Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. A. Baethmann

IN-VITRO KULTIVIERUNG VON PORCINEN LEBERSCHNITTEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
René Borscheid
aus Bobingen
2004

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜCHEN

Berichterstatter:	Prof.Dr.med.Dr.med.vet. C. Hammer
Mitberichterstatter:	Priv.Doz.Dr.med. D. Rapaport
	Prof.Dr.med. M. Gratzl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr.med.vet. E. Thein
Dekan:	Prof.Dr.med.Dr.h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	28.10.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1.Einleitung 5

1.1.Überblick 5

1.2.Stand der Xenotransplantation 6

1.3.Leber und Xenotransplantation 9

1.4.Kultivierung von Lebergewebe 11

1.5.Minuth-System 13

2.Methodik 16

2.1.Versuchsbeschreibung 16

2.2.Versuchstiere 17

2.3.Explantation 18

2.4.Gewebepräparation 21

2.5.Perfusionskultur 23

2.6.Perfusionsmedium 27

2.7.Blutgasanalyse 28

2.8.LDH-Messung 28

2.9.AST-Messung 29

2.10.ALT-Messung 30

2.11.Cholinesterase-Messung 31

2.12.Harnstoff-Messung 32

2.13.Protein ELISA 32

2.14.Histologie 33

2.15.Statistik 33

3.Ergebnisse 34

3.1.Kammerparameter 34

3.1.1.pH-Werte 34

3.1.2. O_2-/CO_2-Partialdrücke 35

3.1.3.Lactat 36

3.2.Perfusat 37

3.2.1.LDH 37

3.2.2 AST 38
3.2.3.ALT 38
3.2.4.de Ritis-Quotienten 39
3.2.5.ChE 40
3.2.6.Protein 40
3.2.7.Harnstoff 41

3.3.Histologie 42
3.3.1.Explantation 42
3.3.2.Perfusion 24 Stunden 43
3.3.3.Perfusion 48 Stunden 44
3.3.4.Perfusion 72 Stunden 45

4.Diskussion 46
4.1.Gewebepräparation und Schnittdicke 46
4.2.Sauerstoffbedarf und –versorgung 48
4.3.Ischämie-Reperfusionsschaden 49
4.4.Enzymaktivitäten und Zellschädigung 52
4.5.Proteinstoffwechsel 53
4.6.pH-Veränderungen 55
4.7.Zusammenfassung und Schlussfolgerung 56

Literaturverzeichnis 58
Abkürzungsverzeichnis 64
Abbildungsverzeichnis 66
Danksagung/Widmung 67
Abstract 68
Lebenslauf 69

1. Einleitung

1.1.Überblick

Seit langer Zeit beschäftigt sich die Menschheit mit Phänomenen wie Altern, Krankheit und Tod. Schon früh erhob sich die Frage, wie der menschliche Körper funktioniert. Ist der Mensch mehr als die Summe seiner Einzelteile, kann Leiden beeinflusst oder das Leben verlängert werden? Vielfältig waren Erklärungen und Lösungsvorschläge für diese Probleme. Ägyptische Priester der Pharaonen-Dynastien mumifizierten die Leichname bedeutender Personen, um den Körper für die Reise in das Jenseits vorzubereiten. Die Organe wurden in den Kanopen für die letzte Reise konserviert. Diese gesegneten Tongefässe enthielten die „Essenz" des Verstorbenen und wurden dem Grab beigegeben, sie würden im neuen Leben schließlich gebraucht werden.

Heute hat die moderne Medizin viele dieser Menschheitsträume in greifbare Nähe gerückt. Die Transplantationsmedizin tauscht kranke gegen gesunde Organe aus, Dialysegeräte können die Funktion einer Niere übernehmen, das gebrochene Hüftgelenk wird durch eine Metallprothese ersetzt. Technologischer Fortschritt ermöglicht Wissenschaftlern und Ärzten der Natur, bis in den molekularen Bereich hinein, ihre Rätsel zu entlocken. Das Verständnis von Krankheit und Normalfunktion, als Basis für Diagnostik und Therapie, kann anhand kontrollierter Experimente an standardisierten Modellen vertieft werden. Das einzelne Organ, die einzelne Zelle kann mittlerweile isoliert betrachtet und studiert werden. Diese Vorgehensweise muss sich die Kritik einer Simplifizierung gefallen lassen. Aus dem physiologischen Gefüge herausgenommen liefern diese Versuche unter Umständen ein verzerrtes Bild der Wirklichkeit. Andererseits ist ein rein deskriptiv-deduktiver Ansatz angesichts der Komplexität biologischer Organismen sicher mit ähnlichen Schwierigkeiten behaftet: wie beeinflusst das Detail das Gesamtbild, was ist Ursache, was ist Wirkung? Neuere Modelle versuchen beide Ansätze zu vereinigen: das isolierte Organ oder die Zelle stehen nach wie vor im Mittelpunkt des Interesses, allerdings wird das Versuchsmilieu so weit als möglich der Physiologie nachgestaltet. Einzelne Mechanismen können so beleuchtet werden, ohne dass der Versuchsaufbau die natürliche Funktion der Biologie stört.

Die Arbeitsgruppe Xenotransplantation des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU in München untersucht die Möglichkeit, ob unter entsprechenden Vorraussetzungen Tierorgane zur Transplantation beim Menschen verwendet werden können. Neben Fragen der Immunreaktion, der OP-Technik und der Übertragung von Krankheitserregern, stellt die physiologische Kompatibilität ein wesentliches Problem dar. Kann ein Tierorgan im Menschen überhaupt ordnungsgemäß funktionieren? Die Leber, als biochemische Schaltstelle des Organismus, stellt hier ein besonderes Problem dar. Können die vielfältigen Moleküle, die von der Leber gebildet werden einfach durch einen Satz tierischer ersetzt werden? Können diese tierischen Stoffe menschliche Zellen ernähren, mit ihnen kommunizieren, sie in ihren Aufgaben unterstützen? Diese Fragen, mit denen der Sinn und Zweck der Xenotransplantation steht und fällt, sind bis zum heutigen Tag größtenteils unbeantwortet. Die systematische Untersuchung dieser Fragestellung stellt einen wesentlichen Schwerpunkt der Arbeitsgruppe Xenotransplantation dar. Zur Durchführung dieser Studien habe ich im Rahmen meiner Dissertation versucht, ein bereits etabliertes Versuchsmodell für in-vitro Perfusion von diversen Zellenarten und Geweben auf die Kultivierung von Lebergewebe zu übertragen. Unter standardisierten Bedingungen, so nahe an der physiologischen Situation wie möglich, sollten dann Experimente zur physiologischen Kompatibilität bei Xenotransplantation folgen.

1.2. Stand der Xenotransplantation

Mit den enormen Fortschritten der Chirurgie im 19. und 20.Jahrhundert rückte die Organtransplantation in den Bereich des Möglichen. Nach Entwicklung der Technik der Gefäßanastomose durch Alexis Carrel 1904 [Hammer C, 1998] folgten schon bald die ersten Tierexperimente zur Transplantation von Organen. Als mögliche klinische Therapie war die Xenotransplantation, als Transplantation von tierischen Organen in den menschlichen Körper, eine hoffnungsvolle Option. Zum einen waren wohl die ethischen Bedenken zu Beginn der Transplantationsmedizin zu hoch, um menschliche Spender in Erwägung zu ziehen, zum anderen

fehlten die intensivmedizinischen Möglichkeiten und die Logistik, um die Organe potentieller Spender lange genug bis zur Operation vital zu erhalten. So schien das Tierorgan sehr praktikabel und auch kostengünstig. Forschungen zur Xenotransplantation, wie zur Allotransplantation wurden mit gleichem Aufwand und gleicher Berechtigung nebeneinander betrieben. Neben den verwandten Primaten, rückte hier das Schwein, als Tier mit einer dem Menschen ähnlichen Physiologie, in den Fokus der Wissenschaft. Aus der reichhaltigen Erfahrung mit dem Haustier Schwein, bezüglich Aufzucht und Haltung, schien sich hier eine ernsthafte Option für einen raschen klinischen Einsatz aufzutun. Erst die Entwicklung der Immunologie und Molekularbiologie förderten Erkenntnisse zu Tage, welche ein anderes Licht auf die Xenotransplantation warfen. Jede neue Information führt zu einer Vielzahl von neuen Fragen und zum heutigen Zeitpunkt scheint die Xenotransplantation immer weiter in die Ferne zu rücken. Zunächst waren es vorrangig immunologische Fragestellungen, die einen klinischen Einsatz von Tierorganen unmöglich machten. Anders als bei der Allotransplantation von menschlichen Geweben, gibt es bei der Xenotransplantation eine Vielzahl von immunologischen Reaktionen, die bei der Situation menschlicher Spender – menschlicher Empfänger keine Rolle spielen. Kann die Immunkompatibilität bei Allotransplantation schon ein schwieriges Problem sein, bei der Xenotransplantation stellt sie ein beinahe unüberwindliches Hindernis dar. Insbesondere die so genannte hyperakute Abstoßungsreaktion gegen Schweineorgane, durch präformierte xenoreaktive Antikörper vermittelt, führt innerhalb von Minuten zum Transplantatversagen und Gewebetod. Diese Antikörper richten sich gegen α-Glycosylreste an den Oberflächen der porcinen Zellen. [Candinas et al, 1999]. Erst die jüngeren Fortschritte im Bereich der Klonierung von genetisch veränderten Tieren scheinen hier eine Lösung aufzuzeigen: Schweine mit transgener Expression von hDAF, einem humanen Regulationsprotein der Komplementkaskade, welches in das porcine Genom eingeführt wurde und auf den Zelloberflächen exprimiert wird, zeigen im Experiment Schweineorgan – Perfusion mit Humanblut/Transplantation in humanverwandte Primatenspezies eine geringe bis keine hyperakute Abstoßung. Das artfremde humane Protein im porcinen Organ

scheint hier wirkungsvoll die hyperakute Abstoßung zu verhindern [Pöhlein et al., 1996; Cozzi et al, 2000; Ramirez et al, 2000]. Die weiteren immunologischen Probleme im Sinne der verzögerten und späten Abstoßungsreaktion, die im wesentlichen den Mechanismen bei der Allotransplantation entsprechen, könnten mit Hilfe der etablierten klinischen Strategien der Transplantationsmedizin durchaus einfacher zu lösen sein. Ist die klinische Xenotransplantation damit in greifbare Nähe gerückt? Mit Sicherheit nein, denn außer der immunologischen Problematik stehen zwei weitere Hindernisse einem unmittelbaren Einsatz von Tierorganen in der klinischen Praxis im Wege: infektiologische und physiologische Fragestellungen. Von Seiten der Infektiologie scheint die Transplantation von xenogenen Organen zumindest mit einem potentiellen Infektionsrisiko behaftet zu sein: im Rahmen der Genomforschung rückten in den letzten Jahren zunehmend so genannte endogene Retroviren ERV in den Focus der Xenotransplantation. Diese Retroviren haben sich im Verlauf der Evolution in die DNA der verschiedenen Spezies eingeschleust, liegen dort in inaktiver Form vor und werden an die jeweiligen Nachkommen weitervererbt. Unter physiologischen Bedingungen stellen diese „schlummernden Viren" keine Gefahr dar, sie sind praktisch seit Jahrmillionen Bestandteil des menschlichen Genoms. Kritisch ist allerdings die Frage zu stellen, wie sich solche normalerweise inaktiven Viren in einer xenogenen Transplantationssituation verhalten. Retroviren können unter bestimmten Bedingungen aktiviert werden und dann zu viralen Infektionen oder auch onkogener Entartung führen. Bei Xenotransplantation muss hier zunächst von einer möglichen Gefährdung des humanen Empfängers durch so genannte PERV (porcine endogene Retroviren) ausgegangen werden [Stoye et al, 1998]. Sollten sich die immunologischen, wie infektiologischen Probleme lösen lassen, stellt sich immer noch die Frage nach der physiologischen Kompatibilität von Mensch und xenogenem Transplantat. Kann ein Tierorgan überhaupt die physiologische Funktion eines humanen Organs ersetzen? 1992 transplantierte Starzl [Starzl et al, 1993] einem Patienten mit terminalem Leberversagen eine Pavianleber. Der Patient stabilisierte sich zunächst, verstarb dann allerdings nach 70 Tagen an septisch-hämorrhagischen Komplikationen. Bei der Aufarbeitung des Falles

zeigte sich, dass die Physiologie des Patienten völlig verändert war: Plasmaproteingehalt, Gerinnungsfaktoren, Lipidprofil näherten sich zunehmend der physiologischen Situation des Pavians an. Ob dies die unmittelbare Todesursache war, oder ob andere Faktoren, wie die postoperative Immunsuppression oder der HIV-Statuts des Patienten den Tod zur Folge hatte, bleibt letztlich ungeklärt. Um die Frage nach physiologischer Kompatibilität bei Xenotransplantation zu beantworten ist sicherlich eine differenzierte Vorgehensweise angebracht. Es ist durchaus denkbar, dass bestimmte Organe, die im Organismus nur eine begrenzte Anzahl von Funktionen übernehmen, der Xenotransplantation zugänglich sind. Grob vereinfachend könnte man behaupten, dass ein tierisches Herz, als banale Pumpe, sowie eine tierische Niere, als simpler Filter, im menschlichen Organismus unter annähernd physiologischen Bedingungen funktionieren könnten. Man bedenke dabei, dass sich die Funktionen dieser beiden Organe in begrenztem zeitlichen Rahmen heute auch schon maschinell ersetzen lassen. Zudem haben einzelne klinische Nieren-Xenotransplantationen durch Reemtsma in den 60er Jahren des 20.Jahrhunderts wenigen Patienten zumindest kurzfristig das Überleben gesichert. Neuere Transplantationsstudien an Primaten lassen zumindest für die Nieren-Xenotransplantation Hoffnung aufkeimen [Cozzi et al, 2000]. Anders stellt sich die Situation hingegen bei einem weitaus komplexeren Organ, wie der Leber, dar. Hier scheinen zu viele Unterschiede in der Physiologie der einzelnen Spezies zu bestehen, als dass ein Gelingen der Leber-Xenotransplantation in naher Zukunft denkbar wäre. Festzuhalten gilt allerdings, dass über das Problem der physiologischen Kompatibilität bei Xenotransplantation bis jetzt nur vergleichsweise wenig Untersuchungen erfolgt sind und die Frage zum heutigen Zeitpunkt nur mit einem gewissen Maß an Spekulation beantwortet werden kann.

1.3. Leber und Xenotransplantation

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels im Organismus. Der Hepatozyt verfügt über einen Satz von annähernd 2500 verschiedenen Enzymen, von denen viele lebenswichtige Vorgänge abhängen, wie die Synthese von Plasmaproteinen, Gerinnungsfaktoren, Immunmodulatoren, die

aerobe und anaerobe Glykolyse, die β-Oxidation von Fettsäuren, sowie die Biotransformation und Ausscheidung von Metaboliten, um nur einige Beispiele zu nennen.

Angesichts der Komplexität dieses Organs erscheint es nicht verwunderlich, dass es bis heute nicht gelungen ist, die Funktion der Leber maschinell zu ersetzen, wie dies bei der kranken Niere z.B. mit Hilfe der Hämodialyse über Jahre hinweg möglich ist. Es wird zwar intensiv der Einsatz von „künstlichen" Lebern an Tiermodellen erforscht und diese vereinzelt auch schon im klinischen Alltag, etwa bei der Therapie des Leberausfallkomas, erprobt. Bei diesen Bioreaktoren welche mit porcinen Hepatozyten befüllt werden [Takahashi et al, 1992; Yanagi et al, 1989], steht allerdings die mangelhafte Entgiftungsfunktion des kranken Organs im Mittelpunkt. Den Ersatz der vollen physiologischen Funktion der Leber kann dieses System natürlich nicht leisten. Hier stellt einzig und allein die allogene Lebertransplantation eine Option dar. Angesichts des enormen Mangels an Spenderorganen erscheint die Leber-Xenotransplantation als möglicher Ausweg. Aber darf man angesichts der Komplexität dieses Organs, den vielen feinregulierten Stoffwechselmechanismen, von einer Kompatibilität Tier – Mensch ausgehen?

Die Xenotransplantation unterscheidet in ihren Modellen sog. konkordante und diskordante Spezies: zueinander konkordante Spezies weisen einen höheren evolutionären Verwandtheitsgrad auf, als zueinander diskordante [Hammer C, 1994]. Aus diesem Verwandtschaftsverhältnis zeigen sich oft erhebliche Ähnlichkeiten in der Physiologie der einzelnen Spezies, die dazu verleiten mögen von einer Kompatibilität zweier Spezies auszugehen. In vielen Fällen trifft dies auch zu, wenn man als Beispiel das Insulin des Schweins, einer dem Menschen diskordanteren Spezies im Vergleich zu den näher verwandten Primaten, heranzieht. Seit Jahren wird es erfolgreich in der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt. Das Molekül unterscheidet sich in nur wenigen Aminosäuren von der Sequenz des humanen Insulins und kann selbst als artfremdes Protein seine spezifische Aufgabe im menschlichen Organismus erfüllen. Aber zwischen der Substitution eines Moleküls und der eines ganzen Organs liegen Welten.

Auch wenn es viele Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Primaten, bzw. Schweinen gibt, können mindestens ebenso viele Unterschiede bestehen, welche die Xenotransplantation verhindern. Es wurde bereits angedeutet, dass die physiologischen Anforderungen an eine transplantierte Niere oder ein transplantiertes Herz bedeutend geringer sind, als an die Leber. Zum heutigen Zeitpunkt kann aufgrund der wenigen Untersuchungen nicht gesagt werden, ob eine xenogene Leber die fehlende Organfunktion im Menschen ersetzen kann. Dafür müssen auch andere Maßstäbe definiert werden, als bei der Untersuchung von Nieren- und Herz-Xenotransplantation gelten: die Funktion einer Niere kann sehr wohl mit physikalischen Fakten, wie Filtrationsdruck, Elektrolytkonzentrationen im Harn oder Harnmenge gemessen werden. Um die Leber zu beurteilen, bedarf es ungleich detailierterer biochemischer Analysen, wie z.B. die Untersuchung von Liganden-Rezeptor-Interaktionen bei der Aufnahme von Lipiden in die Zellen oder der Regulationsmechanismen der Albuminsynthese. Da nur wenige Studien sich bis jetzt mit den metabolischen Eigenschaften von nicht-humanen Hepatozyten [Donato et al, 1999] oder dem Interspezies-Vergleich von Leberphysiologie [Kobayashi et al, 1998; Munitiz et al, 1999; Adham et al, 1997] beschäftigt haben, schien es uns sinnvoll, zunächst ein Modell zur Untersuchung von Leberphysiologie zu etablieren und dann systematisch die wichtigen Aspekte der Xenotransplantation zu untersuchen. Am ehesten geeignet hielten wir hierfür den Einsatz von frischen Leberschnitten, die zum einen die dreidimensionale Struktur des Gewebes erhalten und damit die physiologischen Gegebenheiten im Organ widerspiegeln, und zum anderen einer Vielzahl von Untersuchungstechniken zugänglich sind.

1.4. Kultivierung von Lebergewebe

Erste in-vitro Versuche mit Gewebeschnitten wurden bereits 1923 von Otto Warburg durchgeführt und leisteten einen bedeutenden Beitrag zur Erforschung der Abläufe des intermediären Stoffwechsels. Allerdings limitierten die begrenzten Möglichkeiten der Schnitttechnik über lange Jahre einen breiten Einsatz von Lebergewebeschnitten: es gab schlichtweg keine Methode um

reproduzierbar einheitliche Gewebeschnitte herzustellen [Parrish et al, 1995; Olinga et al, 1997]. Die Schnittdicke, die ein limitierender Faktor für die Sauerstoffversorgung der Zellen darstellt, hing von der Erfahrung des Laboranten ab und führte durch die ungenauen manuellen Schnitttechniken zu rascher Zellnekrose [Campbell et al, 1971; Smith et al, 1985]. In der Folge verlagerte sich die Forschung an Leberzellen weitgehend auf isolierte Hepatozyten, die das Problem der kritischen Sauerstoffversorgung umgehen, aber wesentlich rascher ihre metabolischen Eigenschaften, insbesondere der Aktivität der an der Biotransformation beteiligten Enzyme, verlieren. Hier gilt auch zu bedenken, dass der Metabolismus in der Leber von einer Heterogenität der Hepatozyten abhängig ist: die dreidimensionale Anordnung im Gewebe führt zu einer zonalen Spezialisierung der Zellen. Aus den komplexen Zellinteraktionen herausgelöst, kann der isolierte Hepatozyt viele seiner Funktionen nicht mehr wahrnehmen [Smith et al, 1985]. In den achtziger Jahren des vorigen Jahrhunderts gelang es dann erstmals mit Hilfe spezialisierter Schneideapparaturen Gewebeschnitte von einheitlicher Qualität und definierter Schichtdicke zu erzeugen. Seither erfreut sich die Forschung an frischen Leberschnitten wachsender Beliebtheit, umgeht sie doch die vielfältigen Nachteile der Kultur mit isolierten Hepatozyten. Insbesondere im Bereich des Pharmakometabolismus, der Hepatotoxizität, sowie der Hepatokarzinogenese haben Leberschnitte heute einen festen Stellenwert in der aktuellen Forschung [Parrish et al, 1995]. Auch wenn durch die feinere Schichtdicke des Lebergewebes die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Metaboliten verbessert wird, erfordert die Kultur von Leberschnitten einen hohen technischen Aufwand, um ein längerfristiges Überleben und Funktionieren der Hepatozyten zu gewährleisten. Hier haben sich mehrere Lösungsansätze herausgebildet, die sich im wesentlichen in zwei Gruppen einteilen lassen: zum einen sog. submerge-Kulturen, in denen das Lebergewebe vollständig von Nährmedium umspült wird, und zum anderen dynamic-organ-Kulturen, in denen das Gewebe intermittierend dem Nährmedium und dem verwendeten Gasgemisch ausgesetzt ist [Olinga et al, 1997]. In der Bewertung dieser Kultursysteme ist die Literatur jedoch widersprüchlich: wird einerseits eine bessere Sauerstoffversorgung durch den phasenweisen Kontakt des Gewebes mit

dem Gasgemisch in den dynamic-organ Kulturen postuliert [Smith et al, 1985], so scheint dieses System durch Ablösung der Gewebeschnitte von der Unterlage, mit nachfolgender Faltung des Gewebes, sowie mechanischer Traumatisierung durch das Umwälzsystem, insgesamt mit schlechteren Resultaten hinsichtlich der Gewebeviabilität aufzuwarten [Hashemi et al, 1999; Olinga et al, 1997]. Die Beurteilung der Leberschnitte erfolgt unter anderem anhand folgender Parameter: histologisches Erscheinungsbild, Enzym-leaking, insbesondere von LDH und anderen in der Leber vorkommenden Enzymen, wie AST/GOT und ALT/GPT, ATP-Gehalt und Enzymaktivität der Phase I und II der hepatischen Biotransformation.

