



Universität Rostock
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften



**Biologische Wirkung von
Caprylat und N-Acetyltryptophan
- Auswirkungen in humanen Albuminlösungen für
therapeutische Anwendungen -**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Melanie Stiffel
geb. am 26.06.1980 in Hohenmölsen

Rostock, Februar 2014

- Gutachter 1: Prof. Dr. Jan Stange,
Medizinische Fakultät, Nephrologie, Universität Rostock
- Gutachter 2: Prof. Dr. Birgit Piechulla
Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät, Biochemie,
Universität Rostock
- Gutachter 3: Prof. Dr. Barbara Nebe
Medizinische Fakultät, Zellbiologie, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 19. Februar 2014

Datum der Verteidigung: 08. Mai 2015

Für meine Eltern



I. Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Abkürzungsverzeichnis	
V	Glossar	
1	Einleitung	1
1.1	Die Leber und ihre Funktionen	1
1.2	Störung der Leberfunktion - Leberversagen	2
1.3	Extrakorporale Leberunterstützungsverfahren.....	3
1.3.1	Hämodialyse	4
1.3.2	Plasma Exchange	5
1.3.3	Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS).....	5
1.3.4	Prometheus.....	6
1.4	Albumin und seine Stabilisatoren	7
1.4.1	Humanes Serum Albumin (HSA).....	7
1.4.2	Caprylat (CATE).....	8
1.4.3	N-Acetyltryptophan (NAT)	10
1.4.4	Hepalbin-Adsorber	11
1.5	Hepatozyten.....	12
1.6	Zielsetzung und Fragestellung	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Testsubstanzen.....	14
2.2	Zellkultur	16
2.2.1	Zelllinie.....	16
2.2.2	Kultivierung	16
2.2.3	Testvorbereitung / -ablauf	17
2.2.4	Testdurchführung.....	18

2.2.5	Tests	20
2.3	Gaschromatographie.....	24
2.4	Dialyse und Patientenplasmen	25
2.5	Statistische Methoden	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Hepatozyten Zelllinie HepG2 C3A.....	27
3.1.1	Einfluss von FKS und Heparin.....	27
3.1.2	Bestimmung der Zellproliferation und –vitalität	27
3.1.3	Bestimmung der Zytotoxizität	41
3.1.4	Monitoring physiologischer Parameter – Bionasensor	48
3.2	Fibroblasten Zelllinie L929	50
3.2.1	Bestimmung der Zellproliferation und -vitalität.....	50
3.3	Patientenplasmen	55
3.3.1	Bestimmung der Zellproliferation und –vitalität	55
3.3.2	Bestimmung der Zytotoxizität	56
3.4	Messwerte Stabilisatoren (Gaschromatographie/ HPLC).....	57
4	Diskussion.....	61
4.1	Hepatozyten Zelllinie HepG2 / C3A.....	61
4.1.1	Bestimmung der Zellproliferation und –vitalität	61
4.1.2	Bestimmung der Zytotoxizität – Cytochrom P450	68
4.2	Zelllinie L929 – Fibroblasten.....	73
4.3	Patienten.....	74
4.4	Fazit und Ausblick	76
4.5	Fehlerbetrachtung	79
5	Zusammenfassung.....	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Anhang.....	94
7.1	Reagenzien.....	94

7.2	Material	95
7.3	Geräte	96
7.4	Programme	97
7.5	Zusätzliche Diagramme des Ergebnisteils.....	98
7.5.1	Wirkung von FKS	98
7.5.2	Wirkung von Heparin.....	100
7.5.3	Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5.....	102
7.5.4	Vergleich unterschiedl. CATE und NAT Konzentrationen	113
7.5.5	Vergleich unterschiedlicher Albuminkonzentrationen	123
7.5.6	Vergleich von Plasma und Albumin mit und ohne CATE	126
7.5.7	ive Dead Färbung.....	134
7.5.8	Bionasensor	136
7.5.9	Fibroblasten	140
VI	Danksagung	
VII	Eidesstattliche Erklärung	
VIII	Tabellarischer Lebenslauf	
IX	Veröffentlichungen	

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Indikationen für Leberersatzverfahren.....	3
Abbildung 2:	Hepalbin-Adsorber, Albutec GmbH	11
Abbildung 3:	Aufbauanleitung des Hepalbin-Adsorbers zur Deligandisierung von HSA	15
Abbildung 4:	Metabolismus von Verapamil	23
Abbildung 5:	Alle Messergebnisse und statistische Signifikanzen der Zellzahlbestimmung (A), sowie die berechnete Vitalität (B) beider Albumine. (n=18)	28
Abbildung 6:	Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich untereinander. (n=9).....	29
Abbildung 7:	Vitalitätsbestimmung der einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen in 5 % Albumin. Dargestellt werden alle Werte und dazugehörige Signifikanzen. (n=9).....	30
Abbildung 8:	Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der unterschiedlichen Albuminkonzentrationen im Vergleich mit DA 10 und DA 5. (n=12)..	31
Abbildung 9:	Alle Vitalitäten zwischen den verschiedenen Albuminkonzentrationen und deligandisierten Albumin mit entsprechenden Signifikanzen. (n=12)	32
Abbildung 10:	Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung vom Plasma und deligandisiertem Albumin zueinander. (n=9)	33
Abbildung 11:	Alle Werte zur Vitalitätsbestimmung für Plasma im Vergleich zu deligandisierten Albumin und zugehörige Signifikanzen. (n=9)	34
Abbildung 12:	Dargestellt werden die aus den XTT Messwerten und Zellzahl berechneten Ergebnisse der Zellaktivität pro Zelle. (n=6).....	34
Abbildung 13:	Alle berechneten Zellaktivitäten der CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen pro Zelle im Vergleich zum deligandisierten Albumin (0 mmol). (n=9)	35
Abbildung 14:	Alle Ergebnisse der LDH Freisetzung pro Zelle und errechneten Signifikanzen der zu vergleichenden Albumine. (n=18).....	37
Abbildung 15:	Alle errechneten Ergebnisse der LDH Freisetzung pro Zelle für alle CATE (A) und NAT (B) Konzentration im Vergleich zu 0 mmol (deligandisiertes Albumin). Es sind alle statistischen Unterschiede gekennzeichnet. (n=9)	38

Abbildung 16:	5 % Standard Albumin mit beiden Stabilisatoren (A); 5 % deligandisiertes Albumin (B); Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung:20-fach	39
Abbildung 17:	5 %-iges Albumin mit 5 mmol/l CATE (A); 5 %-iges Albumin mit 5 mmol/l NAT (B); Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung: 20-fach.....	40
Abbildung 18:	Alle Messergebnisse der Resorufinumsetzung pro Zelle des Cytochrom P 450 Systems mit jeweiligen Signifikanzen. (n=18)	41
Abbildung 19:	Alle Werte der Resorufinumsetzung pro Zelle für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen mit errechneten Signifikanzen. (n=9)	42
Abbildung 20:	Alle Werte der errechneten Resorufinkonzentration pro Zelle. In Abschnitt A werden alle Signifikanzen für das 10 und 2,5 %-ige Albumin dargestellt und in Abschnitt B für das 7,5 und 5 %-ige.....	43
Abbildung 21:	Darstellung der Resorufinwerte pro Zelle von allen drei Plasmen zueinander und zu DA. (n=9)	44
Abbildung 22:	Es werden die Konzentrationen der Verapamilumsetzung zu seinem Metabolit D-617 gezeigt (A) mit den dazugehörigen Signifikanzen zwischen beiden Albuminen. In Abschnitt B wurde die D-617 Konzentration pro Zelle berechnet und dargestellt. (n=6)	45
Abbildung 23:	In Abschnitt A werden die Norverapamil Konzentrationen zwischen A 5 und DA 5 mit allen Signifikanzen dargestellt. Abschnitt B zeigt die berechneten Norverapamil Konzentrationen pro Zelle beider getesteter Albumine. (n=6).....	46
Abbildung 24:	Zelladhäsion der Bionasmessung für 5 %iges Standard Albumin (A) und deligandisiertes Albumin (B) in einem Zeitraum von 72 h.	49
Abbildung 25:	Alle Werte der Zellzahl- (A) und Vitalitätsbestimmung (B) und dazugehörige Signifikanzen der Albumine A 5 und DA 5. (n=9)	50
Abbildung 26:	Alle Werte und Signifikanzen der Zellaktivität via XTT Test im Vergleich vom Standard Albumin und deligandisierten Albumin. (n=9)52	
Abbildung 27:	Die Ergebnisse der LDH Freisetzung vom Standard Albumin im Vergleich zu deligandisierten Albumin und den Mediumkontrollen. (n=9)	53
Abbildung 28:	Bilder der Live Dead Färbung von L929 Zellen mit 5 %igen Standard Albumin (A) und 5 %igen deligandisierten Albumin (B). Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung: 20-fach.....	54

Abbildung 29:	Bildausschnitt vom Mittelteil des Wells für Standard Albumin (A) und deligandisiertes Albumin (B). Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung: 20-fach	54
Abbildung 30:	Zellzahlbestimmung der Patientenplasmen vor und nach Behandlung von MARS (A) und Rezirkulation (B).	55
Abbildung 31:	Gezeigt werden die Zellviabilitäten der Patientenplasmen im Vergleich von MARS (A) und der Rezirkulation (B).	56
Abbildung 32:	Alle Ergebnisse der Ethoxyresorufinumsetzung der MARS (A) und Rezirkulation (B) vor und nach der Behandlung.	56
Abbildung 33:	Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung beim Vergleich der Verdünnungsmedien DMEM und FKS. (n=6)	98
Abbildung 34:	Errechnete Vitalitäten der Zellen im Vergleich der beiden Zellkulturmedien. (n = 6)	98
Abbildung 35:	Darstellung der Messdaten der Zellaktivität via XTT Test. Vergleich der beiden Zellkulturmedien. (n=3, MW)	99
Abbildung 36:	Lactatdehydrogenase Messdaten im Vergleich zwischen beiden verwendeten Zellkulturmedien. (n=3, MW)	99
Abbildung 37:	Resorufingehalt der Zellen mit getestetem Albumin und unterschiedlichen Zellkulturmedium. (n=3, MW)	100
Abbildung 38:	Vergleich der Zellzahlen unterschiedlicher Plasmen mit verschiedenen CATE Konzentrationen. (n=3, MW)	100
Abbildung 39:	Vitalitätsunterschiede zwischen verschiedenen Plasmen mit unterschiedlichen CATE Konzentrationen. (n=3, MW)	101
Abbildung 40:	Messwerte der Zellaktivität via XTT Test. Vergleich zwischen heparinisierten und nicht heparinisierten Plasma. (n=3; MW)	101
Abbildung 41:	Ergebnisse der Resorufinmessung der unterschiedlichen Plasmen mit verschiedenen CATE Konzentrationen. (n=3; MW)	102
Abbildung 42:	Alle Werte der Zellzahlbestimmung der getesteten Albumine zu den Mediumkontrollen. (n=18)	102
Abbildung 43:	Vitalitätsbestimmung und dazugehörige Signifikanzen zwischen A und DA zu beiden Mediumkontrollen. (n=18)	103
Abbildung 44:	Alle gemessenen XTT Werte, welche dann für die Berechnung pro Zelle verwendet wurden. (n=6)	103
Abbildung 45:	Alle Ergebnisse der Zellaktivitätsbestimmung via XTT Test. Im Vergleich stehen beide getestete Albumine zu beiden Mediumkontrollen. (n=6)	104

Abbildung 46:	Errechnete Ergebnisse der Zellaktivität pro Zelle der beiden Albumine zu den Mediumkontrollen. (n=6).....	104
Abbildung 47:	Die gemessenen LDH Werte für A und DA mit jeweiligen Signifikanzen. (n=18)	105
Abbildung 48:	Alle Messwerte der LDH Freisetzung für die Albumine im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=18).....	105
Abbildung 49:	Alle errechneten Ergebnisse für die LDH Freisetzung pro Zelle für beide Albumine im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=18)	106
Abbildung 50:	Alle Messwerte der Resorufinumsetzung für beide Albumine im Vergleich. Alle statistischen Signifikanzen sind in der Grafik enthalten. (n=18)	106
Abbildung 51:	Messwerte der Resorufinbestimmung beider Albumine zu den Mediumkontrollen FKS und DMEM mit dazugehörigen Sigifikanzen. (n=18)	107
Abbildung 52:	Alle pro Zelle errechneten Resorufinwerte zu A und DA im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=18).....	107
Abbildung 53:	Alle Messwerte der Verapamilumsetzung in seinen Metaboliten D-617 (A). Die errechneten Werte der D-617 Konzentration pro Zelle. Im Vergleich steht A10 zu DA 5. (n=6)	108
Abbildung 54:	Alle Ergebnisse der D-617 Metabolit Messung für den Vergleich von Standard Albumin und Mediumkontrollen. (n=6)	108
Abbildung 55:	Die errechneten Werte für die D-617 Konzentration pro Zelle im Vergleich von Standard Albumin und Mediumkontrollen. (n=6)	109
Abbildung 56:	Alle Werte der Messung der Verapamilumsetzung in den Metaboliten D-617. Im Vergleich stehen deligandisiertes Albumin mit Mediumkontrollen. (n=6)	109
Abbildung 57:	Die Ergebnisse der errechneten Metabolit D-617 Konzentration pro Zelle vom deligandisierten Albumin zu den Mediumkontrollen. (n=6)	110
Abbildung 58:	Die Messergebnisse der Norverapamilumsetzung von A 10 im Vergleich mit DA 5 (A). Des Weiteren werden die errechneten Werte pro Zelle dargestellt (B). (n=6)	110
Abbildung 59:	Alle Werte der Norverapamil Messung vom Standard Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=6)	111
Abbildung 60:	Die errechneten Werte der Norvera-pamilumsetzung für das Standard Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=6).....	111

Abbildung 61:	Die Messwerte der Norverapamil Messung für das deligandisierte Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=6).....	112
Abbildung 62:	Alle errechneten Werte für die Norverapamil Konzentration vom deligandisierten Albumin zu den Mediumkontrollen. (n=6)	112
Abbildung 63:	Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der einzelnen CATE Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt alle Signifikanzen der 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die für die 0,6 und 0 mmol. (n=9)	113
Abbildung 64:	Alle Werte der Zellzahlbestimmung für die einzelnen NAT Konzentrationen mit den Signifikanzen zu 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B). (n=9)	113
Abbildung 65:	Alle Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung im Vergleich von allen CATE Konzentrationen zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=6).....	114
Abbildung 66:	Alle Werte der Vitalitätsbestimmung für die einzelnen NAT Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A stellt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol dar und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=6).....	114
Abbildung 67:	Alle Messwerte der XTT Bestimmung für die Zellaktivität im Vergleich von CATE (A) und NAT (B). Sowohl bei CATE als auch bei NAT gibt es zwischen allen Konzentrationen (außer 0,6 mmol) eine Signifikanz von $p < 0,001$ zu 0,6 und 0 mmol. (n=18).....	115
Abbildung 68:	Alle Messwerte der Zellaktivität via XTT. Im Vergleich stehen alle CATE Konzentrationen zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die Konzentrationen 0,6 und 0 mmol. (n=18)	115
Abbildung 69:	Alle Messwerte der Zellaktivität von allen NAT Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B zeigt die 0,6 und 0 mmol Konzentration. (n=18).....	116
Abbildung 70:	Alle errechneten Werte der Zellaktivität pro Zelle für alle CATE Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=19).....	116

Abbildung 71:	Alle errechneten Zellaktivitäten pro Zelle für alle NAT Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=9).....	117
Abbildung 72:	Alle Messwerte der LDH Freisetzung für die CATE (A) und NAT (B). (n=9)	117
Abbildung 73:	Alle LDH Messwerte für die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B) im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)	118
Abbildung 74:	Alle Messwerte der LDH Freisetzung der NAT Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die Konzentrationen 0,6 und 0 mmol. (n=9)	118
Abbildung 75:	Alle errechneten Werte der LDH Freisetzung pro Zelle für die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B) im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)	119
Abbildung 76:	Alle errechneten LDH Werte für die NAT Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A stellt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol dar und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=9).....	119
Abbildung 77:	Alle Werte der Resorufinmessung für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen. (n=9).....	120
Abbildung 78:	Alle Messwerte der Resorufinumsetzung für die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B) im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)	120
Abbildung 79:	Alle Messwerte der Resorufinumsetzung der NAT Konzentrationen. In Abschnitt A werden die Werte und Signifikanzen der 5mmol im Vergleich zu den Mediumkontrollen gezeigt, in Abschnitt B die 3,75 bis 1,25 mmol und in Abschnitt C die 0,6 und 0 mmol. (n=9).....	121
Abbildung 80:	Die errechneten Resorufinwerte pro Zelle für alle CATE Konzentrationen (5 bis 1,25 mmol (A); 0,6 und 0 mmol (B)) im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=9)	122
Abbildung 81:	Alle errechneten Werte der Resorufinumsetzung pro Zelle für die NAT Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=9)	122

Abbildung 82:	Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der verschiedenen Albuminkonzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=12)	123
Abbildung 83:	Die Vitalitätsbestimmung für das Standard Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=12).....	123
Abbildung 84:	Alle Ergebnisse der XTT Messung für Standard HSA und Deligandisiertes HSA (A/B) und die dazugehörigen errechneten Werte der Zellaktivität pro Zelle für beide Albumine (C). (n=12).....	124
Abbildung 85:	Alle Ergebnisse für die Zellaktivität vom Standard Albumin im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die eigentlichen Messwerte, Abschnitt B die errechnete Aktivität pro Zelle. (n=12).....	125
Abbildung 86:	Die eigentlichen Messwerte der Resorufinumsetzung vom Standard Albumin und deligandisiertem Albumin. Im Abschnitt A werden alle Signifikanzen von A 10 gezeigt in Abschnitt B die von allen anderen. (n=12)	125
Abbildung 87:	Alle Messwerte der Resorufin Konzentration (A) und die errechneten Umsätze pro Zelle (B) für alle Albuminkonzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=12).....	126
Abbildung 88:	Alle Ergebnisse und Signifikanzen der Zellzahlbestimmung von Plasma im Vergleich zu CATE 5 (A) und den Mediumkontrollen (B). (n=9)	126
Abbildung 89:	Alle Werte der errechneten Vitalität vom Plasma und CATE 5 (A), sowie den Mediumkontrollen (B). Es werden alle Signifikanzen angezeigt. (n=9).....	127
Abbildung 90:	Alle Messwerte (A) und errechneten Zellaktivitäten pro Zelle (B) für den Vergleich von Plasma und deligandisiertem Albumin. (n=6).....	127
Abbildung 91:	Alle Ergebnisse der Zellaktivität via XTT für Plasma im Vergleich zu CATE 5 (A) und Mediumkontrollen (B). (n=9).....	128
Abbildung 92:	Zellaktivitäten pro Zelle via XTT Methode. Plasma im Vergleich zu CATE 5 (A) und zu Mediumkontrollen (B). Alle Signifikanzen sind in der Abbildung mit dargestellt. (n=6)	128
Abbildung 93:	Alle Werte der LDH Messung (A) und die errechnete LDH Freisetzung pro Zelle für den Vergleich von Plasma und deligandisiertem Albumin. (n=9).....	129

Abbildung 94:	Alle Werte zur LDH Freisetzung im Vergleich von Plasma mit CATE 5. Es werden die eigentlich gemessenen Werte dargestellt (A), als auch die Errechneten pro Zelle (B). (n=9)	129
Abbildung 95:	Es werden die Ergebnisse der LDH Messung im Vergleich von Plasma und den Mediumkontrollen mit allen Signifikanzen dargestellt (A). Abschnitt B zeigt alle Werte pro Zelle. (n=9).....	130
Abbildung 96:	Die Messwerte der Resorufinumsetzung für den Vergleich von Plasma und deligandisierten Albumin. (n=9)	130
Abbildung 97:	In dieser Abbildung werden alle Ergebnisse der Resorufinmessung dargestellt. Es werden alle drei Plasmen mit CATE 5 verglichen. Abschnitt A zeigt die ermittelten Werte und Abschnitt B die Ergebnisse pro Zelle. (n=9).....	131
Abbildung 98:	In diesen Darstellungen werden die Resorufinumsätze und die dazugehörigen Signifikanzen vom Plasma dargestellt. Im Vergleich stehen jetzt die Mediumkontrollen. In Abschnitt A sind die gemessenen Werte, in Abschnitt B die Werte pro Zelle. (n=9)	131
Abbildung 99:	Alle Messwerte der Verapamilumsetzung in den D-617 Metabolit für deligandisiertes Albumin im Vergleich mit Plasma. Abschnitt A zeigt alle Signifikanzen von DA 5 FKS und Abschnitt B die von DA 5 DMEM. (n=6)	132
Abbildung 100:	Die Ergebnisse der Verapamilumsetzung zu seinen Metabolit Norverapamil im Vergleich von deligandisierten Albumin und Plasma. Abschnitt A stellt die Signifikanzen von DA 5 FKS dar und Abschnitt B von DA 5 DMEM. (n=6).....	132
Abbildung 101:	Alle errechneten Ergebnisse der Verapamilumsetzung in seine Metabolite D-617 (A) und Norverapamil (B) pro Zelle. Im Vergleich stehen das deligandisierte Albumin und Plasma. (n=6).....	133
Abbildung 102:	Alle Ergebnisse der Verapamil Metaboliten D-617 (A) und Norverapamil (B) für Plasma im Vergleich zu Mediumkontrollen. (n=6)	133
Abbildung 103:	Dargestellt werden alle errechneten Werte der Verapamil Metaboliten D-617 (A) und Norverapamil (B) pro Zelle für Plasma und Mediumkontrollen. (n=6)	134
Abbildung 104:	5 % Albumin mit 2,5 mmol/l CATE (A) und 2,5 mmol/l NAT (B)	134
Abbildung 105:	Mediumkontrolle FKS (A); Mediumkontrolle DMEM (B).....	135

Abbildung 106: 5 % Standard Albumin mit beiden Stabilisatoren (A); 5 % deligandisiertes Albumin (B).....	135
Abbildung 107: Messung der Zelladhäsion von 10 % Standard Albumin.	136
Abbildung 108: Die Grafik stellt den Verlauf der O ₂ Sättigung von C3A Zellen dar in Verbindung mit 5 % (A) und 10 % (B) Standard Albumin.	137
Abbildung 109: O ₂ Sättigung (A) und Ansäuerung (B) der C3A Zellen in Verbindung mit deligandisierten Albumin über einen Zeitraum von 72 h.	138
Abbildung 110: Die Ansäuerung (pH-Wert) der C3A Zellen in Verbindung mit 5 % (A) und 10 % (B) Standard Albumin im Zeitraum von 72 h.....	139
Abbildung 111: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9).....	140
Abbildung 112: Alle Werte der Vitalitätsbestimmung der CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=9).....	140
Abbildung 113: Alle Werte der Zellaktivität für Standard Albumin im Vergleich mit deligandisierten Albumin. (n=9).....	141
Abbildung 114: Alle Messwerte der Zellaktivität für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9).....	141
Abbildung 115: Alle Zellaktivitäten pro Zelle für alle CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=9).....	142
Abbildung 116: Die Messwerte der LDH Freisetzung für das Standard Albumin im Vergleich zum deligandisierten Albumin und den Mediumkontrollen. (n=9).....	142
Abbildung 117: Alle LDH Messwerte für die CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)	143
Abbildung 118: Alle errechneten LDH Werte pro Zelle für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9).....	143

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellung der Stammlösung und Arbeitslösung beider Stabilisatoren	14
Tabelle 2: Beschreibung Testablauf	18
Tabelle 3: Testablauf	18
Tabelle 4: Messwerte aus der Testsubstanz Albumin vom Stabilisator CATE	57
Tabelle 5: Messwerte aus der Testsubstanz Albumin vom Stabilisator NAT	58
Tabelle 6: Messwerte aus der Testsubstanz Gesundplasma vom Stabilisator CATE ..	59

IV. Abkürzungsverzeichnis

HSA	Humanes Serum Albumin
CATE	Caprylat
NAT	N-Acetyltryptophan
FKS	Fetales Kälberserum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
LDH	Lactat Dehydrogenase
3 MC	3-Methylcholanthren
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
MW	Mittelwerte
A	Standard Albumin
A 10	10 %-iges Standard Albumin
A 7,5	7,5 %-iges Standard Albumin
A 5	5 %-iges Standard Albumin
A 2,5	2,5 %-iges Standard Albumin
DA	Deligandisiertes Albumin
0 mmol/l CATE o. NAT	Deligandisiertes Albumin
DA 10	10 %-iges deligandisiertes Albumin
DA 5	5 %-iges deligandisiertes Albumin
P 10	Gesundplasma mit 10 mmol/l CATE
P 5	Gesundplasma mit 5 mmol/l CATE
P 0	Gesundplasma
5/ 3,75/ 2,5 mmol/l CATE	5 %-iges DA mit 5/ 3,75/ 2,5 mmol/l CATE
1,25/ 0,6 mmol/l CATE	5 %-iges DA mit 1,25/ 0,6 mmol/l CATE
5/ 3,75/ 2,5 mmol/l NAT	5 %-iges DA mit 5/ 3,75/ 2,5 mmol/l NAT
1,25/ 0,6 mmol/l NAT	5 %-iges DA mit 1,25/ 0,6 mmol/l NAT
FKS Mediumkontrolle	Zellkulturmedium mit 10 % FKS Anteil
DMEM Mediumkontrolle	Zellkulturmedium ohne FKS

V. Glossar

Begriff	Beschreibung
Adhärenz	Entstehung von Zell-Zell-Kontakten durch Zelladhäsionsproteine
adhärent	Zusammenhaften von Zellen
Arachidonsäure	vierfach ungesättigte Fettsäure
Astrozyten	stern- bzw. spinnenförmig verzweigte Zellen, bilden die Mehrheit der Gliazellen im zentralen Nervensystem von Säugetieren, bilden Grenzmembranen zur Gehirnoberfläche und zu Blutgefäßen
Aszites	Bauchwassersucht, eine pathologische (krankhafte) Flüssigkeitsansammlung in der freien Bauchhöhle
Akute-Phase-Protein	Proteine, die durch Gewebsschädigungen entstehen, es kommt es zu unspezifischen Immunreaktionen (Akute-Phase-Reaktion), Botenstoffe stimulieren Synthese verschiedener Akute-Phase-Proteine in der Leber Funktion: - Lokalisierung der Entzündung - Verhinderung der Ausbreitung - Unterstützung des Immunsystems
Bilirubin	gelbes Abbauprodukt des Häm-Anteils des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin und damit ein Gallenfarbstoff
Benzodiazepin	Angstlösender, zentral muskelrelaxierender, sedierender und hypnotisch (schlaffördernd) wirkender Arzneistoffe
Cholesterol	Naturstoff, lebenswichtiges Sterol und ein wichtiger Bestandteil der Plasmamembran
Cut-off	Toleranzgrenze, bezeichnet einen Toleranzwert in der Analytik von z.B. Drogen und Medikamenten
Clearence	Entfernen einer bestimmten exo- oder endogenen Substanz aus einem gegebenen Körpersystem
Globulin	Protein des Blutplasmas
Glucosehomöostase	Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels im Blut
Hämodynamik	Blutfluss in Blutgefäßen
Homöostase	Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtszustandes eines offenen dynamischen Systems
Hypokalzämie	Calciumspiegel im Blutserum unter 2,2 mmol/ l oder Gehalt von Calcium-Ionen unter 1,1 mmol/ l, bewirkt Störung des

	Gleichgewichts zwischen verschiedenen Elektrolyten, kann zu Übererregbarkeit des Nervensystems führen bis hin zu Krämpfen in der Skelettmuskulatur
Hypoalbuminämie	verminderte Konzentration des Proteins Albumin im Blutplasma
Häm	eisenhaltiger Farbstoff Teil der roten Blutkörperchen
Interstitium	Zwischenraum, parenchymatöse Organe durchziehende und untergliederndes Zwischengewebe
Intravasal	„in einem Blut- oder Lymphgefäß befindlich“, zum anderen die Verabreichung von Substanzen in ein Blut- oder Lymphgefäß
Kolloide	Emulsionen oder Suspensionen von Tröpfchen oder Teilchen in einer Flüssigkeit
Mercaptane	Thioalkohole nennt man aufgrund ihrer Fähigkeit, Quecksilber-(II)-Ionen zu binden, auch Mercaptane
Monolayer	bezeichnet abhängig vom Fachgebiet, eine Schicht von Atomen, Molekülen oder Zellen
Ödeme	Schwellung des Gewebes aufgrund einer Einlagerung von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem
Phenobarbital	Arzneistoff aus der Gruppe der Barbiturate, wird in der Epilepsiebehandlung sowie zur Narkosevorbereitung eingesetzt
Porcin	vom Schwein stammend
Proliferation	in der Zellbiologie - Wachstum und die Vermehrung von Zellen
Proteinogene Aminosäure	Aminosäuren, aus denen die menschlichen Proteine zusammengesetzt sind
Proteolyse	enzymatische Hydrolyse von Proteinen durch Peptidasen
Somnolenz	quantitative Bewusstseinsstörung
Thyroxin	Hormon, das in der Schilddrüse bei Säugetieren gebildet wird
Transcortin	Plasmaprotein, verantwortlich für Bindung und Transport von Glukokortikoiden und Progesteron im Blut
Vasodilatation	Erweiterung der Blutgefäße
2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin	chlorhaltige, hochgiftige organische Verbindung

1 Einleitung

1.1 Die Leber und ihre Funktionen

Die Leber ist das größte und wichtigste Stoffwechselorgan des menschlichen Organismus. Sie stellt eine wichtige Verbindung mit besonderer Enzymausstattung zwischen Verdauungstrakt und Blutkreislauf dar, sowie das metabolische Regulationszentrum des menschlichen Körpers. Die Aufgaben der Leber sind sehr vielfältig. In ihr werden Nahrungsbestandteile umgebaut, gespeichert und je nach Stoffwechsellaage wieder in den Blutkreislauf abgegeben. Sie metabolisiert und speichert Energie, welche für alle wichtigen Prozesse im Organismus gebraucht wird. Die Leber ist Synthese-, Speicher- und Abbauort für Transportproteine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme und Coenzyme, sowie Vitamine. Sie hält die Plasmaprotein-Homöostase aufrecht, wie z.B. bei Albumin und Gerinnungsfaktoren, und ist für die Bildung von Cholesterol zuständig. Des Weiteren katalysiert sie Prozesse, die für den Aufbau und Erhalt ihrer eigenen zellulären und extrazellulären Strukturen notwendig sind. Die Leber dient dem Körper auch als aktives und passives Blutreservoir. Sie spielt außerdem eine Rolle im Immunsystem, in dem sie neben denaturierten Proteinen und Lipiden auch Viren, Bakterien und Tumorzellen abbaut. Des Weiteren stellt sie eine beträchtliche Kapazität im Rahmen der Proteinsynthese dar. Das heißt, es werden nicht nur Proteine zur Erhaltung des Organs synthetisiert, sondern auch spezifische Proteine, die über das Blut mit anderen Organen wichtige Funktionen erfüllen (z.B. Albumin). Die Leber ist neben der Milz und dem Knochenmark Hauptabbauort für Häm, indem sie es in der umgewandelten Form Bilirubin vom Albumin abtrennt und dann weiter abbaut (Rodekamp, 2008).

Eine der wichtigsten Hauptaufgaben der Leber ist die effiziente Entgiftung des Organismus. In den Leberzellen, den Hepatozyten, findet der Fettsäureabbau statt. Sie bilden täglich bis zu 700 ml Gallenflüssigkeit. Sie machen etwa 80 % des Lebervolumens aus, übernehmen die Hauptlast der Biotransformation von vielen in Stoffwechselprozessen anfallenden und für den Organismus toxischen Substanzen. Dazu gehören z.B. Ammoniak, Mercaptane, Gallensäuren, Bilirubin, Fettsäuren und endogene Benzodiazepine (Thomson & Arthur, 1999; Zakim, 2003; Löffler & Heinrich, 2007). Über das Enzymsystem wandelt die Leber diese Stoffe durch Detoxikation in Derivate um, welche dann über die Galle oder über den Urin ausscheidbar sind.

1.2 Störung der Leberfunktion - Leberversagen

Wird die Leberfunktion durch endo- und exogene Einflüsse behindert, kommt es zu vielfältigen Störungen im gesamten Organismus. Die Funktionsstörung kann zur metabolischen Entgleisung führen, die durch Akkumulation proteingebundener Toxine und Störungen im Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System gekennzeichnet ist. (Vogel, Komm, & Lorenz, 1984). Weitere Folgen sind Elektrolytverschiebungen, Störungen im Vitaminhaushalt und in der Wärmeregulation. Bei Hypoalbuminämie kommt es zum Abfall des kolloidosmotischen Druckes. Dadurch kann, die in das Interstitium ausgetretene Flüssigkeit nicht wieder in den Kreislauf eintreten und es kommt zu onkotisch bedingten Ödemen (Herpertz, 2010). Außerdem tritt eine Verringerung des Transportes proteingebundener Toxine auf, d.h. der Anteil der ohnehin schon vermehrten albumingebundenen Toxine nimmt drastisch zu. Es kommt zur Verschiebung des metabolischen Gleichgewichtes (Bernau, Rueff & Benhamon, 1986; Splendiani, Tancredi & Daniele, 1990; Jauregui & Ganu, 1991). Leberpflichtige neurotoxische Substanzen kumulieren und können so ausschlaggebend für die Entstehung des hepatischen Komas sein. All diese Vorgänge führen letztendlich zum Leberversagen, was mit einem Mangel an Transportproteinen, einem Aszites, einer Infekt-Abwehrschwäche und einer disseminierten intravasalen Gerinnung einhergeht (Sen et al. 2002; Bernal et al. 2010). Neben der toxischen Wirkung auf das Gewebe, kommt es auch zur Verschlechterung der hämodynamischen Kreislauftsituation (Vallance & Moncada, 1991; Rosch & Garcia-Pagau, 2000), des Wasser- und Elektrolythaushaltes und der renalen Funktion (Sellinger et al. 1990; Bomzon et al. 1997), sowie zu Störungen im Zentralnervensystem bis hin zum Koma (Albrecht & Jones, 1999; Clemmensen et al. 1999; Sen & Williams, 2002). Dies sind wesentliche Faktoren bei der Entstehung des Multiorganversagens bis hin zum Tod, wenn sich die Leber nicht schnell genug regenerieren kann (Rozga et al. 1994). Die Rolle der Leber als Regulationszentrale des Nährstoff- und Hormonstoffwechsels wird deutlich, wenn man die vielfältigen endokrinen Veränderungen betrachtet, die bei Leberversagen eintreten (Green, 1977, Long, 1980). Aus all diesen Gründen kommt es bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung der erwähnten eingeschränkten Entgiftungsfunktion der Leber zur Anreicherung von wasserlöslichen und proteinaffinen Substanzen, wie z.B. Abbaustoffe oder Toxine. Daher ist die selektive Entgiftung in der Therapie des Leberversagens von großer Bedeutung. In der Medizin gibt es bereits viele unterschiedliche Therapieansätze zur Entfernung dieser Substanzen, welche im nachfolgenden Kapitel ausführlich erläutert werden.

1.3 Extrakorporale Leberunterstützungsverfahren

Es kann durch die unterschiedlichsten Krankheiten zum Leberversagen kommen. In jedem Fall ist eine Therapie nötig und der Einsatz eines Leberunterstützungs-

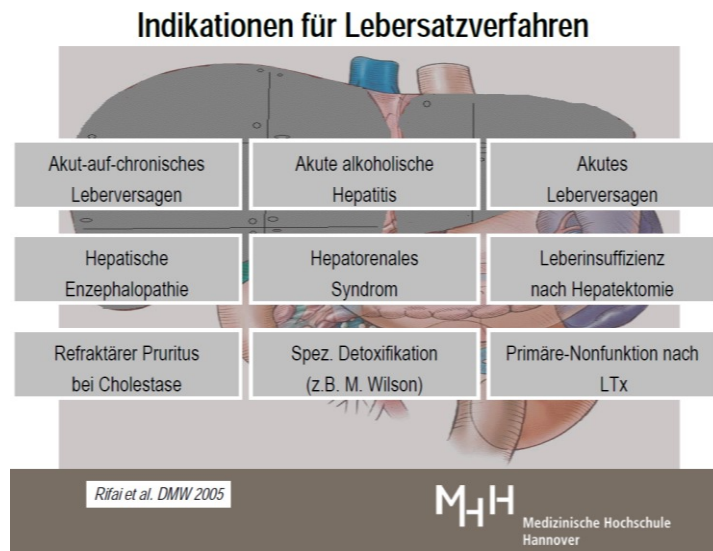


Abbildung 1: Indikationen für Leberersatzverfahren

verfahrens ist fast immer unumgänglich. Einige Indikationen für Leberersatztherapie finden sich in Abbildung 1. Die große Aufgabe dieser Therapie besteht in der Unterstützung der Leberfunktion. Es sollen Komplikationen verhindert und der Leber die Möglichkeit zur Regeneration gegeben werden. Das primäre Ziel der Leberunterstützungsverfahren

ist die Entfernung giftiger Substanzen aus dem Organismus. Da die Leber im Leberversagen unfähig ist ihrer Entgiftungsfunktion nachzukommen, führt dies zur Akkumulation von toxischen Substanzen im Blut, die zum Teil wasserlöslich, zum größten Teil aber schlecht oder gar nicht wasserlöslich sind. Für letztere werden daher Transportproteine wie das Albumin benötigt, um die Zirkulation der Toxine im Blut zu gewährleisten (Rodekamp, 2008). Die einfachste Möglichkeit, dem Körper die schädlichen Substanzen in der Leberersatztherapie zu entziehen, wäre somit, sie an Transportproteine gebunden zu entfernen. Das Entgiftungsverfahren sollte das Blut vollständig von allen Toxinen reinigen ohne gleichzeitig einen hohen Verlust an Albumin oder Substanzen mit ähnlicher Größe hervorzurufen. Andernfalls würde es zum Verlust anderer Transportproteine, wie Thyroxin bindendes Globulin und Transcortin kommen. Sie werden in der Leber synthetisiert und dienen der Bindung sowie dem Transport von Schilddrüsenhormonen. Kommt es zur Schädigung der Leber ist die Produktion dieser Proteine nicht gewährleistet. Andererseits kann es auch durch den Einsatz einer Leberersatztherapie zur Entgiftung zum Verlust jener Proteine kommen. Die Verteilung der zu transportierenden Substanzen an die Zielzellen wäre somit nicht mehr ausreichend (Rodekamp, 2008). Des Weiteren würde der Verlust von Akute-Phase-Proteinen auftreten. Sie werden ebenfalls in der Leber synthetisiert und dienen der Lokalisation von Entzündungen und verhindern deren Ausbreitung. Sie

sorgen für die Eliminierung von „körperfremden“ Stoffen durch Phagozyten. Käme es zur Entfernung dieser Akute-Phase-Proteinen, hätte dies folgeschwere Konsequenzen für das Immunsystem und die Infektabwehr. Eine falsche Entgiftungstherapie hätte ebenfalls Auswirkungen auf das Gerinnungssystem des Körpers. Beim Verlust des in der Leber synthetisierten und Gerinnungsfaktoren hemmenden, inaktiven Proenzym Protein C würde z.B. die Blutgerinnung begünstigt werden. Dies kann zu einer erhöhten Thrombosegefahr führen (Levi & van der Poll, 2007; Löffler & Heinrich, 2007). Aus all diesen Gründen muss bei der Entwicklung von Leberersatz- bzw. Leberunterstützungsverfahren darauf geachtet werden, dass bei der Entfernung der Toxine nicht auch nützliche Substanzen in großen Mengen entfernt werden. Es wurden verschiedene Verfahren erprobt, um die Funktion der Leber bei chronischen Lebererkrankungen oder akutem Leberversagen zu unterstützen bzw. sie zu ersetzen. Ein optimales Leberunterstützungsverfahren sollte die Hauptfunktionen der Leber wie Entgiftung, Synthese und Regulation verschiedener Substanzen sowie Stoffwechselprozesse übernehmen. Bioartifizielle Systeme können neben der Entgiftung auch einen Teil der Synthesefunktion der Leber ersetzen. Dabei wird Patientenblut durch einen Bioreaktor mit humanen oder porcinen Hepatozyten geleitet. Die Effektivität hängt dabei immer von der Funktionsfähigkeit der Hepatozyten ab. Diese Systeme werden allerdings wegen ihrer mit hohem Risiko behafteten immunologischen Unverträglichkeit und Mangel an humanen Spenderhepatozyten in naher Zukunft wohl nicht als Standardtherapie zur Verfügung stehen (Ellis et al. 1996; Rozga, 2006). Die folgenden Therapien bedienen sich maschineller Verfahren und sind primär auf den Ersatz der Entgiftungsfunktion fokussiert.

1.3.1 Hämodialyse

Bei der Hämodialyse findet ein Stoffaustausch zwischen Blut und Dialysat statt. Der Austausch erfolgt über eine semipermeable Membran zu kleinen Teilen mittels Ultrafiltration und Konvektion, überwiegend aber über Diffusion (Kuhlmann et al. 2008). Der Cut-off (Ausschlussgrenze) der gebräuchlichen High-Flux Membran liegt hier zwischen 20.000 und 50.000 Dalton, was mit der menschlichen Nierenglomerulmembran vergleichbar ist. Die Hämodialyse zeigt respektable Ergebnisse bezüglich der Entfernung kleinmolekularer wasserlöslicher Substanzen, wie Ammoniak, Kreatinin, Aminosäuren oder Glukose. Des Weiteren dient sie aber auch der Stabilisation des Elektrolythaushaltes (Knell & Dukes, 1976; Canand, 2009). Die Effektivität bezüglich der Clearance mittelgroßer (Ricci et al. 2006) und großer

Moleküle, aber auch lipophiler oder albumingebundener Substanzen wie Bilirubin und Gallensäure ist hingegen ungenügend. Dies bedeutet, dass eine alleinige Hämodialyse-Therapie beim Leberversagen nicht ausreicht (Silk et al. 1977; Garg, 2000; Ward, et al. 2000).

1.3.2 Plasma Exchange

Bei dem Plasmaaustausch Verfahren kommt es zur effizienten Elimination wasserlöslicher wie auch Albumin gebundener Toxine aus dem Blut. Das toxische Plasma wird durch Plasmapherese entfernt und es erfolgt eine Substitution des fehlenden Volumens durch frisches Spenderplasma. Es ist eine wirksame Methode vorübergehend die metabolische Situation im Organismus zu stabilisieren und klinisch wichtige Parameter zu verbessern (Larsen et al. 1994; Clemmensen et al. 2001). Der Cut-off des Plasmafilters liegt bei zirka drei Millionen Dalton. Durch Zugabe von dem Gerinnungshemmer Citrat zum Spenderplasma kommt es zur erhöhten Gefahr der Citrattoxikation (Mollison & Contreras 1994). Dies kann zu Nebenwirkungen wie z.B. Hypokalzämie, Muskelkrämpfen oder pulmonalen Komplikationen führen (Rozga et al. 2006). Ein anderes Problem bei dieser Therapie ist, dass Substanzen wie Hormone, deren Transportproteine und für die Leberregeneration wichtige Wachstumsfaktoren vielfach mit entfernt werden (Winikoff et al. 1985; Kobata 2004). Es tritt zwar eine kurzfristige Korrektur der klinischen Parameter auf, jedoch hat dies keinen Einfluss auf die Regeneration von Lebergewebe. Auch langfristig zeigt es keine Prognoseverbesserung beim fulminanten Leberversagen. Daher ist diese Leberersatztherapie nur als Überbrückungsmaßnahme bis zur Regeneration der Leber oder bis zur Transplantation einsetzbar. Über längeren Zeitraum wird diese Plasmaaustauschtherapie, nicht zuletzt wegen der hohen Kosten, nicht standardmäßig angewandt (Winikoff et al. 1985; Rodekamp 2008).

1.3.3 Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS)

Das MARS System ist eine Kombination von Dialyse, Filtration und Adsorption. Es wird versucht dadurch eine optimale Entgiftung des Organismus zu erzielen (Stange et al. 1993). Bei diesem Verfahren wird Patientenblut gegen eine 20 %-ige Albuminlösung dialysiert. Albumingebundene Toxine treten mitsamt Trägerprotein an die Membran heran und lösen sich vom Albumin. Danach diffundieren diese durch die Poren der Membran und binden an das Albumin im Dialysatkreislauf. Der Cut-off der Membran

liegt bei über 50.000 Dalton und ist daher für Albumin undurchlässig. Das Dialysat wird durch einen anschließenden Kreislauf über einen weiteren Dialysator und zwei Adsorbersäulen (Aktivkohlefilter und Anionenaustauscher) geleitet, gereinigt und somit regeneriert. Der Aktivkohlefilter dient in erster Linie der Entfernung lipophiler Toxine. Der Anionenaustauscher bindet hauptsächlich Bilirubin und entfernt es aus dem Kreislauf (Evenepoel et al. 2003). Über den Parallelkreislauf erfolgt die Dialyse des Albumins gegen eine Bicarbonatlösung. Dies gewährleistet die Entfernung wasserlöslicher kleinmolekularer Substanzen und den Ausgleich des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt (Stange et al. 1993). Im Laufe der Zeit hat sich diese Therapie als gängiges Leberunterstützungsverfahren etabliert. Es zeigt eine zufriedenstellende Effektivität bei der selektiven Entfernung von wasserlöslichen wie auch albumin-gebundenen Toxinen aus dem Blut (Mitzner et al. 2001; Mitzner et al. 2009). Unzulänglichkeiten dieses Verfahrens begründen sich in den Bindungseigenschaften der albumingebundenen Toxine. Durch die enge Bindung an das Trägerprotein ist die Entgiftungskapazität dieser Substanzen durch die Undurchlässigkeit der Membran für Albumin limitiert. Nur der freie Anteil an proteingebundenen Toxinen im Blut gelangt durch die Membran. Ein weiteres Problem sind die Sättigungsphänomene der eingebauten Adsorbersäulen (Rodekamp 2008). Bedingt durch die unterschiedlichen Albuminbindungsformen und durch die Sättigungsphänomene wird die Effizienz der Detoxifikation im Verfahren eingeschränkt (Evenepoel et al. 2003; Evenepoel et al. 2005).

1.3.4 Prometheus

Das Prometheus Leberersatzverfahren ist eine Kombination aus Adsorption und Diffusion und dient der selektiven Entgiftung von anfallenden Toxinen. Es kombiniert eine Methode zur Entfernung albumingebundener Toxine (FPSA – fractionated plasma separation and adsorption) mit einer High-Flux Hämodialyse. Dies soll zur größtmöglichen Eliminierung von proteingebundenen wie auch wasserlöslichen Toxinen führen (Falkenhagen et al. 1999). Mittels Albumindialysator (Cut-off bei zirka 250.000 Dalton) werden Albumin und damit albumingebundene Toxine vom restlichen Blut getrennt. Im anschließenden Kreislauf wird das Albumin in zwei Adsorbersäulen geleitet. Hier werden gebundene Toxine durch den direkten Kontakt mit hochaffinem Adsorptionsmaterial vom Albumin gelöst und an den Adsorber gebunden. Das dadurch gereinigte Albumin wird dann dem Patienten wieder zugeführt. Anschließend wird das Blut über einen High-Flux Dialysator dialysiert, um wasserlösliche Toxine zu entfernen

(Rifai et al. 2003). Einschränkungen in der Effektivität liegen im Abfall des Serumalbumins unter der Anwendung des Verfahrens (Evenepoel et al. 2005; Krisper & Stauber 2007). Dies spiegelt sich im Abfall des mittleren arteriellen Drucks wieder. Die eingebauten Adsorber haben eine limitierte Adsorptionskapazität, was zur eingeschränkten Effektivität hinsichtlich der Entfernung toxischer Substanzen führt. Deshalb sind im Hinblick auf die therapeutische Wirksamkeit Grenzen gesetzt (Rozga 2006).

1.4 Albumin und seine Stabilisatoren

1.4.1 Humanes Serum Albumin (HSA)

Bei all diesen Leberersatztherapien ist Albumin ein bedeutender Bestandteil. Albumin gehört zu den Plasmaproteinen und zur Gruppe der globulären Proteine. Es ist das am häufigsten vorkommende Protein im Blut. Das Humane Serum Albumin ist das bedeutendste Transportprotein des menschlichen Organismus und bindet den Großteil der wasserunlöslichen Substanzen wie Fettsäuren und Bilirubin, Spurenelemente, Vitamine, Hormone, Toxine, Kationen und Arzneimittel (Pardridge & Mietus 1979; Hirata 1985). Es hat eine ausgezeichnete Bindungskapazität und die höchste Konzentration im Blutplasma (35-53 g/l im gesunden Menschen). Albumin teilt sich im gesamten Organismus zu 40 % im Blutplasma und zu 60 % im Gewebe auf. Es wird in der Leber gebildet, ausgehend von der Bildung von Preproalbumin in den Hepatozyten. Im Endoplasmatischen Retikulum bildet sich daraus das Proalbumin, welches wiederum in den Golgi-Vesikeln zu Albumin umgewandelt wird. Es ist wasserlöslich und besteht aus bis zu 590 Aminosäuren. Zu den zahlreichen Aufgaben des Albumins gehört unter anderem die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes und des Blut-pH-Wertes. Der kolloidosmotische Druck, ist der osmotische Druck, der durch Kolloide in einer Lösung ausgeübt wird. Körperflüssigkeiten, wie Blutplasma, weisen durch die Anzahl der in ihnen gelösten Teilchen einen bestimmten Druck auf. Kommt es zum Verlust von Albumin und dadurch zum Absinken dieses Druckes im Blut, sammelt sich, wie schon erwähnt, Flüssigkeit im Interstitium an. Durch diese Flüssigkeitsansammlungen entstehen Ödeme und Aszites (Herpertz 2010).

Des Weiteren spielt Albumin eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase, in der Blutgerinnung, im Immunsystem und im Verlauf von Entzündungen. Bei Leberzirrhose kommt es unter anderem zur Einschränkung der

Albuminsynthese und somit zum Hypoalbuminämie. Auch bei Unterernährung kann es zur Reduktion oder sogar zur Einstellung der Albuminproduktion kommen.

HSA wurde im zweiten Weltkrieg als Volumenersatzstoff eingeführt (Peters 1996) und wird bis heute bei Lebererkrankungen als periphere und zentralvenöse Infusion in den Konzentrationen von 5 %, 10 %, 20 % und 25 % verabreicht. Es wird in verschiedenen Bereichen der Medizin eingesetzt. Anwendung findet es bei Intensiv- und Verbrennungspatienten, in der Herzchirurgie, bei Lebertransplantationen und bei Leberersatztherapien.

Für die Produktion von Albumin als Arzneimittel muss es lager- und widerstandsfähig gemacht werden. Der Mechanismus der Konservierung beruht darauf, dass dem Albumin zwei Stabilisatoren hinzugefügt werden. Caprylat (CATE) und N-Acetyltryptophan (NAT) setzen sich an die Benzodiazepin-Bindungsstelle (Bindungsstelle II) des Albuminmoleküls (Kragh-Hansen 1991; Klammt et al. 2009). Damit kommt es zu einer Konformationsänderung des Moleküls, wie z.B. verbesserte Wärmebeständigkeit bis Temperaturen von 60 °C (Arakawa & Kita 2000). Beide Stabilisatoren können bei normaler Leberfunktion gut abgebaut werden. Bei Einschränkung der Entgiftungsleistung der Leber kommt es allerdings zur Anreicherung im Blut. Wie voran gegangene Studien belegen, können Caprylat und N-Acetyltryptophan selbst zu Komplikationen im Leberversagen beitragen und damit die Krankheit verstärken. Sowohl CATE als auch NAT sind in die Pathogenese des Leberkomas involviert (Mitkov 1988, Ono et al. 1978, Knell et al. 1974). CATE hat nicht nur einen schädigenden Effekt auf die Hämodynamik und Vasodilatation, sondern kann auch die Katecholaminwirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur hemmen (Kristev et al. 1992). Insbesondere besetzen beide Stabilisatoren Bindungsstellen des Albumins und tragen damit zu einer Verschärfung der Albumin-Toxin-Überladung bei der Infusion bei schweren Lebererkrankungen bei (Stange et al. 2011). Dies hat wiederum eine Einschränkung der eigentlichen Wirkung der Albumininfusion zufolge (Peters, 1996).

1.4.2 Caprylat (CATE)

Caprylsäure ist eine gesättigte mittelkettige Fettsäure (Octansäure). Caprylat wird zur Herstellung von Seifen, Farbstoffen, Fungiziden, natürlichen Insektiziden und antiseptischen Arzneimitteln verwendet.

Fettsäuren werden in der Leber synthetisiert und ihr Abbau erfolgt mittels β -Oxidation in den Mitochondrien. Fettsäuren werden aus Triglyceriden durch Lipasen freigesetzt. Lipasen sind hormonsensitiv, können Insulin hemmen und Adrenalin sowie Glucagon

aktivieren. Freigesetzte Fettsäuren werden ins Blut abgegeben und ans Albumin gebunden (Benzodiazepin-Bindungsstelle). Zellen, die Fettsäuren brauchen, nehmen sich diese aus dem Blut und speichern sie gebunden an Proteine. Zum Verbrauch werden diese dann durch CoA zu AcylCoA verestert. AcylCoA gelangt dann mit Hilfe von Carnitin in die Mitochondrien. Hier werden sie mittels β -Oxidation zu AcetylCoA abgebaut. Dieses AcetylCoA wird dann in den Citratzyklus eingespeist oder zu Ketokörpern verarbeitet. Diese sind wiederum wichtig für die Energiegewinnung des Gehirns (Glucoseersatz). Der Fettsäureabbau liefert sehr viel Energie für den Organismus (Rehm & Hammar 2001).

Wie schon erwähnt wird CATE als Stabilisator in der kommerziellen Herstellung von HSA eingesetzt und bindet an dessen Bindungsstelle II. Es wurde experimentell durch Ligandenbindung nachgewiesen, dass diese Bindungsstelle Medikamente binden kann (Ligand deplatziert Medikament). Der Warfarin-Ligand bindet an die Bindungsstelle I und der Indoles-and-Benzodiazepin-Ligand bindet an die Bindungsstelle II. Diese Liganden waren namensgebend für die Bindungsstellen des Albuminmoleküls (Noctor & Wainer 1992). Die Kinetik von Albumin zur Medikamentenbindung kann auch durch die Stopped-flow-Methode von Rietbrock und Laßmann ermittelt werden. Bei dieser Methode wird Dansylsarcosin als Modellligand eingesetzt. Die Bindung dieses Liganden an die Bindungsstelle II ist abhängig von der Konzentration der Fettsäuren. Die Bindung wird gehemmt, wenn Fettsäuren am Albumin gebunden sind. Mittelkettige Fettsäuren mit 10-12 C-Atomen zeigen die stärkste Hemmwirkung (Menke et al. 1989). Die Benzodiazepin-Bindungsstelle ist eine spezielle Region zur Bindung von endogenen Metaboliten, Hormonen und unterschiedlichen Medikamenten. Diese Bindungsstelle hat eine sehr starke Bindungskonstante für mittelkettige Fettsäuren wie CATE, die andere Substanzen von dieser Stelle deplatziert. Bei Lebererkrankungen und Leberversagen kommt es zur Beeinträchtigung des Fettsäure-Metabolismus. Dadurch wird der Abbau von CATE gestört und dessen Konzentration im Blut steigt an. In Untersuchungen wurde festgestellt, dass Patienten mit Leberzirrhose oder hepatischer Enzephalopathie eine drei- bis fünfzehnmal höhere CATE Konzentration erreichen können als gesunde Menschen (Rabinowitz et al. 1978; Klammt et al. 2009). Normalerweise hat CATE im gesunden Körper eine Halbwertszeit von 35 Sekunden (Rowley & Collins 1985). Umso schwerer die Lebererkrankung desto länger ist die Zeit bis zum Abbau. Spätere Forschungen zeigten, dass CATE einen schädigenden Effekt auf die Hämodynamik hat, also z.B. Vasodilatation mit konsekutiver Kreislaufverschlechterung verursacht. Dies geschieht durch die Hemmung der

Katecholaminwirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur und die Anregung des Prostaglandinstoffwechsels (Kristev et al. 1992).

In vorangegangenen Studien wurde nachgewiesen, dass CATE in die Pathogenese des Leberkomas involviert ist. Darunter fällt u.a. die Hemmung des Harnstoffzyklus in der Leber. Es kommt zur Hemmung der Synthese von Carbonylphosphat, die zur Störung der Ammoniakentgiftung führt. Dadurch wird die Pathophysiologie der hepatischen Enzephalopathie unterhalten (Mitkov 1988). Des Weiteren werden der Volumenkontrollmechanismus und die Na-K-ATPase der Astrozyten gestört (Olsen et al. 1989). Es folgt eine Steigerung des Abbaus verzweigtkettiger Aminosäuren und zur gesteigerten Proteolyse in der Skelettmuskulatur, sowie zur vermehrten Produktion von Ammoniak im Organismus (Mitkov 1993; Paul 1992; Paul & Adibi 1980; Vazques et al. 1988). CATE hat eine wesentliche Beteiligung an der Ausbildung des Hirnödems in Form von Glutamin als Produkt des CATE Abbaus (Blei 2000; Blei et al. 1994; Norenberg & Bender 1994). Es kommt zur Beschleunigung der Aufnahme aromatischer Aminosäuren und Tryptophan im Gehirn mit der Folge der Beförderung des Leberkomas (James et al. 1979; Strom et al. 1984).

1.4.3 N-Acetyltryptophan (NAT)

N-Acetyltryptophan wird in vivo rasch in Tryptophan umgewandelt und ist eine lipophile, aromatische und proteinogene α -Aminosäure (Endo 1980; Rose, Coon et al. 1955; Wegmann et al. 1979). NAT kann nicht im menschlichen Körper gebildet werden und muss mittels Nahrungsmittel aufgenommen werden. Es gehört demnach zu den essentiellen Aminosäuren. Es kommt u.a. in Sojabohnen, Cashew-Kernen, Kakaopulver, Haferflocken, Kuhmilch, Hühnerfleisch, Hühner- und Schweinefleisch vor. In diesen Stoffen kommt L-Tryptophan allerdings nur chemisch gebunden vor. Der Tagesbedarf eines gesunden Menschen beträgt zwischen 3,5 bis 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Kommerziell wird es in Arzneimitteln und Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt und vermarktet. Im menschlichen Körper ist Tryptophan am Aufbau von verschiedenen Proteinen oder Enzymen beteiligt und ist Vorläufer für verschiedene Botenstoffe wie Serotonin und Melatonin, sowie Provitamin für das Vitamin B₃ (Breyer & Walter 1991; Young & El-Khoury 1996; Radwanski & Last 1995). Die Plasma-halbwertszeit im menschlichen Organismus beträgt $2 \pm 0,1$ h, die allerdings bei Lebererkrankungen bis auf $4,7 \pm 0,4$ h ansteigt. Bei Patienten mit schweren Lebererkrankungen gilt Tryptophan als eine pathogene Substanz bei der Entstehung des Leberkomas (Ono et al. 1978; Knell et al. 1974). Der Tryptophan-Metabolit Oxindol

tritt bei Patienten mit gestörter Leberfunktion in höheren Konzentrationen auf. Er besitzt eine neurodepressive Wirkung und ist in der Zusammenwirkung mit neuronalen spannungsabhängigen Natriumkanälen Koma auslösend (Carpenedo et al. 1998; Mannaioni et al. 1999; Moroni et al. 1998). Die Wirkung von Tryptophan wird beim Leberversagen durch den ungebundenen Anteil verstärkt. Dieser Effekt tritt auf, weil der Tryptophanabbau in der Leber gestört und die Albuminkonzentration durch die Lebererkrankung im Blut gesunken sind. Das Tryptophan wird aus der Albuminbindung durch z.B. CATE oder endogene Gifte verdrängt, die in der Leber nicht ausreichend abgebaut wurden (Kragh-Hansen 1991; Tavares-Almeida et al. 1985). Durch den freien Anteil im Blut gelangt es ebenfalls verstärkt über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn. Hier sorgt es im Zusammenspiel mit anderen gleichfalls erhöhten aromatischen Aminosäuren für einen gestörten Haushalt der Catecholamine, Serotonine und ihrer Metaboliten (Borg et al. 1982). Die Folge ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen verschiedenen Neurotransmittern. Es kommt zu potentiellen Beeinträchtigungen des neuropsychiatrischen Zustandes und zunehmender Somnolenz bis hin zum Koma (Bergeron et al. 1991; Fernstrom & Wurtman 1972; Hartmann & Spinweber 1979).

1.4.4 Hepalbin-Adsorber

Der Hepalbin-Adsorber, ein Aktivkohlefilter, ist ein CE-zertifiziertes Medizinprodukt der Albutec GmbH Rostock (Abb. 2). Er kann die eben genannten Stabilisatoren durch eine



Abbildung 2: Hepalbin-Adsorber, Albutec GmbH

bettseitige Entfernung aus dem kommerziellen HSA herausfiltern und löst den Konflikt zwischen Stabilisationsnotwendigkeit und eingeschränkter Bindungseigenschaft. Bisher war eine unkomplizierte Deligandisierung zur Anwendung am Patienten nicht möglich, da insbesondere CATE

eine sehr starke Bindung mit Albumin eingeht. Es wurde durch die Bestimmung der Menge der entfernten Stabilisatoren und der Reduktion des molaren Verhältnisses von CATE und NAT zum Albumin eine signifikante Abreicherung nachgewiesen. Das heißt in einer 20 %igen HSA-Lösung fiel die Menge an CATE von 1600 µmol auf durchschnittlich 8,7 µmol. Die Menge an NAT fiel auf unter 10 µmol. Das Verhältnis CATE/ Albumin (mol/ mol) fiel von 5,3 auf 0,029 und das Verhältnis NAT/ Albumin von

5,3 auf unter 0,033. Die Messung der Albuminbindungskapazität ergab, dass die eingeschränkte Kapazität von 30-40 % in kommerziell erhältlichem HSA nach der Passage des Hepalbin-Adsorbers auf nahezu physiologische Werte (> 95 %) gesteigert werden konnte. Dies bedeutet eine Infusion von 1 g deligandisiertem Albumin hat eine vergleichbare Bindungsfähigkeit wie eine Infusion von 3 g herkömmlichen HSA. In Anbetracht der erheblichen, in der Literatur belegten, Nebenwirkungen von CATE und NAT bei Patienten mit Lebererkrankungen und ebenfalls belegten Bioverträglichkeiten des Produktes stellt nach der medizinischen Risiko/Nutzen-Analyse das Medizinprodukt einen erheblichen Vorteil in der Behandlung von Patienten mit Lebererkrankungen dar (Albutec GmbH 2007).

