

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Charakterisierung von Hepatozyten in einem
miniaturisierten 3D-Durchflussbioreaktor**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Moll, Matthias Stephan

2018

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Mätzler

Tag der Disputation: 09.03.2016

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	IV
II Abkürzungsverzeichnis	VIII
III Abbildungsverzeichnis.....	XI
IV Tabellenverzeichnis	XVIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Leberanatomie und -physiologie.....	1
1.2 Medikamentenentwicklung.....	3
1.3 Kultivierungssysteme von Hepatozyten	5
1.4 Projektrahmen der Dissertation	9
1.5 Ziel der Dissertation	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Materialien- und Geräteliste.....	11
2.2 Chemikalienliste.....	14
2.3 Softwareliste	17
2.4 Zellkultur	18
2.4.1 Zellzählung.....	18
2.4.2 Huh7.....	18
2.4.3 Primäre humane Hepatozyten (pHH).....	19
2.5 Kultursysteme	23
2.5.1 2D-Kultur	23
2.5.2 Kollagensandwich	24
2.5.3 Zell-Slide/Zellchip	25
2.5.4 r3 ^D - KITChip Bioreaktor.....	27
2.6 Quantifizierung des Zellschadens.....	30
2.6.1 Lactatdehydrogenase (LDH)	30

2.6.2 Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	31
2.6.3 Resazurinumsatz.....	32
2.7 Untersuchung der Syntheseleistung von Huh7 und pHH unter Medikamentengabe	33
2.7.1 Gluconeogenese und basale Ureasythese.....	34
2.7.2. Albuminsynthese	36
2.8 Untersuchung der Biotransformation von Huh7 und pHH.....	38
2.8.1 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR	38
2.8.2 Messung der MDR1-Aktivität von Huh7 und pHH	43
2.9 Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol, Diclofenac und Coffein durch pHH	44
2.10 Untersuchung der Gallensäurenbildung von pHH.....	46
3. Ergebnisse	47
3.1 Untersuchung der Glucoseabsorption des Schlauchsystems	47
3.2 Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol durch Huh7	48
3.3 Untersuchung der Toxizität von Paracetamol und Diclofenac an Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur	50
3.3.1 Untersuchung der Toxizität von Paracetamol an Huh7 und pHH	50
3.3.2 Untersuchung der Toxizität von Diclofenac	56
3.4 Untersuchung der Metabolisierung von APAP, Diclofenac und Coffein an pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur	61
3.4.1 Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol in pHH.....	61
3.4.2 Untersuchung der Metabolisierung von Diclofenac in pHH	62
3.4.3 Untersuchung der Metabolisierung von Coffein in pHH.....	63
3.5 Untersuchung der MDR1-Aktivität an Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur	63

3.6 Untersuchung der Gallensäurenbildung durch pHH in statischer 3D- und 2D-Kultur.....	65
3.7 Untersuchung der Genexpression an mit Paracetamol und Diclofenac behandelten Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur	66
3.7.1 Untersuchung der Genexpression an Huh7 nach Paracetamolbehandlung	67
3.7.2 Untersuchung der Genexpression an Huh7 nach Diclofenacbehandlung.....	70
3.7.3 Untersuchung der Genexpression von pHH nach Paracetamolbehandlung	72
3.7.4 Untersuchung der Genexpression von pHH nach Diclofenacbehandlung.....	75
4. Diskussion	76
4.1 Diskussion der Glucoseabsorption des Schlauchsystems	76
4.2 Diskussion der Metabolisierung von Paracetamol durch Huh7	77
4.3 Diskussion der Wirkung von Paracetamol und Diclofenac auf die Glucose-, Urea- und Albuminfreisetzung von Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur.....	78
4.3.1 Diskussion der Wirkung von Paracetamol und Diclofenac auf die Glucose- und Ureafreisetzung von Huh7 in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur.....	79
4.3.2 Diskussion der Wirkung von Paracetamol und Diclofenac auf die Glucose-, Urea- und Albuminfreisetzung von pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur	81
4.4 Diskussion der Metabolisierung von APAP, Diclofenac und Coffein an pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur	84
4.5 Diskussion der MDR1-Aktivität von Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur.....	85

4.6 Diskussion der Gallensäurenbildung durch pHH in statischer 3D- und 2D-Kultur	87
4.7 Diskussion der Genexpression von Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur nach Behandlung mit Paracetamol und Diclofenac	87
4.7.1 Diskussion der Genexpression von Huh7 in nach Paracetamol- und Diclofenacbehandlung.....	88
4.7.2 Diskussion der Genexpression von pHH nach Paracetamol- und Diclofenacbehandlung.....	90
5. Zusammenfassung	92
6. Literaturverzeichnis	93
7. Danksagungen	99
8. Erklärung zum Eigenanteil.....	100

II Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
β2M	β-2-Mikroglobulin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
ACN	Acetonitril
ALT	Alanin-Aminotransferase, Synonym für GPT
APAP	Acetaminophen
AST	Aspartat-Aminotransferase, Synonym für GOT
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
Bioreaktor	r3 ^D -KitChip Bioreaktor
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cholsäure
CDCA	Chenodesoxycholsäure
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP	Cytochrom
DCA	Desoxycholsäure
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DILI	Drug induced liver injury
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EMA	European Medicine Agency
Et al.	Et alii (und andere)
FCS	Fetales Kalbsserum
g	Gramm
g	Vielfaches der Fallbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCA	Glycocholsäure
GCDCA	Glycochenodesoxycholsäure
GDCA	Glycodesoxycholsäure
GLCA	Glycolithocholsäure
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GUDCA	Glycoursodesoxycholsäure
h	Stunde
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LCA	Lithocholsäure
LDH	Lactat-Dehydrogenase
m	Meter
MDR1	Multi-Drug-Resistance-Protein 1
MDH	Malat-Dehydrogenase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRP1	Multidrug Resistance-Related Protein

NAPQI	N-Acetyl-p-Benzochinon-Imin
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
pHH	Primäre humane Hepatozyten
PK	Positivkontrolle
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassaypuffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RS	reaction solution
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SOP	Standard operating procedure
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodesoxycholsäure
TDCA	Taurodesoxycholsäure
TLCA	Taurolithocholsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUDCA	Tauroursodesoxycholsäure
U	Unit
UDCA	Ursodesoxycholsäure
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
WME	William's Medium E

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Medikaments nach Lüllmann et al., 2010, Pharmakologie und Toxikologie, S. 63-72, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York ¹⁰ und Mutschler et al., 2012, Arzneimittelwirkungen, S. 119-123, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart ⁹	4
Abbildung 2: Veränderung der Biotransformation von Hepatozyten in 2D- und 3D-Kultur; modifiziert nach A. Bachmann.....	6
Abbildung 3: Spülen des Leberstücks in Stopplösung zur Inhibierung der Collagenaseaktivität im Rahmen der Isolation von Hepatozyten. Foto übernommen von A. Bachmann.	22
Abbildung 4: Aufbau des Zellchips in Draufsicht, Quelle: ibidi.....	25
Abbildung 5: Aufbau des Zellchips seitlich, Quelle: ibidi.....	25
Abbildung 6: Membranaufbau des Zellchips von ibidi. Bildquelle: ibidi.....	25
Abbildung 7: Schichtaufbau des Bioreaktors, bestehend aus einem grauen Plastikgehäuse, 3 Lagen Plastikdichtleisten und einer Membran. Der Reaktor wurde durch Deckgläser nach außen verschlossen. Quelle: KITChip-Handbuch ⁴⁴	28
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Bioreaktors. Modifiziert aus dem KITChip-Handbuch ⁴⁴	28
Abbildung 9: Der r3 ^D -KitChip Bioreaktor; übernommen von A. Bachmann. Links im Bild befindet sich die Pumpe von Ismatec, in der Mitte der r3 ^D -KITChip Bioreaktor und rechts eine Schott-Flasche, in der sich das Flüssigkeitsreservoir, mit dem der Reaktor perfundiert wird, befindet.....	29
Abbildung 10: Resazurinumsatz zu Resurofin im Rahmen einer Reduktionsreaktion (Entnommen aus dem Promega Celltiter-Blue® Cell Viability Assay Handbuch, S. 9 ⁴⁸).....	32
Abbildung 11: Schema des Versuchs zur Beurteilung der Syntheseleistung von Huh7 und pHH unter dem Einfluss von Paracetamol oder Diclofenac.	33

Abbildung 12: Schematischer PCR-Ablauf, Beschreibung nach Löffler et al., 2006, Biochemie & Pathobiochemie, S. 247, Springer Medizin Verlag, Heidelberg ⁵ und modifiziert.	40
Abbildung 13: Versuchsschema zur Untersuchung der MDR1-Aktivität in Huh7 und pHH.	44
Abbildung 14: Versuchsschema zur Untersuchung Metabolisierung von Paracetamol, Diclofenac und Coffein durch pHH.	45
Abbildung 15: Versuchsschema zur Untersuchung der Gallensäurenbildung durch pHH.	46
Abbildung 16: Glucosegehalt von Proben nach 10 Minuten, 4 Stunden, einem Tag, 2 Tagen und 3 Tagen nach Zugabe von Reaktionslösung (RS). Die statistische Analyse erfolgte durch ein 2-Way-Anova; N=3, n=9. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	47
Abbildung 17: LDH-Freisetzung von Huh7 in einem Kollagensandwich der Konzentration 1 mg/ml an Tag 3 N=1, n=3. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	48
Abbildung 18: Resazurinumsatz an Tag 3 in einem Kollagensandwich der Konzentration 1 mg/ml. Huh7 wurden mit 0, 100 μ M und 1000 μ M Acetaminophen behandelt. Proben wurden nach 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen und jeweils mit der Kontrolle des entsprechenden Zeitpunktes verrechnet. N=1, n=3. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	49
Abbildung 19: An Tag 5 freigesetzte Glucose nach Behandlung mit APAP von in 3D und 2D kultivierten Huh7. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *** entspricht einem p-Wert < 0,0001. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	50
Abbildung 20: An Tag 5 freigesetzter basaler Harnstoff von Huh7 nach Paracetamolbehandlung in 3D- und 2D-Kultur. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den	

Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.....	51
Abbildung 21: LDH-Freisetzung an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Paracetamolbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	52
Abbildung 22: Glucosefreisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH an Tag 5 nach Paracetamolbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.	53
Abbildung 23: Basale Ureafreisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH an Tag 5 nach Paracetamolbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.....	53
Abbildung 24: Albuminfreisetzung an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Paracetamolbehandlung. N=1, n=2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.....	54
Abbildung 25: LDH-Freisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Paracetamolbehandlung an Tag 3 vor Medikamentengabe und an Tag 4 nach Medikamentengabe. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	55
Abbildung 26: An Tag 5 freigesetzte Glucose von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *** entspricht einem p-Wert <0,0001. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	56

Abbildung 27: Basale Ureafreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	57
Abbildung 28: LDH-Freisetzung an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	58
Abbildung 29: Glucosefreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=2-3, n=2-3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	58
Abbildung 30: Basale Ureafreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=2-3, n=2-3; Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	59
Abbildung 31: Albuminfreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=2-3, n=2-3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.	60
Abbildung 32: LDH-Freisetzung vor Medikamentengabe an Tag 3 und nach Medikamentengabe an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	60
Abbildung 33: APAP-Glucuronid- und -Sulfatfreisetzung von 3-5 Tage in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse für das APAP-Sulfat erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des	

Mittelwerts angegeben. * entspricht einem p-Wert <0,05. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.....	61
Abbildung 34: 4´-OH-Diclofenacfreisetzung von 3-5 Tage in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. * entspricht einem p-Wert <0,05, *** einem p-Wert <0,0001. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.....	62
Abbildung 35: Paraxanthinfreisetzung von 3-5 Tage in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	63
Abbildung 36: Rhodaminfreisetzung von in 3D und 2D kultivierten Huh7. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	64
Abbildung 37: Rhodaminfreisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.	64
Abbildung 38: Gallensäurefreisetzung von 3 Tage in 3D ohne Perfusion und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	66
Abbildung 39: CYP1A2-, 3A4- und 2E1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	68

Abbildung 40: UGT1A1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	68
Abbildung 41: MDR1-, MRP1- und BCRP-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	69
Abbildung 42: Albumin--Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	70
Abbildung 43: CYP3A4- und 2C9-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Diclofenac behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	70
Abbildung 44: MDR1-, MRP1- und BCRP-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Diclofenac behandelten Huh7. N=2, n=2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	71
Abbildung 45: Albumin-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Diclofenac behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	72
Abbildung 46: CYP1A2-, 3A4- und 2E1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.	73
Abbildung 47: UGT1A1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=2, n=2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	73
Abbildung 48: MDR1-, MRP1- und BCRP-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research ⁶⁰ publiziert.	74

Abbildung 49: Albumin-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert..... 75

Abbildung 50: Huh7 und pHH in Poren nach 3D-Kultur ohne Fluss; linkes Bild: Huh7; rechtes Bild: pHH..... 82

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von Kultursystemen für Hepatozyten, modifiziert und übersetzt aus Bachmann, Moll et al., 2015 ¹⁶	7
Tabelle 2: Materialien- und Geräteliste.....	11
Tabelle 3: Chemikalienliste.....	14
Tabelle 4: Softwareliste	17
Tabelle 5: Verwendete Primer für die PCR	41
Tabelle 6: Gebildete Gallensäuren von in 3D und 2D kultivierten pHH. Nicht nachweisbare Gallensäuren sind rot, nicht quantifizierbare gelb und quantifizierbare grün hinterlegt.	65

1. Einleitung

1.1 Leberanatomie und -physiologie

Die Sonderstellung der Leber beginnt bereits mit der Blutversorgung. Die Leber wird nicht nur rein arteriell versorgt, sondern auch mit einem Pfortadersystem durch die Vena portae hepatis¹⁻³. Die Vena portae hepatis führt im Gegensatz zur Arteria hepatica communis durch den venösen Abfluss des Verdauungstraktes wesentlich nährstoffreicheres Blut, sodass ein Großteil der Nährstoffe die Leber, im Gegensatz zu anderen Organen, über den portalvenösen Zufluss erreicht².

Das Leberparenchym kann unterschiedlich eingeteilt werden. Die der Leberphysiologie am meisten entsprechende Einteilung ist der Azinus³. Er beschreibt den Bereich zwischen zwei Zentralvenen und einer Glisson-Trias, da eine Trias mehrere Zentralvenen mit Blut versorgt. Der Bereich selbst kann weiter in drei Zonen unterteilt werden. In Zone 1 des Azinus, die der Trias am nächsten liegt, ist der Sauerstoffgehalt am höchsten, in Zone 3, die der Zentralvene am nächsten liegt, am geringsten, weshalb jede Zone eine andere Aufgabe erfüllen kann^{2,3}. So wird in der ersten Zone vermehrt Gluconeogenese und Harnstoffsynthese betrieben, während in Zone 3 die anaerobe Glycolyse abläuft¹.

Das Leberparenchym selbst besteht aus Hepatozyten. Diese Zellen sind polyploid und besitzen mehrere Pole^{1,4}, da jeder Hepatozyt an mehrere Gallenkanälchen, den apikalen Polen entsprechend, und Sinusoide, den basolateralen Polen entsprechend, grenzt.

Die Funktion der Hepatozyten selbst ist vielseitig. Im Rahmen der Einleitung soll vor allem auf die Funktionen und Besonderheiten eingegangen werden, die für die durchgeführten Experimente von Bedeutung sind.

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel. Sie ist in der Lage, alle Schritte der Gluconeogenese durchzuführen⁵ und damit die Glucosehomöostase des Körpers aufrecht zu erhalten, indem sie Glucose freisetzt³. Sie versorgt dadurch andere Organe, die so ihre Funktion erst

erfüllen können. Weiterhin ist die Leber mit den Transaminasen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) am Aminosäurestoffwechsel beteiligt⁶. Klinische Relevanz besitzt diese Tatsache, dass man durch die Messung der freigesetzten Transaminasen einen Leberschaden^{6,7} feststellen kann. Doch nicht nur am Energiestoffwechsel sind Hepatozyten entscheidend beteiligt, auch die Plasmaproteinsynthese läuft in der Leber ab⁷. Dabei sei insbesondere die Albuminsynthese erwähnt, die zum Erhalt des kolloidosmotischen Drucks und zum Transport von Stoffen im Blut dient^{5,7,8}. Die Untersuchung des freigesetzten Albumins kann damit als ein Marker für die Syntheseleistung von Hepatozyten angesehen werden.

Des Weiteren ist die Leber zuständig für vielerlei Formen der Entgiftung¹⁻³. So wird Ammoniak, ein Abbauprodukt des Aminosäurestoffwechsels⁵, durch die Harnstoffsynthese in ein Produkt überführt, das durch die Niere ausgeschieden werden kann¹. Zusätzlich wird auch Cholesterin von Hepatozyten in Gallensäuren umgewandelt und so ausscheidungsfähig gemacht². Darüber hinaus spielt die Leber eine wichtige Rolle im Xenobiotikametabolismus¹⁻³. So erfolgt dort ein Großteil der im Körper stattfindenden Biotransformation, um schwer auszuscheidende Stoffe in leichter auszuscheidende Stoffe zu überführen³.

Die Biotransformation eines Moleküls erfolgt für gewöhnlich in drei Schritten, den sogenannten Phasen I bis III⁵. Davor wird das Molekül in die Zelle aufgenommen, beispielsweise über Transportproteine^{9,10}. In Phase I werden einem Molekül, sofern es nicht über geeignete reaktive Gruppen verfügt, selbige angefügt⁵. Dies erfolgt über sogenannte Cytochrom-P-450-Enzyme, die aufgrund ihrer hohen interindividuellen Varianz und damit einhergehenden variierenden Geschwindigkeiten des Medikamentenmetabolismus eine wichtige Rolle bei Wirkungen und Nebenwirkungen spielen¹¹⁻¹³. Die reaktiven Gruppen sind von entscheidender Bedeutung, da an sie in der Phase II polare Moleküle binden, um die apolare Grundsubstanz wasserlöslich und damit ausscheidbar zu machen⁵.

Nachdem Phase I und II erfolgt sind, werden die so aufbereiteten Moleküle durch verschiedene Transporter aus den Hepatozyten transportiert⁵. Dies

entspricht der Phase III⁵. Je nachdem, ob das Molekül durch die Galle oder die Niere ausgeschieden werden soll, erfolgt der Efflux durch apikale oder basolaterale Transporter⁵. Es sei dabei erwähnt, dass manche Transporter, die am Efflux beteiligt sind, auch einen Medikamenteninflux bewirken können⁹. Zusammenfassend kann die Funktion von Hepatozyten durch die Synthese von Glucose, Urea, Albumin und Gallensäuren, sowie durch die Aktivität der Biotransformation beurteilt werden.

1.2 Medikamentenentwicklung

Die Entwicklung eines Medikamentes ist ein aufwendiger und zeitintensiver Prozess. So können vom Entwicklungsbeginn bis zur Zulassung zehn Jahre und mehr vergehen und mehrere hundert Millionen und mehr aufgewendet werden¹⁰. Die Ursache davon ist, dass aus einer Gruppe von 10000 Wirkstoffen im Mittel lediglich zehn die Phase der klinischen Testung erreichen¹⁰ und lediglich ein einziger Wirkstoff letztendlich zugelassen wird⁹.

Der Beginn der Entwicklung ist die sogenannte präklinische Phase. In ihr erfolgt die Ermittlung von möglichen Wirkstoffen, meist durch molekularbiologische Verfahren⁹. Im Anschluss werden *in vitro* das Wirkspektrum und der Wirkmechanismus ermittelt und der Einfluss und mögliche Toxizität auf verschiedene Organe und die Organselektivität überprüft. Ist dies abgeschlossen, so erfolgt eine Untersuchung an Tieren^{9,10}. Sie dient zur Überprüfung der Pharmakokinetik, Mutagenität und Teratogenität, sowie der Untersuchung von subakuter, subchronischer und chronischer Toxizität⁹.

Wirkstoffe, die diese Tests erfolgreich absolviert haben, treten in die klinische Prüfung ein, wobei hier erstmalig der Wirkstoff am Menschen getestet wird^{9,10}. Diese setzt sich aus vier Phasen zusammen⁹.

In der klinischen Phase I erfolgt eine Prüfung an gesunden Probanden zur Untersuchung von Pharmakokinetik und –dynamik am Menschen, sowie die Ermittlung einer potentiellen Dosierung⁹.

Phase II beinhaltet die Testung an 100-500 Kranken zur Ermittlung von minimal wirksamer und maximal verträglicher Dosis und Dosis-Wirkungsbeziehungen⁹. Daran schließt sich Phase III an, wobei der Wirkstoff hier an einer größeren Patientenkohorte geprüft wird, um so nach Möglichkeit einen Wirksamkeits- und Unbedenklichkeitsnachweis führen zu können^{9,10}. Die Untersuchung erfolgt hierbei meist multizentrisch im Vergleich zur Placebokontrolle oder Standardtherapie^{9,10}.

Schematische Darstellung der Entwicklung eines Medikaments



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Medikaments nach Lüllmann et al., 2010, Pharmakologie und Toxikologie, S. 63-72, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York¹⁰ und Mutschler et al., 2012, Arzneimittelwirkungen, S. 119-123, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart⁹

Verliefen die Phasen I bis III zufriedenstellend, so erfolgt die Zulassung des Medikaments, in Europa beispielsweise durch die EMA oder das BfArM⁹ und das Medikament tritt in Phase IV ein. In ihr erfolgen Studien zu Langzeitwirkungen, die auch seltene Nebenwirkungen aufdecken können, und Anwendungsbeobachtungen⁹. Selbst sich in diesem Stadium befindliche Medikamente wirken nur in 30 bis 60 %¹² und werden gegebenenfalls wieder vom Markt genommen.

Die Leber betreffende Nebenwirkungen sind für einen großen Teil der medikamentösen Nebenwirkungen verantwortlich¹⁴. Es ist daher aus ökonomischer Perspektive wichtig, frühzeitig toxische Medikamente zu erkennen, um eine kostspielige weitere Entwicklung zu unterbinden und Ressourcen besser zu kanalisieren. Der momentane Goldstandard der präklinischen Medikamententests ist die 2D-Kultur^{15,16}. Allerdings werden in ihr durch Dedifferenzierung der Hepatozyten Form und Funktion verloren¹⁶, und es besteht daher auch aus dieser Perspektive die Notwendigkeit, neue Kultivierungssysteme für Hepatozyten zu entwickeln, um so günstiger und erfolgreicher Medikamentenentwicklung betreiben zu können. Als Beispiele für mangelnde Tests vor der humanen Medikamentengabe seien Contergan und der Antikörper TGN1412 angeführt. Contergan ist embryotoxisch¹⁷, während TGN1412 in zu hohen Konzentrationen einen Zytokinsturm auslöst, der zu multiplem Organversagen mit potenziell tödlichem Ausgang führt¹⁸. Beide Medikamente hätten durch besseres Testen *in vitro* als potenzielle Gefahrenquellen identifiziert werden können. Dies zeigt die Wichtigkeit, über die passenden *in vitro*-Testsysteme zu verfügen.

1.3 Kultivierungssysteme von Hepatozyten

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Kultivierungssystemen für Hepatozyten, über die hier eine kurze Übersicht gegeben werden soll.

Der Goldstandard ist zur Zeit die 2D-Kultur^{15,16,19,20}. Diese ermöglicht den Hepatozyten, über einen Zeitraum von wenigen Tagen, den Glucosestoffwechsel, die Ureasyntese und die Aktivität von Phase I- und II-Enzymen beizubehalten und ist einfach zu bedienen¹⁵. Dennoch unterliegen Hepatozyten in 2D-Kultur einigen Limitationen, da diese Kulturbedingungen zu einem raschen Verlust der Zellmorphologie und der Funktion führen, insbesondere der Biotransformation^{16,19}. Außerdem konnte gezeigt werden, dass pHH auf Paracetamol in 3D-Kulturen, nicht aber in 2D-Kulturen sensibel

reagieren, da in der 2D-Kultur die für die Aufnahme des Paracetamols nötigen Transporter nicht ausreichend funktionieren oder fehlen²¹.

Während 2D-Kulturen deshalb bereits 2003 im Journal *Nature* mit der Frage „good bye, flat biology?“²² bedacht wurden, erfolgte erst in den letzten Jahren eine intensive Forschung hin zur 3D-Zellkultur. Sie liegen in einer großen Vielzahl vor (s. Tabelle 1). Diese Kultivierungsform führt zu wesentlich langsamerer Dedifferenzierung der Primärzelle und Funktionen können über längere Zeit bis zu einigen Wochen beibehalten werden, Gallengangskanäle werden ausgebildet und die Hepatozyten reagieren sensibler auf verschiedene Substanzen^{15,16,19,20}. Problematisch dabei ist allerdings, dass sich bei zu hoher Zelldichte nekrotische Bereiche durch Minderversorgung bilden und Hochdurchsatzexperimente, wie sie bisher in der 2D-Kultur möglich sind, noch nicht vollständig etabliert sind^{15,16}.

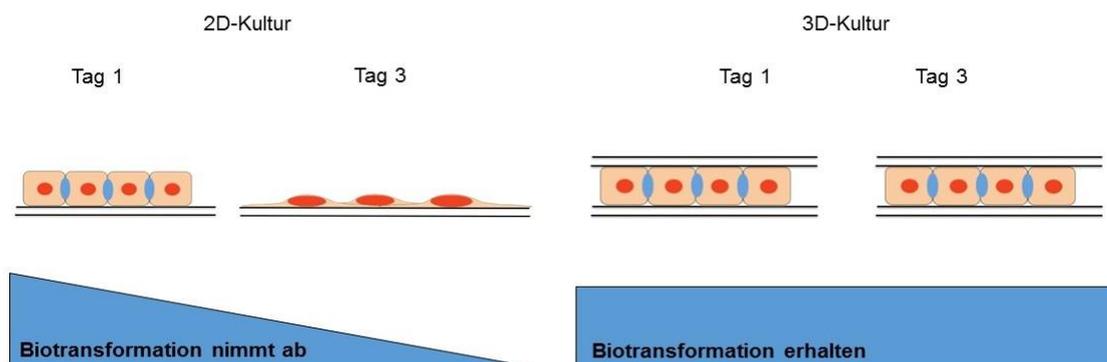


Abbildung 2: Veränderung der Biotransformation von Hepatozyten in 2D- und 3D-Kultur; modifiziert nach A. Bachmann.

Zur Umgehung des Nekroseproblems gibt es 3D-Kultursysteme mit Perfusion, die für eine gleichmäßigere Nähr- und Sauerstoffversorgung sowie Metabolitenentfernung sorgen^{15,16,19,23}. Außerdem führt der Fluss zu einer weiteren Verbesserung der Hepatozytenfunktion^{15,16,23}. In dieser Arbeit werden die Systeme des r-3^D-KITChip und 3D-Zellchips von ibidi verwendet, es existieren jedoch noch eine Vielzahl anderer Systeme^{16,19,20}. Allerdings verfügen diese Systeme über verschiedene Nachteile. Ein Hochdurchsatz ist mit ihnen nicht etabliert^{15,16}, die Viabilität von Zellen variiert stark in 3D-Kulturen mit Perfusion in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen¹⁵ und die Systeme

sind oft teuer oder nur begrenzt verfügbar^{16,19}, Denkbar ist außerdem beispielsweise eine erschwerte Adhäsion aufgrund der Perfusion. In der folgenden Tabelle ist eine kurze Übersicht über die verschiedenen Kultursysteme mit ihren Vor- und Nachteilen gegeben.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von Kultursystemen für Hepatozyten, modifiziert und übersetzt aus Bachmann, Moll et al., 2015¹⁶.

Kultur	Vorteil	Nachteil	Referenz
2D			
Monolayer	Goldstandard für die Untersuchung von Metabolismus und Toxizität von Medikamenten	Schneller Verlust von Zellpolarität und Morphologie	15,20,24
	Ideal zur Überprüfung von Unterschieden bei der Metabolisierung zwischen Spezies und Individuen	Schneller Verlust der Biotransformation, Abnahme der Albuminfreisetzung und Zell-Zell-Interaktion	
	Beibehalten von Schlüsselfunktionen wie Kohlenhydratstoffwechsel und Plasmaproteinsynthese für 24-72 Stunden	Begrenzte Verfügbarkeit der Zellen	
Kokultur	Verbesserte Funktionalität aller Zelltypen	Kein Standard etabliert	24-28
	Erhöhte Expression von Phase I- und II-Enzymen	Große Variabilität zwischen verschiedenen Laboratorien	
	Beibehalten der Zellmorphologie		
	Induzierbarkeit von CYPs		
3D			

Hydrogel (Mit und ohne Gerüst)	Beibehalten von leberspezifischen Funktionen über längere Zeit	Mangel an etablierten Standards	15,20,24,29-34
	Erhöhte Medikamentensensitivität	Nicht an den Hochdurchsatz adaptiert	
	Langzeitexpression von Phase I- und II-Enzymen	Rückgewinnung der Zellen gestaltet sich schwierig	
Kokultur	Verbesserte Expression von Phase I- und II-Enzymen, Induzierbarkeit durch Medikamente	Kein Standard etabliert	26,35,36
	Zellpolarität, Zell-Zell-Kontakte und Gallenkanäle werden beibehalten	Nicht an Hochdurchsatz adaptiert, hohe Variabilität bei Viabilität und Differenzierung	
	Mimt die <i>in vivo</i> -Architektur		
	Zellen länger viabel		
Bioreaktor mit Perfusion	Anhaltende leberähnliche Zellfunktionen und leberspezifische Enzymaktivitäten	Kein standardisiertes System verfügbar	15,20,24
	Präzise Abstimmung von Fluss und Konzentration der Medikamente	Nicht an Hochdurchsatz adaptiert	
	Ermöglicht mikroskopische Untersuchung		
	Formation einer sinusoidähnlichen Struktur (HepaChip®)		

	Schnelle Differenzierung der Zellen nach Applikation von Fluss		
--	--	--	--

1.4 Projektrahmen der Dissertation

Die Dissertation erfolgt innerhalb eines durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projektes. In diesem Rahmen kooperierten das Karlsruher Institut für Technologie (KIT), die Universität Tübingen, vertreten durch das Institut für Unfallmedizinische Forschung, die Pharmacelsus GmbH (Saarbrücken), die ibidi GmbH (Martinsried) und die Firma Jacob Plastics GmbH (Wilhelmsdorf), die im Verlauf in die Firma HBW-Gubesch Kunststoff-Engineering (Emskirchen) integriert wurde.

Zielsetzung ist hierbei die Entwicklung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Zellkultursystems mit Perfusion, insbesondere für Hepatozyten, um dadurch naturgetreuere Kulturbedingungen und Versuchsergebnisse zu erhalten¹⁶.

Im folgenden Abschnitt werden die Aufgaben der Projektpartner in Kürze zusammengefasst:

Die Firma Jacob bzw. Gubesch befasst sich im Rahmen des Projektes mit der Entwicklung von Maschinen zur Produktion von mikrostrukturierten Folien in industriellem Ausmaß. Das KIT stellt mikrogeformte r-3^D-KITChips in verschiedenen Ausfertigungen im Labormaßstab her. Die ibidi GmbH entwickelt mit Hilfe der Membranen des KIT ein Prototyp-Zellkultursystem. Pharmacelsus untersucht die CYP-Aktivitäten und untersucht in Zusammenarbeit mit der Universität Tübingen unter anderem die Bildung von Arzneistoffmetaboliten von Zellen, die in den Kultursystemen der oben genannten Projektpartner kultiviert werden. Die Universität Tübingen entwickelt SOPs zur Übertragung von Protokollen auf die entwickelten Kultursysteme, stellt Primärzellen bereit und untersucht akute Toxizität von Arzneistoffen an Primärzellen und Zelllinien.

