

1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Überblick zur Leberzelltransplantation

Historisch gesehen handelt es sich bei der Idee, Leberzellen zu verpflanzen, um kein neuartiges Konzept. Bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts versuchten Forscher auf die unterschiedlichste Art, zerkleinerte Leberanteile zu transplantieren.[1, 2] So versetzte zum Beispiel Hans Popper Leberfragmente in die vordere Augenkammer der Ratte.[3] Jedoch kam es bei derartigen Versuchen in den meisten Fällen entweder zu einer Degeneration der Gewebestücke oder die Transplantate waren nach einigen Tagen nicht mehr nachzuweisen.

Viele Arbeitsgruppen in den USA und in Europa griffen die Hepatozytentransplantation wieder auf, als in den späten 60er Jahren erfolgreiche Versuche zur Zellisolation von Hepatozyten durch Berry und Friends [4, 5] und zur Transplantation von Pankreasinzellzellen [6] vollzogen wurden. Die ersten Erfolge einer Therapie durch Hepatozytentransplantation im Tiermodell waren in den späten 70er Jahren zu verzeichnen, als Rugstad *et al.* [7], Matas *et al.* [8] und Groth *et al.* [9] berichteten, daß nach intraportaler Infusion isolierter Hepatozyten oder subkutaner Implantation von Hepatomazellen in hyperbilirubinämie Gunn-Ratten eine Reduktion des Serum-Bilirubinspiegels erzielt werden konnte.

Zu dieser Zeit jedoch waren Patienten bereits erfolgreich durch eine orthotope Lebertransplantation therapiert worden.[10] Die Indikation zur orthotopen Lebertransplantation deckte das breite Feld all jener Erkrankungen ab, die sich auch zu einer Domäne der Hepatozytentransplantation hätte entwickeln können. Bei einem akuten Leberversagen, bei einer fortgeschrittenen Leberzirrhose oder einer chronischen Lebererkrankung im Endstadium war nunmehr die orthotope Lebertransplantation Therapie der Wahl.[11]

Nahezu 20 Jahre ist es her, da legten Baumgardner *et al.* [12] in einem Übersichtsartikel die Gründe dar, warum die Hepatozytentransplantation als ein vielversprechendes Verfahren weiter zu verfolgen sei und sogar verstärkt Gegenstand der Forschung werden solle. Sie könne entweder als Therapie bestimmter genetisch bedingter Lebererkrankungen oder als Überbrückung zur orthotopen Lebertransplantation mit Vorteilen gegenüber alternativen Behandlungsmethoden angewandt werden. Er faßte die bis dahin erschienenen tierexperimentellen Studien zusammen, zeigte die bereits

überwundenen Hindernisse auf und kam zu der Überzeugung, daß die Hepatozytentransplantation eine realisierbare alternative Therapie von Lebererkrankungen bieten könnte, in denen die strukturelle Integrität der Leber noch besteht.

Seitdem sind die ersten Therapieversuche beim Menschen in der Literatur dokumentiert. So berichteten 1992 Mito *et al.* als erste über eine Hepatozytentransplantation beim Menschen.[13] In einem Editorial aus dem Jahre 2003 postulierten Strom und Fisher [14], daß Hepatozyten in der klinischen Anwendung portal oder in ektope Orte wie zum Beispiel in die Milz transplantiert, in der Lage sind, die Leberfunktion zu unterstützen, und als Alternative zur orthotopen Lebertransplantation bereits erfolgreich eingesetzt wurden.

Trotz der fortschreitenden Entwicklung und trotz der bestehenden Möglichkeiten und Erfolge beschränkt sich die Zahl der Applikationen im Menschen weltweit nur auf einige dutzend Fälle. Diese wurden von Fisher und Strom detailliert und tabellarisch 2006 in *Transplantation* zusammengefaßt.[15] Die Frage, warum das Potential dieser Behandlungsform in der klinischen Anwendung nicht ausgeschöpft wird, sei mit einem Zitat von Strom beantwortet: „... *mainly because the availability of [human] liver cells is limited.*“[14]

1.2 Durch Hepatozytentransplantation behandelbare Erkrankungen

Die Hepatozytentransplantation ist ein Therapiekonzept, mit dem lebensbedrohliche Leberfunktionsstörungen behandelt werden können. Das Prinzip besteht darin, vereinzelte Leberzellen oder leberzellähnliche Zellen in ein geeignetes Blutgefäß oder Körperorgan zu infundieren. Die so eingebrachten Zellen unterstützen Stoffwechselleistungen der Leber oder ersetzen gar fehlerhafte Genprodukte oder Stoffwechselwege.

