

Bioreaktor zum Langzeiterhalt differenzierter hepatischer Zellfunktionen für *in vitro* Wirkstoffprüfungen alternativ zu Tierversuchen

Jörg Gerlach, Juliane Unger, Oliver Hole, Jens Encke, Christian Müller* und Peter Neuhaus

Chirurgische Klinik, *Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Freie Universität Berlin

Zusammenfassung

Vorgestellt wird ein Leberzellkulturmodell zum Erhalt der physiologischen Funktionen von primären Hepatozyten aus Schlachthoforganen. Das Anwendungsgebiet eines solchen Modells liegt in Langzeitmetabolismusstudien, Enzyminduktionsversuchen sowie in der Messung von Langzeitzytotoxizitätstests niedriger Dosierungen als Alternativen zu Tierversuchen.

In dem Kulturmodell werden in einem Bioreaktor Kapillarmembranen für verschiedene biologische Funktionen an Leberzellen vorbeigeführt, um den physiologischen Aufbau der Leber mit ihrer Lobulus-Feinstruktur zu imitieren. Dabei bilden kultivierte Hepatozyten auf den Kapillarsystemen, durch welche ein Medium-Durchstrom sowie die Oxigenierung des Systems erfolgt, Zellaggregate aus. Durch eine entsprechend dimensionierte parallele Anordnung solcher Einheiten wird ein Kultursystem für Laboruntersuchungen ermöglicht, das in Kapazität und Zellumgebung der menschlichen Leber angenähert werden kann. Das System weist hierbei folgende Charakteristika auf: Perfusion der Zellen, dezentraler Metabolitenzufluß und -abtransport mit geringen Stoffgradienten, abgetrennte Sauerstoffzufuhr bzw. CO₂-Entsorgung, Zelladhäsion, Kokultur mit Sinusendothelzellen, parallele Versorgung identischer Zelleinheiten, Möglichkeit weiterer Funktionen wie Substratsteuerung, Dialyse, dezentraler Wärmeaustausch zum Tieffrieren der Zellen.

In dieser Art von Bioreaktoren war die Leberzellkultur technisch zuverlässig über Zeiträume von mehreren Wochen durchführbar. Das Kulturmodell erbringt eine Verbesserung des externen Zellmetabolismus im Vergleich zur Standardkulturtechnik, untersucht anhand der Zytochrom-P450-Aktivität (Midazolammetabolismus, Lidocain/MEGX-Test, Galaktoseelimination), der Albuminsynthese und der Enzymliberation (LDH, GLDH, GOT, GPT, gGT). Damit erscheinen Voraussetzungen gegeben, einen Einsatz des Modelles anstelle von Tierversuchen zu überprüfen.

Summary: Bioreactor for long-term maintenance of differentiated hepatic cell functions

A culture model and a bioreactor construction for hepatocyte *in vitro* culture is described. The reactor is based on capillaries for hepatocyte immobilisation. Four discrete capillary membrane systems, each serving different purposes, are woven to create a three-dimensional framework for decentralised cell perfusion with low metabolite gradients and decentralised oxygenation and CO₂ removal. The biochemical performance of reactors initially seeded with 2.5×10^9 pig hepatocytes was evaluated (pig albumin synthesis, midazolam- and lidocaine/ MEGX metabolism, galactose elimination, enzymeleakage). The specific construction of the reactor enables a use in pharmacology alternatively to animal experiments.

Keywords: hepatocytes, abattoir organs, bioreactor, cell perfusion systems, co-culture, alternatives to animal experimentation, liver toxicity, pharmaco metabolism

Einleitung

Thema der vorliegenden Arbeit ist die erste Beschreibung einer Alternativmethodik zum Tierversuch, die für Langzeitmetabolismusstudien, Enzyminduktionsversuchen sowie Messung von Langzeitzytotoxizitäts-

tests niedriger Dosierungen geeignet erscheint.

Auch wenn mit *in vitro* Methoden die gesetzlich vorgeschriebenen Tierversuche vor einer klinischen Einführung von Wirkstoffen nicht ersetzt werden können (vgl. auch die EG-Richtlinien zu Zulassungsver-

fahren für Arzneimittel, EG, 1983), ergibt sich mit *in vitro* Methoden ein Einsparpotential für Tierversuche in der Pharmaindustrie: Für eine pharmakologisch/toxikologische Bewertung insbesondere von Substanzen in der ersten Erprobungsphase sind Angaben zu ihrem Metabolismus und

ihrer Toxizität unabdingbare Voraussetzung. Bislang wurden solche Untersuchungen fast ausschließlich am Tiermodell durchgeführt; sie könnten aber teilweise durch Untersuchungen an Zellkulturen ersetzt werden.

In vitro Metabolismusstudien werden seit einiger Zeit unter Verwendung von Monolayerzellkulturen durchgeführt. Die Leber, Zielorgan solcher Studien, besteht aus einem Zellverbund unterschiedlicher Zellpopulationen und ist über den Kreislauf mit weiteren metabolisierenden oder ausscheidenden Organsystemen wie etwa der Niere verbunden. Zusätzlich besitzt die Leber die Möglichkeit, über die Galle Metaboliten auszuschleiden. Diese Vernetzung der Organe im Körper muß bei der Konzipierung von *in vitro* Modellen berücksichtigt werden. Das konventionelle Zellkulturmodell erlaubt hier also nur bedingt Aussagen. Doch auch der Tierversuch ermöglicht ein dem Humanstoffwechsel nur angenähertes Modell. Angesichts der zur Zeit verfügbaren *ex vivo* Versuchsanordnungen kann deshalb letztlich nur eine Anwendung am Menschen selbst die relevanten Daten zur Erfassung der Auswirkungen eines Pharmakons für den Humanorganismus liefern. Dabei können jedoch z.B. beim Menschen nicht beliebig hohe Dosierungen einer Substanz eingesetzt werden, um deren Metabolismus in geeigneter Weise zu erfassen, da vor allem bei noch unerprobten Substanzen die toxikologischen Auswirkungen zunächst nicht eingeschätzt werden können. Da sich hier, alternativ zum Tierversuch, *in vitro* Untersuchungen mit Zellkulturen anbieten, ist die Weiterentwicklung der Standardkulturtechnik von großem Interesse.

Prinzipiell wäre zunächst für Erprobungen am menschlichen System primären humanen Hepatozyten der Vorzug zu geben. Diese sind aber nicht in ausreichendem Umfang verfügbar. Es mußte also nach alternativen Zelltypen gesucht werden, die dem menschlichen Organismus möglichst nahe kommen und überdies in

ausreichender Menge verfügbar sind. Schweineleberzellen aus Schlachthoforganen (Gerlach et al., 1993a) bieten sich hier an.