Gemeinsam mit der Pharmacelsus GmbH werden die Metaboliten verschiedener Medikamente und deren Effekte überprüft.

1.5 Ziel der Dissertation

Das Ziel der Dissertation ist der Vergleich und die Validierung eines 3D-Kultursystems mit Fluss mit einer konventionellen 2D-Kultur.

Dabei werden die Syntheseleistungen im Bereich Glucose, Urea und Albumin von Hepatozyten und einer Hepatozytenzelllinie unter Einfluss der Modellsubstanzen Paracetamol und Diclofenac bestimmt. Außerdem wird der Einfluss der Substanzen auf die Genexpression der Biotransformation untersucht. Zusätzlich wird die MDR1-Aktivität und der gebildeten Metaboliten aus den Modellsubstanzen Paracetamol und Diclofenac, sowie von Coffein, welche vom Konsortium ausgewählt wurden, in 2D- und 3D-Kulturen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien- und Geräteliste

Tabelle 2: Materialien- und Geräteliste

Material	Hersteller	Artikelnummer
0,2 ml Mikroreaktionsgefäß für PCR <ul style="list-style-type: none"> • Blau • Grün • Rot 	Carl Roth, Karlsruhe	CH88.1 CH89.1 CH90.1
0,5 ml Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht	72.699
1,5 ml Mikroreaktionsgefäß <ul style="list-style-type: none"> • Rot • Grün 	Carl Roth, Karlsruhe	4189.1 4209.1
2 ml Mikroreaktionsgefäß	Carl Roth, Karlsruhe	CK06.1
3D-Zellchip	Ibidi, Planegg/ Martinsried	Prototyp
6-Well-Platte	Corning, Corning (USA)	353046
12-Well-Platte	Corning, Corning (USA)	3512
24-Well-Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen	662160
96-Well-Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen	655180
Abzug Secuflow	WALDNER Laboreinrichtungen, Wangen	200/02895/300
Analysenwaage ABJ 120-4M	KERN & Sohn, Balingen	WB1140084
CO ₂ -Inkubator C-150 (37 °C, 5% CO ₂)	Binder, Tuttlingen	9040-0078
Falcon Tube <ul style="list-style-type: none"> • 15 ml • 50 ml 	Greiner bio-one, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht	188271 62.547.004

Fluoreszenzmikroskop EVOS	AMG, Bothell (USA)	91-AF-4301
Gefrierschrank (-20°C) Power Cooling Forma 900 Series	Liebherr, Bulle (Schweiz)	7081896-04
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo scientific, Waltham (USA)	827860-2521
Geldokumentationssystem Gel iX Imager	INTAS Science Imaging, Göttingen	
Glasflaschen <ul style="list-style-type: none"> • 200 ml • 500 ml • 1000 ml 	Schott AG, Mainz	
Handschuhe Peha-soft nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim	942207
Purple nitrile Nitrilhandschuhe	Kimberly Clark, Irving (USA)	52002M
Indikatorpapier Pehanon	Macherey-Nagel, Düren	904 17
Knopfkanüle	Eigene Konstruktion	
Kühlschrank/ Gefrier-Kombi (+4 °C/- 20 °C)	Liebherr, Bulle (Schweiz)	7081896-04
Kulturflaschen <ul style="list-style-type: none"> • T25 • T75 • T175 	Greiner bio-one, Frickenhausen Corning, Corning (USA) Greiner bio-one, Frickenhausen	660025 430641 660175
Laborwaage Kern PCB	KERN & Sohn, Balingen	WD110036863
LVis-Platte	BMG Labtech, Ortenberg	0680B0001C
Mehrkanalpipette Lambda Plus (5-50 µl, 20-200 µl, 50-300 µl)	Corning, Corning (USA)	4081 4082 4083
Mikrowelle	Severin, Sundern	8068.0000
Mullbinde	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf	13621

PCR-Gerät Arktik Thermal Cycler	Thermo scientific, Waltham (USA)	TCA0096
PCR-Gerät Veriti 96-Well- Thermal Cycler	Applied Biosystems, Carlsberg (USA)	4375786
Pasteurpipette <ul style="list-style-type: none"> • 150 mm • 230 mm 	Carl Roth, Karlsruhe	4518.1 4522.1
pH-Meter FiveEasy FE20	Mettler Toledo AG, Columbus (USA)	1232315296
Peristaltische Pumpe IPC 8- und 12-Kanal Peristaltische Pumpe für Leberisolation	Ismatec, Glattbrugg Carl Roth, Karlsruhe	0934.1
Pipettierhilfe Rota-Filler 3000	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)	HS08348
Pipettenspitzen <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl • 100 µl • 1000 µl 	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf Sarstedt, Nümbrecht Ratiolab, Dreieich	720011 70760 2100610
Plate reader Fluostar Omega	BMG Labtech, Ortenberg	415-1264
r-3 ^D -KITChip	KIT, Karlsruhe	
Silikonschlauch Tygon S3 E3603	Saint Gobain, Courbevoie (Frankreich)	YL81.1
Spritzen <ul style="list-style-type: none"> • 1 ml BD Plastipak • 10 ml • 20 ml • 50 ml Injectomat 	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA) BBraun, Melsungen BBraun, Melsungen Fresenius Kabi, Homburg	300026 4606108V 4606205V 9000701
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm)	Millipore Ltd., Tullagreen (Irland)	SLGPO33RS

Stripetten <ul style="list-style-type: none"> • 5 ml • 10 ml • 25 ml • 50 ml 	Corning, Corning (USA)	4487 4101 4489 4490
Wippschüttler DRS-12	LTF Labortechnik, Wasserburg	11DE090 und 11DE243
Sterilbank Thermo Scientific Safe 2020	Thermo scientific, Waltham (USA)	51026934
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo scientific, Waltham (USA)	75003424
Umkehrmikroskop Primo Vert	Carl-Zeiss-Microimaging, München	415510-1101-000
Vortexer LSE Vortex Mixer	Corning, Corning (USA)	S1101243
Wasserbad AQUAline AL25 Wasserbad für die Leberisolation	LAUDA, Lauda- Königshofen	LCB0727
Zellschaber	Corning, Corning (USA)	13312013
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo scientific, Waltham (USA)	75003629
μ-Slide VI 0.4	Ibidi, Martinsried	80601

2.2 Chemikalienliste

Tabelle 3: Chemikalienliste

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
Acetaminophen	Sigma, St. Louis (USA)	A5000-100G
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe	3620.1
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe	2267.1
bisBenzimidin H Trihydrochlorid 33342 (Hoechst)	Sigma, St. Louis (USA)	14533-100MG
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe	6943.1
Brij 35	Carl Roth, Karlsruhe	CN21.1

Bromphenol Blau	Carl Roth, Karlsruhe	A512.1
BSA (Bovines Serumalbumin)	Carl Roth, Karlsruhe	8076.4
CaCl ₂ * H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe	CN93.1
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe	Y015.1
Coffein	Sigma, St. Louis (USA)	C0750
Collagenase P, Typ 2	PAA, Pasching (Österreich)	K21-420
ddH ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe	3175.1
DEPC (Diethylenpyrocarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe	K020.3
Desoxycholsäure (DOC)	Carl Roth, Karlsruhe	3484.1
Diclofenac	Sigma, St. Louis USA)	D6899-10G
DMEM high glucose (4,5g/l) mit Glutamin	Sigma, St. Louis (USA)	D5796
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, St. Louis (USA)	67-68-5
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma, St. Louis (USA)	D8537
Easycoll Separating Solution (Percoll, density 1.124)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)	17-0891-01
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe	8043.2
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe	3054.1
Ethanol (99,9 %)	Merck, Darmstadt/ Apotheke des UKT	K42754183
Ethidiumbromidlösung 1 % in Wasser	Carl Roth, Karlsruhe	2218.1
FBS (South American)	Invitrogen, Carlsbad (USA)	41G3510K
Fetales Kalbsserum (FCS)	Gibco, Carlsbad (USA)	10270-106
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo scientific fermentas, Waltham (USA)	K1612
Folinreagenz	Sigma, St. Louis (USA)	F9252
Formaldehydlösung 37 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe	4979.1
Glucose (D-(+))	Sigma, St. Louis (USA)	G7021
Glucoseoxidase	Sigma, St. Louis (USA)	G6125-10kU
Glutaminlösung (L-Glutamin)	PAA, Pasching (Österreich)	M11-006
Griseofulvin	Fagron, (Niederlande)	Rotterdam 700771-0001

Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe	7530.1
Glycogen	Carl Roth, Karlsruhe	HP51.1
Hepes, 1 M	Sigma, St. Louis (USA)	H0887
Histoacrylgewebekleber (5x 0,5ml)	BBraun, Melsungen	1050052
Human Albumin ELISA Quantification Set	Bethyl Laboratories, Montgomery (USA)	E80-129
Humanes Insulin (Actrapid Flex Pen)	Apotheke des UKT	
Isopropanol	VWR, Radnor (USA)	20842.330
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe	HN02.2
Kit Fluitest GPT ALT	Analyticon, Berlin	1187
Kit Fluitest GOT AST	Analyticon, Berlin	1177
Kit Fluitest LDH-L	Analyticon, Berlin	2222
Kupfersulfat*5 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe	P024.1
Leupeptin	Carl Roth, Karlsruhe	CN33.2
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe	4203.1
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe	8355.5
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe	KK36.2
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe	X891.2
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe	P028.1
Natriumchlorid	VWR, Radnor (USA)	27.810.295
Natriumfluorid	Carl Roth, Karlsruhe	P756.1
Natrium-Kalium-Tartrat	Sigma, St. Louis (USA)	S2377
Natrium-L-Lactat	Sigma, St. Louis (USA)	71718-10G
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis (USA)	S6508-10G
Natrium-Pyruvat-Lösung (100 mM)	PAA, Pasching (Österreich)/Sigma, St. Louis (USA)	S11-003/S8636
Natronlauge (2 M)	Carl Roth, Karlsruhe	T135.1
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	PAA, Pasching (Österreich)	M11-003
N-1-Naphthyl-Ethylendiamin-Dihydrochlorid	Sigma, St. Louis (USA)	33461
N-Acetyl-L-Cystein	Carl Roth, Karlsruhe	4126.2
O-Dianisidin	Sigma, St. Louis (USA)	D9143-5G

O-Phthalaldehyd	Sigma, St. Louis (USA)	P1378
p-Coumarinsäure	Carl Roth, Karlsruhe	9908.1
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma, St. Louis (USA)	P0781
Pepstatin A	Sigma, St. Louis (USA)	P4265-5MG
Peroxidase	Sigma, St. Louis (USA)	P8250-5kU
Phalloidin	Sigma, St. Louis (USA)	P2141-1MG
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth, Karlsruhe	6367.1
pUC19-Marker ready-to-use	Carl Roth, Karlsruhe	X901.1
ReadyMix	peqlab, Erlangen	KM5101
Resazurinnatriumsalz	Sigma, St. Louis (USA)	199303-1G
Rhodamin 123	Sigma, St. Louis (USA)	83702
Salzsäure (HCl) 2 M	Carl Roth, Karlsruhe	T134.1
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe	X873.1
Tergitol-Lösung	Sigma, St. Louis (USA)	NP40S-100ml
TriFast (peqGold)	Peqlab, Erlangen	30-2020
TRIS-Base	Sigma, St. Louis (USA)	T1503
Trypsin/EDTA (T/E)	Sigma, St. Louis (USA)	T3924
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe	9127.1
Urea	Carl Roth, Karlsruhe	3941.3
Wasserstoffperoxid (30 % H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe	CP26.5
Williams Medium E	Sigma, St. Louis (USA)	W1878

2.3 Softwareliste

Tabelle 4: Softwareliste

Programm	Name	Verwendungszweck
GraphPad Prism 5	GraphPad Prism	Erstellung von Graphen und statistische Auswertung
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java	Bildauswertung
Microsoft Office 2010	Microsoft Excel Microsoft Powerpoint	Datenauswertung und- aufbereitung

	Microsoft Word	
Omega 1.3	BMG Labtech, Ortenberg	Messung von Absorption und Fluoreszenz in Experimenten

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zellzählung

Für die Zellzählung wurde folgende Lösung angesetzt:

- Trypanblau-Arbeitslösung, bestehend aus 0,75 ml Trypanblau-Stock
0,5 % gelöst in 2,25 ml PBS

Die Zählkammer wurde vor Benutzung mit 70 % Ethanol geputzt. Dann wurde das Deckglas auf der Zählkammer fixiert. Daraufhin wurde die gewünschte Verdünnung aus der Trypanblau-Arbeitslösung und der zu untersuchenden Probe erstellt. Davon wurden 10 µl in die Zählkammer gegeben, jedes der vier großen Quadrate ausgezählt und der Durchschnitt der lebenden Zellen und der Gesamtzellzahl errechnet.

Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$n = c * V * d * F$$

n entsprach der Zellzahl, c dem ausgezählten Durchschnitt, d dem Verdünnungsfaktor und F dem Faktor der Zählkammer, bei der verwendeten Kammer lag dieser bei 10⁴.

Der Quotient aus der Anzahl der lebenden Zellen durch die Gesamtzahl aller Zellen entsprach der Viabilität.

2.4.2 Huh7

Bei den Huh7 handelte es sich um eine erstmals 1982 beschriebene humane Hepatomzelllinie³⁷. Sie zeichnet sich gegenüber anderen Zelllinien, wie

beispielweise HepG2, durch eine bessere Expression von Phase I- und II-Enzymen aus, insbesondere von CYP3A4^{38,39}. Die durch den Hepatomursprung gegebene Immortalität der Zelllinie ermöglichen eine fortlaufende Kultur und konstante Versuchsbedingungen, da eine Zelllinie im Gegensatz zu primären humanen Hepatozyten nicht über eine große Donorvariabilität verfügt^{24,40}.

Das Kulturmedium bestand aus einem Volumen von 500 ml DMEM, dem 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml FCS dazugegeben worden waren.

Wenn die Zellzahl einer Zellkulturflasche ihre Kapazität überschritt, so wurde folgendermaßen vorgegangen, um die Zellen zu splitten und ein weiteres Kultivieren zu ermöglichen:

Das Kulturmedium und Trypsin-EDTA wurden auf 37 °C erwärmt. Das Medium in der Zellkulturflasche wurde abgesaugt und die Flasche mit DPBS gespült. Danach wurde Trypsin/EDTA zugegeben und die Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5-10 Minuten inkubiert, um die Zellen abzulösen. Zur Inaktivierung der Trypsinlösung wurde Kulturmedium hinzugegeben. War dies erfolgt, so wurde die Zellsuspension in ein Falcon gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 600 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand aus Medium und Trypsin/EDTA abgesaugt und die so zentrifugierten Zellen mit 10 ml Medium versetzt. An dieser Stelle konnte eine gegebenenfalls notwendige Zellzählung erfolgen, sofern die Zellen nicht nur passagiert, sondern für Experimente vorbereitet werden sollten. Daraufhin wurden die Zellen je nach experimentellem Design ausgesät oder in ein Kulturgefäß mit Kulturmedium gegeben und die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ fortgesetzt, bis die Zellkulturflasche erneut eine kritische Füllmenge erreicht hatte.

2.4.3 Primäre humane Hepatozyten (pHH)

2.4.3.1 Allgemeines

Primäre humane Hepatozyten sind der Goldstandard für Metabolisierungs-⁴⁰ und Hepatotoxizitätsstudien²⁴. Ihre Verfügbarkeit ist jedoch beschränkt^{16,24}. Die

im Rahmen der Dissertation verwendeten Hepatozyten wurden bei erklärtem Einverständnis von Patienten mit einem primären Lebertumor oder einer Lebermetastase aus der Kapsel des linken oder rechten Leberlappens gewonnen.

2.4.3.2 Isolation von pHH aus Leberresektaten

Die Isolation erfolgt modifiziert nach Knobloch et al., 2012⁴¹.

Folgende Lösungen wurden für die Isolation hergestellt:

- Perfusionslösung I (10x), bestehend aus 83 g NaCl, 5 g KCl und 24 g HEPES, gelöst in 1000 ml ddH₂O, eingestellt auf pH 7,5 mit HCl und NaOH und steril filtriert
- Perfusionslösung II, bestehend aus Lösung A und B
 - Lösung A, bestehend aus 5,85 g NaCl, 0,75 g KCl, 36 g HEPES, 7,5 g BSA, gelöst in 1300 ml ddH₂O
 - Lösung B, bestehend aus 1,05 g CaCl₂·2 H₂O, gelöst in 150 ml ddH₂O
 - 1300 ml Lösung A und 150 ml Lösung B wurden gemischt, auf pH 7,5 mit HCl und NaOH eingestellt und steril filtriert
- Stopplösung, bestehend aus 600 ml PBS und 100 ml FCS
- Hepatozytenkulturmedium, bestehend aus 500 ml Williams Medium E, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 8 µl Hydrocortison, 7,5 ml HEPES, 5 ml Natriumpyruvat, 0,25 µl Humaninsulin, 50 ml FCS und 5 ml nichtessentielle Aminosäuren
- Hepatozytenhungermedium, bestehend aus 500 ml Williams Medium E, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 7,5 ml HEPES

Vorbereitung

Die Zentrifuge wurde auf 4 °C gekühlt. Die peristaltische Pumpe und das Wasserbad wurden unter der Werkbank aufgestellt. Letzteres wurde mit

Wasser befüllt und auf 39 °C erwärmt. Die Perfusionslösungen I und II wurden ebenfalls auf 39 °C erwärmt. Eine 500 ml-Flasche, gefüllt mit 400 ml Perfusionslösung I, wurde in das Wasserbad gestellt. Ein Schlauchsystem und die peristaltische Pumpe wurden vorbereitet. Eine leere 500 ml-Flasche wurde ebenfalls in das Wasserbad gestellt und ein Büchner-Trichter über der Flasche befestigt. Daraufhin wurden die restlichen benötigten Gegenstände unter die Werkbank gestellt. Ein Styroporkarton wurde mit Eis gefüllt und je nach Gewicht des Resektats ungefähr zehn 50 ml-Falcons auf Eis gestellt.

Isolation

Das Gewicht des Leberstücks wurde bestimmt. Dies diente einerseits der Abschätzung, wie viel an Materialien im weiteren Isolationsverlauf benötigt werden würde, andererseits der Dokumentation. Die Knopfkanülen wurden an den Silikonschlauch angeschlossen und es wurde überprüft, ob sie perfundierbar waren. Im Anschluss wurde unter die Werkbank eventuell vorhandenes Blut am Leberstück mit Gaze abgetupft. Die Knopfkanülen wurden an den Blutgefäßanschnitten des Leberstücks mit Gewebekleber fixiert. Daraufhin wurde dem System Fluss appliziert, um nicht verschlossene Gefäßanschnitte aufzufinden und mit Gewebekleber zu verschließen.

Dann wurde die Leber auf den Büchnertrichter gegeben und mindestens 300 ml Perfusionslösung I über einen Zeitraum von 20 bis 30 Minuten zugeführt, um das Blut zu entfernen. Währenddessen wurden 50 ml Perfusionslösung II mit 100 mg Collagenase P gemischt und in eine 500 ml-Flasche steril filtriert, in die zusätzlich 50 ml Stopplösung hinzugefügt wurden. Bis zum Gebrauch wurde die Lösung bei 39 °C aufbewahrt.

Nachdem das Blut aus der Leber entfernt wurde, wurde die Flasche mit der Perfusionslösung II und der Stopplösung unter den Büchnertrichter gestellt. Das Schlauchsystem wurde vom Leberstück entfernt und Perfusionslösung I durch Perfusionslösung II ersetzt. Dann wurden die Knopfkanülen erneut an das Leberstück angeschlossen, eventuelle Leckagen mit Gewebekleber fixiert und für 10-20 Minuten perfundiert, bis die Leber irreversibel deformiert war.

Die so behandelte Leber wurde in die vorbereitete Petrischale gegeben, die Knopfkanülen entfernt und Stopplösung hinzugegeben. Das Leberstück wurde mit einem Skalpell in zwei Hälften geschnitten und die Hepatozyten mit der Stopplösung herausgespült. Die so mit Zellen angereicherte Stopplösung wurde durch einen mit Gaze ausgekleideten Trichter in 50ml-Falcons abfiltriert.

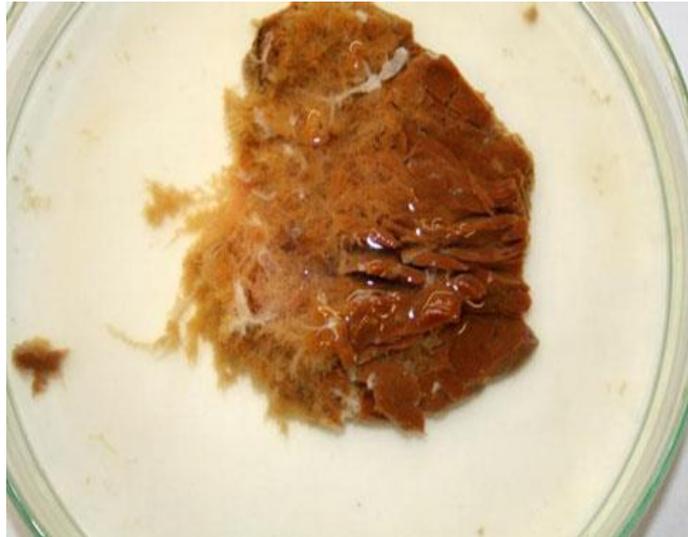


Abbildung 3: Spülen des Leberstücks in Stopplösung zur Inhibierung der Collagenaseaktivität im Rahmen der Isolation von Hepatozyten. Foto übernommen von A. Bachmann.

Dann erfolgte die Zentrifugation für fünf Minuten bei 100 g und 4 °C. Der Überstand wurde abgesaugt, in jedes Falcon 50 ml PBS gegeben und die Falcons auf Eis gestellt. Außerdem erfolgte zu diesem Zeitpunkt eine Zellzählung, um abzuschätzen, ob Percoll nötig sein könnte. Dazu wurden die Viabilität ermittelt. Falls die Viabilität gut und kein Percoll nötig war, wurde erneut für fünf Minuten bei 100 g und 4 °C zentrifugiert, das PBS abgesaugt und in jedes Falcon 50 ml Hepatozytenmedium gegeben.

Dichtegradientenzentrifugation (Percoll)

Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers GE Healthcare. Es wurde fünfundzwanzigprozentige Percollarbeitslösung hergestellt, dazu wurden 5 ml Percolllösung und 15 ml PBS in ein 50 ml-Falcon gegeben. Ungefähr 5 ml der Zelllösung wurden pro Falcon vorsichtig auf die Percolllösung gegeben.

Die Zentrifugation erfolgte für zwölf Minuten bei 1300 g, 4 °C und minimaler Beschleunigung und minimalem Bremsen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit PBS versetzt. Die Pellets wurden zusammengeführt und für fünf Minuten bei 100 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und Hepatozytenmedium hinzugegeben. Danach erfolgte eine erneute Zellzählung. Die gesamte Isolation erfolgte im Team, da verschiedene Aufgaben gleichzeitig auszuführen waren.

2.4.3.3 Aufarbeitung von verschickten pHH

Vor Beginn der Aufarbeitung wurde PBS auf Eis gestellt und die Zentrifuge auf 4 °C gekühlt. Die Zellen wurden aus dem Transportgefäß mit PBS in 50 ml-Falcons überführt, wobei jedes Falcon mit maximal $50 \cdot 10^6$ Zellen befüllt wurde. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 100 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in PBS gelöst. Lagen mehrere Pellets vor, so wurden diese zusammengeführt. Daraufhin erfolgte eine Zellzählung. War die Viabilität nicht ausreichend, so wurde eine Dichtegradientenzentrifugation angeschlossen, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben.

War keine Dichtegradientenzentrifugation nötig, so wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in Hepatozytenmedium gelöst und eine erneute Zählung durchgeführt.

2.5 Kultursysteme

2.5.1 2D-Kultur

Die 2D-Kultur gilt als Goldstandard der Hepatozytenkultursysteme^{15,16} und wurde als Kontrolle für die Versuche mit den verwendeten 3D-Kultursystemen verwendet. Dabei wurden 6-Well-Platten, die zuvor mit 750 µl einer Kollagenlösung kollagenisiert worden waren, verwendet. Die Lösung bestand

aus einem Kollagengel der Konzentration 2,5 mg/ml, das 1:20 in PBS verdünnt worden war, sodass in der Lösung eine Konzentration von 125 µg/ml erzielt wurde. Vor Verwendung wurde die Kollagenlösung abgesaugt und jeder Well mit PBS gespült. Pro Well wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät, das Volumen der zugegebenen Medien oder Versuchslösungen betrug jeweils 2 ml pro Well. Die Adhäsionsdauer lag bei 1-4 Stunden für Huh7 und 4-24 Stunden für pHH. Die Versuchsdurchführungen in den 2D-Kulturen erfolgten mit Ausnahme der fehlenden Applikationsmöglichkeit von Fluss und den angepassten Volumina exakt wie in den dreidimensionalen Kultursystemen.

2.5.2 Kollagensandwich

Die Herstellung erfolgte modifiziert nach Godoy et al., 2013²⁴.

Zur Herstellung eines Kollagensandwichs wurde folgende Lösung hergestellt:

- Kollagensandwichlösung, bestehend aus 0,6 ml Kollagenlösung der Konzentration 10 mg/ml, 0,3 ml DMEM 10x und 2,1 ml PBS. Der pH wurde mit Natronlauge und Salzsäure auf 7,4 eingestellt. Es wurde auf Eis gearbeitet, um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern.

Pro Well wurden 100 µl der Kollagensandwichlösung aufgebracht, mit dem breiten Ende einer Pipettenspitze verteilt und für 30-45 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis das Kollagen fest geworden war. Dann wurden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät und 500 µl Medium pro Well hinzugegeben. Die Adhäsionsdauer variierte je nach Zelltyp. Nach der Adhäsion wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt, um akzidentielles Absaugen von Wellinhalt zu vermeiden. Jeder Well wurde mit 500 µl PBS gewaschen, auch das PBS wurde mit einer Pipette entfernt. Danach wurden erneut 100 µl Kollagensandwichlösung pro Well zugegeben und für 30-45 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis das Kollagen sich verfestigt hatte.

2.5.3 Zell-Slide/Zellchip

Beim Zellchip von ibidi handelte es sich um einen Prototypen.

2.5.3.1 Der Aufbau des Zellchips

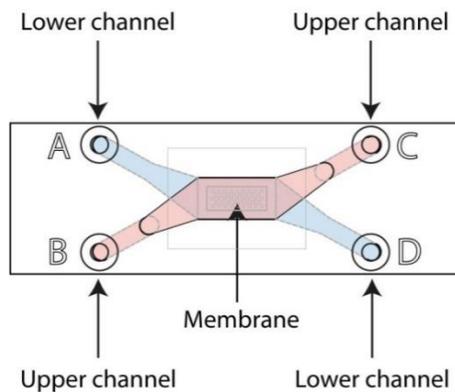


Abbildung 4: Aufbau des Zellchips in Draufsicht, Quelle: ibidi

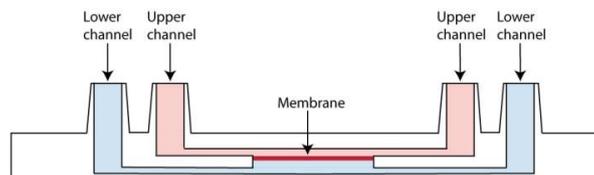


Abbildung 5: Aufbau des Zellchips seitlich, Quelle: ibidi

Der Zellchip wurde in einem Stück geliefert und setzte sich wie folgt zusammen: Er besaß einen unteren Kanal, der durch die Ports A und D gespült werden konnte. Der obere Kanal konnte durch die Ports B und C gespült werden. Zwischen den Kanälen befand sich die Membran.

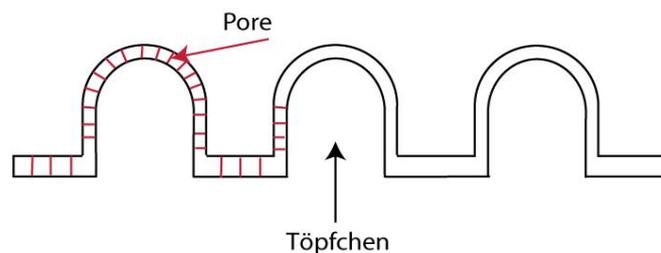


Abbildung 6: Membranaufbau des Zellchips von ibidi. Bildquelle: ibidi

Sie war gleich aufgebaut wie die im Bioreaktor verwendete Membran, jedoch aus verfahrenstechnischen Gründen umgedreht eingebaut, weshalb es für die Adhäsion nötig war, den Chip mit dem unteren Kanal nach oben aufzustellen.

2.5.3.2 Zellkultur im Zellchip

Das Kollagenisieren erfolgte gemäß dem Handbuch von ibidi. Hierzu wurde von Port A nach D, dem unteren Kanal entsprechend, mit 2 ml 30% Glycerol gespült. Dann wurde mit 2 ml 30% Glycerol von Port B nach C, dem oberen Kanal entsprechend, gespült. Schließlich wurde von Port A nach D 0,5 ml Kollagen der Konzentration 0,1 mg/ml, in Essigsäure gelöst, zugegeben und für 40 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Zur Zellaussaat wurden von Port A nach C 50 µl Medium mit 10^6 Zellen zugeführt, für Huh7 DMEM mit P/S und FCS und für pHH Hepatozytenmedium, zugegeben und 25 µl passendem Medium nachgespült, ebenfalls von A nach C. Schließlich erfolgte eine Inkubation von 1 Stunde für die Huh7 und für 4-24 Stunden für die pHH. Nach der Adhäsion wird überprüft, wie viele Zellen ausgespült wurden, indem der Chip mit PBS gespült und das gesammelte PBS ausgezählt wurde.

2.5.3.3 Probleme des Zellchips

Der Zellchip unterlag einigen Limitationen. Die Schwierigkeiten begannen bei der Beschaffung. So war die Verfügbarkeit des Zellchips während der gesamten experimentellen Tätigkeit in großen Phasen nur eingeschränkt, da die Herstellung des Gehäuses und der Membran, auf die die Zellen ausgesät wurden, von unterschiedlichen Herstellern durchgeführt wurde. Die Chips wurden dann von Hand zusammengebaut, wobei das Gehäuse, je nach Generation, aus mehreren zusammengeklebten Einzelteilen bestand, woraus sich Prädilektionsstellen für Leckagen während des Experimentierens ergaben.

Auch die Durchführung von Experimenten gestaltete sich schwierig. Während der experimentellen Arbeit kamen zwei Generationen des Zellchips zum Einsatz. Die erste Generation ließ sich zwar mit Zellen beimpfen, allerdings liefen alle Chips bis auf eine Ausnahme bei der Perfusion am Ansatz der Ports am Gehäuse an den besagten Prädilektionsstellen aus. Die zweite Generation Chips besaß ein Gehäuse, das aus einem Stück bestand, allerdings verfügte das Gehäuse über zwei zusätzliche blinde Ports, die in mehreren Fällen jedoch nicht blind waren. Auch das Perfundieren der unbearbeiteten Chips durch die Membran war nur schwerlich möglich, da sich der Chip mit der zur Perfusion verwendeten Flüssigkeit aufblähte und Fluss nur durch starken Druck der Pumpe überhaupt möglich war. Lediglich Superfusion funktionierte mit den bereits oben angeführten Einschränkungen. Unter diesen Umständen wurden die Zellen nicht nach SOP ausgesät, sondern lediglich in den unteren Kanal eingefügt, statt via Perfusion in die Membran gespült zu werden. Die Adhäsion erfolgte dann im gedrehten Chip. Eine Vergleichbarkeit mit dem Bioreaktor, bei dem das Beimpfen und alle Versuche in Perfusion erfolgen konnten, war so nur eingeschränkt gegeben.