1.5 Hepatozyten

Hepatozyten sind Leberepithelzellen, die zirka 70 % des Lebervolumens einnehmen. Ihre Subklonierungskriterien sind unter anderem eine starke Kontaktinhibition des Wachstums, eine hohe Produktionsrate für verschiedene Proteine und auch die Fähigkeit in glucosedefizienten Medium zu wachsen. Die C3A Zelllinie ist gut differenziert. Sie weist viele phäno- und genotypische Eigenschaften der normalen Leberzelle auf und besitzt viele Funktionen, die für normale humane Hepatozyten typisch sind. In Kultur sezernieren die Zellen wichtige Plasmaproteine wie z.B. Albumin, Transferrin oder Haptoglobin. Ebenfalls sind sie in der Lage Glykogen zu bilden, wenn genügend Glucose im Zellkulturmedium vorhanden ist. Das heißt sie sind fähig zur Gluconeogenese, was eine der wichtigsten leberspezifischen Stoffwechselfunktionen ist (Knowles et al. 1980). In Ihrer Wachstumsphase vor dem Konfluieren verhalten sie sich sehr ähnlich dem sich regenerierenden Lebergewebe. Sobald sie konfluent sind wird das Wachstum durch Kontaktinhibition limitiert und die Verdopplungszeit der Zellen steigt an. In dieser Phase entsprechen sie dem adulten Phänotyp. Es kommt zur Verminderung der Zellneubildungsrate und die Zelle widmet sich der Synthese von Stoffen (Haubner 2010). Die HepG2 / C3A Zelllinie ist wegen ihrer leberspezifischen Differenzierung bereits als Bestandteil eines künstlichen Leberunterstützungsverfahrens zur Therapie des Leberversagens erprobt (Sussman et al. 1994). In pharmakologischen und toxikologischen Studien ist sie eine etablierte und oft genutzte Zelllinie (Dehn et al. 2004). Aus all diesen Gründen wurde dieser Zelllinie für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Vorrang gegeben. Die hier bestimmten Parameter, wie der Aktivierungsgrad des Cytochrom P450 Systems, die Proliferationsrate, ebenso die Vitalität und Zellviabilität, sollen den Einfluss und den

Unterschied vom stabilisatorbeladenen Albumin und dem gereinigten Albumin auf die Hepatozyten in vitro zeigen. Durch die gute Differenzierung dieser HepG2 / C3A Zelllinie könnten die Wirkungen in vitro Aufschlüsse auf das Verhalten in vivo geben. Die Leber besteht zu rund 60 bis 70 % aus Hepatozyten und zu ca. 30 bis 40 % aus Zellen unterschiedlicher Herkunft, beispielsweise Gallengangepithelzellen, Fibroblasten, Kupffer-Zellen, sinusoidalen Endothelzellen, lebereigenen natürliche Killerzellen und hepatischen Sternzellen (hepatic stellate cells, HSCs).

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Ein Verfahren, das einen kompletten Leberersatz darstellt, existiert bis dato nicht. Es stehen Systeme zur Verfügung mit denen eine teilweise Entgiftung erzielt werden kann, um die Leber in ihrer Funktion zu unterstützen. Extrakorporale Leberersatzverfahren können lediglich die therapeutische Lücke in der Behandlung des akuten Leberversagens schließen, nicht aber den völligen Ersatz der Leber gewährleisten.

Albumin stellt in der Leberersatztherapie eine wichtige Rolle dar. Es ist in vielen verschiedenen Dialyseverfahren dafür zuständig Toxine im Patientenplasma heraus zu transportieren. Die darin enthaltenen Stabilisatoren könnten im Widerspruch zu den eigentlich positiven Effekten des Plasmaersatzmittels Albumin stehen. Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Verfahren zur Entfernung der Stabilisatoren mittels Hepalbin-Adsorber. Aufgrund der bestehenden Bedeutung von Albumin sollen die möglichen Interaktionen und die biologische Wirkung zwischen herkömmlichem Albumin und stabilisator-abgereichertem Albumin (deligandisiert) in vitro an einer humanen Leberzelllinie charakterisiert werden. Dabei sollen die schädigenden Effekte bzw. Eigenschaften der Stabilisatoren im HSA hervorgehoben werden. Die Ergebnisse dieser Interaktionsanalysen könnten dann bei Leberersatztherapien mit der Verwendung von deligandisiertem Albumin, bei der Entwicklung von neuen Dialysetherapien bzw. bei der Verbesserung von schon angewandter Leberersatztherapien Berücksichtigung finden. Außerdem könnten neue Einsatzmöglichkeiten, wie z.B. in der Zellkultur, für Albumin erschlossen werden. Des Weiteren sollen bereits ermittelte Forschungsergebnisse bestätigt oder gegeben falls korrigiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Testsubstanzen

In dieser Arbeit soll die Wirkung der Stabilisatoren CATE und NAT im kommerziell erhältlichen HSA getestet werden. Die Ausgangslösung hat eine Albuminkonzentration von 20 % und eine Konzentration der Stabilisatoren um die 20 mmol/l. Diese wurde mit eigens angesetzttem Kulturmedium auf die Konzentrationen von 10 %; 7,5 %; 5 % und 2,5 % verdünnt. Die entsprechenden Konzentrationen der Stabilisatoren wurden durch Gaschromatographie in unserem Labor ermittelt. Des Weiteren wurden Tests mit CATE und NAT in Reinsubstanz durchgeführt. Die 5; 3,75; 2,5, 1,25 und 0,6 mmol/l CATE bzw. NAT wurden in 5 % deligandisiertem Albumin aufgelöst. In der Konzentration 0 mmol/l spiegelt sich reines deligandisiertes Albumin wider. Um die Stabilisatoren dem Albumin bzw. Plasma hinzufügen zu können, musste es zuerst in Lösung gebracht werden. Beide Stoffe standen in Pulverform zur Verfügung und konnten mittels Natronlauge (NaOH) gelöst werden, nachfolgend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Essigsäure wieder auf einen neutralen Wert von 7,4 eingestellt. Die Stammlösung beider Stabilisatoren wurde zur Aufbereitung der einzelnen Arbeitslösungen verwendet (Tab. 1). Die Arbeitslösungen enthielten neben der Stammlösung (Lösung 1) auch 20 %-iges deligandisiertes Albumin (Lösung 2), Kulturmedium mit 10 % FKS (Fetales Kälberserum; Lösung 3) und Natriumchlorid (Lösung 4). Die genaue Zusammensetzung wird in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Herstellung der Stammlösung und Arbeitslösung beider Stabilisatoren

Lösung	Konzentration	CATE Molekulargewicht: 166,2g/l	NAT Molekulargewicht: 246,26 g/l
Stammlösung	20 mmol/l	3,32 mg/ml Volumen= 60 ml	4,93 mg/ml Volumen= 60 ml
Arbeitslösung	5 mmol/l	2,5 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 - Lösung 4	2,5 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 - Lösung 4
	3,75 mmol/l	1,875 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 0,625 ml Lösung 4	1,875 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 0,625 ml Lösung 4

	2,5 mmol/l	1,25 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 1,25 ml Lösung 4	1,25 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 1,25 ml Lösung 4
	1,25 mmol/l	0,625 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 1,875 ml Lösung 4	0,625 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 1,875 ml Lösung 4
	0,6 mmol/l	0,3125 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 2,1875 ml Lösung 4	0,3125 ml Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 2,1875 ml Lösung 4
	0 mmol	- Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 2,5 ml Lösung 4	- Lösung 1 2,5 ml Lösung 2 5 ml Lösung 3 2,5 ml Lösung 4

Das deligandisierte Albumin wurde in allen Versuchsansätzen mitgetestet. Die Herstellung dieses Albumins erfolgt mittels Hepalbin-Adsorber, durch den die Stabilisatoren herausgefiltert werden.

Am oberen Anschluss des Adsorbers wird ein Infusionsschlauch, am unteren ein Partikelfilter angeschlossen (Abb. 3 A). Anschließend wird das gesamte System mit NaCl gespült. Nach dem Spülvorgang wird die Albuminlösung langsam über den Infusionsschlauch über den Absorber gegeben.

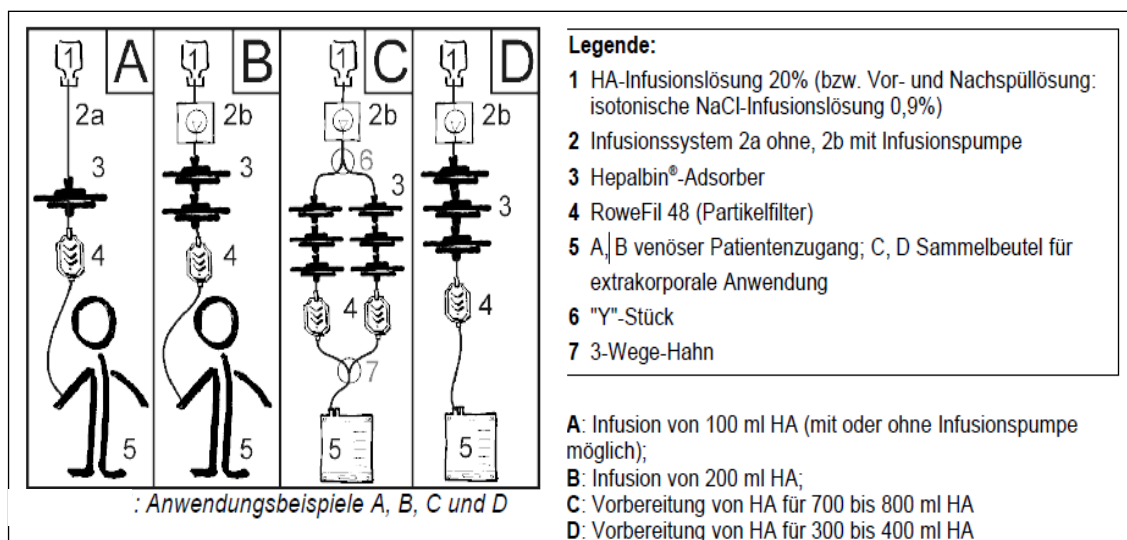


Abbildung 3: Aufbauanleitung des Hepalbin-Adsorbers zur Deligandisierung von HSA

Das deligandisierte Albumin kann anschließend abgefangen werden. Für die Herstellung von 100 ml HSA ist ein Hepalbin-Adsorber in der Nutzung durch freien Fall ausreichend. Wenn größere Mengen aufgetrennt werden sollen, müssen mehrere Hepalbin-Adsorber verwendet werden (Abb. 1 C). Um den Auftrennungsfluss zu gewährleisten muss dabei eine Infusionspumpe verwendet werden.

Um die getesteten Konzentrationen von beiden Albuminen zu erreichen, wurden diese mit Zellkulturmedium verdünnt. Um den Einfluss von FKS im Test ausschließen zu können, wurde eine vergleichende Testreihe mit und ohne FKS durchgeführt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die permanente humane Hepatozyten-Zelllinie in allen Testansätzen verwendet. Es handelt sich um Leberepithelzellen, die an vielen Stoffwechselvorgängen beteiligt sind und wichtige Funktionen im Organismus besitzen. Zu diesen gehören u.a. die Entgiftung mit zahlreichen Umwandlungsreaktionen, die Synthese von Fettsäuren und Gallensäure, sowie die Proteinsynthese. Im Speziellen wurde die Hepatoblastom-Zelllinie HepG2/C3A, Subklon der humanen Hepatoblastom-Zelllinie Hep/G2 verwendet. Diese sind gut differenziert und besitzen viele phäno- und genotypische Eigenschaften der normalen Leberzellen.

Zur Testung der Stabilisatoren CATE und NAT im Einzelnen wurde die permanente Zelllinie L929 (Mausfibroblasten) ebenfalls verwendet. Die Fibroblasten stammen aus normalen areolaren und adipotischen Geweben einer männlichen C3H/An Maus. Es handelt sich um bewegliche, im Bindegewebe vorkommende Zellen mesenchymaler Herkunft. Fibroblasten werden nach der Reifung zu Fibrozyten und sind dann unbeweglich. Sie sind u.a. für die Synthese der Interzellularsubstanz (extrazellulärer Matrix) verantwortlich, produzieren Kollagen und stellen ein sensibles in vitro-Testsystem für Bioverträglichkeitsprüfungen und Toxizitätstests dar.

2.2.2 Kultivierung

Die HepG2/C3A-Zellen wurden in einem eigens angesetzten Kulturmedium im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, 60 % Luftfeuchtigkeit) in Zellkulturflaschen und 24-Well-Platten kultiviert. Das Kulturmedium besteht aus Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM) mit 10 % oder 15 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Glutamin-Lösung (200 mM) und 1 % Antibiotika-/Antimykotika-Lösung (Penicillin G (10.000 IE/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)). Zur Revitalisierung wurden die Hepatozyten in das beschriebene Kulturmedium überführt und nach Zellzählung mit Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip) mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in eine 25 T Zellkulturflasche (10 ml Volumen) ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h, danach im Rhythmus Montag – Mittwoch – Freitag. Wurde eine Konfluenz von etwa 80 – 90 % erreicht, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mehrmals mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) gespült und die Zellen anschließend durch Zugabe von Trypsin EDTA (1,25 mg/ml) abgelöst. Darauf folgend wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml neu ausgesät.

Die L929-Zellen wurden mit 2×10^5 Zellen/ml eingesät und im selben Rhythmus wie die Hepatozyten kultiviert, ausschließlich das Kulturmedium wurde nur mit 5 % FKS substituiert. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In den folgenden beschriebenen Experimenten haben die verwendeten Zellen die Passage 10 nicht überschritten.

2.2.3 Testvorbereitung / -ablauf

Die 10 %-igen, 15 %-igen Hepatozyten und die Fibroblasten wurden 14 Tage nach Revitalisierung in bestimmten Konzentrationen in 24-Well-Platten zum Testansatz eingesät. Zur Stimulation der 15 %-igen Hepatozyten wurde bereits 7 Tage nach der Revitalisierung 3-Methylcholanthren (3-MC) beim Mediumwechsel und Passagieren dem Medium in einer Konzentration von 2,68 mg/ml (10 μ mol/l) zugesetzt. Die Induktion mit 3-MC (stark krebserregender polyzyklischer aromatischer Kohlenstoff) soll eine Erhöhung der CYP 1A2 Aktivität bewirken. Bei Hepatozyten kann durch diese Stimulation das P450 System über das 40-fache des Ausgangswertes gesteigert werden (Donato et al. 1993).

Für den jeweiligen Testansatz wurden drei 24-Well-Platten mit Hepatozyten vorbereitet. Bei den Testansätzen mit den Fibroblasten waren nur zwei 24-Well-Platten Testgrundlage (Tab. 2).

Tabelle 2: Beschreibung Testablauf

24-Well-Platte	Test	Hepatozyten	Fibroblasten
Platte 1	Zellzahl & Vitalität XTT (direkt)	10 % HepG2/C3A	5 % L929
Platte 2	LDH Live / Dead	10 % HepG2/C3A	5 % L929
Platte 3	Ethoxyresorufin	15 % HepG2/C3A (vorstimuliert)	nicht getestet

2.2.4 Testdurchführung

Nach der Einsaat der Zellen in die entsprechende 24-Well-Platte erfolgte am dritten Tag ein Reagenzwechsel. Am sechsten Tag wurden die jeweiligen Tests durchgeführt. Der detaillierte Testablauf wird in Tabelle 3 beschrieben. Für alle Testreihen wurden jeweils drei Ansätze an hintereinander folgenden Tagen angefertigt. Somit erfolgten pro Testreihe jeweils drei Durchführungen pro Testmethode unter annähernd selben Bedingungen.

Tabelle 3: Testablauf

<u>HepG2/C3A</u> mit 10 % Kulturmedium	<u>HepG2/C3A</u> mit 15 % Kulturmedium	<u>Fibroblasten L929</u> mit 5 % Kulturmedium
Tag 1 ➤ Zellkulturflaschen HepG2/C3A 10 % und 15 %, sowie L929 aus Brutschrank ➤ altes Kulturmedium absaugen ➤ Zellrasen mit PBS waschen und PBS wieder absaugen (eventuell mehrmals waschen) ➤ Zellrasen mit Trypsin-EDTA 1x (1,25mg/ml) gleichmäßig überschichten ➤ Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit), ca. 10 min ➤ Zellkulturflaschen aus Brutschrank → Abklopfen der Zellen (Shake-off-Verfahren) ➤ Enzymreaktion durch Zugabe von entsprechendem Kulturmedium (> 4 ml) stoppen ➤ Überführung der Zellsuspension in ein entsprechendes BlueCap ➤ Zentrifugation: 152 g , 5 min, RT ➤ Überstand absaugen ➤ Zellpellet mit entsprechendem Kulturmedium resuspendieren ➤ Zellzahl- & Vitalitätsbestimmung, 1:8 Verdünnung mit PBS und Trypanblau		

Aussaat der 10 %-igen HepG2/C3A Zellen in eine 24-Well-Zellkulturplatte 500.000 Zellen in 250 µl/Well → $2,0 \times 10^6$/ml	Aussaat der 15 %-igen vor-stimulierten HepG2/C3A Zellen in eine 24-Well-Zellkulturplatte 500.000 Zellen in 500 µl/Well → $1,0 \times 10^6$/ml	Aussaat der 5 %-igen L929 Zellen in eine 24-Well-Zellkulturplatte 100.000 Zellen in 250 µl/Well → $1,0 \times 10^5$/ml
Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit 4 h Adhäsion Zugabe von Testsubstanz	Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit 24 h	Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit 4 h Adhäsion Zugabe von Testsubstanz
<u>Tag 2 / Tag 3</u> Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit	<u>Tag 2 / Tag 3</u> tgl. Mediumwechsel - Medium absaugen - Zugabe von 500µl 15 % Kulturmedium mit 3-MC (5,36 mg/l = 20µmol/l)	<u>Tag 2 / Tag 3</u> Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit
<u>Tag 4</u> • Überstand absaugen • 2x mit PBS spülen • Zugabe der Testsubstanz		<u>Tag 4 - Test</u> • <u>Platte 1</u> - Zellzahl/ Vitalität - XTT direkt • <u>Platte 2</u> - LDH - Live/ Dead
<u>Tag 5 / Tag 6</u> Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit		-
<u>Tag 7</u> • <u>Platte 1</u> - Zellzahl/ Vitalität - XTT direkt • <u>Platte 2</u> - LDH - Live/ Dead	<u>Tag 7</u> • <u>Platte 3</u> - Metabolisierung von Ethoxyresorufin	-

2.2.5 Tests

2.2.5.1 Bestimmung der Zellproliferation und Vitalität - Trypanblau

Trypanblau dient zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität. Tote und absterbende Zellen haben keine intakte Zellwand mehr, so dass der Farbstoff in das Zytoplasma eindringen kann. Diese Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau (Belinsky et al. 1984).

Der Überstand der Zellen wurde pro Well in ein BlueCap überführt. Jedes Well wurde daraufhin zweimal mit PBS gespült und immer in das jeweilige BlueCap überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl Trypsin pro Well mit anschließender Inkubation (37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit, ca. 10 min). Die abgelösten Zellen wurden ebenfalls in das dazugehörige BlueCap überführt. Um auch alle Zellen übertragen zu können, wurde jedes Well nochmals mit PBS gespült. Alle BlueCaps wurden für 5 min bei 153 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit Zellkulturmedium resuspendiert. Bei weniger Zellvolumen wurde eine 1:2 Verdünnung (25 µl Zellsuspension + 25 µl Trypanblau) angefertigt. Bei Höherem war die Verdünnung 1:8 (25 µl Zellsuspension + 75 µl PBS + 100 µl Trypanblau). Das Trypanblau sollte nicht zu lange auf die Zellen wirken, da dieser Stoff bei zu langem Einwirken auch intakte Zellen schädigt. Anschließend wurden in den vier Abschnitten des C-Chips alle lebenden und toten Zellen gezählt. Um die Gesamtzellzahl pro Well zu bestimmen, wird die Anzahl der vitalen Zellen (Mittelwert aus allen vier Zählkammern) mit dem Faktor 10⁴ multipliziert und diesen Wert wiederum mit dem Faktor der Verdünnung. Dieses Ergebnis zeigt die Gesamtzellzahl pro Milliliter lebender Zellen. Die Vitalität (%) der Zellen berechnet sich aus dem Quotienten von Lebendzellzahl und Gesamtzellzahl (lebende + tote Zellen).

2.2.5.2 Stoffwechselaktivierung – XTT Bestimmung

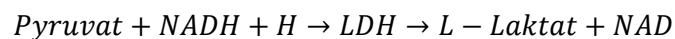
Der XTT Assay ist eine photometrische Nachweismethode für die Zellviabilität (Analyse der allgemeinen Stoffwechselaktivität). Es ist eine nichtradioaktive Quantifizierung der Zellproliferation und –lebensfähigkeit. Bei diesem Test reduzieren metabolisch aktive Zellen proportional durch mitochondriale Dehydrogenase das gelbe Tetrazoliumsalz XTT (Natrium-3'-(1-(Phenyl-aminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium)-bis (4-Methoxy-6-Nitro)), welches den Zellen hinzugegeben wird, zu orangefarbenen wasserlöslichen Formazan-Salz um. Es ist wasserlöslich und kann mit einem Photometer quantifiziert werden.

Nach der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurden 2 x 100 µl (Doppelbestimmung) der Zellsuspension in eine transparente 96-Well-Platte pipettiert. Entsprechend der Kit-

Anleitung wurden 100 µl XTT Reagenz (bestehend aus XTT labeling reagent und electron-coupling reagent im Verhältnis 50:1) dazugegeben. Unmittelbar nach der Inkubation (1 h, 37°C, 5 % CO₂, absolute Luftfeuchtigkeit) erfolgte die spektrophotometrische Messung am Photometer bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm und einer Absorptionswellenlänge von 450 nm. Die Absorptionswerte sind proportional der Konzentration des Formazanproduktes. Da die Umwandlung bei toten Zellen durch ihre inaktiven Mitochondrien nicht stattfindet, ist der gemessene Wert gleich der Stoffwechselaktivität der lebenden Zellen. Umso mehr aktive vitale Zellen, desto höher der gemessene Wert.

2.2.5.3 Lactat-Dehydrogenase

Die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ein weiterer Proliferations- und Vitalitätstest. LDH ist ein hochmolekulares, tetrameres Zellenzym, welches eine große Bedeutung für den Intermediärstoffwechsel der Zellen hat. Es hat eine wichtige Rolle im anaeroben Stoffwechsel der Zelle. Es ist ein stabiles, im Zytoplasma aller Zellen vorkommendes Enzym, das bei Zellschädigung schnell ins Kulturmedium übergeht. Es kommt in so gut wie allen Zellen vor, besonders hohe Konzentrationen kommen in der Leber, im Herz, Skelettmuskel, Niere und in Erythrozyten vor. Im Blut ist verhältnismäßig wenig LDH zu finden. Kommt es jedoch zur Zellschädigung oder Apoptose, steigt der LDH Spiegel an. Dieser Wert korreliert mit vielen Erkrankungen und ist daher ein guter Nachweis dafür. Es katalysiert je nach pH-Wert die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat (und umgekehrt), als Coenzym dient dabei NADH (bzw. NAD).



Der Nachweis beruht auf der Schädigung der Zellen, in der die Integrität der Zellmembran verloren geht. So wird die Membran permeabel für große Moleküle und LDH wird extrazellulär freigesetzt.

Am Testtag wurden 200 µl Zellkulturüberstand in spezielle Mikrotubes pipettiert. Die LDH Bestimmung erfolgte methodisch als kinetisch-optischer Test nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC). Die Bestimmungen wurden am EDV-gestützten Analysenautomaten (Cobas Mira, Roche Diagnostics) spektralphotometrisch bei 340 nm durchgeführt, wobei der Verbrauch des Coenzym NADH + H⁺ als Maß für die LDH Aktivität gilt.

2.2.5.4 Live Dead Färbung

Die Live Dead Färbung ist eine stimulante Identifizierung lebender und toter Zellen durch Fluoreszenz Marker (Calcein-AM & Ethidium Homodimer-1), die verschiedene Parameter der Zellvitalität erkennen, wie die intrazelluläre Esterase-Aktivität oder die Integrität der Plasmamembran (Dehn et al. 2004). Das nicht-fluoreszierende Zellwandpermeable Esterasesubstrat Calcein-AM (Calcein-Aceton-Methylester) diffundiert durch die Zellmembran und wird im Zytoplasma enzymatisch zu fluoreszierendem Calcein umgesetzt. Dieses bildet mit Ionen Chelate, die die Zelle nicht passieren können. Die Esteraseaktivität ist nur in aktiven Zellen vorhanden. Aus diesem Grund zeigen nur lebende vitale Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine grüne Fluoreszenz. Der rot-fluoreszierende Farbstoff Ethidium Homodimer-1 kann nur in Zellen eindringen und sich an die zelluläre DNA anlagern, welche eine beschädigte Zellmembran haben (Dong et al. 2001).

Am Testtag wurde der Überstand der Wells abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Zugabe der Live Dead Reagenz. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C, 5 % CO₂ und absoluter Luftfeuchtigkeit. Danach konnten die entsprechenden Floreszenzen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop differenziert und fotografisch dokumentiert werden.

2.2.5.5 Cytochrom P450 System – CYP 1A2 mit Ethoxyresorufin

Die Cytochrom P450 Familie besteht aus mikrosomalen Hämoproteinen, die für den oxidativen, peroxidativen und reduktiven Stoffwechsel einer Vielzahl von endogenen Stoffen, sowie für den Abbau von Fremdstoffen (Pharmaka, Medikamente) eine zentrale Bedeutung haben. Hämoproteine kommen in Mitochondrien sowie im endoplasmatischen Retikulum vor. Der in dieser Arbeit verwendete Test ist eine Methode zur Bestimmung der CYP 1A2-Aktivität. Die Funktion von Cytochrom P450 Isoenzym 1A2 liegt hauptsächlich im Fremdstoffmetabolismus (Umwelt- und Nahrungsgifte, Medikamente) (Kelly & Sussman 2000; Sauer et al. 2012).

Am Testtag wurde der Überstand der Zellen abgesaugt und ein Gemisch aus einer Ethoxyresorufin-/Dicumarol-Lösung im Volumen von 500 µl auf die Zellen pipettiert. Die Zellen inkubierten für 1 h bei 37°C, 5 % CO₂ und absoluter Luftfeuchtigkeit. In dieser Zeit wird ein Teil des Ethoxyresorufin von den Zellen zu Resorufin umgewandelt. Das Dicumarol soll weitere Verstoffwechslungen des Resorufin verhindern (Sauer et al. 2012). Nach der Inkubation wurden 2 x 75 µl pro Well (Doppelbestimmung) abgenommen und in eine schwarze 96-Well-Platte übertragen. Es erfolgte die Zugabe von 15 µl/Well einer Glucuronidase/Arylsulfatase- und Natrium-Acetat-Puffer-Lösung.

Diese Lösung soll eventuell gebildete Resorufin-konjugate hydrolisieren (Sauer et al. 2012). Die 96-Well-Platte inkubierte schüttelnd (600 U/min) für weitere 3 h bei 37°C. Nach Ablauf der Zeit wurden 200 µl Ethanol (absolut) pro Well hinzugegeben. Dieses stoppt die Reaktion der Lösungen. Vor der Messung wurden die Standards, die aus Resorufin und der Glucuronidase/Arylsulfatase-Natrium-Acetat-Puffer-Lösung sowie Ethanol bestehen, pipettiert. Die Standards werden zur Berechnung der Resorufin-Standard-Kurve (Leerprobe, 10 – 20 – 40 und 80 pmol) benötigt. Durch die Darstellung der Standardwerte in einem Diagramm kann mit Hilfe der Gleichung einer linearen Regressions-Gerade die Resorufinwerte der Zellen berechnet werden.

2.2.5.6 Cytochrom P450 System – CYP 3A4 mit Verapamil

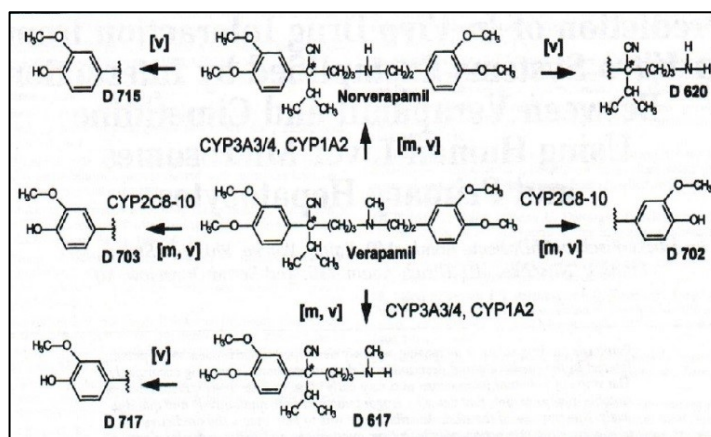


Abbildung 4: Metabolismus von Verapamil

Zur besseren Erkenntnis des Cytochrom P450 Systems wurde der Ethoxyresorufintest mit dem Wirkstoff Verapamil durchgeführt. Es sollen eventuelle Fluoreszenzstörungen eingegrenzt werden und als zweite Methode für die Aktivität des Cytochrom P450 Systems, speziell für das

Subenzym CYP 3A4 dienen. Verapamil (Verapamilhydrochlorid) ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der Kalzium-antagonisten oder Kalzium-kanalblocker. Es wirkt gefäß-erweiternd und im AV-Knoten des Herzens leistungsverzögernd. Verapamil wird über das Cytochrom P450 System metabolisiert (Abb. 4), welches der Leber hilft Arzneimittel und Umweltgifte abzubauen (Fischer 1997). Mittels Flüssigchromatographie (HPLC) ist es möglich sehr niedrige Konzentrationen von Verapamil und dessen Metaboliten zu bestimmen. Diese Testdurchführung erfolgte genau wie in Kapitel 2.2. (Tab. 3) für den Ethoxyresorufintest beschrieben. Der einzige Unterschied liegt in der Zugabe von 75 µmol/l Verapamil zu jeder Testsubstanz. Am Testtag wurde der Überstand abgenommen, aus welchem alle Verapamilmetaboliten durch das Dr. Magarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology in Stuttgart bestimmt wurden. Anschließend erfolgte der in Kapitel 2.2.5.4 beschriebene Ethoxyresorufintest. Es wurden alle weiteren Tests ebenfalls durchgeführt um eventuelle Einflüsse des Verapamils auf die Zellen ausschließen zu können.

2.2.5.7 Bionasensor

Der Bionasensor ist ein zellbasierter markierungsfreier real-time Assay zum Monitoring physiologischer Parameter von Zelllinien und Primärzellen. Das Analysegerät ermittelt die respiratorische und glykolytische Aktivität sowie morphologische Charakteristika von lebenden Zellen kontinuierlich über definierte Zeiträume. Zeitkurven der Sauerstoffaufnahme, Protonenabgaberraten und der Zellimpedanz (Adhäsion, Proliferation, Membranintegrität) geben Auskunft über den physiologischen Status von Zellen (Bionas GmbH, Rostock).

Die Versuche wurden mit HepG2/C3A Zellen durchgeführt, welche mit einem Volumen von 2×10^6 Zellen/ml auf den Bionas Chips ausgesät wurden. Es folgt eine Inkubation von 1 h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und absoluter Luftfeuchtigkeit, um eine gewisse Adhärenz zu gewährleisten. Anschließend wird der Chip mit Zellkulturmedium aufgefüllt und es folgte eine weitere Inkubation von 24 h. Es wurde DMEM ohne Natrium-Bicarbonat verwendet. Das Medium (50 g) wird in 1 l sterilem Wasser gelöst und muss vor Anwendung pH neutralisiert (pH-Wert 7,4) werden. Neben den zu testenden Substanzen (10 % und 5 % HSA, 10 % deligandisiertes Albumin) wird das genannte Kulturmedium mit 1 % Antibiotikum und 0,1 % FKS immer als Kontrolle parallel mit getestet. Das benötigte Volumen der Reagenzien erschließt sich aus der Dauer der Tests und der Addierung des vier minütigen Mediumwechsels. Sowohl das Standard Albumin (20 %) als auch das deligandisierte Albumin (20 %) wurden mit Kulturmedium auf die jeweilige Konzentration verdünnt.

Nach dem Desinfizieren mit 70 %-igen Ethanol und PBS wurden beide Chips mit Kontrollmedium gespeist. Nach zirka 2 h wurde eine der Kanülen in die jeweilige Testsubstanz gesteckt. Dieser Vorlauf erlaubt eine definierte Zeitangabe, ab wann die Wirkung des Albumins auf die Zellen beginnt. Nach Ablauf der 72 h Testzeit wurden die Zellen mit 0,2 % Triton 100 x abgetötet. Dies lässt alle Messwerte absinken und zeigt nochmals eine Reaktion der Zellen.

Die Auswertung der Messdaten erfolgt am Computer und kann in Excel graphisch dargestellt werden.

2.3 Gaschromatographie

Mittels Gaschromatographie konnten die genauen Konzentrationen von CATE bestimmt werden. Es ist eine sehr empfindliche Methode zur chromatographischen Auftrennung und Analyse von Stoffmengen. Es ist sogar möglich minimale Stoffmengen von bis zu 10^{-9} zu messen. Die komplexesten Stoffmengen lassen sich in

ihre einzelnen Komponenten aufspalten (Oehme 1996). Im einfachsten Fall erfolgt dies ausschließlich aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der Einzelsubstanzen. Es ergibt sich die Auftrennung in alle einzelnen chemischen Verbindungen. Grundbedingung für dieses Verfahren ist allerdings, dass der zu trennende Stoff entweder schon gasförmig ist oder sich unzersetzt verdampfen lässt. Die Probe wird von einem Trägergas durch eine kapillarartige Säule transportiert. Die Komponenten der Probe verweilen je nach Polarität und Dampfdruck der einzelnen Gasmoleküle unterschiedlich lange an der stationären Phase der Säule. Ein Detektor misst den Austrittszeitpunkt am Säulenende. Bei polaren Trennsäulen werden Alkohole, Ester und Ketone mit gleichen Siedepunkten festgehalten. Es erfolgt eine spezielle Wechselwirkung (Gleichgewicht zwischen Gasphase und stationärer Phase), die als Raoult'sches Gesetz gilt. Je höher der Partialdampfdruck einer Substanz nach dem R. Gesetz, d.h. je länger sich die Substanz in der Gasphase befindet, desto kürzer wird die Retentionszeit (Zeit von Injektor bis zum Detektor) (Oehme 1996).

Die zu bestimmenden Proben (Bestimmungsvolumen von 100 µl) werden zusammen mit 20 µl eines inneren Standards, 20 µl Chlorwasserstoff und 70 µl EtAC/n-Hexan in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Danach wird das Gemisch in einem Schüttler 2 min geschüttelt und anschließend 2 min bei 20.900 g (14.000 U/min) zentrifugiert. Aufgrund dieses Verfahrens trennt sich die organische Phase vom Gemisch und setzt sich an der Oberfläche ab. Anschließend wird diese in ein speziell für den Gaschromatographen geeignetes Glasröhrchen mit Microeinsatz überführt und gemessen. Die Trägersäule wird nach jeder Probe mit Isopropanol gespült. Die Auswertung der gemessenen Stoffkonzentrationen erfolgt am Computer.

2.4 Dialyse und Patientenplasmen

Um die Reaktion des Plasmas von kranken Menschen und die darin enthaltenen Toxinen in vitro zu testen, wurde Patientenplasma in die Zellkulturversuche mit einbezogen und auf HepG2/C3A Zellen getestet. Das Plasma wurde Patienten entnommen, welche an einer Studie teilnahmen, in der eine neu orientierte Dialysetherapie (Rezirkulation) mit deligandisiertem Albumin getestet wurde. Das Plasma wurde sowohl in der Kontrollgruppe (MARS Dialyse) abgenommen, als auch bei den Patienten der Testgruppe (Rezirkulation). Um den toxischen Grad der Patientenplasmen zu erkennen, wurden diese in der Zellkultur eingesetzt. Es wurden mehrere Toxin-Konzentrationen (Bsp. Bilirubin oder Caprylat) in den Plasmen bestimmt, welche in die Auswertung der hier durchgeführten Tests mit einfließen.

Die Abnahme erfolgte vor und nach der Behandlung am Patienten direkt in der Klinik. Das Plasma wurde abgenommen und in Eppendorfgefäße eingefroren. Alle Testansätze wurden wie in Kapitel Zellkultur (2.2) angefertigt. Das Patientenplasma wurde mit einem Volumen von 250 µl pro Well auf die Zellen pipettiert. Die Zellen inkubierten anschließend für 3 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ und absoluter Luftfeuchtigkeit. An Tag 3 erfolgte ein Reagenzwechsel. Das Plasma wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und abschließend Zellkulturmedium (10 % FKS) hinzugefügt. Darauf folgend wurden die Zellen weitere 3 Tage inkubiert. Am Tag 6 wurden die einzelnen Tests durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3).

2.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Statistikprogramms SigmaPlot 11 der Firma Systat Software GmbH.

Da alle Testreihen an verschiedenen Tagen mit zeitlich unterschiedlich revitalisierten Zellen durchgeführt wurden und somit die Schwankungen zwischen den einzelnen Tagen doch etwas zu hoch schienen, erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe eines gepaarten Statistiktest. Es standen zwei Tests zur Verfügung, je nachdem ob die Werte eine Normalverteilung aufwiesen, wurde entweder der paired t-test angewandt oder bei fehlgeschlagenen Normalitätstest der Wilcoxon Signed Rank Test. Die graphische Darstellung erfolgte über SigmaPlot. Bei einer Normalverteilung und angewandtem paired t-test wurden die Werte mit Mittelwerten und Standardabweichungen im Box Plot dargestellt. Bei einem fehlgeschlagenen Normalitätstests und dem darauf folgenden Wilcoxon Test wurden die Daten mit der Standardabweichung als Vertical Bar Chart graphisch dargestellt. Alle statistischen Signifikanzen wurden in allen Graphen angegeben.

3 Ergebnisse

Die ermittelten Ergebnisse werden im folgenden Kapitel in die einzelnen betrachteten Parameter untergliedert. Es wurden nur die Hauptgrafiken dargestellt. Die Ergebnisse der LDH-, XTT- und Resorufinmessung wurden immer auf die Zellzahlen berechnet, um den eigentlichen Wert pro Zelle zu ermitteln. Die Ergebnisse pro Zelle werden hier im Ergebnissteil dargelegt. Zum besseren Verständnis der Auswertungen sind im Anhang weitere Grafiken zur Betrachtung aufgeführt, welche alle weiteren Ergebnisse grafisch darstellen. In den einzelnen Abschnitten des folgenden Kapitels werden alle Erkenntnisse beschrieben, welche anschließend in dem Kapitel Diskussion ausführlich erläutert und diskutiert werden

3.1 Hepatozyten Zelllinie HepG2 C3A

3.1.1 Einfluss von FKS und Heparin

Die Auswertungen der Testdaten, welche in den Grafiken im Anhang Kapitel 7.5.1 in den Abbildungen 33 bis 37 dargelegt werden, ergaben weitestgehend keine statistischen Signifikanzen zwischen den Mediumkontrollen DMEM und FKS. Einzige statistische Unterschiede wurden in der Vitalität bei A 5 festgestellt. Auffällig ist, dass die Streuung der Daten zwischen beiden Medienkontrollen schwankt. Dennoch sind die Unterschiede nicht ausschlaggebend genug.

Die Ergebnisse der Testreihe, in der Plasma mit und ohne Heparin getestet wurde, werden im Kapitel 7.5.2 im Anhang in den Abbildungen 38 bis 41 graphisch dargestellt. Es zeigten sich lediglich bei 5 mmol/l CATE eine Signifikanz zwischen beiden Substanzen. Die anderen Reagenzien wiesen keine Unterschiede auf.

3.1.2 Bestimmung der Zellproliferation und –vitalität

3.1.2.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durch Trypanblau

3.1.2.1.1 Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5

Die Zellzahlen des 10 und 5 %-igen Albumin Vergleichs zeigen eindeutige Signifikanzen zwischen dem Standard HSA und dem deligandisierten Albumin (Abb.

5 A). Sowohl A 10 (MW 2,4⁺⁵), als auch A 5 (MW 3,4⁺⁵) weisen weniger Zellen als DA 10 (MW 8,6⁺⁵) und DA 5 (MW 8,3⁺⁵) auf.

Im Vergleich zu den Kontrollen DMEM (MW 8,8⁺⁵) und FKS (MW 8,5⁺⁵) zeigen sich bei A ähnliche Verhältnisse wie zu DA. Beide Konzentrationen des Standard Albumins weisen signifikant kleinere Zellzahlen als die Kontrollen auf, wohingegen die Werte von beiden DA Konzentrationen sich im selben Zahlenspektrum befinden und somit signifikant gleich den Kontrollen sind (Anhang Kapitel 7.5.3 Abb. 42).

Die Berechnung der Zellvitalität ergab ebenfalls einen Unterschied zwischen beiden getesteten Albuminen. Es ergibt sich eine signifikant niedrigere Vitalität bei A 10 (MW 80) und A 5 (MW 79) im Vergleich zu beiden DA (MW 91, 92) (Abb. 5 B). In den

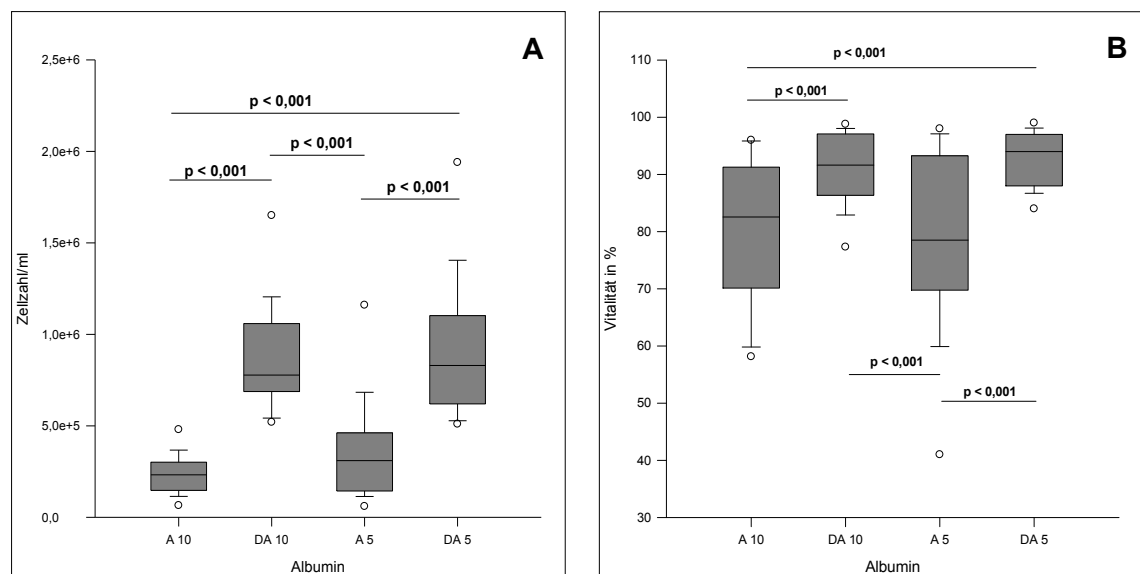


Abbildung 5: Alle Messergebnisse und statistische Signifikanzen der Zellzahlbestimmung (A), sowie die berechnete Vitalität (B) beider Albumine. (n=18)

Vitalitätsunterschieden hinsichtlich der Mediumkontrollen erwiesen sich nur statistische Unterschiede zwischen dem Standard Albumin und beiden Kontrollen (FKS MW 90, DMEM MW 91). Die Zellen des deligandisierten Albumins hatten gleich gute Vitalitäten wie die Zellen der Kontrollen. Nur die Schwankungen der einzelnen Werte waren bei DA etwas höher. Die genauen Signifikanzen der Albumine zu den Mediumkontrollen zeigen sich im Anhang Kapitel 7.5.3 in Abbildung 43.

3.1.2.1.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

In diesem Kapitel sollen die Unterschiede in einzelnen CATE und NAT Konzentrationen gezeigt werden (Abb. 6). Jeder Stabilisator wird im Einzelnen betrachtet. Es werden unterschiedliche Konzentrationen beider Stabilisatoren miteinander und mit reinem 5 %igen DA (0 mmol/l) verglichen.

In den Zellzahlen wird deutlich, dass es zwischen den einzelnen Konzentrationen 5; 3,75; 2,5 und 1,25 mmol/l CATE keine signifikanten Unterschiede gibt. Die Mittelwerte schwanken nur minimal. Unter den vier größeren NAT Konzentrationen ist 5 mmol statistisch größer als 3,75 und 1,25. Zur 0,6 mmol und 0 mmol weisen alle anderen Konzentrationen beider Stoffe signifikant kleinere Zellzahlen auf. Auch zwischen 0,6 und 0 mmol ergibt sich bei NAT ein kennzeichnender Unterschied. Weiterhin wird deutlich, dass es zwischen 1,25 und 0,6 mmol zu einen großen Sprung in den Werten kommt. Die größten Zellzahlen weist eindeutig das deligandisierte Albumin auf (Abb. 6)

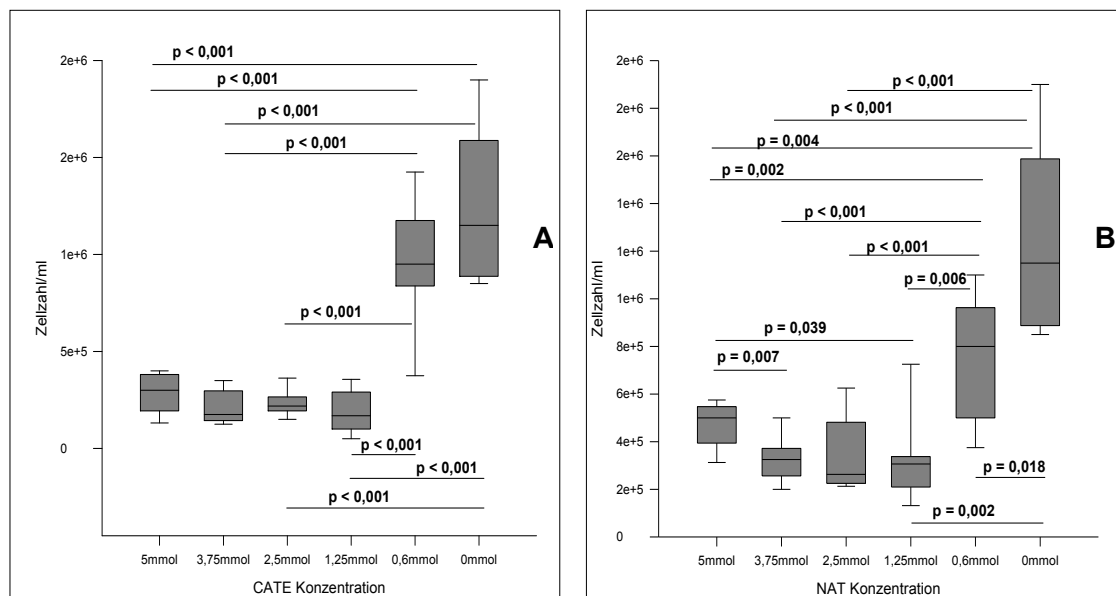


Abbildung 6: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich untereinander. (n=9)

Betrachtet man die Unterschiede von CATE zu beiden Mediumkontrollen, ergaben sich bei allen Konzentrationen statistisch kleinere Ergebnisse zu den Kontrollen. Zu 0,6 und 0 mmol hingegen waren die Mediumkontrollen kleiner. In den einzelnen NAT Konzentrationen ergaben sich etwas andere Signifikanzen.

Es wurden bei den Konzentrationen 3,75 und 1,25 mmol NAT deutlich niedrigere Zellzahlen gemessen als bei der DMEM Kontrolle. Nur 2,5 mmol wies auf eine signifikant kleinere Zellzahl zum FKS Medium hin. Die 0,6 mmol NAT schien ähnliche Zellzahlen wie die Kontrollen aufzuweisen, 0 mmol hingegen hatte definitiv höhere Werte als beide Medien (Abb. 63 und 64 im Anhang Kapitel 7.5.4).

Hinsichtlich der Vitalität der Zellen lässt sich bei CATE eindeutig feststellen, dass die Zellen ohne Stabilisator auch die höchste Vitalität aufweisen. Alle anderen Konzentrationen sind signifikant geringer (Abb. 7 A). Bei NAT verhält es sich ähnlich. Die

0,6 mmol Konzentration hat die geringste Vitalität. Alle anderen mit Ausnahme von 5 mmol sind signifikant geringer als das Albumin ohne NAT (Abb. 7 B).

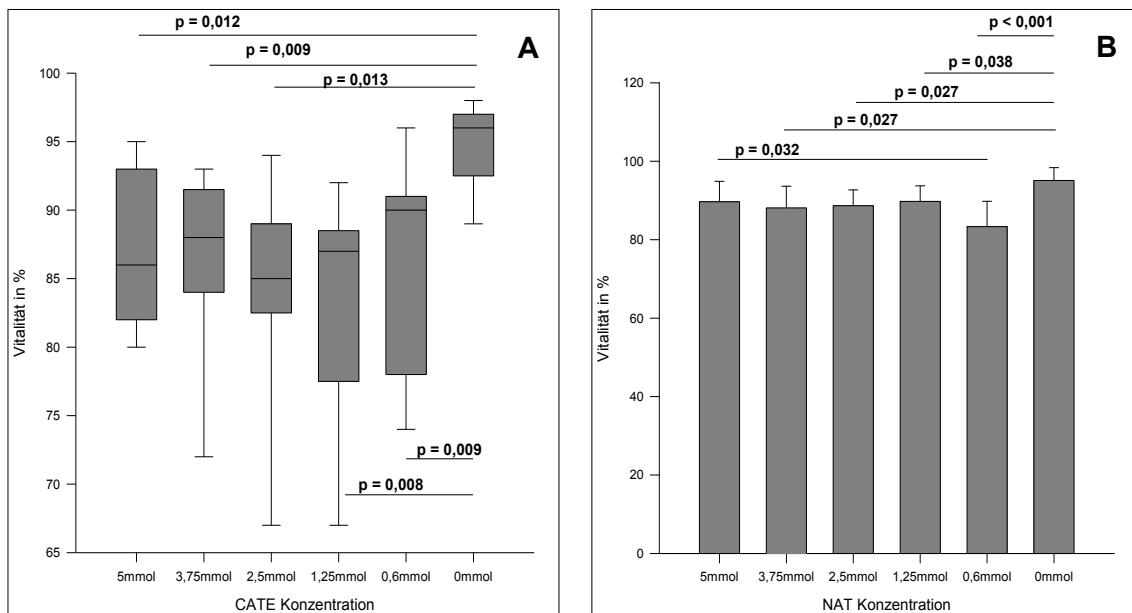


Abbildung 7: Vitalitätsbestimmung der einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen in 5 % Albumin. Dargestellt werden alle Werte und dazugehörige Signifikanzen. (n=9)

Statistische Unterschiede zwischen FKS Kontrolle und CATE wurden nur zu 1,25 und 0 mmol nachgewiesen. Zur Konzentration 1,25 mmol hatte FKS eine höhere Vitalität, zum deligandisierten Albumin eine geringere. Auch bei NAT hatte das DA (0 mmol) die höchste Vitalität und somit als einzige Konzentration einen signifikanten Unterschied zur FKS Kontrolle. Die anderen Konzentrationen beider Stabilisatoren hatten eine kleinere Vitalität als die DMEM Kontrolle. Die Grafiken zum Vergleich mit den Mediumkontrollen befinden sich im Anhang Kapitel 7.5.4 (Abb. 65 und 66).

3.1.2.1.3 Vergleich von verschiedenen Albuminkonzentrationen

Um die Auswirkung vom FKS auf das Wachstum der Zellen einschätzen zu können, wurden verschiedene Konzentrationen vom Standard Albumin getestet. Der Anteil des Zellkulturmediums mit FKS wurde im Anteil immer höher, je kleiner die Konzentration vom Albumin war. Diese Konzentrationen wurden mit DA 10 und DA 5 sowie den Mediumkontrollen verglichen. Es zeigte sich, dass trotz mehr FKS Medium Anteil die Zellzahlen beim Standard HSA kleiner waren als bei DA. Von den Albuminkonzentrationen 10 % (MW 3,9⁺⁵) und 5 % (MW 7⁺⁵) waren die Zellzahlen signifikant kleiner als beim deligandisierten Albumin (MW DA = 10 7,6⁺⁵; DA 5 = 8⁺⁵). In Abbildung 8 kann man erkennen, dass die Zellzahlen auch bei der 2,5 % Albuminkonzentration (MW 7,1⁺⁵) kleiner sind, nur statistisch konnte der Unterschied

nicht nachgewiesen werden. Auffällig zwischen den einzelnen Albuminkonzentrationen ist, dass der höchste Sprung zwischen 7,5 % (MW $4,9^{+5}$) und 5 % (MW $7,1^{+5}$) liegt (Abb. 8). Hinsichtlich der Mediumkontrollen wird erkennbar, dass alle HSA Konzentrationen signifikant geringere Zellzahlen aufweisen als das FKS Medium (MW $1,2^{+6}$). DMEM (MW $5,2^{+5}$) zeigt jedoch ähnliche Zellzahlen (Anhang Kapitel 7.5.4 Abb. 82).

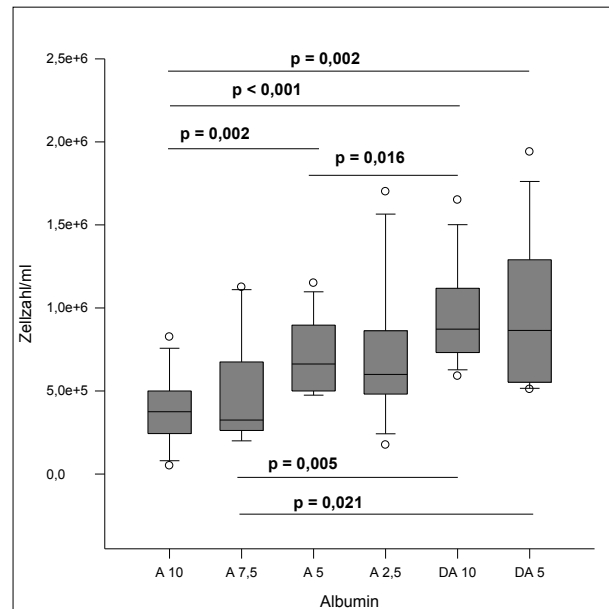


Abbildung 8: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der unterschiedlichen Albuminkonzentrationen im Vergleich mit DA 10 und DA 5. (n=12)

Was die Vitalität der Zellen angeht, werden die Unterschiede zwischen A (MW 83, 82, 89, 81) und DA (MW 94, 94) noch deutlicher. Hier zeigen sich statistische Signifikanzen zwischen allen Standard Albumin Konzentrationen und dem Deligandisierten. Außer A 5, welches nur signifikant kleiner zu DA 10 ist, sind die Zelle aller anderen Konzentrationen trotz mehr FKS Anteil in ihrer Vitalität niedriger (Abbildung 9). Nicht nur zwischen beiden Albuminen gibt es statistische Unterschiede, auch innerhalb des Standard HSA. Die Vitalität der Zellen schwankt mal höher mal niedriger zwischen den einzelnen Albuminkonzentrationen (Abbildung 9). Betrachtet man die HSA Konzentrationen zu den Mediumkontrollen (MW FKS 91, DMEM 92), so haben alle außer A 5 signifikant schlechtere Vitalitäten. Die dazugehörigen Ergebnisse und Signifikanzen werden im Anhang Kapitel 7.5.5 in Abbildung 83 grafisch dargestellt.

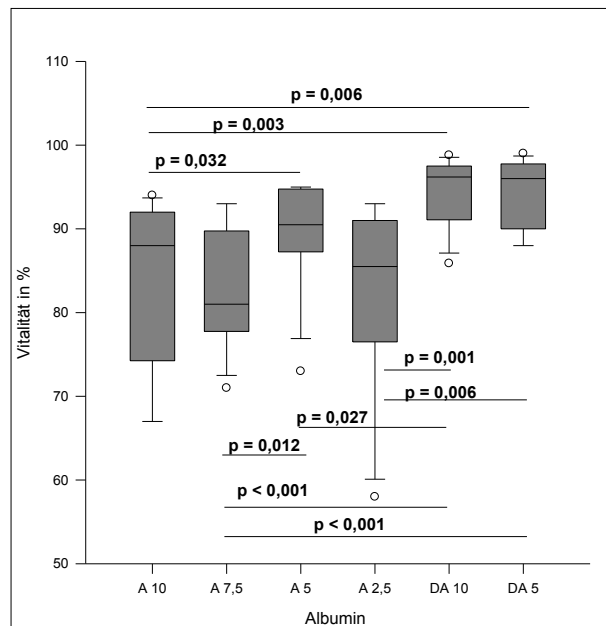


Abbildung 9: Alle Vitalitäten zwischen den verschiedenen Albuminkonzentrationen und deligandisierten Albumin mit entsprechenden Signifikanzen. (n=12)

3.1.2.1.4 Vergleich von Plasma und Albumin mit und ohne CATE

Weiterhin wurde Gesundplasma mit dem Stabilisator CATE getestet und im Vergleich zu deligandisierten Albumin gesetzt. In den ermittelten Zellzahlen spiegeln sich schon vorangegangene Ergebnisse wieder. Betrachtet man nur die Plasmaproben, so erkennt man einen Anstieg der Zellzahlen je weniger CATE im Plasma enthalten ist. Der größte signifikante Unterschied zeigt sich zwischen P 10 (MW $1,9^{+5}$) und P 5 (MW $5,6^{+5}$). Die Zellzahlen von DA 10 (MW $7,4^{+5}$) und DA 5 (MW $8,4^{+5}$) sind zu P 10 und P 5 signifikant größer, allerdings nicht zum Plasma ohne CATE (MW $6,8^{+5}$). Zwar hat DA 5 die höchsten Zellzahlen, dennoch zeigen sich zu beiden DA und P 0 keine statistische Signifikanten (Abb. 10).

In der Abbildung 85 im Anhang Kapitel 7.5.6 werden alle Ergebnisse und dazugehörigen Signifikanzen zur Zellzahlbestimmung vom Plasma in Bezug auf CATE 5 (5% Albumin mit 5 mmol CATE) und den Mediumkontrollen dargestellt. Es zeigt sich das P 10 annähernd gleiche Zellzahlen aufweist wie CATE 5. Des Weiteren sind sowohl P 5 als auch P 0 signifikant größer als CATE 5, auch wenn P 0 die höchsten Zellzahlen aufweist. Hinsichtlich der Mediumkontrollen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen P 10 und beiden Kontrollen, P 10 hat deutlich weniger Zellzahlen. Die DMEM Kontrolle hat deutlich geringere Zellzahlen als das FKS, somit liegt es auf demselben Wertespektrum wie P 5. Es gibt statistische Signifikanzen zwischen P 5 und FKS, sowie zwischen P 0 und DMEM.

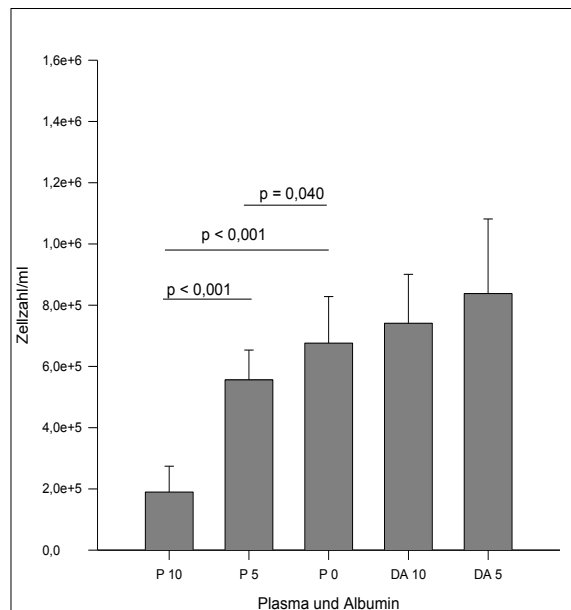


Abbildung 10: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung vom Plasma und deligandisiertem Albumin zueinander. (n=9)

In den Vitalitäten erkennt man andere Unterschiede als bei den Zellzahlen und den vorangegangenen Testreihen. Zeigen sich in den Zellzahlen die Konzentrationen von CATE im Plasma doch sehr negativ, ist dies in der Vitalität anders. In Abbildung 11 ist erkennbar, dass beide DA (MW DA 10 = 87 %, DA 5 = 90 %) doch etwas schlechter in der Vitalität sind als das Plasma (MW P 10 = 94 %, P 5 = 95 %, P 0 = 95 %). Diese scheint auch unabhängig von der CATE Konzentration zu sein. In Bezug auf CATE 5 zeigen sich die Plasmen ebenfalls signifikant besser. Nur allein das DMEM Medium hat signifikant höhere Vitalitätswerte. Hinsichtlich der FKS Kontrolle zeigen sich keine Unterschiede (Anhang Kapitel 7.5.6 Abb. 89).

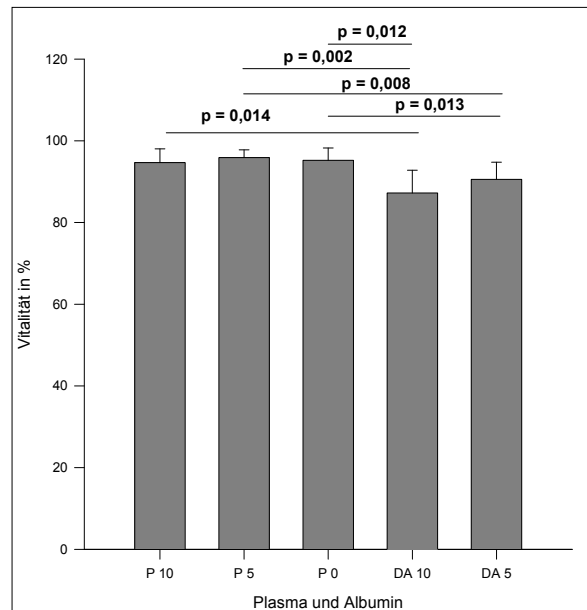


Abbildung 11: Alle Werte zur Vitalitätsbestimmung für Plasma im Vergleich zu deligandisierten Albumin und zugehörige Signifikanzen. (n=9)

3.1.2.2 Stoffwechselaktivierung – XTT Bestimmung

3.1.2.2.1 Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5

Prüft man die Daten der XTT Messung nach der Berechnung pro Zelle, werden die eigentlichen Unterschiede erkennbar. Im Gegensatz zu den Messwerten (Anhang, Kapitel 7.5.3, Abb. 44), wird jetzt deutlich, dass das DA 10 (MW $1,61^{-6}$) und DA 5 (MW $1,45^{-6}$) pro Zelle eine geringere Zellaktivität aufweist als A 10 (MW $2,85^{-6}$) und A 5 (MW $2,47^{-6}$) (Abb. 12).

