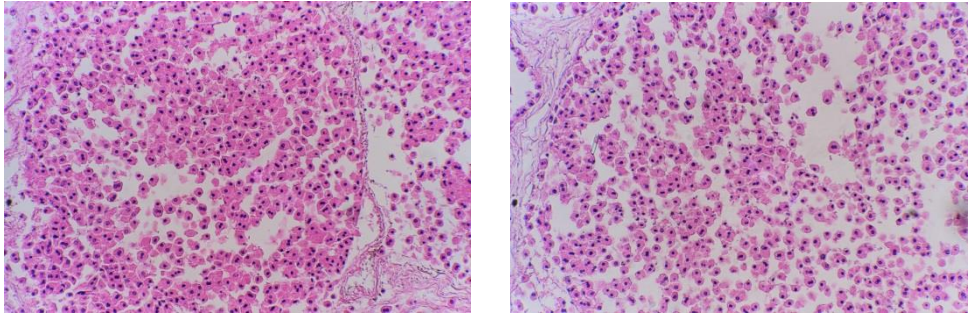


Abbildung 51. H&E-Färbung nach 48 h, 20x Vergrößerung.

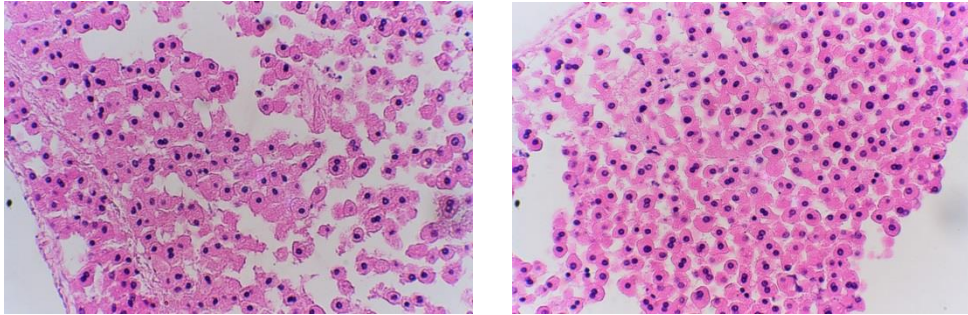


Abbildung 52. H&E-Färbung nach 48 h, 40x Vergrößerung.

Besiedelung nach 72 h Versuchsdauer

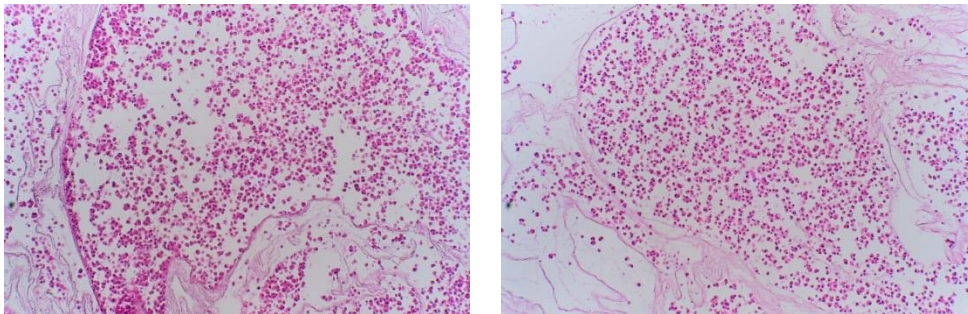


Abbildung 53. H&E-Färbung nach 72 h, 10x Vergrößerung.

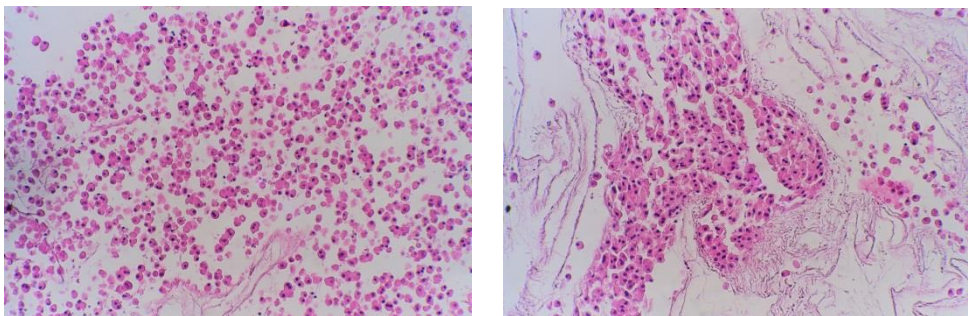


Abbildung 54. H&E-Färbung nach 72 h, 20x Vergrößerung.

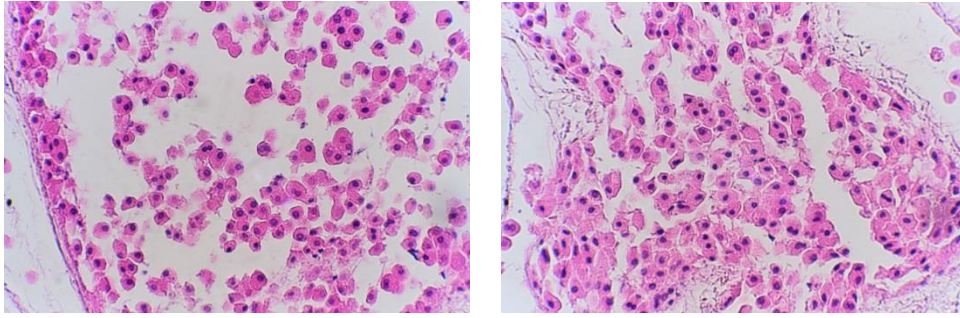


Abbildung 55. H&E-Färbung nach 72 h, 40x Vergrößerung.

Besiedelung nach 96 h Versuchsdauer

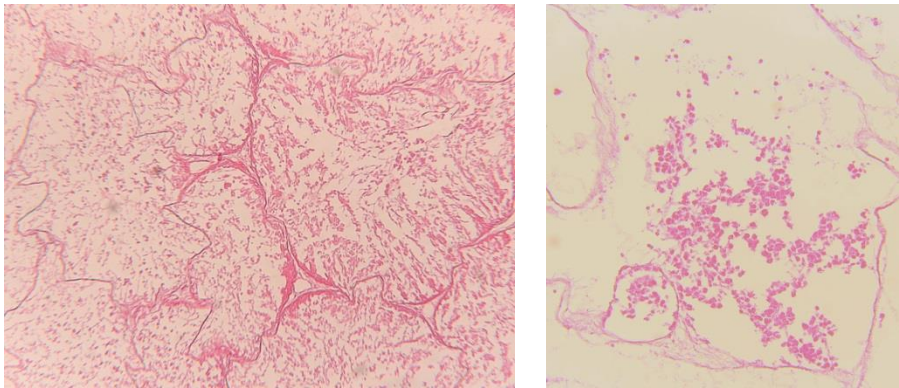


Abbildung 56. H&E-Färbung nach 96 h, 4x und 10x Vergrößerung.

