

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Für die Versuchreihen wie auch für die Isolation der Hepatozyten oder der mononukleären Zellen aus der Milz wurden Wistarratten verwandt. Die Tiere wurden in der Gewichtsklasse 220–250 g bestellt und etwa eine Woche vor Versuchsbeginn geliefert.¹ Bei Anlieferung wurden die Tiere untersucht und bis zu Beginn der Versuche in den Stallungen der Charité Campus Virchow Klinikum bei einem 24 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in geeigneten Käfigen artgerecht gehalten.

Zu jeder Zeit, vor wie nach dem Versuch, wurden sie mit ausreichend Futter und Trinkwasser versorgt. Nach den Leberteilresektionen wurde zum Trinkwasser zusätzlich eine 5%ige Glucoselösung für die Dauer des Beobachtungszeitraumes *ad libidum* angeboten. Nach operativer Traumatisierung wurde auf eine ausreichende Schmerzmedikation geachtet. Nach den Eingriffen wurden die Tiere wieder in die Stallungen zurückgebracht und dort versorgt.

Die Versuche sind gemäß den Bestimmungen nach §8 Abs. 1 TierSchG von der Tierversuchskommission geprüft, und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Projekt-Nr. G0032/05 genehmigt worden.

2.2 Definition anatomischer Strukturen

In der Literatur werden unterschiedliche Begriffe für anatomische Strukturen der Ratte verwandt. Daher soll an dieser Stelle eine einheitliche Terminologie festgelegt werden: Die Rattenleber besteht aus mehreren deutlich voneinander abgrenzbaren Leberlappen (Abbildung 2.1). Die beiden großen zusammen zirka 70% des Lebervolumens messenden Leberlappen sind der mittlere (ML) und der linke Leberlappen (LL). Nach dem Anheben und Verlagern der großen Leberlappen kommen rechts ein nach unten spitz zulaufender, der Cava anliegender Leberlappen sowie ein ebenfalls mit flächigem Kontakt rechts zur Cava liegender halbrunder Leberlappen zum Vorschein. Der erstere wird vorderer rechter, der zweite hinterer rechter Leberlappen benannt (vRL und hRL). Sie messen jeweils ungefähr 10% des Gesamtlebervolumens. Links der Cava liegen, den Magen umschließend, zwei weitere kleinere, sich sehr ähnliche, je knapp

¹Die Tiere wurden bezogen über die Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland.

2 Material und Methoden

5% messende, sogenannte omentale Leberlappen – der obere (oOL) und der untere omentale Leberlappen (uOL). Mit der Gewebebrücke zwischen diesen beiden kleinen Lappen messen sie ziemlich genau 10% des Gesamtlebervolumens.

Die Milz befindet sich leicht verschieblich und luxierbar in der hinteren linken Loge. Durch die am Hilus und am hinteren Pol gelegenen Gefäße wird sie zusammen mit einer Art peritonealem Meso an ihrer Stelle gehalten. Der venöse Abfluß erfolgt über mehrere im Milzhilus befindliche, teils in das Pankreas ziehende Gefäße, die in die Pfortader münden. Diese teilt sich im Leberhilus auf und zieht zusammen mit den Leberarterien entlang der Gallenwege in die einzelnen Lappen, wo sie als gemeinsame Strukturen weiter aufzweigen.

In dieser Arbeit wird lienal synonymal zu „in die Milz“ verwendet. Als subperitoneal wird die Schicht knapp unter der Serosa des parietalen Peritoneums bezeichnet.

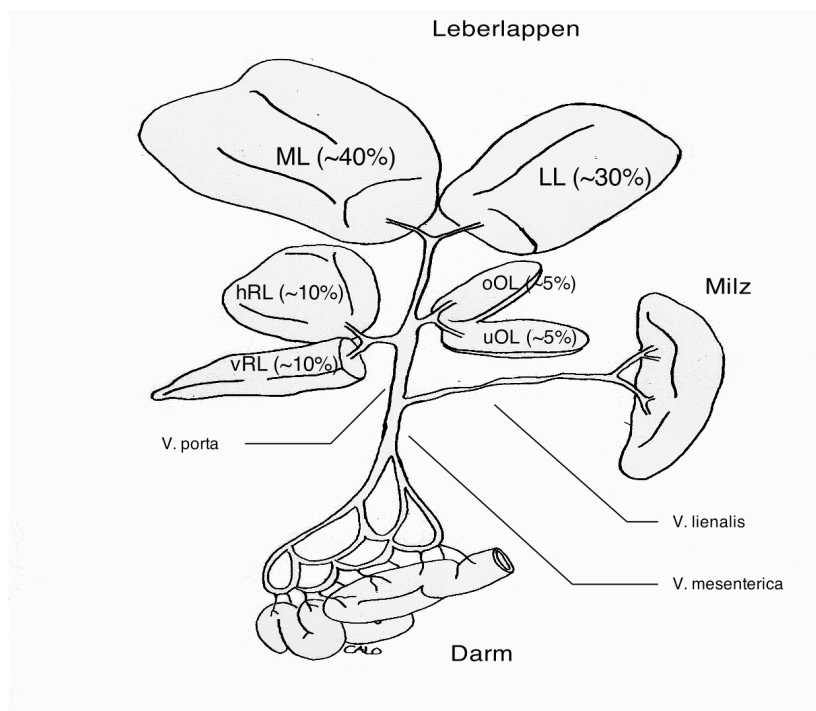


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Anatomie der Rattenleber mit portalen Zufüssen und Volumenanteilen der Leberlappen.

2.3 Operationsvorbereitung und Narkose

Zur Vorbereitung einer Operation werden die Tiere in den Operationsraum gebracht, inspiziert, gewogen und der Grad der Enzephalopathie anhand des Enzephalopathiescores, wie in Tabelle 2.1 auf Seite 25 aufgeführt, eingeschätzt. Der initiale Enzephalopathiescore sollte die volle Punktzahl von 5 nicht unterschreiten. Andernfalls wird dies als Ausschlußkriterium gewertet. Ebenfalls werden Tiere, die offensichtlich nicht gesund sind, zur Operation nicht herangezogen.