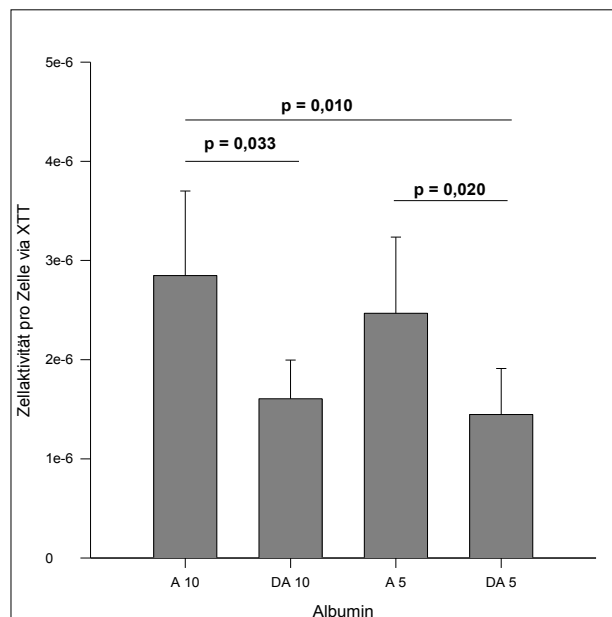


Abbildung 12: Dargestellt werden die aus den XTT Messwerten und Zellzahl berechneten Ergebnisse der Zellaktivität pro Zelle. (n=6)

Im Vergleich mit den Mediumkontrollen ergeben sich dieselben Unterschiede. Es zeigt sich das Standard Albumin mit den höchsten XTT Werten pro Zelle. Wohingegen das deligandisierte Albumin als auch die Kontrollen in der Zellaktivität annähernd gleich sind, aber in Bezug auf das Standard Albumin sehr viel niedriger. Die Ergebnisse mit den dazugehörigen Diagrammen für die errechneten Werte pro Zelle, als auch die Rohdaten finden sich im Anhang Kapitel 7.5.3 Abbildung 45 und 46.

3.1.2.2.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

Bei beiden Stabilisatoren (Abb. 13) wird deutlich, dass 0 mmol die niedrigsten Werte aufweist. Signifikant ist dieser Unterschied allerdings nur zu 1,25 und 3,75 mmol bei CATE und zu 0,6 mmol bei NAT. In den anderen Konzentrationen gibt es einige Unterschiede zwischen CATE und NAT. Weist die 5 mmol Konzentration bei CATE höhere Zellaktivitäten auf als bei 0 mmol, so sind die Werte bei NAT sehr ähnlich. Bei CATE sind 3,75 und 1,25 mmol am höchsten, bei NAT die 2,5 und 0,6 mmol. Auch zeigen sich bei NAT kennzeichnende Unterschiede zwischen 5 mmol und 3,75 sowie 2,5 mmol. Bei CATE hingegen sind keine statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen messbar.

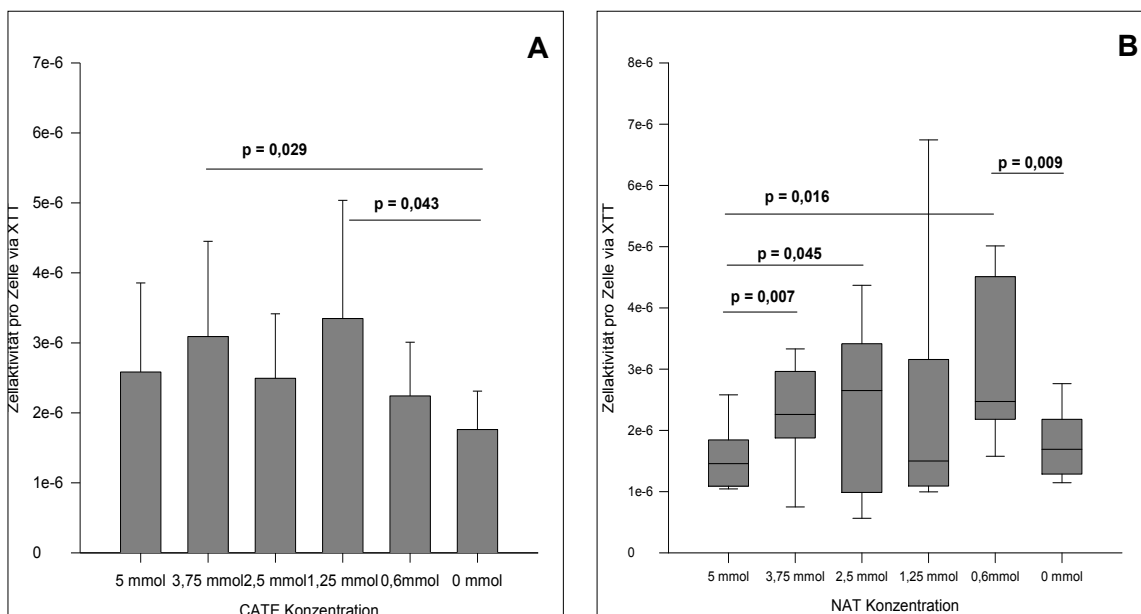


Abbildung 13: Alle berechneten Zellaktivitäten der CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen pro Zelle im Vergleich zum deligandisierten Albumin (0 mmol). (n=9)

Im Vergleich CATE und NAT zu den Mediumkontrollen sind die CATE Konzentrationen 3,75; 2,5 und 1,25 mmol signifikant größer als die DMEM Kontrolle. Die 3,75 mmol zeigt dies ebenfalls zu FKS. Das Wertespektrum hat sich deutlich erhöht und die Schwankungen zwischen den einzelnen Werten sind gestiegen. Dennoch liegt die Aktivität der Kontrollen niedriger und im selben Bereich wie das deligandisierte

Albumin. Bei den NAT Konzentrationen waren die Werte bei 5 mmol am niedrigsten. Dies spiegelte sich auch in den kleineren Werten zu den Mediumkontrollen wieder. Signifikanzen zeigten sich nur zwischen 2,5 mmol und dem FKS Medium (siehe Anhang Kapitel 7.5.4 Abb. 68 bis 71).

3.1.2.2.3 Vergleich von verschiedenen Albuminkonzentrationen

Bei der Auswertung der Aktivitätswerte pro Zelle für die verschiedenen Albuminkonzentrationen entsteht ein ähnliches Bild wie bei den bereits gezeigten Ergebnissen der anderen Testreihen. Die Werte des deligandisierten Albumins sind sehr viel niedriger als die des Standard HSA. Es wird klar, dass mit sinkender Albuminkonzentration die Zellaktivität ebenfalls sinkt.

Im Vergleich der einzelnen Konzentrationen des Standard Albumins mit den Mediumkontrollen sind die Ergebnisse ähnlich. Die Werte der Mediumkontrollen sind nach der Berechnung pro Zelle annähernd gleich oder kleiner als die von A, aber gleich zu DA (Anhang, Abb. 84 und 85).

3.1.2.2.4 Vergleich von Plasma und Albumin mit und ohne CATE

Auch die Testreihe der Plasmaanalyse zeigt pro Zelle, dass DA 10 und DA 5 die am niedrigsten Zellaktivitäten haben. DA 10 (MW $1,65^{-6}$) hat signifikant kleinere Werte als P 10 (MW $3,5^{-6}$) und P 5 (MW $2,9^{-6}$). DA 5 (MW $1,3^{-6}$) ist deutlich kleiner zu allen Plasmen. Unter den einzelnen Plasmaproben wird deutlich, dass mit sinkendem CATE Anteil auch die Zellaktivität sinkt. Zwischen P 5 und P 0 (MW $2,23^{-6}$) ist dies auch durch eine statistische Signifikanz verdeutlicht. Alle Messwerte und berechneten Zellaktivitäten werden in der Abbildung 90 im Anhang Kapitel 7.5.6 dargestellt.

Im Vergleich mit CATE 5 zeigen sich keine statistischen Unterschiede. Die Mittelwerte bewegen sich in einem ähnlichen Bereich. P 10 zeigt höhere Werte als alle anderen und hat mit CATE 5 die höchsten Schwankungen. Auch die Zellaktivitäten der Mediumkontrollen zeigen eine Signifikanz von P 10 zum FKS, wobei P 10 die höchsten Werte aufweist. P 5 und P 0 liegen mit ihren Werten höher als die FKS Kontrolle, dennoch zeigen sich keine weiteren Signifikanzen (Anhang Kapitel 7.5.6, Abb. 91 und 92).

3.1.2.3 Freisetzung von LDH

3.1.2.3.1 Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5

Die durch die Messwerte (siehe Anhang, Abb. 47) errechneten Ergebnisse des LDH Gehaltes pro Zelle ergaben, dass A 10 (MW $1,21^{-3}$) und A 5 (MW $1,26^{-3}$) signifikant höhere LDH Freisetzungen verursachen als DA 10 (MW $1,6^{-4}$) und DA 5 (MW $2,69^{-3}$).

Die größten Schwankungen der Werte wurden bei A 10 und A 5 beobachtet. Die statistischen Unterschiede sind klar erkennbar (Abb. 14).

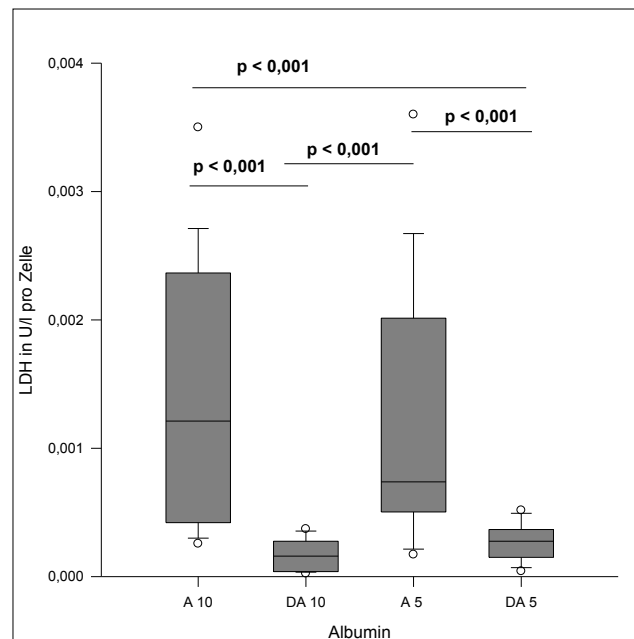


Abbildung 14: Alle Ergebnisse der LDH Freisetzung pro Zelle und errechneten Signifikanzen der zu vergleichenden Albumine. (n=18)

Die Unterschiede zu den Mediumkontrollen sind deutlich größer. Die Kontrollen (MW FKS=3,41⁻⁴; DMEM=3,94⁻⁴) wiesen annähernd ähnliche LDH Werte auf wie DA 5, DA 10 hat hingegen signifikant geringere als die beide Kontrollen. Im Gegensatz hierzu ergaben sich bei A 10 als auch A 5 eine sehr viel höhere LDH Freisetzung als bei den Mediumkontrollen (Signifikanzen Abb. 48 und 49, Anhang).

3.1.2.3.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

Auch die LDH Freisetzung für die einzelnen Stabilisatoren wurden pro Zelle berechnet (Messwerte im Anhang Abb. 72) und die statistischen Unterschiede ermittelt. Es wird deutlich, dass bei 0 mmol die geringsten Werte gemessen wurden und dies auch signifikant zu allen anderen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (Abb. 15). Wobei die 0,6 mmol Konzentration zu allen anderen nur bei CATE (Abb. 15 A) signifikant viel kleiner ist. Bei NAT wies sie nur zu 1,25 mmol einen statistischen Unterschied auf. Beim Stabilisator NAT sind die Schwankungen innerhalb der einzelnen Konzentrationen etwas höher (Abb. 15 B).

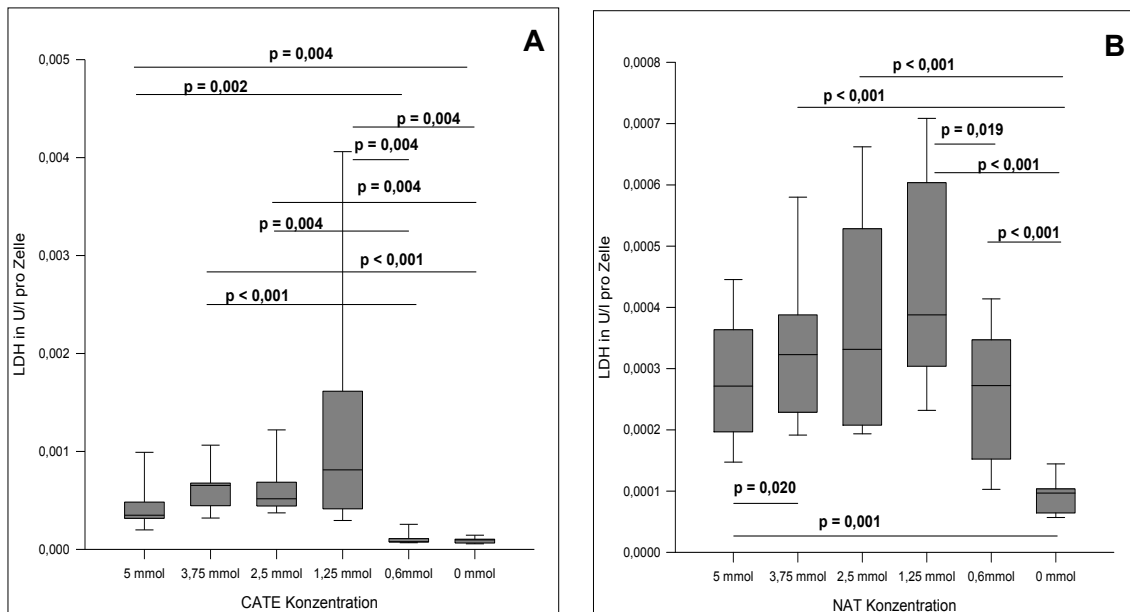


Abbildung 15: Alle errechneten Ergebnisse der LDH Freisetzung pro Zelle für alle CATE (A) und NAT (B) Konzentration im Vergleich zu 0 mmol (deligandisiertes Albumin). Es sind alle statistischen Unterschiede gekennzeichnet. (n=9)

Betrachtet man die errechneten LDH Werte pro Zelle der Mediumkontrollen sind erheblich weniger Unterschiede zu erkennen. Bei CATE ist eine Signifikanz zwischen der FKS Kontrolle zu den Konzentrationen 5 und 0 mmol zu verzeichnen. Das DMEM Medium ist nur statistisch größer zu 0,6 und 0 mmol. Die 1,25 mmol Konzentrationen beider Stoffe machen eine Ausnahme und haben etwas höhere Werte als die Kontrollen. Beim Stabilisator NAT sind die Ergebnisse der FKS Kontrolle signifikant höher als bei 5; 3,75; 2,5 und 0 mmol. Zu DMEM gibt es statistische Unterschiede zu 5; 0,6 und 0 mmol. (Anhang Kapitel 7.5.4, Abb. 73 bis 76)

3.1.2.3.3 Vergleich von Plasma und Albumin mit und ohne CATE

Die Werte von P 10 (MW 4,29⁻⁴) waren signifikant am höchsten. Durch die hohe Standardabweichung konnte allerdings zu DA 10 (MW 2,27⁻⁴) und DA 5 (MW 2,98⁻⁴) keine Signifikanz kenntlich gemacht werden. Diese zeigten sich jedoch zu P 5 (MW 1,12⁻⁴) und P 0 (MW 8,51⁻⁵). Aber hier sind die beiden DA höher als P 5 und P 0 (Abb. 93 im Anhang Kapitel 7.5.6).

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Plasmaproben und CATE 5 so wird deutlich, dass P 10 gleich CATE 5 ist und beide größer sind als P 5 und P 0. Wobei allerdings nur CATE 5 eine Signifikanz gegenüber diesen beiden aufweist. Im Vergleich zu den Mediumkontrollen erkennt man die Ähnlichkeit der Werte von P 10 und FKS. Beide sind signifikant größer als P 5 und P 0. Die Ergebnisse von DMEM sind am höchsten und statistisch größer zu allen Plasmen (Anhang, Abb. 94 und 95).

3.1.2.4 Live Dead Färbung

3.1.2.4.1 Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5

Die Ergebnisse der Live Dead Färbung erlaubte einen optischen Einblick in die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung. Es konnten die vorangegangenen Messergebnisse verdeutlicht und nochmals untermauert werden.

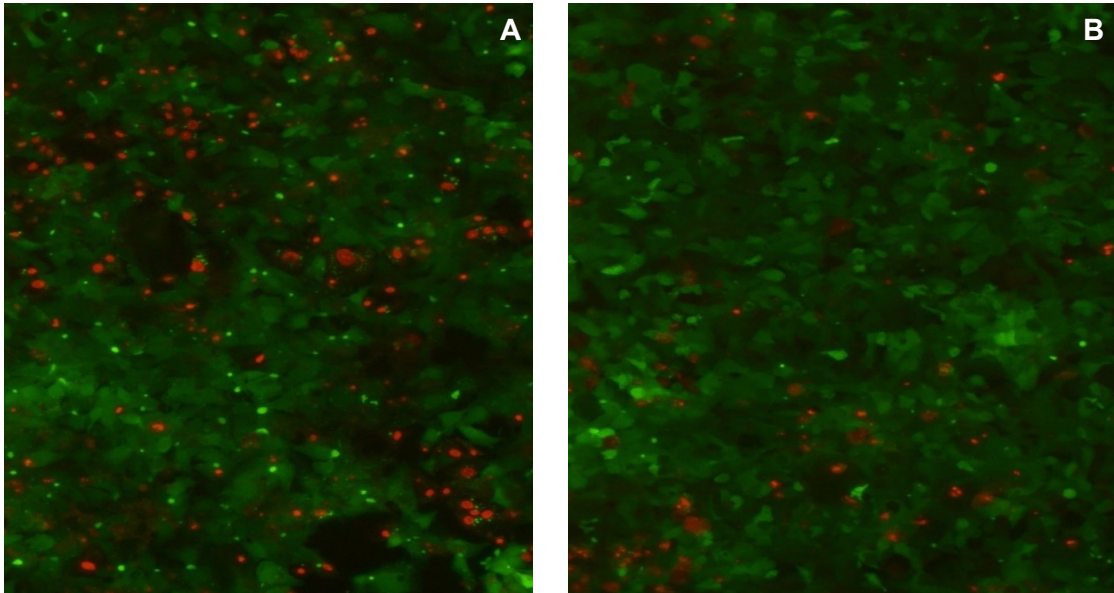


Abbildung 16: 5 % Standard Albumin mit beiden Stabilisatoren (A); 5 % deligandisiertes Albumin (B); Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung: 20-fach

Es wird ebenfalls ein Unterschied zwischen dem herkömmlichen Standard HSA und dem deligandisierten HSA erkannt. In A 5 (Abb. 16 A, Anhang 105 A) sind weniger Zellen und durchaus mehr tote (rote Zellen) im Gegensatz zu DA (Abb. 16 B, Anhang 105 B). Durch die erhöhte Zelldichte bei DA und FKS ist natürlich auf die toten Zellen zu achten. Da die Zellzahlen von DA und FKS sehr viel höher sind als die Zellzahlen des Standard Albumins und es optisch mehr tote Zellen zu sein scheinen, muss bei der Auswertung der toten Zellen immer die Gesamtzellzahl einbezogen werden, um die Relation der Auswirkung betrachten zu können. Somit sind es in der Berechnung zur Zelldichte dennoch im Gesamtbild weniger tote Zellen bei DA als bei A.

3.1.2.4.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

In der Färbung der Zellen der 5 mmol CATE und NAT Konzentration kann man ebenfalls Unterschiede zum deligandisierten Albumin (Abb. 16 B) feststellen. Auch hier werden deutlich mehr tote Zellen wahrgenommen (Abb. 17).

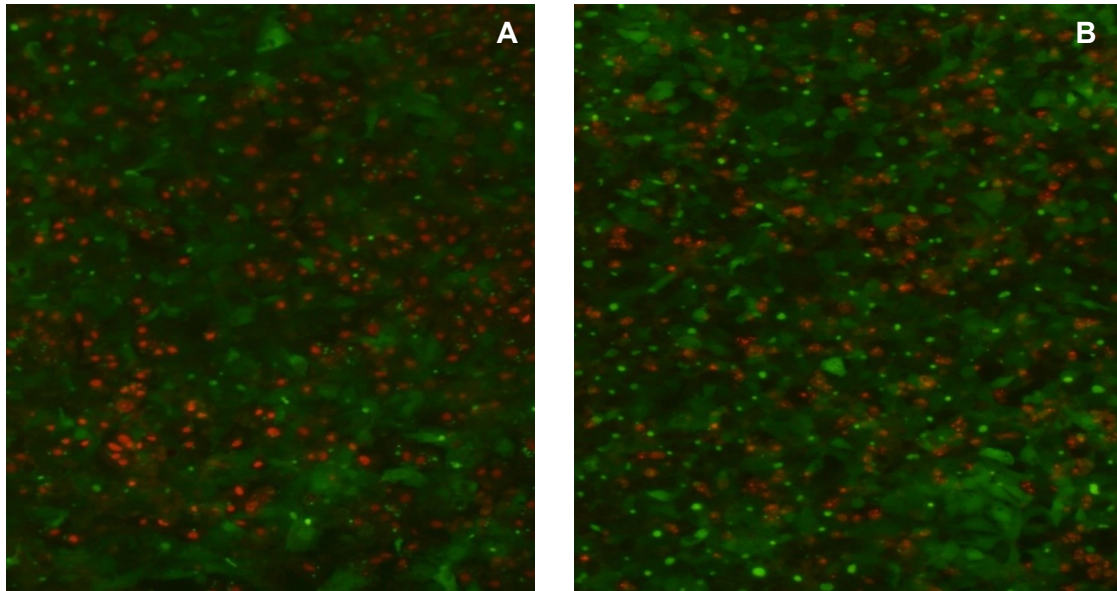


Abbildung 17: 5 %-iges Albumin mit 5 mmol/l CATE (A); 5 %-iges Albumin mit 5 mmol/l NAT (B); Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung: 20-fach

In Abbildung 17 B (NAT) wirkt es, als wäre das Gesamtvolumen der Zellen etwas höher als in A. Ebenfalls die Anzahl der toten Zellen wirkt geringer. Diese optischen Erkenntnisse spiegeln die Messergebnisse der Zellzahlen aus Kapitel 3.1.2.1.2 wieder. In den Beispielbildern für kleinere Konzentrationen beider Stabilisatoren wird das eben beschriebene Ergebnis deutlich (siehe Anhang Kapitel 7.5.7 Abb. 104). Auf den Bildern der Zellen, welche den Kontrollen ausgesetzt waren, geben die schon in der Zellzahl gemessenen Werte zu A und DA wieder. Das Gesamtvolumen ist höher und die toten Zellen geringer als beim Albumin mit Stabilisatoren aber ähnlich dem Deligandisierten (siehe Anhang, Abb. 106).

3.1.3 Bestimmung der Zytotoxizität

3.1.3.1 Cytochrom P450 Aktivierung – CYP 1A2 mit Ethoxyresorufin

3.1.3.1.1 Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5

Die Abbildung 18 zeigt, dass die Umsetzung von Ethoxyresorufin pro Zelle (Messwerte siehe Anhang Kapitel 7.5.3 Abb. 50) bei A (MW A 10 = $7,37^{-5}$; A 5 = $3,78^{-5}$) deutlich höher als bei DA (MW DA 10 = $5,98^{-6}$; DA 5 = $5,6^{-6}$) ist. Eindeutig ist, dass die Zellen mit Standard Albumin das Ethoxyresorufin statistisch signifikant in höheren Mengen umsetzen, als Zellen mit deligandisiertem Albumin.

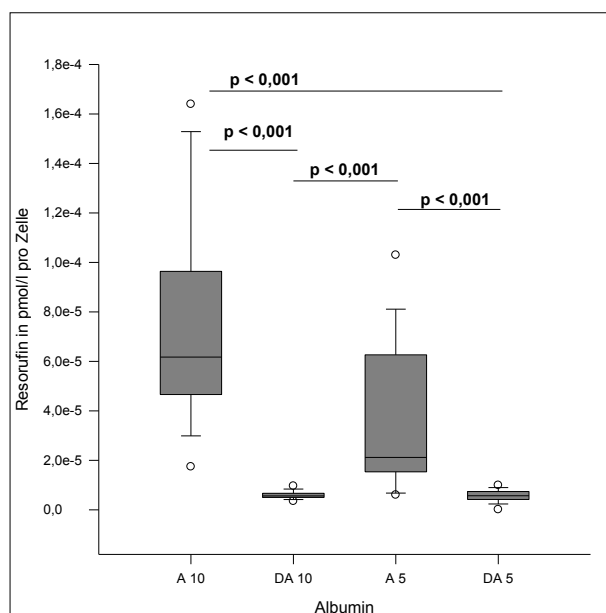


Abbildung 18: Alle Messergebnisse der Resorufinumsetzung pro Zelle des Cytochrom P 450 Systems mit jeweiligen Signifikanzen. (n=18)

In Bezug beider Albumine vergleichend mit den Mediumkontrollen zeigen sich nur signifikante Unterschiede zum Standard Albumin, nicht aber zum Deligandisierten. Die Kontrollen (MW FKS= $5,08^{-6}$; DMEM= $6,05^{-6}$) haben einen ähnlich niedrigen Resorufinumsatz wie DA. Die entsprechenden Grafiken mit allen Signifikanzen befinden sich im Anhang Kapitel 7.5.3 Abbildung 51 und 52.

3.1.3.1.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

Auch für die einzelnen Stabilisatoren wurde der Resorufingehalt pro Zelle errechnet und in Abbildung 19 graphisch dargestellt. Dabei konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass bei beiden die 0 mmol zu allen anderen Konzentrationen einen kennzeichnend niedrigeren Umsatz des Resorufin aufweist. Auch die kleinste

gemessene Konzentration von 0,6 mmol war signifikant kleiner als die Anderen, aber dennoch statistisch größer als 0 mmol. Zwischen allen anderen einzelnen Konzentrationen ergaben sich keine statistischen Unterschiede. Bei CATE traten mehr Schwankungen innerhalb der Werte auf, was bei NAT nicht der Fall war.

Beim Vergleich mit den Mediumkontrollen zeigte sich bei beiden Stabilisatoren ein sehr ähnliches Bild. Alle Konzentrationen von 5 bis 1,25 mmol sind kennzeichnend größer als beide Kontrollen. Die 0,6 mmol Konzentration bei beiden Stoffen ist kleiner als FKS und DMEM, allerdings nur bei CATE signifikant zu DMEM. Auch 0 mmol zeigten hier signifikant geringere Resorufinwerte als beide Medien (siehe Anhang Kapitel 7.5.4, Abb. 77 bis 81).

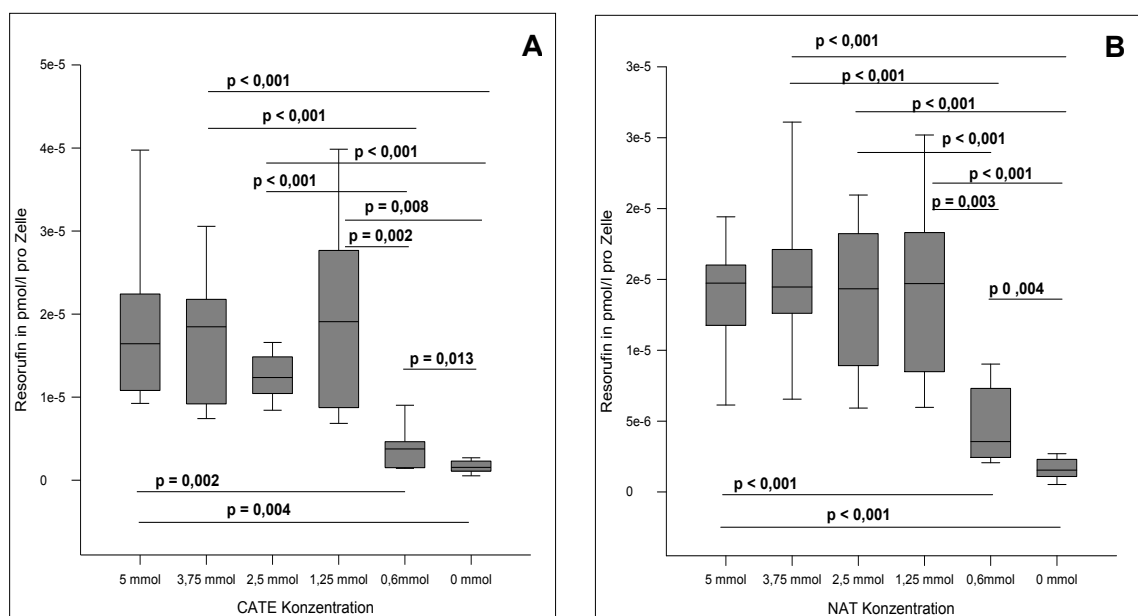


Abbildung 19: Alle Werte der Resorufinumsetzung pro Zelle für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen mit errechneten Signifikanzen. (n=9)

3.1.3.1.3 Vergleich von verschiedenen Albuminkonzentrationen

Die errechneten Werte (Messwerte siehe Anhang Kapitel 7.5.4, Abb. 86) zeigen, dass der umgesetzte Resorufingehalt mit kleiner werdender Konzentration des Albumins sinkt, wobei beide DA die niedrigsten Werte aufweisen. Alle A Werte sind signifikant größer als DA 10 (MW 5,12⁻⁶) und bis auf A 2,5 (MW 7,62⁻⁶) auch als DA 5 (MW 6,09⁻⁶). Zwischen den einzelnen A Konzentrationen sind die 10 (MW 2,56⁻⁵) und 7,5 (MW 2,21⁻⁵) signifikant größer als die zwei geringeren Konzentrationen (Abb. 20).

Bezüglich der Mediumkontrollen zeigt sich, dass pro Zelle die Werte der 10 und 7,5 %-igen Albuminlösung immer noch signifikant größer sind als beide Kontrollen. Die

kleineren Albuminkonzentrationen dagegen sind statistisch größer zur FKS Kontrolle. Diese weist den kleinsten Wert in der Resorufinumsetzung auf und ist ebenfalls gleich den beiden deligandisierte Albuminkonzentrationen. Diese Ergebnisse können im Anhang Kapitel 7.5.4 in der Abbildung 87 abgelesen werden.

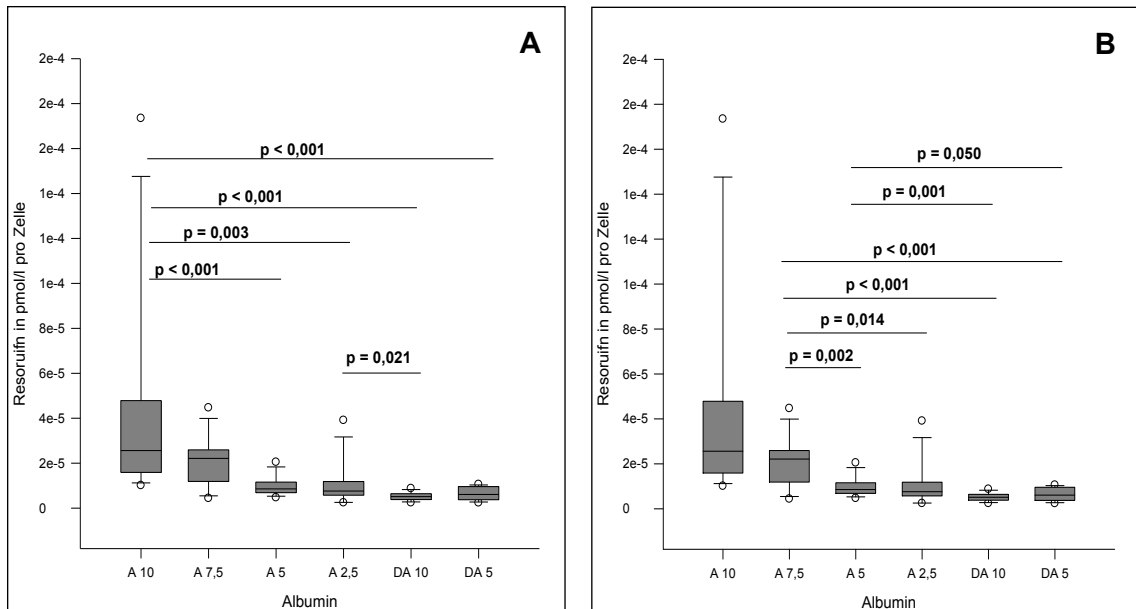


Abbildung 20: Alle Werte der errechneten Resorufinkonzentration pro Zelle. In Abschnitt A werden alle Signifikanzen für das 10 und 2,5 %-ige Albumin dargestellt und in Abschnitt B für das 7,5 und 5 %-ige.

3.1.3.1.4 Vergleich von Plasma und Albumin mit und ohne CATE

Zwischen Plasma und deligandisierten Albumin gibt es deutliche Unterschiede (Abb. 21, Messwerte Abb. 93 im Anhang). P 10 (MW $3,09^{-5}$) hat die höchste Resorufinkonzentration pro Zelle und ist nicht nur signifikant zu den beiden anderen Plasmen sondern auch zu beiden DA Konzentrationen. Es fällt auf, dass P 5 (MW $9,43^{-6}$) und P 0 (MW $8,12^{-6}$) im Umsatz stark gesunken sind. Dennoch sind beide signifikant größer als DA 10 (MW $5,82^{-6}$). Einzig DA 5 (MW $6,72^{-6}$) ist signifikant kleiner zu P 5. Im Ganzen ist zu sagen, dass das deligandisierte Albumin weniger Resorufinumsatz aufweist als die Plasmen.

Im Vergleich der Plasmen zu CATE 5 wird sichtbar, dass CATE 5 kennzeichnend kleinere Werte hat als P 10 und größere zu P 5 und P 0. Die Werte beider Mediumkontrollen sind statistisch kleiner als P 10. FKS hat insgesamt die kleinste Resorufinumsetzung. DMEM hat höhere Werte als die FKS Kontrolle und ist statistisch größer als P 5 und P 0 (Anhang Kapitel 7.5.6, Abb. 97 und 98).

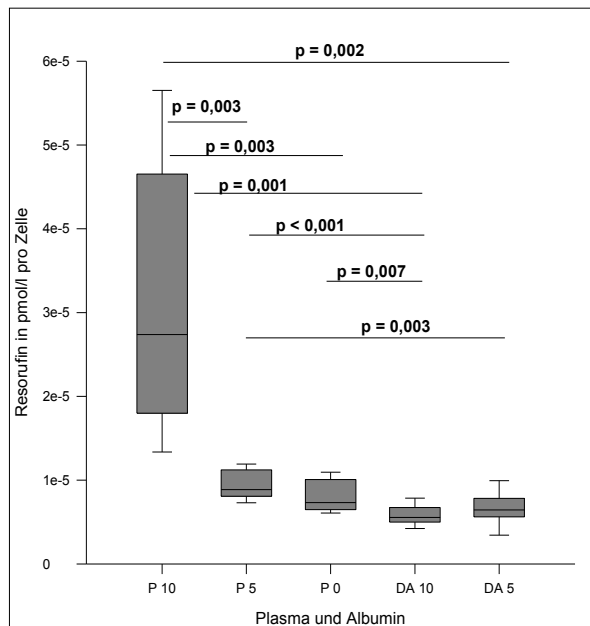


Abbildung 21: Darstellung der Resorufinwerte pro Zelle von allen drei Plasmen zueinander und zu DA. (n=9)

3.1.3.2 Cytochrom P450 Aktivierung – CYP 3A4 mit Verapamil

3.1.3.2.1 Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5

Bei der Umwandlung von Verapamil in seine Metaboliten kam es bei beiden Albuminen nur zur Umsetzung in Norverapamil und D-617. Es wurden beide Albumine mit beiden Mediumkontrollen verdünnt und gemessen. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den Verdünnungen analysiert. FKS hat keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte.

Die Ergebnisse für den D-617 Metaboliten zeigen, dass der Mittelwert der A 5 Konzentrationen fast fünfmal kleiner ist als der von DA 5 (Abb. 22 A). Im Anhang in Abbildung 53 werden die Ergebnisse von A 10 dargelegt. In Abbildung 22 B werden die pro Zelle errechneten D-617 Konzentrationen dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die signifikanten Unterschiede verändert haben. Die Werte von A 5 DMEM streuen deutlich mehr als DA 5, dennoch ist nur zwischen A 5 FKS und DA 5 DMEM eine Signifikanz zu verzeichnen. Schaut man auf den Vergleich A 10 und DA 5 spiegeln sich die Messergebnisse in denen pro Zelle wieder. Es zeigt sich eine deutliche Signifikanz in den niedrigeren Werten von A 10 (siehe Anhang, Abb. 53).

In Bezug auf die Unterschiede der D-617 Konzentrationen von beiden Albuminen zu den Mediumkontrollen liegen folgende Erkenntnisse vor. Während A 10 nur zur FKS Kontrolle signifikant kleiner ist, weist A 5 zu beiden Kontrollen niedrigere

Konzentrationen auf (Anhang Kapitel 7.5.3 Abb. 54). Allerdings gibt es keine durch die Statistik beschriebenen Unterschiede in den errechneten Werten pro Zelle (Anhang Abb. 55). Betrachtet man die Ergebnisse zwischen deligandisiertem Albumin und den Kontrollen sind zwar kleine Unterschiede erkennbar, allerdings keine Signifikanzen nachweisbar (Anhang Abb. 56). Pro Zelle sind die Konzentrationen im deligandisierten Albumin deutlich höher als bei den Mediumkontrollen (Anhang Kapitel 7.5.3 Abb. 57).

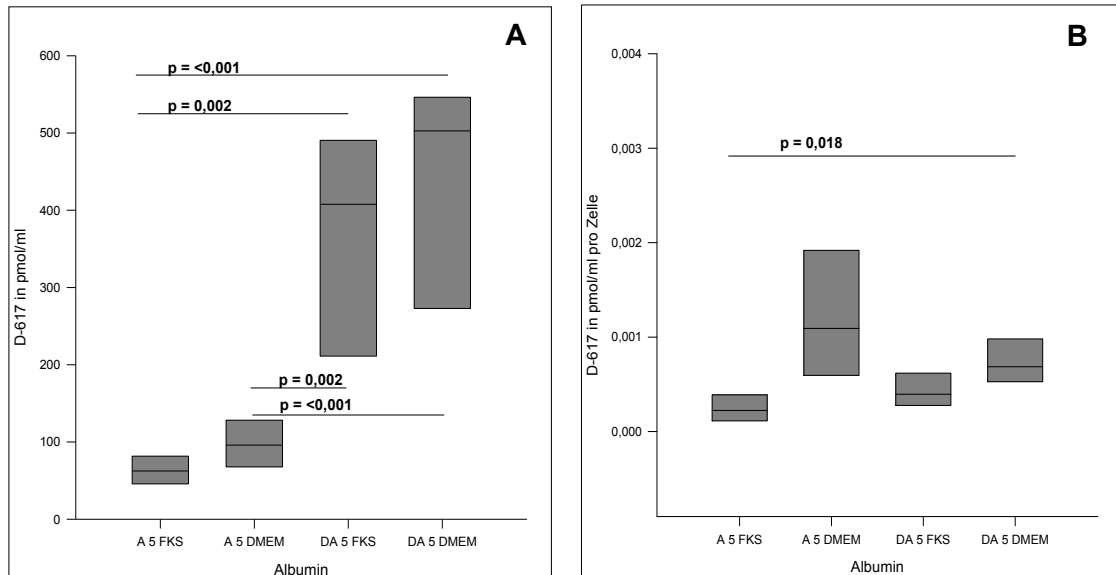


Abbildung 22: Es werden die Konzentrationen der Verapamilumsetzung zu seinem Metabolit D-617 gezeigt (A) mit den dazugehörigen Signifikanzen zwischen beiden Albuminen. In Abschnitt B wurde die D-617 Konzentration pro Zelle berechnet und dargestellt. (n=6)

Die Messergebnisse der Umsetzung zu Norverapamil zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen A und DA. Die Werte des deligandisierten Albumins sind fast dreimal so hoch wie die vom Standard HSA (Abb. 23 A, Anhang Kapitel 7.5.3 Abb. 58 A). Hinsichtlich der Werte von A 5 und DA 5 pro Zelle ergeben sich keine Unterschiede in der statistischen Auswertung. Nur A 5 DMEM schwankt etwas mehr in den Konzentrationen und ist damit etwas höher (Abb. 23 B). Die Werte zwischen A 10 und DA 5 zeigen mehr Unterschiede, welche auch durch Signifikanzen untermauert werden (Anhang 7.5.3, Abb. 58 B).

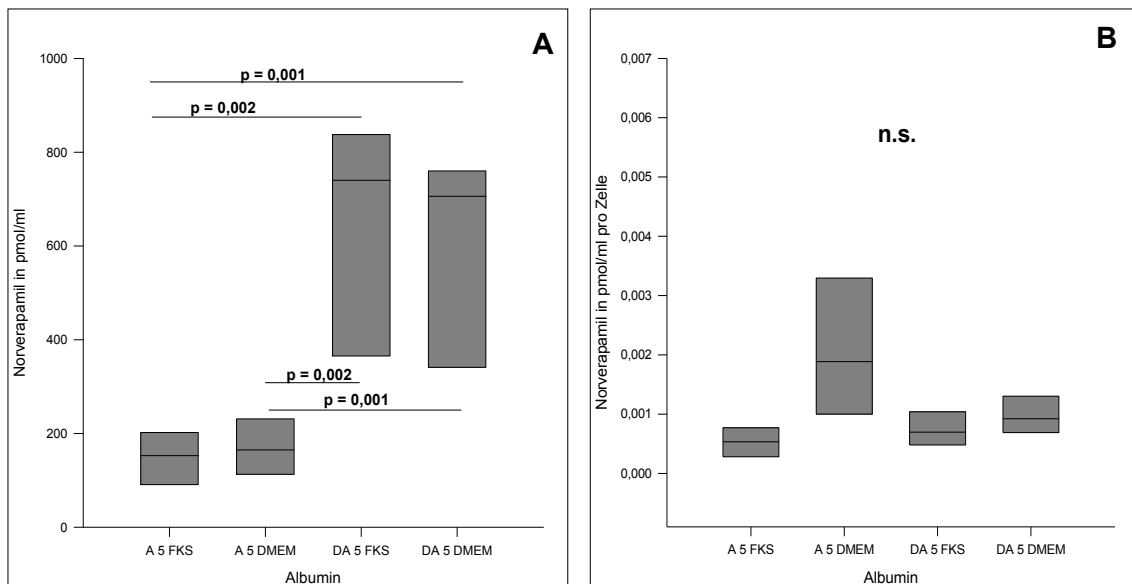


Abbildung 23: In Abschnitt A werden die Norverapamil Konzentrationen zwischen A 5 und DA 5 mit allen Signifikanzen dargestellt. Abschnitt B zeigt die berechneten Norverapamil Konzentrationen pro Zelle beider getesteter Albumine. (n=6)

Im Vergleich der Albumine mit den Mediumkontrollen ergibt sich das gleiche Bild wie beim D-617 Metabolit. Während die Medien dreimal so hohe Konzentrationen vom Norverapamil zum HSA aufweisen, zeigen sich zwischen ihnen und DA keine Unterschiede. Es sind keine statistischen Signifikanzen vorhanden. Die Messwerte von A 10 und A 5 sind nur zum FKS Medium signifikant größer. Alle Werte zum Vergleich befinden sich im Anhang Abbildung 59 bis 61. Betreffend der Werte pro Zelle ergaben sich ebenfalls andere Unterschiede. Pro Zelle gibt es keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen A und den Kontrollen, da die Konzentration im FKS Medium pro Zelle gesunken ist. Es zeigt sich eine statistische Signifikanz gegenüber dem deligandisierten Albumin und der FKS Kontrolle (Anhang, Abb. 60 bis 62). DA ist nun deutlich höher in der Umsetzung als das FKS Medium.

3.1.3.2.2 Vergleich von Plasma und deligandisierten Albumin

Der Vergleich von Plasma mit und ohne CATE zum deligandisiertem Albumin zeigt eine sehr viel stärkere Umsetzung von Verapamil zu den D-617 Metabolit im Albumin. Plasma kann eine Steigerung der D-617 Konzentrationen bewirken, wobei die Umsetzung nicht signifikant nachweisbar ist.

Bei Norverapamil werden die eindeutigen Konzentrationsunterschiede vom deligandisierten Albumin zum Plasma ebenfalls erkenntlich. Die Werte innerhalb des Plasmas steigen mit abnehmender CATE Konzentration. Auf die Zellzahl errechnet sinken die Werte untereinander ab. Die Konzentrationen des deligandisierten Albumins

sind aber immer noch größer. Innerhalb der Plasmen ist kein Unterschied mehr zwischen P 10 und P 5 bei D-617 erkennbar. Beim Norverapamil hingegen sind weiterhin Unterschiede zwischen den Plasmen mit CATE messbar. P 0 hingegen ist jetzt nicht mehr größer als die beiden anderen Plasmen sondern weist eine geringere Konzentration bei beiden Metaboliten auf. Die Ergebnisse mit dazugehörigen Signifikanzen werden in den Abbildungen 99 bis 101 im Anhang Kapitel 7.5.6 grafisch dargestellt.

In Bezug auf die Mediumkontrollen zeigen sich bei beiden Metaboliten die Werte vom Plasma signifikant geringer. Die Werte der DMEM Kontrolle zeigen die größte Schwankung, aber auch den höchsten Mittelwert. Innerhalb der Plasmen wird ein statistischer Unterschied zwischen P 10, P 5 und P 0 bei beiden Metaboliten erkennbar. Pro Zelle sind die Unterschiede allerdings wieder anders. Mit sinkender CATE Konzentration sinkt auch die Konzentration des umgesetzten Metaboliten. Einen signifikanten Unterschied gibt es nur zwischen P 5 und P 0, sowie zwischen P und der FKS Kontrolle. Die Kontrollen setzten das Verapamil signifikant stärker in die Metaboliten D-617 und Norverapamil um als das Plasma. Pro Zelle sinkt der Umsatz vom FKS Medium und die DMEM Kontrolle hat eine ähnlich starke Streuung wie P 10. Signifikanzen ergeben sich allerdings nur zwischen P 5 und P 0, sowie P 0 und der FKS Kontrolle. Die Ergebnisse für CATE und den Mediumkontrollen befinden sich im Anhang Kapitel 7.5.6 in den Abbildungen 102 und 103.

3.1.4 Monitoring physiologischer Parameter – Bionasensor

3.1.4.1.1 Vergleich von Standard HSA und deligandisiertem HSA

In den Bionas Testläufen wurden die Unterschiede zwischen dem Standard HSA und deligandisiertem HSA über einen Zeitraum von 72 h aufgezeichnet. Es spiegelten sich nicht nur die Unterschiede in den Zellzahlen der vorangegangenen Testreihen wieder, sondern es ergab auch einen Einblick in die Ansäuerung und O₂-Sättigung der Zellen. In der Kurve der Zelladhäsion der Mediumkontrolle erkennt man eine Anstieg-Abfall-Anstieg-Kurve (Abb. 24). Bei beiden Standard Albumin Konzentrationen (10 %, 5 %) zeigt sich die Kurve stetig absinkend (5 % in Abb. 24 A, 10 % im Anhang 7.5.8, Abb. 104). Betrachtet man im Vergleich die Zelladhäsion vom deligandisierten Albumin, wird deutlich wie viel besser hier die Zellen im Wachstum und in der Adhäsion im Gegensatz zu A sind (Abb. 24 B).

Hinsichtlich der O₂-Sättigung werden ebenfalls klare Unterschiede deutlich. Beim 5 %-igen Standard Albumin zeigt sich nach einem kurzen Anstieg ein Abfall der Werte, was wiederum zum Sinken der Zelladhäsion passt. Beim 10 %-igen HSA spiegelt sich die Kurve der Zelladhäsion wieder. Es kommt zu einem stetigen Abfall der Sauerstoffsättigung. Die Werte der Mediumkontrolle kommen annähernd der Zelladhäsion nah. Zeigt sich ein Anstieg in der Adhäsion fällt die O₂-Sättigung etwas ab bis es wieder in einen leichten Anstieg übergeht. Beim deligandisierten Albumin wird ein anderes Bild erkennbar. Obwohl die Zelladhäsion durchweg gleich zu bleiben scheint, steigt die Sauerstoffsättigung stetig an (siehe Anhang Kapitel 7.5.8, Abb. 108 und 109 A).

Bei der Ansäuerung (pH-Wert) fällt die Kurve beim 5 und 10 %-igen Standard Albumin sofort nach Zugabe des Albumins ab und bleibt über den gesamten Messzeitraum auf diesem Level. Die Mediumkontrolle schwankt etwas zwischen den einzelnen Messungen, bleibt dennoch annähernd konstant. Die Kurve des deligandisierten Albumins ist ähnlich der Sauerstoffsättigung. Sie zeigt einen durchgehenden leichten Anstieg. Die dazugehörigen Ergebnisse werden im Anhang in den Abbildungen 109 B und 110 graphisch dargestellt.

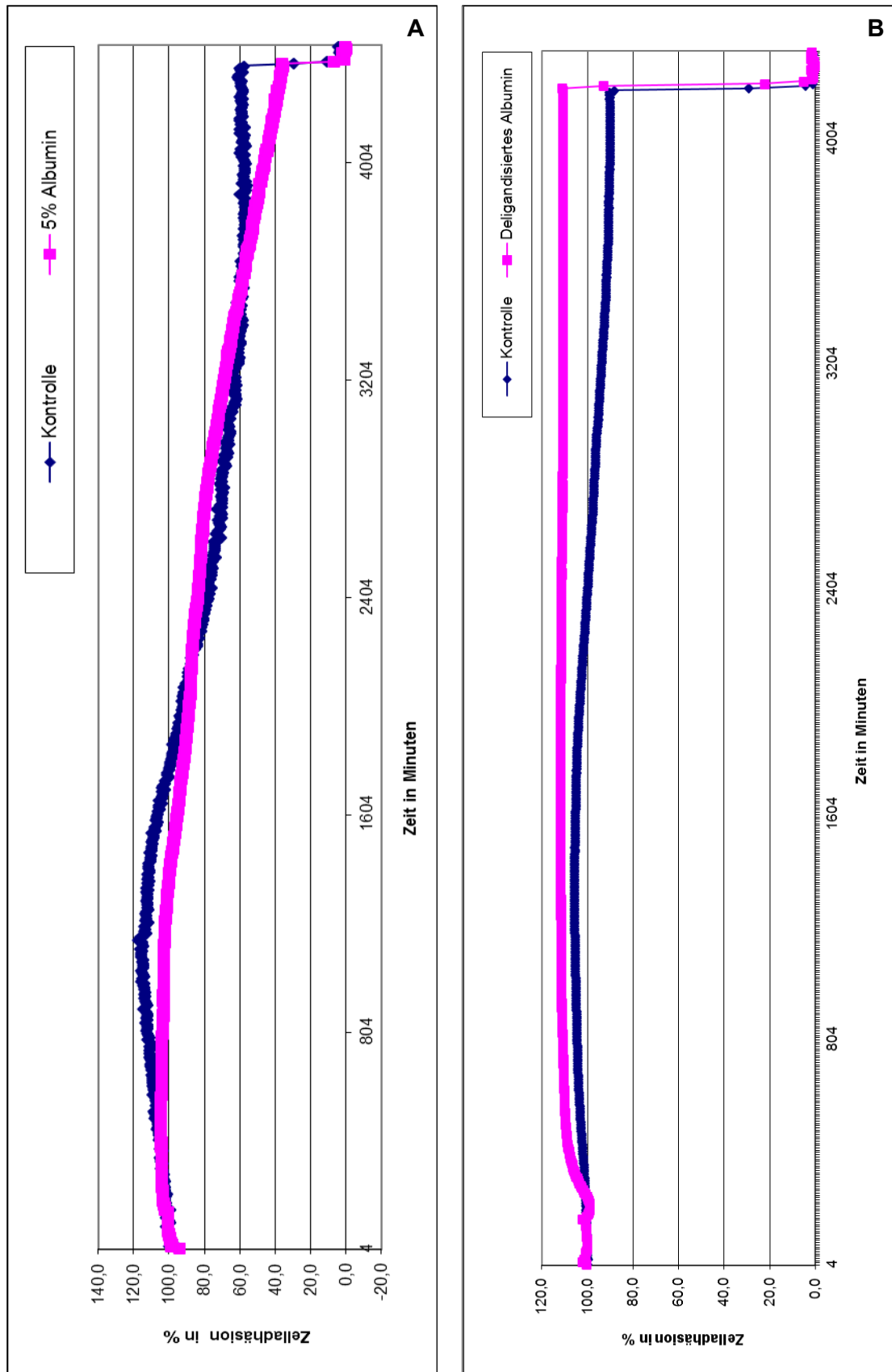


Abbildung 24: Zelladhäsion der Bionasmessung für 5 %iges Standard Albumin (A) und deligandisiertes Albumin (B) in einem Zeitraum von 72 h.

3.2 Fibroblasten Zelllinie L929

3.2.1 Bestimmung der Zellproliferation und -vitalität

3.2.1.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durch Trypanblau

3.2.1.1.1 Vergleich von A 5 und DA 5

In der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung der Fibroblasten wurde 5 %-iges Standard Albumin mit 5 %-igen deligandisierten Albumin verglichen. Dabei konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass DA 5 (MW $5,9^{+5}$) signifikant höhere Werte in den Zellzahlen aufweist als A 5 (MW $2,9^{+5}$) (Abb. 25 A). Somit können die Zellzahlergebnisse der Fibroblasten mit denen der C3A Zellen gleichgesetzt werden. Hinsichtlich der Mediumkontrollen ist DA auch um einiges größer als beide Kontrollen. A 5 hingegen ist signifikant kleiner zu FKS, aber größer zu DMEM (Abb. 25 A). Die Fibroblasten allerdings zeigen im Gegensatz zu den C3A Zellen andere Vitalitäten. Ergaben sich bei diesen noch signifikante Unterschiede, sind sie bei den Fibroblasten zwischen A (MW 95), DA (MW 97) und den Mediumkontrollen (MW FKS = 97, DMEM = 95) annähernd gleich. Tendenzen sind erkennbar, aber noch keine statistischen Unterschiede nachweisbar (Abb. 25 B).

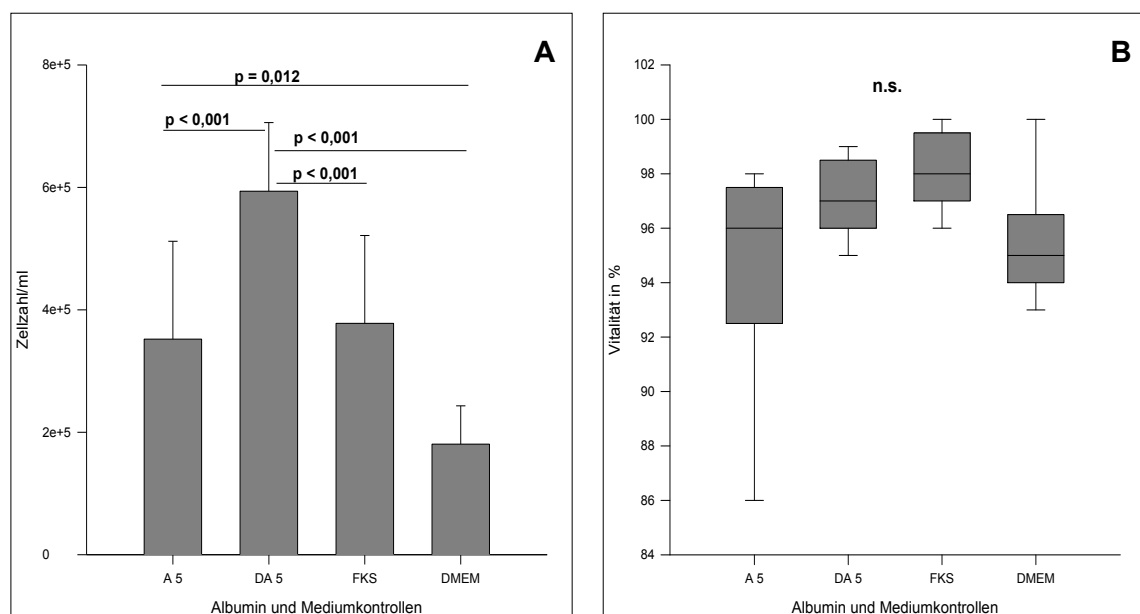


Abbildung 25: Alle Werte der Zellzahl- (A) und Vitalitätsbestimmung (B) und dazugehörige Signifikanzen der Albumine A 5 und DA 5. (n=9)

3.2.1.1.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

Für diese Zelllinie wurden ebenfalls verschiedene CATE und NAT Konzentrationen untereinander und in Bezug auf die Mediumkontrollen getestet.

Die einzelnen CATE Konzentrationen zeigen eine steigende Tendenz der Zellzahlen mit abnehmendem Anteil an CATE. Eine Signifikanz ist aber nur zwischen 5 und 3,75 mmol zu verzeichnen. Zu den Mediumkontrollen gibt es nur statistische Unterschiede von 2,5 und 1,25 mmol zu DMEM. Diese Kontrolle hat auch die niedrigsten Zellzahlen in dieser Testreihe. FKS liegt auf demselben Wertespektrum wie die beiden niedrigsten CATE Konzentrationen. Die höchste Vitalität zeigt allerdings das FKS Medium und ist signifikant zu 3,75; 2,5 und 1,25 mmol. Die niedrigste Vitalität weist hier die 3,75 mmol Konzentration auf, ist jedoch nur zu 5 mmol kennzeichnend geringer.

Die Unterschiede in den Zellzahlen zwischen den einzelnen NAT Konzentrationen sind nur zu 1,25 mmol deutlich erkennbar. Diese Konzentration zeigt die höchsten Zellzahlen, ist aber nur zu 5 mmol signifikant. Alle Anderen sind annähernd gleich zueinander. In Bezug auf die Kontrollen wird erkennbar, dass DMEM die niedrigsten Zellzahlen aufweist und signifikant kleiner zu 2,5 und 1,25 mmol ist. Bei der Vitalitätsbestimmung ergaben sich mehr Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen. Die ersten Beiden weisen zueinander annähernd gleiche Werte auf, sowie die beiden letzten Konzentrationen. Ein signifikanter Unterschied konnte nur zwischen 5 mmol und den beiden letzten Konzentrationen nachgewiesen werden. Auch bei NAT hat das FKS Medium die höchste Vitalität, ist aber nur kennzeichnend größer als 1,25 mmol. Alle Werte und Signifikanzen zu der genannten Auswertung werden im Anhang Kapitel 7.5.9 in den Abbildungen 111 und 112 graphisch dargestellt.

3.2.1.2 Stoffwechselaktivierung – XTT Bestimmung

3.2.1.2.1 Vergleich von A 5 und DA 5

Die errechnete Zellaktivität pro Zelle des Standard- und deligandisierten HSA ergaben ebenfalls ähnliche Unterschiede wie in den Testreihen der C3A Zellen. Beide Mediumkontrollen weisen die höchste Zellaktivität auf und sind signifikant zu DA 5 (MW 5,6⁻⁷), welches die geringste Aktivität aufweist. Die Werte von A 5 (MW 1,31⁻⁶) sind in demselben Spektrum angelegt wie die vom FKS Medium (MW 1,25⁻⁶). Statistisch kennzeichnende Unterschiede ergeben sich allerdings nur zu DA 5. Die Ergebnisse werden in Abbildung 26 graphisch dargestellt und die Rohdaten befinden sich im Anhang Kapitel 7.5.9 in Abbildung 113.

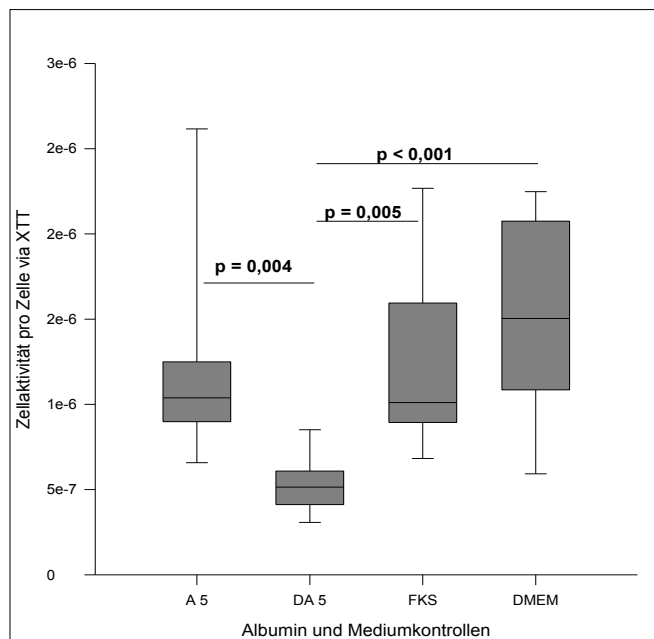


Abbildung 26: Alle Werte und Signifikanzen der Zellaktivität via XTT Test im Vergleich vom Standard Albumin und deligandisierten Albumin. (n=9)

3.2.1.2.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

Im Vergleich der Zellaktivität pro Zelle der unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen ergaben sich keine statistischen Signifikanzen untereinander und zu beiden Mediumkontrollen. Die Werte wiesen zwar starke Schwankungen auf und die Mittelwerte wichen voneinander ab (hauptsächlich bei NAT), aber dennoch waren die Unterschiede nicht statistisch aussagekräftig (siehe Anhang Kapitel 7.5.9, Abb. 114 und 115).

3.2.1.3 Freisetzung von LDH

3.2.1.3.1 Vergleich von A 5 und DA 5

Bei der LDH Freisetzung pro Zelle wurde deutlich, dass die Mediumkontrollen (MW FKS = $1,68^{-4}$; DMEM = $2,68^{-4}$) um einiges höhere Werte aufwiesen als die beiden Albumine (MW A 5 = $1,58^{-4}$; DA 5 = $1,10^{-4}$). Die Schwankungen der Werte liegen ebenfalls bei den Kontrollen am höchsten. Beide Albumine waren allerdings nur signifikant kleiner zur DMEM Kontrolle. Zueinander ergaben sich keine Unterschiede. Die Ergebnisse werden in Abbildung 27 mit allen Signifikanzen graphisch dargestellt (Messwerte im Kapitel 7.5.9 im Anhang, Abb. 116).