Aus den oben angeführten Gründen wurde der Zellchip nur für die Untersuchung der Gallensäurebildung verwendet, da hierbei die grundsätzliche Eignung der Membran für die 3D-Kultur von pHH ohne Perfusion untersucht werden sollte.

2.5.4 r3^D- KITChip Bioreaktor

Der Fabrikationsprozess des KITChip Bioreaktors wurde von Altmann et al. und Gottwald et al. beschrieben^{42,43}. Experimente mit Rattenhepatozyten wurden bereits in ihm durchgeführt¹⁹.

2.5.4.1 Aufbau des Bioreaktors und des Schlauchsystems

Der Bioreaktor bestand aus einem Plastikgehäuse, in das zwei Deckgläser, drei Plastikdichtleisten und eine Membran eingebracht waren. Das Gehäuse besaß

vier Ports, die von links nach rechts mit 1 bis 4 durchnummeriert wurden. Nur die Membran war hierbei ein Einmalprodukt.

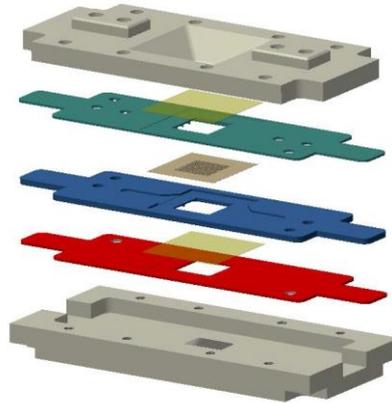


Abbildung 7: Schichtaufbau des Bioreaktors, bestehend aus einem grauen Plastikgehäuse, 3 Lagen Plastikdichtleisten und einer Membran. Der Reaktor wurde durch Deckgläser nach außen verschlossen. Quelle: KITChip-Handbuch⁴⁴.

Port 1 und 4 ermöglichten dabei ein Durchspülen des unteren, Port 2 und 3 des oberen Kanals. Eine Perfusion durch die Membran war von oben nach unten von Port 2 nach Port 4, von unten nach oben von Port 1 nach Port 3 möglich.



Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Bioreaktors. Modifiziert aus dem KITChip-Handbuch⁴⁴.

Das Schlauchsystem verband das Falcon, das die zu perfundierende Flüssigkeit enthielt, mit dem Bioreaktor. Dabei fasste das ganze System mit dem Bioreaktor 2 ml. Das Falcon war mit 4 ml Flüssigkeit gefüllt, sodass während der Versuchsdurchführung stets 6 ml Flüssigkeit verwendet wurden.

Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, wurden alle dem Bioreaktor zugegebenen Flüssigkeiten auf 37 °C erwärmt.



Abbildung 9: Der r3^D-KitChip Bioreaktor; übernommen von A. Bachmann. Links im Bild befindet sich die Pumpe von Ismatec, in der Mitte der r3^D-KITChip Bioreaktor und rechts eine Schott-Flasche, in der sich das Flüssigkeitsreservoir, mit dem der Reaktor perfundiert wird, befindet.

2.5.4.2 Zellkultur im Bioreaktor

Für die Arbeit mit dem Bioreaktor wurde eine Flussgeschwindigkeit von 200 µl/min gewählt. Zwar wurde gezeigt, dass Flussgeschwindigkeiten von 400 µl/min insbesondere für Kulturen von längerer Dauer besser geeignet sind^{43,45}, allerdings erwies sich im Rahmen der Versuchsdurchführung, dass eine Flussrate von 200 µl/min zu wesentlich weniger Störfällen, insbesondere Auslaufen an den Ports, führte und somit eine verlässliche Versuchsdurchführung erst möglich wurde.

Für das Kollagenisieren des Bioreaktors wurde zuerst mit 3 ml 100% Isopropanol von Port 2 nach 3, dem oberen Kompartiment entsprechend, gespült, bis dieses gefüllt war, danach wurde von Port 2 nach Port 4 durch die Membran gespült. Danach wurden 3 ml 50% Isopropanol von Port 2 nach Port 4 zugeführt. Daraufhin wurden insgesamt 10 ml ddH₂O für die Spülung von Port 1 nach Port 4, dem unteren Kompartiment entsprechend, von Port 1 nach Port 3, von unten durch die Membran, und von Port 2 nach Port 3 zur Entfernung von Luftblasen, verwendet. Schließlich wurden 450 µl Kollagenlösung der Konzentration 125 µg/ml zugegeben, erst von Port 2 nach Port 3, bis das obere

Kompartiment gefüllt war, dann von Port 2 nach Port 4 durch die Membran. Danach wurden der Zu- und der Abflussschlauch abgeklemmt, damit der Reaktor keine Luft ansog und für 2 Stunden im Brutschrank oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Zur darauffolgenden Beimpfung mit Zellen wurden 150 µl einer $2 \cdot 10^6$ Zellen beinhaltenden Lösung in den Dreiwegehahn gegeben. Die Pumpe lief dabei rückwärts von Port 3 nach Port 2, bis das obere Kompartiment gefüllt war. Nachdem das obere Kompartiment gefüllt war, erfolgte die Perfusion von Port 3 nach Port 1, bis die Zelllösung vollständig im Reaktor angekommen war. Die Inkubation erfolgte für Huh7 für 4 Stunden, für pHH über Nacht. Vor Versuchsbeginn wurde überprüft, wie viele Zellen ausgespült worden waren, indem der Bioreaktor mit PBS gespült und das gesammelte PBS ausgezählt wurde.

2.6 Quantifizierung des Zellschadens

2.6.1 Lactatdehydrogenase (LDH)

Die LDH kommt in verschiedenen Organen vor⁶. Sie katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Lactat und zurück und schließt den anaeroben Weg der Glycolyse ab⁵. Erhöhte LDH-Werte findet man bei vielen verschiedenen Formen von Zellschädigungen, beispielsweise bei schweren Leberschäden oder Hämolysen⁶.

Zur Messung wurde das Kit Fluitest LDH-L der Firma Analyticon verwendet. Dabei wurde das Prinzip der NADH⁺-Bildung bei der Reaktion von Lactat und NAD⁺ zu Pyruvat und NADH⁺ ausgenutzt. Das Kit beinhaltete die Lösungen R1 und R2 für die LDH-Messung.

Zur Messung wurden fünf Teile R1 und ein Teil R2 gemischt. 100 µl der so hergestellten Lösung wurden auf 85 µl Überstand gegeben. Die Messung erfolgte bei 340 nm in einer 96-Well-Platte über 10 Minuten in 11 Zyklen.

Zur Berechnung wurde folgender Korrekturfaktor F angewandt⁴⁶:

$$F = \text{Gesamtvolumen} / (\varepsilon * d * \text{Probevolumen})$$

Dabei entspricht ε dem Extinktionskoeffizienten von NADH 6300 l/(mol*cm) und d der Schichtdicke bzw. Höhe im Well 0,56 cm. Der so ermittelte Korrekturfaktor war für die gewählten Volumina 616,9.

2.6.2 Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Zu Beginn des Kapitels ist anzumerken, dass Aspartat-Aminotransferase (AST) ein Synonym für GOT und Alanin-Aminotransferase (ALT) ein Synonym für GPT ist.

GPT ist hauptsächlich in der Leber im Zytosol lokalisiert⁶. Es katalysiert die Reaktion von Alanin und α -Ketoglutarat zu Pyruvat und Glutamat und zurück^{5,6}. Zur GPT-Messung wurde das Kit Fluitest GPT ALT der Firma Analyticon verwendet. Dabei wurde das durch die GPT gebildete Pyruvat von zugegebener LDH mit NAD^+ zu NADH^+ und Lactat umgesetzt und der NADH^+ -Abfall gemessen. Das Kit beinhaltet die Lösungen R1 und R2 für die GPT-Messung. GOT ist ein Enzym, das in der Leber, der Muskulatur und dem Gehirn zu finden ist⁶. Es katalysiert die Reaktion von Aspartat und α -Ketoglutarat zu Oxalacetat und Glutamat und zurück^{5,6}. Es ist, je nach Isoform, mitochondrial oder zytosolisch lokalisiert⁶. Durch den sogenannten De-Ritis-Quotienten, dem Quotienten von GOT durch GPT, kann die Schwere eines Leberschadens eingeschätzt werden⁷.

Zur GOT-Messung wurde das Kit Fluitest GOT AST von Analyticon verwendet. Das durch die GOT gebildete Oxalacetat wurde in einer zweiten Reaktion durch zugegebene MDH mit NADH^+ zu Malat und NAD^+ umgesetzt und der NADH^+ -Abfall gemessen. Im Kit waren die Lösungen R1 und R2 für die GOT-Messung enthalten.

Zur Messung wurden, fünf Teile R1 und ein Teil R2, jeweils für die GPT- oder GOT-Messung, gemischt. 100 µl der so hergestellten Lösung wurden auf 85 µl Überstand gegeben. Die Messung erfolgte bei 340 nm in einer 96-Well-Platte über 10 Minuten in 11 Zyklen. Zur Berechnung wurde der Korrekturfaktor aus Kapitel 2.6.1 verwendet.

2.6.3 Resazurinumsatz

Resazurin wird durch mitochondriale Aktivität in Resorufin, ein fluoreszierendes Molekül umgewandelt⁴⁷. Durch die Messung wird der Zellschaden indirekt über die Schädigung der Mitochondrien festgestellt. Die Reaktion erfolgt wie unten dargestellt:

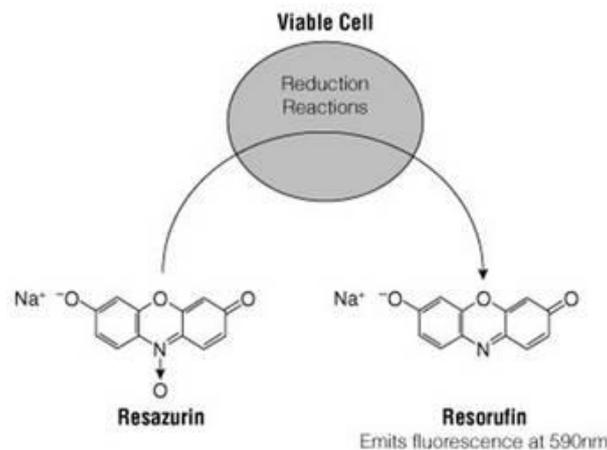


Abbildung 10: Resazurinumsatz zu Resorufin im Rahmen einer Reduktionsreaktion (Entnommen aus dem Promega Celltiter-Blue® Cell Viability Assay Handbuch, S. 9⁴⁸)

Die Messung des Resazurinumsatzes erfolgt modifiziert nach McMillian et al., 2002⁴⁷.

Für die Messung des Resazurinumsatzes wurden folgende Lösungen hergestellt:

- Resazurinstocklösung (11x), bestehend aus 0,125 g Resazurinnatriumsalz, gelöst in 500 ml PBS

- Resazurinarbeitslösung, bestehend aus 100 µl Resazurinstocklösung und 1 ml PBS

Das Medium wurde von der Platte entfernt und jeder Well mit PBS gewaschen. Auf jeden Well wurden dann, abhängig von der Größe der Platte (z.B. 2 ml pro Well in der 6-Well-Platte), Resazurinarbeitslösung gegeben. Dann wurde nach festgelegten Zeitpunkten (30, 60, 120 und 180 Minuten) Proben abgenommen.

2.7 Untersuchung der Syntheseleistung von Huh7 und pHH unter Medikamentengabe

Der Versuchsablauf ist in nachfolgendem Schaubild dargestellt.

Versuchsschema zur Beurteilung der Syntheseleistung

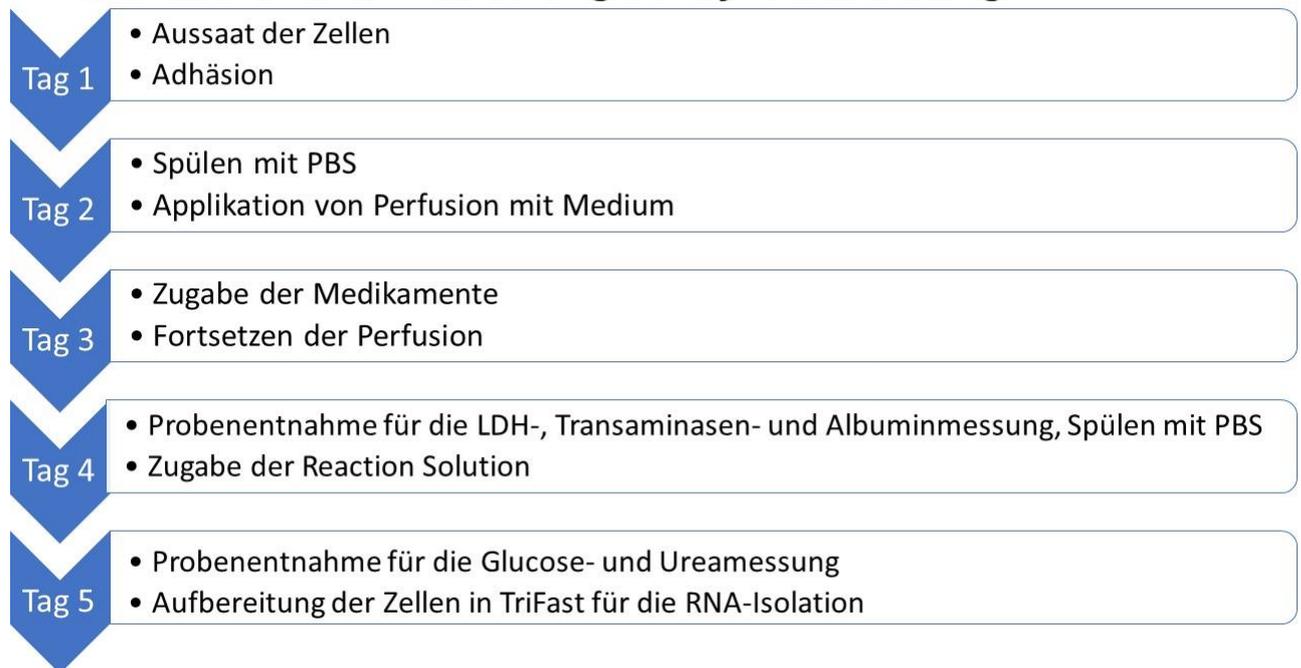


Abbildung 11: Schema des Versuchs zur Beurteilung der Syntheseleistung von Huh7 und pHH unter dem Einfluss von Paracetamol oder Diclofenac.

2.7.1 Gluconeogenese und basale Ureasyntese

Gluconeogenese und Urea-Synthese werden von Hepatozyten durchgeführt⁵. Ihre Freisetzung kann daher Rückschlüsse auf die Funktion der Zellen geben. Es wurde die Wirkung von Paracetamol, das von nun an mit APAP abgekürzt wird, und Diclofenac darauf untersucht. Um gleichzeitig Glucose und Urea untersuchen zu können, wurde lediglich die basale Ureasyntese untersucht.

Folgende Lösungen wurden für die Versuchsdurchführung verwendet:

- 100 µM APAP, gelöst in ddH₂O
- 1000 µM APAP, gelöst in ddH₂O
- 100 µM Diclofenac, gelöst in ddH₂O
- 750 µM Diclofenac, gelöst in ddH₂O

Folgende Lösungen wurden für die Glucosemessung verwendet:

- Reaktionslösung (RS), bestehend aus 19 mg MgCl₂, 2 ml Natrium-Pyruvat-Lösung 100 mM, gelöst in 200 ml PBS, steril filtriert und bei 4 °C gelagert
- L-Lactat-Lösung, bestehend aus 10 ml RS und 10 mg Natrium-L-Lactat
- Glucose-Stock-Lösung für die Standardkurve, bestehend aus 10,8 mg D-Glucose und 10 ml RS, 1:10 verdünnt mit RS
- 1 M TRIS-Puffer mit pH 8, bestehend aus 12,2 g TRIS, 60 ml ddH₂O, auf pH 8 gebracht mit NaOH und dann auf 100 ml mit ddH₂O aufgefüllt
- Gesättigte O-Dianisidin-Lösung, bestehend aus 10 mg O-Dianisidin und 1 ml 99,9 % Ethanol
- GLOX-Lösung, bestehend aus 15,5 mg Glucoseoxidase, 2,8 mg Peroxidase, 10 ml 1 M TRIS-Puffer mit pH 8, 31,7 mg EDTA, 40 ml ddH₂O und 400 µl gesättigter O-Dianisidin-Lösung

Folgende Lösungen wurden für die Harnstoffmessung verwendet:

- Urea-Stock-Lösung für die Standardkurve, bestehend aus 10 mg Urea, 10 ml RS, 1:10 verdünnt mit RS

- 10 % Brij 35-Lösung, bestehend aus 5 g Brij 35 und 50 ml ddH₂O für das NED-Reagenz
- O-Phthalaldehydlösung, bestehend aus 800 ml ddH₂O, 74 ml konzentrierter H₂SO₄, 200 mg O-Phthalaldehyd, 3 ml Brij-Lösung, aufgefüllt auf 1 l mit ddH₂O
- NED-Reagenz, bestehend aus 600 ml ddH₂O, 222 ml konzentrierter Schwefelsäure, 5 g Borsäure, 3 ml Brij-Lösung, 600 mg N-(1-Naphthyl)Ethylendiamindihydrochlorid, aufgefüllt auf 1 l mit ddH₂O

Der Versuch erstreckte sich über 5 Tage:

Am ersten Tag erfolgte nach Kollagenisieren das Beimpfen mit Zellen sowohl der 2D-Kultur als auch der Bioreaktoren.

Am zweiten Tag wurde der Reaktor mit PBS gespült und die nicht adhärennten Zellen ausgezählt. Dann erfolgte eine Perfusion mit Medium für 24 Stunden.

Am dritten Tag wurden die Zellen mit APAP oder Diclofenac gestresst. Es wurde in der 3D-Kultur und in der 2D-Kultur je eine Kontrolle unbehandelt belassen und 100 µM und 1000 µM APAP oder 100 µM und 750 µM Diclofenac zugegeben. Die Konzentrationen wurden vom Konsortium, das dieses Projekt entworfen hat, festgelegt. Danach wurde erneut für 24 Stunden inkubiert. Außerdem wurden vor Medikamentengabe Proben für die LDH- und Transaminasenbestimmung genommen.

Am vierten Tag wurde erneut mit PBS gespült. Danach wurde RS zugegeben. Im Rahmen der Dissertation wurde die basale Harnstoffsynthese untersucht, da der Fokus auf der Toxizitätsuntersuchung lag und keine ausreichende Anzahl an 3D-Kultursystemen für einen Vergleich zwischen basaler und stimulierter Harnstoffmessung bei Medikamentengabe vorlag. Zuvor wurde das Medium zur LDH- und Transaminasenbestimmung nach Medikamenteneinfluss entnommen und bei 4 °C aufbewahrt. Das für die Albuminmessung entnommene Medium wurde bis zur Vermessung bei -80 °C gelagert. Danach erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden.

Am fünften Tag erfolgte die Probenabnahme für die Glucose- und Ureamessung. Dazu wurden jedem Ansatz 1 ml Probe entnommen und bei 4

°C bis zur Messung verwahrt. Zusätzlich wurde die Membran des 3D-Systems in TriFast eingelegt und bei -80 °C verwahrt, um aus ihr RNA zu gewinnen. Analog dazu wurde jeder Well mit 500 µl TriFast versetzt, nachdem die RS entfernt worden war, um die so erstellte Lösung dann abzuschaben und in einem Eppendorfgefäß bei -80 °C zu verwahren.

Der Glucosestandard wurde, beginnend bei 150 nmol/ml, in um 30 nmol/ml abnehmenden Schritten pipettiert. Dann wurden jedem Ansatz 150 µl GLOX-Lösung und 100 µl Probe pro Well hinzugegeben.

Der Ureastandard wurde, bei 100 µg/ml beginnend, in 1:2-Verdünnung pipettiert. Danach wurden 60 µl O-Phthalaldehydlösung, 60 µl NED-Reagenz und 80 µl der Proben pro Well hinzugegeben. Daraufhin erfolgte eine ein- bis zweistündige Inkubation im Brutschrank. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 420 nm für Glucose und bei 460 nm für Harnstoff im Plate Reader.

2.7.2. Albuminsynthese

Die Messung erfolgte modifiziert nach den Angaben des Herstellers Bethyl Laboratories.

Albumin wird in der Leber synthetisiert und trägt einen großen Teil zum kolloidosmotischen Druck des Blutes und dessen Transportkapazität von Medikamenten und damit auch der Entgiftung von Stoffen bei^{5,7,8}. Die Albuminmessung kann also ebenfalls Rückschlüsse auf die Funktion der Leberzellen ermöglichen.

Für die Messung des Albumingehalts im Überstand wurden folgende Lösungen verwendet:

- Coating-Puffer, bestehend aus 1:100 verdünntem Coating-Puffer, verdünnt in TBS, dem 50 mM NaHCO₃ und 50 mM Na₂CO₃ zugegeben wurden
- Waschpuffer, bestehend aus 0,05 % Tween 20 in TBS

- Blocking-Lösung, bestehend aus 1 % BSA in TBS
- Proben-Konjugatpuffer, bestehend aus 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 in TBS
- Reaktionslösung A, bestehend aus 25 µl Luminol-Stammlösung und 11 µl p-Coumarinsäure-Stammlösung, gelöst in 2,5 ml 100 mM TRIS-Puffer
- Reaktionslösung B, bestehend aus 5 µl 30 % H₂O₂, gelöst in 2,5 ml 100 mM TRIS-Puffer
- BSA-Stocklösung der Konzentration 400 ng/µl

Die Schritte bis zur Entnahme des Überstandes für die Albuminmessung sind in Kapitel 2.7.1 beschrieben. Zur Messung der Albuminkonzentration im Überstand erfolgte bis zum Schritt der Inkubation mit dem Detektions-Antikörper nach Herstellerangaben des Human Albumin ELISA Quantification Sets. Hierfür wurden 100 µl des Coating-Puffers auf eine 96-Well-Albumin-ELISA-Platte gegeben und im Dunkeln für eine Stunde unter stetem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände verworfen, fünffach mit Waschpuffer gewaschen und jedem Well 200 µl Blocking-Lösung zugegeben. Daraufhin erfolgte eine Inkubation unter den obigen Bedingungen für 30 Minuten.

Danach wurde die Platte erneut gewaschen und 100 µl der Proben in den gewünschten Verdünnungen 1:50 und 1:100 zugegeben. Die Verdünnung erfolgte mit Proben-Konjugatpuffer. Zusätzlich wurde der Standard hinzu pipettiert, wobei hierfür BSA-Stocklösung mit Proben-Konjugatpuffer verdünnt und in serieller 1:2-Verdünnung auf die Platte gegeben wurde. Die Platte wurde erneut unter den obigen Bedingungen für eine Stunde inkubiert und gewaschen. Im Anschluss wurde gemäß den Angaben des Herstellers der Horseradish-Peroxidase-Antikörper mit Proben-Konjugatpuffer verdünnt und 100 µl davon in jedes Well gegeben, erneut wie bereits ausgeführt 60 Minuten inkubiert und gewaschen.

Zur Lumineszenzmessung wurden jedem Well 100 µl der Reaktionslösungen A und B zugegeben und die Platte im Plate Reader vermessen.

2.8 Untersuchung der Biotransformation von Huh7 und pHH

2.8.1 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR

2.8.1.1 RNA-Isolation

Die Gewinnung der RNA war mit Problemen verbunden. Es zeigte sich, dass sich die Membranen des Bioreaktors, eingelegt in TriFast und aufbewahrt bei -80°C über einen Zeitraum von mehreren Monaten, aufgelöst und die Proben so verunreinigt hatten. Diese führte dazu, dass RNA, insbesondere in der 3D-Kultur, nur in geringer Quantität und Qualität gewonnen werden konnte, weshalb es zu kleineren N und n kam. Schwierigkeiten bei der Isolation von RNA aus 3D-Kultursystemen sind bereits in der Literatur beschrieben⁴⁹.

Die RNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers peqlab. Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

- DEPC- H₂O, bestehend aus 1 ml DEPC und 1 l ddH₂O
- 70 % Ethanol, bestehend aus 35 ml 99 % Ethanol und 15 ml DEPC- H₂O
- 5 % Glycerollösung in 5X-TBE gelöst, bestehend aus 0,89 M TRIS, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA in ddH₂O
- 1,5 % Agarosegel, bestehend aus 1,7 g Agarose, gelöst in 100 ml TBE und 7 µl Ethidiumbromidlösung
- TriFast

Auf die Membran des Bioreaktors wurden in einem Eppendorfgefäß 500 µl TriFast gegeben, für die 2D-Kulturen wurden entsprechend 500 µl TriFast pro Well verwendet, mit einem Zellschaber gekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Phasentrennung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 500 µl TriFast wurden 100 µl Chloroform zugegeben, danach wurde gevortext und erneut bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 14000 g für 10 Minuten zur Phasentrennung.

Zur RNA-Fällung wurde die so abgetrennte obere wässrige Phase in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol pro ursprünglich verwendeten 500 µl TriFast versetzt. Zur Steigerung der Ausbeute wurde pro verwendetem Volumen Isopropanol 0,3-mal so viel Natriumacetat zugegeben. Danach wurde erneut gevortext und 1 µl Glykogen zugegeben. Dann wurde für 24 Stunden bei -20 °C inkubiert. Daraufhin wurde 5-15 Minuten bei 4 °C inkubiert und dann für eine Stunde bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert.

Das so gewonnene Pellet wurde gewaschen und mit 1000 µl 70 % Ethanol aufgenommen, gevortext und bei 4 °C und 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, auf das Verdunsten des Ethanols bei geöffnetem Eppendorfgefäß gewartet und das RNA-Pellet dann in 20 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Zur Quantifizierung der RNA wurde zuerst die LVis-Plate auf Staub kontrolliert, indem auf jeden benötigten Platz 2 µl DEPC-H₂O gegeben und im Plate-Reader bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen wurde. Absorptionswerte kleiner 0,03 galten als ausreichend sauber. Danach wurde das DEPC-H₂O entfernt und 2 µl der RNA-Lösung bei gleichen Wellenlängen gemessen.

Die Überprüfung der Integrität erfolgte durch Gelelektrophorese, wobei 4/5 RNA mit 1/5 5X-Ladepuffer gemischt wurden, bestehend aus 5mg/ml Bromphenolblau und 5 % Glycerol, gelöst in 5X TBE. 10 µl einer so erstellten Probe und 3 µl pUC19-Marker wurden auf ein 1,5 % Agarosegel, bestehend aus 1,7 g Agarose, 100 ml TBE und 7 µl Ethidiumbromid gegeben. Dann wurden für 45 Minuten 90 V angelegt und die Banden danach mit dem Gel-Doc-System abgebildet.

2.8.1.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte aus der gewonnenen mRNA. Zuerst wurde durch die reverse Transkriptase ein RNA-DNA-Hybrid gebildet⁵. Dieser wurde gespalten und der DNA-Einzelstrang mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase komplementär ergänzt⁵.

Die cDNA-Synthese erfolgte nach Angaben des Kitherstellers Thermo scientific fermentas. Dazu wurde aus dem First Strand Synthesis Kit folgende Lösung erstellt:

- Mastermix, , bestehend aus 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix, 2 µl M-Mulv und 1 µl Ribolock

Zur cDNA-Synthese wurde das First Strand Synthesis Kit verwendet. Die RNA wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 9 µl aufgefüllt, wobei jeder Probe je 1 µl Random-Hexamer- und Oligo(dT)₁₈-Primer und 9 µl Mastermix zugegeben wurde. Dann wurde gevortext und kurz zentrifugiert. Die Synthese erfolgte gemäß dem Programm des Cyclers. Nach erfolgter Synthese wurde die cDNA mit DEPC-Wasser auf eine Menge von 10 ng in einem definierten Volumen verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.8.1.3 PCR

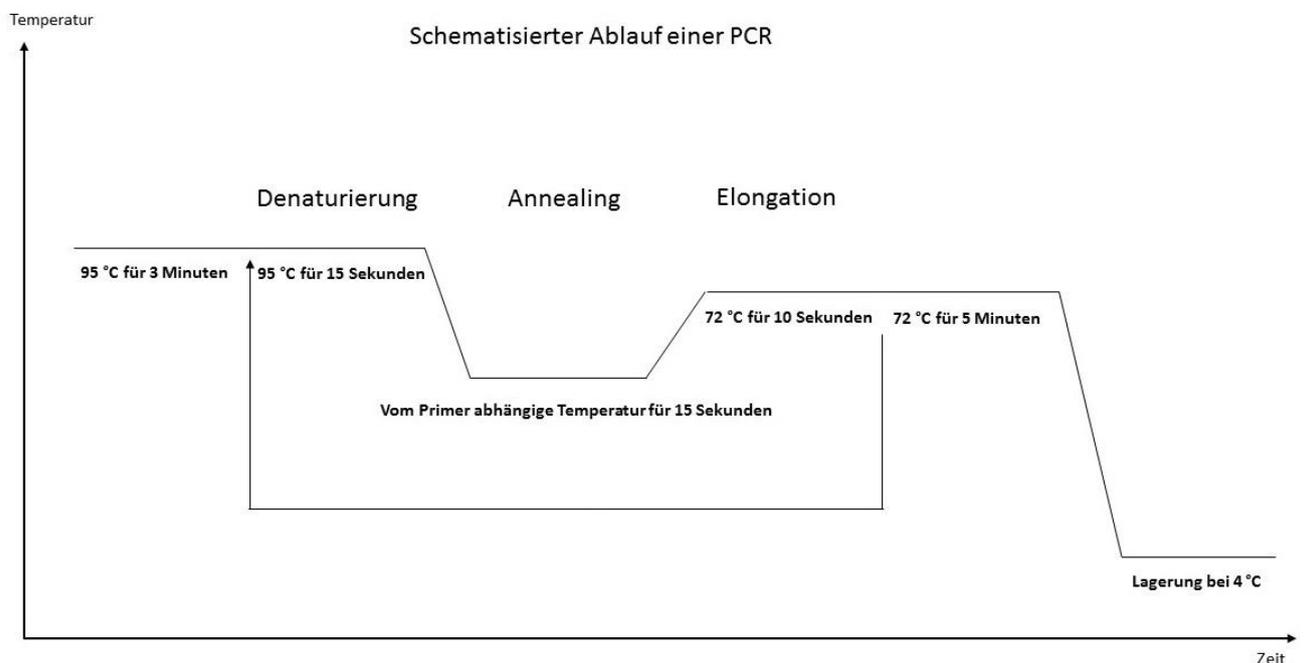


Abbildung 12: Schematischer PCR-Ablauf, Beschreibung nach Löffler et al., 2006, Biochemie & Pathobiochemie, S. 247, Springer Medizin Verlag, Heidelberg⁵ und modifiziert.