Bei der Verwendung von Leberzellen in Kultur sollte das jeweilige Kulturmodell berücksichtigt werden. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei, sowohl die Viabilität als auch die Funktionstüchtigkeit einer Hepatozytenkultur über einen ausreichend langen Zeitraum zu gewährleisten. Bislang zeigte sich hier ein limitierendes Phänomen: Die metabolische Aktivität von isolierten Hepatozyten *in vitro* entspricht für den ersten Kulturtag weitgehend den Leistungen des intakten Organes (Berry et al., 1991), doch obgleich solche primären Hepatozyten *in vitro* über mehrere Wochen überlebensfähig sind, verlieren sie unter Standardkulturbedingungen nach wenigen Tagen ihre metabolische Aktivität (Gerlach et al., 1989). Untersuchungen zur Verbesserung des Funktionserhaltes von isolierten Hepatozyten berücksichtigten bisher in erster Linie die Zelladhäsion, den Einfluß verschiedener Adhäsionssubstrate, die Zusammensetzung des Kulturmediums, die Kokultivierung mit Endothelzellen sowie Wachstumsfaktoren. Dabei wurde zunächst die Standardkulturtechnik, bei der die Zellen in mit Kollagen beschichteten Kulturgefäßen als Monolayer am Leben erhalten werden, weitgehend beibehalten. Sie bietet den Zellen jedoch eine unphysiologische Umgebung, denn hier findet ihr Stoffaustausch mit dem Kulturmedium nur durch Diffusion statt, während Hepatozyten *in vivo* unter wesentlich effektiveren Perfusionsbedingungen arbeiten. Unter Diffusionsbedingungen entstehen auch erhebliche Gradienten von O₂, CO₂ und von verschiedenen Metaboliten. Darüber hinaus ist in den üblichen Kulturschalen die *in vivo* wirksame Arbeitsteilung der Zellen entlang ihrer Anordnung im Leberlobulus aufgehoben. Der vektorielle Stofftransport zu den Zellen und von ihnen weg wird damit im Vergleich zu ihrer Situation im lebenden Organ stark beeinträchtigt. Auch verhindert

die Aufhebung des physiologischen Zusammenhangs zwischen den einzelnen Zellen in der Standardkulturtechnik die funktionsbezogene Verknüpfung von Signalwegen mit räumlichen Kommunikationsmustern, was ein wesentlicher Faktor in der Selbstreduzierung des Metabolismus von Hepatozyten *in vitro* sein dürfte.

Ziel unserer bisherigen Untersuchungen war daher die Entwicklung eines Zellkulturmodells, das einerseits Lösungen für die geschilderten Probleme der zu schaffenden Kulturbedingungen bietet und andererseits die bisherigen Erkenntnisse der Hepatozytenforschung z. B. hinsichtlich einer Kokultivierung in sich vereint (Gerlach und Neuhaus, 1994). Als Ausgangspunkt diente das in den siebziger Jahren von Knazek et al. (1972) vorgestellte Kapillarmembran-Bioreaktorprinzip. Mit der vorliegenden Arbeit soll der Stand der Entwicklungen anhand erster Ergebnisse vorgestellt werden. Abb. 1a erläutert das entwickelte Kulturmodell in schematischer Darstellung. Für das zunächst relativ aufwendig erscheinende Konstruktionsprinzip wurde eine Fertigungstechnik entwickelt, die eine industrielle Produktion (Gerlach, 1992) der Bioreaktoren (Abb. 1b) und deren labortechnische Nutzung ermöglicht.

Material und Methoden

Hepatozytenisolierung

Hepatozytengewinnung:

Hierbei wurden zwei Verfahren angewendet. Im ersten Verfahren wurden uns vom Schlachthof Berlin-Moabit Lebern von männlichen Hausschweinen der „Deutschen Landrasse“ mit 40–50 kg Körpergewicht (kgKG) zur Verfügung gestellt. Die Lebern wurden von den Schlachthofmitarbeitern hygienisch entnommen und von uns auf Eis in das Labor transportiert, wo sie an eine Perfusionsapparatur angeschlossen wurden. Das Verfahren wurde bereits beschrieben (Gerlach et al.,

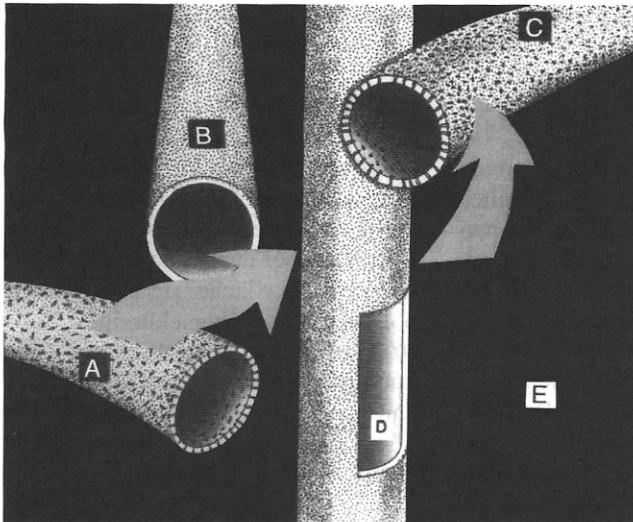


Abbildung 1a:
Entwickeltes
Kulturmodell.
Ausschnitt der
kleinsten Kapillar-
einheit in einer
schematischen
Zeichnung.
A) Mediumin-
stromkapillaren,
B) Oxigenierungs-
kapillaren,
C) Mediumaus-
stromkapillaren,
D) Kokulturräum-
partiment,
E) Hepatozyten-
kulturraum. Die
Hepatozyten
werden mit dem
Kulturmedium
zwischen A) und
C) perfundiert.

1993a). Der Zeitraum von der Tötung der Schweine bis zur Organentnahme betrug maximal 20 min. Die Perfusion wurde jeweils spätestens 90 min. ab Tötung begonnen. Im zweiten Verfahren wurden männliche Hausschweine der „Deutschen Landrasse“ nach artgerechter Stallhaltung bei Fütterung ad libitum bis etwa 30 kg KG unter Narkosebedingungen getötet. Unter sterilen Bedingungen wurde die Leber freipräpariert und die *v. portae* kanüliert. Daraufhin erfolgte über die *v. portae* eine Perfusion von Isolierungslösungen nach dem Eröffnen der Lebervenen. Das Organ wurde unter dieser Perfusion entnommen und in die gleiche vorgenannte Perfusionsapparatur verbracht. Die nähere Beschreibung erfolgte in (Gerlach et al., 1993b).