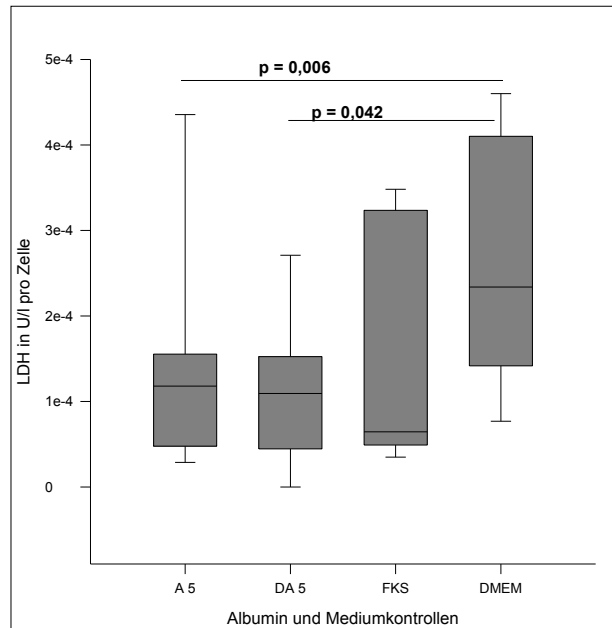


Abbildung 27: Die Ergebnisse der LDH Freisetzung vom Standard Albumin im Vergleich zu deligandisierten Albumin und den Mediumkontrollen. (n=9)

3.2.1.3.2 Vergleich unterschiedlicher CATE und NAT Konzentrationen

Große Unterschiede in den einzelnen Konzentrationen von CATE und NAT ergaben sich in der LDH Messung nicht. Die Schwankungen bei NAT sind etwas größer, ergeben aber keinen signifikanten Unterschiede untereinander. Auch in Bezug auf die Mediumkontrollen ergaben sich nur signifikant kleinere Werte der Konzentrationen, außer 5 mmol, zu DMEM. Bei CATE sind die Schwankungen nicht all zu groß und die CATE Konzentrationen zeigen ähnlich hohe LDH Werte wie die Mediumkontrollen. Ausschließlich 3,75 mmol ist signifikant kleiner als DMEM, es weist zu allen die geringste LDH Umsetzung auf. Untereinander zeigte sich nur zwischen 2,5 und 1,25 mmol ein statistischer Unterschied (Anhang Kapitel 7.5.9, Abb. 117 und 118).

3.2.1.4 Live Dead Färbung

3.2.1.4.1 Vergleich von A 5 und DA 5

In der Live Dead Färbung lassen sich die Unterschiede zwischen Standard Albumin (Abb. 27 A) und deligandisierten Albumin (Abb. 27 B) ebenfalls zeigen. Im Standard Albumin sind eindeutig mehr tote Zellen zu erkennen. Hinsichtlich der Zelldichte kann man in Abbildung 28 auch erkennen, dass zur Mitte des Wells die Zellzahlen beim Standard Albumin (A) abnehmen, beim deligandisierten Albumin (B) aber annähernd

gleich bleiben. Die hohen Zellzahlen bei DA lassen die Zellen kugelig erscheinen, wohingegen sie bei A ihre typische Fibroblastenform beibehalten haben.

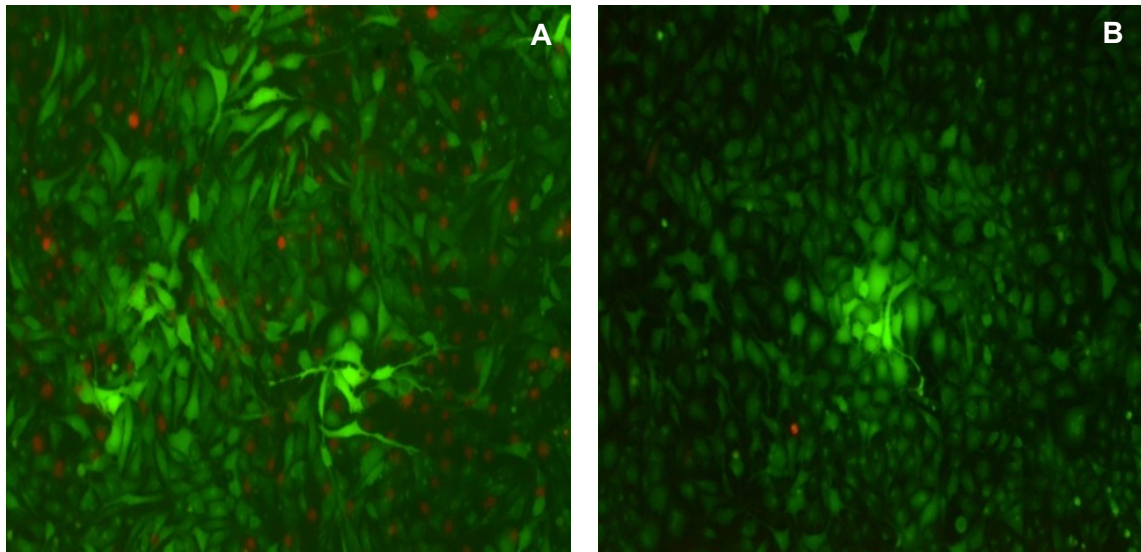


Abbildung 28: Bilder der Live Dead Färbung von L929 Zellen mit 5 %igen Standard Albumin (A) und 5 %igen deligandisierten Albumin (B). Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung: 20-fach

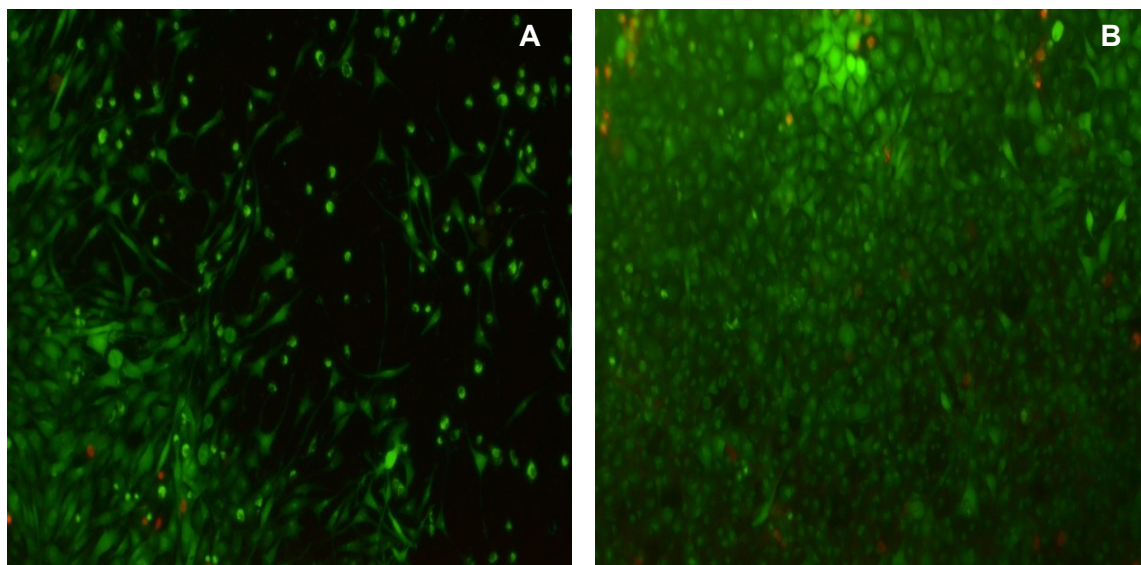


Abbildung 29: Bildausschnitt vom Mittelteil des Wells für Standard Albumin (A) und deligandisiertes Albumin (B). Inkubationszeit = 6 Tage; Vergrößerung: 20-fach

3.3 Patientenplasmen

Durch die Patientenplasmen soll der Unterschied zwischen den Lebertherapieverfahren MARS und Rezirkulation gezeigt werden. Es werden jeweils die Daten vor und nach jeder Behandlung miteinander ausgewertet.

3.3.1 Bestimmung der Zellproliferation und –vitalität

3.3.1.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durch Trypanblau

Bei der Zellzahlbestimmung der Patientenplasmen vor und nach der Behandlung zeigt sich in Abbildung 30 sowohl bei MARS (A) als auch bei der Rezirkulation (B) ein Anstieg der Zellzahlen. Mit einer Zellzahlzunahme von vorher $6,9^{+5}$ (MW) zu nachher $8,0^{+5}$ (MW) ist nur bei der Rezirkulation der Unterschied signifikant größer. Bei der Marsbehandlung lag der Unterschied zwischen vorher und nachher nur bei einer Steigerung von $6,9^{+4}$ (MW).

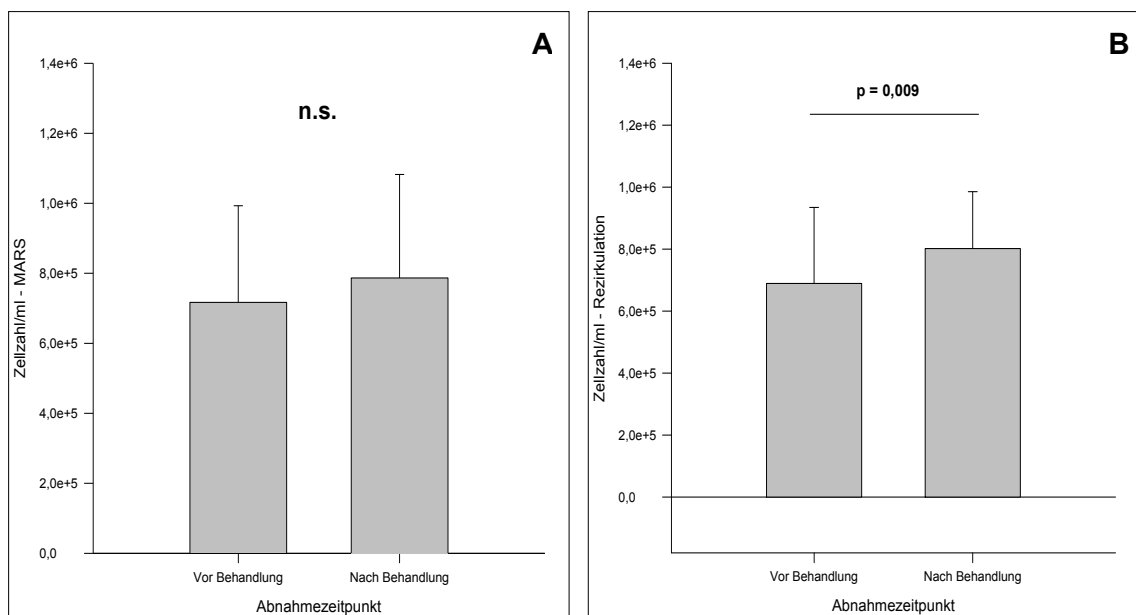


Abbildung 30: Zellzahlbestimmung der Patientenplasmen vor und nach Behandlung von MARS (A) und Rezirkulation (B).

Bei der Vitalitätsbestimmung gab es keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Weder bei der MARS Behandlung noch bei der Rezirkulation nahm die Vitalität zu oder ab. Lediglich zwischen den beiden hatte die Rezirkulation mit 96 % (MW) eine etwas höhere Vitalität als die Zellzahlen der MARS Behandlung mit 94 % (MW). Die Ergebnisse werden in Abbildung 31 für beide Behandlungsmethoden graphisch dargelegt.

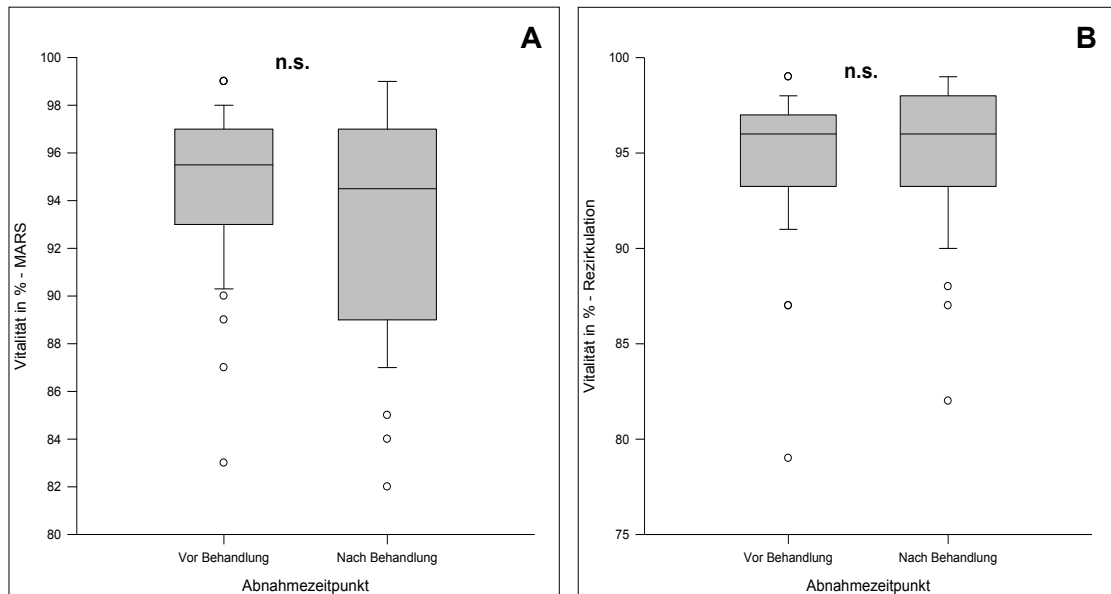


Abbildung 31: Gezeigt werden die Zellviabilitäten der Patientenplasmen im Vergleich von MARS (A) und der Rezirkulation (B).

3.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität

3.3.2.1 Cytochrom P450 Aktivierung – Ethoxyresorufin

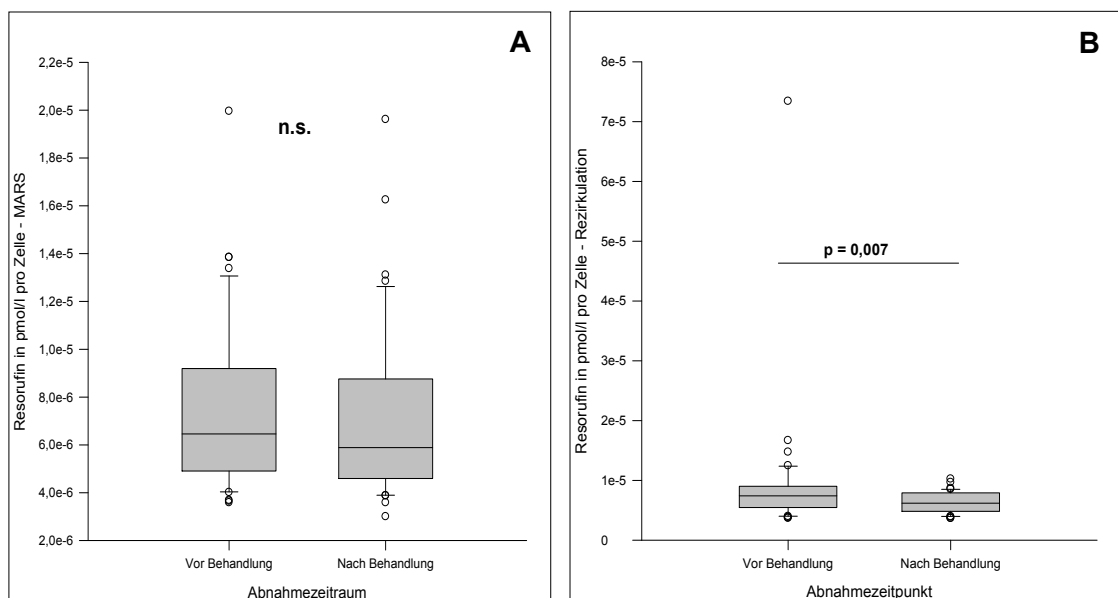


Abbildung 32: Alle Ergebnisse der Ethoxyresorufinumsetzung der MARS (A) und Rezirkulation (B) vor und nach der Behandlung.

In der Resorufinkonzentration pro Zelle zeigt sich bei MARS vor der Behandlung ($7,5 \times 10^{-6}$) und danach (7×10^{-6}) kein signifikanter Unterschied (Abb. 32 A). Bezüglich der Rezirkulation ist durchaus ein statistischer Rückgang des Resorufins ermittelbar (Abb. 32 B). Der Wert pro Zelle lag im Durchschnitt vor der Behandlung bei $7,6 \times 10^{-6}$ und danach bei $6,1 \times 10^{-6}$.

3.4 Messwerte Stabilisatoren (Gaschromatographie/ HPLC)

In diesem Kapitel werden in den nachfolgenden Tabellen die Messwerte der Testsubstanzen CATE und NAT in beiden Albuminen und im Plasma dargestellt. Diese wurden zu jeder Testdurchführung bestimmt, um die Konzentrationen der Stabilisatoren ermitteln zu können.

Tabelle 4: Messwerte aus der Testsubstanz Albumin vom Stabilisator CATE

Testsubstanz	Stabilisator	Probenname	Konzentration in mmol/l
10 % Albumin	CATE	A 10	10,06
		A 10	11,70
		A 10	10,07
		A 10	9,10
		A 10	10,40
Mittelwert:			13,64
Stabw:			4,67
Median:			11,05
5 % Albumin		A 5	5,83
		A 5	5,04
		A 5	5,02
		A 5	4,80
		A 5	5,90
Mittelwert:			5,18
Stabw:			1,28
Median:			5,03
10 % deligandisiertes Albumin		DA 10	0,07
		DA 10	0,02
		DA 10	0,01
		DA 10	0,01
		DA 10	0,03
Mittelwert:			0,03
Stabw:			0,02
Median:			0,02
5 % deligandisiertes Albumin		DA 5	0,04
		DA 5	0,02

		DA 5	0,01
		DA 5	0,02
		DA 5	0,01
Mittelwert:			0,02
Stabw:			0,01
Median:			0,02
5 % Albumin		5	5,68
		3,75	4,02
		2,5	2,34
		1,25	1,58
		0	0,07

Tabelle 5: Messwerte aus der Testsubstanz Albumin vom Stabilisator NAT

Testsubstanz	Stabilisator	Probenname	Konzentration in mmol/l
10 % Albumin	NAT	A 10	7,02
		A 10	7,33
		A 10	7,46
		A 10	7,31
		A 10	7,20
Mittelwert:			7,26
Stabw:			0,15
Median:			7,31
5 % Albumin		A 5	4,05
		A 5	3,85
		A 5	3,83
		A 5	3,84
		A 5	4,07
Mittelwert:			3,93
Stabw:			0,11
Median:			3,85
10 % deligandisiertes Albumin		DA 10	0,00
		DA 10	0,00
		DA 10	0,00
		DA 10	0,00
		DA 10	0,00
Mittelwert:			0,00
Stabw:			0,00
Median:			0,00
5 % deligandisiertes Albumin		DA 5	0,00
		DA 5	0,00

		DA 5	0,00
		DA 5	0,00
		DA 5	0,00
Mittelwert:			0,00
Stabw:			0,00
Median:			0,00
5 % Albumin		5	4,39
		3,75	3,40
		2,5	2,30
		1,25	1,22
		0	0,00

Tabelle 6: Messwerte aus der Testsubstanz Gesundplasma vom Stabilisator CATE

Testsubstanz	Stabilisator	Probenname	Konzentration in mmol/l
Plasma	CATE	P 10	11,51
		P 10	11,56
		P 10	7,20
		P 10	10,06
		P 10	11,50
		P 10	11,50
		P 10	13,20
Mittelwert:			10,93
Stabw:			1,74
Median:			11,50
		P 5	3,65
		P 5	4,40
		P 5	3,50
		P 5	5,04
		P 5	3,60
		P 5	4,40
		P 5	6,90
Mittelwert:			4,50
Stabw:			1,11
Median:			4,40
		P 0	0,01
		P 0	0,01
		P 0	0,02

		P 0	0,02
		P 0	0,01
		P 0	0,01
		P 0	0,01
Mittelwert:			0,01
Stabw:			0,00
Median:			0,01

4 Diskussion

4.1 Hepatozyten Zelllinie HepG2 / C3A

Für diese Arbeit wurde die humane Hepatoblastoma Zelllinie HepG2 / C3A ausgewählt, welche aus einer etablierten Leberkarzinom Zelllinie HepG2 hervorgegangen ist.

Ziel dieser Arbeit war es, sich mit den biologischen Effekten der Stabilisatoren im Albumin in vitro auf Leberzellen auseinanderzusetzen. Es sollte überprüft werden, ob die Wirkung des Albumins ohne CATE und NAT effektiver bei der Behandlung von Lebererkrankungen sein könnte. Des Weiteren sollen die Erkenntnisse dieser Arbeit helfen den Einsatz von deligandisiertem Albumin in der Zellkultur, in Leberunterstützungsverfahren, in der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden bzw. in der Verbesserung von schon angewandten Methoden (Bsp. Biosensoren) zu etablieren.

4.1.1 Bestimmung der Zellproliferation und –vitalität

Jede Zelle unterliegt einem natürlichen Zyklus, welcher in die Interphase (G1-, S- und G2-Phase), Mitose bzw. Meiose und in die Zellteilungsphase unterteilt wird. Zellpopulationen höherer Organismen haben eine optimale Funktionsleistung während der Proliferationspause (Leffert et al. 1988). Bei Hepatozyten sind differenzierte spezifische Leistungen in der Proliferationsphase nur bedingt vorhanden. Das bedeutet, dass hepatozytenspezifische Leistungen von Leberzellen nur ausführbar sind, wenn sie sich außerhalb der Teilungsphase bzw. dem Zellzyklus befinden (Schuetz et al. 1988). Diese Erkenntnis macht es möglich, aus den Ergebnissen dieser Arbeit bestimmte Schlussfolgerungen zu ziehen.

4.1.1.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung – Trypanblau

In den Ergebnissen der Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Methode, zeigte sich, dass das Albumin mit den beiden Stabilisatoren eindeutig schlechter auf das Zellwachstum einwirkte als das deligandisierte Albumin. CATE und NAT wirkten eindeutig negativ auf die Proliferation der Hepatozyten. Es zeigte sich, dass das deligandisierte Albumin gleich gute Ergebnisse erzielte wie die Mediumkontrollen. Diese Daten spiegelten sich in verschiedenen Albuminkonzentrationen wieder. Obwohl die Konzentration der Stabilisatoren mit der HSA Konzentration sank und der Mediumanteil anstieg, zeigte das deligandisierte Albumin trotz höherem Albuminanteil

eindeutig eine bessere Wirkung auf die Zellen. Der Anteil an FKS-haltigem Medium, der dem Albumin immer hinzugefügt wurde, hatte somit kaum Auswirkungen auf die Reaktion der Zellen. Die Proliferation wurde durch das FKS in dem Fall nicht unterstützt und blieb weiterhin negativ in Verbindung mit dem Standard Albumin. Beide Stabilisatoren im Albumin wirken somit negativ auf die HepG2 / C3A Zellen und ihre Proliferation. Um festzustellen, welche Wirkung die einzelnen Stabilisatoren besitzen, wurden diese getrennt voneinander analysiert. Zu einer 5 %-igen deligandisierten Albuminlösung wurden CATE und NAT unabhängig voneinander in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Die Ergebnisse spiegeln die gleichen Auswirkungen auf die Zellen wieder, wie die Daten der vorangegangenen Testreihe. Die unterschiedlichen Konzentrationen zeigten in beiden Fällen einen ähnlichen Effekt auf die Proliferation. Es wurden fünf Konzentrationen CATE bzw. NAT mit gereinigtem stabilisatorfreien Albumin, welches mit 0 mmol/l bezeichnet wurden, verglichen. Die stark negative Wirkung setzte erst bei der kleinsten Konzentration von 0,6 mmol/l aus, obwohl diese im Gegensatz zu dem CATE und NAT freien Albumin immer noch Auswirkungen auf die Zellen zeigte. Somit ist klar definiert, dass sowohl CATE als auch NAT die Proliferation der Hepatozyten unterdrückt. Die Zellen erreichen die erste Phase des Zellzyklus nicht. Da die Zellen nicht proliferieren können und die vorhandenen Zellen im Abbau der beiden Stoffe so stark beansprucht werden (siehe auch XTT), kommt es offensichtlich ab einem gewissen Zeitpunkt zum Absterben der Zellen. Die Ergebnisse der dazugehörigen Zellvitalität belegen dieselben Erkenntnisse. Die Zellen mit Kontakt zu den Stabilisatoren, egal in welcher Zusammensetzung des Albumins, zeigten immer eine schlechtere Vitalität als die Zellen mit Kontakt zu deligandisiertem Albumin.

Einen kleinen Unterschied bei den einzelnen Stabilisatoren wurde allerdings sichtbar. Die Wirkung von CATE auf die Vitalität war negativer im Gegensatz zu NAT. Es konnte beobachtet werden, dass die mittelkettige Fettsäure einen stärkeren Einfluss hat als NAT (siehe auch Live Dead Bilder). Somit hemmt CATE nicht nur das Wachstum der Zellen, sondern wirkt ab einem gewissen Zeitpunkt toxisch, so dass die noch vorhandenen Zellen absterben. Obwohl CATE toxischer wirkt als NAT, sind in den Proben beider Stabilisatoren vermehrt tote Zellen im Gegensatz zum stabilisatorfreien Albumin vorhanden. Damit ist eindeutig bewiesen, dass DA sowohl auf das Zellwachstum als auch auf die Vitalität einen positiven Effekt hat, dass es das eingesäte Zellvolumen bis zu drei Mal erhöhte.

Dass die Zellen durch das stabilisatorbehaftete Albumin auch in Ihren Funktionen gehemmt wurden und dies höchst wahrscheinlich auch einen starken Einfluss auf das Wachstum und Überleben der Zellen hatte, konnte durch den Bionas-Test untermauert werden. Es wurde dokumentiert, dass sich die Zellen mit stabilisatorbeladenem Albumin nicht vermehrten sondern weniger wurden, was durch den Verlust ihre Adhärenz erkenntlich gemacht werden konnte. Im Gegensatz zum deligandisierten Albumin, was die Zellen genauso wie das Kontrollmedium eher zum Wachsen brachte. Durch den Bionassensor konnte gleichzeitig auch ein Einblick auf die Sauerstoffsättigung und den pH-Wert der Zellen genommen werden. Während beim stabilisatorfreien Albumin diese Werte einen deutlichen Anstieg aufzeigten, fielen sie beim normalen Albumin rapide ab. Es bestand zwar ein kleiner Unterschied in der Stärke zwischen 10 und 5 %-igem Albumin, aber der Effekt war derselbe. Mit abnehmender Zellzahl wurden natürlich auch die Reaktionen geringer. Jedoch sanken die Sauerstoffsättigung und der pH-Wert sofort ab als das Standard Albumin auf die Zellen gegeben wurde. Es scheint, dass die Zellen stark mit dem Abbau von CATE und NAT beschäftigt waren. Sie konnten sich somit nicht weiter vermehren und auf Dauer überleben.

Da gezeigt werden konnte, dass CATE einen höheren toxischen Effekt aufweist als NAT, wurde dieser Stabilisator in den Konzentrationen von 10 und 5 mmol/l auch in Verbindung mit Gesundplasma getestet. Dieses Plasma wurde sowohl mit Gesundplasma ohne CATE als auch mit deligandisierten Albumin verglichen. Auch hier wurden die Reaktionen von CATE auf die Proliferation der C3A Zellen deutlich. Es kam ebenfalls wie beim Albumin zum Wachstumstop. Es gab allerdings leichte Abweichungen von der Stärke der Reaktion. Wirkten beim Albumin die 10 und 5 % fast gleich, so gab es im Plasma einen größeren Unterschied. Die Zellen kamen mit den 5 mmol/l CATE im Plasma wesentlich besser aus als im Albumin. Dennoch war im Gegensatz zum Gesundplasma eine deutliche Reaktion der Zellen nachweisbar. Der größte Kontrast in dieser Testreihe, im Gegensatz zu den mit Albumin in den vorangegangenen Testreihen, lag allerdings in der Vitalität der Zellen. Diese war auch mit CATE teilweise etwas besser als das stabilisatorfreie Albumin. Das kann vermutlich damit erklärt werden, dass das Plasma im Allgemeinen bessere Voraussetzungen erfüllt als reines Albumin. Im Plasma selbst ist nicht nur Albumin enthalten, sondern ebenfalls weitere protektive Eiweiße wie auch andere Bestandteile, die für den Abbau von CATE in Frage kommen und somit die Reaktion auf die Zellvitalität beeinflussen können. Dennoch sind die Reaktionen auf die Zellzahlen eindeutig. Aus diesen

Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das deligandisierte Albumin immer noch ein besserer Plasmaersatzstoff darstellt als das bisher erhältliche Standard Albumin. Des Weiteren könnte man in Erwägung ziehen, dass das deligandisierte Albumin in der Zellkultur vermutlich als Kulturmedium einsetzbar wäre und es in manchen Bereichen auch das Fetale Kälber Serum ersetzen könnte.

4.1.1.2 Stoffwechselaktivierung – XTT Bestimmung

Der XTT Test ist ein auf Tetrazoliumverbindungen basierender Test. Tetrazoliumverbindungen, wie MTT und XTT werden durch Oxidoreduktasen zu colorimetrisch erfassbaren Formazansalzen reduziert (Mosmann 1983). Tests, die auf solche Tetrazoliumverbindungen basieren, ermöglichen die resultierende Zellwachstumsrate nach Einfluss einer zu testenden Substanz direkt mit Hilfe einer Zellkultur festzustellen, da bei gleichbleibender Zellaktivität der Umsatz von Tetrazolium mit der Zellzahl korreliert. So ist es möglich unbekannte Materialien zuverlässig auf wachstumshemmende Wirkung zu testen. Zusätzlich wurde von Gerlier und Thomasset (1986) der mit dem XTT verwandte MTT Test auch als Test für die Zellaktivität vorgeschlagen. Da bei gleichbleibender Zellzahl der Umsatz von Formazansalzen auch von der Konzentration von Reduktionsmitteln, wie NADPH abhängt. Der Umsatz spiegelt u.a. die mitochondriale Aktivität wieder, wobei auch andere Generatoren von Reduktionsmitteln, wie die zytosolische Glykolyse oder das P 450 System das Testergebnis beeinflussen können. Im Falle von XTT geht man heute davon aus, dass die Reduktion auf der Zellmembran stattfindet, da das wasserlösliche XTT schwer membrandurchlässig ist. Oxidative Prozesse dürften bei gleicher Zellzahl das XTT Ergebnis senken, da die Zahl an Reduktionsmitteln in der Zelle sinkt (Berridge 2005). In dieser Arbeit wurde der XTT Test daher auch im Zusammenhang mit der Zellzahl ausgewertet, um eventuelle zytotoxische Effekte in antiproliferative oder die Zellaktivität mindernde Effekte differenziert beurteilen zu können. Es ist damit ein Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest, der zur Erforschung von Wachstumsfaktoren, Nährstoffen, Zytokinen, sowie zytotoxischen und chemotherapeutischen Substanzen dient (Haubner 2010; Roehm 1991). Die Hauptaufgabe der Mitochondrien sowohl in Leberzellen als auch in anderen ist es, die frei werdende Energie in den universellen Energieträger ATP zu binden (Hinkle 1988). Sie stellen u.a. Energie für die Schaffung von Reduktionsmitteln wie NADH oder NADPH bereit. Eine Umwandlung bei toten Zellen ist nicht möglich, da nach dem Zelltod keine Reduktionsmittel mehr gebildet werden können (Cory 1991). Metabolisch aktive Zellen weisen eine höhere Aktivität der Mitochondrien auf als metabolisch inaktive (Seifert

1988). Laut Uludag (1990) bilden viele Zellen mehr Formazan pro Zelleinheit. Er wies eine Korrelation zwischen Zellzahl und Formazanbildung nach.

Betrachtet man die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, werden zwei Sachverhalte erkennbar. In den direkt gemessenen Werten des XTT Testes zeigt sich bei den höheren Zellzahlen des deligandisierten Albumins auch ein höherer Formazanumsatz. Wenig Zellzahlen bei A 10 und A 5 zeigen weniger Umsatz, viele Zellen bei DA 10 und DA 5 einen höheren Tetrazoliumumsatz.

Untersucht man die Aktivität pro Zelle wird allerdings deutlich, dass die Zellaktivität pro Zelle bei Anwesenheit der Stabilisatoren um einiges höher ist als bei CATE und NAT freiem Albumin. Dieser Effekt ist bei 5mmol/l Caprylat im 5% Albumin auch in der Verdünnungsreihe erkennbar. Es zeigt sich, dass der Tetrazoliumumsatz noch höher ist als beim deligandisierten Albumin (0 mmol/l). Bei den Verdünnungskurven ist allerdings auch für beide Stabilisatoren mit kleinen Schwankungen eine „parabelartige“ Kurve erkennbar. Während eine maximale Stimulation des Tetrazoliumumsatzes bei Konzentrationen um 1,25 mmol/l zu erkennen ist, nimmt darüber hinaus die Aktivität pro Zelle wieder ab. Die Bereitstellung von Reduktionsmitteln für die Formazanumsetzung ist hier nicht mehr steigerbar.

Für die mittelkettige Fettsäure Caprylat gäbe es eine logische Erklärung. Es ist bekannt, dass mittelkettige Fettsäuren, ungehindert in die Mitochondrien eindringen können. Sie müssen nicht erst durch das Coenzym A aktiviert und mittels Carnitin über die Mitochondrienmembran in die Matrix transportiert werden (Lindner et al. 2010). CATE kann demnach sofort in die Mitochondrien eindringen. Bei kleinen Konzentrationen kann daher über die Zellatmung mehr NADPH bereitgestellt werden, wobei bei höheren Konzentrationen die Mitochondrien mit Caprylat überflutet werden und es zu einer Übersättigung in den Mitochondrien kommt. Es kommt zur Erschöpfung der Mitochondrien und die Atmungskette zum Erliegen bzw. kommt es durch die Überflutung mit Radikalen zur Schädigung der Mitochondrien.

Hinsichtlich der essentiellen Aminosäure NAT könnte wohlmöglich dieselbe Aussage getroffen werden. Als Aminosäure kann sie in die Proteinsynthese der Mitochondrien involviert sein und somit die Mitochondrienmembran passieren bzw. In Stoffwechselprozesse der Mitochondrien eingebaut werden. Somit könnte der Mechanismus des NAT Einflusses ähnlich wie bei CATE erklärt werden.

Bei den errechneten Ergebnissen pro Zelle für die Plasmaproben stieg die Zellaktivität ebenfalls wie beim Albumin mit ansteigender CATE Konzentration an. Somit treffen alle vorangegangenen Aussagen zum Albumin gleichermaßen auch auf das Plasma zu.

4.1.1.3 Freisetzung von LDH

Die Laktat-Dehydrogenase ist ein stabiles Enzym mit einer Schlüsselstellung im anaeroben Stoffwechsel einer Zelle. Sie trägt außerdem zur Aufrechterhaltung der zellulären Glucosehomöostase bei und kommt im Zytoplasma jeder Zelle vor. Bei einer intakten Zelle ist LDH nur intrazellulär zu finden. Weiterhin katalysiert dieses Enzym auch die Oxidation von Laktat zu Pyruvat und ist in vielen verschiedenen Geweben nachweisbar (Bergmayer 1983). Ein Anstieg der LDH Aktivität über die Norm (120 bis 240 U/l im Blutserum) wurde bereits unter vielen pathologischen Bedingungen beobachtet. Als zytosolisches Enzym deutet ein erhöhter Nachweis von intrazytoplasmatischen LDH im Kulturmedium auf eine Zellmembranschädigung durch Permeabilitätsstörungen bzw. Zelltod hin. Daher wird es seit Jahren als Markerenzym eingesetzt, um das Absterben der Zellen in Kultur zu bestimmen. Allerdings können keine Rückschlüsse auf die Art des Zelluntergangs geschlossen werden (Haubner 2010; Viebahn et al. 1990; Gerlach et al. 1994). Aus diesem Grund dient die LDH Konzentration im Mediumüberstand der in dieser Arbeit untersuchten HepG2 / C3A Zellen als ein Maß für den vermehrten Zelltod. Diese genannten Erkennungsmerkmale spiegeln sich in den Ergebnissen dieser hier vorliegenden Experimente wieder. Die Werte der LDH Messung untermauern die Aussagen der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durch die Trypanblaumethode. Zeigen sich die Zellzahlen beim deligandisierten Albumin in einem großen Volumen mit einer geringen Anzahl an toten Zellen, so stimmt der niedrigere LDH Wert mit den Aussagen aus der Literatur überein. Im Gegensatz dazu, weist das kommerziell erhältliche Albumin zu seinen niedrigeren Zellzahlen und hohem Anteil an toten Zellen einen entsprechend hohen LDH Spiegel auf. Das einzig Auffällige in den Ergebnissen sind die Mediumkontrollen. Diese zeigen trotz hoher Zellzahl und wenig toten Zellen trotzdem sehr hohe LDH Werte im Überstand. Da die Mediumkontrollen im Zellvolumen und in der Vitalität sonst immer ähnlich dem deligandisierten Albumin waren, zeigt sich im LDH Spiegel ein großer Unterschied. Das deligandisierte Albumin hat den erwarteten niedrigen LDH Wert, der durch die Ergebnisse der Trypanblau-Methode angenommen wurde. Die Mediumkontrollen hingegen weisen eine ungewöhnliche und keineswegs erwartete hohe LDH Konzentration auf. Laut Lindemann (1995) zeigten sich in Untersuchungen auch hin und wieder mit zunehmendem Zellwachstum sehr hohe LDH Werte. Es wird davon ausgegangen, dass neben der Proliferation auch ein Zelluntergang in derselben Phase stattfindet. Ab einem gewissen Punkt überwiegt allerdings das Wachstum der Zellen und das Zellvolumen steigt trotz hohem LDH Wert weiter an (Lindemann 1995). Da die

Zellen im Medium die optimalen Wachstumsbedingungen haben, kann man davon ausgehen, dass die Proliferation schnell voran geschritten ist. Bei vollständiger Konfluenz der Wellwachstumsfläche befinden sich die Zellen in sehr engem Zell-Zell-Kontakt, sodass keine Oberfläche als Substrat frei vorhanden ist. Durch die Kontakthemmung kommt zur Verlangsamung der Zellteilungsrate. Des Weiteren werden die Nährstoffe knapp und die Zellen sterben ab. Somit kommt es zum eben genannten gleichzeitigen Zellwachstum und Zelluntergang. Dies könnte den erhöhten LDH Wert in den Mediumkontrollen erklären. Andererseits könnte die Zugabe vom Albumin selbst eine Rolle spielen. Da die Zellen zusätzlich Albumin im Medium hatten, könnten die metabolischen Komponenten des Albumins beim Erhalt der Zellen ebenfalls einen Einfluss gegeben haben. Diese Aussage könnte ebenso bei den Versuchen mit dem Gesundplasma zutreffen. In den Messwerten bei allen Plasmen wurden generell niedrigere LDH Konzentrationen im Gegensatz zu den Albuminen und Kontrollen gemessen. Zwischen den Plasmen selbst zeigt sich aber doch, dass mit steigender CATE Konzentration auch der LDH Spiegel steigt. Pro Zelle hingegen zeigt sich P 10 mit dem größten Umsatz. P 5 wiederum ist vergleichbar mit dem Gesundplasma und deligandisiertem Albumin, wie dies auch schon bei der XTT Messung der Fall war. Die Aussage, dass der Effekt von CATE im Plasma erst ab einer höheren Konzentration aufzutreten scheint, trifft nicht nur bei XTT sondern auch beim LDH zu. Dies könnte, wie schon erwähnt, an den im Plasma neben dem Albumin befindlichen Proteinen liegen. CATE kann schneller gebunden werden und somit sind kleine Konzentrationen nur minimal einflussreich.

Die niedrigen Zellzahlen mit entsprechender geringen Vitalität und dem ebenso dazugehörigen hohen LDH Spiegel im Medium weisen eindeutig auf eine Schädigung der Zellen durch CATE und NAT hin. Das einzig herausstechende und abweichende Merkmal ist die Zellaktivität pro Zelle via XTT Messung. Durch die drei anderen Proliferations- und Vitalitätstests dargelegten Ergebnisse, lässt sich der Verdacht bestätigen, dass die Aktivität der Zellen kurz vor ihrem Tod angestiegen sein muss. Durch die hohe Aktivität der Zellen, die Fremdstoffe abzubauen, und die nicht vorhandene bzw. unterdrückte Wachstumsphase der Zellen muss man davon ausgehen, dass die vorhandenen eingesäten Zellen bis zu einem gewissen Punkt mit der Situation des Metabolismus der beiden Stabilisatoren zurechtkommen. Dann aber gehen sie in eine Phase der Überanstrengung über was bis zum Tod führte.

4.1.1.4 Live Dead Färbung

An der in dieser Arbeit durchgeführte Live Dead Färbung erfolgte keine statistische Auswertung. Der Test diene lediglich der optischen Untermauerung der ermittelten Werte der bereits genannten Tests. Das Anfärben von lebenden und toten Zellen ist durch ein Gemisch spezieller Fluoreszenzfarbstoffe möglich. Lebende vitale Zellen werden unter dem Lichtmikroskop leuchtend grün wieder gegeben, tote Zellen mit geschädigter Zellmembran rot (Dehn et al. 2004; Dong et al. 2001). Aus dem Verhältnis von lebenden zu toten Zellen lässt sich der relative Anteil an abgetöteten Hepatozyten semiquantitativ ermitteln (Haubner 2010). Die Zellmembran fungiert im Falle des Zelltodes nicht mehr als Barriere zur Umgebung. Daher ist dies für den Nachweis von einer intakten bzw. geschädigten Zellmembran eine schnelle und praktische Methode zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Bakterien oder Zellen (Korber 1996).

Die während der Experimente festgehaltenen Bilder spiegeln die bereits ermittelten und ausgewerteten Ergebnisse der Zellproliferation- und vitalität wieder. Die erhöhte Anzahl an toten Zellen und das geringere Zelldichte beim Standard Albumin sind deutlich sichtbar. Im Gegensatz dazu sind die hohen Zellzahlen und die wenigen toten Zellen im deligandisierten Albumin und den Mediumkontrollen ebenfalls klar erkennbar. Genauso konnten die geringen Unterschiede der einzelnen CATE und NAT Konzentrationen aus den schon dargelegten Ergebnissen optisch veranschaulicht werden. Der negative Effekt von Caprylat und N-Acetyltryptophan als Stabilisatoren im Albumin konnte auch durch diesen Test nochmals bestätigt werden und untermauert alle anderen dargelegten Ergebnisse.

4.1.2 Bestimmung der Zytotoxizität – Cytochrom P450

Das Cytochrom P450 System besteht aus Hämproteinen, die in den Metabolismus vieler Arzneimittel und Xenobiotika, sowie endogener Substrate eingebunden sind. Sie katalysieren viele Reaktionen und ihre Substrate sind unter anderem Fettsäuren, Steroide, Prostaglandine und eine Vielzahl an körperfremden Verbindungen wie Arzneimittel und Ethanol. Sie werden in mehr als 3000 P450-Gene bzw. cDNAs und in mehr als 200 CYP Familien unterteilt. Es ist bekannt, dass 15 verschiedene Cytochrome am Arzneimittelmetabolismus beteiligt sind und einen entscheidenden Einfluss auf dessen Wirkung und Wirksamkeit haben (Bernhardt 2004).

4.1.2.1 Cytochrom P450 Aktivierung – CYP 1A2 mit Ethoxyresorufin

Für die Analyse der CYP Induktion wird häufig der Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Assay (EROD-Assay) verwendet. Es handelt sich um ein kinetisches Verfahren bei dem ein künstliches Substrat (7-Ethoxyresorufin) mit der Hilfe des Enzyms 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase in das messbare Endprodukt Resorufin umgewandelt wird (Burk & Mayer 1998; Haubner 2010). Diese Enzymaktivität wird als EROD Aktivität bezeichnet. Dieser EROD Assay eignet sich zur Darstellung der CYP 1A2 – Induktionsstärke. Diese CYP Familie ist für den oxidativen, peroxidativen und reduktiven Stoffwechsel von endo- und exogenen Stoffen von Bedeutung. Die CYP Enzyme oxygenieren das Substrat und vermindern somit die Lipidlöslichkeit, was eine Verbesserung der Elimination zur Folge hat. Die Präsenz von CYP 1A2 ist beim Menschen organspezifisch beinahe ausschließlich auf die Leber beschränkt. Die in dieser Arbeit verwendete Hepatozyten-Zelllinie HepG2 / C3A zeigt allerdings eine eher geringe Aktivität im P450 System. Durch Inkubation mit 3-Methylcholantren (3-MC) kann eine Aktivitätssteigerung auf ein 40-faches im Vergleich zum Ausgangswert bewirkt werden (Donato 1993). Aus diesem Grund kam es auch in den hier dargelegten Experimenten zum Einsatz des Stoffes 3-MC. Das mikrosomale Protein des Cytochrom P 450 Systems, welches für diesen Stoffwechsel verantwortlich ist, deethyliert in Gegenwart von NADPH Ethoxyresorufin zu Resorufin. Dieser Stoff ist sehr stark fluoreszierend und damit gut nachweisbar. Die entstandene Menge Resorufin gibt dann Aufschluss über die EROD-Aktivität (Auernhammer 2003).

Die Zellen zeigten in der Resorufinumsetzung starke Unterschiede zwischen den beiden eingesetzten Albuminen. Es wurde sofort deutlich, dass beide Stabilisatoren im Standard HSA einen hohen Einfluss auf das CYP 1A2 haben. Die gemessenen Werte des deligandisierten Albumins wiesen eine sehr viel geringere Umsetzung des Ethoxyresorufin in Resorufin auf. Auch die Aktivität von CYP 1A2 pro Zelle zeigte beim Standard Albumin eine bis zu 5-fach höhere EROD-Aktivität auf. Mit sinkender Albuminkonzentration und somit auch sinkender Stabilisatorkonzentration sank die EROD-Aktivität ebenfalls. Erst ab einer Konzentration von 2,5 % Albumin zeigten sich ähnliche Werte wie beim 10 %-igem deligandisiertem Albumin. Bei der Aufschlüsselung der beiden Stabilisatoren zeigte sich eindeutig, dass es zwischen CATE und NAT keine Unterschiede in der Induktion des Resorufinumsatzes gab. Auch hier sank die EROD-Aktivität mit sinkender Konzentration des jeweiligen Stabilisators. Wie auch bei allen anderen Tests zeigte sich hier erst zwischen der 1,25 mmol/l und der 0,6 mmol/l Konzentration ein deutlicher Sprung in der Reaktion. Zwischen diesen beiden

Konzentrationen sank der Umsatz rapide ab. Dieser Unterschied war bei NAT sogar noch etwas größer als bei CATE. Bei der Aktivität pro Zelle zeigten sich keine Signifikanzen zwischen den einzelnen Konzentrationen von 5 bis 1,25 mmol/l. Erst bei 0,6 mmol/l gab es wieder einen großen Sprung zur niedrigeren Aktivität. Es zeigt sich kaum ein Unterschied in der Resorufinumsetzung zwischen der 0,6 und 0 mmol/l Konzentration der beiden Stabilisatoren. Dasselbe Bild zeigte sich ebenfalls bei den Testreihen mit Plasma. Je mehr CATE im Plasma vorhanden war, desto größer war auch die Umsetzung des Ethoxyresorufins. Das Plasma ohne CATE war ähnlich dem deligandisierten Albumin. Aus diesen vorgelegten Daten lässt sich schließen, dass sowohl CATE als auch NAT einen stimulierenden Effekt auf das CYP 1A2 Enzym haben müssen und somit den Resorufinumsatz anregen. Die Stimulation zeigt sich bis zu einer minimalen Konzentration und kann somit schon durch kleine Mengen im kranken Körper zu Wechselwirkungen mit anderen Substanzen führen. Aus der Literatur ist bekannt, dass CYP 1A2 für den Arzneimetabolismus in der Leber mit verantwortlich ist. In wie weit diese Überstimulation des P 450 Systems für dieses spezielle Subenzym einen negativen Einfluss hat, müsste durch bestimmte Testmethoden wie z.B. die Proteomenanalyse noch genauer untersucht werden. Diese Daten könnten dann Aufschluss über die Veränderungen der Zellen darlegen. Durch die Stimulierung der Zellen mit 3-MC im Vorfeld und während des Testdurchlaufs, nachweisbar nochmals durch die Verabreichung von CATE und NAT, steigerte sich die EROD-Aktivität je nach Konzentration der Stabilisatoren um das bis zu 3-fache im Vergleich zu den Kontrollen. Diese stimulierende Wirkung neben 3-MC wurde schon bei anderen Stoffen nachgewiesen. So konnte Auernhammer (2003) einen 3-fach erhöhten Ethoxyresorufinumsatz durch die Zugabe von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in den Lebermikrosomen der Ratte erzielen. Auch das Substrat Phenobarbital konnte als Stimulator der EROD-Aktivität neben 3-MC von Mühlenfeld (2004) nachgewiesen werden. Zwar war die Steigerung nicht gleichermaßen wie bei Stimulierung mit 3-Methylcholandren, dennoch konnte eine eindeutige Aktivierung des CYP 1A2 erreicht werden. Es ist bekannt, dass CYP 450 Enzyme an der Synthese von Fettsäuren beteiligt sind (Mühlenfeld 2004). Dies könnte ebenfalls eine Schlüsselaussage hinsichtlich CATE und der Aktivierung des CYP 1A2 Enzyms sein. Durch das übermäßig enthaltene CATE könnte die Zelle angeregt sein die mittelkettige Fettsäure schnell abzubauen und somit die EROD-Aktivität ansteigen zu lassen. Wie die Daten der XTT Assay Auswertung ebenfalls zeigten, fielen die Zellen mit Standard Albumin durch eine sehr viel höhere Zellaktivität auf als die mit deligandisiertem Albumin. In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass die Stabilisatoren einen

negativen Einfluss auf die HepG2 C3A Zellen aufweisen. Hinsichtlich des CYP 1A2 Enzyms durch Caprylat muss konstatiert werden, dass dieser im Zusammenhang mit einer erhöhten Zelltoxizität, also einer Verschlechterung der Zellvitalität, verbunden war. Hier ist die Aktivierung des P 450 Systems unter Umständen die direkte Folge der Überladung der Mitochondrien und der Produktion toxischer Stoffwechselprodukte. Bei der Stimulation des P 450 Systems durch Tryptophan war dieses nicht mit einer schweren Zelltoxizität verbunden. Hier liegt nahe, dass die CYP Stimulation durch das 3-Methylcholantren unter Anwesenheit von Tryptophan stärker umgesetzt werden kann, da es als essentielle Aminosäure jede Proteinexpression positiv beeinflussen dürfte. Insbesondere ist Tryptophan eine wichtige Schlüsselaminosäure beim Elektrotransfer im Rahmen der P 450 Monooxygenasereaktion (Meints et al. 2013). Da die Zellteilung unterdrückt wird, kommt es auch nicht zum Zellwachstum und zur Versorgung mit neuen Zellen, welche den Stoffwechsel unterstützen könnten. Bezüglich des Einsatzes in der Medizin, könnte es durchaus zu Komplikationen in bestimmten Behandlungen führen, wenn dieses Enzym in einem so hohen Maß angeregt wird und es zu Wechselwirkungen verschiedener Medikamente kommt.

4.1.2.2 Cytochrom P450 Aktivierung – CYP 3A4 mit Verapamil

Ein weiterer Indikator für das Cytochrom P450 System ist Verapamil. Dieser Kalzium-Antagonist ist als Inhibitor des CYP 3A4 bekannt (Ogu & Maxa 2000). Er bindet an die Rezeptoren der Hepatozyten-Kalziumkanäle und vermindert so den Kalzium-Einstrom in die Zelle und den Kalzium-Anstieg im Zellkern. Die kalziuminduzierte Fragmentation sowie die Kalzium-Deregulation, als Ursache vom Zelltod, werden unterdrückt (Ray 1993). Verapamil vermindert außerdem die kalziumabhängige Aktivierung der Phospholipasen, was dazu führt, dass die Zellmembranauflösung und Arachidonsäurefreisetzung begrenzt wird (Grollman 1988). Verapamil verhindert die komplette Entleerung des Kalzium-Speichers des Endoplasmatischen Retikulums (ER), welches eine wichtige Rolle in dem Protein-, Lipid- und Detoxikations-metabolismus spielt. Unter in vitro Bedingungen wird das ER leichter als jede andere Zellstruktur zerstört. Dies macht die Bedeutung der Stabilisation des ER in vitro für den Erhalt der Zellfunktion deutlich. Des Weiteren schützt es die Mitochondrien vor einer Kalziumüberladung und hält somit die mitochondriale Funktion länger aufrecht (Sippel et al. 1993; De Pierre et al. 1988). Laut Lindemann (1995) wurden zusätzliche Proteinbanden mittels Gelelektrophorese entdeckt, was auf die wesentlichen eben genannten Verapamilwirkungen auf den Erhalt der Zellviabilität zurück zuführen sein könnte. Die Stabilisierung des ER könnte die zusätzlichen Proteinbanden erklären.

Diese Banden verschwanden allerdings wieder nach 24h aus den Proben, was sich durch die Halbwertszeit von Verapamil von 5 bis 7 Stunden erklären lassen könnte. Das Verapamil wurde über das CYP 3A4 im Cytochrom P450 System abgebaut und war offensichtlich nach 24 Stunden nicht mehr in wirksamen Konzentrationen in der Zellkultur vorhanden (Lindemann, 1995). Verapamil wird in verschiedene Metaboliten umgewandelt. Im Hinblick auf die verwendeten Hepatozyten wird am häufigsten das Norverapamil und D-617 umgesetzt. Es ist bekannt, dass die Interaktion von Medikamenten und anderen Stoffen (Bsp. Cimetidine) den Stoffwechsel anderer Substanzen (Bsp. Verapamil) beeinflussen können (Fischer 1997). Smith et al. (1984) zeigte einen signifikanten Effekt an pharmakokinetischen Parametern, wenn Verapamil oral verabreicht wurde.

Die Umsetzung von Verapamil über das CYP 3A4 Enzym in dieser Arbeit bestätigte die Aussage von Fischer (1997). Es konnten lediglich die Metaboliten D-617 und Norverapamil gemessen werden. Einzig bei den Plasmaproben wurden minimale Werte des D-702 Metaboliten ermittelt. In den direkten Messwerten wurde deutlich sichtbar, dass das stabilisatorfreie Albumin (5 %) wieder einmal im Vorteil gegenüber dem stabilisatorbeladenen Albumin (5 %) ist. Die Umsetzung von Verapamil in die beiden Metaboliten D-617 und Norverapamil bei den Zellen mit deligandisierten Albumin ist durch die hohe Zelldichte fast vier Mal größer. In den Berechnungen der Aktivität pro Zelle sinken diese Werte um ein vielfaches beim 5 %-igen Albumin. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen beiden Albuminen. Es fällt auf, dass die höchste Konzentration von beiden Metaboliten nur beim Standard Albumin ohne FKS Anteil zu verzeichnen waren (ohne Signifikanzen). Im Gesamtbild der Messwerte kann man die Aussage treffen, dass viele Zellen viel Verapamil metabolisieren. Was in diesem Fall zutreffend ist, da die Zellzahlen beim deligandisierten Albumin sehr viel höher waren als beim Standard Albumin. Dennoch ist die Umsetzung pro Zelle sehr gering. Die Frage stellt sich nun, ob das Zellwachstum auch in diesem Falle eine Rolle spielt. Eindeutig lässt sich mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen sagen, dass sich keine Stimulation des CYP 3A4 Enzyms im Cytochrom P 450 Systems nachweisen lässt. Einzig beim 10-%igen Standard Albumin war eine etwas höhere Aktivität (ohne Signifikanz) zu erkennen. Der Metabolismus des Verapamils über das CYP 3A4 Enzym war dennoch nachweisbar. Allerdings gibt es keinen Beweis dafür, dass die Stabilisatoren wie beim Resorufin den Umsatz stimulieren bzw. steigern. Es gibt keinen direkten Effekt von CATE und NAT auf das CYP 3A4 Enzym des Cytochrom P 450 Systems. Im Gegensatz zu der stimulierenden

Wirkung auf das CYP 1A2 ist die Reaktion auf das Verapamil lediglich Ausdruck der besseren Zellzahl und –vitalität bei der Kultivierung im deligandisiertem Albumin. Durch weiterführende Tests mit deutlich mehr Datenvolumen könnten eventuell bessere Aussagen getroffen werden und die, in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen oder widerlegen.

4.2 Zelllinie L929 – Fibroblasten

Neben den Wirkungen auf Leberzellen und den damit verbundenen Therapien, sollte auch der Effekt auf eine andere Zelllinie untersucht werden. Insbesondere sollte dabei analysiert werden, ob die Wirkungen spezifisch für Leberzellen sind. Aus diesem Grund wurden in einer weiterführenden Testreihe außerdem Fibroblasten in einige Tests einbezogen. Fibroblasten (hauptsächlich von Nagetieren) werden laut dem AMG zur Testung von Toxizität von Medikamenten in erster Linie verwendet, da diese unspezifisch und widerstandsfähig sind. Sie sind im Bindegewebe vorkommende Zellen mesenchymaler Herkunft, die hauptsächlich für die Bildung von Kollagen verantwortlich sind.

Auch auf die Fibroblasten hatten CATE und NAT einen inhibierenden Einfluss auf das Zellwachstum. Bezüglich der Zellzahlen wurde deutlich, dass die Proliferation der Fibroblasten durch beide Stabilisatoren unterdrückt wird. Die Zellzahlen des deligandisierten Albumins waren meist doppelt so hoch wie beim normalen Standard Albumin. Auch in den Live Dead Bildern spiegelt sich dieses Ergebnis deutlich wieder. Die Zellzahlen sind beim deligandisierten Albumin nachweisbar höher. Bei den Einzelkonzentrationen zeigte sich dann, dass mit sinkender Stabilisatorkonzentration die Zellzahlen anstiegen. Der Unterschied zu den HepG2 / C3A Zellen liegt allerdings darin, dass bei den Fibroblasten die negative Wirkung schon bei einer Konzentration von 1,25 mmol/l nachlässt. Die Vitalität der Zellen wird bei den Fibroblasten nicht stark angegriffen.

Es lässt sich außerdem sagen, dass hier nur das Wachstum der Zellen eingeschränkt wird, nicht aber die Vitalität. Auch die LDH Werte lagen bei beiden Albuminen in den gleichen Konzentrationen vor. Einzig in der XTT Aktivität zeigten sich wieder ähnliche Unterschiede zwischen dem Standard- und dem deligandisiertem Albumin, wie bei den C3A Zellen zuvor. Die Zellen mit den Stabilisatoren haben eine sehr viel höhere Aktivität pro Zelle. Somit lässt sich dieselbe Reaktion wie bei den C3A Zellen feststellen und ebenso erklären. Der NADPH Haushalt der Fibroblasten zeigt dieselbe Erschöpfung. Das die Toxizität bei diesen Zellen weniger ausgeprägt ist kann darin

liegen, dass sie weniger Mitochondrien haben als Leberzellen. Dies könnte der Grund sein, dass die Bildung von Radikalen durch die mitochondriale Überflutung von Caprylat weniger ausgeprägt ist.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Live Dead Färbung von den Fibroblasten zeigen phänotypische Veränderungen der Zellmorphologie. Während die typische Struktur der Fibroblasten mit dem langgestreckten Zellkörper und den Fortsätzen beim Standard Albumin deutlich erkennbar ist, sind beim deligandisiertem Albumin die Zellen ohne Ausläufer und rund. Dies kann sich durch die hohe Zelldichte erklären lassen. Da die Zellen mit dem deligandisiertem Albumin deutlich besser und schneller gewachsen sind, sind sie über den Monolayer hinaus gewachsen. Dies bedeutet, dass die Zellen schon übereinander wachsen. Sie haben keinen Platz mehr direkt neben einander und fangen an übereinander zu wachsen und sich abzulösen. Dies könnte eine Erklärung für die untypische Fibroblastenform sein. Da die Zellen mit dem Standard Albumin schlechter wachsen, haben diese noch genügend Platz um größere Flächen auszufüllen.

Es wäre vorstellbar in zukünftigen Testreihen die Wirkung von CATE und NAT an weiteren Zelllinien auszutesten. Somit könnte der Wirkungsgrad dieser beiden Stoffe besser eingegrenzt und der Einsatz von Albumin verbessert werden.

