

**Entwicklung und Charakterisierung eines
24Well-Mini-Bioreaktors mit
sauerstoffpermeablem Membranboden für
pharmakologisches *in vitro*-Screening an
primären Zellen**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biotechnol. Angelika Langsch
geboren am 24.09.1973 in Bad Harzburg

2002

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. med. Augustinus Bader

Tag der Promotion: 6. November 2002

Datum der Veröffentlichung: November 2002

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Medizinischen Hochschule Hannover in Kooperation mit der Fa. Genedrugs GmbH unter der Leitung von Prof. Dr. Augustinus Bader.

Bei Prof. Bader möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas, die zahlreichen kreativen Ideen und die Möglichkeit zum sehr selbständigen Arbeiten bedanken. Besonderer Dank gilt ihm und Herrn Rüdiger von der Fecht für die Konstruktion und Realisierung des Bioreaktors.

Herrn Prof. Scheper danke ich für die Übernahme des Referats und Frau Dr. Kasper für die konstruktive Korrektur der Arbeit.

Für die Bereitstellung von Laborräumen und –geräten und seine stete Unterstützung in Verwaltungsfragen danke ich Herrn Prof. Galanski, der trotz des Umzugs von Prof. Bader die Beendigung der Arbeit in Hannover ermöglichte.

Für ihr Interesse an meiner Arbeit und besonders die vielen hilfreichen Diskussionen möchte ich Inka Jasmund danken.

Herrn Dr. Hauschild danke ich für die Organentnahmen aus den Schweinen im Tier-OP.

Bei Corinna Mauth und Dr. Lothar Just aus der AG Bader an der GBF in Braunschweig bedanke ich mich für die Kultivierung und Bereitstellung der Daten von Neuronen.

Für die Isolierung von Cardiomyozyten möchte ich Payam Akhyari und Panagiotis Theodorow aus der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der MHH danken.

Für die Durchführung vieler HPLC-Analysen und ihre große Hilfsbereitschaft danke ich Ingrid Schmidt-Richter. Auch den Mitarbeitern der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie gilt mein Dank für die Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich zahlreichen weiteren Personen im Tier-OP, in den Forschungswerkstätten und der Glasbläserei sowie den Mitgliedern der eigenen Arbeitsgruppe für ihr Mitwirken und ihre Unterstützung danken.

Tagungsbeiträge

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden aus Prioritätsgründen bereits bei einigen Tagungen vorgestellt:

Langsch A, Jasmund I, Sievers H, Bader A. Pharmacological Screening with primary cells in a novel bioreactor. *Int J Artif Organs*: 25(7), 683 (87)

Vortrag: XXIX ESAO Congress, Wien, Österreich, 28.-31. August 2002

Langsch A, Schmidt-Richter I, Bader A. Novel Bioreactor for Pharmaceutical Screening on Primary Cells. *Tissue Engineering*: 7(5), 616 (O-23)

Vortrag: 1st Biennial Conference of the ETES, Freiburg, 7.-10. November 2001

Langsch A, Sievers H, Bader A. Pharmaceutical Screening on Primary Hepatocytes in a Mini-Bioreactor.

Vortrag: 9th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, 7.-10. Oktober 2001

Langsch A, Sievers H, Bader A. Small Scale Bioreactor to Perform Pharmaceutical Screening. *Int J Artif Organs*: 24(8), 556 (97)

Vortrag: XXVIII EASO Congress, Gent, Belgien, 22.-25. September 2001

Langsch A. Bioreactor for Primary Cells to Perform Pharmaceutical Screening.

Vortrag: 5th ICCE, Aachen, 04.-06. Juli 2001

Langsch A, Schmidt-Richter I, Bader A. Bioreactor for Pharmaceutical Screening Generally Applicable for Primary Cells. *ESACT PROCEEDINGS, Volume 1: Animal Cell Technology: From Target to Market, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0264-5*

Poster mit Buchbeitrag: 17th ESACT Meeting 2001, Tylösand, Schweden 10.-14. Juni 2001

Zusammenfassung

Viele Pharmaka besitzen eine Reihe von Wechsel- und Nebenwirkungen, die zur Zeit hauptsächlich in Tierversuchen untersucht werden. Diese sind nicht nur gesellschaftlich umstritten, es kann auch zu Unterschieden zwischen der Reaktion des Testtieres und dem Menschen kommen, sogenannten Interspeziesdifferenzen, welche die Aussagen über die zu erwartenden Wirkungen beim Menschen erschweren. Eine moderne Alternative ist die Durchführung von Pharmascreeings *in vitro* an primären humanen Zellen. Ihre Reaktion auf einen Wirkstoff kann schneller, genauer und kostengünstiger Aufschluss über das Wirkungspotential eines Medikaments geben.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung eines Mini-Bioreaktors zum pharmakologischen *in vitro*-Screening. Er besitzt die Dimensionen einer herkömmlichen 24Well-Zellkultur-Platte, deren Bodenfläche durch eine gaspermeable Membran ersetzt wurde. Damit ist es möglich, die darauf kultivierten Zellen definierten Sauerstoffbedingungen auszusetzen. Der Bioreaktor erlaubt die Kultivierung verschiedener primärer Zellen. In dieser Arbeit wurden Endothelien, Fibroblasten, Cardiomyozyten, Chondrozyten, Neuronen und Hepatozyten untersucht. Da die Leber das Hauptstoffwechselorgan des Körpers ist, wurde die Hepatozytenkultur ausführlicher betrachtet. Für die Validierung des Systems wurden wegen der leichteren Verfügbarkeit porcine Hepatozyten verwendet. Diese zeigen über einen Zeitraum von zwei Wochen im Bioreaktor stärkere gewebespezifische Leistungen und eine bessere Differenzierung als bei der Kultivierung in herkömmlichen Systemen.

Ein Modellscreening mit Johanniskraut zeigt, dass die Hepatozyten in der Lage sind, Wechselwirkungen in Form einer Enzyminduktion wirkstoffabhängig anzuzeigen. Es wurden Unterschiede in den Wechselwirkungen verschiedener Präparationen der selben Substanz bestimmt und eine gute *in vivo/in vitro*-Korrelation gezeigt. Damit ist der Bioreaktor sehr gut für ein pharmakologisches Screening geeignet.

Mit Hilfe der gaspermeablen Membran können die Zellen definierten Gasbedingungen ausgesetzt werden. Die Hepatozyten zeigten bei der Kultivierung mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen eine der *in vivo*-Zonierung entsprechende Anpassung in periportales und perivenöses Verhalten. Ein Screening mit dem Antioxidantium Vitamin C als Wirkstoff bei künstlich erzeugtem oxidativen Stress führte ebenfalls zu *in vivo*-entsprechenden Ergebnissen. Damit ist der entwickelte Bioreaktor nicht nur für ein pharmakologisches Screening von neuen Wirkstoffen, sondern auch für die Untersuchung der Zellschädigung und –alterung durch oxidativen Stress sowie das Screening potentieller neuer Antioxidantien geeignet.

Ein Einfrierprogramm ermöglicht die Kryokonservierung der Zellen im Bioreaktor unter Erhalt der organospezifischen Eigenschaften. Damit ist die Unabhängigkeit des Bioreaktors von Zellisolationen gewährleistet.

Stichworte: 24Well-Bioreaktor, primäre Zellen, pharmakologisches *in vitro*-Screening

Abstract

Most drugs possess a range of interactions and side effects, which are currently mainly investigated in animal experiments. These are not only controversially assessed, but also differences in the reaction of test animals and men occur. The so-called interspecies differences make predications of the effects to be expected in men more difficult. A modern alternative is the use of *in vitro* screenings with primary human cells. Their reactions to a drug can lead to faster, more precise and more cost effective information of its effects.

This thesis describes the development and characterization of a mini-bioreactor for pharmacological *in vitro* screenings. It has the dimensions of a conventional 24well-plate, the bottom of which is replaced by a gaspermeable membrane. Hence, cells cultivated on it can be exposed to exactly defined oxygen conditions. The bioreactor is generally applicable for the cultivation of numerous kinds of primary cells. In this thesis endothelial cells, fibroblasts, cardiomyocytes, chondrocytes, neurons, and hepatocytes were examined. Since the liver is the body's main organ of metabolism, hepatocytes were studied in more detail. For the validation of the system porcine hepatocytes were used because of better availability. Compared to cells cultivated in conventional systems the hepatocytes show stronger organ specific performances and a better differentiation in the bioreactor for a period of two weeks.

A model screening with St. John's Wort showed, that the cells are able to distinguish drug-drug-interactions in form of an enzyme induction in a compound dependent way. Differences in the interaction of different preparations of the same drug were found, showing a good *in vivo/in vitro* correlation. This makes the bioreactor highly suitable for a pharmacological screening.

The gaspermeable membrane allows the exposure of the cells to exactly defined gas conditions. Cultivated at different oxygen concentrations the hepatocytes exhibit an adaption to periportal and perivenous characteristics, reflecting the *in vivo* zonation. A screening with the antioxidant Vitamin C as drug for artificially generated oxidative stress also revealed *in vivo*-corresponding results. Therefore, the bioreactor is not only suitable for a pharmacological screening of new drugs but also for investigations of cell damage and cell aging by oxidative stress and screenings of potential new antioxidants.

A cryopreservation method allows to store the cells frozen in the bioreactor while preserving their organ specific properties, making the bioreactor independent from cell isolations.

Key Words: 24well-bioreactor, primary cells, pharmacological *in vitro*-screening

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
	Aufgabenstellung und Zielsetzung	3
2	THEORETISCHER HINTERGRUND	5
2.1	Die Leber	5
2.1.1	Aufbau der Leber	5
2.1.2	Aufgaben der Leber	7
2.1.3	Biotransformation	8
2.1.4	Leberbioreaktoren	11
2.2	Pharmakologisches Screening <i>in vitro</i>	13
2.2.1	Rekombinante Enzyme	13
2.2.2	Subzelluläre Fraktionen	14
2.2.3	Leberschnitte	14
2.2.4	Hepatozyten	15
2.2.5	DNA-Microarrays	17
2.3	Johanniskraut	17
2.4	Oxidativer Stress	19
2.4.1	Antioxidantien	20
2.4.2	Vitamin C	21
2.5	Kryokonservierung	22
2.5.1	Schädigungsmechanismen	22
2.5.2	Kryoadditive	23
2.5.3	Kryokonservierung von Leberzellen	24
2.5.4	Mathematische Modellierung des Temperaturverlaufs an der Zellschicht	25
3	DER BIOREAKTOR.....	28
3.1	Aufbau	28
3.2	Anforderungen und Eigenschaften	30
4	MATERIAL UND METHODEN	31
4.1	Zellisolationen, Kultivierungen und Färbungen	31
4.1.1	Kollagen-Extraktion	31
4.1.2	Hepatozyten	32
4.1.3	Endothelien	34
4.1.4	Fibroblasten	35
4.1.5	Chondrozyten	35
4.1.6	Cardiomyozyten	37
4.1.7	Nervenzellen	38
4.2	Analytik	39
4.2.1	Zellzahlbestimmung	39
4.2.2	Albumin	39
4.2.3	Harnstoff	41
4.2.4	Glucose	42
4.2.5	Laktat	42
4.2.6	LDH	43
4.2.7	EROD und ECOD	44
4.2.8	Diazepam	45
4.2.9	UGT und ST	48

4.2.10	Induktionen.....	50
4.3	Screening mit Johanniskraut.....	50
4.3.1	Johanniskrautpräparate.....	51
4.3.2	Versuchseinteilung.....	52
4.4	Oxidativer Stress.....	53
4.5	Kryokonservierung.....	53
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	56
5.1	Exemplarische Darstellung der Anwendbarkeit zur Kultivierung verschiedener Zellen im Bioreaktor.....	56
5.1.1	Ergebnisse.....	56
5.1.2	Diskussion.....	59
5.2	Untersuchung zur Erbringung gewebespezifischer Leistungen der Leberzellen.....	60
5.2.1	Ergebnisse.....	60
5.2.2	Diskussion.....	68
5.3	Modellscreening mit Johanniskraut (<i>Hypericum perforatum</i>).....	73
5.3.1	Ergebnisse.....	73
5.3.2	Diskussion.....	81
5.4	Screening von Antioxidantien bei oxidativem Stress.....	85
5.4.1	Ergebnisse.....	85
5.4.2	Diskussion.....	98
5.5	Kryokonservierung.....	103
5.5.1	Ergebnisse.....	103
5.5.2	Diskussion.....	113
5.6	Eignung des Bioreaktors.....	117
6	AUSBLICK.....	119
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	121
8	ANHANG.....	136
8.1	Geräte.....	136
8.2	Materialien.....	137
8.3	Chemikalien.....	138
8.4	Antikörper für Histochemie.....	140
8.5	Isolierung der Cardiomyozyten.....	141
8.6	Stoffdaten für das Kryomodell.....	141

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BR	Bioreaktor
BSA	Bovines Serum Albumin
CYP	Cytochrome P450
DAB	Di-Amino-Benzidine
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DC	Dicumarol
DEX	Dexamethason
DHA	Dehydroascorbinsäure
DMD	Desmethyldiazepam
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DIF	HybridoMed DIF 1000-Medium
EC	Ethoxycoumarin
ECOD	Ethoxycoumarin-O-Deethylase
EGM	Endothelial Cell Growth Medium
EGTA	Ethylene Glycol-bis(β -Aminoethyl Ether)N,N,N',N',-Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Ethoxyresorufin
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylase
EZR	Extrazellularraum
FCS	Fötales Kälber Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FMB	Flachmembranbioreaktor
Glu	β -Glucuronidase
Gly	Glycinpuffer
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HES	Hydroxyethylenstärke
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IZR	Intrazellularraum
LDH	Laktat-Dehydrogenase
3-MC	3-Methylcholanthren
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	Methylumbelliferon-7-glucuronid
4-MUS	Methylumbelliferon-7-sulfat

PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PB	Phenobarbital
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Rif	Rifampicin
ROS	reactive oxygen species / reaktive Sauerstoffverbindung
rpm	rotations per minute / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
ST	Sulfotransferase
TEA	Triethylamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TPBS	Tween Phosphate Buffered Saline
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
U	Unit [1 U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$]
UDP	Uridin-diphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
WE	William's Medium E
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Zulassung eines neuen Arzneiwirkstoffs setzt die genaue Kenntnis des Metabolismus beim Menschen und der Wirkung der Metabolite hinsichtlich erwünschter und unerwünschter Effekte voraus. Diese Informationen sind für die Beurteilung weiterer pharmakokinetischer Parameter wie Wechsel- und Nebenwirkungen sowie der akuten und chronischen Toxizität von entscheidender Bedeutung. So schreiben die Allgemeinen Verwaltungsvorschriften zur Anwendung der Arzneimittelpflichtlinien vom 14. Dezember 1989 (B Anz Nr. 243a) im Anhang (Abschnitt 4C) vor, dass untersucht werden soll:

- ob ein Stoff metabolisiert wird,
- ob die Wirkung eines Stoffes auf seine eigene Wirkung oder die Wirkung von Metaboliten zurückzuführen ist, und
- wie sich die Pharmakokinetik nach ein- und mehrmaliger Gabe dieses Stoffes beim Tier verhält.

Diese Untersuchungen werden fast ausschließlich in Tierversuchen durchgeführt, wobei es von entscheidender Bedeutung ist, dass eine Spezies gewählt wird, deren Metabolismus dem des Menschen möglichst ähnlich ist. Andernfalls besteht die Gefahr, dass aufgrund von Interspeziesdifferenzen Metabolite gar nicht erst erfasst werden. Im Anhang der EG-Empfehlung 75/318/EWG heißt es zur Auswahl der Spezies für pharmakologische und toxikologische Untersuchungen: "Der Wert des Modells für die Extrapolation auf den Menschen hängt weitgehend von der qualitativen Ähnlichkeit zwischen dem als Modell verwendeten Tier und dem Menschen ab; die Ähnlichkeit ist im allgemeinen nicht bekannt". Dies wird durch die Verwendung mehrerer Spezies, mindestens zwei, zu kompensieren versucht, wobei eine der Spezies kein Nagetier sein darf. Hierbei zeigt sich deutlich das Problem, dass eine gewisse Sicherheit nur dadurch zu erreichen ist, dass eine größere Anzahl unterschiedlicher Spezies und damit auch eine große Anzahl von Tieren verwendet wird, bevor Daten über den Metabolismus beim Menschen vorliegen.

Zur Verringerung der auch gesellschaftlich umstrittenen Tierversuche und um humanrelevantere Aussagen erhalten zu können, wurde bereits 1959 von Russell und Burch [1] das Konzept der 3Rs entwickelt: „Refine, Reduce, Replace“. Eine Abklärung des Metabolismus eines Pharmakons beim Menschen vorab in Form eines *in-vitro*-Modells würde zu einer erheblichen Einsparung (Reduction) von Tierversuchen führen, weil diese teilweise durch die *in-vitro*-Studie ersetzt (Replacement) würden und darüber hinaus eine gezielte Auswahl einer geeigneten Spezies (Refinement) für weitere pharmakokinetische und toxikologische Untersuchungen möglich würde.

In den letzten zehn Jahren stieg das Bestreben, Tierversuche vollständig durch andere Testverfahren zu ersetzen, sobald dies vertretbar ist. Diese müssen ohne die Verwendung von

Tieren zu wissenschaftlich gleichermaßen vertretbaren Resultaten gelangen können. Dafür ist es nötig, Testsysteme zu entwickeln, welche nicht nur die Tiermodelle ersetzen, sondern darüber hinaus auch durch die Ermöglichung eines funktionsfähigen humanen Stoffwechselsystems die Relevanz pharmakokinetischer und toxikologischer Untersuchungen für den Menschen steigern („refinement of results“). Zudem ist zu erwarten, dass ein geeignetes Modell auch erheblich schneller und kostengünstiger zu Ergebnissen führt.

Routinemäßig können bereits Zellen aus pharmakologisch und toxikologisch bedeutsamen Organen wie Leber, Niere und Nervensystem *in vitro* eingesetzt werden. Untersuchungen von toxikologischen Befunden *in vivo* erfordern aber auch den Einsatz anderer Zellsysteme aus Knorpel, Knochen, Gefäßen, Skelett- und Herzmuskel, Hoden usw. [2]. Ein geeignetes System sollte dabei die *in vivo*-Verhältnisse im Körper möglichst genau imitieren, um die komplexen Wirkmechanismen im Organ widerspiegeln zu können. Ist dies der Fall, kann nicht nur die Wirkung eines Pharmakons analysiert werden, auch Schädigungen können simuliert werden. So können Zellkulturen z.B. durch oxidativen Stress (wird z.B. für Tumorerkrankungen verantwortlich gemacht) künstlich geschädigt werden, um die Wirkung potentieller Antioxidantien zu untersuchen. Auch besitzt ein *in vitro*-Modell den Vorteil, durch Kryokonservierung (Lagerung bei tiefen Temperaturen) haltbar gemacht und damit nach dem Auftauen jederzeit einsetzbar zu sein.

Gerade hier weisen aber viele existierende Modelle ihre Grenzen auf. So verlieren viele Systeme bereits nach kurzer Zeit ihre organotypische Funktion [3]. Oft ist der Gasaustausch der Zellen nur durch Diffusion durch das Kulturmedium gewährleistet [4]. Wünschenswert ist aber eine exakt definierbare, unabhängige Sauerstoffversorgung. Zudem verlieren viele primäre Zellen durch die Kryokonservierung an Vitalität oder gewebespezifischer Funktion [5]. Komplizierter aufgebaute Bioreaktoren, wie z.B. Hohlfaserreaktoren bieten nicht die Möglichkeit zur Kryokonservierung, da die großen auftretenden Temperaturgradienten das definierte Einfrieren verhindern.

Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ausgehend von der beschriebenen Problematik ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Charakterisierung eines für die gewebespezifische Langzeitkultivierung primärer Zellen generell einsetzbaren Mini-Bioreaktors mit unabhängiger Sauerstoffversorgung und der Möglichkeit zur Kryokonservierung. Der Bioreaktor soll eine künstliche Schädigung der Zellen durch oxidativen Stress ermöglichen und somit nicht nur für den Einsatz zum *in vitro*-Screening neuer Pharmaka, sondern auch neuer Antioxidantien geeignet sein.

Die Arbeit gliedert sich in die folgenden sechs Teilziele:

1. Entwicklung des Bioreaktors

Ziel: Damit die Sauerstoffversorgung der Zellen unabhängig von der Mediumversorgung erfolgen kann, soll die Konstruktion des Bioreaktors einen exakt definierbaren und von der Schichtdicke des Medienüberstands unabhängigen Gasaustausch von O₂ und CO₂ gewährleisten. Eine optische (mikroskopische) Qualitätskontrolle der Zellen soll ermöglicht werden. Die einzelnen Kulturflächen dürfen dabei eine kritische Größe nicht überschreiten, damit bereits mit kleinen Wirkstoffmengen und geringem Zellbedarf ein pharmakologisches Screening durchgeführt werden kann.

Vorgehen: Ein 24Well-Bioreaktor mit einem gaspermeablen Membranboden wird konstruiert.

2. Exemplarische Darstellung der Anwendbarkeit des Bioreaktors für primäre Zellsysteme

Ziel: Um möglichst umfassende Aussagen über die Wirkung eines Pharmakons auf den gesamten Körper treffen zu können, soll das Bioreaktorsystem für verschiedene Zellsysteme geeignet sein.

Vorgehen: Verschiedene primäre Zellsysteme, wie Hepatozyten (Leber), Nervenzellen, Cardiomyozyten (Herzmuskel), Chondrozyten (Knorpel), Endothelien und Fibroblasten (Gefäße) werden im Bioreaktor kultiviert.

3. Erbringung gewebespezifischer Leistungen

Ziel: Um für ein pharmakologisches Screening geeignet zu sein, soll gezeigt werden, dass die Zellen im Bioreaktor gewebespezifische Leistungen erbringen.

Vorgehen: Da die Leber das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers ist, eignen sich hepatische Funktionen besonders für das *in vitro*-Screening von Pharmaka. Da humane Leberzellen jedoch nur in begrenzter Anzahl und nicht jederzeit verfügbar sind, werden zur Etablierung und Validierung des Bioreaktors Schweinehepatozyten verwendet. Die Beibehaltung gewebespezifischer Leistungen über einen Zeitraum von 15 Tagen wird am Beispiel von Leberzellen näher untersucht und mit Kulturen in herkömmlichen Systemen verglichen. Für den Primärmetabolismus werden Albumin als Parameter für die

Proteinsekretion, Harnstoff als toxikologischer Parameter, Glucose und Laktat für die Beurteilung des metabolischen Status und die LDH-Aktivität als Parameter für die Integrität der Plasmamembran und die Lebensfähigkeit der Zellen bestimmt. Für den Erhalt der Differenzierung werden sowohl Phase I- (EROD, CYP 1A1/1A2 und ECOD, CYP 2B1/2B2) als auch Phase II-Aktivitäten (UGT und ST) der leberspezifischen Biotransformation, sowie die Beibehaltung der Möglichkeit zur Drug-Drug-Interaktion (Wechselwirkungen) untersucht.

4. *in vitro*-Screening im Bioreaktor

Ziel: Für den Einsatz des Bioreaktors zum *in vitro*-Screening in der pharmazeutischen Forschung soll seine Eignung in einem exemplarischen Screening mit verschiedenen Johanniskraut-Präparaten bewiesen werden.

Vorgehen: Es wird untersucht, ob verschiedene hepatische Enzyme (CYP 1A1/1A2, CYP 2B1/2B2, CYP 2C9 und CYP 3A4) unterschiedliche Reaktionen auf verschiedene Präparationen (Extrakt, Pulver, Öl, Tee und zwei aufgereinigte Inhaltsstoffe) des gleichen Arzneimittels (Johanniskraut) zeigen.

5. Untersuchung von oxidativem Stress und Screening von Antioxidantien

Ziel: Eine Realisierung exakt definierter Oxygenierungsbedingungen soll die Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf die Hepatozyten ermöglichen. Es soll geprüft werden, ob der Bioreaktor auch für die Untersuchung der Zellschädigung und -alterung durch oxidativen Stress sowie das Screening potentieller neuer Antioxidantien geeignet ist.

Vorgehen: Die Leberzellen werden bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (20%, 30% und 40% O₂) kultiviert und die Auswirkungen des so erzeugten oxidativen Stress' auf den Primärstoffwechsel und die Biotransformation beobachtet. Exemplarisch für ein *in vitro*-Screening von Antioxidantien soll die schützende Wirkung des bekannten Antioxidantiums Vitamin C auf die Zellen nachgewiesen werden.

6. Kryokonservierung des Bioreaktors

Ziel: Um ein Screening an humanen Hepatozyten jederzeit durchführen zu können, soll der Bioreaktor bei Verfügbarkeit mit diesen beimpft und dann kryokonserviert werden.

Vorgehen: Zur Entwicklung, Etablierung und Validierung eines Kryoprotokolls werden ebenfalls Schweinehepatozyten verwendet. Nach dem Auftauen des Bioreaktors werden wiederum der Primärmetabolismus sowie die Biotransformationsleistungen der Zellen bestimmt und mit einer nicht eingefrorenen Kontrolle verglichen.

Um das entwickelte Kryoprotokoll schnell und einfach auf andere, ähnliche Systeme übertragen zu können, wird der Temperaturverlauf an der Zellschicht berechnet und mit der tatsächlich in der Mediumschicht gemessenen Temperatur verglichen.

2 Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel sind die Grundlagen beschrieben, auf denen die Entwicklung des Bioreaktorsystems aufbaut. Dazu ist es wichtig, Aufbau und Funktion der Leber zu verstehen und bestehende *in vitro*-Modelle zu kennen. Um die Eignung zur Anwendung als Screening-Reaktor zu analysieren, wird die *in vivo/in vitro* Korrelation der induzierenden und inhibierenden Wirkungen verschiedener Johanniskraut-Präparate sowie die Auswirkung von oxidativem Stress und der Zugabe von Vitamin C untersucht. Die Entwicklung eines geeigneten Kryoprogramms setzt eine genau Kenntnis der molekularen Vorgänge beim Einfrierprozess voraus, welche hier dargestellt werden.

2.1 Die Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan und mit bis zu 2,5 % des Körpergewichts die größte exokrine Drüse des Menschen. Sie entwickelt sich während der Gestation durch Aussprossung aus dem Rumpfdarm, wobei sich aus dem Endoderm zwei Abschnitte ausbilden. Aus einem Abschnitt entsteht die Gallenblase, welche an die Leber assoziiert ist, aus dem anderen das eigentliche Leberparenchym (Hepatozyten) und die intrahepatischen Gallengänge. Die nicht-parenchymalen Leberzellen entstehen aus dem Mesoderm. Zu diesen gehören die sinusoidalen Endothelzellen (Schutz vor Scherbelastungen durch den Blutstrom), die Kupfferzellen (Makrophagen), die Itozellen (Fett und Vitamin A speichernde Zellen, können nach Metamorphose Kollagen sezernieren) und die Pit-Zellen (natürliche Killerzellen) [6].

2.1.1 Aufbau der Leber

Die klassische Anatomie gliedert die Leber in einen rechten und einen linken Lappen sowie zwei kleinere Lappen. Sie erhält das nährstoffreiche, venöse Blut aller unpaaren Bauchorgane (Magen, Darm, Pankreas und Milz) aus der Pfortader. Zur Versorgung des Parenchyms führt die Leberarterie zusätzlich sauerstoffreiches arterielles Blut aus der Bauchorta heran. Nach der hepatischen Metabolisierung wird das Blut durch die Lebervene und die untere Hohlvene abgeführt [7].

Unter dem Mikroskop zeigt sich die Gliederung der Leber in gleiche Baueinheiten (s. Abbildung 2-1), die als Leberläppchen [8] bezeichnet werden. Diese besitzen eine annähernd hexagonale Struktur, eine Größe von etwa 2 mm^3 , und sind im Zentrum von der Zentralvene durchzogen (4). An den Eckpunkten, den sogenannten Portalfeldern, führen Äste der Pfortader und der Leberarterie dem Leberläppchen Blut zu, ein Gallengang führt die in den Hepatozyten gebildete Galle entgegen dem Blutstrom ab. Diese drei Gefäße bilden das sogenannte Glisson'sche Trias (1, 5). Im Portalbereich mischt sich das Pfortaderblut mit dem

arteriellen Blut und strömt senkrecht dazu durch die Sinusoide (Kapillarsystem der Blutgefäße) an 15 bis 25 Hepatozyten vorbei auf die Zentralvene zu. Hier sammelt es sich wieder und strömt aus der Leber ab.

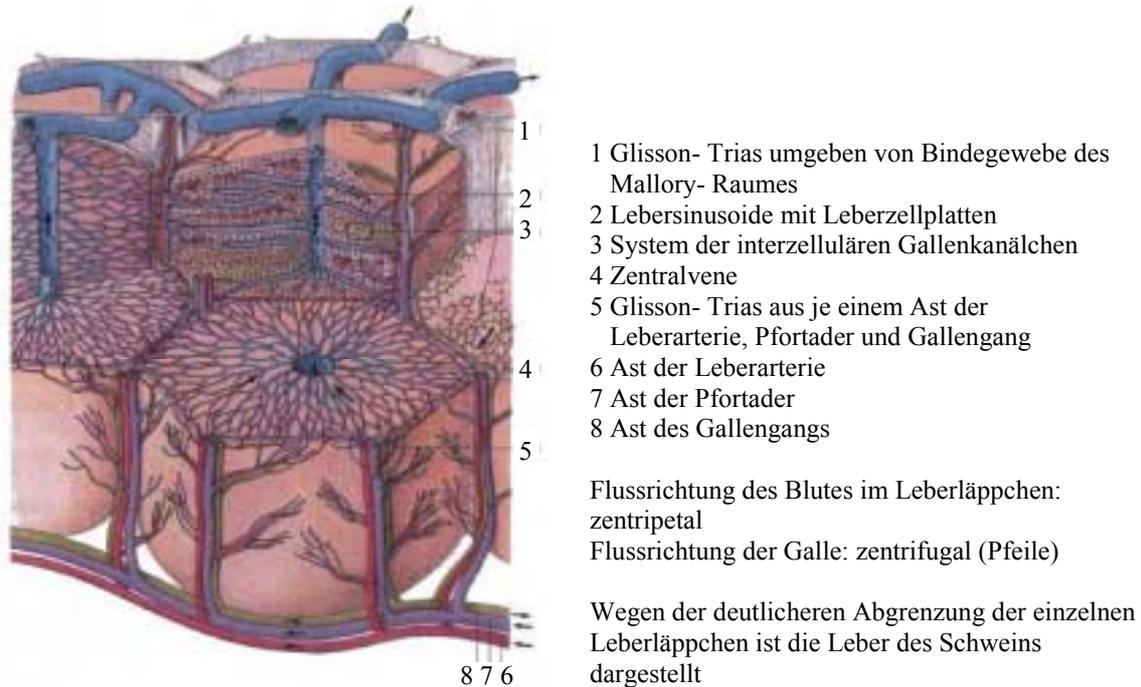


Abbildung 2-1: Mikroskopischer Aufbau der Leber [9]

Das Leberparenchym wird in seiner Funktion genauer durch das Modell des Leberazinus beschrieben [8]. Dieser wird als Dreieck von zwei Portalfeldern und der Zentralvene gebildet und besitzt drei Zonen: Die Portalzone am Pfortaderzweig, die von sauerstoff-, hormon- und nährstoffreichem Blut versorgt wird (periportal), die Zentralzone um die Zentralvene herum, die von sauerstoff-, hormon- und nährstoffarmem, dafür aber kohlendioxidreichem Blut erreicht wird (perivenös), und die zwischen diesen beiden Zonen liegende Intermediärzone.

Die Hepatozyten liegen in Monolayern zwischen den radial auf die Zentralvene zulaufenden Blutsinusoiden (2). Zwischen den Wänden der aneinanderstoßenden Hepatozyten liegen die interzellulären Gallenkanälchen (3). Diese schließen sich zu einem Netzwerk zusammen, das in die kleinsten Gallengänge mündet. Die in der Leber gebildete Galle fließt entgegen dem Blutstrom in die Gallenblase und von dort in den Darm ab.

Den Hauptteil der metabolischen Leistung erbringen die Hepatozyten. Sie bilden mit 80% des Zellvolumens und 60% der Gesamtzellzahl den größten Anteil der Leberzellen [10]. Betrachtet man die Mikroarchitektur der Hepatozytenplatten, so zeigt sich unabhängig von den Gradienten im Sinusoidalraum ein einheitliches morphologisches Bild. Jeweils unter- und oberhalb des Hepatozytenmonolayers befindet sich das blutführende, mit Endothelzellen ausgekleidete Sinusoid (\varnothing 9-12 μm). Durch Kapillarfenster (\varnothing ca. 100 nm) in den Endothelzellen dringen die Blutinhaltsstoffe zu den Mikrovilli der Hepatozyten vor. Diese

stehen nicht direkt mit dem Sinusoid in Kontakt, sondern sind durch einen flüssigkeitsgefüllten Raum davon getrennt. Dieser „Disse’scher Raum“ genannte Spalt (\varnothing ca. $0,3 \mu\text{m}$) wird zum Teil auch als Matrix bezeichnet, da er in lockerer Packung Laminin, Fibronectin, verschiedene Proteoglykane und Kollagen vom Typ I, III, IV und VI enthält.

2.1.2 Aufgaben der Leber

Alle im Intestinaltrakt resorbierten Stoffe, wie zum Beispiel Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Vitamine, aber auch Fremd- und Giftstoffe werden der Leber zur Metabolisierung über das Blut mit einem Volumenstrom von $1,5 \text{ l min}^{-1}$ zugeführt. In ihr laufen die meisten der bekannten Reaktionen des Intermediärstoffwechsels ab. Hinzu kommt die Synthese von Verbindungen, die für andere Organe von Bedeutung sind, sowie die Metabolisierung körpereigener und körperfremder Substanzen. Die Aufgaben der Leber umfassen somit [9]:

- Blutbildung beim Fetus bis zum siebten Schwangerschaftsmonat und postfötal in Zuständen starken Blutverlusts
- Abbau und Ausscheidung des Blutfarbstoffs in Form von Bilirubin über Galle und Darm (Häm-Degradation)
- Bildung eines Aminosäurepools für die Proteinbiosynthese
- Harnstoffsynthese zur Ammoniakentgiftung und als wasserlösliches Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels
- Regulierung des Glukosespiegels im Blut durch Glykolyse, Aufbau des Speicherkohlenhydrats Glykogen durch Glykogenese aus glukoplastischen Aminosäuren oder durch Abbau von Kohlenhydraten, sowie Glukoneogenese durch Konvertierung von Laktat, Pyruvat u.a. zu Glukose
- Regulation und Speicherung von Spurenelementen und Vitaminen (Vitamine A, D, K, B12, Eisen, Magnesium, Kupfer etc.)
- Synthese und Abbau von Lipoproteinen (Cholesterin, Triglyceride) als zentrales Organ des Fettstoffwechsels
- Synthese von Cholesterol und der hieraus abgeleiteten Gallensäuren
- Synthese von Gerinnungsfaktoren (Prothrombin, Fibrinogen)
- Regulation des Säure-Base-Haushaltes im Blut (pH-Wert)
- Synthese von Akut-Phase-Proteinen (Gerinnungsfaktoren, Komplementsystem, Kallikrein-Kinin-System, Proteinaseinhibitoren, Oponine, Transportproteine) bei Verletzungen und Entzündungen
- Phagozytose von Bakterien sowie körpereigener und körperfremder Zellbestandteile durch Kupfferzellen

- Überführung von Fremdstoffen in wasserlösliche Derivate (Biotransformation, Kapitel 2.1.3)

Der Leber fällt somit eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung konstanter Metabolitkonzentrationen im Blut zu, mit der die Funktionsfähigkeit aller extrahepatischer Organe und Gewebe gewährleistet wird. Außerdem ist sie neben den Nieren das wichtigste Ausscheidungsorgan des Körpers, da sie über die Gallenflüssigkeit viele körpereigene und körperfremde Verbindungen in den Intestinaltrakt abgibt [6].

2.1.3 Biotransformation

Die Hauptfunktion der Biotransformationsreaktionen besteht in der „Entgiftung“ des Organismus. Apolare, lipophile und damit nicht oder nur langsam ausscheidungsfähige Verbindungen werden in polare, wasserlösliche Substanzen umgewandelt, die dann leicht über den Harn oder die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden können. Derartige Verbindungen können körpereigene, endogen entstandene Stoffe, sog. Endobiotika, oder auch körperfremde Substanzen, die sog. Xenobiotika, sein. Zu den ersteren gehören z.B. die schlecht wasserlöslichen Steroidhormone oder Stoffwechselprodukte wie Bilirubin. Die Zahl der Xenobiotika nimmt mit der ständigen Entwicklung chemisch-technischer Verfahren rasant zu. Zu ihnen gehören beispielsweise Pharmaka, Konservierungs- und Geschmacksmittel.

Biotransformationsreaktionen finden in beschränktem Umfang in nahezu allen Geweben statt. Die Leber ist jedoch nicht nur wegen ihrer Größe, sondern auch wegen ihrer besonders reichen Ausstattung mit den Enzymen der Biotransformationsreaktionen das wichtigste Organ für diese Funktion. Eine erfolgreiche Biotransformation findet jedoch nur in voll differenzierten Hepatozyten statt. Üblicherweise wird die Biotransformation in zwei Phasen unterteilt:

1. In der ersten Phase werden die in Frage kommenden Verbindungen meist durch oxidative, seltener durch reduktive Reaktionen so weit modifiziert, dass sie reaktive Gruppen erhalten. Enthält ein Substrat bereits eine funktionelle Gruppe, kann es auch direkt in die Phase II eintreten.
2. An die funktionelle Gruppe werden in der zweiten Phase der Transformationsreaktion polare oder stark geladene Verbindungen geknüpft, so dass die dabei entstehenden Konjugate besonders gut wasserlöslich werden.

Sie können nun durch Exkretion in die Galle oder über Blut und Nieren durch Filtration ausgeschieden werden.

Phase I

Einen wesentlichen Beitrag zur Phase I der Biotransformation leisten die zur Großfamilie der Cytochrom P450-Enzyme (CYP450) gehörenden sauerstoffabhängigen mikrosomalen Monooxygenasen. Dieses im endoplasmatischen Reticulum lokalisierte System wurde zuerst von Brodie et al. [11] und Mason et al. [12] beschrieben. Das charakteristische Absorptionsmaximum des Enzymkomplexes bei 450 nm führte zur Namensgebung [13, 14]. Bisher wurden über 230 verschiedene CYPs charakterisiert, von denen die meisten in der Säugetierleber vorkommen [15], einige jedoch auch in anderen Organen wie Niere, Lunge, Darm oder Haut [16, 17]. Weitere wichtige Phase I-Reaktionen neben den Oxidations- und Reduktionsreaktionen sind die hydrolytische Spaltung (besonders Ester- und Peptid-Spaltung), die Methylierung und die Desulfurierung.

Als Beispiel für die Phase I können die von EROD (Ethoxyresorufin-O-Deethylase, CYP 1A1/2) und ECOD (Ethoxycoumarin-O-Deethylase, CYP 2B1/2) katalysierten Reaktionen herangezogen werden (s. Abbildung 2-2).

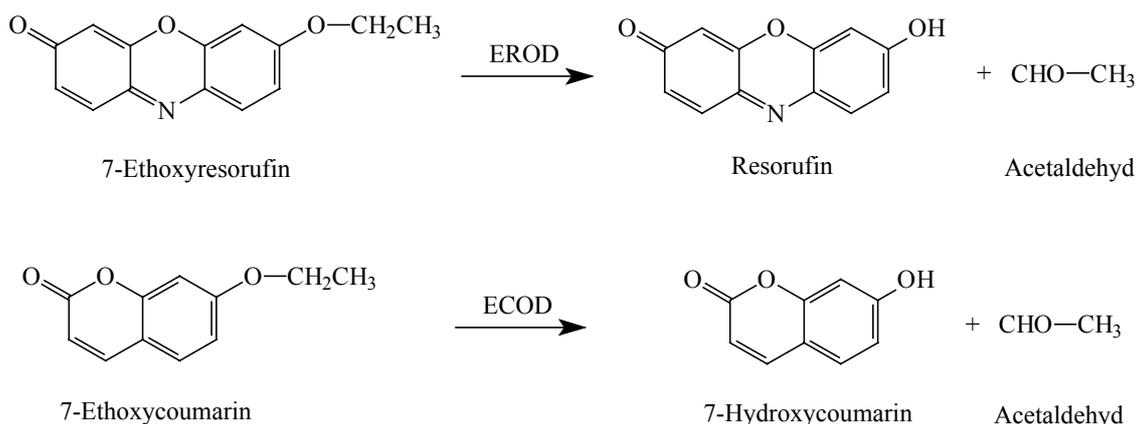


Abbildung 2-2: Katalytische Reaktionen der Monooxygenasen EROD und ECOD

Beide Enzyme spalten die Ethylgruppe ihrer Substrate ab. Durch die Einführung der funktionellen OH-Gruppe in die Substrate kommt es zur Erhöhung der Polarität und Verringerung der biologischen Aktivität oder Toxizität. Einige Pharmaka und manche Karzinogene werden allerdings erst durch diese Umwandlungsreaktion biologisch aktiv.

Phase II

Die Phase II der Biotransformation wird auch als Konjugationsphase bezeichnet. In ihr werden die in der Phase I entstandenen Verbindungen über ihre reaktiven Gruppen an polare Substanzen gekoppelt, wodurch sie in ausreichend hydrophile Verbindungen umgewandelt und somit ausscheidungsfähig werden. Alle daran beteiligten Enzyme gehören zur Gruppe der Transferasen.

Die häufigsten Phase II-Reaktionen sind die Glucuronidierung sowie die Sulfatierung. Durch Kopplung mit Glucuronsäure entstehen die Glucuronide. Die Konjugation mit UDP-Glucuronat kann dabei mit OH-Gruppen, primären und sekundären Aminen sowie mit Carboxylgruppen erfolgen. Ein wichtiges Beispiel für diesen Reaktionstyp ist die Glucuronidierung von Bilirubin zu Bilirubindigluconid. Sulfatiert werden im allgemeinen OH-Gruppen sowie Aminogruppen. Substrat hierfür ist das aktivierte Sulfat oder 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS). Östrogene werden beispielsweise meist erst nach Sulfatierung als Sulfate ausgeschieden. Als Beispielreaktion *in vitro* kann dabei die Konjugation von 4-Methylumbelliferon genutzt werden (s. Abbildung 2-3):

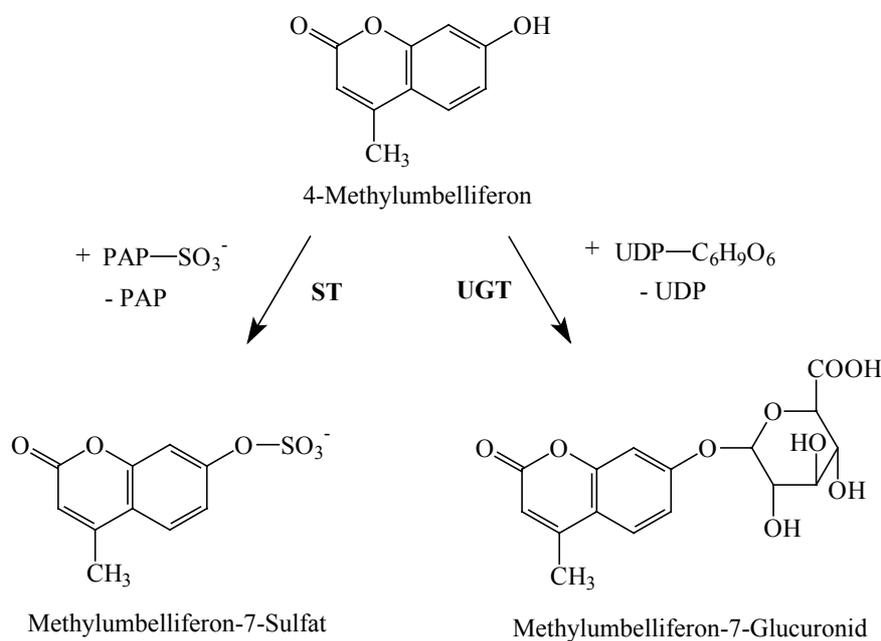


Abbildung 2-3: Katalytische Reaktionen von ST und UGT

Auch das Phase II-Substrat 4-Methylumbelliferon besitzt eine funktionelle OH-Gruppe. An diese wird entweder von der Sulfotransferase (ST) ein Sulfat-Rest gekoppelt, oder von der UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) ein Glucuronosylrest. Dadurch wird das Substrat polarer und so wasserlöslich, dass es ausgeschieden werden kann. Ebenso wie die CYPs liegt UGT im endoplasmatischen Retikulum vor, ST dagegen im Cytoplasma.

Die verschiedenen Biotransformationsenzyme, insbesondere die CYPs, sind leicht induzierbar. Dies bedeutet, dass ihre Aktivität bei besonders hoher oder lang andauernder Substratzufuhr oder einer als Induktor wirkenden Substanz durch vermehrte Synthese des betreffenden Enzymproteins zunimmt. Da sie im allgemeinen nur eine geringe Substratspezifität zeigen, kann eine Induktion die Verstoffwechslung und damit die Wirkung z.B. eines Arzneimittel wesentlich beeinflussen. Die so auftretenden Wechselwirkungen werden auch als Drug-Drug-Interaktionen bezeichnet. Der Nachweis der CYP-Aktivität in der

Kultur ist somit ein wichtiger Parameter, der Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit und den Differenzierungsgrad der Hepatozyten zulässt und ein *in vitro*-Screening ermöglicht.

2.1.4 Leberbioreaktoren

Seit einiger Zeit kommt es bei der Behandlung von Patienten mit akutem Leberversagen zu einer verstärkten Nachfrage nach einem geeigneten Leberunterstützungssystem, welches eine zeitweise Substitution der Leberfunktionen übernehmen kann. Dieses System soll solange die Entgiftung der im Organismus anfallenden Stoffwechselprodukte (Biotransformation) extrakorporal übernehmen, bis sich das eigene Organ regeneriert hat oder ein passendes Spenderorgan gefunden wurde. Für diese Aufgabe wurden verschiedene bioartifizielle Systeme entwickelt, in denen isolierte Leberzellen mit einem künstlichen Perfusionssystem kombiniert werden. Diese sind im Folgenden beschrieben.

In dem von Sussman et al. [18] beschriebenen System werden Hepatoma-Zellen auf der äußeren Oberfläche von semipermeablen, hohlen Kapillarfasermembranen kultiviert, die in einem Plastikgehäuse gebündelt sind. Sobald die Zellen adhärirt und eine Lebergewebe-ähnliche Struktur angenommen haben, wird Nährmedium durch die Kapillaren zirkulieren gelassen.

Das von Nyberg et al. [19] entwickelte System enthält in zylindrischen Kollagengelen eingeschlossene primäre Hepatozyten im Inneren von Hohlfasern. Dies ermöglicht neben der Nutzung einer großen Zellzahl auch einen engen Kontakt zwischen benachbarten Zellen, welcher für die vollständige und differenzierte Funktion der Hepatozyten wichtig ist. Untersuchungen haben signifikante Albuminsekretionen und CYP-Aktivitäten in diesem Bioreaktor-Design gezeigt [20].

Sowohl in seiner Entwicklung als auch in der klinischen Erprobung fortgeschritten ist der HepatAssist 2000 [21]. In diesem System wird das Plasma des Patienten durch einen primäre porcine Hepatozyten enthaltenden Hohlfaserbioreaktor perfundiert. Dieser ist mit einem vollständigen Schlauchset, einem integrierten Oxygenator und Wärmetauscher, einem Plasmareservoir und einer BAL2000 Hohlfaserkassette bestückt. Kryokonservierte Hepatozyten werden bei Bedarf aufgetaut und mit Cytodex-3 Microcarriern in den Bioreaktor gegeben. Zudem wurde ein Programm entwickelt, welches die Funktion während der Behandlung eines Patienten simuliert. Hiermit wurden nicht nur die Sauerstoffverbrauchsrate und die spezifische Leberzellfunktion (Diazepammetabolismus, s. Kapitel 4.2.8), sondern auch die *in vitro*- und *in vivo*-Leistung des Bioreaktors bestimmt.

Gerlach et al. [22] entwickelten ein System, in dem primäre porcine Hepatozyten und sinusoidale Endothelzellen auf der äußeren Oberfläche und in den Zwischenräumen von vier verwobenen biomatrix-beschichteten Hohlfasermembranen adhären kultiviert werden. Diese sind in drei Ebenen jeweils senkrecht zueinander ausgerichtet und dienen verschiedenen

Funktionen. So erlaubt das System eine dezentralisierte Mediumperfusion, eine unabhängige Sauerstoffzufuhr, sowie einen Nährstoff- und Metabolitenaustausch bei niedrigen Gradienten, wodurch der Stofftransport durch die Zellmasse deutlich angeregt wird. Die Hepatozyten bilden spontan Aggregate und nehmen während der Kultur eine dreidimensionale Struktur innerhalb des Bioreaktors an. Es wurde gezeigt, dass sie ihre differenzierte Funktion über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen beibehalten.

Einen zweidimensionalen Ansatz beschrieben Bader et al. [23] und de Bartolo et al. [24] mit dem Flachmembran-Bioreaktor (FMB). Dieser besteht aus einer Vielzahl einzelner Flachbettmodule, wovon jedes eine oxygenierende Oberfläche (PTFE-Membran) von 1150 cm² besitzt. Zur Zeit können bis zu 50 Module parallel genutzt werden. Isolierte Hepatozyten werden zusammen mit nicht-parenchymalen Leberzellen im modifizierten Sandwich (s. Kapitel 2.2.4) kultiviert und unabhängig vom Mediumfluss durch Molekulardiffusion des Luftsauerstoffs durch die nicht-poröse PTFE-Membran oxygeniert. Die zweidimensionale Gestaltung ermöglicht die Kryokonservierung des Bioreaktors [25] unter Erhalt von vollständig differenzierten primären Zellen. Stabile Biotransformationsraten und die Fähigkeit zu Drug-Drug-Interaktionen bleiben für einen Zeitraum von drei Wochen erhalten [26].

Als dreidimensionale Weiterentwicklung des FMB konzipierten Jasmund et al. [27] auf der Grundlage eines Hohlfaseroxygenators einen Bioreaktor, der aus zwei Membranpaketen besteht und eine verbesserte Sauerstoffzufuhr ermöglicht. In der ersten Kammer sind Lagen aus Wärmetauscherfasern und Lagen aus mikroporösen Oxygenierungsfasern kreuzweise angeordnet, die zweite Kammer besteht nur aus Oxygenierungsfasern. Primäre Hepatozyten werden auf den äußeren Oberflächen der Hohlfasern kultiviert. Durch diesen Raum wird auch das Kulturmedium perfundiert, so dass ein direkter Kontakt mit den Zellen besteht. Die geringe Baugröße des Oxygenators ermöglicht, besonders da kein Inkubator erforderlich ist, sowohl eine gute Handhabbarkeit und als auch eine hohe Zelldichte ($5 \cdot 10^7$ Zellen ml⁻¹). Kultivierungen mit primären porcinen Hepatozyten zeigten, dass die Zellen ihre Vitalität und ihren Primärmetabolismus für mindestens drei Wochen beibehalten.

Die beschriebenen Bioreaktoren wurden für den Einsatz als extrakorporales Leberunterstützungssystem entwickelt, durch ihre Baugröße (sehr hoher Zell- und Wirkstoffbedarf) und mit Ausnahme des FMB auch den komplexen Aufbau sind sie jedoch für ein pharmakologisches *in vitro*-Screening ungeeignet.

2.2 Pharmakologisches Screening *in vitro*

Stoffwechselwege, Wechselwirkungen und Nebenwirkungen neu entwickelter Medikamente werden heute hauptsächlich in Tierversuche erforscht. Diese sind nicht nur ethisch umstritten, sondern auch teuer, zeitaufwendig und benötigen eine große Menge Wirkstoff. Zudem führen sie aufgrund von Interspeziesdifferenzen nicht unbedingt zu humanrelevanten metabolischen oder pharmakokinetischen Informationen [28]. Daher wurden verschiedene (humane) *in vitro*-Modelle entwickelt, die die klinische Entwicklung eines Wirkstoffs besonders hinsichtlich pharmakokinetischer Variabilität und Drug-Drug-Interaktionen erleichtern und verbessern sollen. Dabei ist die Betrachtung der Interaktionen des Wirkstoffs mit dem CYP-System besonders wichtig [29]. Die CYPs 2D6, 3A4 und 2C9 stellen gemeinsam mehr als 50 % der gesamten menschlichen CYPs der Leber dar [30], und fast 80 % aller Medikamente werden durch sie metabolisiert [31]. Werden die CYPs 1A2 und 2C19 hinzugerechnet, steigen beide Werte auf über 80 % [30]. Vermehrtes Interesse richtet sich auch auf die Enzyme CYP 2B6 [32] und die Glukuronosyltransferase (Phase II) [33]. Die Interaktion eines neuen Medikaments mit einem oder mehreren dieser CYPs kann zu klinisch relevanten Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten führen, die von den gleichen Enzymen metabolisiert werden. Die so erhaltenen *in vitro*-Ergebnisse für die Absorption, Metabolisierung und Interaktionen eines Wirkstoffs können auf den Menschen *in vivo* extrapoliert werden. Diese Möglichkeit führte zur gegenwärtigen Philosophie in der Wirkstoffentwicklung: „fail early – fail cheaply“ [28]. So können der Arzneimittel-Metabolismus und mögliche Wechselwirkungen bereits verstanden werden, bevor ein Medikament zum klinischen Einsatz kommt. Immer häufiger werden bereits humane Modelle eingesetzt, mit dem Ziel, Wechselwirkungen vollends zu vermeiden.

2.2.1 Rekombinante Enzyme

Eine Möglichkeit, komplexe Systeme oder Prozesse wie den Metabolismus zu verstehen, besteht im Isolieren der kleinstmöglichen Einheit. Dabei handelt es sich hier um das für einen metabolischen Stoffwechselweg verantwortliche Enzym. Die erstmalige Isolation von CYPs und dem enzymatischen Co-Faktor Cytochrom P450-Reduktase gelang 1968/69 [34, 35] und zog die derzeitigen Verfügbarkeit so vieler CYPs nach sich. Die erste Aufreinigung einer Isoform, heute als CYP 2B4 bekannt, gelang van der Hoeven et al. 1974 aus Phenobarbital-induzierter Kaninchenleber [36], gefolgt von der Isolation und Aufreinigung verschiedenster CYPs aus einer Vielzahl von Säugetieren [37]. Anfang der 90er Jahre waren bereits über 100 verschiedene CYPs kloniert und sequenziert, darunter auch die wichtigsten humanen Isoformen [38, 39]. Die Fortschritte der Molekularbiologie führten zu einer transienten und stabilen Expression von katalytisch aktiven CYPs in verschiedenen Expressionssystemen wie Bakterien [40], Hefen [41], Insekten- [42] und Säugerzellen [43]. Die Nutzung dieser cDNA

exprimierten CYPs zur Analyse der Enzymfunktion und –struktur führte zu einem besseren Verständnis der Substrat- und Inhibitorspezifität verschiedener Isoformen [37, 43, 44]. Eine zielgerichtete Mutagenese und die Expression der Mutanten für *in vitro*-Untersuchungen wurden zu einer wichtigen Methode bei der Erforschung von Substrat-Enzym-Interaktionen am aktiven Zentrum [45-48]. Die so gewonnenen Kenntnisse über humane CYP-Isozym-Funktionen und -Spezifitäten führten zu ihrer Nutzung im High Throuput Screening und zu Untersuchungen zum Isoform selektiven Metabolismus und zur Metabolitformation [49]. Die Expression anderer für den Metabolismus wichtiger Enzyme wurde weit weniger erforscht, jedoch gewinnt das Phase II-Enzym UGT zunehmend an Beachtung für weiterführende Metabolismus-Untersuchungen [50].