Die PCR erfolgte aus der gewonnenen cDNA. Zunächst erfolgte die Denaturierung⁵. An die so gewonnenen Einzelstränge lagerten sich zunächst Primer, die vom gewünschten Zielgen abhängen, an⁵. Im Anschluss erfolgte die Elongation, indem Desoxyribonucleotide angelagert wurden, bis erneut ein Doppelstrang gebildet wurde⁵. Wurde dieser Zyklus wiederholt, so erhielt man eine amplifizierte spezifische Sequenz⁵.

Für die PCR wurden 10 µl ReadyMix mit 6 µl DEPC-Wasser, 2 µl Probe und je 1 µl des gewünschten forward- und reverse-Primer gemischt, gevortext und zentrifugiert. Die Negativkontrolle bestand aus DEPC-Wasser statt cDNA, die Positivkontrolle aus cDNA, in der das gesuchte Gen bereits nachgewiesen werden konnte.

Die Annealing-Temperatur der Primer ist in Tabelle 5 dargestellt. Nach durchgeführter PCR erfolgte die Auswertung via Gelelektrophorese, wie bereits im Kapitel RNA-Isolation beschrieben. Die Quantifizierung der Bilder erfolgte mit ImageJ. Die Zielgene, die vom Konsortium, das dieses Projekt entworfen hat, ausgewählt wurden, und ihre Primer sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Sequenzen wurden durch interne Primeroptimierung bestimmt. Nachfolgend ist die Funktion der einzelnen Gene erklärt:

Für die Phase I wurde die Expression von CYP1A2, CYP3A4 und CYP2E1, die die Bildung von NAPQI aus APAP katalysieren^{11,21,24,50}, und CYP2C9 und 2C8, die Diclofenac verstoffwechseln^{11,51-54}, untersucht. Für die Phase II wurden UGT1A1, das im Paracetamolstoffwechsel APAP-Glucuronid bildet⁵⁵, und GSTA1 untersucht. An Transportern wurde BCRP untersucht, das eine Rolle bei der Ausscheidung von APAP-Metaboliten spielt⁵⁵, und MDR1, das zusammen mit BCRP im Rahmen der Medikamentenentwicklung untersucht wird²⁴. Außerdem wurde die Expression von MRP1 untersucht, wobei eine Hochregulation ein Hinweis auf regenerierende Hepatozyten ist²⁴. Zusätzlich wurde die Genexpression von Albumin untersucht.

Tabelle 5: Verwendete Primer für die PCR

Gen	Vorwärtsprimer 5'→3'	Rückwärtsprimer 5'→3'	Produktlänge in bp	T _m [°C]

GAPDH	GTCAGTGGTGGAC CTGACCT	AGGGGTCTACATGGCA ACTG	420	56
β-Actin	CGACAACGGCTCC GGCATGT	GCACAGTGTGGGTGA CCCCG	461	64
β-2- Microglob ulin	AGATGAGTATGCCT GCCGTG	GCGGCATCTTCAAACC TCCA	105	60
CYP1A2	TCGACCCTTACAAT CAGGTGG	GCAGGTAGCGAAGGA TGGG	254	60
CYP3A4	ATTCAGCAACAAGA ACAAGGACA	TGGTGTTCCTCAGGCAC AGAT	314	56
CYP2E1	GACTGTGGCCGAC CTGTT	ACACGACTGTGCCCTG GG	297	59
CYP2C8	CATTACTGACTTCC GTGCTACAT	CTCCTGCACAAATTCG TTTTC	147	60
CYP2C9	CTGGATGAAGGTG GCAATTT	AGATGGATAATGCCCC AGAG	308	59
UGT1A1	GCTGTTCCCACTTA CTGCAC	GCTTCAAATTCCTGGG ATAGTGG	499	57
GSTA1	TCTGCCCGTATGTC CACCT	GCTCCTCGACGTAGTA GAGAAGT	185	59
Albumin	TTTATGCCCCGGAA CTCCTTT	TGTTTGGCAGACGAAG CCTT	142	60
MDR1	AATCGGGGGCTGC GCATCTG	CAGCCGCTGCTCCCCA CAAA	252	61
MRP1	TTGGATGAGGCCAC GGCAGC	CTGGGGCTCACACCAA GCCG	247	58
BCRP	CTCCGAGCGCACG CATCCTG	AGCTGTGCGGGGAA GCCAT	153	61

Zur Normalisierung der PCR wurden GAPDH, β-Actin und β2M verwendet^{56–58}, da die Verwendung von einem Housekeeping-Gen zu systematischen Verzerrungen geführt hat, weshalb das jeweils am wenigsten verzerrende Gen für die Normalisierung der jeweiligen Gruppe verwendet wurde. Aufgrund der

unterschiedlichen Qualität der RNA wurde die Medikamentengabe in der 3D-Kultur nur mit der Kontrolle in 3D verglichen und als Vielfaches der Kontrolle dargestellt, selbiges gilt für die 2D-Kultur.

2.8.2 Messung der MDR1-Aktivität von Huh7 und pHH

Die Interaktion von MDR1 mit Medikamenten wird im Rahmen der Zulassung untersucht²⁴, die Messung der Aktivität im zu testenden System ist daher von hoher Relevanz.

Für die Messung der MDR1-Aktivität wurden folgende Lösungen benötigt:

- 30 mM Rhodaminlösung, bestehend aus 2 mg Rhodamin 123 gelöst in 175 µl Ethanol, dann mit Medium weiterverdünnt auf 3 µM
- 11 mM Glucoselösung, bestehend aus 19,8 mg Glucose und 10 ml DPBS

Nach erfolgter Beimpfung wurde das Kultursystem mit PBS gespült, um nicht adhärierte Zellen auszuspülen. Dann folgte Perfusion für 24 Stunden mit Medium.

Zur Bestimmung der MDR1-Aktivität wurde das Kultursystem mit PBS gespült und 3 µM Rhodaminlösung zugegeben. Die Konzentration wurde durch das Konsortium, das dieses Projekt entworfen hat, festgelegt. Dann erfolgte eine dreißigminütige Inkubation im Brutschrank. Nach dieser Inkubation wurde mit PBS gespült. Daraufhin wurde 11 mM Glucoselösung zugegeben. Es erfolgte eine Brutschrank-Inkubation der pHH für 2 Stunden mit Probenentnahmen nach 60 und 120 Minuten, der Huh7 für 3 Stunden mit Probenentnahmen nach 60, 120 und 180 Minuten.

Zur Messung wurde eine Standardkurve als Triplikat erstellt. Dazu wurde 0,3 nmol/100 µl Rhodaminlösung in PBS verdünnt und die Konzentration 1:2 verdünnt. Zusätzlich wurde ein PBS-Leerwert in die Standardkurve aufgenommen.

Die Messung erfolgte im Plate-Reader bei einer Exzitation von 485 nm, einer Emission von 520 nm und einem Gain von 800 nm.

Das Versuchsschema ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

Versuchsschema der Untersuchung der MDR1-Aktivität

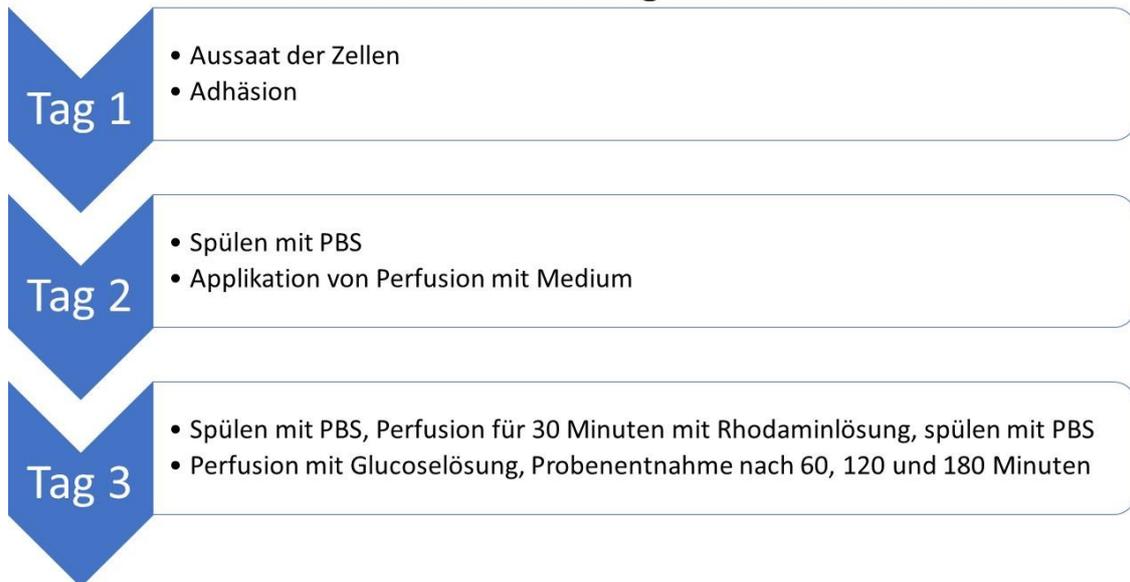


Abbildung 13: Versuchsschema zur Untersuchung der MDR1-Aktivität in Huh7 und pHH.

2.9 Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol, Diclofenac und Coffein durch pHH

Für die Metabolisierungsuntersuchungen wurden folgende Lösungen angesetzt:

- Acetaminophen-Stocklösung der Konzentration 100 mM, gelöst in H₂O
- Diclofenac-Stocklösung der Konzentration 10 mM, gelöst in ACN und H₂O im Verhältnis 1:1
- Coffein-Stocklösung der Konzentration 100 mM, gelöst in Ethanol
- Acetaminophen-Assay-Lösung der Konzentration 100 µM, bestehend aus Acetaminophen-Stocklösung, verdünnt 1:1000 in WME
- Diclofenac-Assay-Lösung der Konzentration 10 µM, bestehend aus Diclofenac-Stocklösung, verdünnt 1:1000 in WME
- Coffein-Assay-Lösung der Konzentration 100 µM, bestehend aus Coffein-Stocklösung, verdünnt 1:1000 in WME

- Griseofulvinlösung der Konzentration 1 μM , gelöst in ACN

Durchführung des Versuchs

Das Versuchsschema ist in nachfolgendem Schaubild dargestellt.

Versuchsschema der Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol, Diclofenac und Coffein

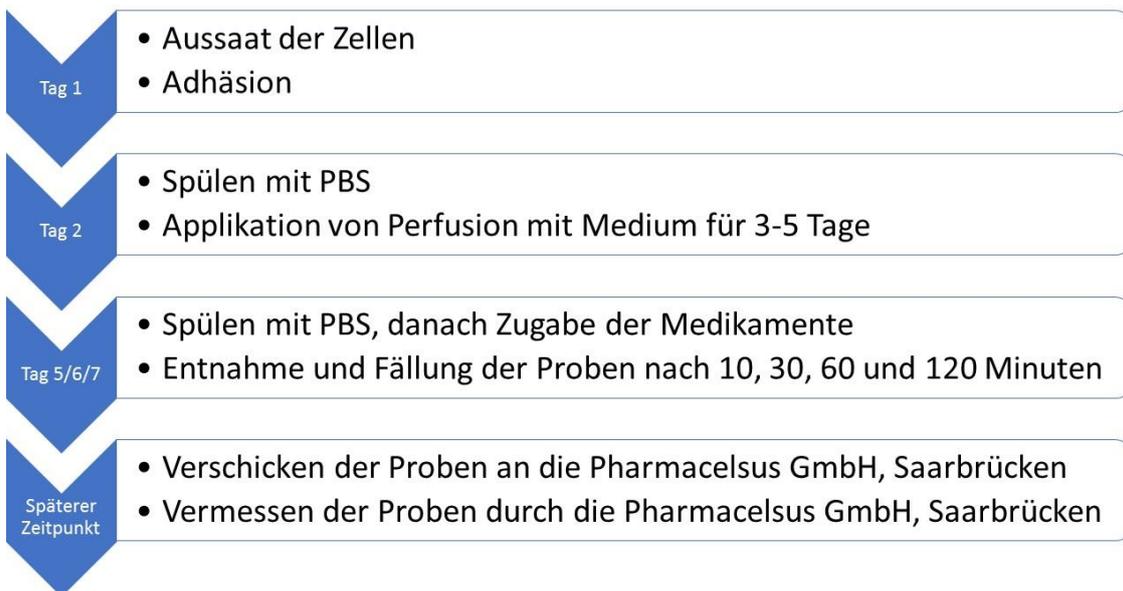


Abbildung 14: Versuchsschema zur Untersuchung Metabolisierung von Paracetamol, Diclofenac und Coffein durch pHH.

Die Durchführung erfolgte gemäß der SOP von Pharmacelsus. Die pHH wurden im Bioreaktor und in der 2D-Kultur ausgesät und für 3-5 Tage im Inkubator kultiviert. Dann wurde mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die Assay-Lösungen, deren Konzentrationen durch das Konsortium, das dieses Projekt entworfen hat, festgelegt wurden, zugegeben und für 120 Minuten im Inkubator kultiviert. Zusätzlich dazu wurden 200 μl jeder Assay-Lösung in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß ebenfalls im Brutschrank inkubiert, um unspezifischen Abbau zu prüfen. Vom Bioreaktor und der 2D-Kultur wurden nach 10, 30, 60 und 120 Minuten jeweils 200 μl Probe entnommen. Diese wurden mit 200 μl der Griseofulvinlösung gefällt, 10s gevortext und für 5 Minuten bei 4800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Genau gleich wurde mit 200 μl jeder Assay-

Lösung verfahren, um einen 0-Minuten-Wert zu erhalten. Die so vorbereiteten Proben wurden an die Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken zur Messung der Metaboliten geschickt.

2.10 Untersuchung der Gallensäurenbildung von pHH

Der Versuchsablauf ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

Versuchsschema der Untersuchung der Gallensäurenbildung

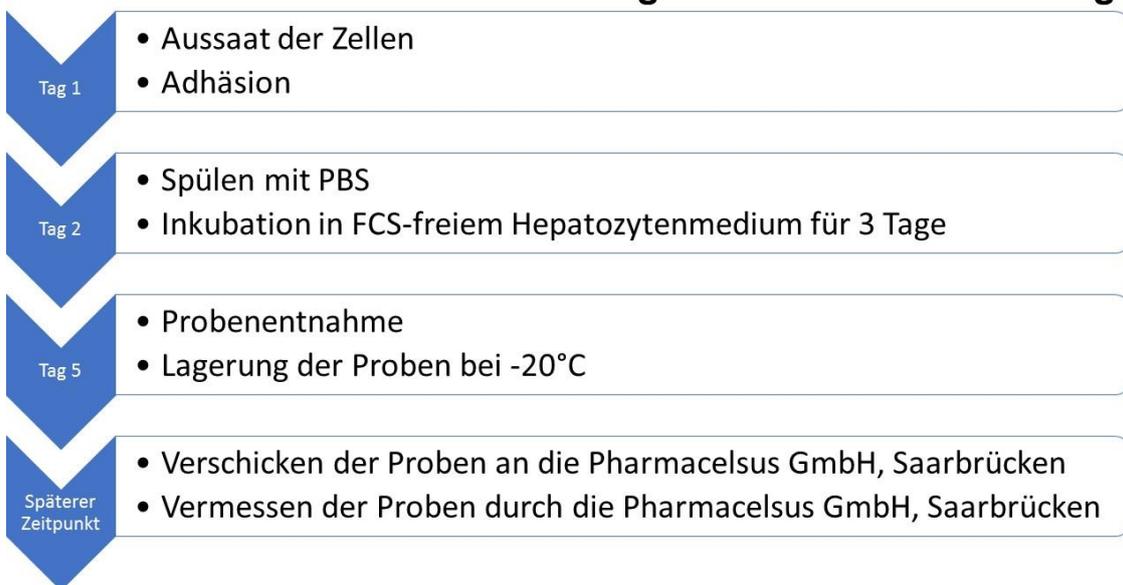


Abbildung 15: Versuchsschema zur Untersuchung der Gallensäurenbildung durch pHH.

Die Messung der Gallensäurenbildung ist ein weiterer Indikator für die hepatische Funktion⁵. Die Bestimmung der Gallensäuren ergab sich als Konsequenz aus den Ergebnissen der MDR1-Aktivität (siehe Kapitel 3.5). Für die Messung wurden pHH im Zellchip von ibidi und in der 2D-Kultur ausgesät und für drei Tage in FCS-freiem Hepatozytenmedium kultiviert. Der Versuch erfolgte mangels Membranen für den Bioreaktor dabei im nicht perfundierten Zellchip. Dabei erfolgte keine Perfusion, der Chip wurde aufgrund der in Kapitel 2.5.3.3 dargestellten Schwierigkeiten als statisches dreidimensionales Kultursystem verwendet. Danach wurde der Überstand abgenommen und an die Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken zur Gallensäuremessung geschickt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Glucoseabsorption des Schlauchsystems

In internen Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass das verwendete Schlauchsystem aus PVC dazu neigt, verschiedene Medikamente zu absorbieren. Da im Rahmen der Toxizitätsuntersuchungen Glucose gemessen wird, wurde eine vorbeugende Voruntersuchung durchgeführt, um auszuschließen, dass das Schlauchsystem mit der Glucose interagiert. Dabei wurde ein Schlauchsystem ohne Zellen verwendet. Es wurde wie zur Glucosemessung vorgegangen, wobei zuerst für einen Tag mit Medium, danach einen Tag mit Medikamenten und daraufhin einen Tag mit Reaktionslösung (RS) perfundiert wurde. Zusätzlich wurden Proben nach 10 Minuten, 4 Stunden, einem Tag, zwei Tagen und drei Tagen nach Reaktionslösungszugabe (RS) abgenommen und daraus der Glucosegehalt bestimmt. Die Messung der Reaktionslösung an Tag 3 soll zeigen, dass das Schlauchsystem auch keine Glucose abgibt.

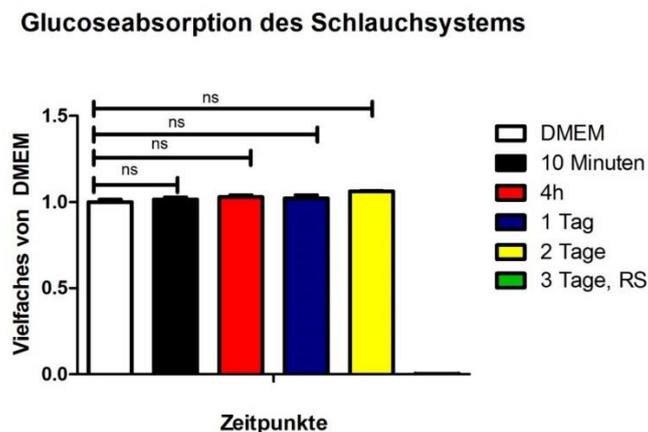


Abbildung 16: Glucosegehalt von Proben nach 10 Minuten, 4 Stunden, einem Tag, 2 Tagen und 3 Tagen nach Zugabe von Reaktionslösung (RS). Die statistische Analyse erfolgte durch ein 2-Way-Anova; N=3, n=9. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Die beobachtete Glucosekonzentration bleibt während der Perfusion mit Medium konstant. Ersetzt man das Medium durch RS, so kann keine

Glucosefreisetzung beobachtet werden. Eine Interaktion zwischen Glucose und Schlauchsystem kann nicht beobachtet werden.

3.2 Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol durch Huh7

Huh7 sind eine humane Krebszelllinie. Damit einhergehend sind in humanen Hepatozyten vorhandene Biotransformationsenzyme nicht im selben Maße wie in pHH exprimiert^{38,39}, weshalb nicht sicher von einer Metabolisierung von Paracetamol ausgegangen werden kann. Da in pHH eine Paracetamoltoxizität im Kollagensandwich, nicht aber in 2D beobachtet werden kann²¹, und nur in 3D die Transporter funktionell angeordnet sind, wird zur Untersuchung ein Kollagensandwich mit Huh7 verwendet. Zur Messung des Zellschadens, der durch eine Metabolisierung von Paracetamol zu NAPQI^{11,24,50,55} entsteht, wurden LDH-, GPT-, GOT-Freisetzung und die Resazurinunwandlung bestimmt. Diese Voruntersuchung soll verifizieren, dass Huh7 Paracetamol verstoffwechseln können.

Die Messung der LDH- und Transaminasenfreisetzung erfolgte wie im Kapitel 2.6 beschrieben. Die Freisetzung von LDH und Transaminasen bei Zelluntergang wird als Maß für die Schädigung der Zellen verwendet⁶.

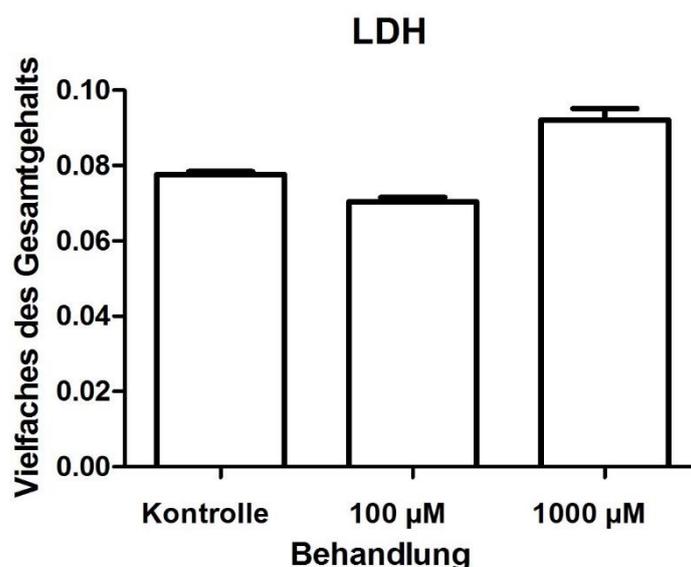


Abbildung 17: LDH-Freisetzung von Huh7 in einem Kollagensandwich der Konzentration 1 mg/ml an Tag 3 N=1, n=3. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Die LDH-Messung zeigt eine tendenzielle Zunahme der LDH-Freisetzung im Vergleich zwischen Kontrolle und 1000 μM Paracetamol.

Die Messung der Transaminasen sollte dazu dienen, einen leberspezifischeren Marker als LDH für den Zellschaden zu verwenden. Allerdings lag der weitaus größte Teil der Messwerte unter der Nachweisgrenze des Testkits, die bei 4 U/l liegt, weshalb die erzielten Werte leider nicht über die nötige Aussagekraft verfügen. Auch die Messungen der Toxizitätstests mit Paracetamol und Diclofenac zeigten das gleiche Problem. Eine Variation von Probenmengen konnte keine besseren Ergebnisse erzielen. Es ist also davon auszugehen, dass die verwendeten Testkits nicht sensibel genug für die zu messenden Konzentrationen sind.

Die untenstehende Abbildung zeigt einen Zusammenhang zwischen Acetaminophenbehandlung und verringertem Resazurinumsatz. Damit liegt nahe, dass Huh7 in der Lage sind, Acetaminophen zu NAPQI umzusetzen und dadurch einen mitochondrialen Schaden hervorzurufen.

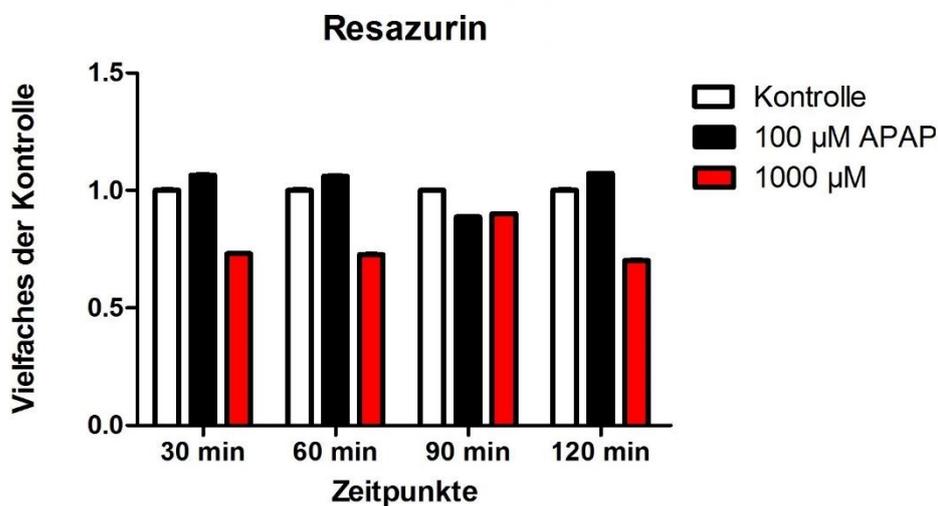


Abbildung 18: Resazurinumsatz an Tag 3 in einem Kollagensandwich der Konzentration 1 mg/ml. Huh7 wurden mit 0, 100 μM und 1000 μM Acetaminophen behandelt. Proben wurden nach 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen und jeweils mit der Kontrolle des entsprechenden Zeitpunktes verrechnet. N=1, n=3. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

3.3 Untersuchung der Toxizität von Paracetamol und Diclofenac an Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Die Toxizitätstests wurden wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Es wurde die Bildung von Glucose, Urea und Albumin, sowie die Freisetzung von LDH untersucht.

3.3.1 Untersuchung der Toxizität von Paracetamol an Huh7 und pHH

Paracetamol wird hauptsächlich über CYP2E1^{11,24,55}, aber auch über andere CYPs, beispielsweise 2A6, 1A2, 2D6, 2C9 und 2C19¹¹ und 3A4⁵⁰ zu NAPQI (N-Acetyl-p-Benzoquinon-Imin) verstoffwechselt, das normalerweise durch GSH abgefangen wird^{24,55,59}. Die Wirkung wird dadurch erzielt, dass die Thiolgruppe mit freien Radikalen reagiert und sie so unschädlich macht⁵. Ist nicht genügend GSH vorhanden, so bindet NAPQI an andere Proteine und verursacht so Zellschäden und –untergang.

3.3.1.1 Einfluss des Paracetamols auf Huh7

Glucose kann durch die Gluconeogenese in Hepatozyten neu synthetisiert werden⁵. Das Ausmaß der Freisetzung weist auf die Syntheseleistung der Hepatozyten oder der Leberzelllinie hin.

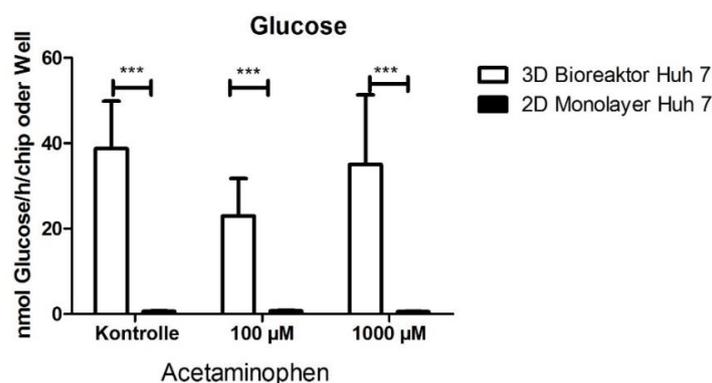


Abbildung 19: An Tag 5 freigesetzte Glucose nach Behandlung mit APAP von in 3D und 2D kultivierten Huh7. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *** entspricht einem p-Wert < 0,0001. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Es zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Kultur in 2D und 3D, jedoch nicht zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen, sodass sich ein Vorteil der 3D-Kultur gegenüber der 2D-Kultur zeigt, jedoch keine Paracetamolwirkung festgestellt werden kann.

Urea wird in Hepatozyten durch den Harnstoffzyklus gebildet, um so Ammoniak zu entgiften und ausscheidbar zu machen⁵. Das Ausmaß der Ureafreisetzung ist also, genauso wie die Glucosefreisetzung, ein Parameter, um die Syntheseleistung des Hepatozyten oder der Leberzelllinie zu beurteilen.

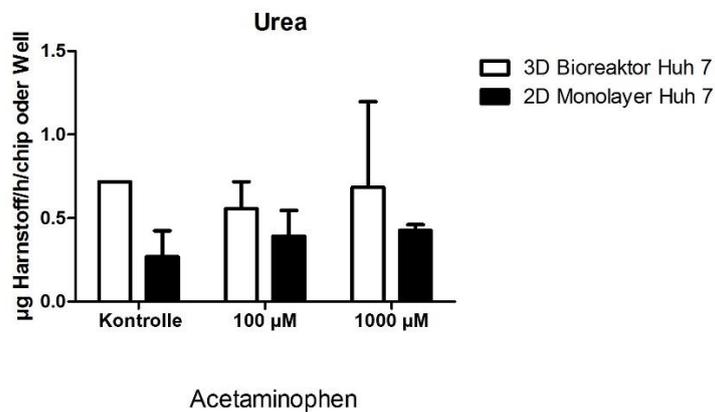


Abbildung 20: An Tag 5 freigesetzter basaler Harnstoff von Huh7 nach Paracetamolbehandlung in 3D- und 2D-Kultur. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Es zeigt sich eine erhöhte basale Ureafreisetzung in 3D-Kultur. Bei 1000 µM APAP nimmt die Ureafreisetzung, verglichen zur Kontrolle, in geringem Maß zu. Es wurde lediglich die basale Ureafreisetzung gemessen, da so in einem Versuch Glucose und Urea gemessen werden konnten.

Die LDH-Freisetzung wird als Maß für den Zellschaden gemessen⁶. Ein Einfluss der APAP-Gabe auf die LDH-Freisetzung kann unter beiden Kulturbedingungen nicht beobachtet werden.

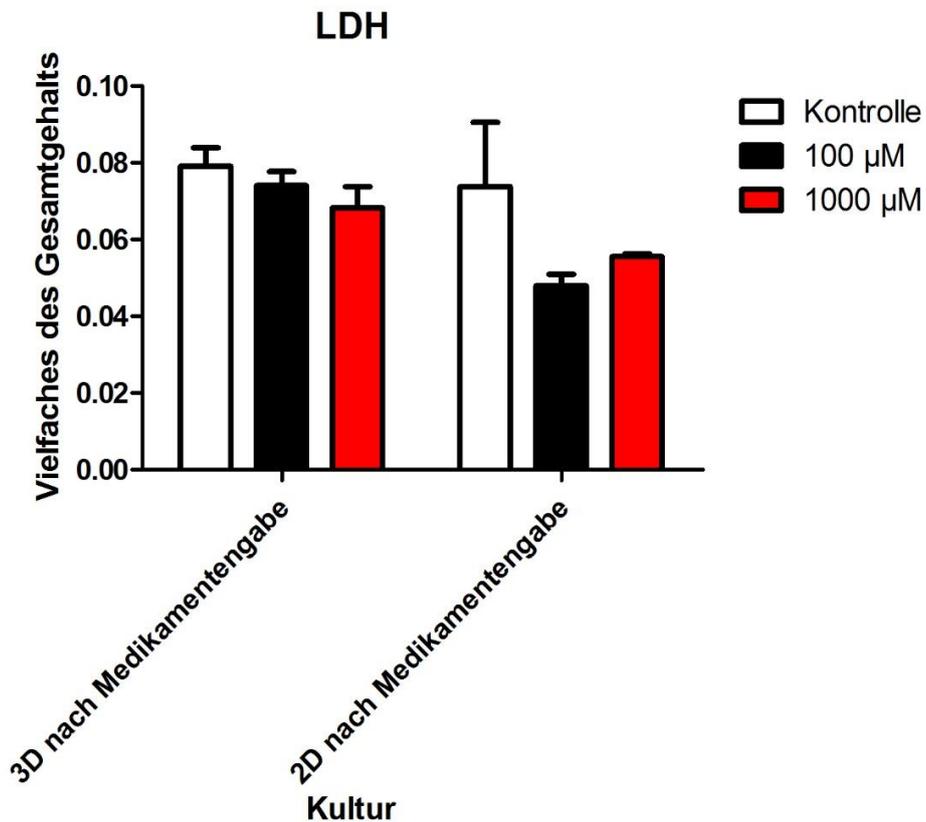


Abbildung 21: LDH-Freisetzung an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Paracetamolbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Huh7 von den Kulturbedingungen profitieren.

