

Aus der Chirurgischen Klinik
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der prädiktive Wert des LiMAx-Tests für das quantitative
und qualitative Ergebnis einer Isolierung von primären
humanen Hepatozyten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dalma Rebeka Major
aus Miskolc, Ungarn

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract (English version)	3
2. Abstrakt (Deutsche Version)	5
3. Manteltext	
3.1. Einleitung und Fragestellung	7
3.2. Methodik	
3.2.1. Studiendesign	11
3.2.2. Klinische Parameter	11
3.2.3. Isolierung primärer humaner Hepatozyten	11
3.2.4. Bestimmung der Zellausbeute und Viabilität	13
3.2.5. Zellkultur	13
3.2.6. Albumin Elisa	13
3.2.7. BCA Messung	14
3.2.8. Der LiMAx-Test	15
3.2.9. Leber-Volumetrie	15
3.2.10. Statistische Auswertung	16
3.3. Ergebnisse	17
3.3.1. Demographische und klinische Merkmale des Patientenkollektivs	17
3.3.2. Quantitatives Isolierungsergebnis	20
3.3.3. Korrelation der Volumen-korrigierten LiMAx-Werte mit dem quantitativen Isolierungsergebnis	21
3.3.4. Korrelation der Volumen korrigierten LiMAx-Werte mit den metabolischen Parametern	22
3.4. Diskussion	23
3.5. Aktueller Forschungsstand und Ausblick	27
3.6. Quellenverzeichnis	28
4. Eidesstattliche Versicherung	33
5. Anteilserklärung	34
6. Auszug aus der Journal Summary List	35
7. Publikation	37
8. Curriculum Vitae	45
9. Publikationsliste	48
10. Danksagung	49

1. Abstract (English version)

Primary human hepatocytes are gaining importance for cellular therapies, tissue engineering and pharmacological and toxicological research. Isolation of primary human hepatocytes is time consuming and expensive. It is therefore important to know which factors influence the outcome of the isolation procedure. Besides technical factors, such as warm and cold ischemia time, size of the liver specimen, or duration of collagenase perfusion, multiple clinical and histopathological factors have been described in literature. Elevated gamma- glutamyltransferase (GGT) or alanine transaminase (ALT) levels, for example, correlate negatively with the outcome of isolation. Steatosis and cirrhosis of the donor liver also tend to worsen the isolation outcome. In order to predict which liver specimen is worth isolating, it would be useful to have just a single preoperative parameter or test. In this study we investigated, whether the results of the “maximal liver function capacity test”, abbreviated LiMAx test, as a preoperative non-invasive test, are capable of predicting the isolation outcome of primary human hepatocytes.

Liver tissue was obtained from partial hepatectomies performed at the Department of Surgery at the Charité - Universitätsmedizin Berlin. From a total of 64 hepatocyte isolations, n=48 were included in this study. The isolation outcome was determined by the total cell yield, the viable cell yield and cell viability. LiMAx values were derived from electronic patient's records and liver volumes were visually determined by volumetry of preoperatively acquired computed tomography and magnetic resonance images. Tumor-free liver volumes were used to calculate the volume adjusted mean LiMAx values. These values were correlated with the outcome parameters of the hepatocyte isolation procedures.

The volume adjusted mean LiMAx showed a significant positive correlation with the total cell yield ($p = 0.049$; $r = 0.242$; $n = 48$), whereas correlations of volume adjusted LiMAx values with viable cell yield and cell viability did not show statistical significance. A significant correlation between volume adjusted mean LiMAx and total cell yield ($p = 0.012$; $r = 0.488$; $n = 21$) and viable cell yield ($p = 0.034$; $r = 0.405$; $n = 21$) was found in subgroup of hepatocyte isolations from patients with colorectal metastases. Hepatocyte isolations from patients with carcinoma of the biliary tree showed significant correlations of volume adjusted mean LiMAx with cell viability ($p = 0.046$; $r = 0.387$; $n = 20$) but lacked significant correlations with total cell yield ($p = 0.401$; $r = -0.060$; $n = 20$) and viable cell yield ($p = 0.480$; $r = 0.012$; $n = 20$).

Furthermore, hepatocytes out of 11 isolations were cultured over 5 days for measurement of albumin, urea and aspartate aminotransferase with LiMAx values. The correlation of these parameters with the volume adjusted mean LiMAx values did not reach significance.

In conclusion, the LiMAx test could be a useful clinical tool to predict the outcome of hepatocyte isolations, especially for patients with colorectal liver metastases. Further subgroup investigation

is needed to fully understand the relation of LiMAx values to isolation outcome parameters and hepatocytes in vitro.

2. Abstrakt (Deutsche Version)

Primäre humane Hepatozyten gewinnen stetig an Bedeutung, sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Medizin im Rahmen von Zelltherapien. Das Ergebnis der Isolierung primärer humaner Hepatozyten hängt stark von der Qualität des Lebergewebes ab und es bis gibt bis dato keinen zuverlässigen präoperativen Test, um das Ergebnis einer Isolierung vorhersagen zu können. Ziel dieser Promotionsarbeit war, die Ergebnisse des LiMAX-Tests („maximal liver function capacity test“) mit dem quantitativen und qualitativen Ergebnis in der Isolierung von primären humanen Hepatozyten zu korrelieren. Dieser Test ist im klinischen Alltag in Verwendung um die präoperative Leberfunktion zu messen und die Regenerationsfähigkeit der Leber prognostisch einschätzen zu können. Es wurde postuliert, dass dieser Test auch für die Vorhersage des Ergebnisses der Leberzellisolierung genutzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden präoperativ erhobene LiMAX-Werte retrospektiv erfasst. Präoperative CT- und MRT-Bildgebung wurden für die Bestimmung des Lebervolumens mittels Volumetrie herangezogen. Die LiMAX-Werte wurden auf das Lebervolumen normiert, um die Stoffwechsellkapazität des Lebergewebes vergleichbar zu machen. Primäre humane Hepatozyten wurden aus partiellen Leberresektionen gewonnen (n=64). Nach Ausschluss entsprechend vordefinierter Ausschlusskriterien wurden Zellen von n=48 Spendern in die Studie aufgenommen. Die gewonnene Zellzahl sowie die Viabilität der isolierten Leberzellen wurden mit den Volumen-korrigierten LiMAX-Werten korreliert. Darüber hinaus wurden Zellen von 11 Hepatozyten-Isolierungen auf Mikrotiterplatten über 5 Tage kultiviert, um die metabolischen Parameter Albumin, Harnstoff und Aspartat-Aminotransferase im Verlauf zu bestimmen und mit den LiMAX-Messwerten zu korrelieren.

Die gemittelten Volumen-korrigierten LiMAX-Werte zeigten eine signifikante positive Korrelation mit der Gesamtzellzahl ($p = 0,049$; $r = 0,242$; $n = 48$). Die LiMAX-Werte korrelierten jedoch nicht mit der viablen Zellzahl und der Zellviabilität. Um die Korrelationen in einer möglichst homogenen Untersuchungsgruppe in Bezug auf die Tumorentitäten zu ermitteln, wurden Subgruppen gebildet. In der Subgruppe von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen zeigte sich eine signifikante Korrelation der LiMAX-Werte mit der Gesamtzellzahl ($p = 0,012$; $r = 0,488$; $n = 21$) und der viablen Zellzahl ($p = 0,034$; $r = 0,405$; $n = 21$). In der Subgruppe der Patienten mit Karzinomen des Gallengangsystems korrelierten die LiMAX-Werte mit der Zellviabilität signifikant ($r = 0,387$; $p = 0,046$; $n = 20$), nicht jedoch mit der Gesamtzellzahl ($r = -0,060$; $p = 0,401$; $n = 20$) oder den viablen Zellen ($r = 0,012$; $p = 0,480$; $n = 20$). Die korrigierten LiMAX-Werte konnten mit keinem der ermittelten metabolischen Parameter korreliert werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass der LiMAX-Test im klinischen Alltag als nützliches Messinstrument für die Vorhersage von Isolierungsergebnissen von humanen Hepatozyten genutzt werden kann, so lange die zugrunde liegende Lebererkrankung

berücksichtigt wird. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um die Vorhersagekraft des Tests abschließend zu ermitteln.

3. Manteltext

3.1. Einleitung und Fragestellung

Die Anwendungsbereiche von primären humanen Hepatozyten sind vielfältig. Sie werden sowohl im Bereich der pharmakologischen-toxikologischen Forschung, als auch in anderen Bereichen der Grundlagenforschung eingesetzt. In der Regenerativen Medizin werden primäre humane Hepatozyten beispielsweise zur Durchführung von Rezellularisierungsversuchen von Organmatrizen verwendet, mit dem Ziel, künstliche Organe zu entwickeln. Es existieren unter anderem Ansätze, porcine dezellularisierte Lebermatrizen mit den verschiedenen hepatischen Zellreihen zu rezellularisieren und somit ein Organ zu erschaffen, welches in seinen Eigenschaften einer humanen Leber ähnelt (1).

Therapeutischen Einsatz finden primäre humane Hepatozyten bereits im Bereich der Leberzelltransplantation, welche insbesondere bei neonatalen Patienten eine Alternative zur orthotopen Lebertransplantation darstellen könnte. Die Vorteile der Leberzelltransplantation liegen dabei in der geringeren Invasivität des Verfahrens, sowie der Möglichkeit die Transplantation mehrmals zu wiederholen. Zudem ist es nicht notwendig die eigene Leber des Empfängers zu entfernen, sodass man sich von diesem Verfahren vor allem beim akuten Leberversagen eine Überbrückung der Zeit bis zur Regeneration der nativen Leber oder bis zur orthotopen Lebertransplantation erhofft. Einen vollständigen Ersatz zur Lebertransplantation im akuten und chronischen Leberversagen kann die Leberzelltransplantation aktuell jedoch noch nicht bieten. Zumindest vorübergehende klinische Erfolge konnten bei pädiatrischen Patienten mit angeborenen metabolischen Erkrankungen, wie etwa dem Crigler-Najjar-Syndrom, Typ 1 Glykogenose oder mit Harnstoffzyklusdefekten erzielt werden. (2, 3, 4)

Eine routinemäßige Anwendung der Leberzelltransplantation gibt es aktuell nicht. In der Literatur sind circa 150 Fälle von erfolgter Leberzelltransplantation beim Menschen beschrieben (5), die erzielten klinischen Effekte waren in den meisten Fällen nur vorübergehender Natur. Der Stellenwert der Leberzelltransplantation beschränkt sich insofern derzeit eher auf eine „Bridging“-Therapie bei ausgewählten pädiatrischen Patienten. Vor einer weiterführenden klinischen Evaluierung dieses Therapiekonzepts müssen dementsprechend zahlreiche offene Fragen geklärt werden, wie zum Beispiel die Immunogenität der transplantierten Zellen und das Langzeitergebnis nach Leberzelltransplantation (6).