4.3 Patienten

Die Hauptaufgabe bei der Therapie des Leberversagens ist die Vermeidung von sekundären Organversagen, wie z.B. der hepatischen Enzephalopathie oder des hepatorenenalen Syndroms. Studien haben gezeigt, dass die intravenöse Verabreichung von Albumin bestimmte Komplikationen vermeiden kann. Dennoch zeigen sich bei den Patienten mit Multiorganversagen nicht gewünschte oder nur geringfügige Leistungen (Stange et al. 2011; Gines et al. 1996; Finfer et al. 2006). Um das Humane Serum Albumin haltbar und lagerfähig zu machen, wurden ihm die beiden Stabilisatoren CATE und NAT hinzugefügt. Spätere Forschungen zeigten, dass beide Stoffe an der Bindungsstelle II des Albuminmoleküls binden. Diese Stelle ist allerdings für Stoffe vorgesehen, welche bei Lebererkrankungen vermehrt auftreten bzw. bei Komplikationen beteiligt sind (Kragh-Hansen 1990). Therapeutisches HSA sollte im Stande sein freie Bindungsstellen bereit zu stellen um die Bindungskapazität der Toxine im Organismus zu erhöhen. Diese Bindungsstellen werden durch CATE und NAT beansprucht und verdrängen somit die zu bindenden Toxine im Blut des Patienten. Des Weiteren führen diese beiden Stoffe zu Komplikationen. Es ist bereits

bekannt, dass sowohl CATE als auch NAT die Pathogenese des Leberkomas verstärken können (Mitkov 1988). In vorangegangenen Studien von Stange et al. (2009, 2011) kam in der Behandlung von Lebererkrankungen bereits das deligandisierte Albumin zum Einsatz. Es zeigten sich deutliche Verbesserungen des Gesundheitszustandes und eine Verminderung der gemessenen Toxine im Blut der Patienten, wenn das stabilisatorfreie Albumin zum Einsatz kam. Auf diesen beiden Studien basiert eine neu entwickelte Methode zur Leberunterstützung, die so genannte Rezirkulation. Bei dieser Behandlung kommt es zur Anwendung von mehreren Hepalbin-Adsorbentien der Firma Albutec, welche das Standard Albumin vor der Anwendung am Patienten auf reinigen und von CATE und NAT fast vollständig befreien. Dieses Therapieverfahren wurde mit dem schon bekannten MARS Verfahren in einer randomisierten Cross Over Studie eingesetzt. Da vorausgehende Untersuchungen bestätigt haben, dass durch die bisher im MARS-Verfahren eingesetzten Adsorbentien nicht nur die Elimination von CATE und NAT aus dem Albumindialysat unvollständig ist, sondern bei der üblicherweise hohen Konzentrationen von 15 bis 20 % Albumin auch während der initialen Behandlung aus dem Dialysat in das Patientenblut einströmt. Es wurden den Patienten vor und nach jeder Behandlung Blut entnommen und das daraus resultierende Plasma kam unter anderem zum Einsatz in einer in dieser vorgelegten Arbeit durchgeführten Testreihe. Es sollte den Einfluss der Stabilisatoren bei der Albumin Dialyse auf zellulärer Ebene aufzeigen. Es wurden beide Leberunterstützungsverfahren in Bezug auf Zellzahl, Vitalität und CYP 1A2 Aktivierung miteinander verglichen. Es zeigten sich eindeutige Signifikanzen bei der Rezirkulation zwischen Beginn und Ende der Behandlung. Bei den Zellzahlen zeigte sich nur bei der Rezirkulation ein nachweisbarer Anstieg, nicht so bei der MARS Behandlung. Dies spiegelt die Ergebnisse der mit Albumin durchgeführten Testreihen in dieser Arbeit wider. Auch bei den Vitalitäten zeigten sich in den Patientenplasmen ähnliche Ergebnisse wie in den zuvor dargelegten Daten der Gesundplasmaproben mit und ohne CATE. Es waren hier keine Veränderungen zwischen Beginn und Ende beider Leberunterstützungsverfahren nachzuweisen. Die Vitalitäten lagen von Anfang an in einem guten Bereich, der keine Einschränkung auf die Zellen zeigte. Dies kann man wiederum mit derselben Begründung wie bei den Gesundplasmaproben darlegen. Plasma enthält neben dem Albumin noch weitaus mehr Proteine, welche beim Einwirken auf die Zellen eine Rolle spielen könnten.

Die Ergebnisse des Ethoxyresorufintests spiegelten ebenfalls die gleichen Erkenntnisse wider, welche schon bei den Testreihen mit beiden Albuminen gemacht wurden. In der MARS Behandlung kommt es zum Einsatz von stabilisatorbehaftetem

Albumin, was sich in der Stimulation des CYP 1A2 Enzyms widerspiegelt. Hier kam es zu keiner Verminderung der EROD-Aktivität zwischen Beginn und Ende der Behandlung. Bei der Rezirkulation hingegen, in der das deligandisierte Albumin Verwendung fand, kam es eindeutig zu einer signifikanten Abnahme der CYP Aktivität. Somit kann durch diese Ergebnisse dargelegt werden, dass die Stabilisatoren auch hier einen Einfluss auf die Stimulierung des CYP 1A2 führen. Dies könnte durch effektivere Entgiftung nach der Behandlung zu einer Normalisierung der P 450 Aktivität führen.

Durch die Studien von Stange et al. konnte bereits in Anfängen gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität des deligandisierten Albumins eindeutig besser zu sein scheint als beim Standard Albumin. Die Toxine werden durch die Stabilisatoren nicht verdrängt und können somit besser an die Bindungsstellen des Albumin Moleküls binden und abtransportiert werden. In den hier vorliegenden Ergebnissen konnte durchaus die Wirkung von CATE und NAT auch in vivo dargelegt werden, wobei in vivo natürlich auch andere Toxine eine Rolle spielen. Die vorangegangenen Daten mit den Albumin Testreihen wurden auch bei Verwendung von Patientenplasma untermauert. Es zeigt sich, dass die Wirkung auf die Leberzellen durch das deligandisierte Albumin eindeutig besser zu sein scheint. Die Zellen können sich schneller regenerieren und das Zellwachstum kommt nicht zum Erliegen, was bei der Regeneration der Leber bei Patienten mit einer Lebererkrankung von Belang ist. Die Anreicherung der Stabilisatoren wird vermieden und es können weniger Komplikationen auftreten. Auch hier spiegelt sich die Vermutung wider, dass das deligandisierte Albumin ein eindeutig physiologischerer Plasmaersatz ist. Des Weiteren konnte in Anfängen gezeigt werden, dass die Leberunterstützungstherapie durch die Rezirkulation zu besseren Effekten führt als mit MARS. Es sollten dennoch in folgenden Studien weitere Tests in der Zellkultur mit Patientenplasmen durchgeführt werden, um noch bessere und klarere Aussagen treffen zu können.

4.4 Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten konnten den negativen Effekt der im kommerziell erhältlichen Albumin vorhandenen Stabilisatoren CATE und NAT verdeutlichen. Aus vorangegangenen Studien war bereits bekannt, dass sowohl Caprylat als auch N-Acetyltryptophan negative Wirkungen auf Patienten mit Lebererkrankungen haben (Kristev et al. 1992; Mitkov 1988; Mitkov 1993; Blei 2000; James et al. 1979; Ono et al. 1978; Kragh-Hansen 1991). Durch den häufigen Einsatz von Albumin in der Therapie

von Erkrankungen von Leber und Niere, nimmt es eine wichtige Rolle in der heutigen Medizin ein. Durch das Zusammenwirken von Albuminmangel und Anreicherung von Toxinen im Organismus durch Lebererkrankungen ist es wichtig, durch Leberunterstützungstherapien diese Toxine aus dem Körper zu entfernen und den Albuminverlust auszubalancieren. Albumin besitzt spezielle Bindungsstellen für die im Körper gebildeten Toxine und andere Substanzen. Diese Bindungsstellen sind allerdings beim herkömmlichen Standard Albumin bereits durch die Stabilisatoren besetzt. Die Bindungsaffinität des Albuminmoleküls ist somit eingeschränkt und kann seine medizinische Funktion nicht voll ausschöpfen (Kragh-Hansen 1991; Klammt et al. 2009, Stange et al. 2011). Durch eine Studie von Stange et al. (2011) konnte gezeigt werden, dass die Effektivität des Albumins gesteigert werden konnte, wenn die Stabilisatoren CATE und NAT entfernt wurden. Des Weiteren können Komplikationen und eine Verschlechterung des Krankheitszustandes verhindert werden. Hier setzen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an. Es konnte in einem in vitro Zellkulturversuch verdeutlicht werden, in wie weit der negative Effekt der beiden Stabilisatoren aus dem Albumin in direktem Weg auf die Leberzellen wirkt. Die wichtigste Aussage durch die ermittelten Daten ist, dass sowohl CATE als auch NAT einen sehr starken negativen Einfluss auf die Zellproliferation und die Zellvitalität haben. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Leberzellregeneration bei Patienten mit Lebererkrankungen ebenfalls durch die beiden Stabilisatoren gehemmt werden könnte. Durch die Unterdrückung der Zellteilung bzw. Zellneubildung kann es nicht oder nur unzureichend zu einer Regeneration der Leber bzw. Verbesserung des Gesundheitszustandes des Patienten kommen.

Die starken Stoffwechselreaktionen, wie sie sich beim EROD bzw. XTT Assay zeigten, wiesen auf eine Überreaktion der Zellen hin. Sind die Stabilisatoren nicht im Albumin enthalten, zeigen die HepG2 / C3A Zellen eindeutig einen besseren Proliferations- und Vitalitätszustand. Somit lässt sich auf die Studie von Stange et al. (2011) aufschließend sagen, dass Albumin nicht nur mehr Bindungsfähigkeit ohne die Stabilisatoren aufweist, sondern ebenfalls in die Leberzellregeneration positiv einwirken kann. Die Toxine können durch die Leberersatzverfahren mit Hilfe des deligandisierten Albumins effektiver gebunden und entfernt werden. Damit können CATE und NAT keinen negativen Einfluss auf den Gesundheitszustand des Patienten nehmen. Die Leber kann sich vermutlich schneller regenerieren.

Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Therapie mit deligandisiertem Albumin effektiver, schneller und vorteilhafter für Leberpatienten sein kann. Die, in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse für die Zellkulturtests mit den Patientenplasmen können

ebenfalls an die Studie von Stange et al. anschließen und diese in vitro bestätigen. Das Leberersatzverfahren Rezirkulation wurde mit gereinigtem Albumin durchgeführt und zeigte deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Zellzahlen und der EROD Aktivität. Diese signifikant besseren Ergebnisse konnten bei der MARS Therapie nicht dargelegt werden. Dies unterstützt die Aussagen von Stange et al. (2009, 2011) in den an Patienten durchgeführten Studien. Auch in den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich definitiv die Aussage bestätigen, dass das deligandisierte Albumin ohne die beiden Stabilisatoren einen positiveren Effekt auf Zellen bzw. Patienten hat.

Der Einsatz des stabilisatorfreien Albumins als Plasmaersatz konnte ebenfalls als positiv belegt werden. Es wurde gezeigt, dass das Plasma in Bezug auf Albumin in der Zellkultur immer besser ausfällt, da es mehr Bestandteile enthält, die vom Organismus benötigt werden. Dennoch kann man eindeutig durch die hier vorliegenden Daten belegen, dass die Wahl von deligandisiertem Albumin als Plasmaersatz die bessere wäre. Nicht nur der Einsatz des stabilisatorfreien Albumins in der Medizin bei Leberunterstützungsverfahren, Albumininfusion und Plasmaersatz kann empfohlen werden. Es ist durchaus denkbar, dass die Anwendung von deligandisiertem Albumin genauso in der Zellkultur seinen Platz finden könnte. Bis heute wird das tierische fetale Kälberserum zur Kultivierung von Zellen eingesetzt. Es ist ein wirksamer Zusatz, der die Kultivierung von Zellen schnell und gut ermöglicht. Dennoch muss man davon ausgehen, dass ein humaner Stoff, wie das deligandisierte Albumin, vielleicht doch effektiver wäre. Es könnte durch Versuche ausgetestet werden, ob die Effektivität der Zellproliferation und Vitalität durch das stabilisatorfreie Albumin gesteigert und somit die Zeit der Kultivierung verkürzt werden könnte. Des Weiteren sollte der Einsatz in Bioreaktoren überdacht werden, da auch hier die Verwendung eines humanen Stoffes einen großen Vorteil darstellt. In all diesen Anwendungsgebieten könnten die Erfolge deutlicher werden, wenn das deligandisierte Albumin eingesetzt werden würde. Sicherlich ist es notwendig weitere Tests durchzuführen, um eventuelle Fehlerquellen besser ausschließen zu können. Außerdem kann man durch eine höhere Anzahl an Werten, die Statistik deutlicher darstellen und die Daten werden aussagekräftiger. Es sind weitere Studien geplant, um die Effektivität des deligandisierten Albumins direkt an Leberpatienten zu untermauern und klar darzulegen. Es sollte allerdings auch weiterhin der Einsatz in der Zellkultur nicht außer Acht gelassen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die vermutete negative biologische Wirkung von CATE und NAT dargelegt und bestätigt werden. Durch die gezeigten Daten können die Einsatzmöglichkeiten der Albuminlösungen für therapeutische Anwendungen in der Medizin verbessert und definitiv erweitert werden. Trotz noch weiterer Studien und

Testreihen wird jetzt schon davon ausgegangen, dass ein humanes Serum Albumin ohne die beiden Stabilisatoren CATE und NAT ein effektiveres Arzneimittel darstellt und weitere Einsatzmöglichkeiten in der medizinischen Forschung bietet.

4.5 Fehlerbetrachtung

In allen Versuchsansätzen wurde steril gearbeitet. Die Reagenzien wurden nach Vorschrift angefertigt und wie beschrieben auf die Zellen gegeben. Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass in den Versuchsabläufen kleine Fehler unterlaufen sein könnten. Jeder Ansatz wurde an einen anderen Tag angefertigt, wodurch interserielle Abweichungen möglich sind. Obwohl die Zellen aus derselben Charge stammten, könnte es doch Unterschiede gegeben haben. Die Zellen waren demnach nie gleich alt. Dies könnte leichte Einflüsse auf den Versuch gehabt haben. Des Weiteren könnten beim Pipettieren kleine Abweichungen der hinzugegebenen Mengen aufgetreten sein. Das Anfertigen der einzelnen Konzentrationen kann durch das Abwiegen der hinzugegebenen Stabilisatoren leichte Unterschiede aufweisen. Auch das Ansetzen der benutzten Reagenzien der einzelnen Tests kann durch Umwelteinflüsse von Tag zu Tag leicht abweichen. Bei der Anwendung der Geräte lassen sich bestimmte Fehlerberechnungen ebenfalls nicht ausschließen. Dennoch kann diese Arbeit mit gutem Gewissen die Ergebnisse darlegen, da immer darauf geachtet wurde, ob es starke Abweichungen zu den vorhergehenden Tests gab. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils in einem gepaarten Test, wenn die Exposition an der Zellkultur untersucht wurde.

5 Zusammenfassung

Das Leberversagen ist eine schwerwiegende Erkrankung, welche zur Störung der Entgiftungsfunktion und Ausfall der Synthesefunktion der Leber führt. Ohne medizinische Behandlung kann die Ansammlung der Toxine durch die Entwicklung sekundärer Organversagen bis zum Tod des Patienten führen. Das häufigste Arzneimittel, was hierbei zum Einsatz kommt, ist das Humane Serum Albumin. Dieses verfügt allerdings über Stabilisatoren, denen schädigende Wirkungen nachgewiesen wurden. Die Firma Albutec entwickelte ein neues Verfahren zur Entfernung dieser Stabilisatoren. Mit Hilfe des Hepalbin-Adsorbers wies das Albumin nahezu physiologische Werte, durch die Elimination der Stabilisatoren, von über 95 % auf (Albutec GmbH). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen schließt diese hier vorliegende Arbeit an.

In dieser Promotionsarbeit soll die biologische Wirkung der beiden Stabilisatoren in vitro an einer humanen Leberzelllinie (Hepatozyten Zelllinie - HepG2 / C3A) dokumentiert werden. Ziel war es, die negativen Effekte von Caprylat und N-Acetyltryptophan durch verschiedene Testmethoden zu charakterisieren. Im Gegenzug sollte ebenfalls die verbesserte Effektivität von Albumin ohne beide Stabilisatoren dargelegt und die Erkenntnisse von Stange et al. untermauert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Caprylat als auch N-Acetyltryptophan einen starken Einfluss auf die C3A - Leberzellen haben. Es kam bei beiden zur Unterdrückung der Zellproliferation. Dies bedeutet, dass die Zellen nicht im Stande waren sich zu vermehren. Hinsichtlich der Vitalität konnte belegt werden, dass Caprylat toxischer auf die Zellen wirkte als das N-Acetyltryptophan. In den Zytotoxizitätstests wurde eine starke Überreaktion der Zellen auf Caprylat festgestellt. Hier war die Toxizität verbunden mit einer erhöhten mitochondrialen Aktivität und P 450 Aktivität des Subenzym CYP 1A2 erkennbar. Dies muss dahingehend im Zusammenhang mit toxischen Effekten gewertet werden.

Die Aktivierung des P 450 Systems durch N-Acetyltryptophan war nicht mit einer höheren Toxizität verbunden, so dass hier der Einbau von Tryptophan in P 450 System beteiligte Proteine als Mechanismus der Stimulation verstanden werden könnte.

Die Aktivierung des Subenzym 3A4, gemessen an der Verapamilmetabolisierung war weniger ausgeprägt als beim CYP 1A2.

Die HepG2 / C3A Zellen, welche mit dem deligandisierten Albumin versorgt wurden, zeigten nahezu gleich gute Reaktion wie die Kontrollen. Die Zellproliferation und –

vitalität waren sehr gut und die Stoffwechselreaktion genauso normal wie bei den Mediumkontrollen.

Des Weiteren konnten Plasmen in der Zellkultur getestet werden, welche Patienten vor und nach der Behandlung mit Standard Albumin oder deligandisiertem Albumin entnommen wurden. Es zeigte sich ebenfalls ein positiverer Effekt nach der Behandlung mit deligandisiertem Albumin. Es kann also stark davon ausgegangen werden, dass der Einsatz von stabilisatorfreien Albumin in der Medizin sehr von Vorteil wäre. Toxine können schneller und effektiver entfernt werden, es kommt zu keiner Überreaktion der Zellen und somit zu weniger Komplikationen. Die Leberzellen können sich schneller regenerieren und die Leber wieder schneller ihre Entgiftungs- und Synthesefunktion selbst übernehmen. Dies sind die Hauptaufgaben der Leberersatzverfahren und mit Hilfe des deligandisierten Albumins kann man davon ausgehen, dass die Ziele der Therapie schneller erreicht werden können. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das stabilisatorfreie Albumin ein besserer Plasmaersatz darstellt als das herkömmlich erhältliche Standard Albumin.

Weiterhin ist es denkbar, dass neue Einsatzmöglichkeiten für das Albumin erschlossen werden können, wenn die störenden und funktionsunterdrückenden Stabilisatoren nicht mehr enthalten sind. Der Einsatz von deligandisiertem Albumin in der Zellkultur wäre durchaus vorstellbar und umsetzbar.

In Zukunft könnten weitere Tests an anderen Zelllinien durchgeführt werden, um mehr Klarheit über das Ausmaß der Reaktionen auf Caprylat und N-Acetyltryptophan im gesamten Organismus zu bekommen. Ebenfalls kann der Einfluss auf Proteine durch die Proteomenanalyse nachgewiesen werden, um die unterschiedlichen Mechanismen der P 450 Aktivierung durch Caprylat und N-Acetyltryptophan zu entschlüsseln. Diese Untersuchungen und weitere Studien an Patienten können die hier vorliegenden Erkenntnisse untermauern und den Einsatz in der Medizin festigen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, J., Painter, B., & Payne, W. (1963). Effect of sodium caprylate on *Candida albicans*. I. Influence of concentrations on ultrastructure. *J Bacteriol*, 86: 548-57.
- Albrecht, J., & Jones, E. (1999). Hepatic encephalopathy: molecular mechanism underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci*, 170(2): 138-46.
- Albutec GmbH. (2007). *Hepalbin Adsorber und Albumin funktioniert*. Rostock: Infoheft Albutec.
- Arakawa, T., & Kita, Y. (2000). Stabilizing effect of caprylate and N-Acetyltryptophan on heat induced aggregation of bovine serum albumin. *Biochem et Biophys Acta*, 1479: 32-36.
- Auernhammer, J. (2003). *Einfluss von TCDD auf Arzneimittelstoffwechsel am Beispiel von Imipramin*. München: Dissertation, Universität München.
- Banares, R., Nevens, F., & et al. (2010). Extracorporeal liver support with Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) in patients with acute-on-chronic liver failure (AOCLF). *Hepatology*, 52: 459-60.
- Belinsky, S., Poop, J., Kaufmann, F., & Thurman, R. (1984). Trypan Blue uptake as a new method to study hepatotoxicity in the perfused liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 230:755-60.
- Bergeron, M., Reader, T., & Butterworth, R. (1991). Early changes of serotonin turnover in brain following portocaval anastomosis: relation to altered sleep patterns and diurnal rhythms? Progress in Hepatic Encephalopathy and Metabolic Nitrogen Exchange. *F.Bengtsson. Boca Raton: CRC Press*, 219-32.
- Bergmeyer, H. (. (1983). *Enzymes 1: Oxidoreductase, Transferases*. In: *Methods of enzymatic Analysis, Volume III*. Weinheim: Verlag Chemie Weinheim.
- Bernal, W., Auzinger, G., & et al. (2010). Acute liver failure. *Lancet*, 376 (9736): 190-201.
- Bernau, J., Rueff, B., & Benhamon, J. (1986). Fulminant and Subfulminant Liver Failure. Definition and Causes. . *Seminars in Liver Disease*, 6: 97-106.
- Bernhardt, R. (2004). Cytochrom 450: versatile Enzymsysteme mt Anwendung in der Biotechnologie und Medizin. *Biochemie*, Universität Saarland.
- Berridge, M., Herst, P., & Tan, A. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Ammu Rev*, 11:127-52.
- Blei , A. (2000). *Fulminant hepatic failure. Liver Disease: Diagnosis and management*. New York: Hg BR Bacon and AM DiBesceglie, Churchill Livingston.

- Blei, A., Olafsson, S., Therrien, G., & Butterworth, R. (1994). Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portocaval anastomosis. *Hepatology*, 19: 1437-44.
- Bomzon, A., Holt, S., & et al. (1997). Bile acids, oxidative stress and renal function in biliary obstruction. *Semine Nephrol*, 17 (6): 549-62.
- Borg, J., Warter, J., Schlienger, J., & et al. (1982). Neurotransmitter modifications in human cerebrospinal fluid and serum during hepatic encephalopathy. *J Neurol Sci*, 57:343-56.
- Bosch, J., & Garcia-Pagau, J. (2000). Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol*, 32 (1): 141-56.
- Breyer, H., & Walter, W. (1991). *Lehrbuch der Organischen Chemie*. Stuttgart: Hirzel Verlag.
- Breyer, H., & Walter, W. (1991). *Lehrbuch der Organischen Chemie*. Stuttgart: Hirzel Verlag.
- Brunner G. (1992). Plasmapherese und Detoxifikation. 63: 999-1002.
- Burke, M., & Mayer, R. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal - o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methyl cholanthrene. *Drug Metab Dispos*, 2(6): 583-88.
- Canand. (2009).
- Carpenedo, R., Mannaioni, G., & Moroni, F. (1998). Oxindole, a sedative tryptophan metabolite, accumulates in blood and brain of rats with acute hepatic failure. *J Neurochem*, 70:1998-2003.
- Clemmensen, J., Kondrup, J., & et al. (2001). Effects of high-volume plasmapheresis on ammonia, urea, and amino acid in patients with acute liver failure. *Am J Gastroenterol*, 96(4): 1217-23.
- Clemmensen, J., Larsen, F., & et al. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology*, 29 (3): 648-53.
- Conn, H., & Lieberthal, M. (1979). *The Syndrom of Portal-Systemic Encephalopathy, Pathogenesis of Portal-Systemic Encephalopathy. The Hepatic Coma Syndroms and Lactilose*. Baltimore: 1-121: Williams & Wilkins.
- Cordoba, J., & Blei, A. (1996). Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis*, 16 (3): 271-80.
- Cordoba, J., & Blei, A. (2007). *Hepatic Encephalopathy*. Philadelphia: Schiff's Diseases of the Liver. 2: 569 ff.

- Cordoba, J., & Minquez, B. (2008). Hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis*, 28 (1): 70-80.
- Cory, A., Owen, T., Barltrop, J., & Cory, J. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, 3: 207-12.
- De Pierre, J., Anderson, G., & Dallner, G. (1988). *Endoplasmatic Reticulum and Golgi Complex; in Arias IM, Jakoby WB, Popper H et al: The Liver Biology and Pathobiology*. NY: Raven Press.
- Dehn, P., White, C., Comers, D., Shipkey, G., & Cumbo, T. (2004). Characterization of the human hepatocellular Carcinoma (HepG2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 40(5-6): 172-82.
- Dong, Z., Venkatachalam, M., Weinberg, J., Saikumar, P., & Patel, Y. (2001). Protection of ATP-depleted cells by impermeant strychnine derivatives: implications for glycine cytoprotection. *Am J Pathol*, 158(3): 1021-28.
- Ellis, A., Hughes, R., & et al. (1996). Pilo-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology*, 24 (6): 1446-51.
- Endo, Y. (1980). In vivo deacetylation of N-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats. *Biochem Biophys Acta*, 628: 13-18.
- Endo, Y. (1980). In vivo deacetylation of N-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats. *Biochem Biophys Acta*, 628:13-18.
- Evenepoel, E., Maes, B., & et al. (2003). Detoxifying capacity and kinetics of the molecular adsorbent recycling system. Contribution of the different inbuilt filters. *Blood Purif*, 21(3): 244-52.
- Evenepoel, P., Laleman, W., & et al. (2005). Detoxifying capacity and kinetics of Prometheus - a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *Blood Purif*, 23(5): 349-58.
- Falkenhagen, D., Strobl, W., & et al. (1999). Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *J Artif Organs*, 23(1): 81-6.
- Fernstrom, J., & Wurtman, R. (1972). Brain serotonin content: Physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*, 178:414-16.
- Finfer, S., Belloneo, R., McEvoy, S., & et al. (2006). Effect of baseline serum albumin concentrations on outcome of resuscitation with albumin or saline in patients in intensive care units: analysis of data from the saline versus albumin Fluid evaluation (SAFE) study. *BMJ*, 333:1044.

- Fischer, U., Rohde, B., Wacke, R., & Stange, J. (1997). Prediction of in vivo Drug interaction from in vitro systems exemplified by interaction between Verapamil and Cimetidine using human liver microsomes and primary hepatocytes. *J Clin Pharmacol*, 37: 1150-59.
- Garg. (2000).
- Gerlach, J., Emcke, J., Muller, C., & et al. (1994). cell culture model for hepatocyte culture in ioreactors for metabolic utilization in hybrid liver support system . *J Zentralbl Chir*, 119: 334-40.
- Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*, 94(1-2): 57-63.
- Gines, A., Fernandez-Esparrach, G., Monescillo, A., & et al. (1996). Randomized trial comparing albumin, dextran 70, and polygeline in cirrhoris patients with ascites treated by paracentesis. *Gastroenterology*, 111:1002-10.
- Green, G. (1977). Mechanism of hypogonadism in cirrhotic males. *Gut*, 18 (10): 843-53.
- Grollman, E. (1988). *Calcium signals in the Liver; in Arias IM, Jakoby WB, Popper H at al: The Liver Biology and Pathobiology*. NY: Raven Press.
- Hagemann, R. (1984). *Allgemeine Genetik*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
- Handler, J., & Thurman, R. (1985). Fatty acid - dependent ethanol metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, 133(1): 44-51.
- Hartmann, E., & Spinweber, C. (1979). Sleep induced by L-tryptophan. *J Nerv Ment Dis*, 167:497-99.
- Haubner, C. (2010). *Zytotoxizitätstest zur Ermittlung der Leberfunktion auf der Basis humaner Hepatozyten (Biosensor) bei septischen Patienten: Ergebnisse einer Pilotstudie*. Universität Rostock, Rostock.
- Herpertz, U. (2010). *Ödeme und Lymphdränage, Diagnose und Therapien von Ödemkrankheiten*. Schattauer GmbH, Verlag für Medizin und Naturwissenschaften.
- Herpertz, U. (2010). *Ödeme und Lymphdränage. Diagnose und Therapien von Ödemkrankheiten*. Schattauer GmbH: Verlag für Medizin und Naturwissenschaften.
- Heydinger, J., & Nakhasi, D. (1996). Medium chain triacylglycerids. *J of Food Lipids*, 3(4): 251-57.
- Hinkle, P. (1988). *Mitochondrien; in Arias IM, Jakoby WB, Popper H at al: The Liver Biology and Pathobiology*. NY: Raven Press.
- Hirata. (1985).

- Ho, D., Fan, S., & et al. (2002). Selective plasma filtration for treatment of fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine in a pig model. *Gut*, 50(6): 869-76.
- James, J., Ziparo, V., Jeppsson, B., & Fischer JE. (1979). Hyperammonaemia, plasma amino imbalanced and blood brain amino acid transport: a unified theory of portal systemic encephalopathy. *Lancet*, 2: 772-5.
- Jauregui, H., & Ganu, K. (1991). Mammalian hepatocytes as a foundation for treatment in human liver failure. *J Cell Biochem*, 45: 359-65.
- Jost, L., Kirkwood, J., & Whiteside, T. (1992). Improved short- and long-term xxt based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods*, 147: 153-65.
- Kelly, J., & Sussman, N. (2000). A fluorescent cell-based assay for cytochrom P450 isozyme 1A2 induction and inhibition. *J Biomol Screen*, 5(4):249-53.
- Klammt, S., Koball, S., Hickstein, H., Glober, M., & et al. (2009). increase of Octanoate concentrations during Extracorporeal Albumin Dialysis Treatment. *Ther Apher Dial*, 13(5): 437-43.
- Knell, A., & Dukes, D. (1976). Dialysis procedures in acute liver coma. *Lancet*, 2 (7982): 402-3.
- Knell, A., Davidson, A., Williams, R., & et al. (1974). Dopamine and serotonin metabolism in hepatic encephalopathy. *Brit Med J*, 549-51.
- Knowles, B., Howe, C., & Aden, D. (1980). Human hepatoblastoma cell line secrete the major plasma proteins and hepatic B surface antigen. *Science*, 209: 497-99.
- Kobata. (2004).
- Korber, D., Choi, A., Wolfaardt, G., & Caldwell, D. (1996). Bacterial plasmolysis as a physical indicator of viability. *Appl Environ Microbiol*, 62(11): 3939-47.
- Kragh-Hansen, U. (1990). Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull*, 37:57-84.
- Kragh-Hansen, U. (1991). Octanoate binding to the indole- and benzodiazepine binding region of human serum albumin. *Biochem J*, 273: 641-44.
- Krisper, P., & Stauber, R. (2007). Technology insight: artificial extracorporeal liver support - how does Prometheus compare with MARS? *Nat Pract Nephrol*, 3(5): 726-76.
- Kristev, A., Mitkov, D., & Lukanov, J. (1992). Effects of the medium chain octanoic fatty acid on the contractile activity of vascular smooth muscle tissues. *Folia Med (Plovdiv)*, 1: 12-18.

- Kuhlmann, W., Böhler, & Luft. (2008). *Hämodialyse. Nephrologie, Pathophysiologie - Klinik-Nierenersatzverfahren*. Stuttgart. 5. überarbeitete Auflage: 547 ff: Thieme.
- Larsen, F., Hansen, B., & et al. (1994). Cerebral blood flow velocity during high volume plasmapheresis in fulminant hepatic failure. *Int J Artif Organs*, 17(6): 353-61.
- Lauer, U. (2009). *Leber & Gastrointestinaltrakt*. Thieme.
- Leffert, H., Koch KS, Lad, P., & et al. (1988, pp 833-850). *hepatocyte Regeneration, Replication and Differentiation, in Arias IM, Jakoby WB, Popper H at al: The Liver Biology and Pathobiology*. NY: Raven Press.
- Lei, T., Xie, W., Han, J., Corkey, B., Hamilton , J., & Guo, W. (2004). Medium chain fatty acids attenuate agonist - stimulated lipolysis, mimicking the effect of starvation. *Obes Res*, 12(4): 599-611.
- Levi, M., & van der Poll, T. (2007). Recombinant human activated protein C: current insights into its mechanism of action. *Crit Care*, S. 11 (5): S3.
- Lindemann, S. (1995). Einfluss der Mikroverkapselung auf Wachstum- und Stoffwechselverhalten von primär isolierten Rattenhepatozyten, Hepatomazellen sowie immortalisierte Hepatozyten im Vergleich zur Monolayerkultur. Rostock: Universität Rostock.
- Lindner, M., Hoffmann, G., & Matern, D. (2010). Newborn screening for disorder of fatty acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inherit Metab Dis*, 33(5):521-6.
- Lockwood, A., McDonald, J., & et al. (1979). The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest*, 63 (3): 449-60.
- Löffler, P., & Heinrich. (2007). Die Leber als Ausscheidungsorgan. In *Biochemie und Pathobiochemie* (S. 1097 ff). Springer.
- Long, R. (1980). Endocrine aspects of liver disease. *Br Med J*, 280 (6209): 225-8.
- Lu, C., Li, C., Tsai, C., Lii, C., & Chen, H. (2010). Decosahexaenoic acid down - regulated phenobarbitat induced cytochrome p450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes via the sphingomyelinase/ceramide pathway. *J Nutr Biochem*, 21(4): 338-44.
- Mannaioni, G., Carpenedo, R., Corradetti, R., & et al. (1999). Tryptophan metabolism and hepatic encephalopathy. Studies on the sedative properties of oxindole. *Adv Exp Med Biol*, 467:155-67.
- Mas, A. (2006). Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to treatment. *Digestion*, 73 (1): 86-93.

- Meints, C., Simtchok, S., & Wolthers, K. (2013). Aromatic substitutions of FAD-shielding tryptophan reveals its differential role in regulating electron flux in methionine synthase reductase and cytochrome p 450 reductase. *FEBS Journal*, 1460-74.
- Menke, G., Wörner, W., Kratzer, W., & Rietbrock, N. (1989). Kinetics of drug binding to human serum albumin: allosteric and competitive inhibition at the benzodiazepine binding site by free fatty acids of various chain lengths. *Naun Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 339(1-2): 42-47.
- Mitkov, D. (1988). *Influence of fatty acids on the detoxication of ammonium in the liver: implications for hepatic encephalopathy. Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy*. Amsterdam: Hg PB Soeters, Elsevier.
- Mitkov, D. (1993). The role of the octanoic fatty acid in the pathogenesis of the metabolic alkalosis in experimental liver failure. *Folia Medica (Plovdiv)*, 35:23-27.
- Mitzner, S., Stange, J., & et al. (2009). Albumin dialysis MARS: knowledge from 10 years of clinical investigations. *Asaio J*, 55(5): 498-502.
- Mitzner, S., Stange, J., & et al. (2001). Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure. *J Am Soc Nephro*, 12(17): S75-82.
- Mollison, E., & Contreras. (1994). *Citrat toxicity. Some unfavourable effects of blood transfusion. Blood transfusion in clinical medicine*. Oxford: Blackwell scientific.
- Mori, T., Eguchi, Y., & et al. (2002). A case of acute hepatic insufficiency treated with novel plasmapheresis plasma diafiltration for bridge use until liver transplantation. *Ther Apher Dial*, 6(6): 463-6.
- Moroni, F., Carpenedo, R., Venturini, J., & et al. (1998). Oxindole on the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Lancet*, 351:1861.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63.
- Muck, W. (1994). *Pharmacokinetic drug interactions. In Kuhlmann J: Drug interactions studies during drug development*. Munich: Schwerdt Verlag.
- Muehlenfeld, K. (2004). *Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomazelllinie HepG2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistar-Ratte*. Berlin: Humboldt-Universität.

- Nakae, H., Igarashi, T., & et al. (2007). A case report of hepatorenal syndrome treated with plasma diafiltration (selective plasma filtration with dialysis). *Ther Apher Dial*, 11(5): 391-5.
- Noctor, T., & Wainer JW. (1992). Allosteric and competitive displacement of drugs from human serum albumin by octanoic acid, as revealed by high-performance liquid affinity chromatography, on a human serum albumin-based stationary phase. *J of Chromat*, 522: 305-15.
- Norenberg, M., & Bender, A. (1994). Astrocyte swelling in liver failure: a role of glutamine and benzodiazepine. *Acta Neurochir*, 60: 24-27.
- Oehme. (1996).
- Oehme, M. (1996). *Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen. Grundlagen und Anwendungen*. Heidelberg: hüthig GmbH.
- Olsen, J., Holtzman, D., Sankar, R., Lawson, C., & Rosenberg, R. (1989). Octanoic acid inhibits astrocyte volume control: implications for cerebral edema in Reye's syndrom. *J Neurochem*, 52: 1197-1202.
- Ono, J., Hutson, D., Dombro, R., Levi, J., Livingstone, A., & Zeppa, R. (1978). Tryptophan and hepatic coma. *Gastroenterology*, 74:196-200.
- Pardridge, W., & Mietus, L. (1979). Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest*, 64 (1): 145-54.
- Paul, H., & Adibi, S. (1980). Leucin degradation and protein turnover in clofibrateinduced muscle protein degradation in rats. *J Clin Invest*, 6: 1285-93.
- Paul, H., & Adibi, S. (1992). Mechanism of increased conversion of branched chain keto acid dehydrogenase from inactiv to active from by medium chain fatty acid (octanoate) in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 267: 11208-14.
- Peters, T. (1996). *All about Albumin. Biochemistry, Genetics and metical Applications*. San Diego: Academic Press.
- Ponikvar, R., Buturovic, & et al. (1998). Hyperbaric oxygenation, plasma exchange and hemodialysis for treatment of acute liver failure in a 5-year-old-child. *J Artif Organs*, 22(11): 952-7.
- Rabinowitz, Z., Staeffen, J., Blanquet, P., & al, e. (1978). Sources of serum ¹⁴C Octanoate in cirrhosis of the liver and hepatic encephalopathy. *J Lab Chem Med*, 91(2): 223-27.
- Radwanski, E., & Last, R. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell*, 7(7):921-34.

- Radwanski, E., & Last, R. (1995). Tryptophan synthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell*, 7(7):921-34.
- Ray, S., Kamendulis, M., Gurule, M., & et al. (1993). Ca²⁺ antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *The FASEB Journal*, 7: 453-62.
- Rehm, H., & Hammar, F. (2001). *Biochemie light*. erw. 2. Auflage: Verlag Hari Deutsch.
- Ricci, Z., Ronco, C., & et al. (2006). Solute removal during continuous renal replacement therapy in critically ill patients: convection versus diffusion. *Crit Care*, 10 (2): R67.
- Rifai, K., Ernst, T., & et al. (2003). Prometheus - a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *Hepatology*, 39(6): 984-90.
- Rifai, K., Kribben, A., & et al. (2010). Extracorporeal liver support by fractionated plasmaseparation and adsorption (Prometheus) in patients with acute-on-chronic liver failure (Helios study): a prospective randomized controlled multicenter study. *Hepatology*, 52: 3.
- Rodekamp, B. (2008). Effekt von diffusiven und konvektiven Transportmechanismen auf die Elimination von wasserlöslichen und proteingebundenen Toxinen bei Hämodiafiltration mit verschiedenen Porengrößen in der Leberersatztherapie. *Doktorarbeit*. Universität Rostock.
- Roehm, N., Rodgers, G., Hatfield, S., & Glasebrock, A. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*, 142(2): 257-65.
- Rosch, & Garcia-Pagau. (2000).
- Rose, W., Coon, M., & Lambert GF. (1955). The amino acid requirements of man.VIII. The metabolic availability of the optical isomers of acetyltryptophan. *J Biol Chem*, 212:201-5.
- Rose, W., Coon, M., & Lambert, G. (1955). The amino acid requirements of man.VIII.The metabolic availability of the optical isomers of acetyltryptophan. *J Biol Chem*, 212:201-5.
- Rowley, H., & Collins, R. (1985). 1-14C Octanoate: a fast functional marker of brain activity. *Brain Research*, 325-29.
- Rozga, J. (2006). Liver support technology- an update. *Xenotransplantation*, 13 (5): 380-9.
- Rozga, J., Podesta, L., Le Page, E., & et al. (1994). A bioartificial liver to treat severe acute liver failure. *Ann Surg*, 21: 538-44.

- Rozga, J., Umehara, Y., & et al. (2006). A novel plasma filtration therapy for hepatic failure: preclinical studies. *Ther Apher Dial*, 10(2): 138-44.
- Sauer, M., Haubner, C., Mencke, T., Nöldge-Schomburg, G., Mitzner, S., Altrichter, J., et al. (2012). Impaired cell function of hepatocytes incubated with plasma of septic patients. *Inflamm Res*, 61(6):609-16.
- Schuetz, E., Li, D., Omiecinski, C., & et al. (1988). Regulation of gene expression in adult rat hepatocyte cultured on a basement membrane matrix. *J of Cellular Phys*, 134: 309-23.
- Seifert, S., & England, S. (1988). *Energy Metabolism; in Arias IM, Jakoby WB, Popper H at al: The Liver Biology and Pathobiology*. NY: Raven Press.
- Sellinger, M., Haag, K., & et al. (1990). Sulfated bile acids inhibit Na(+) - H⁺ antiport in human kidney brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol*, 258 (4 Pt 2): F 986-91.
- Sen, & Williams. (2002).
- Sen, S., Williams, R., & et al. (2002). The pathophysiological basis of acute-on-chronic liver failure. *Liver*, 22(2):5-13.
- Silk, D., Trewby, P., & et al. (1977). Treatment of fulminant hepatic failure by polyacrylonitrile-membrane haemodialysis. *Lancet*, 2 (8027): 1-3.
- Sippel, H., Stauffert, I., & Estler, C. (1993). Protective effect of various calcium antagonists against an experimentally induced calcium overload in isolated hepatocytes. *Biochemical Pharmacol*, 46: 1937-44.
- Smith, M., Benyunes, B., Bjornsson, T., & et al. (1984). Influence of cimetidine on Verapamil kinetics and dynamics. *Clin Pharmacol Ther*, 36: 551-4.
- Splendiani, G., Tancredi, M., & Daniele, M. (1990). Treatment of acute liver failure with hemodetoxification techniques. *J Artif Organs*(13: 370-74), S. 13: 370-74.
- Stange, J., Mitzner, S., & et al. (1993). A new procedure for the removal of protein bound drugs and toxins. *Asaio J*, 39(3): MG 21-5.
- Stange, J., Goetze, A., Klammt, S., Strube, S., & et al. (2009). Commercial Albumin containing Caprylate as conservative may be limited to exert its clinical benefits as an i.v. plasma expander in advanced liver failure with renal insufficiency. *CRRT - International Conference on Advances in Critical Care, San Diego*, Poster.
- Stange, J., Ramlow, W., & et al. (1993). Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins. *J Artif Organs*, 17(9): 809-13.

- Stange, J., Stiffel, M., Goetze, A., & et al. (2011). *Industrial stabilizers caprylate and N-acetyltryptophanate reduce the efficacy of albumin in liver patients*. 17(6): 705-9: Liver Transplantation.
- Strom, R., Cardelli-Cangiano, P., Fiori, A., & et al. (1984). *Ammonia, methylmercaptan, and blood brain transport of amino acids. Advances in hepatic encephalopathy and urea cycle disease*. Basel: Karger.
- Sussman, N., Gislason, G., Coulin, C., & Kelly, J. (1994). The hepatic extracorporeal liver assistent device: Initial clinical experience. *Artif Organs*, 18:390-96.
- Tavares-Almeida, I., Gulyassy, P., Depner, T., & Jarrard, E. (1985). Aromatic amino acid metabolites a potential protein binding inhibitors in human uremic plasma. *Biochem Pharmacol*, 34:2431-38.
- Terenci, P., Lockwood, A., & et al. (2002). Hepatic encephalopathy - definition, nomenclature, diagnosis and quantification: final report of the working party at the 11th World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. *Hepatology*, 35 (3): 716-21.
- Thiessen, H., Jacobsen, J., & Brodersen, R. (1972). Displacement of Albumin-bound Bilirubin by Fatty Acids. *Acta Paedial Scand*, 61: 285-88.
- Thomson, R., & Arthur, M. (1999). Mechanisms of liver cell damage and repair. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11 (9): 949-55.
- Uludag, H., & Sefton, M. (1990). Colorimetric assay for cellular activity in microcapsules. *Biomaterials*, 11: 708-12.
- Vallance, P., & Moncada, S. (1991). Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet*, 337 (8744): 776-8.
- Vallance, P., & Moncada, S. (1991). Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet*, 337 (8744): 776-8.
- Vazques, J., Paul, H., & Adibi, S. (1988). Regulation of leucine catabolism by caloric sources Role of glucose and lipid in nitrogen sparing during nitrogen deprivation. *J Clin Invest*, 82: 1606-13.
- Viebahn, R., de Groot, H., Lauchart, W., & et al. (1990). Primary hepatocyte culture - a model for the study of liver preservation. *Transplant Proc*, 22: 511-12.
- Viegas, C., Almeida, P., Cavaco, M., & Sacorreia, I. (1998). The H(+)-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid - supplemented medium accompanying the decrease in intercellular pH and cell viability. *Appl Environ Microbiol*, 64(2): 779-83.
- Vogel, G., Komm, C., & Lorenz, R. e. (1984). Das akute Leberversagen - neue therapeutische Aspekte. *Intensivbehandlung*(9), 9: 60-6.

- Ward, R., Schmidt, B., & et al. (2000). A comparison of on-line hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: a prospective clinical study. *J Am Soc Nephrol*, 11(12): 2344-50.
- Watanabe, M., Jones, S., Iwata, H., Kim, E., & Kennedy, S. (2009). Effects of co-exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and perfluorooctane sulfonate or perfluorooctanoic acid on expression of cytochrome P450 isoforms in chicken (*Gallus gallus*) embryo hepatocyte cultures. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 149(4): 605-12.
- Wegmann, H., Curtius, H., Gitzelmann, R., & Otten, A. (1979). Nutritive value of N-acetyl-L-Tryptophan in man. *Dev Paediatr Acta*, 34:497-508.
- Wegmann, H., Curtius, H., Gitzelmann, R., & Otten, A. (1979). Nutritive value of N-acetyl-L-tryptophan in man. *Dev Paediatr Acta*, 34:497-508.
- Winikoff, S., Glassman, M., & et al. (1985). Plasmapheresis in a patient with hepatic failure awaiting liver transplantation. *J Pediatr*, 107(4): 547-9.
- Wolczak, L., & Schoenfeld, P. (1993). Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochem Biophys Acta*, 1183: 41-57.
- Yang, J., Rayalam, S., Della-Fera, M., Ambati, S., & Baile, C. (2009). Octanoate and decanoate induce apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food*, 12(5): 959-66.
- Young, V., & El-Khouri, A. (1996). Human amino acid requirements: A re-evaluation. *The United Nations University Press*, 17(3).
- Young, V., & El-Khouri, A. (1996). Human amino acid requirements: A re-evaluation. *The United Nations University Press*, 17(3).
- Zakim, B. (2003). Systemic Effects of Liver Disease. *Hepatology*, 1: 456 ff.
- Zieve, F., Zieve, L., Drazaki, W., & Gilsdorf, R. (1974). Synergism between ammonia and fatty acids in the production of coma: Implications for hepatic coma. *J Pharm Exp Ther*, 191:10-16.
- Zieve, L. (1966). Pathogenesis of hepatic coma. *Arch Intern Med*, 119: 211-23.
- Zieve, L. (1984). *Role of synergism in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Hepatic encephalopathy in chronic liver failure*. New York: Plenum Publishing Corp.
- Zieve, L., & Derr, R. (1981). Methionine and fatty acids depress urea synthesis by the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology*, 80: 1355.

7 Anhang

7.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories
Penicilin G (10.000 IE/ ml)/ Streptomycin (10 mg/ ml)	PAA
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco®, life technologies
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA
Trypsin EDTA 1x (1,25 mg/ ml)	PAA
Dulbecco`s PBS without Ca & Mg	PAA
20% Albumin (Human) 100 ml Flaschen	Octapharma
Trypanblau, 0,4 %	Gibco®, Invitrogen
3-Methylcholanthrene, 98 %	Aldrich
Glucoronidase/ Arylsulfatase	Roche
Natriumacetat-Puffer	PAA
Ethoxyresorufin	Molecular Probes Eugene
DMSO	Merck
Dicumarol	Aldrich
Pyrifin	
Resorufin	
Ethanol, absolut	Sigma
Ethanol, 70 %	Sigma
Cell Proliferation Kit II (XTT), XTT Labeling Reagenz, Kopplungsreagenz	Roche Diagnostics GmbH
LDH, IFCC (flüssig)	LT-SYS®
Deproteinizer	LT-SYS®
Richtigkeitskontrollen	LT_SYS®
Probengefäße (LDH)	Sarstedt
Live Dead® Viability/ Cytotoxicity Kit for mammalien cells (Calcein AM 4 mM, Ethidium homodimer-1 2 mM)	Molecular Probes

Isotone Natriumchloridlösung, 0,9 % (NaCl)	Braun
Sodium octanoate, 99 % (CATE)	Sigma
N-Acetyl-L-tryptophan (NAT)	Sigma
Natriumhydroxid 10 mol/l (NaOH)	Zentralapotheke Rostock
Steriles Wasser, Ultra Pure Water	Biochrom
EtAC/ nr (Hexan) Uvasol	Merck
Heptadecansäure, 2-Methyl-heptadecansäure, 98 %	Sigma
Ethylacetat (reinst)	Merck
Verapamil, VeraHEXAL® injekt, 5 mg/ 2 ml Injektionslösung	Hexal
Triton 100x, Octoxinol 9	PAA
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (Powder) without sodium bocarbonat	PAA

7.2 Material

Material	Hersteller
HepG2/ C3A Zellen	American Type Culture Collection – ATCC, CRL – 10741, USA
L929 Zellen	Gibco Ltd. Paisley, Scotland
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Bluecaps (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen (25T, 75T, 175T)	Greiner Bio-One
C-Chip Neubauer improved	A. Hartenstein Laborversand
Zellkulturplatten (24 Well, 96 Well), transparent	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte (96 Well), schwarz	Greiner Bio-One
Infusionsschlauch-Infudrop, 230cm	Fresenius Kabi AG
Partikelfilter, ROWEFIL 48, 0,2 µm PES-Membran	RoweMed

Hepalbin-Adsorber	Albutec GmbH
GCS Glasröhrchen	
GCS Glaseinsatz	

7.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Binder
Vortex-Mischer MSI Minishaker	IKA® Works Inc.
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech
Wasserbad	Memmert
Sterilabank	Hera Safe (Kendro)
Absaugpumpe/ KNF Neuberger N 811KT. 18	Werner Hassa GmbH
Mikroskop Wilovert S Will	Hund
Isolierbehälter/ Cryo-Safe™ Scienceware	Bel-Art Products
Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Socorex
Pipetten (5-50 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl)	Finnpipette
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Centrifuge 5417 C	Eppendorf
Cobas Mira plus	Roche
Kühlschrank	
Photometer, Anthos Reader	Anthos labtec instruments
Inkubationsschüttler (Ethoxy)	
ph-Meter, ph 7310 P, WTW	Inolab
Reagenzschüttler Gyrator	Uniprep
Bionas 1500 ² analyzing system	Bionas GmbH
Fluoreszenzmikroskop, Nikon Diaphot 300	
Fluoreszenzreader, Fluoroskan Ascent	Lab Systems Thermo Scientific

7.4 Programme

Programm	Hersteller
MS Word	Microsoft
MS Excel	Microsoft
MS Powerpoint	Microsoft
SigmaPlot 11.0	Systat Software Inc.
Lab Solutions, GCsolution-Analysis 2.5	Shimadzu Cooperation
Bildbearbeitung	

7.5 Zusätzliche Diagramme des Ergebnisteils

7.5.1 Wirkung von FKS

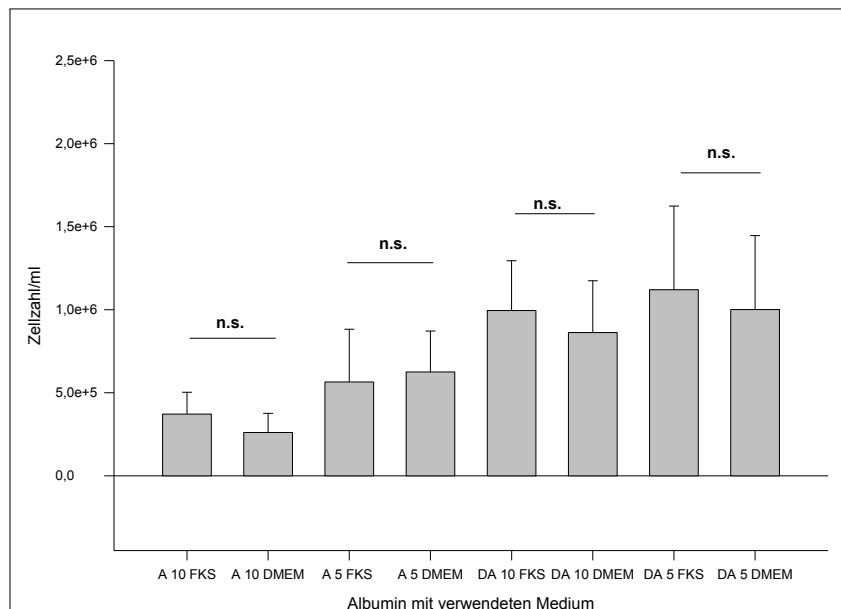


Abbildung 33: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung beim Vergleich der Verdünnungsmedien DMEM und FKS. (n=6)

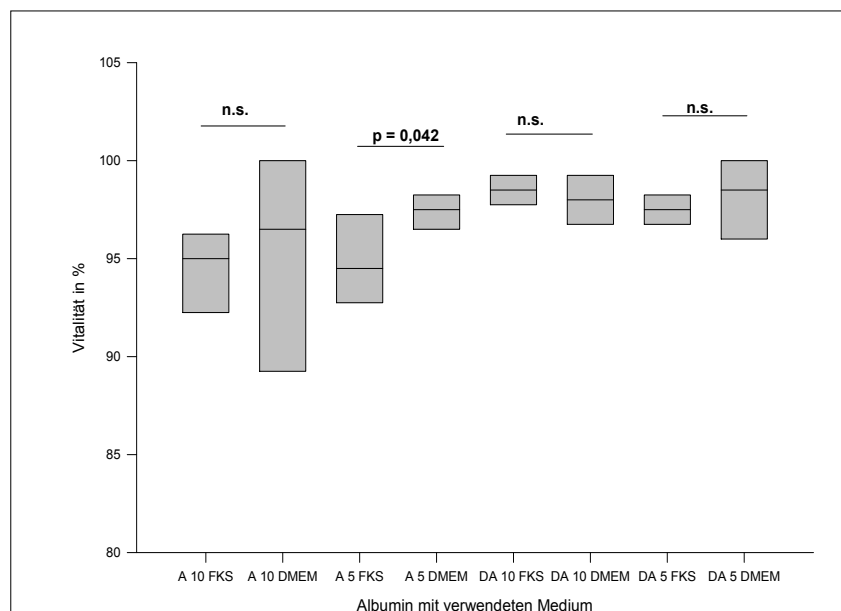


Abbildung 34: Errechnete Vitalitäten der Zellen im Vergleich der beiden Zellkulturmedien. (n = 6)

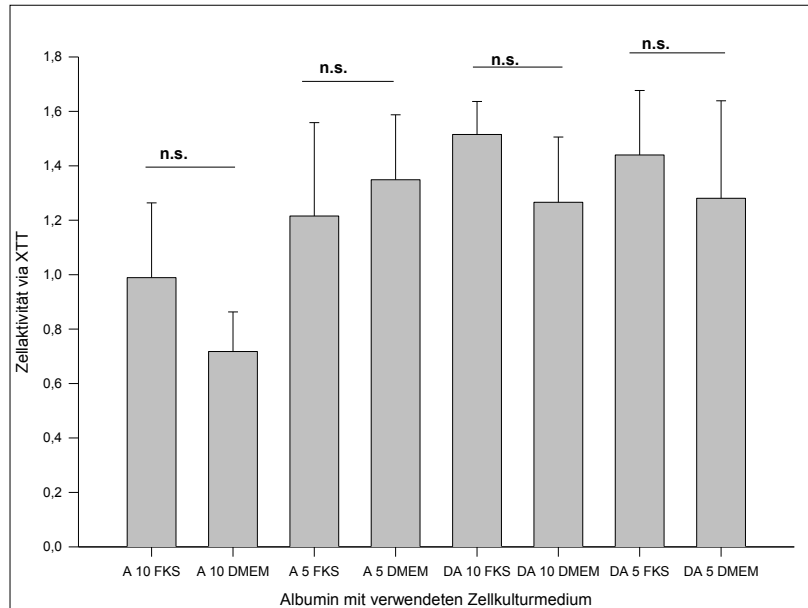


Abbildung 35: Darstellung der Messdaten der Zellaktivität via XTT Test. Vergleich der beiden Zellkulturmedien. (n=3, MW)

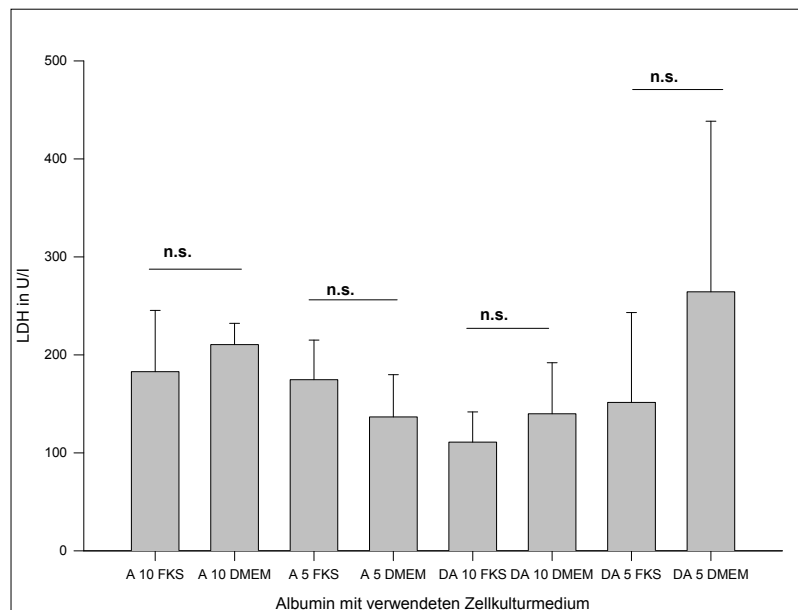


Abbildung 36: Lactatdehydrogenase Messdaten im Vergleich zwischen beiden verwendeten Zellkulturmedien. (n=3, MW)

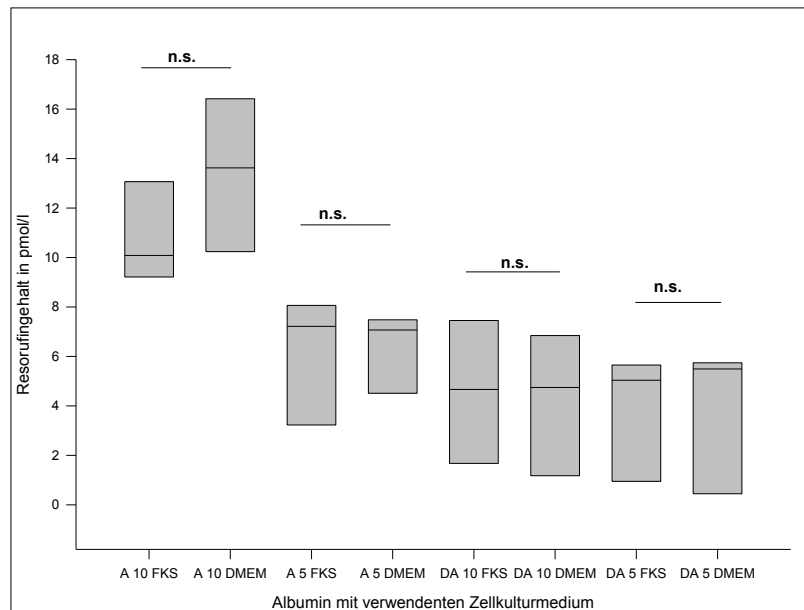


Abbildung 37: Resorufingehalt der Zellen mit getestetem Albumin und unterschiedlichen Zellkulturmedium. (n=3, MW)

7.5.2 Wirkung von Heparin

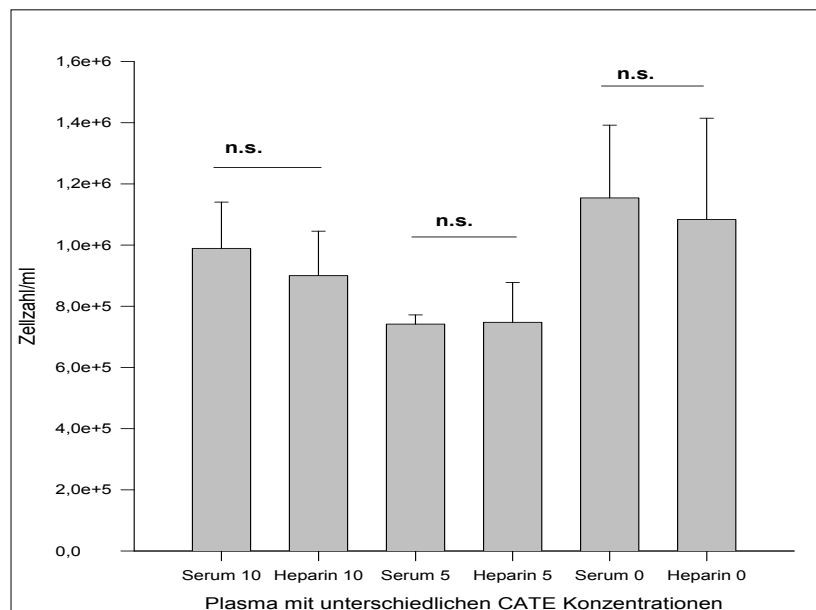


Abbildung 38: Vergleich der Zellzahlen unterschiedlicher Plasmen mit verschiedenen CATE Konzentrationen. (n=3, MW)

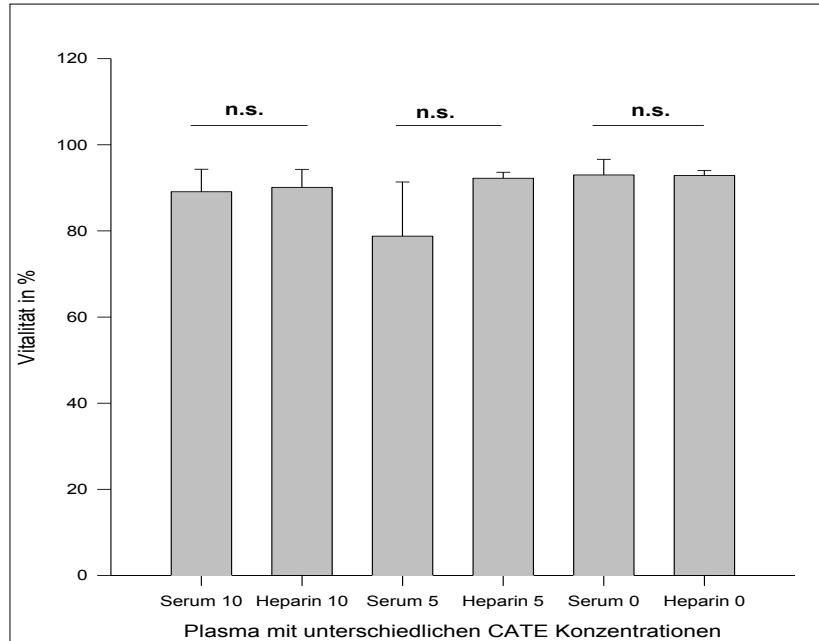


Abbildung 39: Vitalitätsunterschiede zwischen verschiedenen Plasmen mit unterschiedlichen CATE Konzentrationen. (n=3, MW)