1.5. Minuth-System

Die in-vitro Forschung an Zellen und Geweben hat eine weite Verbreitung gefunden. Erstaunlicherweise hat sich die Technik der Zellkultur im letzten Jahrhundert nur unwesentlich weiterentwickelt. Nach wie vor zählen Petrischale und Pipette zur Grundausrüstung eines jeden mit Zellkultivierung beschäftigten Labors. So etabliert und einfach diese Methoden sein mögen, sie sind mit einigen erheblichen Nachteilen behaftet. Zum einen findet die Ansiedlung der zu kultivierenden Zellarten als Monolayer statt, welches zwar praktikabel für die mikroskopische Untersuchung ist, aber mit dem Prozess der Zelldedifferenzierung erkauft wird. Eine entdifferenzierte Zelle verhält sich unter Umständen nicht wie die gleiche Zellart im physiologischen Milieu, die gewonnene Information aus dem Experiment ist eventuell ungenau, wenn nicht unbrauchbar. Zum anderen führt der ständig nötige manuelle Austausch von Nährmedium zu erheblichen Fluktuationen im Kulturmilieu, Nährstoffe, Metaboliten, pH und Gaspartialdrücke schwanken zum Teil beträchtlich. Diese Schwankungen verfälschen zu nicht unerheblichem Teil die Physiologie der Zelle. Nicht zu vernachlässigen ist hier natürlich auch die Gefahr einer mikrobiologischen Kontamination. Erst langsam macht sich die Erkenntnis breit, dass valide Zellforschung mit anderem Instrumentarium erfolgen muss. Insbesondere die in-vitro Simulation von Geweben, die im Rahmen der Forschung um tissue-engineering und Transplantation eine immer bedeutendere Rolle einnimmt, erfordert hier

neue Strategien. Ein Ansatz ist die dreidimensionale Zellkultur, in der nahe an der physiologischen Situation im Organismus, Zellen in gewebeähnlichem Verband untersucht werden können. Zellen werden hierbei in einer ihrem natürlichen Umfeld nachstrukturierten Matrix eingebracht und so der ungewollte Entdifferenzierungsprozess vermieden. Die extrazelluläre Matrix hat zudem bedeutende Aufgaben in der Entwicklung und Reifung von Zellen, sie reguliert und potenziert die Auswirkungen von Hormonen und Wachstumsfaktoren und hält die Bedingung für die Zelle konstant. Selbstverständlich ist diese Art von Zellkultur ein weitaus komplexerer Vorgang als die herkömmliche Monolayerkultur und mit deren Methoden nicht durchführbar. Die Zelldichte in Geweben oder dreidimensionalen Kulturen ist erheblich höher, die Anforderungen an Nähr- und Sauerstoffversorgung, sowie den Abtransport von potentiell schädigenden Metaboliten sind hierbei wesentliche Faktoren.

Minuth hat ein neues System für eine Perfusionskultur von Zellen und Geweben entwickelt, die den hohen Anforderungen der neueren Zellforschung gerecht werden. Das Minuth-System kann sowohl für Monolayer- wie 3D-Zellkulturen [Kloth et al, 1998; Sittinger et al, 1997] verwendet werden und bietet gegenüber den etablierten Labormethoden folgende Vorteile: die zu untersuchenden Zellen werden auf einem Trägermedium in eine abgeschlossene Kammer eingebracht, die unter Raumluft oder im Inkubator betrieben werden kann. Die Kammer wird über eine Rollerpumpe mit einer konstanten Flussrate mit frischem Zellmedium gespült, verbrauchtes Nährmedium und potentiell schädigende Metaboliten werden kontinuierlich abtransportiert. Dies gewährleistet zum einen konstante Versuchsbedingungen über einen langen Zeitraum. Die für den Erfolg der Zellkultur essentiellen Parameter, wie Nährstoffkonzentration, pH oder Gaspartialdrücke unterliegen nur minimalen Schwankungen. Zum anderen ist die Gefahr einer mikrobiellen Kontamination durch wiederholte Manipulation an der Kultur deutlich reduziert. Sondermodelle der Minuth-Kammer ermöglichen zusätzlich die getrennte Perfusion von unterschiedlichen Zelloberflächen, wie sie z.B. bei der Untersuchung der embryonalen Differenzierung von renalen Sammelrohrzellen entscheidend ist [Minuth et al, 1998; Minuth et al,

1999]. Hierbei konnte die Auswirkung der unterschiedlichen apikalen und basalen Elektrolytkonzentration im Harn bzw. Serum auf die Ausreifung der Sammelrohrzellen differenziert untersucht werden. Eine weitere interessante Anwendung des Systems erfolgte in der Kultur von Chondrozyten in dreidimensionalen Matrizes. Sittinger konnte zeigen, dass im Vergleich zu den herkömmlichen Zellkulturtechniken für Chondrozyten, das Minuth-System über einen Zeitraum von bis zu 40 Tagen hinsichtlich Konstanz von pH und Glucoseangebot deutlich weniger Fluktuationen aufwies und die Chondrozyten einen hohen Grad an Differenzierung konservierten [Sittinger et al, 1997]. Die vielen Vorteile dieses Systems in der Kultur von Zellen und Geweben veranlassten uns, in der Arbeitsgruppe Xenotransplantation, die Minuth-Kammer, im Gegensatz zu den bereits in der Literatur beschriebenen Methoden [Olinga et al, 1997], für die Langzeitkultur von porcinen Leberschnitten zu verwenden. Leider gilt es festzuhalten, dass uns trotz intensiver Bemühungen eine Kultivierung von frischem Lebergewebe im Minuth-System nicht gelang.

2.Methodik

2.1. Versuchsbeschreibung

Frisch explantierte Schweineleber wird in Scheiben geschnitten und in ein Perfusionskultursystem der Marke Minucells (Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) eingebracht. Die Perfusionskammern werden 24, 48 oder 72 Stunden betrieben. Jeweils zu Beginn und Ende eines Versuchs werden Gewebeproben asserviert und nach Aufbereitung histologisch untersucht. Wegen der Gefahr einer mikrobiellen Kontamination, sowie um eine Vergleichbarkeit der gemessenen Enzymaktivitäten zu gewährleisten, kann während des Versuchs die Kammer nicht geöffnet und Gewebe entnommen werden. Aus diesem Grund werden die Gewebeschnitte in drei Gruppen mit den oben angegebenen Perfusionszeiten untersucht. Bei Versuchsende wird der Inhalt einer Kammer komplett zur weiteren Untersuchung entnommen.

Im Verlauf des Experiments werden mit einer 1ml-Spritze (Becton Dickinson, Le Port de Claix, Frankreich) Proben des Nährmediums aus der Kammer gesaugt und mittels eines Blutgas-Analysegerätes (Modell 860, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) auf pH, pO_2, pCO_2 und Lactat untersucht. Aus der Kammer abgeflossenes Perfusat wird in 14ml-Kunststoffröhrchen (Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland) aufgefangen und für weitere Untersuchungen asserviert. In den Proben werden die Enzymaktivitäten für LDH, AST, ALT, sowie die Mengen an Gesamtprotein und Harnstoff gemessen. Proben aus der Kammer bzw. im Auffangbehälter werden gleichzeitig zu definierten Zeitpunkten entnommen (Ausnahme t = 0 Stunden: nur Kammerprobe): 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 und 72 Stunden (Abb.1). Proben aus der Kammer werden sofort gemessen, Sammelperfusat wird bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert.

Die Hauptversuche werden mit den oben beschriebenen Gruppen zu 24, 48 und 72 Stunden, mit jeweils 8 Sätzen an Leberschnitten à 6 Stück (n = 8), durchgeführt. Als Erkenntnis aus den Vorversuchen wird diese Versuchsreihe unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Einbringung des Minuth-Systems in einen Inkubator mit 5% O_2-, 5% CO_2- und 90% N_2-Atmosphäre.

Die Vorversuche, mit jeweils 2 bis 3 Sätzen an Gewebeschnitten, liefen mit Perfusionszeiten zwischen 12 und 168 Stunden. Diese Experimente wurden unter Raumluft oder mit CO_2 Anreicherung (21% O_2, 5% CO_2 und 74% N_2), sowie Zusatz von gereinigtem Schweineserum in verschiedenen Konzentrationen zum Nährmedium durchgeführt. Hier erfolgten auch molekularbiologische Untersuchungen zur Expression der mRNA von Albumin, Cytochrom P450 und β-Actin (Ergebnisse nicht dargestellt).

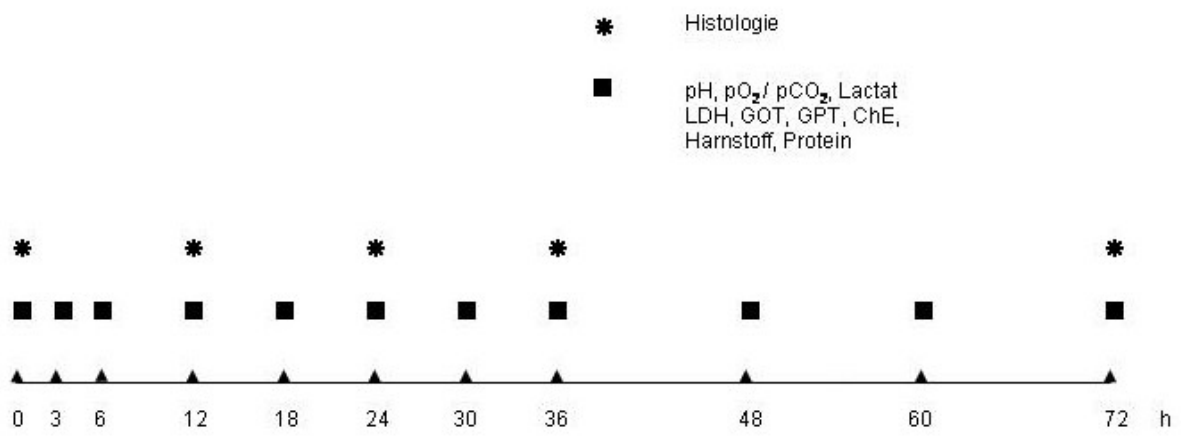

Abb.1: Zeitablauf der Perfusionsexperimente; angegeben sind die Messzeitpunkte in Stunden nach Perfusionsbeginn, sowie die jeweils durchgeführten Untersuchungen (✱ für Histologie und ■ für Enzym-, Harnstoff-, Protein- und Blutgasmessungen)

2.2. Versuchstiere

Männliche und weibliche Landrasse Schweine (Versuchstiergut Oberschleißheim, Oberschleißheim, Deutschland) mit Körpergewichten zwischen 9,5 und 22,5 kg werden für unsere Versuche verwendet. Die Tiere werden etwa zwei Tage vor Versuchsbeginn an das Institut für Chirurgische Forschung transportiert und dort nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 26. Februar 1993, insbesondere der § 1, § 2, § 4 Absatz 1, § 5 Absatz 1, § 6 Absatz 1 Nr.2 und Nr.4, §§ 7-9, § 11 Absatz 1 Nr.1, Absatz 2-4, § 11a Absatz 1 und 3, gehalten. Die Versuchsreihe wurde von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen Hammer 3/27-2000 genehmigt.

2.3. Explantation

Die Narkoseeinleitung erfolgt am Tag der Operation durch intramuskuläre Injektion von Azaperon (Stresnil, Jansen Cilag, Neuss, Deutschland) Dosis 20 mg/kg KG, Ketamin (Hersteller) Dosis 20 mg/kg KG, Midazolam (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) Dosis 1,5 mg/kg KG sowie Atropin (Braun, Melsungen, Deutschland) Dosis 0,1 mg/kg KG retroaurikulär in die Halsmuskulatur. Nach Wirkungseintritt werden die Tiere gewogen und unter Beatmungs- und Intubationsbereitschaft in den Operationssaal transportiert. Über eine Ohrvene wird ein peripher-venöser Zugang von 20G - 18G gelegt (Vasculon Plus, Ohmeda, Helsingborg, Schweden). Die Tiere werden mit Fentanyl (Jansen Cilag, Neuss, Deutschland) Dosis 1 mg/kg KG und Midazolam (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) Dosis 0,25 mg/kg KG intravenös über einen Perfusor (Modell Pefusor IV, Braun, Melsungen, Deutschland) narkotisiert, mit Pancuronium (Curamed, Karlsruhe, Deutschland) 0,4 mg/kg KG relaxiert, anschließend endotracheal intubiert und mit 20 ml/kg KG Atemminutenvolumen beatmet (Sirecust 304 D, Siemens, Erlangen, Deuschland). Die verwendete FiO_2 beträgt zwischen 50% und 100%. Die Tiere werden auf dem Rücken gelagert und über die Extremitäten Vier-Punkt-fixiert. Nach der Hautdesinfektion des Abdomens und des Halses mit Iodlösung (Kodan, Schülke+Mayr, Norderstedt, Deutschland) erfolgt die sterile Abdeckung. Um einen stabilen zentral-venösen Zugang zu erhalten wird nun zunächst eine Venae sectio der Vena jugularis interna durchgeführt. Wahlweise rechts- oder linksseitig wird die Haut paratracheal auf einer Länge von etwa 10 cm inzidiert, dann die oberflächliche Halsfaszie eröffnet und unter Abdrängen des Musculus sternocleidomastoideus die prätracheale Halsfaszie präpariert. Nach Inzision der Vagina carotica wird die V. jugularis interna auf einer Länge von etwa 3 cm freipräpariert und distal ligiert (3/0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland), proximal wird das Gefäß abgeklemmt und dann doppelt angeschlungen (3/0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Mittels einer Mikroschere erfolgt nun die Inzision der Venenwand, über den Wanddefekt wird eine 20 G Venenverweilkanüle (Vasculon Plus, Ohmeda, Helsingborg, Schweden) in die V. jugularis interna vorgeschoben, die Gefäßklemme gelöst und der

Katheter über die doppelte Gefäßschlinge gesichert. Über einen Drei-Wege-Hahn (Braun, Melsungen, Deutschland) werden die Perfusorleitungen von peripher- auf zentralvenös umgesteckt. Der operative Zugang für die Hepatektomie erfolgt über eine mediane Laparotomie. Zunächst wird die Haut vom Processus xyphoideus bis etwa 10 cm oberhalb der Symphyse median inzidiert und dann das subcutane Gewebe mittels Elektroskalpell bis zur oberflächlichen Bauchfaszie präpariert. Bei den männlichen Schweinen wird hierbei sorgfältig um den Penis herum präpariert, um eine Eröffnung des Präputiums und damit mögliche bakterielle Kontamination zu vermeiden. Die Blutstillung kleinerer Haut- und Subcutanblutungen erfolgt durch Elektrokoagulation. Nach Darstellung der Linea alba auf ganzer Länge der Inzision wird die Bauchwand einschließlich des Peritoneums durch Scherenschlag in der Sehnenplatte an einer Stelle eröffnet. Unter Führung mit dem in die Bauchhöhle eingebrachten Finger wird die Inzision dann vorsichtig in der Linea alba nach proximal und distal erweitert. Ein Retraktor zum Offenhalten der Inzision wird eingbracht und dann der Darm mit Hilfe von Bauchtüchern nach distal verlagert, um das Ligamentum hepatoduodenale für die weitere Präparation darzustellen. Zunächst wird das viscerale Peritoneum im Bereich des Lig. hepatoduodenale stumpf abpräpariert, um die drei darunter laufenden Strukturen der A. hepatica propria, der Vena portae und des Ductus choledochus sichtbar zu machen. Die A. hepatica propria wird zunächst nach proximal zu ihrem Ursprung aus der A. hepatica communis bzw. dem Truncus coeliacus zurückverfolgt und der Abgang am Truncus freipräpariert und angeschlungen (3/0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Die Vena portae wird proximal der Einmündung der V. lienalis von den umgebenden Strukturen freipräpariert und proximal doppelt, wie distal einfach angeschlungen (3/0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Das Darmpaket wird nun nach links verlagert, um Zugang zu der Vena cava inferior zu erlangen. Von ihrem Eintritt in die Leber weg nach distal wird die V. cava inferior dann auf einer Länge von etwa 3 cm freipräpariert. Nach der Präparation der drei beschriebenen Strukturen wird dann zunächst die A. hepatica communis am Truncus coeliacus ligiert, die V. portae distal ligiert und deren Wand nach Setzen einer proximalen Gefäßklemme

inzidiert. Ein steriles Infusionssystem (Braun, Melsungen, Deutschland), das am distalen Ende abgeschnitten wurde und UW-Lösung (Du Pont, Bad Homburg, Deutschland) zuleitet, wird dann in die Vena portae eingeführt und mittels der doppelten Gefäßschlinge gesichert. Nun wird das Infusionssystem geöffnet und zügig 1000 ml gekühlter und heparinisierter (25.000 IE Heparin, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) UW-Lösung in die Leber infundiert. Direkt nach Kannülierung der V. portae wird die inferiore Vena cava mit einer Gefäßklemme verschlossen. Das Tier wird nun durch eine Bolusinjektion von 40 mmol Kaliumchlorid (Braun, Melsungen, Deutschland) und Fentanyl (Jansen Cilag, Neuss, Deutschland) getötet und der Thorax über eine mediane Thorakotomie eröffnet, sowie die Vena cava superior inzidiert, um einen schnelleren Abfluß der Spüllösung aus der Leber zu erreichen. Die korrekte und vollständige Perfusion der Leber mit UW-Lösung zeigt sich in einer stetigen Abblassung des Organs. Die Leber wird dann unter Dissektion der Haltbänder, des Diaphragmas und der zu-/abführenden Gefäße explantiert und in ein steriles Gefäß (Schott, Jena, Deutschland) verbracht und bis zur weiteren Präparation auf Eis gekühlt.