3.3.1.2 Einfluss des Paracetamols auf pHH

Die beobachtete Glucosefreisetzung ist in der 2D-Kultur tendenziell höher als in der 3D-Kultur. Ein Einfluss des Paracetamols auf die Freisetzung kann in der 2D-Kultur nicht beobachtet werden, in der 3D-Kultur zeigt sich eine sehr geringe Abnahme der Glucosefreisetzung bei zunehmender Paracetamolkonzentration.

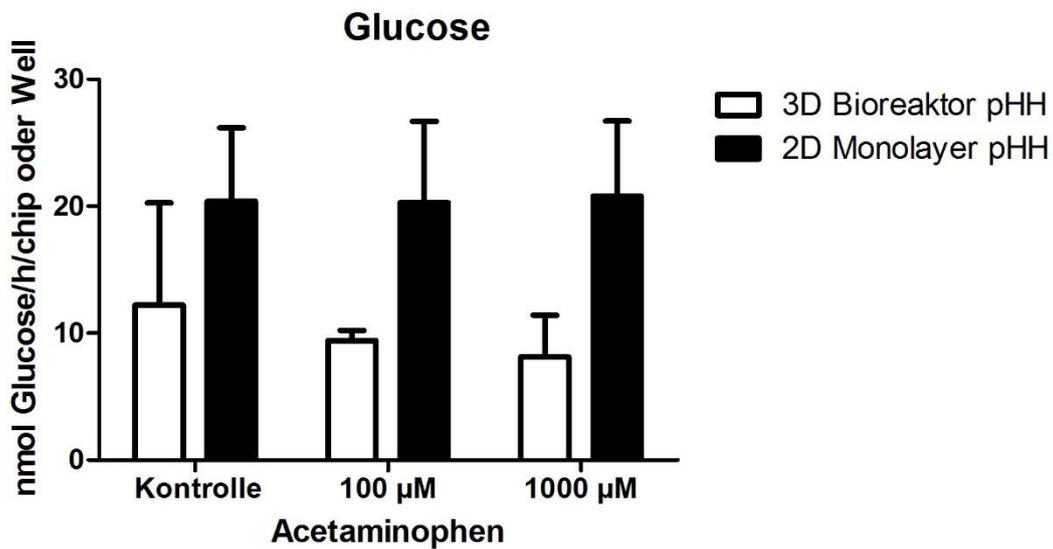


Abbildung 22: Glucosefreisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH an Tag 5 nach Paracetamolbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.

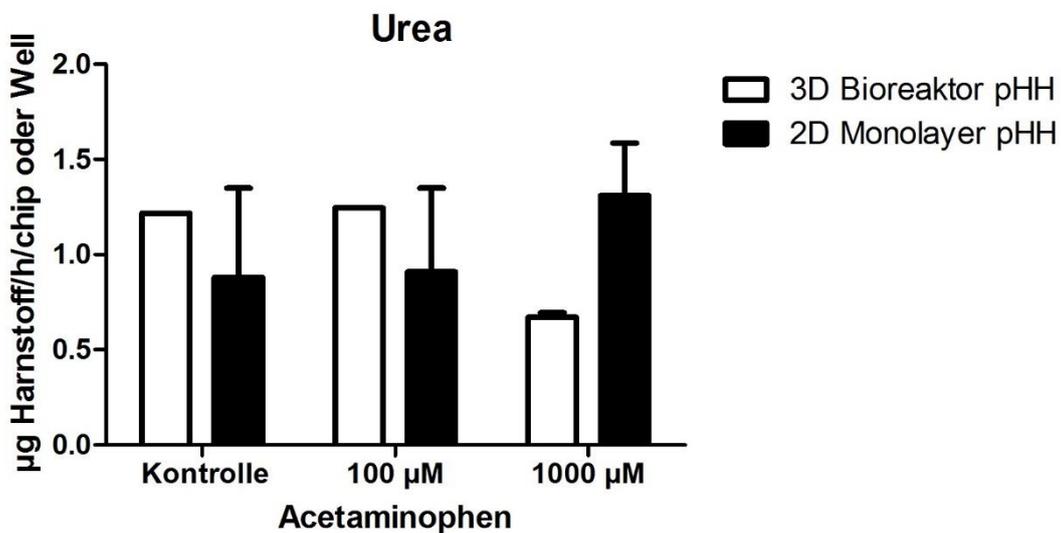


Abbildung 23: Basale Ureafreisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH an Tag 5 nach Paracetamolbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.

Das Niveau der basalen Ureafreisetzung ist für die Kontrolle und mit 100 µM APAP behandelten pHH in 2D- und 3D-Kultur ähnlich, bei 1000 µM APAP zeigt

sich jedoch eine Abnahme in der 3D-Kultur, während es in der 2D-Kultur zu einer Zunahme kommt.

Albumin wird von Hepatozyten synthetisiert und dient der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und dem Molekültransport im Blut^{5,8}. Dabei transportiert Albumin auch Xenobiotika⁵ und nimmt so an der Entgiftung teil. Die freigesetzte Menge erlaubt, genauso wie bei Glucose und Urea, einen Rückschluss auf die Syntheseleistung^{5,7}.

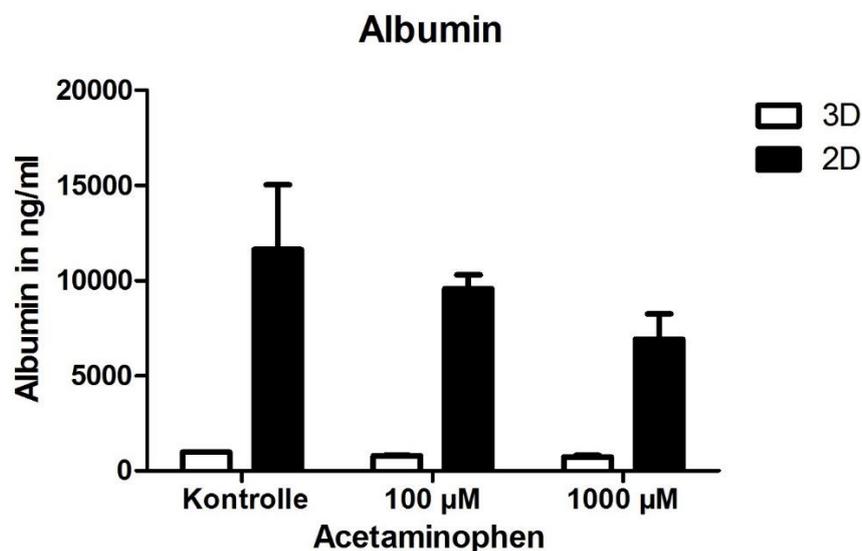


Abbildung 24: Albuminfreisetzung an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Paracetamolbehandlung. N=1, n=2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Syntheseleistung in der 2D-Kultur, verglichen mit der 3D-Kultur. Unter zunehmender Paracetamolkonzentration nimmt die Albuminsynthese ab, wobei dieser Effekt in der 2D-Kultur deutlicher als in der 3D-Kultur hervortritt. Aufgrund von begrenzter Verfügbarkeit von pHH und Bioreaktormembranen konnte dieser Versuch leider nur im Unikat ausgeführt werden.

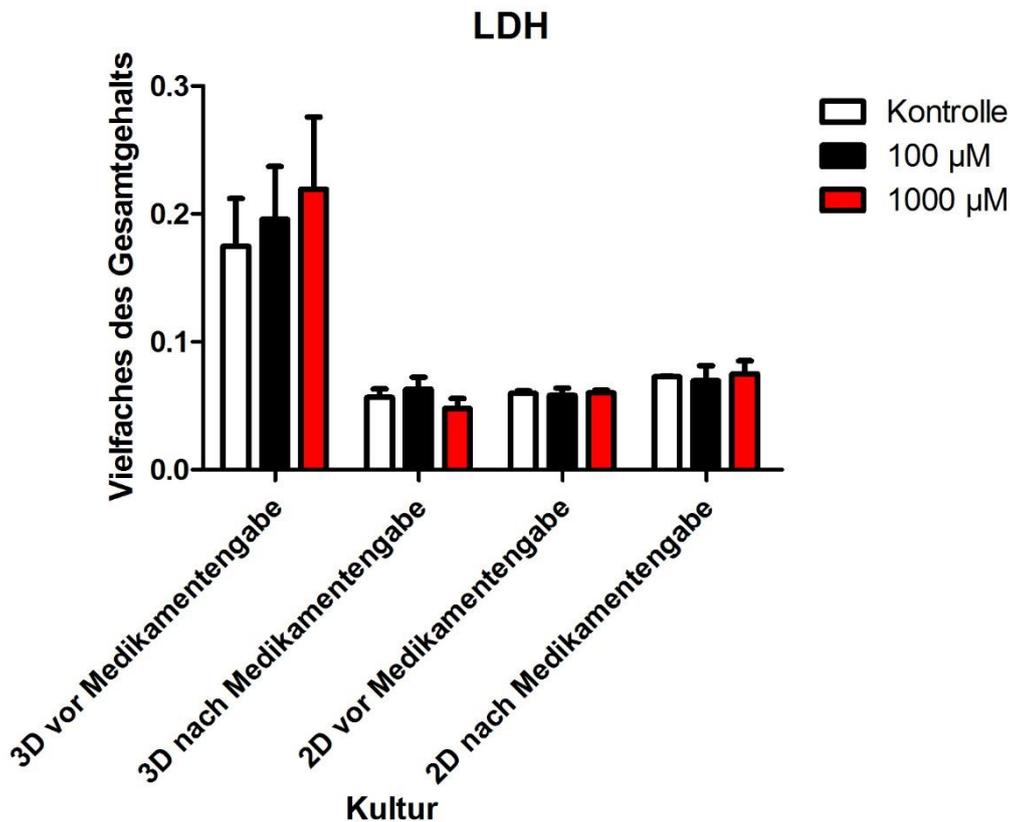


Abbildung 25: LDH-Freisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Paracetamolbehandlung an Tag 3 vor Medikamentengabe und an Tag 4 nach Medikamentengabe. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Es zeigt sich bei beiden Kulturbedingungen eine zu Beginn hohe LDH-Freisetzung, die im Laufe des Versuchs abnimmt. Insbesondere in der 3D-Kultur unterliegt die LDH-Freisetzung jedoch großen Schwankungen, obwohl die Zellen bis zum Zeitpunkt der Medikamentengabe gleich behandelt werden, möglicherweise ein Hinweis auf eine Ungleichheit innerhalb der Bioreaktoren, da für jede Konzentration immer der selbe Bioreaktor verwendet wurde. Die LDH-Konzentration ist in der 3D-Kultur vor der Medikamentengabe höher als in der 2D-Kultur.

Zusammenfassend kann beobachtet werden, dass die pHH unabhängig von der Paracetamolkonzentration in der 3D-Kultur mit Fluss eine geringere Syntheseleistung zeigen, wenn man sie mit der 2D-Kultur vergleicht.

3.3.2 Untersuchung der Toxizität von Diclofenac

Diclofenac wird hauptsächlich durch CYP2C9 und CYP2C8 verstoffwechselt^{11,51–53}.

3.3.2.1 Einfluss des Diclofenacs auf Huh7

Die Glucosefreisetzung fällt in 3D-Kultur in hochsignifikantem Maße höher aus als in 2D-Kultur. Unter 3D-Kulturbedingungen zwischen 100 μM und 750 μM Diclofenac und unter 2D-Kulturbedingungen kann mit steigender Diclofenackonzentration in der Tendenz eine Abnahme der Glucosefreisetzung beobachtet werden.

Im Vergleich mit den mit Paracetamol behandelten Huh7 kann in der 3D-Kultur und in der 2D-Kultur eine erhöhte Glucosefreisetzung beobachtet werden.

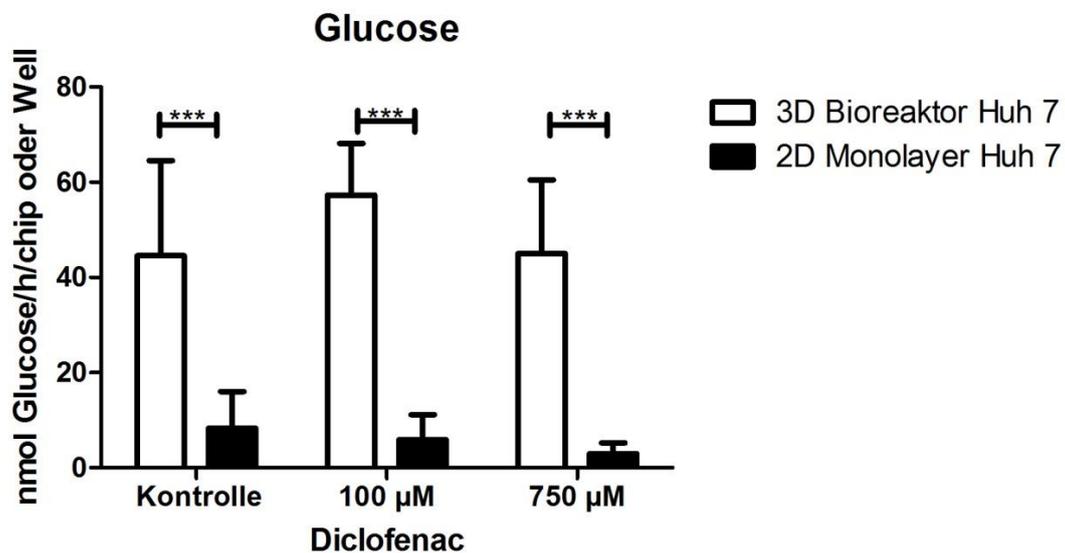


Abbildung 26: An Tag 5 freigesetzte Glucose von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *** entspricht einem p-Wert <0,0001. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Das Niveau der basalen Ureafreisetzung liegt in der 3D- höher als in 2D-Kultur. Bei Diclofenacgabe kann in der 3D-Kultur eine Zunahme der Ureafreisetzung und mit großer Streubreite beobachtet werden, in der 2D-Kultur bleibt die Freisetzung gleich.

Verglichen mit den mit Paracetamol behandelten Huh7 liegt die Ureafreisetzung unter 3D- und 2D-Kulturbedingungen höher.

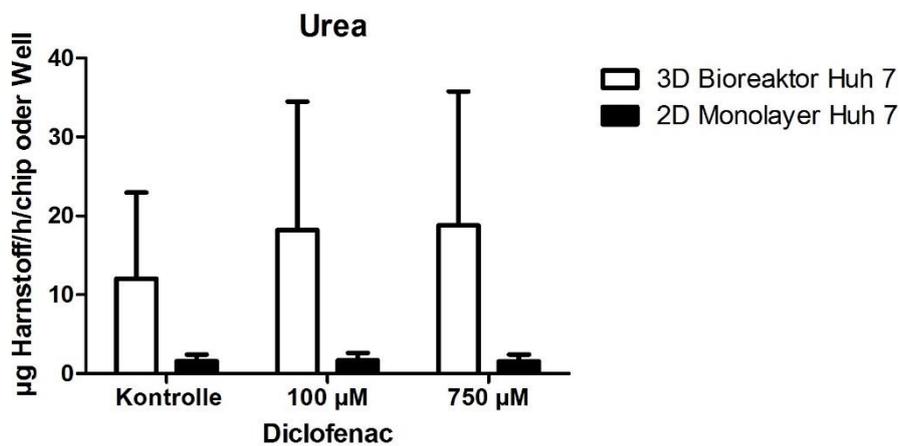


Abbildung 27: Basale Ureafreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Bei der Diclofenacbehandlung in 3D-Kultur kann, im Gegensatz zur Paracetamolgabe, eine Zunahme der LDH-Freisetzung bei steigenden Diclofenackonzentrationen beobachtet werden.

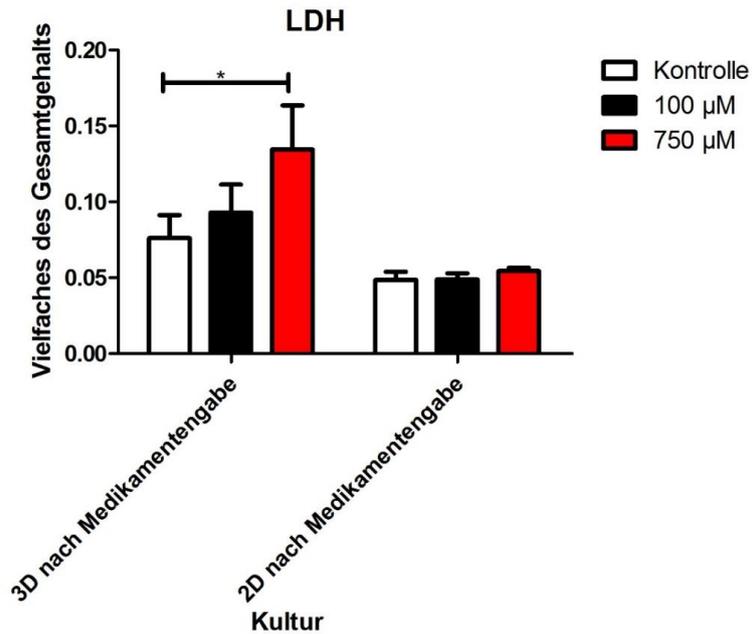


Abbildung 28: LDH-Freisetzung an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten Huh7 nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

3.3.2.2 Einfluss des Diclofenacs auf pHH

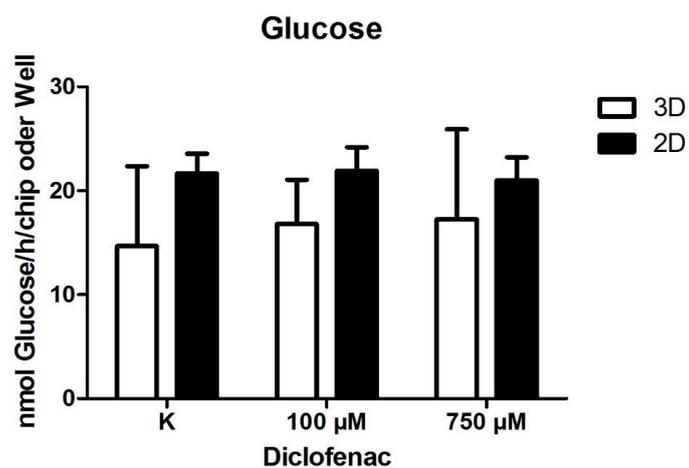


Abbildung 29: Glucosefreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=2-3, n=2-3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Die Freisetzung der Glucose ist in der 2D-Kultur etwas höher als in der 3D-Kultur. Außerdem kann in der 3D-Kultur, aber nicht in der 2D-Kultur, ein geringer Anstieg der Glucosefreisetzung bei steigenden Konzentrationen von Diclofenac beobachtet werden.

Es kann unter 3D-Kulturbedingungen eine proportional zur Diclofenackonzentration ansteigende Freisetzung von Urea beobachtet werden. Ohne Diclofenacgabe kann in der 3D-Kultur keine Ureafreisetzung festgestellt werden. Da eine basale Ureafreisetzung bei der Kontrolle der mit Paracetamol behandelten pHH nachweisbar ist, ist unter Berücksichtigung aller mit pHH erzielten Ergebnisse hier eine Instabilität anzunehmen, aufgrund derer keine Ureafreisetzung in der Kontrolle detektierbar ist. Mit Ausnahme von 750 μM Diclofenac ist die Ureafreisetzung in der 2D-Kultur höher als in der 3D-Kultur, auch die Schwankungen bei Diclofenacgabe fallen geringer aus.

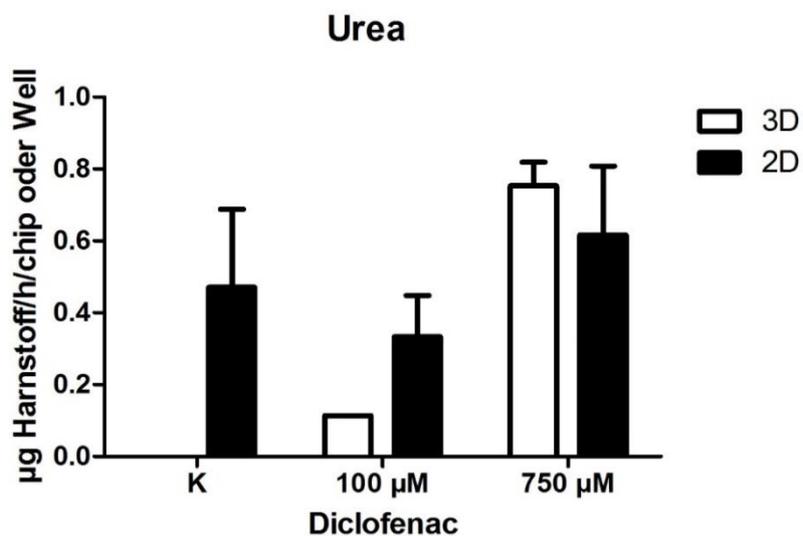


Abbildung 30: Basale Ureafreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=2-3, n=2-3; Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

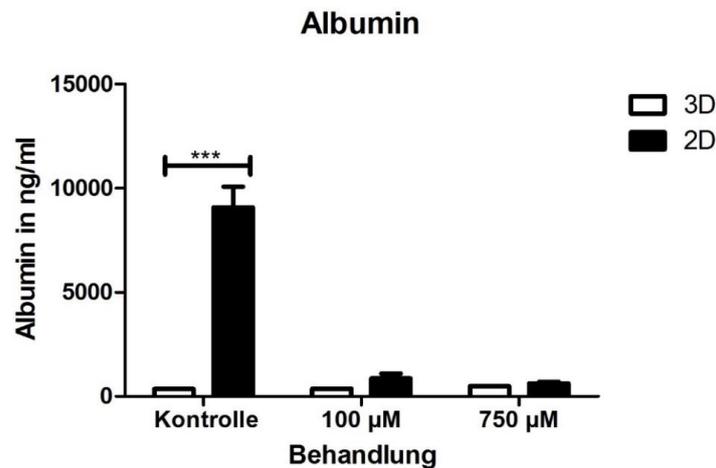


Abbildung 31: Albuminfreisetzung an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=2-3, n=2-3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.

Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Syntheseleistung in der 2D-Kultur, verglichen mit der 3D-Kultur. Unter zunehmender Diclofenackonzentration nimmt die Albuminsynthese in der 2D-Kultur ab, während sie in der 3D-Kultur im Wesentlichen unverändert, aber im Allgemeinen sehr gering, bleibt.

Eine deutliche Auswirkung des Diclofenacs auf die LDH-Freisetzung kann nicht beobachtet werden.

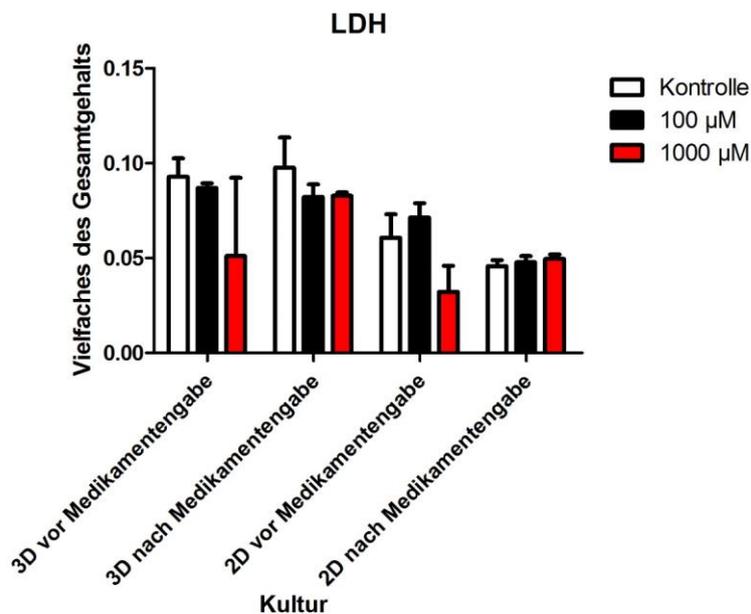


Abbildung 32: LDH-Freisetzung vor Medikamentengabe an Tag 3 und nach Medikamentengabe an Tag 4 von in 3D und 2D kultivierten pHH nach Diclofenacbehandlung. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

3.4 Untersuchung der Metabolisierung von APAP, Diclofenac und Coffein an pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Die Metabolisierungsuntersuchungen von APAP, Diclofenac und Coffein sollen aufzeigen, wie unterschiedlichen Kulturbedingungen für die Hepatozyten zu einem unterschiedlichen Arsenal von an der Biotransformation beteiligten Enzymen führen. Die Probenanalyse erfolgte durch die Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken.

3.4.1 Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol in pHH

Für Paracetamol wurde die Bildung von APAP-Glucuronid und APAP-Sulfat durch UDP-Glucuronyl-Transferasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT)⁵⁵ untersucht.

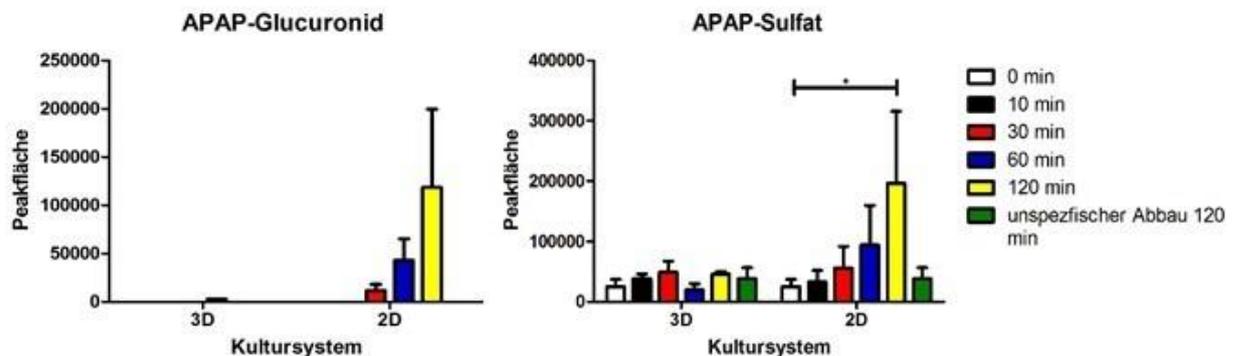


Abbildung 33: APAP-Glucuronid- und -Sulfatfreisetzung von 3-5 Tage in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse für das APAP-Sulfat erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. * entspricht einem p-Wert <0,05. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Während es unter 3D-Kulturbedingungen zu einer äußerst geringen APAP-Glucuronidsynthese kommt, wird es unter 2D-Kulturbedingungen stetig zunehmend synthetisiert. Ein unspezifischer Abbau oder ein Vorkommen in der Versuchslösung selbst wird nicht beobachtet.

APAP-Sulfat hingegen findet sich in der Versuchslösung selbst, wird aber auch in geringem Maß unspezifisch gebildet. In der 3D-Kultur kann keine wesentliche

Eigensynthese über das Maß des unspezifischen Abbaus hinaus beobachtet werden, während es in der 2D-Kultur zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration kommt.

Zusammenfassend kann also in der 2D-Kultur eine Metabolisierung festgestellt werden, in der 3D-Kultur jedoch nur in verschwindend geringem Maß.

3.4.2 Untersuchung der Metabolisierung von Diclofenac in pHH

Für Diclofenac wurde die Bildung von 4'-OH-Diclofenac insbesondere durch CYP2C9^{9,11,51-54} untersucht.

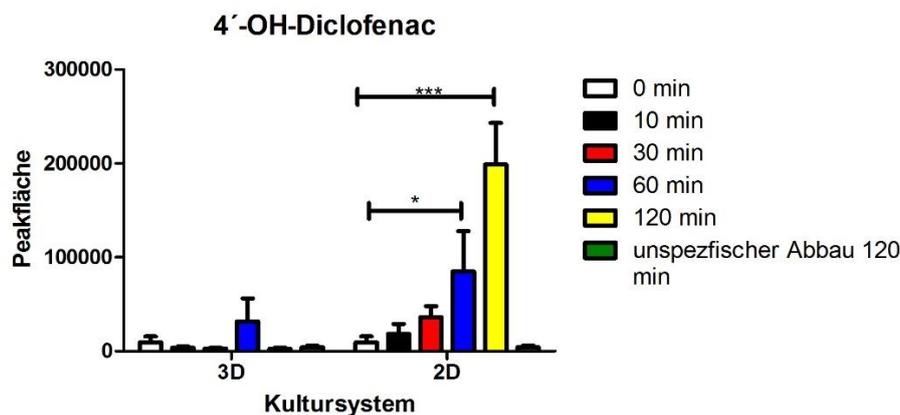


Abbildung 34: 4'-OH-Diclofenacfreisetzung von 3-5 Tage in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. * entspricht einem p-Wert <0,05, *** einem p-Wert <0,0001. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

4'-OH-Diclofenac kommt in der Versuchslösung selbst vor und wird im Laufe der Zeit geringfügig abgebaut. In der 3D-Kultur liegt der Peak bei 60 Minuten, um dann wieder abzunehmen, während es in der 2D-Kultur zu einem statistisch signifikanten konstanten Anstieg über die Zeit kommt.

Wie bereits bei APAP kann auch hier eine wesentlich bessere Metabolitenbildung in der 2D-Kultur beobachtet werden.

3.4.3 Untersuchung der Metabolisierung von Coffein in pHH

Für Coffein wurde die Bildung von Paraxanthin durch CYP1A2^{11,61,62} untersucht.

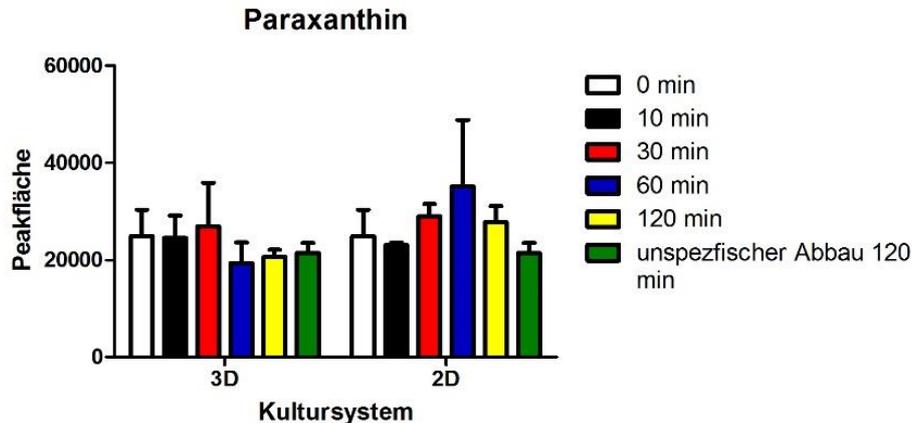


Abbildung 35: Paraxanthinfreisetzung von 3-5 Tage in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Paraxanthin kommt in großem Maß in der Versuchslösung selbst vor und wird im Laufe der Zeit geringfügig abgebaut. Eine wesentliche Synthese kann unter 3D-Kulturbedingungen nicht beobachtet werden. Unter 2D-Kulturbedingungen wird ein nicht signifikanter Peak bei 60 Minuten beobachtet.