2.2.2 Subzelluläre Fraktionen

Subzelluläre Fraktionen, also Mikrosomen, andere Zellorganellen und Leberhomogenate, bilden das meistgenutzte *in vitro*-System zur Untersuchung von Arzneimittel-Stoffwechselwegen. Die Entwicklung von Techniken zur Gewebekomogenisierung im Jahr 1936 [51] zeigte, dass Leberhomogenisate alle bedeutenden Phase I und Phase II Enzyme enthalten. Nach der Entwicklung differenzierender Zentrifugationstechniken wurden diese Enzyme einzelnen Organellen zugeordnet. Die Vorteile dieses Systems liegen in ihrer einfachen Herstellung, ihrer Reproduzierbarkeit, der Möglichkeit zur längerfristigen Lagerung und der ausreichenden Charakterisierung optimaler Inkubationsbedingungen [52]. Nachteilig ist jedoch, dass einige Enzyme labil sind und für ihre Aktivität die Zugabe von Co-Faktoren benötigen, die durch die verminderte Zellintegrität nicht mehr zur Verfügung stehen. Seit Beginn der 60er Jahre [53, 54] werden mikrosomale Systeme als wichtiges Instrument zur Erforschung von Arzneimittel-Stoffwechselwegen genutzt. Heutzutage werden die Ergebnisse, die in Metabolismus-Studien zu spezifischen Medikamenten mit Mikrosomen gewonnen werden, entweder mit den Ergebnissen aus parallelen Studien mit ganzen Zellen verglichen, oder Daten aus Untersuchungen mit subzellulären Fraktionen anderer Spezies gegenübergestellt [52]. Dabei stellen Mikrosomen die meistgenutzte subzelluläre Fraktion für die Nutzung zum *in vitro*-Screening.

2.2.3 Leberschnitte

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts werden Leberschnitte als *in vitro*-Modell für Metabolismus-Studien eingesetzt [55]. Neue Bedeutung erlangte diese Methode um 1990 nach der Entwicklung eines neuen Schneidegeräts [56], mit dem Schnitte von konstanten Massen und mit minimaler Zellschädigung hergestellt werden konnten. Die Verbesserung des Schneiders führte zur Entwicklung dynamischer organischer Kulturen [57], die eine Inkubation von Leber- oder anderen Gewebeschnitten über mehrere Stunden ermöglichen. Seit Anfang der

90er Jahre wurden diese Technologien sowohl in der universitären Forschung als auch von der pharmazeutischen Industrie für die Untersuchung von Stoffwechselwegen [55, 58], Entgiftungsleistungen [59], Transportmechanismen und Möglichkeiten zur Kühlung [58] sowie der Kryokonservierung [55, 58] genutzt. Der Vergleich mit Hepatozytenkulturen zeigte jedoch, dass Aufnahme und Abbau der Metaboliten im Leberschnitt allgemein niedriger waren als in der Zellkultur. Die Methode der Leberschnitte als prädiktives Modell für pharmakokinetische Forschungen verlor daher allgemein an Bedeutung [60]. Heutzutage werden Leberschnitte hauptsächlich für Kurzzeitstudien (bis zu vier Stunden) eingesetzt, um metabolische Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies zu untersuchen [55].

2.2.4 Hepatozyten

Seit der Entwicklung geeigneter Isolierungsmethoden mit reproduzierbar hohen Zellzahlen und -vitalitäten um 1970 [61, 62] gewann die Hepatozytenkultur als ganzzelliges *in vitro*-Modell an Popularität. Ihre gewebespezifische Ausprägung kommt der *in vivo*-Situation deutlich näher als die von Zelllinien und Zellfragmenten. In Suspension zeigten die Zellen jedoch schon innerhalb weniger Stunden eine hohe Abnahme der Vitalität und metabolischen Leistung [63]. Mit der Verwendung adhärenter Zellkulturen konnte die *in vivo*-Situation der Zellen besser imitiert werden. Sie überlebten jetzt länger, zeigten jedoch weiterhin den Verlust der leberspezifischen Funktionen nach wenigen Stunden, da sich die Leberzellen entdifferenzierten. Der Einsatz von Wachstumsfaktoren und Hormonen, verbesserten Kulturmedien und mit biologischen Matrices beschichteten Oberflächen reduzierte die Entdifferenzierung; die leberspezifischen Funktionen konnten nun einige Tage aufrecht erhalten werden [64]. Die Methoden wurden zuerst an Säugerhepatozyten (insbesondere Rattenzellen) optimiert und dann auf die humane Leber übertragen. Diese Erfolge verschoben den Interessenschwerpunkt von den damals (um 1970) primitiven Leberschnitten als ganzzelligem Modell auf die Leberzellkultur [65]. In den 70er und 80er Jahren wurden die Kryokonservierung [66], Suspensionskulturen und Langzeit-Monolayer-Kulturen von Hepatozyten untersucht [67]. Der Entwicklung des Präzisionsschneiders für Leberschnitte trat die Entwicklung verbesserter Kultivierungsmethoden für Hepatozyten, wie die Sandwich-Kultur [68] oder die Gel-Immobilisierung [69], entgegen. Es wurde erkannt, dass der Erhalt der Leberfunktionen in direktem Zusammenhang mit der Morphologie der Zellen steht. Bei der Kultivierung konnte eine kontinuierliche Verflachung der Zellen beobachtet werden, wobei sie ihre polarisierte Struktur verloren. Damit verloren die Zellen auch ihre Kompartimentierung in Gallengang- und Sinusoidalraum, der gerichtete Transport konnte nicht länger aufrecht erhalten werden und es kam zum Funktionsverlust [70]. Wesentliche Vorteile konnten durch die Entwicklung des Sandwichmodells und anderer Immobilisierungsverfahren erzielt werden, welche eine stabile Architektur der Leberzellen in

Kultur erhalten. Neben Metabolismusstudien eignen sich diese Modelle speziell für die Untersuchung humaner Enzyminduktionen auf mRNA-, Protein- und Enzymaktivitätsebene. Sie bieten eine wertvolle Möglichkeit für die Bewertung von Metabolismwegen und Drug-Drug-Interaktionen kommerzieller Arzneimittel [71].

Das Sandwich-Modell

Das Sandwich-Modell realisiert ein Maximum an Reorganisation der *in vivo*-Mikroarchitektur der Hepatozytenmonolayer. Dafür werden die Zellen mit einer Dichte von ca. $1,5 \cdot 10^5$ Zellen cm^{-2} auf einer Kollagenmatrix sedimentiert. Da die natürliche Matrix *in vivo* zum größten Teil aus Kollagen besteht, wird auch im *in vitro*-Modell Kollagen als Matrixmaterial verwendet. Nach Ausbildung der Zell-Zellkontakte und der Reorganisation der Gallengänge werden die Zellen durch Überschichtung mit einer zweiten Kollagenschicht stabilisiert (s. Abbildung 2-4).

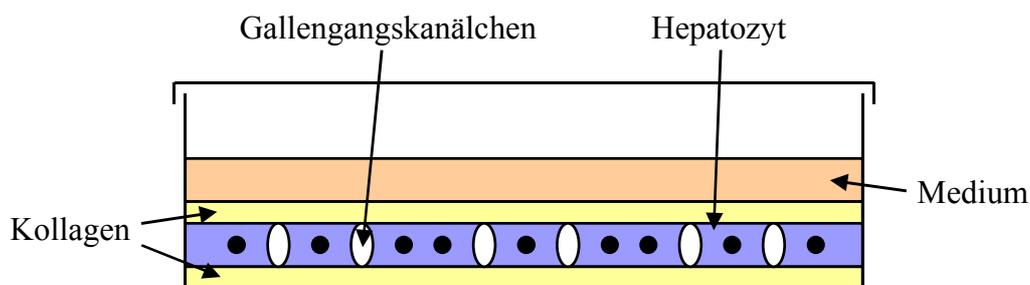


Abbildung 2-4: Sandwich-Kultur

In der klassischen Form des Sandwichs werden nur Hepatozyten zwischen den beiden Kollagenschichten kultiviert [72]. Dafür werden alle nichtparenchymalen Zellen bei der Zellisolation durch eine aufwendige Percoll-Zentrifugation abgetrennt. Da es aber zum Verlust einer Reihe von Leberfunktionen kommen kann, werden im modifizierten Sandwich Kokulturen aus Hepatozyten und nichtparenchymalen Zellen kultiviert. Hier können die leberspezifischen Funktionen über mehrere Wochen aufrecht erhalten werden [73]. Es entsteht ein konfluenter Monolayer, bei dem die Zellen durch die Aufrechterhaltung einer stabilen Architektur eine der *in vivo*-Situation entsprechende Morphologie aufweisen [74, 75] und daher für Metabolismus-Studien gut geeignet sind [76]. Adulte Hepatozyten sind *in vitro* allerdings nicht in der Lage zu proliferieren.

2.2.5 DNA-Microarrays

Seit etwa zehn Jahren (Anfang der 90er) besteht die Möglichkeit, DNA-Fragmente bekannter Sequenzen auf einen Glas- oder Nylonträger fest aufzubringen (Microarray) [77]. Je nach Länge des ausgewählten DNA-Fragments des zu untersuchenden Gens werden Oligo-DNA-Microarrays (20-25-mer Oligonukleotide) und cDNA-Microarrays (500-5000 Basenpaare) unterschieden [78]. cDNA-Microarrays sind in der Lage, mehrere Tausend Genexpressionsanalysen in einem einzigen Experiment durchzuführen [77]. Nach der Inkubation eines Pharmakons auf den Zielzellen (z.B. Hepatozyten) wird die gesamte mRNA extrahiert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben [77]. Alternativ kann auch unmarkierte cDNA durch *in vitro*-Transkription in markierte cRNA umgeschrieben werden. Dies wird bei der Nutzung von Oligo-DNA-Microarrays bevorzugt [78]. Die Nutzung von Nukleotiden, die entweder mit dem Farbstoff Cy3 oder Cy5 gekoppelt sind, ermöglicht eine gleichzeitige Untersuchung von Test- und Referenzzellen [77]. Die synthetisierte cDNA bzw. cRNA wird auf den Chip aufgegeben und hybridisiert mit der Array-DNA. Mit Hilfe eines Laserscanners wird die Fluoreszenz der immobilisierten Proben bestimmt, wobei das Signal proportional zur Konzentration der Probe ist [77].

Eine durch ein Pharmakon ausgelöste physiologische Änderung hat spezifische Auswirkungen auf das Expressionsmuster einer Zelle. Diese Änderung im Vergleich zum Expressionsmuster einer unbehandelten Zelle zeigt sich direkt im Hybridisierungssignal. So kann direkt qualitativ und quantitativ bestimmt werden, um welchen Grad sich die Expression des zugehörigen Gens verändert hat und wie sich dies in der veränderten mRNA-Gesamtmenge der Zelle ausdrückt (Up-/Downregulierung, Über-/Unter-Expression, Induktion/Repression) [77]. Auch Mutationen in den betroffenen Genen lassen sich direkt aufdecken [79]. Zudem kann die Expression der Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Langzeitwirkung) und bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden.

Eine Weiterentwicklung der DNA-Microarray-Technik stellen die Proteinmicroarrays dar, mit denen auch die durch ein Pharmakon bedingten Veränderungen im Proteinhaushalt der Zelle bestimmt werden können [80].

2.3 Johanniskraut

Bei Johanniskraut-Extrakten handelt es sich um ein etabliertes pflanzliches Anti-Depressivum. In jüngerer Zeit wurden jedoch mehrere Fälle von Wechselwirkungen von Johanniskrautextrakt-Präparaten mit anderen Medikamenten wie oralen Kontrazeptiva („Anti-Baby-Pille“) [81], den Anti-Koagulantien Phenprocoumon [81] und Warfarin [82], dem Anti-Asthmatikum Theophyllin [83], dem Immunsuppressivum Ciclosporin [81, 84], dem HIV-

Protease-Inhibitor Indinavir [85] und weiteren Arzneistoffen bekannt. Es wurde durchweg eine Beeinflussung von Laborparametern (Prothrombinzeit) im Sinne einer Wirkungsabschwächung oder eine Absenkung der Plasmaspiegel der betroffenen Pharmaka beobachtet. In klinischen Studien mit gesunden Probanden wurde eine Plasmaspiegelabsenkung bei Digoxin [86], Phenprocoumon [87] und Amitriptylin [88] nachgewiesen. Diese Daten deuteten im Zusammenhang mit Humanstudien zur Beeinflussung des 6- β -OH-Cortisol/Cortisol – Verhältnisses im Urin durch Johanniskrauttrockenextrakt [89, 90] auf eine Induktion des CYP-Systems als mögliche Ursache für die beobachteten Wechselwirkungen hin.

Untersuchungen dieser Wirkungen ergaben eine Induktion von CYP 2C und 3A *in vivo* [90]. Moore et al. [91] fanden für drei verschiedene Johanniskraut-Extrakt-Präparationen und den Inhaltsstoff Hyperforin eine Induktion von CYP 3A4 in humanen Hepatozyten, während für den Inhaltsstoff Hypericin und verschiedene Flavonoide keine Wirkung zu beobachten war. Dagegen beschreiben Markowitz et al. [92] eine inhibierende Wirkung der Flavonoide. Außerdem entdeckten Moore et al. [91] und Wentworth et al. [93], dass Hyperforin ein hoch wirksamer Aktivator des Pregnane-X-Rezeptors ist, der für die Induktion der hepatischen CYP 3A Genexpression als Reaktion auf Xenobiotika bekannt ist. Somit konnte Johanniskraut eine eindeutig induzierende Wirkung von CYP 3A zugesprochen werden.

Während die bisher vorliegenden Daten auf der Anwendung von Johanniskrauttrockenextrakten und verschiedenen reinen Inhaltsstoffen basieren, unterscheiden sich weitere auf dem Markt befindliche traditionelle Johanniskrautzubereitungen wie Tee, Pulver in Kapseln, Ölmazerate und Pflanzensäfte in ihrer Zusammensetzung von diesen zum Teil deutlich bezüglich ihres Gehalts an für Johanniskraut typischen Inhaltsstoffen und den pro Tagesdosis verabreichten Wirkstoffmengen.

Es besteht daher die Frage, ob alle diese Produkte aufgrund der bisher nur mit einzelnen Präparaten gesammelten Erfahrungen im Hinblick auf ihr Wechselwirkungspotential gleich zu bewerten sind. Andernfalls erfordern Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten und Inhaltsstoffen eine differenzierte Bewertung. Eine die Enzymaktivität steigernde Wirkung von Arzneistoffen beruht im Allgemeinen auf einer Induktion, eine aktivitätsmindernde Wirkung jedoch auf einer Inhibierung [94, 95]. Ein Wirkstoff kann somit sowohl die DNA- als auch die Protein-Ebene beeinflussen.

2.4 Oxidativer Stress

Für die Funktion der Organe ist Sauerstoff eine unentbehrliche Energiequelle. Die Leber ist eines der am stärksten sauerstoffabhängigen Organe. Für die Aufrechterhaltung der metabolischen Funktionen verbraucht sie große Mengen O_2 [96]. Die Konzentration des im Blut gelösten Sauerstoffs beträgt dabei 13 % im periportalen und 4 % im perivenösen Bereich. Wie verschiedene Untersuchungen gezeigt haben [97, 98], bringt eine Kultivierung von Hepatozyten bei den *in vivo* beobachteten spezifischen Sauerstoffkonzentrationen aber keine metabolischen Vorteile. Allerdings konnte bei Rattenhepatozyten beobachtet werden, dass niedrige Sauerstoffkonzentrationen für das Zellwachstum und die Proliferation von Vorteil sind [99, 100]. Die optimale Sauerstoffkonzentration liegt für die meisten Säugerzellen, abhängig von ihrer Sauerstoffempfindlichkeit [101], bei 20 %, entsprechend der Umgebungsluft [102]. Dieser Unterschied zwischen den entsprechenden *in vivo/in vitro* Sauerstoffpartialdrücken ist folgendermaßen zu erklären: Das die Leber erreichende Blut enthält nicht nur gelösten, sondern auch an Hämoglobin gebundenen Sauerstoff, wodurch eine größere Menge als die gemessenen 4-13 % zur Verfügung steht [97].

Sauerstoff ist ein universeller Elektronenakzeptor, der die Energiegewinnung aus Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen ermöglicht. Bei diesen katabolischen Prozessen entstehen freie Sauerstoffradikale und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) wie Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale ($\cdot OH$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [103], welchen der Körper zusammen mit exogen aufgenommenen Radikalen beständig ausgesetzt ist [104]. Aber auch ein Sauerstoffüberschuss (Hyperoxia) verursacht eine verstärkte spontane ROS-Bildung [105]. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die Mehrheit der ROS in der mitochondrialen Elektronentransportkette produziert, da 90 % des Sauerstoffverbrauchs des Körpers in den Mitochondrien zu Wasser reduziert wird [106].

ROS werden jedoch auch in anderen biochemischen Reaktionen der Zelle gebildet, z.B. von phagozytierenden Zellen während des „respiratory burst“, um Bakterien, Viren oder andere Fremdstoffe zu eliminieren [107]. Die peroxisomale Produktion von H_2O_2 kann erheblich ansteigen, wenn große Mengen Fett über die β -Oxidierung metabolisiert werden [108]. In Gegenwart von Sauerstoff können auch verschiedene andere Ein-Elektronen-Transferwege $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 bilden. Beispiele hierfür sind die Oxidierung von D-Aminosäuren, die Aktivierung von CYPs, der Abbau von Xanthine zu Harnsäure und die Autoxidation von Catecholamin [109, 110]. Die Mehrzahl der Hydroxylradikale wird durch eine metallabhängige Aufspaltung von Wasserstoffperoxid gebildet [111]. Dabei ist die Eisen(III)-abhängige Anreicherung von $\cdot OH$ die größte zelluläre Radikalquelle [112]. Ebenso sind weitere Metalle in der Lage, anfangs gering reaktive Sauerstoffzwischenstufen zu stärker reaktiven ROS zu konvertieren.

Obwohl dies normale Prozesse in der Zelle sind, besitzen ROS die starke Tendenz, anderen Molekülen Elektronen zu entziehen, um einen chemisch stabileren Zustand zu erreichen. Als Folge sind sie in der Lage, verschiedenen zellulären Komponenten oxidativen Schaden zuzuführen. Diese Eigenart wird als „Sauerstoffparadoxon“ bezeichnet: obwohl Sauerstoff essentiell für die Energiegewinnung ist, ist er gleichzeitig schädlich [113, 114]. Die Zelle besitzt jedoch eine Reihe von antioxidativen Schutzmöglichkeiten. Ist das Verhältnis des Pro-Oxidant/Anti-Oxidant-Systems zu Gunsten der ROS verschoben, spricht man von oxidativem Stress. Dieser kann entweder von einer erhöhten Exposition mit Oxidantien (z.B. auch erhöhte Sauerstoffkonzentration) oder von einem geschädigten Schutzsystem herrühren.

Unkontrollierter oxidativer Stress führt zu Zellschädigungen wie z.B. Lipidperoxidation [115] und damit Membranschädigungen [116], DNA-Strangbrüchen [117] und starken Proteinveränderungen [118]. Dies kann die Zellen sowohl zu unkontrolliertem Wachstum stimulieren und zu malignen Zellen führen [119] als auch die metabolischen Funktionen der Zellen beeinträchtigen, das Zellwachstum hemmen und letztendlich zum Zelltod führen [120]. Damit wird der oxidative Stress langfristig für Alterungsprozesse und die Entwicklung oder Beschleunigung von Erkrankungen wie Arteriosklerose [111], Morbus Alzheimer, Tumorerkrankungen [115], Altersdiabetes, sowie für chronisch degenerative Erkrankungen des ZNS (z.B. Morbus Parkinson), der Lunge, des Intestinums, der Gelenke und des Auges verantwortlich gemacht [121].

2.4.1 Antioxidantien

Für den Schutz vor oxidativem Stress besitzen Zellen und Gewebe eine Reihe von antioxidativ wirkenden Systemen. Dabei werden enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien unterschieden.

1. Enzymatische Antioxidantien:

Das wichtigste antioxidativ wirkende Enzym ist die selenabhängige Glutathion-Peroxidase, welche Sauerstoff- und Lipidperoxide reduziert [122]. Dabei wird das stark antioxidative Tripeptid Glutathion (γ -Glutamin-Cystein-Glycin) oxidiert. Die Superoxid-Dismutase setzt Superoxidanionradikale in Wasserstoffperoxid um, welches dann von Katalasen und Peroxidasen zu Wasser und Sauerstoff entgiftet wird.

2. Nicht-enzymatische Antioxidantien:

Die wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien sind die Vitamine E (fettlöslich) und C (wasserlöslich). Von den E-Vitaminen wirkt wahrscheinlich ausschließlich α -Tocopherol [123], welches sich in der Lipidphase der Zellmembranen und in Lipoproteinen (z.B. im Blutplasma) befindet. Dort führt es zu einem Kettenabbruch durch Addition eines

Wasserstoffatoms an das „angreifende“ Radikal, wodurch es selbst zu einem relativ stabilen, schlecht reaktiven Radikal wird. Dieses diffundiert an die Oberfläche der Zellmembran und wird dort durch wasserlösliche Wasserstoffdonatoren wie Vitamin C regeneriert [124]. Der oxidative Abbau von Vitamin E wird durch Flavonoide (besonders Catechin, Epicatechin, Quercetin und Resveratrol) verhindert. Auch Beta-Carotin und Ubiquinon können eine wichtige antioxidative Rolle spielen, wobei ihre Wirkweise noch nicht vollständig geklärt ist [125].

2.4.2 Vitamin C

Das wasserlösliche Antioxidantium Vitamin C (Ascorbinsäure) kann neben der Regeneration von Vitamin E auch direkt Radikale reduzieren, z.B. aus Umweltbelastungen wie Autoabgase, Ozon oder Zigarettenrauch, aber auch Sauerstoffradikale bei Inkubation mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen (s. Abbildung 2-5):

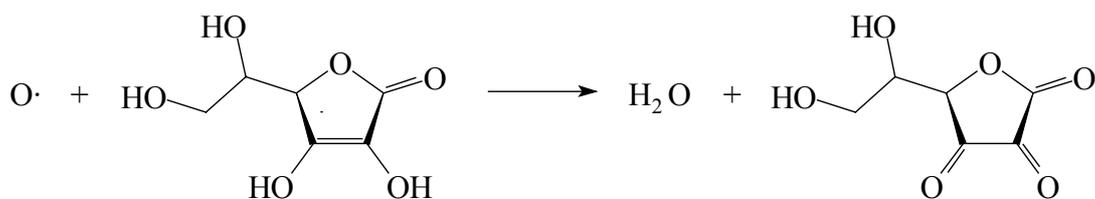


Abbildung 2-5: Antioxidative Wirkung von Vitamin C

Vitamin C ist nicht nur als Antioxidantium von Bedeutung, sondern auch für die Bildung von Kollagen (Bindegewebe, Knochen, Knorpel, Dentin) und die Aufrechterhaltung der normalen Funktion dieser Gewebe (Bildung von Hydroxyprolin aus Prolin). Daraus lässt sich die Bedeutung von Vitamin C für den Zustand der Leber erkennen. Vitamin C unterstützt die hepatische Metabolisierung von Medikamenten (Biotransformation) durch seine Funktion, Metabolite zu hydroxilieren oder zu reduzieren. Da der Mensch, ebenso wie das Schwein, nicht die Fähigkeit besitzt, Vitamin C selbst aus Glukose zu synthetisieren (Defektmutation), ist er auf die Zufuhr durch die Nahrung (250 mg pro Tag) angewiesen [126]. Die Leber ist in der Lage, Vitamin C aus der oxidierten Form Dehydroascorbinsäure (DHA) zu recyceln [127]. Dieses Recycling ist neben der Nahrungsaufnahme wichtig für die Konstanthaltung des Vitamin C-Vorrats im Körper. Dabei ist besonders die Leistungsfähigkeit der Hepatozyten für die DHA-Reduktion beträchtlich.

Die an der Plasmamembran wirkende Ascorbinsäure ist als Schutz vor der oxidativen Zellschädigung und Apoptose bekannt [128]. Ihre Wirksamkeit ist sowohl *in vivo* bei verschiedenen Krebserkrankungen (Kehlkopf-, Speiseröhren-, Luftröhren-, Mundhöhlen-, Magen- und Bauchspeicheldrüsenkrebs) [129-135] als auch *in vitro* bei chromosomaler

Schädigung nachgewiesen [136, 137]. Zudem ist die stimulierende Wirkung *in vitro* auf das Wachstum, die Proliferation und den Metabolismus verschiedener primärer Zellen [138-140] dokumentiert.

2.5 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung von Zellen wird die physiologische Temperatur von 37°C auf eine sehr viel niedrigere Lagerungstemperatur gesenkt. Diese muss so niedrig sein, dass das System stabil eingefroren ist und physikalische Prozesse wie Rekristallisation oder Devitrifikation nicht möglich sind. Tierische Zellen werden in der Regel bei -196°C gelagert und können bei Bedarf wieder aufgetaut und kultiviert werden.

2.5.1 Schädigungsmechanismen

Während des Einfrierprozesses können die Zellen durch Kristallbildung und -wachstum sowie durch osmotische Reaktionen geschädigt werden.

Wird eine Flüssigkeit abgekühlt, bilden sich bei Erreichen des Gefrierpunkts nicht sofort Kristalle. Die Lösung unterkühlt zunächst, bis ab einer bestimmten Temperatur die Kristallisation einsetzt [141]. Nun steigt die Temperatur der Lösung abrupt auf ihren Gleichgewichtsfrierpunkt und es wird Kristallisationswärme freigesetzt. Durch diese schnelle Temperaturänderung können die Zellen geschädigt werden.

Für die Kristallisation ist die Bildung eines Kristallisationskeims nötig. Dieser Vorgang ist in großen Volumina wahrscheinlicher als in kleinen [142], da die Akkumulation der Mindestmolekülzahl hier leichter möglich ist. Für die Kryokonservierung von Zellsystemen bedeutet dies, dass sich Kristalle zunächst im Extrazellularraum (EZR), also im Medium, bilden, während eine Kristallisation im Intrazellularraum (IZR) unwahrscheinlicher ist. Da in wässrigen Lösungen, also auch im Medium, zunächst reines Wasser ausfriert, werden die Salze der verbleibenden Lösung aufkonzentriert. Die Zellen reagieren hierauf mit Wasserabgabe an den EZR, bis das osmotische Gleichgewicht wieder eingestellt ist. Während des Absenkens der Temperatur können zwei wesentliche Schädigungsarten auftreten, die durch die Zwei-Faktor-Hypothese von Mazur [143, 144] beschrieben werden.

1. Osmotische Schädigung der Zellen bei zu niedriger Kühlrate

Wird die Kühlrate so gering gehalten, dass die Lösung an der Liquiduslinie entlang abgekühlt wird, kann sich das Gleichgewicht immer wieder neu einstellen. Dadurch werden die Zellen stark entwässert, es treten Konformationsänderungen und schließlich irreversible Denaturierungen der Zellproteine auf, die zum Zelltod führen.

2. Intrazelluläre Eisbildung bei zu hoher Kühlrate

Wird eine zu hohe Kühlrate gewählt, kann sich bei beginnender Eisbildung im EZR kein neues osmotisches Gleichgewicht zwischen IZR und EZR einstellen. Hierdurch verbleibt Wasser im IZR und kann dort auskristallisieren. Die intrazelluläre Eisbildung ist jedoch für alle Zelltypen tödlich, sobald die Kristalle größer als 300 nm werden [145]. Zudem dehnt sich Wasser beim Gefrieren aus, so dass die Zellen zu einem gewissen Grad entwässert werden müssen, damit die Zellmembran beim Erstarren des Plasmas nicht zerreißt.

Für eine erfolgreiche Kryokonservierung müssen also die bestmöglichen Bedingungen gefunden werden, die eine Zellschädigung durch zu niedrige bzw. zu hohe Kühlraten sowie einen schnellen Temperaturanstieg durch freiwerdende Kristallisationswärme verhindern.

2.5.2 *Kryoadditive*

Die Zugabe von Kryoadditiven zum Einfriermedium wirkt der osmotischen Schädigung der Zellen entgegen. Dabei werden makromolekulare Additive, wie HES, Dextran oder Polyvinylpyrrolidon, und niedermolekulare Additive, zu denen DMSO und Glycerin gehören, unterschieden [146].

Die Wirkung der makromolekularen Additive, die nur im EZR wirken, beruht auf der Erhöhung der Viskosität des EZR. Die Polymere binden Wasser in großen Mengen in ihrer Hydrathülle, wodurch weniger freies Wasser für die Kristallisation zur Verfügung steht und die Unterkühlbarkeit der Lösung steigt. Daher erfolgt die Kristallisation im EZR bei niedrigeren Temperaturen, bei denen jedoch bereits die Permeabilität der Zellmembran für Wasser herabgesetzt ist. Der Stoffaustausch über die Membran nimmt somit mit sinkender Temperatur ab, die Zelle wird weniger stark entwässert. Zwar sind die makromolekularen Kryoadditive nicht toxisch, wirken aber aufgrund ihrer Größe nur im EZR und sind damit hauptsächlich für die Kryokonservierung kleiner, wenig komplexer Zellen wie z.B. Erythrozyten geeignet.

Bei großen, komplexen Zellen wie z.B. Hepatozyten kommen die niedermolekularen Additive zum Einsatz. Sie wirken sowohl im EZR als auch im IZR, indem sie den Gefrierpunkt der Lösung senken. Dadurch wird die Membranpermeabilität der Zellen vermindert, die osmotische Wasserabgabe erfolgt langsamer und es sind geringere Kühlraten möglich. Zudem erhöhen sie die Viskosität und puffern den Wassertransport, da ein Wasser/Additiv/Salz-Komplex bei tieferen Temperaturen ausfriert und so den Salzgehalt der Lösung senkt [147]. Durch die Verlangsamung der Eiskristallisationskinetik wird gleichzeitig die Neigung zur interzellulären Eisbildung verringert.

Ein häufig verwendetes niedermolekulares Kryoadditiv ist DMSO, welches jedoch zelltoxische Eigenschaften besitzt. Aufgrund seiner Eigenschaft als Zwitterion kann es sich in

die Zellmembran einlagern und ihre Stabilität beeinträchtigen. Zudem erhöht DMSO die Osmolalität der Lösung. Bei Zimmertemperatur liegt sie in einer Lösung mit 10 % DMSO 5mal höher als die physiologische Osmolalität. Die Zelle reagiert darauf mit starkem Wasserverlust. Ein schnelles Permeieren würde aber zu einer Membranschädigung führen. Daher erfolgt die Aufgabe des Einfriermediums bei einer Temperatur von 0°C, da hier die Permeabilität der Membran niedriger ist und DMSO innerhalb der Zellmembran aufgrund geringerer kinetischer Energie weniger destabilisierend wirkt [148-150]. Beim Auftauen wird das Einfriermedium durch das Auftaumedium so stark verdünnt (in der Regel 1:10), dass die osmotischen Effekte des DMSO vernachlässigbar werden.

Der Einsatz von Kryoadditiven wirkt also der osmotischen Schädigung durch zu niedrige Kühlraten entgegen. Damit ist die Nutzung der niedrigen Kühlraten möglich, eine Schädigung durch intrazelluläre Eisbildung bei zu hohen Kühlraten kann vermieden werden. Die Schädigung der Zellen durch abrupte Erwärmung auf den Gleichgewichtsfrierpunkt kann durch ein sogenanntes Seeding, ein schnelles, gezieltes Gegenkühlen, umgangen werden.

2.5.3 Kryokonservierung von Leberzellen

Leberzellen sind extrem anfällig für Schädigungen durch Einfrier- und Auftau-Prozesse, sodass die Wahl des Kryoadditivs, dessen Konzentration sowie der Kühl- und Auftauraten entscheidend für das Überleben der Zellen ist [151]. Da Leberzellen *in vitro* nicht proliferieren, ist es sehr wichtig, eine geeignete Konservierungsmethode zu finden, die die Zellschädigung und den Verlust der spezifischen Funktionen minimiert. Dabei sollte das Kryoprogramm Zellschädigungen durch längerfristige Aussetzung in der hyperosmotischen Umgebung, durch intrazelluläre Eisbildung [152] und einen Temperaturanstieg durch freiwerdende Kristallisationswärme verhindern [151]. Die extrazelluläre Eisbildung sollte induziert und die interne und externe Zellumgebung stabilisiert werden [153, 154].

Die Kryokonservierung von frisch isolierten Zellsuspensionen zeigte bisher wenig Erfolg. Die Kultureigenschaften der Hepatozyten wurden durch den Einfrierprozess stark verändert: Zwar betrug die Vitalität der Zellen direkt nach dem Auftauen 30-80 %, nahm aber bereits nach kurzer Zeit beachtlich ab [155, 156]. Zudem kam es zu einer sehr schlechten Adhärenz der Zellen [5, 157], verbunden mit Veränderungen der Morphologie [158, 159] und einer beeinträchtigten Funktionalität [160, 161]. Die synthetischen Prozesse wie Glukoneogenese [162] und Proteinsynthese (z.B. Albumin) [163] verringerten sich, die Phase I-Aktivität sank bis auf 10 % [164] und die Phase II-Aktivität verschwand nahezu vollständig [165]. Dabei waren zytosolische Enzyme am stärksten betroffen, die Sulfokonjugation nahm stärker ab als die Glukuronidierung [165]. Mit diesem Verfahren können kryokonservierte Hepatozyten-Suspensionen nur für Kurz-Zeit- (< 12 h), nicht jedoch Lang-Zeit- Untersuchungen genutzt werden [166].

Dieser bezeichnende Funktionalitäts-Verlust wird von Membranschädigungen, bedingt durch den enzymatischen Verdau während der Zellisolierung, hervorgerufen [152]. Werden die Hepatozyten bereits vor der Kryokonservierung in Kultur gebracht, kann eine Regeneration der Membranstabilität und somit eine größere Widerstandsfähigkeit gegen osmotischen Stress ermöglicht werden [72]. Die Schädigungen können auch durch eine Anwendung der nicht-enzymatischen Isolierungstechnik mittels EDTA-Perfusion vermieden werden [167, 168], allerdings ist die Zellausbeute in diesem Fall deutlich geringer und die Methode gerade für humane Leberstücke somit ungeeignet [169].

Eine 24-stündige Vorkultivierung der Zellen hat sich als besonders günstig herausgestellt [170], wobei die Kultivierung als Suspensionskultur [171], Einkapsulierung in Kalzium-Alginat [171, 69] oder als Sandwich [173-175] erfolgen kann. Gerade die Kultivierung als Monolayer ermöglicht einen einheitlichen Einfluss der Temperaturänderungen auf die Zellen, wobei die extrazelluläre Matrix einen zusätzlichen Schutz bietet [152]. Auf diese Weise eingefrorene Zellen zeigen unabhängig von der Lagerungszeit nach dem Auftauen eine hohe Überlebensrate, eine andauernde Proteinsynthese (Albumin) und eine CYP-Aktivität über zwei Wochen in Kultur [152, 153, 173-175]. Dies ist besonders bei immobilisierten Kulturen wichtig, da keine Möglichkeit besteht, tote Zellen oder Zelldebris nach dem Auftauen zu entfernen [153]. Bisher wurden Hepatozyten hauptsächlich als Suspension in speziellen Kryobehältern [170, 171] oder als Monolayer in Zellkulturflaschen bzw. Petrischalen [152, 153, 173-175] eingefroren, jedoch konnte mit Ausnahme des FMB [25] bislang kein Bioreaktorsystem als funktionelle Einheit kryokonserviert werden [152]. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Entwicklung eines geeigneten Kryoprogramms für den Mini-Bioreaktor.

2.5.4 Mathematische Modellierung des Temperaturverlaufs an der Zellschicht

Für eine einfachere Übertragbarkeit des Kryoprotokolls auf andere, ähnliche Systeme kann der Temperaturverlauf an der Zellschicht rechnerisch approximiert und mit der tatsächlich in der Mediumschicht gemessenen Temperatur verglichen werden. Dafür wird ein stark vereinfachtes Modell herangezogen, welches nur die Wärmeleitung, nicht aber die Wärmekonvektion und die Wärmestrahlung berücksichtigt [25].

Ausgangspunkt für die Berechnung des Wärmeübergangs durch stationäre Wärmeleitung in ruhenden Medien ist das Fourier'sche Grundgesetz der Wärmeleitung [176]. Für eine ebene Schicht lautet dieses:

$$\dot{Q} = \frac{\lambda}{\delta} \cdot A \cdot \Delta T \quad (1)$$

mit	\dot{Q}	= Wärmestrom	[W]
	λ	= Wärmeleitfähigkeit	[W m ⁻¹ K ⁻¹]
	δ	= Schichtdicke	[m]
	A	= Oberfläche	[m ²]
	ΔT	= Temperaturdifferenz	[K]

Daraus ergibt sich der Wärmedurchgangskoeffizient k:

$$k = \frac{\lambda}{\delta} \quad (2)$$

bzw. $\sum \frac{\lambda}{\delta}$ bei mehrschichtigen Durchgängen (unter Vernachlässigung der Wärmeübergangskoeffizienten).

Die aufgenommene bzw. abgegebene Wärmemenge des Mediums über die Zeit beträgt damit:

$$Q = k \cdot A \cdot \Delta T \cdot t = m \cdot c \cdot T \quad (3)$$

mit	Q	= Wärmemenge	[J]
	k	= Wärmedurchgangskoeffizient	[W m ⁻² K ⁻¹]
	t	= Zeit	[s]
	m	= Masse	[kg]
	c	= spezifische Wärmekapazität	[J kg ⁻¹ K ⁻¹]
	T	= momentane Temperatur	[K]

Bei variablem Wärmestrom gilt:

$$dQ = k \cdot A \cdot \Delta T \cdot dt = m \cdot c \cdot dT \quad (4)$$

und somit

$$k \cdot A \cdot (T_M - T_K) dt = m \cdot c \cdot (T_1 - T_2) \quad (5)$$

wobei $T_M > T_K$ und $T_1 > T_2$

mit	T_M	= Mediumtemperatur	[K]
	T_K	= Kammertemperatur	[K]
	T_1	= Isttemperatur	[K]
	T_2	= Solltemperatur	[K]

Die Auflösung nach der Medientemperatur und Integration nach der Zeit führt zu:

$$T_M = (T_1 - T_2) \cdot e^{-\frac{k \cdot A \cdot t}{m \cdot c}} + T_K \quad (6)$$

bzw. $T_M = a \cdot T_1 + (1 - a) \cdot T_K \quad (7)$

mit $T_K = T_2$

$$a = e^{-\frac{k \cdot A \cdot t}{m \cdot c}}$$

Im Fall einer Eisbildung ändert sich im vorliegenden System der Wärmedurchgangskoeffizient k der Mediumschicht:

$$k_{ges} = k_{Medium} + k_{Eis} = \left(\frac{\lambda}{\delta} \right)_{Medium} + \left(\frac{\lambda}{\delta} \right)_{Eis} \quad (8)$$

Zwar sind die Schichtdicken des Einfriermediums und die des Eises bei vollständig gefrorener Schicht bekannt, jedoch ändern sich diese während des Einfriervorgangs. Somit ergibt sich:

$$\delta_{ges} = \delta_{Medium} + \delta_{Eis} \quad (9)$$

Mit Hilfe der Liquiduskurve für ein H₂O-DMSO (2M) –NaCl (0,9Vol%) Gemisch kann der prozentuale Eisgehalt der Schicht näherungsweise ermittelt werden [177]. Dieser wird berechnet durch:

$$E(t) = 39,195 \cdot \ln T' - 58,691 \quad (10)$$

mit $E(t)$ = prozentualer Eisanteil

T' = Temperatur [°C]

Durch die Berechnung von $E(t)$ ergibt sich auch die Dicke der Eisschicht δ_{Eis} . Damit gilt für den Wärmedurchgangskoeffizienten k der Mediumschicht:

$$k_{ges} = k_{Medium} + k_{Eis} = \left(\frac{\lambda}{\delta_{ges} - \delta_{Eis}} \right)_{Medium} + \left(\frac{\lambda}{\delta} \right)_{Eis} \quad (11)$$

Durch Einsetzen in Gleichung (7) kann die Medientemperatur T_M bei vorgegebener Kammertemperatur T_K berechnet werden, wenn T_1 die Anfangstemperatur der Probe und T_2 als Solltemperatur gleich der Kammertemperatur ist. So wird schrittweise die Medientemperatur während der gesamten Kryokonservierung errechnet, indem die ermittelte Medientemperatur jeweils als neue Isttemperatur T_1 eingesetzt wird.

3 Der Bioreaktor

Aufbauend auf die vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Bader zur *in vitro*-Oxygenierung von Leberzellen mit Hilfe von gaspermeablen biokompatiblen Membranen [4, 24, 178, 179] wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Augustinus Bader und Herrn Rüdiger van der Fecht, ehemaliger Leiter der Zentralen Forschungswerkstatt der MHH, der in dieser Arbeit beschriebene und charakterisierte Mini-Bioreaktor entwickelt. Er stellt ein Scale-Down der bis dahin vorhandenen Kultursysteme (FMB) dar und wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt (DPMA) patentiert [180].

3.1 Aufbau

Der Bioreaktor besitzt die Dimensionen einer herkömmlichen 24Well-Zellkultur-Platte. In Abbildung 3-1 sind die Einzelteile, aus denen der Mini-Bioreaktor zusammengesetzt ist, dargestellt.



Abbildung 3-1: Einzelteile des Mini-Bioreaktors

Unter das Hauptteil aus Polycarbonat werden eine gaspermeable Membran (25 μm Schichtdicke), eine Silikon-Dichtung und ein Metallboden geschraubt. Abbildung 3-2 zeigt den fertig zusammengesetzten Bioreaktor.

Der Bioreaktor hat somit nur die gaspermeable Folie als Bodenfläche, Zellen können direkt darauf kultiviert und damit auch mikroskopiert werden. Die Folie besitzt unter Normalbedingungen eine Sauerstoffpermeabilität von $11,6 \cdot 10^3 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Somit steht den Zellen pro Well (1,77 cm^2) und Tag eine maximale Sauerstoffmenge von 90 $\mu\text{mol O}_2$ zur Verfügung. Primäre porcine Hepatozyten besitzen einen Sauerstoffbedarf von 26-78 $\mu\text{mol 24 h}^{-1} 10^6$ Zellen [181]. Bei einem Inokulum von 250.000 Hepatozyten pro Well liegt der tägliche Sauerstoffbedarf also bei 6,5-19,5 $\mu\text{mol O}_2$. Damit steht den Zellen 5-14mal mehr Sauerstoff

zur Verfügung als sie benötigen, eine vom Medium unabhängige Sauerstoffversorgung ist gewährleistet.

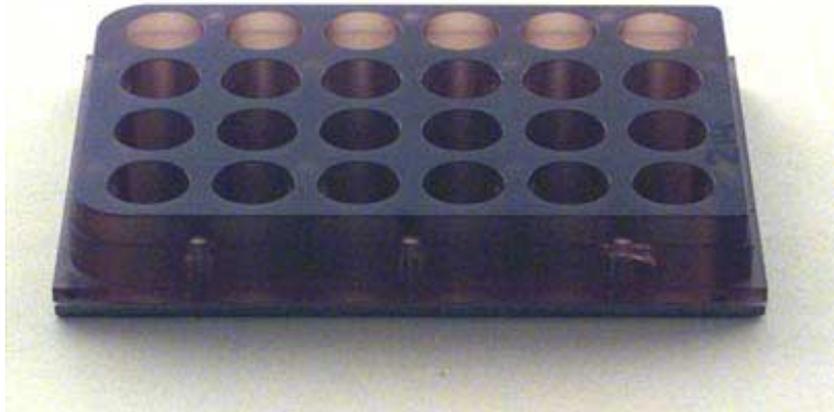


Abbildung 3-2: Zusammengesetzter Bioreaktor

Für die Zellkultur wird der Reaktor mit einem Deckel verschlossen und in eine Halterung gestellt, die die direkte Sauerstoffkonvektion der Umgebungsatmosphäre zur Unterseite des Bioreaktors zulässt (Abbildung 3-3).



Abbildung 3-3: Einsatz des Bioreaktors für die Zellkultur

Der Aufbau der Zellkultur ist am Beispiel für Hepatozyten schematisch in Abbildung 3-4 dargestellt.

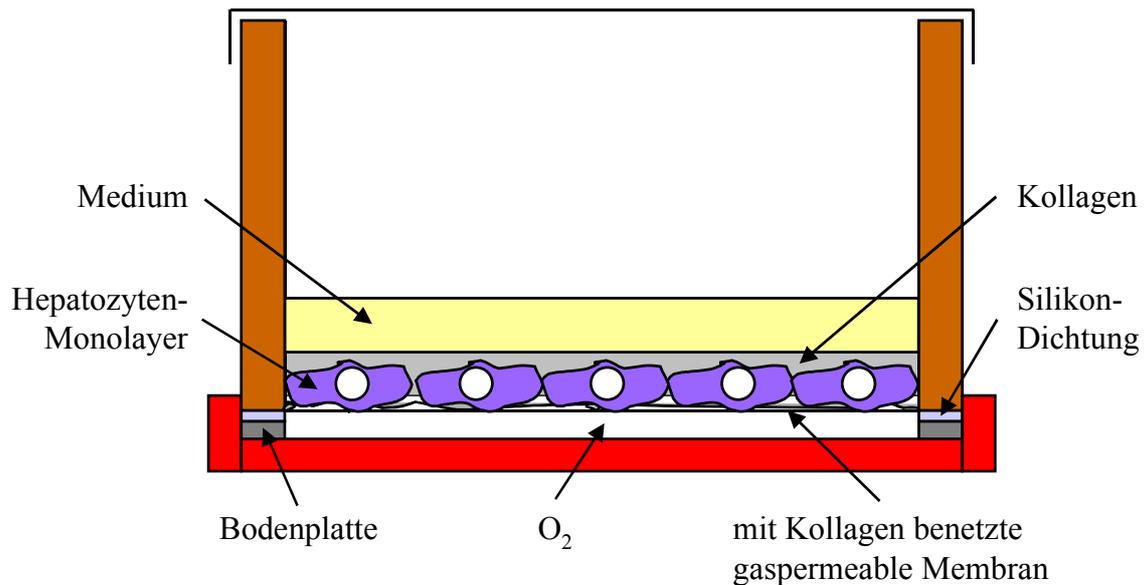


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung einer Hepatozytenkultur im Mini-Bioreaktor (Betrachtung für ein Well)

3.2 Anforderungen und Eigenschaften

Für den generellen Einsatz zum pharmakologischen Screening werden an die Eigenschaften des Bioreaktors folgende Anforderungen gestellt:

- Sauerstoffversorgung unabhängig von der Medienversorgung
- Mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie
- Eignung für die Kultivierung verschiedener primärer Zellsysteme
- Erbringung gewebespezifischer Leistungen
- Eignung für die Untersuchung von oxidativem Stress und somit das Screening von Antioxidantien
- Kryokonservierbarkeit

Durch die Konstruktionsweise des Mini-Bioreaktors werden somit zwei der gestellten Anforderungen erfüllt: eine vom Medium unabhängige Sauerstoffversorgung und die mikroskopische Kontrolle der Zellkulturen.

Das definierte Einfrieren adhärenter Zellen ist besonders in Zellplattensystemen möglich, wie sie in dem Bioreaktor realisiert werden. Da sich alle Zellen in gleichen definierten Abständen von der Kältequelle befinden, kann die beim Einfrierprozess freiwerdende intrazelluläre Kristallisationswärme besonders gut in einer homogenen Form gegenreguliert werden. Damit sollte auch die Kryokonservierung der Hepatozyten im Bioreaktor möglich sein.

Ob auch diese und die weiteren Anforderungen erfüllt werden, ist Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

4 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die Durchführungen der verschiedenen Versuche beschrieben. Genaue Angaben zu Geräten, Materialien und Chemikalien finden sich im Anhang.

4.1 Zellisolationen, Kultivierungen und Färbungen

Die generelle Eignung des Mini-Bioreaktors wurde anhand der Kultivierung verschiedener primärer Zellen untersucht. Ihre Gewinnung und Kultivierung sowie die Kollagen-Extraktion (Sandwich-Kultur der Hepatozyten) sind im Folgenden beschrieben.

4.1.1 Kollagen-Extraktion

Lösungen:

NaCl-Lösung	1 % und 30 %
Essigsäure	3 %
Lösung aus	5 % NaCl + 0,6 % Essigsäure
HCl	1 mM

Extraktion:

Für den Aufbau der modifizierten Sandwich-Kultur wurde Kollagen aus Rattenschwänzen nach der Methode von Elsdale und Bard [182] extrahiert. Diese wurden bei -20°C gelagert und bei Bedarf in Wasser aufgetaut. Zunächst wurde die Haut abgezogen und die Kollagenfasern mit einer Klemme vom Schwanz abgedreht. Die so erhaltenen Streifen wurden in 1 % NaCl-Lösung gesammelt, dann mit Wasser gespült und über Nacht bei 4°C in eine langsam gerührte 3 % Essigsäure (200 ml/Schwanz) gegeben.

Am folgenden Tag wurde die entstandene Suspension durch eine Gazebinde filtriert, um die aufgequollenen Fasern zurück zu halten. Die aufgefangene Lösung wurde für eine Stunde bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand wurde weiter aufgearbeitet und das Pellet verworfen. 30 % NaCl-Lösung wurde entsprechend $\frac{1}{5}$ des erhaltenen Volumens abgemessen und der Lösung über Nacht zutropfen gelassen, wobei die Flüssigkeit langsam gerührt wurde.

Am nächsten Tag wurde die Lösung bei 4500 g und 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand dann verworfen und das Pellet in 5 % NaCl + 0,6 % Essigsäure (50 ml/Schwanz) resuspendiert. Diese Lösung wurde dann erneut für 10 min bei 4500 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und das Pellet in 5 % NaCl + 0,6 % Essigsäure (50 ml/Schwanz) resuspendiert. Die Kollagenlösung wurde in Dialyseschläuche gefüllt und diese für 5 Tage bei 4°C in 1 mM HCl langsam gerührt. Dabei wurde die HCl-Lösung täglich gewechselt.

Danach wurde das Kollagen in sterile Flaschen gefüllt, 3 % Chloroform zugegeben und so lange mit leicht geöffnetem Deckel bei 4°C ruhen gelassen, bis sich das Chloroform vollständig aufgelöst hatte (2-3 Tage).

Diese Stammlösung wurde nun entweder bei 4°C gelagert oder zum Gebrauch mit 1 mM HCl auf eine Endkonzentration von 1,11 mg ml⁻¹ eingestellt. Das extrahierte Kollagen besteht zum größten Teil aus Typ I-Kollagen, stellt jedoch eine Mischung verschiedener Typen dar.

4.1.2 Hepatozyten

Lösungen:

Alle Isolationspuffer: in Aqua bidest., pH 7,4, müssen steril filtriert werden

Puffer I:	wird vor der Zellisolation durch Zugabe von EGTA (4 ml l ⁻¹) aus Puffer II hergestellt
	EGTA: 50 mM
Puffer II:	NaCl 8,3 g l ⁻¹
	KCl 0,5 g l ⁻¹
	HEPES 2,4 g l ⁻¹
Puffer III:	NaCl 3,9 g l ⁻¹
	KCl 0,5 g l ⁻¹
	HEPES 2,4 g l ⁻¹
	Glukose 2,0 g l ⁻¹
Puffer IV:	HBSS (10x) 100 ml l ⁻¹
	HEPES 2,4 g l ⁻¹
	BSA 2,0 g l ⁻¹
	Glukose 1,0 g l ⁻¹
	CaCl ₂ · H ₂ O 0,3 g l ⁻¹
Collagenase:	250 mg/Isolation (500 ml Puffer III)
CaCl ₂ :	200 mM
Premix	Penicillin 9070 kU l ⁻¹
	Streptomycin 9,1 g l ⁻¹
	Glutamin 26,5 g l ⁻¹
	Insulin 3628 U l ⁻¹
	Glucagon 317,5 µg l ⁻¹
	Prednisolon 18,14 mg l ⁻¹

10x DMEM	DMEM	100 mg l ⁻¹
	NaHCO ₃	37 g l ⁻¹
WE	William's Medium E	500 ml
	Premix	27,2 ml
	Fötale Kälber Serum	25 ml
DIF	HybridoMed DIF 1000 Medium	500 ml
	Premix	27,2 ml

Isolierung:

Für die Isolierung von Leberzellen wurden weibliche Schweine der Deutschen Landrasse mit einem Gewicht von 15-20 kg vom Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee bezogen. Die Leberentnahme erfolgte an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Tiere wurden vom Tierpfleger narkotisiert und die Hepatektomie nach der von Siewert 1997 [183] beschriebenen Methode durchgeführt. Der Brustraum des Tieres wurde eröffnet und die Pfortader der Leber abgeklemmt. Durch eine Perfusionsnadel wurde das Organ mit 4°C kalter Ringer-Lösung perfundiert, bis es hell und somit ausgeblutet war. Nun wurde die Leber entnommen und die Gallenflüssigkeit durch Punktion abgesaugt.

Die Leberzellisolation erfolgte in Anlehnung an die von Seglen (1976) [62] und Hoogenboom (1989) [184] beschriebenen Methoden. Das Organ wurde in 4°C kalter Ringer-Lösung in das Labor gebracht und eine große Kanüle in die Pfortader eingenäht. Hierdurch wurde das Organ mit 1,5 Litern Puffer I perfundiert, um es vollständig zu entbluten. Dieser Puffer enthält EGTA, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Anschließend wurde die Leber mit der gleichen Menge Puffer II perfundiert, um das EGTA wieder zu entfernen, da es eine inhibierende Wirkung auf Collagenase besitzt. Nun folgte eine 30 minütige Perfusion mit 500 ml Collagenase-haltigem (0,05 %) Puffer III, um das Bindegewebe anzudauen und so die Hepatozyten herauszulösen. Dieser Puffer wurde rezirkulieren gelassen und nach kurzer Zeit mit 10 ml CaCl₂ (200 mM) versetzt, um letzte EGTA-Reste zu binden. Anschließend wurde die Leber mit Puffer IV übergossen, mechanisch zerkleinert und die entstandene Zellsuspension durch eine Nylongaze (auf Eis) filtriert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Das Filtrat wurde bei 75 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und dann je nach Aufreinigungsgrad zwei- bis dreimal in Puffer IV gewaschen und rezentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in WE aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Vitalität der Schweinehepatozyten lag in der Regel bei über 90 %, Ausbeuten von etwa $10 \cdot 10^9$ Zellen wurden erreicht. Diese Isolationsmethode führt zu einer Suspension aus Hepatozyten sowie nicht-parenchymalen Zellen.