Mit der Notwendigkeit der Optimierung der Leberzelltransplantation steigt voraussichtlich auch der Bedarf an humanen Hepatozyten. Eine große und vor dem Hintergrund der Notwendigkeit der Reduktion von Tierversuchen auch weiterhin wachsende Bedeutung haben primäre Hepatozyten in der pharmakologischen-toxikologischen Forschung und in der Grundlagenforschung. Eine der bedeutendsten Aufgaben der Leber ist die Metabolisierung von

Xenobiotika. Durch Biotransformation werden so genannte *Prodrugs* in aktive Metabolite verwandelt und Substanzen insofern verändert, dass sie vom Organismus ausgeschieden werden können. Hierbei sind insbesondere die Enzyme des Cytochrom P-450-Systems zu erwähnen. Die breite genetische Varianz im CYP-450-System und dadurch entstehende interindividuelle Unterschiede in der Metabolisierung von Medikamenten und Wechselwirkungen zwischen Medikamenten macht in-vitro Untersuchungen an humanen Hepatozyten umso bedeutsamer. Beispielsweise wird das Enzym CYP3A durch das Antibiotikum Rifampicin induziert. Bei gleichzeitiger Einnahme von Rifampicin mit Medikamenten, welche Substrate des CYP3A Enzyms sind, wie zum Beispiel orale Kontrazeptiva, wird die Metabolisierung dieser Medikamente beschleunigt und führt demzufolge zu niedrigeren Plasmakonzentrationen. (7) Primäre humane Hepatozyten können nicht durch immortalisierte Zelllinien wie etwa HepG2 ersetzt werden da sie bestimmte physiologische CYP-Enzyme nicht exprimieren.

Da die Beschaffung von einer ausreichenden Zellzahl an primären humanen Hepatozyten schwierig ist, wird in Versuchsreihen häufig auf tierische Zellen zurückgegriffen. Die Vergleichbarkeit mit menschlichen Zellen ist jedoch begrenzt. In einer Arbeit von Brambilla et al. wurden 42 Wirkstoffe von unterschiedlichen Wirkstoffklassen jeweils in Ratten- und humanen Hepatozyten hinsichtlich ihrer Hepatotoxizität untersucht. Für 28 Wirkstoffe zeigten sich keine Unterschiede, drei Wirkstoffe erwiesen sich als toxischer für humane Hepatozyten und 10 als toxischer für Rattenhepatozyten. Beispielsweise führten Versuche mit dem Betablocker Propranolol erst bei einer 30-fach höheren Dosierung zur Letalität von Rattenhepatozyten als von humanen Hepatozyten (8). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Verwendung von humanen Hepatozyten in der pharmakologischen Forschung in der Humanmedizin.

Die Anzahl an für Forschungsvorhaben oder therapeutische Konzepte benötigten Hepatozyten variiert entsprechend der Komplexität der Versuchsaufbauten, als auch in Bezug auf die oben genannten Anwendungsbereiche, enorm. Während für toxikologische Testungen in der Zellkultur unter Umständen nur wenige Millionen Zellen benötigt werden, benötigt man für Rezellularisierungsversuche oder Leberzelltransplantationen mehrere Milliarden primärer Hepatozyten. (9, 10,11)

Eine effiziente „*in vitro*“-Expansion von humanen Hepatozyten ist zwar mittlerweile technisch möglich, jedoch nach wie vor verhältnismäßig aufwendig (12). Aufgrund des erforderlichen Zeitaufwandes und der Kostspieligkeit einer Zellisolierung ist es von Bedeutung den Prozess der Leberzellisolierung zu optimieren und die Faktoren, welche die Zellausbeute und die Viabilität der Zellen beeinflussen, zu kennen. Darüber hinaus sind Testverfahren bzw. (nichtinvasive) Parameter zur Prognose der Zellausbeute wünschenswert.

Zur Gewinnung von primären humanen Hepatozyten bieten sich im Wesentlichen drei Quellen an: Es besteht die Möglichkeit primäre humane Hepatozyten aus Lebern von Organspendern

zu isolieren. Meist handelt es sich hierbei um Organe, welche sich nicht zur Transplantation eignen. Dies betrifft meistens Transplantate mit einer fortgeschrittenen Steatosis hepatis (13) oder Organe, welche einer zu langen kalten Ischämiezeit unterlagen oder aufgrund traumatischer Verletzungen als nicht transplantabel eingestuft wurden (14). Allerdings ist die Verfügbarkeit solcher Organe und die daraus resultierende Zellausbeute limitiert. Die im Rahmen der Empfängerhepatektomie entnommenen erkrankten Lebern wurden ebenfalls als mögliche Zellquelle untersucht, erscheinen aber aufgrund der schweren Schädigung dieser Organe nicht für die Routine-Leberzellisolierung geeignet (15).

Eines der gängigsten Verfahren zur Gewinnung von Hepatozyten für *in-vitro* Untersuchungen stellt die Nutzung von Lebergewebe dar, welches bei großen leberchirurgischen Eingriffen aus dem Resektat gewonnen werden kann (16). Ein großer Vorteil im Vergleich zu Isolierungen aus ganzen Organen ergibt sich durch die zeitliche Planbarkeit und durch die kürzeren kalten Ischämiezeiten. Zur Isolierung der Zellen aus dem Gewebeverband wird ein zweistufiges Kollagenase-Perfusionsverfahren genutzt, welches erstmalig von Berry und Friend im Jahre 1969 für die Isolierung von Hepatozyten aus Rattenlebern und 1982 von Guguen-Guillouzo et.al aus humanen Lebern beschrieben wurde (17,18).

Jedoch sind durch Verbesserung der Operationstechniken und durch Zunahme an laparoskopische Operationsverfahren große Leberteileresektionen seltener geworden. Diese Entwicklung wird in Zukunft unter Umständen das Ergebnis der Leberzellisolation beeinflussen, wie Untersuchungen aus unserer Klinik zeigen (19,20). Somit werden primäre humane Hepatozyten immer wertvoller.

Zur Optimierung der Leberzellisolierung aus Leberteileresektaten ist es von Bedeutung die Faktoren zu kennen, welche das Isolierungsergebnis beeinflussen. In der Literatur wurde eine Vielzahl solcher Faktoren beschrieben, wie zum Beispiel kalte und warme Ischämiezeiten, Alter und Geschlecht der Gewebespender und zirrhotische oder steatotische Veränderungen des Gewebes (21), die aber zum teilweise, wie etwa das histopathologische Bild, erst nach der Operation zur Verfügung stehen. Ein präoperative zu erhebender, nicht-invasiver Parameter zur Einschätzung des Erfolgs einer Leberzellisolierung wäre dementsprechend wünschenswert.

Zur präoperativen Einschätzung der postoperativen Leberfunktion nach größeren leberchirurgischen Eingriffen wurde der LiMAx-Test entwickelt. Der LiMAx-Test ist ein nicht-invasiver $^{13}\text{C}_2$ -Atemtest, welcher in klinischen Studien die enzymatische Leberfunktion in unterschiedlichen klinischen Situationen nachgewiesen hat. Das intravenös applizierte ^{13}C -Methacetin wird über das Cytochrom CYP1A2 metabolisiert, welches ausschließlich von Hepatozyten exprimiert wird. Dieser Test erlaubt die präoperative Einschätzung der Leberfunktion, was insbesondere bei Patienten mit strukturellen Veränderungen der Leber, wie etwa Fettleber, Leberfibrose oder Leberzirrhose, wichtig ist, um ein postoperatives

Leberversagen zu vermeiden (22, 23). Andere Tests zur Messung der Leberfunktion, wie etwa der Indocyaningrün-Eliminationstest oder der Galaktose-Eliminations-Test, konnten die postoperative Leberfunktion nicht zuverlässig einschätzen (24, 25). Studien haben hingegen gezeigt, dass mithilfe des LiMAX-Tests auch bei zirrhotisch veränderten Lebern die postoperative Leberfunktion zuverlässig vorhergesagt werden kann (21, 22). Mithilfe des LiMAX-Tests konnten frühe Stadien einer Leberzirrhose und Leberzirrhose im Endstadium unterschieden werden. (26, 27) In einer Studie von Stravitz et al. konnte der LiMAX-Test darüber hinaus bei Patienten mit Leberzirrhose das Mortalitätsrisiko aufgrund von Komplikationen, welche auf den Leberschaden zurückzuführen sind, exakter ausdrücken als der MELD Score ≥ 15 und ≥ 19 (27).

Da sich präoperative Faktoren (z.B. Steatose, Fibrose und Zirrhose), welche bekanntermaßen mit einem schlechteren Isolierungsergebnis assoziiert sind, sich auch in einem schlechteren LiMAX-Wert niederschlagen, liegt die Vermutung nahe, dass sich Lebergewebe mit einer guten Stoffwechselfunktion, folglich entsprechend hohen LiMAX-Werten, besser zur Isolierung von primären humanen Hepatozyten eignet, als mutmaßlich vorgeschädigte Lebern mit niedrigeren LiMAX-Werten (28).

Primäres Ziel dieser Arbeit ist daher, mittels der Ergebnisse von Leberzellisolierungen und deren Korrelation mit den Ergebnissen, der in der klinischen Routine erhobenen LiMAX-Testergebnissen, zu untersuchen, ob der LiMAX-Test als prädiktives Instrument zur Vorhersage des quantitativen und qualitativen Isolierungsergebnisses dienen kann. Eine weiterführende Fragestellung in Bezug auf die prospektiv erhobenen Daten ist, ob die Stoffwechselfunktion und metabolische Funktion der isolierten Hepatozyten in vitro mit dem LiMAX-Wert korreliert.