3.5 Untersuchung der MDR1-Aktivität an Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

MDR1 ist ein im Hepatozyten apikal, also gallenwärts gerichteter Transporter^{4,8,24,40}. Zur Aktivitätsuntersuchung wurde Rhodamin verwendet. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 2.8.2 dargestellt.

Die Rhodaminfreisetzung in Huh7 ist in der 3D- und 2D-Kultur nach 60 Minuten am höchsten und nimmt dann kontinuierlich ab. Aufgrund dessen wurde der Messzeitpunkt nach 180 Minuten im Versuch mit pHH weggelassen. Die

Freisetzung von Rhodamin ist im Allgemeinen in der 3D-Kultur höher, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur 2D-Kultur.

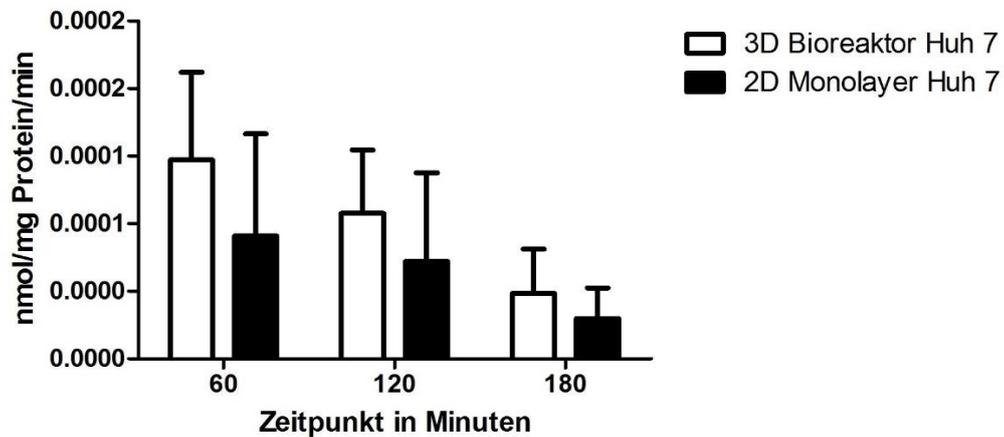


Abbildung 36: Rhodaminfreisetzung von in 3D und 2D kultivierten Huh7. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

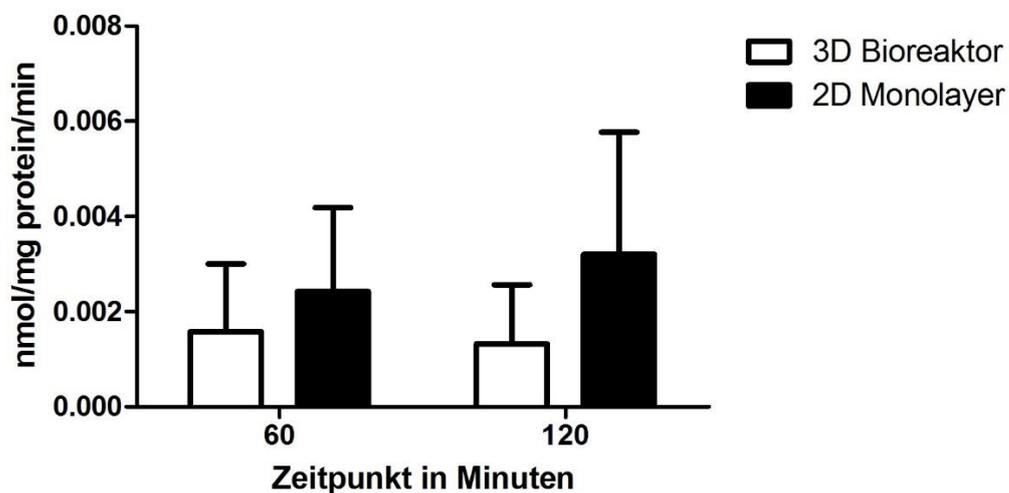


Abbildung 37: Rhodaminfreisetzung von in 3D und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden auf den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert.

Es zeigt sich, dass in 3D kultivierte pHH weniger Rhodamin freisetzen als in 2D kultivierte pHH. Außerdem nimmt die Freisetzung in der 2D-Kultur zwischen 60

und 120 Minuten zu, während sie in der 3D-Kultur abnimmt. Eine statistische Signifikanz ist dabei nicht festzustellen. Die Freisetzung bewegt sich in einer um den Faktor 10 höheren Größenordnung als bei Huh7.

3.6 Untersuchung der Gallensäurenbildung durch pHH in statischer 3D- und 2D-Kultur

Die Untersuchung der Gallensäurenbildung der pHH sollte dazu dienen, die in der 3D-Kultur geringere MDR1-Aktivität der pHH dadurch zu erklären, dass der apikal gerichtete MDR1-Transporter^{4,8,24,40} Rhodamin teilweise in Gallenkanäle abgibt, die in der Literatur^{28,40,63–65} beschrieben werden. Eine hypothetisch erhöhte Gallensäurenbildung im Vergleich zur 2D-Kultur kann als Anzeichen für eine vermehrte Gallengangsbildung angesehen werden.

Die Probenanalyse erfolgte durch die Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken.

Tabelle 6: Gebildete Gallensäuren von in 3D und 2D kultivierten pHH. Nicht nachweisbare Gallensäuren sind rot, nicht quantifizierbare gelb und quantifizierbare grün hinterlegt.

Gallensäure	3D	2D
CA	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
CDCA	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
DCA	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
LCA	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
UDCA	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
GCA	Quantifizierbar	Quantifizierbar
GCDCA	Quantifizierbar	Quantifizierbar
GDCA	Nicht quantifizierbar	Nicht nachweisbar
GLCA (auch im Medium in geringen Mengen nachweisbar)	Nicht quantifizierbar	Nicht quantifizierbar
GUDCA	Nicht quantifizierbar	Nicht quantifizierbar
TCA	Quantifizierbar	Quantifizierbar

TCDCA	Quantifizierbar	Nicht quantifizierbar
TDCA	Nicht quantifizierbar	Nicht nachweisbar
TLCA	Nicht quantifizierbar	Nicht nachweisbar
TUDCA	Nicht quantifizierbar	Nicht quantifizierbar

Es zeigt sich, dass die in 3D kultivierten pHH 3 Gallensäuretypen mehr bilden als in der 2D-Kultur. Die quantifizierbaren Gallensäuren sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

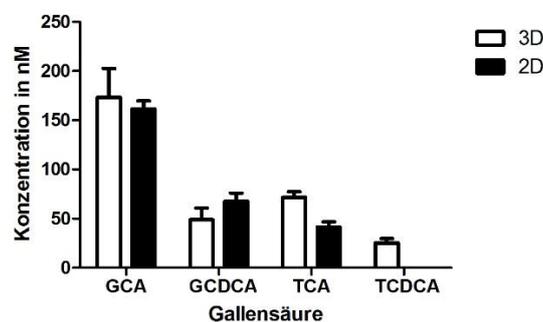


Abbildung 38: Gallensäurefreisetzung von 3 Tage in 3D ohne Perfusion und 2D kultivierten pHH. N=3, n=3; die statistische Analyse erfolgte über ein 2-Way-Anova. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Dabei gibt es keinen statistisch signifikanten quantitativen Unterschied zwischen in 3D und in 2D kultivierten pHH. TCDCA wird jedoch unter 3D-, nicht aber unter 2D-Kulturbedingungen in einem quantifizierbaren Maß gebildet.

3.7 Untersuchung der Genexpression an mit Paracetamol und Diclofenac behandelten Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Für die Untersuchung der Genexpression wurde RNA aus den Toxizitätsversuchen gewonnen. Es wurde die Expression von Phase I- und II-Enzymen, Transportern und Albumin untersucht. Wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben, gestaltete sich die Gewinnung der RNA schwierig. Daher sind die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse stets mit Vorsicht zu betrachten.

Für die mit Paracetamol behandelten Zellen wurde die Expression von CYP1A2, CYP3A4 und CYP2E1 untersucht, da diese Phase I-Enzyme die

Bildung von NAPQI katalysieren^{11,21,24,50,55}. Außerdem wurde die UGT1A1-Expression untersucht, das APAP-Glucuronid bildet⁵⁵.

Für die mit Diclofenac behandelten Zellen wurde die Expression von CYP2C9 und 3A4, die für die Bildung von OH-Diclofenac verantwortlich sind^{9,11,51–54,66}, untersucht.

Unabhängig von der Behandlung wurde zusätzlich die Expression von MDR1, MRP1 und BCRP untersucht. BCRP spielt eine Rolle in der Ausscheidung von APAP-Metaboliten⁵⁵ und wird mit MDR1 für die Entwicklung von Medikamenten untersucht²⁴. MRP1 wird vermehrt in sich regenerierenden Hepatozyten exprimiert²⁴.

Außerdem wurde die Expression von Albumin untersucht, da die in Kapitel 3.3 beobachteten steigende Medikamentendosen eine Abnahme der Freisetzung suggerieren.

Zusätzlich wurde die Expression von CYP2C8 untersucht, dessen Expression jedoch weder in den Proben mit pHH, noch in den Proben mit Huh7, nachgewiesen werden konnte, obwohl die Expression in der Literatur beschrieben ist⁶². Die GSTA1-Expression konnte ebenfalls weder in pHH, noch in Huh7 nachgewiesen werden, obwohl eine Expression auch für Huh7, wenn auch in geringem Maß, beschrieben werden konnte^{38,39}. In beiden Fällen konnte bei funktionierender Positivkontrolle ein defekter Primer ausgeschlossen werden.

3.7.1 Untersuchung der Genexpression an Huh7 nach Paracetamolbehandlung

Die Genexpression von CYP1A2 zeigt in der 3D-Kultur eine mit steigender APAP-Konzentration abfallende Expression. In der 2D-Kultur kommt es bei Gabe von 100 µM und 1000 µM APAP zu einem Abfall der Genexpression auf die Hälfte der Expression der Kontrolle. Für die CYP3A4-Expression zeigt sich ein ähnliches Bild wie für CYP1A2. Die CYP2E1-Expression ist, mit Ausnahme

der mit 1000 μM APAP in 2D kultivierten Proben, die eine Expressionssteigerung zeigen, bei allen anderen untersuchten Proben frei von Veränderung.

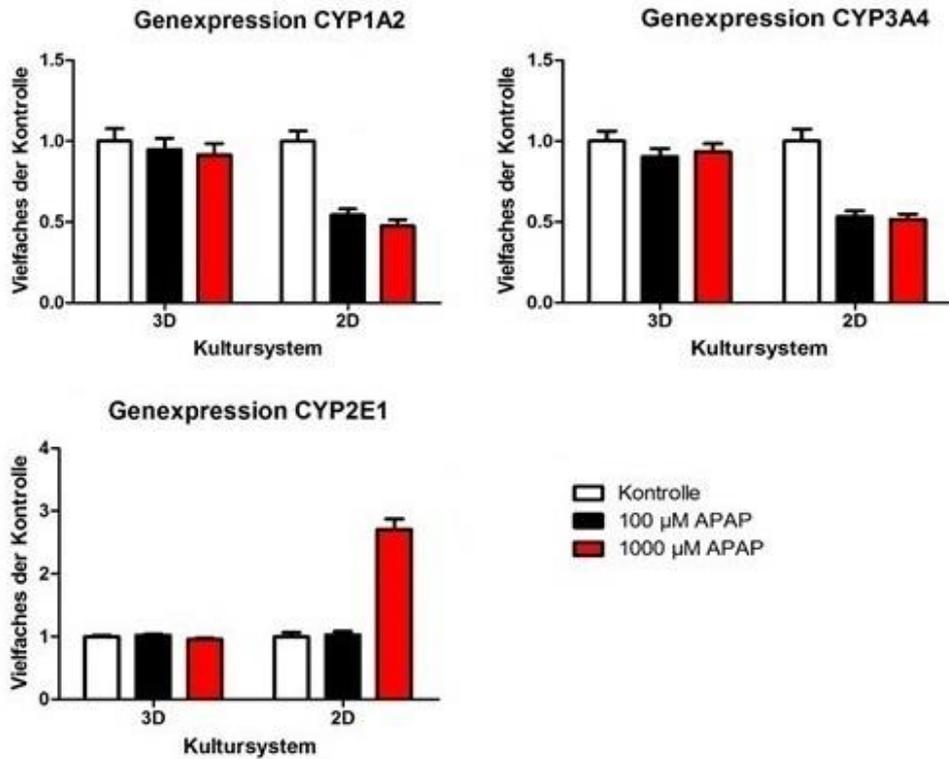


Abbildung 39: CYP1A2-, 3A4- und 2E1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

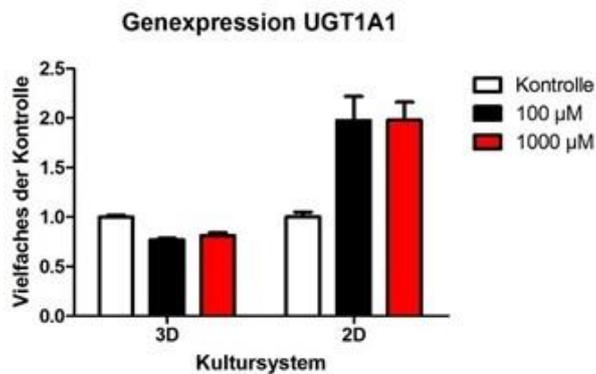


Abbildung 40: UGT1A1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Es zeigt sich in der 3D-Kultur ein geringer Abfall der UGT1A1-Expression bei Gabe von Paracetamol, während es in der 2D-Kultur bei Gabe von Paracetamol zu einem Anstieg der UGT-Expression kommt.

Die MDR1-Expression ist in der 3D-Kultur in geringem Maß bei steigender APAP-Konzentration vermindert. In der 2D-Kultur kommt es dagegen mit steigenden APAP-Konzentrationen zu einem Abfall der MDR1-Expression.

Dagegen ist die MRP1-Expression unter APAP-Behandlung, mit Ausnahme eines geringen Anstiegs in der 3D-Kultur bei Behandlung mit 1000 µM APAP, in der 3D- und 2D-Kultur nicht verändert.

Außerdem zeigt sich in der 3D-Kultur ein geringer Abfall der BCRP-Expression bei Paracetamolgabe. In der 2D-Kultur kann keine Veränderung beobachtet werden.

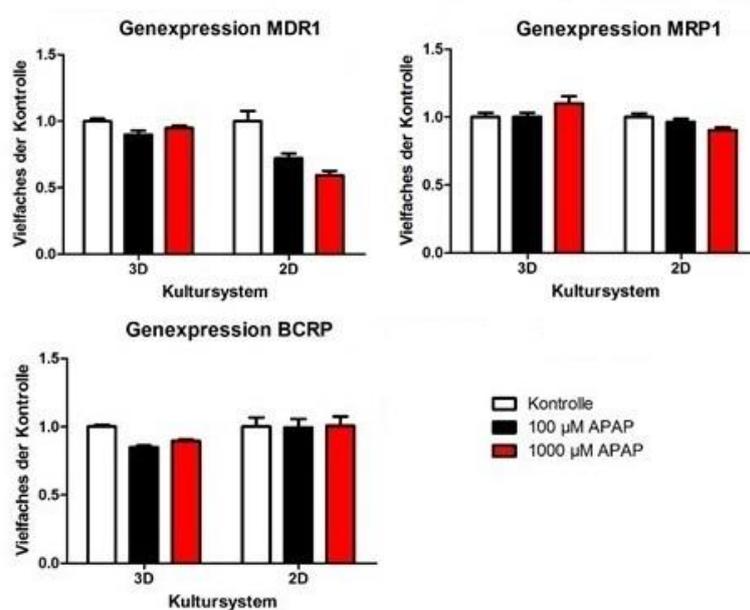


Abbildung 41: MDR1-, MRP1- und BCRP-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

In der 3D-Kultur kann bei Gabe von 100 µM ein Abfall der Albuminexpression beobachtet werden, während es bei 1000 µM zu einem Anstieg kommt. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der 2D-Kultur bei Gabe von 100 und 1000 µM APAP ein Abfall der Albuminexpression.

Genexpression Albumin

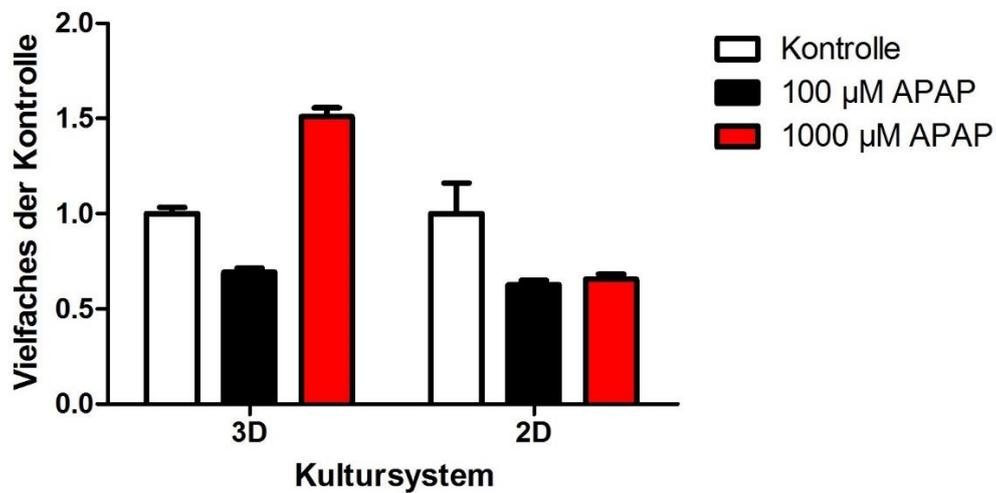


Abbildung 42: Albumin-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

3.7.2 Untersuchung der Genexpression an Huh7 nach Diclofenacbehandlung

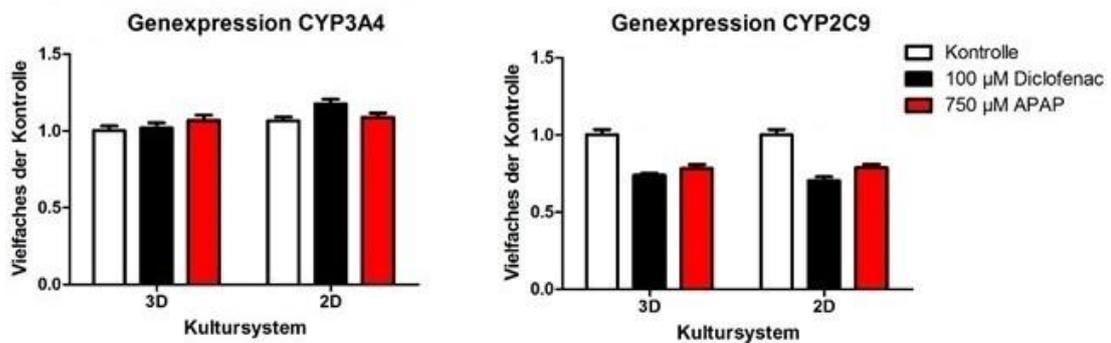


Abbildung 43: CYP3A4- und 2C9-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Diclofenac behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

In der 3D-Kultur kann ein sehr geringer Anstieg der CYP3A4-Expression bei steigenden Diclofenackonzentrationen beobachtet werden, während es in der 2D-Kultur bei Gabe von 100 µM Diclofenac zu einem Anstieg der CYP3A4-Expression kommt.

Die Expression von CYP2C9 ist in der 3D- und 2D-Kultur bei Gabe von 100 μM oder 750 μM Diclofenac verringert.

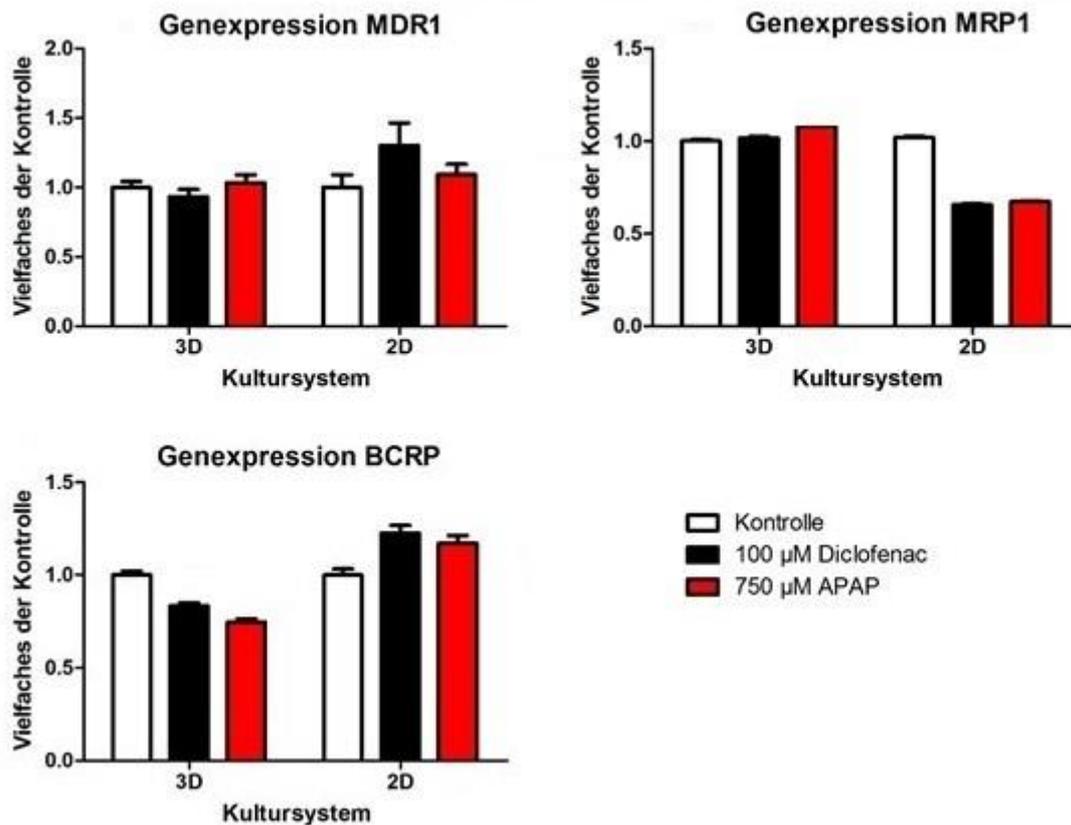


Abbildung 44: MDR1-, MRP1- und BCRP-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Diclofenac behandelten Huh7. N=2, n=2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Die MDR1-Expression ist in der 3D-Kultur bei Diclofenacgabe konstant. In der 2D-Kultur kommt es jedoch bei Gabe von 100 μM Diclofenac zu einem Anstieg. Es zeigt sich in der 3D-Kultur bei Gabe von 750 μM Diclofenac ein geringer Anstieg der MRP1-Expression, während es in der 2D-Kultur bei 100 μM und 750 μM Diclofenac zu einem Abfall der MRP1-Expression kommt.

Die BCRP-Expression nimmt in der 3D-Kultur bei steigender Diclofenackonzentration immer weiter ab. In der 2D-Kultur kommt es allerdings bei Gabe von Diclofenac zu einem Anstieg der BCRP-Expression.

Die Albuminexpression zeigt bei Gabe von 100 μM in der 3D-Kultur einen Anstieg, während es in der 2D-Kultur bei Gabe von Diclofenac zu einem Abfall der Albuminexpression kommt.

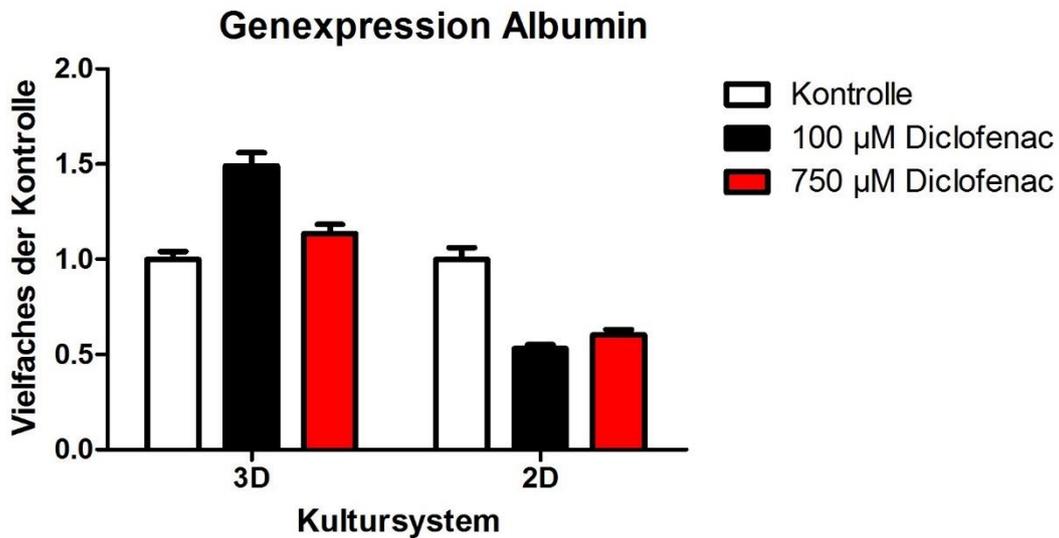


Abbildung 45: Albumin-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Diclofenac behandelten Huh7. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

3.7.3 Untersuchung der Genexpression von pHH nach Paracetamolbehandlung

Die CYP1A2-Expression ist in der 3D-Kultur bei Gabe von 1000 μM APAP geringfügig erhöht, während es in der 2D-Kultur bei gleicher Behandlung zu einem Abfall der CYP1A2-Expression kommt.

Für die CYP3A4-Expression zeigt sich in der 3D-Kultur bei APAP-Gabe eine Abnahme. In der 2D-Kultur findet sich hingegen ein Expressionsanstieg proportional zur APAP-Gabe.

Die CYP2E1-Expression ist in der 3D-Kultur bei Gabe von 100 μM APAP reduziert, während sich in der 2D-Kultur kein Einfluss des APAP zeigt.

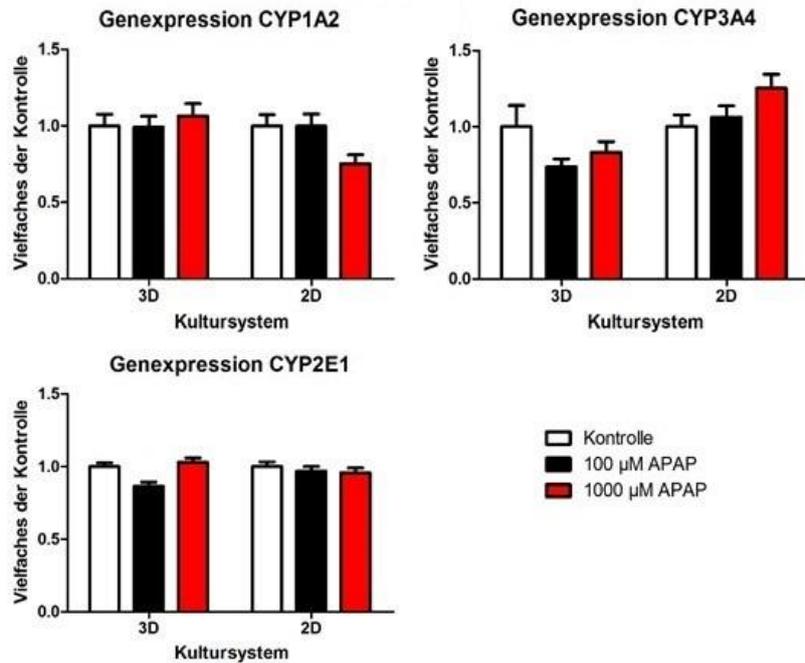


Abbildung 46: CYP1A2-, 3A4- und 2E1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Die UGT1A1-Expression zeigt in der 3D-Kultur bei Gabe von 100 μM und 1000 μM APAP einen Anstieg. In der 2D-Kultur kann dagegen keine signifikante Veränderung bei APAP-Gabe festgestellt werden.

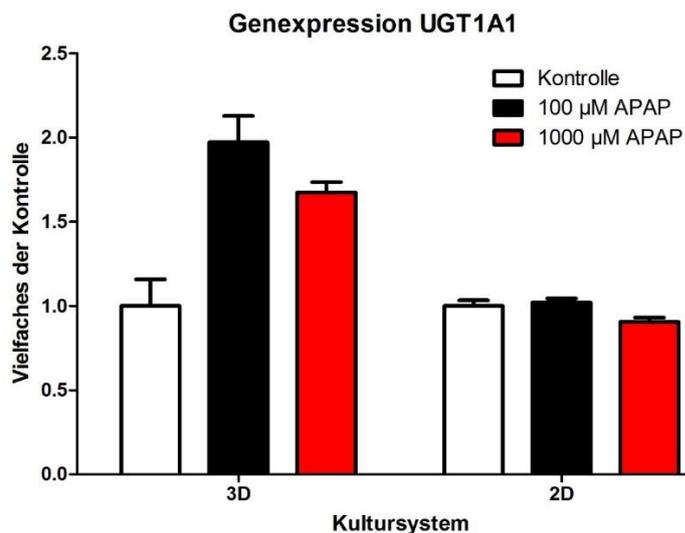


Abbildung 47: UGT1A1-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=2, n=2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Es zeigt sich in der 3D-Kultur bei Gabe von APAP eine geringfügig erhöhte MDR1-Expression, während es in der 2D-Kultur bei Gabe von 1000 μM APAP zu einer Erhöhung und bei Gabe von 100 μM ebenfalls zu einer Erhöhung der MDR1-Expression kommt.

Die MRP1-Expression ist, mit Ausnahme der Behandlung mit 1000 μM APAP in der 3D-Kultur, die zu einem Anstieg führt, von der APAP-Gabe nicht beeinflusst. Für die BCRP-Expression kann ein reziprokes Verhalten zur APAP-Konzentration in der 3D-Kultur beobachtet werden, während in der 2D-Kultur ein proportionales Verhalten vorliegt.

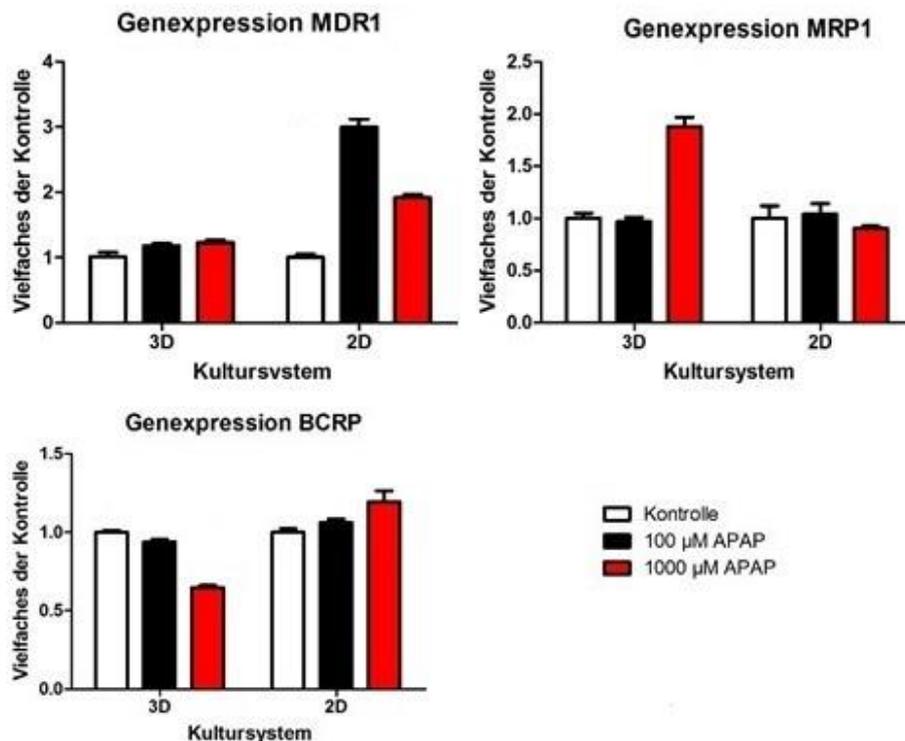


Abbildung 48: MDR1-, MRP1- und BCRP-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

Die Albuminexpression ist in der 3D- und 2D-Kultur bei Gabe von 1000 μM APAP erhöht. In der 3D-Kultur kommt es zusätzlich bei Gabe von 100 μM APAP zu einem Abfall der Albuminexpression.