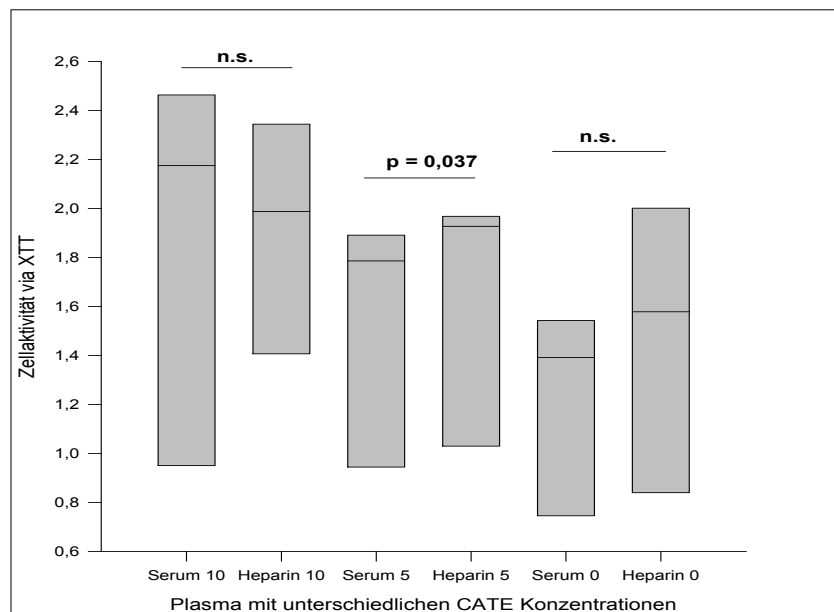


Abbildung 40: Messwerte der Zellaktivität via XTT Test. Vergleich zwischen heparinisierten und nicht heparinisierten Plasma. (n=3; MW)

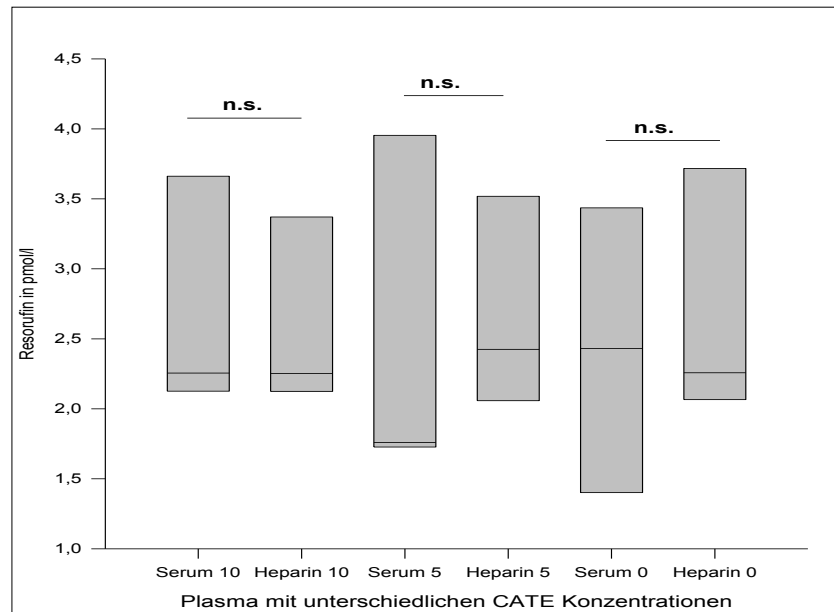


Abbildung 41: Ergebnisse der Resorufinmessung der unterschiedlichen Plasmen mit verschiedenen CATE Konzentrationen. (n=3; MW)

7.5.3 Vergleich von A 10 und A 5 mit DA 10 und DA 5

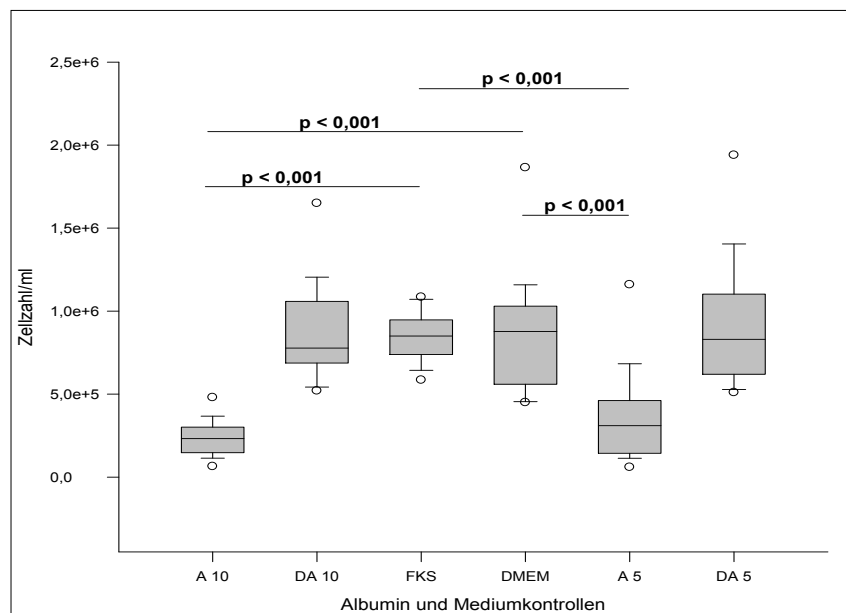


Abbildung 42: Alle Werte der Zellzahlbestimmung der getesteten Albumine zu den Mediumkontrollen. (n=18)

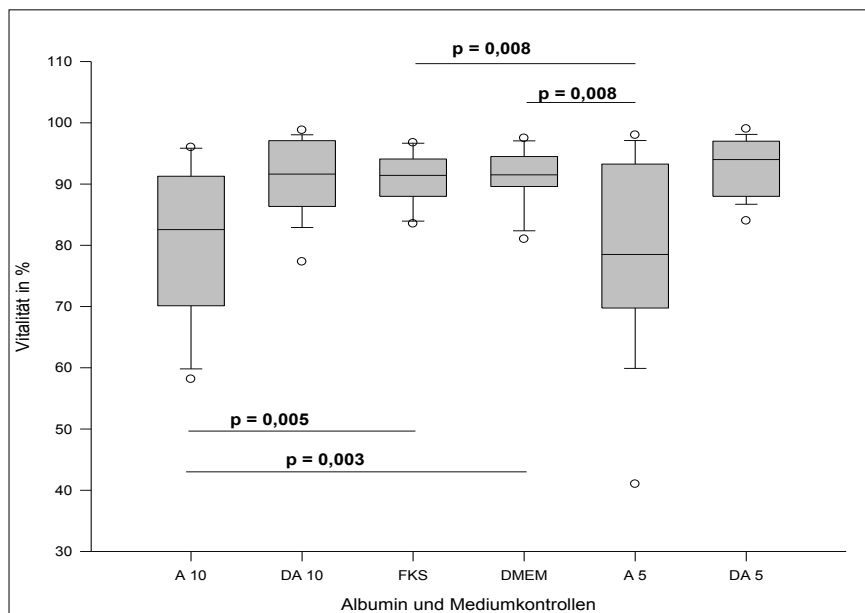


Abbildung 43: Vitalitätsbestimmung und dazugehörige Signifikanzen zwischen A und DA zu beiden Mediumkontrollen. (n=18)

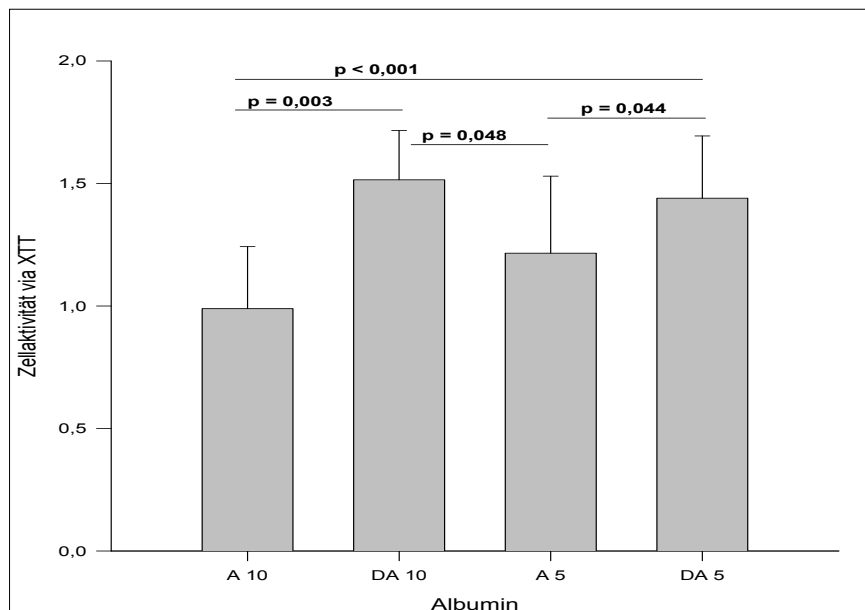


Abbildung 44: Alle gemessenen XTT Werte, welche dann für die Berechnung pro Zelle verwendet wurden. (n=6)

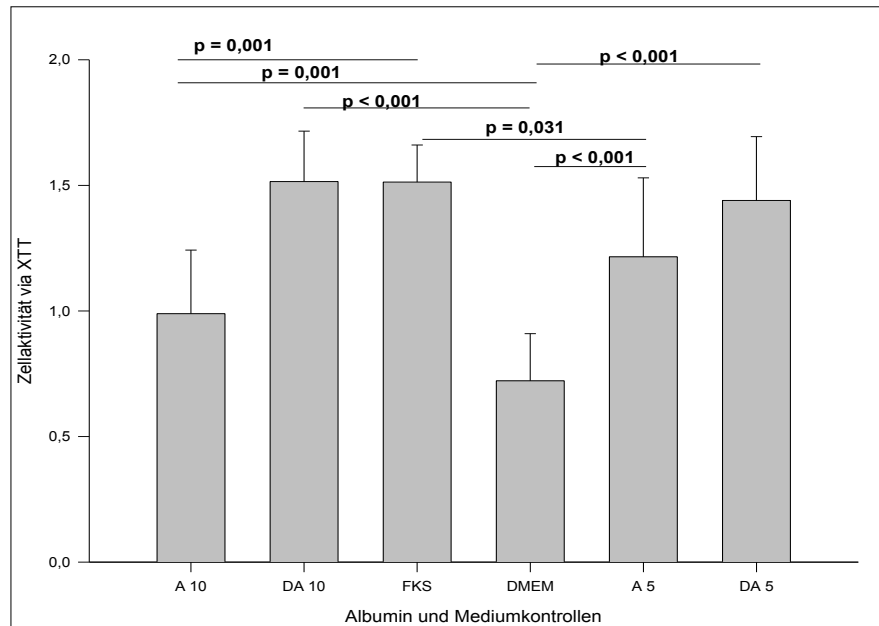


Abbildung 45: Alle Ergebnisse der Zellaktivitätsbestimmung via XTT Test. Im Vergleich stehen beide getestete Albumine zu beiden Mediumkontrollen. (n=6)

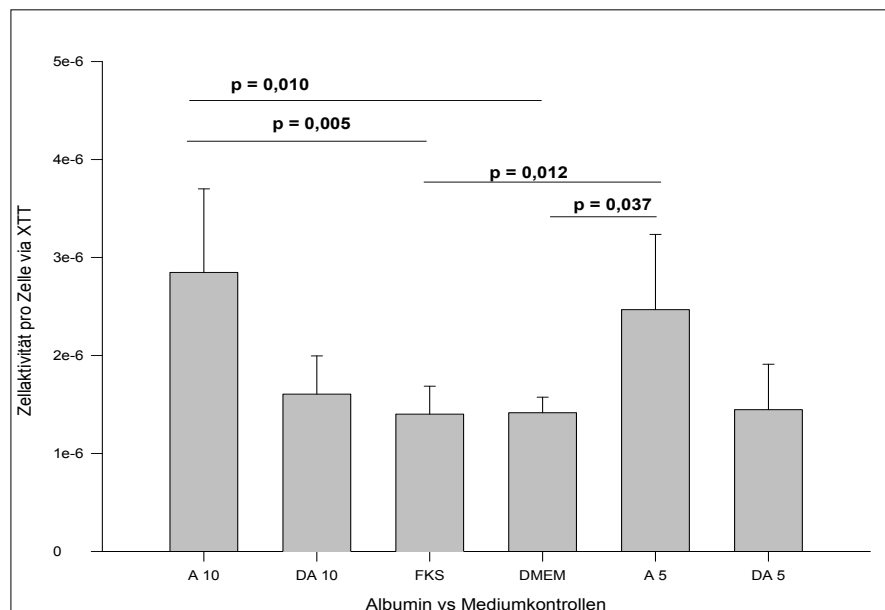


Abbildung 46: Errechnete Ergebnisse der Zellaktivität pro Zelle der beiden Albumine zu den Mediumkontrollen. (n=6)

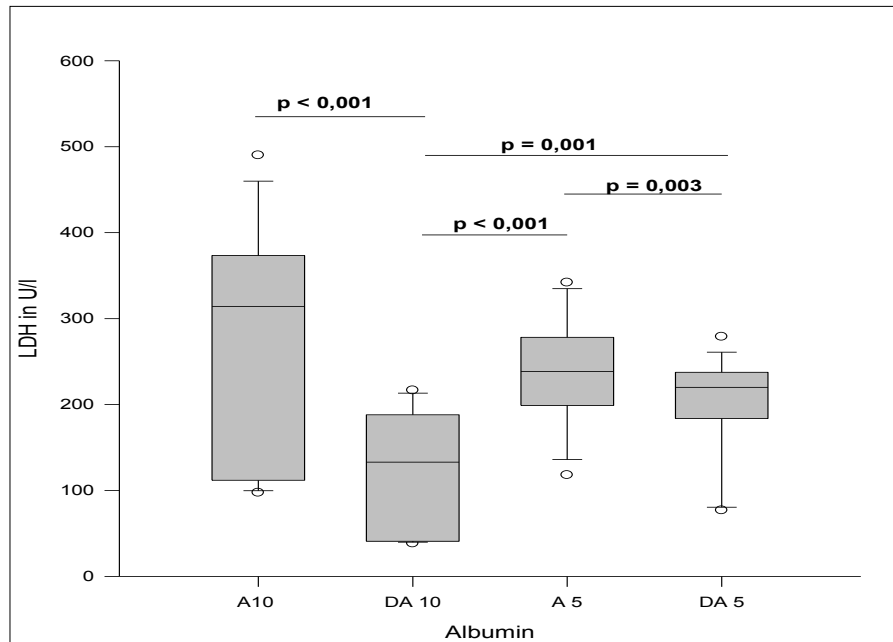


Abbildung 47: Die gemessenen LDH Werte für A und DA mit jeweiligen Signifikanzen. (n=18)

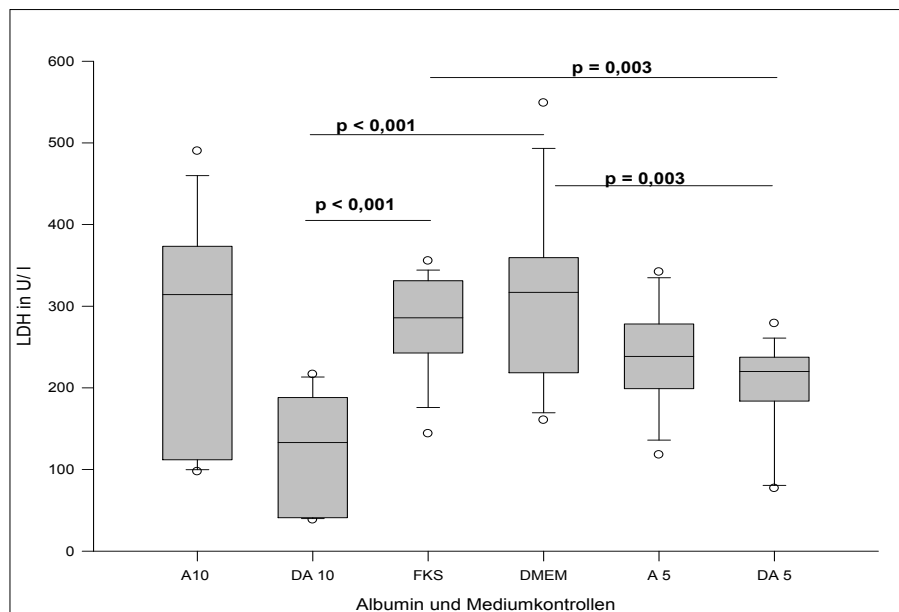


Abbildung 48: Alle Messwerte der LDH Freisetzung für die Albumine im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=18)

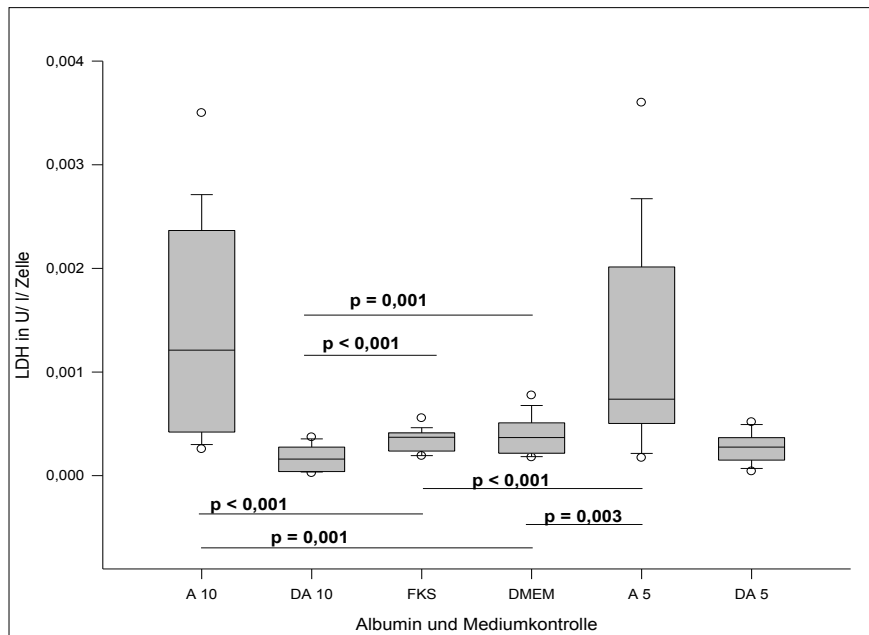


Abbildung 49: Alle errechneten Ergebnisse für die LDH Freisetzung pro Zelle für beide Albumine im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=18)

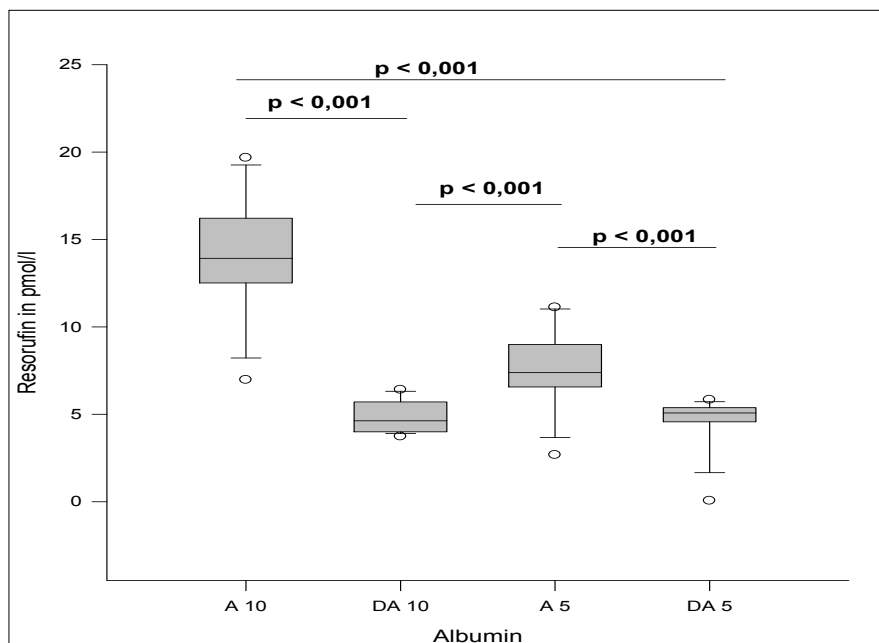


Abbildung 50: Alle Messwerte der Resorufinumsetzung für beide Albumine im Vergleich. Alle statistischen Signifikanzen sind in der Grafik enthalten. (n=18)

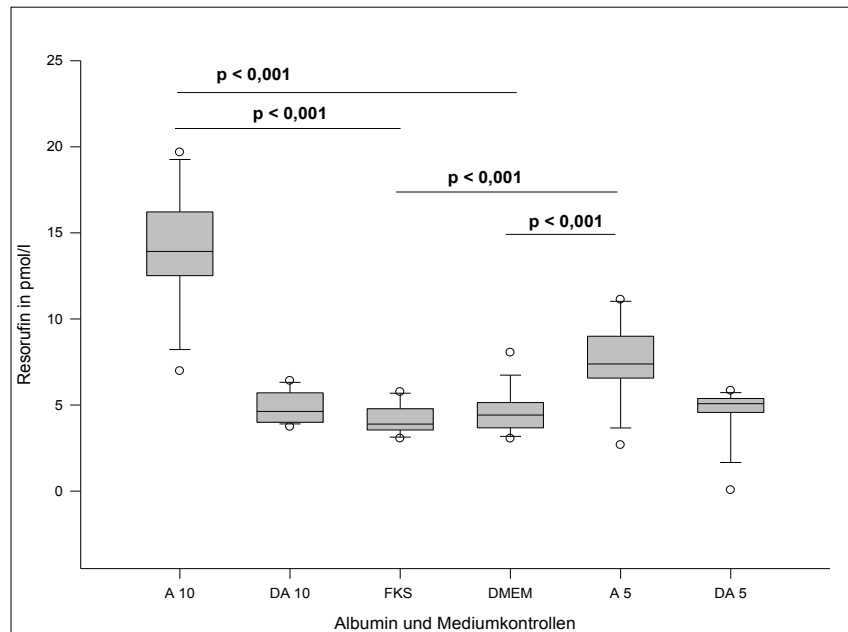


Abbildung 51: Messwerte der Resorufinbestimmung beider Albumine zu den Mediumkontrollen FKS und DMEM mit dazugehörigen Sigifikanzen. (n=18)

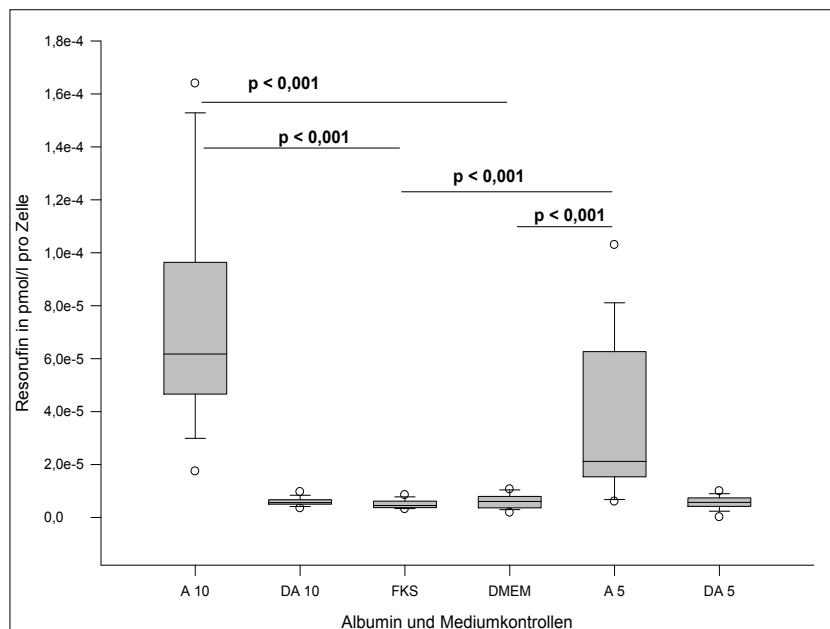


Abbildung 52: Alle pro Zelle errechneten Resorufinwerte zu A und DA im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=18)

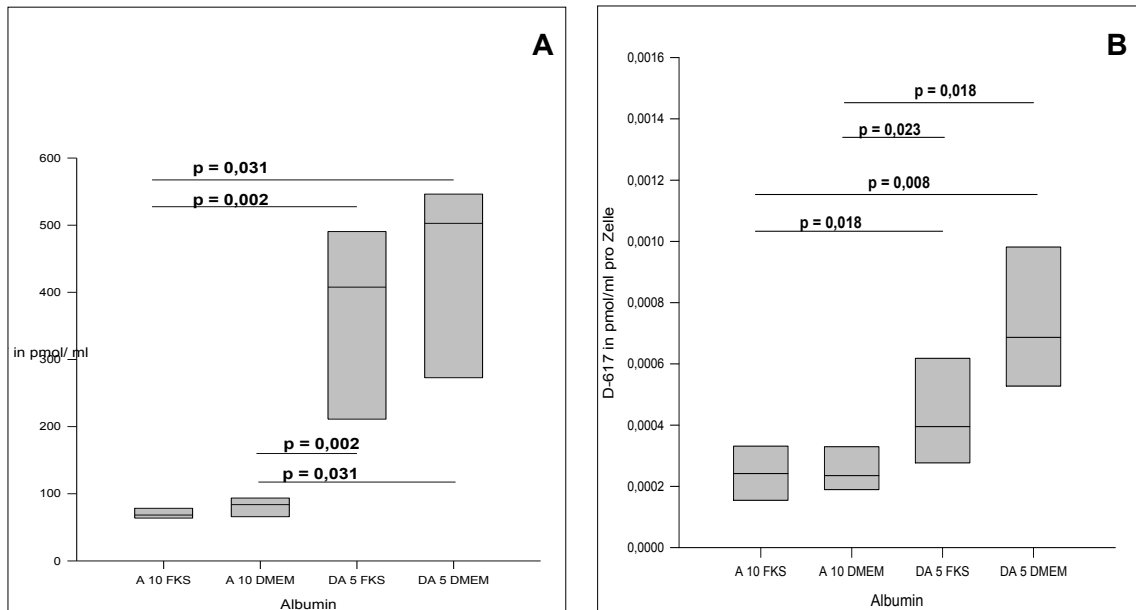


Abbildung 53: Alle Messwerte der Verapamilumsetzung in seinen Metaboliten D-617 (A). Die errechneten Werte der D-617 Konzentration pro Zelle. Im Vergleich steht A10 zu DA 5. (n=6)

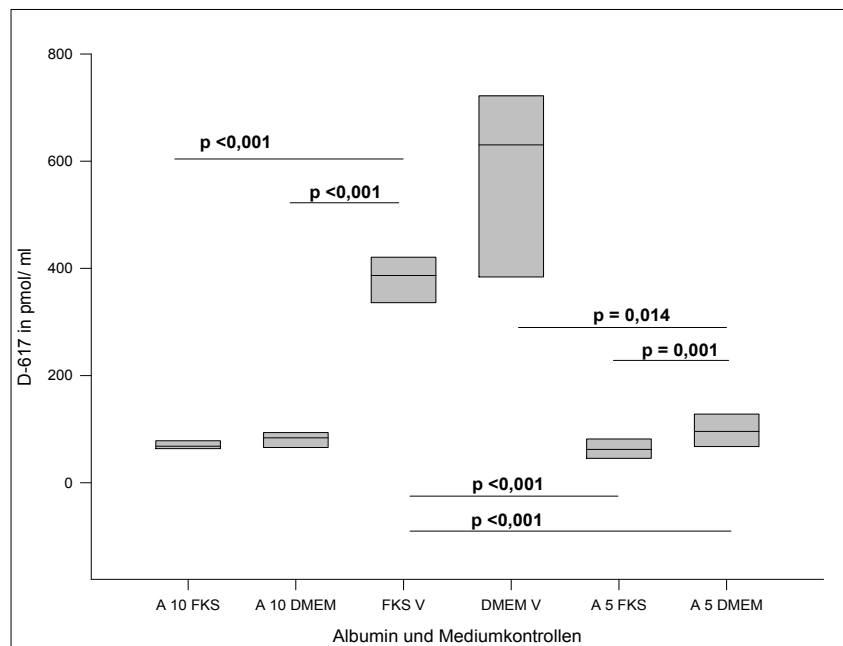


Abbildung 54: Alle Ergebnisse der D-617 Metabolit Messung für den Vergleich von Standard Albumin und Mediumkontrollen. (n=6)

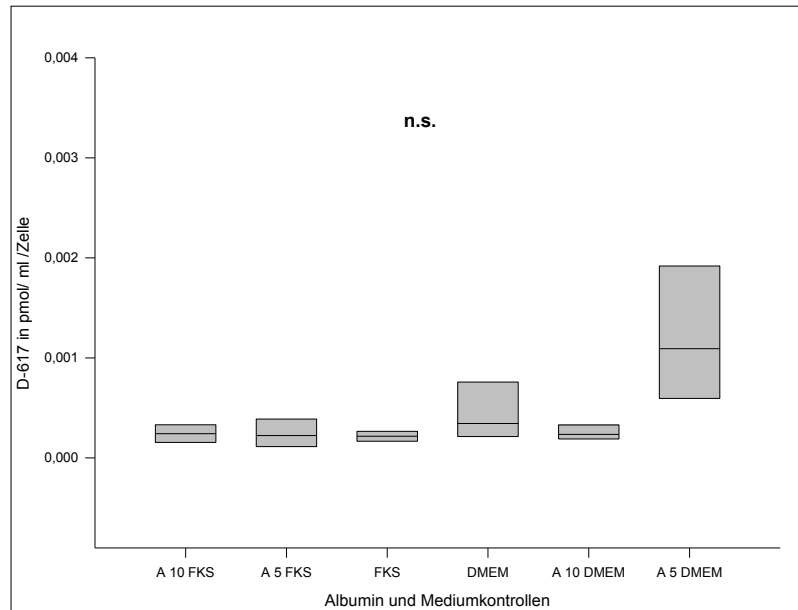


Abbildung 55: Die errechneten Werte für die D-617 Konzentration pro Zelle im Vergleich von Standard Albumin und Mediumkontrollen. (n=6)

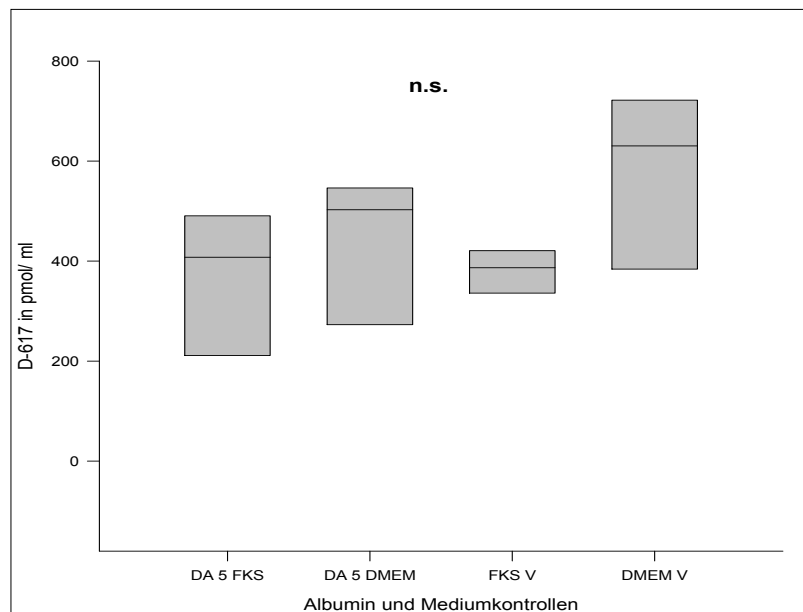


Abbildung 56: Alle Werte der Messung der Verapamilumsetzung in den Metaboliten D-617. Im Vergleich stehen deligandisiertes Albumin mit Mediumkontrollen. (n=6)

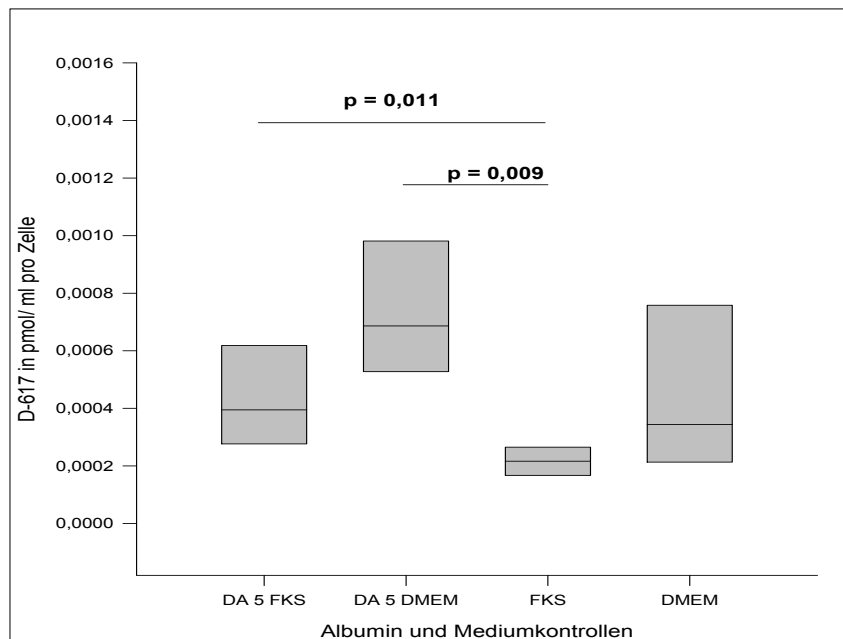


Abbildung 57: Die Ergebnisse der errechneten Metabolit D-617 Konzentration pro Zelle vom deligandisierten Albumin zu den Mediumkontrollen. (n=6)

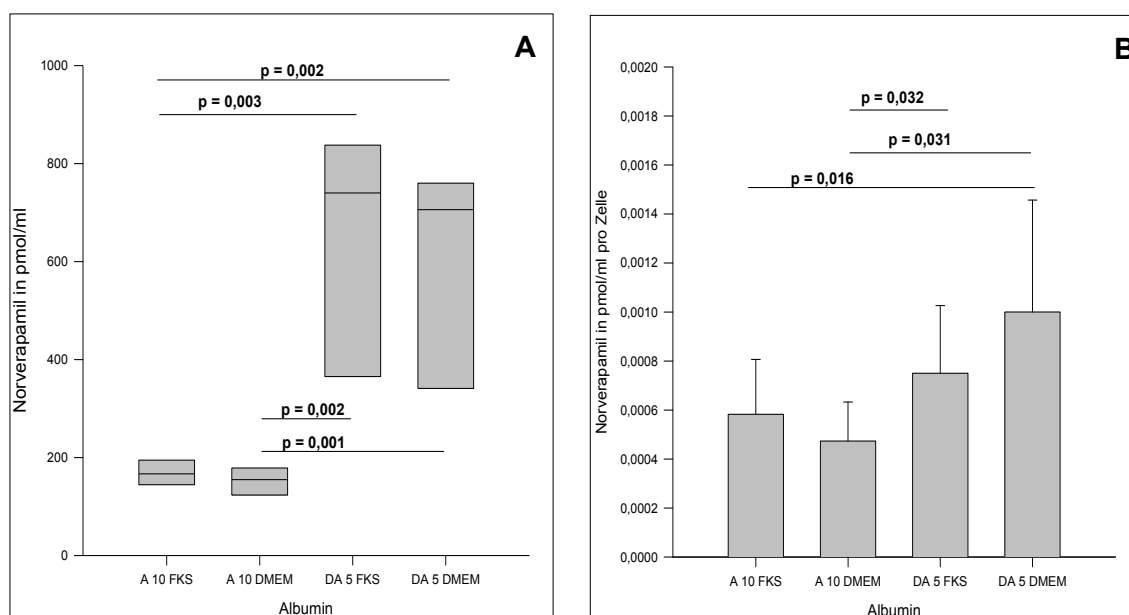


Abbildung 58: Die Messergebnisse der Norverapamilumsetzung von A 10 im Vergleich mit DA 5 (A). Des Weiteren werden die errechneten Werte pro Zelle dargestellt (B). (n=6)

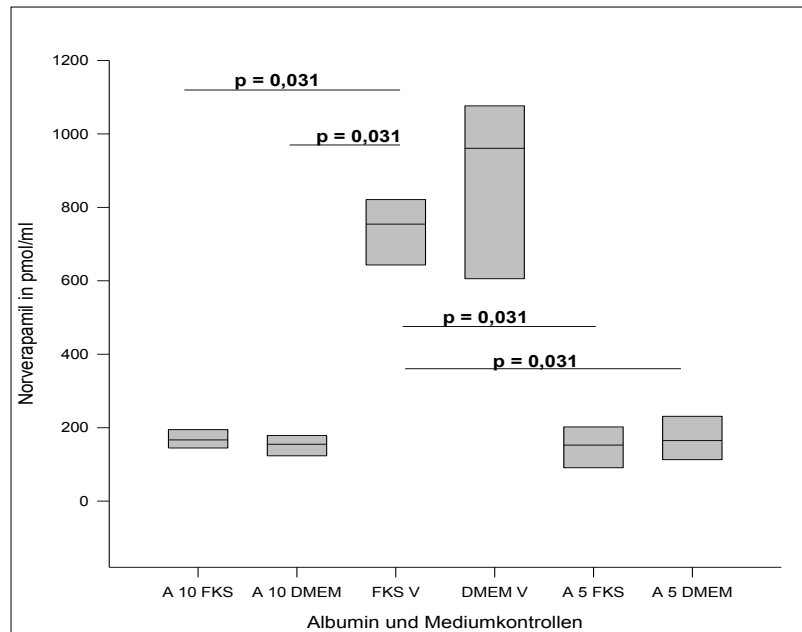


Abbildung 59: Alle Werte der Norverapamil Messung vom Standard Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=6)

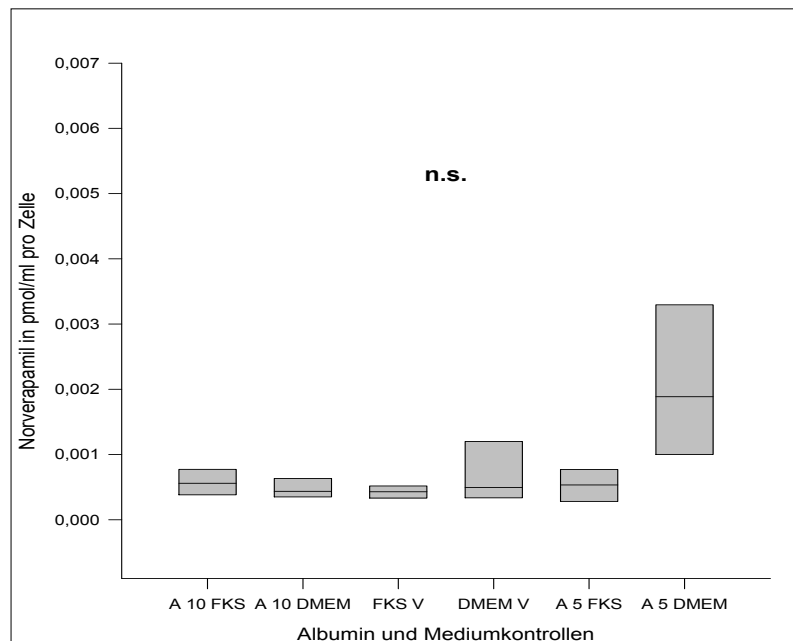


Abbildung 60: Die errechneten Werte der Norverapamilumsetzung für das Standard Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=6)

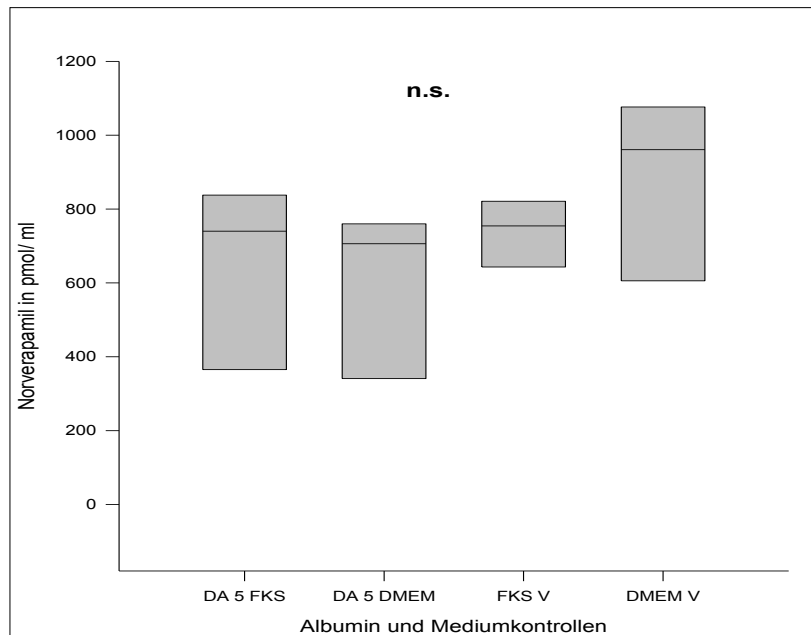


Abbildung 61: Die Messwerte der Norverapamil Messung für das deligandisierte Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=6)

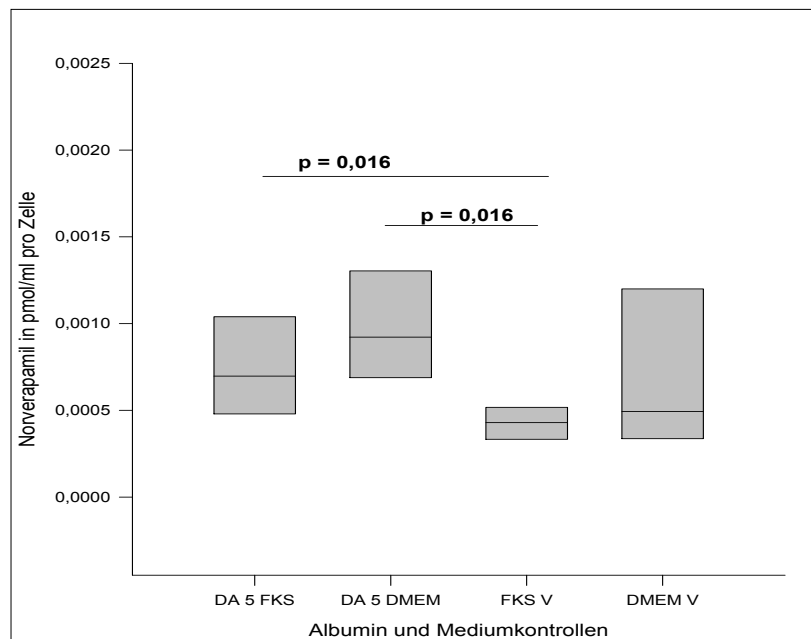


Abbildung 62: Alle errechneten Werte für die Norverapamil Konzentration vom deligandisierten Albumin zu den Mediumkontrollen. (n=6)

7.5.4 Vergleich unterschiedl. CATE und NAT Konzentrationen

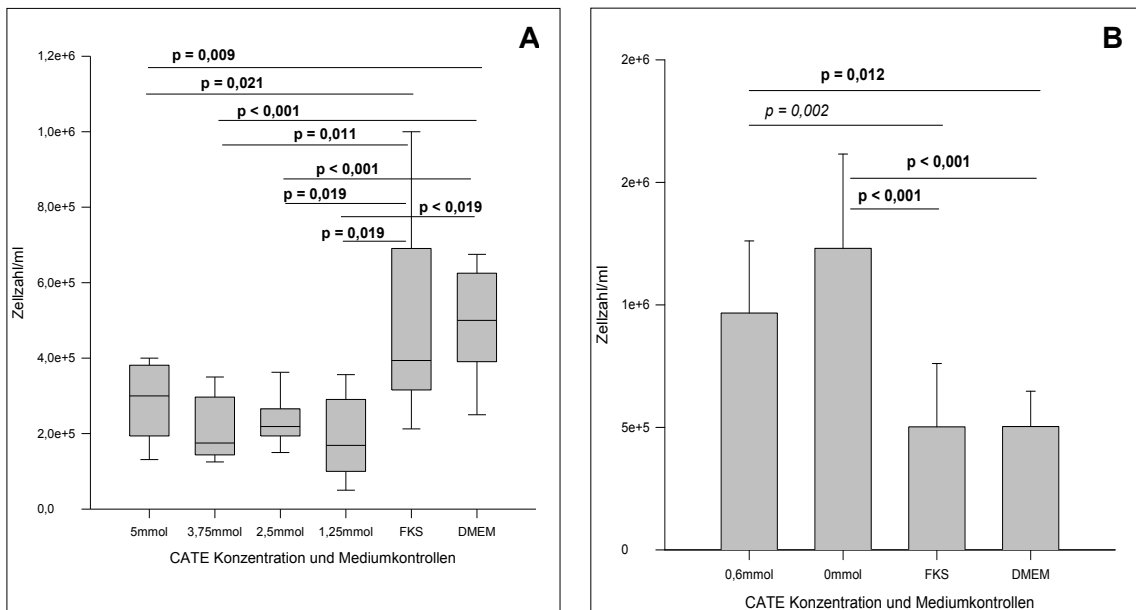


Abbildung 63: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der einzelnen CATE Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt alle Signifikanzen der 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die für die 0,6 und 0 mmol. (n=9)

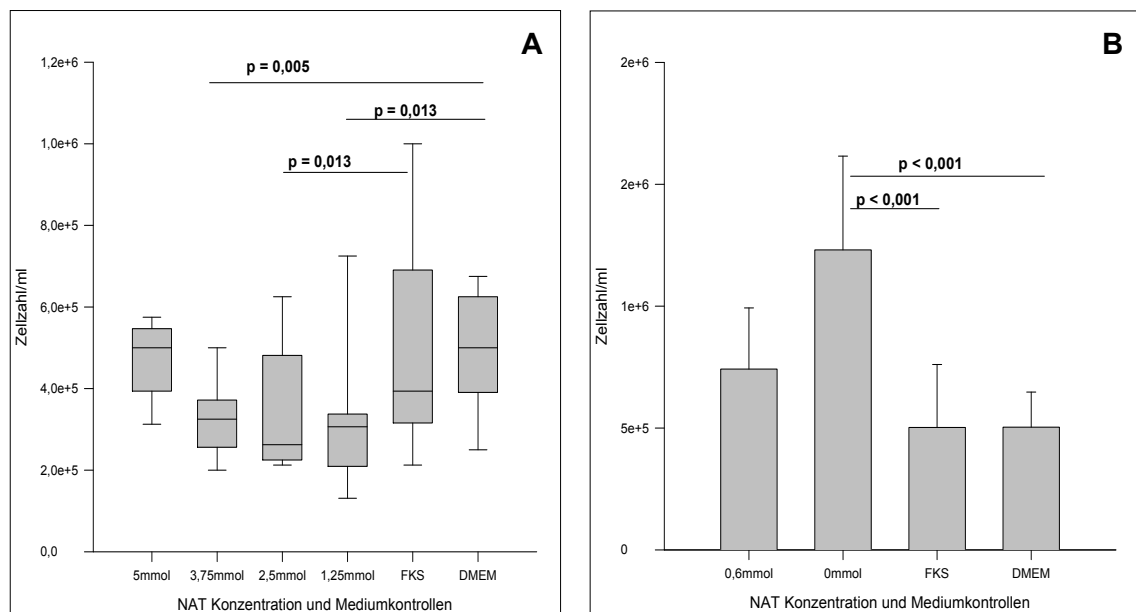


Abbildung 64: Alle Werte der Zellzahlbestimmung für die einzelnen NAT Konzentrationen mit den Signifikanzen zu 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B). (n=9)

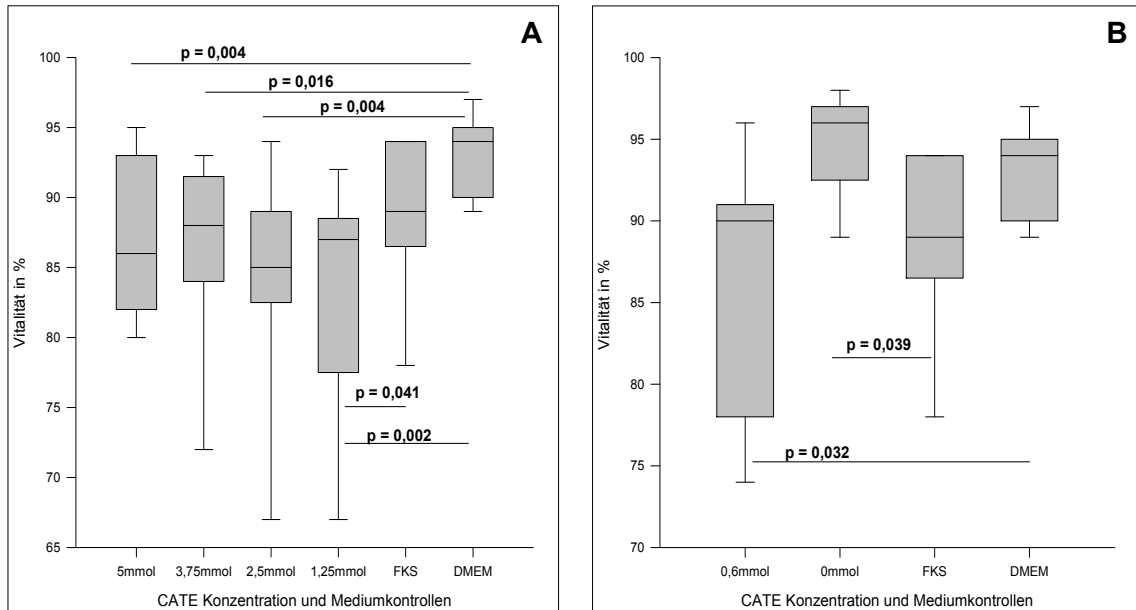


Abbildung 65: Alle Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung im Vergleich von allen CATE Konzentrationen zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=6)

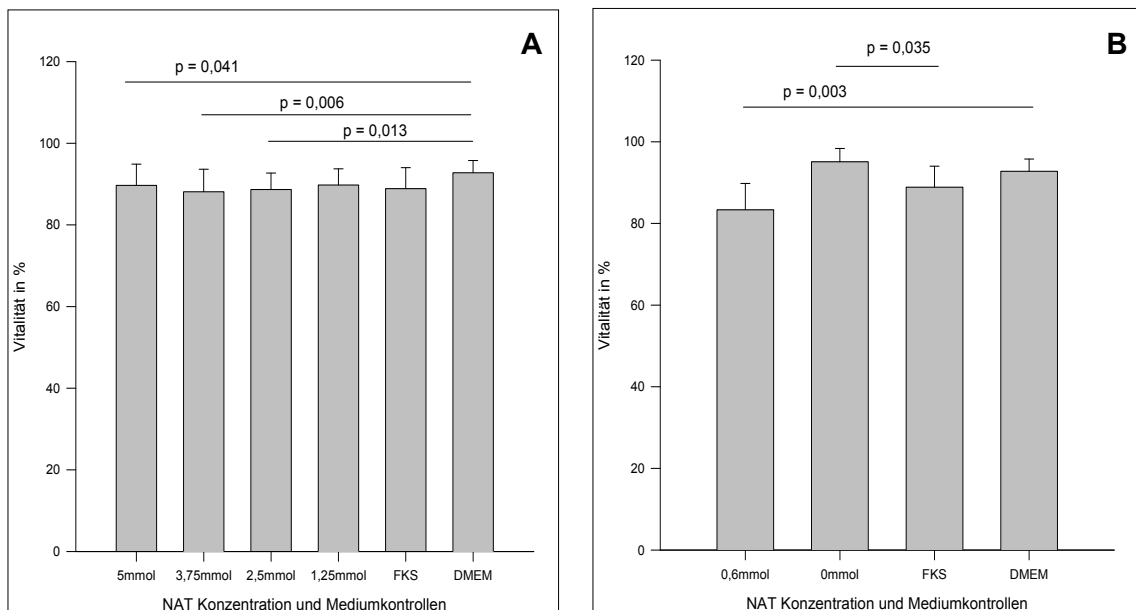


Abbildung 66: Alle Werte der Vitalitätsbestimmung für die einzelnen NAT Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A stellt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol dar und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=6)

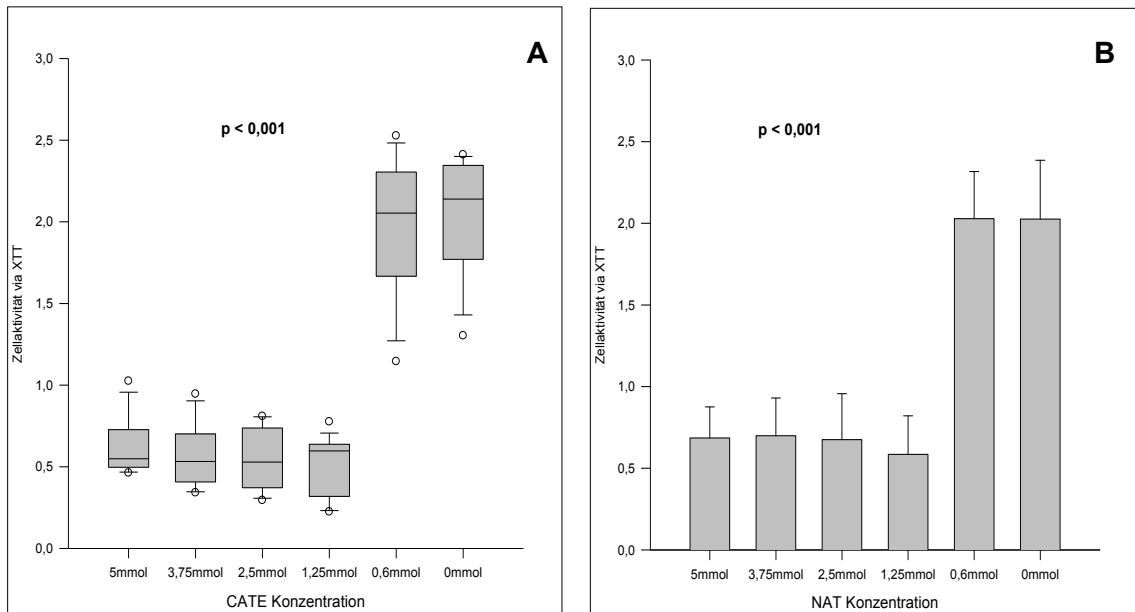


Abbildung 67: Alle Messwerte der XTT Bestimmung für die Zellaktivität im Vergleich von CATE (A) und NAT (B). Sowohl bei CATE als auch bei NAT gibt es zwischen allen Konzentrationen (außer 0,6 mmol) eine Signifikanz von $p < 0,001$ zu 0,6 und 0 mmol. (n=18)

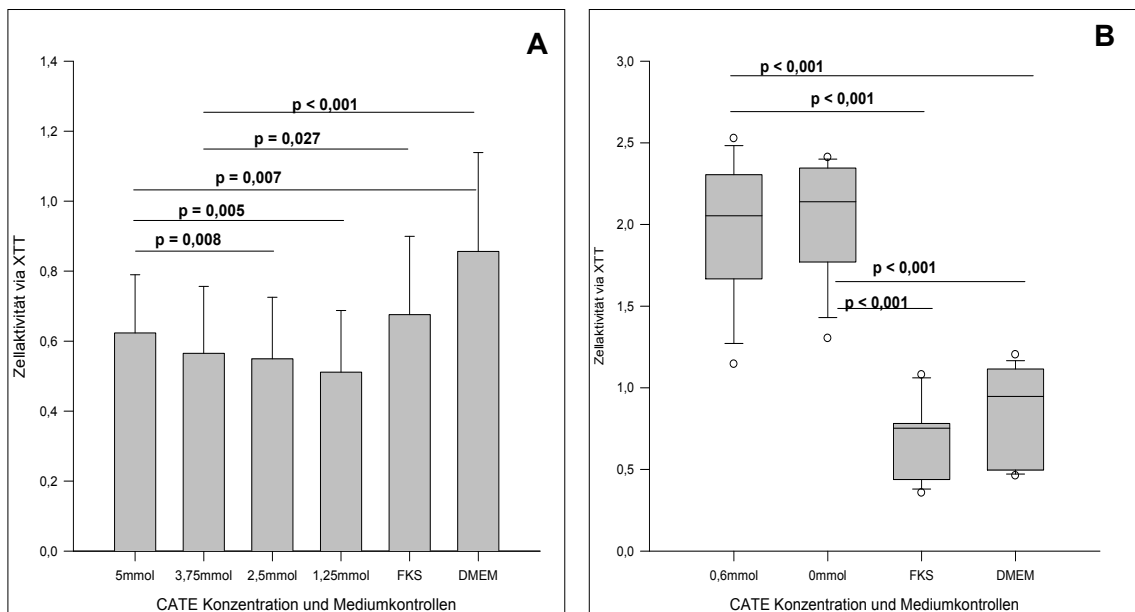


Abbildung 68: Alle Messwerte der Zellaktivität via XTT. Im Vergleich stehen alle CATE Konzentrationen zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die Konzentrationen 0,6 und 0 mmol. (n=18)

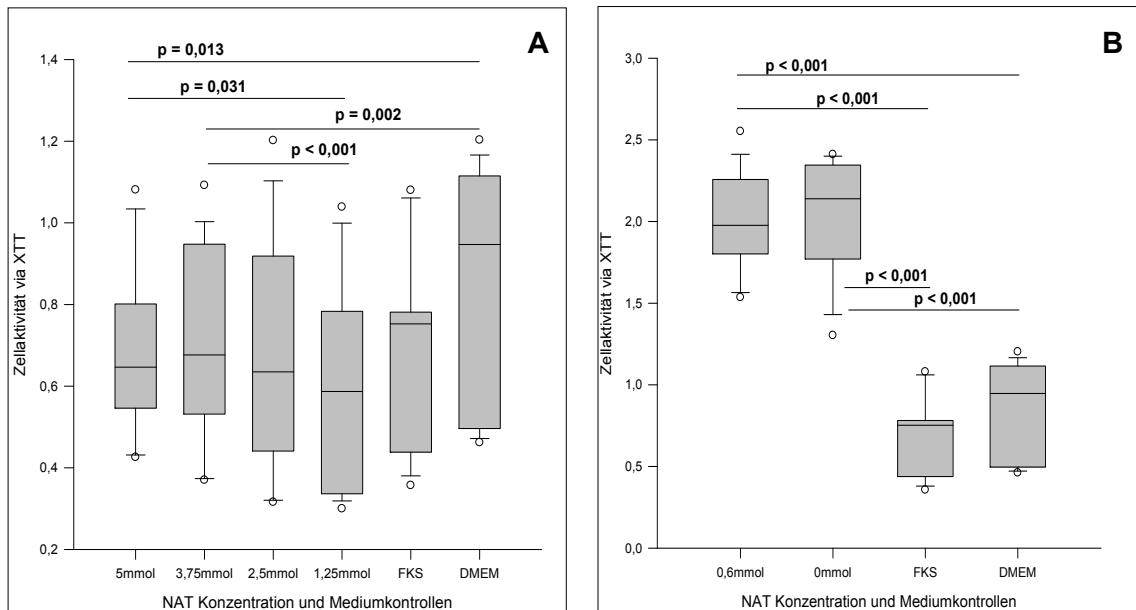


Abbildung 69: Alle Messwerte der Zellaktivität von allen NAT Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B zeigt die 0,6 und 0 mmol Konzentration. (n=18)

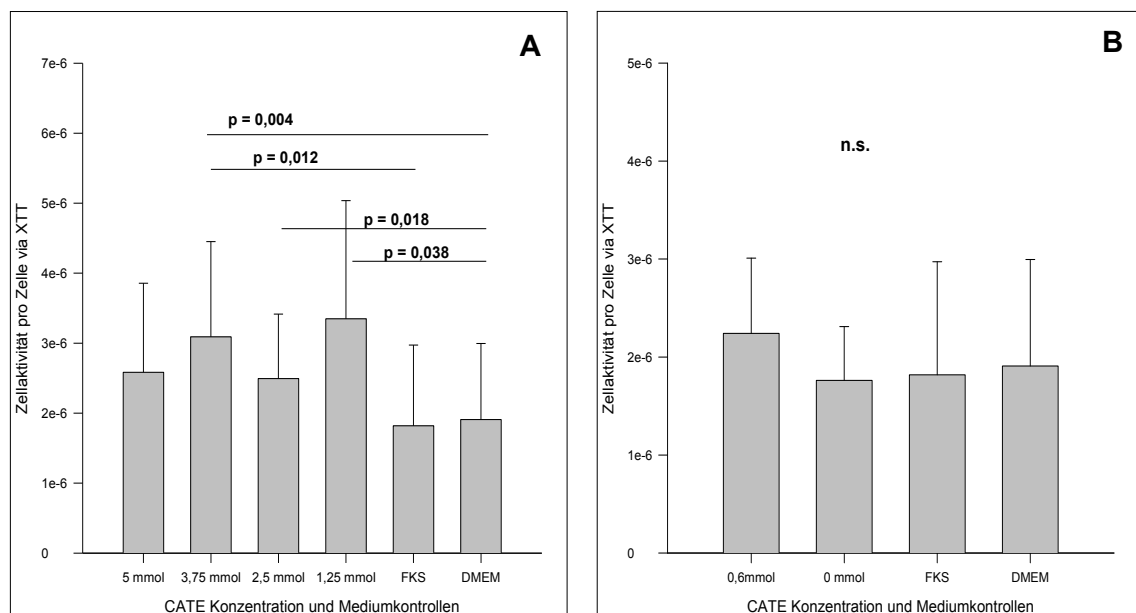


Abbildung 70: Alle errechneten Werte der Zellaktivität pro Zelle für alle CATE Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=19)