Nachbehandlung der Zellen:

Nach den Perfusionsschritten wurde die Leber in auf 4°C gekühltem Kulturmedium ausgeschwenkt und dabei die Leberkapsel mit stumpfen Instrumenten eröffnet. Dabei wurden die Zellen in das Medium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde nacheinander jeweils durch Nylonnetze mit 500, 200 und 100 µm Porenweite (ZBF/Zürich, CH) gegossen und anschließend in Kultur-

medium bei zweimaliger Zentrifugation mit 10 g gewaschen. Die Zellsuspensionen der Schlachthoforgane wurden zusätzlich mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (Perftoft et al., 1977) und anschließendem zweimaligen Waschen in Standardmedium weiterverarbeitet. Die *Zellausbeute* wurde als Relation des zum Schluß ausgewogenen Zellfeuchtgewichts der isolierten Zellen gegenüber dem Organgewicht zu Beginn des Verfahrens in % angegeben. Die *Viabilität* der Zellen wurde im Trypanblaufarbstofftest mittels Phasenkontrastmikroskopie in % der nicht angefärbten Zellen angegeben (Kissmeyer-Nielsen und Kjerbye,

1967) und durch Anlegen von Adhäsionskulturen mit Auszählung der nach 24 Stunden Standardkultur adhären und abgeflachten Hepatozyten kontrolliert.

Sinusendothelzellkultur

Unter der Kollagenaseperfusion zur Verdauung des Leberbindegewebes werden mit der Enzymlyösung aus den Lebergefäßen ein Großteil der Endothelzellen herausgelöst. Zur Gewinnung dieser Zellen wurde die Kollagenaselösung nach der Organpassage steril gesammelt und im Anschluß durch Zentrifugation mit 80 g über 10 Minuten und anschließendem Waschen in Standardkulturmedium bearbeitet. Später wurden diese Endothelzellen in das Kokulturräumchen des Bioreaktors gegeben. Ein Teil der Zellen wurde zur Kontrolle unter Standardbedingungen in Kulturflaschen mit Medium 199 im Inkubator kultiviert.

Aufbau der Bioreaktoren

Wesentliches Merkmal unserer Bioreaktorkonstruktion ist die Verwendung von getrennten und voneinander unabhängigen, aber miteinander verwobenen Hohlfasermembransystemen. Durch die räumliche Anordnung solcher Systeme wird ein dezentraler An- und Abtransport von Nährstoffen, Metaboliten und Syntheseprodukten sowie den notwendigen Gasen zu einer Vielzahl von

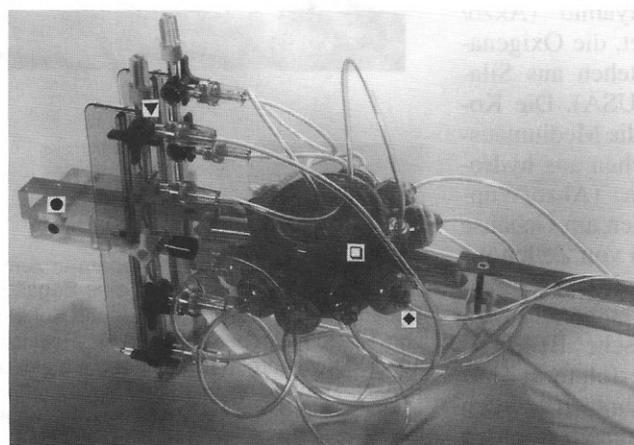


Abbildung 1b:
Entwickeltes
Kulturmodell.
Foto eines
Bioreaktors des
Kulturmodells. Für
das Konstruktions-
prinzip wurde
eine Fertigungs-
technik entwick-
elt, die eine in-
dustrielle Produk-
tion ermöglicht.

Zellen parallel und damit unabhängig von ihrer Position im Bioreaktor ermöglicht. Charakteristisch ist die Kultivierung von Zellen in einem Kompartiment, das für jeweils wenige Zellen identische Bedingungen der Versorgung aufweist. Zusätzliche Kapillarkompartimente nehmen in ihrem Lumen Sinusendothelzellen in Kokulturtechnik auf. Die Anordnung der Kapillaren und der Aufbau der Reaktoren geht aus Abb.1 hervor. Für adhäsionsabhängige Hepatozyten bieten die Kapillarsysteme durch Verwendung von adhäsionsgeeignetem Polyamid und Polypropylen den zusätzlichen Vorteil einer Zelladhäsionsfläche. Die Zellen bilden Aggregate zwischen den Kapillaren, die an den Kapillaren adhären (Gerlach et al., 1993c; Gerlach et al., 1994a). Die Zellkultur in Aggregattechnik auf Hohlfasermembranen ermöglicht so, im Gegensatz zur Standardkulturtechnik, als Monolayer in Kulturflaschen oder in Standardbioreaktoren eine dreidimensionale Anordnung der Zellen und eine physiologisch-polare Ausrichtung der Transportsysteme zwischen den Zellen, wodurch ein transzellulärer Transport ermöglicht wird.

Das Außengehäuse der Reaktoren besteht aus Polyurethan (Akzo/Wuppertal), das zusätzlich Anstromkappen zum Verteilen der Medien zu den Kapillaren aufnimmt. Die Kapillaren sind untereinander im Randbereich durch Polyurethan vergossen. Diese Polyurethanvergußmasse schließt das Zellkompartiment nach außen ab. Für die Medieinstromkapillaren wird Polyamid (Akzo/Wuppertal) verwendet, die Oxigenationsmembranen bestehen aus Silastik (Dow Corning, USA). Die Kokulturkapillaren und die Mediaustromkapillaren bestehen aus hydrophilem Polypropylen (Akzo/Wuppertal). Anschlußstellen am Gehäuse dienen dem Einfüllen von Zellen ins Zellkompartiment sowie der Aufnahme von Druck- und Temperaturmesssonden. Eine technische Beschreibung des Aufbaues erfolgte in Gerlach (1992). Vor Gebrauch wurden die Reaktoren zusammen mit den

Anschlußleitungen bei 60°C mit Ethylenoxid sterilisiert. Zum Entgasen wurde über 48 h abwechselnd mit Vakuum und Druckluft gewaschen.

Die Kapillarsysteme der Bioreaktoren wurden in einzelnen Studien auf der Hepatozytenadhäsionsoberfläche im Zellkompartiment mit adhäsionsvermittelnden Substraten beschichtet. Zur Anwendung kamen Kollagen A (Biochrom/Berlin) und Basement Membrane Matrigel™ (Collaborative Research, Bedford, USA) bzw. keine Beschichtung. Kollagen A wird aus Rinderplazenta hergestellt. Matrigel™ ist eine lösliche Basalmembranpräparation als Produkt einer EHS-Zelllinie, die Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-

proteoglykane und Nidogen enthält. Die Beschichtung der Kapillaren erfolgte nach Verdünnung der flüssigen Stammlösung mit Standardkulturmedium bei +4°C und Einschweben in die vorgekühlten Reaktoren. Über die Kapillarsysteme wurden die Reaktoren auf 37°C erwärmt, wobei das Adhäsionssubstrat an der Oberfläche der Kapillaren polymerisiert. Überschüssiges Substrat wurde durch Spülung des Zellkompartiments mit Standardmedium entfernt.

