

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie
Campus Virchow - Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Schutz vor hypothermer Schädigung in Kulturen von primären humanen Hepatozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Dominik Paul Modest
aus Hamburg

Gutachter: 1. Professor Dr. med. P. Neuhaus

2. Professor Dr. med. S. Jonas

3. PD Dr. med. H. Gebhardt

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Hintergrund der Arbeit	7
1.2 Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme	8
1.3 Probleme der Leberunterstützungssysteme auf Zellbasis	9
1.4 Erkenntnisse zum Zusammenhang von Alterungsprozessen und Kälte . . .	10
2 Stand der Wissenschaft	11
2.1 Ansätze zur Langzeitkultur primärer humaner Hepatozyten	11
2.2 Mechanismen der Zellschädigung in hypothermen Kulturen	12
2.3 Schutz vor kälteinduzierter Schädigung von Hepatozyten	13
3 Ziel der Studie	15
4 Material und Methoden	16
4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	16
4.1.1 Geräte	16
4.1.2 Verbrauchsmaterial	17
4.1.3 Isolierungslösungen	18
4.1.4 Kulturmedien	19
4.2 Versuchsaufbau	21
4.3 Herkunft der Zellen	22
4.4 Protokoll der Leberzellisolierung aus Resektaten	23
4.5 Mediumwechsel	27
4.6 Entnahme der Proben	28
4.6.1 Mediumproben für biochemische Testverfahren	28
4.6.2 Proteinproben	28
4.7 Testverfahren	28
4.7.1 LDH-Bestimmung	28
4.7.2 AST-Bestimmung	29

4.7.3	Harnstoffbestimmung	29
4.7.4	Albuminbestimmung	30
4.7.5	Zellaktivität (Cell Proliferation Assay)	30
4.7.6	Gesamtproteinbestimmung	30
4.7.7	Lichtmikroskopie	31
4.8	Statistik	31
5	Ergebnisse	32
5.1	AST-Aktivität in den Mediumüberständen	33
5.2	LDH-Aktivität in den Mediumüberständen	34
5.3	Bestimmung des Gesamtproteins	35
5.4	Harnstoffkonzentrationen in den Mediumüberständen	36
5.5	Albuminkonzentrationen in den Mediumüberständen	37
5.6	Zellaktivität (Cell Proliferation Assay)	38
5.7	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen	39
6	Diskussion	41
6.1	Die Zellkulturen	41
6.2	Der Versuchsaufbau	41
6.3	Die Kulturmedien	42
6.4	Die Ergebnisse	44
6.5	Ausblick	47
7	Zusammenfassung	49
	Literaturverzeichnis	51
	Danksagung	57
	Lebenslauf von Dominik Modest	58
	Erklärung	59

Abkürzungsverzeichnis

AMC-BAL	Amsterdam Medical Center-Bioartificial Liver
ALT	Alanin-aminotransferase
AST	Aspartat-aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
DADLE	D-Ala ₂ , D-Leu ₅ -Enkephalin
E	Extinktion
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELAD	Extracorporeal Liver Assist Device
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDP	Fruktosediphosphat
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GSH	Glutathion
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HIT	Hibernation Induction Trigger
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
LDH	Lactatdehydrogenase
MARS	Molecular Adsorbents Recirculation System
MDH	Malatdehydrogenase
MELS	Modular Extracorporeal Liver Support
MIBG	Meta-Iodobenzylguanidin
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt.
NAC	N-Acetyl-Cystein
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NH ₄ ⁺	Ammoniumion
P I	Perfusionslösung 1
P II	Perfusionslösung 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglykol
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROS	Reactive Oxygen Species
SPAD	Single Pass Albumin Dialysis

Abbildungsverzeichnis

4.1	Schema der Versuchsgruppen	21
4.2	Zeitschema des Versuchsaufbaus	22
4.3	Einbringen der Kanülen	24
4.4	Perfusion eines Resektats	25
4.5	Herstellen einer Zellsuspension	25
4.6	Filtration einer Zellsuspension	26
4.7	Zentrifugenröhrchen mit Percollgradient	27
5.1	AST-Aktivität in den Mediumproben	33
5.2	LDH-Aktivität in den Mediumproben	34
5.3	Gesamtprotein in den Zellkulturen	35
5.4	Harnstoff in den Mediumproben	36
5.5	Albumin in den Mediumproben	37
5.6	Zellaktivität	38
5.7	Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A1	39
5.8	Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A2	39
5.9	Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A3	40
5.10	Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A4	40

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

Patienten, die ein akut auftretendes Leberversagen erleiden, haben eine schlechte Prognose. Der Ausfall der Leber als zentrales Organ für vielfältige Biosynthesewege, Detoxifikationsprozesse und Regulationsvorgänge führt zu einem Krankheitsbild, das nur schwer beherrscht werden kann. Typische Folgen des Leberversagens sind unter anderem Enzephalopathie, Ödeme, renales und pulmonales Versagen, Störungen der Glukosehomöostase, Gerinnungsstörungen, Ausfälle im Immunsystem und des Kreislaufs. Auswege aus dieser Situation stellen entweder die intensivmedizinische Betreuung bis zur Regeneration des Organs oder, im Falle des Ausbleibens einer rechtzeitigen Regeneration, die Lebertransplantation dar. Die Transplantation eines Spenderorgans kann nicht immer durchgeführt werden, da sowohl ein geeignetes Organ verfügbar, als auch der Patient für einen solchen Eingriff geeignet sein muss. Der zunehmende Mangel an Organen stellt ein weiteres Problem dar, so dass Transplantationen teilweise zu spät oder gar nicht erfolgen können.

Aus diesem Grund besteht Bedarf an temporären Therapieoptionen, die es ermöglichen, die Leberfunktion der Patienten bis zur Transplantation oder Regeneration zu unterstützen. Eine Möglichkeit ist hier der Rückgriff auf artifizielle Leberunterstützungssysteme im Sinne einer Dialyse. Bereits zum Einsatz gekommen sind hierbei geschlossene Dialysekreisläufe, wie das Molecular Adsorbents Recirculation System (MARS)¹ und das Prometheus-System.² Aber auch offene Systeme wie Single Pass Albumin Dialysis (SPAD) werden derzeit evaluiert.³

Diese Systeme sind zwar in unterschiedlicher Weise befähigt die Detoxifikationsleistung der Leber zu übernehmen, andere leberspezifische Funktionen wie Synthese und Regulation werden leider nicht adressiert. In diesem Sinne ist die Integration von Zellkulturen in die Therapie des akuten Leberversagens wünschenswert. Dies bedeutet den Einsatz von bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen, von denen man sich erhofft, dass sie in der Lage sind, die erwähnten Funktionen der Leber zu ersetzen.

1.2 Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme

Um Leberzellen für die extrakorporale Anwendung zu nutzen, müssen die Zellen isoliert und in geeigneten Bioreaktoren kultiviert werden, die es wiederum erlauben, dass das Blut oder Plasma der Patienten im Bedarfsfall mit den Leberzellen in Kontakt treten kann. Klinisch getestete Systeme sind das Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD; VitaGen Inc., LaJolla, CA, USA), das HepatAssist-System (Circe Biomedical, Lexington, USA), die Amsterdam Medical Center-Bioartificial Liver (AMC-BAL) und das Berliner Modulare Extrakorporale Leberunterstützungssystem (MELS).

Beim ELAD-System werden ca. 200-400g Zellen einer Hepatoblastomlinie (C3A) im Dialysatraum eines modifizierten Dialysefilters mit Patientenplasma in Kontakt gebracht. Dieses fließt nach einer einmaligen Passage des Bioreaktors zum Patienten zurück. Das System wurde bisher im Rahmen von zwei kontrollierten klinischen Studien getestet, erbrachte aber keinen signifikanten Überlebensvorteil.⁴⁵

Beim HepatAssist-System werden kryokonservierte immobilisierte primäre porcine Hepatozyten im Extracapillarraum eines Dialysefilters verwendet. Das über eine Zentrifuge abgetrennte Plasma fließt durch Aktivkohlefilter und durch einen Oxygenator, um dann durch die Kapillaren des Plasmafilters zum Patienten zurückzukehren. Das System wurde an zwei Zentren zur Überbrückung der Wartezeit bis zu einer Transplantation eingesetzt.⁶⁷

Die AMC-Bioartificial Liver verwendet ebenfalls primäre porcine Hepatozyten. 200g dieser Zellen befinden sich in einer aufgerollten Polyestermatrix, in die hydrophobe Kapillaren eingelagert sind, welche eine dezentrale Oxygenierung ermöglichen. Patientenplasma und Zellen treten dabei ohne eine Membranbarriere in direkten Kontakt. In einer Pilotstudie wurde bei 6 von 7 Patienten eine erfolgreiche Überbrückungstherapie bis zur Transplantation durchgeführt. Ein Patient erfuhr eine spontane Regeneration seiner Leberfunktion und musste sich keiner Transplantation unterziehen.⁸

Das Modulare Extrakorporale Leberunterstützungssystem (MELS) beinhaltet einen speziellen Bioreaktor, der die Kultivierung von 400-600g primärer porciner oder primärer humaner Hepatozyten erlaubt. Erforderliche Detoxifikations- und Dialysemodule können in das System integriert werden. Bisher wurden 20 Patienten mit insgesamt 22 Bioreaktoren therapiert. Davon erfolgte bei 8 Patienten die Bestückung des Bioreaktors mit porcinen Zellen, bei 12 Patienten mit primären humanen Zellen. Die positive Beeinflussung der Symptomatik des Leberversagens im Sinne einer Verbesserung oder Stabilisierung der Laborwerte der Patienten konnte gezeigt werden. Zu Infektionen mit porcinen endogenen Retroviren (PERV) kam es nicht.⁹¹⁰

1.3 Probleme der Leberunterstützungssysteme auf Zellbasis

Die Versorgung der bioartifiziellen Leberunterstützungssysteme mit metabolisch kompatiblen und risikoarmen Zellkulturen ist momentan als eines der grössten Probleme des Therapiekonzeptes anzusehen.

Für einen therapeutischen Einsatz eines Bioreaktors werden je nach System bis zu 600g Zellen benötigt. Denkbare Quellen für diese Mengen sind ganze humane oder porcine Organe, oder aber Tumorzelllinien mit hepatozytenähnlichem Metabolismus. Leider sind Tumorzelllinien bisher in ihrem leberspezifischen Metabolismus deutlich inaktiver als primäre Zellen und bergen bei Materialdefekten zusätzlich das Risiko einer metastatischen Tumorausbreitung in den Patienten.¹¹ Porcine Zellen haben den Nachteil, dass metabolische Inkompatibilitäten bestehen und dass Xenozoonosen, beispielsweise mit porcinen Retroviren, nicht auszuschließen sind. Vor diesem Hintergrund muss die Verwendung von primären humanen Hepatozyten als Lösung der ersten Wahl angesehen werden. Leider sind kultivierte primäre humane Hepatozyten nicht in der Lage zu proliferieren und somit in ihrer Lebensdauer limitiert. Kulturen primärer porciner Hepatozyten sind zwar ebenfalls nicht im gewünschten Maßstab proliferationsfähig, ihre Bevorratung in Form von lebenden Schweinen ist allerdings leichter als bei humanen Zellen zu bewerkstelligen, da keine Vorhersage über die Verfügbarkeit von abgelehnten Spenderorganen zu machen ist. Während die Bereitstellung von Tumorzelllinien ebenfalls recht gut möglich ist, ist es derzeit bei primären humanen Hepatozyten nicht möglich, Vorräte an Zellen anzulegen. Die Gewinnung der Zellen ist in ausreichender Menge nur aus ganzen abgelehnten Spenderorganen zu realisieren. Diese Zellquelle erlaubt keine gezielte Bevorratung von Kulturen primärer humaner Hepatozyten, so dass die zeitliche Koordination von Patient und Bioreaktor nicht zu gewährleisten ist. Des Weiteren sind die gewonnenen Zellen als Teil des abgelehnten Spenderorgans, das meist auf Grund pathologischer Veränderungen nicht zur Transplantation zugelassen wurde, individuell geschädigt. Die resultierende Zellkultur kann ebenfalls nur individuell verschiedene Leistungen erbringen, die vor dem Einsatz der Kultur identifiziert werden sollte. Diese Probleme könnten momentan nur durch eine verlängerte und standardisierte Kulturphase der primären humanen Hepatozyten gelöst werden. Eine verlängerte Lebensdauer von Kulturen primärer humaner Hepatozyten durch hypotherme Lagerung wäre eine denkbare Lösung dieses Problems, sofern es möglich ist, die Leistungsfähigkeit der Zellen weitgehend zu erhalten.

1.4 Erkenntnisse zum Zusammenhang von Alterungsprozessen und Kälte

Die hypotherme Lagerung der Leberzellen soll zu einer Reduktion des Metabolismus und damit auch des Sauerstoffverbrauchs führen. Diese Strategie hat nach heutigem Stand der Wissenschaft das Potential, Alterungsvorgänge und Schädigungen der Leberzellen zu verzögern. Aus Experimenten an Kleintiermodellen geht hervor, dass eine Verringerung des Nahrungsangebots Alterungsprozesse verzögern kann. Insbesondere der Sauerstoffverbrauch scheint eng mit der Alterung von Zellen und Geweben zu korrelieren.^{12 13 14}

In der Natur ist das Prinzip einer hypothermen „Stand-by-Kultur“ weit verbreitet. Zahlreiche Tierarten halten ihren Winterschlaf unter extremen Bedingungen. So sind hochalpin lebende Murmeltiere in der Lage, für fünf bis sechs Monate bei einer Körpertemperatur von 3-5°C sowie einer Vitalfunktion von zwei Herzschlägen und einem Atemzug pro Minute zu überleben. Diese eingeschränkten Körperfunktionen beinhalten auch eine saisonale Schrumpfung des Gastrointestinaltraktes und der Nieren.^{15 16} Arktische Erdhörnchen erreichen während des Winterschlafs Körpertemperaturen unterhalb des Gefrierpunktes ohne dabei einzufrieren.¹⁷ Vorübergehende hypotherme, hypometabole Phasen von acht bis neun Stunden sind nächtens auch bei Rotwild im Sinne einer energiesparenden Überwinterungsstrategie zu beobachten.¹⁸ Ähnliche Strategien finden bereits Anwendung in einigen medizinischen Fachrichtungen: Die seit den Anfängen der Transplantationsmedizin praktizierte Kühlung von zu transplantierenden Organen zielt ebenfalls darauf ab, die Schädigung von Geweben, die unter anderem durch oxidative Prozesse entsteht, durch eine hypotherme, hypometabole Lagerung zu mindern.^{19 20} Diese Erkenntnisse finden in der Herzchirurgie Anwendung, wenn Eingriffe unter totalem Kreislaufstillstand erforderlich werden, wie es unter anderem bei der Versorgung von Aneurysmen oder Dissektionen des Aortenbogens notwendig werden kann. Die potentielle klinische Bedeutung hypothermer Therapien zeigten Experimente an Schweinen, denen mittels Skalpell unbehandelt letale Verletzungen an großen Gefäßen beigebracht wurden. Anstatt die Verletzungen sofort zu verschließen, ließen Alam et al. diese Tiere ausbluten, wobei das Blut aufbewahrt wurde. Nach unterschiedlichen Zeiten im Schockzustand wurden die Tiere mit 4°C kalter, hyperkaliämischer Lösung perfundiert, was zu einem kardioplegen Herzstillstand führte. Nach bis zu 60 Minuten metabolischem Arrest durch hypotherme Spülung wurden die Tiere durch Beseitigung der Hyperkaliämie, Versorgung ihrer Verletzungen und Rückgabe ihres gewärmten, antikoagulierten Blutes und Defibrillation „geweckt“. Bis auf wenige Ausnahmen waren bei den Tieren weder neurologische noch andere ernsthafte Schäden zu beobachten.²¹ Diese Ergebnisse wurden an Hunden und Schweinen in zahlreichen, teilweise sehr ähnlichen Versuchsansätzen bestätigt.^{22 23}

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Ansätze zur Langzeitkultur primärer humaner Hepatozyten

Die Isolierung von primären Hepatozyten aus ganzen Rattenlebern wurde zuerst in den 70er Jahren von Seglen beschrieben.²⁴ Die ersten Kulturen von primären humanen Hepatozyten hingegen konnten von Miyazaki et al. aus Leberbiopsien gewonnen werden.²⁵ Die in dieser Arbeit angewandte Methode ist eine Modifikation der von Dorko et al. beschriebenen Kollagenase-Perfusionstechnik von Leberresektaten oder ganzen Organen.²⁶ Zellkulturen primärer humaner Hepatozyten sind über Zeiträume von mehr als ein paar Stunden nur über den Einsatz diverser Techniken zur Verbesserung von Zellimmobilisierung, Vergrößerung der Adhäsionsoberflächen und Verstärkung der Zell-Matrixkontakte zu realisieren. Dazu dienen unter anderem Kollagenbeschichtungen der Kulturschalen (Plastik, Glas)²⁷ und Doppelbeschichtungen von Zellträgern und Monolayern (Sandwichkulturen).²⁸

Die Aufbewahrung bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes führt bei primären humanen Hepatozyten zu einer massiven Schädigung, vor allem hinsichtlich der Fähigkeit zur Adhärenz der Zellen nach dem Auftauen. Für diese Schäden wird unter anderem die intrazelluläre Eiskristallbildung und das fehlende osmotische Gleichgewicht bei Zugabe oder Entfernung von Kryoprotektiva bzw. bei extrazellulärer Eiskristallbildung verantwortlich gemacht. Da dieses Problem bisher noch nicht hinreichend beeinflussbar ist, kann das Einfrieren von primären humanen Hepatozyten momentan als Lösungsansatz für die Langzeitlagerung von primären humanen Hepatozyten noch nicht dienen.²⁹

Die Reduktion des Zellmetabolismus und von oxidativen Schädigungen ist das Ziel der hypothermen Lagerung von biologischen Materialien für wissenschaftliche, aber auch klinische Zwecke. Die Aufbewahrung von Zellen bei Temperaturen knapp über dem Gefrierpunkt hat auf der einen Seite die bekannten und auch erwünschten Wirkungen wie eine Reduktion der metabolischen Leistung, andererseits hat auch diese Hypothermie zellschädigende Einflüsse.