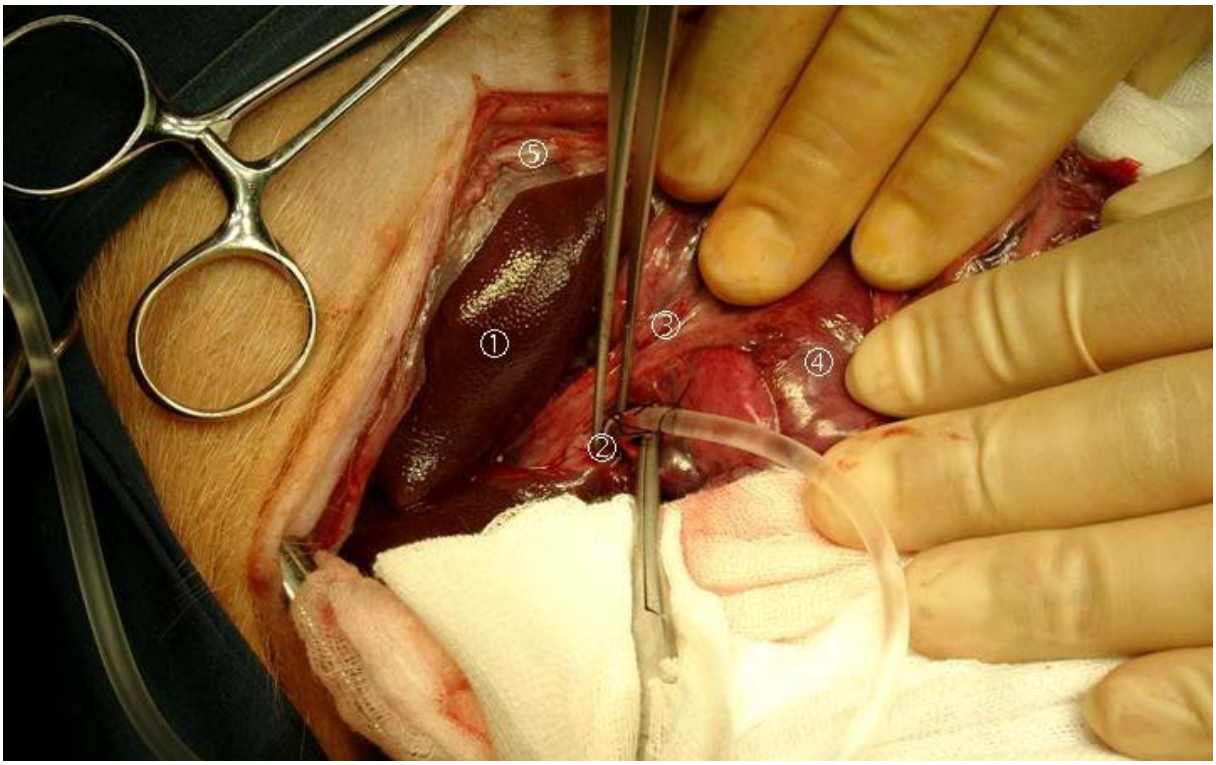

Abb.2: OP-Situs mit Leber ①, kannülierter Pfortader ②, Ligamentum hepatoduodenale ③, Duodenum ④, Processus xyphoideus ⑤

2.4. Gewebepräparation

Aus der explantierten Leber wird unter sterilen Bedingungen mittels eines Skalpells ein ca. 3 cm x 3 cm x 3 cm großes Gewebestück herausgeschnitten. Das Gewebe enthält überwiegend Parenchym und weist keine größeren Gefäße oder Gallengänge auf. Damit ist in den einzelnen Versuchen die Masse an Hepatozyten in etwa vergleichbar. Das vorpräparierte Gewebestück wird in die sterilisierte Schneideapparatur (Werkstatt des Instituts für chirurgische Forschung, München, Deutschland; Abb.3: ①) eingebracht, in der 25 Rasierklingen (Wilkinson, Solingen, Deutschland) im Abstand von jeweils 1 Millimeter montiert sind. Mittels einer hohlen Kunststoffform (Werkstatt des Instituts für chirurgische Forschung, München, Deutschland; Abb.3: ②) wird das Gewebe in Position gehalten, ein Metallstempel (Werkstatt des Instituts für chirurgische Forschung, München, Deutschland; Abb.3: ③) wird in die Form eingeführt. Unter leichtem manuellem Druck wird das Gewebe mit dem Stempel gegen die Klingen gedrückt und in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Mit Hilfe zweier Mikrodissektions-Pinzetten werden die Gewebeschnitte (Abb.4: ①) vorsichtig zwischen den Messern heraus gezogen und bis zur weiteren Verarbeitung in einer mit Williams E Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) gefüllten Petrischale (100/20mm, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) aufbewahrt, das Zellmedium wird mit wenigen Tropfen Gentamycin-Lösung (Gencin, Curasan, Kleinostheim, Deutschland) versetzt. Aus den Leberscheiben werden runde Stücke mit einem Durchmesser von 13 mm mittels einer Metallstanze (Abb.4: ②) gewonnen. Das fertig präparierte Gewebe wird mit Hilfe von mikrochirurgischen Instrumenten auf eine Nitrocellulose-Trägermembran aufgebracht (Millipore, Eschborn, Deutschland; Abb.4: ③) und in einen Gewebeträger aus zwei Kunststoffringen eingespannt (Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland; Abb.4: ④/⑤). Bis zur Einbringung in das Kultursystem werden die präparierten Leberschnitte in Williams E Medium auf Eis gekühlt (Abb.4).

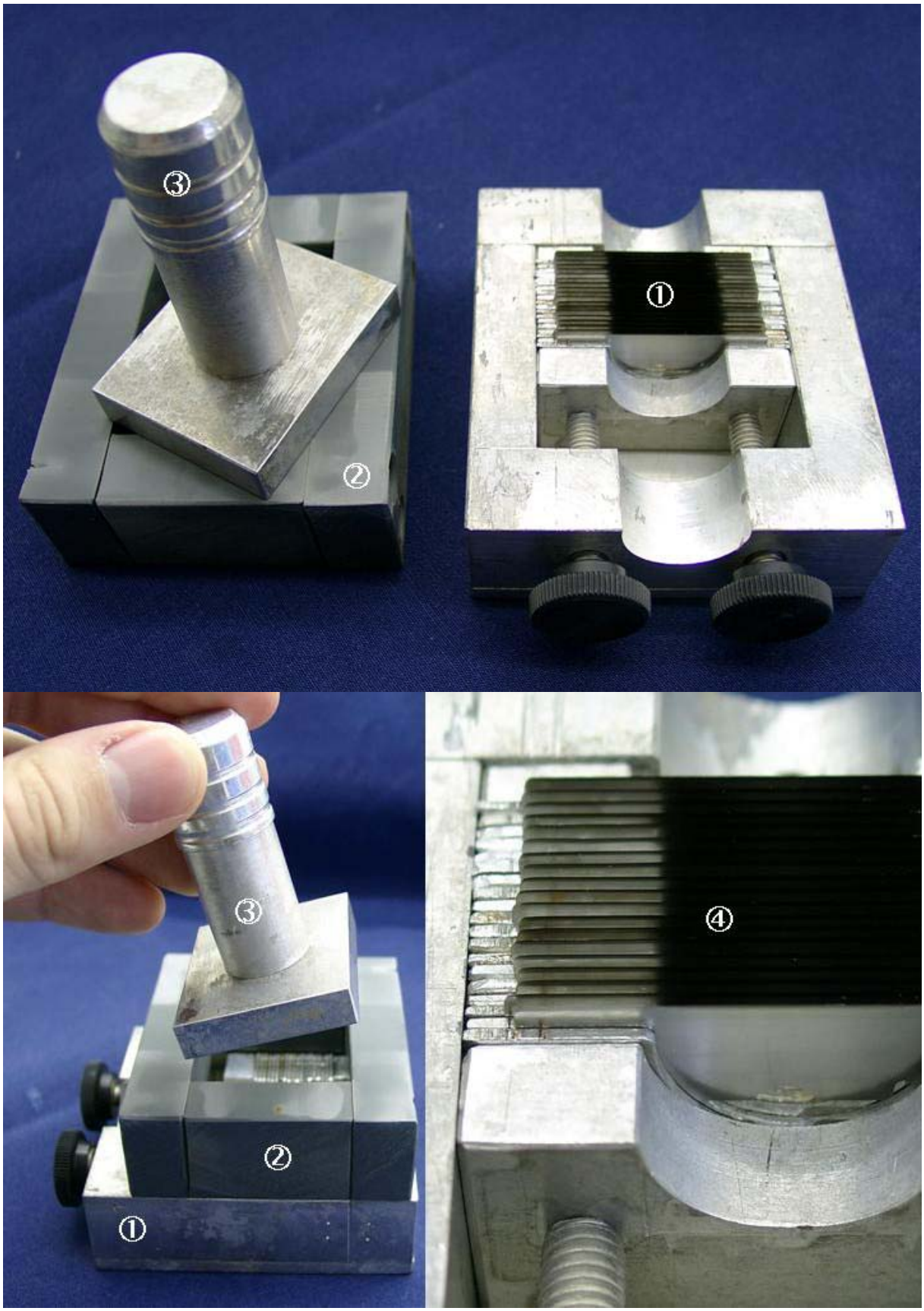

Abb.3: Schneideapparatur ①, Postitionierungsform ②, Stempel ③, Rasierklingen, ④; Schneidevorgang: die Postitionierungsform wird auf die Schneidevorrichtung gesetzt, dann das Leberstück innerhalb der Form auf die Klingen gelegt und mittels Stempel nach unten gedrückt

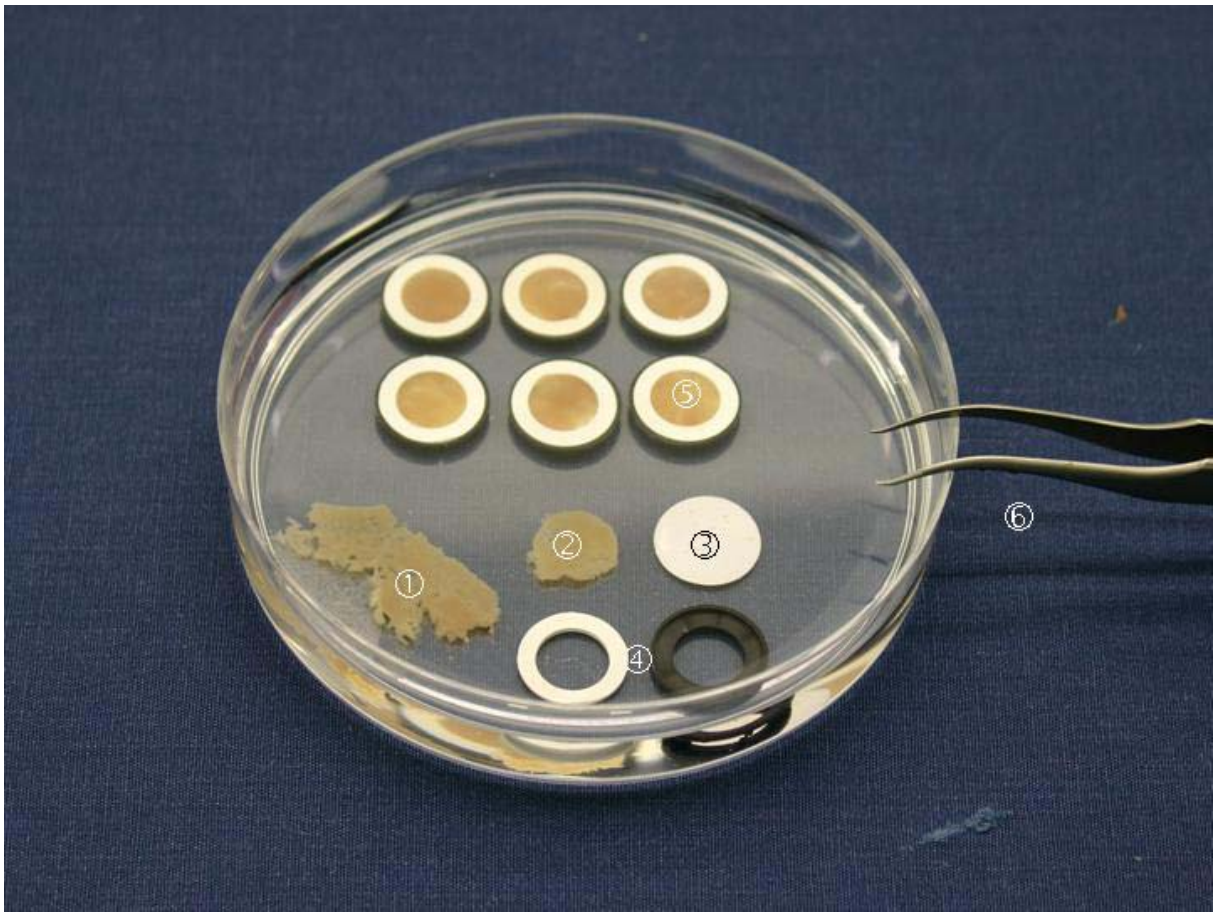

Abb.4: Leberschnitte roh ①, gestanzte Leberschnitte ②, Nitrocellulosemembran ③, Halterungsringe einzeln ④ und montiert ⑤, mikrochirugisches Instrumentarium ⑥

2.5. Perfusionskultur

Die präparierten Leberschnitte werden in einem Perfusionskultursystem (Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) untersucht. Das System besteht aus einer Kunststoffkammer mit den Maßen 6 x 4 x 3,5 cm (Abb.6). Über einen aufklappbaren Deckel können die Minucells-Geweberinge in eine Halterung innerhalb der Kammer geschoben werden. Das Modell bietet Platz für sechs Geweberinge (Abb.6: ⑨), die in aufrechter Position in das System montiert werden. Die Kammer fasst ein Volumen von ca. 6 ml. Am einen Ende der Kammer befindet sich auf Höhe des Bodens eine Einlassbohrung (Abb.6: ⑧), das andere Ende auf Höhe des Klappdeckels ist mit einer Auslassöffnung (Abb.6: ⑩) versehen. Über die beschriebenen Öffnungen kann die Kammer mit neuem Zellmedium gespeist werden, bzw. kann verbrauchte Nährlösung aus der Kammer abfließen. Dieses Konstruktionsprinzip gewährleistet einen

gleichmäßigen Austausch des im System befindlichen Mediums: frische Lösung tritt auf Bodenhöhe in die Kammer ein, verbrauchtes Medium wird schichtweise zum Abfließen gebracht [Minuth et al., 1999]. Im Inneren der Kammer kann ein annähernd konstantes Milieu aufrechterhalten werden, es stehen ausreichende Mengen an O_2 und Nährstoffen zur Verfügung, toxische Metabolite und Zellenzyme, die das kultivierte Gewebe schädigen könnten werden kontinuierlich abtransportiert.

Zu- und ableitende Schläuche bestehen aus Ismaprene mit einem Innendurchmesser von 1,02 mm und Längen zwischen 10 und 20 cm (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland; Abb.5: ③). Sie werden über Kunststoff-Konnektoren (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) mit der Minuth-Kammer bzw. miteinander verbunden. Zur besseren Regulierung des O_2-Partialdruckes im Zellmedium werden überwiegend Ismaprene-Schläuche statt der mitgelieferten Silikonleitungen verwendet Ismaprene ist erheblich undurchlässiger für Gase als Silikon. Durch die Verwendung des Materials kann eine übermäßige Sättigung des Mediums mit O_2 vermieden werden. In den Vorversuchen zeigte sich, dass bei Verwendung von Silikonschläuchen der O_2-Partialdrücke im Zellmedium bis 200 mm Hg betrug. Da bei diesem unphysiologisch hohen O_2 ein toxischer Effekt auf die Leberzellen nicht ausgeschlossen werden kann, werden Ismaprene-Schläuche verwendet und die Minuth-Kammer, sowie Zu- und Ableitungen in einen Inkubator (Cytoperm, Heraeus, Hanau, Deutschland) mit 5% O_2-, 5% CO_2- und 90% N_2-Athmosphäre eingebracht. Mittels dieses Versuchsaufbaus können die O_2-Partialdrücke im Inneren der Kammer zwischen 65,16 ± 21,16 mmHg und 108,36 ± 5,57 mmHg eingestellt werden. Lediglich die im Inkubator liegenden Schläuche sind aus Silikon (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland; Abb.5: ④), hierbei soll durch die bessere Leitfähigkeit von Gasen sichergestellt werden, dass genügend CO_2 in das Zellmedium diffundieren kann, um über den verwendeten Bikarbonatpuffer ein konstantes pH-Milieu zu erhalten. Der Inkubator temperiert das Perfusionssystem auf 37°C. Die Minuth-Kammer wird aus einer Vorratsflasche mit 100 ml Williams E Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland; Abb.5: ①) über eine Rollerpumpe Modell IPC N8 (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland; Abb.5: ②) perfundiert. Die Flussrate beträgt 1,2 ml/h, wie in der Literatur in etwa empfohlen

[Minuth et al, 1999], der komplette Inhalt der Kammer wird damit in ca. 5 Stunden komplett ausgetauscht. Beim Durchlaufen des Leitungssystems im Inkubator dampft überschüssiges O_2 aus dem Medium heraus, CO_2 wird zur Regulierung des pH-Wertes vermehrt aufgenommen. Am Kammerabfluss befindet sich ein Drei-Wege-Konnektor (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland; Abb.5: ⑥), über den mittels einer 1ml-Spritze (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich) Proben des Mediums aus der Kammer entnommen werden können. Das weiter distal ableitende Schlauchstück wird dabei mittels einer Kunststoffklemme verschlossen, um eine Vermischung von Medium aus der Kammer und dem Sammelbehälter zu vermeiden. Bei Entnahme von Proben darf die Spritze keine Luftblasen enthalten, da sonst die Messung der Gaspartialdrücke verfälscht wird. Aus dem System abfließendes Medium wird in 14ml-Kunststoffröhrchen (Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland; Abb.5: ⑦) aufgefangen und weiteren Untersuchungen zugeführt. Kammern, sowie Schläuche und Vorratsflaschen werden vor Versuchsbeginn plasma- bzw. dampfsterilisiert. Das System wird zur Äquilibrierung ca. 12 bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn in Betrieb genommen. Der Aufbau des Systems ist der Abbildungen (Abb. 5) zu entnehmen: Über die Rollerpumpe ② wird frisches Medium aus dem Reservoir ① durch das Schlauchsystem ③/④ in die Kammer ⑤ befördert. Am Kammerabfluss sitzt der Drei-Wege-Hahn ⑥, über den die Proben für die weiteren Untersuchungen entnommen werden. Das ableitende Schlauchsystem führt zu einem Auffangbehälter ⑦, in dem das verbrauchte Zellmedium für weitere Analysen gesammelt wird. Das Reservoir für frisches Medium, die Rollerpumpe, sowie ein Teil des zuführenden Schlauchsystems befinden sich an der Raumluft, der aus Silikon bestehende Teil der zuführenden Leitung, die Kammer, sowie das ableitende Schlauchsystem mit Auffangbehälter, befinden sich im Inkubator.

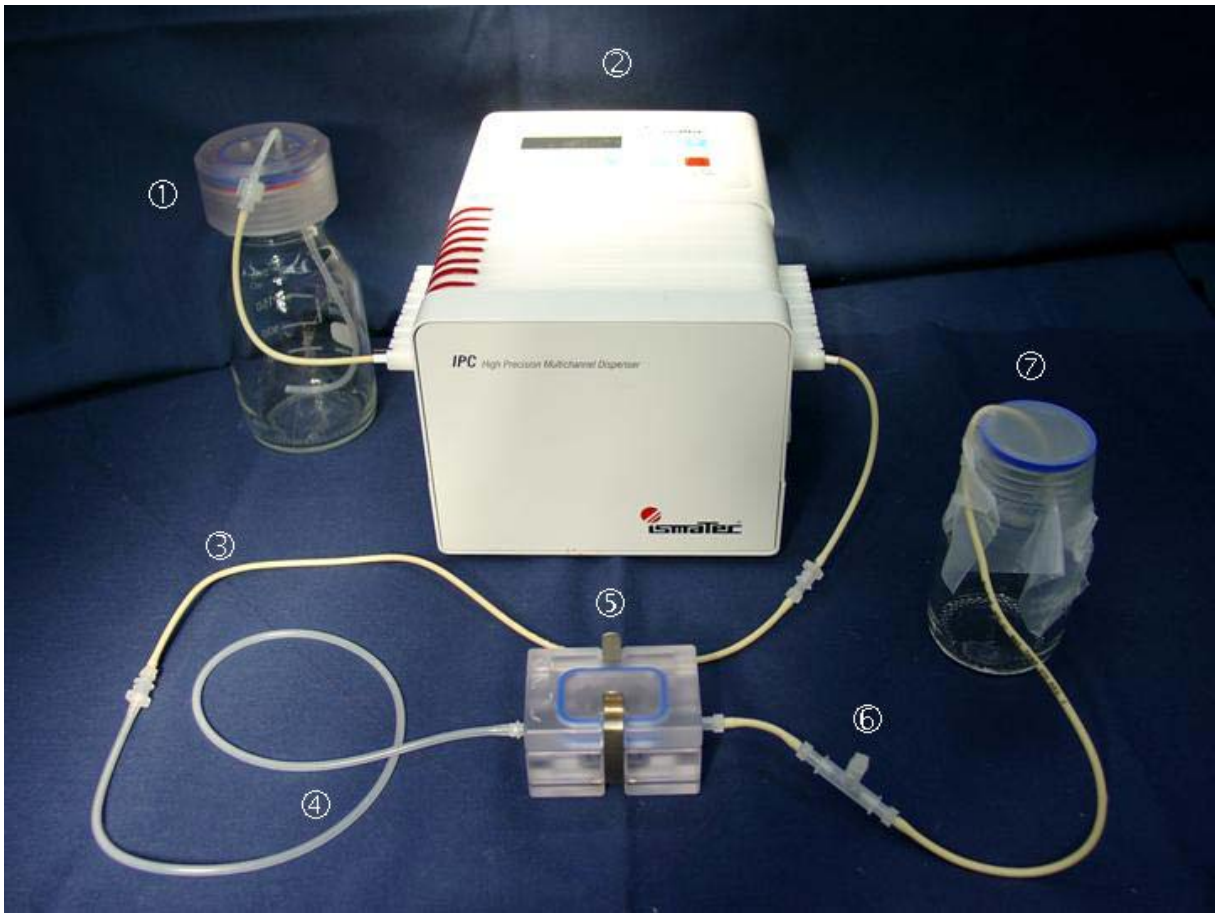

Abb.5: Minuth-Perfusionssystem mit Medium-Reservoir ①, Rollerpumpe ②, Ismaprene- ③ und Silikon-Schlauch ④, Perfusionskammer ⑤, Dreiwegehahn ⑥, Auffangbehälter ⑦