Kultivierung:

Bevor das Rattenschwanz-Kollagen eingesetzt wurde, wurde es 10:1 mit 10x DMEM versetzt, um einen neutralen pH-Wert zu erhalten und das Aushärten des Kollagens zu begünstigen. Die Wells des Bioreaktors wurden mit Kollagen benetzt, indem dieses in die Wells gegeben und sofort wieder abgenommen wurde. Danach wurde eine Zellsuspension mit 500.000 vitalen Hepatozyten/ml in WE angesetzt und davon jeweils 0,5 ml/Well aufgegeben. Die Zellen wurden für 90 min adhären gelassen, dann wurde der Überstand mit nicht-adhären (toten oder stark geschädigten) Zellen abgesaugt und 250 µl/Well WE-Medium aufgegeben. Dies führt zu einer Kokultivierung von Hepatozyten und nicht-parenchymalen Zellen. 48 Stunden nach der Isolation wurde eine deckende/stabilisierende zweite Kollagenschicht aufgebracht (250 µl/Well), für eine Stunde härten gelassen und die Zellen mit 250 µl/Well DIF-Medium gefüttert [68]. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden.

4.1.3 EndothelienLösungen:

PBS, pH 7,4:	NaCl	8,0 g l ⁻¹
	KCl	0,2 g l ⁻¹
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g l ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	0,24 g l ⁻¹

Medium: EGM: Endothelial Cell Growth Medium

Präparation:

Die Zellisolierung erfolgte aus porcinen Arterienstücken nach der von Lindl [185] beschriebenen Methode. Die Arterie wurde für eine Stunde in 4°C-kühlem PBS (3x Pen/Strep) desinfiziert, dann dreimal mit frischem PBS (3x Pen/Strep) gewaschen und geöffnet. Das Endothel wurde in einem Zug von der Oberfläche abgeschabt und in ein Zentrifugenglas mit Medium (EGM) überführt, 10 min bei 250 g zentrifugiert und zweimal mit Medium gewaschen. Die Zellen wurden in eine Kulturflasche mit 5 ml Medium überführt und für eine Woche ohne Mediumwechsel inkubiert. Danach wurde zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel vorgenommen, konfluente Endothelien wurden 1:2 gesplittet.

Kultivierung:

Die Wells des Bioreaktors wurden mit Gelatine benetzt. Dann wurden die Zellen in einer Dichte von 25.000 Zellen/Well in EGM-Medium aufgegeben. Die Adhäsionszeit betrug 60 min, dann wurden die nicht-adhären Zellen abgesaugt und 250 µl/Well Medium

aufgegeben. Während der anschließenden Kultivierung erfolgte zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel.

4.1.4 Fibroblasten

Lösungen:

Medium:	DMEM	
	FCS	15 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %

Isolierung:

Für die Isolierung von Fibroblasten wurden humane Venen aus der Herz-Thorax-Gefäßchirurgie der MHH verwendet. Die Adventitia der Venen wurde mit Hilfe einer Pinzette abpräpariert und in kleine Stücke (ca. 0,25 cm²) zerschnitten. Diese Stücke wurden auf den Boden einer Petrischale „geklebt“, leicht antrocknen gelassen und die Petrischale dann auf den Kopf gedreht, sodass sich die Stücke festsaugen konnten. Nach 15 Minuten wurde die Schale wieder umgedreht und mit einer 100 µl-Pipette vorsichtig ein Hof aus Medium um die einzelnen Stücke gezogen (Befeuchtung). Nach 4-8 Tagen wuchsen Fibroblasten aus den Stücken aus.

Kultivierung:

Die Fibroblasten wurden mit Hilfe von Trypsin von den Petrischalen abgelöst und in Kulturflaschen überführt. Für die Bioreaktoren wurden die Zellen abtrypsiniert und in einer Dichte von 25.000 Zellen/Well ausgesät. Ein Mediumwechsel fand zweimal wöchentlich mit je 250 µl Medium/Well statt.

4.1.5 Chondrozyten

Lösungen:

Medium:	IMDM	
CaCl ₂ , 1 M:	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147 g l ⁻¹
Lösung A: Tris-Stock, 1 M, pH 7,5:	Tris HCl	127 g l ⁻¹
	Tris Base	23,6 g l ⁻¹
Lösung B: NaCl-Stock, 5 M:	NaCl	292,2 g l ⁻¹

Waschpuffer:	Lösung A	100 ml l ⁻¹
	Lösung B	30 ml l ⁻¹
	CaCl ₂	2 ml l ⁻¹
	BSA	1 g l ⁻¹
Färbepuffer:	Lösung A	100 ml l ⁻¹
	Lösung B	30 ml l ⁻¹
	CaCl ₂	2 ml l ⁻¹
	BSA	10 g l ⁻¹

Quelle:

Chondrozyten aus einem Gelenkknorpel aus humanem Knie wurden von Biochrom (Berlin) bezogen.

Kultivierung:

Die Chondrozyten wurden in mit Kollagen beschichtete Kulturflaschen überführt und alle zwei Tage das Medium (IMDM) gewechselt. Die Wells der Bioreaktoren wurden mit Kollagen benetzt und die Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen/Well ausgesät. Ein Mediumwechsel fand jeden zweiten Tag mit je 250 µl Medium/Well statt.

Histochemie:

Für die histochemische Färbung der Chondrozyten wurde das Medium aus den Wells entfernt und die Zellen mit 200 µl/Well Aceton (-20°C) für 8 min fixiert. Nachdem die Zellen getrocknet waren, wurden sie 5 min in Waschpuffer gewaschen. Dann wurden mit 0,3 % H₂O₂ in Waschpuffer für 30 min (Inkubation im Dunkeln) die endogenen Peroxidasen blockiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer gewaschen und dann mit Ziegenserum (da sek. AK aus Ziege) für 15 min der Hintergrund blockiert. Danach wurde das Serum abgenommen und direkt für eine Stunde der primäre Antikörper (1:250 in Färbepuffer) aufgegeben. Nun wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der sekundäre Antikörper (1:50 in Färbepuffer) für 30 min aufgegeben. Währenddessen wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) angesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser ist Peroxidase gekoppelt und lagert sich an den sekundären Antikörper an. Der sekundäre Antikörper wurde abgenommen, die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der ABC für 30 min aufgegeben. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal in Waschpuffer gewaschen und dann DAB (Di-Amino-Benzidine, Substrat für Peroxidase) für 7 min aufgegeben. Danach wurden die Zellen dreimal in Aqua dest. gewaschen und dann der Bioreaktor aufgeschraubt und die Membran entnommen. Sie wurde 4 min mit Hämalaun

gegengefärbt, dreimal mit Aqua dest. gespült und dann 10 min unter Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Abspülen mit Aqua dest. wurde die Folie für je 2 min in 96 % und 100 % Ethanol und anschließend je 5 min in zwei Xylolbädern (100 %) entwässert. Nun wurde die Membran zerschnitten, weitere 5 min in Xylol gegeben und dann die Zellen der einzelnen Wells mit Eukitt auf Objektträgern eingedeckelt. Die Chondrozyten erscheinen als braune Zellen mit blauem Kern im Durchlichtmikroskop.

4.1.6 Cardiomyozyten

Lösungen:

Aufbewahrungsmedium:	MEM	
	Glutamax	1%
Waschmedium:	MEM	
	Glutamax	1 %
	Dnase	0,05 %
	Horse Serum	10 %
Kulturmedium:	DMEM/F12	
	Horse Serum	10 %
	HEPES	75 µM
PFA (Para-Formaldehyd):	3 % (w/v) in PBS	
	bei 55°C mindestens 1 h rühren	
	nach Klärung in Eiswasser überführen	
	über Faltenfilter filtrieren	
	Aliquots bei -20°C lagern	

Isolierung:

Die Isolierung von Cardiomyozyten wurde mit Herzen aus Embryonen von trächtigen Ratten (E11-E12, Sprague Dawley) durch Mitarbeiter der Herz-Thorax-Gefäßchirurgie ausgeführt. Die genaue Methode ist im Anhang (s. Kapitel 8.5) beschrieben.

Kultivierung:

Die Zellen wurden in einer Dichte von 25.000 Zellen/Well ausgesät. Ein Mediumwechsel fand jeden zweiten Tag mit 250 µl Medium/Well statt.

Histochemie:

Am 5. Kulturtag wurden die Cardiomyozyten nach Mediumabnahme für 30 min mit 3 % PFA fixiert. Dann wurden sie mit Waschpuffer 5 min gewaschen und mit 4 % Ziegenerum und 0,3 % Triton für 15 min der Hintergrund blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper (1:1000 in Färbepuffer) für 60 min aufgegeben. Dann wurden die Zellen dreimal in Waschpuffer gewaschen und der sekundäre Antikörper (1:100 in Färbepuffer) für 30 min aufgegeben. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und für 5 min im Dunkeln mit DAPI zur Kernfärbung inkubiert. Anschließend wurden die Cardiomyozyten je dreimal gründlich mit Waschpuffer und Aqua dest. gewaschen. Danach wurde der Bioreaktor aufgeschraubt, die Membran entnommen und in Ethanol und Xylol entwässert (s. Chondrozyten). Nach dem Zerschneiden der Folie wurden die Präparate mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt.

4.1.7 Nervenzellen

Alle Arbeiten mit Nervenzellen fanden durch die Mitarbeiter der GBF Braunschweig statt [s. Doktorarbeit Corinna Mauth].

Lösungen:

Medium:	DMEM/F12
	N2-Supplement
	bFGF 20 ng ml ⁻¹
	FCS 10 %
	Ascorbinsäure 100 µM

Isolierung:

Die Isolierung der Nervenzellen fand aus undifferenzierten, neuronalen Progenitoren aus dem ventralen Mesencephalon der Ratte (E12) statt. Stücke des ventralen Mesencephalons wurden freipräpariert, in Ca- und Mg-freiem HBSS gesammelt und in 1 mm³ große Stückchen zerschnitten [186]. Diese wurden mechanisch zerrieben und die Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen/Well im Bioreaktor (mit 1 mg ml⁻¹ Fibronectin benetzt) ausgesät.

Kultivierung:

Die Zellen wurden mit DMEM/F12 mit N2-Supplement und bFGF (20 ng/ml) kultiviert. Nach einer Proliferationsdauer von 7 Tagen (90 % Konfluenz) wurde die Differenzierung der Zellen eingeleitet. Dazu wurde ein Medienwechsel durchgeführt, wobei fötales Kälberserum (10 %) und Ascorbinsäure (100 µM) zugesetzt wurden.

Histochemie:

Die histochemische Färbung der Nervenzellen wurde analog zu den Cardiomyozyten durchgeführt (s. Kapitel 4.1.6). Allerdings fand keine Kernfärbung mit DAPI statt.

4.2 Analytik

Alle Proben zur Bestimmung des Primärmetabolismus und der Biotransformation wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert, LDH wurde sofort nach der Probenahme bestimmt. Alle Konzentration wurden als Dreifachbestimmung je Probe ermittelt.

4.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests ermittelt. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden $20\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $80\ \mu\text{l}$ Trypanblau und $100\ \mu\text{l}$ NaCl-Lösung (0,9 %) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Da Trypanblau in die DNA interkaliert, der Farbstoff jedoch nur in tote Zellen eindringen kann, erscheinen lebende Zellen im Mikroskop gelb, tote Zellen blau. Die Zellen von vier Außenquadraten wurden ausgezählt und das Ergebnis gemittelt. Die Multiplikation mit 100.000 ergab die Zellzahl pro ml. Auf diese Weise wurden die Gesamtzellzahl und die Vitalität der Zellen ermittelt.

4.2.2 AlbuminLösungen:

Pig Albumin Stammlösung: $10\ \text{mg ml}^{-1}$ in TPBS

Goat Anti Pig Albumin: $1\ \text{mg ml}^{-1}$

Coating-Puffer, pH 9,6:	Na_2CO_3	$1,61\ \text{g l}^{-1}$
	NaHCO_3	$2,93\ \text{g l}^{-1}$

TPBS (5x), pH 7,4:	NaCl	$40,0\ \text{g l}^{-1}$
	KCl	$1,0\ \text{g l}^{-1}$
	KH_2PO_4	$1,0\ \text{g l}^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$	$7,15\ \text{g l}^{-1}$
	TWEEN 20	$2,5\ \text{g l}^{-1}$
	zum Gebrauch 1:5 mit Aqua bidest. verdünnen	

Färbelösung, pH 5,0:	Zitronensäure-Monohydrat	$5,1\ \text{g l}^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$	$9,15\ \text{g l}^{-1}$

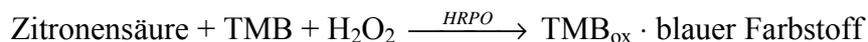
Tetramethylbenzidin (TMB): $2\ \text{mg/ml}$ in DMSO

Stopp-Lösung: 111 ml konz. Schwefelsäure (95-97 %, p.A.)
 (= 8 N Schwefelsäure) 389 ml Aqua bidest.
 auf Eis ansetzen

Prinzip:

Die Albumin-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) in 96Well-Platten nach der Methode von Dunn [187] bestimmt.

Die Wells werden mit Schweine-Albumin beschichtet und unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 10 % FCS abgesättigt. Die Proben und ein spezifischer HRPO-konjugierter (Horsradish Peroxidase) Anti-Pig-Albumin-Antikörper werden aufgegeben. Das Albumin am Well-Boden tritt nun in Konkurrenz zum Albumin in den Proben um die spezifische Bindung des Antikörpers. Die Proben werden entfernt, sodass nur Reaktionen des Antikörper-Albumin-Komplexes am Well-Boden gemessen werden können. In Gegenwart von Zitronensäure und H_2O_2 wird TMB durch die HRPO oxidiert und ein blauer Farbstoff entsteht:



Diese Reaktion wird durch die pH-Änderung bei Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, es entsteht ein gelber Farbstoff, der ein Absorptionsmaximum bei 490 nm besitzt und photometrisch gemessen werden kann. Der Nachweis ist umgekehrt proportional zur Albumin-Konzentration der Proben:



Durchführung:

Zuerst wurden die 96Well-Platten mit spezifischem Albumin beschichtet. Es wurden pro Platte 11 ml Coating-Puffer mit 55 μl Pig-Albumin-Stammlösung angesetzt und davon je 100 μl /Well pipettiert (entspricht 5 μg Albumin/Well). Die so gecoateten Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Platten ausgeschlagen und verbleibende Bindungsstellen mit je 200 μl /Well FCS (10 % in TPBS) für eine Stunde bei 37°C unspezifisch blockiert. Danach wurden die Platten viermal mit kaltem TPBS gewaschen, gut ausgeschlagen und anschließend direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

Als Nullwert wurden dreimal 200 μl /Well TPBS verwendet. Eine Standardreihe aus Pig-Albumin-Stammlösung in TPBS mit den Konzentrationen 20, 30, 40, 50, 60, 70 und 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde angesetzt. Je dreimal 100 μl Standard bzw. Probe wurden pipettiert und eine

Antikörperverdünnung von $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in TPBS angesetzt. Hiervon wurden je 100 μl /Well aufgegeben, nicht jedoch auf die Blanks. Die Platten wurden gut geschüttelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

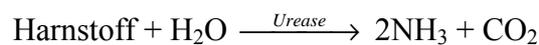
Am folgenden Tag wurden die Platten ausgeschlagen, viermal mit kaltem TPBS gewaschen und gut ausgeklopft. Für die Färbung wurden pro Platte je 10 ml Färbelösung, 0,5 ml TMB und 30 μl H_2O_2 (30 %) angesetzt. Davon wurden je 100 μl /Well aufgegeben und die Reaktion nach 7 Minuten durch 50 μl /Well Stopplösung gestoppt. Nun wurden die Platten bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm im Multi-Plate-Reader gemessen und die Albumin-Konzentration der Proben direkt mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

4.2.3 Harnstoff

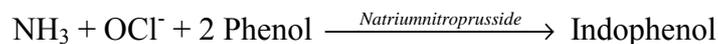
Der Harnstoffgehalt der Proben wurde mit Hilfe eines Kits (Nr. 640) von Sigma (Steinheim) bestimmt.

Prinzip:

In Gegenwart von Urease reagieren Harnstoff und Wasser zu Ammoniak und Kohlendioxid:



Das entstandene Ammoniak reagiert mit alkalischem Hypochlorit und Phenol in der Gegenwart von Natriumnitroprusside zu Indophenol:



Indophenol ist ein blauer Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 570 nm. Die gemessene Absorption ist der Harnstoffkonzentration in der Probe direkt proportional.

Durchführung:

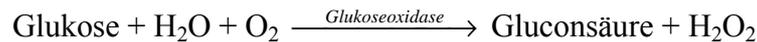
Zunächst wurde der geliefert Urease-Puffer in 30 ml Aqua dest. gelöst. Die Probenanalyse fand in 96Well-Platten statt. Es wurden Standards mit den Konzentrationen 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 und 75 mg/dl angesetzt. Je dreimal 1 μl Standard bzw. Probe und 50 μl Urease-Puffer wurden pro Well pipettiert und die Platte anschließend 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 100 μl Phenolnitroprussid und 100 μl alkalisches Hypochlorit zugegeben und die Platte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde sie bei 540 nm im Multi-Plate-Reader gemessen und die Harnstoffkonzentration der Proben direkt mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

4.2.4 Glucose

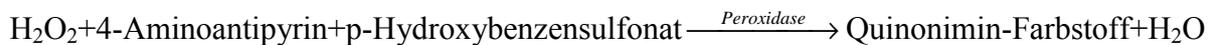
Der Glucosegehalt der Proben wurde ebenfalls mit Hilfe eines Kits (Nr. 315) von Sigma (Steinheim) bestimmt.

Prinzip:

Durch das Enzym Glukoseoxidase wird Glukose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert:



Das Enzym Peroxidase katalysiert die Reaktion des gebildeten H_2O_2 mit 4-Aminoantipyrin und p-Hydroxybenzensulfonat zu einem Quinonimin-Farbstoff:



Dieser Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 505 nm. Seine Bildung kann photometrisch bestimmt werden und ist der Glukosekonzentration der Probe direkt proportional.

Durchführung:

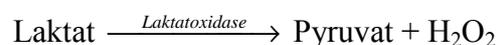
Der Inhalt der gelieferten Reagenzflasche wurde zunächst in 100 ml Aqua dest. gelöst und wegen der Lichtempfindlichkeit des Reagenz in eine braune Flasche gegeben (90 Tage lagerbar). Die Probenanalyse fand in 96Well-Platten statt. Von einer Standardlösung (100 mg/dl) wurden je dreimal 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7.5 μl je Well pipettiert, von den Proben je dreimal 1 μl . Dann wurden 200 μl Reagenz je Well aufgegeben und die Platte für 18 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde sie bei einer Wellenlänge von 490 nm im Multi-Plate-Reader gemessen und die Glukosekonzentration der Proben direkt mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

4.2.5 Laktat

Auch die Laktatkonzentration der Proben wurde mit Hilfe eines Kits (Nr. 735) von Sigma (Steinheim) bestimmt.

Prinzip:

Das Enzym Laktatoxidase katalysiert die Reaktion von Laktat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid:



Mit Hilfe des H_2O_2 katalysiert das Enzym Peroxidase die Bildung eines Farbstoffs, der ein Absorptionsmaximum bei 540 nm besitzt. Der photometrisch gemessene Absorptionsanstieg ist der Laktatkonzentration der Probe direkt proportional.

Durchführung:

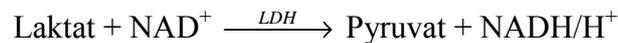
Das gelieferte Reagenz wurde vorsichtig in 10 ml Aqua dest. gelöst und direkt verwendet oder bei -20°C gelagert (max. 1 Monat). Die Probenanalyse fand in 96Well-Platten statt. Es wurden Standards mit den Konzentrationen 5, 10, 20, 30, 40, 80 und 120 mg/dl (0,111 mg/dl entspricht 1 mM) hergestellt und je dreimal 1 μl Standard bzw. Probe und je 100 μl Reagenz je Well pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 540 nm im Multi-Plate-Reader gemessen. Die Laktatkonzentration der Proben wurde direkt mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

4.2.6 LDH

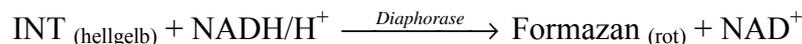
Die LDH-Aktivität der Proben wurde mit Hilfe eines Zytotoxizität-Kits (Cat. No. 1 644 793) der Firma Roche (Mannheim) bestimmt.

Prinzip:

Im ersten Schritt wird zugegebenes Laktat durch das Enzym LDH, welches sich in den Proben befindet, unter der Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ zu Pyruvat oxidiert:



Im zweiten Schritt transferiert das Enzym Diaphorase H/H^+ von NADH/H^+ auf Iodotetrazoliumchlorid (INT), welches zu Formazan reduziert wird:



Eine Erhöhung der Zahl an toten oder membrangeschädigten Zellen in der Kultur bewirkt eine Zunahme der LDH-Aktivität im Überstand. Diese Zunahme ist direkt proportional zur Menge des gebildeten Formazans, welches ein Absorptionsmaximum bei 500 nm besitzt und gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Durchführung:

Zuerst wurde der Katalysator in 1 ml Aqua dest. gelöst. Als Reaktionsgemisch für eine 96Well-Platte wurde 250 μl Katalysator (Diaphorase, NAD^+) mit 11,25 ml Färbelösung (INT, Laktat) gemischt und sofort verwendet. Die Standards aus L-LDH aus Schweinemuskel mit den Konzentrationen 0, 5, 10, 20, 30, 50 und 70 U/l mussten jedes Mal frisch in Medium angesetzt werden. Je zweimal 100 μl Standard bzw. Probe und 100 μl Reaktionsgemisch

wurden je Well pipettiert und die Platte für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde sie bei 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm im Multi-Plate-Reader gemessen und die LDH-Aktivität der Proben direkt mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

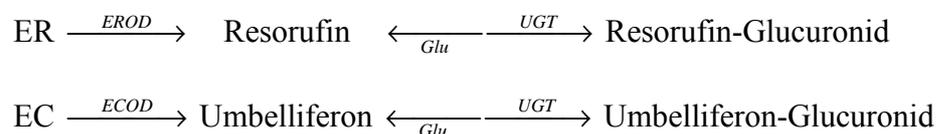
4.2.7 EROD und ECOD

Lösungen:

ER	= Ethoxycoumarin	10 mg/ml in DMSO
EC	= Ethoxyresorufin	1 mg/ml in DMSO
DC	= Dicumarol	10 mg/ml in DMSO
Glu	= β -Glucuronidase	10.000 U/ml in NH ₄ Ac
NH ₄ Ac	= Ammoniumacetatpuffer	200 mM, pH 4,5
Gly	= Glycinpuffer	1,6 M, pH 10,3 (dafür 1,3 M NaOH einwiegen)

Prinzip:

EROD und ECOD metabolisieren ER bzw. EC in einer Phase I-Reaktion zu Resorufin bzw. 7-Hydroxycoumarin (= Umbelliferon), welche von UGT in einer Phase II-Reaktion weiter umgesetzt werden. Diese Reaktion kann jedoch durch das Enzym β -Glucuronidase rückgängig gemacht werden:



Durch die Messung der Gesamtmenge an Resorufin bzw. Umbelliferon kann die Aktivität der Enzyme EROD und ECOD bestimmt werden.

Durchführung:

Um die Enzymaktivitäten von EROD und ECOD zu bestimmen, wurden ihre Substrate Ethoxyresorufin (ER) und Ethoxycoumarin (EC) in einer Endkonzentration von $c_{\text{end}}\text{ER} = 10 \mu\text{M}$ und $c_{\text{end}}\text{EC} = 70 \mu\text{M}$ angesetzt. Dabei wurde auch das Volumen der Kollagenschichten für die Konzentrationsberechnung berücksichtigt. Außerdem wurde dem ER auch Dicumarol in gleicher Konzentration zugegeben, um das Enzym DT-Diaphorase, das ebenfalls ER metabolisieren kann, zu hemmen. Der Mediumüberstand wurde von den Zellen abgenommen und die angesetzten Substratmedien (250 μl /Well) für eine Stunde aufgegeben. Nach dieser Inkubation wurden die Überstände abgenommen und direkt weiterverarbeitet oder eingefroren.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden zunächst Standards der Produkte in den folgenden Konzentrationen angesetzt: Resorufin: 0, 10, 50, 100, 300, 500, 1000 und 3000 nM, Umbelliferon: 0, 0,1, 0,5, 1, 3, 5, 10 und 30 μM . In jedes Well einer 96Well-Platte wurden je dreimal 60 μl der Standards bzw. Proben und 60 μl NH_4Ac bzw. $\text{NH}_4\text{Ac} + 100 \text{ U ml}^{-1}$ β -Glucuronidase pipettiert, die Platten gut geschüttelt, mit Folie verklebt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde 180 μl Glycinpuffer je Well zugegeben und die Fluoreszenz im Fluorimeter bestimmt. Resorufin wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}}=530 \text{ nm}$ angeregt und die Emission bei $\lambda_{\text{Em}}=580 \text{ nm}$ gemessen. Umbelliferon wurde bei $\lambda_{\text{Ex}}=360 \text{ nm}$ angeregt und die Emission bei $\lambda_{\text{Em}}=460 \text{ nm}$ gemessen. Die Produktkonzentration der Proben wurde direkt über die Standards berechnet. Daraus konnte die Enzymaktivität A wie folgt errechnet werden:

$$A = c \cdot f / (t \cdot z) [\mu\text{U/Mio Zellen}] \quad (12)$$

Mit: $c =$ Konzentration (über Eichgerade)
 $f =$ V [ml] (Umrechnungsfaktor nmol/l \rightarrow pmol/Well) für EROD
 V [μl] (Umrechnungsfaktor $\mu\text{mol/l} \rightarrow$ pmol/Well) für ECOD
 $t =$ Inkubationszeit (1h = 60min)
 $z =$ Zellzahl (n/Well)
 $V =$ Volumen (Mediumüberstand + Kollagenschicht)

4.2.8 Diazepam

Lösungen:

Diazepam	10 mg/ml in DMSO
Midazolam	100 $\mu\text{g/ml}$ in DMSO
Natronlauge	4 M
Messwasser:	HPLC-Wasser 1 l
	Triethylamin 800 μl (0,04 %, hält pH konstant)
	mit Essigsäure auf pH 7 einstellen
Fließmittel:	Methanol 25 %
	Acetonitril 34 %
	Messwasser 41 %

Prinzip:

Diazepam wird über verschiedene CYP-Isoenzyme (Phase I der Biotransformation) abgebaut: die CYPs 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4 und 3A5 demethylieren Diazepam zum

Zwischenprodukt Desmethyldiazepam. In einer Konkurrenzreaktion kann Diazepam durch die CYPs 3A4, 3A5 und 2C19 zu Temazepam hydroxyliert werden [188]. Beide Zwischenprodukte werden dann durch die Nachschaltung der entsprechenden Konkurrenzreaktion zum Endprodukt Oxazepam metabolisiert (s. Abbildung 4-1). Sowohl das Substrat als auch die beiden Zwischenprodukte und das Endprodukt sind über HPLC bei einer Wellenlänge von 236 nm nachzuweisen [189].

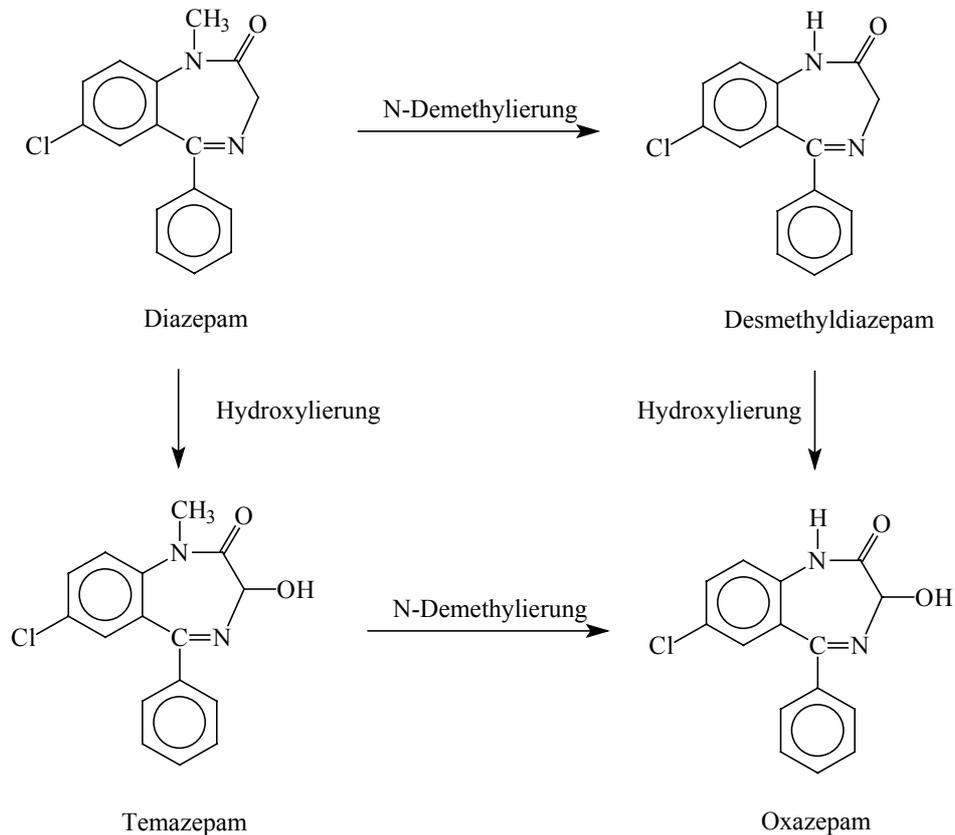


Abbildung 4-1: Metabolismusweg von Diazepam

Durchführung:

Das Substrat Diazepam wurde unter Berücksichtigung des Volumens der Kollagenschichten in einer Konzentration von $c_{\text{end}} = 20 \mu\text{g/ml}$ in Medium angesetzt. Der Mediumüberstand wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen für eine Stunde mit dem angesetzten Substratmedium ($250 \mu\text{l/Well}$) inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und direkt weiterverarbeitet oder bis zur Extraktion eingefroren.

Je 1 ml der Proben wurde in ein Glasröhrchen pipettiert und je $10 \mu\text{l}$ Midazolam (interner Standard, $c_{\text{end}} = 1 \mu\text{g/ml}$), $20 \mu\text{l}$ 4 M NaOH (Einstellung auf pH 8) für den besseren Übergang der Metabolite vom Medium ins Lösungsmittel Ethylacetat und $100 \mu\text{l}$ Isopropanol zum Fällen der Proteine zugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurden je 5 ml Ethylacetat hinzugefügt und der Ansatz 30 min rotieren gelassen, um die Metabolite in die organische Phase übergehen zu lassen. Für eine exakte Phasentrennung wurden die Proben 15 min bei

200 g zentrifugiert. Die Ethylacetatphase (obere Phase) wurde abgenommen, mit Stickstoff vollständig eingedampft und bis zur Analyse erneut eingefroren.

Für die HPLC-Analyse der Diazepam- und Produktkonzentrationen wurden die Proben aufgetaut, in je 120 µl Fließmittel aufgenommen und gut gemischt. Anschließend wurden sie für ca. 10 sec. bei v_{\max} in der Tischzentrifuge zentrifugiert und das gesamte Volumen von 120 µl in ein HPLC-Probenröhrchen überführt. Die Messung fand mit der Methode der Reversed Phase-HPLC bei einer Wellenlänge von $\lambda = 236$ nm statt (Säule: LiChrospher 100RP-18e, 5 µm). Für die Eichung der HPLC wurden folgende Standards angesetzt:

Oxazepam: 5 / 10 / 50 / 100 / 200 / 500 / 1000 / 2000 ng/ml

Desmethyldiazepam: 25 / 50 / 250 / 500 / 1000 / 2500 / 5000 / 10000 ng/ml

Temazepam: 25 / 50 / 250 / 500 / 1000 / 2500 / 5000 / 10000 ng/ml

Diazepam.: 50 / 100 / 500 / 1000 / 2000 / 5000 / 10000 / 20000 ng/ml

Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min.

Als Laufmittel wurde ein Gradient aus Methanol, Acetonitril und Messwasser programmiert:

Tabelle 4-1: Laufmittel-Gradient zur Diazepam-Bestimmung

Minuten	MeOH [%]	ACN [%]	H ₂ O [%]
0	25	34	41
14	23	36	41
19	0	80	20
24	0	100	0
27	0	100	0
32	25	34	41
35	25	34	41

Die einzelnen Metabolite konnten bei folgenden Retentionszeiten gemessen werden:

Oxazepam: ca. 7,5 min

Desmethyldiazepam: ca. 9,6 min

Temazepam: ca. 10,6 min

Midazolam: ca. 12,2 min

Diazepam: ca. 13,9 min

Ein Beispielchromatogramm für die Bestimmung der Diazepam-Metabolite ist in Abbildung 4-2 gezeigt.

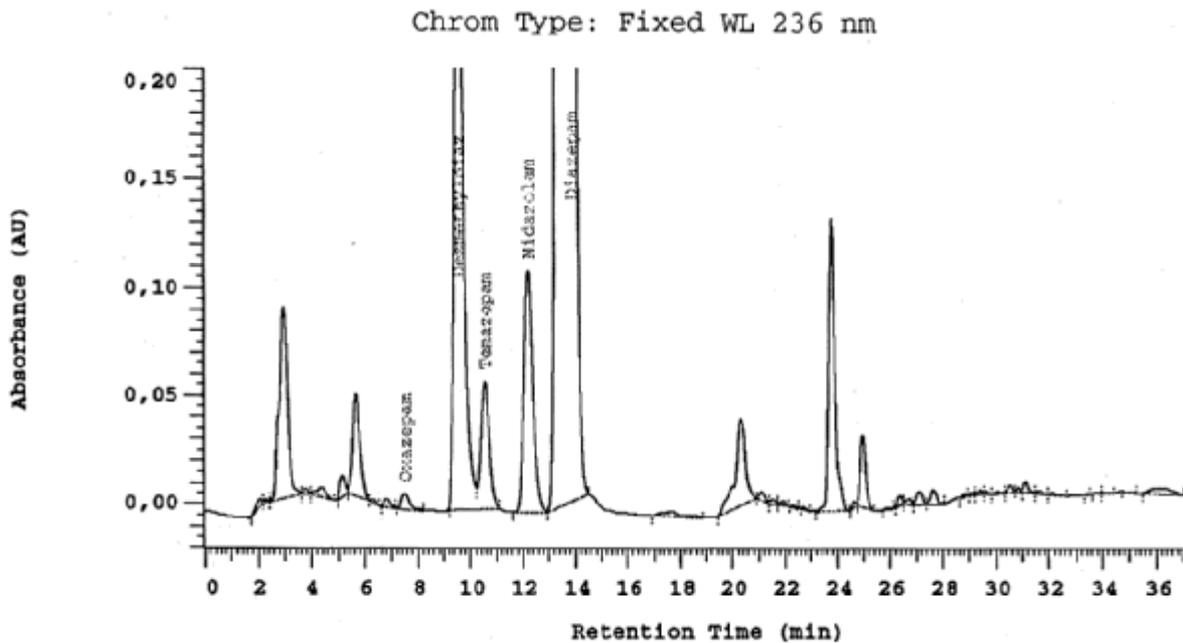


Abbildung 4-2: Beispielchromatogramm für die Bestimmung der Diazepam-Metabolite

4.2.9 UGT und ST

Lösungen:

4-Methylumbelliferon	100 mM in DMSO
Ammoniumacetat	50 mM, pH 7 (mit Essigsäure einstellen)

Prinzip:

UGT und ST metabolisieren die Phase II-Reaktionen von 4-Methylumbelliferon (4-MU) zu 4-Methylumbelliferon-Glucuronid (4-MUG, Glucuronidierung) bzw. 4-Methylumbelliferon-Sulfat (4-MUS, Sulfatierung). Sie konkurrieren um das selbe Substrat, welches in großer Menge vorhanden ist. Sowohl das Substrat als auch die beiden Endprodukte sind über HPLC bei einer Wellenlänge von $\lambda = 336$ nm nachzuweisen:



Durchführung:

Um die Enzymaktivitäten von UGT und ST zu bestimmen, wurde das Substrat 4-MU in einer Endkonzentration von $c_{\text{end}} = 100 \mu\text{M}$ angesetzt. Dabei wurde auch das Volumen der Kollagenschichten für die Konzentrationsberechnung berücksichtigt. Der Mediumüberstand wurde von den Zellen abgenommen und das Substratmedium ($250 \mu\text{l}/\text{Well}$) für eine Stunde aufgegeben. Nach dieser Inkubation wurden die Überstände abgenommen und direkt weiterverarbeitet oder eingefroren.

Für die HPLC-Analyse wurden die Proben durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert. Ein Probenvolumen von je 120 μl wurde in ein HPLC-Vial pipettiert. Die Messung fand mit der Methode der RP-HPLC bei einer Wellenlänge von $\lambda = 336 \text{ nm}$ statt (Säule: LiChrospher 100RP-18e, 5 μm). Für die Eichung der HPLC wurden für das Substrat 4-MU sowie für die beiden Produkte 4-MUG und 4-MUS Standards von jeweils 2, 4, 6, 8, 10, 12,5, 16 und 20 μM angesetzt.

Die Laufgeschwindigkeit betrug 1,3 ml/min.

Als Laufmittel wurde folgender Gradient aus NH_4Ac und Acetonitril verwendet:

Tabelle 4-2: Laufmittel-Gradient zur 4-MU-Bestimmung

Minuten	NH_4Ac [%]	ACN [%]
0	100	0
6	100	0
15	60	40
17	60	40
20	50	50
28	0	100
28,1	100	0
30	100	0

In Abbildung 4-3 ist ein Beispielchromatogramm für die Bestimmung der 4-MU-Metabolite gezeigt.

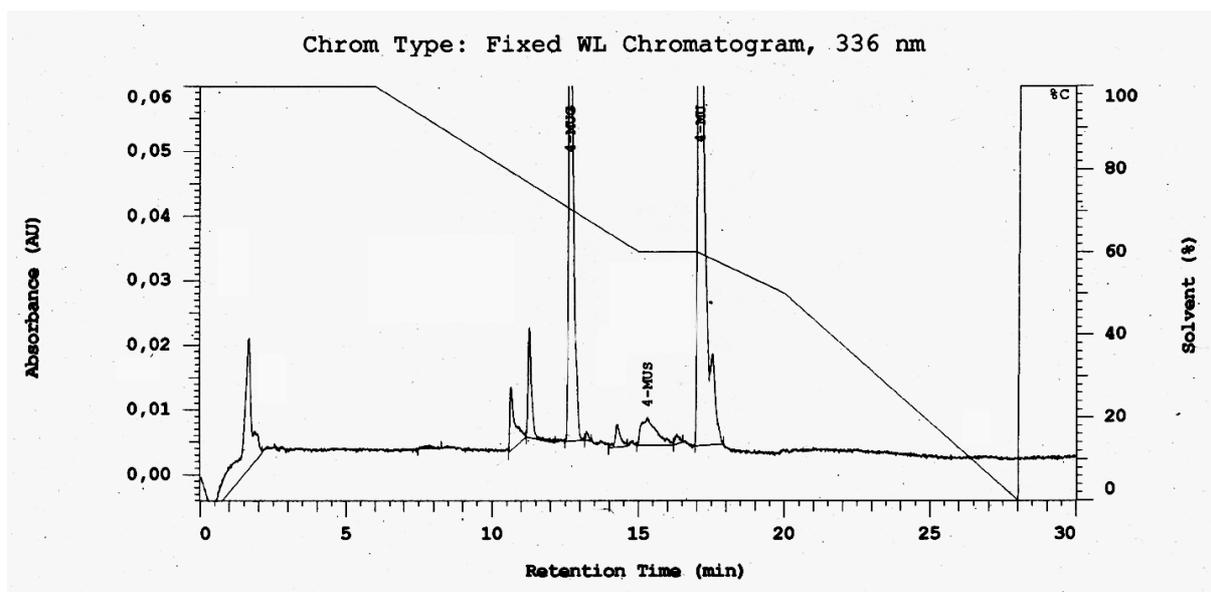


Abbildung 4-3: Beispielchromatogramm für die Bestimmung der 4-MU-Metabolite

Die einzelnen Metabolite konnten bei folgenden Retentionszeiten gemessen werden:

4-MUG: ca. 12,7 min

4-MUS: ca. 15,3 min

4-MU: ca. 17,1 min

Die von der HPLC-Software (La Chrom D-7000 HSM) berechneten Produktkonzentrationen wurden wie für ECOD (s. Kapitel 4.2.7) beschrieben in Enzymaktivitäten umgerechnet.

4.2.10 Induktionen

Lösungen:

3-MC = 3-Methylcholanthren 7,5 mM in DMSO

PB = Phenobarbital 1,5 M in DMSO

Rif = Rifampicin 75 mM in DMSO

Durchführung:

Um die Interaktionsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurden die einzelnen Biotransformationsenzyme im wöchentlichen Abstand induziert. Dafür wurden jeweils am 3. und 10. Kulturtag folgende Induktionsmedien (unter Berücksichtigung des Volumens der Kollagen-Schicht) angesetzt und für drei Tage auf die Zellen gegeben (500 µl/Well):

3-MC: $c_{\text{end}} = 5 \mu\text{M}$ induziert EROD

PB: $c_{\text{end}} = 1 \text{mM}$ induziert ECOD

Rif: $c_{\text{end}} = 50 \mu\text{M}$ induziert UGT

Für ST konnte kein geeigneter Induktor gefunden werden [190].

Am 6. bzw. 13. Kulturtag wurden die Induktionsmedien abgenommen, die Zellen mit Medium gründlich gewaschen und die Aktivitätszunahme der einzelnen Enzyme untersucht.

4.3 Screening mit Johanniskraut

Die bisher vorliegenden Daten der Wechselwirkungen von Johanniskraut resultieren aus der Anwendung von Trockenextrakten. Dagegen unterscheiden sich weitere auf dem Markt befindliche Johanniskrautzubereitungen wie Tee, Pulver in Kapseln, Öle und Pflanzensäfte in ihrer Zusammensetzung von den Trockenextrakten zum Teil deutlich bezüglich ihres Gehalts an für Johanniskraut typischen Inhaltsstoffen und den pro Tagesdosis verabreichten Drogenäquivalenten.

Es wurde daher erwartet, dass diese Produkte ein unterschiedliches Wechselwirkungspotential auf verschiedene CYPs besitzen. Für das pharmazeutische Screening dieser Präparate in dem

entwickelten Mini-Bioreaktor-System wurden die Veränderungen folgender Enzymaktivitäten untersucht:

EROD:	CYP 1A
ECOD:	CYP 2B
Diazepamstoffwechsel:	CYP 2C/3A

4.3.1 Johanniskrautpräparate

Geprüft wurden ein methanolischer Extrakt (Jarsin[®]), drei Johanniskraut-Pulver unterschiedlicher Zusammensetzung (s. Tabelle 5-2 S. 80), Johanniskraut-Tee und Johanniskraut-Rotöl sowie die Inhaltsstoffe Hyperforin und Hypericin (nur Diazepamstoffwechsel) hinsichtlich einer Induktion/Repression von CYP 450. Die Präparate wurden von der Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, zur Verfügung gestellt und die jeweiligen Konzentrationen entsprechend den empfohlenen Tagesdosen der verschiedenen Präparate ausgewählt. Als Lösungsmittel wurde Cremophor RH 40 (Glycerin-Polyethylenglykoxystearat, hydrophober Anteil: Fettsäureglycerinpolyglykolester und Fettsäurepolyglykolester, hydrophiler Anteil: Polyethylenglykolen und Glycerinethoxylat) verwendet. Als Vergleich der Interaktionsintensität wurde der bekannte CYP 3A-Induktor Dexamethason ($c_{\text{end}} = 200 \mu\text{M}$, Stamm: 300 mM in DMSO) parallel mitgeführt.

Extrakt (Jarsin[®]) und Pulver

Für einen Liter Stammlösung wurden 3 g Prüfsubstanz in einem mit Alufolie umwickelten Messkolben in Cremophor-Lösung (5 % in Aqua dest.) gelöst. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C gerührt und dann durch einen Faltenfilter filtriert. Die Stammlösung wurde für jeden Versuch frisch angesetzt.

Tee

Der Teebeutelinhalt (4,5 g) wurde in einem mit Alufolie umwickelten Becherglas mit 250 ml kochendem Wasser übergossen, 10 min ziehen gelassen und in dieser Zeit zweimal aufgerührt. Anschließend wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert, mit 250 ml Cremophor-Lösung (10 % in Aqua dest.) und etwas Wasser auf 500 ml aufgefüllt und unter Rühren abkühlen gelassen.

Öl

In einem Messkolben wurden 12,5 g Cremophor RH 40 und 600 mg Prüfsubstanz eingewogen und beides bei 50°C im Wasserbad geschmolzen. Dann wurde der Kolben in kleinen Schritten mit Wasser (37°C) unter ständigem Rühren auf 250 ml aufgefüllt, mit Alufolie umwickelt und der Ansatz noch 1 h bei 37°C gerührt.

Hyperforin und Hypericin

Jeweils 10 mg der Prüfsubstanzen wurden in 1 ml DMSO gelöst.

Die unterschiedlichen Zubereitungen und Reinsubstanzen wurden als 1 %-ige Verdünnungen in Medium auf die Leberzellen aufgegeben. Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Zusammensetzung (Hyperforin, Hypericin, Flavonoide) der aufgegebenen Präparationen zu untersuchen, wurde der Extrakt nicht nur in Cremophor RH 40, sondern auch in DMSO gelöst (s. Tabelle 5-2, S. 80). Nach einer Inkubationszeit von zwei, drei und vier Tagen wurde das Medium abgenommen und die Zellen gründlich mit Medium gewaschen, um eventuelle Johanniskraut-Rückstände z.B. aus der Kollagenschicht zu entfernen. Anschließend wurde substrathaltiges Medium (ER, EC, Diazepam) aufgegeben, nach einer Stunde wieder abgenommen und die Proben bis zur Analyse eingefroren. Zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Zellen wurde jeweils ein Modellinduktor (3-Methylcholantren für EROD, Phenobarbital für ECOD, Dexamethason für CYP 3A) mitgeführt. Diese Modellinduktoren wurden in DMSO gelöst, da es hier mit Cremophor RH 40 als Lösungsvermittler zu Ausfällungserscheinungen kam. Zusätzlich wurden Lösungsmittelkontrollen (DMSO, Cremophor RH 40) und eine Nullwertkontrolle (nur Medium) mitgeführt.

Proben der verschiedenen Präparate wurden durch die Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, auf ihre jeweilige Zusammensetzung hinsichtlich der beiden Reinsubstanzen Hyperforin und Hypericin und ihres Flavonoid-Gehalts untersucht.

4.3.2 Versuchseinteilung

Die Versuche wurden in zwei Gruppen mit den Leberzellen von jeweils drei verschiedenen Isolationen durchgeführt. In der ersten Gruppe wurde die generelle Wirksamkeit von Johanniskraut auf die gewählten Enzyme untersucht, in der zweiten wurde speziell die Wirksamkeit der Inhaltsstoffe auf nur einen Metabolismus betrachtet. Die Johanniskraut-Zubereitungen wurden in folgende zwei Gruppen unterteilt:

Erste Versuchsgruppe – Wirksamkeit auf verschiedene Enzyme:

Johanniskrautzubereitungen	Enzyme
Extrakt	CYP 1A2 (EROD) CYP 2B6 (ECOD) CYP 2C und 3A (Diazepamstoffwechsel)
Pulver (1)	
Rotöl	
Tee	

Zweite Versuchsgruppe – Wirksamkeit der Inhaltsstoffe:

Johanniskrautzubereitungen	Enzyme
Extrakt Pulver 1-3 Hyperforin Hypericin	CYP 2C und 3A (Diazepamstoffwechsel)

4.4 Oxidativer Stress

Um die Hepatozyten oxidativem Stress auszusetzen, wurden drei verschiedene Inkubatoren auf die Sauerstoffkonzentrationen 20 %, 30 % und 40 % O₂ eingestellt. Direkt nach der Zellaufgabe wurden die Bioreaktoren in die jeweiligen Inkubatoren aufgeteilt und über die gesamte Kulturdauer darin belassen. Die gaspermeable Membran stellte so für den Sauerstoff die einzige Diffusionsbarriere zwischen der Kultivierungsatmosphäre und den Hepatozyten dar. Die Bioreaktoren wurden dabei jeweils mit und ohne Zugabe des Antioxidantiums Vitamin C (Ascorbinsäure) inkubiert.

Lösungen:

Ascorbinsäure-Stammlösung: 150 mM

Da Ascorbinsäure sehr empfindlich ist, wurden Aliquots der Stammlösung eingefroren. Für jede Anwendung wurde dem Medium frisches Vitamin C mit einer Endkonzentration von $c_{\text{end}} = 100 \mu\text{M}$ zugesetzt, wobei das Volumen der Kollagenschicht in die Berechnung mit einbezogen wurde.

4.5 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde ein computergesteuertes Einfriergerät von Sy-Lab (Purkersdorf, Österreich) verwendet und verschiedene Programme getestet. Mit dem folgenden entwickelten Kryoprogramm ist es möglich, die Zellen einzufrieren und vital wieder aufzutauen. Zunächst wurde der Gleichgewichtsfrierpunkt des Einfriermediums im Mini-Bioreaktor bei einer Kühlrate von $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ bestimmt. Er liegt bei -12°C . Da die Induktion der Kristallisation durch Absenken der Kammertemperatur das Risiko beinhaltet, die Zellen durch intrazelluläre Eisbildung zu schädigen, muss die Kristallisation möglichst am Gleichgewichtsfrierpunkt eingeleitet werden. Hierdurch wird eine Unterkühlung des Mediums vermieden. Zur Kompensation der freiwerdenden Kristallisationswärme wurde ein Seeding (schnelles gezieltes Kühlen) in das Kühlprogramm eingeführt.

Lösungen:

Einfriermedium: FCS + 10 % DMSO

Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden am Tag nach der Isolation als Single-Gel (ohne obere Kollagen-Schicht) eingefroren. Dabei waren sie zu mehr als 50 % konfluent. Das Einfriermedium wurde jedes Mal frisch angesetzt und bei 0°C auf Eis vortemperiert. Der Medienüberstand wurde aus dem Mini-Bioreaktor entfernt und pro Well 250 µl des Einfriermediums aufgegeben. Dann wurden die Bioreaktoren bei +4°C für 10 min vorinkubiert.

Kryoprozess

Für den Einfrierprozess wurde die Kühlkammer auf 4°C vortemperiert. Nach Erreichen der Starttemperatur wurden die Bioreaktoren auf einem Rost in Höhe des Ventilators positioniert und das Programm gestartet. Nach 5 min bei 4°C wurde die Kammertemperatur mit $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -40°C abgekühlt. Bei Erreichen einer Kammertemperatur von -12°C wurde durch ein Seeding die Kristallisation ausgelöst. Dafür wurde die Kammertemperatur mit $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -32°C abgesenkt und sofort für eine Minute mit $+40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ wieder erwärmt. Nach Erreichen der Kammertemperatur von -40°C wurde mit $-2,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -60°C und mit $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -100°C abgekühlt. Nach 15 min bei -100°C wurden die Bioreaktoren entweder bei -180°C gelagert oder sofort wieder aufgetaut. Der programmierte Temperaturverlauf in der Kühlkammer ist in Abbildung 4-4 gezeigt.

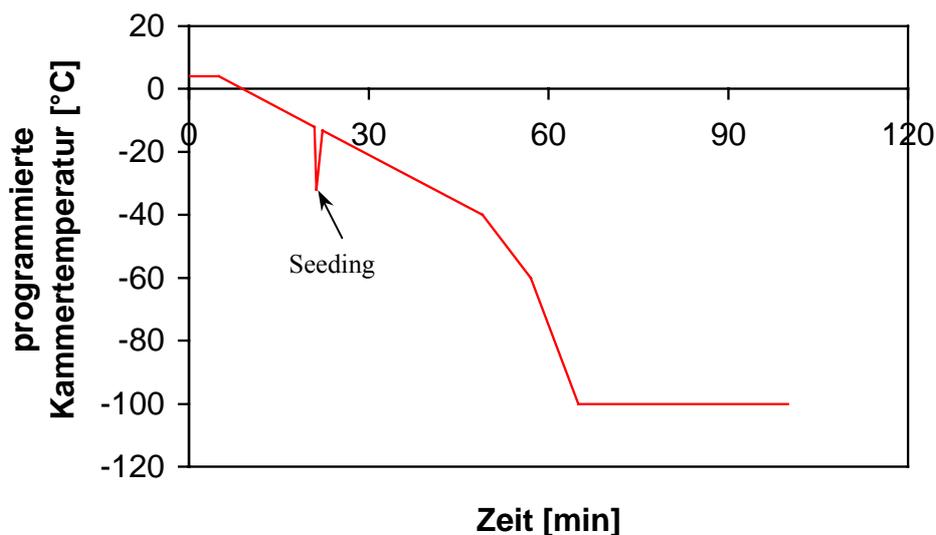


Abbildung 4-4: Temperaturprofil des Kryoprogramms

Auftauprozess und weitere Kultivierung

Die tiefgefrorenen Bioreaktoren wurden mit Alkohol (70%) abgewischt, um gefrorenes Kondenswasser zu entfernen. Pro Well wurden 2 ml 37°C warmen Kulturmediums zugegeben und die Bioreaktoren für 10 min bei 37°C im Inkubator erwärmt. Dann wurde der Überstand vollständig abgesaugt und durch 250 µl frisches WE komplett ersetzt.

Am Tag nach dem Auftauen erfolgte die Aufgabe der 2. Kollagenschicht. Danach wurden die Zellen mit 250 µl serumfreiem Kulturmedium gefüttert und ebenso wie die Kontrollen weiterkultiviert.

Mathematische Modellierung

Für die mathematische Modellierung der Medientemperatur wurden die Wärmeleitungen durch ein- oder mehrschichtige Wände betrachtet. Dabei wurde die punktuelle Temperatur für die Medienkühlung durch folgende Schichten berechnet (Abbildung 4-5):

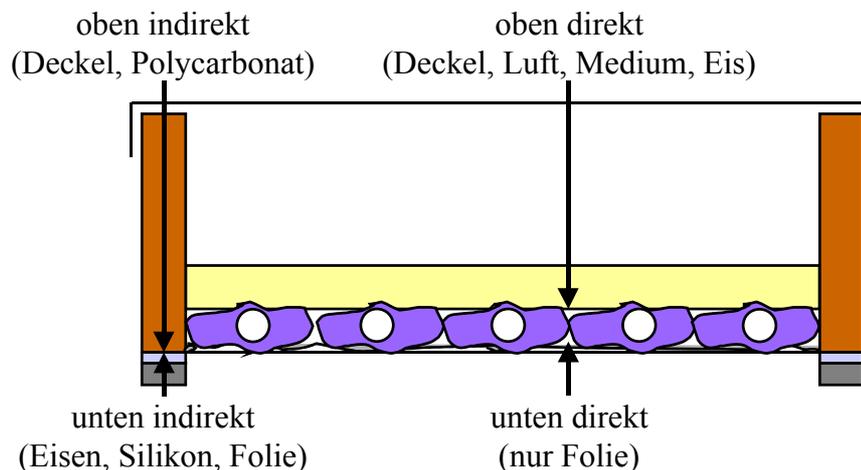


Abbildung 4-5: Wärmeleitung durch ebene Schichten des Bioreaktors

Für ebene Schichten gilt bei der Wärmeleitung $T_{\text{mittel}} = \frac{T_1 + T_2}{2}$. (13)

Somit sind $T_{\text{direkt}} = \frac{T_{\text{oben-direkt}} + T_{\text{unten-direkt}}}{2}$ (14)

und $T_{\text{indirekt}} = \frac{T_{\text{oben-indirekt}} + T_{\text{unten-indirekt}}}{2}$. (15)

Beide Temperaturen wurden berechnet.