3.2. Methodik

3.2.1. Studiendesign

Im Zeitraum von 2012 und 2016 konnten an Lebergeweben von 64 humanen Leberresektaten, welche bei Leberteilresektionen in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin gewonnen wurden, Zellisolierungen durchgeführt werden. Von diesen 64 Isolierungen konnten jedoch nur 48 in die Studie eingeschlossen werden, da in 4 Fällen keine präoperativen LiMAX-Werte vorhanden waren und in 12 Fällen aufgrund mangelnder Bildqualität und unvollständigen Datensätzen keine Volumetriebestimmung durchgeführt wurde.

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte retrospektiv, die Erhebung der Zellisoliationsparameter erfolgte sowohl prospektiv als auch retrospektiv. Wir verwendeten Daten aus Isolierungen welche ab 2012 durchgeführt wurden und erweiterten die Isolierungsdatenbank fortlaufend.

Darüber hinaus wurden Zellen von 11 Isolierungen in Kultur genommen, um eine möglichen Korrelation zwischen LiMAX-Werten und metabolischer Funktion zu untersuchen. Ausgewertet wurde nur das Ergebnis der Zellen in der Zellkultur vor der Aufreinigung mit der Percoll Lösung. Zur Einschätzung der Prädiktivität des LiMAX-Tests für das Ergebnis der Leberzellisolierung wurden folgende Parameter mit LiMAX-Messwerten korreliert: Die Gesamtzellzahl, die viable Zellzahl und die Viabilität der Zellen.

3.2.2. Klinische Parameter

Die präoperativen laborchemischen Parameter des Patientenkollektivs, wie Gesamtbilirubin, Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), alkalische Phosphatase (AP) (U/L), Gamma-Glutamyltransferase (GGT) und aktivierte Prothrombinzeit (aPTT) wurden aus den elektronischen Patientenakten entnommen.

3.2.3. Isolierung primärer humaner Hepatozyten

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden Hepatozyten aus überschüssigem, gesundem Lebergewebe isoliert, welches bei Leberteilresektionen an der Chirurgischen Klinik der Charité-Universitätsmedizin Berlin gewonnen wurde. Die Proben stammten von Patienten mit malignen lebereigenen Tumoren oder Lebermetastasen anderer Tumor-Entitäten, sowie benignen

Erkrankungen der Leber. Vor der Verwendung der Gewebeproben wurde von den Patienten ihr Einverständnis schriftlich bestätigt. (eine Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin liegt vor, EA2/137/09)

Die Gewebeproben wurden mit einem Skalpell von einem makroskopisch tumorfrei imponierenden Rand des Hauptresektats abgetrennt. Das Gewebestück wurde sofort in sterilem William's E Medium auf Eis gelagert, ins Labor transportiert und im Anschluss unter Einhaltung einer möglichst kurzen kalten Ischämiezeit mittels eines etablierten zweistufigen Kollagenase-Perfusionsverfahrens isoliert (16).

Hierfür wurden zunächst Knopfkanülen in die Gefäße an der Oberfläche des Resektats eingebracht und mit Histoacrylkleber fixiert. Im Anschluss wurde das Gewebe mit 500 ml auf 37°C temperierter Ethylenglykoltetraessigsäure-Lösung, kurz EGTA-Lösung (1.42 M NaCl, 67 mM KCl, und 100 mM 4-(2-hydroxyethyl)- 1-piperazineethanschwefelsäure, 2.5 mg EGTA [alle Chemikalien von Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland]) über 10-20 Minuten gespült, um im Gefäßsystem verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Verdauungsphase mit einer Kollagenase P-haltigen Lösung (67 mM NaCl, 6.7 mM KCl, 100 mM 4-(2-hydroxyethyl)- 1-piperazineethanschwefelsäure, 7.5 g Albumin, 4.8 mM CaCl₂·2H₂O [alle Chemikalien von Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland], 100 mg Kollagenase P (Roche, Mannheim, Deutschland). Die Perfusion des Gewebes wurde dabei solange aufrechterhalten, bis das Lebergewebe makroskopisch suffizient zersetzt imponierte. Die Kanülen wurden entfernt und das Gewebe in einer Petrischale mit einer 4 °C kalten Waschlösung (1.42 M NaCl, 67 mM KCl, und 100 mM 4-(2-hydroxyethyl)- 1-piperazineethanschwefelsäure [Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland]), der 25 ml 20% Humanalbumin beigemischt wurden, perfundiert, um die Hepatozyten aus der extrazellulären Matrix zu lösen. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Kompressen gefiltert, in 50 ml Falcons abgefüllt und bei 50 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit modifiziertem William's E Medium ([Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland], 1 µM Fortecortin [Merck Serono GmbH, Darmstadt, Deutschland], 1 µM Humaninsulin [Lilly, Indianapolis, IN], 1 mM Natriumpyruvat [Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland], 100 U/mL · 100 µg Penicillin/Streptomycin [Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland], 20 mM L-Alanyl-L-Glutamin [Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland], 10 mM HEPES Puffer [Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland], 10% fötales Kälberserum [Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland]) resuspendiert. Als nächsten Schritt erfolgte die Aufreinigung der Zellen durch Zentrifugation bei 1474 g und 4°C für 20 Minuten unter Beimischung einer 25% Percoll Lösung ([Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland] 1.124g/mL), welche als Dichtegradient diente. Danach erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit Phosphat Puffer Lösung (PBS) und eine erneute Zentrifugation bei 50 g und 4°C für 5 Minuten.

3.2.4. Bestimmung der Zellausbeute und Viabilität

Vor und nach Aufreinigung mit der Percoll Lösung (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der viablen Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer unter Anwendung des Trypanblau-Exklusionstests. Hierbei wurden 900 µl Trypanblau mit 100 µl der Zellsuspension vermengt. Die zwei Kammern der Neubauer-Zählkammer, bestehend aus je vier Großquadraten zu je sechzehn kleinen Quadraten, wurden mit der Zellsuspension beschickt. Die Zahl aller Zellen wurde ermittelt, indem die Zellen pro Quadrat unter Berücksichtigung des Verdünnungsverhältnisses von 1:10 ausgezählt und gemittelt wurden. Die viablen Zellen pro Milliliter Zellsuspension wurden anschließend mit dem Volumen der gesamten Zellsuspension multipliziert. Nekrotische bzw. apoptotische Zellen färben sich aufgrund der Einlagerung des Farbstoffs in der Zellmembran blau und werden bei der Zählung der viablen Zellen somit nicht berücksichtigt. Die Zellviabilität wurde in Prozent ausgedrückt und ergab sich durch Division der viablen Zellzahl durch die Gesamtzellzahl.

3.2.5. Zellkultur

Von den im prospektiven Teil der Studie durchgeführten Isolierungen konnten Leberzellen aus 11 Isolierungen in Kultur gebracht werden, um Stoffwechselfparameter und morphologische Eigenschaften im Verlauf zu bestimmen. Es wurden 1×10^6 Zellen pro Well auf einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und mit modifiziertem William's E Medium kultiviert. Die Kulturdauer betrug insgesamt 6 Tage. In dieser Zeit wurde täglich das Zellwachstum und die Integrität der Zellen mikroskopisch beurteilt, sowie die Zellkultur mit PBS gewaschen und das Nährmedium gewechselt. Für die Bestimmung der Stoffwechselfparameter wurden nur Zellkulturen mit einer Zelldichte zwischen 70 % und 100 % verwendet. Der Überstand wurde jeweils nach 24, 48 und 96 Stunden entnommen und für biochemische Analysen verwendet. Der Überstand wurde für 5 Minuten bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und die Proben wurden zur Messung von Aspartataminotransferase (AST) und Harnstoff in das Labor Berlin versendet. Die Proben wurden automatisiert und standardisiert gemessen (cobas® 6000 analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) (30).

3.2.6. Albumin Elisa

Der Zellkulturüberstand für die Bestimmung des Albumingehalts wurde unmittelbar nach der Entnahme bis zur Verwendung bei -80 °C konserviert. Die Messungen erfolgten in Duplets

mithilfe des „Human albumin elisa quantitation“-Sets (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Bei diesem Test handelt es sich um einen Sandwich Elisa. Zunächst erfolgte eine Inkubation der 96-well Platten mit je 100 µl des „Coating“ Antikörpers bei 20-25 °C für 60 Minuten. Nach mehreren Waschvorgängen und einer 30-minütigen Inkubation mit einem Blockierungspuffer wurde die eigentliche Probe den Wells hinzugegeben und eine halbe Stunde lang inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschvorgang, um die ungebundenen Antigene bzw. Bestandteile der Probe zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem HRP Detektionsantikörper, ein weiterer primärer Antikörper, welcher an das Antigen bindet. An diesen Antikörper binden im letzten Schritt die Antikörper der TMB „Substrate Solution“, welche den Farbumschlag verursachen. Nach der lichtgeschützten Entwicklung der Well-Platte erfolgte die photometrische Bestimmung des Farbumschlags bei 450 nm im Fluostar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

3.2.7. BCA Messung

Die Messwerte der AST-, Harnstoff- und Albuminbestimmung wurden in Bezug auf das Gesamtprotein in den jeweiligen Proben normalisiert. Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte mittels BCA Messung in Triplets. Hierfür wurde das Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific, MA, USA) verwendet.

Zunächst wurde eine Albuminverdünnungsreihe als Standard hergestellt. Die BSA Konzentrationen betragen 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 und 25 µg/mL. In jeder Konzentration wurden je 2 Wells beschickt, 2 Wells enthielten kein Albumin als Kontrolle. Für die Herstellung der Arbeitslösung wurden BCA Reagens A mit BCA Reagens B in einem Verhältnis von 50:1 vermischt. Es wurden 25 µl der Probenlösung bzw des Standards pro Well auf einer 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Der Probenlösung wurden 200 µl der Arbeitslösung beigemischt und durchmischt. Die Platte wurde für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Test beruht auf der Tatsache, dass zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Dabei entsteht durch die verwendete Bichininsäure ein violetter Farbstoff, dessen Absorption im Anschluss an die Inkubationszeit bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Fluostar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bestimmt wurde (29).