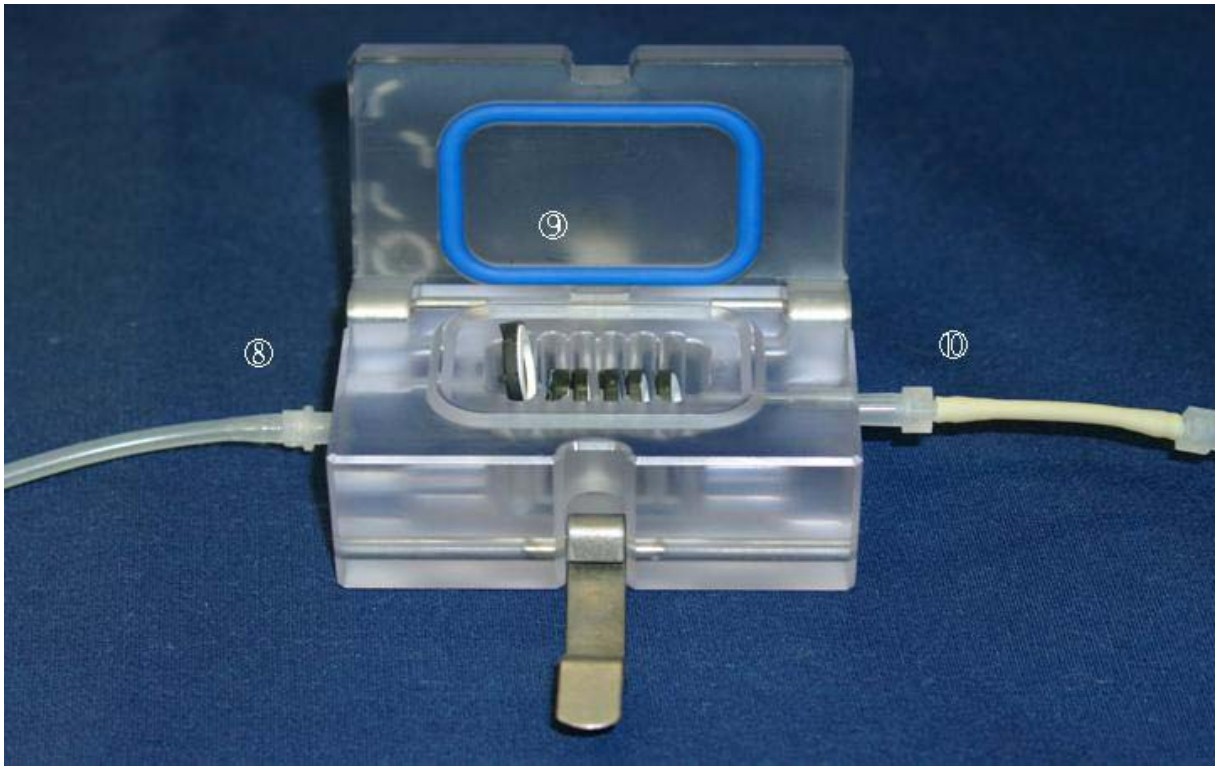

Abb.6: Minuth-Kammer mit Zufluss ⑧, Geweberingen ⑨ und Abfluss ⑩

2.6. Perfusionsmedium

Zur Perfusion der porcinen Leberschnitte wird Williams E Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) verwendet [Williams et al., 1971]. Williams E Medium findet in der Literatur breite Verwendung bei der Kultur von Hepatozyten [Olinga et al., 1997; te Velde et al., 1995; Ota et al, 1996]. Dem Nährmedium werden folgende Zusätze beigemengt: L-Glutamin 1,31 g/l (Biochrom, Berlin, Deutschland), porcines Insulin Novo Semilente 178 IE/l (Novo Nordisk, Mainz, Deutschland), Glucagon GlucaGen 15,6 µg/l (Novo Nordisk, Mainz, Deutschland), Prednison Predinsolut 893 µg/l (Jenapharm, Jena, Deutschland), sowie Gentamycin Gencin 160 mg/l (Curasan, Kleinostheim, Deutschland) und Partricin 10 mg/l (Biochrom, Berlin, Deutschland) als Antibiotikum bzw. Antimykotikum [Bader et al., persönliche Kommunikation, 2000]. Das Medium wird unter sterilen Bedingungen zubereitet, jeweils 100 ml in sterile Glasgefäße (Schott, Jena, Deutschland) abgefüllt und dann mit einem passenden Schraubdeckel mit Schlauchstück und Konnektor (Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) verschlossen. Die Vorratsbehälter mit WE-Lösung werden bei Raumtemperatur gelagert. Beim Durchlaufen des Schlauchsystems wird das Medium im Inkubator auf 37°C erwärmt. Während unserer Versuche beobachteten wir keinerlei Kontamination mit Mikroorganismen.

NaCl	6800		L-Methionin	15
KCl	400		L-Phenylalanin	25
$NaH_2PO_4*2H_2O$	158,3		L-Prolin	30
$MgSO_4*7H_2O$	200		L-Serin	10
$CaCl_2*2H_2O$	264,9		L-Threonin	40
Natriumpyruvat	25		L-Tryptophan	10
D-Glucose	2000		L-Tyrosin	35
$NaHCO_3$	2200		L-Valin	50
$CuSO_4*5H_2O$	0,00009		Glutathion	0,05
$Fe(NO_3)_3*9H_2O$	0,0001		L-Ascorbinsäure	2
$MnCl_2*4H_2O$	0,0001		Biotin	0,5
			Calciferol	1
L-Alanin	90		D-Ca-Pantothenat	1
L-Arginin*HCl	60,5		Cholinchlorid	1,5
L-Asparagin*H_2O	20		Folsäure	1
L-Asparaginsäure	30		i-Inositol	2
L-Cystin*HCl	52,05		Menadion*$NaHSO_4*3H_2O$	0,01

L-Cystin*Na_2	23,7		Nicotinamid	1
L-Glutaminsäure	50		Pyridoxal*HCl	1
Glycin	50		Riboflavin	0,1
L-Histidin*HCl*H_2O	20,3		Thiamin*HCl	1
L-Isoleucin	50		DL-α-Tocopherolphosphat*Na_2	0,01
L-Leucin	75		Vitamin A-Acetat	0,1
L-Lysin*HCl	87,5		Vitamin B12	0,2
			Methyllinolat	0,03

Abb.7: Williams E-Medium, Angaben in mg/l

2.7. Blutgasanalyse

Der pH-Wert, das Lactat, sowie die Gaspartialdrücke für O_2 und CO_2 werden mittels eines handelsüblichen Blutgasanalysators (Modell 860, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) gemessen. Dabei wird das Perfusat über spezifische Elektroden geleitet, die über eine Messung der Potentialdifferenz gegenüber einer Standardlösung, die Konzentration an H^+-Ionen und Lactat, sowie die Gaspartialdrücke für Sauerstoff und Kohlendioxid berechnen.

2.8. LDH-Messungen

Lactatdehydrogenase LDH ist ein ubiquitär vorkommendes zytoplasmatisches Enzym, das bei Schädigung der Zellmembran in das Blutplasma freigesetzt werden kann. Eine Erhöhung der LDH-Aktivität ist damit ein unspezifischer Hinweis für Zellschädigung und –untergang. In der Klinik z.B. findet sie als Marker bei Myokardinfarkt oder Hämolyse Anwendung. In unserem Versuchsaufbau dient die LDH-Messung dem Nachweis einer allgemeinen Zellschädigung.

Die während des Versuchszeitraumes gesammelten Medium-Proben werden auf Aktivität der LDH untersucht. Der photometrische Testkit LDH (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet die optimierte Standard-Methode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Der Test verwendet folgendes Prinzip:

$$Pyruvat + NADH + H^+ \xleftrightarrow{LDH} L - Lactat + NAD^+$$

Photometrisch wird die Extinktionsänderung ΔA/min bei 340 nm Wellenlänge und 25°C bestimmt und in die Enzymaktivität umgerechnet. Als Positivkontrolle wird Precinorm U (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Durchführung der Messung werden jeweils 100 µl Perfusat und 3000 µl Standardlösung in eine Kunststoffküvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert (Eppendorf Pipetten und Pipettenspitzen, Hamburg, Deutschland) und nach Bestimmung der Anfangsabsorption dreimalig im Abstand von jeweils einer Minute die Extinktion im Photometer (DU 7500 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemessen. Die Endergebnisse werden direkt als Enzymaktivitäten ausgedruckt.

2.9. AST-Messungen

Aspartat-Aminotransferase AST (ehemals GOT) ist ein zytoplasmatisches und mitochondriales Enzym, das in Herzmuskel, Skelettmuskel und Lebergewebe vorkommt. Eine Erhöhung der AST-Aktivität ist damit ein Hinweis für Zellschädigung und –untergang innerhalb der genannten Gewebe. In unserem Versuchsaufbau dient die AST-Messung neben den anderen Enzymmessungen dem Nachweis einer hepatozellulären Schädigung.

Die während des Versuchszeitraumes gesammelten Medium-Proben werden auf Aktivität der AST untersucht. Der photometrische Testkit AST (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet die optimierte Standard-Methode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Der Test verwendet folgendes Prinzip:

$$\alpha - Oxoglutarat + L - Aspartat \xleftrightarrow{AST} L - Glutamat + Oxalacetat$$

$$Oxalacetat + NADH + H^+ \xleftrightarrow{MDH} L - Malat + NAD^+$$

Photometrisch wird die Extinktionsänderung ΔA/min bei 340 nm Wellenlänge und 25°C bestimmt und in die Enzymaktivität umgerechnet. Als Positivkontrolle wird Precinorm U (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Durchführung der Messung werden jeweils 500 µl Perfusat und 3000

µl Standardlösung in eine Kunststoffküvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert (Eppendorf Pipetten und Pipettenspitzen, Hamburg, Deutschland) und nach Bestimmung der Anfangsabsorption dreimalig im Abstand von jeweils einer Minute die Extinktion im Photometer (DU 7500 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemessen. Die Endergebnisse werden direkt als Enzymaktivitäten ausgedruckt.

2.10. ALT-Messungen

Alanin-Aminotransferase ALT (ehemals GPT) ist ein zytosolisches Enzym, das ausschließlich in Hepatozyten vorkommt. Eine Erhöhung der ALT-Aktivität ist damit ein spezifischer Hinweis für eine Leberzellschädigung. Praktisch tritt eine Erhöhung der ALT allerdings nur bei sehr schweren Schäden auf. In unserem Versuchsaufbau dient die ALT-Messung neben den anderen Enzymmessungen dem Nachweis einer hepatozellulären Schädigung.

Die während des Versuchszeitraumes gesammelten Medium-Proben werden auf Aktivität der ALT untersucht. Der photometrische Testkit ALT (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet die optimierte Standard-Methode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Der Test verwendet folgendes Prinzip:

$$\alpha - Oxoglutarat + L - Alanin \xleftrightarrow{ALT} L - Glutamat + Pyruvat$$

$$Pyruvat + NADH + H^+ \xleftrightarrow{LDH} L - Lactat + NAD^+$$

Photometrisch wird die Extinktionsänderung ΔA/min bei 340 nm Wellenlänge und 25°C bestimmt und in die Enzymaktivität umgerechnet. Als Positivkontrolle wird Precinorm U (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Durchführung der Messung werden jeweils 500 µl Perfusat und 3000 µl Standardlösung in eine Kunststoffküvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert (Eppendorf Pipetten und Pipettenspitzen, Hamburg, Deutschland) und nach Bestimmung der Anfangsabsorption dreimalig im Abstand von jeweils einer Minute die Extinktion im Photometer

(DU 7500 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemessen. Die Endergebnisse werden direkt als Enzymaktivitäten ausgedruckt.

2.11.Cholinesterase-Messungen

Die Acetylcholinesterase ist für die Spaltung von Acetylcholin im synaptischen Spalt zuständig. Die im Serum auftretende Pseudocholinesterase ChE ist in ihrer Funktion bisher nicht erforscht. Sie dient jedoch in der Klinik als Marker für die Proteinsyntheseleistung der Leber. Bei etlichen Lebererkrankungen, insbesondere der Leberzirrhose, ist sie erniedrigt und kann so diagnostisch wegweisend sein.

Die während des Versuchs gewonnenen Perfusatproben werden auf ChE mittels eines kinetischen Tests (Merck, Darmstadt, Deutschland) untersucht, der S-Butyrylthiocholiniodid als Substrat verwendet.

$$S-Butyrylthiocholiniodid + H_2O \xleftrightarrow{Cholinesterase} Thiocholiniodid + Butyrat$$

$$Thiocholiniodid + 5{,}5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat \leftrightarrow 5-Mercapto-2-nitrobenzoat + 2Nitrobenzoato-5-mercaptothiocholin$$

Photometrisch wird die Extinktionsänderung ΔA/min bei 405 nm Wellenlänge und 25°C bestimmt und in die Enzymaktivität umgerechnet. Als Positivkontrolle wird Precinorm U (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Durchführung der Messung werden jeweils 10 µl Perfusat und 1000 µl Standardlösung in eine Kunststoffküvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert (Eppendorf Pipetten und Pipettenspitzen, Hamburg, Deutschland) und nach Bestimmung der Anfangsabsorption dreimalig im Abstand von jeweils einer Minute die Extinktion im Photometer (DU 7500 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemessen. Die Endergebnisse werden aus den jeweiligen Extinktionen berechnet.

2.12. Harnstoffmessungen

Im Rahmen des Proteinmetabolismus der Hepatozyten werden Aminosäuren und Proteine im Harnstoffzyklus zu Harnstoff abgebaut. Harnstoffproduktion dient somit als Funktionsmarker für den Proteinstoffwechsel.

Die während des Versuchs gesammelten Proben werden auf ihren Harnstoffgehalt untersucht. Der kinetische UV-Test (Merck, Darmstadt, Deutschland) arbeitet mit der GlDH-Methode. Harnstoff wird vollenzymatisch entsprechend folgender zwei Teilschritte umgesetzt:

$$Harnstoff + H_2O + 2H^+ \xleftrightarrow{Urease} CO_2 + 2NH_4^+$$

$$2NH_4^+ + 2\ \ 2-Oxyglutarat + 2NADH \xleftrightarrow{GlDH} 2\ \ 2-Glutamat + 2NAD^+ + 2H_2O$$

Die Abnahme der NADH-Extinktion ΔA/min pro Zeiteinheit ist proportional der Harnstoffkonzentration. Sie wird photometrisch bei 340 nm und 25°C bestimmt. Als Standard wird Precinorm U (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Durchführung der Messung werden jeweils 10 µl Perfusat und 2000 µl Standardlösung in eine Kunststoffküvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert (Eppendorf Pipetten und Pipettenspitzen, Hamburg, Deutschland) und nach Bestimmung der Anfangsabsorption einmalig im Abstand von fünf Minuten die Extinktion im Photometer (DU 7500 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemessen. Die Harnstoffkonzentrationen werden über den Standard aus den jeweiligen Extinktionen berechnet.

2.13. Protein-ELISA

Ein wichtiger Aspekt zur Beurteilung der Vitalität sowie Funktionalität von Zellen ist die Proteinproduktion und –sekretion. Das gesammelte Perfusat wird daher nach der Bradford-Methode [Bradford M., 1976] auf seinen Proteingehalt untersucht. Das Prinzip des Tests beruht auf der Änderung des Absorptionsverhaltens von Coomassie Brilliant Blue G-250, einem Farbstoff mit

einem Absorptionsmaximum von 495 nm, der mit Proteinen einen chemischen Komplex bildet, dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Die Messung der Zunahme der Absorption bei 595 nm kann dann gegen eine Proteinstandardkurve erfolgen, die jeweiligen Proteinkonzentrationen können berechnet werden. Die Farbstofflösung wird folgendermaßen hergestellt: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) werden in 50 ml 95% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und 100ml 85% Phosphorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 1 Liter Endvolumen verdünnt. Jeweils 50 µl der Proteinprobe werden mit 200 µl Bradford-Reagenz in eine 96-well ELISA-Platte (ICN, Eschwege, Deutschland) pipettiert und die Absorption bei 595 nm im ELISA-Reader (Easy Reader EAR 400 AT, SLT Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

2.14. Histologie

Die zu Beginn und Ende des Versuchs entnommenen Gewebeproben werden histologisch untersucht. Frisch geschnittene Leber, sowie das Gewebe aus den Kammern, welches aus den Minuth-Geweberingen entfernt wird, werden in 8% Paraformaldehyd (Apotheke des Klinikums Innenstadt, München, Deutschland) über einige Tage fixiert, dann in Paraffin (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet und geschnitten. Die entparaffinierten Schnitte werden mit Hämatoxylin/Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und mikroskopiert (Zeiss Axiophot, Jena, Deutschland). Bei der histologischen Untersuchung werden folgende Punkte begutachtet: Histoarchitektur, Kernmorphologie, Vorkommen und Ausmaß von Nekrosen.

2.15. Statistik

Die erhobenen Daten für Gasmessungen, Enzymwerte und ELISA werden gemittelt, die Standardabweichungen berechnet und anschließend graphisch dargestellt. Da nur die Versuchsreihe mit den drei unterschiedlichen Perfusionszeiten ohne Kontrollgruppen durchgeführt wurde, kann keine detailiertere statistische Analyse durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Kammerparameter

Bei Analyse des Kammerperfusates mittels des Blutgasanalysegerätes ergeben sich im Zeitverlauf von 72 Stunden für den pH, den Sauerstoffpartialdruck pO_2, den Kohlendioxidpartialdruck pCO_2, sowie Lactat folgende Ergebnisse.

3.1.1. pH-Werte

Zu Beginn der Messungen liegt der pH in der Minuth-Kammer bei 7,39 ± 0,03. Innerhalb der ersten 12 Stunden zeigte sich ein deutlicher Abfall des pH-Wertes in den sauren Bereich, mit den deutlichsten Veränderungen in den ersten drei Stunden nach Beginn der Perfusion. Zwischen 12 und 24 Stunden stabilisiert sich der pH bei Werten von 7,13 ± 0,06/0,09 und 7,15 ± 0,04 und steigt dann im Verlauf der folgenden 36 Stunden an. Gegen Ende der Perfusion, im Zeitraum 48 bis 72 Stunden nach Start des Experimentes, pendelt sich der pH bei Werten um 7,25 (7,23 ± 0,03 bis 7,26 ± 0,02) ein.

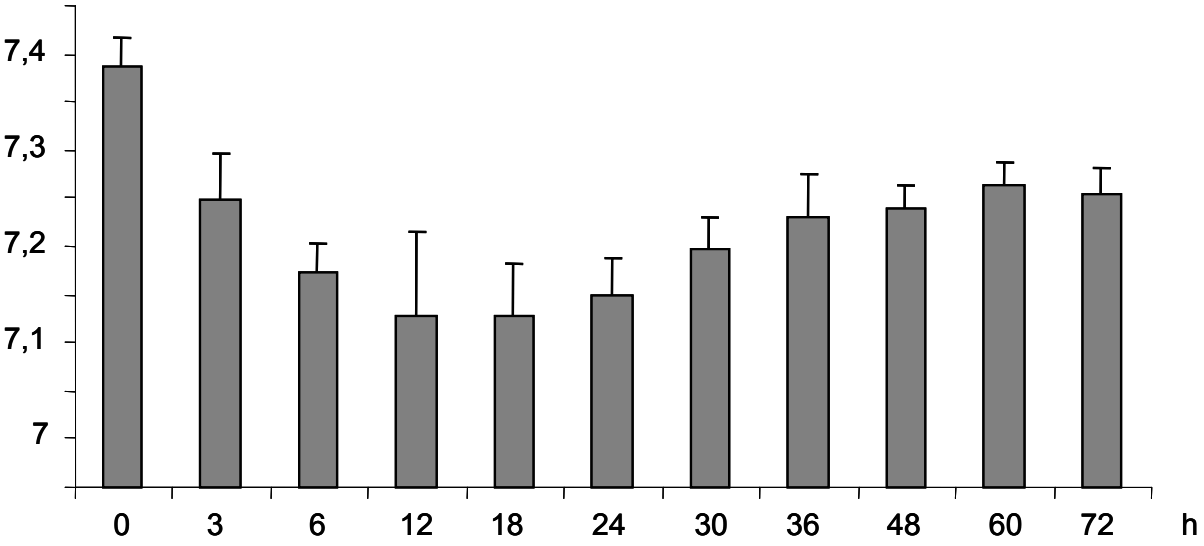

Abb.8: pH-Wert in der Minuthkammer im Zeitverlauf; Mittelwert und Standardabweichung; n = 8

3.1.2. pO_2- und pCO_2-Partialdrücke

Der Sauerstoffpartialdruck im Perfusat der Kammer weist zu Beginn der Perfusion einen Wert von 108,36 ± 5,57 mmHg auf. Zwischen 3 und 6 Stunden fällt der pO2 auf 92,8 ± 9,04 mmHg um im Zeitraum der nächsten 6 Stunden leicht anzusteigen. Nach 12 Stunden ist ein weiterer Abfall des Partialdrucks zu beobachten, die Werte bleiben in den nächsten 18 Stunden annähernd konstant, mit leicht abfallender Tendenz, bei 85,45 ±9,62 mmHg bis 78,79 ± 9,29 mmHg. Zwischen den Messzeitpunkten 36 und 48 Stunden, bzw. 48 und 60 Stunden sinkt der pO2 nochmals deutlich auf Werte von 72,35 ± 14,12 bzw. 60,96 ± 8,34 mmHg ab. Bei Versuchsende wurde der Partialdruck bei 65,16 ± 21,16 mmHg notiert.

Der Kohlendioxidpartialdruck im Williams E Medium wird bei Perfusionsstart mit 32,81 ± 2,41 mmHg festgehalten. Im Verlauf der nächsten 12 Stunden zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg bis auf 57,09 ± 10,44 mm Hg. Zwischen 12 und 24 Stunden nach Beginn bleibt der pCO2 auf diesem Niveau konstant, fällt anschließend leicht ab und stabilisiert sich, mit geringgradiger Abwärtstendendenz bis Versuchsende, bei ca. 45 mmHg (von 49,93 ± 4,24 bis 43,43 ± 2,04 mmHg).