Zellperfusion

Die Bioreaktoren wurden in eine Zellperfuisionsapparatur integriert (Abb. 2), die eine Temperierung auf

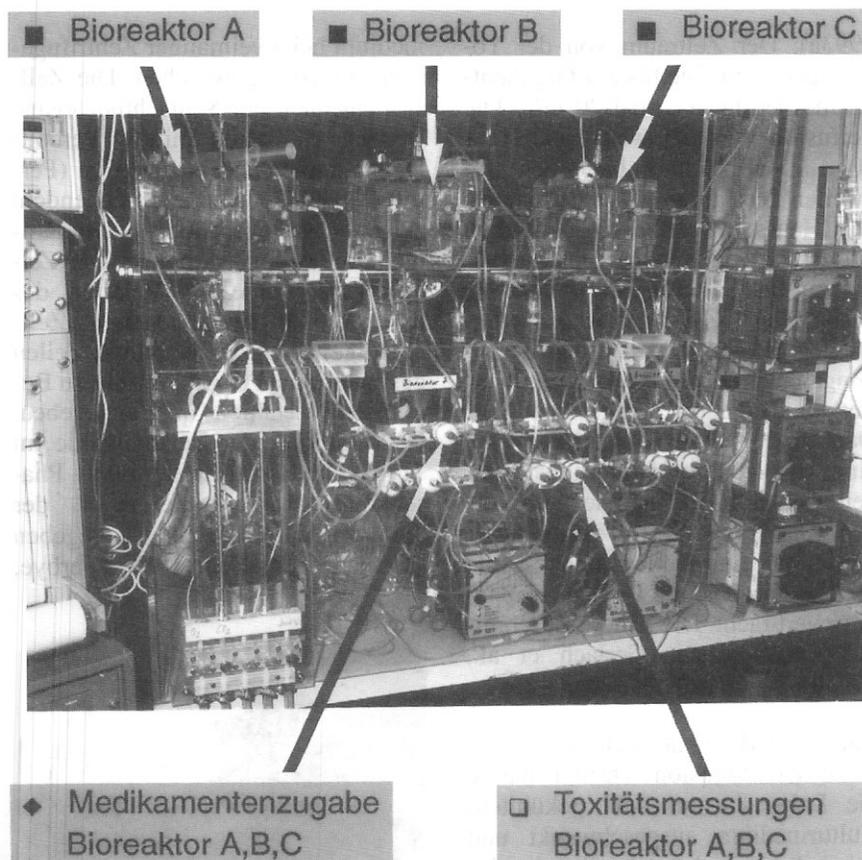


Abbildung 2: Zellperfuisionsapparatur zum Betrieb der Bioreaktoren: Eine Temperierung hält die Zellen bei 37°C, eine Begasungseinrichtung dient der Versorgung mit Sauerstoff, Stickstoff, Druckluft und Kohlendioxid, Rollerumpen im Leistungsbereich von 10–200 ml/h perfundieren die Reaktoren, Rollerumpen im Leistungsbereich von 10–100 ml/h sorgen für den Mediaustausch. Monitoring mit Mehrkanalschreiber (Druck, Temperatur, Fluß und Sauerstoffpartialdruck) dient der Dokumentation für sechs Reaktoren, eine Vorratsmediumkühleinrichtung temperiert den Mediumvorrat bei +4°C.

37°C, eine Begasung mit Sauerstoff, Stickstoff, Druckluft und Kohlendioxid, Rollerpumpen im Leistungsbereich von 10–200 ml/h bzw. von 10–100 ml/h, ein Monitoring mit Mehrkanalschreiber (Druck, Temperatur, Fluß und O₂-Partialdruck) für sechs Reaktoren sowie eine Vorratsmediumkühlung auf +4°C gewährleistet.

Die Reaktorkreisläufe wurden kontinuierlich mit 33 ml/h Frischmedium perfundiert, entsprechende Mengen verbrauchten Mediums aus den Systemen herausgeführt. Dabei handelt es sich um ein Perfusionskulturprinzip, wobei ein täglich kompletter Mediumwechsel des Systemvolumens (790 ml) erfolgte. Darüber hinaus wurden die Reaktoren mit dem in den Kreisläufen enthaltenden Medium kontinuierlich mit einem Fluß von 25 ml/min durchspült, um eine optimale Mediumverteilung zu erreichen.

Die verwendeten Perfusionschläuche (B. Braun/Melsungen) enthielten für die Frischmediumversorgung Rollerpumpenschläuche aus Silastik und für die Zellperfusion Rollerpumpenschläuche aus PVC. Die Silastikschläuche wurden einmal wöchentlich steril gewechselt.

Für die Studien wurden jeweils $2,5 \times 10^9$ nach dem vorgenannten Verfahren gewonnene Hepatozyten in die Reaktoren gefüllt. Um die Zellen im Kapillarbett gleichmäßig zu verteilen und um ihre Adhäsion über die gesamte Zirkumferenz der Kapillaren zu ermöglichen, wurden die Reaktoren während der ersten acht Stunden nach Perfusionsbeginn in drei Ebenen rotiert. Diese Rotation erfolgte über die ersten drei Stunden in Abständen von 15 min und bis zur achten Stunde in Abständen von 30 min.

Mit dem beschriebenen Aufbau wurden $n = 8$ Kurzzeituntersuchungen über 28 Tage sowie eine Langzeitstudie über sieben Wochen durchgeführt. Die Ergebnisse der Stoffwechseluntersuchungen sind bei $n=8$ als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Kulturmedium

Verwendet wurde mit Bikarbonat gepuffertes Williams-E-Medium mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B und HEPES sowie Zusätzen von Schweineinsulin, Dexamethason und Glukagon (alles Biochrom/Berlin).

Zellfunktionsmonitoring

Zur Kontrolle einer ausreichenden Mediumversorgung wurden täglich Glukose und Elektrolyte bestimmt. In der ersten Woche wurden Funktions- bzw. pharmakologische Tests alle zwei Tage und von der zweiten bis zur siebenten Woche einmal wöchentlich durchgeführt. Hierzu wurde die kontinuierliche Mediumzufuhr unterbrochen, und die Zellen wurden über sechs Stunden ohne Mediumwechsel mit konstant 790 ml Medium rezirkulierend mit 25 ml/min perfundiert. Zum Zeitpunkt Null wurden die Testsubstanzen zugeführt, und in Abständen von je 1, 2, 4 und 6 Stunden erfolgten Probenentnahmen zur Analytik (s.u.).