Als Indikationen zur Anwendung der Hepatozytentransplantation werden im allgemeinen erachtet [16]:

- das akute Leberversagen,
- die chronische Leberinsuffizienz im Endstadium,
- progrediente, genetisch bedingte metabolische Lebererkrankungen und
- die postoperative hepatische Insuffizienz nach Leberteilresektion.

So unterschiedlich die Entitäten und Ursachen sein mögen, und so verschieden die Verläufe sich verhalten, ist ihnen ein Spektrum von klinischen, biochemischen und physiologischen Veränderungen gemeinsam, die durch einen Einbruch der synthetischen, regulatorischen und detoxifizierenden Funktion der Leber charakterisiert ist.[17]

Zu den typischen Komplikationen einer dekompensierten Leberinsuffizienz zählen [18]: (1) Ausbildung von Aszites und Ödemen mit Auswirkung auf das Herzkreislaufsystem, (2) Entwicklung einer ausgeprägten Koagulopathie mit der Gefahr von Blutungen, (3) Zunahme einer hepatischen Enzephalopathie bis zum hepatischen Koma, (4) hepatorenales Syndrom bis zum akuten Nierenversagen, (5) hepatopulmonales Syndrom bis zur globalen respiratorischen Insuffizienz, (6) Ausbildung ösophagealer Varizen aufgrund eines portalen Hypertonus und (7) Infektion des Aszites als spontan bakterielle Peritonitis.

Unter dem Auftreten mehrerer Komplikationen steigt das Risiko, daß sich ein Multiorganversagen ausbildet, welches unter einem konservativen Therapieregime mit einer hohen Mortalität assoziiert ist.[19]

1.2.1 Das akute Leberversagen

Das akute Leberversagen (ALF) ist ein schweres, rasch progredientes und oft tödlich verlaufendes Krankheitsbild, dem massive Leberzellschädigung oder -nekrosen zugrunde liegen. Innerhalb weniger Tage oder Wochen nach Auftreten eines Ikterus setzt die hepatische Enzephalopathie bei zuvor lebergesunden Personen ein.[20] In der Folge kommt es zu Störungen im Säure-Basen-Haushalt, der Nierenfunktion, sämtlicher Organsysteme bis hin zu hyperdynamen Kreislaufversagen, Sepsis und der lebensbedrohenden Hirndrucksteigerung mit Gefahr einer Einklemmung des Hirnstamms.[21] Die Letalität des akuten Leberversagens beträgt in Abhängigkeit der Ätiologie etwa 20 bis 80%.

Neben der von O'Grady vorgeschlagenen Einteilung des Leberversagens entsprechend des zeitlichen Verlaufs in hyperakut, akut und subakut [21] wurde von Lee eine Einteilung nach der Ätiologie erarbeitet.[22] Danach sind virale Hepatitiden weltweit die häufigste Ursache, gefolgt von medikamenteninduziertem Leberversagen, wobei jedoch große regionale Unterschiede festzustellen sind. So ist zum Beispiel die Acetaminophenvergiftung mit suizidaler Absicht in Großbritannien der häufigste Auslöser, wohingegen sie in anderen Ländern eine untergeordnete Rolle spielt.[23]

1.2.2 Die chronische Leberinsuffizienz im Endstadium

Begründet sich die Entwicklung einer Leberinsuffizienz auf die Progression einer lang vorbestehenden Lebererkrankung, bezeichnet man dies als chronische Leberinsuffizienz (CLI). Im allgemeinen besteht bereits eine fortgeschrittene Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie.[18, 24] Bei einer Dekompensation wird die Leber mit den an sie gestellten Anforderungen überfordert. Unbehandelt mündet sie unweigerlich in das hepatische Koma und in ein Multiorganversagen, was schließlich zum Tode führt. Ist

diese Entwicklung mit einem raschen Einbruch der Leberfunktion verbunden, also mit Zeichen eines akuten Leberversagens, das sich der chronischen Leberinsuffizienz aufpfropft, spricht man im englischen Sprachraum treffend von einer *acute-on-chronic liver insufficiency*. [25] Sie nimmt einen ähnlichen Charakter an, wie das akute Leberversagen. Im Gegensatz dazu ist jedoch eine Lebererkrankung vorbestehend.