Abbildung 2.2: Operationsplatz mit Operationstisch, festinstalliertem Mikroskop, mikrochirurgischem Instrumentarium und Narkoseeinheit.

Die Narkose wird in einem speziell angefertigten nahezu luftdicht verschließbaren durchsichtigen Hohlzylinder eingeleitet. Ein Gasgemisch von Isofluran², Sauerstoff und Lachgas³ in fixen Anteilen wird nach Verschuß des Zylinders zugeführt. Bei ausreichend tiefer Narkotisierung wird das Tier aus dem Zylinder genommen und an den Stellen der geplanten Laparotomie großzügig mit einem speziellen Langhaarschneider geschoren sowie umgehend auf dem Operationstisch wieder an die Narkosemaske angelegt. Auch dort wird durch das Schlauchsystem der Maske ein Narkosegasgemisch aus Isofluran, Sauerstoff und Lachgas über eine Narkoseeinheit⁴ dem Tier zugeführt und so die Narkose aufrecht erhalten. Ein zweiter, die Narkosemaske umschließender Halbzyylinder ist an das Vakuumsystem der Wandleitungen angeschlossen und dient der Absaugung der Ausatemluft sowie entweichender Gase. Durch Bändchen um die

²1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether, Fa. Baxter, Deutschland.

³Distickstoffdioxid (N₂O₂).

⁴Sulla 808, Fa. Dräger, Deutschland.

Extremitäten wird das Tier in der gewünschten Lage atraumatisch fixiert, das Instrumentarium und die Operationsmaterialien werden zurechtgelegt. Der Eingriff wird begonnen.

Das Gemisch des Narkosegases wird über die Narkoseeinheit so eingestellt, daß eine ausreichende Tiefe der Narkose während der Operation gewährleistet ist. Intraoperativ muß, kontrollierbar über die Atem- und Pulsfrequenz des Tieres, das Gasgemischverhältnis reguliert werden, wobei eine inadäquate Erhöhung der Atem- und Pulsfrequenz als Zeichen der nicht ausreichenden Tiefe und eine erniedrigte Atem- und Pulsfrequenz als eine zu tiefe Narkose zu werten ist.

Nach einer subtotalen Leberteilresektion ist der Narkosegasverbrauch erfahrungsgemäß um mindestens die Hälfte niedriger, so daß nach Entfernen oder einer Ligatur der Leberlappen die Beimischung von Isofluran und Lachgas zeitnah zur Resektion der Leberlappen entsprechend herunterreguliert werden muß.

Nach Beendigung der Operation wird auch die Narkose beendet. Das Tier wird von der Narkosemaske genommen und vorsichtig in einen Einzelkäfig gelegt und bis zum vollständigen Erwachen mit einer Wärmelampe in genügendem Abstand bestrahlt. Zur initialen Schmerzmedikation wird im Bereich der Hüfte noch während der Nachwirkung der Narkose subkutan am Schenkel der unteren Extremität ein Depot mit Tramadol⁵ 20 mg/kg Körpergewicht gesetzt. Die postoperative Schmerzmedikation wird durch verdünntes Metamizol⁶ ins Trinkwasser gegeben. Zur Vermeidung einer postoperativen Hypoglykämie nach der subtotalen Leberteilresektion wird dem erwachenden Tier sogleich eine gesättigte Dextroselösung⁷ gereicht, welche es am Operationstag neben Wasser und üblichem Futter *ad libidum* zu sich nehmen kann. Nachdem ein ausreichender Wachheitsgrad erreicht ist, wird es in die Stallungen zurückgebracht.

2.4 Operative Technik und subtotale Leberteilresektion

Die operativen Eingriffe werden, wenn auch nicht unter sterilen, doch aber unter sauberen Kautelen vollzogen. Das Instrumentarium wird vor jeder Operation gewaschen und desinfiziert, ebenso werden die Ablage und die Operationsfläche vor jeder Operation gesäubert und neu bespannt. Die rasierte Hautfläche der Tiere wird vor der Operation mit Händedesinfektionsmittel mechanisch gereinigt.

Bei der Operation werden hauptsächlich spezielle für die Mikrochirurgie entwickelte Instrumente⁸ verwendet, wie mikrochirurgische Schere, Pinzetten und Klemmen. Bei

⁵Tramal[®], Fa. Grünenthal, Deutschland.

⁶Novaminsulfon[®], Fa. Winthrop, Deutschland.

⁷DextroPur[®], Fa. Dextro Energy, Deutschland.

⁸Fa. Aesculap, Deutschland und Fa. Martin, Deutschland

Operationsschritten, die ein sehr genaues Arbeiten mit kleinen Strukturen erfordern, wird das am Arbeitsplatz festinstallierte Mikroskop⁹ mit Lichtquelle eingesetzt.

Die Eröffnung des Abdomens geschieht durch eine mediane Laparotomie. Das Tier wird auf dem Rücken liegend an den Extremitäten auf der Unterlage fixiert. Wenn eine ausreichende Narkosetiefe hergestellt ist, wird nach einem Hautschnitt unterhalb des Nabels die Haut über das gesamte Abdomen median mittels der Schere vorerst unterminiert und sodann bis auf das Xyphoid aufgeschnitten. Nach Identifizierung der *Linea alba* wird durch selbige mit einem kleinen Schnitt das Abdomen eröffnet und unter Sicht der Schnitt nach oben bis zum Xyphoid erweitert. Das Xyphoid wird mit einer Klemme gefaßt und kopfwärts fixiert, so daß die Oberbauchregion gut exponiert und einsehbar ist. Mittels an den Wundrändern eingesetzten Backhausklemmen wird das Abdomen offen gehalten. Es folgt obligat eine Exploration. Auffälligkeiten, wie Tumor, Verwachsungen oder Herniationen werden registriert und führen gegebenenfalls zum Ausschluß.