3.2.8. Der LiMAx-Test

Der LiMAx-Test wird an der Charité - Universitätsmedizin Berlin routinemäßig vor großen leberchirurgischen Eingriffen durchgeführt und wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. M. Stockmann in mehreren Studien untersucht (22,30).

Zur Erhebung des LiMAx-Wertes wird der/die Patient/Patientin mit dem Liver Investigation Package (FLIP ®, Humedics GmbH Berlin, Deutschland) über ein Mundstück und einen Schlauch mit der Messapparatur verbunden. In einem ersten Schritt wird das individuelle Verhältnis von $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ in der Ausatemluft bestimmt. Danach wird dem liegenden und seit mindestens 3 Stunden nüchternen Patienten intravenös ein ^{13}C -Methacetin Bolus appliziert. Die Dosierung beträgt 2 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Das ^{13}C -Methacetin wird nun zu Paracetamol und $^{13}\text{CO}_2$ metabolisiert. Die hierbei entstehende Paracetamol Menge ist unbedenklich und liegt bei einem 80 kg wiegenden Patienten mit 160 mg weit unter der empfohlenen Tagesmaximaldosis. Der Quotient aus $^{13}\text{CO}_2$ und $^{12}\text{CO}_2$ korreliert positiv mit der Leberfunktion. Über einen Zeitraum von 60 Minuten erfolgt die Messung von $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ über eine Atemmaske mittels einer nicht-dispersiven, isoton selektiven Infrarotspektrometrie. Zeitgleich erfolgt eine kinetische Analyse zur Errechnung der maximalen Umsetzungskapazität des Enzyms CYP1A2 für ^{13}C -Methacetin. Der Referenzwert für gesunden Probanden beträgt $>315 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ (22,30).

3.2.9. Lebervolumetrie

Für die volumetrischen Analysen wurden MRT- oder CT-Datensätze in vergleichbarer Qualität genutzt. Es wurden stets die vor der Operation rezentesten Aufnahmen verwendet. Mit Hilfe des Programms Visage (Visage Imaging GmbH, Berlin, Deutschland) erfolgte die volumetrische Analyse der CT- und MRT-Aufnahmen der Leber. Die Lebern wurden durch erfahrene Untersucher in axialen Schnittbildern manuell umrandet. Anhand der Schichtdicke der Bilderserien wurde durch das Programm Visage das Lebervolumen errechnet. Da man davon ausgeht, dass der tumorbefallene Teil der Leber nicht am regulären Stoffwechsel der Leber teilnimmt und daher nicht durch den LiMAx-Wert ausgedrückt werden kann, wurde das totale funktionelle Lebervolumen (TFLV) wie folgt errechnet:

$$\text{TFLV} = \text{TLV} - \text{TV}$$

TLV steht dabei für das totale Lebervolumen und TV für das Tumolvolumen. Die analysierten Bilder wurden von mindestens einem zusätzlichen Untersucher supervidiert und validiert und gegebenenfalls korrigiert. Für die weiterführenden statistischen Untersuchungen und für die Korrelationen mit den Ergebnisparametern der Leberzellisolierungen wurden die Volumen-

korrigierten LiMAx-Werte genutzt.

3.2.8. Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der Daten wurde die Software GraphPad Prism, Version 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet. Die Korrelationsanalysen wurden mit der Pearson Korrelation für parametrische Parameter und die Spearman Korrelation für nicht-parametrische Parameter durchgeführt. Die Korrelationen der Volumen-korrigierten LiMAx-Werte mit den Isolierungs-Outcome-Parametern wurden mit einem One-Tailed-Test berechnet. Die Korrelationen der Volumen-korrigierten LiMAx-Werte mit den laborchemischen GGT-Werten wurden mittels eines Two-Tailed-Tests ermittelt.

Die Beschreibung der Unterschiede in den Charakteristika innerhalb der Studiengruppe erfolgte mittels One-Way-Anova Analyse, sowie Kruskal-Wallis Test für alle Parameter, welche den D'Agostino-Pearson Test auf Normalverteilung nicht bestanden. Ein P-Wert $p < 0.05$ wurde als signifikant gewertet.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Demographische und klinische Merkmale des Patientenkollektivs

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden die Ergebnisse von 48 Leberzellisolierungen aus Leberteileresektaten untersucht. Dabei erfolgten 20 Leberteileresektionen aufgrund von Karzinomen der Gallenwege entsprechend Cholangiozellulären Karzinomen (CCC, n=11), Klatskin-Tumoren (n=6) und Gallenblasenkarzinomen (n=3) und 21 Leberteileresektionen aufgrund von kolorektalen Lebermetastasen. Die 7 weiteren Leberteileresektionen erfolgten zur Behandlung von Hepatozellulären Karzinomen (n=3), einem undifferenzierten Karzinom (n=1) Metastasen eines gastrointestinalen Stromatumors (n=1), einem Leberabszesses (n=1), sowie in einem Fall als Therapiekonzept bei einem Patienten mit einer primär sklerosierender Cholangitis (n=1). Da die kolorektalen Lebermetastasen und die Karzinome des Gallengangsystems zahlenmäßig den anderen Entitäten überlegen waren, erfolgte eine Einteilung in entsprechende Subgruppen für eine nachfolgende Subgruppenanalyse.

In der Tabelle 1 sind die demographischen Charakteristika des Patientenkollektivs, sowie weitere, für die Leberzellisolierung relevante, Einflussfaktoren zusammengefasst.

Der Altersdurchschnitt lag bei $64,7 \pm 1,66$ Jahren. Das Patientenkollektiv setzt sich aus 35 männlichen und 13 weiblichen Patienten zusammen. Die Leberresektate waren im Mittel 22,73 g schwer, die kalte Ischämiezeit betrug im Durchschnitt 18,48 Minuten und die Zeit der Behandlung mit der Kollagenase P Lösung betrug 7,88 Minuten im Durchschnitt.

Zwischen dem Gesamtkollektiv, sowie den Subgruppen der Gallenwegstumore und der kolorektalen Lebermetastasen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich demographischer Charakteristika, präoperativer Einflussfaktoren oder histopathologischer Faktoren, wie Steatose und Fibrose (*Tab. 1*).

Bezüglich der präoperativen laborchemischen Parameter zeigte sich einzig in Bezug auf die GGT ein signifikanter Unterschied, wobei dies vor allem als Ausdruck einer Cholestase zu werten ist und sich um ein typisches Phänomen bei Patienten mit cholangiogenen Tumoren handelt, wie bereits zuvor in der Literatur beschrieben wurde (28).

Tabelle 1. Demographische, klinische und laborchemische Merkmale des Patientenkollektivs

Parameter	Alle Patienten	Gallengangs- karzinome	Kolorektale Leber- metastasen	P-Wert
Fallzahl	48	20	21	
Geschlecht (m/w)	35/13	12/8	17/4	0.324
Alter (in Jahren)	64.65±1.66	68.50±2.47	61.33±2.50	0.089
Kalte Ischämiezeiten (Min)	18.48±1.75	16.59±1.20	20.38±3.74	0.937
Perfusionszeit mit	7.88±0.23	7.98±0.34	7.98±0.28	0.951
Kollagenase P (Min)				
Gewicht des Leberresektats (g)	22.73±1.96	22.90±3.49	22.79±2.43	0.860
Laborchemische Parameter				
Bilirubin (mg/dl)	0.73±0.12	0.79±0.22	0.50±0.05	0.775
ALT (U/l)	35.77±422	38.23±4.80	33.40±6.80	0.311
AST (U/l)	38.16±3.48	44.65±6.92	29.86±3.11	0.113
AP (U/l)	163.5±26.59	257.30±69.36	117.8±16.25	0.097
GGT (U/l)	233.5±38.29	386.80±69.37	95.17±23.82	<0.001
aPTT (s)	35.36±0.59	36.32±1.21	34.19±0.52	0.284
Chirurgische Indikation				
HCC	3	-	-	
Gallengangskarzinome	20	20	-	
Kolorektale Lebermetastasen	21	-	21	
Gutartige Lebererkrankungen	2	-	-	
Andere	2	-	-	
Fibrose				
Keine Fibrose	12	7	5	
Fibrose	24	9	11	

Zirrhose	1	0	0	0.816
Keine Daten verfügbar	11	4	5	
Steatose				
Keine Steatose	8	4	4	
≤30% Steatose	14	3	7	
>30% Steatose	4	1	3	0.837
Keine Daten verfügbar	22	12	7	

Tabelle 1. Demographische und klinische Merkmale des Patientenkollektivs

Die Tabelle 1 zeigt die demographischen und klinischen Merkmale des Gesamtpatientenkollektivs und der Untergruppen des Patientenkollektivs mit kolorektalen Lebermetastasen und Gallengangskarzinome. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Mittelwerte (\pm) angegeben. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet und in fett dargestellt.

3.3.2. Quantitatives Ergebnis der Leberzellisolierung

Betrachtet man die Isolierungsergebnisse der gesamten Studienpopulation, konnte eine durchschnittliche Gesamtzellzahl von $21,23 \cdot 10^6$ Zellen/g erzielt werden. Die viable Zellzahl betrug im Durchschnitt $17,75 \cdot 10^6$ Zellen/g. Das bedeutet, dass eine mittlere Viabilität von 80,15 Prozent erzielt werden konnte.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Untergruppen, fällt auf, dass die Gesamtzellzahl und auch die viable Zellzahl in der Untergruppe der Kolorektalen Karzinome über den durchschnittlichen Zellzahlen der Untergruppe der Gallengangskarzinome liegen. Diese Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant. Die Viabilität der Zellen in der Untergruppe der Gallengangskarzinome war nur minimal der Viabilität in der Untergruppe der Kolorektalen Karzinome unterlegen, auch hier konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden. Ebenso wenig zeigten sich signifikante Unterschiede in den gemittelten Volumen-korrigierten LiMAX Werten.