1.2.3 Genetisch bedingte metabolische Lebererkrankungen

Im weiten Feld der metabolischen Lebererkrankungen ist eine mögliche Indikationsstellung zur Hepatozytentransplantation differenziert zu betrachten. Durch Hepatozytentransplantation behandelbare metabolische Erkrankungen sind primäre metabolische, das heißt in den meisten Fällen durch genetische Mutation bedingte Lebererkrankungen.

Einteilen lassen sich die primären metabolischen Störungen in zwei Mechanismen: (1) Formation von atypischen Makromolekülen, die nicht abgebaut werden können und sich ablagern und (2) ausgeprägte oder totale Blockade eines metabolischen Stoffwechselweges mit der Folge, daß ein Produkt nicht ausreichend synthetisiert werden kann, wodurch Metabolite akkumulieren und abnormale Metabolite gebildet werden können. Die Symptome treten meist bereits nach den ersten Lebenswochen bis -monaten ein, gehen in vielen Fällen mit neurologischen Symptomen einher und haben nicht selten eine infauste Prognose.

Folgend sind primäre metabolische Störungen aufgeführt, für die eine Indikation zur Behandlung durch eine Hepatozytentransplantation möglich ist und zum Teil bereits durchgeführt wurde: (1) LDL-Rezeptormangel [26], (2) Ornithintranscarbamylase-Mangel [27], (3) α 1-Antitrypsin-Mangel [28], (7) Reye-Syndrom, (4) Glycogen-Speicher-Erkrankung Typ Ia [29], (5) Crigler-Najjar-Syndrom (Bilirubin-UDP-Glukuronyltransferase-Defekt) [30], (6) Infantile Refsum-Erkrankung [31], (8) Mauriac-Syndrom und (9) Wilson-Erkrankung.

1.2.4 Die postoperative Leberinsuffizienz

Neben den klassischen Definitionen des akuten Leberversagens ist mit einer chirurgisch induzierten Leberinsuffizienz nach erweiterter Leberteilektomie oder Splitlebertransplantation eine Entität zu ergänzen, die ähnlichen Charakter annehmen kann, wie bei einem hyperakuten oder akuten Leberversagen. [32] In dieser als postoperative hepatische Leberinsuffizienz (PHI) bezeichneten Komplikation kann das Restgewebe in seiner Funktion derart reduziert sein, daß eine Detoxifikation, Syntheseleistung und Regenerationsfähigkeit nicht ausreicht, um den Stoffwechselerfordernissen gerecht zu werden. [33]

Die konservative Therapie beschränkt sich auf die Substitution nachweislich fehlender Plasmabestandteile. Bei einer Dekompensation oder einer kompletten postoperativen Leberinsuffizienz bleibt auch hier die orthotope Lebertransplantation als ultimative Therapieoption bislang alternativlos.[34] Da allerdings bei metastasierenden Erkrankungen die orthotope Lebertransplantation grundsätzlich nicht indiziert ist und andererseits gerade Patienten mit einer malignen Raumforderung einen Großteil des Patientenguts zur Leberteilektomie ausmachen [35, 36, 37], bleiben nur wenige Fälle, in denen diese Therapieoption im Falle einer postoperativen Leberinsuffizienz wahrgenommen werden kann.

