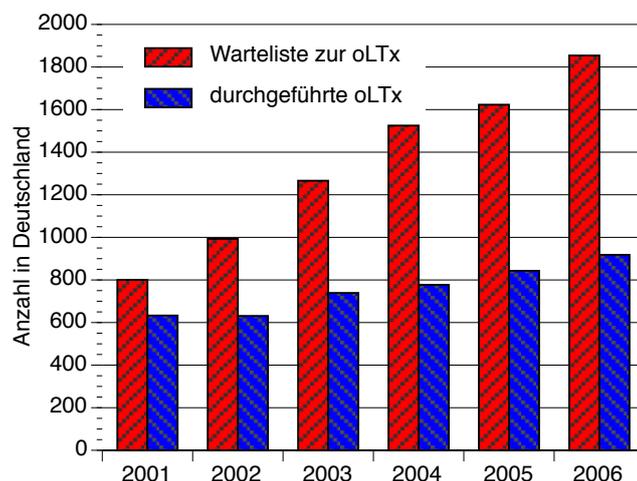


## 4 Diskussion

### 4.1 Neue Möglichkeiten durch Hepatozytentransplantation

Die orthotope Lebertransplantation ist eine effektive Methode zur Behandlung einer akuten oder progredient verlaufenden Lebererkrankung.[69] Sie stellt nach Ausschöpfen konventioneller Therapiemethoden derzeit die einzige anerkannte Therapie für akute, chronische oder genetisch bedingte Lebererkrankungen dar, die im Verlauf eine lebensbedrohliche Entwicklung annehmen.[34, 70, 71, 72]

Der Bedarf an transplantierbaren Organen ist jedoch bei weitem nicht gedeckt. Zwar nimmt die Spendebereitschaft zu, und neu erarbeitete Konzepte – wie Leberlebenspende oder Nutzung marginaler Organe – konnten das Spendeaufkommen weiter verbessern, jedoch ist seit Jahren weltweit eine zunehmende Diskrepanz zu den benötigten Organen zu beobachten. So standen in Deutschland im Jahre 2006 den 918 transplantablen Lebern 1854 Patienten auf der Warteliste gegenüber (Abbildung 4.1).[73] Es resultieren zunehmend längere Wartezeiten und ein hohes Risiko, auf der Warteliste zu versterben.



**Abbildung 4.1:** Zunehmende Knappheit der Organe zur orthotopen Lebertransplantation in Deutschland.[73]<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Daten unter <http://www.eurotransplant.nl>, letzter Zugriff am 23.09.2007.

In Anbetracht der geschilderten Situation haben Forschungsgruppen sich zum Ziel gesetzt, Alternativen zur orthotopen Lebertransplantation zu entwickeln. Die Hepatozytentransplantation als Therapieoption bietet eine vielversprechende Perspektive. Möglichkeiten, die sich aus der Kryokonservierung in Verbindung mit alternativen Zellquellen oder einer Gentherapie ergeben, sind enorm und könnten dazu beitragen, den Pool der Patienten, die auf ein Organ warten, zu verkleinern.

Trotz dieses Potentials sind noch weitere Anstrengungen erforderlich, bevor die Hepatozytentransplantation als Routineverfahren eingesetzt werden kann. Bisher sind es zumeist für die Lebertransplantation abgelehnte, minderwertige Organe, die zur Zellisolation herangezogen werden. Es fehlt an Alternativen zu primären humanen Hepatozyten.[74, 75] Dieses Problem wird in der Literatur eindringlich diskutiert.[14, 41] Es ist zu erwarten, daß in den kommenden Jahren Forschungsgruppen ihre Aufmerksamkeit verstärkt darauf richten werden, Alternativen zu primären humanen Hepatozyten zu identifizieren und zu evaluieren. Vor einer Anwendung am Patienten ist es notwendig, in entsprechenden Tierversuchen die Durchführung einer Transplantation von hepatozytenähnlichen Zellen genauestens zu untersuchen.