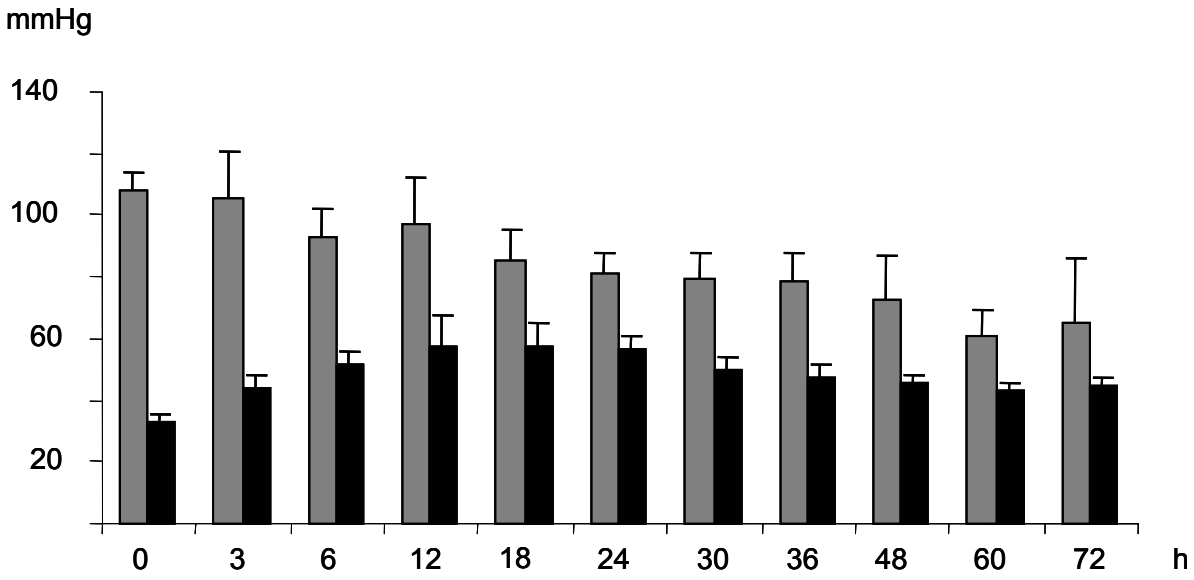

Abb.9: pO2- (grau) und pCO2-Partialdrücke (schwarz) in der Kammer; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 8

3.1.3 Lactat

Das Lactat zeigt innerhalb der ersten 12 Stunden nach Beginn der Perfusion einen deutlichen Anstieg von 0 auf 1,45 ± 0,61 mg/dl. Im Verlauf der nächsten 60 Stunden findet sich ein kontinuierlicher Abfall bis annähernd zum Ausgangswert. Die Spitzenwerte beim Messzeitpunkt 12 Stunden haben eine große Varianz, die Standardabweichung ist im Vergleich auffällig groß.

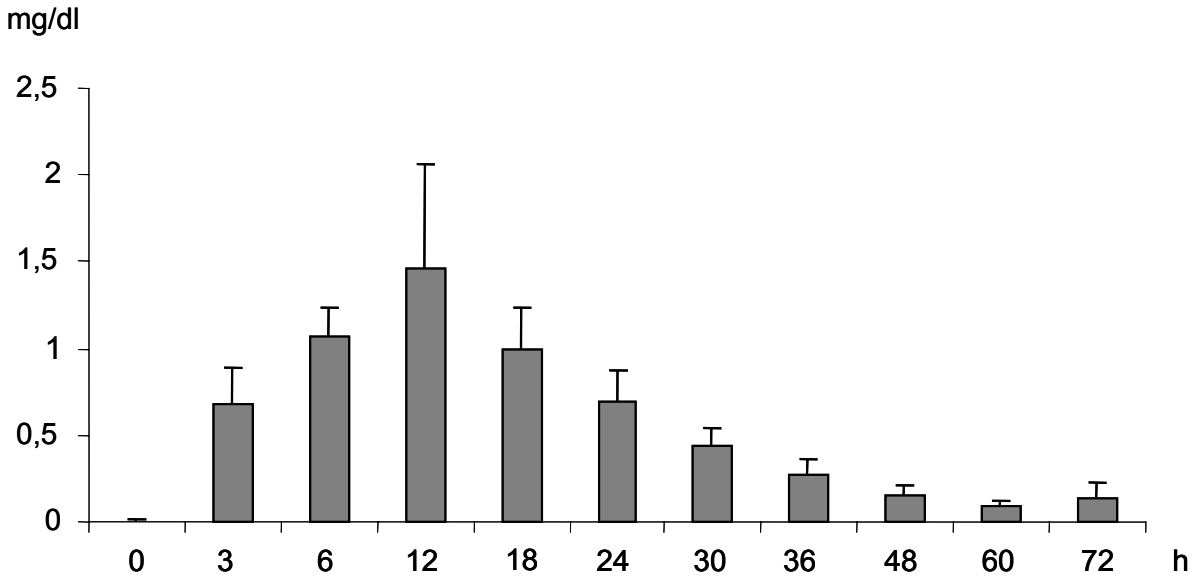

Abb.10: Lactat im Kammerperfusat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 8

3.2. Perfusat

Das in den vorgegebenen Intervallen gesammelte Perfusat wird auf LDH, AST/GOT, ALT/GPT und ChE, sowie Harnstoff und Gesamt-Protein untersucht und erbringt folgende Ergebnisse.

3.2.1. LDH

Die Aktivität der Lactatdehydrogenase LDH steigt von 2,94 ± 2,14 U/l zu Beginn, innerhalb der ersten drei Stunden auf 65,57 ± 19,47 U/l. Es folgt ein weiterer deutlicher Anstieg bis zum Zeitpunkt 6 Stunden auf 214,32 ± 53,69. Der Spitzenwert der Enzymaktivität nach 12 Stunden Perfusion bei 270,16 ± 225,35 U/l zeigt eine sehr hohe Standardabweichung. Zwischen 12 und 18 Stunden wird ein leichter Abfall der Aktivität bemerkt, LDH bleibt bis 24 Stunden nach Beginn des Experiments bei Werten zwischen 219,9 ± 119,46 U/l und 226,77 ± 73,35 U/l konstant. Nach 24 Stunden fällt die Enzymaktivität kontinuierlich ab, bei Versuchsende wird LDH mit 29,4 ± 13,98 U/l gemessen.

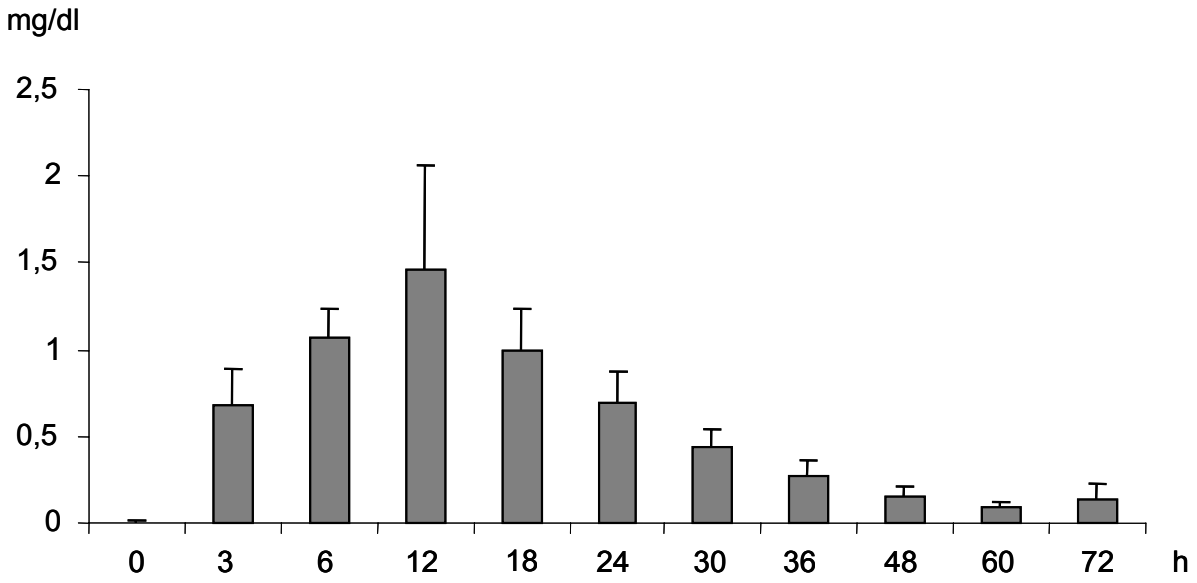

Abb.11: LDH-Aktivität im Kammerperfusat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 8

3.2.2. AST

AST/GOT steigt innerhalb der 6 Stunden von 1,46 ± 0,82 U/l auf 139,68 ± 24,02 U/l und bleibt dann innerhalb der nächsten Stunden auf diesem Niveau annähernd konstant. Zwischen den Messzeitpunkten 12 und 18 Stunden bzw. 18 und 24 Stunden wird erneut ein Anstieg der Enzymaktivität beobachtet, auf 167,56 ± 59,53 U/l bzw. 210,16 ± 31,38 U/l. Bis 30 Stunden nach Perfusionsbeginn bleibt die AST-Aktivität dann konstant bei ca. 210 U/l (210,16 ± 31,38 U/l bis 209,41 ± 19,39 U/l). Danach fallen die Werte kontinuierlich ab bis 21,92 ± 9,61 U/l bei Beendigung des Experiments nach 72 Stunden.

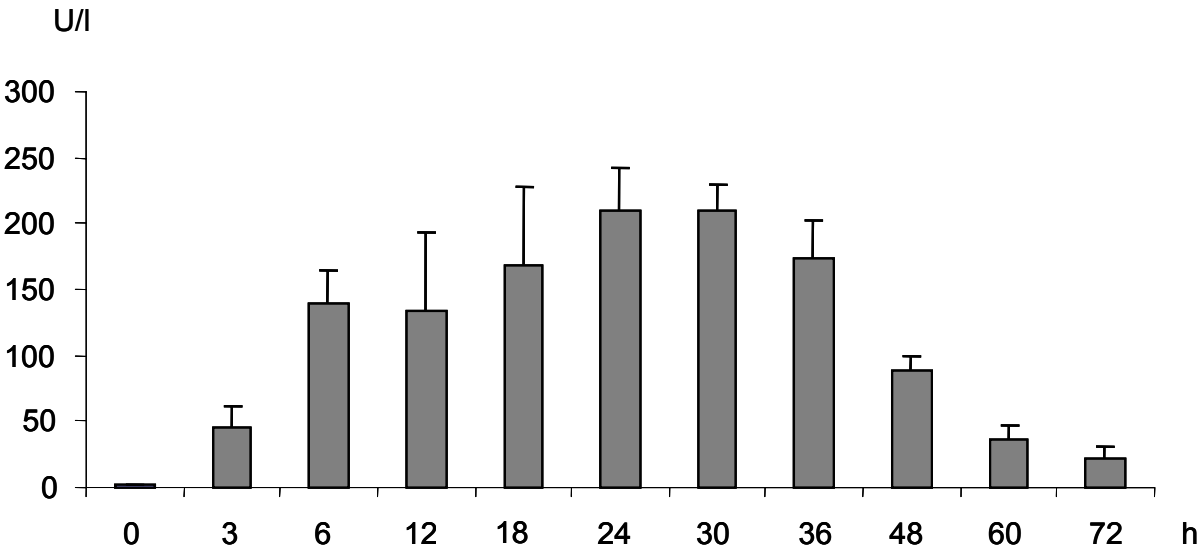

Abb.12: AST/GOT-Aktivität im Kammerperfusat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 8

3.2.3. ALT

Die Aktivität der ALT/GPT zeigt in den ersten 12 Stunden des Versuchs zunächst einen eher dezenten Anstieg von 0,67 ± 0,31 U/l über 2,84 ± 0,95 und 6,35 ± 1,86 U/l (nach 3 bzw. 6 Stunden) auf 11,17 ± 11,33 U/l. Innerhalb der nächsten 12 Stunden folgt dann ein deutlich beschleunigter Enzymanstieg auf 19,03 ± 11,41 U/l nach 18 Stunden und 35,9 ± 11,41 U/l nach 24 Stunden. Der Spitzenwert von 39,42 ± 10,41 U/l wird zum Zeitpunkt 30 Stunden gemessen. Im

weiteren Verlauf fällt die Enzymaktivität dann rapide ab und bleibt in den letzten 12 Stunden des Experimentes bei 6,24 ± 2,58 U/l bzw. 5,31 ± 2,73 U/l annähernd konstant.

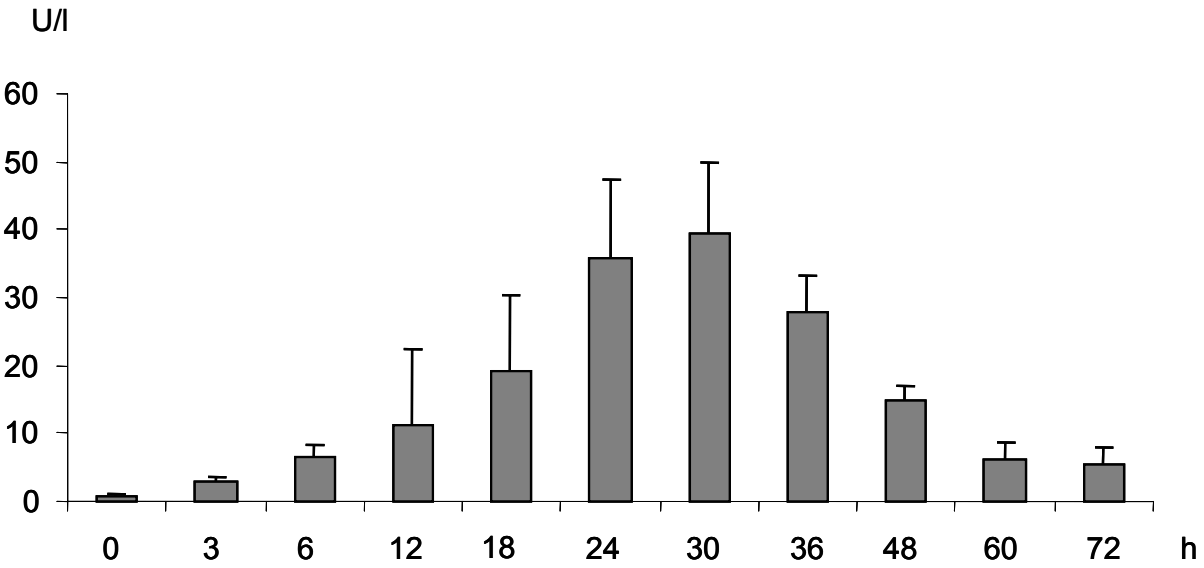

Abb.13: ALT/GPT-Aktivität im Kammerperfusat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 8

3.2.4 de-Ritis-Quotienten

Der de-Ritis-Quotient AST/ALT ist zu allen Messzeitpunkten über 0,7. Die höchsten Quotienten finden sich nach 3 bzw. 6 Stunden Perfusion mit 15,87 und 22. Nach 6 Stunden fallen die Quotienten und pendeln sich dann bis zum Ende der der Perfusion bei etwa 5 ein.

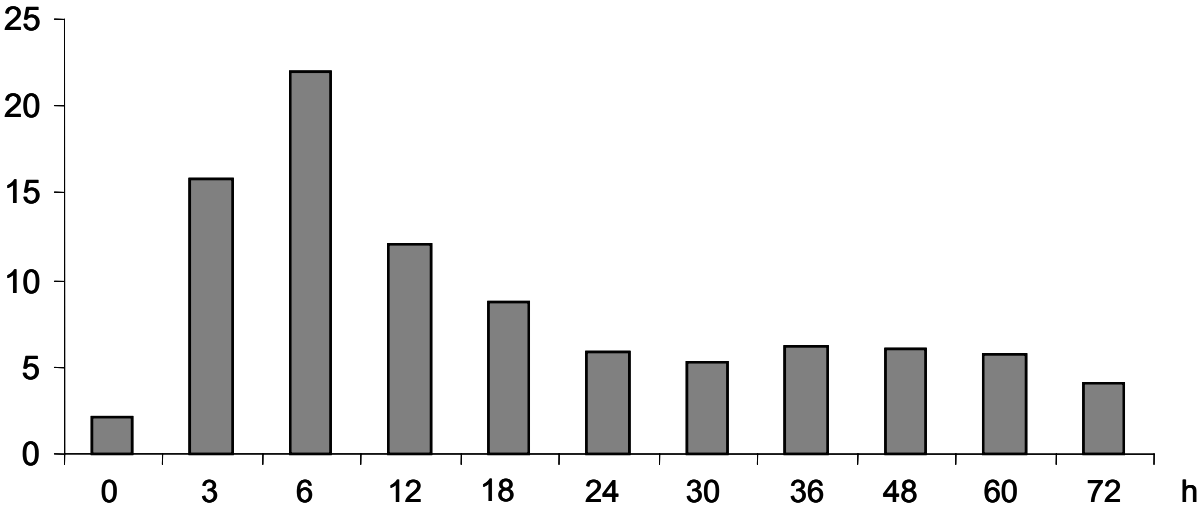

Abb.14: de Ritis-Quotienten AST/ALT (aus den Mittelwerten von AST und ALT gebildet)

3.2.5 Cholinesterase

Die Aktivität der Cholinesterase ist im Versuchszeitraum konstant nur geringgradig über Null (0,025 ± 0,01 U/l bis 0,073 ± 0,09 U/l). Es wurden lediglich 5 Gruppen gemessen (n=5).

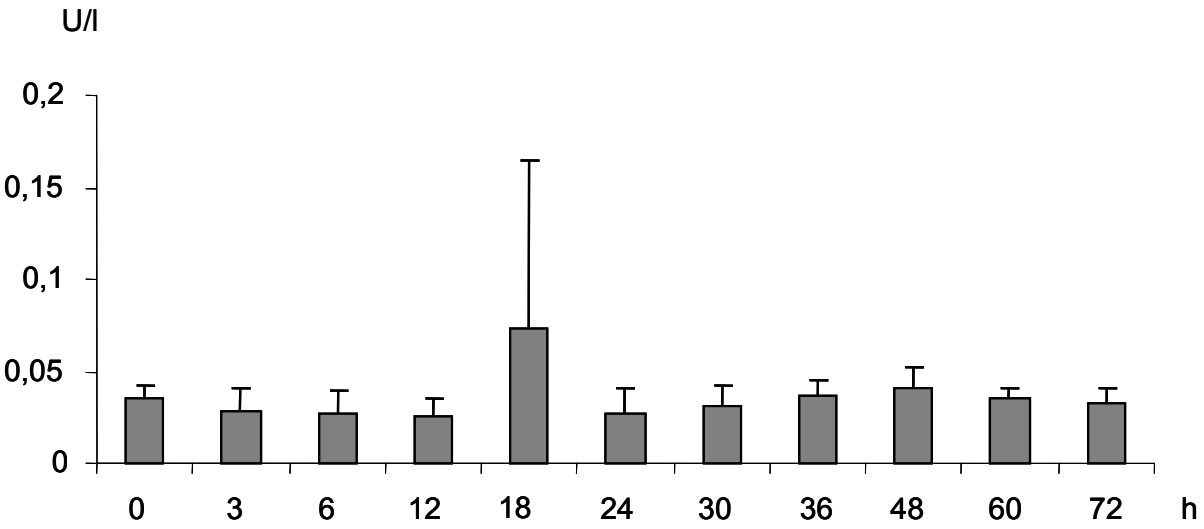

Abb.15:Cholinesterase-Aktivität im Kammerperfusat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 5

3.2.6. Protein

Der Proteinspiegel steigt in den ersten sechs Stunden nach Perfusionsbeginn rasch auf Werte bis 265,04 ± 103,79 µg/ml. Zu den Messzeitpunkten 12 Stunden, bzw. 18 Stunden folgt ein leichter Abfall, auf ein annähernd konstantes Niveau bei 217,31 ± 61,38 µg/ml, bzw. 200,99 ± 43,8 µg/ml. Zwischen 18 und 24 Stunden Perfusion findet nochmals ein dezenter Anstieg der Proteinmenge im Perfusat statt, bis 254,08 ± 58,97 µg/ml, und hält sich dann weitere sechs Stunden konstant. Nach 30 Stunden Perfusion kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Proteinmenge, die Werte sinken von 255,22 ± 58,36 µg/ml zum Zeitpunkt 30 Stunden, über 173,22 ± 58,76 µg/ml nach 36 Stunden, 110,93 ± 23,09 µg/ml nach 48 Stunden und 52,53 ± 21,35 µg/ml nach 60 Stunden bis auf 32,94 ± 17,23 µg/ml bei Versuchsende nach 72 Stunden ab.

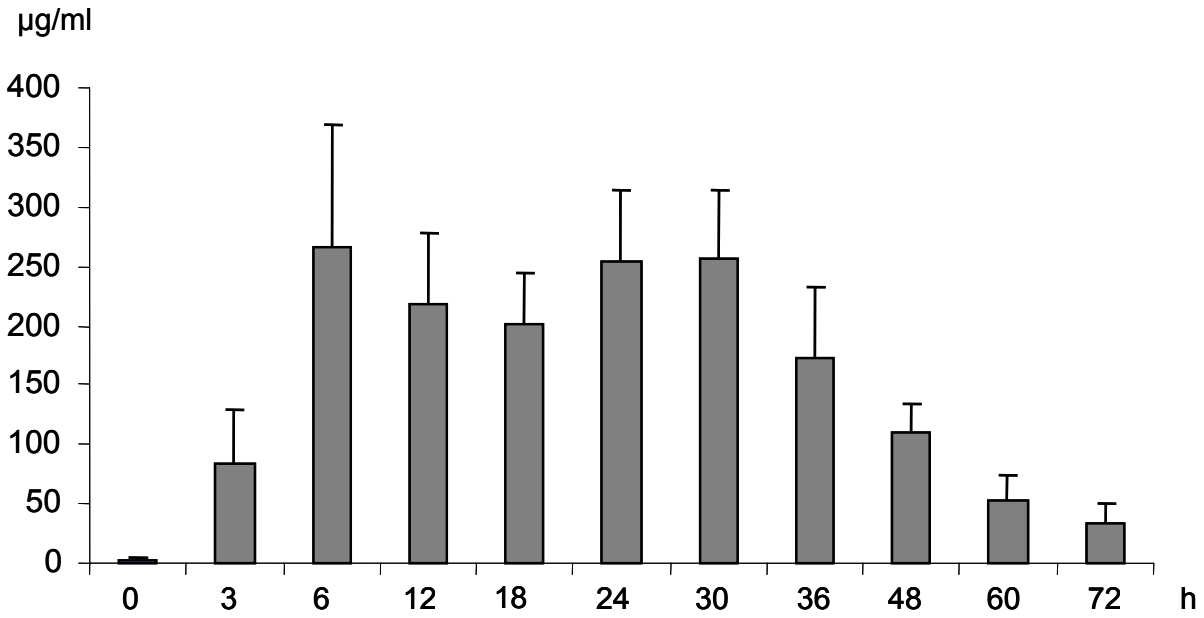

Abb.16: Protein im Perfusat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 8

3.2.7 Harnstoff

Die Harnstoffmenge im Kammerperfusat stellt sich sehr inhomogen dar. Die einzelnen Werte zu den jeweiligen Messzeitpunkten zeigen eine große Variabilität mit teils sehr hohen Standardabweichungen (zwischen 1,68 ± 3,21 mg/dl und 3,99 ± 4,41 mg/dl). Zu keinem Zeitpunkt wird im Perfusat mehr Harnstoff als zu Versuchsbeginn gemessen, die Werte liegen auf insgesamt niedrigem Niveau.