1.3 Hepatozytentransplantation als Therapieoption

Um die Überlebensrate der Patienten zu verbessern, die bei Vorliegen einer lebensbedrohlichen Leberinsuffizienz nicht einer orthotopen Lebertransplantation zugeführt werden können oder auf ein Transplantat warten müssen, wurden vier sich prinzipiell unterscheidende Methoden entwickelt, die Leberfunktion temporär zu unterstützen: (1) Artifizialen, zellfreien extrakorporalen Systemen wie Dialyse, Aktivkohlefilter oder Plasmaaustauscher, wird Blut oder Plasma des Patienten zugeführt, um unter Verwendung verschiedenster Verfahren bestimmte Metabolite im Körper des Patienten zu reduzieren. Diese Systeme werden eingesetzt, um lediglich die detoxifizierende Funktion der Leber zu unterstützen. Der Effekt ist in einzelnen Untersuchungen gezeigt, jedoch fehlen größere randomisierte Studien.[38, 39] (2) Die extrakorporale Perfusion ganzer Organe, durch die zusätzlich metabolische Funktionen geleistet werden, konnte sich klinisch bisher nicht durchsetzen.[39] (3) Mit der klinischen Erprobung hybrider Leberunterstützungsverfahren konnten Effekte der beiden zuvor genannten Methoden kombiniert werden. Erste klinische Anwendungen lieferten vielversprechende Ergebnisse, relativierten sich aber in späteren Studien.[40] (4) Mit der Hepatozytentransplantation sind erfolgreiche Ansätze tierexperimentell und bereits klinisch angewandt.[15, 41]

Durch das Einbringen isolierter Hepatozyten oder hepatozytenähnlicher Zellen kann temporär eine ausreichende Leberleistung erzielt werden, bis die volle Organfunktion in bezug auf Synthese und Entgiftung durch die regenerierende Restleber übernommen oder ein geeignetes Spenderorgan transplantiert wird. Neben einer überbrückenden Therapie sind kurative Ansätze vor allem bei genetischen Erkrankungen als kausale Therapie realistisch und in zahlreichen Fällen bereits dokumentiert.[15]

1.4 Hepatozytentransplantationsmodelle

1.4.1 Induktion eines Leberversagens

Methoden zur Induktion eines akuten Leberversagens im Tiermodell sind bei Mäusen [42, 43], Ratten [44, 45], Schweinen [46] und Hunden [47] beschrieben. Eine nahezu letale Schädigung wird erreicht durch Fütterung von Toxinen wie Tetrachlorkohlenstoff [43], Dimethylnitrosamine [45], oder D-galactosamine [48]. Nach Unterbindung von Lebergefäßen [46] tritt ein deutlicher ischämischer Schaden mit Leberzellnekrosen auf.

Durch eine subtotale Leberteileresektion im Rattenmodell kann eine gezielte gut reproduzierbare Schädigung erreicht werden. In den Untersuchungen von Eguchi *et al.* [49] werden nach Resektion der beiden großen Leberlappen und Ligatur der rechten Leberlappen nur eine geringe Variation des zurückbleibenden funktionellen Restgewebes beobachtet, die eine reliable, stabile Überlebenszeit bedingt. Diese Methode entspricht nahezu einer 90%igen Leberteileresektion.

Der Vorteil einer chirurgischen Methode ist das mit der Operation zeitgenaue Auftreten der Insuffizienz. Im Gegensatz zu toxischen Modellen kann die Hepatozytenimplantation ausreichend in zeitlicher Beziehung zur Leberschädigung gesetzt werden.

1.4.2 Geeignete Implantationsorte

In der Literatur sind mannigfach Implantationsorte im Tiermodell untersucht. Neben einer portal-venösen Implantation bieten sich ektope, das heißt außerhalb der Leber gelegene Implantationsorte an. Die Milz, die Niere oder der Peritonealraum zeigten die vielversprechendsten Ergebnisse. Diese seien im Einzelnen aufgeführt:

Nach einer portal-venösen Implantation gelangen die Zellen in eine ideale Umgebung in bezug auf die einzigartige Struktur der Leber und Interaktion mit den dort nicht-parenchymalen Zellen. Zudem erhält das portale Blut Wachstumsstimulanzen, von denen positive Effekte für die so eingebrachten Zellen zu erwarten sind.[50] Eine Einnistung über Sinusoide erfolgt erst zwanzig Stunden nach Transplantation, eine vollkommene Eingliederung in die Matrix mit Reparatur der sinusoidalen Barriere dauert etwa eine Woche.[51] Es besteht jedoch die Gefahr, daß ein nach Leberschädigung vorbestehender portaler Hypertonus weiter verstärkt wird.[52]

Darby *et al.* untersuchten das Verhalten tief in die Pulpa der Milz implantierter Hepatozyten.[53] Sie überleben in einem geeigneten Modell mehr als einundzwanzig Monate und bilden hepatisch-retikulär strukturiertes Gewebe aus.[54] Nach einer Leberschädigung erhalten auch die in die Milz implantierten Hepatozyten eine Wachstumsstimulation.[55]

Die Niere als Implantationsort wurde von Ohashi *et al.* [56] beschrieben. Jedoch waren die Resultate insgesamt nicht befriedigend.[57] Erst nach zusätzlicher Injektion von nicht-parenchymalen Zellen konnten verbesserte Ergebnisse erzielt werden.