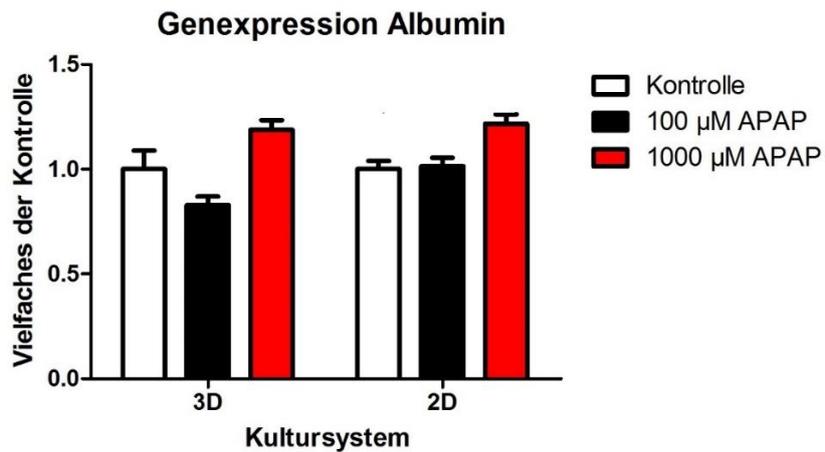


Abbildung 49: Albumin-Expression an Tag 5 von in 3D und 2D kultivierten mit Paracetamol behandelten pHH. N=1-2, n=1-2. Für jeden Datensatz ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Diese Daten wurden bei den Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg präsentiert und als Abstract in European Surgical Research⁶⁰ publiziert.

3.7.4 Untersuchung der Genexpression von pHH nach Diclofenacbehandlung

Insbesondere im bei diesem Versuch müssen die dargestellten Limitationen bei der RNA-Isolation bei Betrachtung der Ergebnisse im Hinterkopf behalten werden, da die Expression aller untersuchten Gene keine Veränderung unter Diclofenacgabe zeigt.

4. Diskussion

Die Dissertation erfolgte im Rahmen eines durch das BMBF geförderten Projektes mit einer Vielzahl von Teilnehmern (siehe Kapitel 1.4). Durch dieses Konsortium wurden die Protokolle für die meisten der durchgeführten Versuche festgelegt. Das Ziel der Dissertation ist die Validierung eines perfundierten 3D-Kultursystems, indem Huh7 und pHH untersucht werden. Gegenstand der Untersuchungen sind dabei die Syntheseleistungen in Form von Glucose, Urea und Albumin unter Medikamenteneinfluss, sowie die Auswirkungen des Medikamenteneinflusses auf die Expression von Genen der Biotransformation, die Aktivität von MDR1 und die Metabolisierung von Paracetamol, Diclofenac und Coffein durch pHH. Als wesentlicher Befund aus den Ergebnissen sei an dieser Stelle aufgegriffen, dass die pHH von der verwendeten 3D-Kultur mit Fluss in diesem Kulturmodell nicht profitieren, die Huh7 hingegen schon. Dies wird im Detail in Kapitel 4.3 diskutiert.

4.1 Diskussion der Glucoseabsorption des Schlauchsystems

Möglicherweise interagieren Materialien, die im Rahmen von Zellkulturen verwendet werden, mit verschiedenen dabei benutzten Chemikalien und Zellen. Als Beispiel für diese Interaktion sei hier PDMS, ein Kunststoff, aufgeführt, der im Rahmen einer Kultur Oligomere abgibt und so zytotoxisch wirken kann⁶⁷⁻⁶⁹, aber andererseits auch hydrophobe Moleküle absorbieren kann^{67,69-71}. Deshalb wurde entschieden, vorbeugend das Absorptionsverhalten des verwendeten Schlauchsystems für Glucose zu überprüfen, insbesondere, da interne Vortests gezeigt haben, dass auch das verwendete Schlauchsystem dazu neigt, manche Moleküle zu absorbieren und die ersten Versuche der Glucosemessung starke Schwankungen gezeigt haben, die allerdings später als unzureichendes Spülen mit PBS identifiziert werden konnten.

Die in Kapitel 3.1 dargestellten Ergebnisse lassen jedoch den Rückschluss zu, dass das Schlauchsystem Glucose praktisch nicht absorbiert und abgibt. Dies

ist literaturkonform, da die Absorption meist hydrophobe Moleküle betrifft^{67,69–71}. In Anbetracht der Ergebnisse stellte sich das verwendete Schlauchsystem also als geeignet für die Untersuchung von Glucosefreisetzung dar.

4.2 Diskussion der Metabolisierung von Paracetamol durch Huh7

Bevor die Huh7-Zelllinie für die Experimente mit Paracetamol eingesetzt wurde, war zu überprüfen, ob die Zelllinie selbst unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen in der Lage ist, Paracetamol umzusetzen. Für Huh7 ist eine geringe Genexpression für diverse Phase I-Enzyme, darunter CYP1A2, 3A4 und 2E1, UGT- und SULT-Enzyme beschrieben^{38,39}, die wichtig sind für die Umsetzung von Paracetamol zu APAP-Sulfat, APAP-Glucuronid und NAPQI^{11,21,24}. Damit sind die Voraussetzungen für eine Umsetzung von Paracetamol in der Literatur gegeben. Es wurden LDH, Transaminasen und der Resazurinumsatz gemessen.

Für die LDH-Freisetzung zeigt bei Gabe von 1000 µM APAP einen Anstieg, dieser fällt zwar gering aus, entspricht aber der aus dem obigen Text entwickelten Erwartung.

Die Transaminasenfreesetzung konnte mit dem verwendeten Kit leider in keinem der durchgeführten Versuche erfolgreich durchgeführt werden. Dafür kommen mehrere Ursachen in Frage. So ist das Kit laut Herstellerinformation für die Bestimmung von Transaminasen aus Patientenserum und nicht aus Mediumüberstand ausgelegt. Der Grenzwert des Kits liegt laut Angaben des Herstellers bei 4 U/l. Die erfolglose Messung kann einerseits daran liegen, dass in Huh7 wenig Transaminasen gebildet werden⁴⁶, oder aber, dass die Toxizität des verabreichten Paracetamols nicht ausreicht, einen Zelluntergang, der zu einer Transaminasenfreesetzung von über 4 U/l führt, hervorzurufen. Ein weiterer möglicher Grund kann die geringe Ausprägung der von Schyschka et al. beschriebenen 3D-Strukturen sein, die überhaupt nötig sind, um eine Paracetamoltoxizität zu erzielen²¹. Für primäre Rattenhepatozyten ist eine geringere Freisetzung von Transaminasen als von LDH beschrieben, was

möglicherweise übertragbar ist⁷². Außerdem konnten Xie et al.⁵⁹ zeigen, dass bei Gabe von APAP mit Konzentrationen von 5 und 10 mM nach 20 Stunden ein Anstieg der GPT-Freisetzung beginnt, der bei ungefähr 48 Stunden ein Maximum erreicht. Schyschka et al.²¹ konnten zeigen, dass dies in ähnlichem Ausmaß nicht nur für GPT, sondern auch für GOT gilt, wobei bei einer Kultivationsdauer von 72 Stunden auch mit geringen APAP-Konzentrationen toxische Effekte erzielt werden konnten. Dabei wurde ebenfalls ein Kit der Firma Analyticon verwendet, allerdings wurde nicht bei 340nm, sondern bei 570 und 690 nm gemessen, so dass die Wellenlänge ebenfalls eine mögliche Fehlerquelle darstellen könnte. Jedoch sind die im Rahmen der Dissertation verwendeten 340 nm von Hersteller empfohlen.

Zusammenfassend können als Ursachen eine zu geringe Konzentration, eine zu kurze Inkubation des Paracetamols oder eine ungenügende Ausbildung der 3D-Struktur angenommen werden.

Zur Ergänzung der Untersuchung der Metabolisierung von Paracetamol wurde die Umwandlung von Resazurin analysiert. Resazurin wird von Mitochondrien umgesetzt und kann so auf eine geringere Mitochondrienaktivierung hinweisen, So kann sich ein Zellschaden an Mitochondrien⁵⁵, der nicht zwangsläufig zum Zelltod führt, manifestieren⁴⁷.

Im Versuch konnte eine geringere Umwandlung von Resazurin im Kollagensandwich bei Gabe von 1000 µM APAP im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dies kann, bei sonst exakt gleichen Kulturbedingungen, auf eine Schädigung durch Paracetamol zurückgeführt werden. Eine Metabolisierung von Paracetamol durch Huh7 ist also zumindest anzunehmen.

4.3 Diskussion der Wirkung von Paracetamol und Diclofenac auf die Glucose-, Urea- und Albuminfreisetzung von Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Es ist bekannt, dass 3D-Kulturen über ein breites Spektrum an Vorteilen gegenüber einer 2D-Kultur verfügen¹⁶. Dazu gehört eine bessere Ähnlichkeit mit

in vivo-Ergebnissen¹⁵, beispielsweise im Sinne von Sensitivität gegenüber Pharmaka^{15,16,19,20} und eine besserer Urea- und Albumin-Syntheseaktivität^{15,16,19,20}, um nur einige zu nennen. Wird zusätzlich Fluss hinzugefügt, so kann in anderen Kultursystemen eine Reihe weiterer Vorteile bei der Kultur von pHH, wie verstärkte Metabolitenproduktion, Enzymaktivitäten und Xenobiotikametabolismus²³, beobachtet werden.

4.3.1 Diskussion der Wirkung von Paracetamol und Diclofenac auf die Glucose- und Ureafreisetzung von Huh7 in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Die hochsignifikant erhöhte Glucosefreisetzung in der 3D-Kultur zeigt deutlich, wie die Huh7 von den veränderten Kulturbedingungen profitieren, was sich mit den Erwartungen aus der Literatur deckt^{16,19,20}. Eine Interaktion der Glucose mit dem Schlauchsystem selbst kann durch unsere Ergebnisse ausgeschlossen werden. Interne Voruntersuchungen haben außerdem gezeigt, dass ein ausreichendes Spülen des Schlauchsystems vor Zugabe der Reaktionslösung nötig ist, da es sonst zu falsch hohen Glucosewerten kommt. Diese falsch hohen Werte können durch die Glucoseergebnisse der pHH, die in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt werden, ausgeschlossen werden, da die Spülung des Schlauchsystems in allen Fällen gleich erfolgte.

Die Schwankung innerhalb der Replikate selbst kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Genexpression von Enzymen in Huh7 von deren Passage abhängt³⁸, ebenso wie die Proliferation³⁷. Die in geringe Änderung der Glucosefreisetzung in Abhängigkeit von der Paracetamolkonzentration kann darauf zurückgeführt werden, dass für die Entstehung eines deutlichen Zellschadens binnen 24 Stunden Konzentrationen von 5 oder mehr mM APAP nötig sind⁵⁹ oder eine längere Inkubation nötig ist^{21,59}. Eine Wirkung des Diclofenacs auf die Glucosefreisetzung kann nicht beobachtet werden. Da jedoch Veränderungen in der Urea- und LDH-Freisetzung beobachtet werden konnten, scheint der Schwellenwert für die toxische Wirkung von Diclofenac auf

die Glucosefreisetzung höher zu liegen als die hier verwendeten Konzentrationen. Die Glucosefreisetzung von Huh7 profitiert zusammengefasst deutlich von den Kulturbedingungen in 3D.

Die basale Ureafreisetzung fällt in der 3D-Kultur ebenfalls erwartungsgemäß höher aus^{15,16,19,20}. Schwankungen innerhalb eines Replikates sind auch hier möglicherweise passageabhängig, wie für Genexpression³⁸ und Proliferation beschrieben³⁷. Außerdem gelten die bereits angeführten Einschränkungen zur Konzentration⁵⁹ und Einwirkdauer des Paracetamols^{21,59}. Der Anstieg in der 3D-Kultur ist jedoch nicht so groß, wie dies bei Glucose der Fall ist. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die basale Ureasyntese in der 3D-Kultur eine gewisse Anlaufzeit benötigt⁷³ und nur die basale Ureafreisetzung ohne Stimulation gemessen wurde, da so bei begrenzter Verfügbarkeit von Bioreaktormembranen eine gleichzeitige Glucosemessung möglich war. Die Ureafreisetzung von Huh7 profitiert, wenn auch weniger stark als die Glucosefreisetzung, von den Kulturbedingungen in 3D.

Die an der LDH-Messung nicht sichtbaren Auswirkungen des Paracetamols, aufgrund von Konzentration⁵⁹ und Dauer des Einwirkens^{21,59}, sind bereits dargestellt.

Der dargestellte Anstieg der LDH-Freisetzung bei Gabe von Diclofenac in der 3D-Kultur, der sich proportional zur Diclofenackonzentration verhält, deckt sich mit den Erwartungen aus der Literatur³². Es kann also davon ausgegangen werden, dass Diclofenac, im Gegensatz zu Paracetamol, bereits in den verwendeten Konzentrationen zytotoxisch wirkt, wie von Müller et al. 2011³² beschrieben. Dies liegt höchwahrscheinlich daran, dass Paracetamol erst durch Abbau zu NAPQI^{11,24,55} zu einem Zellgift wird, was bei den verwendeten Konzentrationen nicht in einem Maß geschieht oder durch GSH^{24,55,59} entsprechend kompensiert wird, bevor es zu einer erhöhten LDH-Freisetzung führt.

4.3.2 Diskussion der Wirkung von Paracetamol und Diclofenac auf die Glucose-, Urea- und Albuminfreisetzung von pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Ein großes Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung des Kultursystems auf die Tauglichkeit, pHH zu kultivieren.

Es kann, aus den gleichen Gründen wie bereits oben beschrieben, kein signifikanter Einfluss des Paracetamols oder Diclofenacs auf die Glucosefreisetzung beobachtet werden. Allerdings fällt auf, dass die Glucose-, basale Urea- und Albuminfreisetzung in der 3D-Kultur geringer ausfällt als in der 2D-Kultur. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen, vom Aufbau und den Bedingungen des Bioreaktors und des Schlauchsystems über die Kultivierungsbedingungen bis hin zu den Zellen selbst.

Die Ports, an denen das Schlauchsystem angeschlossen ist, neigen dazu, zu Versuchsbeginn etwas undicht zu sein, wodurch anfänglich Luft in den Bioreaktor gezogen wird und so eine Blase über der Bioreaktormembran im oberen Kanal entsteht und eventuell die Perfusion dadurch beeinträchtigt wird. Dies wird von Huh7-Krebszellen möglicherweise besser vertragen. Die Perfusion an sich ist aufgrund von vermehrt festgestellten Undichtigkeiten bei Flussgeschwindigkeiten von 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, wie von den Entwicklern des Systems empfohlen^{43,45}, auf 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduziert worden. Dadurch konnte das zuvor regelmäßig auftretende Problem der Undichtigkeiten an den Ports, die das Schlauchsystem mit dem Bioreaktor verbinden, behoben werden, da die Schlauchsysteme andernfalls leer liefen und eine Versuchsdurchführung unmöglich wurde. Eine verringerte Flussrate könnte jedoch zu minderoxygenierten Arealen wie in Kulturen ohne Fluss geführt haben^{16,24}, was die Gesamtsyntheseleistung des Bioreaktors vermindert haben könnte.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Poren beim Kollagenisieren sehr ungleichmäßig mit Kollagen versehen wurden, da während des Vorgangs das Kollagen möglicherweise ungleich verteilt wird. So wäre eine flächendeckende Aussaat der pHH, die eine 3D-Kultivierung auf der ganzen

Membran möglich gemacht hätte, nicht zu gewährleisten. Die Membranen, die zur RNA-Gewinnung in TriFast eingelegt wurden, zeigten nach dem Versuch makroskopisch eine ungleiche Verteilung der Hepatozyten mit teils sehr dicht gepackten und teils makroskopisch nicht sichtbar bedeckten Arealen. Dies ist sowohl durch eine ungleichmäßige Adhäsion, als auch durch ungleichmäßige Perfusion an sich, als auch durch eine ungleichmäßige Perfusion durch Luftblasen im Bioreaktor zu erklären. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, dass das Kollagen selbst möglicherweise für die Kultivierung von pHH im Bioreaktor ungeeignet sein könnte, da beispielsweise für den ibidi-Zellchip bei gleicher verwendeter Membran anders aufbereitetes Kollagen verwendet wurde.

Schließlich ist an die pHH selbst zu denken. Im Gegensatz zu Huh7 besitzen die ausgesäten pHH nie eine Viabilität von 100%, es ist also davon auszugehen, dass lebende und tote Zellen um den Platz in den Poren konkurrieren, was bei Huh7 nicht der Fall ist. Dies kann durch Aufnahmen von für einen Tag ohne Fluss im Zellchip von ibidi kultivierten Huh7 und pHH gezeigt werden. Dabei liegen die Huh7 eng aneinander und es kann von 3D-Strukturausbildung ausgegangen werden, während die pHH bei gleicher verwendeter Zellzahl nur vereinzelt in den Poren anzufinden sind. Deshalb können die 3D-Strukturen möglicherweise nicht im nötigen Ausmaß gebildet werden (siehe hierzu die untenstehende Abbildung). Hierdurch kann eine Polarität der Zellen⁴ möglicherweise nicht oder nicht in ausreichendem Maß ausgebildet werden und eine Voraussetzung für die Paracetamoltoxizität²¹ nicht erfüllt werden.

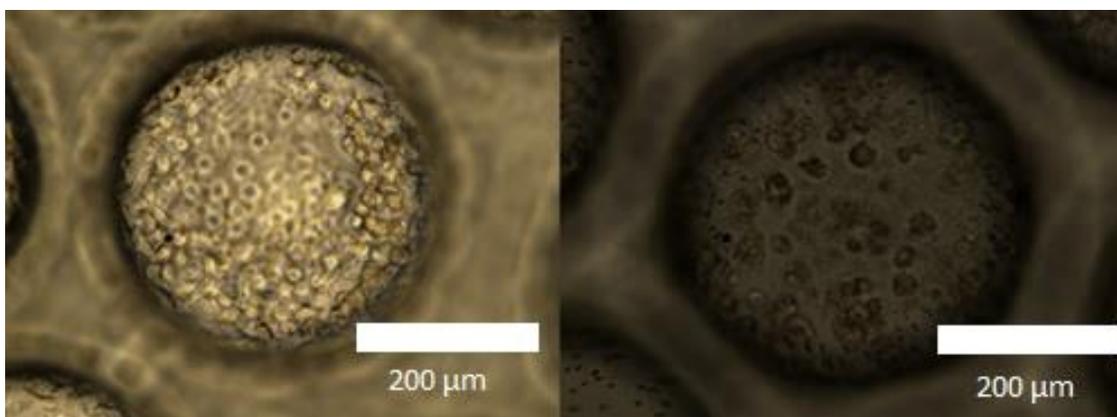


Abbildung 50: Huh7 und pHH in Poren nach 3D-Kultur ohne Fluss; linkes Bild: Huh7; rechtes Bild: pHH

Zuletzt besteht die Möglichkeit einer Verzerrung durch die Spender der pHH. Es besteht theoretisch die Möglichkeit, dass durch die hohe Donorvariabilität⁴⁰ für die 3D-Kultur vermehrt ungeeignete vorgeschädigte Spender verwendet wurden, auch wenn eine Gesamtzahl von über 10 Spendern diese Hypothese unwahrscheinlich erscheinen lässt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Spender, die ja Aufgrund von Lebererkrankungen operiert wurden, bereits von sich aus weniger belastbare Hepatozyten spenden, die dem Stress der Ausbildung von 3D-Strukturen, dargestellt durch eine hohe LDH-Freisetzung zu Kulturbeginn^{72,74}, nicht in dem Maße gewachsen sind, wie das bei gesünderen Spendern der Fall hätte sein können.

Alle diese Faktoren können möglicherweise dazu beitragen, dass die Ergebnisse einer aufgrund der Literatur erwarteten Verbesserung der Syntheseleistung bei pHH^{16,19,20} nicht eingetreten sind, obwohl die wesentlich robustere Huh7- Tumorzelllinie von den Kulturbedingungen profitiert hat.

Die basale Ureafreisetzung liefert in der 3D- und 2D-Kultur ähnliche Ergebnisse unter Gabe von Paracetamol. Dies kann dadurch bedingt sein, dass die Ureasyntese möglicherweise weniger kulturabhängig ist als die Glucosefreisetzung, da auch in isolierten Hepatozyten Ammoniak anfällt, der entgiftet werden muss, während der Stimulus für die Glucosefreisetzung, beispielsweise durch Glucagon, fehlt⁵. Bei Gabe von Diclofenac zeigt sich einerseits, dass basal in der Kontroll-3D-Kultur vermeintlich kein Harnstoff freigesetzt wird, was jedoch in der Kontroll-3D-Kultur bei APAP-Gabe nicht der Fall ist. Dies unterstreicht die Instabilität des Kultursystems für pHH. Andererseits kann ein Anstieg der Ureafreisetzung beobachtet werden. Da gleichzeitig aber kein LDH-Anstieg auftritt, kann das Ansteigen der Ureafreisetzung als früher Hinweis auf Zytotoxizität interpretiert werden. Der bei mit Diclofenac behandelten Huh7, nicht aber bei mit Diclofenac behandelten pHH beobachtete Anstieg der LDH-Freisetzung zeigt die geringere Sensitivität der pHH durch eine bessere enzymatische Ausstattung³⁹, die eine bessere Entgiftung als in Huh7 ermöglicht.

Im Gegensatz zu Glucose und Urea zeigt sich bei der Albuminfreisetzung, insbesondere in der 2D-Kultur, eine deutliche Abnahme der Freisetzung mit steigender Paracetamol- und Diclofenackonzentration. Dies kann möglicherweise daran liegen, dass Paracetamol und Diclofenac an Albumin binden^{75,76} und so gebundenes Albumin nicht mehr freigesetzt wird. Eine verringerte Freisetzung aufgrund einer Schädigung durch Paracetamol und Diclofenac ist in Anbetracht aller anderen bereits beschriebenen Ergebnisse, die keine Auswirkung der Medikamente auf Glucose-, Urea- und LDH-Freisetzung zeigen, eher unwahrscheinlich, da man andernfalls in diesen Bereichen ebenfalls deutliche Änderungen beobachten müsste. Alternativ dazu könnte Albumin auch der zeitlich früheste hier untersuchte Marker sein, der auf die Gabe von APAP oder Diclofenac bei gegebenen Konzentrationen und Inkubationszeiten reagiert.

Die geringen beobachteten Auswirkungen von Paracetamol und Diclofenac könnten durch längere Kultur²¹ oder höhere Dosierungen^{32,59} behoben werden. Auch die von Schyschka et al.²¹ beschriebene notwendige 3D-Struktur der Zellen für die Aufnahme von Paracetamol spielt eine wichtige Rolle für die geringen Veränderungen durch Medikamentengabe, sodass eine ausbleibende Entwicklung der 3D-Strukturen insbesondere die Paracetamolwirkung beeinflusst haben könnte.

4.4 Diskussion der Metabolisierung von APAP, Diclofenac und Coffein an pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Im Rahmen der Dissertation wurde auch untersucht, welche Metaboliten in den unterschiedlichen Kulturbedingungen bei Gabe von geringen Konzentrationen an APAP, Diclofenac und Coffein entstehen. So soll eine Aussage über die Eignung des Kultursystems für mögliche Medikamententests nicht nur auf der Ebene der Toxizität, sondern auch auf Ebene der Metabolitenbildung getroffen werden können.

Für die Paracetamolmetabolisierung sind insbesondere die Phase II-Enzyme zuständig¹³, weshalb die Bildung von APAP-Glucuronid und APAP-Sulfat untersucht wurde. In der Literatur wird eine bessere Konservierung von Phase II-Enzymen^{15,16,20}, im speziellen von UGT^{16,19}, beschrieben, weshalb eine bessere APAP-Metabolitenbildung in der 3D-Kultur zu erwarten ist.

Dies deckt sich jedoch nicht mit den experimentell erzielten Ergebnissen, die in der 2D-Kultur eine signifikant erhöhte Bildung der APAP-Metaboliten zeigen.

Für die Diclofenacmetabolisierung zu 4'-OH-Diclofenac ist insbesondere CYP2C9 verantwortlich^{9,11,51-54}. In der Literatur wird eine längere Expression von Phase I-Enzymen beschrieben^{15,16,19}, weshalb eine bessere 4'-OH-Diclofenacbildung in der 3D-Kultur zu erwarten ist.

Dies deckt sich, wie bereits zuvor bei Paracetamol, jedoch nicht mit den experimentell erzielten Ergebnissen, die auch für Diclofenac eine in 2D signifikant erhöhte Bildung von 4'-OH-Diclofenac zeigen.

Für die Metabolisierung von Coffein zu Paraxanthin ist insbesondere CYP1A2^{11,61,62} verantwortlich. Da Paraxanthin jedoch bereits in der Versuchslösung selbst in deutlich größerem Ausmaß als dies bei den Diclofenac- und APAP-Metaboliten der Fall war, nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass die Qualität des Coffeins für eine adäquate Versuchsdurchführung nicht ausreichend war, weshalb einerseits Paraxanthin in großem Ausmaß in der Versuchslösung nachgewiesen werden konnte, andererseits aber nicht in signifikantem Maße Paraxanthin gebildet wird. Alternativ kann das gemessene Paraxanthin in der Versuchslösung möglicherweise ein Artefakt sein, das durch die Messung einer paraxanthinähnlichen Substanz entsteht. Der Abfall des Peaks in 2D nach 60 Minuten kann auf eine weitere Metabolisierung des Paraxanthins hindeuten.

4.5 Diskussion der MDR1-Aktivität von Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur

Die Polarisation und damit auch die Differenzierung von Hepatozyten ist komplexer, als dies bei anderen epithelialen Zellen der Fall ist⁴. Da ein

Zusammenhang zwischen Form und Funktion besteht, kann eine Prüfung der MDR1-Aktivität einen Hinweis auf den Differenzierungsgrad der Zellen geben.

Huh7 in 3D-Kultur mit Perfusion zeigen eine geringfügig höhere MDR1-Aktivität als in 2D-Kultur. Da es sich um eine Tumorzelllinie handelt³⁷, ist von sich aus ein geringerer Differenzierungsgrad zu erwarten als bei nicht entarteten Zellen, der für Huh7 im Bereich der Polarisation auch in der Literatur beschrieben ist⁴. Insofern ist, insbesondere in Anbetracht der Steigerung der Glucosefreisetzung in der 3D-Kultur, davon auszugehen, dass der Spielraum für eine MDR1-Aktivitätssteigerung durch 3D-Kultivierung gering ist, insbesondere, wenn man in Betracht zieht, dass die Aktivität in pHH um den Faktor 10 höher ist.

Für pHH kann, wie bereits für die Glucose-, Urea- und Albuminfreisetzung in beschrieben, eine niedrigere MDR1-Aktivität in der 3D-Kultur mit Perfusion experimentell ermittelt werden. Hierfür können die bereits beschriebenen Erklärungsansätze herangezogen werden. Da die MDR1-Transporter jedoch in vivo apikal, also gallenwärts, ausgerichtet sind^{4,8,24,40}, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass bei guter Differenzierung unter 3D-Kulturbedingungen bei hoher MDR1-Aktivität trotzdem niedrige Rhodaminkonzentrationen im Überstand gemessen werden, da das Rhodamin in die bei 3D-Kultivierung gebildeten in der Literatur beschriebenen Gallenkanälchen^{32,40,63-65,77} abgegeben werden. Außerdem ist eine apikale MDR1-Lage auch für 3D-Kulturen beschrieben⁷⁴. In der weniger differenzierten 2D-Kultur geben die MDR1-Transporter Rhodamin in den Überstand ab, da keine Gallenkanälchen vorhanden sind. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Bildung von Gallensäuren durch pHH in 3D-Kultur ohne Fluss und in 2D-Kultur untersucht. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.6 diskutiert.

Von Schyschka et al.²¹ wurden Versuche zur Bestimmung der MRP1-Aktivität in einem Kollagensandwich als 3D-Kultur und einer 2D-Kultur durchgeführt. Dabei wurden in der statischen 3D-Kultur höhere Aktivitäten als in der 2D-Kultur beschrieben. Diese Tatsache, zusammen mit den bereits für den Bioreaktor dargestellten Ergebnissen, deutet jedoch eher darauf hin, dass das verwendete 3D-Kultursystem nicht für die Kultivierung von pHH geeignet ist.

4.6 Diskussion der Gallensäurenbildung durch pHH in statischer 3D- und 2D-Kultur

Gallensäuren dienen dazu, Cholesterin ausscheidbar zu machen und Fett zu verdauen⁵, wobei es eine Vielzahl von Enzymen gibt, die unterschiedliche Gallensäuremoleküle bildet⁵.

Zur Überprüfung der in Kapitel 4.5.2 aufgestellten Hypothese wurde von der Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken eine Analyse des Überstandes von in 3D ohne Fluss und 2D kultivierten pHH durchgeführt, wobei der Überstand auf verschiedene Gallensäuren überprüft wurde. Im Ergebnis zeigt sich zwar eine Bildung von drei Gallensäuretypen in der 3D-Kultur, die in der 2D-Kultur nicht gebildet werden, jedoch liegen sehr viele der gebildeten Gallensäuren unter dem Quantifikationslimit. Die erhöhte Anzahl an gebildeten Gallensäuretypen in der 3D-Kultur kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die im Zellchip verwendete Membran kleiner ist als im Bioreaktor und so weniger mit Sauerstoff minderversorgte Areale vorhanden sind. Außerdem wurde ein anders aufbereitetes Kollagen verwendet als im Bioreaktor, das besser für pHH geeignet sein könnte.

Die quantifizierbaren Gallensäuren zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen der 3D- und 2D-Kultur. Somit kann die aufgestellte Hypothese einer Minderfreisetzung von Rhodamin in den Überstand durch eine deutlich vermehrte Gallengangsbildung widerlegt werden und die in 4.5.2 diskutierten Ergebnisse wahrscheinlich durch die in Kapitel 4.3 angestellten Überlegungen erklärt werden.

4.7 Diskussion der Genexpression von Huh7 und pHH in 3D-Kultur mit Fluss und 2D-Kultur nach Behandlung mit Paracetamol und Diclofenac

Die in Kapitel 2.8 beschriebenen Schwierigkeiten bei der Isolation der RNA führten zu kleineren N und n, was die Ergebnisse anfälliger für Ausreißer macht und die Aussagekraft der Ergebnisse durch die geringere Qualität zusätzlich

vermindert ist. Die Ergebnisse der Genexpression sind daher stets mit diesem Wissen im Hinterkopf zu betrachten.