### 4.2 Vorbedingungen zur Versuchsdurchführung

Nach einer Standardisierung der einzelnen Versuchsabläufe in Vorversuchen sind die Versuchsreihen I–III durchgeführt worden. Es wurden immer mindestens zwei Gruppen in einer Versuchsreihe geführt. Einmal die Behandlungsgruppe, die nach einer Leberschädigung einer Implantation mit funktionellen primären Hepatozyten unterzogen wurde, und eine Kontrollgruppe, bei der statt des Zellsuspensats eine 0,9%ige Kochsalzlösung injiziert wurde.

Der bedeutende Vorteil einer chirurgischen Methode eine Leberinsuffizienz zu induzieren, liegt in der zeitlichen Planbarkeit des Auftretens einer Leberinsuffizienz mit definierten Ausmaß. Im Gegensatz dazu ist in toxischen Modellen die Ausprägung einer gesetzten Leberschädigung einer größeren Variabilität unterworfen und der Zeitpunkt des Auftretens einer definierten Leberinsuffizienz schwieriger festzustellen.[76] Zur Durchführung einer subtotalen Leberteileresektion im Rattenmodell sind mehrfache Varianten in der Literatur beschrieben [49, 63], die alle auf einer Veröffentlichung von Higgins *et al.* aus dem Jahre 1931 basieren.[77] Eguchi *et al.* [49] beschrieben mit der Resektion der großen Leberlappen und Ligatur der rechten Leberlappen mit einer Varianz der funktionell überbleibenden 10% des ursprünglichen Lebergewebes von etwa  $\pm 1\%$  ein Modell, dessen Überleben sich als hoch reproduzierbar stabil erwies.

## 4 Diskussion

Tatsächlich war das Überleben und die mittlere Überlebenszeit der Kontrollgruppen nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung aller Versuchsreihen vergleichbar:

- Versuchsreihe I (n = 9): 33% mit  $3,2 \pm 1,5$  d,
- Versuchsreihe II (n = 10): 20% mit  $3,1 \pm 0,4$  d und
- Versuchsreihe III (n = 14): 29% mit  $3,4 \pm 1,6$  d.

Selbst in der Kontrollgruppe nach Implantation der mononukleären Zellen der Versuchsreihe III (n = 9) lag ein 33%iges Überleben mit einem mittleren Überleben von  $3,2 \pm 1,6$  d in dieser Größenordnung. Die stabile Überlebensrate macht diese Resektionsmethode zu einem sensitiven Verfahren, an dem ein Behandlungserfolg meßbar wird.

Die Ausgangsdaten der Kontroll- und der Therapiegruppen liegen in jeder Versuchsreihe auf vergleichbarem Niveau. Es gibt keine signifikanten Unterschiede beim Ausgangsgewicht und Resektionsgewicht. Dies ist eine weitere Basis für eine verlässliche Aussage.

Die Therapiegruppen, die mit primären Rattenhepatozyten bestückt wurden, waren aufgrund einer nur beschränkten Ausbeute einzelner Zellisolation mit Zellen aus verschiedenen Isolationen bestückt worden. Die Viabilität war jedoch immer größer 93%. Eine Aufschlüsselung der Versuchsgruppen in Untergruppen mit Implantation von Zellsuspensaten unterschiedlicher Viabilität war somit nicht sinnvoll.

Eine Immunsuppression zur Verhinderung einer Abstoßung scheint in einigen Xenotransplantationsmodellen nur notwendig zu sein, wenn ein Überleben der Zellen *in vivo* über zwei Wochen vorausgesetzt wird. Nagata *et al.* [64] entwickelten ein Modell der chronischen Leberinsuffizienz, bei dem nach medikamentöser Induktion einer Zirrhose und Implantation von  $50 \times 10^6$  Schweinehepatozyten sich auch ohne Immunsuppression der gleiche positive Effekt auf das Überleben wie nach Implantation von syngenen Rattenhepatozyten einstellte. Erst bei einer Retransplantation oder sequentiellen Transplantation kam es bei nicht-immunsupprimierten Tieren zu einer durch die zweite Transplantation getriggerten akuten Abstoßungsreaktion.[64]

Daraufhin wurde der Entschluß gefaßt, keine Immunsuppression anzuwenden. Tatsächlich waren in der histologischen Untersuchung nach Tötung am Tag 5 der Versuchsreihe III Zellen in der Milz zu erkennen, die nach morphologischen Kriterien Hepatozyten entsprechen (Abbildung 3.15 auf Seite 40). Es bestätigt sich somit, daß das Überleben der Zellen trotz fehlender Immunsuppression auch in diesem Modell über den Versuchszeitraum von 5 Tagen möglich war.