2.2 Mechanismen der Zellschädigung in hypothermen Kulturen

In den Anfängen der Transplantationsmedizin wurde eine Veränderung der zellulären Ionenhomöostase für die kälteinduzierte Schädigung von verschiedenen, für die Transplantation relevanten Zelltypen als verantwortlich angesehen. Mittlerweile ist diese Annahme entkräftet worden.^{30,31} Rauen et al. konnten nachweisen, dass die Schädigung von Rattenhepatozyten unter kalten Lagerbedingungen in erster Linie von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) ausgelöst wird.^{32,33,34} Diese als radikalische Reaktionskette ablaufende Schädigung konnte für verschiedenste Zelltypen der Ratte, des Schweins, des Kaninchens und des Menschen nachgewiesen werden.^{35,36,37,38,39,40,41,42} Bei der Wiedererwärmung tritt die Schädigung in Form von Apoptose (aber auch Nekrose) zu Tage. Dieses Phänomen ist bei Hepatozyten sehr stark ausgeprägt.⁴⁰ Der Mechanismus, der zur Entstehung der Radikale führt, ist weitgehend bekannt: Innerhalb der ersten Stunden nach der Kaltinkubation kommt es zu einer extremen Erhöhung der zytosolischen Eisenkonzentration. Dieses Eisen ist für die Bildung von freien Radikalen und ROS verantwortlich. Insbesondere dem Hydroxylradikal und Eisen-Sauerstoff-Verbindungen kommen hierbei tragende Rollen zu. Angriffspunkte dieser Verbindungen sind verschiedene zelluläre Strukturen, vor allem eine Lipidperoxidation ist zu beobachten. An den Mitochondrien tritt ein Effekt auf, dessen Folgen besonders drastisch ausgeprägt sind: Eisenabhängig kommt es hier zu einer Störung der Membranpermeabilität, die zu einem Potentialverlust über die Membran führt, der wiederum den Zelltod (Apoptose und Nekrose) auslöst.⁴³ Auch der Verlust von Calciumionen durch die Aufbewahrung in der Kälte scheint eine Rolle bei der Entstehung von Kälteschäden zu spielen. Kim et al. konnten nachweisen, dass es nach dem Absenken der Temperatur zu einem rapiden Anstieg des zytosolischen Calciumgehalts in Rattenhepatozyten kommt. Dies führt dann zu einem Austritt des Calciums aus den Zellen in das Kulturmedium, so dass die Zellen sowohl Verluste an zytosolischem als auch an Gesamtcalcium erleiden.⁴⁴ Die extrazelluläre Präsenz von Calcium hat hingegen im Rattenhepatozytenmodell günstige Auswirkung auf die Aufrechterhaltung des zytosolischen Glutathionspiegels während hypothermer Inkubation, was oxidative Schäden in diesem Fall verminderte. Die Gabe von Vitamin E ist zusammen mit Calcium synergistisch gut wirksam.⁴⁵ Die Lagerung von Rattenhepatozyten in der Kälte scheint auch für das Zytoskelett schwere Konsequenzen zu haben: Vor allem Mikrotubuli werden durch die Kältebehandlung beschädigt und können dadurch reißen, was insbesondere negative Konsequenzen für die Proteinsynthesefähigkeit der Zellen hat. Eine Beteiligung von ROS ist dabei eher auszuschließen^{46,47}, die Verluste an Calcium sind hier allerdings ursächlich beteiligt. Vreugdenhil et al. konnten sowohl die Abhängigkeit der Proteinbiosynthese in Rattenhepatozyten von der Unversehrtheit

des Zytoskeletts dokumentieren, als auch belegen, dass ein weiterer Mechanismus existiert, der die Proteinsynthese in kalt gelagerten Zellen beeinträchtigt und zeitlich nach der Schädigung des Zytoskeletts auftritt. Der genaue Ablauf dieser Schädigung konnte allerdings nicht dargelegt werden. Auch die Verfügbarkeit von Glutathion (GSH) hat offensichtlich einen Einfluss auf das Überleben der Zellen und auch darauf, ob sie im Falle einer Schädigung apoptotisch oder nekrotisch zu Grunde gehen.^{48,49} Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die unbehinderte Fähigkeit von Rattenhepatozyten, Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren, einen essentiellen Schutz vor allem vor Membranschäden darstellt.⁴⁸ Fehlt ATP, kommt es durch die Phospholipase A2 (PLA2) zu einem Abbau der Zellmembran.⁵⁰

2.3 Schutz vor kälteinduzierter Schädigung von Hepatozyten

Die verschiedenen Mechanismen der Kälteschädigung erfordern verschiedene Ansätze der Protektion. Oftmals sind mehrere Stoffklassen verfügbar, die auf die selben Mechanismen abzielen, aber an unterschiedlichen Zielpunkten ansetzen. Zu beachten ist, dass sämtliche Versuche bisher im Tiermodell oder an anderen humanen Zellen gemacht wurden, nicht aber an primären humanen Hepatozyten. Die Entstehung von Hydroxylradikalen und reaktiven Eisen-Sauerstoffspezies lässt sich über die Gabe von intrazellulär wirksamen Eisenchelatoren (z.B. Desferoxamine, 1,10-Phenanthroline, 2,2'-Dipyridyl) hemmen. Sie verhindern die Bildung der reaktiven Substanzen, indem sie das intrazellulär auftretende Eisen chelatieren. Dies reduziert die Apoptoserate.^{40,51} Um die Schäden an den Mitochondrien zu minimieren, kann Cyclosporin A eingesetzt werden, welches der Stabilisierung des Membranpotentials dient. Auch wird mit der Gabe von Cyclosporin A auf die Verhinderung von Zellschäden durch oxidativen Stress, Medikamentenwirkungen (in den Medien) und pH-Schwankungen abgezielt.⁵² Die Gabe von Trifluoperazine ist ebenfalls eine Option, um das mitochondriale Membranpotential konstant zu halten. Es handelt sich um einen PLA2-Inhibitor, der außerdem die ATP-Regeneration günstig beeinflusst.⁵³ Die Gabe von Fruktose-1,6-Diphosphat (FDP) wirkt in Jejunumzellen von Ratten stabilisierend auf die Membranen, ebenso wird die ATP-Regeneration gefördert.⁵⁴ Eine weitere Möglichkeit besteht in der Gabe von Antioxidantien, die die auftretende Lipidperoxidation verhindern soll. Als Beispiel wäre hier Glutathion (GSH) zu nennen, das in der Lage ist, reaktive Sauerstoffspezies abzufangen und damit Schäden zu verhüten. Ebenfalls gegeben wird N-Acetyl-Cystein (NAC), welches ein Vorläufer des GSH ist und von den kultivierten Zellen zur Synthese von GSH benutzt wird. Dabei ist der Zeitpunkt der Applikation von entscheidender Bedeutung: Die Gabe direkt vor der Wiedererwärmung hat den günstigsten Effekt.⁴⁹ Auch die Gabe des lipophilen Antioxidants α -Tocopherol hat das

Potential, die Schädigung von kaltinkubierten Rattenhepatozyten zu verringern.³²

Wie bereits erwähnt, verlieren Rattenhepatozyten in Kulturen ihre Fähigkeit zur Proteinbiosynthese in der Kälte im Zuge eines 2-Phasen-Mechanismus; die zweite Phase (nach der Zytoskelettschädigung) lässt sich durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Steroiden drastisch entschärfen.⁴⁶ Der Verlust von intrazellulären Calciumbeständen wird in erster Linie für die Schäden des Zytoskeletts verantwortlich gemacht. Dementsprechend führt die Gabe von Calcium und dem mikrotubulistabilisierenden Taxol zu verminderten Zellschäden und einer besseren Proteinsyntheseleistung.⁴⁷ Der gleiche Effekt ist nach der Gabe des Polymers Polyethylenglykol (PEG) nachweisbar.⁵⁵ Außerdem besteht die Möglichkeit, Calciumkanäle der betreffenden Zellorganellen, also Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, mit Meta-Iodobenzylguanidin (MIBG, Mitochondrien) oder Ryanodin (endoplasmatisches Retikulum) zu blockieren. Beide Substanzen sind sowohl bei alleiniger, als auch kombinierter Gabe fähig, den Calciumverlust von isolierten Rattenhepatozyten deutlich zu senken. Die Gabe von MIBG verbesserte außerdem die mitochondriale ATP-Regeneration und führte zu einer verstärkt ablaufenden Atmungskette.⁴⁴ Der P53-Inhibitor Pifithrin- α ist über die Blockade des betreffenden Apoptosesignals ebenfalls in der Lage Zellen in der Kälte am Leben zu erhalten. Nachgewiesen wurde dies an ganzen Rattenlebern, die unter anderem mit Pifithrin- α haltiger Lösung perfundiert wurden.⁵⁶

3 Ziel der Studie

Die zellulären Mechanismen der hypothermen Zellschädigung sind in den letzten Jahren zunehmend verstanden worden. Damit eröffnen sich Möglichkeiten, gezielt mit pharmakologischen Maßnahmen in die Prozesse der Kälteschädigung einzugreifen. Innerhalb dieser Studie soll ein serumfreies Kulturmedium (HLC1), das speziell für eine hypotherme Kultivierung von primären humanen Hepatozyten entwickelt wurde, mittels Monolayerkulturen im Rahmen einer 24-stündigen Hypothermieinkubation evaluiert werden. Als Vergleich dient ein Standardkulturmedium für die normotherme Kultur.

Um das Ausmaß der zu erwartenden Zellschädigung zu erfassen, werden Gesamtproteinmessungen, Zellaktivitätstests und mikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen durchgeführt. Die Aktivitäten der Enzyme Lactatdehydrogenase (LDH) und Aspartataminotransferase (AST) in den Kulturmedien dient ebenso der Bemessung des Zellschadens, dabei ist eine LDH- Aktivität auf eine zytosolische Zellschädigung zurückzuführen, während eine AST- Erhöhung neben einem zytosolischen auch einen mitochondrialen Schaden dokumentieren kann. Die Bestimmung der Harnstoff- und Albuminmengen im Kulturmedium spiegelt die Syntheseaktivität der Zellkulturen wieder.

Ziel dieser Arbeit ist die Dokumentation des hypothermen Zellschadens in ungeschützten Kulturen und der Nachweis der eventuellen Überlegenheit des Schutzmediums unter hypothermen Versuchsbedingungen. Dabei sollte sich die Qualität (Zellschaden, Syntheseleistung) der geschützten hypothermen Kulturen nach der Wiedererwärmung möglichst nicht signifikant von den Werten einer Standardkultur abgrenzen. Insbesondere eine ausreichende Erhaltung der Syntheseleistung der Zellkulturen nach der Rekultur ist hierbei von entscheidender Bedeutung, da dies dem Zeitpunkt der potentiellen klinischen Anwendung entspräche. Ebenso soll diese Arbeit klären, ob das Kälteschutzmedium auch unter normothermen Bedingungen als Medium einsetzbar ist.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

4.1.1 Geräte

Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze, Deutschland
Wasserbox	Lauda MD12 BD, Fa. Lauda, Ronighofen, Deutschland
Sterillamina	LaminAir HBB 2448, Fa. Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R, Fa. Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Eppifuge	Zentrifuge 5417 R, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	BB 6060, Fa. Heraeus Instruments, Hanau, Germany
Absaugpumpe	Vacunsafe, Intergra Biosciences, Chur, Schweiz
Photometer	FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg, Deutschland
Rollerpumpe	Cyclo 1, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 40 CFL, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Vortexmixer	Vortex Mixer 7-2020, Fa. neoLab, Heidelberg, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved, Fa. Optik Labor, Friedrichsdorf, Deutschland
Umwälzthermostat	Lauda E100, Fa. Lauda, Ronighofen, Deutschland
Kühlschrank	Comfort NoFrost, Fa. Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Büchnertrichter	Fa. Holdenwanger, Berlin, Deutschland
Silikonschlauch	Tygon S-50HL, Fa. Riesheck, Beisermind, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy, Intergra Bioscience, Chur, Schweiz
Knopfkanülen	Sonderanfertigung, Amefa, Limburg, Deutschland
Präzisionswaage	AC 1215, Sartorius, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	CG840, Schott, Mainz, Deutschland
Heizplatte	IKAMAG RCT, Ika-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Software Image Pro Plus	MediaCybernetic, Silver Spring, USA
Software GraphPad	InStat, San Diego, USA

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Plastikware

Falcon Zentrifugen Röhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA
Latexhandschuhe	Kimberley Clarc, Zaventem, Belgien
Falcon Sterile Einwegpipetten (5, 10 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA
Pasteurpipetten (155 mm)	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Raucodrape OP-Abdecksystem 75x90cm	Lohmann-Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Gazin Mullkompresse 10x10cm	Lohmann-Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Einwegskapel No. 20	Feather, Japan
Einmalspritze 20ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Urinbecher 100ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multiwell 6 well	Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA
Microtest 96well	Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA
Integrid Zellkulturschale 150x25mm	
Typ 353025	Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA
75mm Filtereinheit 500 ml	Nalgene Filtration Products, Neerijse, Belgien
Eppendorftubes (1, 5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Lösungen und Chemikalien

BC Assay Reagent A (95424)	Interchim, Montlucon, Frankreich
Ampuwa, destilliertes Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Collagen A	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypan blue 0,5%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fibrinkleber, Histoacryl, steril	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Percoll Separating Solution	
Density 1,124g/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
CellTiter 96 Aqueous One Solution	
Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA
Humanalbumin 20%, salzarm	ZLB Behring, Hattersheim a.M., Deutschland
Albuwell	Exocell, Inc. Philadelphia, USA
NobiFlow Harnstoff	Hitado Diagnostic Systems
	Möhnesee Delecke, Deutschland
NobiFlow LDH-L	Hitado Diagnostic Systems
	Möhnesee Delecke, Deutschland
NobiFlow ASAT (GOT)	Hitado Diagnostic Systems
	Möhnesee Delecke, Deutschland
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck kGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Merck kGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kupfersulfat (CuSO ₄ *5 H ₂ O) A893090	Merck kGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

4.1.3 Isolierungslösungen

Jeweils in sterilem, destilliertem Wasser enthalten die zwei Isolierungslösungen folgende Bestandteile:

P I enthält: 8,3g Natriumchlorid/l
0,5g Kaliumchlorid/l
2,4g HEPES/l

a) Zur Leberspülung wird 0,95g/l EGTA zugesetzt.

b) Zur Herstellung der ersten Zellsuspension werden 10 g/l Humanalbumin zugesetzt.

P II enthält: 3,9g Natriumchlorid/l
0,5g Kaliumchlorid/l
24g HEPES/l
5g Albumin (0,5%)/l
0,7g Calciumdichlorid/l

Der pH-Wert wird mit Hilfe von Natronlauge jeweils auf 7,5 adjustiert.

Alle Perfusionslösungen werden nach der Herstellung bzw. direkt vor der Anwendung steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

4.1.4 Kulturmedien

- HLC1-Medium, Biochrom AG, Berlin, Deutschland enthält:

Natriumchlorid
Kaliumchlorid
Calciumchlorid
Magnesiumsulfat
Natriumdihydrogenphosphat
Natriumhydrogencarbonat
D-Sorbitol
N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin
Natriumhydroxid
Natriumacetat
Natriumpropionat
Natriumcitrat
D-Glucose
D-Fructose
ATP
Natriumpyruvat
Natrium-alpha-ketobutyrat
Nicotinamid
Inositol
D-Biotin
Calciferol
D-Ca-Pantothenat

Cholinchlorid
Pyridoxal-Salzsäure
Riboflavin
Thiamin-Salzsäure
D,L-alpha-tocopherol-phosphat
Vitamin A-acetat
Vitamin B12
Zinksulfat
Eisennitrat
Manganchlorid
Cobaldchlorid
Kupfersulfat
Natrium-selenoxid
L-Phenylalanin
L-Cystein
L-Arginin
L-Serin
L-Glutamin
L-Glycin
L-Leucin

als Antioxidantien:

L-Carnosin 20mM
Glutathion, reduziert 3mM
Natriumschwefelwasserstoff 0,1mM

als Eisenchelatoren:

2,2'-Dipyridy 0,1mM
1,10 Phenanthroline 0,02mM

- William's Medium E, 500ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
versetzt mit:

5ml N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, 200mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
7,5ml HEPES Buffer 1M	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
5ml Natrium Pyruvat 100mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
5ml Penicillin/Streptomycin 10mg/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
50ml FBS S0115	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

60 μ l Insulin

100 μ l Dexamethason 40mg/5ml

Serological Corporation, Norcross, USA

Merck kGaA, Darmstadt, Deutschland

4.2 Versuchsaufbau

Die Versuche zur Evaluation eines neuen Kälteschutzmediums (HLC1) wurden mit vier Versuchsgruppen durchgeführt. Messungen fanden zu drei Zeitpunkten jeweils im Abstand von 24 Stunden statt.

Nach der Isolierung wurden die Zellen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, William´s Medium E mit Zusätzen) inkubiert. Nach 18-20 Stunden, in denen die Zellen Adhärenz erlangten, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Es folgte die 24-stündige Präkultur an deren Ende (Zeitpunkt T1) Medium- und Proteinproben genommen wurden. Anschließend wurden die Zellen für die nächsten 24 Stunden vier Versuchsgruppen zugeführt: A1 und A2 wurden warm inkubiert, A3 und A4 kalt. A1 und A3 erhielten William´s E Medium. A2 und A4 HLC1.