Xenobiotikametabolismustests:

Die Aktivierung der Zytochromoxidase P450 wurde anhand zweier Xenobiotika untersucht: Das Pharmakon Midazolam wird u.A. in 1-hydroxy-, 4-hydroxy und 1,4-dihydroxy-Midazolam umgewandelt. Die Zugabe erfolgte mit einer Anfangskonzentration von 100 ng/ml im System. Das Pharmakon Lidocain wird u.A. zu Monoethylglycinylidit (MEGX) stickstoffdeethyliert. Die Zugabe erfolgte mit einer Anfangskonzentration von 4 µg/ml im System. Beide Testsubstanzen wurden über sechs Stunden im geschlossenen System perfundiert. Die Bestimmung von Midazolam, Lidocain und MEGX aus den Proben erfolgte mittels Immunoassays in einem TDX-Autoanalyzer (Abbott/Wiesbaden).

Tests der akuten Lebertoxizität:

Die LDH-, GLDH-, GOT-, GPT- und gGT-Freisetzung in das Kulturmedium wurde als Marker der En-

zymleakage der Zellmembran ermittelt. Die Aktivität des Proteinstoffwechsels wurde mittels Bestimmung der Albuminproduktion erfaßt. Durch Verwendung von Antikörpern gegen Schweinealbumin in einem Immunoassay (Nordic-Biogenzia/Bochum) konnten Fehler durch die Verwendung von 10 % Kälberserum im Kulturmedium ausgeschlossen werden. Schweinealbumin wurde mittels Immunoassay in Cobas-Fara-Analysern (Hoffmann La Roche/Grenzach) bestimmt.

Die Aktivität des Zuckerstoffwechsels wurde durch Galaktosebelastungen während der Testphasen mit geschlossenen Kreislaufsystemen (s.o.) durchgeführt. Galaktose wurde in einer anfänglichen Konzentration von 100 mg/dl in die Kreisläufe gegeben und über sechs Stunden perfundiert; der Umsatz wurde in mg/dl/h berechnet. Die Bestimmung erfolgte mittels Cobas-Fara-II-Analysern (Hoffmann La Roche/Grenzach).

Als Maß für den Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde die Differenz des PO₂ im perfundierten Kulturmedium vor und hinter den Reaktoren gemessen. Zur Dokumentation der CO₂-Produktion erfolgte die Messung als Differenz des PCO₂ im perfundierten Kulturmedium über die Reaktoren. Zur Messung der Gaspartialdrücke wurde während der Messungen ein externer Gasaustauscher in den Perfusionskreislauf zwischengeschaltet, so daß konstante Partialdrücke von O₂ und CO₂ vor den Reaktoren garantiert werden konnten. Die Messung des PO₂, des pH und des PCO₂ erfolgte mit einem Blutgasanalysegerät (Typ 178, Corning/Halstead, GB).

Alle nicht weiter beschriebenen Marker wurden mit RA-Analysern von Technikon/Bad Vilbel bestimmt.

Ergebnisse

Leberzellkulturmodell

Durch eine dezentralisierte Anordnung von verschiedenen verwobenen Kapillarmembranen, um die sich die

Hepatozyten herum gruppieren, wurde ein Versorgungssystem mit unterschiedlichen technischen Funktionen für die Zellen geschaffen, bei dem der physiologische Aufbau der Leber mit ihren Lobuli imitiert wurde (s. Abb. 1a und b). Jeweils separate, durch den Aufbau hindurchziehende Kapillarsysteme sorgen für den Hin- und Abtransport des Mediums (damit sind die Substratversorgung und die Trägerlösung für die zu analysierenden endogenen oder exogenen Stoffe gemeint), für die Oxigenierung und die Kohlendioxidentsorgung der Hepatozyten sowie in Kollaturkapillaren für die Anwesenheit von Sinusoidal-Endothelzellen, die die Leberzellfunktion aufrechterhalten helfen. Die Hepatozyten heften sich an die Oberfläche der Kapillaren und bilden Zellaggregate, so daß mehrlagige und miteinander vernetzte Zellschichten analog zur Zellorganisation im Leberlobulus ermöglicht werden. Zwischen diesen Zellschichten werden durch die voneinander unabhängigen, aber verwobenen Kapillaren Stoffgradienten erzeugt, die die aus der Leber bekannte dreidimensionale, funktionsbezogene Zellhierarchie mit räumlichen Zell-Zell-Kommunikationsmustern ermöglichen. Durch die parallele Anordnung einer Vielzahl dieser Einheiten entsteht ein Kultursystem für Laboruntersuchungen, das in der Kapazität beliebig dimensioniert werden kann.

Zellisolierung

Die Hepatozytenisolierung aus Schweinelebern ließ sich mit der entwickelten Fünfschritt-Perfusion reproduzierbar durchführen. In den Kontrollkulturen aus allen Isolierungen wurde in keinem Fall eine bakterielle oder eine Pilzinfektion nachgewiesen. Das intraoperative Isolierungsverfahren an Lebern von 20-kg-KG-Schweinen erbrachte eine mittlere Ausbeute von 71 % Feuchtgewicht des Zellisolats. Die mittlere Viabilität dieser Zellen im Trypanblautest lag bei 82 %. Demgegenüber waren die Ergebnisse bei den Schlachthoforganen deutlich ungünstiger: deren maximale Zellausbeute

lag bei 58 % Feuchtgewicht, mit einer maximalen Viabilität von 39 %. Methoden der Auftrennung von geschädigten und strukturintakten Zellen wie die Percollgradientenzentrifugation ermöglichten allerdings eine weitere Aufarbeitung der Schlachthoforgane, so daß auch aus ihnen schließlich Zellsuspensionen mit über 90 % Viabilität gewonnen werden konnten.

Bioreaktorprüfung

Mit dem beschriebenen Aufbau wurden $n = 8$ Kurzzeituntersuchungen über 28 Tage sowie eine Langzeitstudie über sieben Wochen durchgeführt. Dabei war die Leberzellkultur in allen Fällen sicher und reproduzierbar über Zeiträume von mehreren Wochen durchführbar. Im ersten Versuch wurde ein Silastik-Rollerpumpenschlauch nach 21 Tagen undicht. Daher wurden diese Schläuche bei den weiteren Versuchen wöchentlich ausgetauscht. Unter der Antibiose zeigten sich auch bei täglichen Kontaminationsmöglichkeiten anlässlich der Pharmakazugaben und Probenentnahmen über 7 Wochen keine Sterilitätsprobleme. Reaktoren mit verschiedenen Adhäsionssubstratbeschichtungen der Kapillaren und Reaktoren ohne solche Beschichtung zeigten keine Zellaktivitätsunterschiede.