Für die meisten Präparationsschritte werden neben der Schere Wattetupfer genutzt, um Gewebeschichten durch scherende Bewegung voneinander zu trennen. Teilweise wird auch mit spitzen Pinzetten präpariert, indem das Gewebe auseinandergezogen wird. Wenn Gewebe nur gehalten werden soll, werden die Tupfer angefeuchtet oder die Strukturen werden mittels einer feuchten Kompresse im Abdomen in einer günstigen Lage beschwert, um das Operationsgebiet freizuhalten.

Zur subtotalen Leberteilresektion werden vorerst die Gefäße im Hilusbereich der Leber, die zu den beiden rechten Leberlappen führen (rechter Pfortaderast und rechter Leberarterienast) sowie der rechte Gallengang mit einem dünnen Seidenfaden¹⁰ gemeinsam ligiert (Abbildung 2.3-A). Die beiden Lappen (hRL und vRL) nehmen kurz darauf eine dunkle Farbe an. Eine Resektion dieser Leberlappen erfolgt nicht.

Anschließend werden die zu resezierenden großen Leberlappen (ML und LL) durch scharfes Durchtrennen der Ligamente von den umliegenden Strukturen gelöst und mit einer Ligatur durch einen geflochtenen Faden der Stärke 4-0¹¹ gemeinsam umschlungen und abgebunden (Abbildung 2.3-B). Mit der Schere wird das Lebergewebe nahe der Unterbindung durchtrennt. Das Resektat wird gewogen. Damit ist die subtotale Leberteilresektion vollzogen (Abbildung 2.3-C).

Vor dem Verschuß des Abdomens wird mit 0,9%iger Kochsalzlösung das Abdomen lavagiert und mit einer Kompresse ausgetupft. Die zum Offenhalten des Abdomens angebrachten Klemmen werden gelöst. Das Abdomen wird mit einem geflochtenen Faden der Stärke 4-0 durch eine fortlaufende Naht zweireihig verschlossen – zunächst die

⁹M690, Fa. Leica, USA.

¹⁰Seide „E“, geflochten, Fa. Resorba, Deutschland.

¹¹Vicryl[®], Fa. Ethicon, Deutschland.

2 Material und Methoden

muskuläre Schicht, dann die Haut. Daraufhin ist die Operation beendet und das Tier wird von der Narkosemaske entfernt, womit auch die Narkose beendet ist. Nach einem Ersteingriff wird eine Markierung am Schwanz des Tieres mit einem wasserfesten Markerstift angebracht, so daß es eindeutig zu identifizieren ist.

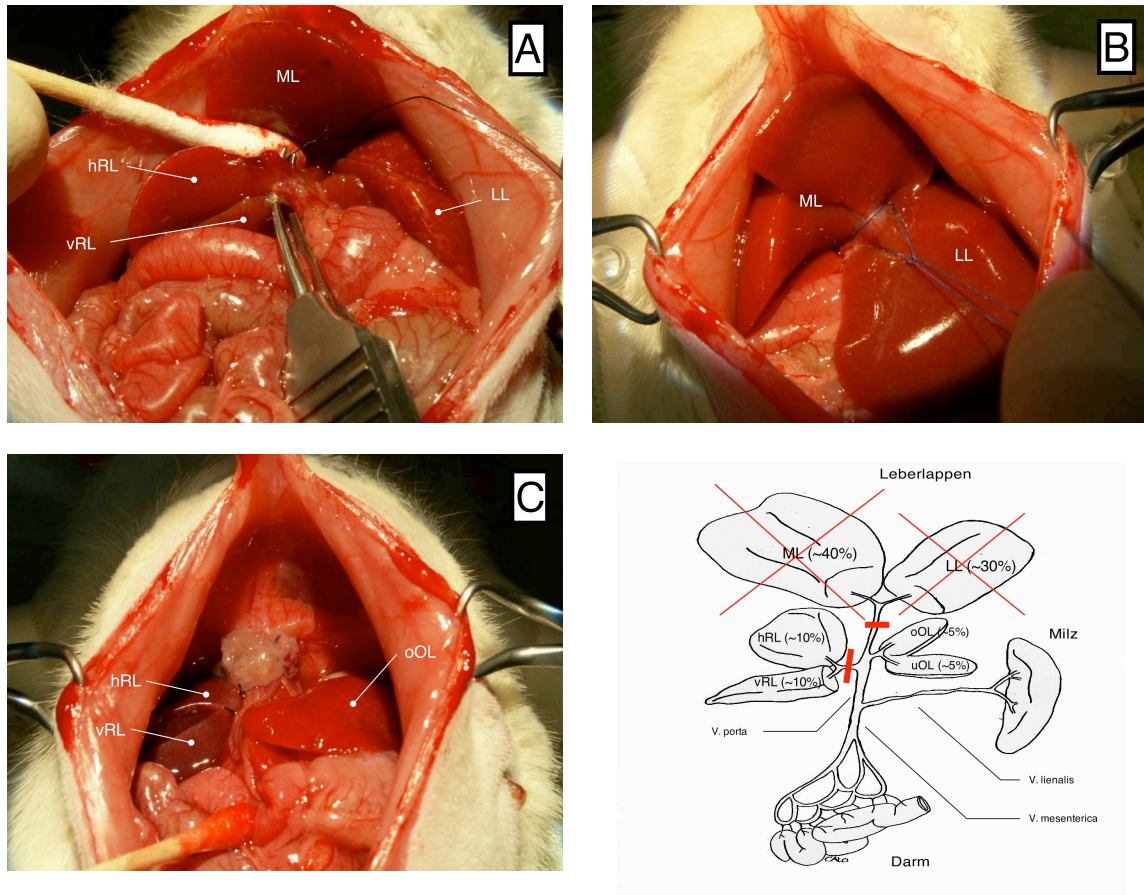


Abbildung 2.3: Die Pinzette hat die nach rechts verlaufenden hilären Strukturen aufgeladen und greift den Seidenfaden zur Unterbindung (A). Schließlich werden die großen Leberlappen ligiert und reseziert (B). Situation nach der subtotalen Leberteilektomie (C).