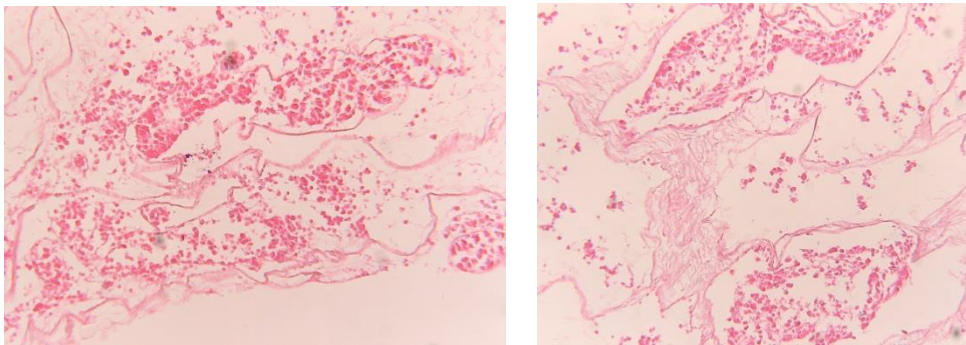


Abbildung 57. H&E-Färbung nach 96 h, 20x Vergrößerung.

Die H&E-Schnitte über den zeitlichen Verlauf von 48, 72 und 96 h lassen vermuten, dass die Hepatozyten gegen Ende der Versuchsdauer zugrunde gehen. Während nach 48 h die Matrix noch mit lebenden Zellen gefüllt ist, die sich auch im Zellverbund zu organisieren scheinen, ist in der Matrix nach 96 h kein lebendes Zellmaterial mehr zu erkennen.

Es zeigt sich jedoch auch, dass die Hepatozyten die kompletten Leberläppchen erreichen und ausfüllen, sowie nicht in den Gefäßen hängen bleiben.

3.3.6 Immunhistochemie

Neben der reinen H&E Färbung, die den Fokus auf intakte Zellkerne richtet, wurden mit Hilfe der immunhistochemischen Ki-67 Färbung mögliche Teilungszustände der Hepatozyten erfasst.

Da in der H&E-Färbung nach 96 h keine lebenden Zellen mehr gesehen werden konnten, wurde bei diesen Leberschnitten auf eine Ki-67 Färbung verzichtet. Die Schnitte der 48 h und 72 h Lebern zeigten jedoch deutlich positive Färbungen der Zellkerne, wie in den Abb. 58-60 zu sehen ist.

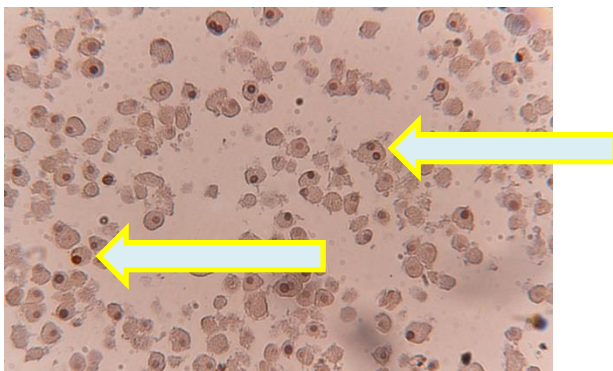


Abbildung 58. Ki-67 Färbung nach 72 h. 40x Vergrößerung.

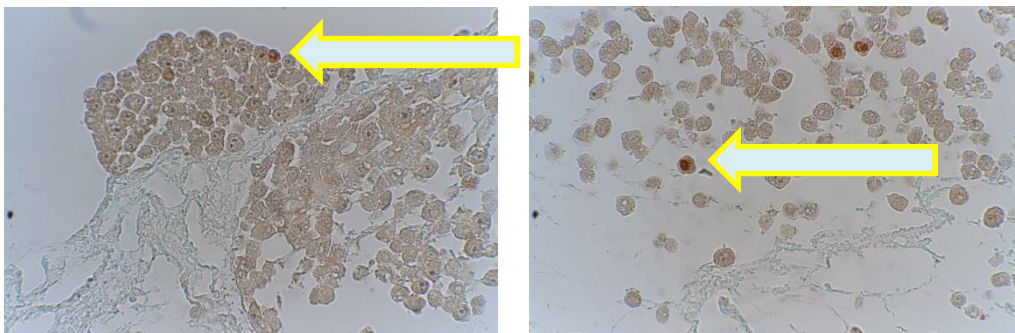


Abbildung 59. Ki-67 Färbung nach 48 h. Braune Zellkerne deuten auf Teilungszustände der Hepatozyten hin. 40x Vergrößerung.

Ergebnisse

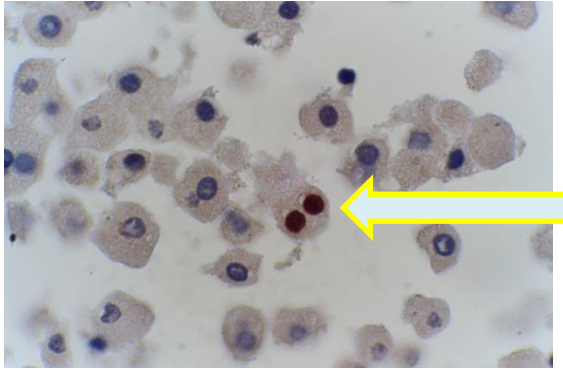


Abbildung 60. Ki-67 Färbung nach 48 h. Hervorhebung eines braun gefärbten Zellkernes mit 100x Vergrößerung.

Vor allem Abb. 60 zeigt deutlich den Unterschied zwischen blau gefärbten Zellkernen, die in der Ruhephase sind und den braunen gefärbten Zellkernen, die eine Teilung eingeleitet haben.

Diskussion

Im ersten Teil unserer durchgeführten Studie konnte ein computergestützter Azellularisierungsvorgang in einem Großtiermodell etabliert werden. Der Prozess resultierte in einer dreidimensionalen Lebermatrix, die im weiteren Studienverlauf für eine Wiederbesiedelung und somit für die Konstruktionen eines transplantierbaren Organs verwendet werden kann.

Die porcinen Lebern konnten in einer durchschnittlichen Zeit von 24 h azellularisiert werden, was durch eine negative H&E-Färbung und eine signifikante DNA-Reduktion bewiesen wurde. Die deutliche Verkürzung der Prozesszeit ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber anderen Protokollen, die zum Beispiel Perfusionszeiten von 96 Stunden beschreiben [34, 56]. Neben der reduzierten Zeit konnte auch der Verbrauch des Detergens auf durchschnittlich 20 l gesenkt werden – dies ist ein enormer Vorteil gegenüber anderen Azellularisierungsmethoden, in denen ein Volumen von 130 l für eine Leber benötigt wird [26]. Die kürzeren Perfusionszeiten und die verminderten Perfusionsvolumina konnten durch einen computerkontrollierten Prozess mit definierten Druck- und Flussraten erreicht werden. Zudem ermöglichte die kontinuierliche Proteinmessung in der Perfusionslösung einen sparsamen Umgang mit dem Detergens, da die Spüllösungen nur getauscht wurden, wenn ein Anstieg der Proteinkonzentration zu verzeichnen war.