Routinekontrollen:

Zur Kontrolle einer ausreichenden Mediumversorgung wurden täglich Glukose und Elektrolytwerte bestimmt. Die Elektrolyte ließen sich durch den Mediaumtausch konstant auf physiologischem Niveau halten. Die Glukosewerte wurden auf dem Level von 100 mg% gehalten, wobei der Glukoseverbrauch während der Leberfunktionstest im geschlossenen System im Mittel bei 40 mg/h pro $2,5 \times 10^9$ Zellen lag und in der siebenten Woche noch 30,6 mg/h pro $2,5 \times 10^9$ Zellen betrug. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde als Differenz des PO_2 im perfundierten Kulturmedium vor und hinter den Reaktoren gemessen. Der Mediumfluß betrug hier jeweils 25

ml/min. Während des ersten Versuchstages lag die PO_2 -Differenz bei 180 mmHg. In der ersten Woche lag sie bei 160 mmHg. Von der zweiten bis fünften Woche blieb die Sauerstoffdifferenz konstant bei etwa 110 mmHg und fiel schließlich bis zur siebten Woche auf unter 60 mmHg ab. Die CO_2 -Produktion wurde ebenfalls als Differenz des PCO_2 im perfundierten Kulturmedium bei 30 ml/min Mediumfluß über die Reaktoren gemessen. Sie lag vom ersten bis siebenten Versuchstag bei 3 mmHg und von der ersten bis zur siebten Woche bei 2 mmHg.

Die LDH-, GLDH-, GOT-, GPT- und gGT-Freisetzung in das Kulturmedium wurde als Marker der Enzymleakage der Zellmembran gemessen. Angegeben ist jeweils der aktuelle Mediumgehalt bei einem täglich vollständigen Mediaumtausch von 790 ml. GOT wurde am Tag 1 mit 100 U/l gemessen, in den ersten fünf Tagen nach Isolierung der Zellen zunehmend geringer freigesetzt und blieb schließlich über insgesamt sieben Wochen unter 30 U/l. GLDH war zwischen Tag 3 und Tag 7 mit Werten um 70 U/l erhöht und fiel ab der sechsten Woche auf Werte unter 30 U/l. GPT und gGT lagen während des gesamten Versuches bei Werten unter 5 U/l. Die LDH-Werte stiegen während der ersten 7 Tage an, um bis zur vierten Woche stabil bei 150 U/l zu liegen

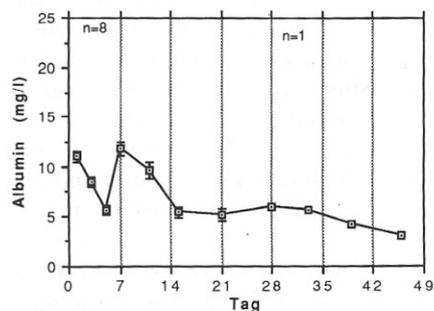


Abbildung 3: Schweinealbumin wurde bei einem täglich vollständigen Austausch des Perfusionsmediums gemessen, die Werte entsprechen der täglichen Albuminproduktion von initial $2,5 \times 10^9$ primären Schweinehepatozyten in 790 ml Medium.

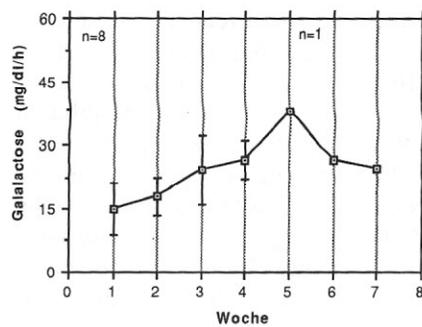


Abbildung 4: Galaktose wurde an den Testtagen zugegeben und im geschlossenen System über sechs Stunden perfundiert. Die Leerwerte lagen jeweils bei 100mg/dl. Angegeben ist der Umsatz pro Stunde für initial 2.5×10^9 primäre Schweinehepatozyten in 790 ml Medium.

und anschließend abzufallen. Zusammenfassend scheint eine stabile Enzymleakage nach der ersten bis zur fünften Woche der Versuche nachweisbar.

Albumin wurde selektiv als Schweinealbumin der Zellen unabhängig vom Albumingehalt des Kälberserumzusatzes des Mediums gemessen. Bei einem täglich kompletten Austausch des Perfusionsmediums entsprechen die aktuellen Werte der täglichen Albuminproduktion. Das Maximum lag bei 12 mg/l pro Tag (Abb. 3).

Die Galaktoseelimination stieg bis zur fünften Woche stetig auf bis zu 38 mg/dl pro Stunde an und fiel in der siebten Woche auf Werte vergleichbar denen der dritten Woche ab (Abb. 4).

Xenobiotikametabolismus durch P450 Zytochromoxidasen:

Lidocain wurde an den Testtagen zugegeben und im geschlossenen System über sechs Stunden perfundiert. Die Leerwerte lagen jeweils bei 4 µg/ml. Innerhalb der ersten sieben Tage stabilisierten sich die Abbauraten, in der zweiten Woche zeigte sich ein zweites Maximum. Von Woche 2 bis Woche 6 waren die Zellen in der Lage, etwa 1 µg/ml pro Stunde abzubauen (Abb. 5). Die MEGX-Synthese lag zwischen der ersten und zweiten Woche mit 65 ng/ml/h initial hoch, um dann, vermutlich infolge

der Aktivierung weiterer Stoffwechselwege des Lidocainabbaues, konstant bei 16 ng/ml/h zu bleiben.

Midazolam wurde an den Testtagen zugegeben und im geschlossenen System über sechs Stunden perfundiert. Die Leerwerte lagen jeweils bei 100 ng/ml. Über die ersten vier Wochen waren die Zellen in der Lage, relativ konstant 50 ng/ml/h abzubauen (Abb. 6).

Diskussion

Für die Bewertung von Pharmaka sind Aussagen zum Metabolismus und zu unerwünschten Wirkungen der Ausgangssubstanz sowie deren Metaboliten erforderlich. Ebenso ist die Organtoxizität für die einzelnen Organsysteme zu untersuchen. *In vitro* Zellkulturen können hier drei wichtige Anforderungen erfüllen:

1. Die Auswahl der Zellart erlaubt selektive Organtoxizitätsuntersuchungen,
2. die Testsubstanzen können unter Verwendung von Hepatozytenkulturen aktiviert werden, und
3. ist eine komplette Metabolisierungsfähigkeit (Phase I und II) möglich.

Das vorgestellte Kulturmodell ist für diese Zwecke als ein *in vitro* Testsystem entwickelt worden. Die realisierten Bioreaktoren erscheinen für ausgewählte Untersuchungen als Alternativmethode zum Tierversuch prinzipiell geeignet, da das Testsystem im Vergleich zur Standardkulturtechnik (Gerlach und Neuhaus, 1994) über längere Zeit funktionsfähig blieb. Die im vorliegenden Artikel vorgestellten ersten Anwendungsergebnisse lassen es sinnvoll erscheinen, weitere Anwendungen wie Studien zur Enzyminduktion zu untersuchen.