Vereinfacht wurde der Bioreaktor in 24 gleichgroße Quadrate eingeteilt, jeweils mit einem Well in der Mitte. Die prozentualen Flächen der direkten und indirekten Wärmeleitung zu den Zellen wurden ermittelt und daraus die resultierende Medientemperatur T_M berechnet.

Temperaturänderungen durch Wärmekonvektion und Wärmestrahlung wurden in diesem Modell nicht berücksichtigt [176].

5 Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend der Aufgabenstellung muss der Bioreaktor für seine Anwendung zum pharmakologischen Screening folgende Anforderungen erfüllen: er soll für die Kultivierung verschiedener primärer Zellen geeignet sein, diese sollen gewebespezifische Leistungen erbringen, das *in vitro*-Screening soll mit *in vivo*-Ergebnissen korrelieren, Untersuchungen bei oxidativem Stress und somit ein Screening von Antioxidantien und die Kryokonservierbarkeit des Bioreaktors sollen möglich sein. Im Folgenden werden für jede Anforderung die Ergebnisse dargestellt und direkt diskutiert.

5.1 Exemplarische Darstellung der Anwendbarkeit zur Kultivierung verschiedener Zellen im Bioreaktor

Zuerst wurde anhand von sechs verschiedenen primären Zellarten exemplarisch gezeigt, dass der Bioreaktor generell für die Kultivierung primärer Zellen geeignet ist.

5.1.1 Ergebnisse

Hepatozyten

Die Leberzellen wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen im Mini-Bioreaktor kultiviert. Abbildung 5-1 zeigt eine 10 Tage alte Kultur (200-fache Vergrößerung).

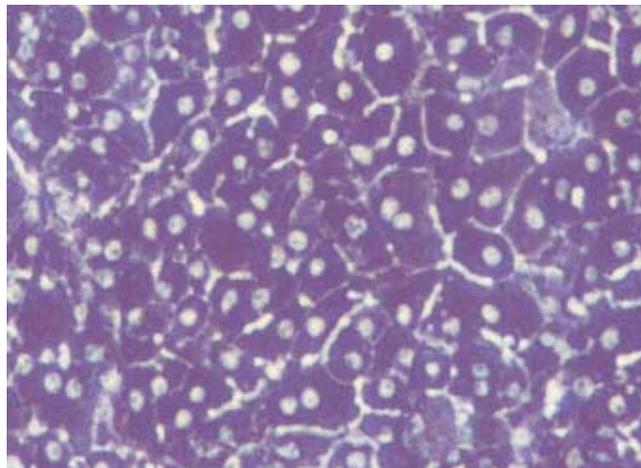


Abbildung 5-1: Hepatozyten-Kultur im Mini-Bioreaktor

Deutlich sind die Ausbildung der Zell-Zellkontakte und die Reorganisation der Gallengänge im Durchlicht zu erkennen. Es ist ein konfluenter Monolayer entstanden, bei dem die Zellen eine der *in vivo*-Situation entsprechende Morphologie aufweisen.

Endothelien

Die Endothelzellen wuchsen im Bioreaktor gut an, nach etwa einer Woche lagen sie konfluent vor. Abbildung 5-2 zeigt die Aufnahme einer sieben Tage alten Kultur im Durchlicht (200-fache Vergrößerung).

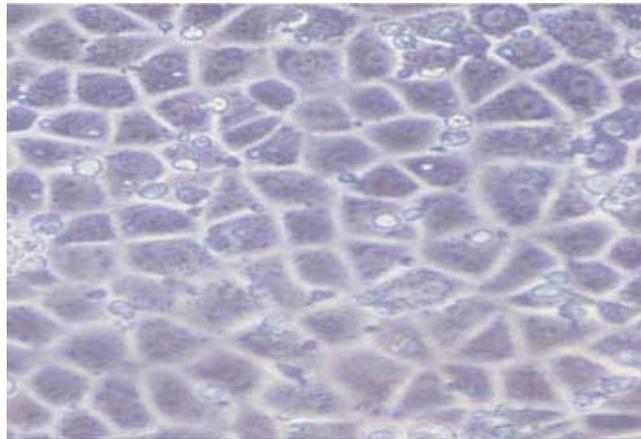


Abbildung 5-2: Endothelzellen im Mini-Bioreaktor

Die Kultivierung der Endothelien im Bioreaktor war sehr unkompliziert, sie verhielten sich ähnlich wie in einer Zellkulturflasche, die Zellen sind aber direkter und in kleineren Mengen zugänglich. Schön ist ihre relativ große, kubische Form zu erkennen.

Fibroblasten

Auch die Fibroblasten lagen nach etwa einer Woche konfluent in den Wells des Mini-Bioreaktors vor, wie in Abbildung 5-3 gezeigt (200-fache Vergrößerung).

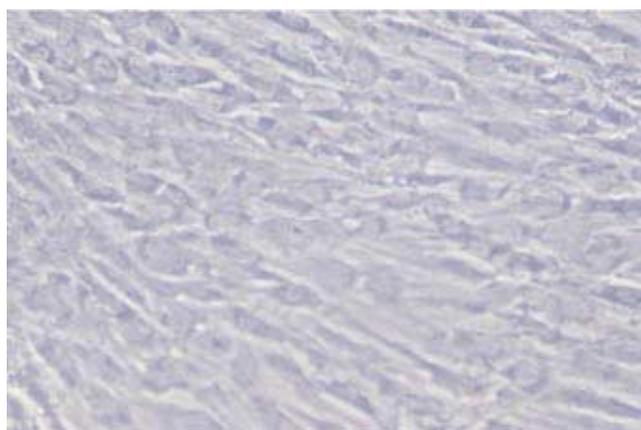


Abbildung 5-3: Fibroblasten im Mini-Bioreaktor

Ihre Kultivierung im Bioreaktor war ebenfalls unproblematisch, sie zeigen im Durchlicht deutlich ihre charakteristische langgestreckte, faserbildende Gestalt.

Chondrozyten

Abbildung 5-4 zeigt eine Caspase-Färbung von Chondrozyten im Mini-Bioreaktor. Dabei sind die Zellkerne dunkel und das Cytoplasma braun zu erkennen (200-fache Vergrößerung).

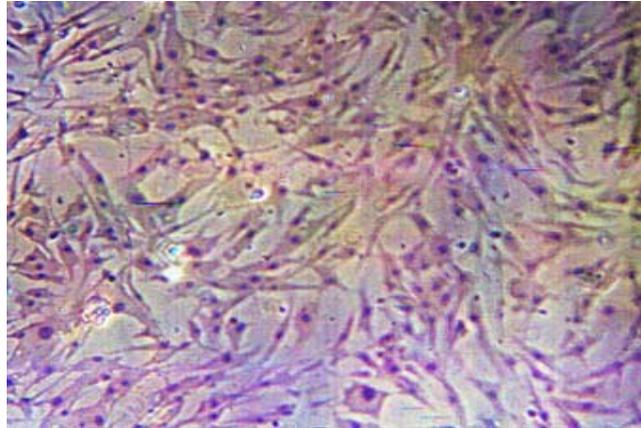


Abbildung 5-4: Chondrozyten im Mini-Bioreaktor

Die Chondrozyten lassen sich gut im Bioreaktor kultivieren und proliferieren, sie zeigen jedoch eine fibroblastenartige Struktur, welche auf eine mögliche Dedifferenzierung der Zellen hinweist. Wie von Bonaventure et al. [191] gezeigt wurde, sind die Veränderungen des Phänotyps jedoch reversibel, die Redifferenzierung der Chondrozyten ist z.B. durch die Kultivierung auf Alginatperlen möglich. Für den Erhalt organotypischer Leistungen wäre somit eine Veränderung der Kulturbedingungen erforderlich.

Cardiomyozyten

Abbildung 5-5 zeigt eine Kultur von Cardiomyozyten im Mini-Bioreaktor (200-fache Vergrößerung). Dabei sind die Kerne der Zellen blau (DAPI) und das Actiningerüst rot (TRITC) zu erkennen.

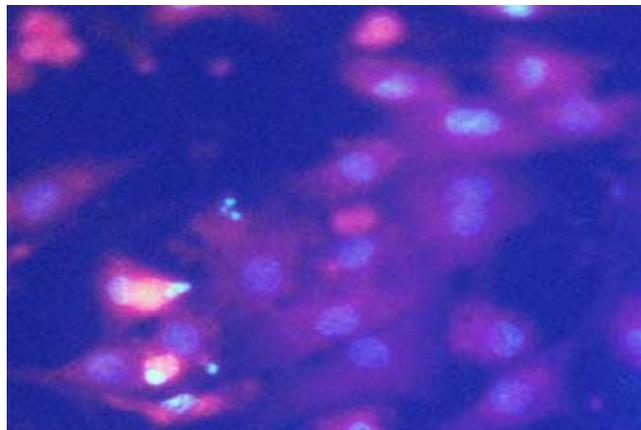


Abbildung 5-5: Cardiomyozyten im Mini-Bioreaktor

Die Cardiomyozyten lassen sich gut im Mini-Bioreaktor kultivieren, sie wurden jedoch nicht konfluent. Als Einschlusskultur in extrazelluläre Matrix (TEBU) konnten sie in Petri-Schalen sogar zum Schlagen gebracht werden, ein rhythmisches Zucken wurde beobachtet.

Nervenzellen

In Abbildung 5-6 ist eine immunocytochemische Markierung gegen β -Tubulin 3 gezeigt, welche spezifisch für Neurone ist (200-fache Vergrößerung).

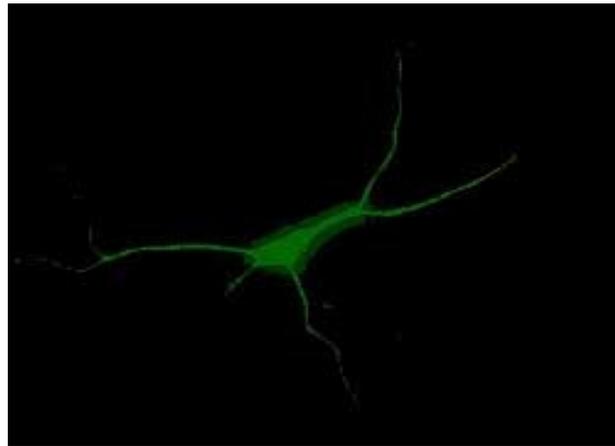


Abbildung 5-6: Neuron im Mini-Bioreaktor

Die undifferenzierten neuronalen Progenitoren ließen sich im Bioreaktor innerhalb einer Woche zu etwa 90 % Konfluenz proliferieren. Wie die Färbung zeigt, ist die anschließende Differenzierung zum differenzierten Neuron gelungen [aus: Doktorarbeit Corinna Mauth, AG Bader, GBF Braunschweig].

5.1.2 Diskussion

Wie die Versuche mit unterschiedlichen Zelltypen gezeigt haben, ist der entwickelte Mini-Bioreaktor gut für verschiedene primäre Zellen einsetzbar. Alle Zelltypen ließen sich problemlos im Bioreaktor kultivieren.

Die Morphologie der Chondrozyten, die die extrazellulären Matrixkomponenten des Knorpels sezernieren, ließ allerdings auf eine mögliche Dedifferenzierung schließen. Diese müsste anhand gewebespezifischer Leistungen jedoch näher untersucht werden. Ein Screening ist unter Umständen nicht ohne Weiteres möglich. Der Bioreaktor kann aber genutzt werden, um die Zellen unter definierten Sauerstoffbedingungen zu expandieren. Für eine zusätzliche Redifferenzierung ist eine Veränderung der Kulturbedingungen nötig [191].

Da die Biotransformation von Arzneistoffen nicht auf die Leber allein beschränkt ist, können auch andere Organe eine wichtige Rolle beim Gesamtmetabolismus eines Wirkstoffs spielen [192]. Alle Xenobiotika müssen, um von den Hepatozyten metabolisiert zu werden, die

Epithelschicht der Darmwand und somit Endothelzellen passieren. Diese besitzen ebenfalls einen hohen Gehalt an CYP 3A4, wodurch ihre Reaktion auf den Wirkstoff von Interesse beim Screening ist. Ebenso ist es wichtig, die Wirkung eines Pharmakons auf Fibroblasten zu kennen, da diese die extrazellulären Matrixkomponenten der meisten Gewebe, wie auch das Kollagen der Leber, sezernieren.

Für die Entwicklung von Morbus Parkinson wird oxidativer Stress verantwortlich gemacht [112]. Das Screening neu entwickelter Medikamente an im Bioreaktor kultivierten Neuronen kann direkte Hinweise auf ihre Wirksamkeit liefern. Neu entwickelte Herzpräparate können an Cardiomyozyten im Bioreaktor untersucht werden.

Diese generelle Anwendbarkeit des Bioreaktors ermöglicht die verschiedensten Untersuchungen mit demselben System. Die Wirkung eines Pharmakons kann z.B. auf die unterschiedlichen Zelltypen gleichzeitig untersucht werden, wodurch ein guter Überblick über die Wirkungen des Arzneimittels auf den gesamten Körper gewonnen werden kann. Auch ist es denkbar, Co-Kulturen der verschiedenen Zellen mit Hepatozyten zu untersuchen, da eine Reihe von Pharmaka erst durch die Phase I der Biotransformation aktiv wird [6]. So kann der Einfluss der verschiedenen entstehenden Metabolite direkt auf die Ziel-Zellen, wie Herz oder Nervensystem, analysiert werden.

5.2 Untersuchung zur Erbringung gewebespezifischer Leistungen der Leberzellen

Nachdem für verschiedene primäre Zellsysteme gezeigt wurde, dass der entwickelte Bioreaktor für ihre Kultivierung geeignet ist, wurde am Beispiel der Leberzellen näher untersucht, ob die Fähigkeit zur Erbringung gewebespezifischer Leistungen beibehalten wird. Der Primärmetabolismus und die Biotransformation der Hepatozyten wurden über einen Kultivierungszeitraum von 17 Tagen bestimmt und mit den Werten von Kultivierungen in herkömmlichen 24Well-Platten verglichen (je drei Wells von je drei Hepatozyten Isolationen). Dabei war die Kultivierungsmethode identisch mit der im Bioreaktor. Eine Kultur über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen erlaubt Aussagen über die Wechselwirkungen bei Mehrfach- und Langzeitgabe eines Pharmakons.

5.2.1 Ergebnisse

5.2.1.1 Primärstoffwechsel

Albumin

Eine hohe Albuminsekretion ist ein Zeichen für eine vitale Hepatozytenkultur. Abbildung 5-7 zeigt die jeweilige Sekretion über die gesamte Kultivierungszeit im Bioreaktor und im Vergleich zur Kultur in einer herkömmlichen 24Well-Platte.

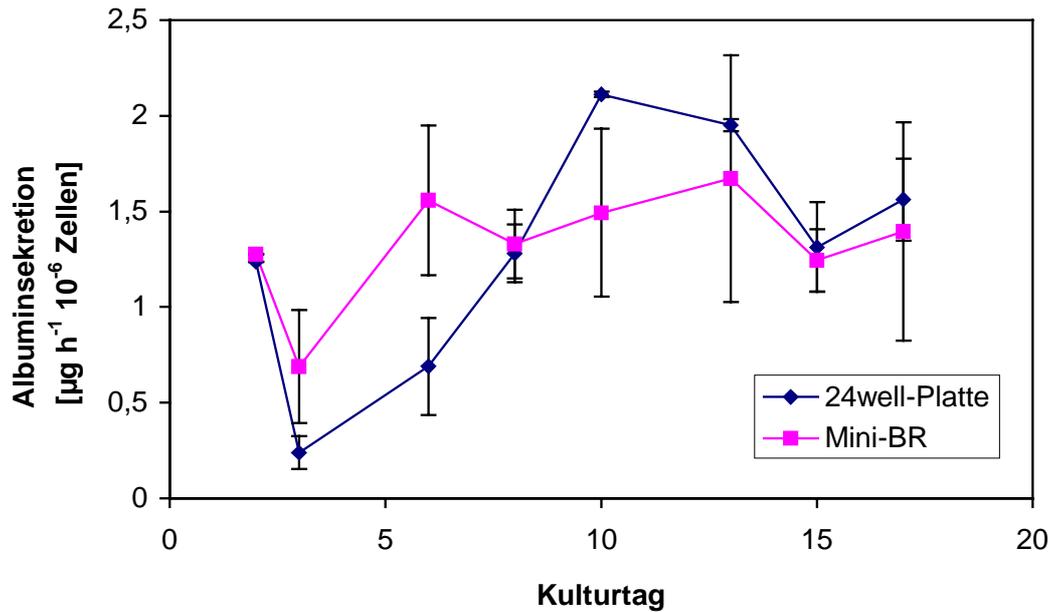


Abbildung 5-7: Albuminsekretion im Mini-Bioreaktor im Vergleich zur herkömmlichen 24Well-Platte

Beide Systeme zeigen in etwa gleiche Sekretionsraten. Dabei fällt auf, dass die Werte im Mini-Bioreaktor insgesamt stabiler sind, es werden im Mittel etwa $1,5 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen Albumin sekretiert. Damit liegen diese Werte am Anfang der Kultivierung über denen der „normalen“ 24Well-Platte (ca. $0,7 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen), während der zweiten Kulturhälfte darunter (ca. $2 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen). Bezüglich der Albuminsekretion lässt der Mini-Bioreaktor somit keinen Vorteil gegenüber der 24Well-Platte erkennen.

Harnstoff

Die gemessene Harnstoffsynthese ist in Abbildung 5-8 dargestellt.

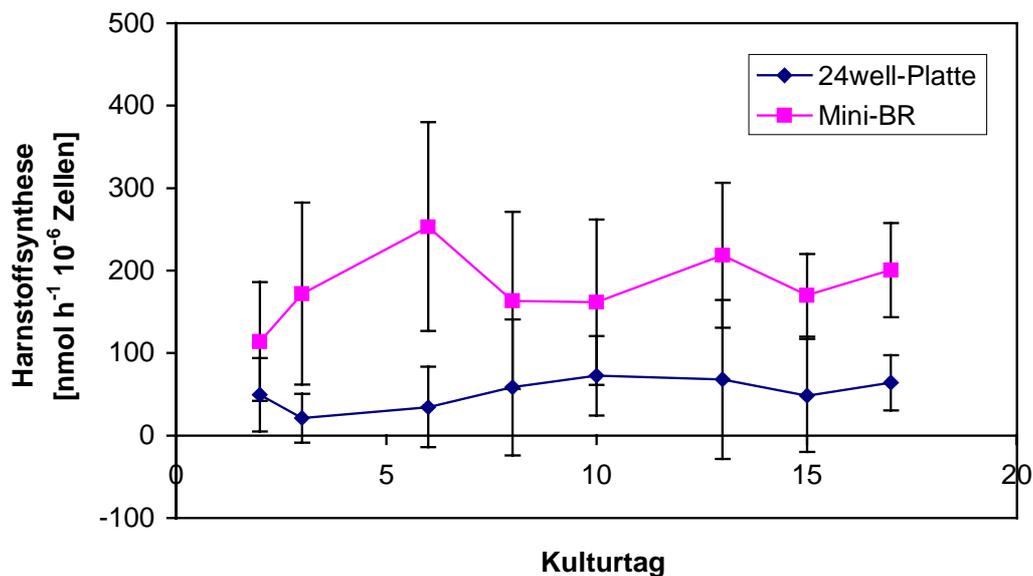


Abbildung 5-8: Harnstoffsynthese im Bioreaktor und in herkömmlichen 24Well-Platten

Die Harnstoffsynthese zeigt die gewebespezifische Entgiftungsleistung der Zellen in der Kultur an und ist ein Zeichen für das Funktionieren des Energiehaushalts. Sie bleibt in beiden Systemen während der gesamten Kultivierungsdauer stabil. Im Bioreaktor schwankt sie zwar stärker, liegt mit im Mittel $180 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen Harnstoff jedoch auch deutlich über der in der herkömmlichen 24Well-Platte mit etwa $55 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Damit ist die Entgiftungsleistung der Hepatozyten im Mini-Bioreaktor etwa 3,3mal so groß wie in der 24Well-Platte.

Glukose

Die Bestimmung des Glukoseverbrauchs erlaubt eine gute Beurteilung der Sauerstoffversorgung. Dabei bedeutet ein geringer Glukoseverbrauch eine gute Sauerstoffversorgung, da die Glukose aerob metabolisiert werden kann und so mehr ATP gewonnen wird als bei teilweise anaerobem Glukoseverbrauch. Für dieselbe ATP-Menge muss hier also mehr Glukose verbraucht werden. In Abbildung 5-9 ist der Glukoseverbrauch der Hepatozyten dargestellt.

In beiden Kultursystemen sinkt der Glukoseverbrauch während der ersten Woche von etwa $700 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen ab und erreicht dann einen stabilen Wert. Dieser beträgt mit etwa $80 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen im Mini-Bioreaktor nur ein Fünftel des Verbrauchs in der 24Well-Platte ($400 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen). Somit ist die Sauerstoffversorgung im Bioreaktor deutlich besser als in der Platte, es finden hauptsächlich aerobe Energiegewinnungsprozesse statt, in der 24Well-Platte im Vergleich mehr anaerobe.

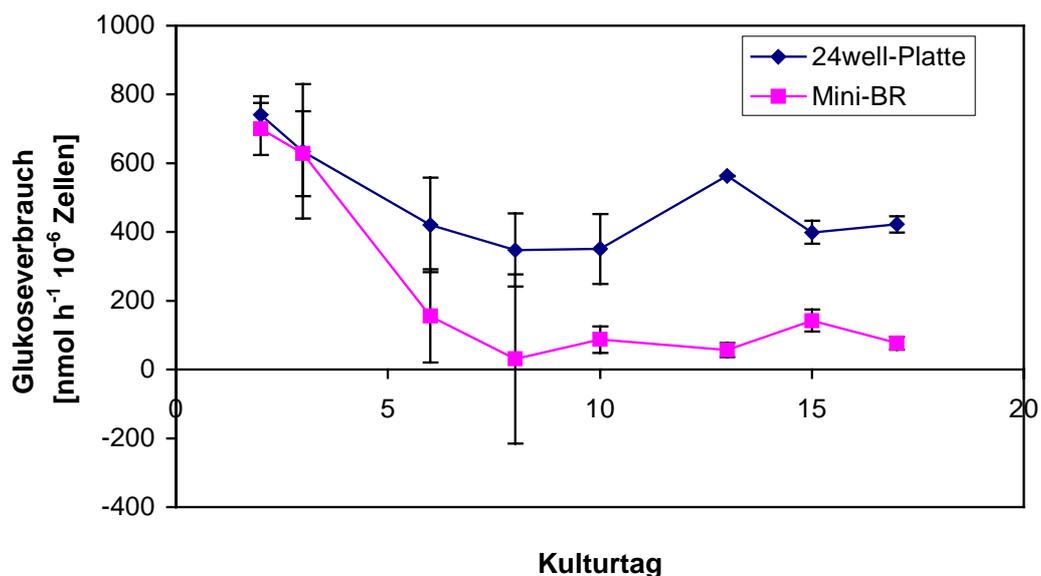


Abbildung 5-9: Glukoseverbrauch im Bioreaktor und in der 24Well-Platte

Laktat

Auch die Laktatbildung lässt Rückschlüsse auf die Sauerstoffversorgung der Zellen zu. Bei einer schlechten Sauerstoffversorgung kommt es zu einem teilweise anaeroben Glukoseabbau und der damit verbundenen Milchsäuregärung und Laktatbildung. Abbildung 5-10 zeigt die Laktatproduktion in den beiden Kultursystemen.

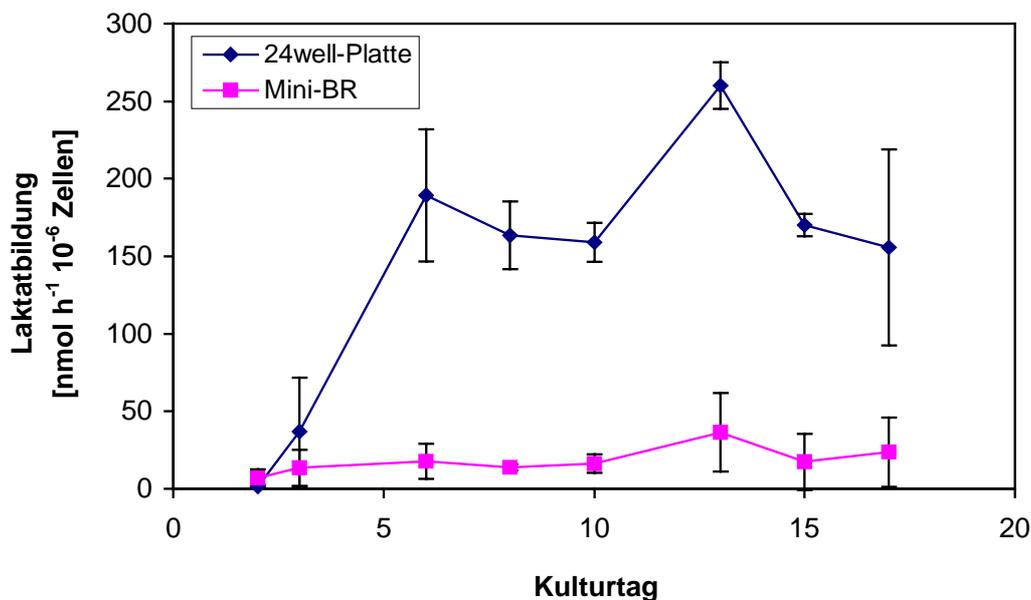


Abbildung 5-10: Laktatbildung im Mini-Bioreaktor und in der 24Well-Platte

Während die Laktatbildung im Mini-Bioreaktor über den Kultivierungszeitraum von etwa 7 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen auf ca. 35 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen nur sehr leicht zunimmt, steigt die Rate in der 24Well-Platte sehr stark von etwa 2 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen auf ein Maximum von 260 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen. Damit ist die Laktatbildung in der Platte fast 7,5 mal so hoch wie im Bioreaktor. In diesem ist die Sauerstoffversorgung der Hepatozyten also deutlich besser, wie auch schon die Ergebnisse des Glukoseverbrauchs gezeigt haben.

LDH

Um die Integrität der Plasmamembran und die Lebensfähigkeit der Zellen zu bestimmen, wurde die LDH-Aktivität im Überstand gemessen. Eine erhöhte LDH-Freisetzung ist ein Zeichen für das Vorhandensein toter oder membrangeschädigter Zellen. Abbildung 5-11 zeigt die LDH-Aktivitäten im Bioreaktor und in der 24Well-Platte.

In beiden Kultursystemen steigt die LDH-Aktivität von einem etwa gleichen Anfangswert von 0,2 mU pro 10⁶ Zellen während der ersten Kulturwoche an, um sich dann kurzzeitig zu stabilisieren. Der hier erreichte Wert ist mit ca. 2,2 mU 10⁻⁶ Zellen im Mini-Bioreaktor weniger als halb so groß wie der von ca. 5 mU 10⁻⁶ Zellen in der 24Well-Platte. Dieses Verhältnis kehrt sich jedoch am Ende der zweiten Kulturwoche um, die LDH-Aktivität im

Bioreaktor steigt deutlich an, während die in der Platte zunächst absinkt, um dann ebenfalls zu steigen. Am Kultivierungsende ist die Aktivität im Bioreaktor mit ca. $9,3 \text{ mU } 10^{-6}$ Zellen etwa 1,5 mal so hoch wie die in der Platte mit etwa $6,4 \text{ mU } 10^{-6}$ Zellen. Somit ist der Bioreaktor bis gegen Ende der zweiten Kulturwoche besser für die Kultivierung von Hepatozyten geeignet, hier liegen weniger tote oder membrangeschädigte Zellen vor als in der 24Well-Platte. Danach nimmt ihre Zahl aber deutlich zu, der Bioreaktor zeigt keine Vorteile gegenüber der 24Well-Platte mehr.

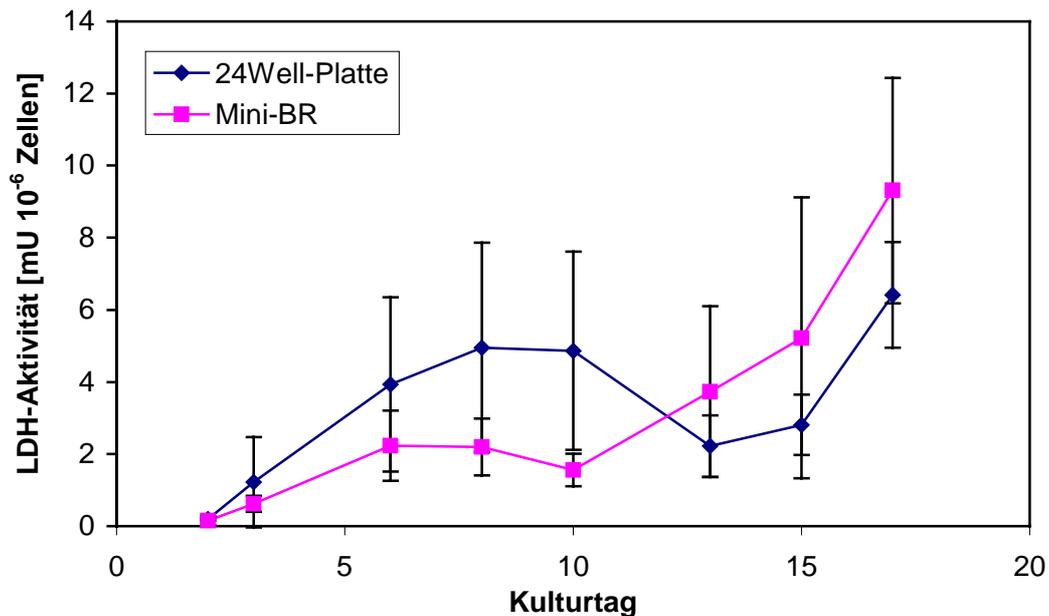


Abbildung 5-11: LDH-Aktivität im Bioreaktor und in der 24Well-Platte

5.2.1.2 Biotransformation

Parallel zur Betrachtung des Primärmetabolismus, die gezeigt hat, dass die Zellen im Bioreaktor gerade hinsichtlich der Sauerstoffversorgung in einem besseren Zustand vorliegen als in der 24Well-Platte, wurden auch die Biotransformation und die Fähigkeit zur Interaktion untersucht. Dafür wurden die entsprechenden Induktoren jeweils am dritten und zehnten Tag auf die einzelnen Enzyme gegeben. Die Ergebnisse werden im Folgenden gezeigt.

EROD

Die für die Phase I der Biotransformation untersuchten Enzyme EROD und ECOD sind sauerstoffabhängige Monooxygenasen. Eine hohe Aktivität spricht auch hier für eine gute Sauerstoffversorgung. Abbildung 5-12 zeigt die EROD-Aktivitäten in jeweils induzierten und nicht induzierten Bioreaktoren und 24Well-Platten.

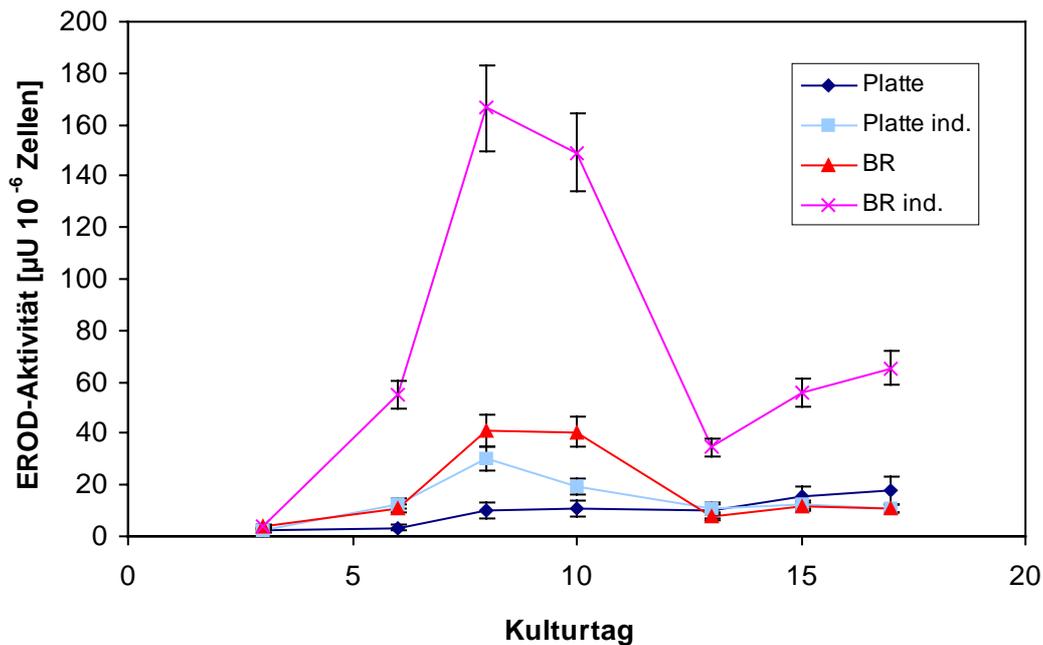


Abbildung 5-12: EROD-Aktivität im Bioreaktor und in der herkömmlichen 24Well-Platte

Beide Systeme zeigen zu Beginn eine Aktivität von 3-4 μU pro 10^6 Zellen und reagieren mit einer Aktivitätssteigerung auf den Induktor 3-Methylcholanthren. Auch die Aktivität der nicht induzierten Enzyme nimmt während der ersten Kulturwoche zu, jedoch differieren die Aktivitäten stark von einander. Während EROD in der nicht induzierten 24Well-Platte auf eine Aktivität von etwa $10 \mu\text{U} 10^{-6}$ Zellen steigt, beträgt sie im nicht induzierten Bioreaktor etwa $40 \mu\text{U} 10^{-6}$ Zellen und ist damit viermal so hoch. Die induzierte EROD-Aktivität in der 24Well-Platte liegt mit $30 \mu\text{U} 10^{-6}$ Zellen unterhalb dieses Werts, und beträgt nur etwa 20 % der Aktivität im induzierten Bioreaktor mit $165 \mu\text{U} 10^{-6}$ Zellen. In der 24Well-Platte ist maximal eine 3,7-fache Induktion, im Bioreaktor eine 5-fache Induktion zu beobachten. Während die Aktivität in den nicht induzierten Bioreaktoren ebenso wie die in der induzierten Platte nach zehn Kulturtagen wieder absinkt, steigt die in der nicht induzierten Platte weiter leicht an. Nach 17 Kulturtagen weisen die beiden Platten und der nicht induzierte Bioreaktor eine etwa gleiche Enzymaktivität von $10-18 \mu\text{U} 10^{-6}$ Zellen auf. Die Hepatozyten im induzierten Bioreaktor reagieren dagegen auch auf die zweite Induktion und erreichen eine Aktivität von $65 \mu\text{U} 10^{-6}$ Zellen am 17. Kulturtag.

Damit werden die bereits vom Primärmetabolismus erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Die Sauerstoffversorgung der Zellen ist im Bioreaktor deutlich besser als in der 24Well-Platte, eine höhere Enzymaktivität ist zu beobachten. Zwar behalten die Hepatozyten in beiden Systemen die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Agenzien, diese ist im Bioreaktor aber stärker ausgeprägt. Somit ist der Bioreaktor gut geeignet, mögliche Interaktionen in einem pharmakologischen Screening zu detektieren.

ECOD

In Abbildung 5-13 sind die ECOD-Aktivitäten der verschiedenen Systeme dargestellt.

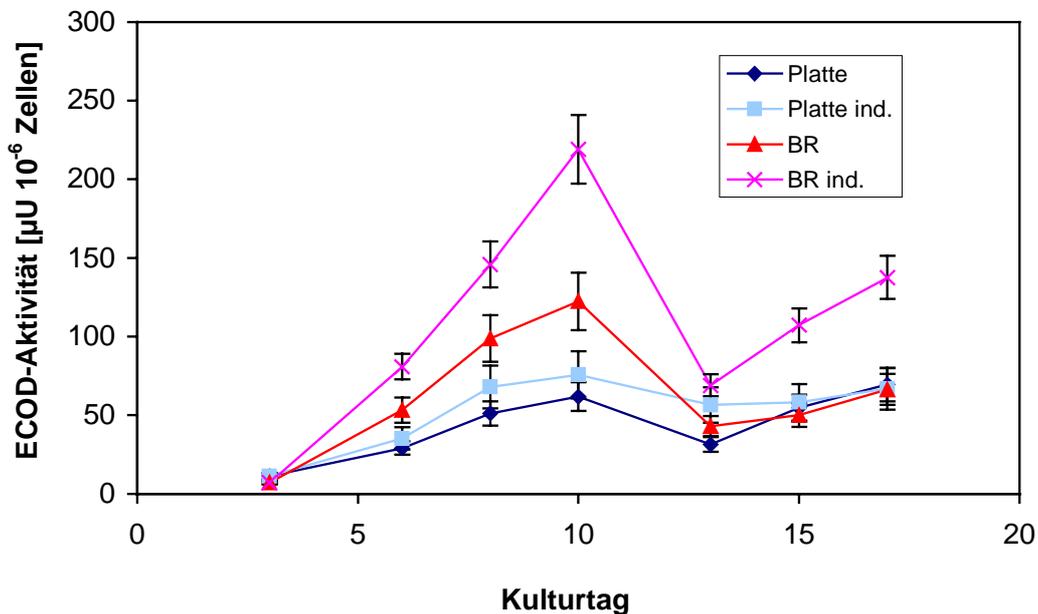


Abbildung 5-13: ECOD-Aktivität im Bioreaktor und in der herkömmlichen 24Well-Platte

Ebenso wie für EROD sind auch für ECOD zu Beginn gleiche Aktivitäten von ca. 7-10 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen in allen Systemen zu beobachten. Sowohl in der induzierten Platte als auch im induzierten Bioreaktor ist eine Reaktion auf das Agens Phenobarbital zu beobachten, ebenso steigt die Aktivität der nicht induzierten Systeme. Die jeweils höchsten Aktivitäten sind am 10. Kulturtag zu beobachten, die 24Well-Platten zeigen eine Grundaktivität von 60 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen und eine induzierte von 75 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Die Aktivitäten liegen in den nicht induzierten Bioreaktoren bei 120 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen, in den induzierten Bioreaktoren bei 220 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Damit liegt auch für ECOD die Grundaktivität der Bioreaktoren über der induzierten Platten. In den Bioreaktoren konnte eine 1,8-fache, in den 24Well-Platten eine etwa 1,3-fache Induktion festgestellt werden. Auch hier sinkt die Aktivität nach zehn Kulturtagen in allen Systemen ab, um anschließend in den Platten und dem nicht induzierten Bioreaktor noch einmal leicht anzusteigen. Diese drei Systeme enden wiederum mit einer etwa gleichen Aktivität von ca. 70 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Dagegen reagieren die Hepatozyten im Bioreaktor auch bei ECOD auf die zweite Induktion und es kann eine Endaktivität von 140 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen gemessen werden.

Die für EROD bereits gewonnenen Ergebnisse treffen somit auch auf ECOD zu: Sowohl die Enzymaktivität, bedingt durch die bessere Sauerstoffversorgung, als auch die Fähigkeit zur Interaktion sind im Bioreaktor stärker ausgeprägt als in der 24Well-Platte.

UGT

Die beiden Phase II-Enzyme UGT und ST sind im Gegensatz zu EROD und ECOD nicht sauerstoffabhängig. Die UGT-Aktivitäten der verschiedenen Systeme sind in Abbildung 5-14 dargestellt.

Auch bei diesem Enzym zeigen beide Systeme zu Beginn eine etwa gleiche Aktivität von 520-540 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Wiederum reagieren die Zellen auch in beiden Systemen auf die Induktion und auch die Grundaktivitäten steigen. Jedoch lassen sich hier nicht so starke Unterschiede zwischen Bioreaktor und Platte beobachten wie in der Phase I. Beide nicht induzierten Systeme erreichen am 6. Kultivierungstag eine Aktivität von ca. 1150 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen, welche sie bis zum Kultivierungsende fast stabil beibehalten. Auch die Werte der beiden induzierten Systeme liegen recht dicht beieinander, doch während in der 24Well-Platte die beiden verschiedenen Induktionen zu erkennen sind, steigt die Aktivität im Bioreaktor kontinuierlich an. Beide Systeme führen zu einer etwa 1,7-fachen Induktion.

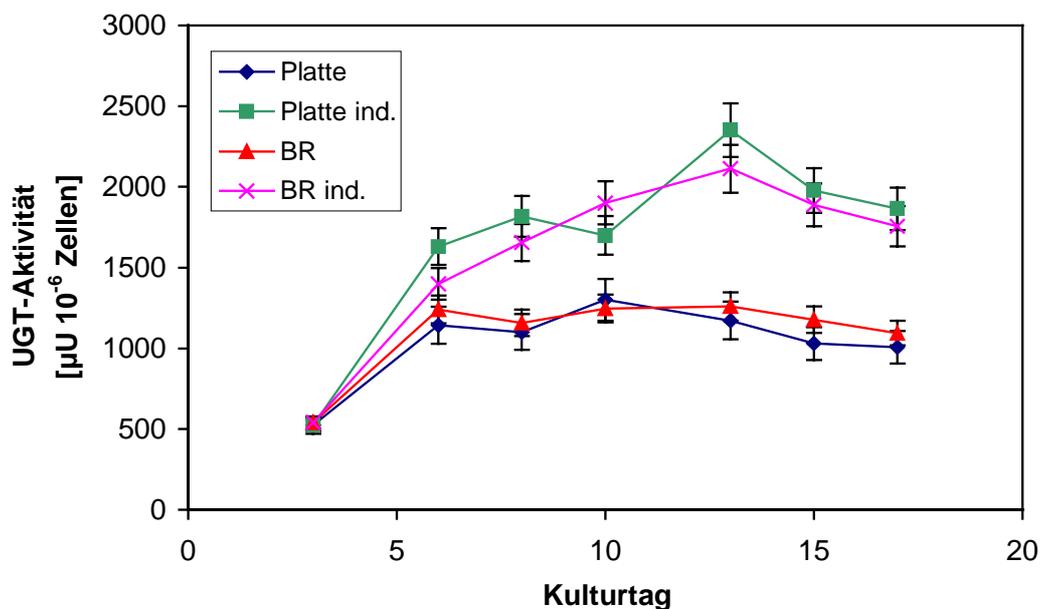


Abbildung 5-14: UGT-Aktivität im Bioreaktor und in der herkömmlichen 24Well-Platte

Für das Phase II-Enzym UGT zeigen beide Systeme das gleiche Verhalten, die Enzymaktivität ist unabhängig von einer besseren Sauerstoffversorgung. Keines der Systeme weist Vor- oder Nachteile bezüglich Aktivität oder Induktionsverhalten auf.

ST

Abbildung 5-15 zeigt die ST-Aktivitäten in den Mini-Bioreaktoren und 24Well-Platten. Keines der beiden Systeme lässt eine eindeutige Wirkung auf die Aktivitäten erkennen. Zwar verlaufen die Kurven der beiden induzierten Systeme stabiler, die insgesamt sehr großen

Schwankungen lassen jedoch keine eindeutigen Aussagen über Vor- oder Nachteile eines Systems zu.

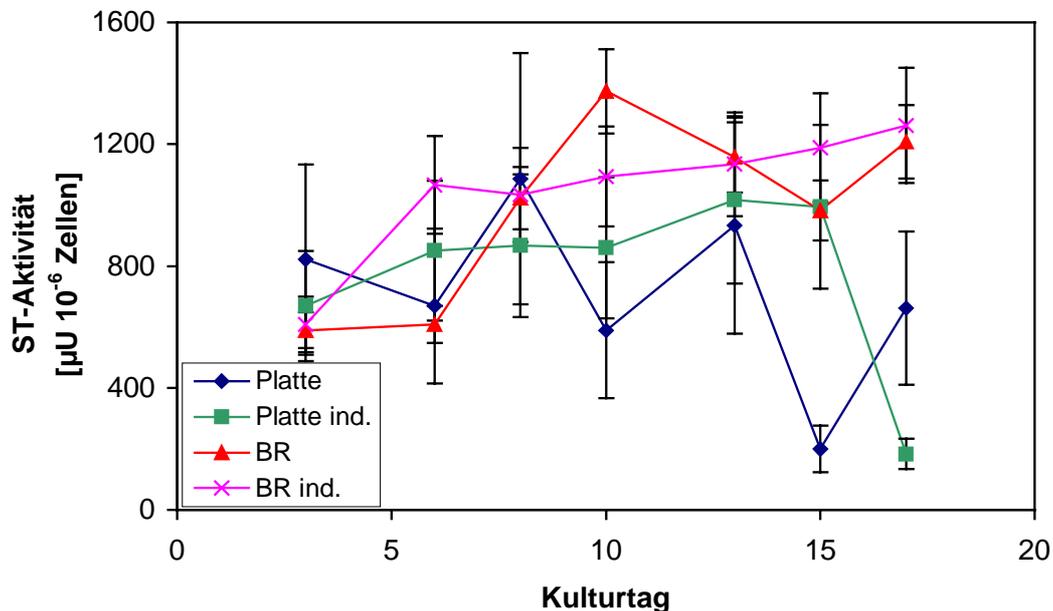


Abbildung 5-15: ST-Aktivität im Bioreaktor und in der herkömmlichen 24Well-Platte

5.2.2 Diskussion

Die Voraussetzung zum pharmakologischen Screening ist die Beibehaltung der gewebespezifischen Leistungen der Zellen im Bioreaktor.

Glukose und Laktat

Ein wichtiger Parameter ist dabei das stöchiometrische Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch [193, 194]. Ein hohes Verhältnis (Maximalwert: 2) spricht für eine vermehrte (anaerobe) Energiegewinnung aus der Glykolyse, während ein niedriges Verhältnis für (aerobe) Energiegewinnung aus der Atmungskette spricht. Im entwickelten Bioreaktor wurde ein Laktat/Glukose-Verhältnis von 0,27 gefunden, in der herkömmlichen 24Well-Platte beträgt es 0,44. Der Bioreaktor zeigt also eine höhere Energiegewinnung aus der Glukose und somit eine bessere Oxygenierung der Zellen als die 24Well-Platte. Diese Werte stimmen gut mit denen von Rocker [195] überein, der für primäre porcine Hepatozyten Werte von 0,3-0,5 fand. Er kultivierte primäre Rattenhepatozyten bei 10 % O₂ sowohl in herkömmlichen Petri-Schalen, als auch in Petri-Schalen mit Membranboden. Für die Petri-Schalen wurden wiederum Werte von 0,3-0,5 gefunden, für die Membran-Schalen sogar nur Werte um 0,1. Dies zeigt, dass die angebotene Glukose bei einer von der Mediumversorgung unabhängigen Sauerstoffversorgung effizienter genutzt werden kann. Eine reine Sauerstoffdiffusion durch

die Mediumschicht ist nicht ausreichend, da bereits eine Schichtdicke von 1 mm zu Sauerstofflimitierungen führt [196].

Der primäre Energielieferant der Leber ist allerdings nicht Glukose, sondern Ketosäuren aus dem Abbau von Aminosäuren [6]. Der Glukoseverbrauch in der Leber ist *in vivo* eher gering, da sie vielmehr die konstante Glukoseversorgung anderer Organe wie Hirn oder Muskeln zur Aufgabe hat. Auch *in vitro* wurde ein geringer Glukoseverbrauch für Rattenhepatozyten nachgewiesen [197]. Gerlach et al. [198] fanden für glykolytische Kulturen von primären porcinen Hepatozyten im Hohlfaserbioraktor einen Glukoseverbrauch von $40 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen, Rocker [195] einen von $200 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen in Petri-Schalen. Auch dies ist in guter Übereinstimmung mit dem für den Bioreaktor gefundenen Wert von $78 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. In der herkömmlichen 24Well-Platte wurde allerdings ein Glukoseverbrauch von $415 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen gefunden. Dieser liegt deutlich über den anderen Werten und zeigt, dass hier Bedingungen herrschen, die der *in vivo*-Situation weniger ähnlich sind. Für Rattenhepatozyten fand Rocker [195] bei einem pO_2 von 10 % einen Glukoseverbrauch von $50\text{-}60 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen für Petri-Schalen mit Membranboden und $70\text{-}150 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen für Petri-Schalen ohne Membranboden. Auch hier führte eine bessere Sauerstoffversorgung zu einem geringeren Glukoseverbrauch.

Bei der Betrachtung des Laktat/Glukose-Verhältnisses muss außerdem beachtet werden, dass die Leber auch Glutamin als Energiequelle nutzen kann [199]. Das in dieser Arbeit benutzte Kulturmedium war mit 9 mM supplementiert. Zur Energiegewinnung genutztes Glutamin kann ebenfalls zu Laktat umgewandelt werden, wodurch das Verhältnis Laktat/Glukose beeinflusst wird. Leberzellen spielen eine große Rolle bei der Regelung des Glutaminhaushalts und stellen dies dem Körper bei Bedarf zur Verfügung. In primären porcinen Hepatozyten sind daher sowohl die Enzyme Glutamatdehydrogenase, Glutaminase (periportal) und Glutaminsynthase (perivenös), als auch die Enzyme der Glukoneogenese und der Harnstoffsynthese (periportal) sehr aktiv [193, 200, 201].

Harnstoff

Eine hohe Harnstoffsynthese ist also ebenfalls ein guter Parameter für die Oxygenierung des Systems. Da bei der Harnstoffsynthese viel Energie benötigt wird, ist sie außerdem ein Zeichen für einen intakten Energiestoffwechsel. Allerdings muss beachtet werden, dass die Harnstoffsynthese stark vom Stickstoffangebot und somit von der Mediumzusammensetzung abhängt. Flendrig et al. [202] und Gerlach et al. [198] fanden für primäre porcine Hepatozyten Syntheseraten von 28 bzw. $63 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen in Hohlfaserbioreaktoren. In Petri-Schalen wurden Harnstoffsynthesen von $55\text{-}85 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen im Single Gel (nur untere Kollagen-Schicht) [203, 204] und $60\text{-}110 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen im Double Gel (Sandwich) [195] gemessen. Dies steht in guter Übereinstimmung zu den in der 24Well-Platte bestimmten

55 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen, die Harnstoffsynthese befindet sich im Bereich der für Hohlfaserbioreaktoren und Single Gels bestimmten Syntheseraten und liegt nur leicht unter denen im Double Gel. Für den Mini-Bioreaktor wurde jedoch eine Harnstoffsynthese von 180 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen gemessen. Diese liegt deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten. Damit ist sie ein Zeichen für eine besonders gute Oxygenierung und Entgiftungsleistung, sowie einen gut funktionierenden Energiestoffwechsel.

Albumin

Die Albuminsynthese wird oft als Qualitätsparameter für die proteinsynthetische Aktivität von Hepatozyten herangezogen [179, 203-205]. *In vivo* ist sie beim gesunden Menschen [206] deutlich höher als beim kranken [207]. *In vitro* ist sie von verschiedenen Parametern abhängig, wie der C-Quelle, der Hormonsubstituierung, Aminosäuren, Zuckern, dem Ammoniumgehalt im Medium und der Serumcharge [195]. Bei der Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten im Single Gel fanden Behnia et al. [204] eine Sekretion von 0,1-1 µg h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen. Gregory et al. [203] bestimmten eine Albuminsynthese von 0,4-1,7 µg h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen sowohl im Single Gel als auch im Double Gel. Ebenfalls für das Double Gel fanden Rocker [195] und de Bartolo et al. [179] Syntheseraten von 1,3-1,6 µg h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen, Hansen et al. [208] von 2 µg h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten Syntheseraten von 0,7-1,7 µg h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen im Bioreaktor und 0,2-2 µg h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen in der 24Well-Platte. Bezüglich der Albuminsekretion bietet der Bioreaktor also keine Vorteile, beide Systeme zeigen der Literatur entsprechende Syntheseleistungen.

Phase I

Wichtig für ein erfolgreiches Screening ist der Erhalt der Biotransformation und der Möglichkeit zu Drug-Drug-Interaktionen in der Zellkultur. Dies ist nur in organotypisch differenzierten Hepatozyten gegeben. Die Fähigkeit, Phase I-Reaktionen durchzuführen, wurde anhand der sauerstoffabhängigen Monooxygenasen EROD (CYP 1A1/1A2) und ECOD (CYP 2B1/2B2) untersucht. Der Erhalt der Interaktionsfähigkeit wurde mittels Induktion mit 3-MC (EROD) und PB (ECOD) analysiert.

Im Single Gel in Petri-Schalen kultivierte primäre porcine Hepatozyten verloren ihre anfängliche EROD-Aktivität von 1-3 µU 10⁻⁶ Zellen während der ersten fünf Kulturtag [203, 204]. Wurden sie jedoch initial durch 3-MC induziert, konnten Aktivitäten von 15-35 µU 10⁻⁶ Zellen und eine 4,5-fache Induktion gemessen werden. Im Double Gel verhält sich die Grundaktivität stabil, in der Petri-Schale wurden Werte von 0,3-2 µU 10⁻⁶ Zellen gefunden [208], im Flachmembranbioreaktor (FMB) 3-8 µU 10⁻⁶ Zellen [26]. In beiden Systemen konnte die EROD-Aktivität induziert werden: 1,5-2-fach in der Petri-Schale, 11-fach im

FMB. In den Versuchen konnten Grundaktivitäten von $10 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen in der 24Well-Platte und $40 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen im Bioreaktor gemessen werden. Damit liegt die 24Well-Platte etwa im gleichen Bereich wie der FMB, die Aktivität im Bioreaktor ist jedoch 4-mal höher. Dies spricht ebenso wie die Daten des Primärmetabolismus für eine sehr gute Oxygenierung der Zellen. Auch die Induzierbarkeit der Hepatozyten blieb in beiden Systemen erhalten, es wurden Werte von $30 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen in der 24Well-Platte und $165 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen im Bioreaktor und somit 3-4-fache Induktionen gefunden. Diese Interaktionsfähigkeit stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Werten für Petri-Schalen überein.