Versuchsgruppen ab dem ersten Kontrollzeitpunkt	William´s Medium E	HLC1
Durchgehend warme Inkubation	A1	A2
Zwischenzeitlich hypotherme Inkubation	A3	A4

Abbildung 4.1: Schema der Versuchsgruppen

Die Gruppen A1 und A3 fungieren hierbei als Kontrollgruppen für die eigentliche Versuchsgruppe A4. Die Studiengruppe A2 wurde mitgeführt, um eventuelle Schädigungen durch das Testmedium im Warmen zu detektieren.

Nach Ablauf dieser Versuchsphase (Zeitpunkt T2) wurden von allen Versuchsgruppen Medium- und Proteinproben genommen und alle für den letzten Messzeitpunkt (Zeitpunkt T3) mitgeführten Kulturen mit William´s Medium E plus Zusätzen in eine 24 Stunden lange Rekulturphase im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) überführt, an deren Ende wieder eine

Medium- und Proteinprobeentnahme bei allen Versuchsgruppen stattfand. Zusätzlich zu den Protein- und Mediumproben wurde an T1 und T3 jeweils ein Zellaktivitätstest durchgeführt.

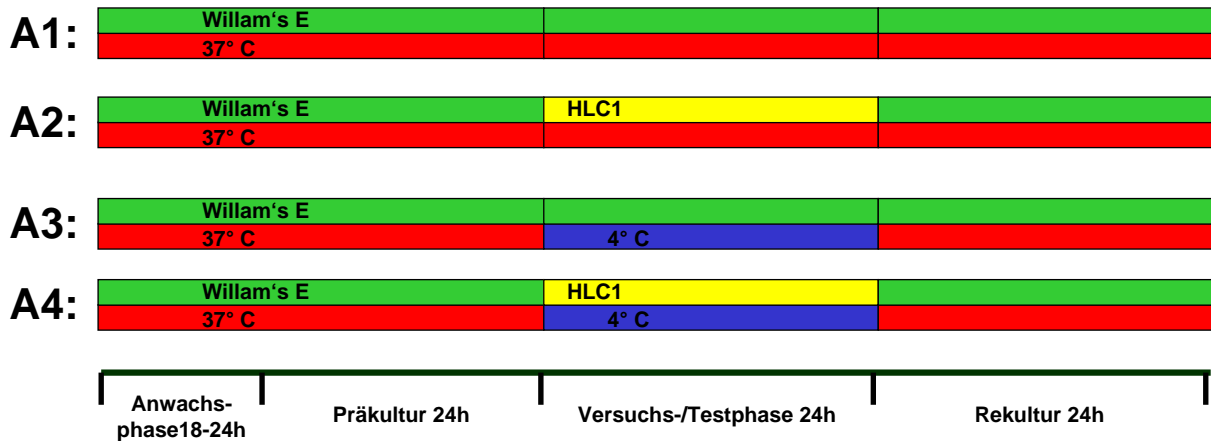


Abbildung 4.2: Zeitschema des Versuchsaufbaus

Um möglichen Schwankungen in den Versuchsergebnissen zu begegnen, wurden für jeden Kontrollzeitpunkt einer jeden Versuchsgruppe 3 Wells einer 6-Well-Platte ausgewertet. Für den MTS-Stimulationstest wurden immer 6 Wells einer 96-Well-Platte mit lebenden Zellen gegen einen Mediumleerwert abgeglichen. Um die Intaktheit der Kulturen zu gewährleisten, wurden sämtliche Zellkulturen täglich per Lichtmikroskop auf Schäden oder andere Unregelmässigkeiten überprüft. Abbruchkriterien für einen laufenden Versuch waren eine mikroskopisch detektierte Infektion gleich welcher Ätiologie, sowie die Präsenz von suspekten Zelltypen im Sinne einer möglichen Tumorzellverunreinigung der Kulturen.

4.3 Herkunft der Zellen

Als Zellquelle dienten makroskopisch nicht pathologisch veränderte Abschnitte von Leberteilresektaten, welche in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Campus Virchow-Klinikum, aus onkologischen Gründen entnommen wurden. Für diese Versuchsreihe wurden Kulturen von n=11 Spendern herangezogen. Das Einverständnis der Patienten wurde präoperativ eingeholt und die Verwendung von Leberteilresektaten für die Kultivierung primärer humaner Hepatozyten von der Ethikkommission der Charité genehmigt. Von den elf Patienten waren sieben weiblichen und vier männlichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter betrug 61 ± 10 Jahre (Spanne: 45-75 Jahre). Sieben Patienten mussten sich aufgrund sekundärer Lebertumore einer Le-

berteilresektion unterziehen, davon waren sechs Malignome colorectale Metastasen, eine die Absiedlung eines neuroendokrinen Tumors. Von den restlichen vier Patienten litten drei an einem cholangiozellulären Karzinom, einer unter einem hepatozellulären Karzinom. Die zur Isolierung verwendeten Segmente wurden jeweils kurz nach der Entnahme in steriler Umgebung unter Aufsicht des die Operation leitenden Chirurgen von den eigentlichen Resektaten abgetrennt. Es wurden nur Stücke verwendet, die über perfundierbare Gefäße verfügten und von möglichst viel Leberkapsel umgeben waren, was einer guten Perfusion zuträglich ist. Als Ausschlusskriterien für einen Isolierungsversuch und eine anschließende Kultivierung der Resektate bestanden lediglich eine Infektion mit Hepatitis B-Viren, Hepatitis C-Viren oder mit HI-Viren.

4.4 Protokoll der Leberzellisolierung aus Resektaten

Die Isolierung der primären humanen Hepatozyten läuft in folgenden Schritten ab:

1. Zubereitung der sterilen Perfusionslösungen
2. Aufbau der Perfusionsanlage
3. Perfusion des Leberresektats, enzymatischer Verdau, mechanische Zerkleinerung
4. Aufreinigung der Zellsuspension mittels Dichtegradientenzentrifugation
5. Aussaat der Zellen auf kollagenbeschichtete Kulturschalen

Für die Perfusion der Leberresektate werden zwei verschiedene Lösungen nacheinander eingesetzt. Bei der ersten Lösung (P I) handelt es sich um eine 39°C warme, gepufferte Elektrolytlösung, die zum einen die Leber freispülen soll und zum anderen mit Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) versetzt ist, welches Calcium- und Magnesiumionen chelatiert, wodurch Gewebsbindungen gelockert werden.

Die auf 39°C vorgewärmte zweite Lösung (P II) ist ebenfalls eine gepufferte, mit Kollagenase versetzte Elektrolytlösung, die das Bindegewebe der Leber zersetzt. Die Zugabe der Kollagenase muss direkt vor der Perfusion erfolgen, da ihre Aktivität bei 39°C schnell erlischt. Da Kollagenase ein calciumabhängiges Enzym ist, muss P II Calcium enthalten. Zum Abstoppen des enzymatischen Verdaus und während der mechanischen Zerkleinerung des perfundierten Resektats wird ebenfalls P I benutzt. In diesem Schritt wird der Lösung statt EGTA humanes Albumin zugesetzt, das die noch vorhandene Aktivität der Kollagenase behindert. Die niedrige Temperatur von 4°C der Lösung soll ebenfalls zur Aktivitätsreduktion beitragen.

Für den Aufbau der Perfusionsanlage werden ein Wasserbad, ein Umwälzthermostat, eine Rollerpumpe, ein durch 2 Y-Stücke in drei Knopfkanülen mündender englumiger Silikonschlauch, ein großes Wasserbad, ein Laborstativset, ein Glasgefäß zum Auffangen der Lösung, ein Büchnersiebtrichter und ein großlumiger Silikonschlauch benötigt. Letzterer wird in die Pumpe eingespannt, durch ihn werden die Perfusionslösungen gepumpt.

Durchführung der Leberzellisolierung:

Die Leberstücke von ca. 10-60 g werden direkt nach der Resektion vom Rand des makroskopisch normal erscheinenden, resezierten Lebergewebes abgetrennt und in ein mit Hepatozytenkulturmedium gefülltes Kunststoffgefäß überführt. Das Kunststoffgefäß wird dann in einer mit Eis gefüllten Kühlbox ins Labor gebracht. Dort werden drei Knopfkanülen in möglichst quer angeschnittene Gefäße eingeführt und dort mit sterilem Gewebekleber befestigt. Falls noch weitere Gefäße vorhanden sind, werden diese mit Gewebekleber verschlossen, so dass eine ausreichende Perfusion möglich wird.

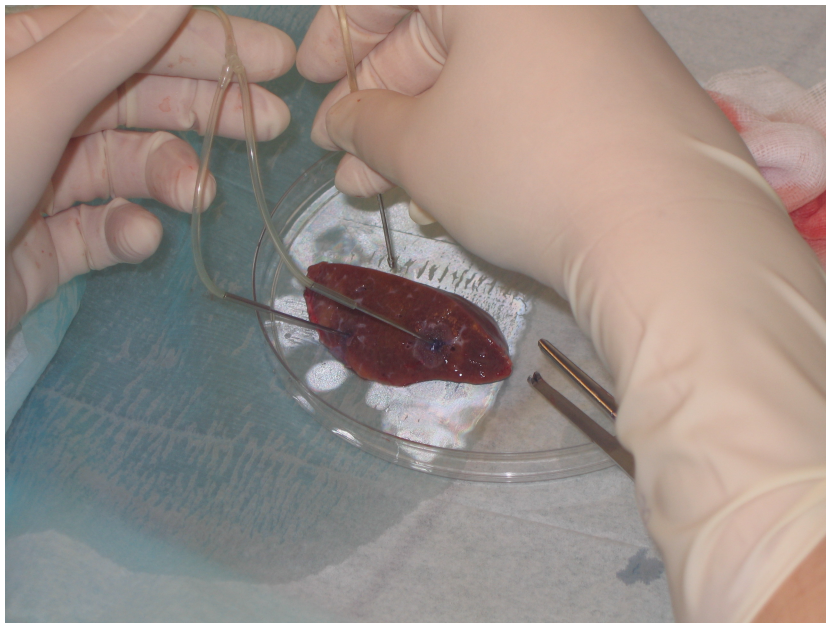


Abbildung 4.3: Einbringen der Kanülen

Im ersten Perfusionsschritt wird die Leber mit Hilfe des in die Pumpe eingespannten Silikonschlauches über die Knopfkanülen für 15-30 Minuten mit 500 ml der Perfusionslösung I (calciumfrei, mit EGTA, 39 °C) gespült.

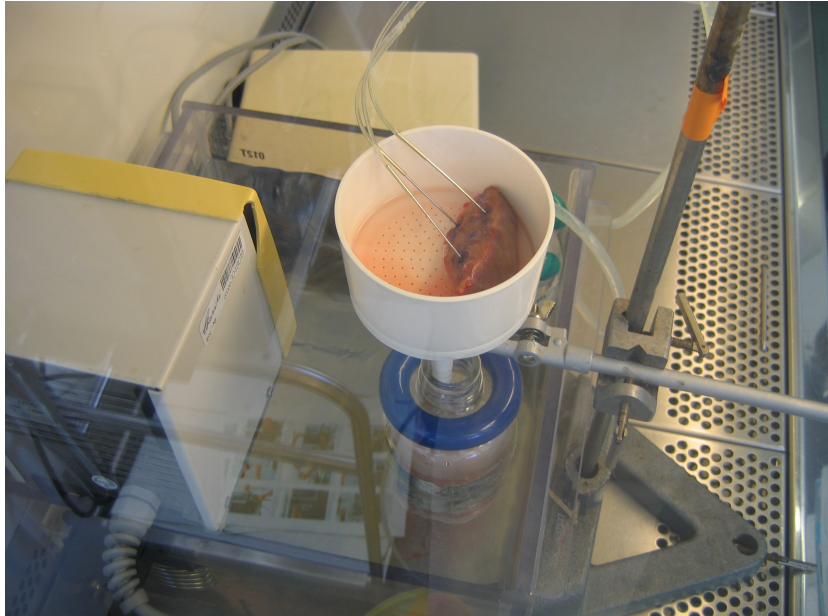


Abbildung 4.4: Perfusion eines Resektats

Für die zweite Perfusionsphase wird das Schlauchsystem umgesteckt, so dass eine Re-zirkulation der Perfusionslösung II (mit Kollagenase, auf 39°C vorgewärmt) erfolgen kann. Die Perfusion wird je nach Gewebequalität 10-30 Minuten aufrecht erhalten und abgebrochen, sobald die Leber durch leichten Druck irreversibel verformbar ist, oder die Dauer von 30 Minuten überschritten wird.

Nach der Perfusion wird die Leber in einer Petrischale mit P I (ohne EGTA, mit Humanalbumin, 4°C) mit einem Skalpell eingeschnitten und die Zellen aus dem verdauten Gewebe geschabt.

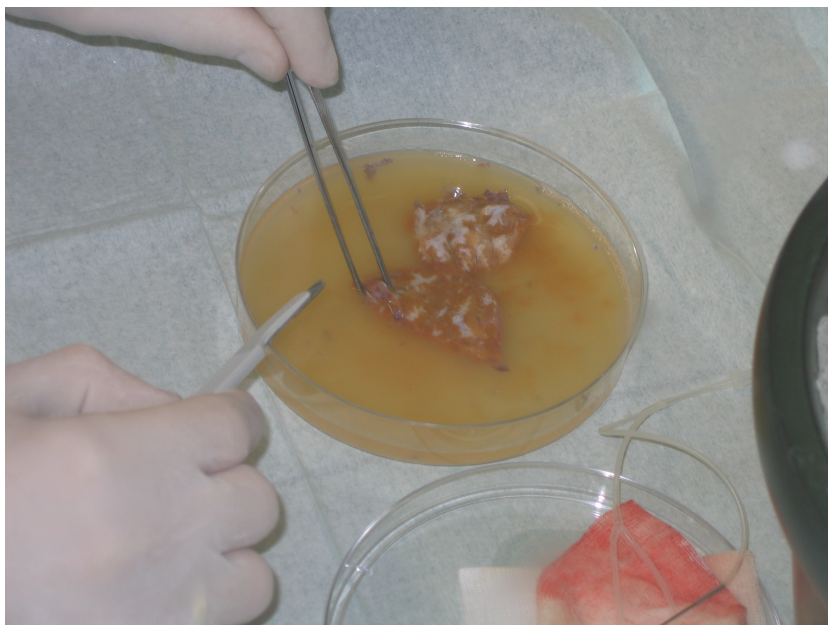


Abbildung 4.5: Herstellen einer Zellsuspension

Die resultierende Zellsuspension wird über sterile Gaze in 50ml Zentrifugationsröhrchen filtriert und dann bei 50 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.



Abbildung 4.6: Filtration einer Zellsuspension

Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und auf Eis gelagert. In einer Neubauer-Zählkammer wird die Zellzahl und die Viabilität mit Trypan Blau (25% in PBS) bestimmt. 20ml 25%iger Percolllösung werden mit jeweils 5ml Zellsuspension überschichtet und bei 1474 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Dichteunterschied zwischen lebenden und toten Zellen sorgt für die Separierung der lebenden von den toten Zellen und Zelltrümmern. Letztere haben eine geringere Dichte und verbleiben als Überstand auf der Percolllösung. Die obere Schicht und die Separierungslösung werden anschließend bis auf einen 5ml Rest über dem Zellpellet abgesaugt.



Abbildung 4.7: Zentrifugenröhrchen mit Percollgradient

Die Zellpellets werden in 35ml PBS resuspendiert und 5 Minuten bei 4°C mit 50 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in Hepatozytenkulturmedium aufgenommen. Erneut wird in einer Neubauer-Zählkammer mit 25% Trypan Blau in PBS die Zellzahl und die Viabilität bestimmt. Zellsuspensionen mit einer Viabilität von mindestens 75% werden auf mit Kollagen A beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, dabei werden pro Well einer 6-Well-Platte 1 Million lebende Zellen ausgesät. Bei einer 96-Well-Platte werden 50000 lebende Zellen in jedes Well gegeben. Die 6-Well-Platten werden mit William's Medium E + Zusätzen auf 2ml aufgefüllt, die 96-Well-Platten auf 100 μ l.

4.5 Mediumwechsel

Bei allen Versuchsgruppen wurde nach 18-20 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen. Dabei wurde das alte Kulturmedium abgesaugt. Um Rückstände zu entfernen, wurde jedes Well einmal mit PBS gewaschen, bevor das neue Medium zugegeben wurde. Sowohl die Kulturmedien als auch das PBS wurden hierbei auf 37°C vorgewärmt. Bei Mediumwechseln vor oder nach den Kaltphasen wurden Medium und PBS auf Zimmer-

temperatur gebracht, um die Zellen keinen rapiden Temperaturschwankungen auszusetzen.

4.6 Entnahme der Proben

4.6.1 Mediumproben für biochemische Testverfahren

Zu jedem Kontrollzeitpunkt wurden je Versuchsgruppe 3 Wells einer 6-Well-Platte zur Auswertung herangezogen. Die Mediumüberstände wurden mit einer 5ml-Pipette abgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und anschließend bei 500 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile abzutrennen. Die nun erhaltenen Überstände wurden auf 3 Eppendorfgefäße verteilt und sofort bei -20°C eingefroren.

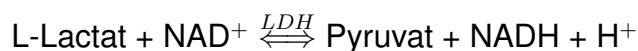
4.6.2 Proteinproben

Die Proteinproben wurden direkt nach der Abnahme der Mediumprobe genommen. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um Zelltrümmer und andere Rückstände zu entfernen. Pro Well wurden 700 μ l PBS zugegeben, der Zellrasen mit einem Zellschaber abgeschabt. Die erhaltene Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß (1,5ml) überführt. Es wurde mit 700 μ l PBS nachgespült, und erneut geschabt. Die Eppendorfgefäße mit der Proteinsuspension wurden bei 2000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem Proteinpellet wurde abgesaugt und das Pellet in 100 μ l PBS resuspendiert. Darauf folgte die Lagerung bei -20°C bis zur Messung.