2.5 Isolation primärer Hepatozyten

2.5.1 Explantation der Leber

Nach der Narkoseeinleitung sowie medianer und zusätzlich quer erweiterter Laparotomie werden alle nicht GefäÙe tragenden Ligamente zwischen den Leberlappen und den umliegenden Strukturen, soweit durch Verlagerung der Leberlappen erreichbar, durchtrennt. Anschließend werden die hilären Strukturen identifiziert und von Fett und Pankreasgewebe befreit. Die Pfortader, beziehungsweise *Vena mesenterica* wird so weit als möglich leberentfernt freipräpariert und mit zwei geflochtenen Fäden der Stärke 5-0 zweifach umschlungen, wobei jeweils ein Knoten vorgelegt wird.

Mit einer dünnen Injektionsnadel von 20 Gauge werden 300 IE Heparin¹² auf 0,3 ml 0,9%ige Kochsalzlösung verdünnt mittels einer 1 ml-Spritze in die subhepatische *Vena cava* appliziert.

Vor der Kanülierung der Pfortader wird eine mit kalter PBS-Lösung¹³ gefüllte Infusionsflasche mit entlüftetem Infusionssystem erhöht aufgehangen. Nun wird die Pfortader mit einer Kocherklemme abgeklemmt und die Klemme so abgelegt, daß das Gefäß unter Spannung aus dem Situs ragt und für eine Kanülierung gut zugänglich ist. Mit einer Venenverweilkanüle¹⁴ von 16 Gauge wird die geklemmte Pfortader weit distal der Leber punktiert und mittels den vorgelegten Knoten fixiert. Das Infusionssystem wird nach Entfernen der Nadel aus dem Mandrain an die Venenverweilkanüle angeschlossen. Der Durchflußregler an der Infusionsleitung wird langsam geöffnet, so daß die Leber mit stetig langsamen Fluß über die Pfortader perfundiert wird. Die subhepatische *Vena cava* wird scharf durchtrennt, um den übermäßigen Druck im Kreislaufsystem, der durch die zugeführte Perfusionslösung entsteht, in den freien Bauchraum zu entlasten.

Während der ungehinderten Perfusion der Leber mit der kalten PBS-Lösung werden die übrigen hilären Strukturen von dem umliegenden Gewebe gelöst. Nun wird mit Zeige- und Mittelfinger die suprahepatische *Vena cava* flankierend die Leber aus dem Situs luxiert und die obere *Vena cava* durchgeschnitten. Mit den Fingern wird weiter nachgegriffen und die noch im Situs haltenden ligamentären Strukturen ohne Verletzung des Parenchyms mit der Schere derart durchtrennt, daß sich die Leber immer weiter nach außen ziehen läßt und schließlich als Ganzes an der fixierten Kanüle noch unter Perfusion aus dem Situs herausheben läßt und in einen ebenfalls mit kalter PBS-Lösung gefüllten sterilen Urinbecher getaucht werden kann. Direkt im Anschluß folgt die Zellisolation.

¹²Liquemin®, Fa. Roche, Schweiz.

¹³Phosphat-gepufferte Salzlösung, Fa. LifeTech, Deutschland.

¹⁴Braunüle®, Fa. Braun, Deutschland.

2.5.2 Kollagenaseperfusionstechnik

Die Hepatozyten werden angelehnt an ein standardisiertes Verfahren nach Dorko *et al.* [65] isoliert. Die an der Kanüle aufgehängte Leber wird an ein speziell angefertigtes bereits vorgefülltes Silikonschlauchsystem¹⁵, welches in eine Rollerpumpe¹⁶ eingelegt ist, angeschlossen (Abbildung 2.4).

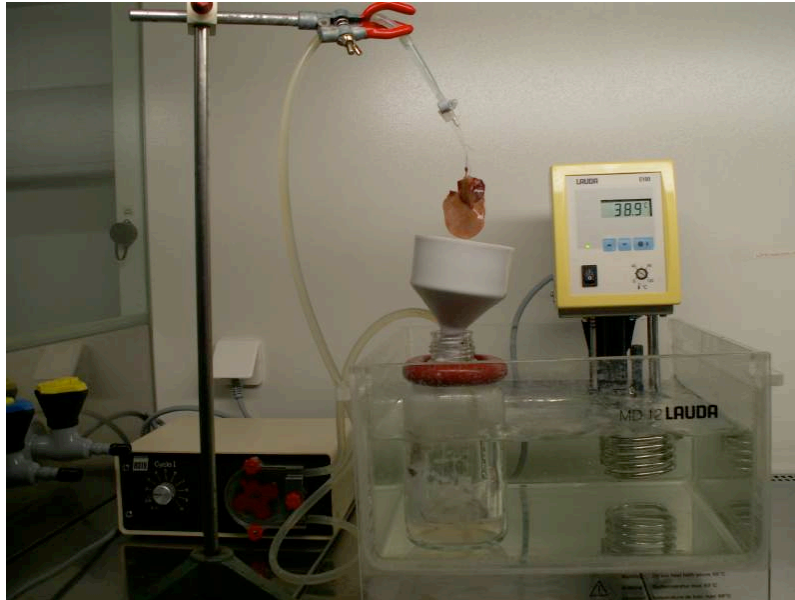


Abbildung 2.4: Apparatur zur Isolation der Hepatozyten mit Rollerpumpe, Wasserbad, Silikonschläuchen, Buchnersieb und Wärmepumpe. Die Leber ist zur Perfusion an der kanülierten Pfortader aufgehängt.