Die Grundaktivität von ECOD bleibt auch bei der Kultivierung im Single Gel erhalten. Behnia et al. [204] fanden im Single Gel Werte von $8-18 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen, die gut mit den im FMB gefundenen Aktivitäten von $5-15 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen [26] übereinstimmen. Dagegen fanden Hansen et al. [208] im Double Gel eine Grundaktivität von $80 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Die in der 24Well-Platte gemessene Grundaktivität liegt mit $40-45 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen zwischen diesen Werten, die im Bioreaktor mit $90 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen darüber. Auch hier zeigt sich, dass die gute Oxygenierung die Enzymaktivität fördert. Im Single Gel [204] wurden induzierte ECOD-Aktivitäten von $70-75 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen gefunden, im FMB [26] von $80-200 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Die in der 24Well-Platte gemessene induzierte Aktivität von $65 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen liegt leicht darunter, die im Bioreaktor mit $275 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen darüber. Dies entspricht einer 1,5-fachen bzw. einer 3-fachen Induktionsrate. Dagegen können in der Literatur 2-13-fache Induktionen gefunden werden [26, 203, 204, 208], wobei beachtet werden muss, dass von deutlich niedrigeren Grundaktivitäten ausgegangen wird.

Der Bioreaktor zeigt also für beide Enzyme deutlich höhere Aktivitäten als die 24Well-Platte, was auf eine bessere Oxygenierung der Zellen zurückzuführen ist.

Phase II

Auch die Konjugationsreaktionen der Phase II sind nur in vollständig differenzierten Hepatozyten möglich und ein wichtiger Aspekt beim Screening nach den Metaboliten eines Pharmakons. Ihr Erhalt ist bei der Leberzellkultivierung unerlässlich. In der vorliegenden Arbeit wurde das Substrat 4-MU sowohl von UGT als auch von ST metabolisiert, so dass eine Konkurrenzreaktion zwischen beiden Enzymen möglich war. Diese wird in der Regel durch die Zugabe einer ausreichend hohen Substratkonzentration (hier: $100 \mu\text{M}$) zu vermeiden versucht.

Sowohl für die Kultur von primären humanen Hepatozyten [209] als auch von primären Rattenhepatozyten [210] wurde eine Abnahme der ST-Aktivität über den Kultivierungszeitraum bei gleichzeitiger Zunahme der UGT-Aktivität gefunden. Humane Leberschnitte [211] zeigten auch bei gleichbleibender UGT-Aktivität eine abnehmende ST-Aktivität, während bei der Kultur porciner Hepatozyten im FMB [26] die UGT-Aktivität von

280 auf 225 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen leicht abnahm und die ST-Aktivität von 60 auf 100 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen leicht anstieg. Dieses Verhalten konnte weder in der 24Well-Platte noch im Mini-Bioreaktor beobachtet werden. Beide Systeme zeigten eine Grundaktivität von 1100 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen, die während der ersten Kulturwoche leicht zu- und in der zweiten Woche leicht abnimmt. Die Induktion mit Rifampicin führte zu einer etwa 2-fachen Induktion auf eine Aktivität von 2000 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Diese Induktionsrate stimmt gut mit der im FMB gemessenen 2-fachen Aktivitätserhöhung auf 450-540 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen überein.

Die ST-Aktivität im FMB [26] nahm hingegen durch die Zugabe von Rifampicin ab, durch die Induktion von UGT kam es zu der erwähnten Konkurrenzreaktion. Jedoch konnte auch dieses Verhalten weder in der 24Well-Platte noch im Bioreaktor beobachtet werden. In keinem der beiden Systeme konnte ein eindeutiger Trend erkannt werden, es wurden sehr große Schwankungen und Standardabweichungen bei den einzelnen Kurvenverläufen gefunden.

Für den sauerstoffunabhängigen Phase II-Metabolismus weist der Bioreaktor somit keine Vorteile gegenüber der 24Well-Platte auf, die Oxygenierungsleistung des Bioreaktors spielt hierfür keine Rolle.

Resultat

Sowohl der Primärmetabolismus als auch die Biotransformation zeigen, dass in dem entwickelten Bioreaktor die gewebespezifische Kultivierung primärer Zellen möglich ist. Sie behalten über den untersuchten Zeitraum von zwei Wochen ihre organotypischen Leistungen bei und liegen vollständig differenziert vor. Die sauerstoffabhängigen Prozesse (Glukoseverbrauch, Laktatbildung, Harnstoffsynthese und Phase I-Reaktionen) lassen zudem erkennen, dass der Bioreaktor verglichen mit der herkömmlichen 24Well-Platte und vielen Systemen in der Literatur verbesserte Leistungen zeigt und somit eine gute und vom Medium unabhängige Oxygenierung gewährleistet. Der Erhalt der Interaktionsfähigkeit (Induktion) zeigt außerdem, dass die Zellen für ein pharmakologisches Screening von Wechselwirkungen gut geeignet sind.

5.3 Modellscreening mit Johanniskraut (*Hypericum perforatum*)

Nachdem gezeigt wurde, dass die Hepatozyten im Bioreaktor bessere gewebespezifische Leistungen erbringen als in der 24Well-Platte, wurde ein Testscreening mit verschiedenen Johanniskraut-Präparaten durchgeführt. Anfängliche Untersuchungen in beiden Kultursystemen zeigten, dass Hepatozyten im Bioreaktor stärker auf die Präparate reagierten. Die mit dem Bioreaktor erhaltenen Ergebnisse werden in diesem Kapitel dargestellt. Die Wirkung der verschiedenen Präparate wird dabei als prozentuale Abweichung von der jeweils entsprechenden Lösungsmittelkontrolle angegeben. Eine positive Wirkung bedeutet also eine Induktion des Enzyms gegenüber der Kontrolle, eine negative Wirkung steht für eine Inhibierung.

5.3.1 Ergebnisse

5.3.1.1 Wirkung auf verschiedene Enzyme

In dieser ersten Versuchsgruppe wurden die verschiedenen Zubereitungen Öl, Pulver, Tee und Extrakt für drei verschiedene Perioden (zwei, drei und vier Tage) auf die Hepatozyten gegeben und ihre Wirkung auf EROD, ECOD und den Diazepamstoffwechsel untersucht.

EROD

Zusätzlich zu den Johanniskrautpräparaten wurde 3-MC als bekannter Vergleichsinduktor untersucht. Die gemessenen Ergebnisse sind in Abbildung 5-16 dargestellt.

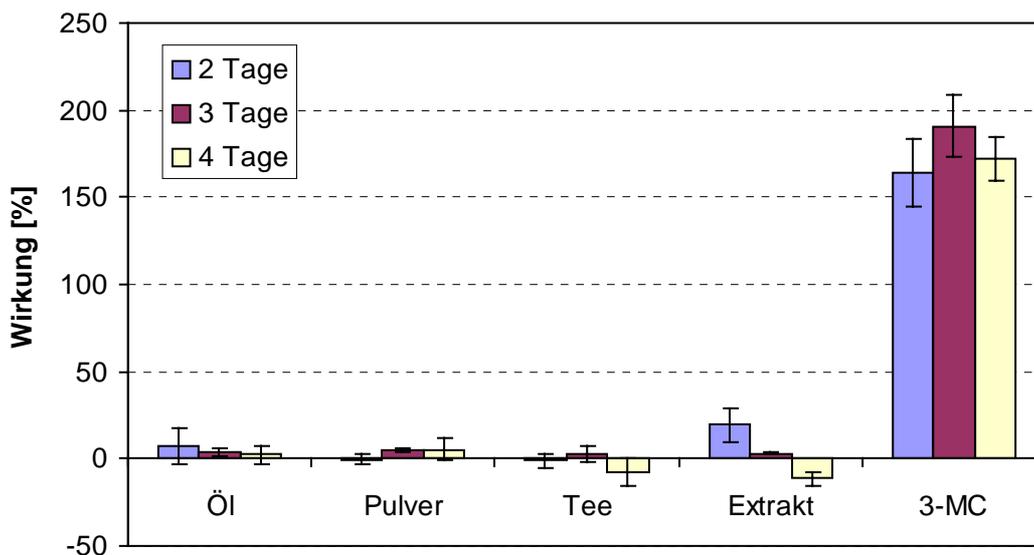


Abbildung 5-16: Wirkung der verschiedenen Johanniskrautpräparate auf EROD

Die drei Präparate Öl, Pulver und Tee besitzen nur eine sehr geringe Wirkung auf EROD, die gemessene Enzymaktivität ist maximal 7,5 % höher oder niedriger als die der entsprechenden

Kontrolle. Der Extrakt zeigt eine etwas größere, zeitabhängige Wirkung. Nach einer zweitägigen Aufnahme erhöht er die EROD-Aktivität um etwa 20 %, eine dreitägige Aufnahme ändert die Enzymaktivität nicht, und die viertägige Aufnahme führt zu einer um ca. 12 % verminderten Aktivität. Einen deutlichen Effekt bewirkt allerdings nur der Modellinduktor 3-MC, die EROD-Aktivität steigt um etwa 175 %.

ECOD

Abbildung 5-17 zeigt die Wirkung der verschiedenen Hypericum-Präparate und des Induktors PB auf ECOD.

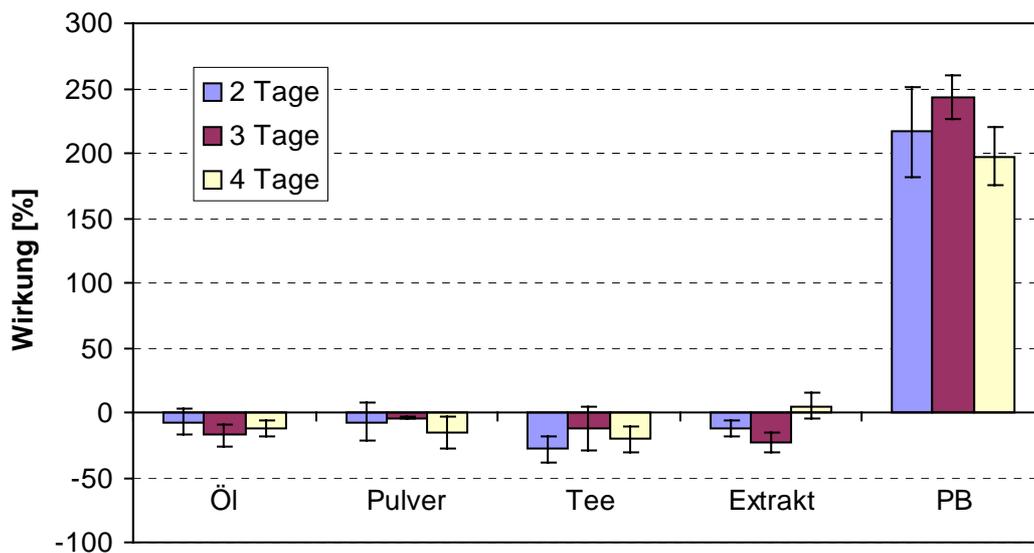


Abbildung 5-17: Wirkung der verschiedenen Johanniskrautpräparate auf ECOD

Auf ECOD wirken die untersuchten Präparate leicht inhibierend. Dabei ist der größte Effekt mit ca. 28 % Aktivitätsverlust bei der zweitägigen Gabe von Johanniskraut-Tee zu beobachten, die insgesamt geringste Wirkung zeigt das Pulver. Die Wirkung der verschiedenen Zubereitungen ist nicht zeitabhängig. Auch bei diesem Enzym zeigt der Modellinduktor PB mit einer Aktivitätssteigerung von etwa 220 % die deutlichste Wirkung.

Desmethyldiazepam

Der Diazepam-Metabolit Desmethyldiazepam entsteht durch die N-Demethylierung des Substrats durch die CYPs 2C und 3A. In Abbildung 5-18 ist daher die Wirkung der Johanniskraut-Zubereitungen und des Induktors DEX auf die Kombination beider CYPs dargestellt.

Auf diesen Metaboliten wirken die Hypericum-Präparate deutlich stärker als auf die Enzyme EROD und ECOD. Bis auf das Öl nach drei Inkubationstagen besitzen alle Zubereitungen eine induktive Wirkung auf Desmethyldiazepam. Die geringste Wirkung zeigt der Tee mit

einer Induktion von ca. 15 % nach einer zweitägigen und einer viertägigen Inkubation. Die stärkste Wirkung zeigt der Extrakt nach zweitägiger Gabe. Die Induktion von ca. 115 % übersteigt sogar die des Modellinduktors Dexamethason mit etwa 100 %. Es fällt auf, dass die Wirkung nach dreitägiger Johanniskraut-Gabe deutlich von der zwei- bzw. viertägigen Gabe variiert. Während die Wirkung beim Tee und Extrakt sinkt, steigt sie beim Pulver an und wirkt beim Öl inhibierend.

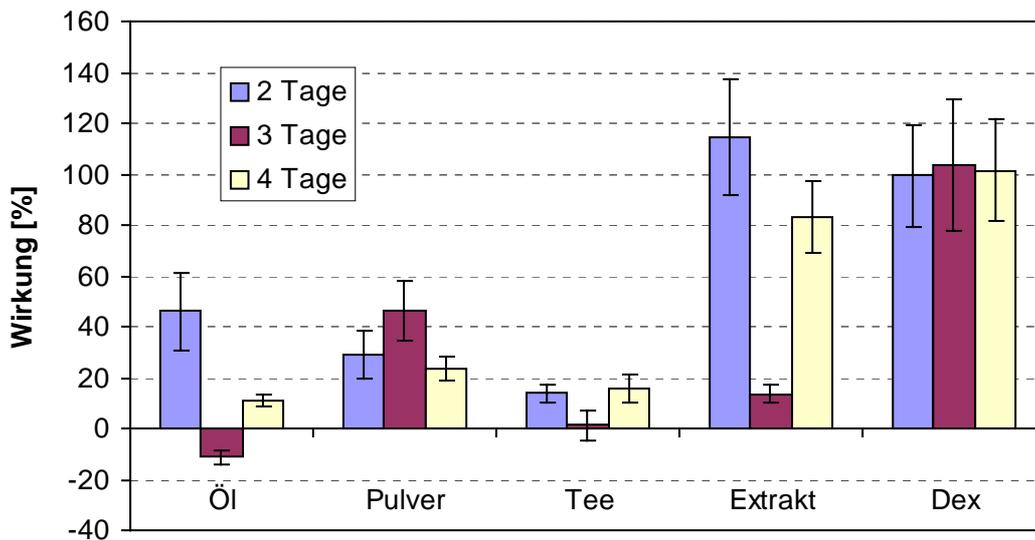


Abbildung 5-18: Wirkung der Johanniskraut-Präparate auf den Metabolit Desmethyldiazepam

Temazepam

Der Metabolit Temazepam entsteht ebenfalls durch die CYPs 2C und 3A durch die Hydroxylierung des Substrats. In Abbildung 5-19 ist die Wirkung der Johanniskraut-Präparationen und des Induktors DEX auf die Kombination beider CYPs dargestellt.

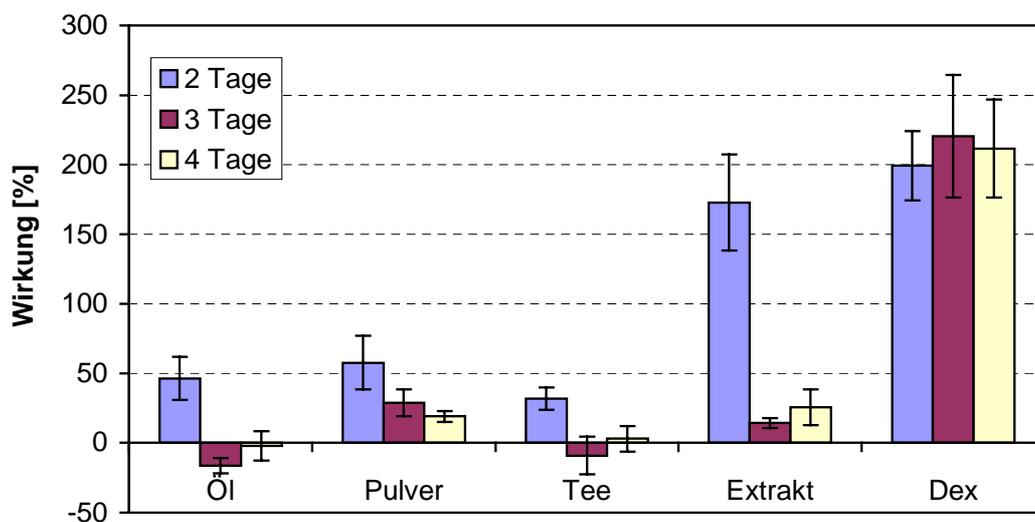


Abbildung 5-19: Wirkung der Johanniskraut-Präparate auf den Metabolit Temazepam

Auf die Bildung dieses Metaboliten zeigen die Johanniskraut-Präparate eine klare Wirkung. Besonders die zweitägige Inkubation aller Zubereitungen wirkt induzierend. Wiederum besitzt der Tee die geringste (ca. 30 %) und der Extrakt die höchste Wirkung. Mit einer Induktion von ca. 175 % erreicht er fast die des Modellinduktors Dexamethason mit etwa 210 %. Die drei- und viertägigen Gaben aller Präparate zeigen schwächer induzierende bzw. inhibierend Wirkungen.

Oxazepam

Die beiden Zwischenprodukte Desmethyldiazepam und Temazepam werden durch die Nachschaltung der jeweils anderen Reaktion (Hydroxylierung von Desmethyldiazepam und N-Desmethylierung von Temazepam) zum Endprodukt Oxazepam metabolisiert. Die Wirkung der verschiedenen Johanniskraut-Zubereitungen hierauf zeigt Abbildung 5-20. Um diese zu veranschaulichen, wurde die Wirkung von Dexamethason nicht gezeigt, da dieses stark induzierend wirkt (10⁴ %).

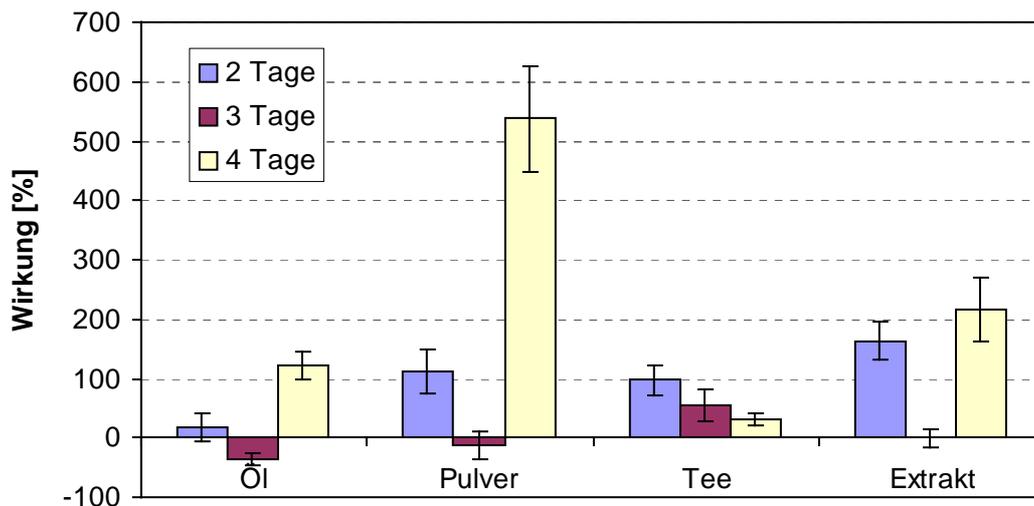


Abbildung 5-20: Wirkung der Johanniskraut-Präparate auf den Metabolit Oxazepam

Die stärkste Wirkung auf das Endprodukt Oxazepam ist nach viertägiger Hypericum-Gabe zu beobachten. Die stärkste Induktion wird dabei vom Pulver mit etwa 540 % hervorgerufen. Auch der Extrakt zeigt mit ca. 215 % noch eine klare induktive Wirkung. Wie schon für Desmethyldiazepam beobachtet, ist der Effekt bei dreitägiger Johanniskraut-Gabe deutlich anders als bei zwei- bzw. viertägiger Gabe. Während der Extrakt keine Wirkung zeigt, inhibieren Öl und Pulver die Bildung von Oxazepam. Nur der Tee zeigt ein anderes Verhalten, die induktive Wirkung nimmt mit zunehmender Inkubationszeit ab.

5.3.1.2 Wirkung der Inhaltsstoffe

In dieser Versuchsgruppe wurde die Wirkung der verschiedenen Inhaltsstoffe auf nur einen Metabolismus untersucht. Die Johanniskraut-Präparate zeigen kaum Wirkung auf EROD und ECOD, aber gerade der Extrakt und das Pulver besitzen eine deutliche induzierende Wirkung auf den Diazepam-Metabolismus. Daher wurden die Inhaltsstoffe sowie drei Pulver unterschiedlicher Zusammensetzung und der Extrakt, sowohl in Cremophor RH 40 als auch in DMSO gelöst, an diesem getestet. Dabei entspricht Pulver 1 dem Pulver der ersten Versuchsgruppe.

Desmethyldiazepam

Die Wirkungen der verschiedenen Substanzen auf Desmethyldiazepam ist in Abbildung 5-21 dargestellt.

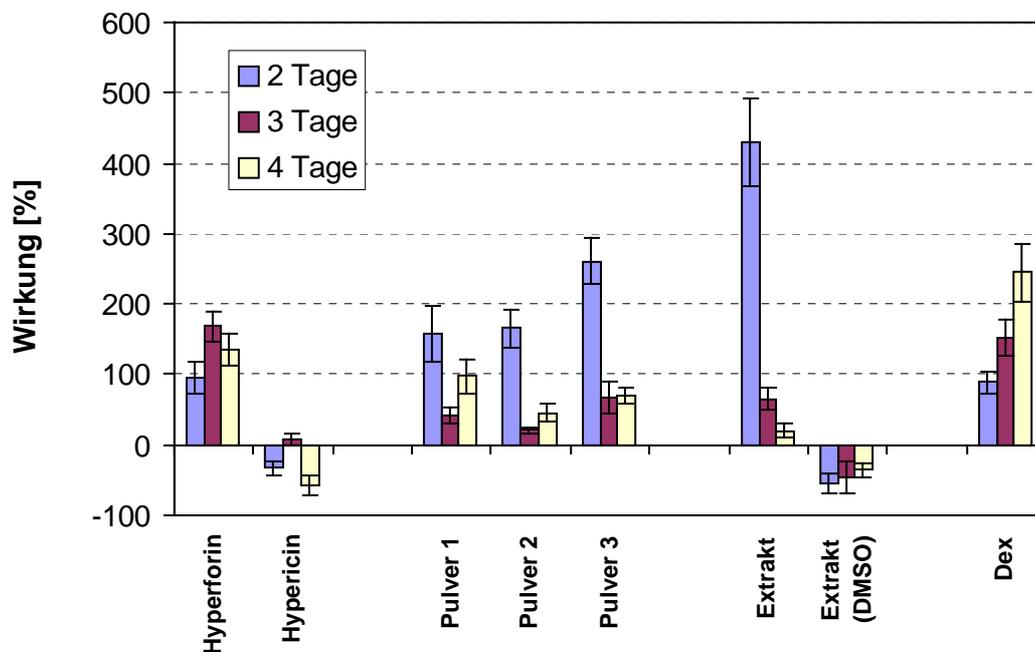


Abbildung 5-21: Wirkung der Hypericum-Inhaltsstoffe auf Desmethyldiazepam

Während der Extrakt in Cremophor RH 40 gelöst eine induzierende Wirkung auf Desmethyldiazepam hat, wirkt er in DMSO gelöst inhibierend. Ebenso inhibiert der Inhaltsstoff Hypericin, während Hyperforin induziert. Die stärkste Wirkung der Zubereitungen ist jeweils nach zweitägiger Inkubation zu beobachten. Dabei zeigen vor allem Pulver 3 und der Extrakt, etwas geringer auch Pulver 1 und 2, eine stärkere Induktion als der Modellinduktor Dexamethason. Wie auch schon in Kapitel 5.3.1.1 beobachtet, unterscheiden sich die Wirkungen der Inhaltsstoffe und Pulver nach dreitägiger Gabe deutlich von denen nach zwei- bzw. viertägiger Gabe.

Temazepam

Abbildung 5-22 zeigt die Wirkung der Inhaltsstoffe auf den Metaboliten Temazepam.

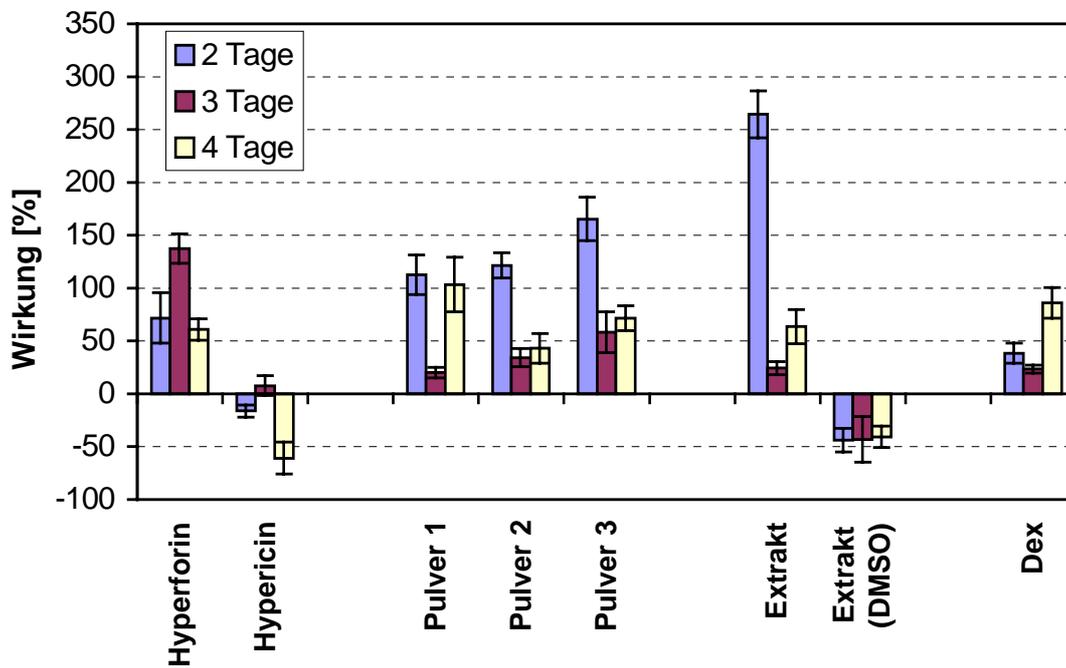


Abbildung 5-22: Wirkung der Hypericum-Inhaltsstoffe auf Temazepam

Die Wirkung der verschiedenen Präparate auf Temazepam ist sehr ähnlich zu der auf Desmethyldiazepam. Der Inhaltsstoff Hyperforin induziert die Bildung von Temazepam, während Hypericin inhibierend wirkt. Der Extrakt wirkt induzierend, wenn er in Cremophor RH 40 gelöst wird, inhibierend in DMSO. Auch hier ist die stärkste Wirkung der Zubereitungen jeweils nach zweitägiger Inkubation zu beobachten und deutlich höher als die Induktion durch den Modellinduktor Dexamethason. Hyperforin induziert nach dreitägiger Gabe am stärksten, während die anderen Zubereitungen nach dieser Inkubationszeit am wenigsten induzieren. Auch Hyperforin besitzt zu diesem Zeitpunkt eine leicht induzierende Wirkung, während es sonst inhibierend wirkt.

Oxazepam

Die Wirkung der Hypericum-Inhaltsstoffe auf das Endprodukt Oxazepam ist in Abbildung 5-23 gezeigt. Um diese übersichtlicher zu gestalten, wurde auf die Darstellung der sehr stark induzierenden Wirkung von Dexamethason (10^4 %) verzichtet.

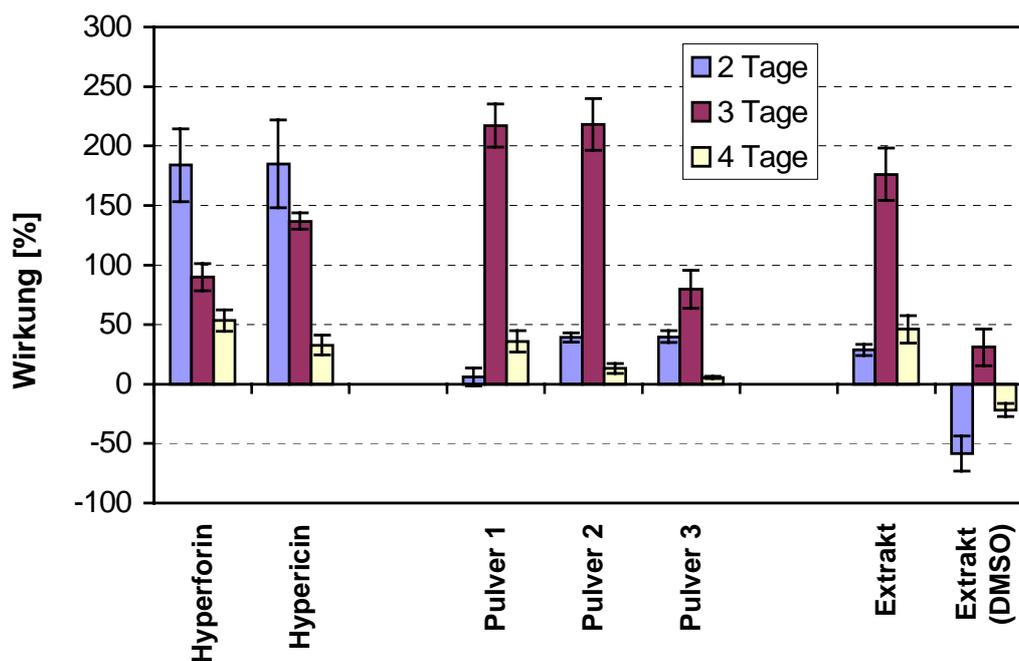


Abbildung 5-23: Wirkung der Hypericum-Inhaltsstoffe auf Oxazepam

Die Wirkung der Präparate auf das Endprodukt unterscheidet sich deutlich von denen auf die Zwischenprodukte. Beide Inhaltsstoffe zeigen nach zweitägiger Inkubation eine stark induzierende Wirkung (etwa 180 %), die mit zunehmender Inkubationsdauer abnimmt. Die Pulver und der Extrakt besitzen die stärkste induzierende Wirkung nach dreitägiger Inkubation, wobei hier besonders die Pulver 1 und 2 und weniger der Extrakt und Pulver 3 induzieren. Auch der in DMSO gelöste Extrakt wirkt nach dreitägiger Gabe leicht induzierend, während er nach zwei- und viertägiger Gabe inhibiert.

5.3.1.3 Übersicht über die Wirkung und Zusammensetzung der einzelnen Präparate

Die beiden Inhaltsstoffe und die verschiedenen Zubereitungen zeigen unterschiedliche Wirkungen auf die verschiedenen Metabolite. Um eine schnelle Übersicht zu ermöglichen, wurde eine grobe Einteilung der Wirktendenzen vorgenommen, welche in Tabelle 5-1 zusammenfassend dargestellt sind.

Tabelle 5-1: Gemittelte Wirkung der verschiedenen Johanniskraut-Präparate

Präparat	EROD	ECOD	DMD	Tem.	Ox.
Hyperforin	n.u.	n.u.	++	++	+++
Hypericin	n.u.	n.u.	-	-	+++
Pulver 1	0	0	++	++	+++
Pulver 2	n.u.	n.u.	++	++	+++
Pulver 3	n.u.	n.u.	+++	+++	+
Extrakt (Cremophor)	0	0	+++	+++	+++
Extrakt (DMSO)	n.u.	n.u.	-	-	-
Öl	0	0	0	0	+
Tee	0	-	0	0	++

n.u.	nicht untersucht	+	leichte Induktion	DMD	Desmethyldiazepam
-	Inhibierung	++	mittlere Induktion	Tem.	Temazepam
0	keine Wirkung	+++	starke Induktion	Ox.	Oxazepam

Die Präparate variieren nicht nur in ihrer Wirkung, sondern auch stark in ihrer jeweiligen Zusammensetzung an Hyperforin, Hypericin und Flavonoiden. Diese wurde von Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, untersucht und ist mit der mittleren Wirktendenz in Tabelle 5-2 dargestellt.

Tabelle 5-2: Zusammensetzung der einzelnen Johanniskraut-Präparate

Präparat	Hyperforin		Hypericin		Flavonoide		Wirktendenz
	[%]	ng ml ⁻¹	[%]	ng ml ⁻¹	[%]	ng ml ⁻¹	
Hyperforin	100	100	-	-	-	-	++
Hypericin	-	-	100	100	-	-	-(+++ Ox.)
Pulver 1	1,12	9,00	4,23	33,9	94,65	758,0	++
Pulver 2	4,05	61,2	0,81	12,3	95,14	1437,0	++
Pulver 3	4,33	50,0	3,2	37,0	92,47	1069,0	++
Extrakt (Cremophor)	24,22	626,8	1,24	32,2	74,54	1928,7	+++
Extrakt (DMSO)	12,38	284,0	0,11	2,5	87,51	2007,0	-
Öl	22,64	1,68	51,75	3,84	25,61	1,9	0
Tee	0,5	8,1	1,05	17,1	98,45	1599,0	+

n.u.	nicht untersucht	+	leichte Induktion	DMD	Desmethyldiazepam
-	Inhibierung	++	mittlere Induktion	Tem.	Temazepam
0	keine Wirkung	+++	starke Induktion	Ox.	Oxazepam

Die Hepatozyten zeigen im Mini-Bioreaktor also nicht nur gewebespezifische Leistungen, sie sind auch zu einem pharmakologischen Screening geeignet.

5.3.2 Diskussion

Johanniskraut wird seit langem als pflanzliches Arzneimittel zur Behandlung von leichten und mittelschweren Depressionen eingesetzt. Jedoch zeigten sich sowohl bei *in vivo*- als auch bei *in vitro*-Studien Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten.

Um die Eignung des Bioreaktors zum pharmakologischen Screening und die damit verbundene *in vivo/in vitro*-Korrelation zu testen, wurden in ihm die Wirkung verschiedener Johanniskraut-Präparate auf verschiedene Enzyme untersucht. Da porcine Hepatozyten benutzt wurden, ist eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zwar nicht gegeben, jedoch können Aussagen über die Eignung des Bioreaktors als Screening-System getroffen werden.

EROD und ECOD

Auf EROD (CYP 1A1/1A2) zeigen die im Mini-Bioreaktor untersuchten Johanniskraut-Zubereitungen nur eine geringe Wirkung. Auf ECOD (CYP 2B1/2B2) besitzt nur der Tee einen minimal inhibierenden Einfluss. Der Erhalt der Interaktionsfähigkeit der Zellen wurde durch die deutlichen Induktionen der Modell-Induktoren 3-MC (EROD) und PB (ECOD) gezeigt. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit Nöldner et al. [212], die bei mit hohen Dosen Johanniskraut-Extrakt und -Komponenten behandelten Ratten keine Reaktionen von EROD und ECOD fanden, jedoch eine deutliche Induktion durch Phenobarbital. Gewertz et al. [213] untersuchten den Einfluss von Johanniskraut-Extrakt auf den Abbau von Koffein zu Paraxanthin durch CYP 1A2 an freiwilligen Probanden. Sie konnten keine Veränderung der Enzymaktivität finden, woraus geschlossen wurde, dass Johanniskraut kaum oder keine Interaktionen mit CYP 1A2 eingeht. Auch dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Allerdings kam es auch bei der Co-Medikation von Theophyllin (Anti-Asthmatikum) und Johanniskraut-Extrakt zu Wechselwirkungen. Nach der Einnahme des Extrakts sanken stabile Theophyllin-Plasmaspiegel stark ab und nahmen nach Beendigung der Co-Medikation wieder die Normalwerte an [83]. Da Theophyllin aber hauptsächlich von CYP 1A2 metabolisiert wird [81], spricht dieser Befund für eine Interaktion mit CYP 1A2.

Diese Differenzen in der CYP 1A2-Induktion könnten durch Speziesunterschiede erklärt werden, die zu einer CYP 1A2-Induktion durch Johanniskraut im Menschen führen, nicht aber im Schwein oder der Ratte. Dem widerspricht jedoch, dass kein Einfluss von Johanniskraut auf den Koffeinabbau gefunden werden konnte.

Diazepam-Metabolismus

Auf den Diazepamstoffwechsel zeigten alle untersuchten Zubereitungen eine Wirkung, wobei deutliche Unterschiede im Einfluss der einzelnen Präparationen bestehen. Diese

Wirkttendenzen stimmen für die beiden Zwischenprodukte Desmethyldiazepam und Temazepam gut überein, die stärkste Aktivitätssteigerung wurde durch den Extrakt hervorgerufen, das Pulver besitzt eine schwächere Wirkung, Öl und Tee induzieren kaum. Die Beeinflussung des Endprodukts Oxazepam unterscheidet sich kaum, jedoch besitzt hier das Pulver eine stärker aktivitätssteigernde Wirkung als der Extrakt und auch der Tee induziert leicht. Insgesamt ist für die drei Metabolite die schwächste Wirkung beim Öl zu beobachten, die stärkste beim Extrakt, der gleichzeitig das am häufigsten verwendete Johanniskraut-Produkt darstellt.

Da Diazepam sowohl von Enzymen der CYP 2C-Gruppe als auch der CYP 3A-Gruppe metabolisiert wird, kann durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht beurteilt werden, ob nur eine oder beide Enzymgruppen von Johanniskraut induziert wurden. Der Extrakt zeigt allerdings auf die beiden Zwischenprodukte eine ähnliche Wirkung wie der mitgeführte Modell-Induktor Dexamethason, der für CYP 3A4-Induktionen bekannt ist. Zusätzliche Untersuchungen auf RNA-Ebene können hier zu genaueren Ergebnissen führen. CYP 3A4 ist das häufigste hepatische Enzym und für die oxidative Metabolisierung von mehr als 50 % aller gängigen Medikamente verantwortlich [92]. Über 70 der bekannten Wirkstoffe und eine Vielzahl endogener Komponenten werden von diesem Enzym metabolisiert [90]. Induktionen oder Inhibitionen stellen daher eine wichtige Quelle von therapeutischen Misserfolgen, Toxizitäten oder anderen ungünstigen Nebenwirkungen dar. So konnten Roby et al. [90] nach Johanniskraut-Extrakt-Einnahme eine Zunahme des 6 β -OH-Cortisol/Cortisol-Verhältnisses um 114 % im Urin von freiwilligen Probanden messen, was für eine starke CYP 3A4-Induktion spricht und zur verminderten therapeutischen Wirksamkeit der von diesem Enzym metabolisierten Medikamente wie R-Warfarin (Anti-Koagulantium) und Ciclosporin (Immunsuppressivum) führte. Auch ein starker Johanniskraut-Tee-Konsum führte zu einem deutlichen Konzentrationsabfall des Ciclosporin-Plasmaspiegels [214].

Die ermittelte Induktion der beiden Enzymgruppen CYP 2C und 3A durch Johanniskraut stimmt mit den Ergebnissen von Maurer [87], de Smet [88] und Yue [82] überein. Sie fanden verringerte Plasmakonzentrationen von Amitriptylin (Antidepressivum) bei gleichzeitiger Einnahme von Johanniskraut [88], was auf eine Interaktion in Form einer Induktion von CYP 2C19 und 3A4 hinweist [215]. Beide Enzyme sind auch am Metabolismus von Diazepam beteiligt. Ebenso konnte eine verminderte Resorption bzw. forcierte Elimination von Phenprocoumon beobachtet werden. Dieses spricht für eine Induktion von CYP 2C9 [87], das ebenfalls Diazepam abbaut. Auf eine Induktion dieses Enzyms weist auch hin, dass sich die verminderte Wirkung von Warfarin nach Beendigung der Johanniskraut-Einnahme normalisierte [82].

Allerdings konnten Ereshefsky et al. [216] in Versuchen mit Dextrometorphan, das von CYP 2D6 zu Dextrorphan und von CYP 3A4 zu 3-Methoxymorphinan abgebaut wird, und

gleichzeitiger Gabe von Johanniskraut-Extrakt an gesunden Probanden keinerlei Interaktionen feststellen. Keinen Einfluss auf CYP 2D6 zu beobachten entspricht den bisherigen Ergebnissen, die für eine hauptsächliche Induktion der CYPs 3A4, 2C und evtl. 1A2 durch Johanniskraut sprechen. Eine Wirkung auf CYP 3A4 wäre hingegen zu erwarten gewesen. So konnten auch Markowitz et al. [92] in Versuchen mit Dextrometorphan und Alprazolam keine Beeinflussung von CYP 2D6 finden, jedoch eine Induktion von CYP 3A4.

Wirkung der Inhaltsstoffe

Auch Nöldner et al. [212] konnten keine Reaktion der untersuchten Enzyme CYP 2D6, 3A3, 3A4, 1A1, 1A2 und 2A auf Johanniskraut-Extrakt sowie einige Inhaltsstoffe wie Hyperforin und Hypericin finden. Sie schlossen daraus, dass Johanniskraut-Präparate und -Komponenten kein Induktionspotential für CYPs besitzen und Wechselwirkungen bei der Co-Medikation mit Johanniskraut unwahrscheinlich sind.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den in dieser Arbeit ermittelten Induktionen. Die drei verschiedenen Pulver, der in Cremophor gelöste Extrakt sowie Hyperforin zeigen auf alle drei Diazepam-Produkte eine aktivitätssteigernde Wirkung, während der in DMSO gelöste Extrakt eine inhibierende Wirkung besitzt. Hypericin inhibiert den Metabolismus der Zwischenprodukte Desmethyldiazepam (DMD) und Temazepam, induziert jedoch die Bildung von Oxazepam.

Die Wirkung aller Zubereitungen stimmt für DMD und Temazepam sehr gut überein: Die stärkste Induktion wird jeweils nach zweitägiger Gabe vom Extrakt hervorgerufen, gefolgt von den Pulvern 3, 2 und 1. Dabei fällt auf, dass in dieser Reihenfolge der prozentuale Hyperforin-Anteil der Zubereitungen abnimmt. Hyperforin allein zeigt nach dreitägiger Gabe eine Induktion, die etwa der von Pulver 2 nach zwei Tagen entspricht. Aus den Anteilen von Hypericin und der Flavonoide lässt sich kein direkter Einfluss auf die Wirkung der Präparate erkennen, Hypericin allein bewirkt jedoch, besonders nach viertägiger Gabe, eine Inhibierung der Aktivität.

Die Bildung des Endprodukts Oxazepam wird jeweils nach dreitägiger Gabe am stärksten von den Pulvern 1 und 2 induziert, gefolgt vom Extrakt (in Cremophor) und Pulver 3. Eine dem Extrakt in etwa entsprechende Induktion zeigen die beiden Inhaltsstoffe Hyperforin und Hypericin nach zweitägiger Gabe. Eine eindeutige Zuweisung der Wirkung durch die Anteile der Inhaltsstoffe ist hier jedoch nicht möglich. Insgesamt lässt sich aber eine klare Induktion der Zwischenprodukte nach zweitägiger Johanniskraut-Gabe und des Endprodukts nach dreitägiger Gabe beobachten. Die stärkste Wirkung geht von Hyperforin aus.

Wird der Extrakt in DMSO gelöst, verändert sich die Zusammensetzung der Zubereitung deutlich. Nur etwa die Hälfte des Hyperforin-Anteils und ein Zehntel des Hypericin-Anteils werden gemessen, der Flavonoid-Anteil steigt dagegen an (s. Tabelle 5-2). Dies allein kann

die Wirkung jedoch nicht begründen, da der Hyperforin-Anteil noch immer deutlich über dem der Pulver liegt, die Hyperincin- und Flavonoid-Anteile darunter. Um eine genaue Erklärung zu finden, muss die Zusammensetzung der Flavonoide weiterführend untersucht werden.

Die inhibierende Wirkung der humanen CYPs 3A4, 1A2, 2B und 2E1 durch Flavonoide ist bekannt. Besonders Quercetin, ein Inhaltsstoff von Johanniskraut, gilt als wirksamer CYP 3A4- [92] und 1A2-Inhibitor [217]. Aber auch dem Inhaltsstoff Hypericin und sehr gering dem Hyperforin wird *in vitro* eine geringe Inhibition der CYPs 2C9, 2D6 und 3A4 zugesprochen [217]. Abbildung 5-24 zeigt die Strukturformeln der verschiedenen Inhaltsstoffe.

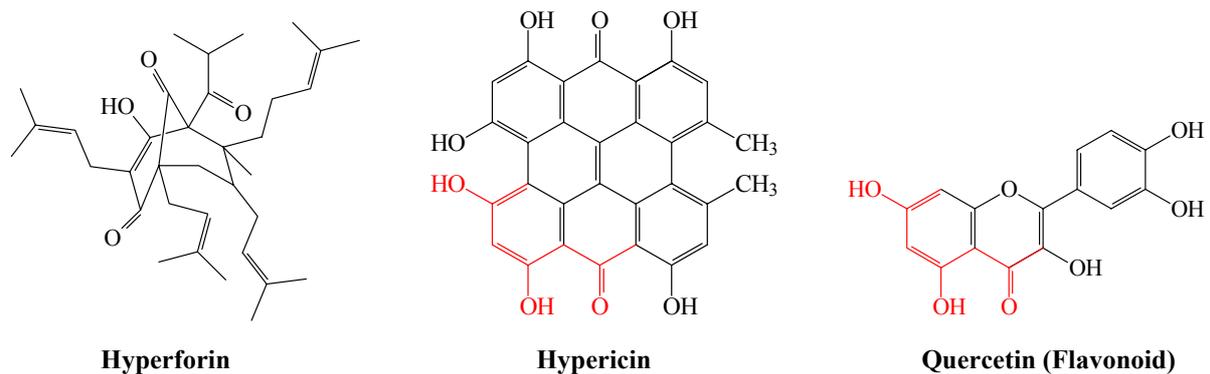


Abbildung 5-24: Strukturformeln der verschiedenen Inhaltsstoffe

Hyperforin unterscheidet sich nicht nur in der Wirkung, sondern auch im Aufbau deutlich von Hypericin und Quercetin. Diese beiden zeigen eine gemeinsame Struktur (rot), die für eine ähnliche Wirkweise stehen kann, wenn sie die Inhibition des aktiven Zentrums des Enzyms bewirkt. Auch die Betrachtung der Strukturformeln kann also einen gewissen Aufschluss über die Wirkweise einer Komponente geben.

Der medizinische Erfolg von Johanniskraut wird dem Hyperforin zugerechnet, die antidepressive Wirkung korreliert mit dem Hyperforingehalt eines Präparats [218]. Hyperforin inhibiert die Aufnahme von Neurotransmittern in den Synapsen [219-221], Johanniskraut-Extrakte hemmen die Aufnahme von Serotonin, Dopamin, Norepinephrin und γ -Aminobuttersäure in (Nager-) Synapsen [219-223]. Damit ist auch ein Screening von Johanniskraut an Neuronen im Bioreaktor interessant.

Moore et al. [91] untersuchten die Wirkung drei verschiedener Extrakte und verschiedener Inhaltsstoffe auf primäre humane Hepatozyten. Die Behandlung mit den Extrakten und Hyperforin führte zu einer deutlichen Induktion der CYP 3A4-Expression, während Hypericin und die untersuchten Flavonoide keine Wirkung zeigten. Hyperforin ist ein wirksamer Ligand für den Pregnan-X-Rezeptor (PXR), der die Transkription von CYP 3A4 reguliert [224-226]. PXR wird von einer Reihe von Xenobiotika, die für die Induktion der CYP 3A4-Expression bekannt sind, aktiviert [227, 228]. Während bei Hypericin und den Flavonoiden kaum PXR-

Aktivität gefunden wurde, stellte sich Hyperforin als wirksamer Aktivator heraus. Dieses Ergebnis erklärt die in dieser Arbeit gefundenen Wirkungen der einzelnen Inhaltsstoffe.

Resultat

Das Modell-Screening im Bioreaktor zeigt eine gute *in vitro/in vivo* Korrelation, jedoch kann, da *in vivo*-Daten nur vom Menschen und von der Ratte vorliegen, kein direkter Vergleich mit den Reaktionen der porcinen Zellen gezogen werden. Differenzen in der CYP 1A2-Induktion wurden beobachtet, die möglicherweise auf Interspeziesdifferenzen hinweisen.

Wie die Screening-Ergebnisse zeigen, ist der entwickelte Mini-Bioreaktor für diese Anwendung gut geeignet, da das System in der Lage ist, Interaktionsdifferenzen zwischen den unterschiedlichen Präparationen derselben Substanz (Johanniskraut) aufzuzeigen. Damit ist der Bioreaktor für ein paralleles Screening verschiedener Substanzen mit unterschiedlichem Induktionspotential geeignet. Das Screening neu entwickelter Pharmaka an verschiedenen humanen Zelltypen kann somit schneller und genauer (Ausschalten der Interspezies-Differenzen) Nebenwirkungen wie Enzym-Induktion und -Inhibierung sowie Cytotoxizitäten für verschiedene Organe aufdecken als dies im Tierversuch möglich ist. Mit Hilfe einer Analyse der beeinflussten Enzyme auf RNA-Ebene lässt sich eindeutig bestimmen, welche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten zu erwarten sind. Durch den hohen organotypischen Zustand der Hepatozyten reicht auch eine geringe Zellzahl aus, um das Interaktionspotential einer Substanz abschätzen zu können. Dies ist besonders bei der geringen Verfügbarkeit humaner Hepatozyten von Vorteil.

5.4 Screening von Antioxidantien bei oxidativem Stress

Durch die Kultivierung direkt auf der gaspermeablen Membran können die Zellen definierten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt werden, da nur die Membran als Diffusionsbarriere besteht. Somit bietet sich der Bioreaktor für die Untersuchung der Auswirkungen von oxidativem Stress sowie ein Screening von Antioxidantien an. Hepatozyten von drei verschiedenen Isolationen wurden über 15 Kulturtage bei 20 %, 30 % und 40 % O₂ mit und ohne Zugabe des Antioxidantiums Ascorbinsäure (Vitamin C, 100 µM) inkubiert.

5.4.1 Ergebnisse

5.4.1.1 Morphologie und Primärstoffwechsel

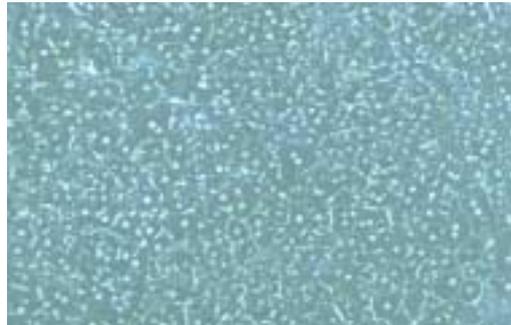
Um den Zustand der Zellen unter oxidativem Stress zu beurteilen, wurden morphologische Veränderungen sowie die charakteristischen Funktionen des Primärstoffwechsels ausgewertet.

Morphologie

Schon nach etwa drei Tagen bei den entsprechenden Kulturbedingungen stellten sich die charakteristischen in Tabelle 5-3 gezeigten Morphologien ein (200-fache Vergrößerung).

Die Zellen bei 20 % O₂ und 30 % O₂ zeigen eine deutliche Reorganisation als Hepatozyten-Monolayer mit klar sichtbaren Gallengangskanälchen. Dabei macht die Morphologie der Kulturen bei 30 % O₂ einen besseren Eindruck, als die bei 20 % O₂. Auch die Zugabe von Vitamin C verbessert das morphologische Bild. Dabei scheint die Ascorbinsäure die Kernteilung zu fördern, es sind viele Hepatozyten mit zwei oder mehr Zellkernen zu erkennen. Das Erscheinungsbild der Zellen bei 40 % O₂ unterscheidet sich davon stark. Es ist nur eine schlechte Reorganisation zu beobachten, die Zellen sehen gestresst aus, es können keine klaren Strukturen erkannt werden. Auch hier bewirkt die Zugabe von Vitamin C eine leichte Verbesserung der Morphologie, Zellen mit zwei bis drei Zellkernen sind zu sehen, sie machen jedoch einen geschädigten Gesamteindruck.

Tabelle 5-3: Morphologie der Hepatozyten bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen mit und ohne Zugabe von Vitamin C

	Ohne Vitamin C	Mit Vitamin C
20 % O ₂		
30 % O ₂		
40 % O ₂		

Albumin

Die Albuminsekretion der Zellen bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ist in Abbildung 5-25 gezeigt.

Sowohl die Auswirkungen der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen wie auch die des Vitamin C sind deutlich zu erkennen. In den ersten drei Kulturtagen sinkt die Albuminsekretion bei allen Ansätzen auf unter $1 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Während die Sekretion ohne Zugabe von Vitamin C bei 20 % O_2 vom dritten (0,2 $\mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen) bis zum zehnten (2,5 $\mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen) Kulturtag steigt und dann bis zum 15. Tag wieder um etwa die Hälfte absinkt, bleibt sie bei 30 % O_2 bis zum achten Kulturtag recht stabil bei $0,5 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen und steigt dann auf $4 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Bei 40 % O_2 sinkt die Albuminsekretion stetig ab, am 15. Kulturtag sind weniger als $0,1 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen vorhanden.

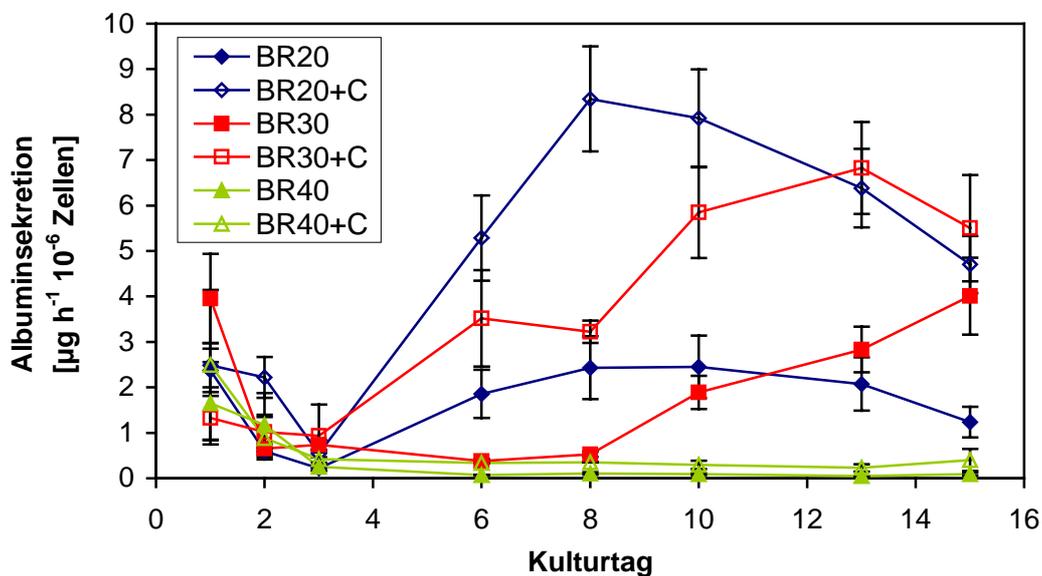


Abbildung 5-25: Albuminsekretion bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Die Zugabe von Ascorbinsäure steigert die Sekretion bei allen drei Sauerstoffkonzentrationen. Dabei spiegeln sich die Tendenzen der entsprechenden Kurven ohne Vitamin C wider. Bei 20 % O_2 steigt die Sekretionsrate bis zum 8. Kulturtag auf $8,3 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen an und fällt dann stetig wieder ab auf $4,7 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Bei 30 % O_2 steigt die Sekretion langsamer an und erreicht am 13. Kulturtag ein Maximum von $6,8 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen, die bis zum 15. Tag wieder absinkt ($5,5 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen). Bei 40 % O_2 verläuft die Albuminsekretion etwa parallel zur Kurve ohne Vitamin C, ein stabiler Wert von $0,4 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen stellt sich ein. Somit bedeutet eine Sauerstoffkonzentration von 40 % O_2 bezüglich des Parameters Albuminsekretion deutlichen oxidativen Stress, welcher bei 30 % O_2 kaum zu beobachten ist.