4.7 Testverfahren

4.7.1 LDH-Bestimmung

Die Nachweismethode beruht auf der äquimolaren Umsetzung von NAD⁺ zu NADH + H⁺ und L-Lactat zu Pyruvat, bei der LDH als Katalysator fungiert :



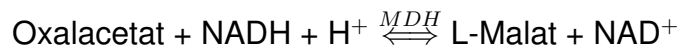
Dementsprechend enthalten die Versuchsreagenzien sowohl L-Lactat als auch NAD⁺. Die Proben wurden mit dem Versuchsreagenz inkubiert und in den vorgegebenen Zeitintervallen bei einer Wellenlänge von 340nm im Photometer gemessen. Dabei ist die Menge an NAD⁺ die Zielgröße der Extinktionsmessung.

Die ausgeworfenen Werte in der Einheit $\Delta E/\text{min}$ wurden mittels der in der Testanleitung aufgeführten Umrechnungsfaktoren in die Einheit U/l überführt. Die untere Nachweisgrenze des Testsystems liegt bei 5 U/l, der Variationskoeffizient bei maximal 1,41%. Es

handelt sich um einen optimierten Test nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

4.7.2 AST-Bestimmung

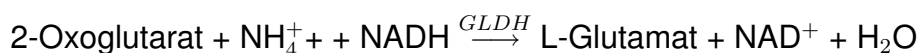
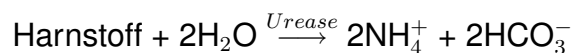
Der Test zur Bestimmung der AST-Aktivität im Kulturmedium ist ebenfalls optischer Art und basiert auf folgenden Reaktionen:



Die Testlösungen beinhalten neben einigen Puffersubstanzen L-Aspartat, Malatdehydrogenase (MDH), 2-Oxoglutarat, NADH und Pyridoxal-5-Phosphat, wobei letzteres zur Stabilisierung der Transaminase beigegeben wird, um falsch niedrige Messwerte zu verhindern. Die Menge an NAD^+ ist die Zielgröße der Extinktionsmessung. Die Proben wurden mit dem Versuchsreagenz inkubiert und dem LDH-Testsystem entsprechend in den vorgegebenen Intervallen bei einer Wellenlänge von 340nm gemessen. Die ausgehenden Werte in der Einheit $\Delta E/\text{min}$ wurden mittels der in der Testanleitung aufgeführten Umrechnungsfaktoren in die Einheit U/l überführt. Die untere Nachweisgrenze des Testsystems liegt bei 4 U/l, der Variationskoeffizient bei maximal 4,4%. Es handelt sich um einen optimierten Test nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

4.7.3 Harnstoffbestimmung

Die Bestimmung des Syntheseprodukts Harnstoff wird erneut mit Hilfe eines optischen Tests vorgenommen. Das Testprinzip ist mit folgenden Reaktionsgleichungen beschrieben:



Neben Puffersubstanzen sind in den Testreagenzien 2-Oxoglutarat, Adenosindiphosphat, Urease, Glutamatdehydrogenase (GLDH) und NADH vorhanden. Die Reagenzien wurden laut Testanleitung gemischt, die Proben mit dem Versuchsreagenz inkubiert und in den vorgegebenden Intervallen bei einer Wellenlänge von 340nm gemessen. Zielgröße der Extinktionsmessung ist wieder NAD^+ . Die Messwerte in der Einheit ΔE wurden mit Hilfe der in der Testanleitung aufgeführten Umrechnungsfaktoren in die Einheit mmol/l umgerechnet. Die untere Nachweisgrenze des Testsystems liegt bei 2mg/dl, der Variationskoeffizient bei maximal 5,79%.

4.7.4 Albuminbestimmung

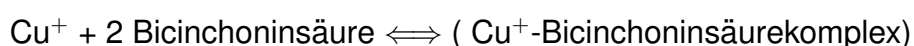
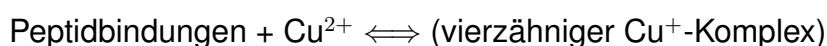
Die Albuminsynthese in den Zellkulturen wurde mit einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Die verdünnten Proben wurden nach Zugabe des Konjugats dreißig Minuten in den mit Antikörpern bestückten Wells einer 96-Well-Platte inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die Platten sechsmal vorsichtig gewaschen und anschließend mit einem Farbewickler inkubiert. Die einsetzende Reaktion wurde nach wenigen Minuten durch Zugabe von Säure gestoppt und die Platte bei 450nm im Photometer gemessen. Mit den bestimmten Extinktionen wurden Konzentrationen der Einheit $\mu\text{g/ml}$ errechnet. Laut Hersteller ergab ein Vergleich zwischen der angeführten Methode der quantitativen Albuminbestimmung und einem Double Antibody Albumin Radioimmunoassay für 45 Proben im Bereich zwischen 0,75 und 1,8 $\mu\text{g/ml}$ einen Korrelationskoeffizienten von 0,9995.

4.7.5 Zellaktivität (Cell Proliferation Assay)

Der verwendete Zellaktivitätstest basiert auf einer colorimetrischen Methode, die auf der Umsetzung von MTS Tetrazolium zu Formazan beruht. Dazu wurden jeweils 6 Wells einer 96-Well-Platte mit lebenden Zellen und 2 Wells ohne Zellen vier Stunden mit dem Testreagenz bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Formazankonzentrationen wurden nach diesen vier Stunden photometrisch bei einer Wellenlänge von 490nm bestimmt. Die gemessenen Extinktionen sind direkt proportional zur Menge an angefallenem Formazan. Dies ist wiederum proportional zur Menge der lebenden Zellen. Zum Zeitpunkt T2 konnten keine Messungen durchgeführt werden, da der Test bei 4°C auf Grund der stark herabgesetzten Stoffwechselrate verfälscht wurde und außerdem mit dem HLC1 Medium eine Interaktion zu beobachten war, die zu falsch hohen Meßwerten führte.

4.7.6 Gesamtproteinbestimmung

Das Testsystem beruht auf der Reduktion zweiwertiger Kupferionen zu Cu^+ durch Proteinbindungen. Die einwertigen Kupferionen werden von Bicinchoninsäure in einem hochspezifischen wasserlöslichen Komplex chelatiert, dessen Konzentration mit einer Wellenlänge von 562nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Reaktion ist zeit- und temperaturabhängig. Die ablaufenden Reaktionen sind (qualitative Darstellung):



Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur Proteinkonzentration, solange selbige $1\mu\text{g/ml}$ nicht unter- oder 100mg/ml nicht überschreitet.

Die gemessenen Extinktionen wurden mit Hilfe einer Standardkurve (mit bovinem Serumalbumin als Referenz) in Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) umgerechnet.

4.7.7 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 32-facher Vergrößerung von den Kulturen in den 6-Well-Platten gemacht. Da das Augenmerk bei der gesamten Versuchsreihe in erster Linie auf dem Kulturergebnis nach der Wiedererwärmung liegt, weil viele Schäden erst in dieser Phase apparent werden, wurden nur Bilder vom letzten Kulturtag abgeglichen.

4.8 Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad InStat, San Diego, USA. Zu Beginn wurde mit Hilfe eines nicht-parametrischen ANOVA-Modells untersucht, ob Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen eruiert werden konnten. Bei Signifikanzen wurden anschließend die einzelnen Datensätze in Paaren abgeglichen. Bei Vergleichen zwischen verschiedenen Versuchsgruppen zu gleichen Zeitpunkten, also ungepaarten, nicht-parametrischen Daten, wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Bei gepaarten Daten, also gleichen Versuchsgruppen und verschiedenen Zeitpunkten, wurde der Wilcoxon-Test genutzt. Dabei wurde jeweils getestet, ob qualitative Unterschiede zwischen den Kollektiven nachweisbar sind. Die Quantität der Unterschiede wurde nicht berücksichtigt.

Einige Messungen lieferten Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze. Diese wurden, um eine Verfälschung der Mittelwerte zu vermeiden, gleich null gesetzt. Irrtumswahrscheinlichkeiten kleiner als 0,05 wurden als signifikant, Werte kleiner als 0,01 als hochsignifikant angesehen.

5 Ergebnisse

Da die Hepatozytenkulturen aus verschiedenen Leberteilresektaten isoliert wurden, bestanden schon zu Beginn der Versuchsreihen teilweise große Differenzen zwischen den einzelnen Kulturen. Dies machte eine Darstellung der biochemischen Messdaten als Einzelverlaufskurven (mit eingezeichneten Mittelwerten und Standardabweichungen) sinnvoll, da die großen Standardabweichungen und die immer wieder auftauchenden Ausreißer die Darstellung von Mittelwerten oder Medianen erschwerten. Alle Grafiken enthalten die Verläufe der elf Leberzellkulturen, sowie den Verlauf des Mittelwertes als prominenteste Kurve. Legenden finden sich aus optischen Gründen nicht in allen Schaubildern, sind allerdings stets für alle Abbildungen gültig. Im Fall der Proteinmessung wurde eine Normierung der Daten auf den Ausgangswert der Kontrollgruppe vorgenommen, das heißt auf die Versuchsgruppe A1 zum Zeitpunkt T1.

5.1 AST-Aktivität in den Mediumüberständen

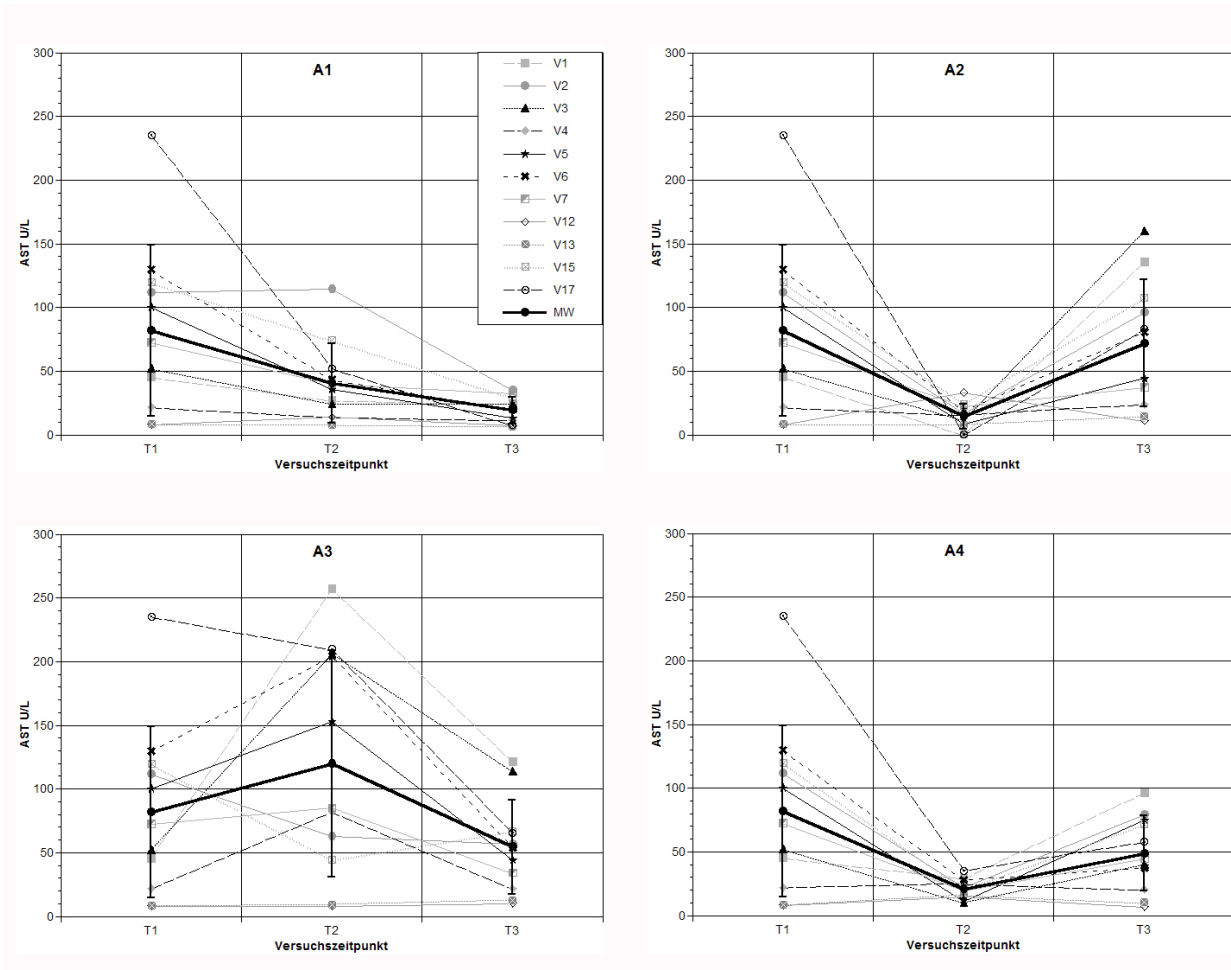


Abbildung 5.1: AST-Aktivität in den Mediumproben

Die initial bestehende AST-Aktivität sinkt bei drei der Versuchsgruppen im Laufe der Versuchstage ab, lediglich die Gruppe A3 hat im Mittel einen Anstieg der AST-Aktivität im Kulturmedium zu verzeichnen. Auffällig ist, dass bei den Versuchsgruppen, die während der Versuchsphase William's E Medium erhielten, die AST-Level vom zweiten zum dritten Versuchszeitpunkt sinken, während die Gruppen, die HLC1 Medium bekamen, zum zweiten Kontrollzeitpunkt sehr niedrige Konzentrationen aufweisen, welche dann steigen. Im gruppenübergreifenden Vergleich zu T2 hat nach 24 Stunden Kaltphase die Gruppe A3 signifikant höhere Werte als alle anderen Versuchsansätze. Außerdem haben die HLC1-inkubierten Gruppen signifikant niedrigere AST-Level als ihre unter gleichen Bedingungen mit William's E Medium gehaltenen Vergleichskulturen (beide $p=0,01$). Nach der Rekulturphase hat die Kontrollgruppe A1 signifikant niedrigere AST-Aktivitäten zu verzeichnen als alle anderen Kulturen, die keine signifikanten Unterschiede untereinander aufweisen.

5.2 LDH-Aktivität in den Mediumüberständen

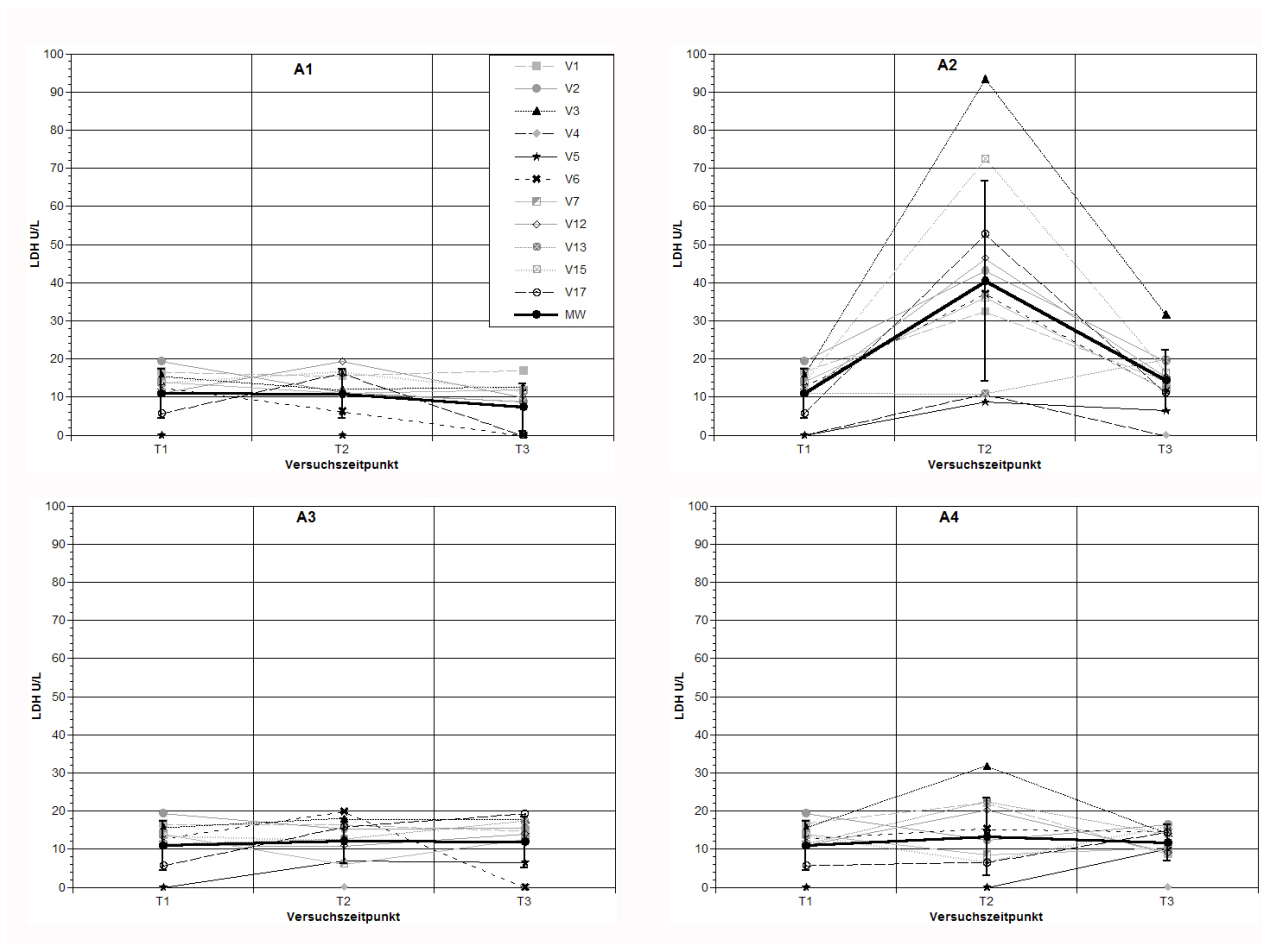


Abbildung 5.2: LDH-Aktivität in den Mediumproben

Bei der Betrachtung der Einzelverlaufskurven fällt auf, dass die einzige Gruppe, die eine deutliche Reaktion in ihrer LDH-Freisetzung zu verzeichnen hat, die mit HLC1 im Brutschrank inkubierte Gruppe A2 ist.