Damit während des gesamten Prozesses ein konstanter Druck von 20 mmHg gehalten werden konnte, wurden die Pumpenumdrehungen durch die Computersteuerung regelmäßig adjustiert. Eine Reduktion der Umdrehungen geht auch mit der Reduktion der Flussraten einher. Dieser Zustand war vor allem gegen Ende der Azellularisierung zu beobachten, da wahrscheinlich die Matrices während des Prozesses schrumpfen und eine höhere Dichte aufweisen. Wären die Flussraten in dieser Situation nicht angepasst worden, wäre mit Schäden an der Mikroarchitektur der Lebern zu rechnen gewesen. Der Druck von 20 mmHg wurde gewählt, um möglichst physiologische Bedingungen mit entsprechenden Flussraten zu schaffen, ohne das Gewebe zu großen Stressfaktoren auszusetzen. Ähnliche Drücke und Flussraten wurden bereits von anderen Gruppen erfolgreich verwendet [33, 36, 37]. Somit konnte neben dem sparsamen Umgang mit Ressourcen, wie Chemikalien und Zeit, eine für die Gewebsarchitektur weniger

aggressive Methode entwickelt werden. Die Kombination eines Azellularisierungsprozesses mit der Computertechnologie ist ein neuer Ansatz, der so bisher noch nicht publiziert wurde. Diese neu entwickelte Methode gibt uns die Möglichkeit, nach standardisiertem Vorgehen tierbasierte Matrices aus Lebern oder anderen Organen zu generieren, um sie in der Zukunft für Wiederbesiedelungsversuche zu verwenden.

Ein Hauptaugenmerk wurde bei der Azellularisierung auf das Auswaschen von zellulärem Material gelegt, um mögliche Abwehrreaktionen gegen das wiederbesiedelte, transplantierte Organ zu vermeiden. Die Minimalkriterien, die durch ein erfolgreiches Azellularisierungsprotokoll erreicht werden sollten, sind weniger als 50 ng Doppelstrang-DNA pro mg EZM Trockengewicht und kein sichtbares zelluläres Material [47].

Mit einer reinen SDS-Perfusion konnte der DNA Gehalt auf 3% der Ausgangsmenge reduziert werden. Diese 3% entsprachen allerdings nicht der geforderten Grenze von weniger als 50 ng Doppelstrang-DNA/mg EZM Trockengewicht, weswegen bei 5 der 10 azellularisierten Lebern noch ein weiterer Perfusionsschritt mit DNase durchgeführt wurde. Dieser zusätzliche Enzymeinsatz resultierte in einer weiteren substantiellen Reduktion hin zu 1% des normalen DNA Gehaltes. Obwohl der erreichte DNA-Gehalt immer noch über den geforderten 50 ng/mg EZM liegt, sollte erwähnt werden, dass es bisher keiner Gruppe, die mit ganzen, porcinen Lebern arbeitet, gelungen ist, die Schwelle von 50 ng dsDNA/mg Trockengewicht EZM zu erreichen. Es wird auch kontrovers diskutiert, ob diese niedrige Schwelle überhaupt notwendig ist, um eine Immunreaktion zu vermeiden [57, 58].

Ein grundsätzlicher Vorteil der Azellularisierungsmethode ist die Konservierung der leberspezifischen Mikroarchitektur, die für eine erfolgreiche Wiederbesiedelung von essentieller Bedeutung ist. Bausteine der EZM spielen eine zentrale Rolle in der strukturellen Organisation und physiologischen Funktion der Leber und sind in der Zelladhäsion, -migration und -proliferation involviert [46]. Weil mit dem Azellularisierungsprozess oft Veränderungen in der EZM einhergehen, soll ein adäquates Procedere zwar DNA eliminieren, dabei aber die Hauptkomponenten der EZM wie Kollagen oder GAGs erhalten. Kollagen schafft strukturelle Stärke, während GAGs eine wichtige Rolle in der Wasserretention, der Bindung von Wachstumsfaktoren und der gelartigen

Konsistenz der EZM spielen [46, 59]. In der hier präsentierten Arbeit konnte zwar ein moderater Verlust von Kollagen während der Azellularisierung verzeichnet werden, durchgeführte H&E-Färbungen zeigen jedoch, dass die Glisson'sche Trias und das vaskuläre Netzwerk erhalten blieben. Ähnliche Ergebnisse wurden von Park et al. [35] sowie Wang et al. [37] erzielt. Sie zeigen einen Verlust von 40% der Kollagenfasern in azellularisierten porcinen Leberproben auf. Andere Studien berichten jedoch von keinen Verlusten durch eine Azellularisierung von Ratten- [32] bzw. Schweineorganen [34, 36], obwohl ebenfalls SDS als Azellularisierungsmittel verwendet wurde. Struecker et al. [36] zeigten sogar erhöhte Kollagenwerte in azellularisierten Matrices. Da die honigwabenartige Struktur der Leberläppchen sowie die Gefäße und die Glisson'sche Trias erhalten werden konnten, kann vermutet werden, dass der teilweise Verlust des Kollagens keine größeren Probleme bei der Wiederbesiedelung bereitet und unter Umständen die Migration der eingeschleusten Hepatozyten in die Tiefe des Organs sogar erleichtert [60].

Die Erhaltung der GAGs ist von substantieller Bedeutung, da sie für die Morphogenese, Zellform und Motilität sehr wichtig sind [61]. Im Gegensatz zu Kollagen, war der GAG-Gehalt um das 5- bzw. 8-fache erhöht im Vergleich zu nativem Lebergewebe. Der Grund für diesen enormen Anstieg ist momentan unklar, jedoch könnte es an strukturellen Veränderungen oder einer erhöhten Bindungsaffinität des Färbereagens zu proteinfreien GAGs liegen. Park et al. haben ähnliche Ergebnisse für die GAGs in porcinem Lebergewebe präsentiert [35]. Außer der Gruppe um Struecker et al., die verringerte GAG-Werte fanden, hat keine weitere Gruppe in porcinen Lebern GAGs nach der Azellularisierung gemessen. Grundsätzlich konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein standardisierter Azellularisierungsvorgang von kompletten porcinen Lebern in knapp 24 Stunden mit Ressourcen schonenden Methoden möglich ist.

Um einen Zwischenschritt zur Wiederbesiedelung von kompletten azellularisierten Organen einzuführen und verschiedene Funktionstest zu etablieren, wurden zwei verschiedene Zellkulturen geschaffen. Zum einen wurden aus porcinen Lebern isolierte Hepatozyten in einem Monolayer in Kultur genommen. Zum anderen dienten kleine, azellularisierte Leberstückchen als Basis für eine weitere Kultur mit porcinen primären Hepatozyten.