Die Zellisolation wird in folgenden Schritten vollzogen. (1) Vorerst wird die Leber mit 300 ml Perfusionslösung I¹⁷ über die Rollerpumpe perfundiert, so daß die Gefäße ausgewaschen werden. (2) Anschließend werden 100 ml auf 37°C vorgewärmte Perfusionslösung II¹⁸ mit 20 µg Kollagenase¹⁹ 18 min zirkulierend perfundiert. (3) Die Leber wird in einer mit Nährmedium gefüllten Kulturschale mittels eines Plastikspatels, ohne zu starke Scherkräfte auszuüben, ausgestrichen und über eine sterile Gaze gefiltert. Bei einem guten Perfusionsergebnis bleibt nur der Gefäßbaum zurück. (4) Die so gewonnene Zellsuspension wird durch Zentrifugation²⁰ mit PBS bei $50 \times g_e$ ²¹, 5 min,

¹⁵Tygon, S-50 HL.

¹⁶Fa. Roth, Deutschland.

¹⁷Die Zusammensetzung der Lösung ist bei Dorko *et al.* [65] als *perfusion solution I* beschrieben; Die Reagenzien wurden von Fa. Merck und Fa. Sigma, beide Deutschland, bezogen.

¹⁸Ebenfalls bei Dorko *et al.* [65] als *perfusion solution II* beschrieben.

¹⁹Collagenase P[®], Fa. Roche, Schweiz.

²⁰Varifuge[®], Fa. Heraeus Instruments, USA.

²¹ $g_e = 9,81 \frac{m}{s^2}$, Erdbeschleunigung.

4°C zweimal gewaschen. Die Zellen werden gezählt und die Viabilität²² mittels der Trypan-Blau-Methode [66] in der Neubauer-Zählkammer [67] festgestellt.

Liegt die Viabilität unterhalb 90% schließt sich eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation²³ bei $200\times g_e$, 20 min, 4°C an. Alle Angaben der Zellzahl in den aufgeführten Versuchen beziehen sich auf lebende (viable) Zellen.

Nach Einstellung auf die gewünschte Zellzahl pro 0,7 ml PBS wird das Suspensat mit je 0,7 ml auf 1 ml-Spritzen verteilt und bis zur Implantation auf Eis gekühlt. Die Vorbereitungen für die Implantation laufen parallel, so daß ohne Verzögerung die Zellen implantiert werden können.

2.6 Gewinnung mononukleärer Zellen

Nach der Narkoseeinleitung und medianer Laparotomie wird mit Wattetupfern die Milz aus der Milzloge luxiert, zwischen Daumen und Zeigefinger gefaßt und derart aus dem Situs gezogen, daß die Gefäße entlang des Milzhilus frei vom angrenzenden Pankreas durchtrennt werden können. Die somit exstirpierte Milz wird in eine mit PBS gefüllte Kulturschale gelegt. Das Tier wird anschließend exsanguiniert.

Nachdem das Milzgewebe mittels Skalpell im RPMI-Medium²⁴ zerkleinert wurde, wird es mit dem Kolben einer Einwegspritze mit leicht drehenden Bewegungen vorsichtig zerdrückt. Dieses in dem Medium vereinzelte Gewebe wird nun durch einen Cell Strainer 70 µm gefiltert und bei $100\times g_e$, 5 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 10 ml RPMI aufgenommen und gut durchmengt. Es folgt die Lyse der Erythrozyten, indem 20 ml destilliertes Wasser zugegeben und gut durchmischt wird. Nach exakt 10 sec wird mit RPMI-Medium aufgefüllt und somit die Lyse gestoppt. Es folgt erneut eine Zentrifugation bei $100\times g_e$, 5 min, 4°C. Das Pellet wird mit circa 30 ml für den Zelltransfer mit PBS gewaschen. Falls danach das Pellet noch rot tingiert ist, muß die Lyse wiederholt werden.

Die Zellzählung erfolgt mit der Trypan-Blau-Methode in der Neubauer-Zählkammer. Die Suspension wird auf die gewünschte Zellzahl pro 0,7 ml PBS eingestellt und bis zur Injektion auf Eis gekühlt.

2.7 Subperitoneale Implantation

Im Falle einer subperitonealen Implantation werden nach medianer Eröffnung des Abdomens an geeigneten Stellen Depots des Injektates knapp unter die Serosa des pari-

²²Definiert als prozentualer Anteil lebender Zellen der Gesamtzellzahl.

²³1:10 verdünnte Percoll-Lösung, Fa. Pharmacia Biotech, Schweden.

²⁴RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium), ein Hydrogencarbonat-Puffersystem.

entalen Peritoneums gesetzt. Hierzu wird der 1 ml-Spritze mit dem Zellsuspensat eine Nadel der Größe 20 Gauge aufgesetzt, die nach dem Einstich über eine ausreichende Strecke unterhalb des Peritoneums geführt wird. Dann wird ein Depot mit etwa einem Viertel des aufgezogenen Volumens von 0,7 ml appliziert. Dies wird dreimal an geeigneten Stellen entlang der vorderen Bauchwand wiederholt, so daß das Injektatvolumen gleichmäßig verteilt ist (Abbildung 2.5).