Im Vergleich mit den anderen Gruppen ergeben sich direkt nach der Kaltinkubation signifikant höhere Werte als bei allen anderen Versuchsgruppen (alle $p \leq 0,01$).

5.3 Bestimmung des Gesamtproteins

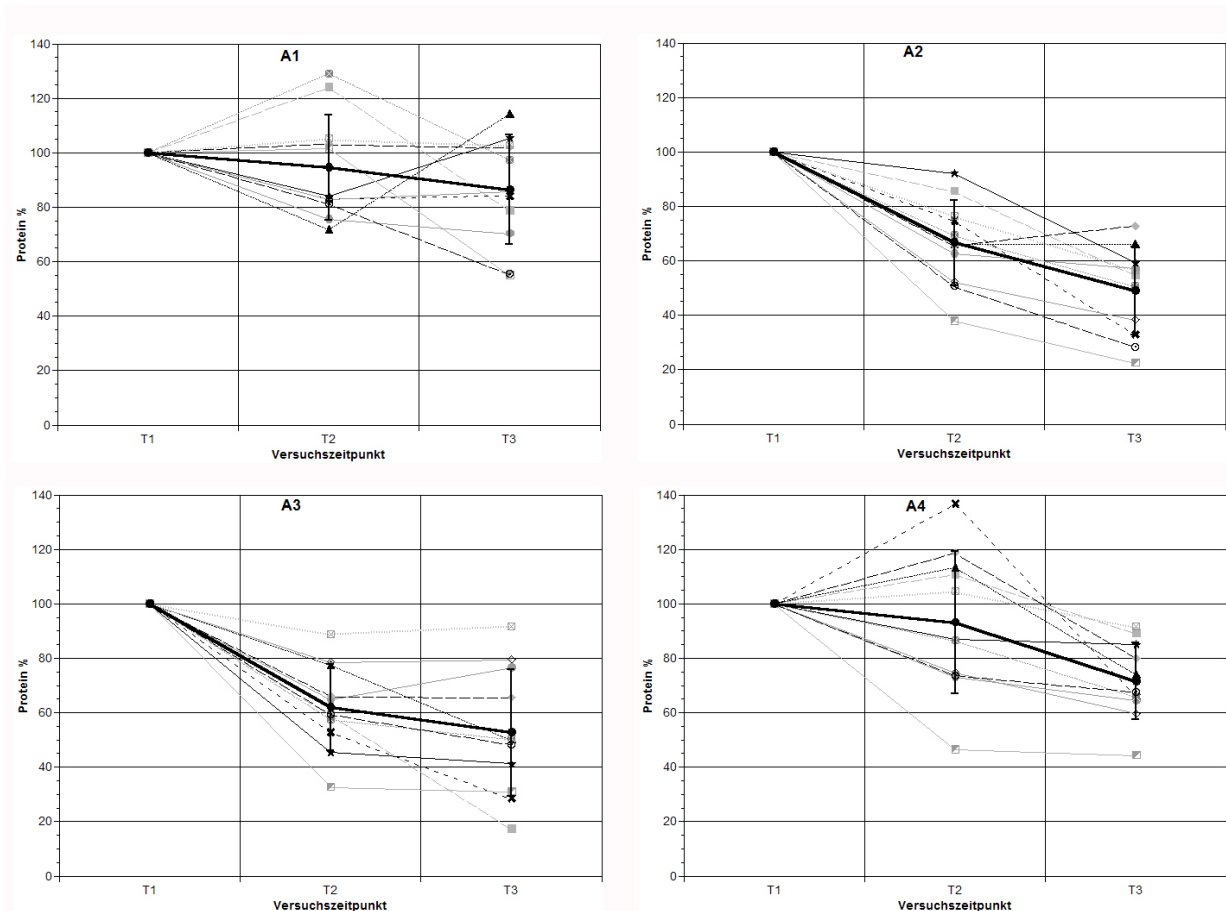


Abbildung 5.3: Gesamtprotein in den Zellkulturen

Bei der Betrachtung der Verlaufskurven, die die Menge an Gesamtprotein in Bezug auf den Anfangswert veranschaulichen, fällt auf, dass bezogen auf die Mittelwerte zu keinem Zeitpunkt eine Zunahme der Proteinmenge zu beobachten ist. Meist sind die Abnahmen von einem Zeitpunkt zum nächsten signifikant, die Ausnahme stellt die Gruppe A1 dar. Die erste Versuchsgruppe hat zwischen den einzelnen Zeitpunkten zwar keine signifikanten Einbußen an Gesamtprotein zu verzeichnen, im Vergleich vorher versus nachher (T1 vs. T3) ist allerdings im Mittel nur noch 86% der Ursprungsmenge vorhanden, diese Abnahme ist fast signifikant ($p=0,08$). Drastische Veränderungen des Proteingehaltes finden sich vor allem bei der ungeschützten Kaltgruppe und bei der warm inkubierten Gruppe mit Kälteschutzmedium (HLC1).

Nach der Kälteexposition, beziehungsweise der Inkubation mit HLC1 bzw. William's E Medium im Brutschrank, also zu T2, haben die Warmgruppe A1 und die Kaltgruppe A4 signifikant mehr Gesamtprotein in den Kulturen als die beiden anderen Gruppen. Zwischen den Gruppen A1 und A4 besteht ebenso wenig ein nachweisbarer Unterschied wie

zwischen den Gruppen A2 und A3.

Nach Abschluss der Rekulturphase hat die Gruppe A1 signifikant größere Proteinmengen als die Gruppen A2 und A3 (beide $p \leq 0,002$). Der Unterschied gegenüber Gruppe A4 zugunsten der Standardkultur A1 ist fast signifikant ($p=0,088$). Die Gruppe A4 hat signifikant höhere Proteinmengen als A2 und A3 (beide $p \leq 0,04$)

5.4 Harnstoffkonzentrationen in den Mediumüberständen

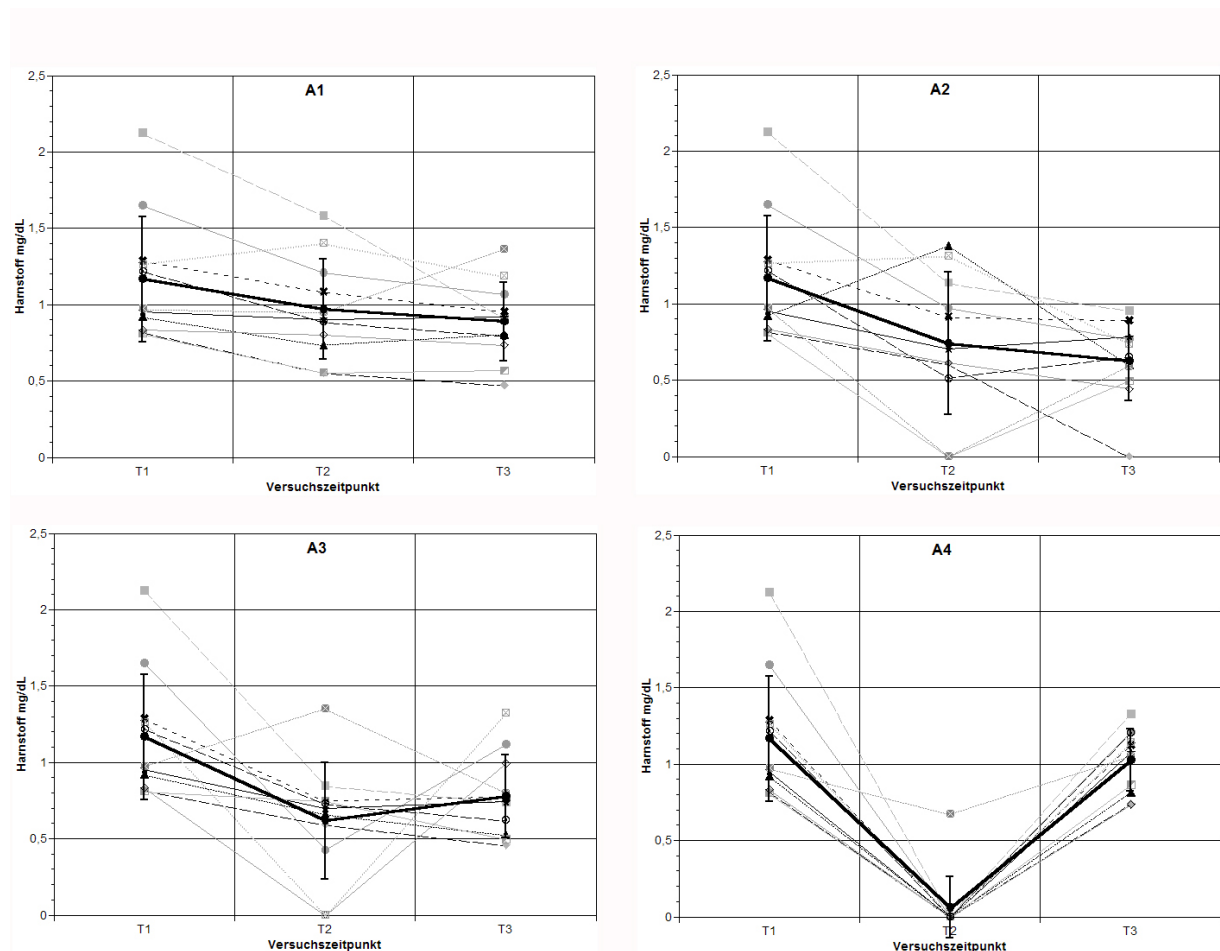


Abbildung 5.4: Harnstoff in den Mediumproben

Auffällig bei der Betrachtung der Harnstofffreisetzung der Zellkulturen ist der heterogene Verlauf der einzelnen Versuchsgruppen, wobei die einzige Gruppe ohne eine signifikante Einbuße am Ende der Versuche im Vergleich zum Ausgangswert die geschützte Kaltgruppe A4 ist.

Am Ende der Expositionsphase, also bei T2, hat die warme Kontrollgruppe A1 signifi-

kant höhere Spiegel zu verzeichnen als die beiden Kaltgruppen, gegenüber der anderen warminkubierten Gruppe besteht kein nachweisbarer Unterschied. Schlussendlich hat die Kaltversuchsgruppe A4 am Ende ihrer Kaltphase signifikant niedrigere Level als alle anderen Gruppen zu diesem Vergleichszeitpunkt.

In der abschließenden Beurteilung der Harnstoffsyntheseleistung nach der eintägigen Wiedererwärmung ergeben sich signifikante Differenzen zwischen den beiden durchgehend im Brutschrank gehaltenen Gruppen zugunsten der mit William's E Medium inkubierten. Dies ist allerdings die einzige signifikante Abgrenzung der unter optimalen Bedingungen gehaltenen Kultur A1. Unterschiede zu den beiden Kaltgruppen sind nicht nachzuweisen. Dagegen hat die mit Kälteschutzmedium kultivierte Gruppe A4 signifikant höhere Harnstoffmengen als die Kaltkontrolle A3.

5.5 Albuminkonzentrationen in den Mediumüberständen

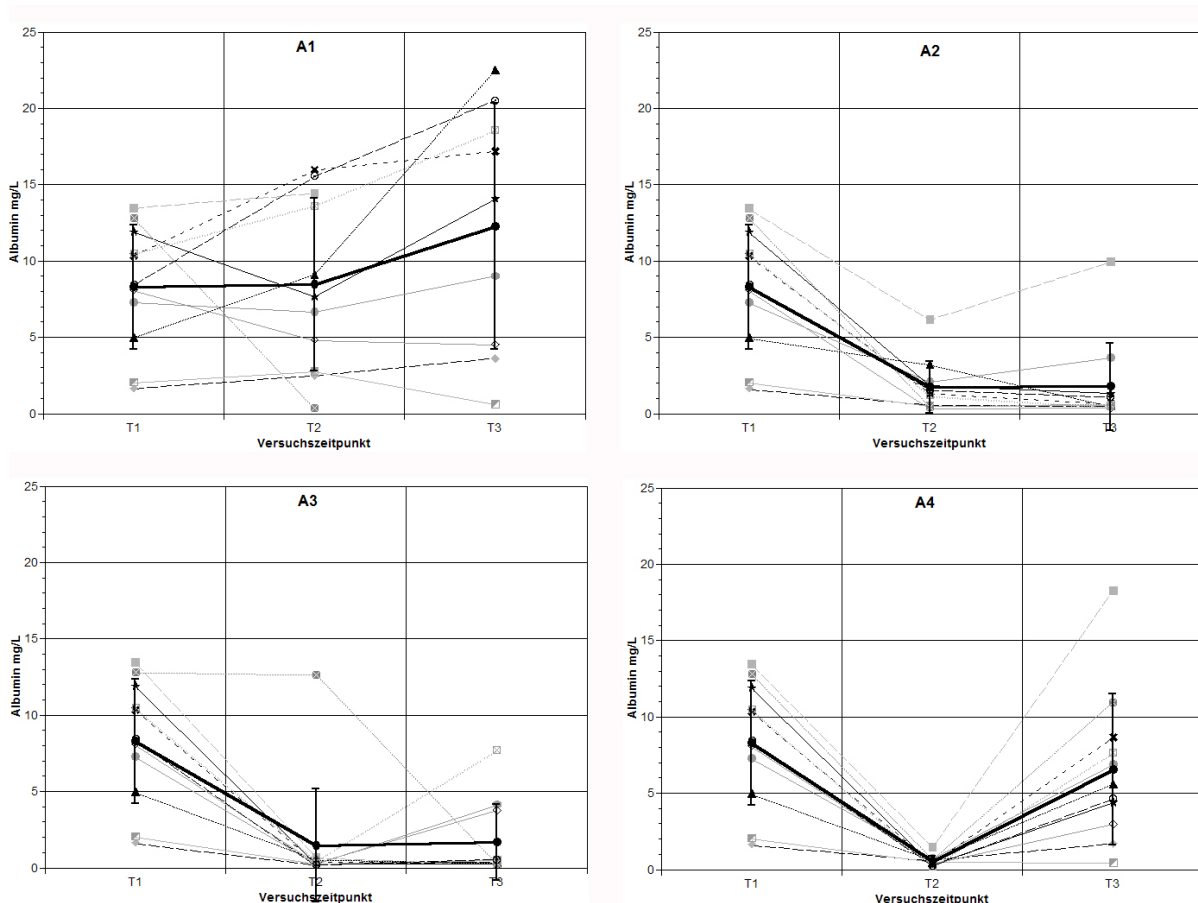


Abbildung 5.5: Albumin in den Mediumproben

Die Einzelverlaufskurven der gemessenen Albuminkonzentrationen zeigen sehr unterschiedliche Verlaufsmuster. Während die erste Gruppe relativ heterogene Verläufe auf-

weist, sind die anderen drei Gruppen einheitlicher geartet. Auffällig ist außerdem der ähnliche Verlauf der zweiten und dritten Versuchsgruppe. In der geschützten Kaltgruppe A4 ist ähnliches Profil wie bei den Harnstoffmessungen zu beobachten. Zum Zeitpunkt der zweiten Probennahme hat Kontrollgruppe A1 signifikant größere Albuminmengen im Medium zu verzeichnen als alle anderen Gruppen. Auch die Zellen der zweiten Versuchsgruppe haben signifikant mehr Albumin ins Medium freigesetzt als die beiden kaltinkubierten Gruppen A3 und A4, zwischen denen wiederum kein nachweisbarer Unterschied besteht. Am Ende der Kultur setzt die erste Versuchsgruppe signifikant höhere Albuminmengen frei als die zweite und die dritte Versuchsgruppe. Der Unterschied zur kaltinkubierten Gruppe A4 ist nicht signifikant, obwohl die Mittelwerte deutlich differieren. Im Vergleich zwischen den beiden Kaltgruppen A3 und A4 bestehen am Kulturende signifikant höhere Albuminkonzentrationen der Gruppe A4.