Harnstoff

Die Reaktion der Harnstoffsynthese auf die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ist in Abbildung 5-26 dargestellt.

Auch hier lässt sich die Wirkung der Ascorbinsäure gut erkennen. Die höchsten Syntheseraten werden bei den Ansätzen 30 % O₂ und 20 % O₂ jeweils unter Zugabe von Vitamin C ab dem 6. Kulturtag mit Maxima von 465 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen bzw. 333 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen erreicht. Ohne Zugabe von Vitamin C liegt die Syntheseleistung der Zellen bei 30 % O₂ während der ersten Woche noch deutlich über der bei 20 % O₂. In der zweiten Woche nähern sie sich einander an, die Syntheserate liegt bei etwa 150 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen. Bei 30 % O₂ sind somit höhere bzw. ähnliche Harnstoffsyntheseraten zu beobachten wie bei 20 % O₂.

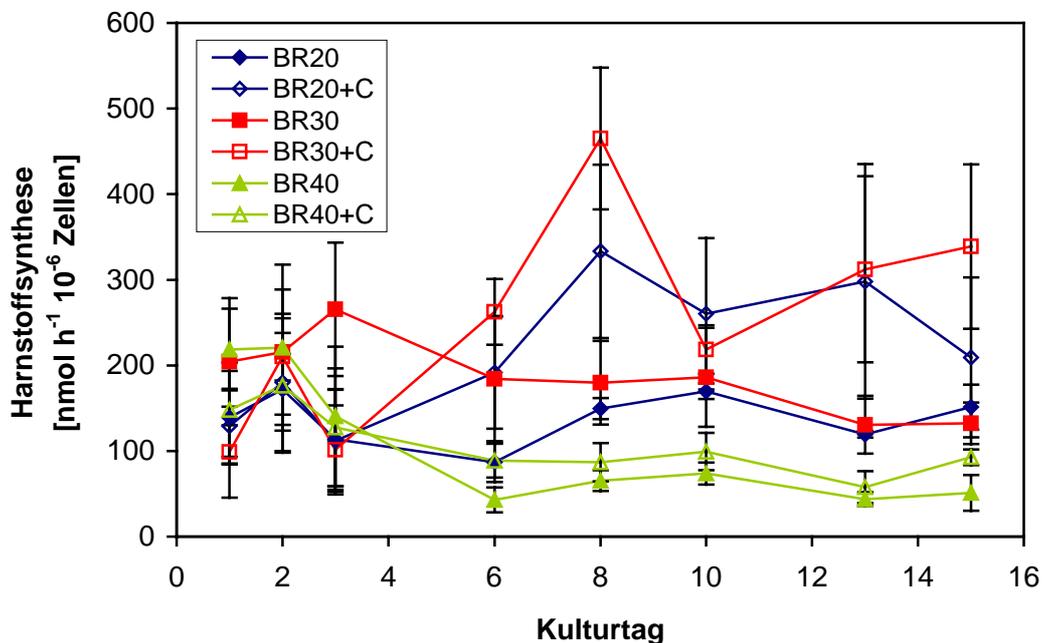


Abbildung 5-26: Harnstoffsynthese bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Auch bei diesem Parameter kann der durch 40 % O₂ hervorgerufene oxidative Stress deutlich beobachtet werden. Es stellen sich ab dem 6. Tag nahezu stabile Syntheseleistungen von 55 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen ohne und 85 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen mit Zugabe des Antioxidantiums ein.

Glukose

Abbildung 5-27 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen auf den Glukoseverbrauch.

Beim Glukoseverbrauch ist keine spezifische Wirkung durch Ascorbinsäure zu erkennen, die beiden Kurven pro Sauerstoffkonzentration zeigen ähnliche Verläufe. Bei allen Sauerstoffkonzentrationen nimmt der Glukoseverbrauch während der ersten Kulturwoche stark ab, in der zweiten Woche ist Glukoseproduktion zu beobachten. Diese ist mit etwa

140 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen bei 30 % O_2 am höchsten, bei 40 % O_2 beträgt sie im Mittel 40 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen, bei 20 % O_2 ca. 25 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Die Wirkendenzen von 20 % O_2 und 40 % O_2 verhalten sich ähnlich, 30 % O_2 wirkt deutlich stärker auf die Zellen.

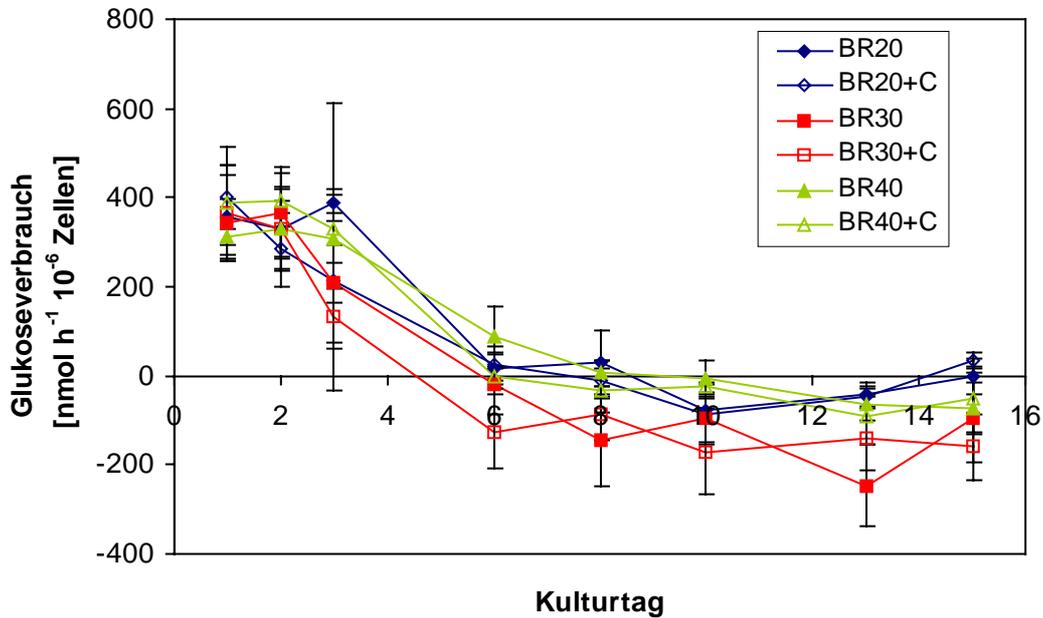


Abbildung 5-27: Glukoseverbrauch bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Laktat

Die Wirkung der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen auf die Laktatbildung ist in Abbildung 5-28 dargestellt.

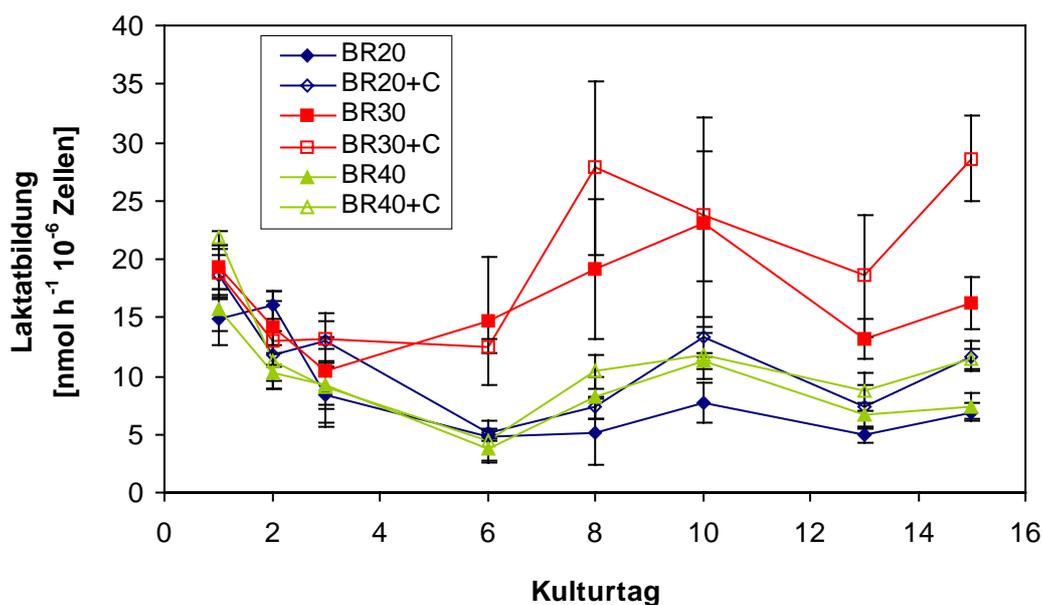


Abbildung 5-28: Laktatbildung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Auch hier ähneln sich die für 20 % O₂ und 40 % O₂ erhaltenen Werte, während die Laktatbildung bei 30 % O₂ deutlich höher ist. Die Wirkung von Vitamin C ist erst ab der zweiten Kulturwoche zu beobachten und nicht sehr deutlich ausgeprägt. Die Laktatbildung bei 20 % O₂ und 40 % O₂ schwankt zwischen 5 und 15 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen, am 15. Kulturtag betragen die Werte etwa 6 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen jeweils ohne und 9 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen jeweils mit Antioxidantium. Dagegen erreichen die Zellen bei 30 % O₂ ohne Vitamin C eine maximale Laktatbildung von 23 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen am 10. Kulturtag, mit Vitamin C von 28 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ Zellen am 8. und 15. Tag.

LDH

Die LDH-Aktivität, dargestellt in Abbildung 5-29, gibt Hinweise auf die Membranintegrität der Hepatozyten bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.

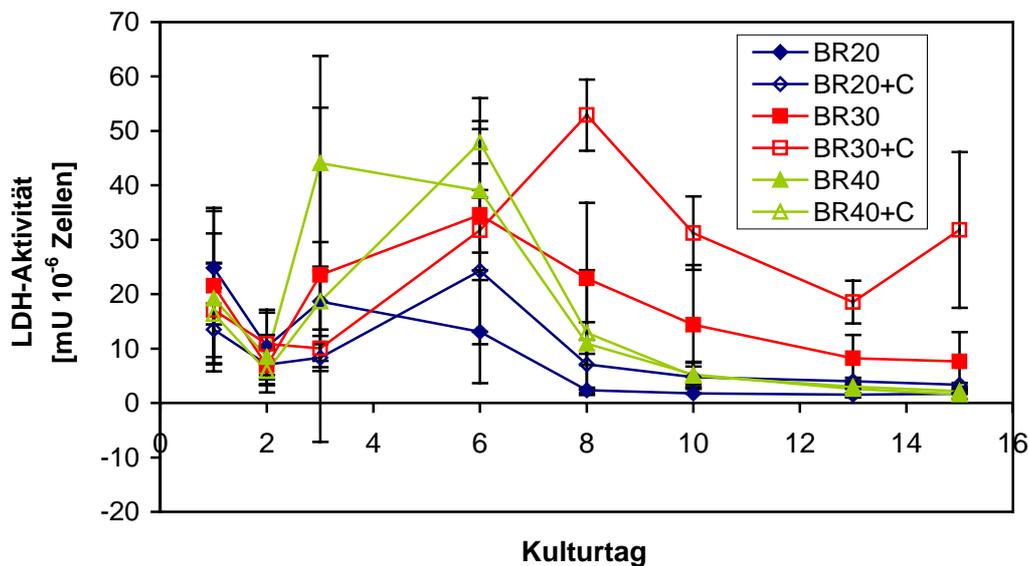


Abbildung 5-29: LDH-Aktivität bei verschiedenen Sauerstoffkonzentration

Die geringsten LDH-Aktivitäten zeigen die Zellen bei einer Sauerstoffkonzentration von 20 % O₂ ohne Vitamin C. Sie sinkt von ca. 18 mU 10⁻⁶ Zellen am 3. Kulturtag auf etwa 2 mU 10⁻⁶ Zellen am 8. Tag und bleibt dann stabil. Mit Vitamin C wird am 6. Tag ein Maximum von ca. 24 mU 10⁻⁶ Zellen erreicht, die Aktivität sinkt auf 7 mU 10⁻⁶ Zellen am 8. Tag und auf etwa 3,3 mU 10⁻⁶ Zellen am 15. Kulturtag. Die Hepatozyten bei 40 % O₂ zeigen ihre maximalen LDH-Aktivitäten ebenfalls an 3. (ohne Ascorbinsäure) und 6. Tag (mit Ascorbinsäure), sie betragen etwa 44 bzw. 48 mU 10⁻⁶ Zellen. Am 8. Kulturtag sind beide bereits auf ca. 11 mU 10⁻⁶ Zellen abgesunken, am 15. Tag ist nur noch eine LDH-Aktivität von 2 mU 10⁻⁶ Zellen zu finden. Die größte LDH-Aktivität bei einer Kultivierung bei 30 % O₂ beträgt ohne Vitamin C 35 mU 10⁻⁶ Zellen am 6. Tag, mit Vitamin C 53 mU 10⁻⁶ Zellen am 8.

Tag. Zwar sinken beide Aktivitäten während der zweiten Kulturwoche ab, aber vor allem die Aktivität bei Zugabe von Vitamin C bleibt deutlich höher als die Aktivitäten der anderen Sauerstoffkonzentrationen.

5.4.1.2 Biotransformation

Der Einfluss der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen und die Wirkung des Antioxidantiums Vitamin C auf die leberspezifischen Biotransformationsleistungen sowie die Interaktionsfähigkeit sind im Folgenden beschrieben.

EROD

Die Hepatozyten wurden bei den drei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen jeweils mit und ohne Zugabe von Vitamin C kultiviert und am 3. und 10. Kulturtag mit 3-MC induziert.

Abbildung 5-30 zeigt die Wirkung von Vitamin C auf die EROD-Aktivität bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Während der ersten Woche liegen die Aktivitäten bei der Zugabe von Vitamin C leicht über denen ohne Vitamin C, in der zweiten Woche ist der Unterschied weniger deutlich. Die höchsten Aktivitäten sind bei 30 % O₂ und 20 % O₂ jeweils mit Vitamin C zu beobachten.

In Abbildung 5-31 ist die Induktion von EROD ohne Zugabe von Vitamin C dargestellt. Bei allen drei Sauerstoffkonzentrationen zeigen die nicht induzierten Zellen eine ähnliche Aktivität von etwa 30 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Die Reaktoren reagieren bei allen O₂-Konzentrationen auf die Induktion. Während sie bei 20 % O₂ und 40 % O₂ eine 1,5-fache Induktion auf ca. 45 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen zeigen, steigt die Aktivität bei 30 % O₂ auf 90 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Hier ist die Induktion doppelt so stark wie bei den beiden anderen Sauerstoffkonzentrationen.

Die EROD-Induktion bei der Zugabe von Vitamin C zeigt Abbildung 5-32. Die nicht induzierten Zellen besitzen bei 20 % O₂ und 40 % O₂ eine Aktivität von ca. 30 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen, bei 30 % O₂ eine kaum höhere Aktivität von 40 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Es sind jedoch große Unterschiede zwischen den Induktionsraten bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen zu beobachten. Die geringste Wirkung zeigt die Induktion bei 40 % O₂, die Aktivität verdoppelt sich ungefähr auf einen Wert von ca. 65 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Bei 20 % O₂ ruft die erste Induktion eine etwa 4-fache Aktivitätssteigerung auf ca. 125 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen hervor, nach der zweiten Induktion steigt die Aktivität auf 165 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen und ist damit etwa 5,5-mal höher als die der nicht induzierten Zellen. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 30 % O₂ ist eine maximale EROD-Aktivität von 215 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen zu finden, auch hier sind die Zellen etwa 5,5-fach induziert.

Die Zugabe von Vitamin C steigert folglich die EROD-Aktivitäten. Die Zellen reagieren bei 20 % O₂ und 30 % O₂ deutlich stärker auf eine Induktion als ohne Vitamin C. Dabei sind die höchsten Aktivitäten jeweils bei 30 % O₂ zu finden. Diese Sauerstoffkonzentration scheint,

anders als die von 40 % O₂, keinen oxidativen Stress hervorzurufen, sondern eher einen aktivierenden Effekt zu besitzen.

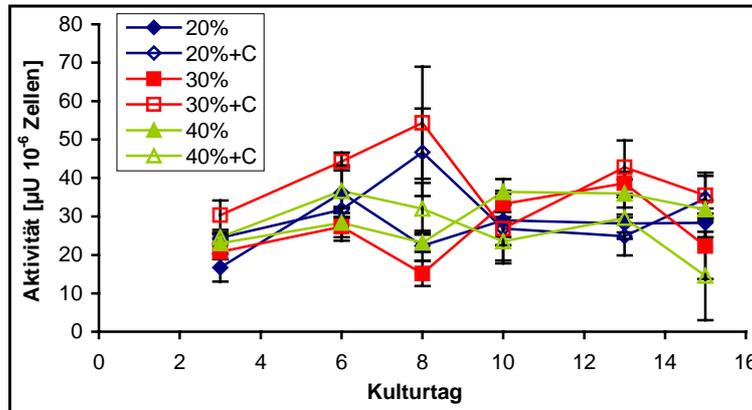


Abbildung 5-30: Wirkung von Vitamin C auf EROD bei oxidativem Stress

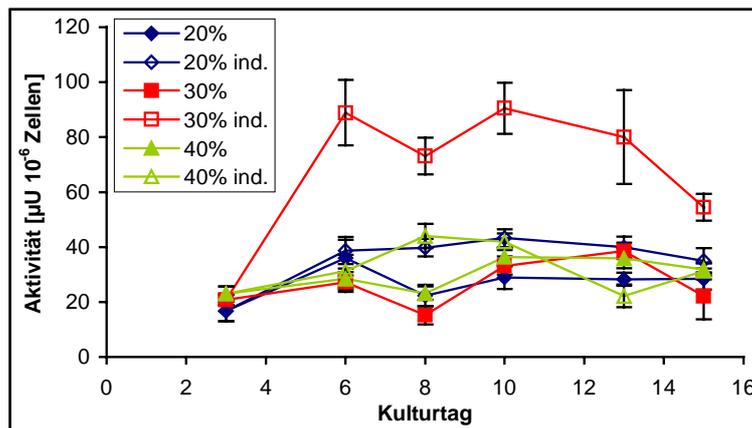


Abbildung 5-31: Induktion von EROD bei oxidativem Stress

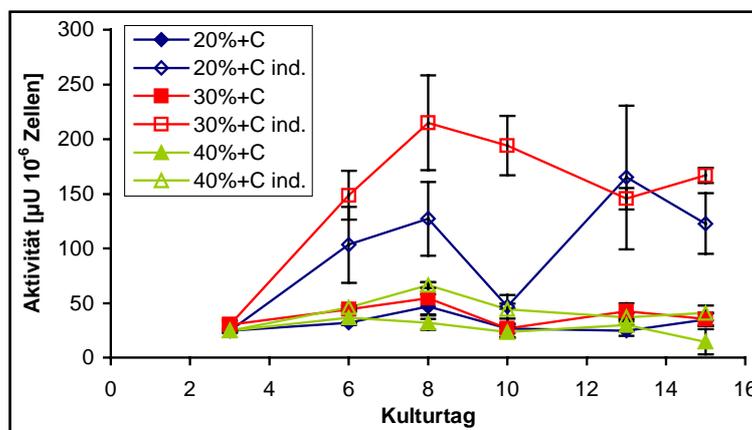


Abbildung 5-32: Induktion von EROD bei oxidativem Stress unter Zugabe von Vitamin C

ECOD

Zur Bestimmung der Interaktionsfähigkeit der Hepatozyten bezüglich ECOD wurden die Zellen am 3. und 10. Kulturtag mit PB induziert.

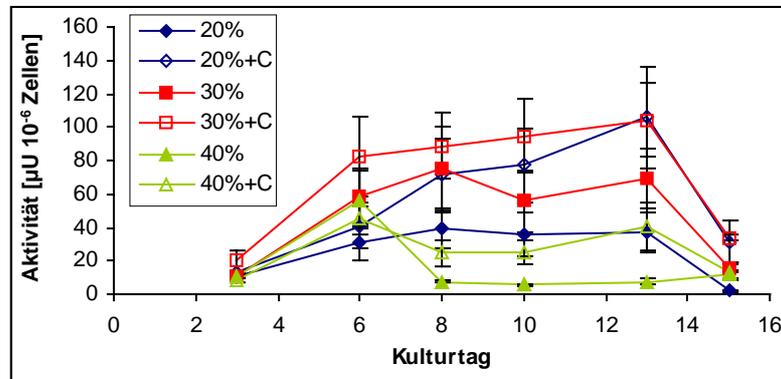


Abbildung 5-33: Wirkung von Vitamin C auf ECOD bei oxidativem Stress

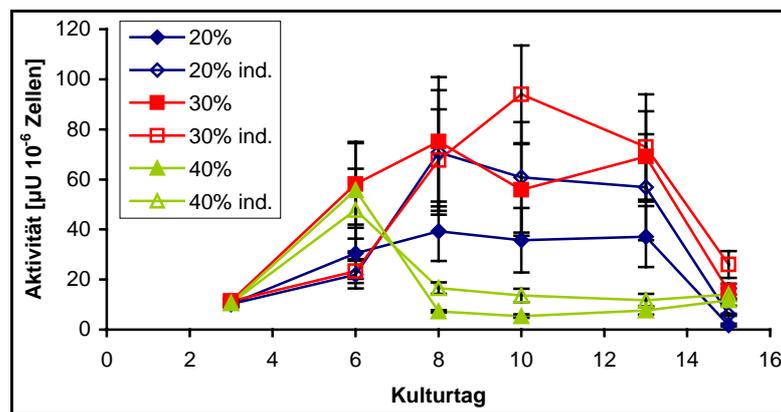


Abbildung 5-34: Induktion von ECOD bei oxidativem Stress

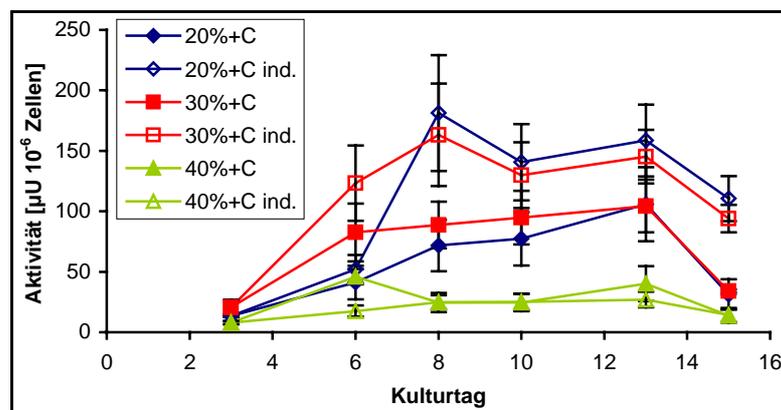


Abbildung 5-35: Induktion von ECOD bei oxidativem Stress unter Zugabe von Vitamin C

Die Wirkung von Vitamin C auf ECOD bei oxidativem Stress ist in Abbildung 5-33 gezeigt. Die Aktivitäten unterscheiden sich stark bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.

Ohne die Zugabe von Vitamin C ist bei 40 % O₂ eine Aktivität von 7 µU 10⁻⁶ Zellen zu finden, bei 20 % O₂ eine von 40 µU 10⁻⁶ Zellen, und bei 30 % O₂ eine von 75 µU 10⁻⁶ Zellen. Diese Aktivitäten steigen durch die Zugabe von Vitamin C auf 25 µU 10⁻⁶ Zellen (40 % O₂), 70 µU 10⁻⁶ Zellen (20 % O₂) und 90 µU 10⁻⁶ Zellen (30 % O₂). Vitamin C besitzt somit eine aktivierende Wirkung auf ECOD.

Abbildung 5-34 zeigt die Induktion von ECOD bei oxidativem Stress ohne die Zugabe von Vitamin C. Bei 40 % O₂ ist eine Verdopplung der Aktivität auf etwa 15 µU 10⁻⁶ Zellen zu beobachten. Auch bei 20 % O₂ ist eine ähnliche Induktionsrate zu finden, die Enzymaktivität steigt um das 1,75-fache auf ca. 70 µU 10⁻⁶ Zellen. Bei 30 % O₂ ist nur am 10. Kulturtag eine leichte etwa 1,3-fache Induktion zu beobachten, die Aktivität beträgt hier ca. 95 µU 10⁻⁶ Zellen.

Die Wirkung von Vitamin C auf die Induktion ist in Abbildung 5-35 dargestellt. Hier sind deutlich stärkere Induktionen zu beobachten. Bei 20 % O₂ und 30 % O₂ werden Aktivitäten von ca. 180 µU 10⁻⁶ Zellen und 165 µU 10⁻⁶ Zellen erreicht. Damit steigen die Aktivitäten um das 2,6- bzw. 1,8-fache. Bei 40 % O₂ reagieren die Hepatozyten nicht auf den Induktor.

Die für EROD erhaltenen Ergebnisse können somit auch für ECOD beobachtet werden. Die Zugabe von Vitamin C wirkt sowohl aktivitäts- als auch induktionssteigernd. Dabei sind die höchsten Aktivitäten jeweils bei 30 % O₂ zu finden. Diese Sauerstoffkonzentration scheint auch auf ECOD einen aktivierenden Effekt zu besitzen, während bei 40 % O₂ deutlich oxidativer Stress zu beobachten ist.

UGT

Die Wirkungen von oxidativem Stress und Vitamin C wurden auch auf die Phase II untersucht. UGT und ST wurden dabei mit Rifampicin induziert.

Abbildung 5-36 zeigt die Wirkung von Vitamin C auf UGT bei oxidativem Stress. Die Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen unterscheiden sich ohne die Zugabe von Vitamin C deutlich. Die höchste Aktivität ist mit ca. 800 µU 10⁻⁶ Zellen bei 20 % O₂ zu beobachten. Bei 30 % O₂ beträgt sie etwa 550 µU 10⁻⁶ Zellen, bei 40 % O₂ nur 200 µU 10⁻⁶ Zellen. Die Zugabe von Vitamin C steigert vor allem bei 30 % O₂ und 40 % O₂ die Aktivität, beide verdoppeln sich in etwa. Bei 20 % O₂ zeigt Vitamin C kaum Wirkung, die Aktivität liegt mit etwa 870 µU 10⁻⁶ Zellen im gleichen Bereich wie ohne Vitamin C.

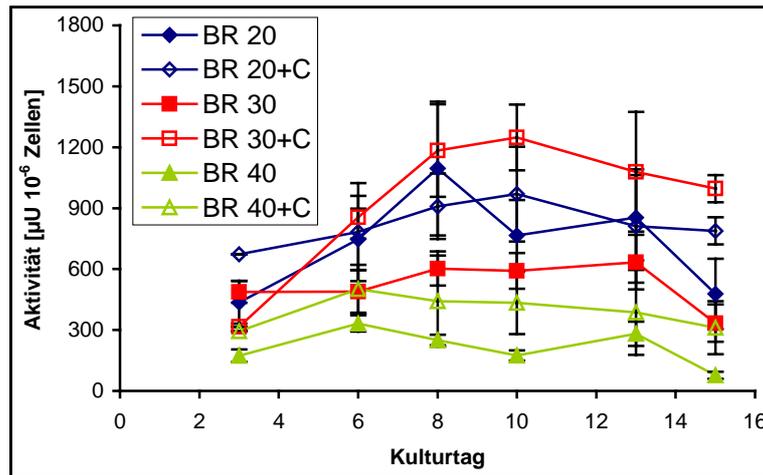


Abbildung 5-36: Wirkung von Vitamin C auf UGT bei oxidativem Stress

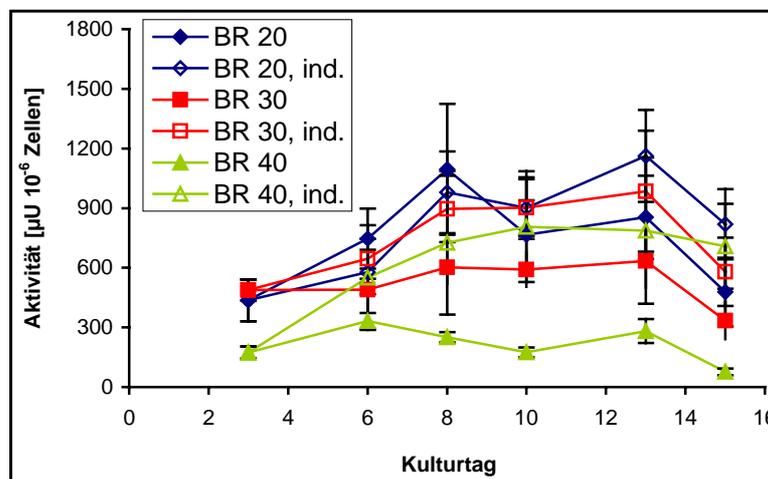


Abbildung 5-37: Induktion von UGT bei oxidativem Stress

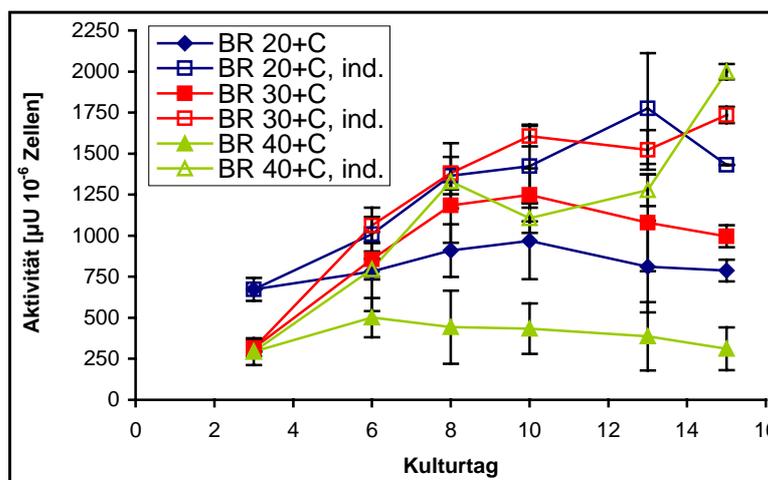


Abbildung 5-38: Induktion von UGT bei oxidativem Stress unter Zugabe von Vitamin C

Die UGT-Induktion bei oxidativem Stress ist in Abbildung 5-37 gezeigt. Je höher die Sauerstoffkonzentration ist, desto größer ist die beobachtete Aktivitätssteigerung. Bei 20 % O₂ steigt die Enzymaktivität um das 1,2-fache auf 960 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Bei 30 % O₂ ruft die Induktion eine etwa 1,5-fache Aktivitätssteigerung auf ca. 850 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen hervor, bei 40 % O₂ steigt die Aktivität auf 750 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen und ist damit 3,8-mal höher als die der nicht induzierten Zellen.

Die Wirkung von Vitamin C auf die Induktion ist in Abbildung 5-38 dargestellt. Die bei 30 % O₂ kultivierten Zellen zeigen mit 1130 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen die höchste Grundaktivität. Bei 20 % O₂ beträgt die Grundaktivität ca. 870 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen, bei 40 % O₂ nur 400 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Auch mit Vitamin C ist die stärkste Induktion bei 40 % O₂ zu beobachten, sie bewirkt eine etwa 3-fache Aktivitätssteigerung auf 1240 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Die induzierten Aktivitäten bei 20 % O₂ und 30 % O₂ sind mit 1500 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen und 1560 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen etwa gleich und damit ca. 1,7- bzw. 1,4-fach höher als die Grundaktivitäten.

Auch auf das Phase II-Enzym UGT wirkt Vitamin C aktivitäts- und induktionssteigernd. Dabei zeigen die Zellen bei 20 % O₂ und 30 % O₂ jeweils ähnliche Aktivitäten. Während die Aktivitäten bei 40 % O₂ deutlich niedriger sind, zeigen sie jedoch die höchsten Induktionsraten. Der oxidative Stress bewirkt also eine Verminderung der Aktivität und eine Steigerung der Interaktionsfähigkeit.

ST

Als zweites Phase II-Enzym wurde ST bei oxidativem Stress mit und ohne Vitamin C untersucht.

Die Wirkungen von Vitamin C und oxidativem Stress auf ST sind in Abbildung 5-39 bis Abbildung 5-41 dargestellt. Zwischen den einzelnen O₂-Bedingungen lassen sich wegen der hohen Schwankungen keine Unterschiede erkennen. Jedoch lässt sich eine leichte Aktivitätssteigerung durch Vitamin C beobachten. Während die Grundaktivitäten und die induzierten Aktivitäten ohne Vitamin C (Abbildung 5-40) zwischen 250 und 800 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen schwanken, liegt dieser Bereich unter Zugabe von Vitamin C (Abbildung 5-41) zwischen 300 und 1300 $\mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen.

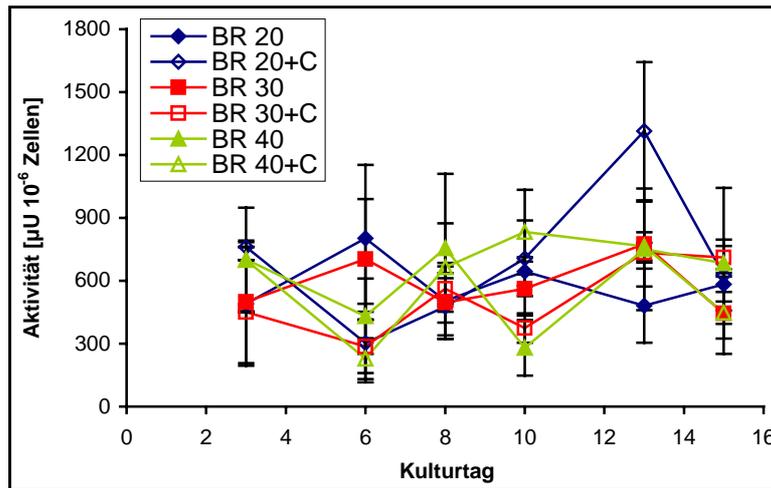


Abbildung 5-39: Wirkung von Vitamin C auf ST bei oxidativem Stress

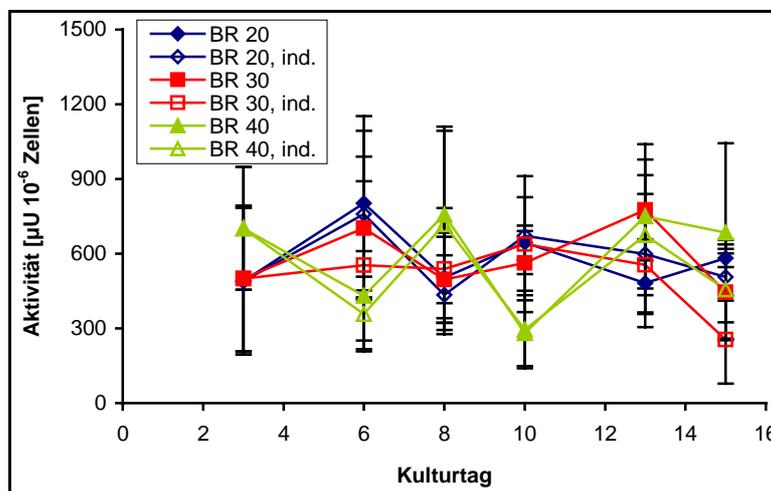


Abbildung 5-40: Induktion von ST bei oxidativem Stress

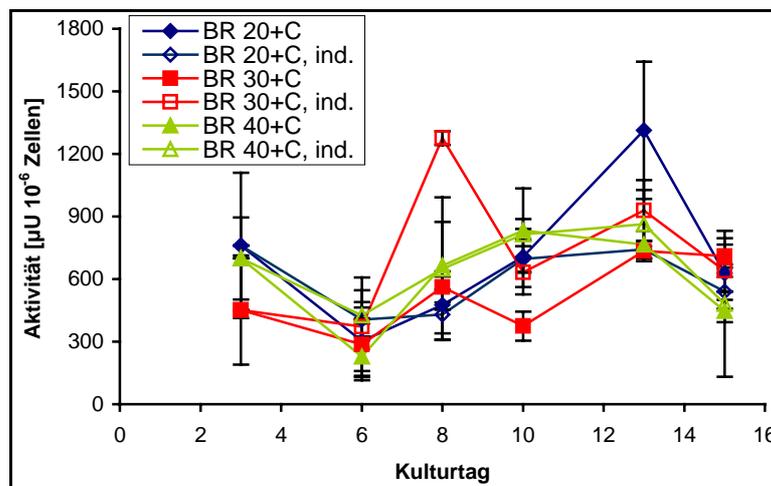


Abbildung 5-41: Induktion von ST bei oxidativem Stress unter Zugabe von Vitamin C

5.4.2 Diskussion

Auch *in vivo* sind die Hepatozyten in der Leber unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt: Die Zellen in der Portalzone (periportal) werden von doppelt so hohen Sauerstoffkonzentrationen erreicht wie die in der Zentralzone (perivenös). Diesem Zonierungsmodell zufolge werden den Hepatozyten bei den verschiedenen Sauerstoffbedingungen unterschiedliche Funktionen zugesprochen. Periportale Zellen führen vorwiegend die Harnstoffsynthese, die Glukoneogenese und die Glukosefreisetzung, die Gallenbildung sowie den enzymatischen Zellschutz durch. Demgegenüber bestehen die Aufgaben der perivenösen Zellen eher in der Glukoseaufnahme und der Glykolyse, der Laktatbildung, der Albuminsekretion und der Biotransformation [229]. Hepatozyten aus den verschiedenen Bereichen können jedoch ihre Funktion bedingt durch Signaleingang und -transmission den jeweiligen Sauerstoffbedingungen anpassen [229]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gemisch aus beiden Bereichen verwendet.

Morphologie

Um die Wirkung von oxidativem Stress und Vitamin C auf die primären porcinen Hepatozyten im Mini-Bioreaktor zu untersuchen, wurden sie bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen 20, 30 und 40 % O₂ kultiviert. Bei 20 % O₂ und besonders bei 30 % O₂ zeigten sie eine deutliche Reorganisation der Monolayer mit klar sichtbaren Gallengangskanälchen, während es bei 40 % O₂ zu einer schlechten Reorganisation kam und die Zellen einen geschädigten Eindruck machten. Bei allen Sauerstoffkonzentrationen verbesserte die Zugabe von Vitamin C das morphologische Bild.

Yanagi et al. [96] kultivierten Rattenhepatozyten bei 10, 20, 30 und 40 % O₂ als Single Gel ohne deckende Kollagenschicht. Bei 10 % O₂ kam es nur zu einer eingeschränkten Adhäsion, die Zellen lagen vereinzelt in der Kultur vor. Bei 20, 30 und 40 % O₂ hingegen wurden gute Zell-Zell-Kontakte erreicht. Nishikawa et al. [97] kultivierten ebenfalls Rattenhepatozyten im Single Gel, sie wählten Sauerstoffpartialdrücke von 5, 10, 20, 50 und 90 % O₂. Bei den drei mittleren Konzentrationen fanden sie konfluente Monolayer, Anzeichen von Zellablösungen oder Deformationen wurden nicht festgestellt. Bei 5 % O₂ löste sich jedoch eine große Zahl der Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden ab, und auch die verbliebenen Zellen zeigten nicht ihre normale Struktur von Membranen, Zytoplasma und Kern. Bei 90 % O₂ war die Morphologie der Zellen während der ersten 24 Stunden sehr gut, dann traten vakuoläre und granuläre Degenerationen im Zytoplasma auf, die täglich zunahmen.

Damit scheinen porcine Hepatozyten empfindlicher auf oxidativen Stress zu reagieren als Rattenhepatozyten.

Albumin

Für die Rattenhepatozyten fanden Yanagi et al. [96] für zunehmende Sauerstoffkonzentrationen erhebliche Zunahmen bei der Albuminsekretionsrate. Dies steht in klarem Widerspruch zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen für porcine Hepatozyten, deren Albuminproduktion mit steigender Sauerstoffkonzentration abnahm. Die Albuminsynthese konnte durch die Zugabe von Vitamin C bei allen Bedingungen deutlich gesteigert werden und spricht somit für die hemmende Wirkung von Sauerstoff auf die Albuminsekretion.

Da die Sauerstoffkonzentration in periportalem Blut etwa doppelt so hoch ist wie in perivenösem Blut [229], bestehen auch in der Leber große Unterschiede zwischen den Sauerstoffversorgungen perivenöser und periportal Hepatozyten. Daher können das Zonierungsmodell und die jeweiligen Charakteristika der Zellen jedes Bereichs als Vergleich genutzt werden. Zwar besitzen alle Hepatozyten die Fähigkeit zur Albuminsynthese, doch zeigen perivenöse, sauerstoffärmere Zellen eine höhere Aktivität [230]. Dies stimmt gut mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen überein.

Harnstoff

Für die Harnstoffsynthese von Rattenhepatozyten fanden Nishikawa et al. [97] bei den Sauerstoffpartialdrücken 10, 20 und 50 % O₂ etwa gleiche Syntheseraten, bei 5 und 90 % O₂ waren diese jedoch deutlich geringer, was für geschädigte Zellen spricht. Yanagi et al. [96] konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Kultivierungen bei 10, 20, 30 und 40 % O₂ feststellen. Auch diese Ergebnisse stimmen nicht mit den in dieser Arbeit gefundenen überein: Die höchste Harnstoffsynthese war für die bei 30 % O₂ kultivierten Hepatozyten zu messen, die deutlich niedrigste bei 40 % O₂.

Kari et al. [231] konnten die höchste Syntheseleistung in der perfundierten Rattenleber in den Regionen mit der höchsten Sauerstoffkonzentration messen. Auch Jungermann beschreibt die Harnstoffsynthese als im periportalen, sauerstoffreichen Bereich vorherrschend [229]. Folglich zeigen die bei 30 % O₂ inkubierten Hepatozyten eine stärkere Syntheseleistung als die bei 20 % O₂. Die bei 40 % O₂ kultivierten Zellen hätten eine noch höhere Synthese zeigen können, jedoch scheinen diese Zellen deutlich geschädigt zu sein (vgl. Morphologie). Auch hier verstärkt die Zugabe von Vitamin C bei allen Sauerstoffkonzentrationen die Syntheseleistung.

Glukose und Laktat

Weder auf den Glukoseverbrauch bzw. die Glukosebildung noch auf die Laktatbildung von primären porcinen Hepatozyten zeigte die Zugabe von Vitamin C eine klare Wirkung. Sowohl mit als auch ohne Ascorbinsäure kam es bei allen drei Sauerstoffpartialdrücken ab dem 6.

Kulturtag zu einer Glukosebildung. Diese war bei 20 % O₂ nur schwach ausgeprägt, bei 40 % O₂ etwas deutlicher, und bei 30 % O₂ am stärksten. Ebenso war die Laktatbildung bei 20 % O₂ am niedrigsten, etwas höher bei 40 % O₂ und am stärksten bei 30 % O₂. Damit ist das stöchiometrische Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch bei allen drei Sauerstoffkonzentrationen negativ.

Nishikawa et al. [97] fanden bei Rattenhepatozyten für die Sauerstoffkonzentrationen 10, 20 und 50 % O₂ etwa gleich starke Glukoseproduktionsraten, bei 5 und 90 % O₂ betrug sie jedoch nur die Hälfte. Auch Rocker [195] fand für primäre porcine Hepatozyten bei zunehmendem Sauerstoffpartialdruck im Medium, bedingt durch eine Reduktion der Mediumschicht, eine Erhöhung der Glukoneogeneserate. Allerdings wurde auch eine Abnahme der Laktatbildung gemessen. Da es sich bei der Glukoneogenese um einen endergonen Prozess handelt, der an den oxidativen Katabolismus gebunden ist, ist die Glukosefreisetzung in periportalen Zellen vorherrschend, während der Glukoseverbrauch durch die Glykolyse, ein exergoner Prozess, von Sauerstoff unabhängig ist und hauptsächlich von perivenösen Zellen durchgeführt wird [232]. Dadurch ist die Laktatbildung in perivenösen Zellen vorherrschend. Die Glukosewerte dieser Arbeit stimmen also gut mit den Ergebnissen aus der Literatur überein, wenn davon ausgegangen wird, dass die porcinen Zellen bei 40 % O₂ bereits deutlich geschädigt sind. Bei der Laktatbildung wäre jedoch für die Hepatozyten bei 20 % O₂ (sauerstoffärmer, eher perivenös) eine höhere Aktivität zu erwarten gewesen als bei 30 % O₂ (sauerstoffreicher, eher periportal).

LDH

Eine niedrige LDH-Aktivität in den Mediumproben lässt auf eine gute Membranintegrität schließen. Während der gesamten Kultivierung der porcinen Hepatozyten wurde die niedrigste LDH-Aktivität bei 20 % O₂ gefunden. Die höchste Aktivität zeigten in der ersten Kulturwoche die Zellen bei 40 % O₂, in der zweiten Woche die Zellen bei 30 % O₂. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Aussagen des Zonierungsmodells, in dem periportalen Hepatozyten eine höhere LDH-Aktivität zugeschrieben wird als perivenösen Hepatozyten. Die Zugabe von Vitamin C führte bei allen drei Sauerstoffkonzentrationen zu einer Aktivitätssteigerung. Auch Oda et al. [104] beschreiben für die Kultivierung von Epithelzellen, dass Vitamin C nicht nur eine Schutzwirkung besitzt, sondern auch eine leichte Zellschädigung verursachen kann. Nishikawa et al. [97] fanden für die Rattenhepatozyten ebenfalls die geringste LDH-Aktivität bei einer Sauerstoffkonzentration von 20 % O₂. Inkubationen bei 10 und 50 % O₂ zeigten deutlich höhere Aktivitäten, die jedoch geringer waren als die Aktivität von Zellen bei 90 % O₂. Die höchste Aktivität wurde bei Inkubationen mit 5 % O₂ gemessen. Bei 90 und 5 % O₂ waren die Zellen stark geschädigt. Im Gegensatz

dazu war die LDH-Aktivität von Rattenhepatozyten in den Untersuchungen von Hartung et al. [233] bei 40 % O₂ um etwa ein Drittel geringer als bei 20 % O₂.

Phase I

Während der katalytischen Aktivität verschiedener CYPs kommt es zur Entstehung freier Radikale [234], welche die größte Quelle intrazellulärer ROS (reactive oxygen species) in der Leber darstellen [235]. Eine stark induzierte CYP-Aktivität kann somit zu Zellschädigungen durch ROS führen [236]. Daher wird bei oxidativem Stress die CYP-Induktion vermindert, um die CYP-bedingte Produktion von ROS und damit die Zellschädigung zu verringern [236]. ROS wirken redox-abhängig negativ-regulierend auf die CYP 2B-Induktion (ECOD) durch PB [236]. Auch für die Regulierung der basalen und induzierten CYP1A1/1A2-Aktivität (EROD) sind ROS bekannt [237]. Eine Zunahme der antioxidativen Leistungsfähigkeit der Hepatozyten wirkt der ROS-abhängigen Inhibition der Induktion jedoch entgegen [236].

Diese Zusammenhänge lassen erwarten, dass die CYP-Aktivitäten der porcinen Hepatozyten sowie ihre Induktionen mit steigender Sauerstoffkonzentration abnehmen, aber durch die Zugabe von Vitamin C gefördert werden. Auch das Zonierungsmodell zeigt, dass höhere CYP-Aktivitäten, obwohl sauerstoffabhängig, bei perivenösen Zellen zu finden sind [232].

Die EROD-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Grundaktivitäten ohne Ascorbinsäure unabhängig von der Sauerstoffkonzentration etwa gleich sind. Wird Vitamin C zugegeben, ist die höchste Aktivität bei 30 % O₂ zu finden, die niedrigste bei 40 % O₂. Somit steigt die Aktivität zwar durch die Zugabe des Antioxidantiums, eine ROS-abhängige Regulierung ist jedoch nicht zu beobachten. Diese Unterschiede könnten durch Interspeziesdifferenzen hervorgerufen sein.

Auch die Induktionen führen jeweils zur höchsten Aktivität bei 30 % O₂, zur geringsten bei 40 % O₂, wobei die Induktionsraten unter Zugabe von Vitamin C höher sind als die ohne. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten des Systems. Bei ECOD sind sowohl mit als auch ohne Vitamin C die höchsten Aktivitäten bei 30 % O₂, die geringsten bei 40 % O₂ zu finden, wobei auch hier die Ascorbinsäure die Enzymaktivität fördert. Ebenso sind die Induktionsraten bei der Anwesenheit des Antioxidantiums stärker ausgeprägt. Es wird die erwartete Regulierung durch Vitamin C zu beobachtet, nicht aber die ROS-abhängige. Jauregui et al. [238] konnten diese Regulierung durch die ROS bei Rattenhepatozyten in Hohlfaserbioreaktoren nicht beobachten, der Diazepam-Metabolismus war bei einer sauerstoffreichen Atmosphäre von 43 % O₂ höher als bei 20 % O₂.

Phase II

Bisher wurden Phase II-Reaktionen unter oxidativem Stress kaum untersucht. UGT-Reaktionen sind eher im perivenösen, sauerstoffarmen Bereich zu finden, ST-Reaktionen eher im periportal, sauerstoffreichen [239]. Damit ist zu erwarten, dass UGT empfindlicher auf die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration reagiert als ST. Die stimmt gut mit den gefundenen Ergebnissen überein: Die UGT-Aktivität ohne Vitamin C nimmt mit steigender Sauerstoffkonzentration ab, mit Vitamin C sind jedoch die höchsten Aktivitäten bei 30 % O₂ zu finden. Auch die Induktionsraten konnten dementsprechend gemessen werden, wobei die Zugabe der Ascorbinsäure die Induktionen verstärkt.

Ein Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf ST ist nicht zu beobachten, die Enzymaktivität ist bei allen Sauerstoffkonzentrationen etwa gleich, steigt allerdings bei der Zugabe von Vitamin C. Dies kann jedoch auch für eine ST-aktivierende Wirkung der Ascorbinsäure sprechen, da das Enzym keine Sauerstoffempfindlichkeit zeigt.

Resultat

Wie die verschiedenen untersuchten Parameter gezeigt haben, sind die höchsten Aktivitäten der im periportalen Bereich vorherrschenden Funktionen des Primärmetabolismus und der Biotransformation bei einer Sauerstoffkonzentration von 30 % O₂ zu finden, die des perivenösen Bereichs bei 20 % O₂. Dagegen führt ein Sauerstoffpartialdruck von 40 % O₂ zu einer deutlichen Schädigung der Hepatozyten, sie reagieren sensitiv auf Veränderungen der Sauerstoffkonzentrationen. Folglich stellt der Bioreaktor nicht nur ein gutes Modell für die oxidative Zellschädigung, sondern auch für die Zonierung des Parenchyms dar.

Der Zusatz von Vitamin C zum Kulturmedium zeigt die erwartete Schutzwirkung, so dass der Bioreaktor auch für ein Screening von Antioxidantien geeignet ist.

Eine erhöhte Menge an ROS führt aber nicht nur zu Zellschädigungen, sie aktiviert auch ein spezifisches genetisches Programm in einer Vielzahl von Zellen [240]. Dadurch wird eine Schutzantwort der Zelle in Form von antioxidativen Enzymen und Enzymen zur Reparatur oder Entfernung oxidierten Proteine, Lipide und der DNA aktiviert [241]. Für weiterführende Arbeiten ist es daher interessant, auch die Reaktionen der Enzyme Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase, Hämoxigenase und Lipid-Peroxidase zu untersuchen.

5.5 Kryokonservierung

Um den Bioreaktor jederzeit verfügbar zu machen, wurde ein Protokoll für seine Kryokonservierung entwickelt. Die Zellen müssen ihre gewebespezifischen Leistungen auch nach dem Auftauen beibehalten, um für ein pharmakologisches Screening geeignet zu sein. Leberzellen von drei verschiedenen Isolationen wurden im Bioreaktor für jeweils einen Tag eingefroren.

5.5.1 Ergebnisse

5.5.1.1 Morphologie und Primärstoffwechsel

Nach dem Auftauen wurden die Zellen zwei Wochen kultiviert und ihre Morphologie sowie die charakteristischen Primärstoffwechselleistungen mit nicht eingefrorenen Kontrollen derselben Isolationen verglichen.

Morphologie

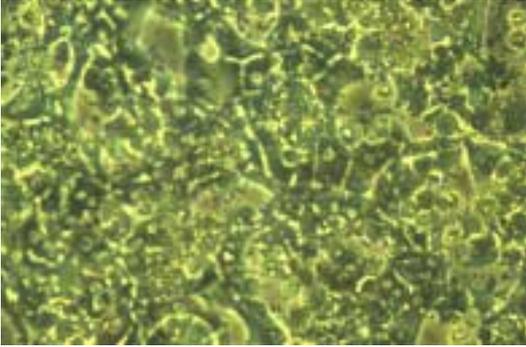
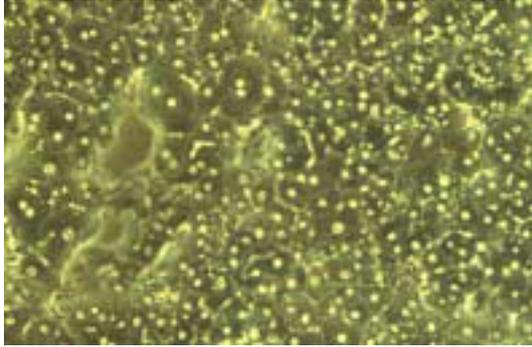
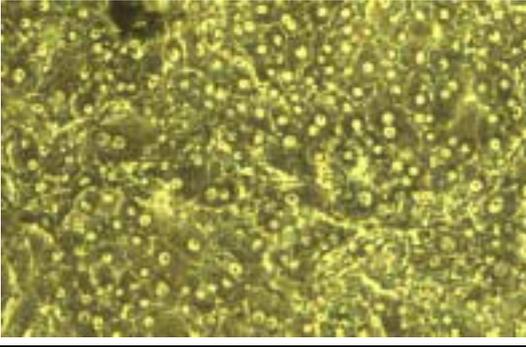
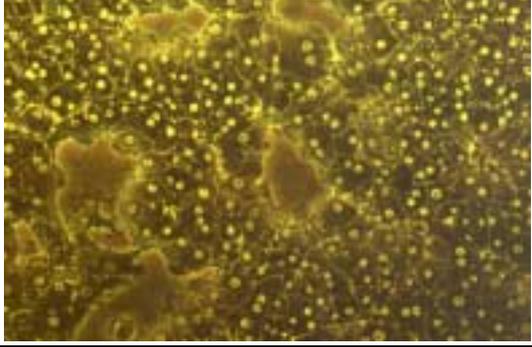
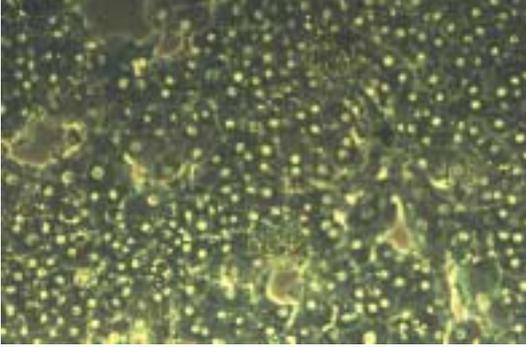
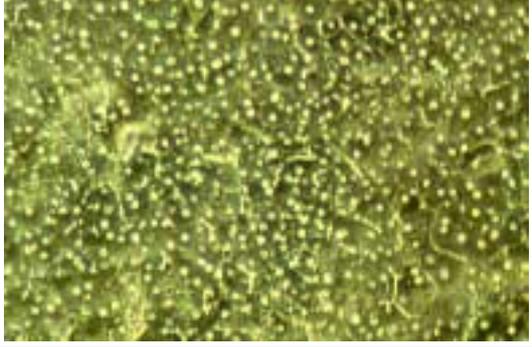
Die über Nacht kryokonservierten Zellen wurden während der gesamten Kultivierung bei einer 200-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop beobachtet. Ihre Morphologie am Tag nach dem Auftauen (Tag 2), am Tag nach Aufgabe der zweiten Kollagenschicht (Tag 3) und eine Woche nach dem Auftauen (Tag 8) ist in Tabelle 5-4 im Vergleich zu nicht eingefrorenen Kontroll-Zellen derselben Isolation dargestellt.