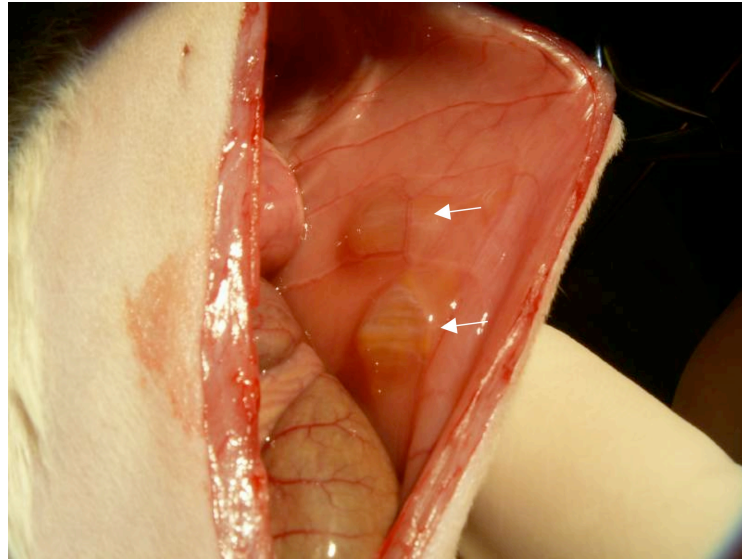


Abbildung 2.5: Situation nach subperitonealer Depotsetzung der Zellsuspension.

Eine Leckage ist nach dem Zurückziehen der Injektionsnadel nicht zu befürchten, da durch die Tunnelung das Gewebe den Stichkanal verschlossen hält.

2.8 Lienale Implantation

Bei einzeitigem Vorgehen schließt sich der subtotalen Leberteilektomie die Implantation in die Milz an. Bei zweizeitigem Vorgehen findet die lienale Implantation zeitlich getrennt von der Resektion in einer eigenständigen Operation statt.

Gezielter und geringer traumatisch kann somit für die alleinige Milzimplantation (zweizeitiges Vorgehen) ein Zugang, der direkt über der Milz gelegen ist, gewählt werden. Die Tiere werden hierfür nach Narkoseeinleitung seitlich gelagert, und das Abdomen durch einen Rippenbogenrandschnitt knapp unterhalb des Rippenbogens links eröffnet. Die Operationswunde wird mit einer geschlitzten feuchten Kompresse bedeckt und durch Backhausklemmen offen gehalten.

In beiden Fällen wird die Milz mit feuchten Tupfern vorsichtig aus dem Situs luxiert. Angepaßt an die Gefäßversorgung wird eine Ligatur auf den vorderen Milzpol gesetzt,

ohne Milzgewebe einzuschneiden und ohne Pankreasgewebe zu verletzen. Der hintere Pol wird mit einem starken geflochtenen Faden der Stärke 0-2 umschlungen. Die Milz wird über die auf der Unterlage eingesteckte Haltevorrichtung an der Ligatur und an dem umschlungenen Faden so aufgehängt, daß sie eine gerade Achse bildet und die Gefäßarkaden frei von Pankreasgewebe erreichbar sind (Abbildung 2.6-A).

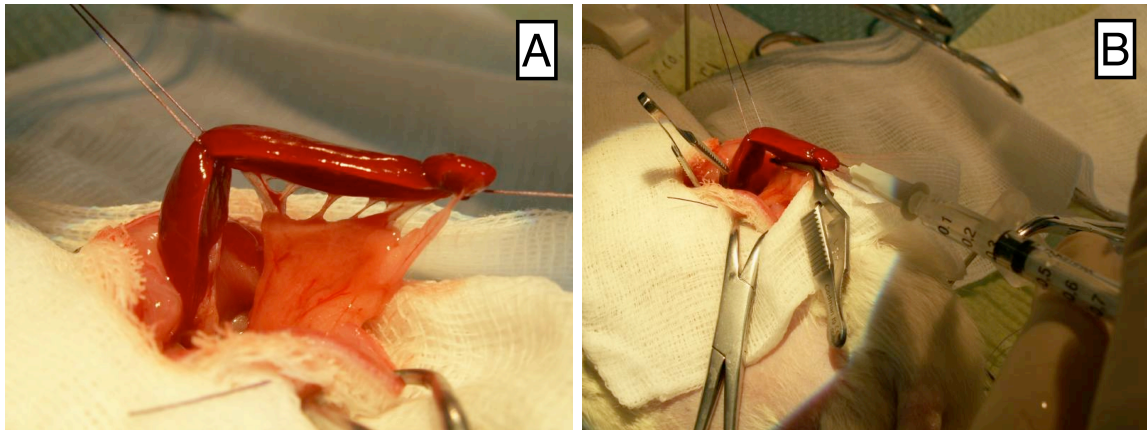


Abbildung 2.6: Freihängende Milz mit Ligatur am vorderen Pol und Schlinge am hinteren Pol kurz vor der Implantation (A) und während der Injektion mit geklemmten hilären Gefäßen (B).

Daraufhin werden zu- und abführende Gefäße der Milz mit passenden mikrochirurgischen Klemmen temporär verschlossen. Die ausgerichtete Achse wird nun genutzt, um mit der auf die Injektionsspritze gesetzten 20 Gauge Nadel am vorderen Pol einzustoßen und durch die Ligatur hindurch die Milz in ihrer nahezu gesamten Achse zu durchdringen (Abbildung 2.6-B). Dies muß gelingen, ohne die Oberfläche der Milz zu durchstechen, da sonst eine Blutung und Leckage der Zellen droht. Schließlich wird unter langsamen Zurückziehen der Nadel das Injektat über den gesamten Stichkanal gleichmäßig verteilt abgegeben. Dabei balloniert sich die Milz auf, die Oberfläche wirkt gespannt.

Nach dem Herausziehen der Nadel kommt bei ausreichend fest gesetzter Ligatur die Blutung aus der Einstichstelle nach wenigen Sekunden zum Stehen. Eventuell ist ein leichter Druck mit einem Tupfer auf die Einstichstelle notwendig. Die Klemmung der Gefäße im Milzhilus bleibt für weitere 5 min gesetzt, mit der Vorstellung eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Nach dem Lösen der Klemmen entstaut sich die Milz. Die Milz wird aus ihrer Aufhängung gelöst, die hintere Umschlingung wird entfernt, die Fäden der Ligatur gekürzt und die Milz gleitet in den Situs zurück.