Die Wahl der Zellsorte ist zunächst etwas ungewöhnlich, da für Zellkulturen gerne mit HepG2 gearbeitet wird – eine Tumorzelllinie, die die Fähigkeit der Proliferation mit sich bringt [62]. Allerdings sollten die Versuche möglichst nahe an einer zukünftigen Wiederbesiedlungspraxis liegen, weswegen die Wahl auf primäre Hepatozyten fiel. Auch von anderen Gruppen wurde der Einsatz von primären Hepatozyten für Zellkulturen oder Wiederbesiedlungen als sinnvoll erachtet [63]. In anderen Studien wurde bereits belegt, dass porcine Hepatozyten in Kultur spezifische Leberfunktionen wie Albuminsynthese, Aminosäurestoffwechsel und Harnstoffproduktion ausführen [64-67].

Die durchgeführten Stoffwechselltests in unseren beiden Zellkulturen lieferten ganz unterschiedliche Ergebnisse. Überraschenderweise konnte in keiner Kultur eine Albuminsynthese festgestellt werden. Dieses Ergebnis war unerwartet, da diverse Studien Albumin im Zellkulturmedium messen konnten. So zeigte die Gruppe um Lin et al., die ebenfalls azellularisierte porcine Leberstückchen mit primären Hepatozyten inkubierten, eine stetige Zunahme der Albuminsynthese über den Versuchsverlauf von 33 Tagen [68]. Studien, die eine andere 3-D-Matrix als Basis wählten und mit porcinen Hepatozyten wiederbesiedelten, demonstrierten ebenfalls, dass eine Albuminsekretion messbar war [34].

Die Harnstoffsynthese konnte in beiden Kulturen nachgewiesen werden, wobei der Monolayer leicht höhere Werte aufwies. Insgesamt wurden zwischen 33 und 48% des zugegebenen Ammoniumchlorids zu Harnstoff umgesetzt. Auffallend war, dass im Monolayer die höchsten Werte nach 21 Tagen Kulturzeit erreicht wurden, während in der 3-D-Matrix zu Beginn die höchste Syntheserate vorhanden war.

Eine weitere Möglichkeit zur Messung der Hepatozytenaktivität ist die Elimination von zugegebener Galaktose aus dem Medium. In beiden Zellkulturen konnte eine Abnahme der Galaktose gemessen werden, wobei die Hepatozyten in der 3-D-Kultur signifikant mehr Galaktose umsetzten als die Hepatozyten im Monolayer. Ganz anders fiel der Aktivitätstest des Cytochrom P 450 Komplexes aus – in den Hepatozyten der 3-D-Struktur wurde kein 7-Hydroxycoumarin gebildet, während die Hepatozyten im Monolayer zumindest bis zum Tag 6 eine Aktivität aufweisen konnten. Betrachtet man zum Schluss die Zellviabilität und die Bestimmung der ASAT sowie deren Quotienten, fällt auf, dass in der 3-D-

Struktur zwar mehr lebende Zellen bis zum Tag 21 vorhanden sind, es sich allerdings nur teilweise um ausdifferenzierte Hepatozyten handelt.

Alle durchgeführten Funktionstests lassen darauf schließen, dass im Monolayer zunächst mehr Zellen haften blieben und ihre typische Funktion als Hepatozyten erfüllten, allerdings mit zunehmender Kulturzeit ihre zelluläre Differenzierung verloren und abstarben. In der 3-D-Struktur siedelten sich eindeutig weniger Hepatozyten an und die typischen Zellfunktionen waren auch deutlich vermindert ausgeprägt. Im Gegensatz zum Monolayer konnten jedoch die Zellen, die sich angesiedelt hatten, länger überleben und in ihrer Form als Hepatozyt erhalten bleiben.

Bis auf die fehlende Albuminsekretion wurden die Ergebnisse anderer Studien bestätigt. Auch in diesen Studien wurde gezeigt, dass Hepatozyten *in vitro* im klassischen Monolayer nach ca. 72 h ihre zelluläre Differenzierung verlieren [69], dass sie in einer 3-D-Struktur länger überleben können und spezifische Differenzierungen länger erhalten bleiben [70].

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Wiederbesiedelung einer azellularisierten Matrix mit primären porcinen Hepatozyten. Die Wiederbesiedlung einer kompletten Leber von der Größe des menschlichen Organs wurde bisher sehr selten durchgeführt. Die Grundlagenarbeit wurde vor allem in Nagetieren geleistet und publiziert.

Für unsere Wiederbesiedelung war es uns wichtig, dass wie bei der Azellularisierung ein automatisierter Ablauf die Arbeit unterstützen soll. Deswegen wurde ebenfalls mit dem Computersystem DASyLab gearbeitet. Bis ein optimales Protokoll etabliert werden konnte, wurde der Aufbau an 15 Lebern getestet und überarbeitet. Letztendlich wurden drei Lebern mit porcinen Hepatozyten wiederbesiedelt und für verschiedene Zeiträume in Kultur gehalten. Durchschnittlich wurden den Matrices 2×10^9 primäre Hepatozyten zugeführt. Eine normale Leber eines erwachsenen Menschen hat im Durchschnitt eine Zellzahl von 4×10^9 Hepatozyten pro kg Körpergewicht [71]. Allerdings muss zum Zeitpunkt der Implantation eine Leber nicht mit einem hohen Prozentsatz der original Zellen wiederbesiedelt sein [21]. Es gibt zwar noch keine als optimal beschriebene Zellzahl, aber aktuelle Studien empfehlen, dass 5% - 10% des vorgenannten Wertes für eine Wiederbesiedelung notwendig sind. Dies würde

bedeuten, dass für die Größe des Organs, mindestens 10×10^9 Hepatozyten eingebracht werden sollten, um eine komplette Wiederbesiedelung des Organs zu erreichen. Daraus lässt sich schließen, dass in weiteren Schritten eine weitaus höhere Zellzahl verwendet werden müsste, um ein Organ in einen transplantationsfähigen Zustand zu bringen.

Um den Zellen gute Kulturbedingungen zu bieten, wurde das Medium regelmäßig durch BGA-Tests untersucht. In allen drei präsentierten Versuchsreihen konnten gute Bedingungen erreicht und gehalten werden. Im Fokus standen vor allem die Glukose-, Natrium- und pH-Werte des Mediums, die kontinuierlich dokumentiert wurden. Mit Hilfe einer zweiten, in den Kreislauf eingebauten Pumpe, konnten auch mögliche Luftblasen, die die Kultur gestört hätten, abgepumpt werden. Eine kontinuierliche dH_2O -Zugabe wirkte einem Verschieben der Natriumchloridverhältnisse entgegen. Insgesamt konnte also eine stabile Umgebung geschaffen werden und mögliche Störfaktoren wurden eliminiert. Eine Optimierung könnte noch erzielt werden, wenn die Leber in einer geschlossenen Kammer inkubiert wird, wie es bereits bei Versuchen mit kleineren Organen gezeigt wurde [27].