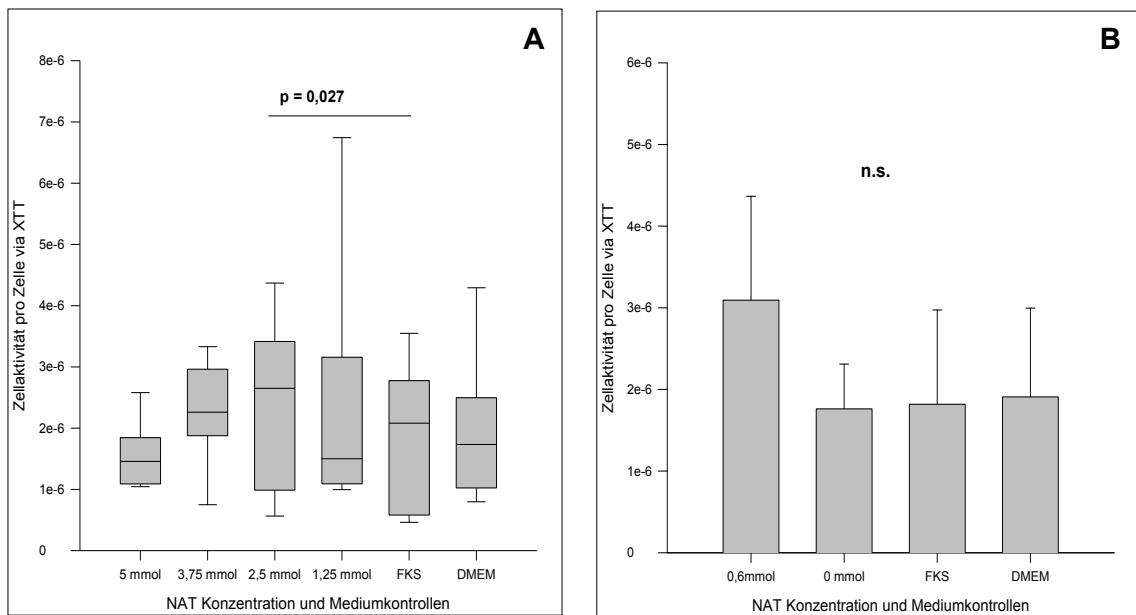


Abbildung 71: Alle errechneten Zellaktivitäten pro Zelle für alle NAT Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=9)

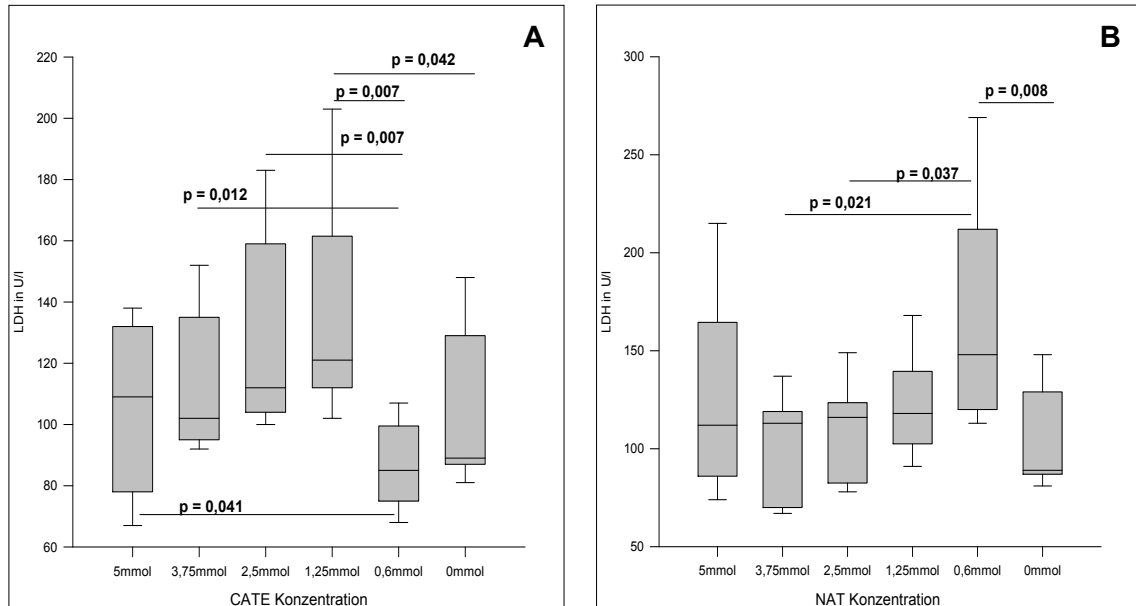


Abbildung 72: Alle Messwerte der LDH Freisetzung für die CATE (A) und NAT (B). (n=9)

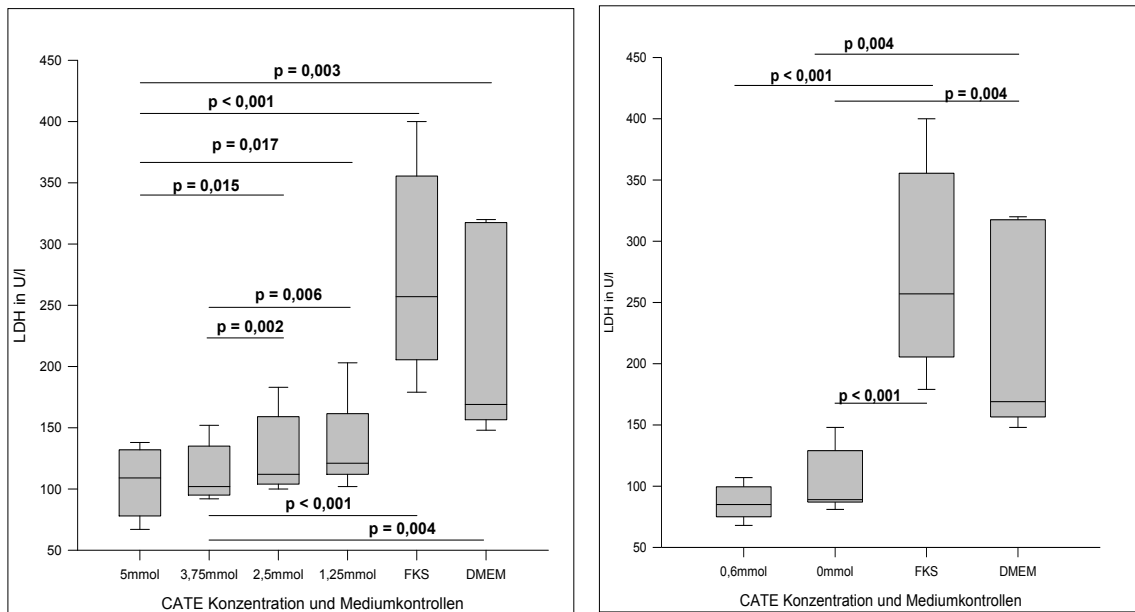


Abbildung 73: Alle LDH Messwerte für die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B) im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)

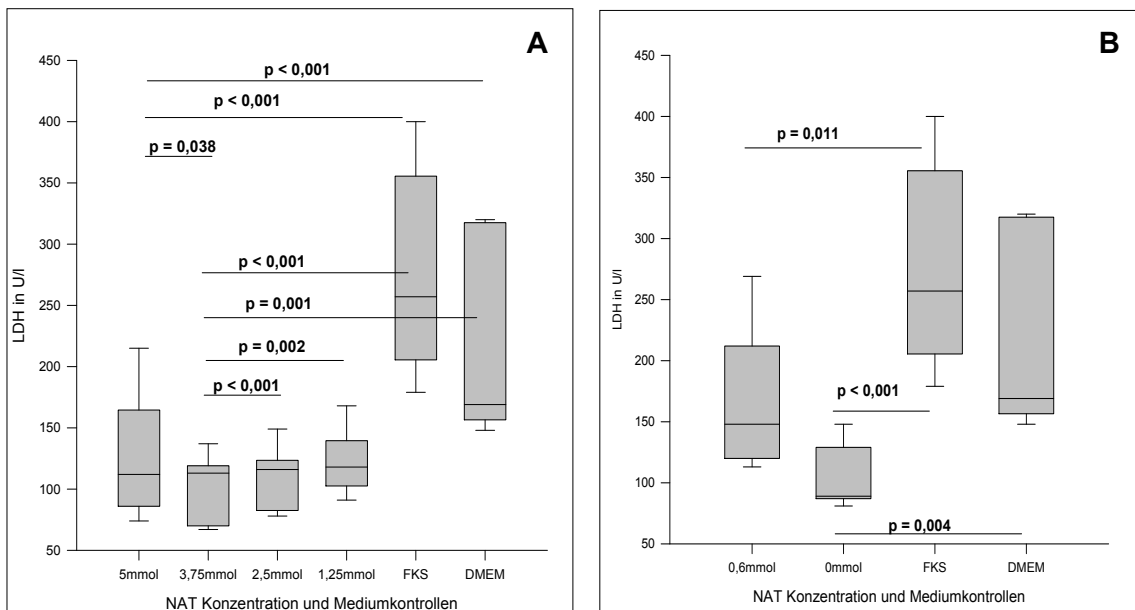


Abbildung 74: Alle Messwerte der LDH Freisetzung der NAT Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol und Abschnitt B die Konzentrationen 0,6 und 0 mmol. (n=9)

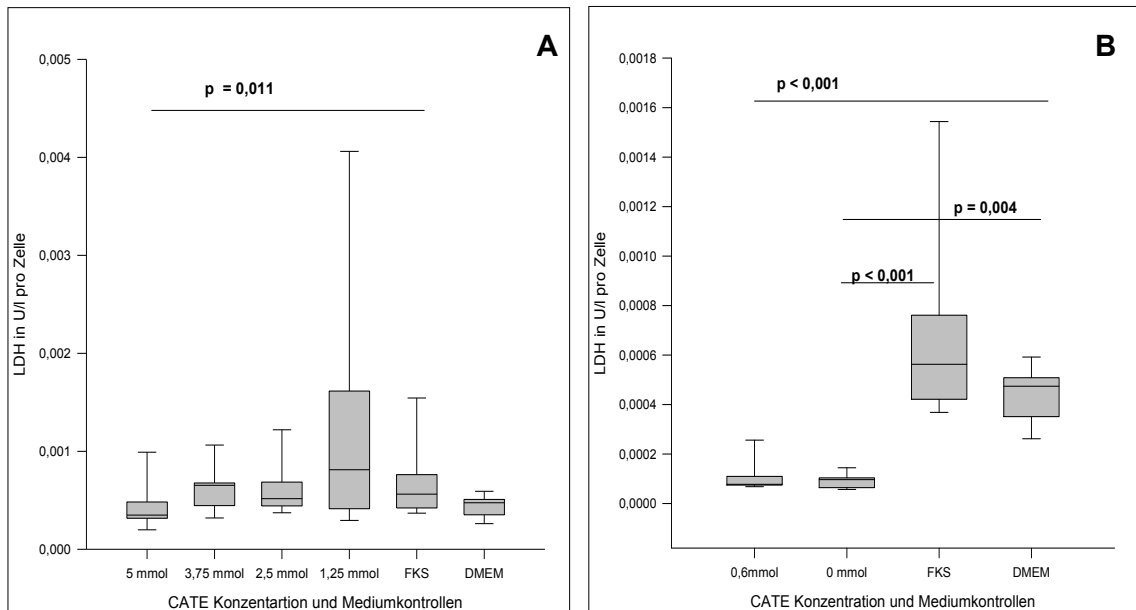


Abbildung 75: Alle errechneten Werte der LDH Freisetzung pro Zelle für die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B) im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)

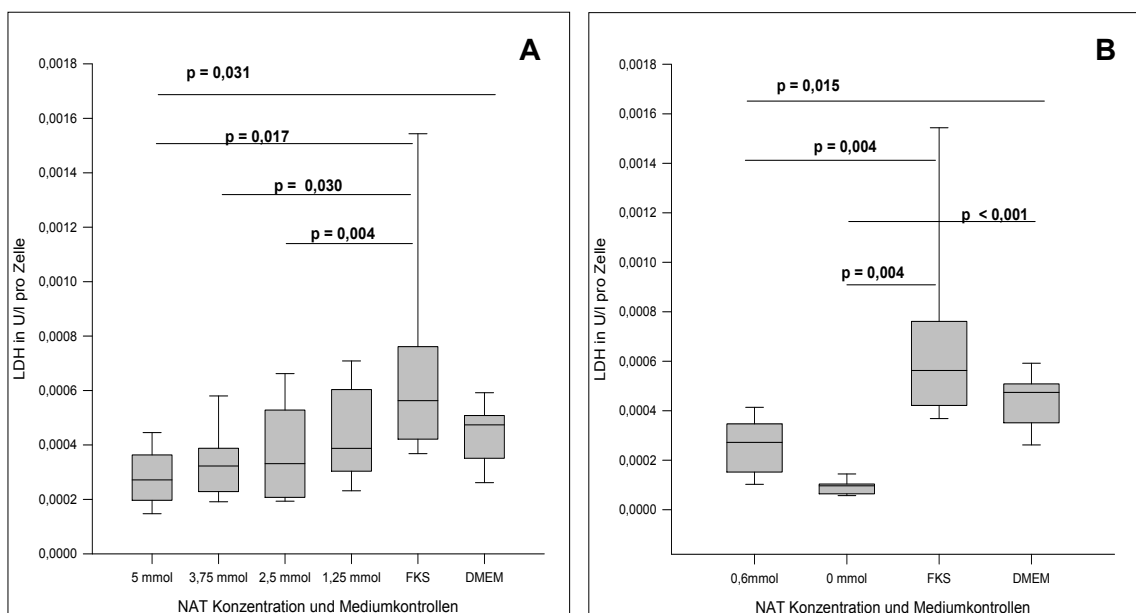


Abbildung 76: Alle errechneten LDH Werte für die NAT Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. Abschnitt A stellt die Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol dar und Abschnitt B die 0,6 und 0 mmol. (n=9)

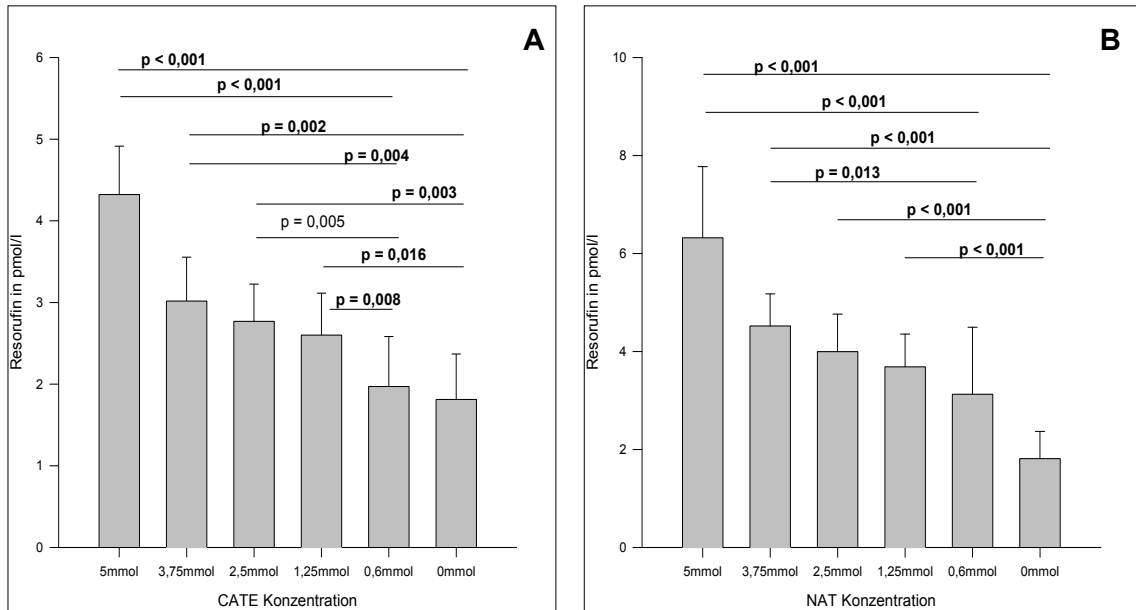


Abbildung 77: Alle Werte der Resorufinmessung für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen. (n=9)

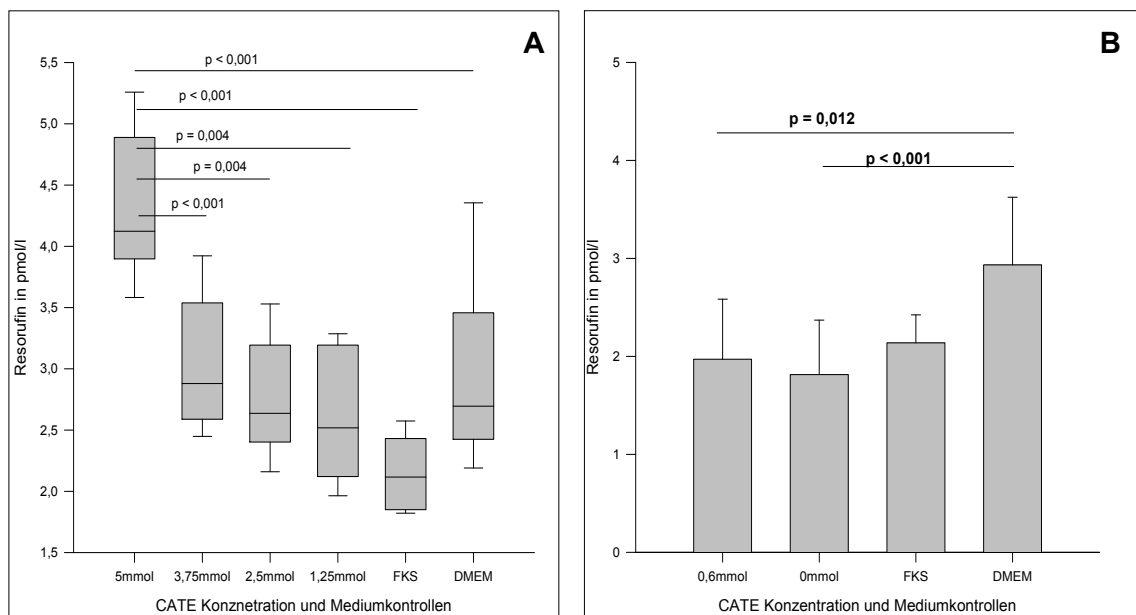


Abbildung 78: Alle Messwerte der Resorufinumsetzung für die CATE Konzentrationen 5 bis 1,25 mmol (A) und 0,6 und 0 mmol (B) im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)

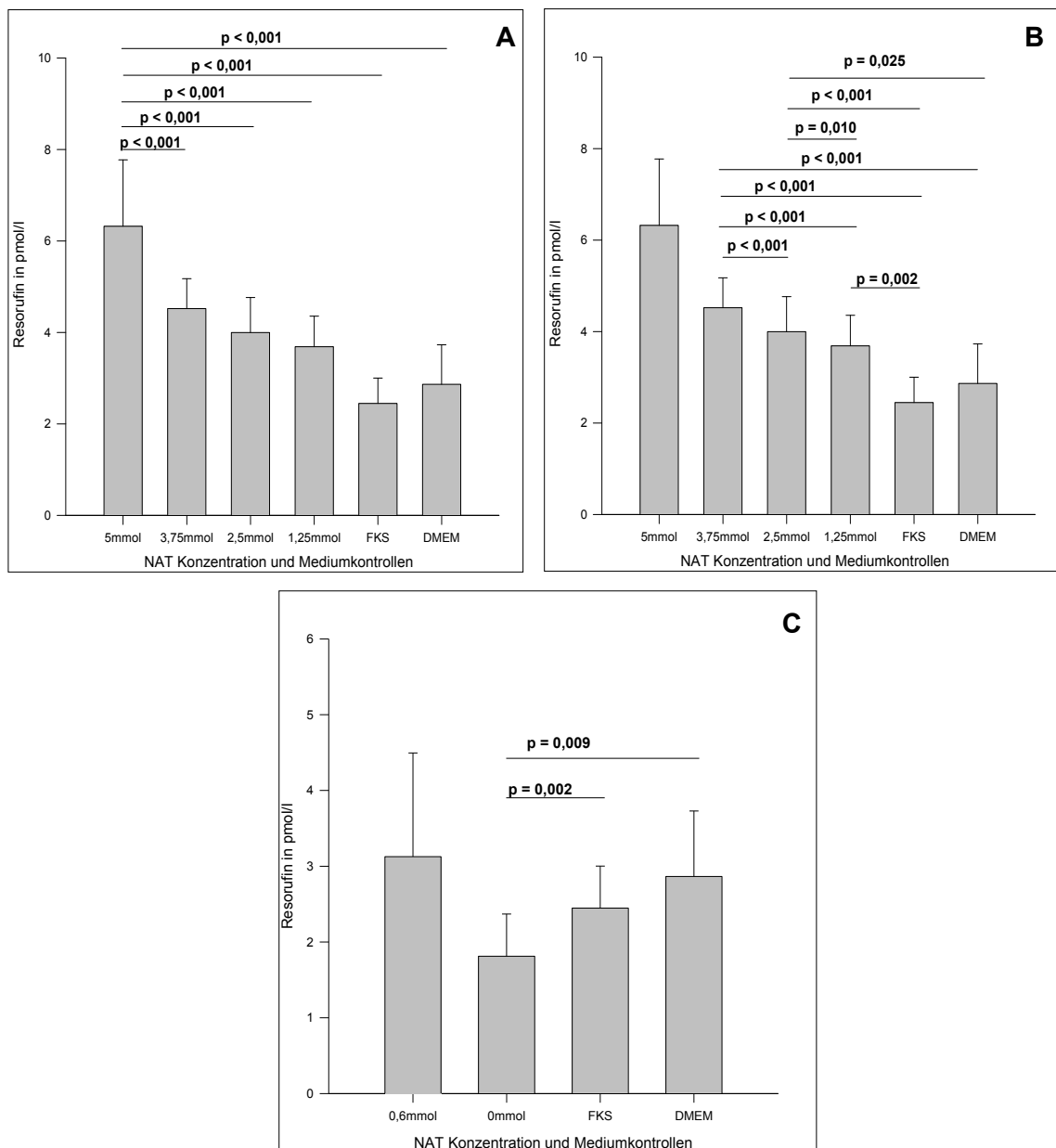
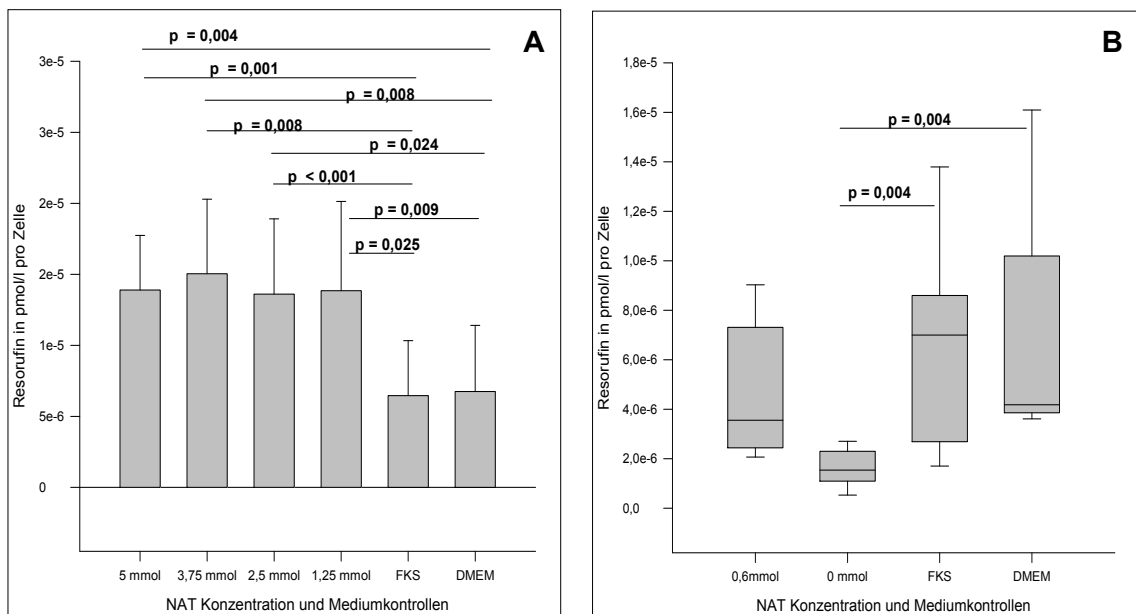
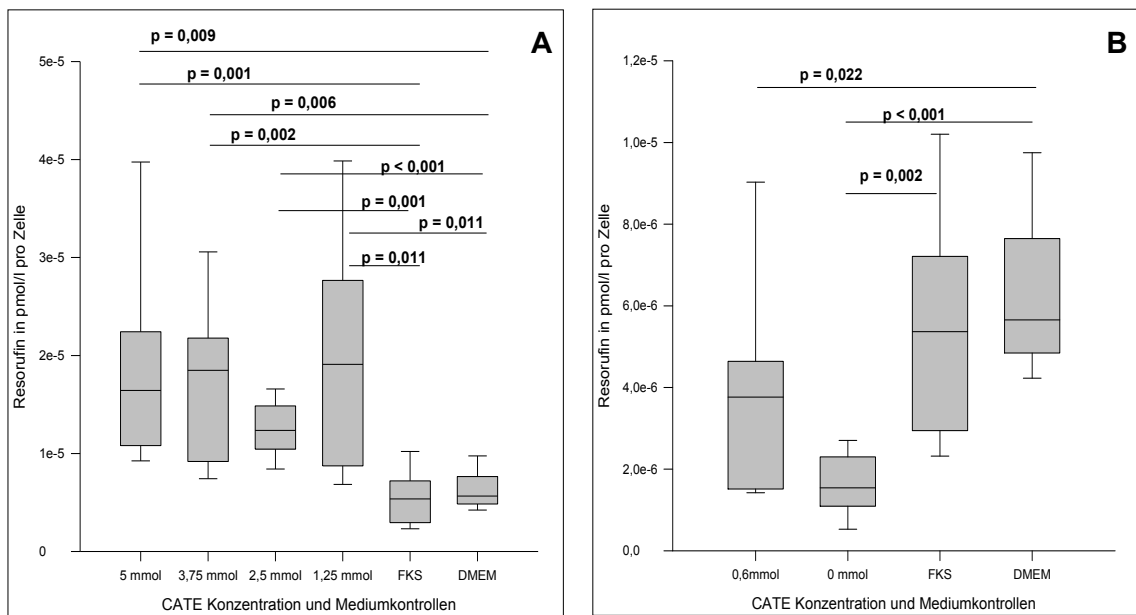


Abbildung 79: Alle Messwerte der Resorufinumsetzung der NAT Konzentrationen. In Abschnitt A werden die Werte und Signifikanzen der 5mmol im Vergleich zu den Mediumkontrollen gezeigt, in Abschnitt B die 3,75 bis 1,25 mmol und in Abschnitt C die 0,6 und 0 mmol. (n=9)



7.5.5 Vergleich unterschiedlicher Albuminkonzentrationen

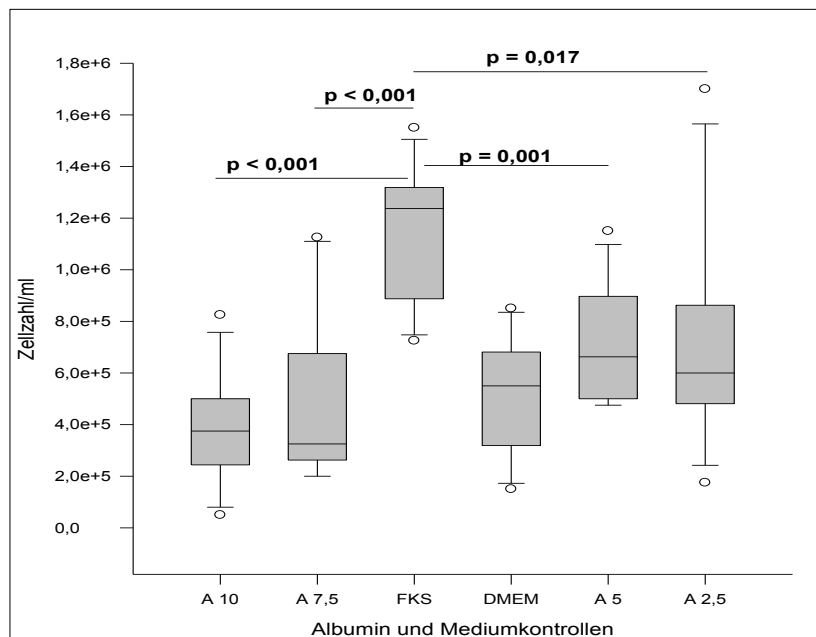


Abbildung 82: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der verschiedenen Albuminkonzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=12)

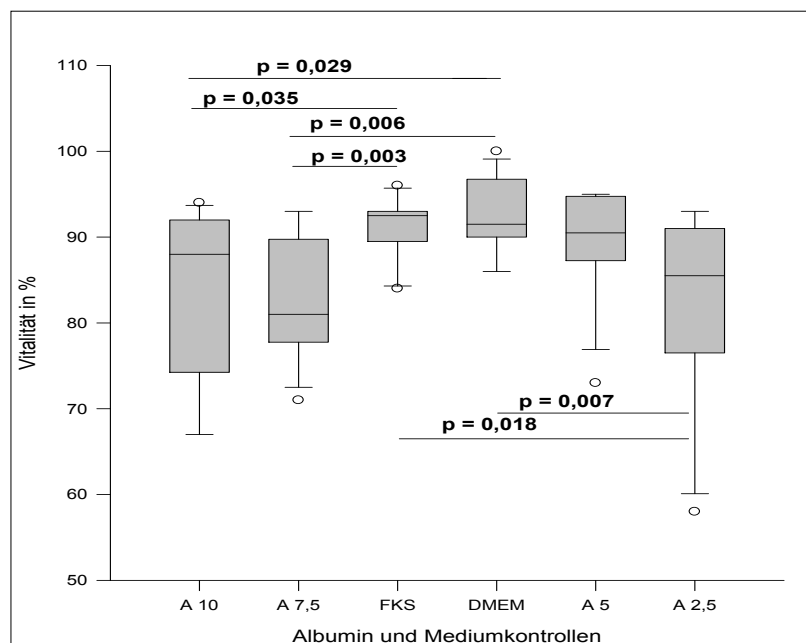


Abbildung 83: Die Vitalitätsbestimmung für das Standard Albumin im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=12)

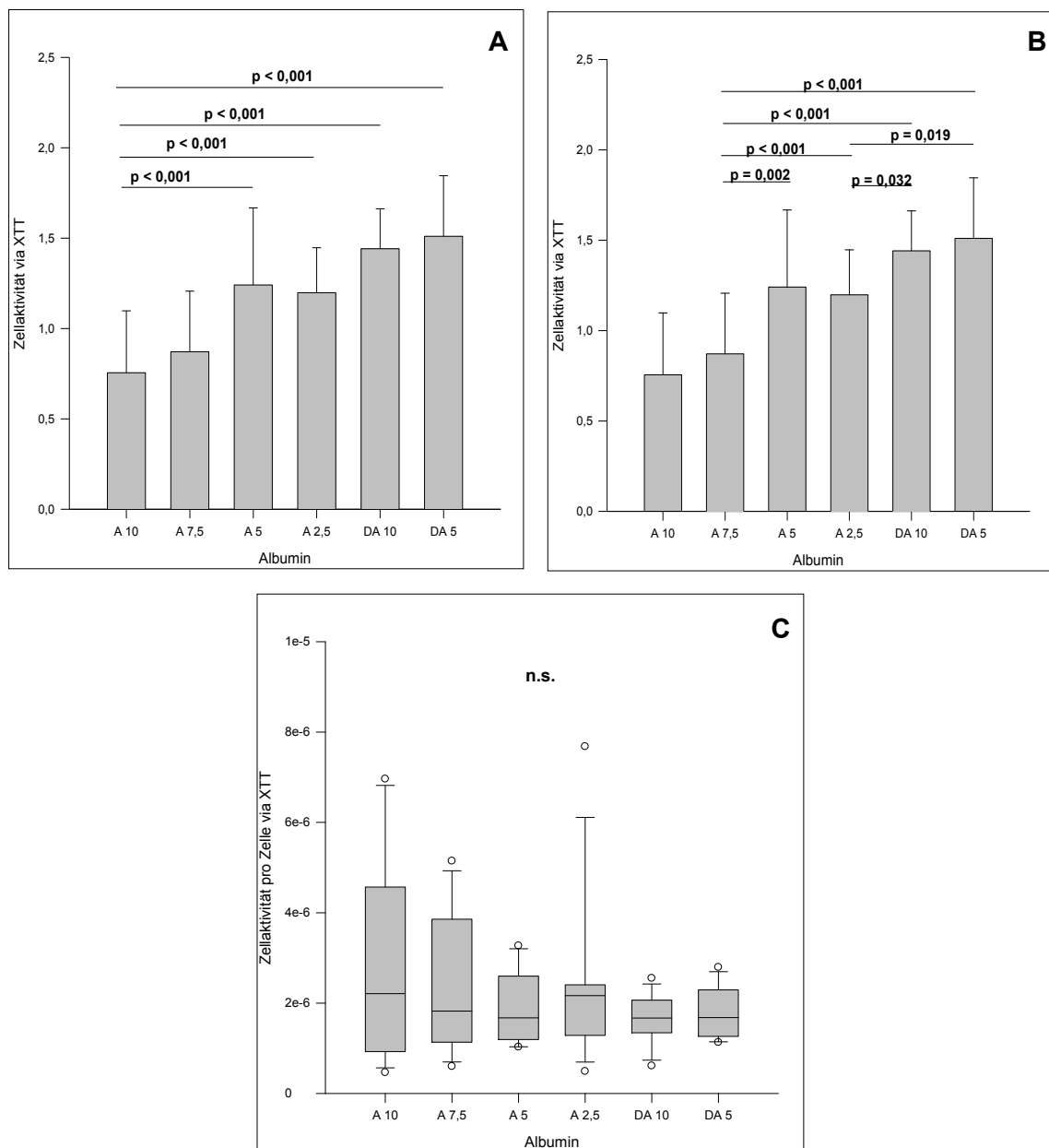


Abbildung 84: Alle Ergebnisse der XTT Messung für Standard HSA und Deligandisiertes HSA (A/B) und die dazugehörigen errechneten Werte der Zellaktivität pro Zelle für beide Albumine (C). (n=12)

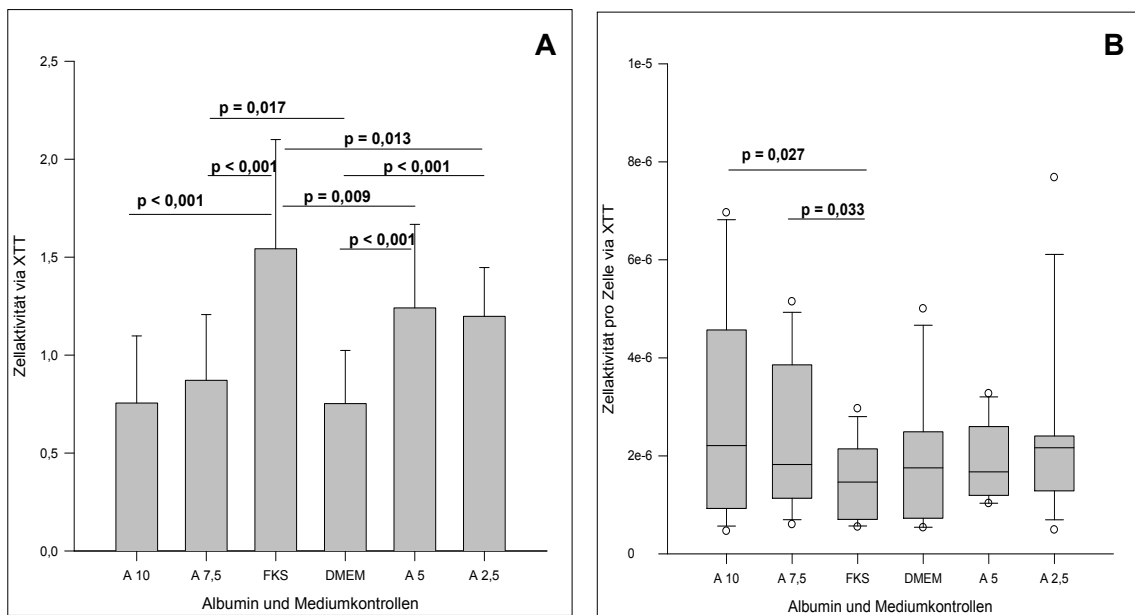


Abbildung 85: Alle Ergebnisse für die Zellaktivität vom Standard Albumin im Vergleich mit den Mediumkontrollen. Abschnitt A zeigt die eigentlichen Messwerte, Abschnitt B die errechnete Aktivität pro Zelle. (n=12)

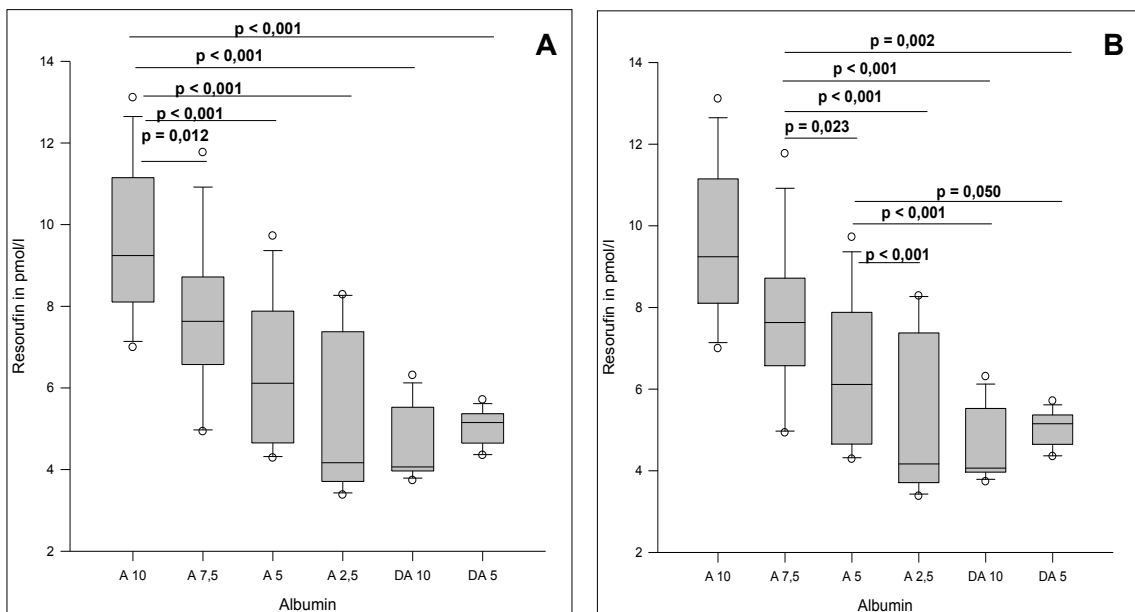


Abbildung 86: Die eigentlichen Messwerte der Resorufinumsetzung vom Standard Albumin und deligandisiertem Albumin. Im Abschnitt A werden alle Signifikanzen von A 10 gezeigt in Abschnitt B die von allen anderen. (n=12)

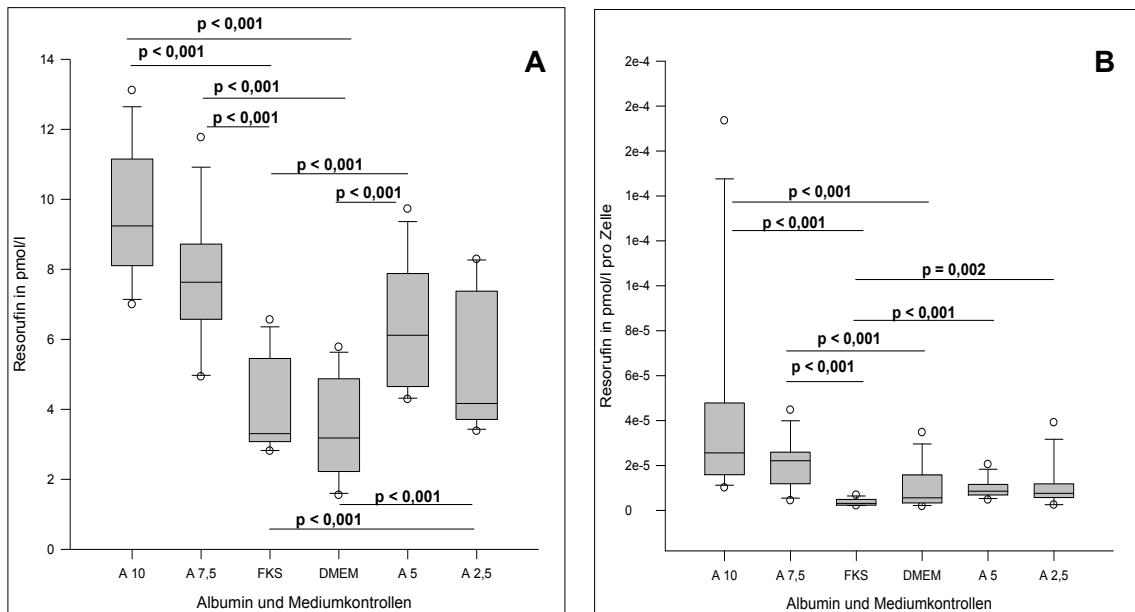


Abbildung 87: Alle Messwerte der Resorufin Konzentration (A) und die errechneten Umsätze pro Zelle (B) für alle Albuminkonzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=12)

7.5.6 Vergleich von Plasma und Albumin mit und ohne CATE

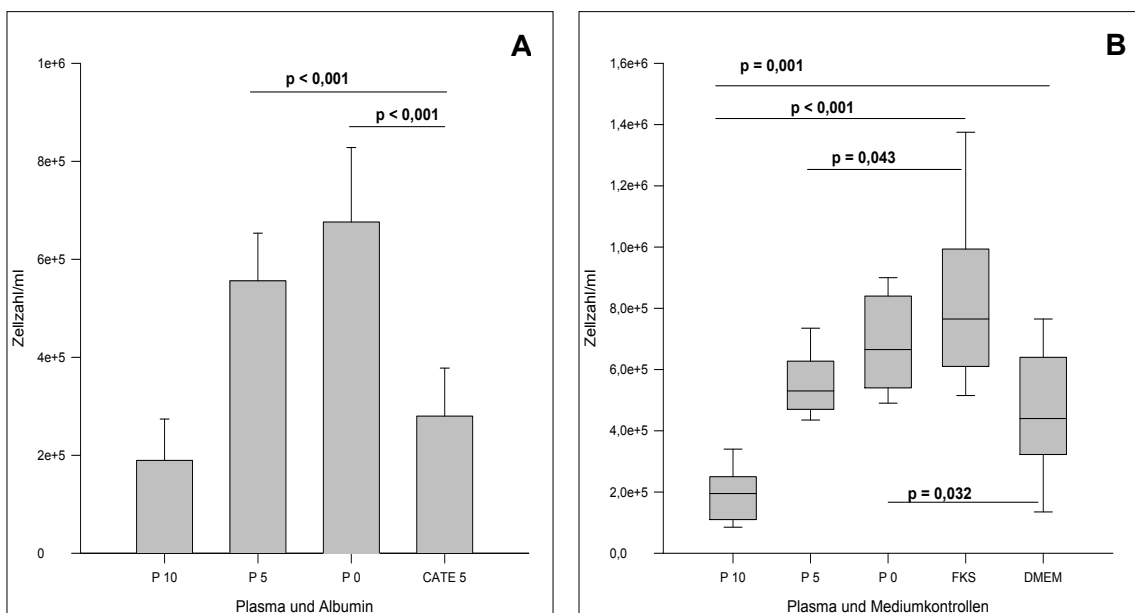


Abbildung 88: Alle Ergebnisse und Signifikanzen der Zellzahlbestimmung von Plasma im Vergleich zu CATE 5 (A) und den Mediumkontrollen (B). (n=9)

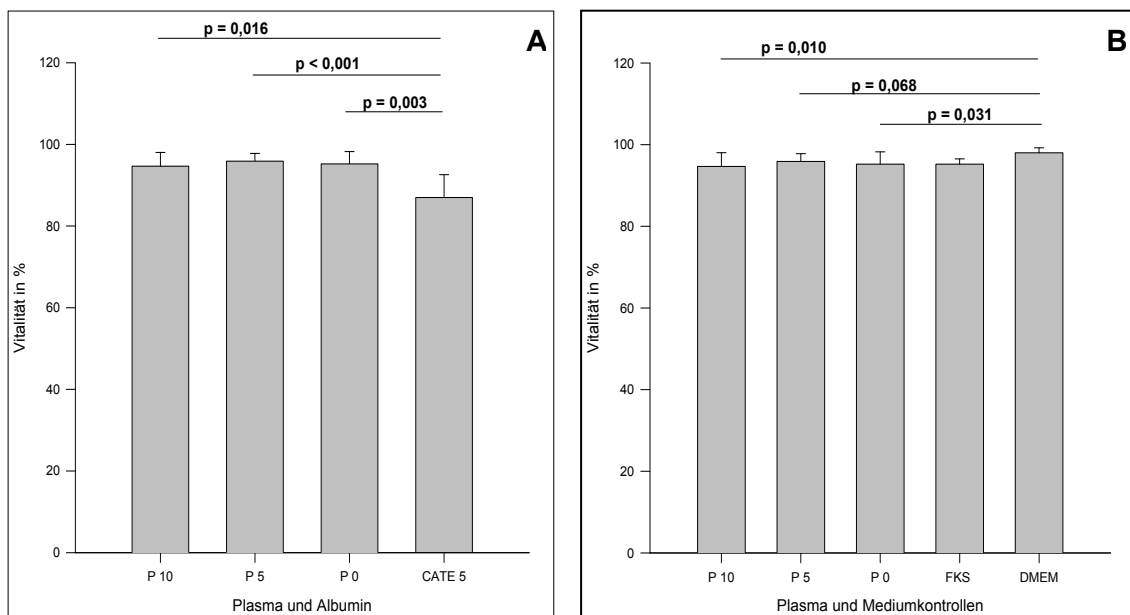


Abbildung 89: Alle Werte der errechneten Vitalität vom Plasma und CATE 5 (A), sowie den Mediumkontrollen (B). Es werden alle Signifikanzen angezeigt. (n=9)

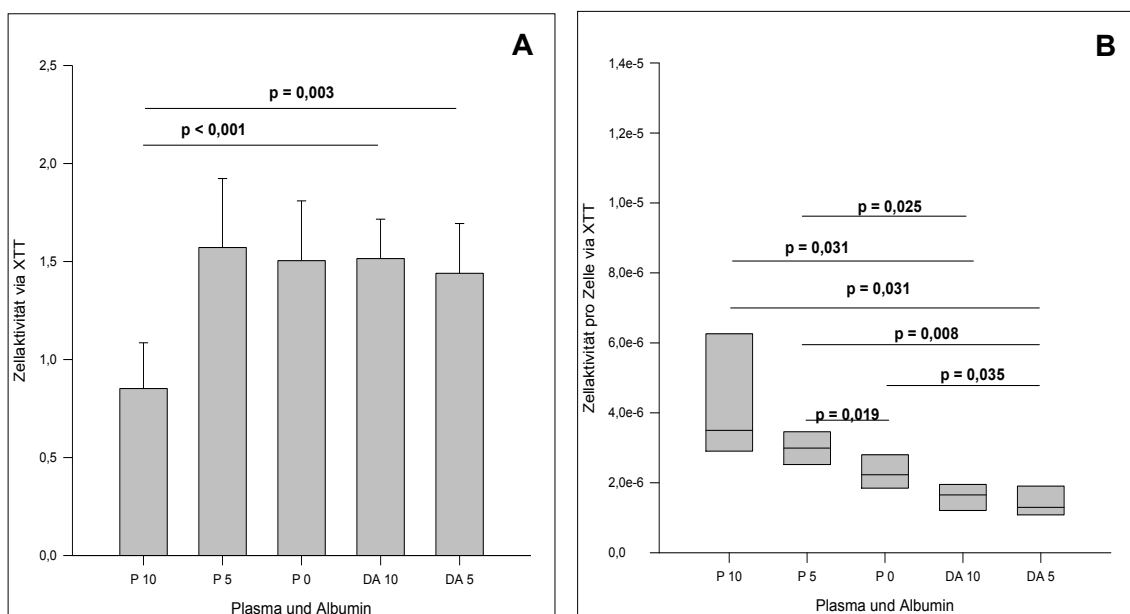


Abbildung 90: Alle Messwerte (A) und errechneten Zellaktivitäten pro Zelle (B) für den Vergleich von Plasma und deligandisierten Albumin. (n=6)

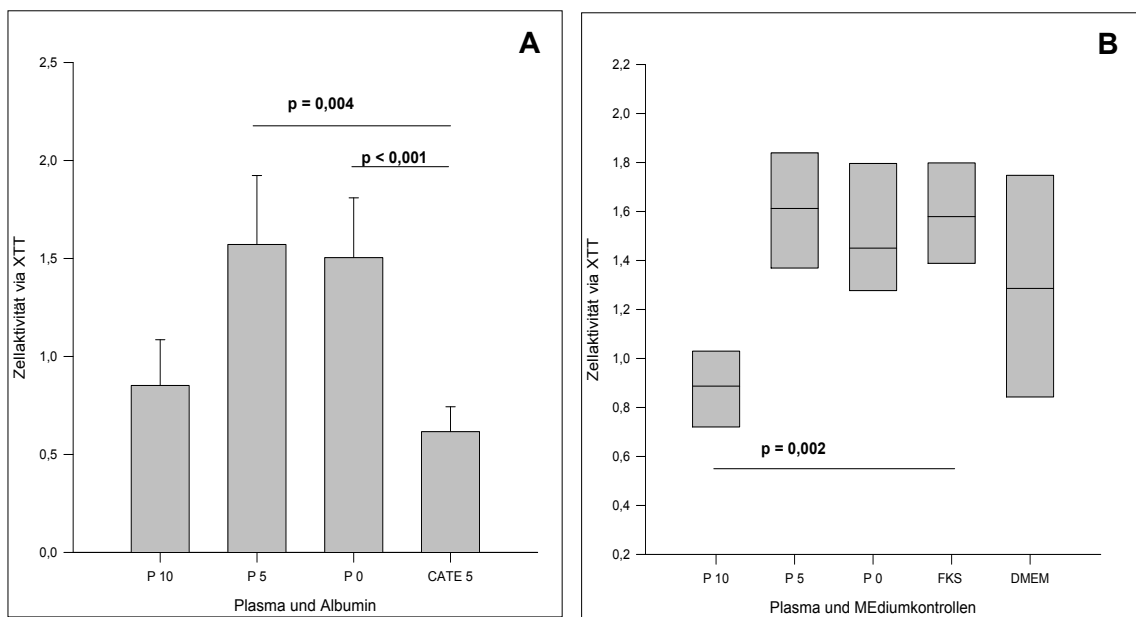


Abbildung 91: Alle Ergebnisse der Zellaktivität via XTT für Plasma im Vergleich zu CATE 5 (A) und Mediumkontrollen (B). (n=9)

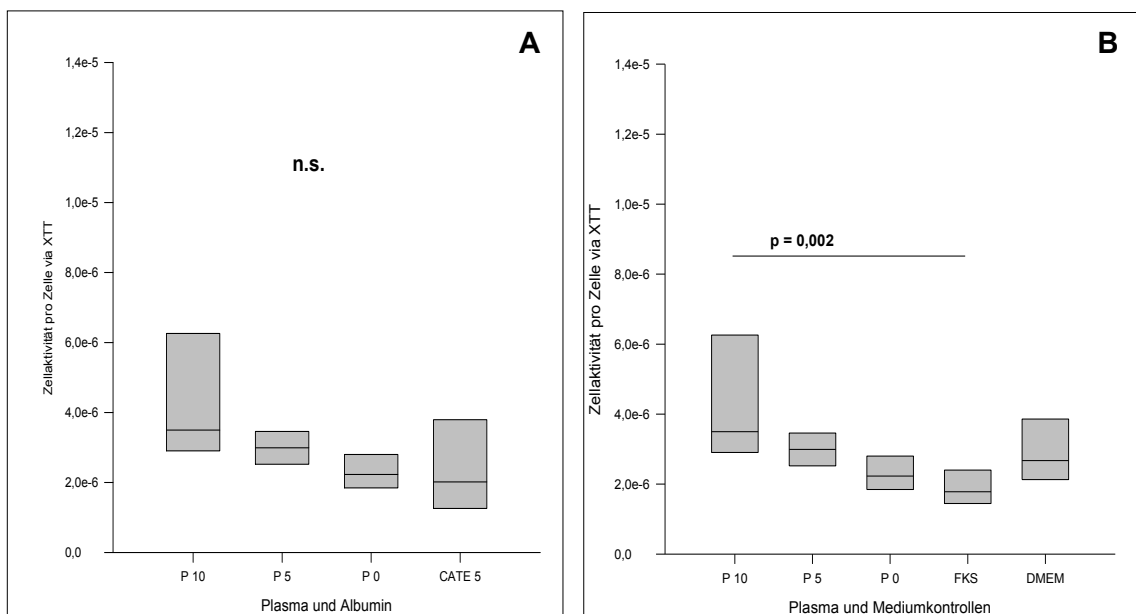


Abbildung 92: Zellaktivitäten pro Zelle via XTT Methode. Plasma im Vergleich zu CATE 5 (A) und zu Mediumkontrollen (B). Alle Signifikanzen sind in der Abbildung mit dargestellt. (n=6)

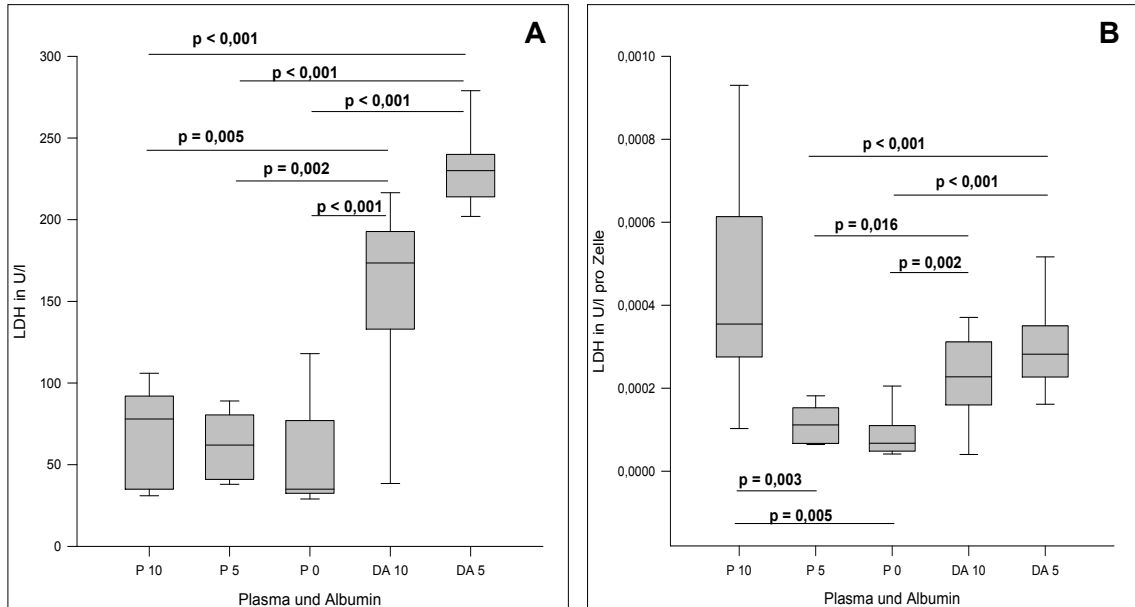


Abbildung 93: Alle Werte der LDH Messung (A) und die errechnete LDH Freisetzung pro Zelle für den Vergleich von Plasma und deligandisiertem Albumin. (n=9)

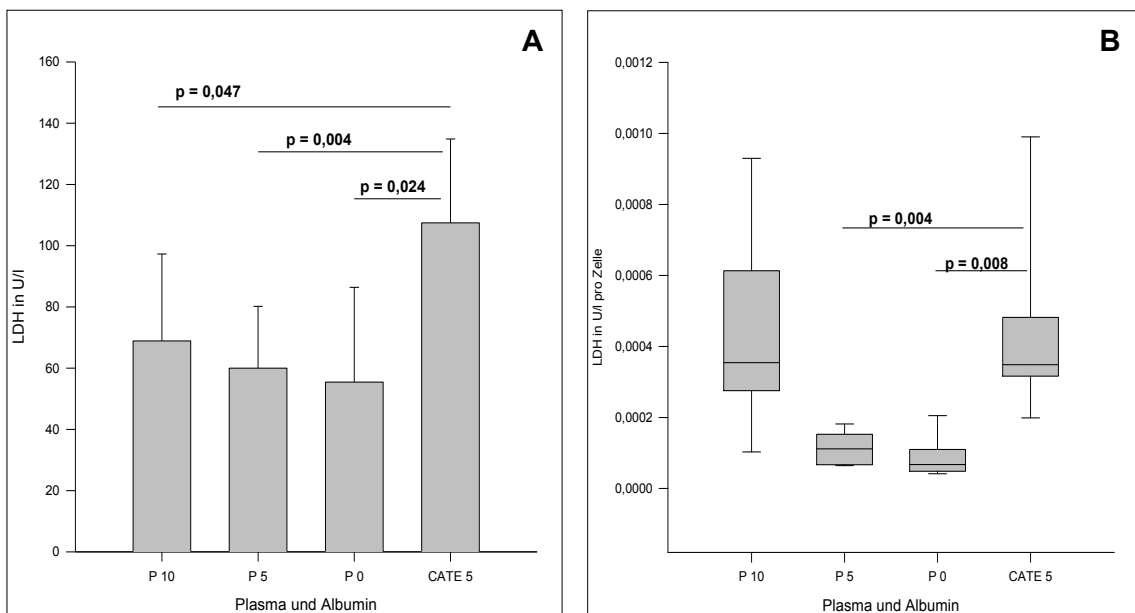


Abbildung 94: Alle Werte zur LDH Freisetzung im Vergleich von Plasma mit CATE 5. Es werden die eigentlich gemessenen Werte dargestellt (A), als auch die Errechneten pro Zelle (B). (n=9)

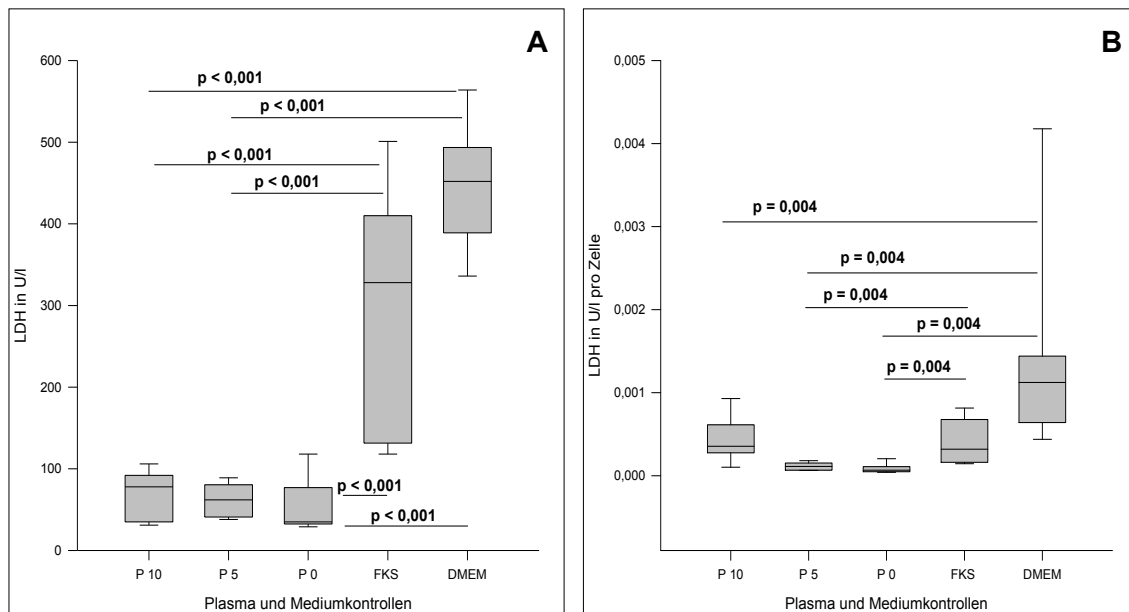


Abbildung 95: Es werden die Ergebnisse der LDH Messung im Vergleich von Plasma und den Mediumkontrollen mit allen Signifikanzen dargestellt (A). Abschnitt B zeigt alle Werte pro Zelle. (n=9)

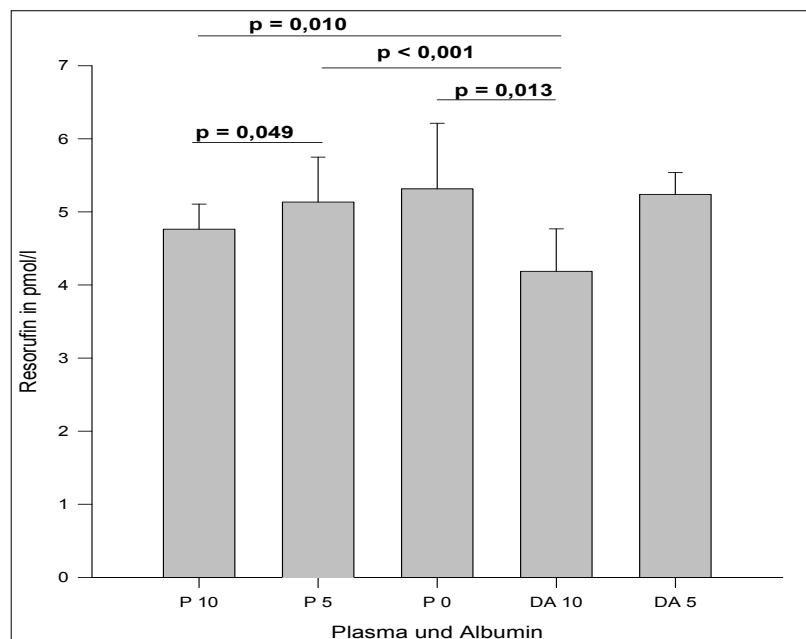


Abbildung 96: Die Messwerte der Resorufinumsetzung für den Vergleich von Plasma und deligandisierten Albumin. (n=9)