2.9 Beobachtungszeit und Nachbetreuung

Der zeitliche Nullpunkt des Versuchs ist die Operation zur subtotalen Leberteilresektion. Der Tag der Resektion wird folglich als Tag 0 bezeichnet. Die Beobachtungszeit schließt sich daran an und beläuft sich auf 5 Tage. Die Tiere werden über den vorgesehenen Beobachtungszeitraum in den Käfigen der Stallungen gehalten. Im weiteren Verlauf wird Nahrung, Wasser und 5%ige Glucoselösung *ad libitum* angeboten.

Mit Hilfe eines eigens entwickelten Enzephalopathiescores wird eine Standardisierung der Einschätzung der Enzephalopathie nach Leberschädigung möglich. Auf einer Skala von 0 bis 5 Punkten wird das Verhalten der Tiere eingestuft, wobei ein unbeeinträchtigtes Verhalten mit 5 Punkten, ein nahezu reaktionsloses Verhalten mit 0 Punkten gewertet wird. Über eine genaue Zuordnung der Punkte gibt Tabelle 2.1 Auskunft. So wird ein Verlaufsparemeter generiert, der zum einen das Ausmaß der Auswirkung der Leberinsuffizienz meßbar macht, zum anderen eine Aussage über die Rekonvaleszenz der Tiere treffen läßt. Ähnlich der Punkteverteilung zum Beispiel bei der Glasgow-Coma-Scale [68] ist so eine Einschätzung objektivierbar möglich.

Nicht zuletzt aus ethischen Gesichtspunkten ist ein Verhalten, das mit maximal 1 Punkt eingestuft wird, als ein fortgeschrittener Schwächezustand zu werten, der es den Tieren nicht mehr möglich macht, sich ausreichend Flüssigkeit zuzuführen. Ein Überleben scheint so unmöglich und die Entscheidung zur vorzeitigen Tötung wird gefällt.

Verhalten	Punkte
Spontanes interessiertes Umherschweifen im Käfig	5
Zurückhaltende spontane Aktivität	4
Zeitweilige Aktivität nach störenden Reizen	3
Keine Aktivität, verzögertes Aufrichten nach Verbringen in Seitenlage	2
Schlaffer Muskeltonus, schwache Lebenszeichen, kaum fähig zu trinken	1
Positiver Cornealreflex als einzige Reaktion	0

Tabelle 2.1: Enzephalopathiescore zur Bewertung der Neurologie in der Leberinsuffizienz. Dieser Parameter wird täglich zur Visite erhoben.

Während der Beobachtungszeit werden die Tiere täglich visitiert. Zur Visite werden sie einzeln aus dem Käfig gehoben und inspiziert. Daraufhin wird das Körpergewicht bestimmt und die Tiere werden wieder in den Käfig zurückgesetzt. Während dieses Vorgangs werden ihre Reaktionen getestet und es ergeht eine Wertung entsprechend des Enzephalopathiescores. Am Ende der Beobachtungszeit (Tag 5) schließt sich der Visite die Tötung der Tiere mit Blut- und Organentnahme an – auch *harvesting* genannt.

Wenn die Tiere vor dem Ende der Beobachtungszeit verstorben sind, wird eine Autopsie durchgeführt. Dazu wird die Laparotomienarbe eröffnet und auf Auffälligkeiten wie Peritonitis, Abszeß oder chirurgische Komplikationen geachtet und entsprechend vermerkt.

2.10 Organentnahme und Probenasservierung

Die Tötung wird am Ende der Beobachtungszeit am Tag 5 in einer eigenständigen Operation durchgeführt. Es wird Blut für laborchemische Analysen und Gewebe für die histologische Begutachtung asserviert.

Nach Operationsvorbereitung und Narkoseeinleitung wird die Laparotomienarbe wiedereröffnet und quer erweitert. Mit trockenen Tupfern wird die *Aorta abdominalis* unterhalb der Leber vom Retroperitonealraum freipräpariert, damit sie mit einer Kocherklemme, ohne Anteile der *Vena cava* mitzuklemmen, gut gefaßt werden kann. Die Klemme wird so abgelegt, daß die Aorta etwas aus dem Situs nach oben ragt und gut zugänglich ist. Mit einer Venenverweilkanüle von 16 Gauge wird die Aorta kanüliert. Nach dem Entnehmen der Punktionsnadel aus dem Mandrain wird zügig eine 10 ml-Spritze konektiert und langsam das Blut aspiriert.

Für laborchemische Bestimmungen wird Blut in dafür vorgesehene Behältnisse gegeben (EDTA-, Heparin-, Citratröhrchen für Neugeborene mit einer Füllmenge jeweils bis 1 ml). Die Blutproben werden in das Zentrallabor des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Campus Virchowklinikum gebracht. Die entsprechenden Analysen auf Albumin, Bilirubin, Quick, ALT, AST, GGT, GLDH, CHE und Glucose werden dort in Auftrag gegeben. Der Umgang mit Blutproben von Versuchstieren ist dort etabliert.

Parameter	Referenzbereich	Einheit
Albumin	3,6–5	g/dl
Bilirubin (total)	≤ 1,0	mg/dl
Quick	70–130	%
ALT	≤ 45	U/l
AST	≤ 50	U/l
GGT	≤ 55	U/l
GLDH	≤ 6,4	U/l
CHE	≥ 5,5	kU/l
Glucose	55–110	mg/dl

Tabelle 2.2: Vom Labor angegebene Referenzbereiche der erhobenen Laborparameter.