Im Laufe der Versuchsdauer sollte die Fähigkeit der Galaktoseelimination als Marker für die Stoffwechselaktivität ermittelt werden. Hierfür wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten eine Galaktoselösung zugegeben und über einen Verlauf von 24 h das Medium gesammelt. In keiner der drei Kulturen konnte eine Abnahme der Galaktosekonzentration festgestellt werden. Auch konnte in keiner Kultur Albumin nachgewiesen und somit eine Sekretion bestätigt werden. Vor allem die nicht vorhandene Albuminsekretion lässt sich nicht erklären, da in mehreren Versuchen, sei es in Nagetieren oder Schweinen, von einer positiven Albuminproduktion berichtet wird [26, 27, 34]. Der Verbrauch von Galaktose wurde in einer wiederbesiedelten Matrix noch nicht publiziert, weswegen zu diesem Thema keine Vergleiche herangezogen werden können. Es ist zu diskutieren, ob sich zu wenige Zellen in der EZM angesiedelt haben, um nennenswerte Mengen an Albumin zu sezernieren bzw. Galaktose zu eliminieren. Dass die injizierten Hepatozyten sich in dem Gerüst ansiedeln konnten, bestätigen die H&E-Schnitte, die makroskopischen Aufnahmen und vor allem die immunhistochemische Färbung mit Ki-67. Diese beweist, dass sich die Zellen im Teilungszustand befinden und somit eine Proliferation stattfindet.

Allerdings war nach einer Versuchsdauer von 96 Stunden ein Untergang der Hepatozyten zu erkennen. Diese zeitliche Begrenzung ist keinesfalls optimal und es gilt sie deutlich zu verbessern. Andere Studien erreichten bereits Versuchsdauern von 4 Tagen bis zu 2 Wochen, wobei die hohen Zeiten nur in Nagetieren und mit pluripotenten Stammzellen erzielt werden konnten [24, 29, 32, 34, 63].

Grundsätzlich lässt sich vor allem über die Wahl der Zellen und die Struktur des Versuchsablaufs diskutieren. Bevor eine Wiederbesiedlung mit Hepatozyten oder anderen Zellen begonnen wird, könnten die Gefäße mit Endothelzellen ausgekleidet werden. Dass dies in großen Matrices funktioniert, hat die Gruppe um Ko et al. bewiesen, die azellularisierte porcine EZM mit Endothelzellen wiederbesiedelten und in vivo an einen physiologischen Blutfluss anschlossen [56]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Baptista et al., die azellularisierte Frettchenlebern mit Endothelzellen auskleideten und zusätzlich noch humane Leberprogenitorzellen einbrachten [31]. Die Idee hierbei ist, dass zum einen eine Durchblutung in vivo ermöglicht wird und zum anderen weitere zugegebene Zellen nicht an den Gefäßwänden haften bleiben.

Neben der Entscheidung für ein Auskleiden der Gefäße ist die Wahl der Zellarten von Bedeutung. Wie in unserer Studie wurden Matrices zunächst nur mit primären Hepatozyten wiederbesiedelt. Mittlerweile wurden aber deutlich mehr Zelltypen herangezogen, um transplantierfähige Organe zu bauen und vor allem in kleinen Organen wurden hier schon vielversprechende Ergebnisse erreicht. Neben den bereits erwähnten pluripotenten Stammzellen aus humanen Embryos wurden unter anderem auch hUVEC Zellen aus der Nabelschnur [31, 72] und mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark verwendet [73].

Im Allgemeinen zeigt die dargestellte Arbeit, dass die Möglichkeit besteht, in Zukunft durch Tissue Engineering ein transplantationsfähiges Organ zu generieren. Dieser Weg würde entscheidende Fortschritte in der Therapie des akuten oder chronischen Leberversagens bringen, da der Mangel an Spenderorganen ausgeglichen werden und die Lebertransplantation als Goldstandard weiterhin durchgeführt werden könnte.

Um dieses Ziel zu erreichen, müssen zukünftige Arbeiten noch bestehende Probleme betrachten und angehen. Es gilt zu klären, welche Zellarten für eine komplette Wiederherstellung der Leberfunktionen nötig sind und in welcher Zahl sowie Reihenfolge sie eingebracht werden müssen. Um große Organe in Kultur zu nehmen, müssen standardisierte Gefäße entwickelt werden, die genügend Platz und ideale Bedingungen bieten. Es gilt bereits erfolgreiche Modelle aus Nagetieren auf humane Größen zu übertragen. Von entscheidender Bedeutung ist eine dauerhafte Steigerung der Kulturdauer, um den Zellen überhaupt die Chance auf Proliferation und somit Vermehrung zu geben. Konnte letztendlich eine funktionierende Leber durch Tissue Engineering hergestellt werden, muss diese im nächsten Schritt im Tiermodell transplantiert und getestet werden, bevor eine Übertragung in den humanen Bereich erfolgen kann.

Um die angesprochenen Probleme und Hürden zu bewältigen, sind noch viele Studien notwendig. Man ist dem Tissue Engineerings einer kompletten Leber allerdings deutlich nähergekommen.

Zusammenfassung

Durch den Mangel an Spenderorganen kann in der Transplantationsmedizin der Bedarf an Organersatz nur teilweise gedeckt werden. Daher sind durch Tissue-Engineering auf Basis tierischer Matrices erzeugte Ersatzorgane eine attraktive Alternative. Zur Generierung dieser zellfreien Matrices stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Sie sind jedoch meistens sehr zeitintensiv und unterliegen keinem standardisierten Prozess. Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung eines kürzeren und schonenderen Azellularisierungsprozesses sowie in weiteren Schritten die Wiederbesiedelung solcher Matrices mit porcinen Hepatozyten.

Für die Entwicklung eines neuen Azellularisierungsprotokolles wurden Lebern aus Göttinger Minipigs mit Hilfe eines computergestützten, zirkulierenden Systems mit einer 1% Natriumdodecylsulfatlösung bei 37°C bei einem vorgegebenen Druck von 20 mmHg für durchschnittlich 24 h gespült. Neben dem Detergenz SDS wurde noch das Enzym DNase für eine komplette Beseitigung der tierischen DNA eingesetzt. Zur Überprüfung der Matrices wurden DNA-, Kollagen- und Glykosaminoglykgehalt bestimmt, sowie H&E-Färbungen angefertigt. In einem zweiten Schritt erfolgte die Etablierung von diversen Stoffwechselltests, wie die Messung der Galaktoseelimination, die Albuminmessung oder die Beurteilung der Zellviabilität. Die verwendeten Medien waren Hepatozytenmonolayer und Hepatozyten-3-D-Strukturen, wofür porcine Hepatozyten in ca 1 cm³ großen Matrixstückchen angesiedelt wurden. Im letzten Schritt erfolgte die Wiederbesiedelung einer azellularisierten, porcinen Lebermatrix mit primären, porcinen Hepatozyten über die Zeitabschnitte von 48, 72 und 96 h. Die Wiederbesiedelung erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines computergestützten, zirkulierenden Systems. Für die Evaluierung der wiederbesiedelten Matrices erfolgten eine Albuminmessung, die Bestimmung der Galaktoseelimination, sowie die Färbung von Schnitten mit H&E und Ki-67.