5.6 Zellaktivität (Cell Proliferation Assay)

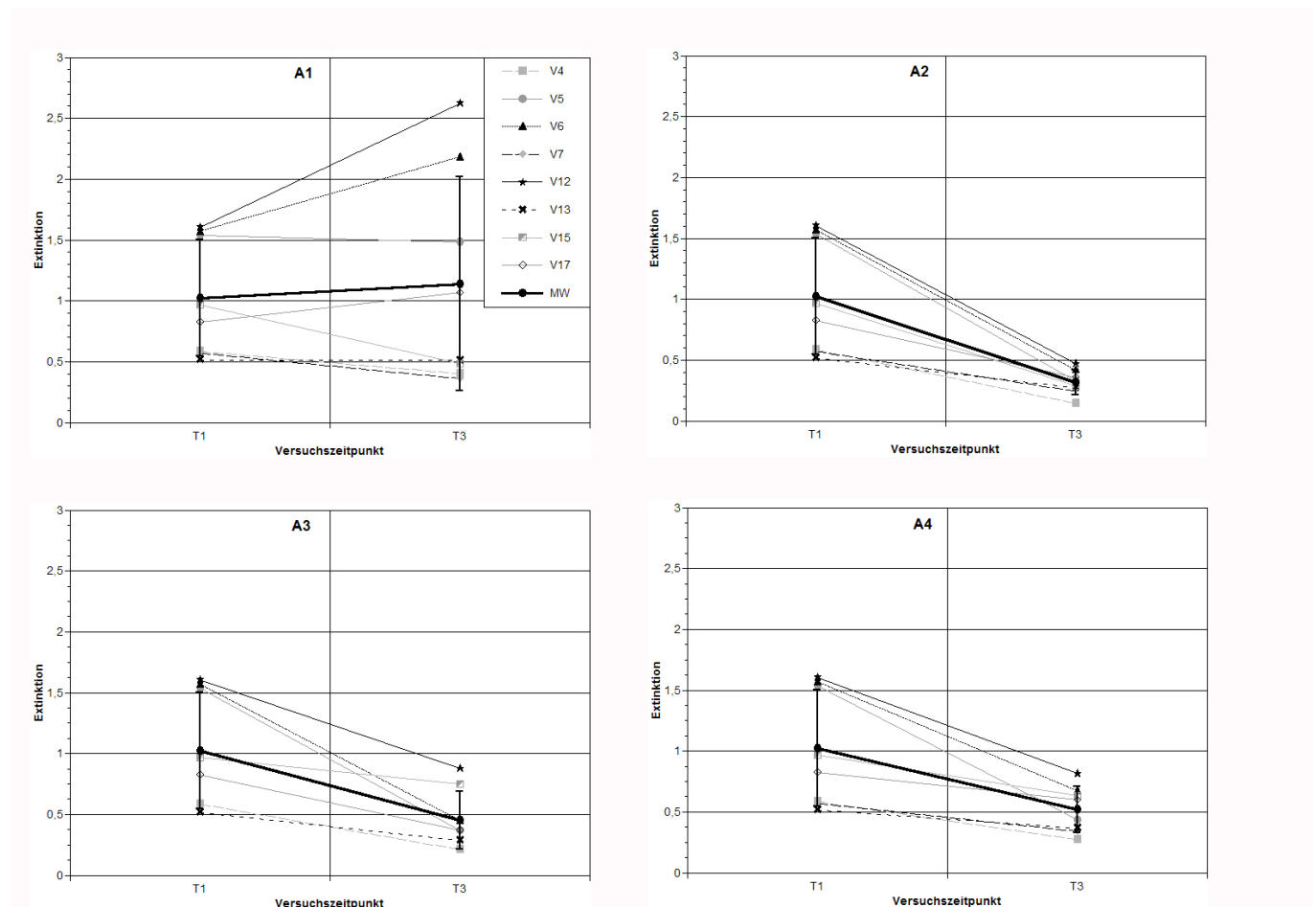


Abbildung 5.6: Zellaktivität

Bezüglich der Zellaktivitätsbestimmung ist zu bemerken, dass nur bei acht statt wie bei den anderen Parametern elf Versuche zur Zellaktivität mit einbezogen wurden. Die graphische Darstellung der gemessenen Zellaktivität zeigt bei allen Versuchsgruppen mit Ausnahme von A1 ein hochsignifikantes Absinken im Vergleich der ersten und letzten Kontrolle.

Im versuchsgruppenübergreifenden Vergleich nach dem Versuchsende hat die durchgehend warm und mit William's E Medium inkubierte Gruppe (A1) signifikant höhere Zellaktivitäten zu verzeichnen als die Gruppen A2 und A3 ($p=0,005$; $p=0,05$), der Unterschied zu Gruppe A4 ist nicht signifikant, obwohl die Mittelwerte stark differieren. Zwischen den beiden Kaltgruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

5.7 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden am Ende der gesamten Kulturphase von allen vier Versuchsgruppen gemacht. Der histologische Qualität der Zellkulturen nach vier Tagen Inkubation im Brutschrank (37°C , $5\% \text{CO}_2$) ist somit als Standardkultur und Vergleichswert anzusehen.

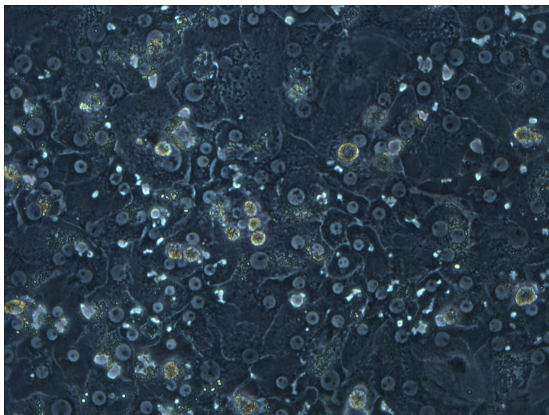


Abbildung 5.7: Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A1

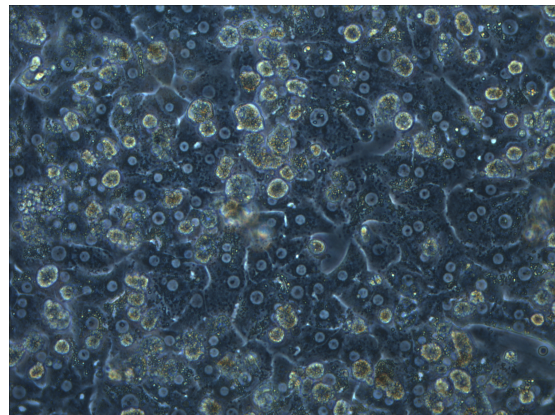


Abbildung 5.8: Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A2

A1: Das Bild zeigt eine Kultur der Kontrollgruppe. Die Zellen sind überwiegend hexagonal und teilweise zweikernig. Die Kernkörperchen sind deutlich im Zellkern abgegrenzt. Die Integrität der Plasmamembranen ist offenbar. Es sind kaum Granula- und Vakuolenausbildungen zu beobachten. Die Vakuolen sind Ausdruck des hohen intrazellulären Fettgehalts.

A2: Die Zellen, die mit HLC1 im Brutschrank inkubiert wurden, erscheinen im Vergleich zu der Kontrollgruppe granulierter. Die Kernkörperchen sind bei vielen Zellen nicht mehr

scharf abzugrenzen. Das vermehrte Auftreten von Vakuolen könnte als Zeichen der erhöhten Entgiftungstätigkeit gewertet werden.

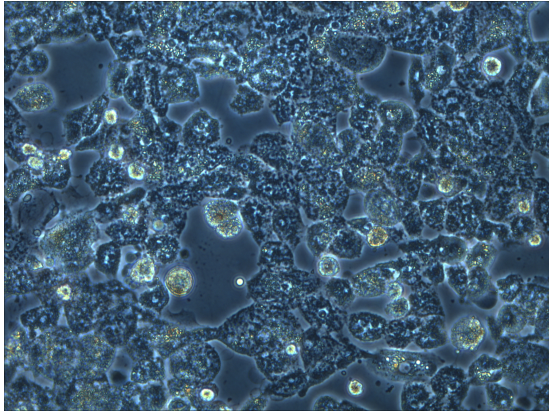


Abbildung 5.9: Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A3

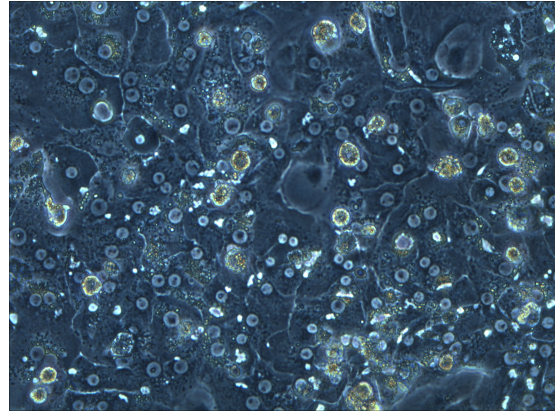


Abbildung 5.10: Lichtmikroskopische Aufnahme Versuchsgruppe A4

A3: Die Zellen, die mit dem Standardkulturmedium der Kaltphase ausgesetzt wurden, sind hochgranulär, nur in Einzelfällen ist der Zellkern auszumachen. Weder die hexagonale Zellform, noch die Unversehrtheit der Plasmamembran sind erhalten. Die Zelldichte ist deutlich vermindert. Der Durchmesser der Zellen imponiert kleiner als in den anderen Versuchsgruppen.

A4: Die Hepatozytenkultur, die mit HLC1 hypothermen Bedingungen ausgesetzt wurde, zeigt sich intakter als die andere Kaltkultur. Die Zellen sind meist hexagonal, häufig zweikernig und verfügen über intakte Plasmamembranen. Die Kerne sind sichtbar, Kernkörperchen sind ebenfalls auszumachen.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation eines Kälteschutzmediums zur hypothermen Kultivierung von primären humanen Hepatozyten. Die Anforderung an das Kulturergebnis beinhaltet, neben einer umfassenden Abschirmung der Zellen gegen hypothermie-induzierte Zellschäden, vor allem eine gute Erhaltung des leberzellspezifischen Metabolismus, um einen klinischen Einsatz der Zellkulturen zu ermöglichen. Verschiedene Aspekte des Studiendesigns haben in dieser Arbeit ihren Einfluss auf die Ergebnisse genommen. Daher gliedert sich die Diskussion dieser Arbeit auch in eben jene Punkte, bevor die Ergebnisse und der Ausblick vor dem Hintergrund des Versuchsaufbaus diskutiert werden.

6.1 Die Zellkulturen

Die unterschiedliche Vorschädigung des Ursprungsorgans durch die Art des Tumors, bestehende Cholestase, Alter, Geschlecht und Lebensgewohnheiten des Patienten schränkt die Vergleichbarkeit der Kulturen ein und führt zu großen Standardabweichungen in vielen Parametern. Da alle Kulturen aus Tumorresektaten gewonnen wurden, ist die Präsenz von Tumorzellen (Mikrometastasen) in den Kulturen nicht auszuschließen. Auch die Sterilität und die einheitlich kurze Ischämiezeit zwischen Resektion und Beginn der Isolierung der verwendeten Leberteilresektate war nicht durchgängig zu garantieren. Die durch die Isolierung herbeigeführten Schäden an den Zellen sind ebensowenig vergleichbar. Die Dauer des Verdau durch die Kollagenaselösung hat hierbei einen nicht unerheblichen Einfluss und kann nur individuell terminiert werden. Abbruchkriterium für den enzymatischen Verdau ist lediglich die subjektive Beurteilung der Verformbarkeit des Lebergewebes. Dies führt zu Verdauzeiten zwischen 10 und 30 Minuten (unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

6.2 Der Versuchsaufbau

In dieser Studie wurde die Kaltphase vorerst auf 24 Stunden begrenzt, was für das Ziel einer Langzeitkultur zu kurz ist, allerdings auch die Möglichkeit bietet, sich schrittweise dem Ziel zu nähern und Korrekturmöglichkeiten zu behalten. Wesentlich ist jedoch, dass diese Versuche auf der Verhinderung der eisenvermittelten Kälteschädigung basieren. Diese

tritt unabhängig von der Dauer der Kaltinkubation auf. Die Versuche wurden in Monolayerkulturen durchgeführt, was zwar dem geplanten Einsatz im Bioreaktor vorerst noch nicht entspricht, allerdings eine einfachere Auswertbarkeit der Testparameter, insbesondere des Gesamtproteins, garantiert. Die Übertragung eines in Monolayersystemen optimierten Kälteschutzmediums auf einen Bioreaktor ist zu einem späteren Zeitpunkt möglich. Die Auswahl der Versuchsgruppen berücksichtigt mehrere Aspekte. Die Kontrollgruppe A1 ist essentiell zur vergleichenden Beurteilung mit einer normalen Kultur. Die zweite Versuchsgruppe dient der Bewertung des Kälteschutzmediums HLC1 unter Warmbedingungen, was zur Beurteilung der Mediumkomposition bezüglich toxischer Bestandteile und zur Planung zukünftiger Änderungen von Bedeutung sein könnte. Um ein Maß für die maximale Schädigung der Hepatozyten zu erhalten, wurde die Versuchsgruppe A3 mit William's E im Kühlschrank inkubiert. Die eigentliche Versuchsgruppe A4 ist somit mit einer anderen „ungeschützten“ Versuchsgruppe direkt vergleichbar, außerdem besteht die Möglichkeit die Leistungsfähigkeit der Kaltkultur mit einer normal inkubierten Hepatozytenkultur abzugleichen.

Den Versuchsaufbau betreffend ist zu vermerken, dass die Kulturphasen zwischen T1 und T2 zwischen den Gruppen eingeschränkt vergleichbar sind. Die ersten beiden Gruppen waren im Brutschrank einer kontrollierten Begasung ausgesetzt, die beiden Versuchsgruppen im Kühlschrank waren unbegast. Die pH-Veränderung innerhalb der 24 Stunden hielt sich allerdings in so engen Grenzen ($\text{pH}=7,55$), dass eine Vergleichbarkeit der Gruppen gegeben ist. Varianzen zwischen den Spendern wurden relativiert, indem eine Versuchsreihe jeweils mit den Zellen einer Leber aus einem Isolierungsvorgang durchgeführt wurde. Die eingesetzte Hypothermie von 4°C konfrontiert die Zellen mit einem massiven Kältereiz. Eine Veränderung der Kulturbedingung zu einer mildereren Hypothermie könnte das Verhältnis aus Hypothermieschaden und Metabolismusreduktion optimieren.⁵⁷ Das Fehlen einer Zellaktivitätsbestimmung an T2 hat mehrere Gründe: Zum einen war der Umsatz des Testreagenz in der Kälte bei allen Zellen gleich null, zum anderen war eine Interaktion des HLC1 Mediums mit der Testreagenz zu beobachten, die zu einem vollständigen Umsatz unabhängig von der Anwesenheit von Zellkulturen führte.

6.3 Die Kulturmedien

Das William's E Medium enthält neben fetalem Kälberserum noch weitere Additiva: Stimulantien wie Insulin, Antiinfektiosa wie Penicillin und Streptomycin, sowie das Glukokortikoid Dexamethason. Da davon ausgegangen wurde, die Zellen in einen metabolischen Arrest zu schicken, ist der Verzicht auf diese Präparate im Kältemedium zu rechtfertigen, allerdings ist eine Beeinträchtigung des Rekulturergebnisses (T3) durch die Absenz der genannten Wirkstoffe, insbesondere des Insulins, so nicht auszuschließen. Ein weiterer

Grund für den Verzicht auf fetales Kälberserum ist die am Ende dieses Projekts stehende Absicht der klinischen Anwendung. Derzeit ist die Integration boviner Substanzen in ein Konzept zur Therapie von intensivmedizinisch betreuten Patienten mit zu vielen immunologischen und infektiologischen Risiken behaftet. Ein Nebenaspekt dieser Arbeit ist auch ein Beitrag zur Weiterentwicklung des Kälteschutzmediums HLC1, oder auch neuer Hypothermiemedien. Dies ist praktikabler, wenn Mediumsbestandteile ergänzt werden können, so dass der Einfluss von Zusätzen relativ einfach evident werden kann. Die Auswahl der Komponenten, die als Schutz vor kälteinduzierter Schädigung dienen sollen, basiert vornehmlich auf Erkenntnissen, die nicht an humanen Zellen, teilweise auch nicht an Hepatozyten, gewonnen wurden. Dies schränkt die Relevanz dieser Substanzen für ein Modell mit primären humanen Zellen sicherlich ein, auch wenn einige Schutzmechanismen bereits an vielen verschiedenen Zelltypen nachzuweisen waren. Insbesondere ist es wahrscheinlich, dass ein Austausch einiger Wirkstoffkomponenten (vor allem der Eisenchelatoren 2,2'-Dipyridyl und 1,10-Phenanthroline) bessere Ergebnisse produzieren könnte. Der hydrophobe Charakter der beiden Chelatoren scheint hydrophileren Produkten wie Desferroxamin unterlegen zu sein. Auch eine Kombination aus hydrophoben und -philen Eisenchelatoren könnte aufgrund der dadurch adressierten unterschiedlichen Kinetiken ein besseres Ergebnis erbringen (bislang unveröffentlichte Ergebnisse von Rauen et al.). Ob der Einsatz der benutzten Antioxidantien und insbesondere der Zeitpunkt der Applikation⁴¹ zu einer Optimierung führen kann, wurde nicht berücksichtigt, um nicht zu viele mögliche Schutzfaktoren gleichzeitig zu bedienen und die Auswertung zu erschweren. Da es sich bei der Zielsetzung dieser Studie um nichts anderes handelt als die möglichst schadensfreie Erzeugung eines winterschlafartigen Zustandes, wäre der Rückgriff auf natürliche winterschlafinduzierende Verbindungen eine weitere elegante Option.