Die intraperitoneale Implantation ist mit eher enttäuschenden Ergebnissen versucht worden.[58] Nach Implantation auf sogenannten *scaffolds* (Trägermaterialien) war jedoch ein Überlebensvorteil im Rattenmodell zu zeigen gewesen.[59]

Als selten angewandte Implantationsorte sind zu nennen: subkutan [60], pulmonal [61], in das intraskapuläre Fettpolster sowie in das Pankreas. Hier sind die Ergebnisse eher schlecht ausgefallen. Ein Überleben implantierter Zellen war nur in geringem Ausmaß oder unter Zuhilfenahme aufwendiger Methoden möglich.[62]

1.4.3 Implantationszeitpunkt, -sequenz und Zellzahl

Angelehnt an klinische Gegebenheiten scheint eine Implantation von einigen Stunden bis Tagen nach einer Leberschädigung realitätsnah zu sein. Alternativ könnte die Implantation jedoch bereits zum Zeitpunkt einer Leberschädigung oder gar vor ihr vorteilhaft sein. Eine weitere Option ist eine sequentielle Implantation, das heißt, daß mehrere Implantationen in Folge durchgeführt werden.

Die Antwort auf die ideale Zellzahl ist direkt an das angewandte Tiermodell und an den Implantationsort gebunden. Im Falle einer intraperitonealen Implantation ist der Rahmen für die Variation der Zellzahl aufgrund des großen Raumes der Bauchhöhle breiter, als zum Beispiel im Falle der Injektion in das subskapuläre Fettgewebe.

In einem Modell der metabolischen Störung bedarf es häufig nur einer geringen Zahl der zu implantierenden Zellen, um ein vorher fehlendes Genprodukt ersetzen zu können.

In Überlebensmodellen wird eine weit größere Zellzahl benötigt, um die Leberfunktion in ihrer Gesamtheit zu unterstützen. Im Rattenmodell sind Zellzahlen von 10×10^6 [58] über 200×10^6 [44, 63] implantierter Zellen beschrieben. Die angewandte Zellzahl der meisten Autoren bewegt sich bei $20\text{--}50 \times 10^6$ Zellen.[59, 64]

1.5 Fragestellung

Mit dieser Arbeit wird die Wirksamkeit einer Leberzelltransplantation nach einer subletalen Leberschädigung im Modell der Ratte analysiert, indem Implantationsort, -zeitpunkt und Zellzahl variiert werden. Zur Induktion einer akuten Leberinsuffizienz eignet sich eine subtotale Leberteileresektion.

Vorrangig ist die Frage nach dem geeigneten Implantationsort zu beantworten. Als Prämisse ist eine gute Erreichbarkeit und ein Lokus für ausreichende Injektatvolumina voranzustellen. Nach Eröffnen des Abdomens ist das Peritoneum sicher und komplikationslos zu erreichen. Die Implantation direkt unter die Serosa des Peritoneums ist in der Literatur nicht beschrieben und wird hier evaluiert. Als Alternative bietet sich die lienale Applikationsform an, also eine Implantation in die Milz, wie sie bereits bei anderen Leberschädigungsmustern in Studien untersucht ist.[64] Wenn sich ein Überlebensvorteil nach Zellimplantation abzeichnet, ist in einem zweiten Schritt die Zellzahl zu variieren, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen.

Zusammengefaßt lassen sich die zu beantwortenden Fragen wie folgt formulieren:

- Kann die subperitoneale Implantation von Hepatozyten das Überleben nach subtotaler Leberteileresektion positiv beeinflussen?
- Ist die lienale Implantation der subperitonealen Implantation in bezug auf postoperatives Überleben überlegen?
- Wann ist der beste Zeitpunkt zur Hepatozytentransplantation gegeben?
- Welche ist die optimale zu transplantierende Zellzahl?