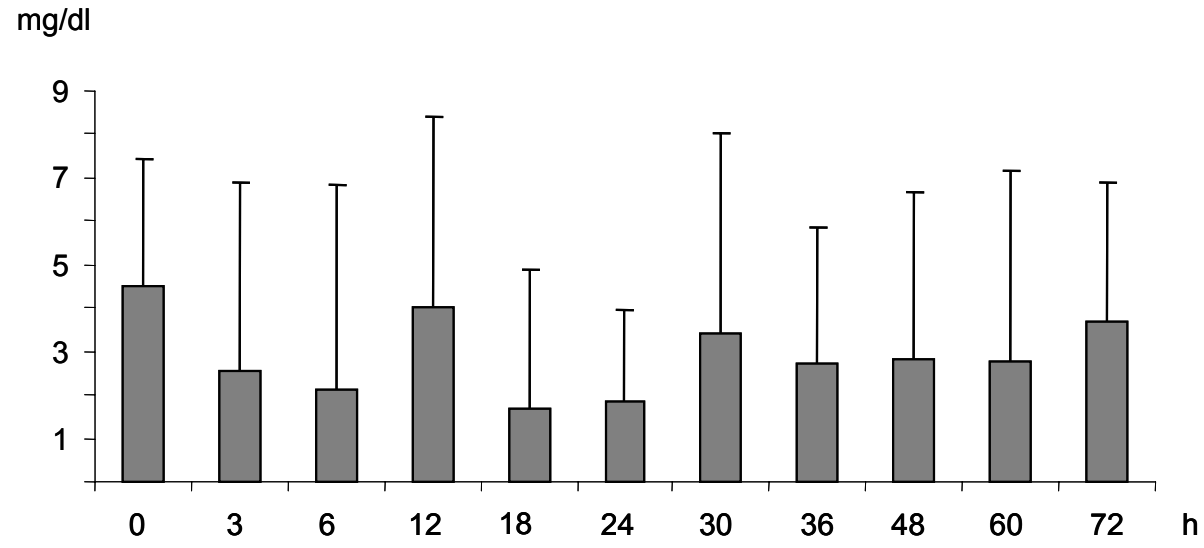

Abb.17: Harnstoff im Kammerperfusat; Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 8

3.3. Histologie

3.3.1. Explantation

Die Histologie der frischen Leberschnitte zeigt eine intakte Histoarchitektur mit den für das Schweineorgan typischen lobulären Septen. Gut zu erkennen sind die Zentralvenen mit den angrenzenden Leberzellbälkchen und die Portalfelder mit Arterienast, Gallengang und Pfortaderast. Die Zellkerne sind basophil und chromatinreich, mit teils deutlichen Nukleolen. Das Zytoplasma erscheint homogen eosinophil, in der Vergrößerung mit feingranulärer Detailstruktur. In den Sinusoide finden sich Endothelzellen, mit schmalen Kernen, sowie dunkelkernige Kupfferzellen.

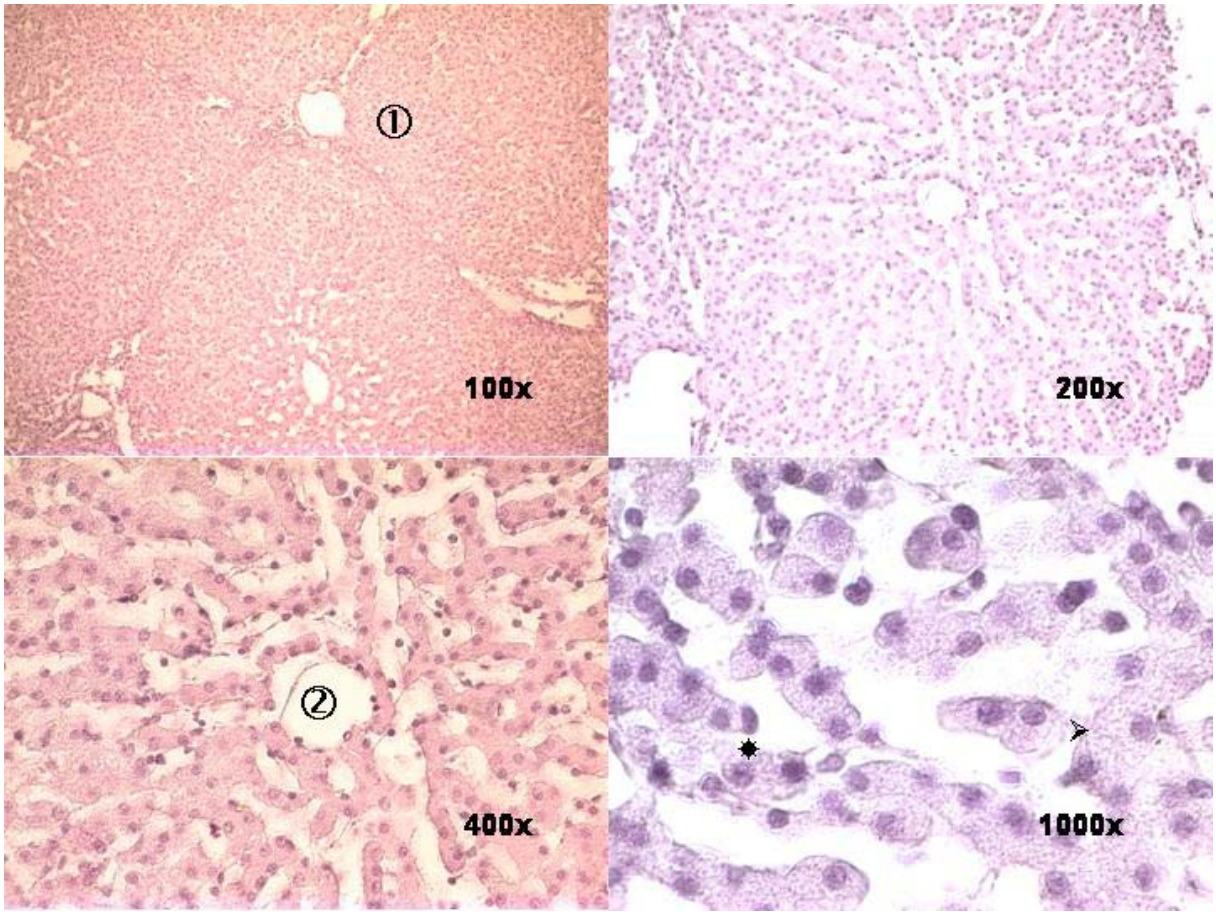

Abb.18: Leberschnitte frisch in 100-, 200-, 400- und 1000-facher Vergrößerung; Portalfeld ①, Zentralvene ②, prominente Nucleoli ✸ und basophile Granulation ➢ des Zytoplasmas

3.3.2. Perfusion 24 Stunden

Nach 24 Stunden Perfusion erscheint das Zytoplasma etwas weniger stark gefärbt hypochrom. Die Zytoarchitektur ist mit den deutlich zu sehenden Zentralvenen und Portalfeldern noch gut erhalten. Die Zellkerne erscheinen in der Übersicht weniger basophil gefärbt, in der Vergrößerung zeigt sich eine Verdichtung der Kernstrukturen, die Heterogenität des Chromatins geht verloren. Das Zytoplasma erscheint fädig durchzogen, mit beginnender vakuolärer Degeneration. Die einzelnen Zellen sind weniger gut abzugrenzen.

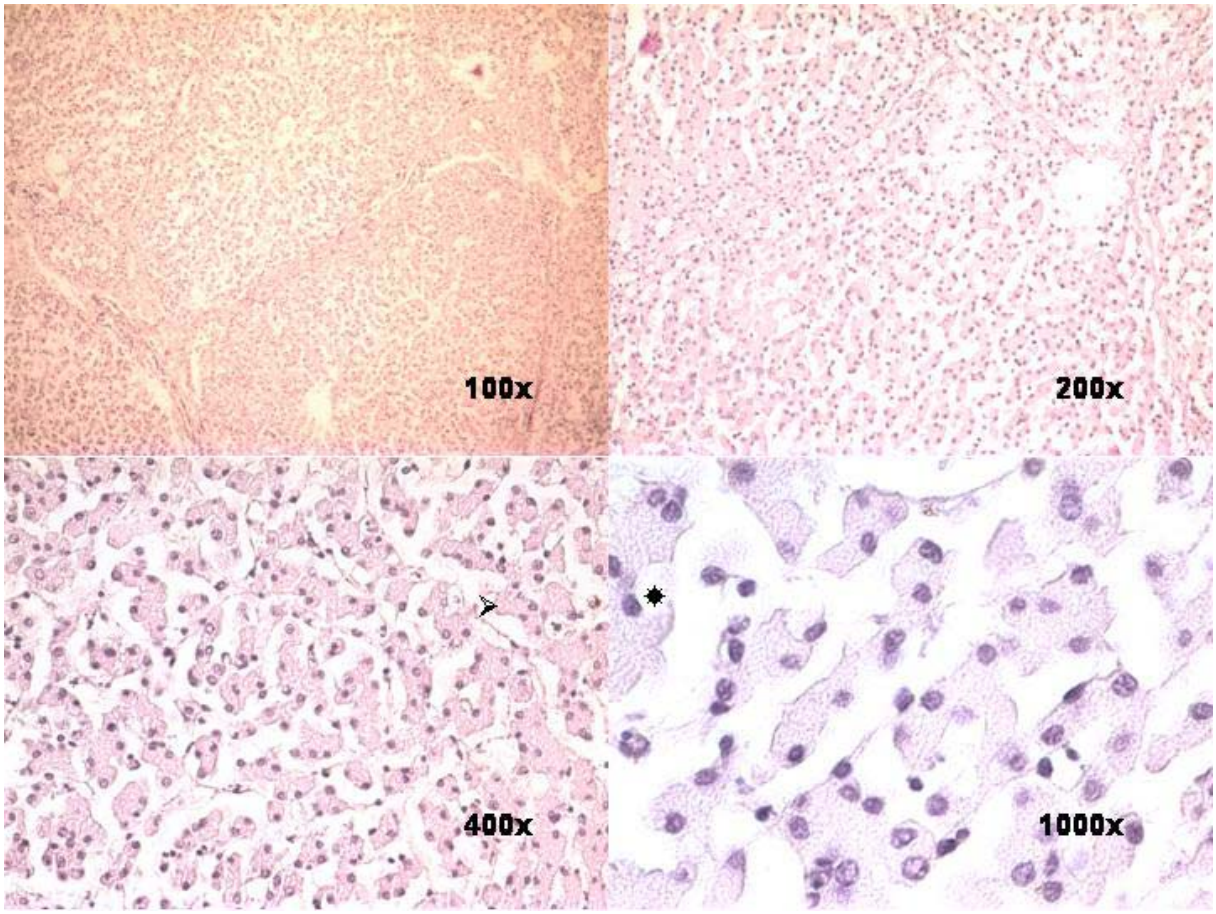

Abb.19: Leberschnitte nach 24 Stunden in 100-, 200-, 400- und 1000-facher Vergrößerung: weitgehend intakte Histoarchitektur, beginnende Vakuolisierung ➢ und basophile Abblassung ✸ des Zytoplasmas

3.3.3. Perfusion 48 Stunden

Nach 48 Stunden Perfusion kann man bei oberflächlich noch erhaltener Gewebearchitektur große nekrotische Areale mit Zellkernverlust und intensiv eosinophilem Zytoplasma beobachten. Die Sinusoide sind angedeutet noch vorhanden, in den Leberzellbälkchen lassen sich keine einzelnen Zellen mehr gegeneinander abgrenzen. In der Vergrößerung zeigt sich vakuolisiertes Zytoplasma und angedeutet Zellkernreste. Die Kerne sind in der Zahl deutlich vermindert, es finden sich große eosinophile Areale ohne Anzeichen für Kernreste. Die verbliebenen Zellkernreste sind homogen in ihrer Struktur und färben kaum noch basophil.

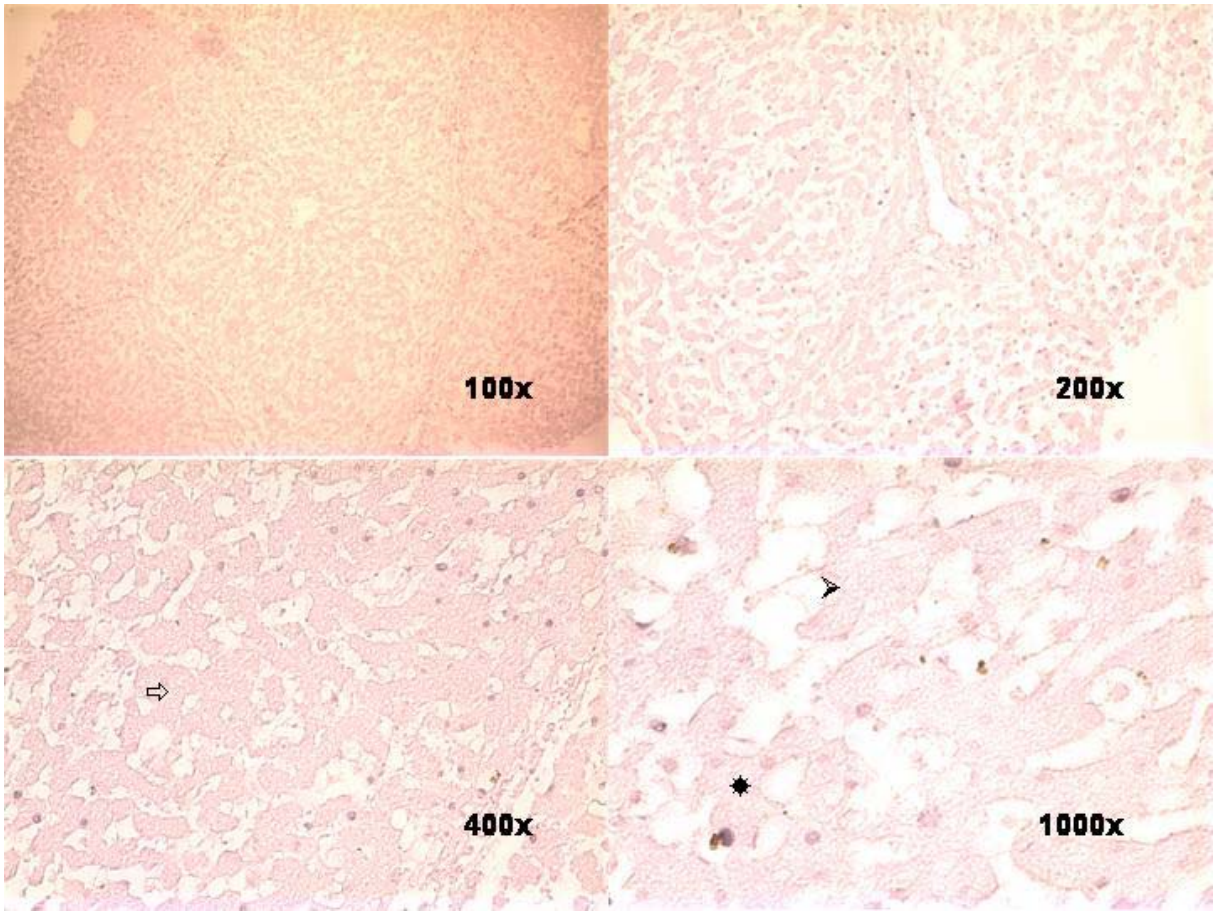

Abb.20: Leberschnitte nach 48 Stunden in 100-, 200-, 400- und 1000-facher Vergrößerung: Verlust der Histoarchitektur mit konfluierenden hypereosinen Nekrosearealen ⇨, Kernverlust ✸ und vakuolischer Degeneration ➢; Vollständiger Verlust der Basophilität

3.3.4. Perfusion 72 Stunden

Nach 72 Stunden beginnt auch die Architektur des Gewebes sich aufzulösen. Sinusoide sind noch angedeutet zu beobachten, Portalfelder mit Gallengängen oder Gefäßen, sowie Zentralvenen sind nicht mehr eindeutig abzugrenzen. Das Parenchym zeigt große, konfluierende Areale von nekrotischen Hepatozyten, Zellkerne und Kernreste sind nur noch spärlich zu finden. In der Vergrößerung erscheint das Zytoplasma stark vakuolisiert, die Zellgrenzen sind nicht mehr zu bestimmen.

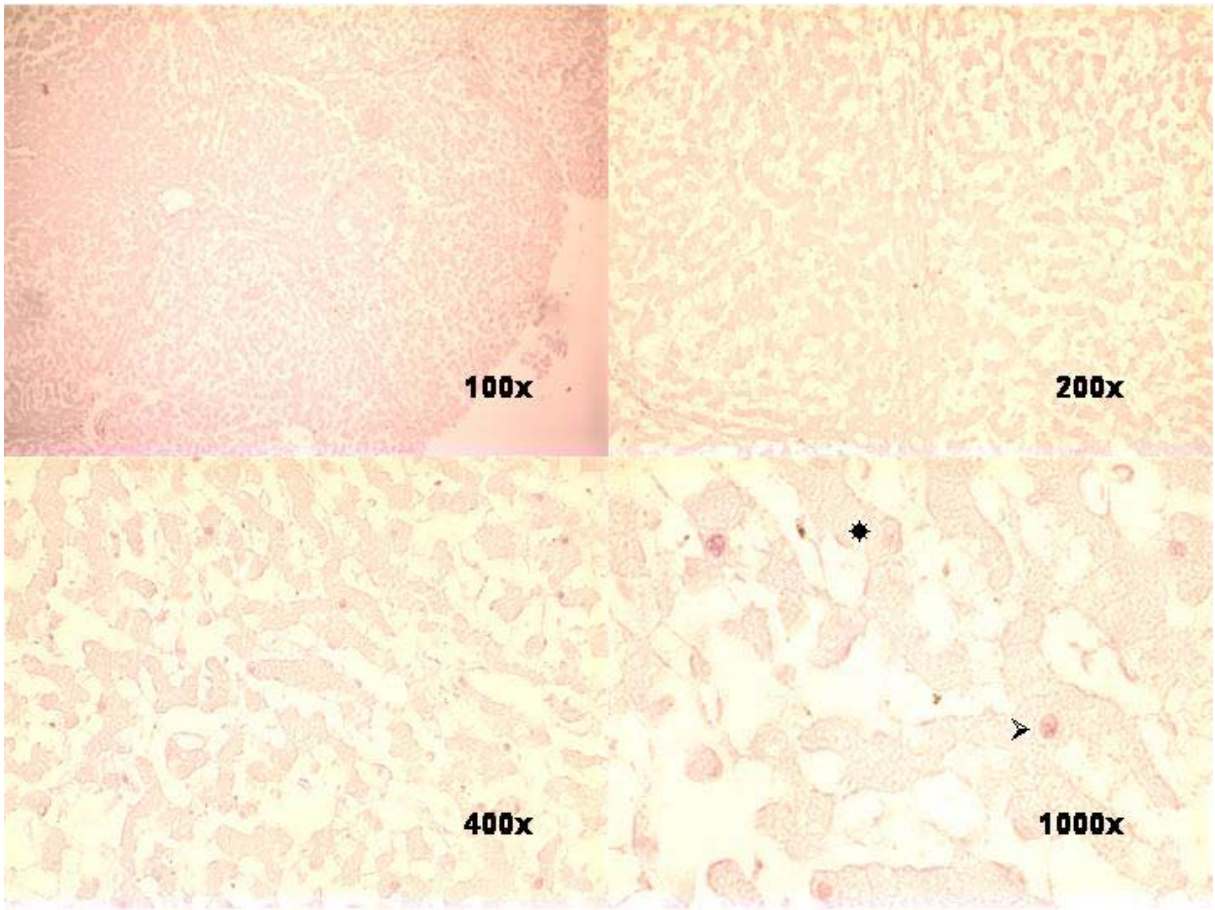

Abb.21: Leberschnitte nach 72 Stunden in 100-, 200-, 400- und 1000-facher Vergrößerung: große konfluierende Nekroseareale, vakuolisiertes Zytoplasma ✸, vereinzelt Kernschatten ➢

4.Diskussion

Leberschnitte werden seit längerer Zeit für metabolische Studien zu Lebertoxizität und Biokinetik von Pharmaka und Toxinen benützt [Parrish et al., 1995]. Ziel der Arbeitsgruppe Xenotransplantation des Instituts für chirurgische Forschung der LMU in München war es, mit Hilfe der „tissue-slices" Studien zur physiologischen Kompatibilität bei Leber-Xenotransplantation durchzuführen. Hierzu sollte zunächst ein Modell für die Langzeitkultur von frischem Lebergewebe entwickelt werden und dann verschiedene Experimente zu Stoffwechsel, hormoneller Regulation etc. durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Fragestellung ist es leider nicht gelungen ein validiertes Modell für die Durchführung dieser Versuche zu etablieren. Die verwendeten Leberschnitte zeigten nach kurzer Zeit im Kultursystem bereits deutliche Anzeichen für Funktionsverlust und Zellnekrose. Unter Berücksichtigung der vorhandenen Literatur über die „tissue-slice"-Technologie und die von uns im Versuch gewonnenen Ergebnisse soll nun eine Analyse über die Schwierigkeiten bei der Kultivierung von Leberschnitten durchgeführt werden.