In verschiedenen Studien ist die Wirkung von Plasma (beziehungsweise dessen Albuminfraktion) winterschlafender Tiere auf nicht winterschlafende Spezies untersucht worden. Eine Übertragbarkeit von diesen Mechanismen auf humane Systeme ist danach als theoretisch möglich anzusehen.⁵⁸ Eine besondere Rolle scheint in der Natur der sogenannte Hibernation Induction Trigger (HIT) zu spielen, dessen Wirkung sich wahrscheinlich über δ_2 -Rezeptoren entfaltet.^{59 60} Die breite Einsetzbarkeit von HIT-ähnlichen Substanzen wird durch verschiedene Studien mit vor allem neurologischen Fragestellungen belegt. Dabei scheint die Fähigkeit dieser Substanzen die Freisetzung von Stickstoffoxid zu blockieren einen wichtigen Bestandteil ihrer neuroprotektiven Wirkung auszumachen.⁶¹ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass (D-Alanin 2, D-Leucin 5)-Enkephalin (DADLE) als künstlicher HIT zumindest im Rattenmodell seine neuroprotektive Wirkung dosisabhängig über Delta-Opioid-Rezeptoren entfaltet, allerdings scheint auch ein noch nicht identifiziertes, nicht-opioides System beteiligt zu sein, wie eine Studie mit Hilfe eines weiteren Delta-rezeptoragonisten (Deltorphin D) und dem Plasma von winterschlafenden Murmeltieren

nahelegt.⁶² Diese Entdeckung wird durch die Ergebnisse von M. Malatesta et al. ergänzt, die an Lebergewebe von winterschlafenden Haselmäusen zeigen konnten, dass der Winterschlaf ein bis zur RNA-Ebene einer Zelle komplex regulierter Vorgang zu sein scheint, der einer Programmierung der Zelle eher entspricht, als eine bloße Reduktion der metabolischen Funktion.⁶³ Im Jahr 2007 konnte von Inuo et al. bewiesen werden, dass (D-Alanin 2, D-Leucin 5)-Enkephalin (DADLE) als künstlicher HIT in der Lage ist, Rattenhepatozyten in einer Suspensionkultur vor Hypothermieschäden (24 Stunden bei 4 °C) zu schützen. Die überlebenden Zellen wurden nach der Hypothermiephase 24 Stunden bei 37 °C rekultiviert. Der artifizielle HIT verbesserte im Rahmen dieser ebenfalls recht kurzen Hypothermiezeit signifikant das Zellüberleben. Dies spiegelte sich sowohl in der Reduktion der Freisetzung von Schädigungsparametern wie LDH und Alanin-aminotransferase (ALT), als auch in Form eines besseren Metabolismus, hier Albuminsynthese und Lidocainstoffwechsel, nach der Rekultur wieder.⁶⁴ Vor diesem Hintergrund ist die Einbindung von DADLE oder ähnlich wirksamen Substanzen in die Konzepte zum Schutz vor Hypothermieschäden nicht nur aus hepatologischer Sicht vielversprechend, auch wenn die Mechanismen an Hepatozyten noch nicht befriedigend aufgeklärt sind. Eine klinische Anwendung von HIT-ähnlichen Substanzen ist daher vorerst allerdings nicht realisierbar, auch wenn der Einsatz von Hibernation Induction Triggern zur Organaufbewahrung ebenfalls erfolgversprechend ist und eine bessere Toleranz der Spendeorgane bezüglich der Ischämiezeit bis zur Reperfusion oder auch zur Isolierung von Interesse wäre.⁶⁵

6.4 Die Ergebnisse

Die Darstellung der Versuchsergebnisse erfordert die Abbildung von Kurvenschaaren. Die beschriebene Individualität der Kulturen führt zu, an den Mittelwerten gemessen, großen Standardabweichungen. Da die Fallzahl der hier vorgelegten Studie nicht sehr groß ist, sind die Ausreißer in der generellen Tendenz schwer kompensierbar. Die gewählte Darstellung erlaubt sowohl das Ablesen von generellen Tendenzen, Mittelwerten und Standardabweichungen, als auch die einfache Identifikation von Ausreißern.

Die Bewertung der Ergebnisse ist am übersichtlichsten nach Versuchsgruppen gegliedert vorzunehmen. Die unter optimalen Kulturbedingungen gehaltene Versuchsgruppe A1 erfährt während des Versuchszeitraumes kaum gravierende Veränderungen. Während die Gesamtmenge an Protein leicht rückläufig ist, verhalten sich auch die Konzentrationen der beiden Schädigungsdetektoren LDH und AST rückläufig oder konstant. Mögliche Gründe hierfür sind der initial ausgesäte Anteil nicht vitaler Zellen, sowie der Anteil der noch vitalen Zellen, die nicht adhären wurden und daraufhin zu Grunde gingen. Durch die Mediumwechsel wird der auf das Konto dieser zwei Fraktionen gehende Anteil der Enzyme durch Auswaschung reduziert. Dies erklärt den eher hohen Ausgangs-

wert der Schädigungsparameter und die kontinuierliche Abnahme des AST-Spiegels. Die Berücksichtigung der Syntheseparameter bestätigt diese Tendenzen. Die Harnstoffkonzentrationen bleiben absolut gesehen auf einem hohen Niveau. Der Anteil freigesetzten Harnstoffs durch Zelltod wäre auch hier eine Erklärung für die leichten Differenzen innerhalb der ersten Versuchsgruppe. Die produzierten Albuminmengen verändern sich nicht signifikant über die Zeit. Die numerische Zunahme des Mittelwertes deutet allerdings auf eine sich eher steigernde Produktionsleistung der Hepatozytenkulturen während der ersten drei Tage hin. Der letzte in Betracht zu ziehende Parameter ist die Zellaktivität; auch hier ergibt sich das Bild einer eher regenerierenden Kultur. Die am Ende der Versuche angefertigten lichtmikroskopischen Bilder bestätigen die guten biochemischen Werte dieser Gruppe.

Die zweite Versuchsgruppe ist mit der ersten direkt vergleichbar, einziger Unterschied war die Applikation von HLC1 Medium zwischen den ersten beiden Versuchszeitpunkten. Die daraus resultierenden Verluste an Gesamtprotein legen den Schluß nahe, dass in dem Kulturmedium essentielle Bestandteile zur normothermen Kultur von primären humanen Hepatozyten fehlen. Eine Toxizität einiger Komponenten in der Wärme ist ebenfalls nicht auszuschließen, denn selbst während der Rekultur mit William's E Medium ist abermals ein heftiges Zellsterben zu beobachten. Die parallel gemessenen Schädigungsparameter zeigen ein komplett differierendes Bild: Die eher zytosolisch anzutreffende Laktatdehydrogenase erreicht unter der Inkubation mit HLC1 Medium an T2 einen Peak, der auch bei der in der Kälte mit HLC1 inkubierten Gruppe A4 nicht zu beobachten ist. Ein Anstieg der AST ist zu diesem Zeitpunkt nicht evident, es ist eine signifikante Abnahme zu verzeichnen. Während der Rekultur kehrt sich das Bild um. Eine Erklärung dafür mag sein, dass der Angriff der zweifelsfrei durch die Inkubation mit HLC1 Medium in der Wärme ausgelösten Schädigung nicht im Bereich der Mitochondrien zu finden ist, die Mitochondrien vielleicht sogar einen gewissen Schutz durch das Medium erfahren. Ein Hinweis darauf bieten die signifikant niedrigeren AST-Mengen an T2 gegenüber der Gruppe A1. Die in den AST-Konzentrationen erst am Ende des Versuchs nachvollziehbaren Schäden würden in diesem Modell dann während der Rekultur mit William's E Medium nur ihren Abschluss finden und wären nicht als Folge der Rekultur zu verstehen. Der Verlauf der Syntheseparameter stützt diese Interpretation. Sowohl die freigesetzten Mengen an Harnstoff als auch an Albumin nehmen deutlich ab, allerdings ist dieser Verlust an Synthesekapazität nur zwischen den ersten Kontrollpunkten signifikant, für den Zeitraum der Rekultur ergeben sich nicht signifikante Änderungen der Mittelwerte. Leider liefert die Bestimmung der Zellaktivität auf Grund der erwähnten HLC1-Testreagenz-Interaktion keine weiteren verwertbaren Aspekte. Nur die am Versuchsende deutliche Reduktion der Aktivität im Vergleich zum Ausgangswert ist sichtbar und entspricht damit den mikroskopisch gewonnenen Eindrücken der Kultur.

Die zum Nachweis der maximalen Schädigung ohne Schutz in der Kälte inkubierte Grup-

pe A3 erleidet einen nicht unerheblichen Schaden, der sowohl in der Betrachtung des Gesamtproteins als auch der AST deutlich wird. Am zweiten Kontrolltag hat diese Versuchsgruppe die niedrigsten Proteinmengen aller Versuchsgruppen vorzuweisen. Dies ist gerade im Vergleich mit der anderen Kaltgruppe A4 nur durch bereits in der Kälte ablaufende Schädigungsprozesse erklärbar. Mit dem Wissen um den Schutz von mitochondrialen Membranpotentialen durch Eisenchelatoren und dem Auftreten der AST-Peaks in nahezu allen Kulturen der Versuchsgruppe muss eine die Mitochondrien einschließende Schädigung hier als Ursache angesehen werden. Dies spricht am ehesten für einen nekrotischen Untergang von Teilen der Kultur. Die LDH-Aktivitäten zeigen überhaupt keine Veränderungen, dies ist vor dem Hintergrund des Ausmaßes der Zellschädigung nicht befriedigend erklärbar. Die signifikanten Einbußen in den Freisetzungen von Syntheseprodukten (Harnstoff, Albumin) am Versuchsende deuten ebenfalls auf eine massive Schädigung dieser Versuchsgruppe in der Kälte hin. Anders als die zweite Versuchsgruppe verfällt die dritte Gruppe in der Rekulturphase nicht mehr so rapide weiter. Die nicht signifikante weitere Abnahme des Gesamtproteins, der signifikante Rückgang der AST-Konzentration, sowie die zumindest konstant bleibenden Syntheseparameter belegen dies. Dieses Ergebnis ist etwas überraschend, da bei Rattenhepatozyten für vergleichbare Zeiträume gezeigt werden konnte, dass die kalte Inkubation zwar für die Verursachung von Schädigungsketten verantwortlich ist, diese allerdings eher in der Phase der Wiedererwärmung zu beobachten sind.³³ Die mikroskopischen Aufnahmen der Versuchsgruppe nach der Rekultur bestätigen den Eindruck einer deutlich geschädigten Kultur. Dieser Kulturverlauf wird aber auch von der geschützten Kaltgruppe A4 teilweise bestätigt, was ebenso überrascht, da dies unter Anwesenheit der Eisenchelatoren geschah. Das erst in der Phase der Wiedererwärmung signifikant sinkende Gesamtprotein und die steigende AST-Konzentration deuten den beschriebenen Ablauf an. Die sich nicht verändernden LDH-Konzentrationen und die vergleichsweise sehr gute Wiederherstellung der Syntheseleistungen nach nahezu völligem Kältearrest relativieren das Bild. Im Vergleich der Zellaktivität am Versuchsende ergeben sich allerdings deutliche Einbußen für beide Kaltgruppen gegenüber der Warmkontrolle A1. Auffallend ist bei beiden kaltinkubierten Gruppen die fehlende Veränderung in den gemessenen LDH-Aktivitäten, zumal die Bestimmung von AST in den Mediumproben Schäden anzeigt. Auch wenn man bedenkt, dass LDH nur zytosolische und AST sowohl zytosolische als auch mitochondriale Schäden detektiert, ist dies nicht befriedigend zu erklären. Bei Rattenhepatozytenkulturen ist laut Rauen et al. die Bestimmung der Laktatdehydrogenase ein etabliertes Mittel, kalteinduzierte Schädigung nachzuweisen. Die lichtmikroskopischen Bilder der geschützten Kaltkultur A4 bestätigen im Vergleich mit der ungeschützten Kaltkultur A3 den besseren Zustand der Kultur am Versuchsende. Nichtsdestotrotz ist der Unterschied in verschiedenen Parametern zur warminkubierten Standardkultur A1 unübersehbar. Im Vergleich der Versuchsgruppen ist die Standardkultur A1 allen anderen Kulturen

überlegen. Ablaufende Schäden sind kaum erkennbar und leberspezifische Funktionen scheinen sich zu erholen. Allerdings ist bekannt, dass primäre humane Hepatozyten unter Standardkulturbedingungen nach gut einer Woche in ihrer metabolischen Leistung stark reduziert sind. Die hier dargestellten guten Ergebnisse der Gruppe A1 sind als falsch positiver Einfluss der kurzen Inkubationsdauern zu verstehen. Die eigentliche Kaltversuchsgruppe A4 zeigt sich zwar den anderen zwei Gruppen nicht zuletzt aufgrund der guten Ergebnisse in den Synthesefunktionen überlegen, fällt aber in eben diesem Punkt, wie auch bei der Bestimmung des Gesamtproteins, gegenüber der Standardkultur A1 leicht ab. Offensichtlich war der mitochondriale Schädigungsweg durch die Gabe der Eisenchelatoren noch nicht gut genug abgedeckt. Die eventuelle Toxizität beziehungsweise ungenügende Ausstattung mit Stimulantien (Insulin) des HLC1 Mediums mag ebenso für die nicht vollständige Erhaltung der Integrität dieser kaltinkubierten Zellen verantwortlich sein. In diesem Sinne scheint der Hauptadressat des Schutzmediums, nämlich der per Wiedererwärmung auftretende radikalvermittelte Oxidationsprozess durch HLC1 Medium nur partiell verhinderbar zu sein, wobei die hier durchgeführte Kaltinkubation mit 24 Stunden eher kurz gewählt ist.

In Bezug auf die anfangs formulierten Ziele dieser Studie ist festzustellen, dass durch die Applikation von eisenchelatorhaltigen Kulturmedien hypothermie-induzierte Schäden an primären humanen Hepatozyten signifikant zu mildern sind. Die eigentliche Versuchsgruppe A4 ist in einer globalen Beurteilung, nicht zuletzt aufgrund der guten Syntheseleistungen am Kulturrende, knapp hinter der warmen Kontrollgruppe A1 einzuordnen. Es liegt nahe, dass bei längeren Kulturzeiten und einem optimierten Kälteschutzmedium eine Überlegenheit von kaltinkubierten Gruppen gegenüber der warmen Kontrolle herbeiführbar ist. Eine Verwendung des Kälteschutzmediums unter normothermen Bedingungen ist aufgrund der dargestellten Schädigung nicht erfolgversprechend.

6.5 Ausblick

Aufgrund der gut erhaltenen Syntheseleistung und der nur milden Schädigung der geschützten Kaltkulturen ist festzustellen, dass primäre humane Hepatozyten mit Hilfe von Schutzkomponenten im 24 Stunden Modell effektiv vor Hypothermie-Schäden geschützt werden können. Um Zellen für den Einsatz in Bioreaktoren aufzubewahren, müssten allerdings weitergehende Ergebnisse bezüglich der Versuchsdauer und der biochemischen Leistungsfähigkeit erzielt werden. Solange sich die Kaltkultur am Ende eines weit längeren Zeitraumes in der Kälte der Warmkontrolle (A1) nicht überlegen zeigt, ist kein Nutzen aus dieser Strategie zu ziehen. Unter der Berücksichtigung der obengenannten Optimierungspotentiale in der Versuchsplanung scheint die hier durchgeführte Kaltinkubation aber noch Verbesserungsspielraum zu haben. Außer den bereits durch-

geführten Maßnahmen gibt es noch andere Konzepte, die darauf abzielen, Zellkulturen oder Organismen in einen Zustand des metabolischen Arrests zu bringen, in dem der potentielle Schutz der Kälte vor Zellalterung die Nachteile der Hypothermie überwiegt. Die Zusammensetzung des Mediums zielt in dieser Arbeit in erster Linie auf die Vermeidung der eisenassoziierten Prozesse ab, andere Mechanismen werden nicht berücksichtigt. Die Zugabe zusätzlicher Medikamente, insbesondere anderer Eisenchelatoren, Antioxidantien oder HIT-ähnlicher Substanzen, könnte den Kälteschutz deutlich verbessern. Darüber hinaus sind andere Schutzkonzepte auf der Basis von geänderten Calciumkonzentrationen, oder einer verbesserten Energiesituation der Zellen hier nicht berücksichtigt worden.^{45 44 66} Neben den Komponenten des Kälteschutzmediums könnten aber auch noch andere Aspekte des Zellschutzes verbessert werden. Eine Veränderung der Gasversorgung im Sinne einer Hypoxie, etwa durch eine andere Mediumschichtdicke und damit einer veränderten Diffusion durch das Medium, sollte evaluiert werden. Rauen et al. konnten an Rattenhepatozyten nachweisen, dass unter hypothermischen Bedingungen hypoxische Kulturen einen gewissen Schutz vor kälteinduzierter Schädigung genießen.³³

Auch der Einsatz von Schwefelwasserstoff (H_2S) zur Begasung könnte Hepatozyten in einen metabolischen Arrest versetzen. Nachgewiesen ist dieses Potential bisher nur im Modell des Mäuseorganismus. Tiere, die mit H_2S begast wurden, fielen in einen an Winterschlaf erinnernden Zustand (suspended animation), der durch eine reduzierte Körperkerntemperatur und ein Absinken der metabolischen Aktivität charakterisierbar war. Nach der Regenerationsphase offenbarten sich keine sichtbaren Schäden.⁶⁷ Dies deckt sich im weiteren Sinne mit den Erkenntnissen von Alam et al. über die Auswirkungen von suspended animation Zuständen, seien sie durch Hypothermie oder Gas induziert und an Schweinen oder Mäusen herbeigeführt. Diese Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass auch an humanen Geweben Zustände, die einem Winterschlaf ähneln, herbeiführbar sind. Dies könnte einen vielversprechenden Ansatz für künftige Kältemedien darstellen. Ein anderes Konzept von Hypothermieschutz wäre die Einführung von ischämischer Präkonditionierung in das Versuchsprotokoll. Im Rattenhepatozytenmodell führte eine zehnmünütige Präinkubation in anoxischem Medium in der nachfolgenden hypothermen Versuchsphase zu einer besseren Viabilität der Zellen gegenüber einer Kontrollgruppe. Auch der Energiemetabolismus der Zellen zeigte sich verbessert gegenüber der nicht vorgeschädigten Vergleichskultur.⁶⁸

7 Zusammenfassung

Einleitung

Zur Behandlung des akuten Leberversagens sind die therapeutischen Alternativen zur Transplantation rar. Mögliche Ansätze bieten Dialysesysteme, oder experimentelle Systeme auf Zellbasis wie die bioartifiziellen Leberunterstützungssysteme. Ihre Praktikabilität hängt mit der Verfügbarkeit von Zellkulturen eng zusammen. Es kommen hier sowohl Tumorzelllinien, als auch primäre porcine oder humane Hepatozyten in Frage. Da bei primären humanen Hepatozyten die Biokompatibilität am größten ist, sind sie als Zellquelle der ersten Wahl anzusehen. Leider sind die Ressourcen an primären humanen Hepatozyten gering, da sie in ausreichender Menge nur aus abgelehnten Spenderorganen isoliert werden können und in vitro nicht proliferieren. Ein Verfahren zur effektiven Nutzung und Lagerung dieser wertvollen Zellquelle ist demnach von Nutzen. Eine mögliche Strategie ist die hypotherme Lagerung der Zellkulturen bis zum Einsatz am Patienten. Leider hat die Hypothermie neben dem gewünschten Effekt der Verzögerung von Alterprozessen auch schädigende Wirkungen. Ziel dieser Studie ist, mit Hilfe eines speziellen Hypothermiemediums Kulturen von primären humanen Hepatozyten während einer 24-stündigen hypothermen Lagerung vor hypothermieinduzierten Schäden zu schützen.