Daraufhin werden die Organe entnommen. Es werden obligat Teile der Restleber und das Organ, in dem die Implantation stattfand, asserviert. Da nach Implantation in

die Milz die Zellen nicht nur in die Leber translozieren, sondern über intrahepatische Sinusoide und die Lebervene oder über porto-cavale *shunts* die Leber verlassen und über das rechte Herz die Lunge erreichen können, wird auch pulmonales Gewebe (als Translokationsort zweiten Grades) entnommen.

Im Falle der subperitonealen Implantation wird das Peritoneum um den Implantationsort zirkulär umschnitten und aus der Bauchwand gelöst. Im Falle der Milz als Implantationsort wird die Milz ähnlich wie zur Milzexstirpation zwischen Daumen und Zeigefinger genommen und von den hilären Strukturen getrennt.

Die Restleber wird von den umliegenden Strukturen getrennt und nach Entfernung der nekrotischen rechten Leberlappen gewogen. Repräsentative Anteile der omentalen Leberlappen werden sodann vorsichtig gefaßt und ohne das Gewebe zu quetschen abgeschnitten. Daraufhin wird der Thorax parasternal eröffnet, eine Lunge mit der Pinzette gefaßt und möglichst hilusnah durchtrennt.

Die so gewonnenen Gewebeanteile werden separat in bereitliegende, eindeutig beschriftete Einbettkassetten eingelegt und in 5%iges Formalin bis zur weiteren Aufarbeitung konserviert und zeitnah für das Schneiden und die Färbung vorbereitet.

2.11 Histologische Aufarbeitung

Die histologische Beurteilung erfolgt an auf Glasobjektträger aufgezogenen und gefärbten Gewebeschnitten. Als Routinefärbung gilt die Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE). Sie ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung, mit der die meisten Fragestellungen beantwortet werden können. Hämatoxilin ist ein basischer Farbstoff in saurer Lösung, der in den Schnitten alle sauren Komponenten wie Zellkerne und saure Schleimsubstanzen anfärbt. Basisch geladene Strukturen wie Zytoplasma, Kollagene und Proteine werden durch Eosin rosa bis rot gegengefärbt.

Das in Paraffin eingebettete Material wird am Rotationsmikrotom 2–4 µm dünn geschnitten. Die Schnitte werden zunächst gründlich entparaffiniert²⁵ und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe bewässert. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wird 10–20 min in Harris Hämatoxilin gefärbt und anschließend 20 min in Leitungswasser (pH ≤ 3,0) gebläut. Anschließend werden die Schnitte mittels Eosin 2–3 min gegengefärbt, kurz gespült und über eine aufsteigende Alkoholreihe und Paraclear entwässert sowie mit lösemittelhaltigem Eindeckmittel²⁶ als Dauerpräparate eingedeckt.

²⁵Paraclear®, Fa. Quartett, USA.

²⁶ClariOn®, Fa. Natutech, Deutschland.

2.12 Datendarstellung und statistische Auswertung

Für jedes Tier werden alle erhobenen Daten in ein entsprechend vorbereitetes Datenblatt eingetragen, wobei jedem eine laufende Nummer zugewiesen wird. Zusammen mit den Laboranalyseergebnissen werden sie dann in eine SPSS[®]-Datenbank²⁷ eingepflegt.

Die Datensätze einer Gruppe werden zusammengefaßt, ein arithmetisches Mittel gebildet, und die Standardabweichungen berechnet. Die Angaben erfolgen in der Form: $\bar{x} \pm SD$ Einheit. Die erhobenen Parameter werden statistischen Test unterworfen. Das Signifikanzniveau wird durch p angegeben. Ein $p \leq 0,05$ wird als statistisch signifikant, $\leq 0,01$ als statistisch hoch signifikant und $\leq 0,001$ als statistisch höchst signifikant gewertet.

Das Überleben einer Gruppe wird in einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve wiedergegeben, das Signifikanzniveau über den Log-Rank-Test ermittelt. Zur statistischen Auswertung der weiteren Datensätze wird nach Prüfung der Homogenität der Varianzen im Levene-Test der Student's t -Test angewandt. Sind mehrere Gruppen zu vergleichen, werden die Daten der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way* ANOVA), gefolgt von einem *post-hoc*-Test nach Tukey unterzogen. Alle Analysen werden mit dem Statistik-Softwarepaket SPSS[®] in der Version 11.5 durchgeführt.

Die Ausgangsdaten werden am Tag 0 erhoben und auf ihre Gleichheit innerhalb der Versuchsreihe getestet. Das Körpergewicht wird zum einen als absolutes Körpergewicht in einem Liniendiagramm mit der Standardabweichung als vertikal gekappte Linie wiedergegeben, zum anderen wird in einem weiteren Liniendiagramm das Verlaufsgewicht relativ zum Körpergewicht an Tag 0 vor der Resektion aufgetragen. Berechnet wird das relative Körpergewicht an Tag i wie folgt: $\Delta KG_{\text{Tag } i} = KG_{\text{Tag } i} - KG_{\text{Tag } 0}$. Zur statistischen Auswertung wird das relative Körpergewicht an Tag 5 ($\Delta KG_{\text{Tag } 5}$) herangezogen. Der Enzephalopathiescore wird ebenfalls gemittelt als Liniendiagramm über den Versuchszeitraum dargestellt.

Die Laboranalysen werden in Boxplots dargestellt. Dabei umfaßt die Box 50% der Daten. Als weiteres Quantil ist der Median als Waagrechte eingezeichnet. Das arithmetische Mittel ist als kleines schwarzes Rechteck wiedergegeben. Die mit Kappen abgeschlossenen vertikalen Whiskers geben die untere und obere Decile an (10tes und 90stes Percentil). Ist der Unterschied einer Therapiegruppe zur Kontrollgruppe statistisch signifikant, wird der Boxplot mit einem Stern (*) im Falle eines hochsignifikanten Unterschieds durch einen doppelten Stern (**) gekennzeichnet.

²⁷SPSS[®], Ltd. Chicago, USA.