4.1. Gewebepräparation und Schnittdicke

Ein wesentlicher Faktor für die erfolgreiche Kultivierung von frischen Leberschnitten ist die Gewebepräparation. Die Herstellung homogener und reproduzierbarer Gewebestücke stellt ein erhebliches Problem dar, welches nur durch großen technischen und finanziellen Aufwand gelöst werden kann. Es zeigte sich, dass speziell die Schnittdicke der „tissue-slices" einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben des Frischgewebes hat. Gewebeproben mit einer Schichtdicke von 200 - 250 μm weisen hierbei die besten Vorraussetzungen auf [Parrish A. et al.; 1995]. Es gilt zu Bedenken, dass die Hepatozyten, in Ermangelung einer Blutzirkulation, unter diesen Bedingungen auf die Diffusion von O_2 und Nährstoffen aus dem Kulturmedium zur Deckung ihres Bedarfs angewiesen sind. Je dicker der Gewebeschnitt ist, und damit die Diffusionsstrecke, umso schlechter werden die inneren Schichten des Gewebes, die nicht direkt mit dem Nährmedium in Kontakt stehen, mit Sauerstoff und Metaboliten versorgt. Dies kann unter entsprechender Schnittführung

histologisch sichtbar gemacht werden: bei Leberschnitten, die eine Dicke von 500 µm überschreiten, kann nach Ablauf von 24 Stunden ein Kern von nekrotischem Gewebe, welcher von vitalen Zellen ummantelt wird, beobachtet werden [Olinga et al., 1997; Smith et al., 1985; Campbell et al., 1971]. Elektronenmikroskopische Untersuchen zeigen, dass innerhalb der ersten 24 Stunden der Leberschnitt-Kultur nur geringgradige Veränderungen auftreten: während der ersten vier Stunden sind endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und andere zelluläre Komponenten der Hepatozyten noch gut erhalten, nach acht Stunden zeigt sich eine beginnende vakuoläre Degeneration des Zytoplasmas, bevorzugt perikanalikulär. Nach 24 Stunden finden sich deutliche Veränderungen des Zytoplasma mit grober Vakuolisierung, teils mit Lipiden gefüllt, gestaffeltes raues endoplasmatisches Retikulum, erweiterte Gallenkanalikuli und nekrotische Sinusoidalzellen [Hashemi et al., 1999; Campbell et al., 1971]. Leider war es uns nicht möglich, durch unsere manuelle Schneidetechnik Leberschnitte von derartiger Stärke und in einheitlicher Qualität zu erzeugen. Zum einen zeigte die Dicke, und damit auch die Masse an Hepatozyten, für die ein Soll von 1 mm festgelegt war, eine erhebliche Variabilität. Aus Gründen der Sterilität wurde auf eine Abmessung und Gewichtsbestimmung der einzelnen Stücke verzichtet, diese Beobachtung spiegelt demnach den subjektiven Eindruck wieder und wurde nicht quantifiziert. Zum anderen wurde beim Schneidevorgang ein nicht unerhebliches Maß von Druck auf das Lebergewebe ausgeübt, was zusätzlich die Vitalität der Hepatozyten beeinflusst haben dürfte. Beide Vorraussetzungen, zu große Schnittdicke und gewebetraumatisierende Verarbeitung, lassen sich gut zur Erklärung des beobachteten Funktionsverlustes und Zelluntergangs heranziehen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang gewesen, in der Histologie verschiedene Schnittebenen oder einen Transversalschnitt zu begutachten, um innere und äußere Zelllagen hinsichtlich ihrer Vitalität zu vergleichen. Aus praktischen Gründen erfolgte nur eine zur Grundfläche des Leberschnittes parallele Schnittführung, eine Aussage hinsichtlich der Frage, ob äußere Zellschichten über den Zeitraum des Versuchs ihre Vitalität erhalten konnten, muss somit unbeantwortet bleiben.

4.2. Sauerstoffbedarf und -versorgung

Zum Problem des Sauerstoffbedarfs und der –versorgung von Leberschnitten in Kultur finden sich in der Literatur teils unklare und widersprüchliche Aussagen. Während einige Arbeitgruppen bei hohen Sauerstoffpartialdrücken, bis zu 300 mmHg, im Nährmedium eine optimale Hepatozytenfunktion beobachteten, zeigten andere Versuchsreihen, bei 80-90% O_2-Atmosphäre, die toxischen Effekte einer hohen Sauerstoffladung auf [Drobner et al., 2000; Yanagi et al., 1989; Yanagi et al, 1990]. Da unsere Fragestellung auf die Kompatibilität zweier unterschiedlicher Spezies abzielte, war uns daran gelegen, ein möglichst physiologisches Modell für die Kultur von Leberschnitten zu entwickeln. Unter Normbedingungen sind Hepatozyten, als Folge einer Durchmischung von arteriellem und portalvenösem Blut, einem Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt, der unterhalb des normales arteriellen pO_2 liegt. Wir haben deshalb für unseren Versuch einen pO_2 von ca. 75 mmHg gewählt, der in etwa dem Sauerstoffpartialdruck in der Pfortader entspricht. Die Sauerstoffmenge im Nährmedium während der Versuche auf diesem Niveau zu stabilisieren, stellte dabei ein erhebliches Problem dar, das nur teilweise gelöst werden konnte. Unter Raumluft waren die gemessenen O_2-Partialdrücke zum einen unphysiologisch hoch und zum anderen sehr variabel, gemessene Werte von 116 bis 183,6 mmHg. Nach zahlreichen Vorversuchen wurde das Perfusionssystem in einer 5% O_2-Atmosphäre betrieben, wobei die Sauerstoffpartialdrücke anfänglich auf 108,36 ± 5,57 mmHg reduziert werden konnten. Es war hingegen nicht möglich, den Sauerstoffgehalt des Mediums über den gesamten Versuchszeitraum konstant zu halten. Zum Ende der Perfusion hin, nach 72 Stunden, ist das Niveau deutlich abgesunken. Obwohl keine konstanten Bedingungen hergestellt werden konnten, kann doch argumentiert werden, dass das Lebergewebe während der Experimente in weitgehend physiologischem Milieu kultiviert wurde. Ob der kontinuierliche Abfall des O_2-Partialdrucks eine Auswirkung auf die Vitalität der Leberschnitte hatte, kann nicht beurteilt werden.

Unser Modell unterscheidet sich insofern von der physiologischen Situation, als dass Sauerstoff nicht über Vermittlung von Hämoglobin an die Zellen geliefert wird, sondern direkt, als

physikalisch gelöstes O_2 aus dem Nährmedium entnommen wird. Man kann argumentieren, dass dem Nährmedium dabei eher die Funktion von Extrazellulärflüssigkeit, als von Blut zukommt. Es konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass die optimale Sauerstoffaufnahme durch Lebergewebe bei Sauerstoffspannungen von 30 mmHg in der Extrazellulär-Flüssigkeit stattfindet, welches dem Normwert des extrazellulären Sauerstoffpartialdrucks entspricht. Werte sowohl über, wie etwa in unserem Versuch zwischen 108,36 ± 5,57 mmHg und 65,16 ± 21,16 mmHg, wie auch unter dieser kritischen Sauerstoffspannung führen zu einer verminderten Aufnahme von Sauerstoff in den Gewebeschnitten. Selbst dicke Gewebeschnitte profitieren nicht von höherem pO_2. Hierbei spielen Hämoglobinreste und im Gewebeschnitt verbleibende Erythrozyten, die selbst nach ausgiebiger Spülung des präparierten Gewebestücks fast immer nachzuweisen sind, eine gewichtige Rolle, da sie zu einer noch höheren und damit potentiell toxischen Sauerstoffladung beitragen [Harken et al.; 1977]. Ob das von uns verwendete Modell unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wirklich innerhalb physiologischer Grenzen betrieben wurde oder nicht, kann angesichts der widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur nicht zufrieden stellend geklärt werden.

4.3. Ischämie-Reperfusionsschaden

Im Rahmen der Diskussion um die Sauerstoffversorgung des Gewebes im Versuch stellt sich auch die Frage, ob die bekannten Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens in unserem Modell eine Rolle spielten. Die Erfahrungen mit der Lebertransplantation, insbesondere dem Transplantatversagen und der Haltbarmachung von explantierten Organen, hat die Erforschung des Ischämie-Reperfusionsschadens vorangetrieben. Kontinuierliche Ischämie führt unweigerlich zum Zelltod. Die einzige Möglichkeit, das Überleben der Zelle, sowie die Wiederherstellung ihrer Funktion zu erreichen ist die Reperfusion des Gewebes und damit die Versorgung mit Sauerstoff. Neben diesem einleuchtenden Prinzip ist hingegen weniger bekannt, dass gerade die wiedereinsetzende Perfusion mit erheblichen Risiken für das Gewebe einhergeht. Es wird zunehmend diskutiert, ob nicht etwa die Reperfusion einen größeren Anteil an der Schädigung von

Zellen hat, als die Ischämie selbst. Dabei spielen mehrere Mechanismen eine entscheidende Rolle [Farmer et al., 2000]. Zum einen wird durch den Ausfall der Sauerstoffversorgung, die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien beeinträchtigt, die zellulären ATP-Reserven werden aufgebraucht, die Zelle kann ihre energieverbrauchenden Funktionen nicht mehr aufrecht erhalten. Dies führt unter anderem zum Ausfall der Na^+-K^+-ATPase, konsekutivem Natriumeinstrom in die Zelle und damit sekundärem Zellödem, das als histopathologisches Korrelat diese Veränderung sichtbar macht. Während das Fehlen von O_2 in der Ischämie offensichtlich ist, kann auch nach Reperfusion die Sauerstoffversorgung des Gewebes deutlich eingeschränkt werden: Reperfusion kann zu Epithelzellschäden führen, die Mikrothrombosierung von Kapillaren, und damit mangelhafte Sauerstoffversorgung, nach sich zieht. Interessanterweise scheint speziell die kalte Ischämie die Nicht-Parenchymzellen zu schädigen, während der Hepatozyt besonders sensibel auf warme Ischämie reagiert. Ein essentieller Mechanismus der Zellschädigung scheint hier die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten als Folge von Endothelläsionen zu sein. Insbesondere die Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen aus den Neutrophilen, sowie dem ATP-Abbau durch Xanthinoxidase, vermag Enzyme, Zellmembranen, Proteine, RNA und DNA zu schädigen. Die anfängliche Imbalance durch die Ischämie wird durch diese Mechanismen potenziert, so dass eine viel gravierendere Zellschädigung, als durch Sauerstoffmangel allein, resultiert. Ob und zu welchem Ausmaß diese Mechanismen auf unser Modell zutreffen, kann nicht abschließend beurteilt werden. Bei der Explantation der Leber wurde das Organ mit kalter UW-Lösung gespült und auf Eis gelagert, im Sinne einer kalten Ischämie. Nach der Gewebepräparation, die zwischen 1 und 2 Stunden in Anspruch nahm, wurden die Leberschnitte in das Kultursystem eingebracht. Das Einbringen der Leberstücke in das Kultursystem stellt sicher nur für einen Teil der Hepatozyten eine Reperfusion dar, nämlich dem Anteil, welcher der Diffusion von Sauerstoff zugänglich ist. Der weitaus größere Teil der Zellen, bei der von uns gewählten Schnittdicke, dürfte wohl eher fortgesetzter Ischämie ausgesetzt sein. Mit Sicherheit werden auch verbleibende neutrophile Granulozyten, sowie Endothelzellen von der Ischämie/Reperfusion beeinflusst, da in unserem

Modell die O_2-Versorgung der Hepatozyten aber nicht über ein Gefäßsystem erfolgen, ist anzunehmen, dass diese Mechanismen von eher untergeordneter Rolle sind. So kann z.B. keine Mikrothrombosierung von Kapillaren in unserem blutfreien System erfolgen.

Im Zusammenhang mit der Präparationstechnik, insbesondere der kalten Ischämie nach Explantation der Leber, muss jedoch die Rolle von Kupfferzellen bei der Funktionseinbuße von Hepatozyten diskutiert werden. Sowohl an vollständigen Organen, wie an auf komplexen Matrizes kultivierten Hepatozyten konnte ein Einfluss von sekretorischen Produkten der Kupfferzellen auf die Leberzellfunktion beschrieben werden. Schock, warme Ischämie, sowie kalte Lagerung können zu einer Aktivierung von Kupfferzellen führen, es kommt zu einer Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies, reaktiven Stickstoffspezies, Zytokinen, Eicosanoiden, Leukotrienen, Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Verdauungsenzymen, wie Proteasen, Kollagenasen und Elastasen. Diese Aktivierung von Kupfferzellen könnte durch Zellbestandteile getriggert werden, die aus geschädigten Hepatozyten freigesetzt werden, wie z.B. Proteine oder Zellorganellen. Gesunde Leberzellen können der Flut von Mediatoren effektiv begegnen, es kommt zu keiner weiteren Zellschädigung. Nach Kältelagerung sind die Hepatozyten jedoch metabolisch inhibiert, die Kupfferzell-Mediatoren führen zu einer signifikanten Abnahme der Proteinsekretion, zu Lipidperoxidation, Entzündungreaktionen und mikrovaskulären Schäden bis hin zum Leberversagen [Lindell et al.; 1994]. So kann die Albuminproduktion von Hepatozyten, die auf einer Laminin-reichem Engelbreth-Holm-Swarm Gelmatrix kultiviert werden, durch IL-6, IL-1 und TNF-α reversibel inhibiert werden [Kowalski-Saunders et al.; 1992]. Einige Autoren beschreiben die Kupfferzell-Aktivierung und nicht die Hepatozytenschädigung als Ursache für Leberversagen nach Transplantation. Es wurde außerdem gezeigt, dass keine Relation zwischen Zellintegrität und metabolischer Funktion besteht: Hepatozyten zeigten nur geringes Enzym"leaking" mit größtenteils intakter Zellmembran bei deutlich eingeschränkter Funktion. Interessanter Weise konnte die Proteinproduktion durch Dexamethason konserviert werden. Ob dabei die Inhibierung

von Kupfferzellen, über Blockade von Zytokinsekretion, oder die steroidabhängige Induktion der Gentranskription eine Rolle spielen, kann nicht differenziert werden. Diese Art der Schädigung könnte in unserem Modell durchaus eine Rolle spielen, da die Kupfferzellen stationär im Gewebeschnitt vorhanden sind und ihre Aktivierung nicht von intravaskulär her erfolgen muss.

4.4. Enzymaktivitäten und Zellschädigung

Während des Versuchs kann ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivitäten von LDH, AST/GOT, ALT/GPT beobachtet werden. Sämtliche dieser Enzyme zeigen eine Zellschädigung an, die meisten Autoren verwenden diese Enzymaktivitäten daher zur Beurteilung der Vitalität ihrer Leberschnitt-Kulturen [Drobner et al., 2000; Yanagi et al., 1989; Hashemi et al., 1999]. LDH ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, AST/GOT kommt außer in der Leber auch in Herz- und Skelettmuskel vor. Lediglich ALT/GPT ist ein leberspezifisches Enzym. LDH und ALT sind zytoplasmatische Enzyme, während AST im Zytosol, wie auch in Mitochondrien vorkommt. In der klinischen Medizin wird der Quotient beider Transaminasen AST/ALT, der sog. de Ritis-Quotient, als Marker für die Schwere eines Leberzellschadens herangezogen. Ist der Quotient größer als 0,7 spricht dies für einen schweren Schaden, weil neben ALT auch AST aus Mitochondrien freigesetzt wird, Werte kleiner als 0,7 sprechen hingegen nur für eine zytosolische Schädigung. Die Berechnung der de Ritis-Quotienten unserer Versuchsreihen ergab deutliche Anzeichen für eine schwere Leberzellschädigung. Die höchsten Quotienten zeigen sich zu den Messzeitpunkten 3 und 6 Stunden mit Werten von 15,87 und 22. Nach diesem Zeitpunkt fallen die Quotienten ab und Pendeln sich bis zum Versuchsende auf einem Level zwischen 6,24 und 4,12 ein. Das deutliche Überwiegen der AST/GOT-Aktivität im Vergleich zur ALT/GPT-Aktivität spricht für eine verstärkte Enzymfreisetzung aus den Mitochondrien, und damit eine massive Leberzellschädigung, wie sie etwa bei Pilzvergiftungen oder fulminanter Virushepatitis beobachtet werden kann.

Interessanter Weise werden die Spitzenwerte für LDH sehr viel schneller erreicht, nach 12 Stunden Perfusion, während AST und ALT eher protrahiert ansteigen, mit einem Aktivitätsmaximum bei 24, bzw. 30 Stunden. AST zeigt einen zweizeitigen Verlauf, mit einer ersten Aktivitätsspitze nach 6 Stunden, folgendem Plateau und dann weiterem Anstieg bis 24 Stunden. Das Verhalten der Enzyme ist mit Sicherheit durch sich addierende Effekte verursacht. Zu Anfang wird das Gewebe geschnitten und gedrückt, einige Zellen erleiden ein nicht unerhebliches mechanisches Trauma. Es kommt zur Freisetzung von LDH, AST und ALT. Im weiteren Verlauf findet eine zusätzliche Zellschädigung durch Nekrose, Ischämie-Reperfusions-Mechanismen, Kupfferzell-Mediatoren statt, die zu einer fortgesetzten Freisetzung von zellulären Enzymen führen. Da es Zeit erfordert, bevor diese Mechanismen zu einer Zellschädigung führen können, ist das Verhalten von ALT und AST mit ihrem späten Aktivitätsmaximum sehr gut zu erklären. Das LDH „leaking" scheint hingegen über längeren Zeitraum konstant zu bleiben. Zunächst erfolgt ein früher Anstieg, dann nach 30 Stunden, ebenso wie bei AST und ALT, ein kontinuierlicher Abfall. Diese Beobachtung geht sicher auf die sich erschöpfenden Enzymvorräte zurück, alle nekrotischen Zellen haben bereits sämtliche Enzyme verloren. Ob das unterschiedliche Verhalten von LDH, AST und ALT auf Aspekte wie Molekülgröße, die die Permeation durch die Zellmembran beeinflusst, oder Verankerung am Zytoskelett zurück zu führen ist, kann hier nicht beurteilt werden.

4.5. Proteinstoffwechsel

In diesem Zusammenhang ist auch die Interpretation der gemessenen Proteinwerte interessant. Die Proteinmenge im Perfusat steigt zunächst rapide an, pendelt sich dann auf annähernd konstantem Niveau ein, um dann zu Ende des Versuchs wieder stark abzufallen. Die Zusammenschau mit dem Verhalten der Enzymaktivitäten legt den Schluss nahe, dass die Zunahme der Proteinmenge auf die freigesetzten Enzyme zurückgeht. Die normalerweise intrazellulären Enzyme, werden durch Leckage in das Perfusat abgegeben und dort in der Proteinbestimmung gemessen. Untersuchungen zu Protein- und mRNA-Synthese nach Ischämie-Reperfusion, bzw. Transplantation haben gezeigt,

dass im Rahmen der kalten Ischämie mit nachfolgender warmer Reperfusion, wie im Falle der Transplantation oder annähernd in unserem Modell, die Proteinsynthese, sowie die Produktion von mRNA deutlich über längeren Zeitraum eingeschränkt ist [Schiaffonati et al., 1993]. Im Gegensatz dazu kann bei warmer Ischämie-Reperfusion ein Anstieg der Proteinsekretion, insbesondere von Akut-Phase- und Hitzeschock-Proteinen beobachtet werden. Hierbei scheint das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies, sowie Proteinabbauprodukten einen stimulierenden Einfluss auf die Gentranskription zu haben. Auch die alleinige kalte Ischämie, wie sie z.B. bei der Lagerung von Transplantaten auftritt, zeigt eine erhaltene Protein- und mRNA-Produktion. Die Kombination von kalter Ischämie und warmer Reperfusion hingegen beeinträchtigt die Fähigkeit der Zellen zur Proteinproduktion. Hierbei scheint insbesondere ein Defizit in der Gentranskription verantwortlich zu sein, dessen genauer Mechanismus noch nicht geklärt ist. Die Stabilität der mRNA ist nicht wesentlich verändert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei den von uns gemessenen Proteinen, nicht um neu synthetisiertes Protein, welches einen Beleg für die Funktionalität der Leberschnitte liefern würde, sondern um aus der geschädigten Zelle freigesetztes Protein handelt. Diese Vermutung wird von den Ergebnissen unserer Voruntersuchungen gestützt, bei denen mittels PCR, außer in frischem Lebergewebe, nur geringe Mengen an mRNA für Albumin, β-Actin und Cytochrom P450 nachgewiesen werden konnten (Ergebnisse nicht dargestellt). Ältere Untersuchungen zeigen bereits, dass nach 48 Stunden, je nach Sauerstoffversorgung des Gewebes, bis zu 90% der zellulären RNA degradiert ist, während DNA vergleichsweise lang konserviert bleibt. Histochemisch zeigt sich dieser Verlust an RNA durch abnehmende zytosolische Basophilität in der HE-Färbung. DNA, färberisch als Nucleoli dargestellt, hingegen ist noch deutlich länger nachzuweisen [Campbell et al, 1971]. Diese Beobachtung zum Proteinmetabolismus wird weiterhin von den gemessenen Cholinesterase-Aktivitäten bestätigt. In der klinischen Medizin ist die Cholinesterase ein verlässlicher Marker für die Proteinsynthese der Leber. In unseren Untersuchungen konnten wir fast keine ChE nachweisen, was gegen eine Proteinproduktion in unseren Leberschnitten spricht. Die niedrigen Harnstoffwerte im Perfusat sprechen ferner dafür,

dass auch der Proteinkatabolismus in den Leberschnitten gestört ist. Beim Proteinabbau werden über Aminosäurevorstufen Ammoniak und CO_2 im Harnstoffzyklus zum wasserlöslichen Harnstoff synthetisiert. Der Prozess verbraucht ATP und so ist das Erliegen der Harnstoffproduktion wohl am ehesten mit dem Energiemangel der hypoxischen Leberzellen zu erklären.