Die hier vorgestellte Doktorarbeit zeigt, dass eine porcine Leber in 24 h in einem standardisierten Prozess mit 1% SDS erfolgreich azellularisiert werden kann, um ein Organgerüst zu erhalten, das für die Herstellung von Gewebsstrukturen geeignet ist. Die Wiederbesiedelungsversuche mit porcinen Hepatozyten ergaben, dass die Zellen das vaskuläre Netzwerk nutzen, um das Portalfeld zu erreichen

Zusammenfassung

und einen Zellverbund zu bilden. Die mit Ki-67 positiv gefärbten Zellen lassen auf einen aktiven Teilungszustand der Zellen während der Zeitläufe 48 und 72 h schließen, während nach 96 h ein Zelluntergang zu erkennen ist. In Grundzügen konnte gezeigt werden, dass die Wiederbesiedelung einer Matrix mit Zellen möglich ist. In weiteren Studien müssen nun die Zellkulturdauer erhöht und neben Hepatozyten weitere Zelltypen eingebracht werden. Grundsätzlich konnte man sich dem Tissue Engineering einer Leber einen weiteren Schritt nähern.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Struktureller und funktioneller Aufbau der Leber.	2
Abbildung 2. Ultrastruktur des Hepatozyten.....	3
Abbildung 3. Grundlagen des Tissue Engineering.....	8
Abbildung 4. Regelungskreisläufe.	24
Abbildung 5. Überwachungs- und Steuerungsoberflächen von DASYSLab.....	25
Abbildung 6. Versuchsaufbau zur Azellularisierung von porcinen Lebern.	25
Abbildung 7. Schematische Darstellung der Hepatozytenisolation	33
Abbildung 8. Aufbau zur Wiederbesiedelung.....	35
Abbildung 9. Beispielhafte Druckregulation	47
Abbildung 10. Flussraten der zehn Azellularisierungsprozesse.....	48
Abbildung 11. Durchschnittliche Flussrate aller Azellularisierungsprozesse.....	48
Abbildung 12. Entwicklung der Proteinkonzentration.....	49
Abbildung 13. Durchschnittliche Proteinkonzentration.....	49
Abbildung 14. Azellularisierungsverlauf zu vier Zeitpunkten.....	51
Abbildung 15. Gewichte der porcinen Lebern	52
Abbildung 16. DNA Rückstände in den azellularisierten Matrices..	53
Abbildung 17. Vergleich des DNA Gehaltes in den Gruppen SDS und SDS+DNase	54
Abbildung 18. DNA-Gehalt der nativen und azellularisierten Matrices im Vergleich.	55
Abbildung 19. Vergleich des Kollagengehaltes in den Gruppen SDS und SDS+DNase.	56
Abbildung 20. Kollagengehalt der nativen und azellularisierten Matrices im Vergleich.	57
Abbildung 21. Vergleich des Glykosaminoglykangehaltes in den Gruppen SDS und SDS+DNase.	58
Abbildung 22. Glykosaminoglykangehalt der nativen und azellularisierten Matrices im Vergleich.....	59
Abbildung 23/24. H&E Färbung natives und azellularisiertes Leberläppchen.....	60
Abbildung 25. Glisson Trias in einer azellularisierten Matrix (x40).	60
Abbildung 26/27. Azellularisierte Matrix mit DNA Schleier	60
Abbildung 28. Hepatozytenkultur im Monolayer, Tag 1 nach Einsaat.....	61

Abbildung 29. Harnstoffkonzentration nach 2 und 4 h im Monolayer.	62
Abbildung 30. Harnstoffkonzentration nach 2 und 4 h in der 3-D-Matrix.	62
Abbildung 31. Harnstoffkonzentration im Monolayer und der 3-D-Matrix	63
Abbildung 32. Abnahme der Galaktose im Monolayer und in der 3-D-Matrix	64
Abbildung 33. Verlauf der 7-HC Bildung im Monolayer.	65
Abbildung 34. Verlauf der 7-HC Bildung in der 3-D-Matrix.	65
Abbildung 35. 3h Wert der 7-HC Fluoreszenz abzüglich des Startwertes.....	66
Abbildung 36. Messung des gebildeten Formazans	66
Abbildung 37. Bestimmung der intrazellulären ASAT.....	67
Abbildung 38. Quotient aus ASAT-Konzentration und Zellviabilität.	68
Abbildung 39. Druckverlauf bei Wiederbesiedelung.....	69
Abbildung 40. Wiederbesiedelungsverlauf über 48 h.....	70
Abbildung 41. Wiederbesiedelungsverlauf über 72 h.....	70
Abbildung 42. Wiederbesiedelungsverlauf über 96 h.....	70
Abbildung 43. Detailaufnahme bei Wiederbesiedelungsversuch nach 48 h.	71
Abbildung 44. Detailaufnahme nach Entnahme der Histologieproben.....	71
Abbildung 45. Gemessene pH Werte im Laufe der 3 Versuchsdurchläufe.	72
Abbildung 46. Partieller Sauerstoffdruck.....	73
Abbildung 47. Partieller Kohlendioxiddruck	73
Abbildung 48. Na ⁺ Konzentration im Medium.	74
Abbildung 49. Glukosekonzentration im Medium.....	74
Abbildung 50. H&E Färbung nach 48 h, 10x Vergrößerung.	75
Abbildung 51. H&E Färbung nach 48 h, 20x Vergrößerung.	76
Abbildung 52. H&E Färbung nach 48 h, 40x Vergrößerung.	76
Abbildung 53. H&E Färbung nach 72 h, 10x Vergrößerung.	76
Abbildung 54. H&E Färbung nach 72 h, 20x Vergrößerung.	76
Abbildung 55. H&E Färbung nach 72 h, 40x Vergrößerung.	77
Abbildung 56. H&E Färbung nach 96 h, 4x und 10x Vergrößerung.	77
Abbildung 57. H&E Färbung nach 96 h, 20x Vergrößerung.	77
Abbildung 58. Ki-67 Färbung nach 72 h. 40x Vergrößerung.	78
Abbildung 59. Ki-67 Färbung nach 48 h.....	78
Abbildung 60. Ki-67 Färbung nach 48 h.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Azellularisierung von Lebern aus verschiedenen Spezies.	10
Tabelle 2. Azellularisierungsprotokoll für porcine Lebern	26
Tabelle 3. Pipettierschema für die Standardreihe der Kollagenbestimmung	29
Tabelle 4. Pipettierschema für die Standardreihe der GAGs Bestimmung	30
Tabelle 5. Entparaffinieren von Gewebeschnitten	31
Tabelle 6. Entwässern von H&E gefärbten Gewebeschnitten	31
Tabelle 7. Pipettierschema für die Standardreihe der Albuminbestimmung	37
Tabelle 8. Pipettierschema für die Standardreihe der Harnstoffbestimmung	38
Tabelle 9. Pipettierschema für die Standardreihe Glukosebestimmung	39
Tabelle 10. Versuchsablauf der Galaktosebestimmung	40
Tabelle 11. Pipettierschema für die Standardreihe von 7-Hydroxycoumarin	41
Tabelle 12. Pipettierschema für die Standardreihe ASAT-Aktivitätsbestimmung	43
Tabelle 13. Entparaffinieren von Histologieschnitten für eine Ki-67 Färbung.....	45
Tabelle 14. Immunhistochemische Färbung mit einem Ki-67 Antikörper	45
Tabelle 15. Gewichtsverläufe der porcinen Lebern im Azellularisierungsprozess	51
Tabelle 16. DNA Rückstände in den azellularisierten Matrices.	53
Tabelle 17. Kollagengehalt der azellularisierten Matrices	56
Tabelle 18. Glykosaminoglykangehalt der azellularisierten Matrices.	58
Tabelle 19. Ammoniakverbrauch in den jeweiligen Zellkulturen.....	63