Tabelle 2. Quantitatives Isolierungsergebnis

Isolierungsergebnis	Alle Patienten	Gallengangs- karzinome	Kolorektale Leber- metastasen	P-Wert
Fallzahl	48	20	21	
Gesamtzellzahl 1×10^6 Zellen/g	21.23 ± 3.14	17.28 ± 3.58	25.67 ± 5.41	0.488
Viable Zellzahl 1×10^6 Zellen/g	17.75 ± 2.81	14.28 ± 3.15	21.36 ± 4.85	0.584
Viabilität %	80.15 ± 1.75	79.74 ± 2.18	80.54 ± 3.19	0.476
Volumen-korrigierte LiMAX - Werte	0.253 ± 0.014	0.256 ± 0.094	0.2638 ± 0.024	0.944

Tabelle 2. Quantitatives Isolierungsergebnis

Die Tabelle 2 zeigt das quantitative Isolierungsergebnis des Gesamtpatientenkollektivs und der Untergruppen mit kolorektalen Lebermetastasen und Gallengangskarzinome. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Mittelwerte (\pm) angegeben. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3.3.3. Korrelation der Volumen-korrigierten LiMAX-Werte mit dem quantitativen Isolierungsergebnis

Die Korrelationsanalysen im Gesamtkollektiv ergaben eine positive und signifikante Korrelation zwischen den Volumen-korrigierten LiMAX-Werten mit der Gesamtzellzahl ($p=0,049$; $r=0,242$). Für die viable Zellausbeute bestand zwar ebenfalls ein positiver Trend zwischen den Volumen-korrigierten LiMAX-Werte und den viablen Zellen, diese Korrelation erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,080$, $r=0,206$). Eine Korrelation zwischen dem Volumen-korrigierten LiMAX und der Viabilität konnte nicht gezeigt werden. (Abb. 1)

Betrachtet man die Subgruppe der Leberzellisolierungen von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen, zeigt sich eine deutlich stärker Korrelation, sowohl für die Gesamtzellzahl ($p=0,012$; $r=0,488$) als auch für die viable Zellzahl ($p=0,034$; $r=0,405$). Beide Korrelationen erreichen statistische Signifikanz. Für die Zellviabilität konnte auch hier keine Korrelation nachgewiesen werden. (Abb.2)

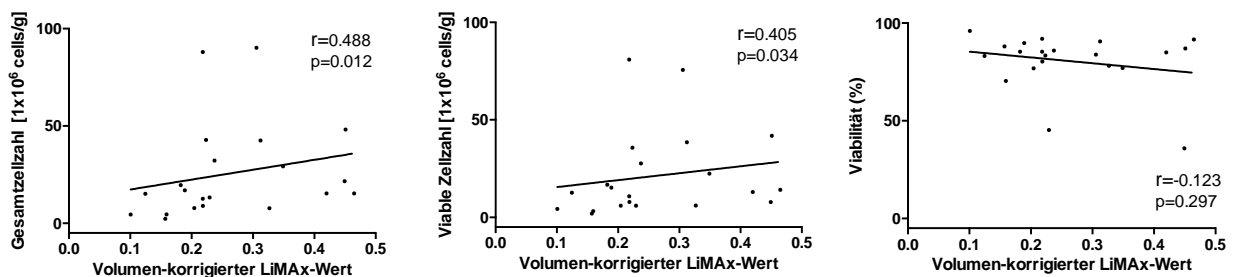


Abbildung 2. Korrelation der Volumen-korrigierten LiMAX-Werte mit dem Isolierungsergebnis in der Untergruppe der Kolorektalen Karzinome. P-Werte wurden mittels einer one-tailed Spearman Korrelationsanalyse berechnet und $<0,05$ als signifikant gewertet.

In der Subgruppe der Gallengangskarzinome konnte hingegen keine Korrelation zwischen Volumen-korrigiertem LiMAX und der Gesamtzellzahl ($r=-0,060$; $p=0,401$), sowie viabler Zellzahl ($r=-0,012$; $p=0,480$) gezeigt werden, jedoch zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der Volumen-korrigierten LiMAX-Werte mit der Zellviabilität ($r=0,387$; $p=0,046$). (Abb. 3)

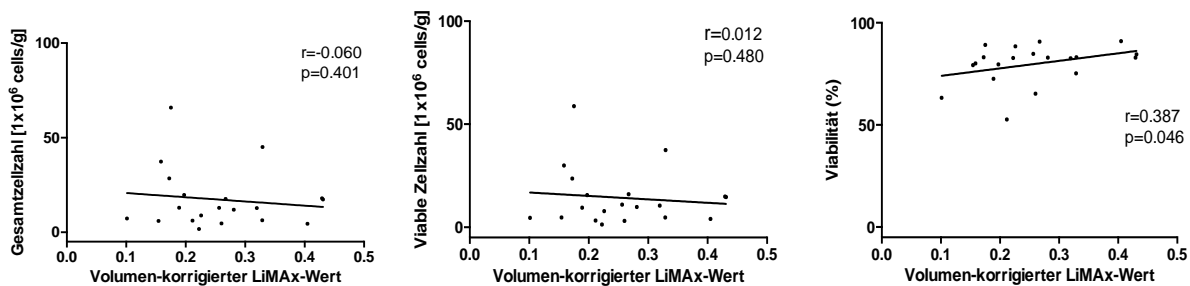


Abbildung 3. Korrelation der Volumen-korrigierten LiMAX-Werte mit dem Isolierungsergebnis in der Untergruppe der Gallengangskarzinome. P-Werte wurden mittels einer one-tailed Spearman Korrelationsanalyse berechnet und <0,05 als signifikant gewertet.

3.3.4. Korrelation der Volumen-korrigierten LiMAX-Werte mit metabolischen Parametern in der Zellkultur

Die Auswertung der metabolischen Parameter AST, Harnstoff und Albumin in Zellkulturen von 11 Isolierungen über den Untersuchungszeitraum von 5 Tagen ergab keine signifikante Korrelation mit den Volumen-korrigierten LiMAX-Werten. Die AST-Werte zeigten jedoch eine Tendenz zu einer negativen Korrelation nach einer Kulturdauer über 48 Stunden ($r = -0,476$; $p = 0,061$). (Tab. 3)

Tabelle 3: Korrelation der metabolischen Parameter mit den Volumen-korrigierten LiMAX-Werten

Kategorie	Harnstoff		AST		Albumin	
	p	r	p	r	p	r
Übernacht	0.473	0.030	0.246	-0.248	0.291	-0.238
48 Stunden	0.419	-0.073	0.061	-0.476	0.467	-0.048
96 Stunden	0.222	-0.245	0.279	-0.200	0.057	-0.619

Tabelle 3. Korrelationskoeffizienten mit p-Werten der metabolischen Parameter der 11 Hepatozytenkulturen. P-Werte wurden mittels einer one-tailed Spearman Korrelationsanalyse berechnet und <0.05 als signifikant gewertet.

3.4. Diskussion

Ziel dieser Studie ist es, den prinzipiellen Nutzen des klinisch angewendeten LiMAx-Tests zur Vorhersage des Isolierungsergebnisses einer Hepatozytenisolierung zu evaluieren. Das Ergebnis der Leberzellisolierung hängt von einer Vielzahl von Einflussfaktoren ab, welche in den vergangenen Jahren bereits ausführlich in der Literatur analysiert und diskutiert wurden. Insgesamt wurden mehr als 25 verschiedene Einflussfaktoren identifiziert, welche sich sowohl auf demographische Charakteristika, histopathologische Eigenschaften des Lebergewebes, Isolierungs-bezogene Einflussfaktoren, zugrundeliegende Erkrankung, präoperative laborchemische Parameter, sowie auf konkomitante Medikation beziehen (28). Die relevantesten Einflussfaktoren scheinen dabei das Alter der Patienten (16, 21,31, 32, 33), die warme Ischämiezeit des Lebergewebes in vivo und ex vivo (21, 31), das Gewicht des zu perfundierenden Leberstücks (21, 32, 31), sowie die Digestionszeit mit Kollagenase P zu sein (31, 32). Weiterhin scheinen histologische Eigenschaften wie Fibrose, Zirrhose und Steatose einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Isolierungsergebnis zu haben (14, 21, 32). Unter den präoperativen laborchemischen Parametern hat sich insbesondere eine erhöhte GGT als negativ prädiktiver Faktor erwiesen (20, 34).

Die tatsächliche Einflussstärke dieser einzelnen Faktoren ist jedoch bis heute unklar. Weiterhin stellen viele dieser Faktoren eine unabänderliche Bedingung dar, sodass sich trotz des Wissens um das negativ-prädiktive Potenzial dieser Parameter kein unmittelbarer praktischer Nutzen ableiten lässt. Einzig eine Optimierung des Isolierungsprozesses mit dem Ziel minimaler kalter Ischämie-Zeiten und optimaler Kollagenase P-Perfusionszeiten lässt sich praktisch umsetzen. Mit Hinblick auf eine Maximierung der Zellausbeute, sowie einen ökonomischen Ressourceneinsatz mit der konkreten Frage, welches Lebergewebe ein gutes Isolationsergebnis erwarten lässt und welches nur wenig bis gar keine nutzbaren Zellen ergibt, benötigt es ein prädiktives Werkzeug, welches über die Beschreibung bloßer Einflussfaktoren hinausgeht.

Einen interessanten und bislang in dieser Weise einzigartigen Ansatz dazu haben Lee et al. geliefert (21). Hierbei wurden mehrere Einflussfaktoren in einem Algorithmus zusammengefasst, um eine prädiktive Aussage über die Zellausbeute, als auch die Zellviabilität nach erfolgter Hepatozytenisolierung zu ermöglichen. Hierbei wurden multivariate Analysen durchgeführt, um die einzelnen Effektstärken der zuvor identifizierten prädiktiven Parameter zu identifizieren. Darauf basierend gingen in den Algorithmus zur Vorhersage der Viabilität die Variablen präoperatives Bilirubin, histologisch gesicherte Fibrose, prozentuales Leberfett und präoperative GGT-Werte ein. Für den Algorithmus zur Vorhersage der Zellausbeute entsprechend wurden die Variablen präoperative Chemotherapie, kalte Ischämiezeit, Gewicht des perfundierten Leberresektats, prozentuales Leberfett, Ludwig-Score und präoperative AST-

Aktivität gewählt. Eine große Stärke dieser Studie ist das große Patientenkollektiv mit Daten aus über 1000 Hepatozytenisolierungen, an welchen die jeweiligen Algorithmen validiert werden konnten. Beide Algorithmen ermöglichen eine gute Vorhersage über die zu erwartende Zellausbeute und Viabilität. Bedauerlicherweise sind in den meisten Fällen histologische Informationen wie Steatose, Fibrose und Zirrhose zum Zeitpunkt der Leberresektion und folglich zum Zeitpunkt der Hepatozytenisolierung noch nicht verfügbar, da pathologische Schnellschnittbegutachtung und Hepatozytenisolierung, nach der chirurgischen Leberresektion etwa zeitgleich erfolgen. Folglich ist der praktische Nutzen dieses Scores nur begrenzt, da in den meisten Fällen eine Abschätzung des Isolierungsergebnisses nur retrospektiv möglich sein wird.