So konnte die Expression von CYP2C8 und GST nicht nachgewiesen werden, obwohl sie auch für Huh7 in der Literatur beschrieben ist^{38,39,62}.

4.7.1 Diskussion der Genexpression von Huh7 in nach Paracetamol- und Diclofenacbehandlung

Für Huh7 ist eine Reihe an exprimierten Genen der Biotransformation bekannt^{38,39,62}. Die Ergebnisse der Versuche mit Paracetamol werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

Für CYP1A2 und 3A4 zeigt sich in der 3D-Kultur ein Unterschied in der Genexpression bei Gabe von Paracetamol, während sich in der 2D-Kultur bei steigender Gabe von APAP eine Abnahme der Genexpression von CYP1A2 und 3A4 zeigt. Dies kann damit erklärt werden, dass die verwendeten Konzentrationen an APAP zwar, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, nicht zum Zelluntergang führen, aber, wie in Kapitel 4.2 gezeigt, durchaus Auswirkungen auf die Zelle haben. Die gestressten Zellen regulieren also nicht notwendige Enzyme herunter, auch wenn eine Beteiligung von CYP1A2 und 3A4 am Paracetamolstoffwechsel in Mäusen beschrieben ist⁵⁵.

Im Gegensatz dazu zeigt die CYP2E1-Expression in der 2D-Kultur bei Gabe von 1000 µM APAP einen Anstieg, was als Beleg für die Belastung der Zelle verstanden werden könnte, da die anfallende Menge an Paracetamol hier zu einem höheren Bedarf an CYP2E1 führen würde⁵⁵, wenn die Sulfatierungskapazität ausgelastet wäre⁹. Die geringer gestressten in 3D kultivierten Huh7 zeigen diesen Anstieg deshalb nicht. Allerdings korreliert eine erhöhte Genexpression von CYP2E1 nicht unbedingt mit einer erhöhten Aktivität⁵³. Da jedoch die Aufnahme von Paracetamol dreidimensionale Strukturen voraussetzt²¹ und eine Aufnahme von Paracetamol zu einer Hochregulation der Bildung von CYP2E1 kommt²¹, ist diese Beobachtung

wahrscheinlich ein Zufallsprodukt, insbesondere, wenn man sich die Schwierigkeiten bei der RNA-Isolation vergegenwärtigt.

Die Expression von UGT1A1 ist in der 2D-, nicht aber in der 3D-Kultur erhöht. Dies kann daran liegen, dass der Stoffwechselweg des Paracetamol über die Phase II-Enzyme¹³ in der 2D-Kultur ausgelastet ist und es zu einer reaktiv erhöhten Genexpression kommt. UGT1A1-Expressionsniveau und Aktivitätsniveau korrelieren jedoch nur gering miteinander⁵³, sodass nicht zwangsläufig auf eine erhöhte tatsächliche Aktivität in der 3D-Kultur bei APAP-Gabe im Vergleich zur Kontrolle geschlossen werden kann.

Die Phase III-Transporter MRP1 und BCRP zeigen keine Änderung bei Gabe von Paracetamol, obwohl in Hepatozyten eine erhöhte MDR1-, MRP1- und BCRP-Expression in durch APAP-Überdosen geschädigten Lebern beschrieben ist⁷⁸ und die MRP1-Expression bereits ab 250 µM APAP-Gabe hochreguliert wird²¹. Dies kann daran liegen, dass die Huh7 über eine verringerte Ausstattung von mit Enzymen und Transportern der Biotransformation verfügen, wie in der Literatur beschrieben^{38,39} und in Kapitel 4.5 für die MDR1-Aktivität dargestellt.

In der 3D-Kultur kommt es bei Gabe von 1000 µM APAP zu einem Anstieg der Albuminexpression. Eine Erklärung hierfür ist möglicherweise, dass APAP an Albumin bindet und bei erhöhtem Bedarf mehr APAP synthetisiert wird⁷⁵.

Im nächsten Abschnitt wird die Wirkung des Diclofenacs auf die Genexpression von Huh7 diskutiert.

Die CYP3A4-Expression zeigt keine Beeinflussung durch Diclofenac, da der größte Teil der OH-Diclofenacbildung über CYP2C9 abläuft¹³.

Die CYP2C9-Expression ist in der 3D- und 2D-Kultur bei Diclofenaccgabe verringert. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist eine, wie für CYP2C9 und Warfarin auf enzymatischer Ebene beschriebene Feedbackinhibition⁷⁹, die dazu führt, dass durch CYP2C9 gebildete Metaboliten auf genomischer Ebene die CYP2C9-Expression hemmen.

Die MDR1-Expression zeigt keine Änderung unter Diclofenaccgabe. Dies ist mit der Literatur zu vereinbaren, da hydrophile Konjugate, zu denen das

glucuronisierte Diclofenac gehört, keine typischen Substrate des MDR1-Transporters sind⁸⁰.

Die MRP1-Genexpression ist in der 3D-Kultur bei Diclofenacgabe geringfügig erhöht, während sie in der 2D-Kultur bei Diclofenacgabe erniedrigt ist. Da MRP1 auch ein Marker für Proliferation sein kann²⁴, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass Huh7 in der 3D-Kultur den Diclofenacstress wesentlich besser überstehen als in der 2D-Kultur.

Für die BCRP-Expression kann in der 3D-Kultur eine zur Diclofenackonzentration proportionale Abnahme festgestellt werden, während es in der 2D-Kultur zu einer Zunahme bei Diclofenacgabe kommt. BCRP transportiert Glucuronidkonjugate⁸⁰ und kommt somit auch als Transporter für Glucuronid-Diclofenac infrage. Da es in der 2D-Kultur bereits zu einer Zunahme der UGT1A1-Expression gekommen ist, ist anzunehmen, dass in der 2D-Kultur per se keine suffiziente Ausstattung für die Diclofenacbiotransformation vorliegt und diese bei Diclofenacgabe erst synthetisiert werden muss.

In der 3D-Kultur kommt es bei Gabe von 100 µM Diclofenac zu einem Anstieg der Albuminexpression. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Diclofenac an Albumin bindet und bei erhöhtem Bedarf mehr Albumin synthetisiert wird^{76,81}.

4.7.2 Diskussion der Genexpression von pHH nach Paracetamol- und Diclofenacbehandlung

Die CYP1A2-Expression ist in der 2D-Kultur bei Gabe von 1000 µM zwar geringgradig verringert. Dies ist möglicherweise, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, durch einen erhöhten Stress der Zellen zu erklären.

Für CYP3A4 kann keine Zu- oder Abnahme beobachtet werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass CYP3A4 zwar möglicherweise in Ratten eine Rolle in der APAP-Metabolisierung spielt⁵⁵, aber die Gabe von APAP in pHH nicht wesentlich mit der Genexpression von CYP3A4 interagiert.

In der 3D-Kultur zeigt sich bei Gabe von Paracetamol ein Anstieg der UGT1A1-Expression. Eine Erklärung hierfür ist, dass Paracetamol durch

Glucuronidierung metabolisiert wird und bei Überlastung der Phase II-Enzyme die NAPQI-Bildung in toxischem Ausmaß beginnt⁹. Allerdings gibt es nur eine geringe Korrelation von UGT1A1-Expression und tatsächlicher Aktivität⁵³, weshalb nicht auf eine tatsächlich erhöhte Phase II-Aktivität in der 3D-Kultur geschlossen werden kann.

Für MDR1 zeigt sich in der 2D-Kultur bei APAP-Gabe eine gesteigerte Expression. MRP1 wird in der 3D-Kultur bei APAP-Gabe verstärkt exprimiert, ebenso BCRP in der 2D-Kultur. Dies ist im Einklang mit der Literatur, die eine gesteigerte Expression der Transporter bei APAP-Gabe beschreibt^{21,78}, allerdings bereits ab 250 μM ²¹, und nicht erst, wie in diesen Ergebnissen dargestellt, ab 1000 μM . Der Abfall der BCRP-Expression in der 3D-Kultur bei Gabe von 1000 μM APAP kann als Ausreißer betrachtet werden, wobei nur eine geringe Korrelation von BCRP-Expression und –aktivität besteht⁵³.

Es zeigt sich in der 3D- und 2D-Kultur bei Gabe von 1000 μM APAP ein Anstieg der Albuminexpression, bei einem in Kapitel 4.3 dargestellten Abfall der Albuminsekretion. Dies ist vereinbar mit einer erhöhten Bindung von APAP an Albumin⁷⁵ und einem steigenden Albuminbedarf, der zu einer gesteigerten Genexpression führt.

Im nächsten Abschnitt wird die Wirkung des Diclofenacs auf die Genexpression von pHH diskutiert.

Alle untersuchten Expressionsprofile zeigen keinen Einfluss des Diclofenacs. Da allerdings im Rahmen der RNA-Isolation Probleme auftraten, ist dieser fehlende Einfluss am ehesten auf die mangelnde Qualität der RNA zurückzuführen, insbesondere aufgrund dessen, dass man im Falle der Huh7 Veränderungen der Genexpression im Rahmen der Diclofenacgabe und im Falle der pHH Veränderungen im Rahmen der APAP-Gabe beobachten kann. Eine fehlerhafte Durchführung der PCR kann dadurch ausgeschlossen werden, dass die parallel durchgeführten Positivkontrollen funktioniert haben.

5. Zusammenfassung

Medikamentenentwicklung ist ein ressourcen- und zeitintensiver Prozess mit einem hohen Risiko, zu scheitern¹⁰. Um möglichst schnell und kostengünstig⁸² festzustellen, ob ein Medikament zulassungsfähig ist oder nicht, ist es notwendig, über möglichst gute präklinische Systeme zur Medikamententestung zu verfügen, insbesondere für pHH, da die Leber für den Großteil des Scheiterns von Medikamenten verantwortlich ist¹⁴. Da dies mit dem momentanen Goldstandard, der 2D-Kultur, aufgrund der raschen Dedifferenzierung der pHH^{15,16,19,20} nur eingeschränkt möglich ist, gilt es, Systeme zu entwickeln, die der 3D *in vivo* Situation, wie z.B. der Leber, möglichst nahe zu kommen. So sollen rasch ungeeignete Medikamente identifiziert und von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen werden können. Im Rahmen der Dissertation wurde das System des r^{3D}-KITChip Bioreaktors beschrieben, wobei Huh7 und pHH kultiviert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die in 3D kultivierten Huh7 eine gegenüber den in 2D kultivierten Huh7 in gesteigertem Maß Glucose und Urea freisetzen und über eine gesteigerte MDR1-Aktivität verfügen. Im Gegensatz dazu zeigten die in 3D kultivierten pHH eine geringere oder ähnliche Freisetzung von Glucose, Urea, Albumin, APAP-Metaboliten und Diclofenac-Metaboliten sowie eine geringere MDR1-Aktivität.

Zusammenfassend konnten die in der Literatur beschriebenen Vorteile einer 3D-Kultivierung für pHH^{15,16,19,20} mit dem hier verwendeten System nicht reproduziert werden. Mögliche problematische Aspekte, wie das Gehäuse, die Perfusion und die Handhabung des Bioreaktors wurden beschrieben und können als mögliche Ansatzpunkte für eine Verbesserung des Systems dienen.

6. Literaturverzeichnis

1. Benninghoff A, Drenckhahn D, Christ B, et al. (2008) *Anatomie Band 1*. 17th ed. München: Urban & Fischer; 697-716
2. Aumüller G, Aust G, Doll A, et al. (2007) *Duale Reihe Anatomie*. 1st ed. Stuttgart: Thieme; 725-736
3. Lüllmann-Rauch R. (2009) *Taschenlehrbuch Histologie*. 3rd ed. Stuttgart, New York: Thieme; 393-406
4. Decaens C, Durand M, Grosse B, Cassio D. (2008) Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol cell*. Volume 100, Issue 7: 387-398. doi:10.1042/BC20070127.
5. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, et al. (2006) *Biochemie Und Pathobiochemie*. 8th ed. Heidelberg: Springer; 370-374, 445-451, 1090-1097, 358-365, 433-434, 244
6. Dörner K, Deufel T, Hascke-Becher E, et al. (2013) *Klinische Chemie Und Hämatologie*. 8th ed. Stuttgart, New York: Thieme; 458-459, 305-307
7. Renz-Polster H, Krauzig S, Bätge B, et al. (2012) *Basislehrbuch Innere Medizin.pdf*. 5th ed. München: Urban & Fischer; 576-581, 876-881
8. Klinker R, Pape H-C, Kurtz A, et al. (2009) *Physiologie*. 6th ed. Stuttgart, New York: Thieme; 224-227, 542, 473
9. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. (2012) *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 10th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 10-12, 119-124, 212, 215-216
10. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. (2010) *Pharmakologie Und Toxikologie*. 17th ed. Stuttgart, New York: Thieme; 59, 63-72
11. Zanger UM, Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. Volume 138, Issue 1: 103-141. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
12. Meyer U a, Zanger UM, Schwab M. (2013) Omics and drug response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Volume 53, Issue October 2012: 475-502. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100502.
13. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. Volume 392, Issue 6: 1093-1108. doi:10.1007/s00216-008-2291-6.
14. Olson H, Betton G, Robinson D, et al. (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*. Volume 32, Issue 1: 56-67. doi:10.1006/rtp.2000.1399.
15. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde E, Donato MT. (2014) Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014: 1553-1568.
16. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, et al. (2015) 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays*. Volume 4, Issue 1: 64-83. doi:10.3390/microarrays4010064.
17. Lenz W. (1988) A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology*.

- Volume 38, Issue 3: 203-215. doi:10.1002/tera.1420380303.
18. Kenter MJH, Cohen AF. (2015) The return of the prodigal Son and the extraordinary development route of antibody TGN1412-lessons for drug development and clinical pharmacology. *Br J Clin Pharmacol*. 2015: n/a - n/a. doi:10.1111/bcp.12605.
 19. Burkhardt B, Martinez-Sanchez JJ, Bachmann A, Ladurner R, Nüssler AK. (2014) Long term culture of primary hepatocytes: new matrices and microfluidic devices. *Hepatol Int*. Volume 7, Issue 3: 14-22.
 20. Soldatow VY, LeCluyse EL, Griffith LG, Rusyn I. (2013) In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)*. Volume 2, Issue 1: 23-39. doi:10.1039/C2TX20051A.In.
 21. Schyschka L, Martínez Sánchez JJ, Wang Z, et al. (2013) Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol*. Volume 87, Issue 8: 1581-1593. doi:10.1007/s00204-013-1080-y.
 22. Good bye, flat biology? (2003) *Nature*. Volume 424, Issue 6951: 861. doi:10.1038/scientificamerican1199-56.
 23. Novik E, Maguire TJ, Chao P, Cheng KC, Yarmush ML. (2010) A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochem Pharmacol*. Volume 79, Issue 7: 1036-1044. doi:10.1016/j.bcp.2009.11.010.A.
 24. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. (2013) *Recent Advances in 2D and 3D in Vitro Systems Using Primary Hepatocytes, Alternative Hepatocyte Sources and Non-Parenchymal Liver Cells and Their Use in Investigating Mechanisms of Hepatotoxicity, Cell Signaling and ADME*. Vol 87.; 2013. doi:10.1007/s00204-013-1078-5.
 25. Pfeiffer E, Kegel V, Zeilinger K, et al. (2014) Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. November 2014: 1-12. doi:10.1177/1535370214558025.
 26. Maurel P, ed. (2010) *Hepatocytes Methods and Protocols*. Humana Press; 2010.
 27. Guzzardi MA, Vozzi F, Ahluwalia AD. (2009) Study of the crosstalk between hepatocytes and endothelial cells using a novel multicompartamental bioreactor: a comparison between connected cultures and cocultures. *Tissue Eng Part A*. Volume 15, Issue 11: 3635-3644. doi:10.1089/ten.tea.2008.0695.
 28. Khetani SR, Bhatia SN. (2008) Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat Biotechnol*. Volume 26, Issue 1: 120-126. doi:10.1038/nbt1361.
 29. Lau TT, Lee LQP, Leong W, Wang D-A. (2012) Formation of model hepatocellular aggregates in a hydrogel scaffold using degradable genipin crosslinked gelatin microspheres as cell carriers. *Biomed Mater*. Volume 7, Issue 6: 065003. doi:10.1088/1748-6041/7/6/065003.
 30. Dash A, Inman W, Hoffmaster K, et al. (2009) Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. Volume 5, Issue 10: 1159-1174. doi:10.1517/17425250903160664.

31. Schmelzer E, Triolo F, Turner ME, et al. (2010) Three-dimensional perfusion bioreactor culture supports differentiation of human fetal liver cells. *Tissue Eng Part A*. Volume 16, Issue 6: 2007-2016. doi:10.1089/ten.tea.2009.0569.
32. Müller D. (2011) Organotypic functional cultures of human liver cells for long-term maintenance and assessment of drug-induced metabolome effects. Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität des Saarlandes
33. Legendre A, Baudoin R, Alberto G, et al. (2010) Metabolic Characterization of Primary Rat Hepatocytes Cultivated in Parallel Microfluidic Biochips. *J Pharm Sci*. Volume 99, Issue 10: 4215-4227. doi:10.1002/jps.
34. Hegde M, Jindal R, Bhushan A, et al. (2014) Dynamic Interplay of Flow and Collagen Stabilizes Primary Hepatocytes Culture in a Microfluidic Platform. *Lab Chip*. Volume 14, Issue 12: 2033-2039. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
35. Inamori M, Mizumoto H, Kajiwara T. (2009) An approach for formation of vascularized liver tissue by endothelial cell-covered hepatocyte spheroid integration. *Tissue Eng Part A*. Volume 15, Issue 8: 2029-2037. doi:10.1089/ten.tea.2008.0403.
36. No DY, Lee S a., Choi YY, et al. (2012) Functional 3D Human Primary Hepatocyte Spheroids Made by Co-Culturing Hepatocytes from Partial Hepatectomy Specimens and Human Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS One*. Volume 7, Issue 12. doi:10.1371/journal.pone.0050723.
37. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. (1982) Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Chemically Defined Medium. *Cancer Res*. Volume 42, Issue September: 3858-3863.
38. Lin J, Schyschka L, Mühl-Benninghaus R, et al. (2012) Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism. *Arch Toxicol*. Volume 86, Issue 1: 87-95. doi:10.1007/s00204-011-0733-y.
39. Donato M, Jover R, Gómez-Lechón M. (2013) Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering. *Curr Drug Metab*. Volume 14, Issue 9: 946-968. doi:10.2174/1389200211314090002.
40. Hewitt NJ, Lechón MJG, Houston JB, et al. (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev*. Volume 39, Issue 1: 159-234. doi:10.1080/03602530601093489.
41. Knobloch D, Ehnert S, Schyschka L, et al. (2012) Human Cell Culture Protocols. Mitry RR, Hughes RD, eds. Volume 806, : 99-120. doi:10.1007/978-1-61779-367-7.
42. Altmann B, Giselbrecht S, Rieke M, et al. (2010) Chip-Based Tissue engineering in Microbioreactors. *Methods Bioeng*. 2010: 83-99.

43. Gottwald E, Giselbrecht S, Augspurger C, et al. (2007) A chip-based platform for the in vitro generation of tissues in three-dimensional organization. *Lab Chip*. Volume 7, Issue 6: 777-785. doi:10.1039/b618488j.
44. Institute for Biological Interfaces 1 (IBG-1). (2012) r-3D-KITChip and KIT-Bioreactor User Manual. Volume 1, Issue May.
45. Altmann B, Giselbrecht S, Weibezahn K-F, Welle a, Gottwald E. (2008) The three-dimensional cultivation of the carcinoma cell line HepG2 in a perfused chip system leads to a more differentiated phenotype of the cells compared to monolayer culture. *Biomed Mater*. Volume 3, Issue 3: 034120. doi:10.1088/1748-6041/3/3/034120.
46. Lukas R. (2013) Überprüfung Der Eignung Des 3D- Zellkultursystems „ R -3 D -KITChip- Bioreaktor “ Für in Vitro Toxizitätstests von Arzneistoffen Am Beispiel Acetaminophen.; Bachelorarbeit, Hochschule Esslingen
47. Mcmillian MK, Li L, Parker JB, et al. (2002) An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol*. 2002: 157-173.
48. Promega. Celltiter-Blue® Cell Viability Assay Handbuch.
49. Altmann B, Welle A, Giselbrecht S, Truckenmüller R, Gottwald E. (2009) The famous versus the inconvenient - or the dawn and the rise of 3D-culture systems. *World J Stem Cells*. Volume 1, Issue 1: 43-48. doi:10.4252/wjsc.v1.i1.43.
50. Laine JE, Auriola S, Pasanen M, Juvonen RO. (2009) Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes. *Xenobiotica*. Volume 39, Issue 1: 11-21. doi:10.1080/00498250802512830.
51. Darnell M, Ulvestad M, Ellis E, Weidolf L, Andersson TB. (2012) In Vitro Evaluation of Major In Vivo Drug Metabolic Pathways Using Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells in Suspension and a Dynamic Three-Dimensional Bioreactor. *J Pharmacol Exp Ther*. Volume 450, : 134-144.
52. Hoffmann S a, Müller-Vieira U, Biemel K, et al. (2012) Analysis of drug metabolism activities in a miniaturized liver cell bioreactor for use in pharmacological studies. *Biotechnol Bioeng*. Volume 109, Issue 12: 3172-3181. doi:10.1002/bit.24573.
53. Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, et al. (2011) Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochrome P450s and UDP-glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metab Dispos*. 2011. doi:10.1124/dmd.111.042259.
54. Rettie AE, Jones JP. (2005) Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Volume 45, Issue 4: 477-494. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095821.
55. McGill MR, Jaeschke H. (2014) Recent Advances in Relation To Hepatotoxicity and Diagnosis. Volume 30, Issue 9: 2174-2187. doi:10.1007/s11095-013-1007-6.METABOLISM.
56. Waxman S, Wurmbach E. (2007) De-regulation of common housekeeping

- genes in hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics*. Volume 8, : 243. doi:10.1186/1471-2164-8-243.
57. Julian GS, de Oliveira RW, Perry JC, Tufik S, Chagas JR. (2014) Validation of housekeeping genes in the brains of rats submitted to chronic intermittent hypoxia, a sleep apnea model. *PLoS One*. Volume 9, Issue 10: e109902. doi:10.1371/journal.pone.0109902.
 58. Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. (2008) Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer*. Volume 8, : 350. doi:10.1186/1471-2407-8-350.
 59. Xie Y, McGill MR, Dorko K, et al. (2014) Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014. doi:10.1016/j.taap.2014.05.010.
 60. Moll M, Bachmann A, Gottwald E, et al. (2015) Characterization of a 3D Microfluidic Bioreactor Using Primary Human Hepatocytes and a Hepatocyte Cell Line. *Eur Surg Res*. Volume 55, Issue 3: 265.
 61. LeCluyse EL. (2001) Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci*. Volume 13, Issue 4: 343-368. doi:10.1016/S0928-0987(01)00135-X.
 62. Choi S, Sainz Jr B, Corcoran P, Uprichard S, Jeong H. (2009) Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica*. Volume 39, Issue 3: 205-217. doi:10.1080/00498250802613620.Characterization.
 63. Nakao Y, Kimura H, Sakai Y, Fujii T. (2011) Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device. *Biomicrofluidics*. Volume 5, Issue 2: 22212. doi:10.1063/1.3580753.
 64. Murray JW, Han D, Wolkoff AW. (2014) Hepatocytes maintain greater fluorescent bile acid accumulation and greater sensitivity to drug-induced cell death in three-dimensional matrix culture. *Physiol Rep*. Volume 2, Issue 12: 1-13. doi:10.14814/phy2.12198.
 65. Goral VN, Hsieh Y-C, Petzold ON, Clark JS, Yuen PK, Faris RA. (2010) Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants. *Lab Chip*. Volume 10, Issue 24: 3380-3386. doi:10.1039/c0lc00135j.
 66. Shen S, Marchick MR, Davis MR, Doss G a., Pohl LR. (1999) Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: Role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem Res Toxicol*. Volume 12, Issue 2: 214-222. doi:10.1021/tx9802365.
 67. Mehling M, Tay S. (2014) Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol*. Volume 25, : 95-102. doi:10.1016/j.copbio.2013.10.005.
 68. Millet LJ, Stewart ME, Sweedler J V, Nuzzo RG, Gillette MU. (2007) Microfluidic devices for culturing primary mammalian neurons at low densities. *Lab Chip*. Volume 7, Issue 8: 987-994. doi:10.1039/b705266a.
 69. Regehr KJ, Domenech M, Koepsel JT, et al. (2009) Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab Chip*. Volume 9, Issue 15: 2132-2139. doi:10.1039/b903043c.Biological.

70. Toepke MW, Beebe DJ. (2006) PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip*. Volume 6, Issue 12: 1484-1486. doi:10.1039/b612140c.
71. Li N, Schwartz M, Ionescu-Zanetti C. (2009) PDMS compound adsorption in context. *J Biomol Screen*. Volume 14, Issue 2: 194-202. doi:10.1177/1087057108327326.
72. Nussler AK, Wang A, Neuhaus P, et al. (2001) The Suitability of Hepatocyte Culture Models to Study Various Aspects of Drug Metabolism. *ALTEX*. 2001: 91-101.
73. Gunness P, Mueller D, Shevchenko V, Heinzle E, Ingelman-Sundberg M, Noor F. (2013) 3D organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for in vitro toxicity studies. *Toxicol Sci*. Volume 133, Issue 1: 67-78. doi:10.1093/toxsci/kft021.
74. Zeilinger K, Schreiter T, Darnell M, et al. (2011) Scaling down of a clinical three-dimensional perfusion multicompartement hollow fiber liver bioreactor developed for extracorporeal liver support to an analytical scale device useful for hepatic pharmacological in vitro studies. *Tissue Eng Part C Methods*. Volume 17, Issue 5: 549-556. doi:10.1089/ten.TEC.2010.0580.
75. Alam A, Uddin R, Haque S. (2008) Protein binding interaction of warfarin and acetaminophen in presence of arsenic and of the biological system. *Bangladesh J Pharmacol*. Volume 3, Issue 2: 49-54. doi:10.3329/bjp.v3i2.835.
76. Chamouard J-M, Barre J, Urien S, Houin G, Tillement J-P. (1985) Diclofenac binding to albumin and lipoproteins in human serum. *Biochem Pharmacol*. Volume 34, Issue 10: 1695-1700.
77. McCarty WJ, Usta OB, Luitje M, et al. (2014) A novel ultrathin collagen nanolayer assembly for 3-D microtissue engineering: Layer-by-layer collagen deposition for long-term stable microfluidic hepatocyte culture. *Technol (Singap world sci)*. Volume 2, Issue 1: 67-74. doi:10.1142/S2339547814500083.A.
78. Barnes SN, Aleksunes LM, Augustine L, et al. (2007) Induction of Hepatobiliary Efflux Transporters in Acetaminophen- Induced Acute Liver Failure Cases ABSTRACT: Volume 35, Issue 10: 1963-1969. doi:10.1124/dmd.107.016170.50.
79. Jones DR, Kim SY, Guderyon M, Yun CH, Moran JH, Miller GP. (2010) Hydroxywarfarin metabolites potently inhibit CYP2C9 metabolism of S-warfarin. *Chem Res Toxicol*. Volume 23, Issue 5: 939-945.
80. Zamek-Gliszczyński MJ, Hoffmaster K a., Nezasa KI, Tallman MN, Brouwer KLR. (2006) Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur J Pharm Sci*. Volume 27, Issue 5: 447-486. doi:10.1016/j.ejps.2005.12.007.
81. Ahmad AM. (2007) Recent advances in pharmacokinetic modeling. *Biopharm Drug Dispos*. Volume 28, Issue 3: 135-143. doi:10.1002/bdd.
82. Au SH, Chamberlain MD, Mahesh S, Sefton M V, Wheeler AR. (2014) Hepatic organoids for microfluidic drug screening. *Lab Chip*. Volume 14, Issue 17: 3290-3299. doi:10.1039/c4lc00531g.

7. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all Jenen danken, die mich im Rahmen meiner Dissertation unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. Andreas Nüssler, der es mir ermöglicht hat, die Dissertation in seinem Institut anzufertigen. Ihm und Dr. Anastasia Bachmann möchte ich dafür danken, mir stets mit Anregungen und einem offenen Ohr für den weiteren Fortgang der experimentellen Arbeit und der Dissertation zur Seite gestanden zu haben. Außerdem möchte ich der gesamten Belegschaft des Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung danken, die meine Promotion zu einer einzigartigen Zeit gemacht und so manche Durststrecke überbrückt und in eine Oase verwandelt haben.

Prof. Mätzler sei in seiner Funktion als Zweitgutachter gedankt.

Dem Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung, dem KIT, der Pharmacelsus GmbH, der Firma HBW Gubesch GmbH und dem BMBF möchte ich dafür danken, dass sie das Projekt, von dem ich einen Teilaspekt bearbeiten durfte, möglich gemacht haben.

Namentlich möchte ich mich hierbei bei Prof. Gottwald, C. Nies, Dr. Müller und Dr. Backes bedanken.

Schließlich möchte ich dem IZKF Promotionskolleg, namentlich Prof. Knipper, Dr. Montero und P. Henger, für die zahlreiche Unterstützung auf allen denkbaren Ebenen danken. Ein Forum für Doktoranden, die gemeinsam die Hürde der Dissertation nehmen wollen, ist eine unschätzbare Möglichkeit.

Zum Abschluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Die Betreuung erfolgte durch Professor Dr. Andreas K. Nüssler und durch Dr. Anastasia Bachmann.

Das Projekt, in dessen Rahmen die Dissertation erfolgte, wurde entworfen durch das Karlsruher Institut für Technologie (KIT), das Institut für Unfallmedizinische Forschung der Universität Tübingen, die Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken, die ibidi GmbH (Martinsried) und die Firma HBW Gubesch GmbH, Jacob Plastics, Wilhelmsdorf.

Die Ergebnisse der Metabolisierungsuntersuchungen in Kapitel 3.4 und 4.4 sowie Gallensäuremessungen in Kapitel 3.6 und 4.6 wurden durch die Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken, ermittelt, die Kultivierung der Zellen und die Gewinnung der untersuchten Proben erfolgte durch mich.

Die im Rahmen der Chirurgischen Forschungstage 2015 in Würzburg unter dem Titel „Characterization of a 3D microfluidic bioreactor using primary human hepatocytes and a hepatocyte cell line“ vorgestellten Ergebnisse wurden folgendermaßen ermittelt:

Die Durchführung und Auswertung der Experimente erfolgte durch Matthias Moll, Dr. Anastasia Bachmann und Prof. Dr. Nüssler vom Institut für Unfallmedizinische Forschung der Universität Tübingen und der Pharmacelsus GmbH, vertreten durch Dr. Perdita Backes und Dr. Daniel Müller. Das Institut für biologische Grenzflächen 5 des Karlsruher Instituts für Technologie, vertreten durch Prof. Dr. Eric Gottwald und Dipl.-LMChem. Cordula Nies entwickelte und stellte die für die Durchführung der Versuche nötigen Mikrokavitätenarrays für den r3^D-KITChip-Bioreaktor bereit. Alle beteiligten Autoren überprüften den Abstract. Der Vortrag wurde durch Matthias Moll im Rahmen der Chirurgischen Forschungstage 2015 in Würzburg gehalten.

Die im Rahmen der Chirurgischen Forschungstage 2015 veröffentlichten Daten finden sich in den Abbildungen 19, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 47, 48 und 49.

Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ich versichere, die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard-Karls-Universität beachtet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die hier vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Tübingen, den

Matthias Moll