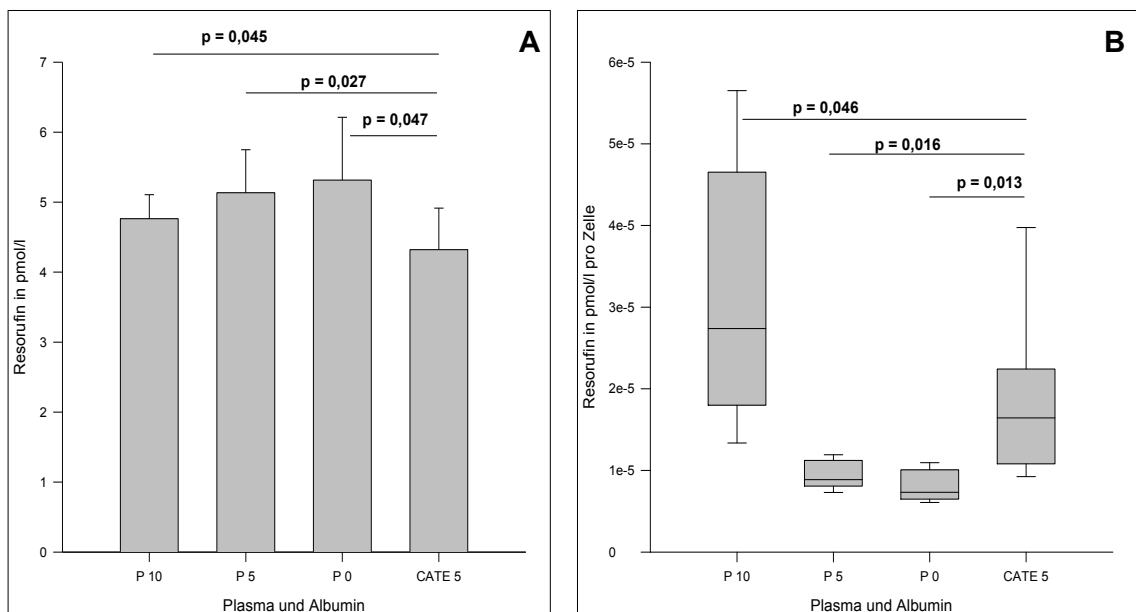


Abbildung 97: In dieser Abbildung werden alle Ergebnisse der Resorufinmessung dargestellt. Es werden alle drei Plasmen mit CATE 5 verglichen. Abschnitt A zeigt die ermittelten Werte und Abschnitt B die Ergebnisse pro Zelle. (n=9)

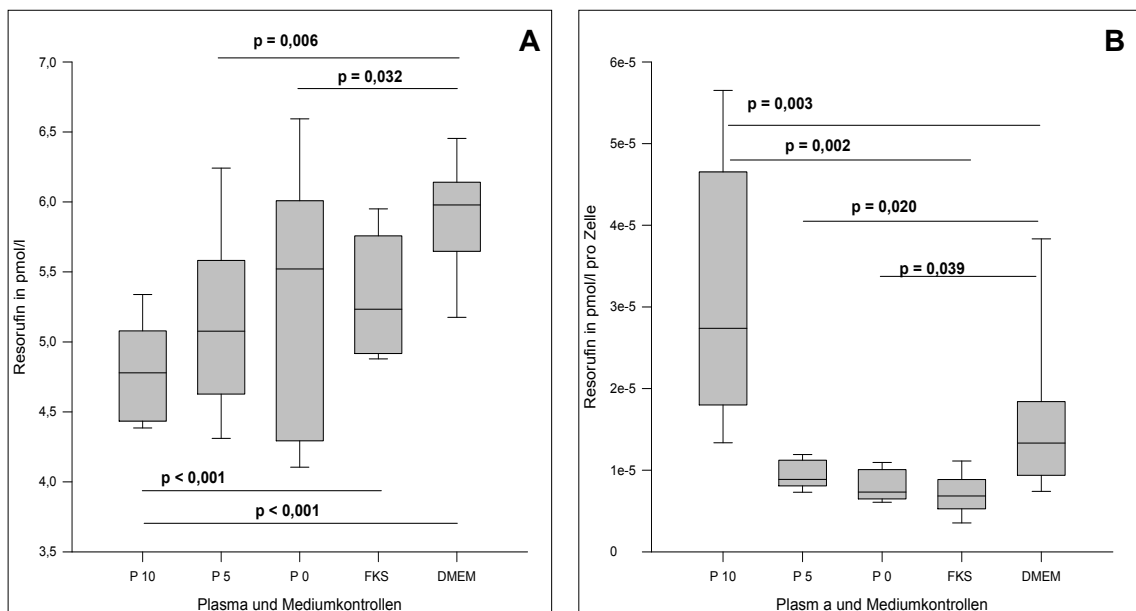


Abbildung 98: In diesen Darstellungen werden die Resorufinumsätze und die dazu gehörigen Signifikanzen vom Plasma dargestellt. Im Vergleich stehen jetzt die Mediumkontrollen. In Abschnitt A sind die gemessenen Werte, in Abschnitt B die Werte pro Zelle. (n=9)

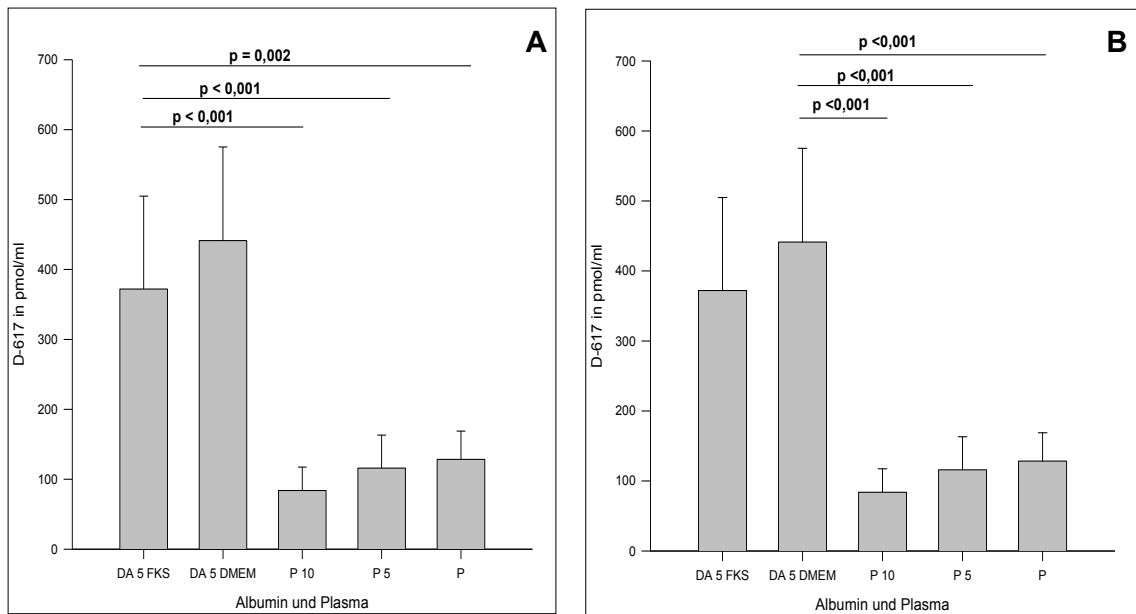


Abbildung 99: Alle Messwerte der Verapamilumsetzung in den D-617 Metabolit für deligandisiertes Albumin im Vergleich mit Plasma. Abschnitt A zeigt alle Signifikanzen von DA 5 FKS und Abschnitt B die von DA 5 DMEM. (n=6)

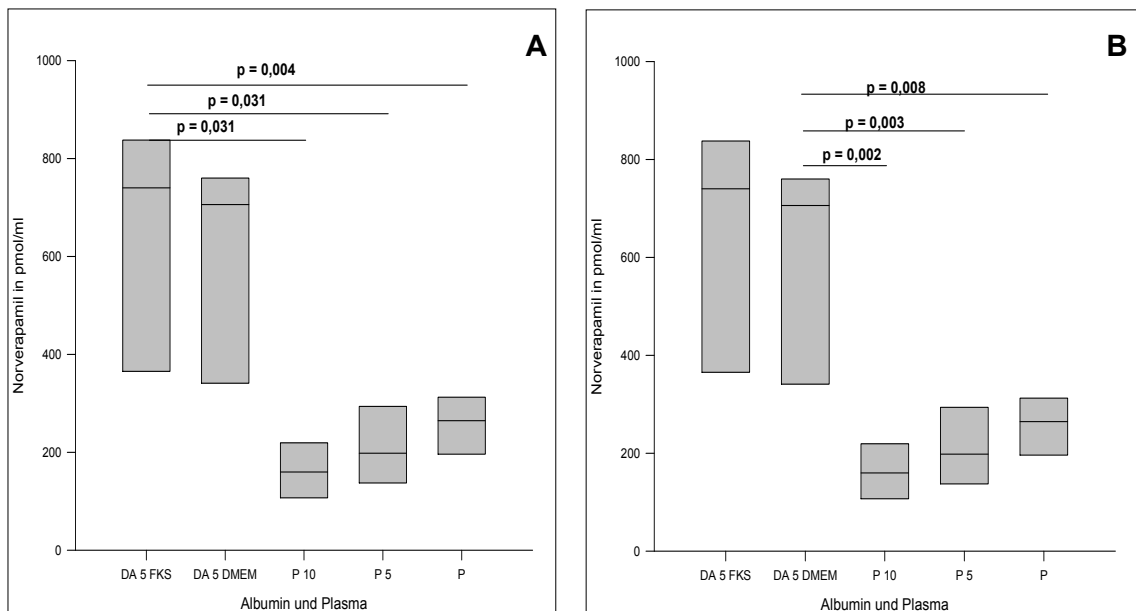


Abbildung 100: Die Ergebnisse der Verapamilumsetzung zu seinen Metabolit Norverapamil im Vergleich von deligandisiertes Albumin und Plasma. Abschnitt A stellt die Signifikanzen von DA 5 FKS dar und Abschnitt B von DA 5 DMEM. (n=6)

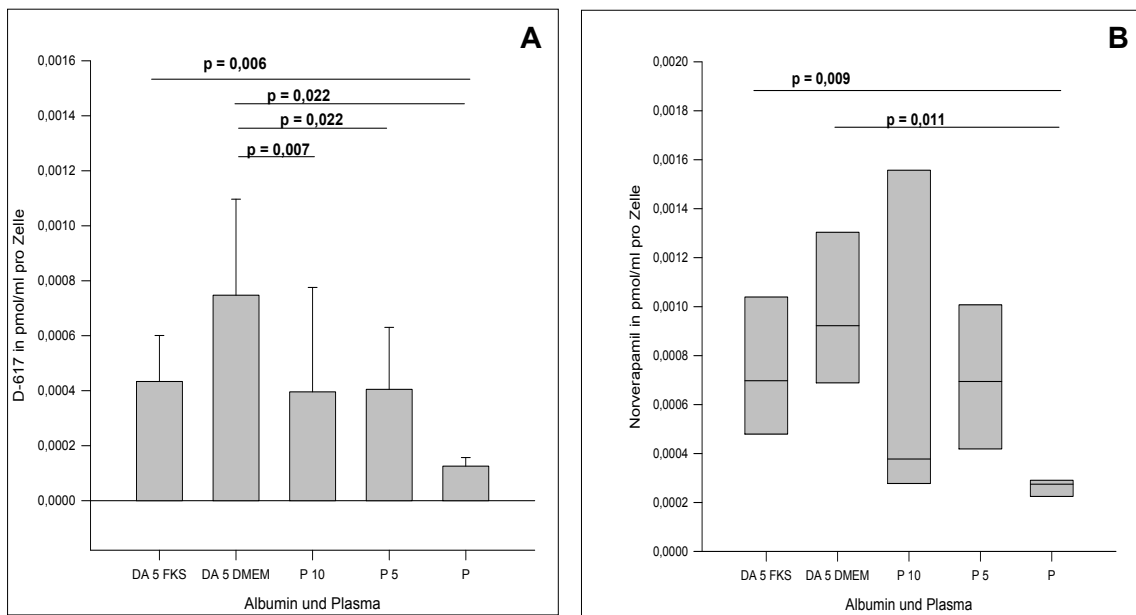


Abbildung 101: Alle errechneten Ergebnisse der Verapamilumsetzung in seine Metabolite D-617 (A) und Norverapamil (B) pro Zelle. Im Vergleich stehen das deligandisierte Albumin und Plasma. (n=6)

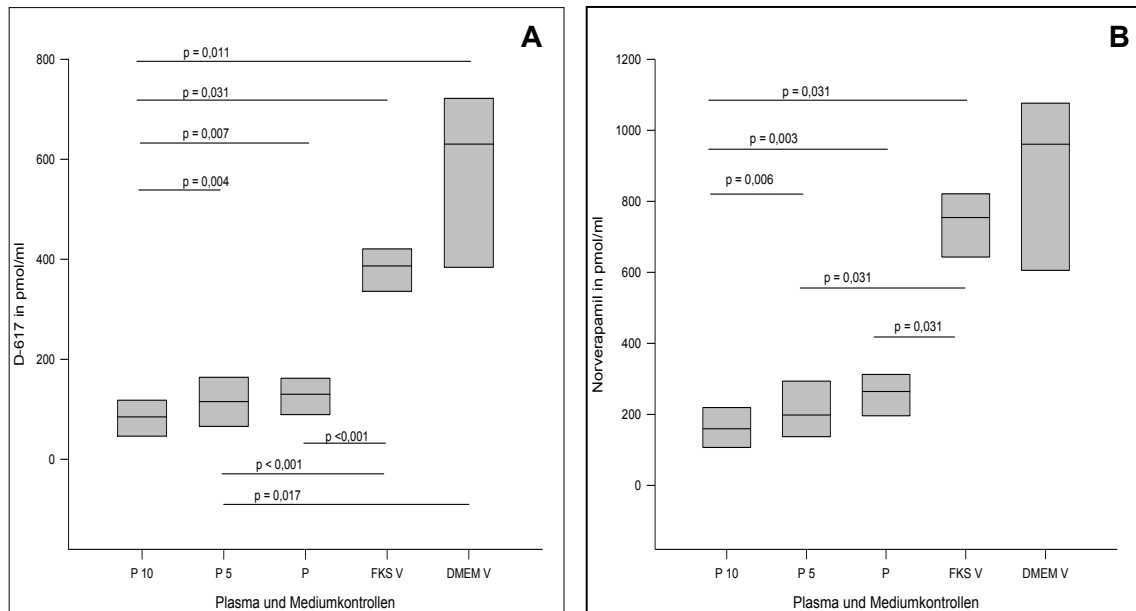


Abbildung 102: Alle Ergebnisse der Verapamil Metaboliten D-617 (A) und Norverapamil (B) für Plasma im Vergleich zu Mediumkontrollen. (n=6)

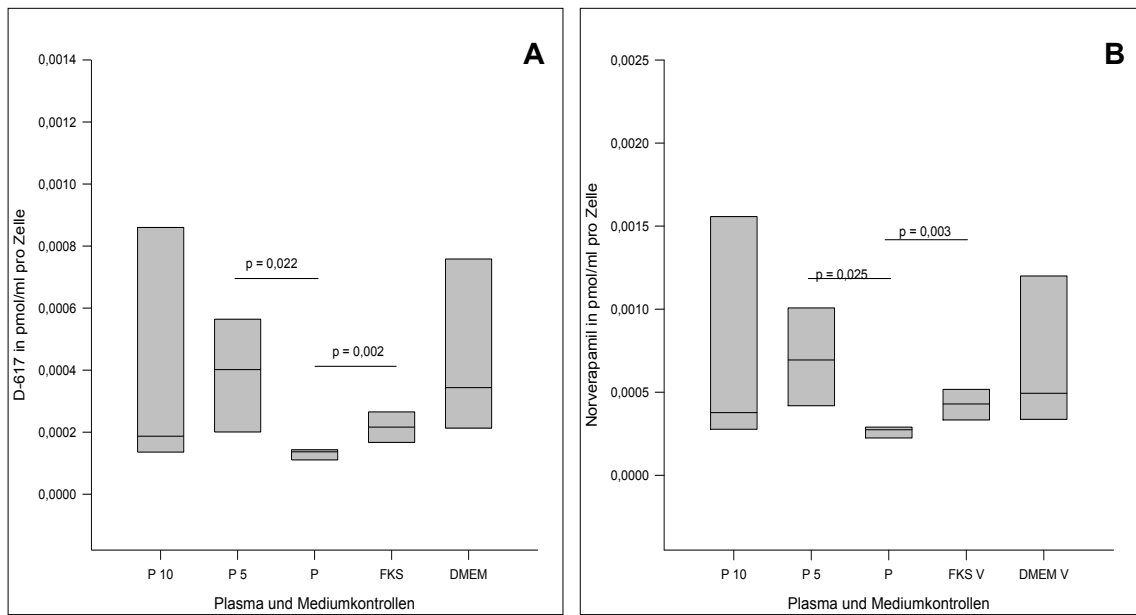


Abbildung 103: Dargestellt werden alle errechneten Werte der Verapamil Metaboliten D-617 (A) und Norverapamil (B) pro Zelle für Plasma und Mediumkontrollen. (n=6)

7.5.7 ive Dead Färbung

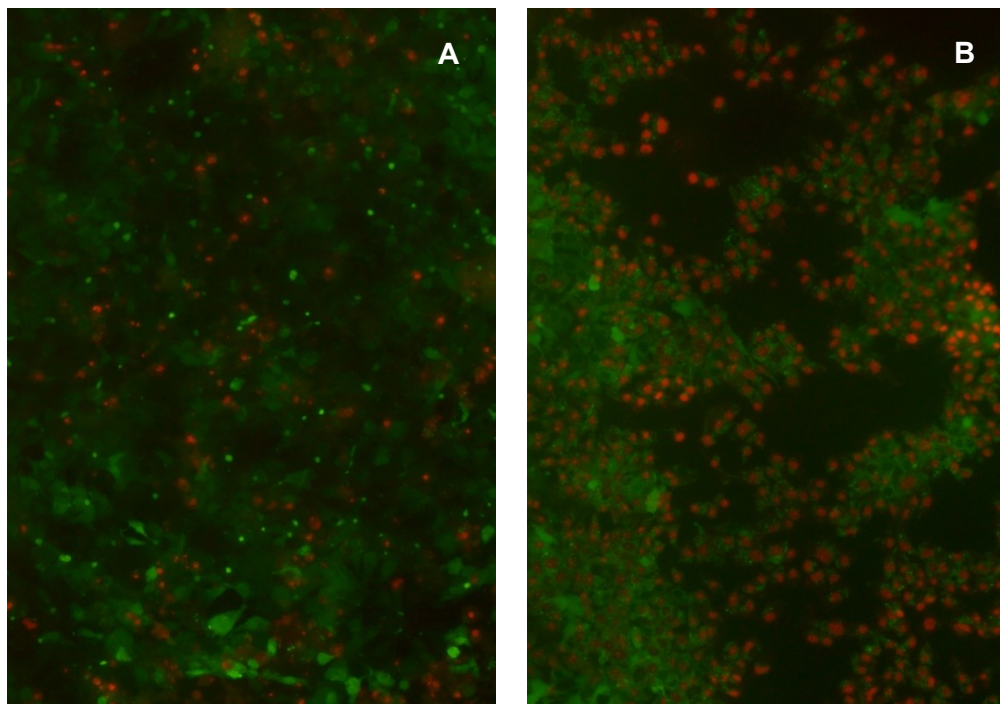


Abbildung 104: 5 % Albumin mit 2,5 mmol/l CATE (A) und 2,5 mmol/l NAT (B)

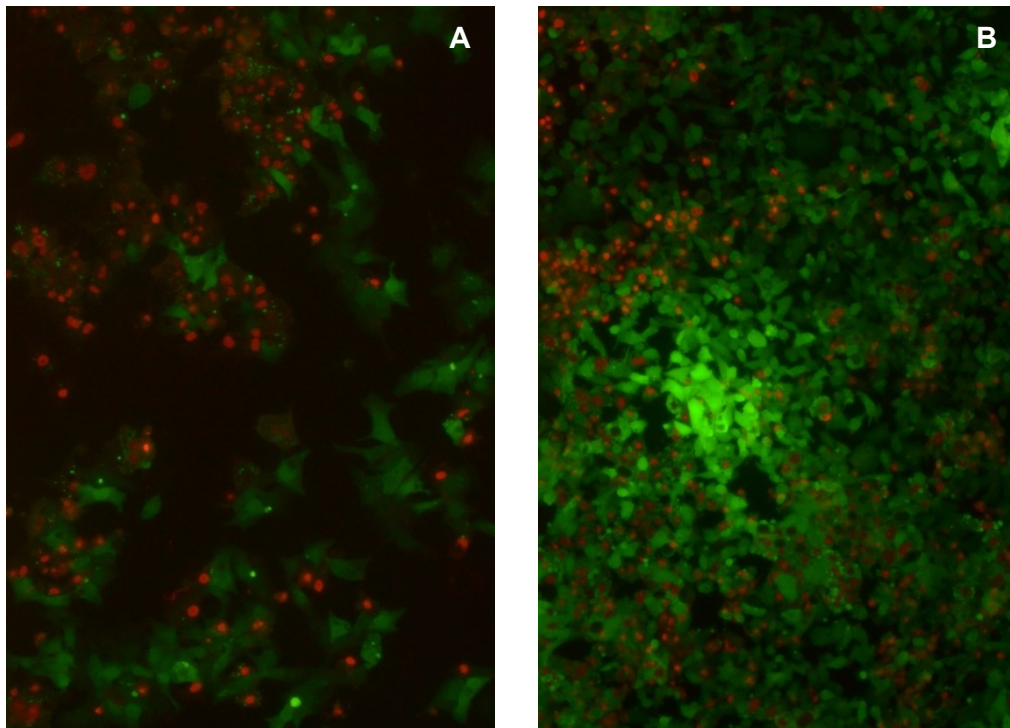


Abbildung 1065: 5 % Standard Albumin mit beiden Stabilisatoren (A); 5 % deligandisiertes Albumin (B)

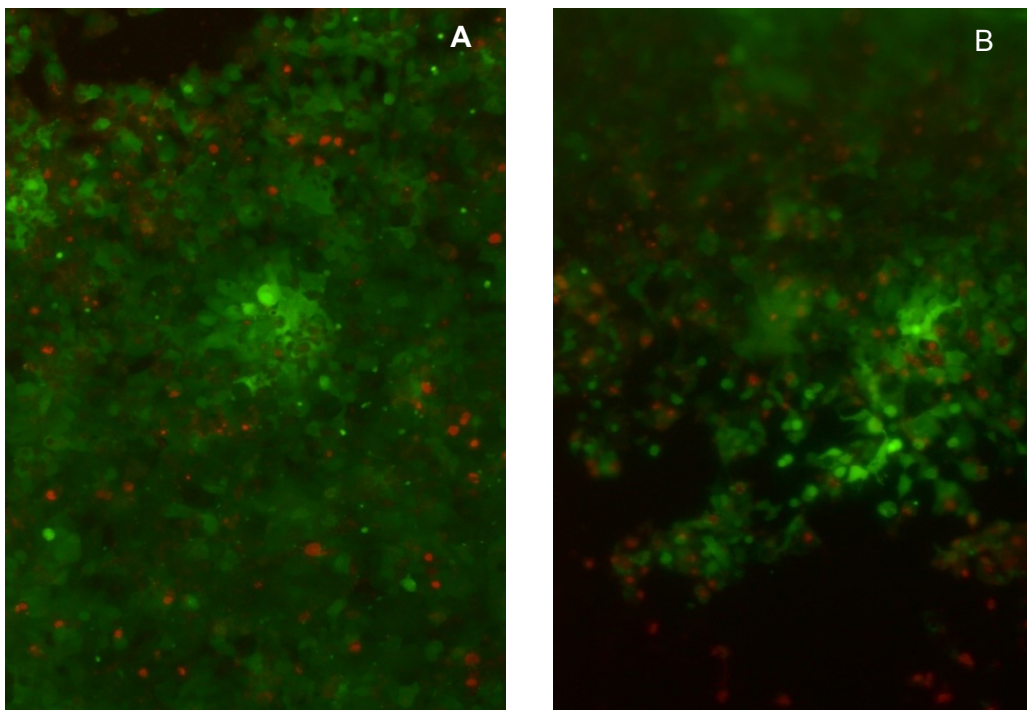


Abbildung 1056: Mediumkontrolle FKS (A); Mediumkontrolle DMEM (B)

7.5.8 Bionasensor

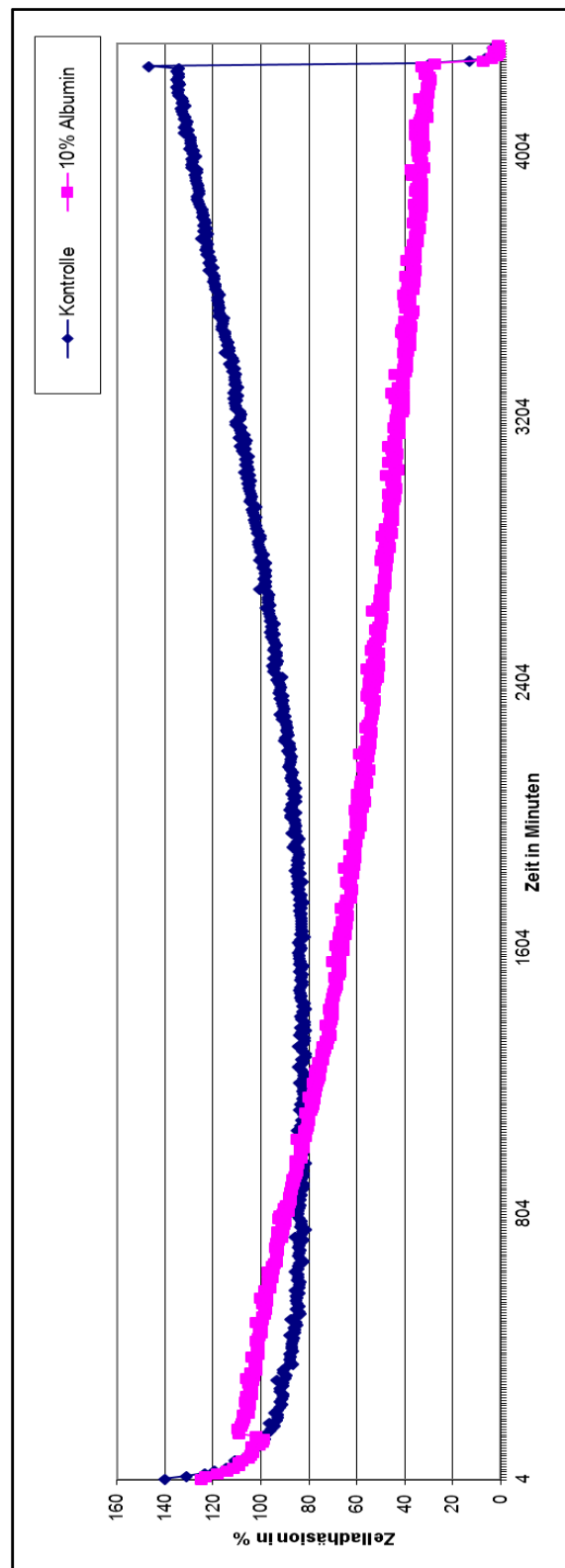


Abbildung 107: Messung der Zelladhäsion von 10 % Standard Albumin.

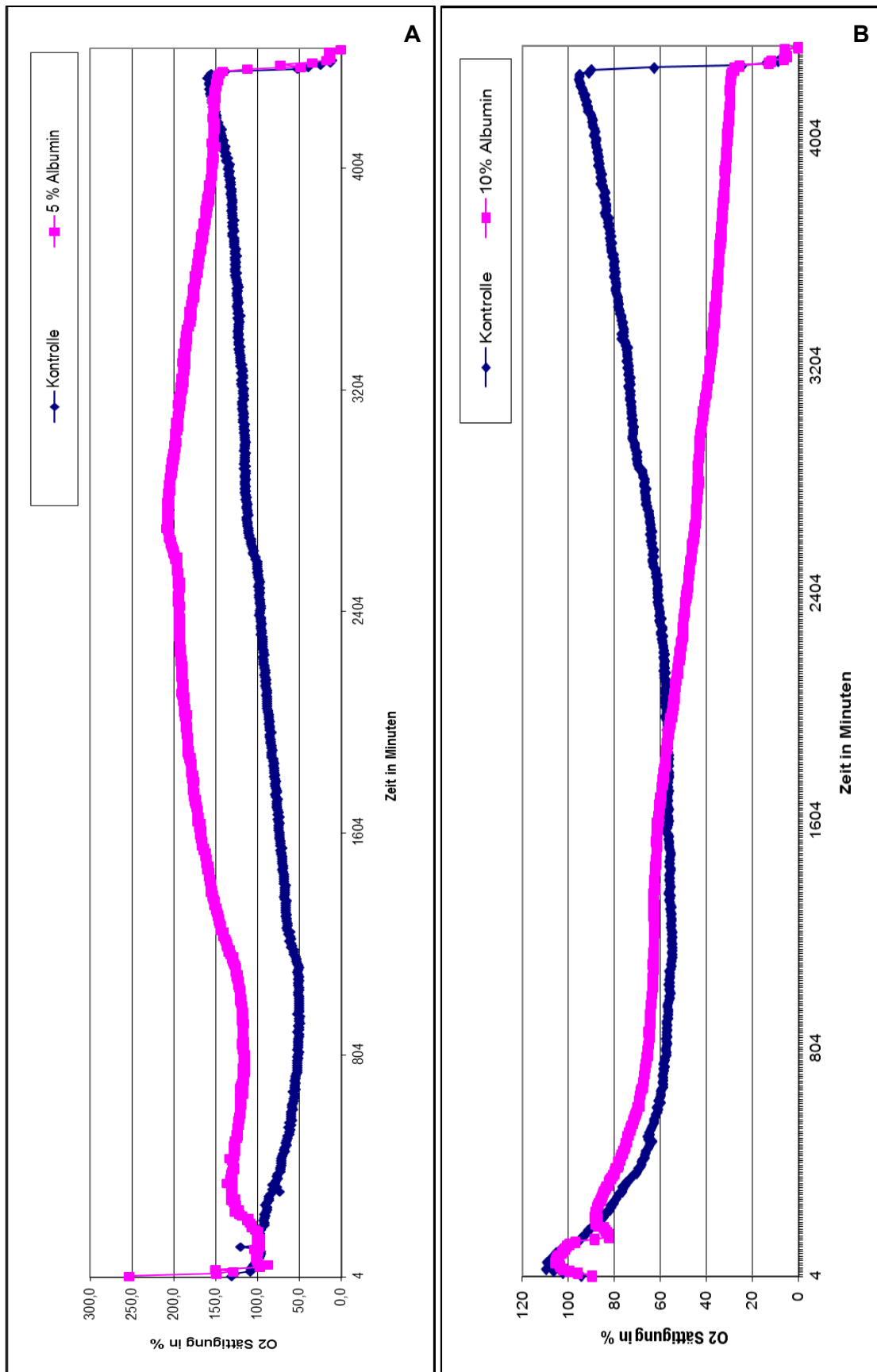


Abbildung 108: Die Grafik stellt den Verlauf der O₂ Sättigung von C3A Zellen dar in Verbindung mit 5 % (A) und 10 % (B) Standard Albumin.

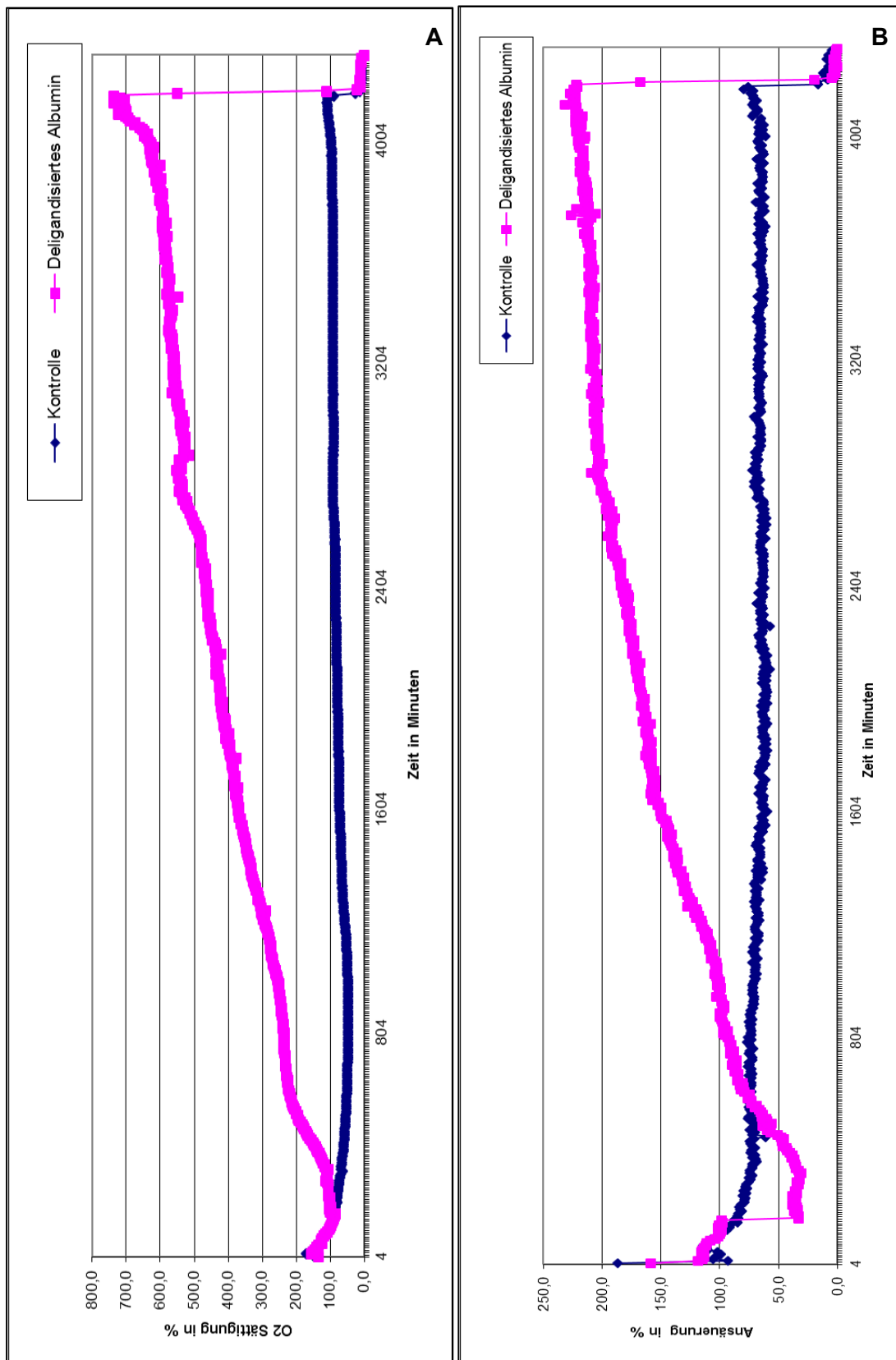


Abbildung 109: O₂ Sättigung (A) und Ansäuerung (B) der C3A Zellen in Verbindung mit deligandisiertes Albumin über einen Zeitraum von 72 h.

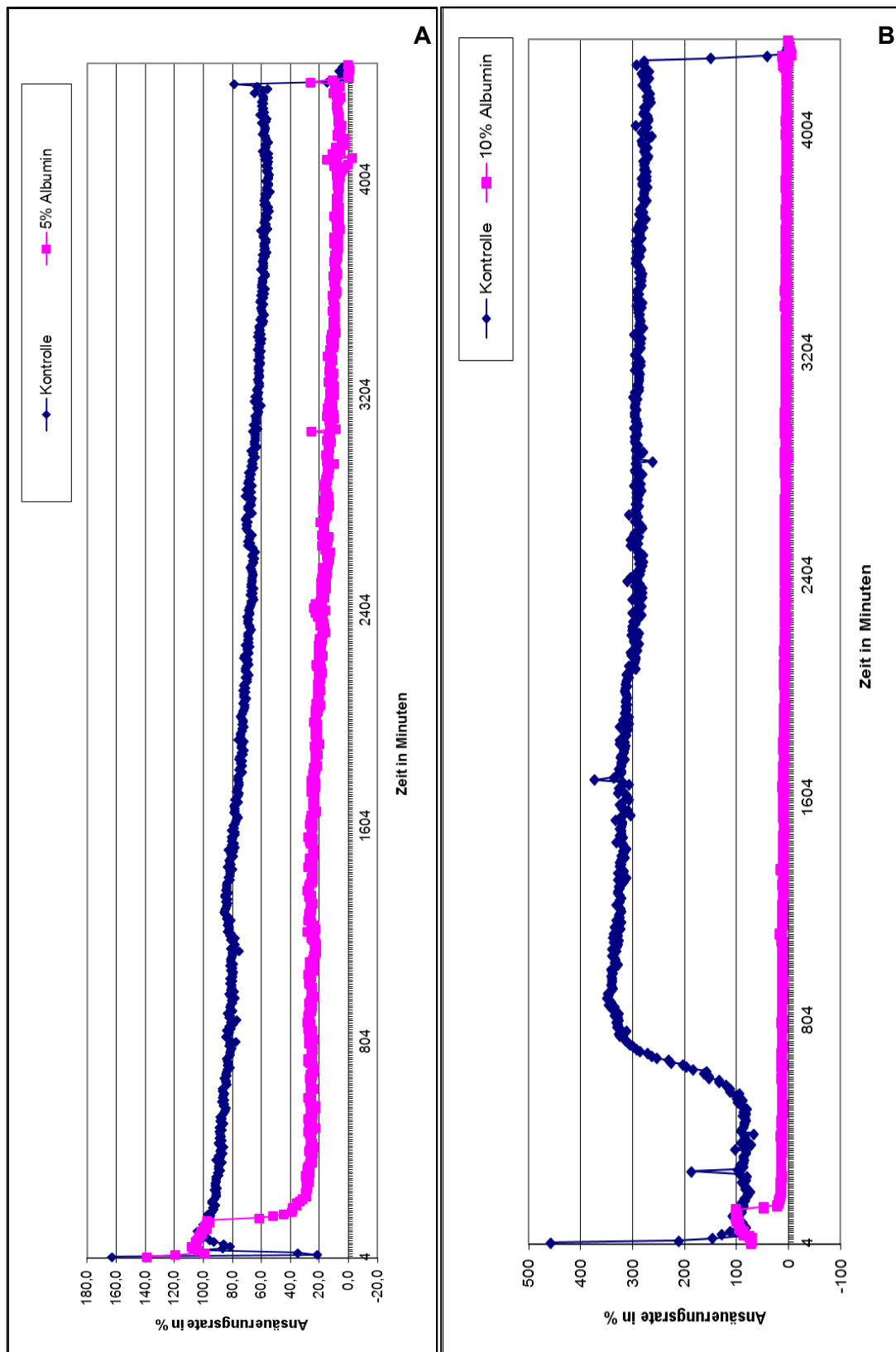


Abbildung 110: Die Ansäuerung (pH-Wert) der C3A Zellen in Verbindung mit 5 % (A) und 10 % (B) Standard Albumin im Zeitraum von 72 h.

7.5.9 Fibroblasten

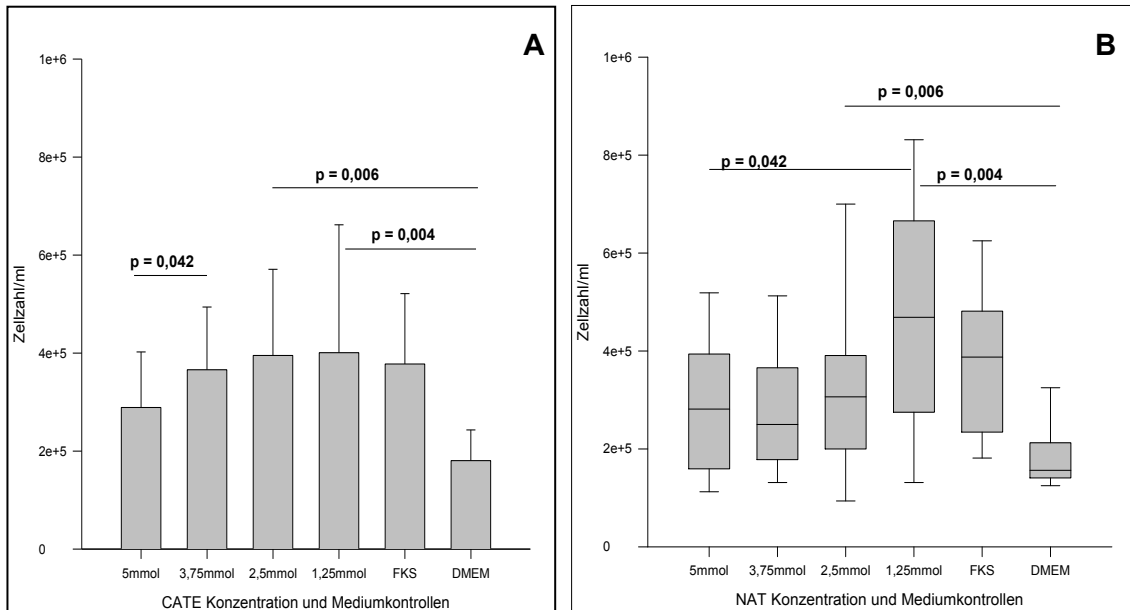


Abbildung 111: Alle Ergebnisse der Zellzahlbestimmung für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)

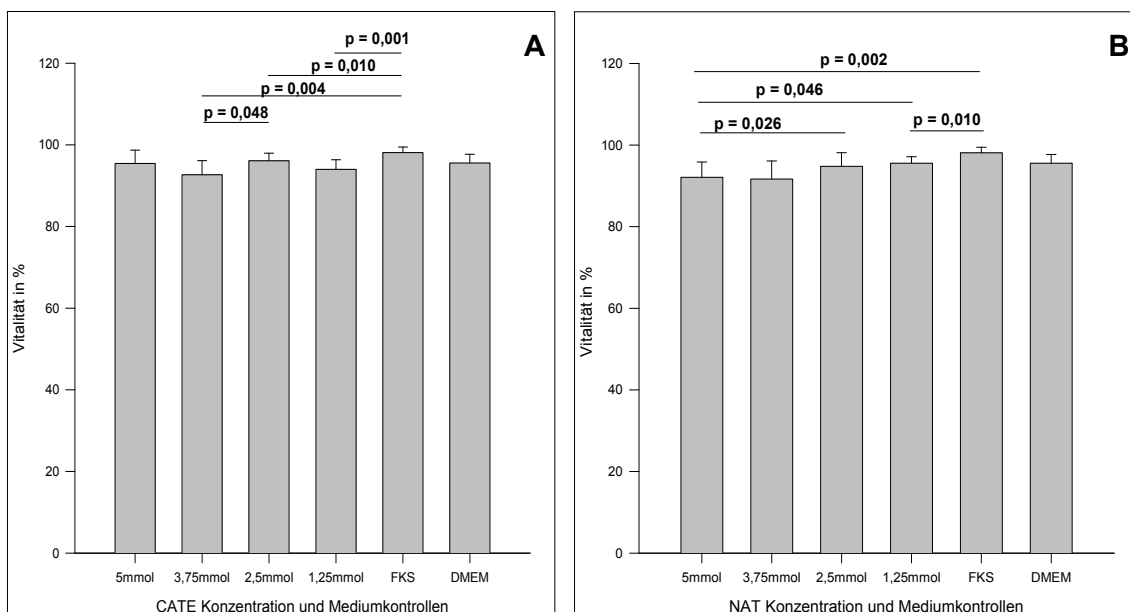


Abbildung 112: Alle Werte der Vitalitätsbestimmung der CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=9)

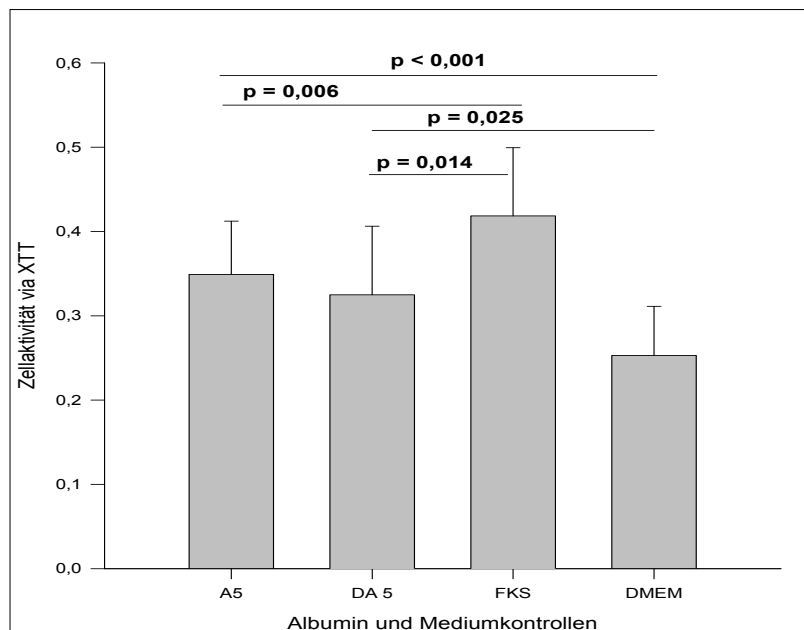


Abbildung 113: Alle Werte der Zellaktivität für Standard Albumin im Vergleich mit deligandisiertem Albumin. (n=9)

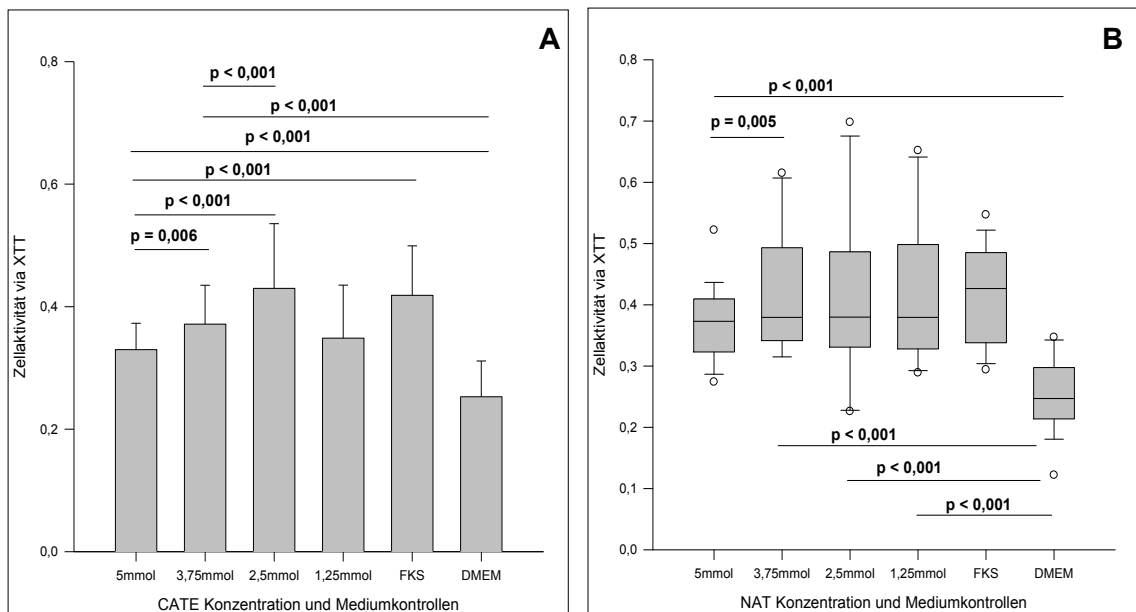


Abbildung 114: Alle Messwerte der Zellaktivität für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)

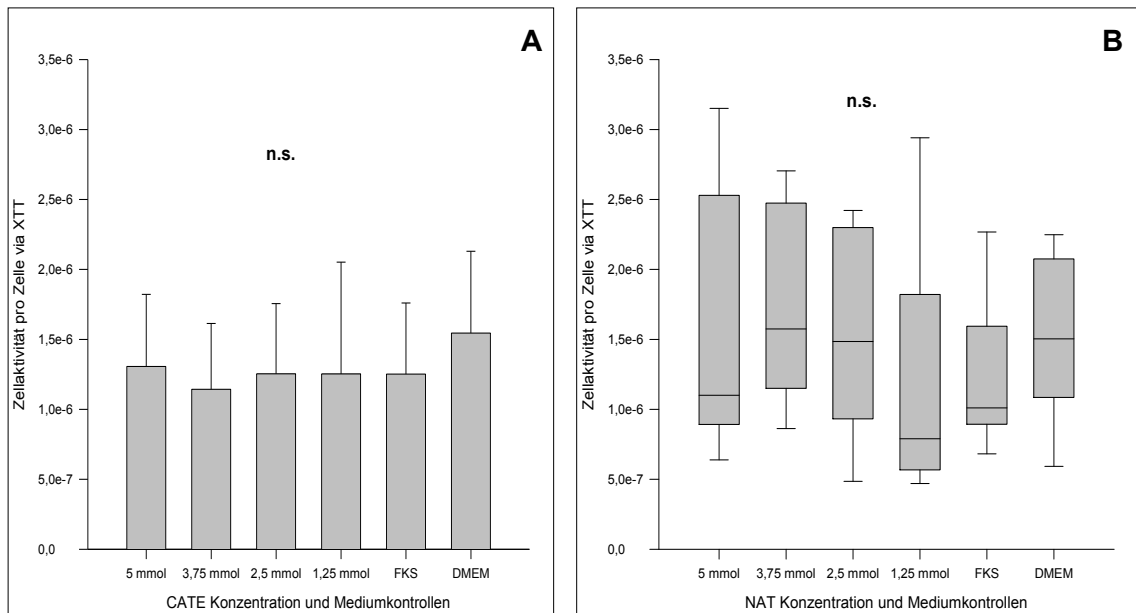


Abbildung 115: Alle Zellaktivitäten pro Zelle für alle CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich zu den Mediumkontrollen. (n=9)

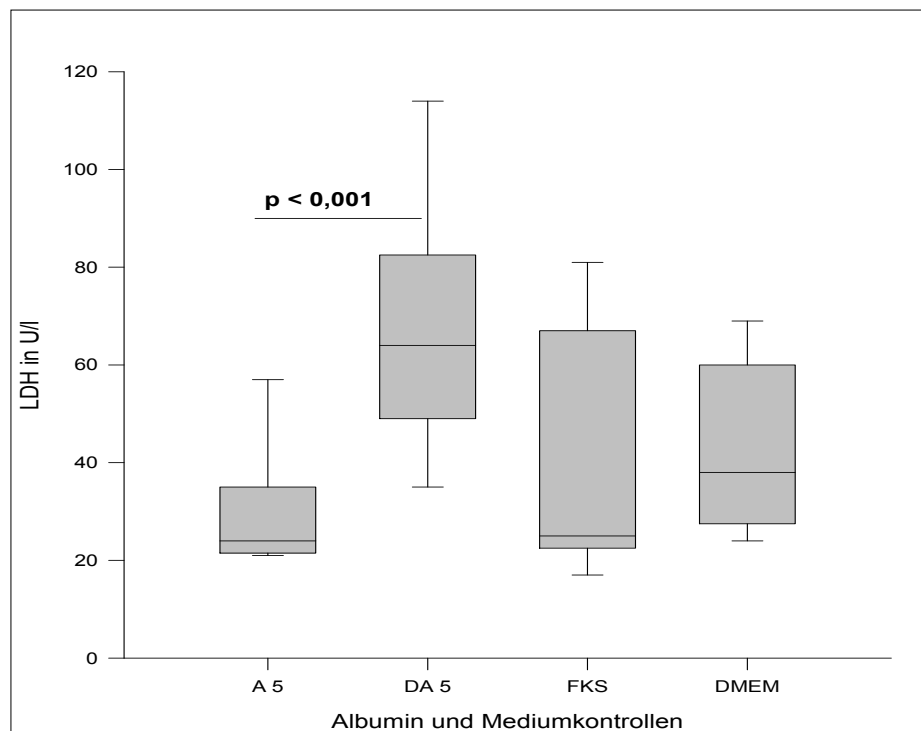


Abbildung 116: Die Messwerte der LDH Freisetzung für das Standard Albumin im Vergleich zum deligandisierten Albumin und den Mediumkontrollen. (n=9)

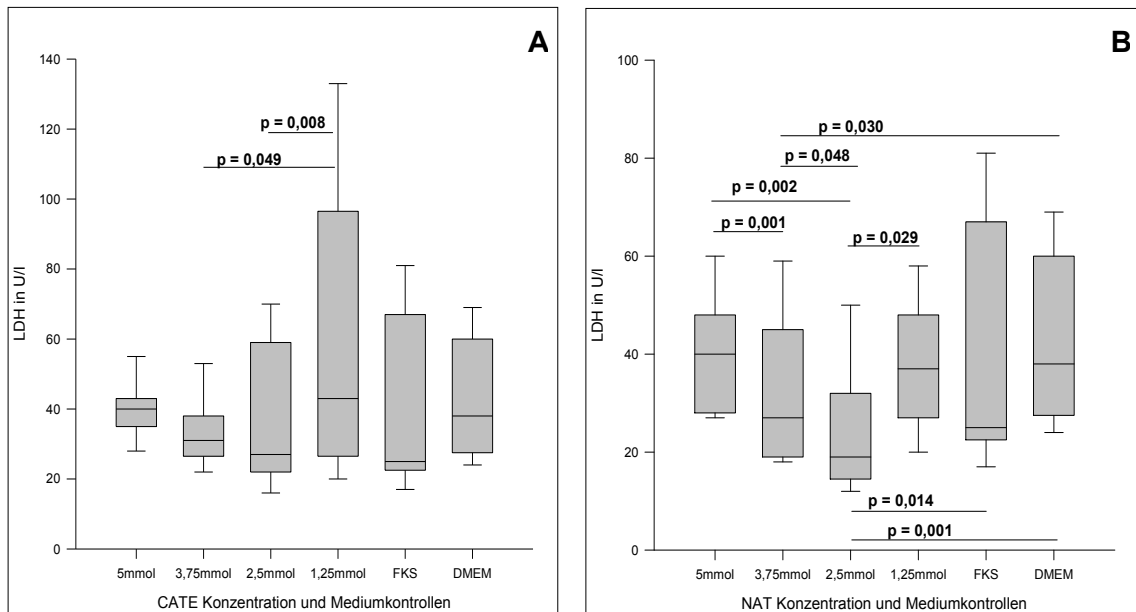


Abbildung 117: Alle LDH Messwerte für die CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)

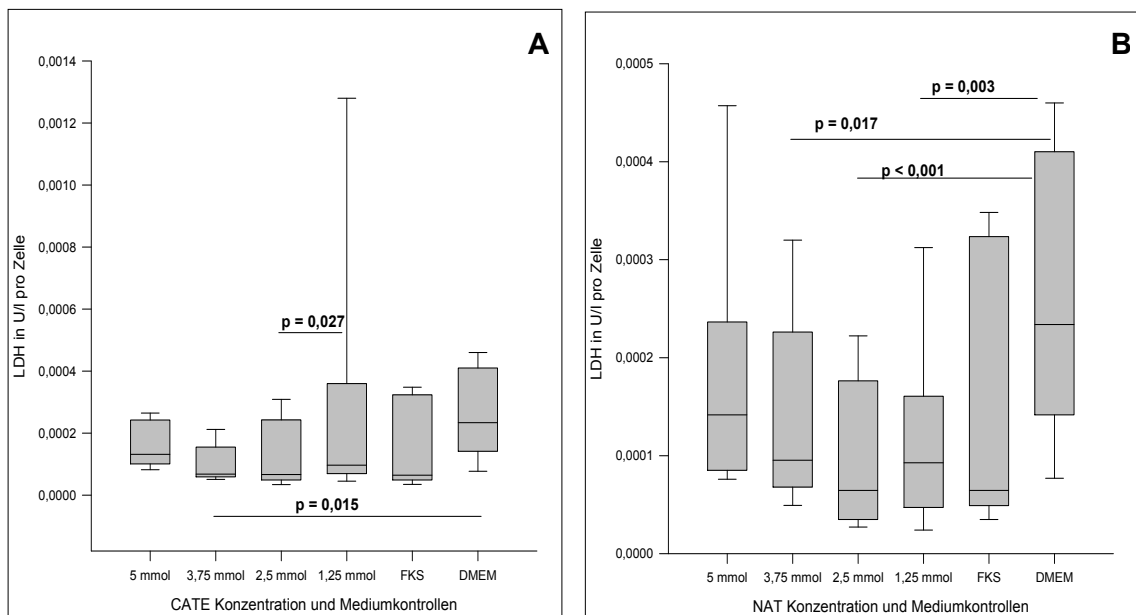


Abbildung 118: Alle errechneten LDH Werte pro Zelle für die einzelnen CATE (A) und NAT (B) Konzentrationen im Vergleich mit den Mediumkontrollen. (n=9)

VI. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jan Stange bedanken, der es möglich gemacht hat dieses interessante Thema zu bearbeiten und mich immer in meinen Ideen unterstützt hat. Ohne ihn wäre ich nicht in diesen interessanten Bereich der Forschung gelangt und hoffe ich kann in Zukunft all das einsetzen, was er mir beigebracht hat.

Des Weiteren geht der Dank an unser Team in den Laboren des Fraunhofer Institutes und CEOS. Nur durch die tolle Zusammenarbeit konnte ich meine Arbeit durchführen. Ein besonderer Dank geht an Sandra Doß, Heike Potschka und die Firma Albutec, die mich nicht nur moralisch sondern auch seelisch unterstützt haben. Ich konnte immer auf einen guten Rat hoffen, wenn ich einmal nicht weiter wusste.

Ein ganz großer Dank geht an meine gute Freundin Kerry Wegner und meinen Freund Mathias Brasack. Ohne sie hätte ich das alles wohl nicht durchgestanden. Ich konnte immer auf ein offenes Ohr und eine Schulter zum Anlehnen hoffen.

Mein größter Dank geht an meine wunderbaren Eltern. Ohne ihre seelische und finanzielle Unterstützung in jeder Lebenslage wäre ich nicht die Person, die ich jetzt bin und kann mit Stolz sagen: Ich bin so froh, dass ihr meine Eltern seit. Auch ohne meine Großeltern, die mich immer unterstützt haben, hätte ich nicht die Erfahrungen machen können, die ich über die Jahre sammeln durfte. Dafür danke ich auch ihnen. Opi Konrad, ich hoffe du bist immer noch stolz auf deine Enkelin, dort wo du jetzt bist.

VII. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Melanie Stiffel, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Ich versichere, dass die Dissertation weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Ich habe bisher weder ein Promotionsverfahren erfolglos beendet noch liegt eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vor.

Melanie Stiffel

Rostock, Februar 2014

VIII. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Melanie Stiffel
Geburtsdatum: 26. Juni 1980
Geburtsort: Hohenmölsen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung

2010 - heute: Universität Rostock, Medizinische Fakultät & Mathematische –
Naturwissenschaftliche Fakultät, Promotion (Dr. rer. nat.)

2000 - 2007: Universität Rostock, Mathematische und Naturwissenschaft-
liche Fakultät, Biologisches Institut, Hauptfach: Zoologie,
Nebenfächer: Meeresbiologie und Ichthyologie,
Nichtbiologisches Nebenfach: Ozeanographie/ Meereschemie
Diplomarbeit: “Die akustische Erforschung des “Rubbing
Beach“ Verhaltens der Northern Resident Orca Gemeinschaft
1996-2005 (Cetacea: Orcinus orca)”, Universität Rostock,
Feldarbeit auf der Cetacea Forschungsstation Orcalab (British
Columbia, Kanada)
Abschluss: Diplom-Biologe

1997 – 2000 Agricolagymnasium Hohenmölsen, Deutschland,
Abschluss: Abitur

1987 – 1997 Sekundarschule Hohenmölsen Nord, Deutschland ,
Realschulabschluss

Berufliche Praxis

Mai 2010 – heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Medizinische Fakultät,
Universität Rostock, Deutschland

- April – Sept. 2009** Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Naturwissenschaftliche Fakultät, University of Oslo, Norwegen
- Juni – Okt. 2008** Forschungsassistent, Orcalab – Forschungseinrichtung für Marine Säugetiere, British Columbia, Kanada
- April 2007 –
Juli 2008** Nachhilfelehrer, Studienkreis Rostock
- Juli – Okt. 2005** Saisonmitarbeiterin, “Meereszentrum Fehmarn”, Burg (Fehmarn), Deutschland

Berufsbezogene Praktika und Kenntnisse

- Dez. 2009 –
April 2010** Fachpraktikum, Albutec GmbH, Rostock, Deutschland, Medizinprodukte und Qualitätsmanagement
- Nov. 2008 –
Jan. 2009** Fachpraktikum, Theoretisch Medizinische Fakultät, Universität Rostock, Deutschland, Genetisch/Molekularbiologische Methoden
- Okt. 2007** Sektion an Schweinswalen (*Phocoena phocoena*), Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) und Seehund (*Phoca vitulina*), Meeresmuseum Stralsund, Deutschland, Untersuchung der Todesursache und Aufbereitung von Tierpräparaten für die Weiterverarbeitung
- Juni – Sept. 2006** Feldarbeit Diplomarbeit, Orcalab – Forschungseinrichtung für Marine Säugetiere, British Columbia, Kanada
- Juni – Sept. 2005** Fachpraktikum Orcalab – Forschungseinrichtung für Marine Säugetiere, British Columbia, Kanada, Bioakustik und Verhalten von Meeressäugern

Weitere Kenntnisse

Sprachkenntnisse

- Englisch in Wort und Schrift (fortgeschritten)

Methoden

- Feldarbeit:
Identifikations von Meeressäugern,
Identifikation von Bioakustik verschiedener Meeressäuger
- Labormethoden
Genetik,
Molekularbiologie,
Biochemie,
Tierphysiologie,
Zellbiologie
- Betreuung klinischer Studien, Datenverarbeitung,
Verarbeitung von Patientenproben und Auswertung

Software

- Microsoft Office: Word, Excel, Powerpoint
- Statistik: SigmaPlot
- Akustikprogramme: Raven, Canarien

Tauchschein

Führerschein

Interessen:

Journalismus, kochen

Rostock, 2014

IX. Veröffentlichungen

- In progress** Stiffel, Stange et al: "Hepatocyte toxicity of commercial albumin is related to industrial stabilizers", Liver International
- in press** Stiffel et al: " 24-hour Performance of Albumin Dialysis assessed by a new two compartment in vitro Model", Therapeutic Apheresis and Dialysis
- 2013** Stiffel, Stange et al: "Hepatocyte toxicity of commercial albumin is related to industrial stabilizers", International Symposium on Albumin Dialysis in Liver Disease (ISAD), Rostock, Deutschland, Poster (Best Poster Award)
- 2012** Stiffel, Stange et al: "Toxicity of Albumin Stabilizers on Albumin Diaysis", European Society for Artificial Organs (ESAO), Rostock, Deutschland, Poster
- 2011** Stange, Stiffel et al: "Industrial stabilizers Caprylate and N-Acetyltryptophanate reduce the Efficacy of Albumin in Liver Patients, Liver Transplantation Journal, 17: 705-709
- 2007** "An acoustical investication of the 'rubbing beach' behaviour of the Northern Resident Orca community 1996-2005 (Cetacea: Orcinus Orca)", Deutsche Zoologische Gesellschaft (DZG) Konferenz, Köln, Deutschland, Poster