Während in einer zwei Tage alten Kontroll-Zellkultur die Reorganisation als Monolayer mit deutlich sichtbaren Gallengangskanälchen bereits gut zu erkennen ist, ist dies bei den aufgetauten Zellen nicht der Fall. Die Zellen zeigen Anzeichen von stressbedingten Schädigungen, die Kryokonservierung hat der Zellstruktur geschadet.

Die zweite Kollagenschicht fördert die Reorganisation der Hepatozyten. Am dritten Tag sehen die Zellen bereits deutlich regeneriert aus, die Ausbildung der Gallengangskanälchen hat begonnen. Die Strukturierung als Monolayer ist bei den Kontroll-Zellen schon weiter fortgeschritten.

Eine Woche nach dem Auftauen zeigen sowohl die kryokonservierten als auch die Kontroll-Zellen das typische Bild der reorganisierten Hepatozytenkultur. Die Morphologie der eingefrorenen Zellen hat sich erholt, die beiden Kulturen sind im Mikroskop kaum noch voneinander zu unterscheiden.

Tabelle 5-4: Morphologie der kryokonservierten und Kontroll-Zellen während der Kultivierung

	Kryokonservierte Zellen	Kontroll-Zellen
Tag 2		
Tag 3		
Tag 8		

Albumin

Abbildung 5-42 zeigt die Albuminsekretion der kryokonservierten Zellen im Vergleich zur nicht eingefrorenen Kontrolle.

Während der gesamten Kultivierung bleibt die Albuminsekretion der kryokonservierten Zellen geringer als die der Kontrolle. Die größten Differenzen sind dabei am 2. und 3. Kulturtag zu beobachten, mit $0,44 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen beträgt die Sekretion der eingefrorenen Zellen nur ein Viertel der Sekretion der Kontrolle ($1,77 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen). Am 6. Tag zeigen beide eine fast gleiche Sekretionsrate von $1,1 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Am 10. Tag besitzen beide ein Maximum, die Albuminsekretion der Kontrolle beträgt $2,4 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen, die der kryokonservierten Zellen ca. $2 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Beide Ansätze verlieren bis zum 15. Kulturtag etwa die Hälfte dieser Aktivität, ihre Sekretionskurven zeigen vom 6. bis 15. Tag ähnlich Verläufe.

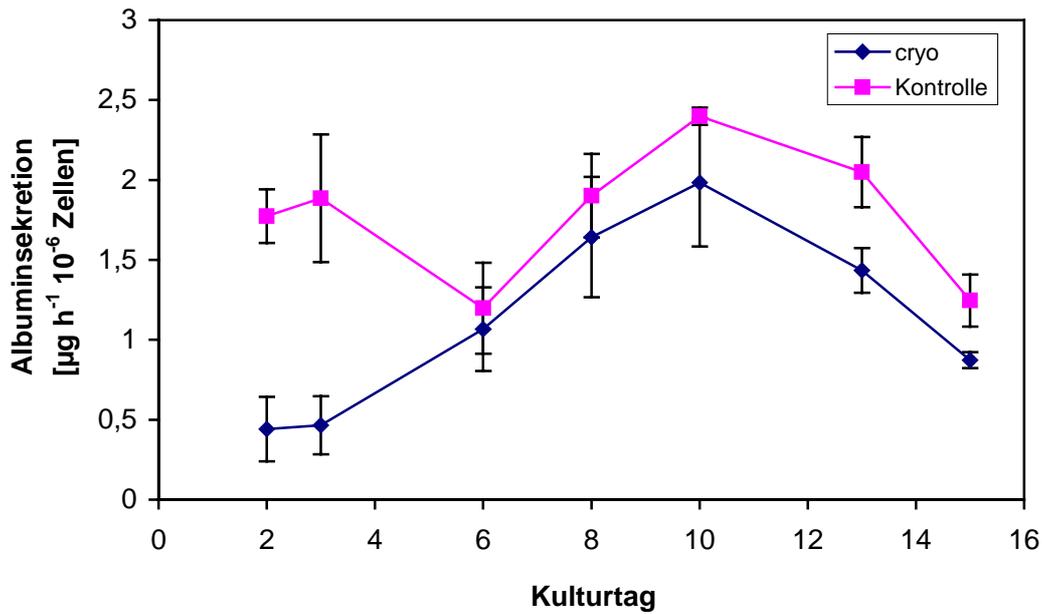


Abbildung 5-42: Albuminsekretion nach der Kryokonservierung

Harnstoff

Der Vergleich der Harnstoffsynthese zwischen kryokonservierten Zellen und Kontroll-Zellen ist in Abbildung 5-43 dargestellt.

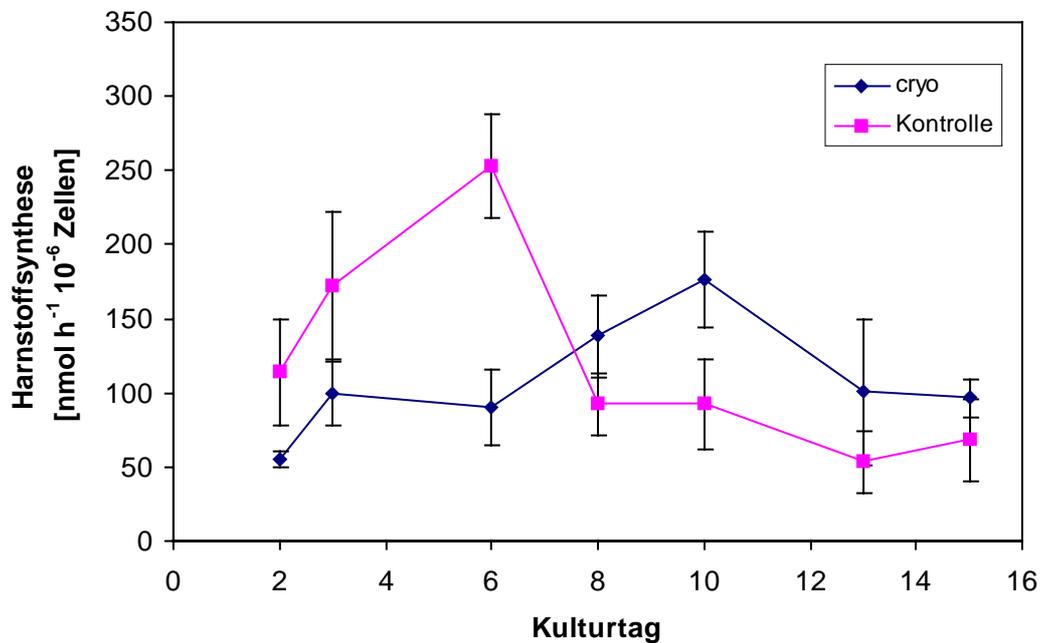


Abbildung 5-43: Harnstoffsynthese nach der Kryokonservierung

Die Harnstoffsynthese der eingefrorenen Zellen liegt während der ersten Kulturwoche unterhalb, während der zweiten oberhalb der Syntheseleistung der Kontrolle. Sie steigt von $55 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen am 2. Tag auf $175 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen am 10. Tag und fällt bis zum

15. Tag wieder auf $95 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Die Harnstoffsynthese der Kontrolle steigt von $115 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen am 2. Tag auf $255 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen am 6. Tag, sinkt aber bereits am 8. Tag auf $90 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen und bis zum 15. Tag auf $70 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen.

Glukose

Abbildung 5-44 zeigt den Glukoseverbrauch der kryokonservierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

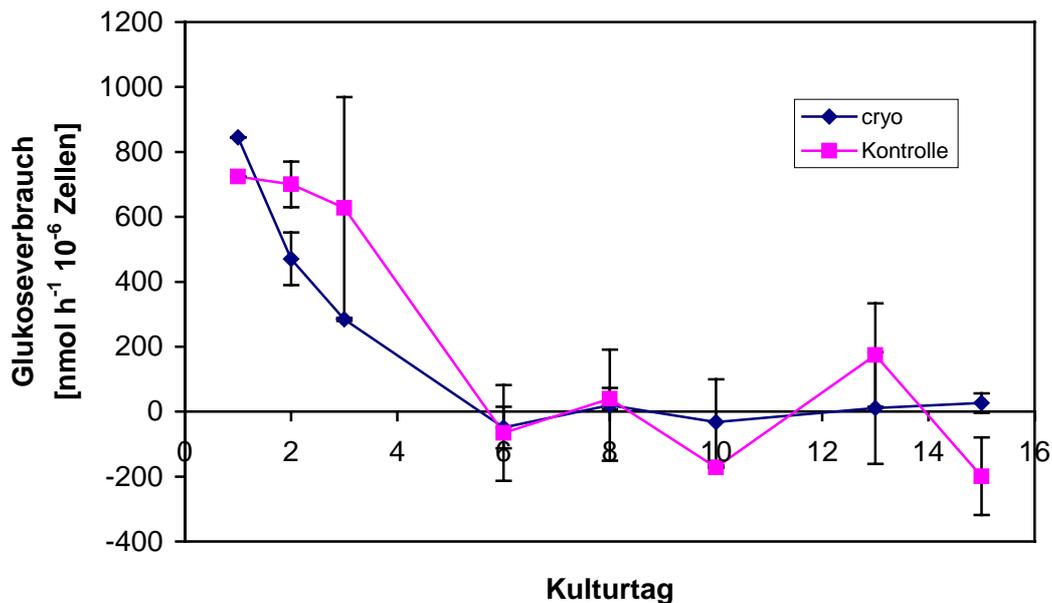


Abbildung 5-44: Glukoseverbrauch nach der Kryokonservierung

Der Glukoseverbrauch beider Ansätze verhält sich sehr ähnlich. Er ist in den ersten drei Tagen bei den kryokonservierten Zellen geringer als bei der Kontrolle, beide sinken jedoch bis zum 6. Kulturtag stark ab und zeigen dann eine leichte Glukoseproduktion von etwa $57 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen. Bis zum Kulturrende wechseln beide Kurven zwischen Glukoseverbrauch und Glukoseproduktion, wobei diese Schwankungen in der nicht eingefrorenen Kontrolle stärker sind als bei den kryokonservierten Zellen.

Laktat

Die Wirkung der Kryokonservierung auf die Laktatbildung ist in Abbildung 5-45 dargestellt. Die Laktatbildung differiert am 2. Kulturtag stark zwischen den kryokonservierten Leberzellen ($28 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen) und der Kontrolle ($8 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen). Während sie bei den eingefrorenen Bioreaktoren am dritten Tag auf $8,5 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen abfällt, steigt sie in der Kontrolle auf $13,5 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Zellen an. Vom 6. bis 15. Kulturtag zeigen beide Kurven etwa gleiche Verläufe, nur am 10. Tag weichen sie stark von einander ab. Während in

der Kontrolle $11,5 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6} \text{ Zellen}$ Laktat gebildet werden, sind es bei den kryokonservierten Zellen $25,5 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6} \text{ Zellen}$, wobei dieser Wert mit einer großen Standardabweichung behaftet ist. Beide Systeme zeigen am Kulturrende eine Laktatbildung von etwa $10 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6} \text{ Zellen}$.

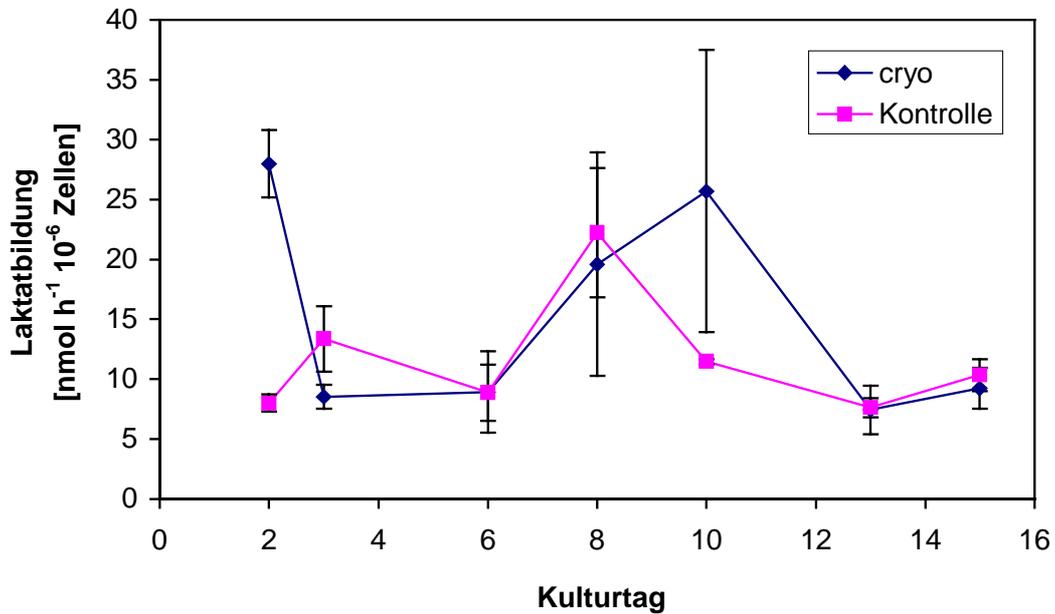


Abbildung 5-45: Laktatbildung nach der Kryokonservierung

LDH

Das Verhalten der LDH-Aktivität nach dem Einfrierprozess ist in Abbildung 5-46 dargestellt.

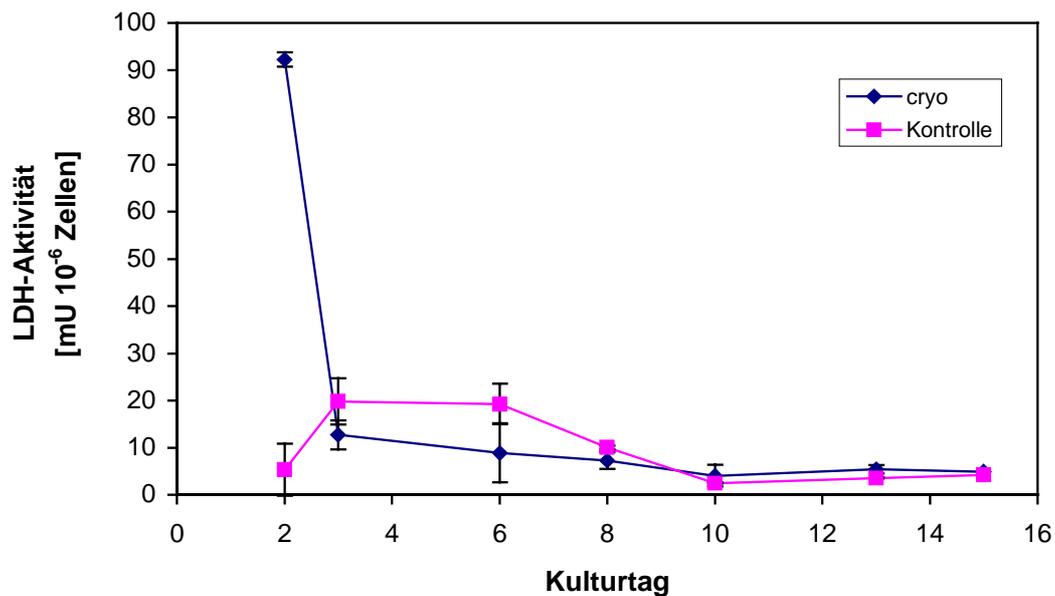


Abbildung 5-46: LDH-Aktivität nach der Kryokonservierung

Die LDH-Aktivität differiert am 2. Tag sehr stark zwischen den kryokonservierten Zellen ($92 \text{ mU } 10^{-6} \text{ Zellen}$) und der nicht eingefrorenen Kontrolle ($5 \text{ mU } 10^{-6} \text{ Zellen}$). Während sie in der Kontrolle jedoch auf etwa $20 \text{ mU } 10^{-6} \text{ Zellen}$ am 3. und 6. Tag ansteigt, sinkt sie in den kryokonservierten Bioreaktoren auf $13 \text{ mU } 10^{-6} \text{ Zellen}$ ab. Bis zum Kulturrende sinkt sie langsam weiter auf ca. $5 \text{ mU } 10^{-6} \text{ Zellen}$ ab. Die Kontrolle zeigt in der zweiten Kulturwoche etwa gleiche LDH-Aktivitäten wie die eingefrorenen Leberzellen.

5.5.1.2 Biotransformation

Um den organotypischen Zustand der Zellen nach der Kryokonservierung zu bestimmen, wurde auch die Wirkung des Einfrierens auf die Biotransformation und die Interaktionsfähigkeit untersucht.

EROD

Die EROD-Aktivität der kryokonservierten Zellen wurde sowohl als Grundaktivität als auch am 3. und 10. Kulturtag induziert gemessen und mit nicht eingefrorenen Kontrollen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-47 dargestellt.

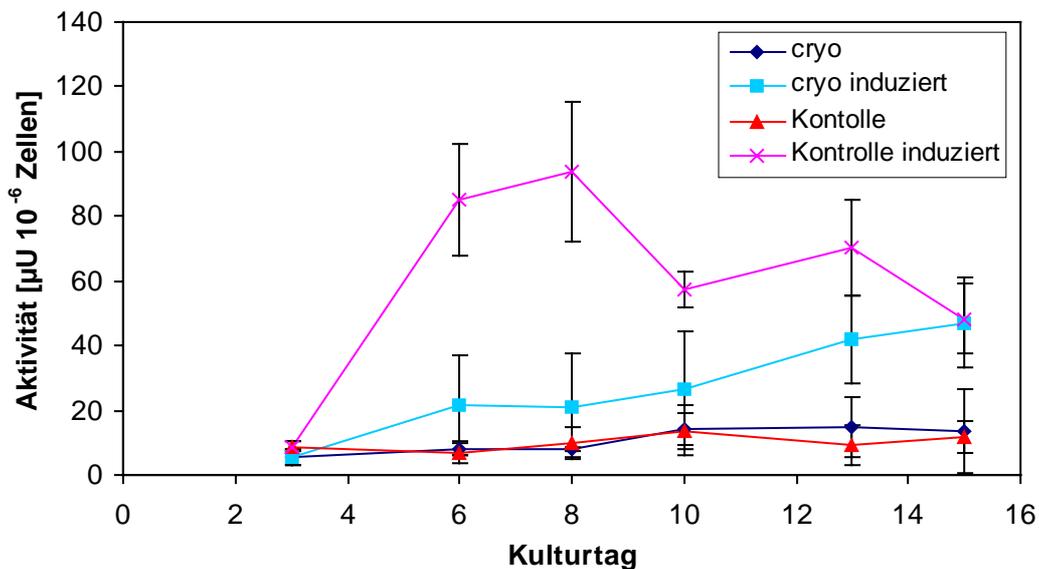


Abbildung 5-47: EROD-Aktivität nach der Kryokonservierung

Die kryokonservierten Zellen zeigen die gleichen nicht induzierten Enzymaktivitäten wie die Kontroll-Zellen. Beide nehmen im Kultivierungsverlauf von ca. 7 auf $15 \text{ } \mu\text{U } 10^{-6} \text{ Zellen}$ zu. Der Einfrierprozess hat hierauf keinen Einfluss.

Die Interaktionsfähigkeit der Zellen wird von der Kryokonservierung jedoch stark beeinträchtigt. Während die Kontroll-Zellen auf beide Induktionen mit einer deutlichen Aktivitätszunahme reagieren, zeigt die Aktivität der kryokonservierten Zellen ein deutlich

anderes Verhalten. Die erste Induktion führt bei der Kontrolle zu einer 10-fachen Aktivitätssteigerung von etwa 8 auf $85 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Die kryokonservierten Zellen reagieren mit einer 4-fachen Induktion, die Aktivität steigt von ca. 6 auf $22 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Die Reaktion der Zellen auf die zweite Induktion ist in der Kontrolle weniger stark ausgeprägt als die auf die erste Induktion. Die kryokonservierten Zellen reagieren ebenso wie bei der ersten Induktion. In beiden Systemen ist die Aktivitätszunahme etwa gleich groß, sie steigt um ca. $15 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Am Ende der Kultivierung zeigen beide Systeme eine etwa gleiche Aktivität von $48 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Somit wird die Interaktionsfähigkeit von der Kryokonservierung zwar beeinträchtigt, regeneriert sich aber während des Kulturverlaufs.

ECOD

Den Einfluss der Kryokonservierung auf die ECOD-Aktivitäten zeigt Abbildung 5-48.

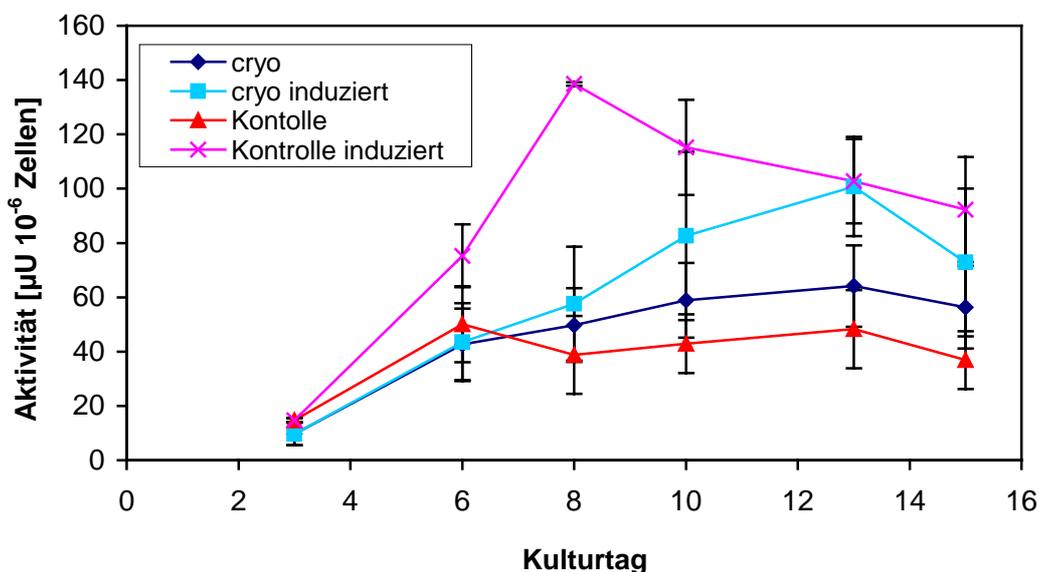


Abbildung 5-48: ECOD-Aktivität nach der Kryokonservierung

Die nicht induzierte Enzymaktivität der kryokonservierten Zellen ist während der ersten Kulturwoche etwas geringer als die der Kontrolle. Beide nehmen vom 3. auf den 6. Kulturtag um etwa $35 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen zu. Doch während die Aktivität der Kontroll-Zellen leicht absinkt und sich im Verlauf der zweiten Woche bei einem Wert von ca. $42 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen stabilisiert, nimmt die Aktivität der kryokonservierten Zellen auf einen Wert von ca. $60 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen weiter leicht zu. Die Kryokonservierung hat also keinen Verlust der Grundaktivität zur Folge. Wie schon für EROD beobachtet, wird die Interaktionsfähigkeit der Zellen durch die Kryokonservierung jedoch stark beeinflusst. Die Kontroll-Zellen reagieren mit einer 3,5-fachen Aktivitätszunahme auf die erste Induktion, ein Maximum von ca. $140 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen wird erreicht. Die Reaktion der kryokonservierten Zellen ist deutlich geringer, ihre Aktivität

nimmt nach der ersten Induktion nur langsam auf etwa $83 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen zu und ist damit nur ca. 1,4-mal höher als die Grundaktivität. Während die kryokonservierten Hepatozyten auch auf die zweite Induktion mit einer deutlichen Aktivitätszunahme reagieren, nimmt die Aktivität der Kontrolle leicht ab, so dass beide Systeme am 13. Kulturtag eine etwa gleiche ECOD-Aktivität von ca. $100 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen aufweisen. Diese nimmt bei den eingefrorenen Zellen schneller wieder ab als bei der Kontrolle. Auch für das Enzym ECOD lässt sich also erkennen, dass die Interaktionsfähigkeit durch den Einfrierprozess beeinträchtigt wird, sich aber während des Kulturverlaufs langsam erholt.

UGT

Die Wirkung der Kryokonservierung auf die Aktivitäten des Phase II-Enzyms UGT ist in Abbildung 5-49 dargestellt.

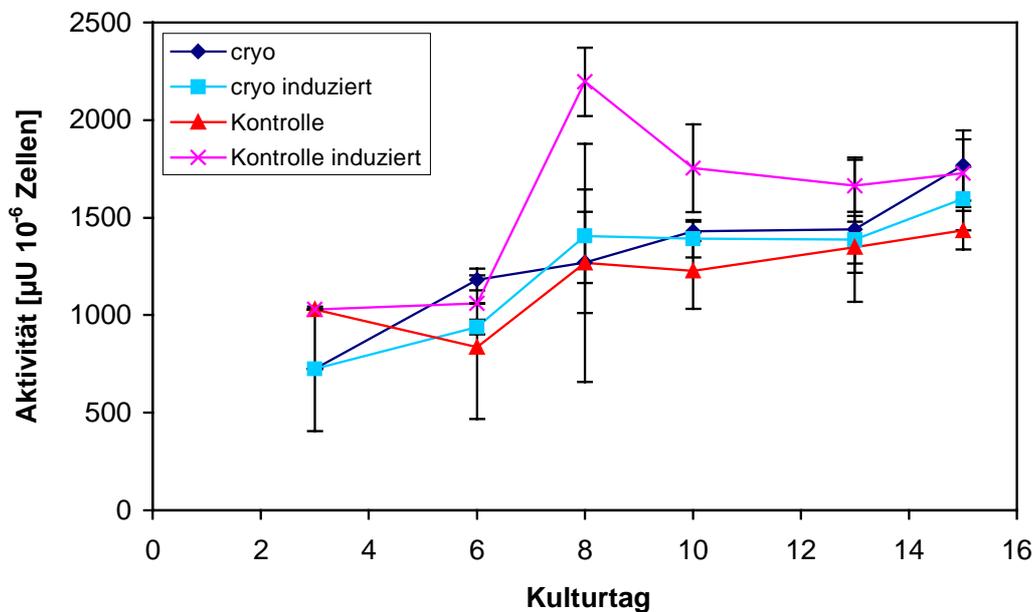


Abbildung 5-49: UGT-Aktivität nach der Kryokonservierung

Die Grundaktivität der kryokonservierten Zellen ist etwas höher als die der Kontrolle. Bei beiden ist im Verlauf der Kultivierung eine Aktivitätszunahme zu beobachten, diese ist jedoch bei den kryokonservierten Zellen stärker ausgeprägt. Damit scheint die Kryokonservierung einen eher aktivierenden Einfluss auf die UGT-Aktivität zu haben.

Im Gegensatz zur Phase I, in der die kryokonservierten Zellen eine langsamere und schwächere Reaktion auf die Induktion zeigen als die entsprechenden Kontrollen, ist für UGT keine Induktion bei den kryokonservierten Zellen zu beobachten. Die induzierten Zellen zeigen nahezu die gleiche Aktivität wie die nicht induzierten Zellen. Die Kontroll-Zellen

hingegen reagieren mit einer ca. 1,7-fachen Aktivitätssteigerung auf die Induktion, eine maximale Aktivität von etwa $2200 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen wird erreicht.

Die Kryokonservierung zeigt einen großen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit. Diese wird im Unterschied zur Phase I nicht regeneriert, sondern ist nach dem Einfrierprozess nicht mehr vorhanden.

ST

Die Reaktion des Phase II-Enzyms ST auf die Kryokonservierung ist in Abbildung 5-50 gezeigt.

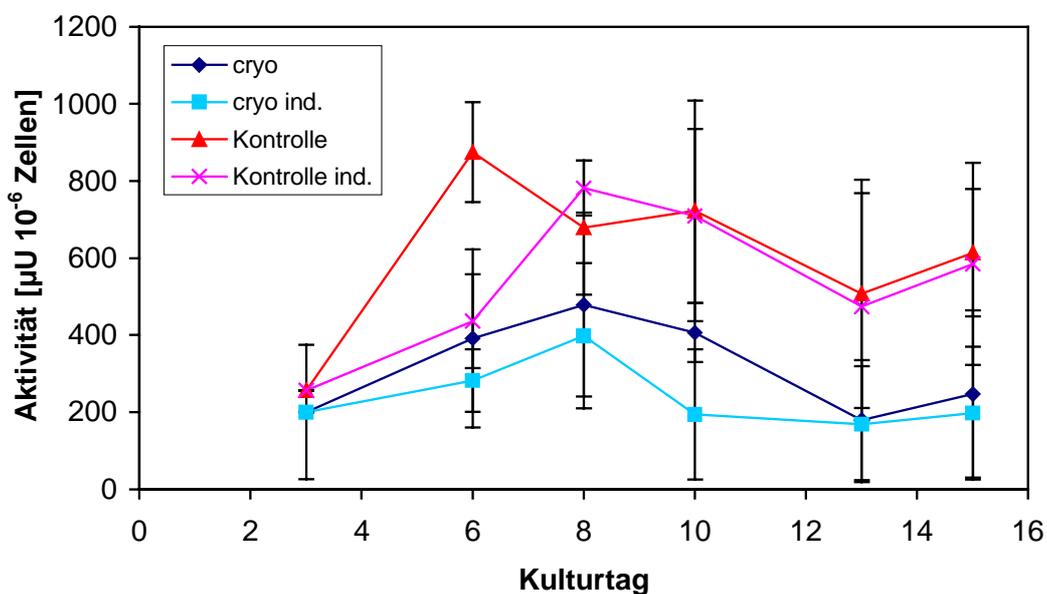


Abbildung 5-50: ST-Aktivität nach der Kryokonservierung

Wie schon zuvor beobachtet (s. Kapitel 5.2 und 5.4) reagiert nur das Enzym UGT auf den Induktor Rifampicin, nicht aber ST. Auch hier kann weder bei den kryokonservierten Zellen noch bei der Kontrolle eine Induktion beobachtet werden. Zwar schwankt die ST-Aktivität stark und es treten große Standardabweichungen auf, doch zeigen sich große Unterschiede zwischen den Aktivitäten der kryokonservierten und der Kontroll-Zellen. Die Aktivität der eingefrorenen Zellen schwankt zwischen 170 und $480 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen, die der Kontrolle zwischen 475 und $875 \mu\text{U } 10^{-6}$ Zellen. Damit wirkt die Kryokonservierung deutlich aktivitätsmindernd auf das Enzym ST.

5.5.1.3 Mathematische Modellierung der Kryokonservierung

Abbildung 5-51 zeigt die programmierte, die berechnete und die gemessene Medientemperatur an den Zellen.

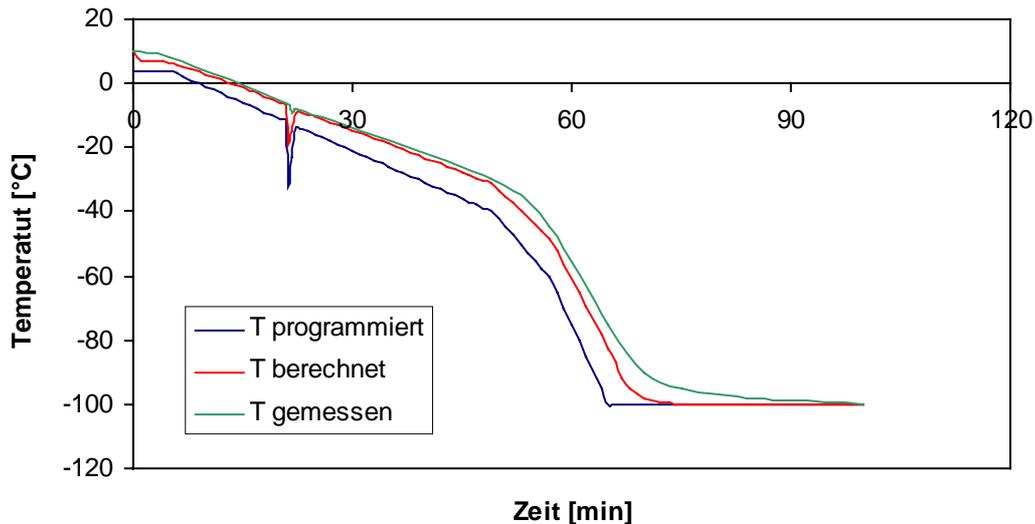


Abbildung 5-51: Temperaturverläufe an den Zellen

Die berechnete Medientemperatur stimmt besonders zu Beginn der Kryokonservierung recht genau mit der gemessenen Temperatur überein. Der durch das Seeding entstandene berechnete Peak ist allerdings stärker ausgeprägt als der gemessene, da die freiwerdende Kristallisationswärme im Modell nicht berücksichtigt wurde. Auch reagiert der berechnete Temperaturverlauf weniger träge auf die Änderung von Kühlraten, so dass das Modell die Endtemperatur von -100°C schneller erreicht als dies tatsächlich gemessen wurde.

Die Berechnung der verschiedenen Wärmedurchgangskoeffizienten k ergab folgende Werte für die einzeln betrachteten Wände:

- $k_{\text{oben direkt}} = 1,459 \text{ W}$ (nur Medium) – $1,464 \text{ W}$ (nur Eis)
- $k_{\text{unten direkt}} = 7800 \text{ W}$
- $k_{\text{oben indirekt}} = 12,65 \text{ W}$
- $k_{\text{unten indirekt}} = 941,4 \text{ W}$

Der Wärmedurchgang durch die reine Folie ist somit deutlich am größten. Durch die als Isolator wirkende Luftschicht im Well ist der Wärmedurchgang direkt von oben am schwächsten. Die vier Koeffizienten unterscheiden sich jeweils um eine Zehnerpotenz voneinander. Von unten werden die Zellen somit viel stärker gekühlt als von oben, die Polycarbonat-Platte des Bioreaktor wirkt als Wärmespeicher, während die Eisenplatte einen guten Wärmeleiter darstellt.

5.5.2 Diskussion

Das Screening einer Vielzahl von in der Entwicklung befindlichen Pharmaka wird durch einen beständigen Zugang zu Hepatozyten deutlich erleichtert werden [171]. Dabei wird die Kryokonservierung primärer Hepatozyten den Bedarf an frischem Lebergewebe stark verringern. Dies ist besonders bei Untersuchungen mit humanen Hepatozyten von Vorteil, da diese nur sehr eingeschränkt verfügbar sind [66]. Die Möglichkeit zur Langzeitlagerung ist gerade für die Forschung in der Hepatologie, Pharmakologie und Toxikologie [165, 242, 243] von großem Wert.

Für die Kryokonservierung porciner Hepatozyten in Suspension und als Sandwich in Kulturflaschen wurden verschiedene Kryoprogramme entwickelt und auf ihre Funktionalität untersucht. Diese sind im Vergleich zu dem für den Mini-Bioreaktor entwickelten Kryoprogramm in Tabelle 5-5 gezeigt. Bei allen Untersuchungen wurde Kulturmedium mit einem Zusatz von 10 % DMSO verwendet. DMSO zeigte bessere kryoprotektive Eigenschaften als Glycerin [148, 149, 157], 1,2-Propandiol [149], Arabinogalaktan [171], Polyvinylpyrrolidon und Dextran [148]. Eine Konzentration von 10 % DMSO erwies sich als am besten geeignet [150, 165]. Um die Notwendigkeit des definierten Einfrierens zu prüfen, wurden auch konstante Kühlraten von $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ und $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ untersucht, um die Zellen von 4°C auf -80°C abzukühlen [153].

Tabelle 5-5: Vergleich verschiedener Kryoprogramme für die Kryokonservierung porciner Hepatozyten

	Suspension [170, 171] Darr und Hubel 2001 Hubel et al. 2001		Monolayer [153] Koebe et al. 1996		Monolayer [151] Koebe et al. 1999		Mini-BR	
Aufgabe	20°C		37°C	15 min	37°C	15 min	4°C	
Kryomedium	-10°C/min	0°C						
Vorkühlphase	0°C	15 min	4°C	10 min	4°C	10 min	4°C	15 min
1. Kühlphase	-1°C/min	-8°C	-1°C/min	-4°C	-1°C/min	-0°C	-1°C/min	-12°C
					-0,5°C/min	-11°C		
Induktion der Eisbildung	-50°C/min	-45°C	-7,2°C/min	-10°C	-11°C	15 min	-60°C/min	-32°C
	+15°C/min	-12°C					+20°C/min	-13,3°C
Weiteres Abkühlen	-1°C/min	-60°C	-1°C/min	-30°C	-3°C/min	-80°C	-1°C/min	-40°C
							-2,5°C/min	-60°C
	-3°C/min	-100°C	-10°C/min	-80°C			-5°C/min	-100°C

Morphologie

Die Kryoprogramme mit kontinuierlicher Kühlrate führten zu stark geschädigten ($-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$) bzw. fast vollständig vernichteten ($-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$) Zellstrukturen [153]. Jede der definierten Konservierungsmethoden führte jedoch zu einer sehr hohen Überlebensrate. Direkt nach dem Auftauen zeigten die Zellen in der vorliegenden Arbeit Anzeichen von Stress, wie mangelnde

Reorganisation als Monolayer und Ausbildung von Gallengangskanälchen. Die Aufgabe der zweiten Kollagen-Schicht führte aber bereits zu einer deutlichen Regeneration der Zellen, welche mit steigender Kultivierungsdauer weiter zunahm. Auch Koebe et al. [151, 153] fanden eine gut erhaltene Morphologie, nur eine leichte Beeinträchtigung der optischen Zellmerkmale, wie eine Schwellung der Gallengangskanälchen, war zu beobachten.

Primärstoffwechsel

Der allgemeine Zustand der Zellen wird in der großen Mehrzahl der Untersuchungen nur über die Albuminsekretionsrate bestimmt. So wurde für die Suspensionen eine stetige Zunahme der Albuminsekretion der aufgetauten Zellen gemessen [170, 171], die jedoch während der gesamten Kulturdauer von 96 Stunden niedriger als die der nicht eingefrorenen Kontrolle war. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Koebe et al. [151, 153] bei der zweiwöchigen Kultivierung von kryokonservierten Monolayer-Kulturen. Die Albuminsekretion der nicht eingefrorenen Kontrolle stieg bis zum siebten [153] bzw. vom fünften bis neunten [151] Kulturtag an und fiel danach wieder ab. Die Sekretionsrate der aufgetauten Zellen lag zu Beginn deutlich darunter. Doch während sie bei den definiert eingefrorenen Zellen ab dem fünften Tag wieder anstieg und am achten Tag die gleichen Werte wie die Kontrolle [153] bzw. ebenfalls am neunten Tag ein der Kontrolle nahekommendes Maximum [151] zeigte, sank sie bei den kontinuierlich eingefrorenen Zellen weiter ab. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Direkt nach dem Auftauen lag die Albuminsekretion der kryokonservierten Zellen deutlich unter der der Kontrolle. Beide stiegen bis zum zehnten Kulturtag an, ab dem sechsten Tag erreichten die eingefrorenen Zellen ähnliche aber stets niedrigere Werte als die Kontrolle.

Die Harnstoffsynthese der aufgetauten Zellen lag in der ersten Kulturwoche unterhalb, in der zweiten Woche oberhalb der Leistung der Kontrolle. Sie wird, ebenso wie der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung, nur wenig vom Einfriervorgang beeinflusst.

Die LDH-Aktivität der kryokonservierten Zellen lag am zweiten Kulturtag weit über der Aktivität der Kontrolle, sank dann aber stark ab. Bereits ab dem dritten Tag sind beide Aktivitäten etwa gleich niedrig, ein Einfluss durch die Kryokonservierung ist nicht mehr zu beobachten. Auch dies stimmt gut mit den Ergebnissen von Koebe et al. [151] überein. Während die Kontrolle eine niedrige LDH-Aktivität zeigte, die zum Kultivierungsende leicht anstieg, nahm die der eingefrorenen Zellen zum Kultivierungsbeginn sehr stark zu und danach bis auf die Aktivität der Kontrolle wieder ab. Diese vorübergehende starke Erhöhung der LDH-Aktivität in Folge der Kryokonservierung ist durch den Zellverlust, bedingt durch osmotischen Stress und Schädigungen durch Eisbildung, zu erklären [151].

Biotransformation

Der Erhalt der Biotransformationsleistungen als Eigenschaft der differenzierten Leberzellkultur wird zumeist nur anhand eines Enzyms, in der Regel EROD oder ECOD, nachgewiesen. Koebe et al. [151, 153] fanden für die Kontrolle eine stabile, während der zweiwöchigen Kultur leicht abnehmende ECOD-Aktivität. Die definiert eingefrorenen Zellen zeigten direkt nach dem Auftauen eine deutlich geringere Aktivität, erreichten aber bereits am vierten [151] bis fünften [153] Kulturtag die gleiche Aktivität wie die Kontrolle. Die Aktivität der kontinuierlich eingefrorenen Zellen nahm hingegen weiter ab und war am Ende der ersten Kulturwoche kaum noch nachweisbar [153].

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl für die Kontrolle als auch für die kryokonservierten Zellen stabile und in etwa gleich hohe EROD und ECOD-Aktivitäten gefunden. Die Grundaktivität wurde durch den Einfrier- und Auftauprozess nicht beeinträchtigt. Allerdings reagierten beide Enzyme nach der Kryokonservierung deutlich schwächer und langsamer auf eine Induktion. Es ist zwar eine Aktivitätszunahme zu beobachten, jedoch erreicht sie erst am Ende der zweiwöchigen Kultivierung die Werte der induzierten Kontrolle. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Hengstler et al. [66] und de Sousa et al. [244], die für kryokonservierte Ratten- bzw. humane Hepatozyten eine deutlich geringere Antwort auf die Induktion als bei nicht eingefrorenen Kontrollen fanden.

Auch die UGT-Grundaktivitäten der kryokonservierten Zellen und der Kontrolle zeigten in der vorliegenden Arbeit ein ähnliches Verhalten wie die von EROD und ECOD. Beide Aktivitäten sind etwa gleich stark ausgeprägt, es ist kein Einfluss durch die Kryokonservierung zu beobachten. Während für die Kontrolle jedoch eine deutliche Aktivitätssteigerung infolge der Induktion zu beobachten ist, zeigen die eingefrorenen Zellen keine Reaktion darauf. Noch stärker ist der Einfluss der Kryokonservierung auf das Enzym ST. Die Aktivität der eingefrorenen Zellen beträgt nur etwa die Hälfte der Kontrollaktivität. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Powis et al. [165] für kryokonservierte Rattenhepatozyten, bei denen die Sulfurierung (ST) von Biphenyl erheblich stärker beeinträchtigt wurde als die Glukuronidierung (UGT). Auch Guillouzo et al. [245] beschreiben, dass besonders Phase II-Enzyme von einer Kryoschädigung betroffen sind, da sie stärker als der Primärstoffwechsel und Phase I-Enzyme von völlig intakten Zellfunktionen abhängen [153].

Modellierung des Temperaturverlaufs an den Zellen

Ein Vergleich der errechneten mit der gemessenen Medientemperatur an der Zellschicht (s. Abbildung 5-51) zeigt, dass während des Seedings eine errechnete Temperatur von -19°C erreicht wird, sie tatsächlich jedoch nur -9°C betrug. Dieser Unterschied begründet sich in der Vernachlässigung der frei werdenden Kristallisationswärme bei der Berechnung. Auch fällt auf, dass das reale System träger reagiert als in der mathematischen Darstellung. Hierbei

spielt neben der fehlenden Berücksichtigung von Wärmekonvektion und Wärmestrahlung besonders die Ansprechzeit des Temperaturfühlers eine Rolle. Auch das eigene Kühlverhalten des verwendeten Pt-100 Thermoelements (\varnothing 1,5 mm) ging nicht in die Berechnung mit ein, obwohl aufgrund der Dicke des Fühlers ein gewisse Ansprechzeit vergeht, bis eine Temperaturänderung angezeigt wird.

Insgesamt spiegelt das Modell den tatsächlichen Temperaturverlauf an der Zellschicht annähernd wieder, so dass bei der Übertragung des Kryoprotokolls auf ein anderes, ähnliches System die Temperatur an den Zellen ausreichend genau berechnet werden kann, um zeit- und materialaufwendige Versuche vermeiden oder ihre Anzahl minimieren zu können.

Resultat

Wie die Ergebnisse der Kryokonservierung zeigen, wird der Primärstoffwechsel der Leberzellen kaum durch das Einfrieren und Auftauen des Bioreaktors beeinträchtigt. Nach einer anfänglich etwas verminderten Aktivität nehmen die einzelnen Parameter sehr schnell wieder die von der Kontrolle gezeigten Normalwerte an. Auch die Grundaktivitäten der Biotransformationsenzyme EROD, ECOD und UGT werden von der Kryokonservierung nicht beeinflusst. Nur ST zeigt als Folge des Einfrierprozesses deutliche Aktivitätsverluste. Somit zeigen die Leberzellen auch nach dem Auftauen weiterhin ihre charakteristischen Funktionen, der Mini-Bioreaktor ist für die Kryokonservierung geeignet. Dabei haben sich gerade die Kultivierung auf extrazellulärer Matrix [246] und Co-Kulturen von parenchymalen und nicht-parenchymalen Zellen [247], wie sie im Bioreaktor realisiert werden, als besonders geeignet erwiesen. Auf diese Weise wird der Bioreaktor jederzeit verfügbar, sein Einsatz ist nicht von Isolationszeiten oder -zahlen abhängig. Allerdings reagieren die Phase I-Enzyme schwächer und langsamer auf eine Induktion, UGT gar nicht. Die Fähigkeit zur Drug-Drug-Interaktion, die für ein pharmakologisches Screening besonders wichtig ist, wird durch die Kryokonservierung beeinträchtigt. Eine mögliche Ursache liegt in der Wahl des Kryoadditivs. Zwar zeigte DMSO verglichen mit anderen Kryoadditiven bessere kryoprotektive Funktionen [148, 149, 157, 171], jedoch besitzt es auch zytotoxische Eigenschaften. Die Einlagerung in die Zellmembran ist verhältnismäßig stabil, so dass DMSO nur langsam wieder ausgewaschen wird. Da die Hepatozyten nicht proliferieren, kommt es nicht wie bei anderen primären Zellen oder Zelllinien zur Regenerierung der Kultur durch „neue“, nicht kryogeschädigte Zellen. Daher ist der Einsatz eines anderen Kryoadditivs wie z.B. HES (Hydroxyethylenstärke) zu testen, welches keine zytotoxischen Eigenschaften besitzt. Durch weitere Untersuchungen zur Verbesserung des Kryoprogramms ist eine Reduzierung zellulärer Schädigungen als Grundvoraussetzung für einen effizienteren Einsatz des Bioreaktors zu erwarten.

5.6 Eignung des Bioreaktors

Wie die Ergebnisse gezeigt haben, erfüllt der Mini-Bioreaktor alle an ihn gestellten Anforderungen: Die zur Validierung genauer untersuchten porcinen Leberzellen behalten während einer zweiwöchigen Kultivierung ihre charakteristische Differenzierung bei, sie zeigen beim Modellscreening mit Johanniskraut eine gute *in vivo/in vitro*-Korrelation und sind für das Screening von Antioxidantien bei künstlich erzeugtem oxidativem Stress geeignet. Außerdem kann der Bioreaktor kryokonserviert, bei Bedarf aufgetaut und somit jederzeit zum Einsatz gebracht werden. Dabei ist diese Technik nicht nur für Hepatozyten anwendbar, sondern auch für eine große Zahl anderer primärer Zelltypen. Das Screening eines Pharmakons an unterschiedlichen primären Zellen im Mini-Bioreaktor kann einen umfassenden Überblick über die zu erwartenden Nebenwirkungen und Interaktionen geben. Um humanrelevante Aussagen treffen zu können, sind humane Zellen darin zu kultivieren. Auf diese Weise können sowohl aufwendige und gesellschaftlich umstrittene Tierversuche als auch die für die Prädiktion erschwerenden Interspeziesdifferenzen vermieden werden. Die Verwendung eines funktionsfähigen humanen Stoffwechselsystems in dieser Form wird helfen, die Relevanz pharmakokinetischer und toxikologischer Untersuchungen für den Menschen zu steigern („refinement“). Dabei ist der Bioreaktor durch seine Größe und die damit verbundene Handhabbarkeit sowie den Membranboden einem Screening in Petrischalen oder herkömmlichen 24Well-Platten überlegen, da ein geringerer Zell- und Wirkstoffbedarf auftreten und definierte Sauerstoffbedingungen gewährleistet werden können.

Tabelle 5-6 zeigt zusammenfassend die Vor- und Nachteile des *in vitro*-Screenings:

Tabelle 5-6: Vor- und Nachteile des *in vitro*-Screenings

Vorteile von <i>in vitro</i> -Testsystemen	Nachteile von <i>in vitro</i> -Testsystemen
<ul style="list-style-type: none"> + Schnell + Kostengünstig + Unkompliziert + Geringe Wirkstoffmengen nötig + Untersuchung einer Vielzahl von Bedingungen gleichzeitig (Zellart, Dosis, Zeitabhängigkeit) + Einfache Validierung der Versuchsbedingungen + Einfache Probennahme + Wenig Testrückstände + Ausschaltung von Interspeziesdifferenzen + Ausschaltung systemischer und Umwelteinflüsse + Co-Kulturen (z.B. Darmepithel - Hepatozyten) möglich, damit komplexeres System + Risikolose Untersuchung humaner Zellen und Gewebe + Reduzierung der Tierversuchszahlen 	<ul style="list-style-type: none"> – Keine Erfassung von <ul style="list-style-type: none"> • systemischen und Umwelteinflüssen • komplexen toxischen Wirkungen, z.B. Kanzerogenität • chronischen Effekten • Heilungsprozessen – Unzureichende Erfassung von organspezifischen Aspekten – Genaue Wirkstoffkonzentration im Organ schwer zu imitieren

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der entwickelte Mini-Bioreaktor für ein *in vitro*-Screening von Pharmaka und Antioxidantien an primären Zellen generell geeignet ist.

In weiterführenden Untersuchungen sollen das Kryoprogramm und die Wahl des Kryoadditivs verbessert und an die Bedürfnisse humaner Zellen angepasst werden, um die Anwendung als „ready to use-Tool“ zu gewährleisten. Auch sollen beim Screening nicht nur die metabolische Ebene, sondern auch die Protein-Ebene (Western Blots) und die DNA- bzw. RNA-Ebene (Chip-Technologie) betrachtet werden. Hierdurch kann nicht nur die Wirkung eines Pharmakons sondern auch deren Ursache (z.B. Inhibierung vs. Repression, Aktivierung vs. Induktion etc.) analysiert werden.

Eine kontinuierliche Nährmedienregeneration soll standardisierte und stabile Kulturbedingungen schaffen und eine Anhäufung von Kataboliten vermeiden. Dies kann durch eine kontinuierliche und gleichmäßige Mediumströmung im Bioreaktor erreicht werden. Einige Zellarten, wie z.B. Endothelzellen, reagieren positiv auf physiologischen Scherstress, der die Differenzierung fördert. Deshalb wurde ein Strömungssystem für den Bioreaktor entwickelt, in dessen Deckel sich Zu- und Ablaufstutzen für die Medienperfusion befinden. Dieses ist in Abbildung 6-1 bis 6-4 dargestellt und soll in weiterführenden Arbeiten getestet werden.



Abbildung 6-1: Unterteil des Strömungssystems

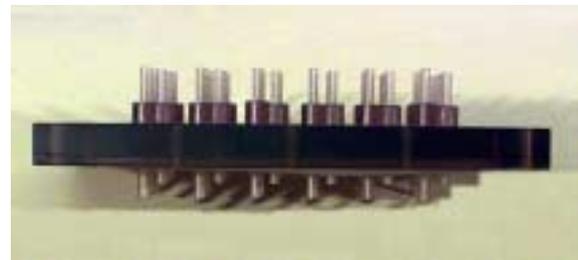


Abbildung 6-2: Deckel des Strömungssystems



Abbildung 6-3: Einsetzen des Bioreaktors



Abbildung 6-4: Aufsetzen des Deckels

Das für die Medienperfusion nötige Schlauchsystem soll zudem ein on-line Monitoring für die Qualitätskontrolle ermöglichen. So könnten z.B. die Konzentrationen der kulturrelevanten

Gase Sauerstoff und Kohlendioxid sowie die Glukose- und Laktatkonzentration im Medium direkt während eines Screenings gemessen und damit der Zellzustand bestimmt werden. Außerdem wurde der entwickelte Bioreaktor vom 24Well- auf das 96Well-System übertragen (Abbildung 6-5 bis 6-7), wodurch es auch für Pipettierautomaten zugänglich ist und automatisierte Screeninguntersuchungen ermöglicht werden. Auch dieses System soll in weiterführenden Arbeiten für die Eignung zum Screening geprüft werden.



Abbildung 6-5: Einzelteile 96Well

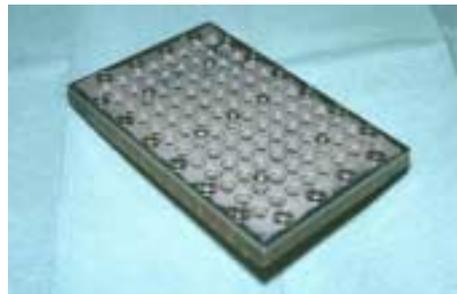


Abbildung 6-6: 96Well-BR



Abbildung 6-7: Strömungssystem

Hierdurch kann eine größere Zahl verschiedener Bedingungen parallel untersucht und ein High Throughput Screening ermöglicht werden.

Ein Screening mit verschiedenen Dosen eines Wirkstoffs für unterschiedliche Wirkzeiten und auf verschiedenen primären humanen Zellen wird so zu einem guten Überblick und sehr differenzierten Bild der Wirkung und der damit beim Patienten zu erwartenden Wechsel- und Nebenwirkungen eines Pharmakons führen. Damit kann zudem auf eine Vielzahl von Tierversuchen verzichtet werden, da die zu erwartenden Ergebnisse infolge des Ausschaltens von Interspeziesdifferenzen genauer sein wird („refinement“).