Vor diesem Hintergrund stellt diese Studie einen neuartigen Ansatz mit dem wesentlichen Vorteil dar, dass der LiMax-Test – zumindest an bestimmten Zentren – routinemäßig präoperativ durchgeführt wird und in der Regel auch eine zur Volumetrie geeignete präoperative Bildgebung in Form einer Computertomographie oder Magnetresonanztomographie vorliegt, womit eine Grundvoraussetzung für ein praktisch anwendbares prädiktives Instrument gegeben ist.

Die Korrelation zwischen Volumen-korrigierten LiMax-Werten und der Zellausbeute war im gesamten Patientenkollektiv zwar signifikant, jedoch eher schwach ausgeprägt, was perspektiv eine sinnvolle Beschreibung eines „Cut-Off“-Wertes, ab welchem eine Isolierung als nicht-erfolgsversprechend gilt und nicht mehr durchgeführt werden sollte, erschwert. Weiterhin zeigte sich eine Korrelation in dieser relativ heterogenen Gruppe nur für die Gesamtzellausbeute. Für die viable Zellausbeute und die Viabilität konnte keine Signifikanz erreicht werden.

Vielversprechender ist dabei der Blick in die Subgruppe der kolorektalen Lebermetastasen, wobei eine deutlich stärkere Korrelation für Gesamtzellzahl, als auch für die viable Zellzahl erkennbar ist. In der Gruppe der Gallenwegstumore lässt sich kein prädiktiver Nutzen des Volumen-korrigierten LiMax ableiten. Die vorliegende Studie ist leider nicht in der Lage, die für diese Diskrepanz verantwortlichen Mechanismen aufzuschlüsseln. Es lässt sich jedoch hypothetisieren, dass metastatische Erkrankungen der Leber ein sonst gesundes Lebergewebe erwarten lassen. Möglicherweise bildet der LiMax-Wert hier in Bezug auf die Leberzellisolierung ein besseres Bild über die verschiedenen negativ-prädiktiven Faktoren, wie Steatose, Fibrose und Zirrhose ab. So ist beispielsweise bekannt, dass eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) oder nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (NASH) bei postoperativen Patienten zu schlechteren LiMax-Werten führt, als bei Patienten ohne histologisch nachgewiesener Steatose der Leber (35). Der Einfluss einer fibrotisch oder zirrhotisch veränderten Leber auf den LiMax-Wert ist ebenfalls überzeugend nachgewiesen (26, 36, 37). Diese Hypothese setzt gleichzeitig voraus, dass in der Gruppe der Gallenwegskarzinome eine Bedingung vorliegt, die nicht unmittelbar durch den LiMax im Sinne

einer verminderten Leberfunktion abgebildet wird, aber dennoch das Isolierungsergebnis deutlich vermindert.

Wie in Tabelle 1 aufgeführt, unterscheiden sich bei Gruppen einzig in den deutlich höheren GGT-Werten in der Gruppe der Gallenwegstumore. Dieser Umstand wurde zuvor schon in der Literatur diskutiert und als klassisches Phänomen der Gallenwegstumore, als Ausdruck der intra- und extrahepatischen Cholestase gewertet (28). Weiterhin ist die GGT aber auch ein unbestrittener negativer Prädiktor für das Isolierungsergebnis. Ob sich jedoch cholestatische Lebererkrankungen und erhöhte GGT-Werte unmittelbar in einem verminderten LiMAX-Wert widerspiegeln ist nicht geklärt und könnte eine Erklärung der deutlichen Unterschiede in beiden Subgruppen sein. In Bezug auf diese Hypothese wäre rückblickend eine genauere Charakterisierung der Cholestase, über die Bewertung von laborchemischen Parametern hinaus, durch eine histologische Beurteilung interessant. Da die histologische Begutachtung jedoch in der Regel vor dem Hintergrund einer onkologischen Tumorresektion durchgeführt wurde, liegt das Augenmerk der histopathologischen Befunde auf einer Beurteilung des Resektionsrandes. Steatose, Fibrose, Zirrhose und insbesondere Zeichen einer intrahepatischen Cholestase wurden nicht standardisiert bewertet.

Eine weitere entscheidende Fragestellung in Bezug auf die Vorhersage des Ergebnisses einer Hepatozytenisolierung ist, ob sich die metabolische Funktion der Hepatozyten in Kultur in Abhängigkeit von beispielsweise zugrundeliegender Diagnose, histologischen Eigenschaften wie Steatose, Fibrose und Zirrhose oder auch Patientencharakteristika unterscheidet. Im Gegensatz zur Abschätzung des quantitativen Ergebnisses, also der gewonnenen Zellzahl, ist die tatsächliche metabolische Funktion der Hepatozyten nicht nur relevant im Sinne einer optimalen Ressourcennutzung und Optimierung des Isolierungsprozesses. Vielmehr ist die metabolische Funktion von größter wissenschaftlicher Bedeutung, da idealerweise für toxikologisch-pharmakologische Tests und sonstigen wissenschaftlichen Anwendungen, eine vergleichbare metabolische Funktion von Hepatozyten in Zellkultur unerlässlich für eine Erhebung valider Daten ist. Umso erstaunlicher ist es, dass bislang keine Daten zu dieser Fragestellung vorliegen. Es ist etwa durchaus denkbar, dass Hepatozyten, welche aus vorerkranktem Lebergewebe, wie etwa einer NASH, gewonnen werden, andere metabolische Charakteristika aufweisen, als Hepatozyten, welche aus prinzipiell gesundem Lebergewebe, wie etwa bei einem gutartigen Lebertumor, gewonnen werden.

Daher war eine weitere Fragestellung dieser Studie, ob sich aus dem Volumen-korrigierten LiMAX auch eine veränderte metabolische Funktion ableiten lässt. Eine überzeugende Antwort darauf konnte diese Arbeit jedoch nicht geben. Dies ist auch maßgeblich auf den kleinen Probenumfang von 11 Proben zurückzuführen.

Eine überzeugende Korrelation zwischen Volumen-korrigierten LiMAX-Werten und dem Isolierungsergebnis konnten in Bezug auf das gesamte Patientenkollektiv nicht gezeigt werden.

Interessant ist jedoch, die deutlich bessere Korrelation in der Subgruppe der kolorektalen Lebermetastasen, sowie die deutliche Diskrepanz zu der Subgruppe der Gallenwegstumore. An dieser Stelle muss, mit dem relativ kleinen Datensatz von insgesamt 48 Isolierungen, auch auf die wesentliche Limitation dieser Studie hingewiesen werden. Eine weiterführende Evaluation des Volumen-korrigierten LiMAx als prädiktives Instrument könnte jedoch lohnenswert sein. Diese sollte vor allem prospektiv ausgerichtet sein, eine deutlich größere Fallzahl umfassen und a priori eine Einteilung in entsprechende Subgruppen festlegen. Weiterhin sollte dann eine genauere Charakterisierung der Subgruppen, insbesondere auch mit Einbeziehung histologischer Kriterien erfolgen. Sollten sich dabei hier beobachtete Trends und Korrelationen bestätigen, können unter Umständen tatsächliche „Cut-Off“-Werte abgeleitet werden, die künftig helfen den Erfolg einer Leberzellisolierung abzuschätzen.

3.5. Aktueller Forschungsstand und Ausblick

In der Experimentellen Chirurgie an der Chirurgischen Klinik der Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin werden unter Leitung von Prof. Dr. med. Igor M. Sauer verschiedene Fragestellung zur Organregeneration untersucht und Organersatzverfahren entwickelt. Den Grundpfeiler dieser Forschung bildet die Leberzellisolierung. Im Fokus steht die Optimierung des Isolierungsprozesses und die Erforschung von Faktoren, welche die Isolierung potenziell beeinflussen.

Vondran et al. etablierten das in dieser Arbeit verwendete Isolierungsprotokoll und untersuchten am Patientenkollektiv der Chirurgischen Klinik der Charité - Universitätsmedizin die wichtigsten die Hepatozytenisolierung beeinflussenden Faktoren (11).

In einer weiteren, dem Themenkreis der Hepatozytenisolierung untergeordneten Fragestellung, wurde der Einfluss einer vorangegangenen portalvenösen Embolisation auf das Isolierungsergebnis überprüft. Um das Risiko für ein postoperatives Leberversagen aufgrund eines zu geringen Volumens der Restleber zu minimieren, wird bei der Pfortaderembolisation die portalvenöse Gefäßversorgung des tumortragenden Leberlappens präoperativ unterbunden. Durch die verstärkte Durchblutung des nicht embolisierten Leberlappens, sowie die relative Minderversorgung in den embolisierten Arealen, beginnt der nicht embolisierte Leberlappen zu hypertrophieren. In unserer Untersuchung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolierungsergebnissen von Lebern mit oder ohne vorangegangener Pfortaderembolisation. Es zeigte sich lediglich ein Trend zu einer besseren Viabilität der Zellen nach erfolgter Pfortaderembolisation (33).

Eine weitere Fragestellung war, der Einfluss von Operationstechniken auf das Isolierungsergebnis. Eigene Untersuchungen zeigten, dass die Leberzellisolierung aus Gewebe, gewonnen durch eine laparoskopische Leberresektion, signifikant schlechter war, als von Lebern nach offenen Operationen. Genauer betrachtet, war nur das Ergebnis von rechtslateralen laparoskopischen Resektionen schlechter. Dies ist am ehesten auf die verlängerten warmen Ischämiezeiten aufgrund der längeren Operationsdauer zurückzuführen (16).