Die Ergebnisse unserer Studien lassen bisher drei Schlußfolgerungen zu:

1. Die Hepatozytenisolierung war sicher und reproduzierbar durchführbar. Unter dem vorgestellten Verfahren sind die Resultate der

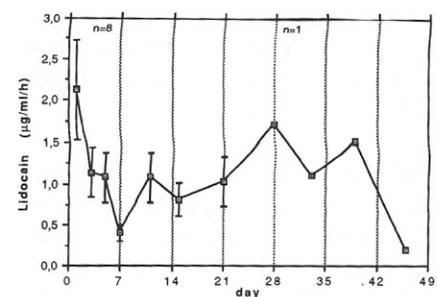


Abbildung 5: Lidocain wurde an den Testtagen zugegeben und im geschlossenen System über sechs Stunden perfundiert. Die Leerwerte lagen jeweils bei 4µg/ml. Angegeben ist der Umsatz pro Stunde für initial 2.5×10^9 primäre Schweinehepatozyten in 790 ml Medium.

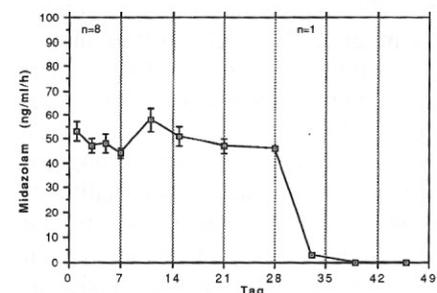


Abbildung 6: Midazolam wurde an den Testtagen zugegeben und im geschlossenen System über sechs Stunden perfundiert. Die Leerwerte lagen jeweils bei 100ng/ml. Angegeben ist der Umsatz pro Stunde für initial 2.5×10^9 primäre Schweinehepatozyten in 790 ml Medium.

Isolierung von Hepatozyten aus Schlachthoflebern zufriedenstellend.

2. Die Leberzellkultur in unserem Modell war ebenfalls technisch sicher und reproduzierbar über Zeiträume von mehreren Wochen durchführbar.
3. Das Kulturmodell erbringt im Vergleich zur Standardkulturtechnik eine Verlängerung der Zellüberlebenszeit und der Zellaktivität. Eine reproduzierbare Enzymfunktion ist auch *in vitro* erhalten. Bisher wurden jedoch nur Zellfunktionsparameter hinsichtlich der Syntheseleistung (Albuminsynthese), des Substratmetabolismus (Galaktoseelimination), des Pharmakametabolismus hinsichtlich der Zytochrom P450-Aktivi-

tät (Midazolam-Metabolismus, Lidocain/MEGX-Test) sowie der Toxizität (LDH, GLDH, GOT, GPT und gGT) untersucht.

Konventionelle Kulturmodelle erlauben pharmakologische Messungen nur in der ersten Woche nach der Zellisolierung. Durch die in unserem Modell ermöglichte Verlängerung der Kulturzeit zeigte sich jedoch, daß die Zellen gerade in dieser ersten Woche eine Adaptationsphase durchlaufen.

In unseren Studien wurde mit primären Hepatozytenkulturen aus Schweineleber gearbeitet; die Verwendung von Hepatozyten aus Humanleber ist jedoch prinzipiell ebenso möglich, wenngleich hier nur in Ausnahmesituationen Organe zur Verfügung stehen können (Gerlach et al., 1994b).

Wesentlich für die Etablierung der Hepatozytenkultur als Alternativmethode zu Tierversuchen erscheint die Möglichkeit von Untersuchungen unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen. Hier sind parallele Reihenuntersuchungen an Kulturen aus einem Organ wünschenswert, was eine standardisierte Leberzellgewinnung mit größtmöglicher Ausbeute an lebensfähigen bzw. stoffwechselaktiven Zellen aus einer Leber zur Voraussetzung hat. Um unter diesen Voraussetzungen Reihenuntersuchungen in größerem Umfang durchführen zu können, haben wir, abweichend von der bisher etablierten Verwendung von Rattenleber, eine Technik zur Isolierung von Hepatozyten und Sinusendothelzellen aus Schweineleber entwickelt (Gerlach et al., 1993b). Die optimale Aufarbeitung des Ausgangsorgans war durch eine Fünfschritt-Perfusion möglich.

Die Verwendung von Hepatozyten aus intraoperativ gewonnenen Schweinelebern macht ein nach dem Tierschutzgesetz anzeigepflichtiges Töten von Tieren unter Narkosebedingungen erforderlich. Dies konnte durch eine Leberzellisolierung aus Organen von Schlachthofschweinen ersetzt werden (Gerlach et al.,

1993a). Mit Verwendung von Schlachthoforganen erscheint die Isolierung von Schweinehepatozyten bei vergleichbarer Zellmenge im Vergleich zur Rattenhepatozytenisolierung methodologisch mit weniger Aufwand und finanziell mit geringeren Kosten verbunden. Die beschriebene primär geringere Ausbeute bei den Schlachthoforganen ist durch eine große Verfügbarkeit dieser Ausgangsorgane und entsprechende Verarbeitungstechnologien auszugleichen. Es bleibt jedoch zu untersuchen, ob die Phase der warmen Ischämie zwischen Tötung und Weiterverarbeitung subletale Schäden setzt, und ob hier einzelne Subpopulationen selektiert werden.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Kulturmodell ließen sich die Bedingungen der *in vitro* Kultur von Hepatozyten weiter an die physiologische Situation in der Leber annähern: Die verwendeten Kapillarsysteme bilden dreidimensionale Strukturen, an denen sich die Zellen organisieren können. Wie im intakten Organ werden viele kleine identische Einheiten für jeweils wenige Zellen geschaffen, die der Einheit des Lobulus in der Leber entsprechen. Da die Kapillaren einerseits untereinander verwoben sind, andererseits so aus dem Reaktor herausgeführt werden, daß sie unabhängig voneinander unterschiedliche Funktionen erfüllen können, ergeben sich Bedingungen ähnlich denen im Lebersinus: unabhängige Mediumzuführung, dezentrale Sauerstoffversorgung (Gerlach et al., 1990a) und Kohlendioxidentsorgung sowie ein unabhängiger Mediumausstrom sind so möglich. Schließlich zeigten sich die verwendeten Kunststoffe zellkompatibel (Gerlach et al., 1990b); die Kapillaren waren zur Hepatozytenadhäsion geeignet (Gerlach et al., 1990c; Gerlach et al., 1990d) und vermitteln eine Zellimmobilisierung.