Literaturverzeichnis

1. Netter, F.H., *Atlas of Human Anatomy*. 2 ed. 1999, East Hanover: Novartis.
2. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 3 ed. 2014, Stuttgart: Thieme Verlag. 1336.
3. Siegenthaler, W. and H.E. Blum, *Klinische Pathophysiologie*. 2006, Stuttgart: Thieme Verlag.
4. Löffler, G., P.E. Petrides, and P.C. Heinrich, *Biochemie & Pathobiochemie*. 8 ed. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 1263.
5. Schmidt, R.F. and F. Lang, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 30 ed. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 1030.
6. Soltys, K.A., et al., *Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation*. *J Hepatol*, 2010. **53**(4): p. 769-74.
7. Fisher, R.A. and S.C. Strom, *Human hepatocyte transplantation: worldwide results*. *Transplantation*, 2006. **82**(4): p. 441-9.
8. Puppi, J. and A. Dhawan, *Human hepatocyte transplantation overview*. *Methods Mol Biol*, 2009. **481**: p. 1-16.
9. Lysy, P.A., et al., *Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(6): p. 864-75.
10. Eurotransplant. 2016; Available from: www.eurotransplant.de.
11. Services, U.S.D.o.H.H. 2016; Available from: <https://optn.transplant.hrsa.gov/>.
12. Singh, S. and K.D. Watt, *Long-term medical management of the liver transplant recipient: what the primary care physician needs to know*. *Mayo Clin Proc*, 2012. **87**(8): p. 779-90.
13. van de Kerkhove, M.P., et al., *Clinical application of bioartificial liver support systems*. *Ann Surg*, 2004. **240**(2): p. 216-30.
14. Hörl, W.H. and C. Wanner, *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis*. 6 ed. 2003, Stuttgart: Thieme Verlag.
15. Saliba, F., *The Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) in the intensive care unit: a rescue therapy for patients with hepatic failure*. *Crit Care*, 2006. **10**(1): p. 118.
16. Stadlbauer, V., et al., *Effect of extracorporeal liver support by MARS and Prometheus on serum cytokines in acute-on-chronic liver failure*. *Crit Care*, 2006. **10**(6): p. R169.
17. Skalak, R., *Tissue engineering : proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, Calif., February 26-29, 1988*. UCLA symposia on molecular and cellular biology : Symposium on Molecular and Cellular Biology, ed. R.H. Skalak. 1988, New York: Liss.
18. Atala, A., et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. *Lancet*, 2006. **367**(9518): p. 1241-6.
19. Dahl, S.L., et al., *Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation*. *Cell Transplant*, 2003. **12**(6): p. 659-66.
20. L'Heureux, N., et al., *Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization*. *Nat.Med.*, 2006. **12**(3): p. 361-365.

21. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. **13**: p. 27-53.
22. Baptista, P.M., et al., *Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering*. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009. **2009**: p. 6526-6529.
23. Mertsching, H., et al., *Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue*. *Transplantation*, 2009. **88**(2): p. 203-210.
24. Wang, X., et al., *Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors*. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 2014. **102**(4): p. 1017-1025.
25. Soto-Gutierrez, A., et al., *Perspectives on whole-organ assembly: moving toward transplantation on demand*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(11): p. 3817-23.
26. Barakat, O., et al., *Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ*. *J.Surg.Res.*, 2012. **173**(1): p. e11-e25.
27. Uygun, B.E., et al., *Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix*. *Nat.Med.*, 2010. **16**(7): p. 814-820.
28. Bao, J., et al., *Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats*. *Cell Transplant*, 2011. **20**(5): p. 753-66.
29. Soto-Gutierrez, A., et al., *A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement*. *Tissue Eng Part C.Methods*, 2011. **17**(6): p. 677-686.
30. Shirakigawa, N., H. Ijima, and T. Takei, *Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering*. *J.Biosci.Bioeng.*, 2012. **114**(5): p. 546-551.
31. Baptista, P.M., et al., *Human liver bioengineering using a whole liver decellularized bioscaffold*. *Methods Mol.Biol.*, 2013. **1001**: p. 289-298.
32. Ren, H., et al., *Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold*. *Liver Int.*, 2013. **33**(3): p. 448-458.
33. Park, K.M. and H.M. Woo, *Porcine bioengineered scaffolds as new frontiers in regenerative medicine*. *Transplant.Proc.*, 2012. **44**(4): p. 1146-1150.
34. Yagi, H., et al., *Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach*. *Cell Transplant.*, 2013. **22**(2): p. 231-242.
35. Park, K.M., et al., *Preparation of immunogen-reduced and biocompatible extracellular matrices from porcine liver*. *J.Biosci.Bioeng.*, 2013. **115**(2): p. 207-215.
36. Struecker, B., et al., *Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions: a technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015. **21**(3): p. 303-13.
37. Wang, Y., et al., *Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts*. *Xenotransplantation*, 2015. **22**(1): p. 48-61.

38. Kajbafzadeh, A.M., et al., *Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue*. Tissue Eng Part C Methods, 2013. **19**(8): p. 642-51.
39. Niemann, H. and B. Petersen, *The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation*. Transgenic Res, 2016.
40. Gilpin, S.E., et al., *Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(3): p. 298-308.
41. Mostow, E.N., et al., *Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial*. J Vasc Surg, 2005. **41**(5): p. 837-43.
42. Arenas-Herrera, J.E., et al., *Decellularization for whole organ bioengineering*. Biomed Mater, 2013. **8**(1): p. 014106.
43. Shupe, T., et al., *Method for the decellularization of intact rat liver*. Organogenesis, 2010. **6**(2): p. 134-136.
44. Mirmalek-Sani, S.H., et al., *Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue*. Am J Pathol, 2013. **183**(2): p. 558-65.
45. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-3243.
46. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. Semin.Cell Dev.Biol., 2002. **13**(5): p. 377-383.
47. Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane, *Autoimmunity and the clearance of dead cells*. Cell, 2010. **140**(5): p. 619-630.
48. Zheng, M.H., et al., *Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **73**(1): p. 61-7.
49. Miranda, J.P., et al., *Towards an extended functional hepatocyte in vitro culture*. Tissue Eng Part C Methods, 2009. **15**(2): p. 157-67.
50. Ebben, J.D., et al., *Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine*. World Neurosurg, 2011. **76**(3-4): p. 270-5.
51. Ankele, D., *Azellularisierung von Lebersegmenten*. 2011, Hochschule Furtwangen University: Villingen-Schwenningen. p. 77.
52. Seglen, P.O., *Preparation of isolated rat liver cells*. Methods Cell Biol, 1976. **13**: p. 29-83.
53. Sies, H., T.P. Akerboom, and J.M. Tager, *Mitochondrial and cytosolic NADPH systems and isocitrate dehydrogenase indicator metabolites during ureogenesis from ammonia in isolated rat hepatocytes*. Eur.J.Biochem., 1977. **72**(2): p. 301-307.
54. Ullrich, V. and P. Weber, *The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1972. **353**(7): p. 1171-7.
55. Greenlee, W.F. and A. Poland, *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**(3): p. 596-605.