4.6. pH-Veränderungen

Der pH-Wert im Perfusionssystem sinkt innerhalb der ersten zwölf Stunden auf 7,13 ab, um sich dann bis zum Ende der Perfusion wieder auf annähernd Ausgangswerte zu bewegen. In diese Betrachtung müssen die pCO_2- und Lactatwerte mit einbezogen werden: beide Kurven zeigen einen etwa spiegelbildlichen Verlauf zum pH. Am Messzeitpunkt 12 Stunden, mit den niedrigsten pH-Werten zeigen sich Maxima von Kohlendioxidpartialdruck und Lactat. Bei höherem pCO_2 löst sich physikalisch mehr CO_2 und kann im Rahmen der Reaktion mit H_20, unter Bildung von Kohlensäure H_2CO_3, Protonen in das Medium abgeben, der pH sinkt. Unklar ist hierbei, ob der CO_2-Anstieg im Medium als Indiz für oxidative Zellatmung gewertet werden kann, oder ob der steigende pCO_2 eher Ausdruck einer langsamen Äquilibrierung mit der Atmosphäre im Inkubator ist, die neben 5% O_2, 90% N_2 auch 5%CO_2 enthielt. Die Kohlendioxidatmosphäre ist nötig um den pH im Nährmedium mittels Bikarbonat HCO_3^- zu stabilisieren. Letztere Annahme scheint eher der Fall zu sein, da im massiven Anstieg des Lactates eine Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel im Hepatozyten gesehen werden kann. Bei anaerober Energiegewinnung wird kein CO_2 frei, es wird vielmehr Pyruvat gebildet, welches unter Einwirkung der Lactatdehydrogenase zu Lactat wird. Lactat und Pyruvat stehen über einen NADH-abhängigen Mechanismus im Gleichgewicht, unter physiologischen Bedingungen mit Konzentrationsverhältnissen von 10 – 20 : 1 auf Seiten des Lactats. Dieses System wird über den intrazellulären NADH-Gehalt reguliert, ein steigendes Lactat bedeutet erhöhtes intrazelluläres NADH [Tobin et al., 1971]. Pyruvat wird hepatisch über den Citratzyklus abgebaut, während Lactat in die Gluconeogenese eingespeist wird. Unter hypoxischen

Bedingungen ist die aerobe Oxidation von Pyruvat im Citratzyklus, so wie die glykolytische Reduktion von Pyruvat zu Lactat gestört. Pyruvat und Lactat akkumulieren, der Umsatz des Citratzyklus nimmt ab, Acetyl-CoA und Ketonkörper fallen vermehrt an. Über das Zusammenwirken mehrerer Faktoren kommt eine Anhäufung von H^+-Ionen zustande, es entsteht eine Laktatazidose. Unter besonderen Bedingungen kann dieser Prozess, selbst bei wieder einsetzender Sauerstoffversorgung, irreversibel werden und zum Zelltod führen. Das Verhalten von pH und Lactat während des Versuchs kann durchaus in Einklang mit dem fortschreitenden Prozess der Ischämie und konsekutiven Zellnekrose gebracht werden. Es bleibt zu diskutieren, ob durch diese pH-Änderung die Funktion noch intakter oder nur minimal geschädigter Zellen negativ beeinflusst wird.

4.7.Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Auswertung der von uns durchgeführten Versuchsreihe zeigt, dass es uns nicht gelungen ist ein validiertes System für die Kultur von Leberschnitten zu etablieren. Die präparierten Gewebeschnitte zeigten bereits nach Ablauf von 24 Stunden in Kultur deutliche Anzeichen für Funktionsverlust und Zellnekrose. Dabei deckt sich unsere Beobachtung mit vielen ähnlichen Ergebnissen in der aufgeführten Literatur. Aus den diskutierten Punkten geht deutlich hervor, dass die Kultivierung von Lebergewebe eine komplexe Angelegenheit darstellt: von einigen bereits gut erforschten Grundlagen, wie etwa dem Einfluss von Schnittdicke auf die Überlebensfähigkeit des Gewebes, über größtenteils noch nicht oder nur teilweise geklärte Aspekte, wie etwa die optimale Sauerstoffversorgung von Leberschnitten, die in der Literatur teils widersprüchlich behandelt werden, gilt es eine Vielzahl von Parametern zu beachten und im Kultursystem richtig zu simulieren. Trotz ausgiebiger Literaturrecherche und Kommunikation mit in der Gewebekultur erfahrenen Arbeitsgruppen ist es offenbar nicht gelungen alle Vorraussetzungen für die erfolgreiche Kultivierung von Leberschnitten in unserem Modell zu schaffen. Dabei muss aber beachtet werden, dass sich die von uns verfolgten Ziele teils erheblich von denjenigen Arbeitsgruppen

unterscheiden, die „erfolgreich“ mit Leberschnitt-Kulturen arbeiten. Die tissue-slice Technik findet in der pharmakologischen und toxikologischen Forschung reiche Anwendung, hierbei werden vorwiegend metabolische Studien zu Pharmaka und Toxinen betrieben, für deren Durchführung ein Überleben und Funktionieren der kultivierten Leberschnitte von wenigen Stunden ausreicht. Auch diesen Gruppen ist es nicht gelungen, die Funktion der Leberschnitte über 24 Stunden hinaus zu konservieren. Für unsere Studien, die umfassende Untersuchungen zur Physiologie bei Leber-Xenotransplantation beinhalten sollten, wäre ein Modell wünschenswert gewesen, welches eine Langzeitkultur von Leberschnitten möglich macht. Dabei sollte das porcine Gewebe zunächst die Möglichkeit haben, sich von Explantation, Ischämie und Präparation zu erholen, um Reaktion in dieser Stressphase nicht als physiologische Antworten misszuverstehen. Es war weiterhin geplant, selektiv humane Metaboliten, wie Lipoproteine oder Hormone, in das System einzuführen, um deren Kompatibilität mit dem Schweineorgan zu untersuchen. Hierbei hätten Analysen zur Genexpression in der Leber interessante Ergebnisse liefern können, ein Vorgang der allerdings eine gewisse Überlebenszeit und Funktionalität des untersuchten Gewebes erfordert. Trotz der vielen Schwierigkeiten und auch der fragwürdigen Durchführbarkeit der Xenotransplantation, scheint es lohnend die in-vitro Kultur von Leberschnitten weiter zu erforschen. Hier bietet sich die Möglichkeit für Grundlagenforschung zur Leberphysiologie, wie auch zu spezialisiert klinischen Fragestellungen z.B. im Rahmen der Organtransplantation oder Hepatitis. Die medizinische Wissenschaft macht rasante Fortschritte und vielleicht ermöglichen es uns neue Erkenntnisse und Technologien bereits in Kürze ein so komplexes und faszinierendes Organ wie die Leber im Labor zu simulieren.

LITERATURVERZEICHNIS

Adham M, Ducerf C, Vernet M, Rigal D, De la Roche E, Bizollon T, Taibi A, Pouyet M, Baulieux J; Changes in serum proteins during isolated pig liver xenoperfusion; Transplantation Proceedings, 29: 3015; 1997

Bradford MM; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; Analytical Biochemistry, 72: 248-254; 1976

Campbell AK, Hales CN; Maintenance of viable cells in an organ culture of mature rat liver; Experimental Cell Research, 68:. 33-42; 1971

Candinas D, Seebach JD; Mechanismen der Xenotransplantatabstoßung; Zentralblatt für Chirurgie, 124:. 591-599; 1999

Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KGC, Zaidi A, Bradley JR, Thiru S, Goddard M, Vial C, Ostlie D, Wallwork J, White DJG, Friend PJ; Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts; Transplantation, 70/1:.15-21, 2000

Donato MT, Castell JV, Gómez-Lechón MJ; Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models; Journal of Hepatology, 31: 542-549, 1999

Drobner C, Glöckner R, Müller D; Optimal oxygen tension conditions for viability and functioning of precision-cut liver slices; Experimental Toxicological Pathology, 52: 335-338; 2000

Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski J, Busuttil RW; Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver; Transplantation Reviews, 14: 106-126; 2000

Frederiks WM, Fronik GM, Hesseling JMG; A method for quantitative analysis of the extent of necrosis in ischemic rat liver; Experimental and Molecular Pathology; 41:119-125; 1984

Hammer CR; Nature's obstacles to xenotransplantation; Transplantation Reviews, 8/4: 174-184; 1994

Hammer CR; Xenotransplantation: Wo führt sie hin? Zentralblatt für Chirurgie, 123: 779-780; 1998

Harken AH, Lillo RS, Haut MJ; The depressant influence of extracellular fluid hyperoxia on liver slice oxygen uptake; J Lab Clin Med; 89: 1269-1277; 1977

Hashemi E, Dobrota M, Till C, Ioannides C; Structural and functional integrity of precision-cut liver slices in xenobiotic metabolism: a comparison of the dynamic organ and multiwell plate culture procedures; Xenobiotica, 29/1: 11-25, 1999

Kloth S, Gerdes J, Wanke C, Minuth WW; Basic fibroblast growth factor is a morphogenic modulator in kidney vessel development; Kidney International, 53: 970-978, 1998

Kobayashi T, Taniguchi S, Ye Y, Niekrasz M, Nour B, Cooper DKC; Comparison of bile chemistry between humans, baboons and pigs: implications for clinical and experimental liver xenotransplantation; Laboratory Animal Science, 48/2: 197-200, 1998

Kowalski-Saunders PWJ, Winwood PJ, Arthur MJP, Wright R; Reversible Inhibition of albumin production by rat hepatocytes maintained on a laminin-rich gel (Engelbreth-Holm-Swarm) in response to secretory products of Kupffer cells and cytokines; Hepatology; 16: 733-741; 1992

Lindell SL, Southard JH, Vreugdenhil P, Belzer FO; Kupffer cells depress hepatocyte protein synthesis on cold storage of the rat liver; Transplantation; 58: 869-874; 1994

Minuth W, Steiner P, Strehl R, Schumacher K, de Vries U, Kloth S; Modulation of Cell Differentiation in Perfusion Culture; Experimental Nephrology, 7: 394-406, 1999

Minuth WW, Steiner P, Strehl R, Kloth S, Tauc M; Electrolyte environment modulates differentiation in embryonic renal collecting duct epithelia; Experimental Nephrology, 5: 414-422, 1997

Munitiz V, Ramirez P, Hernandez Q, Loba M, Chavez R, Muñoz A, Rios A, Minguela A, Parrilla P ; Transplantation Proceedings, 31: 2641-2642 ; 1999

Olinga P, Groen K, Hof I, De Kanter R, Koster H, Leeman W, Rutten A, Twillert K, Groothuis G; Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters; Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 38: 59-69, 1997

Ota K, Saito S, Hamasaki K, Tanaka N, Orita K; Transplantation of xenogeneic hepatocytes: three-dimensionally cultured hepatocyte (spheroid) transplantation into the spleen; Transplantation Proceedings, 28/3: 1430-1432, 1996

Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K; Precision-cut tissue slices: Applications in Pharmacology and Toxicology; Life Sciences, 57: 1887-1901; 1995

Pöhlein C, Pascher A, Baumann P, Abendroth D, Jochum M, White DJG, Hammer C; Transgenic porcine livers reduce liberation of humoral mediators during xenoperfusion with human blood; Transplantation Proceedings, 28/2: 772-774, 1996

Pöhlein C, Pascher A, Storck M, Young VK, König W, Abendroth D, Wick M, Thiery J, White DJG, Hammer C; The function of transgenic human DAF-expressing porcine livers during hemoperfusion with human blood; Transplantation International, 9/Supp. 1: 392-396, 1996

Ramirez P, Chavez R, Majado M, Munitiz V, Muñoz A, Hernandez Q, G-Palenciano C, Pino-Chavez G, Loba M, Minguela A, Yelamos J, Gago MR, Vizcaino AS, Asensi H, Cayuela MG, Segura B, Marin F, Rubio A, Fuente T, Robles R, Bueno FS, Sansano T, Acosta F, Rodriguez JM, Navarro F, Cabezuelo J, Cozzi E, White DJG, Calne RY, Parrilla P; Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days; Transplantation, 70/7: 989-998; 2000

Schiaffonati L, Cairo G, Tacchini L, Pappalardo C, Gatti S, Piazzini-Albani A, Bernelli-Zazzera A; Protein synthesis and gene expression in transplanted and postischemic livers; Transplantation, 55: 977-982, 1993

Sittinger M, Schultz O, Keyszer G, Minuth WW, Burmester GR; Artificial tissues in perfusion culture; The International Journal of Artificial Organs, 20/1: 57-62, 1997

Smith PF, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Putnam CW, Zukoski CF, Davis WM, Brendel K; Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology; Life Sciences, 36:1367-1375; 1985

Starzl TE, Fung J, Tsakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, Kusne S, Rudert WA, Trucco M; Baboon-to-human liver transplantation; The Lancet, 341: 65-71, 1993

Stoye JP, Le Tissier P, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA; Endogenous retroviruses: a potential problem for xenotransplantation? Annals New York Academy of Sciences, 862: 67-74; 1998

Takahashi M, Matsue H, Matsushita M, Sato K, Nishikawa M, Koike M, Noto H, Nakajima Y, Uchino J, Komai T, Hashimura E; Does a porcine hepatocyte hybrid artificial liver prolong the survival time of anhepatic rabbits?; ASAIO Journal, 38: 468-472, 1992

Te Velde A, Ladiges N, Flendrig L, Chamuleau R; Functional activity of isolated pig hepatocytes attached to different extracellular matrix substrates. Implication for application of pig hepatocytes in a bioartificial liver; Journal of Hepatology, 23: 184-192, 1995

Tobin RB, Mehlman MA; pH effects on O2 consumption and on lactate and pyruvate production by liver slices; American Journal of Physiology; 221: 1151-1155; 1971

Williams GM, Weisburger EK und Weisburger JH; Isolation and long-term cell culture of epithelial-like cells from rat liver; Experimental Cell-Research, 69: 106; 1971

Yanagi K, Ookawa K, Mizuno S, Ohshima N; Performance of a new hybrid artificial liver support system using hepatocytes entrapped within a hydrogel; ASAIO Transactions, 35: 570-572, 1989

Yanagi K, Mizuno S, Ohshima N; A high density culture of hepatocytes using a reticulated polyvinyl formol resin; ASAIO Transactions, 36: 727-729, 1990

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
ALT	Alanin-Aminotransferase (siehe auch GPT)
AST	Aspartat-Aminotransferase (siehe auch GOT)
ATP	Adenosintriphosphat
ChE	Pseudocholinesterase
CO_2	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
GlDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetattransaminase (siehe auch AST)
GPT	Glutamat-Pyruvattransaminase (siehe auch ALT)
H_2CO_3	Kohlensäure
HCO_3^-	Bikarbonat-Ion
IE	Internationale Einheiten
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
KG	Körpergewicht
LDH	Lactatdehydrogenase
MDH	Malatdehydrogenase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N_2	Stickstoff
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
$NADH/H^+$	reduziertes NAD^+

NH_4^+	Ammonium-Ion
O_2	Sauerstoff
pCO_2	Kohlendioxidpartialdruck
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Ionen-Konzentration
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonukleinsäure
TNF-a	Tumor-Nekrose-Faktor α
UW	University of Wisconsin
WE	Williams E-Medium

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Nummer		*Seite*
Abb.1	Zeitablauf der Perfusionsexperimente	17
Abb.2	OP-Situs mit kannülierter Pfortader	20
Abb.3	Schneideapparatur	22
Abb.4	Leberschnitte, Nitrocellulosemembran, Gewebehalterung	23
Abb.5	Minuth-Perfusionssystem *	26
Abb.6	Minuth-Kammer *	26
Abb.7	Williams E-Medium	27/28
Abb.8	pH-Werte	34
Abb.9	pO_2- und pCO_2-Partialdrücke	35
Abb.10	Lactatwerte	36
Abb.11	LDH-Aktivitäten	37
Abb.12	AST/GOT-Aktivitäten	38
Abb.13	ALT/GPT-Aktivitäten	39
Abb.14	de Ritis-Quotienten	39
Abb.15	Cholinesterase-Aktivitäten	40
Abb.16	Proteingehalt	41
Abb.17	Harnstoffgehalt	41
Abb.18	Histologie Frischgewebe	42
Abb.19	Histologie nach 24 Stunden Perfusion	43
Abb.20	Histologie nach 48 Stunden Perfusion	44
Abb.21	Histologie nach 72 Stunden Perfusion	45

* mit freundlicher Genehmigung von W.Minuth

DANKSAGUNGEN/WIDMUNGEN

Der Autor bedankt sich bei Herrn Prof.Dr.med.Dr.med.vet. Claus Hammer für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, sowie die ausgezeichnete Betreuung, bei Herrn Prof.Dr.med.Drs.h.c.mult. Konrad Meßmer für die Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung, bei Herrn Dr.med.vet. Eckhart Thein für die Hilfe bei der operativen Tätigkeit und die vielen wissenschaftlichen Ratschläge, sowie bei Frau Anne-Marie Allmeling für die Einarbeitung in sämtliche Labortechniken, ihre tatkräftige Mithilfe bei der Durchführung der Versuche, sowie den Einsatz ihrer langjährigen Erfahrung, die sehr zum Gelingen dieser Versuche beigetragen haben.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern Günter und Jutta Borscheid, denen ich vieles zu verdanken habe und die mich stets uneingeschränkt auf meinem Lebens- und Studienweg unterstützt und begleitet haben.

ABSTRACT

Die enormen Fortschritte und Erfolge im Bereich der Organtransplantation werden heute durch den zunehmenden Mangel an Spenderorganen relativiert. Angesichts dieser Krise gilt es nach kreativen Lösungen zu suchen. Die Arbeitsgruppe Xenotransplantation des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU in München beschäftigt sich schon seit über dreißig Jahren mit der Frage, ob Tierorgane so modifiziert werden können, dass sie als Transplantat im Menschen dienlich sein können. Neben den Problemen der Immunologie wurde die Frage nach der physiologischen Kompatibilität bis jetzt nur sehr unzureichend untersucht. Hierbei wirft die Leber als zentrales Stoffwechselorgan die größten Schwierigkeiten auf. Macht es überhaupt Sinn ein Tierorgan zu transplantieren? Kann eine artfremde Leber überhaupt mit humanen Molekülen und Hormonen arbeiten? Wie wirken sich die tierischen Syntheseprodukte auf den menschlichen Organismus aus? Um diese Fragen zu klären sollte zunächst ein Modell für die in-vitro Kultivierung von Leber etabliert werden. In der Literatur findet die Verwendung von frischen Leberschnitten eine breite Anwendung für eine Vielzahl von Fragestellungen. Wir entschieden uns daher für diese Technik in Kombination mit einem Perfusionskultursystem nach Minuth, welches erfolgreich für Gewebekulturen eingesetzt wird. Für die Gewebegewinnung wurden Schweinelebern explantiert, mit handelsüblicher UW-Lösung gespült und dann in dünne Scheiben geschnitten, die in das Minuth-System eingebracht wurden. Die Leberschnitte wurden bei 37°C und 5% O_2-Begasung über einen Zeitraum von 72 Stunden kultiviert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Perfusatproben aus dem System entnommen und auf pH, pO_2, pCO_2, Enzymaktivitäten, Proteinsekretion und Harnstoffsynthese untersucht. Gewebeproben wurden nach 24, 48 und 72 Stunden entnommen und histologisch untersucht. Es gelang nicht die Leberschnitte über den Versuchszeitraum vital zu erhalten, die Auswertung der Ergebnisse zeigte einen zunehmenden Funktionsverlust und Zelltod des Gewebes auf.

LEBENSLAUF

René Günther Léon Borscheid

geboren am 06.04.1976 in Bobingen

Eltern: Günter Borscheid; Pilot
Jutta Borscheid, geb. Smoczek; Radiologisch-Technische Assistentin

Ausbildung:

1982 - 1983	Grundschule Woringen, Woringen
1983 - 1985	Deutsche Grundschule Sheppard, Wichita Falls, Texas, USA
1985 - 1986	Theodor-Heuss Grundschule, Memmingen
1986 - 1995	Gymnasium der Salesianer Don Boscos, Buxheim
1996 - 2003	Medizinstudium Ludwig-Maximilians-Universität, München,

Berufliche Tätigkeit:

07/2003 - 05/2004	Arzt im Praktikum an der Unfallchirurgischen Abteilung des Krankenhauses Dritter Orden, München
seit 07/2004	Chirurgischer Assistenzarzt an der Yale University, New Haven, Connecticut, USA