Mit Blick auf die Anwendung von humanen Hepatozyten, beispielsweise der pharmakologischen Forschung, ist mutmaßlich die Prädiktivität der metabolischen Zellfunktion wichtiger, als die Vorhersage des quantitativen Isolierungsergebnisses. Aufgrund der geringen Fallzahl der für die metabolischen Analysen genutzten Isolierungen, kann diese Fragestellung allerdings nicht abschließend geklärt werden. Weiterhin ist nach aktuellem Stand der Forschung ebenfalls nicht abschließend geklärt, ob präoperative oder isolierungsbezogene Einflussfaktoren tatsächlich, die in der Zellkultur gemessene, metabolische Funktion isolierter humaner Hepatozyten beeinflussen. Dahingehend werden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Igor M. Sauer derzeit weitergehende Studien durchgeführt.

3.6. Quellenverzeichnis

1. Hillebrandt, KH., Everwien, H., Haep, N., Keshi, E., Pratschke, J., Sauer, IM. (2019) Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transplantation International* 32 (6), 571-585.
2. Soltys, KA., Soto-Gutierrez A., Nagaya, M., Baskin, KM., Deutsch, M., Ito, R., Shneider, BL., Squires, R., Vockley, J., Guha, C., Roy-Chowdhury, J., Strom, SC., Platt, JL., Fox, IJ. (2010) Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *Journal of Hepatology*, 53 (4), 769-774
3. Gramignoli, R., Vosough, M., Kannisto, K., Srinivasan, RC., Strom, SC. (2015) Clinical Hepatocyte Transplantation: Practical Limits and Possible Solutions. *European Surgical Research*, 54 (3-4), 162-77.
4. Najimi, M., Sokal, E. (2005) Liver Cell Transplantation. *Minerva pediatrica* 57 (5), 243-57.
5. Strom, SC., Fisher, RA., Thomposon, MT., Sanyal, AJ., Cole, PE., Ham, JM., Posner, MP. (1997) Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*, 63 (4), 559-569.
6. Sudan, DL., Shaw BW., Fox, IJ., Langnas, AN. (1997) Long-term follow-up of auxiliary orthotopic liver transplantation for the treatment of fulminant hepatic failure. *Surgery*, 122 (4), 7777-8.
7. Li, AP., Kedderis G. (1997) Primary hepatocyte culture as an experimental model for the evaluation of interactions between xenobiotics and drug-metabolizing enzymes. *Chemico-biological interactions*. 107 (1-2),1-3.
8. Brambilla, G., Martelli, A. (1993) Human hepatocyte primary cultures in toxicity assessment. *Cytotechnology*, 11, 6-8.
9. Fox, IJ., Chowdhury, JR., Kaufman, SS., Goertzen, TC., Chowdhury, NR., Warkentin, PI., Dorko, K., Sauter, BV., Strom, SC. (1998) Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *New England Journal of Medicine*. 338(20), 1422-6.
10. Ambrosino, G., Varotto, S., Strom, SC., Guariso, G., Franchin, E., Miotto, D., Caenazzo, L., Basso, S., Carraro, P., Valente, ML., D'Amico, D., Zancan, L., D'Antiga, L. (2005) Isolated

- hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplantation*. 14 (2-3), 151-7.
11. Robertson, MJ., Soibam, B., O'Leary, JG., Sampaio, LC., Taylor, DA. (2018) Recellularization of rat liver: An in vitro model for assessing human drug metabolism and liver biology. *PLoS One*. 13 (1)
 12. Zhang, K., Zhang, L., Liu, W., Ma, X., Cen, J., Sun, Z., Wang, C., Feng, S., Zhang, Z., Yue, L., Sun, L., Zhu, Z., Chen, X., Feng, A., Wu, J., Jiang, Z., Li, P., Cheng, X., Gao, D., Peng, L., Hui, L. (2018) In Vitro Expansion of Primary Human Hepatocytes with Efficient Liver Repopulation Capacity. *Cell Stem Cell*. 23 (6), 806-819.
 13. Tolosa, L., Bonora-Centelles, A., Teresa Donato, M., Pareja, E., Negro, A., López, S., Castell, JV., José Gómez-Lechón, M. (2011) Steatotic liver: a suitable source for the isolation of hepatic progenitor cells. *Liver International*, 31 (8), 1231-8.
 14. Alexandrova, K., Griesel, C., Barthold, M., Heuft, HG., Ott, M., Winkler, M., Schrem, H., Manns, MP., Bredehorn, T., Net, M., Vidal, MM., Kafert-Kasting, S., Arseniev, L. (2005) Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell Transplantation*, 14 (10), 845-53.
 15. Kehr, DC., Raschzok, N., Sauer, IM. (2012) A novel cannulation technique for isolation of human hepatocytes from explanted diseased whole livers. *Transplantation Proceedings*, 44 (4), 999-1001.
 16. Vondran, FW., Katenz, E., Schwartlander, R., Morgul, MH., Raschzok, N., Gong, X., Cheng, X., Kehr, D., Sauer, IM. (2008) Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artificial Organs*, 32 (3), 205-13.
 17. Berry, MN., Friend, DS. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of Cell Biology*, 43 (3), 506-20.
 18. Guguen-Guillouzo C, Champion JP, Brissot P, Glaise D, Launois B, Bourel M, Guillouzo A. High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep*. 1982;6(6):625–628. doi: 10.1016/0309-1651(82)90187-4.

19. Berardi, G., Van Cleven, S., Fretland, ÅA., Barkhatov, L., Halls, M., Cipriani, F., Aldrighetti, L., Abu Hilal, M., Edwin, B., Troisi, RI. (2017) Evolution of Laparoscopic Liver Surgery from Innovation to Implementation to Mastery: Perioperative and Oncologic Outcomes of 2,238 Patients from 4 European Specialized Centers. *Journal of the American College of Surgeons*, 225 (5), 639-649.
20. Horner, R., Kluge, M., Gassner, J., Nösser, M., Major, RD., Reutzel-Selke, A., Leder, AK., Struecker, B., Morgul, MH., Pratschke, J., Sauer, IM., Raschzok, N. (2016) Hepatocyte Isolation After Laparoscopic Liver Resection. *Tissue Engineering Part C Methods*, 22 (9), 839-46.
21. Lee, SM., Schelcher, C., Laubender, RP., Fröse, N., Thasler, RM., Schiergens, TS., Mansmann, U., Thasler, WE. (2014) An algorithm that predicts the viability and the yield of human hepatocytes isolated from remnant liver pieces obtained from liver resections. *PLoS One*, 9 (10).
22. Stockmann, M., Lock, JF., Riecke, B., Heyne, K., Martus, P., Fricke, M., Lehmann, S., Niehues, SM., Schwabe, M., Lemke, AJ., Neuhaus, P. (2009) Prediction of postoperative outcome after hepatectomy with a new bedside test for maximal liver function capacity. *Annals of Surgery*, 250 (1), 119-25.
23. Stockmann, M., Lock, JF., Malinowski, M., Niehues, SM., Seehofer, D., Neuhaus, P. (2010) The LiMAX test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery. *HPB (Oxford)*, 12 (2), 139-46.
24. Schneider, PD. (2004) Preoperative assessment of liver function. *The Surgical Clinics of North America*, 84 (2), 355-73.
25. Mullin, EJ., Metcalfe, MS., Maddern, GJ. (2005) How much liver resection is too much?. *American Journal of Surgery*, 190 (1), 87-97.
26. Jara, M., Dziodzio, T., Malinowski, M., Lüttgert, K., Nikolov, R., Ritschl, PV., Öllinger, R., Pratschke, J., Stockmann, M. (2018) Prospective Assessment of Liver Function by an Enzymatic Liver Function Test to Estimate Short-Term Survival in Patients with Liver Cirrhosis. *Digestive Diseases and Sciences*. 64 (2), 576-584.

27. Stravitz, RT., Reuben, A., Mizrahi, M., Lalazar, G., Brown, K., Gordon, SC., Ilan, Y., Sanyal, A. (2015) Use of the methacetin breath test to classify the risk of cirrhotic complications and mortality in patients evaluated/listed for liver transplantation. *Journal of Hepatology*, 63 (6), 1345-51.
28. Kluge, M., Reutzel-Selke, A., Napierala, H., Hillebrandt, KH., Major, RD., Struecker, B., Leder, A., Siefert, J., Tang, P., Lippert, S., Sallmon, H., Seehofer, D., Pratschke, J., Sauer, IM., Raschzok, N. (2016) Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome? *Tissue Engineering Part C Methods*. 22 (1), 38–48.
29. Smith, PK., Krohn, RI., Hermanson, GT., Mallia, AK., Gartner, FH., Provenzano, MD., Fujimoto, EK., Goeke, NM., Olson, BJ., Klenk, DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.
30. Stockmann, M., Lock, JF., Malinowski, M., Seehofer, D., Puhl, G., Pratschke, J., Neuhaus, P. (2010) How to define initial poor graft function after liver transplantation? - a new functional definition by the LiMAx test. *Transplantation International*, 23 (10), 1023-32.
31. Kawahara, T., Toso, C., Douglas, DN., Nourbakhsh, M., Lewis, JT., Tyrrell, DL., Lund, GA., Churchill, TA., Kneteman, NM. (2010) Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transplantation*. 16 (8), 974-82.
32. Richert, L., Alexandre, E., Lloyd, T., Orr, S., Viollon-Abadie, C., Patel, R., Kingston, S., Berry, D., Dennison, A., Heyd, B., Mantion, G., Jaeck, D. (2004) Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver International*. 24 (4), 371-8.
33. Mitry, RR., Hughes, RD., Aw, MM., Terry, C., Mieli-Vergani, G., Girlanda, R., Muiesan, P., Rela, M., Heaton, ND., Dhawan, A. (2003) Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplantation*. 12 (1), 69-74.
34. Stockmann, M., Lock, JF., Riecke, B., Heyne, K., Martus, P., Fricke, M., Lehmann, S., Niehues, SM., Schwabe, M., Lemke, AJ., Neuhaus, P. (2009) Prediction of postoperative outcome after hepatectomy with a new bedside test for maximal liver function capacity. *Annals of Surgery*, 250 (1), 119-25.