56. Ko, I.K., et al., *Bioengineered transplantable porcine livers with re-endothelialized vasculature*. *Biomaterials*, 2015. **40**: p. 72-9.
57. Kallenbach, K., et al., *Guided tissue regeneration: porcine matrix does not transmit PERV*. *Biomaterials*, 2004. **25**(17): p. 3613-3620.
58. Leyh, R.G., et al., *Acellularized porcine heart valve scaffolds for heart valve tissue engineering and the risk of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus*. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 2003. **126**(4): p. 1000-1004.
59. Hiles, M. and J. Hodde, *Tissue engineering a clinically useful extracellular matrix biomaterial*. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2006. **17 Suppl 1**: p. S39-43.
60. Hata, R., et al., *Activation of collagen synthesis in primary culture of rat liver parenchymal cells (hepatocytes)*. *J Cell Physiol*, 1985. **122**(3): p. 333-42.
61. Brown, A.L., et al., *Development of a model bladder extracellular matrix combining disulfide cross-linked hyaluronan with decellularized bladder tissue*. *Macromol.Biosci.*, 2006. **6**(8): p. 648-657.
62. Takeda, Y.S. and Q. Xu, *Fabrication of 2D and 3D constructs from reconstituted decellularized tissue extracellular matrices*. *J Biomed Nanotechnol*, 2014. **10**(12): p. 3631-7.
63. Gao, R., et al., *Hepatocyte culture in autologous decellularized spleen matrix*. *Organogenesis*, 2015. **11**(1): p. 16-29.
64. Flendrig, L.M., et al., *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**(6): p. 1379-92.
65. Koebe, H.G., et al., *Porcine hepatocytes from slaughterhouse organs. An unlimited resource for bioartificial liver devices*. *ASAIO J*, 1995. **41**(2): p. 189-93.
66. Lazar, A., et al., *Extended liver-specific functions of porcine hepatocyte spheroids entrapped in collagen gel*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1995. **31**(5): p. 340-6.
67. te Velde, A.A., et al., *Functional activity of isolated pig hepatocytes attached to different extracellular matrix substrates. Implication for application of pig hepatocytes in a bioartificial liver*. *J Hepatol*, 1995. **23**(2): p. 184-92.
68. Lin, P., et al., *Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering*. *Tissue Eng*, 2004. **10**(7-8): p. 1046-53.
69. Hu, C. and L. Li, *In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration*. *Protein Cell*, 2015. **6**(8): p. 562-74.
70. Lang, R., et al., *Three-dimensional culture of hepatocytes on porcine liver tissue-derived extracellular matrix*. *Biomaterials*, 2011. **32**(29): p. 7042-52.
71. Sussman, N.L. and J.H. Kelly, *Artificial liver: a forthcoming attraction*. *Hepatology*, 1993. **17**(6): p. 1163-4.
72. Takebe, T., et al., *Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant*. *Nat Protoc*, 2014. **9**(2): p. 396-409.

73. Xiang, J.X., et al., *Liver regeneration using decellularized splenic scaffold: a novel approach in tissue engineering*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2015. **14**(5): p. 502-8.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen aussprechen, ohne deren Unterstützung diese Promotionschrift nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff und PD Dr. Martin Schenk für die Betreuung und Unterstützung als Erst- und Zweitgutachter meiner Dissertation danken. Die Möglichkeit meine Forschung im Institut für Experimentelle Medizin durchführen zu können hat mir sehr viel Freude bereitet und ich konnte in dieser Zeit viele neue Aspekte der Forschung kennenlernen. Auch möchte ich dem Team im Institut danken, das mich stets in meiner Arbeit unterstützt hat. Vor allem danke ich Maria Seitzer, die mich sowohl auf wissenschaftlicher wie auch auf privater Ebene immer motiviert und angetrieben hat, um meinen Zielen näher zu kommen.

Besonders will ich meine zwei Mitstreiterinnen danken, Asja und Judith, die jedes Hoch und jedes Tief mit mir durchlebt haben und mir zur Seite standen. Ohne euch hätte ich manche Situation nicht so gut meistern können.

Abschließend danke ich meiner Familie, die mich meinen langen Weg bis hierhin ohne Wenn und Aber unterstützt hat. Ihr Glaube an mich und meine Fähigkeiten hat mich erst so weit gebracht. Vor allem danke ich euch, dass ihr jede Laune in dieser langen Zeit ertragen habt und trotzdem zu mir standet. Umso mehr freue ich mich nun, diese Arbeit mit euch feiern zu können.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nicola Elena Maria Bühler

Geburtsdatum: 20.07.1985

Nationalität: deutsch

Ausbildung

09/1995 – 07/2004
Abitur
Mörike-Gymnasium, Göppingen

10/2005 – 04/2012
Diplom in Ernährungswissenschaften (sehr gut)
Universität Hohenheim, Stuttgart

08/2008 – 07/2009
Auslandsjahr an der University of Massachusetts,
Amherst, Studiengang Nutritional Science

07/2012 – 06/2015
Cand. Dr. rer. nat., Naturwissenschaften
Allgemeine, Viszerale und Transplantationschirurgie
Universitätskrankenhaus Tübingen, Tübingen und
Interfakultäres Institut für Biochemie, Eberhard-
Karls-Universität, Tübingen

01/2015 – 12/2017
General Management, MBA (sehr gut)
Hamburger Fernhochschule, Hamburg

Berufserfahrung

07/2012 – 06/2015
wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für
Experimentelle Medizin, Allgemeine, Viszerale und
Transplantationschirurgie Universitätskrankenhaus
Tübingen, Tübingen

07/2015 – 12/2016
stellv. Geschäftsführerin der Dr. R. Heberer
Naturheilmittel GmbH

seit 01/2017
Geschäftsführerin der Dr. R. Heberer Naturheilmittel
GmbH

Kongressteilnahmen

Bühler, N., Thiel, K., Thiel, C., Schulze-Osthoff, K., Königsrainer, A., Schenk, M. Kontrollierter Prozess zur Generierung einer azellularisierten Lebermatrix. Posterpräsentation GASL 2013, Tübingen

Bühler, N.E.M., Schenk, M. Controlled processing of a full-size porcine liver to a decellularized matrix for tissue engineering. Poster and talk AASLD 2014, Boston

Publikationen

Bühler, N.E.M., Schulze-Osthoff, K., Königsrainer, A., Schenk, M.: Controlled processing of a full-sized porcine liver to a decellularized matrix in 24 h, J Biosci Bioeng, 2015. **119**(5): p. 609-13.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Tissue Engineering einer Leber“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Göppingen, 04.12.2017