7 Literaturverzeichnis

1. Russell WMS, Burch RL. The principles of human experimental technique. Methuen, London, 1959; reprinted by UFAW 1992
2. Schmuck G. Die Bedeutung standardisierter Zellkulturverfahren für die Routine-Toxikologie der Pharmaindustrie. *ALTEX* **18**: 79-80, 2001
3. Bader A, Knop E, Fruhauf N, Crome O, Boker K, Christians U, Oldhafer K, Ringe B, Pichlmayr R, Sewing KF. Reconstruction of liver tissue in vitro: geometry of characteristic flat bed, hollow fiber, and spouted bed bioreactors with reference to the in vivo liver. *Artif Organs* **19**: 941-950, 1995
4. Bader A, Fruhauf N, Tiedge M, Drinkgern M, De Bartolo L, Borlak JT, Steinhoff G, Haverich A. Enhanced oxygen delivery reverses anaerobic metabolic states in prolonged sandwich rat hepatocyte culture. *Exp Cell Res* **246**: 221-232, 1999
5. Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Fremond B, De Jong H, Guillouzo A. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology* **18**: 406-414, 1993
6. Löffler G, Petrides P. Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage, *Springer-Verlag*, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 1023-1039, 1997
7. Drenckhahn D, Fahimi D, Fleischhauer K. Leber und Gallenblase. In: Drenckhahn D, Zenker W (Eds.) Benninghoff Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 1, 15. Auflage, Urban und Schwarzenberg, pp. 901-925, 1994
8. Rappaport AM, Borowy ZJ, Longheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit: Role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* **119**: 11-34, 1954
9. Beck T. Zur Anatomie des Menschen: Aufbau und Funktion der Leber. *Pharmazeutische Zeitung* **13**: 11-18, 1998
10. Daoust R. The cell population of liver tissue and the cytological reference bases. *Am Inst Biol Sci Publ* **4**: 3-10, 1958
11. Brodie B, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette L, LaDu BN, Mitoma C, Udenfriend S. Detoxification of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* **121**: 603-604, 1955
12. Mason HS, Fowlks WL, Peterson E. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc* **77**: 2914-2915, 1955
13. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* **77**: 493-509, 1958
14. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75**: 376-386, 1958
15. Paine AJ. Hepatic cytochrome P-450. *Essays Biochem* **17**: 85-126, 1981
16. Smith BR, Plummer JL, Wolf CR, Philpot RM, Bend JR. p-Xylene metabolism by rabbit lung and liver and its relationship to the selective destruction of pulmonary cytochrome P-450. *J Pharmacol Exp Ther* **223**: 736-742, 1982

17. Mukhtar H, Khan WA. Cutaneous cytochrome P-450. *Drug Metab Rev* **20**: 657-673, 1989
18. Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisennand HH, Kelly JH. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* **16**: 60-65, 1992
19. Nyberg SL, Platt JL, Shirabe K, Payne WD, Hu WS, Cerra FB. Immunoprotection of xenocytes in a hollow fiber bioartificial liver. *ASAIO J* **38**: M463-467, 1992
20. Nyberg SL, Shirabe K, Peshwa MV, Sielaff TD, Crotty PL, Mann HJ, Rimmel RP, Payne WD, Hu WS, Cerra FB. Extracorporeal application of a gel-entrapment, bioartificial liver: demonstration of drug metabolism and other biochemical functions. *Cell Transplant* **2**: 441-452, 1993
21. Custer L, Mullon CJ. Oxygen delivery to and use by primary porcine hepatocytes in the HepatAssist 2000 system for extracorporeal treatment of patients in end-stage liver failure. *Adv Exp Med Biol* **454**: 261-271, 1998
22. Gerlach JC, Encke J, Hole O, Muller C, Courtney JM, Neuhaus P. Hepatocyte culture between three dimensionally arranged biomatrix-coated independent artificial capillary systems and sinusoidal endothelial cell co-culture compartments. *Int J Artif Organs* **17**: 301-306, 1994
23. Bader A, De Bartolo L, Haverich A. High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *J Biotechnol* **81**: 95-105, 2000
24. De Bartolo L, Bader A. Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* **6**: 40-46, 2001
25. Weingartz U. Kryokonservierung von Schweine-Leberzellen in einem Flachbettmembranbioreaktor. Diplomarbeit, TU Braunschweig, 1999
26. Langsch A, Bader A. Longterm stability of phase I and phase II enzymes of porcine liver cells in flat membrane bioreactors. *Biotechnol Bioeng* **76**: 115-125, 2001
27. Jasmund I, Langsch A, Simmoteit R, Bader A. Cultivation of Primary Porcine Hepatocytes in an OXY-HFB for Use as a Bioartificial Liver Device. *Biotechnol Prog* **18**: 839-846, 2002
28. Ekins S, Ring BJ, Grace J, McRobie-Belle DJ, Wrighton SA. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* **44**: 313-324, 2000
29. Lin JH, Lu AYH. Inhibition of cytochrome P450 and implications in drug development. *Annu Rep Med Chem* **32**: 295-304, 1997
30. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423, 1994

31. Smith DA, Abel SM, Hyland R, Jones BC. Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica* **28**: 1095-1128, 1998
32. Ekins S, VandenBranden M, Ring BJ, Wrighton SA. Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetics* **7**: 165-179, 1997
33. Fisher MB, Campanale K, Ackermann BL, VandenBranden M, Wrighton SA. In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metab Dispos* **28**: 560-566, 2000
34. Lu AYH, Coon MJ. Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J Biol Chem* **243**: 1331-1332, 1968
35. Lu AYH, Junk KW, Coon MJ. Resolution of the cytochrome P450-containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J Biol Chem* **244**: 3714-3721, 1969
36. van der Hoeven TA, Haugen DA, Coon MJ. Cytochrome P-450 purified to apparent homogeneity from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes: catalytic activity and other properties. *Biochem Biophys Res Co* **60**: 569-575, 1974
37. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* **22**: 1-21, 1992
38. Gonzalez FJ. The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicol Lett* **102/103**: 161-166, 1998
39. Nebert SW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook R, Feyereisen Y, Fuji-Kuriyama Y, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ. The 450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* **10**: 1-15, 1991
40. Waterman MR. Heterologous expression of cytochrome P-450 in Escherichia coli. *Biochem Soc Trans* **21**: 1081-1085, 1993
41. Odea K, Sakaki T, Ohkawa H. Expression of rat liver cytochrome P-450mc cDNA in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Cell Biol* **4**: 167-175, 1985
42. Buters JT, Korzekwa KR, Kunze KL, Omata Y, Hardwick JP, Gonzalez FJ. cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus. *Drug Metab Dispos* **22**: 688-692, 1994
43. Crespi CL, Penman BW. Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions. *Adv Pharmacol* **43**: 171-188, 1997
44. Newton DJ, Wang RW, Lu AYH. Cytochrome P450 inhibitors: evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **23**: 154-158, 1995
45. Domanski TL, Schultz KM, Roussel F, Stevens JC, Halpert JR. Structure-function analysis of human cytochrome P-450 2B6 using a novel substrate, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. *J Pharmacol Exp Ther* **290**: 1141-1147, 1999
46. Ellis SW, Hayhurst GP, Lightfoot T, Smith G, Harlow J, Rowland-Yeo K, Larsson C, Mahling J, Lim CK, Wolf CR, Blackburn MG, Lennard MS, Tucker GT. Evidence that serine 304 is not a key ligand-binding residue in the active site of cytochrome P450 2D6. *Biochem J* **345**: 565-571, 2000

47. Fowler SM, Riley RJ, Pritchard MP, Sutcliffe MJ, Friedberg T, Wolf CR. Amino acid 305 determines catalytic center accessibility in CYP3A4. *Biochemistry* **39**: 4406-4414, 2000
48. Parikh A, Josephy PD, Guengerich FP. Selection and characterization of human cytochrome P450 1A2 mutants with altered catalytic properties. *Biochemistry* **38**: 5283-5289, 1999
49. Friedberg T, Pritchard MP, Bandera M, Hanlon SP, Yao D, McLaughlin LA, Ding S, Burchell B, Wolf CR. Merits and limitations of recombinant models for the study of human P450-mediated drug metabolism and toxicity: an intralaboratory comparison. *Drug Metab Rev* **31**: 523-544, 1999
50. Bock KW, Gschaidmeier H, Heel H, Lehmkoetter T, Munzel PA, Bock-Hennig BS. Functions and transcriptional regulation of PAH-inducible human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* **31**: 411-422, 1999
51. Potter VR, Elvehjem CA. *J Biol Chem* **114**: 495, 1936
52. Ekins S, Maenpaa J, Wrighton SA. In vitro metabolism: subcellular fractions. In: T.F. Woolf (Ed.), *Handbook of drug metabolism* (pp. 363-399). New York: Marcel Dekker, 1999
53. Axelrod J. Demethylation and methylation of drugs and physiologically active compounds. In: B.B. Brodie and E.G. Erdos (Eds.), *Metabolic factors controlling duration of drug action* (pp. 97-110). New York: Macmillan, 1962
54. Gillette JR. Oxidation and reduction by microsomal enzymes. In: B.B. Brodie and E.G. Erdos (Eds.), *Metabolic factors controlling duration of drug action* (pp. 13-29). New York: Macmillan, 1962
55. Ekins S. Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* **28**: 591-623, 1996
56. Krumdieck CL, dos Santos JE, Ho KJ. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem* **104**: 118-123, 1980
57. Smith PF, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Putnam CW, Zukoski CF 3rd, Davis WM, Brendel K. Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. *Life Sci* **36**: 1367-1375, 1985
58. Olinga P, Meijer DKF, Sloof MJH, Groothuis GMN. Liver slices in in vitro pharmacology with special reference to the use of human liver tissue. *Toxicol in vitro* **12**: 77-100, 1997
59. Worboys PD, Brennan B, Bradbury A, Houston JB. Metabolite kinetics of ondansetron in rat. Comparison of hepatic microsomes, isolated hepatocytes and liver slices, with in vivo disposition. *Xenobiotica* **26**: 897-907, 1996
60. Glockner R, Steinmetzer P, Drobner C, Müller D. Use of fresh and cryopreserved human liver slices in toxicology with special reference to in vitro induction of cytochrome P450. *Toxicol in vitro* **13**: 531-535, 1999
61. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* **43**: 506-520, 1969
62. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth Cell Biol* **13**: 39-83, 1976
63. Mitaka T. The current status of primary hepatocyte culture. *Int J Exp Pathol* **79**: 393-409, 1998

64. Ehrmann L, Ley GO. The growth of cells on a gel of reconstituted rat tail collagen. *J Nat Can Inst* **16**: 1375-1400, 1986
65. Sinz MW. In vitro metabolism: hepatocytes. In: T.F. Woolf (Ed.), Handbook of drug metabolism (pp. 401-424). New York: Marcel Dekker, 1999
66. Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, Swales N, Fischer T, Biefang K, Gerl M, Bottger T, Oesch F. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* **32**: 81-118, 2000
67. Cross DM, Bayliss MK. A commentary on the use of hepatocytes in drug metabolism studies during drug discovery and development. *Drug Metab Rev* **32**: 219-240, 2000
68. Bader A, Knop E, Kern A, Boker K, Fruhauf N, Crome O, Esselmann H, Pape C, Kempka G, Sewing KF. 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes-design of an organotypical model. *Exp Cell Res* **226**: 223-233, 1996
69. Guyomard C, Rialland L, Fremond B, Chesne C, Guillouzo A. Influence of alginate gel entrapment and cryopreservation on survival and xenobiotic metabolism capacity of rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **141**: 349-356, 1996
70. Watanabe N, Tsukada N, Smith CR, Edwards V, Phillips MJ. Permeabilized hepatocyte couplets. Adenosine triphosphate-dependent bile canalicular contractions and a circumferential pericanalicular microfilament belt demonstrated. *Lab Invest* **65**: 203-213, 1991
71. Li AP, Maurel P, Gomez-Lechon MJ, Cheng LC, Jurima-Romet M. Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact* **107**: 5-16, 1997
72. Yarmush ML, Toner M, Dunn JC, Rotem A, Hubel A, Tompkins RG. Hepatic tissue engineering. Development of critical technologies. *Ann NY Acad Sci* **665**: 238-252, 1992
73. Bader A, Rinkes IH, Closs EI, Ryan CM, Toner M, Cunningham JM, Tompkins RG, Yarmush ML. A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic progresses: cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol Prog* **8**: 219-225, 1992
74. Bader A, Böker K, Christians U, Crome O, Frühauf N, Manns M, Pichlmayr R, Sewing KF. Organotypical culture conditions for primary hepatocytes. *Transplantationsmedizin* **6**: 82-84, 1994
75. Knop E, Bader A, Boker K, Pichlmayr R, Sewing KF. Ultrastructural and functional differentiation of hepatocytes under long-term culture conditions. *Anat Rec* **242**: 337-349, 1995
76. Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol* **54**: 761-772, 1997
77. Krugmann N. Einführung in die cDNA-basierte Microarraytechnologie. Seminar: Microarrays, Universität Tübingen, SS 2002
78. Nieselt-Struwe K. Oligonukleotid-Microarrays - ein Überblick. Seminar: Genexpression und Microarrays, Universität Tübingen, SS 2002
79. Klapproth H. Von der PCR zum Biochip. Vorlesung: DNA-Analytik II, Universität Freiburg, SS 2002

80. Bartelt A. Proteinmicroarrays. Seminar: Microarrays und Genexpression, Universität Tübingen, SS 2002
81. Bon S, Hartmann K, Kuhn M. Johanniskraut: Ein Enzyminduktor ? *Journal suisse de pharmacie* **16**: 535-536, 1999
82. Yue QY, Bergquist C, Gerden B. Safety of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *The Lancet* **355**: 576-577, 2000
83. Nebel A, Schneider BJ, Baker RK, Kroll DJ. Potential metabolic interaction between St. John's Wort and theophylline. *Ann Pharmacother* **33**: 502, 1999
84. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Lüscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's Wort. *The Lancet* **355**: 548-549, 2000
85. Piscitelli SC, Burstein AH, Chaitt D, Alfaro RM, Falloon J. Indinavir concentrations and St. John's Wort. *The Lancet* **355**: 547-548, 2000
86. Johne A, Brockmöller J, Bauer S, Maurer A, Langheinrich M, Roots I. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther* **66**: 338-345, 1999
87. Maurer A, Johne A, Bauer S, Brockmöller J, Donath F, Langheinrich M, Hübner WD, Roots I. Interaction of St. John's wort extract with phenprocoumon. *Eur J Clin Pharmacol* **55**: A22 (abstr. 79), 1999
88. Smet P de, Touw DJ. Safety of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *The Lancet* **355**: 575-576, 2000
89. Kerb R, Bauer S, Brockmöller J, Roots I. Urinary 6- β -hydroxycortisol excretion rate is affected by treatment with *Hypericum* extract. *Eur J Clin Pharmacol* **52**: A186 (abstr. 607), 1997
90. Roby CA, Anderson GD, Kantor E, Dryer DA, Burstein AH. St. John's Wort: effect on CYP3A4 activity. *Clin Pharmacol Ther* **67**: 451-457, 2000
91. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. St. John's Wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *PNAS* **97**: 7500-7502, 2000
92. Markowitz JS, Vane CL de, Boulton DW, Carson SW, Nahas Z, Risch SC. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Life Sciences* **66**: 133-139, 2000
93. Wentworth J, Agostini M, Love J, Schwabe JW, Chatterjee VK. St John's Wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor. *J Endocrinol* **166**: R11-6, 2000
94. Hooper WD. Metabolic drug interactions. In: T.F. Woolf (Ed.), Handbook of drug metabolism (pp. 229-238). New York: Marcel Dekker, 1999
95. Gordon GG, Skett P. Introduction to drug metabolism. Third Edition. Nelson Thornes Publishers, 2001
96. Yanagi K, Ohshima N. Improvement of metabolic performance of cultured hepatocytes by high oxygen tension in the atmosphere. *Artif Organs* **25**: 1-6, 2001

97. Nishikawa M, Uchino J, Matsushita M, Takahashi M, Taguchi K, Koike M, Kamachi H, Kon H. Optimal oxygen tension conditions for functioning cultured hepatocytes in vitro. *Artif Organs* **20**: 169-177, 1996
98. Vanhaecke T, Elaut G, Rogiers V. Effect of oxygen concentration on the expression of glutathione S-transferase activity in periportal and perivenous rat hepatocyte cultures. *Toxicol In Vitro* **15**: 387-392, 2001
99. Kilburn DG, Webb FC. The cultivation of animal cells at controlled dissolved oxygen partial pressure. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering* Vol. X, Issue 6, Pages 801-814 (1968). *Biotechnol Bioeng* **67**: 657-670, 2000
100. Richter A, Sanford KK, Evans VJ. Influence of oxygen and culture media on plating efficiency of some mammalian tissue cells. *J Natl Cancer Inst* **49**: 1705-1712, 1972
101. Pace DM, Thompson JR, Van Camp WA. Effects of oxygen on growth in several established cell lines. *J Natl Cancer Inst* **28**: 897-909, 1962
102. Paul J. Carbohydrate and energy metabolism. *Cells and Tissues in Culture* **1**: 239-276, 1965
103. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine (2nd ed.). Oxford: Clarendon Press, pp. 136-158, 1989
104. Oda D, Nguyen MP, Royack GA, Tong DC. H₂O₂ oxidative damage in cultured oral epithelial cells: the effect of short-term vitamin C exposure. *Anticancer Res* **21**: 2719-2724, 2001
105. Jones DP. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: *Oxidative Stress* (Sies H. Eds.) pp. 151-195, Academic Press, London 1985
106. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochem Biophys Acta* **1271**: 165-170, 1995
107. Cannon JG, Blumberg JB. Acute phase immune responses in exercise. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O (Eds.), *Exercise and Oxygen Toxicity*. New York: Elsevier Science, pp. 447-479, 1994
108. Godin DV, Wohaieb SA. Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status. *Free Radic Biol Med* **5**: 165-176, 1988
109. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**: 139-162, 1994
110. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-605, 1979
111. Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* **23 (Suppl.1)**: 118-126, 1993
112. Ryan TP, Aust SD. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol* **22**: 119-141, 1992
113. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In : Sies H (Ed.), *Oxidative Stress*, pp. 1-8, Academic Press, London, 1985
114. Davies KJA. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* **61**: 1-31, 1995

115. Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* **32**: 71-110, 1993
116. Feralli M, Signorini C, Ciccoli L, Comporti M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem J* **285**: 295-301, 1992
117. Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* **7**: 121-128, 1989
118. Dean RT, Giese S, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci* **18**: 437-441, 1993
119. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm NS* **34**: 26-35, 1994
120. Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* **271**: 7416-7422, 1996
121. Berg A, König D. Oxidativer Stress und Sport. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **51**: 177-178, 2000
122. Flohe L. *New York Wiley* **3A**: 643-731, 1989
123. Friedrich W. Handbuch der Vitamine. Urban & Schwarzenberg, München, 1987
124. Lankenau DH. Vorlesung: Ausflüge in die vergleichende Tierphysiologie, Stunde 4. Uni Heidelberg: 15.05.01
125. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* **50**: 279-289, 2000
126. Wintermeyer U. Vitamin C: Entdeckung, Identifizierung und Synthese – heutige Bedeutung in Medizin und Lebensmitteltechnologie, *Deutscher Apotheker Verlag*, Stuttgart, 1981
127. Li X, Hill KE, Burk RF, May JM. Selenium spares ascorbate and alpha-tocopherol in cultured liver cell lines under oxidant stress. *FEBS Lett* **508**: 489-492, 2001
128. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest* **82**: 1040-1050, 1988
129. Chan SW, Reade PC. The role of ascorbic acid in oral cancer and carcinogenesis. *Oral Dis* **4**: 120-129, 1998
130. Ramaswamy G, Rao VR, Kurnaraswamy SV, Antha N. Serum vitamin's status in oral leukoplakias – a preliminary study. *Oral Oncol, Eur J Cancer* **32B**: 120-122, 1996
131. Gridley G, McLaughlin JK, Block G, Blot WJ, Winn DM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Preston-Martin S, Austin DF, Fraumeni JF Jr. Diet and oral and pharyngeal cancer among blacks. *Nutr Cancer* **14**: 219-225, 1990
132. Lupules CU. Vitamin C inhibits DNA, RNA and protein synthesis in epithelial neoplastic cells. *Int J Vit Nutr Res* **61**: 125-129, 1991
133. Helen A, Vijayammal PL. Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. *J Appl Toxicol* **17**: 289-295, 1997

134. Block G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* **53 Suppl 1**: 270S-282S, 1991
135. Henson DE, Block G, Levine M. Ascorbic acid: biologic functions and relation to cancer. *J Natl Cancer Inst* **83**: 547-550, 1991
136. Trizna Z, Schantz SP, Hsu TC. Effects of N-acetyl-L-cysteine and ascorbic acid on mutagen-induced chromosomal sensitivity in patients with head and neck cancers. *Am J Surg* **162**: 294-298, 1991
137. Trizna Z, Schantz SP, Lee JJ, Spitz MR, Goepfert H, Hsu TC, Hong WK. In vitro protective effects of chemopreventive agents against bleomycin-induced genotoxicity in lymphoblastoid cell lines and peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Cancer Detect Prev* **17**: 575-583, 1993
138. Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Hayashi T, Yamada K, Asai K, Kuzuya F. Antioxidants stimulate endothelial cell proliferation in culture. *Artery* **18**: 115-124, 1991
139. Beckman JS, Minor RL Jr, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* **263**: 6884-6892, 1988
140. Mickle DAG, Li R, Weisel RD, Tumiati LC, Wu TW. Water-soluble antioxidant specificity against free radical injury using cultured human ventricular myocytes and fibroblasts and saphenous vein endothelial cells. *Mol Cell Cardiol* **22**: 1297-1304, 1990
141. Grassmann P. Einführung in die thermische Verfahrenstechnik. Berlin: Walter de Gruyter, 1967
142. Veese T. Untersuchung zur Auftaukinetik und den Überlebensraten bei der Kryokonservierung biologischer Zellen. Dissertation TU Berlin, 1989
143. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* **47**: 347-369, 1963
144. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* **247**: C125-142, 1984
145. Takahashi T, Hirsh A, Erbe E, Williams RJ. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys J* **54**: 509-518, 1988
146. Spieles G. Kryokonservierung biologischer Materialien durch Glasbildung. In: VDI-Fortschrittberichte, Reihe 17: Biotechnik Nr. 143, 1996
147. Groß T. Kryokonservieren isolierter Herzmuskelzellen adulter Ratten. Dissertation TU Aachen, 1997
148. Loretz LJ, Li AP, Flye MW, Wilson AG. Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica* **19**: 489-498, 1989
149. Chesne C, Guillouzo A. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing conditions. *Cryobiology* **25**: 323-330, 1988
150. Diener B, Utesch D, Beer N, Durk H, Oesch F. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology* **30**: 116-127, 1993
151. Koebe HG, Muhling B, Deglmann CJ, Schildberg FW. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures. *Chem Biol Interact* **121**: 99-115, 1999

152. Koebe HG, Pahernik SA, Thasler WE, Schildberg FW. Porcine hepatocytes for biohybrid artificial liver devices: a comparison of hypothermic storage techniques. *Artif Organs* **20**: 1181-1190, 1996
153. Koebe HG, Dahnhardt C, Muller-Hocker J, Wagner H, Schildberg FW. Cryopreservation of porcine hepatocyte cultures. *Cryobiology* **33**: 127-141, 1996
154. Toner M, Borel Rinkes IHM, Cravalho EG, Tompkins RG, Yarmush ML. A controlled rate freezing device for cryopreservation of biological tissue. *Cryo Lett* **14**: 43-56, 1993
155. Innes GK, Fuller BJ, Hobbs KE. Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation. *Cryobiology* **25**: 23-30, 1988
156. Harris CL, Toner M, Hubel A, Cravalho EG, Yarmush ML, Tompkins RG. Cryopreservation of isolated hepatocytes: intracellular ice formation under various chemical and physical conditions. *Cryobiology* **28**: 436-444, 1991
157. Novicki DL, Irons GP, Strom SC, Jirtle R, Michalopoulos G. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes. *In Vitro* **18**: 393-399, 1982
158. Coundouris JA, Grant MH, Engeset J, Petrie JC, Hawksworth GM. Cryopreservation of human adult hepatocytes for use in drug metabolism and toxicity studies. *Xenobiotica* **23**: 1399-1409, 1993
159. Utesch D, Diener B, Molitor E, Oesch F, Platt KL. Characterization of cryopreserved rat liver parenchymal cells by metabolism of diagnostic substrates and activities of related enzymes. *Biochem Pharmacol* **44**: 309-315, 1992
160. Nutt H, Attenburrow V, Fuller BJ. Investigations into repair of freeze/thaw damage in isolated rat hepatocytes. *Cryobiology* **1**: 513-518, 1980
161. Fuller BJ, Grout BW, Woods RJ. Biochemical and ultrastructural examination of cryopreserved hepatocytes in rat. *Cryobiology* **19**: 493-502, 1982
162. Le Cam A, Guillouzo A, Freychet P. Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions. Cryopreservation of hepatocytes. *Exp Cell Res* **98**: 382-395, 1976
163. Fuller BJ, Morris GJ, Nutt LA, Attenburrow VD. Functional recovery of isolated rat hepatocytes upon thawing from -190°C . *Cryo-Lett* **1**: 139-146, 1980
164. Inabe T, Makowka L, Rotstein L, Mahon WA, Falk RE, Falk JE, Phillips MJ. Aminopyrine metabolism in cryopreserved isolated rat hepatocytes. *Canad J Physiol Pharmacol* **59**: 448-451, 1981
165. Powis G, Santone KS, Melder DC, Thomas L, Moore DJ, Wilke TJ. Cryopreservation of rat and dog hepatocytes for studies of xenobiotic metabolism and activation. *Drug Metab Dispos* **15**: 826-832, 1987
166. Dou M, de Sousa G, Lacarelle B, Placidi M, Lechene de la Porte P, Domingo M, Lafont H, Rahmani R. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology* **29**: 454-469, 1992
167. Diener B, Abdel-Latif H, Oesch F. Viability, attachment efficiency, and xenobiotic metabolising enzyme activities are well maintained in EDTA isolated rat liver parenchymal cells after hypothermic preservation for up to 3 days in University of Wisconsin solution. *In Vitro* **31**: 590-594, 1995

168. Rivas PA, Fabrega AJ, Schwartz D, Pollak R. The morphology and function of rabbit hepatocytes isolated using ethylenediaminetetraacetate. *Transplantation* **55**: 335-339, 1993
169. Pahernik SA, Thasler WE, Mueller-Hoecker J, Schildberg FW, Koebe HG. Hypothermic storage of pig hepatocytes: influence of different storage solutions and cell density. *Cryobiology* **33**: 552-566, 1996
170. Darr TB, Hubel A. Postthaw viability of precultured hepatocytes. *Cryobiology* **41**: 11-20, 2001
171. Hubel A, Conroy M, Darr TB. Influence of preculture on the prefreeze and postthaw characteristics of hepatocytes. *Biotechnol Bioeng* **71**: 173-183, 2000-2001
172. Dixit V, Darvasi R, Arthur M, Lewin K, Gitnick G. Cryopreserved microencapsulated hepatocytes--transplantation studies in Gunn rats. *Transplantation* **55**: 616-622, 1993
173. Borel Rinkes IH, Toner M, Sheeha SJ, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term functional recovery of hepatocytes after cryopreservation in a three-dimensional culture configuration. *Cell Transplant* **1**: 281-292, 1992
174. Kasai S, Mito M. Large-scale cryopreservation of isolated dog hepatocytes. *Cryobiology* **30**: 1-11, 1993
175. Koebe HG, Dunn JC, Toner M, Sterling LM, Hubel A, Cravalho EG, Yarmush ML, Tompkins RG. A new approach to the cryopreservation of hepatocytes in a sandwich culture configuration. *Cryobiology* **27**: 576-584, 1990
176. Schlünder EU, Martin H. Einführung in die Wärmeübertragung. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1995
177. Diller KR. The influence of controlled ice nucleation on regulating the thermal history during freezing. *Cryobiology* **22**: 268-281, 1985
178. Bader A, Fruhauf N, Zech K, Haverich A, Borlak JT. Development of a small-scale bioreactor for drug metabolism studies maintaining hepatospecific functions. *Xenobiotica* **9**: 815-825, 1998
179. De Bartolo L, Jarosch-Von Schweder G, Haverich A, Bader A. A novel full-scale flat membrane bioreactor utilizing porcine hepatocytes: cell viability and tissue-specific functions. *Biotechnol Prog* **16**: 102-108, 2000
180. Bader A. Verfahren und Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen. Patent: DE 001 0046 175 A1, 2002
181. Hay PD, Veitch AR, Gaylor JDS. Oxygen Transfer in a Convection-Enhanced Hollow Fiber Bioartificial Liver. *Artif Organs* **25**: 119-130, 2001
182. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* **54**: 626-637, 1972
183. Siewert JR. Chirurgie. 6. Auflage, Springer Verlag, ISBN 3-540-61411-7, S.692
184. Hoogenboom LA, Pastoor FJ, Clous WE, Hesse SE, Kuiper HA. The use of porcine hepatocytes for biotransformation studies of veterinary drugs. *Xenobiotica* **19**: 1207-1219, 1989
185. Lindl T. Zell- und Gewebekultur. 4. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin 2000, ISBN 3-8274-0803-2

186. Studer L, Tabar V, McKay RD. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* **4**: 290-295, 1998
187. Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *J Cell Biol* **116**: 1043-1053, 1992
188. Zomorodi K, Carlile DJ, Houston JB. Kinetics of diazepam metabolism in rat hepatic microsomes and hepatocytes and their use in predicting in vivo hepatic clearance. *Xenobiotica* **25**: 907-916, 1995
189. Lauber R, Mosimann M, Bühner M, Zbinden AM. Automated determination of midazolam in human plasma by high-performance liquid chromatography using column switching. *J Chromtogr B* **654**: 69-75, 1994
190. Ronis MJJ, Ingelman-Sundberg M. Induction of human drug-metabolizing enzymes: mechanisms and implications. In: T.F. Woolf (Ed.), *Handbook of drug metabolism* (pp. 239-262). New York: Marcel Dekker, 1999
191. Bonaventure J, Khadom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. Re-expression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured on alginate beads. *Exp Cell Res* **212**: 97-104, 1994
192. Krishna DR, Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* **26**: 144-160, 1994
193. Neermann J, Wagner R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol* **166**: 152-169, 1996
194. Zeng AP, Hu WS, Deckwer WD. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. *Biotechnol Prog* **14**: 434-441, 1998
195. Rocker, D. Charakterisierung von primären Leberparenchymzellen in Sandwichkonfigurationen. Dissertation, TU Braunschweig, 1999
196. Jensen MD, Wallach DF, Sherwood P. Diffusion in tissue cultures on gas-permeable and impermeable supports. *J Theor Biol* **56**: 443-458, 1976
197. Bissell DM, Levine GA, Bissell MJ. Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture and by cell lines from rat liver. *Am J Physiol* **234**: C122-130, 1978
198. Gerlach JC. Development of a hybrid liver support system: a review. *Int J Artif Organs* **19**: 645-654, 1996
199. Zielke HR, Zielke CL, Ozand PT. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc* **43**: 121-125, 1984
200. Haussinger D, Lamers WH, Moorman AF. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* **46**: 72-93, 1992
201. Watford M, Chellaraj V, Ismat A, Brown P, Raman P. Hepatic glutamine metabolism. *Nutrition* **18**: 301-303, 2002
202. Flendrig LM, la Soe JW, Jorning GG, Steenbeek A, Karlsen OT, Bovee WM, Ladiges NC, te Velde AA, Chamuleau RA. In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *J Hepatol* **26**: 1379-1392, 1997

203. Gregory PG, Connolly CK, Toner M, Sullivan SJ. In vitro characterization of porcine hepatocyte function. *Cell Transplant* **9**: 1-10, 2000
204. Behnia K, Bhatia S, Jastromb N, Balis U, Sullivan S, Yarmush M, Toner M. Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue Eng* **6**: 467-479, 2000
205. Sakai Y, Furkawa K, Suzuki M. Immobilisation and long-term albumin secretion of hepatocyte spheroids rapidly formed by rotational tissue culture methods. *Biotechnol Tech* **6**: 517-532, 1992
206. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum Albumin. *Hepatology* **8**: 385-401, 1988
207. Annoni G, Weiner FR, Colombo M, Czaja MJ, Zern MA. Albumin and collagen gene regulation in alcohol- and virus-induced human liver disease. *Gastroenterology* **98**: 197-202, 1990
208. Hansen T, Borlak J, Bader A. Cytochrome P450 enzyme activity and protein expression in primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures. *Xenobiotica* **30**: 27-46, 2000
209. Koebe HG, Pahernik S, Eyer P, Schildberg FW. Collagen gel immobilization: a useful cell culture technique for long-term metabolic studies on human hepatocytes. *Xenobiotica* **24**: 95-107, 1994
210. Suolinna EM, Pitkaranta T. Effect of culture age on drug metabolizing enzymes and their induction in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **35**: 2241-2245, 1986
211. VandenBranden M, Wrighton SA, Ekins S, Gillespie JS, Binkley SN, Ring BJ, Gadberry MG, Mullins DC, Strom SC, Jensen CB. Alterations of the catalytic activities of drug-metabolizing enzymes in cultures of human liver slices. *Drug Metab Dispos* **26**: 1063-1068, 1998
212. Nöldner M, Chatterjee S. Effects of two different extracts of St. John's wort and some of their constituents on cytochrome P450 activities in rat liver microsomes. *Pharmacopsychiatry* **34 Suppl 1**: S108-110, 2001
213. Gewertz N, Ereshefsky B, Lam YWF, Benavides R, Ereshefsky L. Determination of the differential effects of St. John's wort on the CYP 1A2 and NAT2 metabolic pathways, using caffeine probe methodology. Poster No. 131, Presented at the 39th Annual Meeting of the New Clinical Drug Evaluation Unit Program (NCDEU), Boca Raton, Florida, June 1-4, 1999
214. Mai I, Kruger H, Budde K, Johne A, Brockmoller J, Neumayer HH, Roots I. Hazardous pharmacokinetic interaction of Saint John's wort (*Hypericum perforatum*) with the immunosuppressant cyclosporin. *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**: 500-502, 2000
215. Venkatakrisnan K, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Schmider J, Harmatz JS, Shader RI. Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation in vitro: dominance of CYP 2C19 and 3A4. *J Clin Pharmacol* **38**: 112-121, 1998
216. Ereshefsky B, Gewertz N, Lam YWF, Vegas LM, Ereshefsky L. Determination of SJW differential metabolism at CYP 2D6 and CYP 3A4, using dextrometorphan probe methodology. Poster No. 130, Presented at the 39th Annual Meeting of the New Clinical Drug Evaluation Unit Program (NCDEU), Boca Raton, Florida, June 1-4, 1999
217. Johne A, Schmider J, Maurer A, Brockmoller J, Mai I, Donath F, Roots I. Arzneimittelinteraktionen mit Johanniskrautextrakt. In: Rietbrock N (Ed.), *Phytopharmaka VI: Forschung und klinische Anwendung*, Steinkopff Verlag, Darmstadt, pp. 55-66, 2000
218. Laakmann G, Schule C, Baghai T, Kieser M. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**: 54-59, 1998

219. Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci* **63**: 499-510, 1998
220. Muller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M, Schafer C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**: 16-21, 1998
221. Kaehler ST, Sinner C, Chatterjee SS, Philippu A. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. *Neurosci Lett* **262**: 199-202, 1999
222. Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Chatterjee SS. Activity profiles of two hyperforin-containing hypericum extracts in behavioral models. *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**: 22-29, 1998
223. Butterweck V, Wall A, Lieflander-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **30 Suppl 2**: 117-124, 1997
224. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterström RH, Perlmann T, Lehmann JM. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid-signaling pathway. *Cell* **92**: 73-82, 1998
225. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* **102**: 1016-1023, 1998
226. Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12208-12213, 1998
227. Blumberg B, Sabbagh W Jr, Juguilon H, Bolado J Jr, van Meter CM, Ong ES, Evans RM. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* **12**: 3195-3205, 1998
228. Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA, Moore JT. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol* **14**: 27-39, 2000
229. Jungermann K. Metabolic zonation of liver parenchyma. *Semin Liver Dis* **8**: 329-341, 1988
230. LeBouton AV. Routine overnight starvation and immunocytochemistry of hepatocyte albumin content. *Cell Tissue Res* **227**: 423-427, 1982
231. Kari FW, Yoshihara H, Thurman RG. Urea synthesis from ammonia in periportal and pericentral regions of the liver lobule. Effect of oxygen. *Eur J Biochem* **163**: 1-7, 1987
232. Jungermann K, Sasse D. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends Biochem Sci* **3**: 198-202, 1978
233. Hartung T, Wendel A. Endotoxin-inducible cytotoxicity in liver cell cultures--I. *Biochem Pharmacol* **42**: 1129-1135, 1991
234. Heinemeyer G, Nigam S, Hildebrandt AG. Hexobarbital-binding, hydroxylation and hexobarbital-dependent hydrogen peroxide production in hepatic microsomes of guinea pig, rat and rabbit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **314**: 201-210, 1980

235. Puntarulo S, Cederbaum AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* **24**: 1324-1330, 1998
236. Hirsch-Ernst KI, Schlaefter K, Bauer D, Heder AF, Kahl GF. Repression of phenobarbital-dependent CYP2B1 mRNA induction by reactive oxygen species in primary rat hepatocyte cultures. *Mol Pharmacol* **59**: 1402-1409, 2001
237. Barker CW, Fagan JB, Pasco DS. Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress. *J Biol Chem* **269**: 3985-3990, 1994
238. Jauregui HO, Naik S, Santangini H, Pan J, Trenkler D, Mullon C. Primary cultures of rat hepatocytes in hollow fiber chambers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30A**: 23-29, 1994
239. Pang KS, Terrell JA. Retrograde perfusion to probe the heterogeneous distribution of hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **216**: 339-346, 1981
240. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**: 875-879, 1978
241. Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* **69**: 261-274, 1993
242. Zaleski J, Richburg J, Kauffman FC. Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen. *Biochem Pharmacol* **46**: 111-116, 1993
243. Santone KS, Melder DC, Powis G. Studies of chemical toxicity to fresh and cryopreserved rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **97**: 370-376, 1989
244. De Sousa G, Langouet S, Nicolas F, Lorenzon G, Placidi M, Rahmani R, Guillouzo A. Increase of cytochrome P-450 1A and glutathione transferase transcripts in cultured hepatocytes from dogs, monkeys, and humans after cryopreservation. *Cell Biol Toxicol* **12**: 351-358, 1996
245. Guillouzo A, Riolland L, Fautrel A, Guyomard C. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact* **121**: 7-16, 1999
246. Moshage HJ, Rijntjes PJ, Hafkenscheid JC, Roelofs HM, Yap SH. Primary culture of cryopreserved adult human hepatocytes on homologous extracellular matrix and the influence of monocytic products on albumin synthesis. *J Hepatol* **7**: 34-44, 1988
247. Fautrel A, Joly B, Guyomard C, Guillouzo A. Long-term maintenance of drug-metabolizing enzyme activities in rat hepatocytes after cryopreservation. *Toxicol Appl Pharmacol* **147**: 110-114, 1997

8 Anhang

Folgende Geräte, Materialien und Chemikalien wurden für die Erstellung dieser Arbeit verwendet:

8.1 Geräte

Autoklav 3870 ELV	Systemec (Wettenberg)
Durchlichtmikroskop	Zeiss (Jena)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
ELISA-Reader MRX II	Dynex (Chantilly, Va, USA)
Eppendorfzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Fireboy eco	Integra Biosciences (Fernwald)
HPLC-Anlage LaChrom	Merck Hitachi (Göttingen)
Interface D-7000, Diode Array Detector L-7450,	
Autosampler L-7200, Pumpe L-7100	
Inkubatoren, Cytoperm 2	Heraeus (Hannover-Hamburg)
Kamera Canon AE-1	Canon (Japan)
Kühlzentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus (Hannover-Hamburg)
Kryogerät Icecube 1860	Sy-Lab (Purkersdorf, Österreich)
Laborrührer mit Heizung	Omnilab (Bremen)
Microprocessor pH-Meter pH 539	WTW (Weilheim)
Microtiter Plate Fluorometer, Fluorolite 1000	Dynatech Laboratories (Denkendorf)
Multikanalpipette	Eppendorf (Hamburg)
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Pipettboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipettierhilfen	Eppendorf (Hamburg)
Pumpe, Vario	Ismatec (Wertheim-Mondfeld)
Spülmaschine Mielabor G 7783	Miele (Gütersloh)
Sterile Werkbank Herasafe HS 18	Heraeus (Hannover-Hamburg)
Stickstofftank Apollo 200	Messer (Kirchen/Sieg)
Ultrahochgeschwindigkeitszentrifuge, Avanti TM Y-25	Beckmann (München)
Waage Basic lite	Sartorius (Göttingen)
Waage Basic plus	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad GFL 1083	Omnilab (Bremen)
Wasserstrahlpumpe	Glasbläserei der MHH
Zellisoliationsanlage	Werkstatt der MHH
Zentrifuge Rotina 46R	Hettich (Tuttlingen)

8.2 Materialien

Dialyseschlauch Spectra/Pors Membrane, MWCO 6000-8000 Cat. No. 132 655	Spectrum Medical Industries (Los Angeles, CA, USA)
Faltenfilter, Cat. No. A796.1	Roth (Karlsruhe)
Glasflaschen, diverse Größen	Schott (Mainz)
Konnektor, Cat. No. 974.10	Vygon (Aachen)
LiChrospher 100RP-18e, 5 µm	Macherey-Nagel (Düren)
Minifilter Minisart RC4, Porengröße 0,2 µm, Art. Nr. 17821	Sartorius (Göttingen)
Multi-Well-Plate Washer, Nunc-Immuno Wash 12	Nunc (Wiesbaden)
Nahtmaterial, Cat. No. V310H	Ethicon (Norderstedt)
Nylongaze, Porengröße 100 µm, Cat. No. NYHD 100	Jürgens (Hannover)
Pipettenspitzen, diverse Größen	Eppendorf (Hamburg)
PTFE-Folie bioFOLIE 25, Cat. No. 76077316	In Vitro Systems & Services (Osterode)
PUR System 725 Cat. No. 55679	Rohm und Haas (Bremen)
Röhrchen, 50 ml, Falcon, Cat. No. 352070	Becton Dickinson (Franklin Lake, N. J., USA)
Röhrchen, 15 ml, Falcon, Cat. No. 352097	Becton Dickinson (Franklin Lake, N. J., USA)
Schlauchklemmen, Art. Nr. H 13353	Novodirekt (Kehl)
Silikonschlauch, verschiedenen Größen	Gummi-Wöhleke (Hildesheim)
Spritzen, verschiedene Größen	B. Braun (Melsungen)
Sterilfilter, Midisart 2000, 0,2 µm PTFE, Cat. No. 17 805	Sartorius (Göttingen)
Sterilfilter Reszist 50/0.2, 0,2 µm PTFE, Art.Nr. BN1192-1	Schleicher & Schüll (Dassel)
Sterilfilter Zap-Cup, Art. Nr. AZ 0038-1	Schleicher & Schüll (Dassel)
Übergangsstück, gerade, Cat. No. 2-0961	Neolab (Heidelberg)
Universal-Verschlußstopfen, Luer-Lock, Art.Nr. 9888	Vygon (Aachen)
Zählkammer, Neubauer, Cat. No. 9 161 078	Omnilab (Bremen)
Zellkulturflaschen, 75 cm ² , mit Filter, Cat. No. 658175	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturschale, 60 x 15 mm, Cat. No. 3004	Becton Dickinson (Franklin Lake, N. J., USA)
24-Well Platten, Cellstar, Cat. No. 662 160	Greiner (Frickenhausen)
96 Well Platten, Flachboden, Cat. No. 655 101	Greiner (Frickenhausen)
96 Well Platten, MaxiSorb, Cat. No. 442 404	Nunc (Wiesbaden)

8.3 Chemikalien

Aceton	A-4206	Sigma (Steinheim)
Acetonitril	Cat. No. 100003	Merck (Darmstadt)
Ascorbinsäure	A-4544	Sigma (Steinheim)
Albumin, porcine	A-4414	Sigma (Steinheim)
Ammoniumacetat	Cat. No. 1.01116	Merck (Darmstadt)
Antikörper, Albumin, goat anti pig	Cat. No. 800-338-9579	Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA)
Avidin-Biotin-Komplex (ABC)	Cat. No. 115-065-100	Dianova (Hamburg)
bFGF	F-0291	Sigma (Steinheim)
BSA	Fraktion V, A-1918	Sigma (Steinheim)
CaCl ₂	Cat. No. 949	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Cat. No. 15,182-3	Aldrich (Taufkirchen)
Collagenase	Typ IV CLS, Cat. No. CIV-22	Biochrom (Berlin)
Cremophor RH 40	zur Verfügung gestellt	PhytoLab (Vestenbergsreuth)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Cat. No. 1 644 793	Roche (Mannheim)
DAPI	D-9542	Sigma (Steinheim)
Desmethyldiazepam	D-7282	Sigma (Steinheim)
Dexamethason	D-1756	Sigma (Steinheim)
Di-Amino-Benzidine (DAB)	D-8001	Sigma (Steinheim)
Diazepam	D-0899	Sigma (Steinheim)
Dicumarol	M-1390	Sigma (Steinheim)
Dulbecco's MEM	F-0435	Biochrom (Berlin)
DMEM/F12	C-71310	PromoCell (Heidelberg)
DMEM (10x)	Cat. No. 1-25P32-M	CellConcepts (Umkirch)
DMSO	Cat. No. 1.02952	Merck (Darmstadt)
DNase	Cat. No. 18068-015	Gibco BRL (Karlsruhe)
EGM	Cat. No. C-22010	PromoCell (Heidelberg)
EGTA	E-4378	Sigma (Steinheim)
Essigsäure	99-100 %, Cat. No. 6003	J.T. Baker (Deventer, Holland)
Ethoxycoumarin	E-1379	Sigma (Steinheim)
Ethoxyresorufin	E-3763	Sigma (Steinheim)
Ethylacetat	Cat. No. 1.09623	Merck (Darmstadt)
Eukitt	Cat. No. EUKITT500	Chroma (Münster)
FCS	Cat. No. S0215	Biochrom (Berlin)
Fibronektin	F-0635	Sigma (Steinheim)
Gelatine	G-1890	Sigma (Steinheim)

β-Glucuronidase	G-0251	Sigma (Steinheim)
Glukagon	Cat. No. 8-9402-81-202-1	Novo Nordisk Pharma (Mainz)
Glukose	G-0251	Sigma (Steinheim)
Glukose-Standard	635-100	Sigma (Steinheim)
Glukose (Trinder)	Methode-Nr. 315	Sigma (Steinheim)
Kaisers Glyceringelatine	Cat. No. 1.09242	Merck (Darmstadt)
Glycin	Cat. No. 1504	J.T. Baker (Deventer, Holland)
Hämalaun	Cat. No. 1.09253	Merck (Darmstadt)
Harnstoff-N	Methode-Nr. 640	Sigma (Steinheim)
HBSS (10x)	Cat. No. H15-012	PAA (Linz, Österreich)
HCl, 25%	1.00732.1000	Merck (Darmstadt)
HEPES	H-3375	Sigma (Steinheim)
H ₂ O ₂	Cat. No. 1.077209.250	Merck (Darmstadt)
HPLC-Wasser	Cat. No. 4218	J.T. Baker (Deventer, Holland)
H ₂ SO ₄	Cat. No. 0731	Merck (Darmstadt)
HybridoMed DIF 1000	Cat. No. FZ8055	Biochrom (Berlin)
IMDM	Cat. No. E15-018	PAA (Linz, Österreich)
Insulin	Zul.-Nr. 2932.00.00	Hoechst Marion Roussel (Frankfurt am Main)
Isopropanol	Cat. No. 8119	J.T. Baker (Deventer, Holland)
Johanniskrautpräparate	zur Verfügung gestellt	PhytoLab (Vestenbergsreuth)
KCl	Cat. No. 9022528	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	Cat. No. 4873	Merck (Darmstadt)
Laktat	Methode-Nr. 735	Sigma (Steinheim)
Laktat-Standard	735-11	Sigma (Steinheim)
LDH-Standard	Cat. No. 107 077	Roche (Mannheim)
MEM (1 % Glutamax)	Cat. No. 41090	Gibco BRL (Karlsruhe)
Methanol	Cat. No. 8045	J.T. Baker (Deventer, Holland)
3-Methylcholanthren	M-6501	Sigma (Steinheim)
4-Methylumbelliferon	M-1381	Sigma (Steinheim)
Methylumbelliferon-7- Glucuronid	M-5664	Sigma (Steinheim)
Methylumbelliferon-7- Sulfat	M-7133	Sigma (Steinheim)
Midazolam	M-2419	Sigma (Steinheim)
NaCl	S-5886	Sigma (Steinheim)

Na ₂ CO ₃	Cat. No. 6392	Merck (Darmstadt)
NaHCO ₃	Cat. No. 6329	Merck (Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄	Cat. No. 6580	Merck (Darmstadt)
NaOH	Cat. No. 1.06495	Merck (Darmstadt)
N ₂ -Supplement	Cat. No. 17502	Gibco BRL (Karlsruhe)
Oxazepam	O-5254	Sigma (Steinheim)
PBS	Cat. No. L 182-01	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Cat. No. A 2213	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Cat. No. P-11-013	PAA (Linz, Österreich)
Pferdeserum	Cat. No. S 9133	Biochrom (Berlin)
Phenobarbital	P-5178	Sigma (Steinheim)
Prednisolon-21-Hydrogensuccinat, Solu Decortin	Zul.-Nr. 9238.00.00	Merck (Darmstadt)
Resorufin	R-3257	Sigma (Steinheim)
Rifampicin	R-3501	Sigma (Steinheim)
Ringer-Puffer	PZN-4671719	Delta Pharma (Pfullingen)
Temazepam	T-8275	Sigma (Steinheim)
Tetramethylbenzidin	T-2885	Sigma (Steinheim)
Trimethylamin	T-0886	Sigma (Steinheim)
Tris-Base	T-6066	Sigma (Steinheim)
Tris-HCl	T-5941	Sigma (Steinheim)
Triton	T-8787	Sigma (Steinheim)
Trypanblau	Cat. No. S11-004	PAA (Linz, Österreich)
Trypsin	Cat. No. 35400-027	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Tween 20	Art. Nr. 9127.2	Roth (Karlsruhe)
Umbelliferon	U-7626	Sigma (Steinheim)
William's Medium E	Cat. No. BESP112F	BioWhitaker (Verviers, Belgien)
Xylol	Cat. No. 8118	J.T. Baker (Deventer, Holland)
Ziegenserum	G-5018	Sigma (Steinheim)
Zitronensäure- Monohydrat	Cat. No. 33114	Riedel-de Haën (Seelze)

8.4 Antikörper für Histochemie

Chondrozyten

Prim: Kaninchen Anti-Human CPP32	Cat. No. A 3537	Dako
Sek: Ziege Anti-Kaninchen, Biotin gekoppelt	Cat. No. R 1364 B	Acris (Hiddenhausen)

Cardiomyozyten

Prim: Maus Anti-Ratte Actinin Cat. No. AB 9465-500 Acris (Hiddenhausen)

Sek: Ziege Anti-Maus, TRITC gekoppelt Cat. No. R 1404 T Acris (Hiddenhausen)

Nervenzellen

Prim: Maus Anti-Ratte β -Tubulin Cat. No. T 9156-10 Acris (Hiddenhausen)

Sek: Ziege Anti-Maus, FITC gekoppelt Cat. No. R 1404 F Acris (Hiddenhausen)

8.5 Isolierung der Cardiomyozyten

Für die Isolierung der Cardiomyozyten wurde eine trächtige Ratte mit Ether betäubt, gewogen und narkotisiert. Die narkotisierte Ratte wurde auf dem Rücken liegend fixiert, der Bauch mit 70% Ethanol abgespült und der Bauchraum geöffnet. Die Uteri wurden entnommen und in eine sterile Petrischale mit PBS (4°C) gegeben. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Embryonen wurden herauspräpariert und in Aufbewahrungsmedium bei 4°C getrennt gesammelt. Unter einem Binokular wurden die Herzen herauspräpariert, in frisches Aufbewahrungsmedium überführt und einmal eingeschnitten. Durch vorsichtiges Drücken wurde möglichst viel Blut aus den Herzen entfernt. Sie wurden dann mit einer Pinzette in Reaktionsgefäße mit 500 μ l Waschmedium überführt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l Waschmedium zugegeben und je zehnmal mit blauer und gelber Pipettenspitze trituiert. Die entstandene Suspension wurde zweimal gewaschen und 5 min bei 235 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt [Methode: Anne Kürsten, AG Bader, GBF Braunschweig].

8.6 Stoffdaten für das Kryomodell

	Schichtdicke δ [m]	Wärmeleitfähigkeit λ [$\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$]	spez. Wärmekapazität c [$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$]	Masse m [kg]
Deckel (PE)	0,001	0,35	1846	$0,6 \cdot 10^{-3}$
Polycarbonat	0,017	0,21	1300	0,005
Luft	0,017	0,025	1010	$3,875 \cdot 10^{-6}$
Medium (FCS)	0,00141	0,527	3930	$0,255 \cdot 10^{-3}$
Eis	0,00154	2,32	2100	$0,255 \cdot 10^{-3}$
Folie	$0,025 \cdot 10^{-3}$	0,195	1007	$0,01 \cdot 10^{-3}$
Silikon	0,001	1,1	1580	$0,316 \cdot 10^{-3}$
Eisen	0,002	80,2	460	0,005

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Angelika Langsch
Geburtsdatum/-ort: 24. September 1973 in Bad Harzburg
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

1980-1984 Grundschule Worthstrasse, Goslar
1984-1986 Orientierungsstufe Goldene Aue, Goslar
1986-1993 Christian-von-Dohm-Gymnasium, Goslar
Abschluss: Abitur

Studium

1993-1999: Studium der Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig
Abschluss: Diplom

10/1995: Vordiplom

1996-1997: Auslandsstudium „Graduate Student of Biotechnology“
University of Tennessee, Knoxville, TN, USA

01-05/1997: Studienarbeit: „Development of a Binding Assay for Isolated Membranes
Instead of Whole Cells of *Saccharomyces cerevisiae*“
UT Knoxville, TN, USA

08/1997-04/1998 wissenschaftliche Hilfskraft für Übersetzungen deutsch/englisch und
englisch/deutsch
Institut für Fertigungstechnik und Spanende Werkzeugmaschinen (IFW),
Universität Hannover

01-09/1999: Diplomarbeit: „Langzeitstabilität von Phase I- und Phase II-Enzymen bei der
Langzeitkultivierung von Schweineleberzellen in Flachbettmembran-
bioreaktoren“
Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe
(LEBAO), Medizinische Hochschule Hannover

09/1999: Universitätsabschluß als Diplom-Biotechnologin

10/1999-10/2002 Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover in Kooperation mit
Firma Genedrugs und dem Institut für Technische Chemie der Universität
Hannover
Dissertation: „Entwicklung und Charakterisierung eines 24Well-Mini-
Bioreaktors mit sauerstoffpermeablem Membranboden für pharmakologisches
in vitro-Screening an primären Zellen“
Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2002

08/2002 Auszeichnung mit dem „Young Researcher Award 2002“ der European Society
of Artificial Organs (ESAO)