Analog zu den Verhältnissen im Leberlobulus werden die Zellen in unserem System perfundiert: Das Kulturmedium, das gleichzeitig Nährmedium und Trägerlösung für

die zu analysierenden Substanzen darstellt, gelangt über ein eigenes afferentes Kapillarbett zu den Zellen und strömt dort aus den Kapillaren entlang der Hepatozyten durch das Zellkompartiment des Reaktors. Nach dem Stoffaustausch mit den Zellen gelangt es in ein weiteres unabhängiges Kapillarbett und aus dem Reaktor heraus. Über ein drittes, unabhängiges Kapillarsystem wird Sauerstoff zu den Zellen hin- und Kohlendioxid von den Zellen wegtransportiert.

Das vorgestellte Konstruktionsprinzip eines Bioreaktors ermöglicht die Verwendung weiterer Kapillarmembrankompartimente. So lassen sich mit geeigneten Kapillaren zusätzliche Funktionen in den Bioreaktor integrieren, wie z.B. die oben geschilderte Verwendung einer Kokultur mit Sinusendothelzellen. Alternativ war durch Verwendung von Cuprophan®-Zellulosemembrankapillaren (Akzo AG/ Wuppertal) die Integration einer Dialyse möglich. Weiterhin wäre durch Verwendung eines Kapillarsystems mit großem *cut-off* eine separate Zufuhr von zu untersuchenden Xenobiotika möglich. Durch Verwendung von hydrophoben Kapillaren, z.B. aus Edelstahlröhren, wäre die Integration eines Wärmetauschers in den Reaktor möglich, der den dezentralen Wärmeentzug aus einer Umgebung von nur wenigen Zellen und damit ein steuerbares, rasches Abkühlen erlaubt. So ist die Möglichkeit des DMSO-Einfrierens des ganzen Reaktors mit seinen Zellen denkbar. Weitere Untersuchungen müssen hier zeigen, ob eine Herstellung der Reaktoren mit kultivierten Zellen und deren Konservierung und Transport zum potentiellen Nutzer und dortige Reaktivierung zur Anwendung im industriellen Rahmen möglich ist.

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden mit Leberzellkulturen durchgeführt. Prinzipiell könnte sich das Zellkulturmodell durch entsprechende Modifikationen auch für die Kultivierung von Zellen anderer Organe oder zur Produktion mono-

klonaler Antikörper durch Hybridomazellen als geeignet erweisen, womit sich weitere Anwendungen alternativ zu Tierversuchen eröffnen könnten.

Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt vom Bundesgesundheitsamt Berlin/ ZEBET.

Die Autoren danken herzlich Frau Heber, Frau Moritz, Herrn Lehnert und Herrn Ing. Zartnack im Universitätsklinikum Rudolf Virchow Berlin für ihre Unterstützung sowie Herrn Dr. med. R. Bornemann, Bielefeld, und Herrn Prof. Dr. H. Spielmann für ihre kritische Durchsicht.

Literatur

- Berry, M. N., Edwards, A. M., Barrit, G. J. (1991). Isolated hepatocytes preparation, properties and applications. In B. H. Burdon und P. H. van Knippenberg (Hrsg.), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (121ff). Amsterdam: Elsevier.
- EG. (1983). Council recommendation of 26 October 1983 concerning tests relating to the placing on the market of proprietary medical products (83/ 571/ EEC). *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L 332.
- Gerlach, J. (1992). Modul zur Züchtung und/oder zum Erhalt von Mikroorganismen. *Deutsches Patent, Patentamt München Nr. P 42 30 194*, 7–41.
- Gerlach, J. und Neuhaus, P. (1994). Culture model for primary hepatocytes. *In Vitro Cel. Dev. Biol.*, in press.
- Gerlach J., Schauwecker, H. H. und Planck, H. (1990b). Polyurethanes and their cytocompatibility for cell seeding. In H. Planck (Hrsg.), *Medical Textiles for Implantation* (187–191). Berlin/ Heidelberg: Springer
- Gerlach, J., Smith, M. und Neuhaus, P. (1994a). Hepatocyte culture between woven capillary systems – a microscopy study. *Artif. Org.* 18, 226–230.
- Gerlach, J., Stoll, P., Schnoy, N. und Bücherl E. S. B. (1990c). Membranes as substrate for hepatocyte adhesion in liver support bioreactors. *Int. J. Artif. Org.* 13, 436–441.
- Gerlach, J., Vienken, J., Walker, P. und Affelt, K. (1990d). Computer aided time lapse analysis of hepatocyte morphology during adhesion to cellulose membranes. *Int. J. Artif. Org.* 13, 365–369.
- Gerlach, J., Brombacher, J., Courtney, J. M. und Neuhaus, P. (1993b). Nonenzymatic versus enzymatic Hepatocyte Isolation from Pig Livers for larger scale Investigation of Liver Cell Perfusion Systems. *Int. J. Artificial Organs* 16, 677–681.
- Gerlach, J., Brombacher, J., Klöppel, K., Schnoy, N. und Neuhaus, P. (1994b). Comparison of Four Methods for Mass Hepatocyte Isolation from Pig and Human Livers. *Transplantation* 57, 1318–1328.
- Gerlach, J., Schauwecker, H. H., Klöppel, K., Tauber, R., Müller, Ch. und Bücherl, E. S. (1989). Use of hepatocytes in adhesion and suspension cultures for liver support bioreactors. *Int. J. Artif. Org.* 12, 788–793.
- Gerlach, J., Klöppel, K., Stoll, P., Vienken, J., Müller, C. und Schauwecker, H. H. (1990a). Gas supply across membranes in liver support bioreactors. *Artif. Org.* 14, 328–333.
- Gerlach, J., Klöppel, K., Müller, C., Schnoy, N., Smith, M. und Neuhaus, P. (1993c). Hepatocyte aggregate culture technique for bioreactors in hybrid liver support systems. *Int. J. Artif. Org.* 16, 843–846.
- Gerlach, J., Klöppel, K., Schön, M. R., Brombacher, J., Courtney, J. M., Unger, J. und Neuhaus, P. (1993a). Comparison of pig hepatocyte isolation using intraoperative perfusion without warm ischemia and isolation of cells from abattoir organs after warm ischemia. *Artificial Organs* 17, 950–953.
- Kissmeyer-Nielsen und F., Kjerbye, K. E. (1967). Lymphocytotoxic microtechnique. Purification of lymphocytes by flotation. *Histocompatibility Testing, Kopenhagen 1967*, 381.
- Knazek, R. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O. und Dedrick, R. L. (1972). Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. *Science* 178, 65–67.
- Pertoft, H., Rubin, K., Kjellen, L., Laurent, T. C. und Klingeborn, B. (1977). The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll. *Exp. Cell Res.* 110, 449–57.

Korrespondenzadresse

Jörg Gerlach
 AG Experimentelle Chirurgie
 Universitätsklinikum
 Rudolf Virchow
 Spandauer Damm 130
 D-14050 Berlin