Methoden

Für diese Arbeit wurden primäre humane Hepatozytenkulturen von n=11 Spendern verwendet. Die Isolierung erfolgte mittels Kollagenaseperfusionstechnik aus nicht pathologischen Leberstücken von 10-60g, die im Rahmen von Leberteilresektionen von dem eigentlichen Resektat abgetrennt wurden. Nach einer 24-stündigen Kultur im Brutschrank mit Standardmedium wurden Proben genommen. Für die zweiten 24 Stunden wurden die Kulturen in vier Gruppen aufgeteilt. Zwei Gruppen blieben im Brutschrank, eine erhielt Standardmedium, die andere das Testmedium (HLC1). Die beiden restlichen Gruppen wurden bei 4°C inkubiert, wieder jeweils eine mit Standardmedium und eine mit HLC1. Nach dieser Zeitspanne erfolgte die zweite Probenentnahme. Am dritten Kulturtag wurden alle Gruppen wieder mit Standardmedium im Brutschrank inkubiert, um Schäden zu detektieren, die typischerweise während der Wiedererwärmung auftreten. Am Ende

dieses Tages erfolgte die letzte Probenentnahme. Es wurden für jeden Zeitpunkt und jede Versuchsgruppe unterschiedliche Parameter analysiert (Gesamtprotein, LDH, AST, Harnstoff, Albumin, Zellaktivität) und am Ende des Versuchs lichtmikroskopische Bilder der Zellkulturen angefertigt.

Ergebnisse

Nach der abschließenden Rekulturphase hat die ungeschützt in der Kälte inkubierte Gruppe das niedrigste Niveau der Syntheseparameter und eine hohe Aktivität von Enzymen im Kulturmedium, jeweils als Ausdruck einer massiven Schädigung der Kulturen. Die geschützten Kaltkulturen weisen höhere Enzymaktivitäten als die warme Standardkultur auf, in den Syntheseleistungen sind allerdings keine signifikanten Unterschiede sichtbar. Die im Warmen mit Hypothermiemedium inkubierten Zellen weisen massive Schäden und produzieren in der Rekulturphase signifikant weniger Albumin und Harnstoff als die kaltinkubierte Gruppe mit dem gleichen Medium. Die ungeschützte Kaltgruppe ist in ihrem gesamten Profil im Vergleich mit der geschützten Kaltgruppe als klar unterlegen anzusehen. Die geschützte Kaltgruppe kommt der Standardkultur aufgrund ihrer guten Synthesefunktionen recht nahe.

Diskussion

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, dass eine effektive Minderung der kälteinduzierten Schädigung in Kulturen von primären humanen Hepatozyten durch den Einsatz von HLC1 Medium im 24-Stunden-Modell möglich ist. Die geschützten Kulturen zeigen sich nach Kaltinkubation den ungeschützten deutlich überlegen, erreichen aber nicht ganz das Niveau der durchgehend warm inkubierten Zellkulturen. Die Versuchsdauer ist in diesem Modell noch zu kurz gewählt und müsste für eine effektive Nutzung des Verfahrens sicherlich verlängert werden. Es bieten sich aber sowohl im Versuchsaufbau als auch pharmakologisch noch zahlreiche Möglichkeiten und Maßnahmen zur Verbesserung des Kulturergebnisses an.

Literaturverzeichnis

- [1] Stange J, Mitzner SR, Risler, T et al. Molecular adsorbent recycling system (MARS): clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs*, 23(4):319–330, Apr 1999.
- [2] Rifai K, Ernst T, Kretschmer U et al. Prometheus—a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *J Hepatol*, 39(6):984–990, Dec 2003.
- [3] Sauer IM, Goetz M, Steffen I et al. In vitro comparison of the molecular adsorbent recirculation system (MARS) and single-pass albumin dialysis (SPAD). *Hepatology*, 39(5):1408–1414, May 2004.
- [4] Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA et al. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology*, 24(6):1446–1451, Dec 1996.
- [5] Millis JM, Cronin DC, Johnson R et al. Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation*, 74:1735–1746, Dec 2002.
- [6] Rozga J, Podesta L, LePage E et al. A bioartificial liver to treat severe acute liver failure. *Ann Surg*, 219(5):538–544, May 1994.
- [7] Demetriou AA, Brown RS, Busuttil RW et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg*, 239(5): 660–667, May 2004.
- [8] van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V et al. Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs*, 25(10):950–959, Oct 2002.
- [9] Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K et al. Clinical extracorporeal hybrid liver support—phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation*, 10(5):460–469, Sep 2003.
- [10] Irgang M, Sauer IM, Karlas A et al. Porcine endogenous retroviruses: No infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol*, 28(2): 141–154, Oct 2003.

- [11] Chamuleau RAFM, Deurholt T, Hoekstra R. Which are the right cells to be used in a bioartificial liver? *Metab Brain Dis*, 20(4):327–335, Dec 2005.
- [12] Cadenas E, Packer L. *Understanding the process of aging*. Decker, Marcel, New York, 1999.
- [13] Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci*, 854:118–127, Nov 1998.
- [14] Farmer KJ, Sohal RS. Effects of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp Gerontol*, 22(1):59–65, 1987.
- [15] Armitage KB, Blumstein DT, Woods BC. Energetics of hibernating yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 134(1):101–114, Jan 2003.
- [16] Hume D, Beiglbock C, Ruf T, Frey-Roos F, Bruns U, Arnold W. Seasonal changes in morphology and function of the gastrointestinal tract of free-living alpine marmots (*Marmota marmota*). *J Comp Physiol [B]*, 172(3):197–207, Apr 2002.
- [17] Barnes BM. Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. *Science*, 244(4912):1593–1595, Jun 1989.
- [18] Arnold W, Ruf T, Reimoser S, Tataruch F, Onderscheka K, Schober F. Nocturnal hypometabolism as an overwintering strategy of red deer (*Cervus elaphus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286(1):174–181, Jan 2004.
- [19] Idriss FS. Whole organ preservation for transplantation. *Surg Clin North Am*, 47(1):29–36, Feb 1967.
- [20] Manax WG, Block JH, Eyal Z, Lyons GW, Lillehei RC. Hypothermia and hyperbaria: simple method for whole organ preservation. *JAMA*, 192:755–759, May 1965.
- [21] Alam HB, Bowyer MW, Koustova E et al. Learning and memory is preserved after induced asanguineous hyperkalemic hypothermic arrest in a swine model of traumatic exsanguination. *Surgery*, 132(2):278–288, Aug 2002.
- [22] Sterz F, Holzer M, Roine R et al. Hypothermia after cardiac arrest: a treatment that works. *Curr Opin Crit Care*, 9(3):205–210, Jun 2003.
- [23] Behringer W, Safar P, Wu X et al. Survival without brain damage after clinical death of 60-120 mins in dogs using suspended animation by profound hypothermia. *Crit Care Med*, 31(5):1523–1531, May 2003.

- [24] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 13:29–83, 1976.
- [25] Miyazaki K, Takaki R, Nakayama F, Yamauchi S, Koga A, Todo S. Isolation and primary culture of adult human hepatocytes. Ultrastructural and functional studies. *Cell Tissue Res*, 218(1):13–21, 1981.
- [26] Dorko K, Freeswick PD, Bartoli F et al. A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation. *Cell Transplant*, 3(5):387–395, Sep 1994.
- [27] Koebe HG, Wick M, Cramer U, Lange V, Schildberg FW. Collagen gel immobilisation provides a suitable cell matrix for long term human hepatocyte cultures in hybrid reactors. *Int J Artif Organs*, 17(2):95–106, Feb 1994.
- [28] Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol*, 54(7):761–772, Oct 1997.
- [29] Katenz E, Vondran FWR, Schwartlander R et al. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver Transpl*, 13(1):38–45, Jan 2007.
- [30] Gizewski ER, Rauen U, Kirsch M, Reuters I, Diederichs H, Groot H. Rapid decrease in cellular sodium and chloride content during cold incubation of cultured liver endothelial cells and hepatocytes. *Biochem J*, 322 (Pt 3):693–699, Mar 1997.
- [31] Fuckert O, Rauen U, De Groot H. A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK1 cells. *Transplantation*, 70(5):723–730, Sep 2000.
- [32] Rauen U, de Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic Biol Med*, 24(7-8): 1316–1323, May 1998.
- [33] Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*, 13(1):155–168, Jan 1999.
- [34] Rauen U, Petrat F, Li T, De Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis—evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation. *FASEB J*, 14(13):1953–1964, Oct 2000.
- [35] Rauen U, de Groot H. Mammalian cell injury induced by hypothermia- the emerging role for reactive oxygen species. *Biol Chem*, 383(3-4):477–488, Mar 2002.

- [36] Peters SM, Rauen U, Tijssen MJ et al. Cold preservation of isolated rabbit proximal tubules induces radical-mediated cell injury. *Transplantation*, 65(5):625–632, Mar 1998.
- [37] Salahudeen AK, Huang H, Patel P, Jenkins JK. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation*, 70(10):1424–1431, Nov 2000.
- [38] Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JFM, Russel FGM, de Groot H, Rauen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology*, 47(1):82–91, Aug 2003.
- [39] Salahudeen A, Nawaz M, Poovala V et al. Cold storage induces time-dependent F2-isoprostane formation in renal tubular cells and rat kidneys. *Kidney Int*, 55(5): 1759–1762, May 1999.
- [40] Kerkweg U, Li T, de Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology*, 35 (3):560–567, Mar 2002.
- [41] Salahudeen AK, Joshi M, Jenkins JK. Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation*, 72(5):798–804, Sep 2001.
- [42] Salahudeen AK, Huang H, Joshi M, Moore NA, Jenkins JK. Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am J Transplant*, 3(3):273–280, Mar 2003.
- [43] Rauen U, Kerkweg U, Weisheit D, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic Biol Med*, 35(12):1664–1678, Dec 2003.
- [44] Kim JS, Southard JH. Alteration in cellular calcium and mitochondrial functions in the rat liver during cold preservation. *Transplantation*, 65(3):369–375, Feb 1998.
- [45] Umeshita K, Monden M, Fujimori T et al. Extracellular calcium protects cultured rat hepatocytes from injury caused by hypothermic preservation. *Cryobiology*, 25(2): 102–109, Apr 1988.
- [46] Vreugdenhil PK, Ametani MS, Haworth RA, Southard JH. Biphasic mechanism for hypothermic induced loss of protein synthesis in hepatocytes. *Transplantation*, 67 (11):1468–1473, Jun 1999.

- [47] Kim JS and Southard JH. Membrane stabilizing effects of calcium and taxol during the cold storage of isolated rat hepatocytes. *Transplantation*, 68(7):938–943, Oct 1999.
- [48] Vairetti M, Griffini P, Pietrocola G, Richelmi P, Freitas I. Cold-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione. *Free Radic Biol Med*, 31(8): 954–961, Oct 2001.
- [49] Vairetti M, Ferrigno A, Bertone R, Richelmi P, Berte F, Freitas I. Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1740(3):367–374, Jun 2005.
- [50] Kim JS, Southard JH. Phospholipid metabolism of hypothermically stored rat hepatocytes. *Hepatology*, 30(5):1232–1240, Nov 1999.
- [51] Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol*, 40(4):607–615, Apr 2004.
- [52] Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr*, 31(4):305–319, Aug 1999.
- [53] Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J*, 307 (Pt 1):99–106, Apr 1995.
- [54] Genesca M, Sola A, Azuara D, De Oca J, Hotter G. Apoptosis inhibition during preservation by fructose-1,6-diphosphate and theophylline in rat intestinal transplantation. *Crit Care Med*, 33(4):827–834, Apr 2005.
- [55] Stefanovich P, Ezzell RM, Sheehan SJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. *Cryobiology*, 32(4):389–403, Aug 1995.
- [56] El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin- α -mediated inhibition of hepatocyte necroapoptosis. *Hepatology*, 39(6):1553–1562, Jun 2004.
- [57] Poyck PPC, Hoekstra R, van Wijk ACWA et al. Mild hypothermic preservation for transport purposes of the AMC bioartificial liver charged with porcine hepatocytes. *Transplantation*, 80(9):1153–1160, Nov 2005.
- [58] Oeltgen PR, Walsh JW, Hamann SR, Randall DC, Spurrier WA, Myers RD. Hibernation trigger: opioid-like inhibitory action on brain function of the monkey. *Pharmacol Biochem Behav*, 17(6):1271–1274, Dec 1982.

- [59] Hong J, Sigg DC, Coles JA et al. Hibernation induction trigger reduces hypoxic damage of swine skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 32(2):200–207, Aug 2005.
- [60] Horton ND, Kaftani DJ, Bruce DS et al. Isolation and partial characterization of an opioid-like 88 kDa hibernation-related protein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 119(4):787–805, Apr 1998.
- [61] Govindaswami M, Brown SA, Yu J et al. Delta 2-specific opioid receptor agonist and hibernating woodchuck plasma fraction provide ischemic neuroprotection. *Acad Emerg Med*, 15(3):250–257, 2008.
- [62] Su DS, Wang ZH, Zheng YJ, Zhao YH, Wang XR. Dose-dependent neuroprotection of delta opioid peptide [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin in neuronal death and retarded behavior induced by forebrain ischemia in rats. *Neurosci Lett.*, 423(2):113–117, Aug 2007 .
- [63] Malatesta M, Biggiogera M, Baldelli B, Barabino SM, Martin TE, Zancanaro C. Hibernation as a far-reaching program for the modulation of RNA transcription. *Microsc Res Tech.*, 71(8):564–572, Aug 2008.
- [64] Inuo H, Eguchi S, Yanaga K et al. Protective effects of a hibernation-inducer on hepatocyte injury induced by hypothermic preservation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 14(5):509–513, 2007.
- [65] Chien S, Oeltgen PR, Diana JN, Shi X, Nilekani SP, Salley R. Two-day preservation of major organs with autoperfusion multiorgan preparation and hibernation induction trigger. A preliminary report. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 102(2):224–234, Aug 1991.
- [66] Mamprin ME, Vega F, Rodriguez JV. Adenosine 5'triphosphate transport and accumulation during the cold preservation of rat hepatocytes in University of Wisconsin solution. *World J Gastroenterol*, 11(13):1957–1964, Apr 2005.
- [67] Blackstone E, Morrison M, Roth MB. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, 308(5721):518, Apr 2005.
- [68] Compagnon P, Wang H-B, Southard JH, Mangino MJ. Ischemic preconditioning in a rodent hepatocyte model of liver hypothermic preservation injury. *Cryobiology*, 44(3):269–278, Jun 2002.

Danksagung

Die Anfertigung dieser Promotionsschrift wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr.med. Peter Neuhaus möchte ich für das Überlassen des Themas danken.

Dr.med. Igor Maximilian Sauer danke ich für seine engagierte Betreuung, sein offenes Ohr, seinen Humor und die Freiheiten, die er seinen Mitarbeitern stets einräumt.

Dr.rer.med. Gesine Pless danke ich für die tägliche Betreuung und die ungezählten Hilfen in Labor und Büro.

Dr.rer.med. Ruth Schwartländer bin ich für ihre kritische und fördernde Begleitung meiner Arbeit zu Dank verpflichtet.

PD Dr. Ursula Rauen danke ich für die bereitwillige thematische Unterstützung.

Das BMBF und die universitäre Forschungsförderung der Charite haben dieses Projekt dankenswerter Weise finanziell gefördert.

Herrn PD Dr.Dr. Hopfenmüller bin ich für seine guten Ratschläge, die statistische Auswertung der Ergebnisse betreffend, sehr verbunden.

Für die Hilfe beim Erlernen der Zellisolierungstechnik schulde ich auch Herrn Dr.med. Xiangdong Cheng (Hangzou, China) großen Dank.

Meinen Eltern Hiltrud und Mathias Modest danke ich für die lebenslange Unterstützung und Hilfe. Meinen beiden Schwester Mareike und Cordula danke ich für ihren geschwisterlichen Beistand.

Meiner verstorbenen Großmutter Dr.med. Reingard Crüsemann verdanke ich Zuspruch bei der Entscheidung für meinen medizinischen Werdegang.

Joachim Büchner, Alexander Schwartz, Iliane Deckert, Antonios Douros und Matthias Fröhde danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Heike Irene Meyer danke ich für ihre kompetente Unterstützung bei der Erstellung dieses Dokuments, ihre Geduld und Zuneigung.

Lebenslauf von Dominik Modest

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Dominik Paul Modest, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Schutz vor hypothermer Schädigung in Kulturen von primären humanen Hepatozyten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.“

30.09.2008