35. Hoppe, S., von Loeffelholz, C., Lock, JF., Doecke, S., Sinn, BV., Rieger, A., Malinowski, M., Pfeiffer, AF., Neuhaus, P., Stockmann, M. (2015) Nonalcoholic steatohepatitis and liver steatosis modify partial hepatectomy recovery. *Journal of Investigative Surgery*. 28 (1), 24-31.
36. Buechter, M., Thimm, J., Baba, HA., Bertram, S., Willuweit, K., Gerken, G., Kahraman, A. (2019) Liver Maximum Capacity: A Novel Test to Accurately Diagnose Different Stages of Liver Fibrosis. *Digestion*. 100 (1), 45-54.
37. Stravitz, RT., Reuben, A., Mizrahi, M., Lalazar, G., Brown, K., Gordon, SC., Ilan, Y., Sanyal, A. (2015) Use of the methacetin breath test to classify the risk of cirrhotic complications and mortality in patients evaluated/listed for liver transplantation. *Journal of Hepatology*, 63 (6), 1345-51.

4. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Dalma Rebeka Major, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Der prädiktive Wert des LiMAX-Tests für das quantitative und qualitative Ergebnis einer Isolierung von primären humanen Hepatozyten**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

21.07.2020

Datum

Unterschrift

5. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

The predictive value of the maximal liver function capacity test for isolation of primary human hepatocytes. **Major RD***, Kluge M*, Jara M, Nösser M, Horner R, Gassner J, Struecker B, Tang P, Lippert S, Reutzel-Selke A, Geisel D, Denecke T, Stockmann M, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part C Methods. 2018 Mar;24(3):179-186

***both authors contributed equally to this work**

Beitrag im Einzelnen:

Versuchsvorbereitung

Erlernen der humanen Leberzellisolierung

Erlernen der Arbeit mit Zellkulturen

Erlernen der Volumetrien

Versuche

- Selbstständige Durchführung von Leberzellisolierungen zwischen Februar und Oktober 2015:
Dies beinhaltet das sterile Transferieren von Lebergewebe aus den allgemeinchirurgischen Operationssälen des Virchow Klinikums in die Forschungslabore der AG Experimentellen Chirurgie im Forum 4, am Campus Virchow Klinikum, das Kanülieren sowie die Perfusion des Gewebes.
- Aussäen der Zellen auf 6-well-Platten, Mediumwechsel, Probenentnahme, Asservierung der Proben alle 12-24 Stunden über die gesamte Kulturdauer von 108 Stunden.
- Durchführung der Volumetrien
- Sichtung der Patientenakten und einpflegen der Labor- und LiMAx-Werte in die zur Auswertung angelegte Datenbank
- Durchführung des Albumin-Elisas

Auswertung

Statistische Auswertung der erhobenen Daten mit GraphPad Prism 6.0, sowie die Interpretation der Ergebnisse.

Manuskript

- Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts, Mitarbeit bei der Erstellung der Abbildungen, Bearbeitung der Revision.

Unterschrift, Datum und Stempel des
betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin
Berlin, am 21.07.2020

6. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Tissue Engineering hat Rang 42 von 160 in der Kategorie „biotechnology & applied microbiology“. IF (2017): 3,508; Eigenfactor (2017): 0,023730

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“BIOTECHNOLOGY and APPLIED MICROBIOLOGY”**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 160 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	31,312	50.167	0.054410
2	NATURE BIOTECHNOLOGY	57,510	35.724	0.161460
3	TRENDS IN BIOTECHNOLOGY	14,746	13.578	0.019170
4	GENOME BIOLOGY	34,697	13.214	0.118500
5	BIOTECHNOLOGY ADVANCES	15,722	11.452	0.021940
6	GENOME RESEARCH	38,842	10.101	0.105060
7	CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY	14,009	8.380	0.024860
8	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS	48,853	8.173	0.069510
9	METABOLIC ENGINEERING	6,384	7.674	0.014000
10	MOLECULAR THERAPY	16,013	7.008	0.029180
11	Annual Review of Animal Biosciences	582	6.775	0.002460
12	PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL	6,544	6.305	0.014270
13	BIORESOURCE TECHNOLOGY	101,191	5.807	0.109450
14	REVIEWS IN ENVIRONMENTAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY	1,941	5.716	0.002740
15	STEM CELLS	21,694	5.587	0.035680
16	Biotechnology for Biofuels	7,769	5.497	0.020590
17	BIOINFORMATICS	95,300	5.481	0.201110
18	JOURNAL OF NANOBIOTECHNOLOGY	3,004	5.294	0.005360
19	Journal of Biological Engineering	756	5.256	0.001600
20	CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY	2,831	5.239	0.003810
21	MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	3,440	5.205	0.003220
22	Nanomedicine	7,253	5.005	0.012950
23	HUMAN GENE THERAPY	5,559	4.241	0.007690
24	npj Biofilms and Microbiomes	183	4.128	0.000690

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
25	FOOD MICROBIOLOGY	9,325	4.090	0.012400
26	Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	3,963	4.089	0.006640
27	CANCER GENE THERAPY	2,928	4.044	0.003610
28	Current Opinion in Chemical Engineering	1,381	4.033	0.004340
29	CYTOTHERAPY	5,589	3.993	0.009020
30	EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY	4,426	3.974	0.008370
31	BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING	24,560	3.952	0.020170
32	Microbial Biotechnology	2,741	3.913	0.005610
33	SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY	5,083	3.899	0.005450
34	Microbial Cell Factories	6,026	3.831	0.013090
35	Briefings in Functional Genomics	1,557	3.783	0.004130
36	Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts	3,273	3.745	0.008100
37	New Biotechnology	2,343	3.733	0.004740
38	BMC GENOMICS	37,516	3.730	0.099740
39	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY	100,091	3.633	0.071890
40	MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS	10,099	3.588	0.010270
41	INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION	9,237	3.562	0.011120
42	TISSUE ENGINEERING	21,530	3.508	0.023730
43	Biotechnology Journal	4,515	3.507	0.008950
44	Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr	2,918	3.376	0.004340
45	BIOMASS & BIOENERGY	19,706	3.358	0.023220
46	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	39,010	3.340	0.048620
47	BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL	9,231	3.226	0.009570
48	GENE THERAPY	7,733	3.203	0.007690
49	JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY	7,516	3.103	0.007670
50	Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology	1,344	3.026	0.001810
51	DISEASE MARKERS	3,183	2.949	0.007020
52	ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY	11,461	2.932	0.005130

*

...

Quelle: https://intranet.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/medbib/Impact_Faktoren_2017/ISI-WEB-Liste-Kategorie-Biotechnology_and_applied_Microbiology.pdf abgerufen am 07.12.2018 um 14:31

7. Publikation

Major, RD., Kluge M., Jara, M., Nösser, M., Horner, R., Gassner, J., Struecker, B., Tang, P., Lippert, S., Reutzel-Selke, A., Geisel, D., Denecke, T., Stockmann, M., Pratschke, J., Sauer, IM., Raschozok, N. 2018 (The Predictive Value of the Maximal Liver Function Capacity Test for the Isolation of Primary Human Hepatocytes). *Tissue Engineering Part C Methods*. 24 (3), 179-186.

<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0369>

8. Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

9. Publikationsliste

1. The predictive value of the maximal liver function capacity test for isolation of primary human hepatocytes. **Major RD***, Kluge M*, Jara M, Nösser M, Horner R, Gassner J, Struecker B, Tang P, Lippert S, Reutzel-Selke A, Geisel D, Denecke T, Stockmann M, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part C Methods. 2018 Mar;24(3):179-186

*both authors contributed equally to this work

2. The magnetic field of magnetic resonance imaging systems does not affect cells labeled with micrometer-sized iron oxide particles. Kluge M, Leder A, Hillebrandt KH, Struecker B, Geisel D, Denecke T, **Major RD**, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Schmidt C, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part C Methods, 2017, 23(7): 412-21.

3. Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome?, Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH, **Major RD**, Struecker B, Leder A, Siefert J, Tang P, Lippert S, Sallmon H, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part C Methods, 2016, 22(1):38-48.

4. Hepatocyte Isolation After Laparoscopic Liver Resection. Horner R*, Kluge M*, Gassner J, Nösser M, **Major RD**, Reutzel-Selke A, Leder AK, Struecker B, Morgul MH, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part C Methods, 2016, 22(9):839-46.

*both authors contributed equally to this work

Tissue Engineering: Impact Factor: 3. 508, Eigenfaktor-Score: 0.023730

10. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Nathanael Raschzok für seine ausgesprochen gute Betreuung bedanken. Er hat sich immer Zeit genommen, war Tag und Nacht erreichbar für mich und hat die Arbeit mit seinen guten Ideen und Verbesserungsvorschlägen bereichert. Seine Energie und Ehrgeiz sind eine Inspiration sowohl beruflich als auch privat.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. med. Igor Sauer, dem Leiter der Experimentellen Chirurgie und regenerativen Medizin an der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Ihm haben wir Doktoranden diese gut strukturierte Arbeitsgruppe zu verdanken.

Vielen Dank auch an die MTLAs der Arbeitsgruppe, Peter Tang, Steffen Lippert, Dietrich Polenz, Kirsten Führer für die Einarbeitung in die labortechnischen Methoden und Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Vielen Dank an Anja Reutzel-Selke für die Korrektur der statistischen Auswertung und für ihre aufmunternden Worte in verzweifelten Momenten.

Vielen Dank an Dr. med. Maximilian Jara für die Supervision der Volumetriemessungen.

Danke an meine Mitdoktoranden Martin Kluge, Rosa Horner, Joseph Gassner, Maximilian Nösser und Karl Hillebrandt für die Mitarbeit am Paper und dafür, dass sie die Tage im Labor mit ihrer Anwesenheit, Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt besonderem Humor bereichert haben.

Gesondert möchte ich mich noch einmal bei Martin Kluge, der mir sowohl fachlich als auch privat stets zur Seite stand, bedanken. Die schönste Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass ein gemeinsames Leben auch abseits der Bench funktioniert. Vielen Dank für deine Nerven aus Stahl und, dass du mich erträgst, auch wenn es oft nicht leicht ist.

Danke an meine Eltern, Zoltán und Zsuzsanna Major, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben und all die Jahre mitgefiebert haben. Danke für die vielen motivierenden Nachfragen, wann denn die Arbeit nun endlich fertig sei. Danke, dass ihr irgendwann aufgehört habt zu fragen.

Danke auch an Laura König für deine treue Freundschaft und dein Talent, mich zum Lachen zu bringen, in guten, wie in weniger guten Zeiten.