### 4.3 Erörterung der Ergebnisse

In Tabelle 4.1 sind die Versuchsergebnisse aller Versuchsgruppen knapp zusammengefaßt. Das 5-Tages-Überleben ist in Prozent und in Klammern als Ratio angegeben. Weiterhin ist das relative Körpergewicht der überlebenden Tiere zum Ende des Versuchs ( $\Delta\text{KG}_{\text{Tag } 5}$ ) als Differenz des absoluten Körpergewichts an Tag 5 und des absoluten Körpergewichts vor der subtotalen Leberteileresektion an Tag 0 aufgeführt. Das Restlebergewicht, welches bei den überlebenden Tieren zum Zeitpunkt der Tötung bestimmt wurde, ist in der letzten Spalte wiedergegeben.

Versuchsreihe und -gruppe			Überleben	$\Delta\text{KG}_{\text{Tag } 5}$ [g]	Restleber [g]
I	(subperitoneal)	NaCl	33% (3/9)	$-19 \pm 31$	$5,9 \pm 0,3$
I	(subperitoneal)	24 Mio Hep	38% (3/8)	$-40 \pm 37$	$6,2 \pm 0,6$
II	(lienial)	NaCl	20% (2/10)	$-27 \pm 21$	$5,7 \pm 0,4$
II	(lienial)	24 Mio Hep	0% (0/3)	—	—
III	(lienial Tag -1)	NaCl	29% (4/14)	$-26 \pm 21$	$6,9 \pm 0,5$
III	(lienial Tag -1)	24 Mio Mon	33% (3/9)	$-23 \pm 13$	$5,9 \pm 0,2$
III	(lienial Tag -1)	16 Mio Hep	44% (4/9)	$-16 \pm 24$	$5,8 \pm 0,3$
III	(lienial Tag -1)	24 Mio Hep	72% (13/18)	$+1 \pm 30$	$6,3 \pm 0,8$
III	(lienial Tag -1)	32 Mio Hep	38% (3/8)	$-11 \pm 12$	$6,0 \pm 0,4$
III	(lienial Tag -1)	48 Mio Hep	50% (3/6)	$-4 \pm 34$	$5,6 \pm 0,5$

**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

#### 4.3.1 Subperitoneale Implantation

Nach einzeitiger subtotaler Leberteileresektion und anschließender subperitonealer Implantation von  $24 \times 10^6$  Rattenhepatozyten war kein Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollgruppe nachweisbar (Versuchsreihe I). Auch die anderen erhobenen Parameter wiesen nur tendenzielle, statistisch nicht signifikante Unterschiede auf. In der histologischen Aufarbeitung des Implantationsortes waren reichlich Nekrosen an den Implantationsstellen zu erkennen.

Als Argument für eine subperitoneale Implantation wurde eine gute Erreichbarkeit sowie eine große Fläche, die eine Aufteilung des Suspensates auf mehrere Implantationsdepots möglich machte, angebracht. Weiterhin sind durch die subperitoneale Implantation keine wesentlichen chirurgischen Komplikationen, wie sie bei Gefäßzugen oder bei Implantation in parenchymatöse Organe vorkommen könnten, zu erwarten. In der Literatur ist diese Methode bisher nicht beschrieben, so daß ein Vergleich mit bereits durchgeführten Studien nicht möglich ist.

Im Gegensatz zu anderen, bereits als erfolgreich beschriebenen ektopen Implantationsorten [41], denen man ebenso keine spezifische für Hepatozyten geeignete Umgebung zusprechen kann, bietet das Peritoneum eine eher schlechte Gefäßversorgung. Ein gut durchblutetes Trabekelwerk aus dem zum Beispiel die Milz gebildet ist, besteht hier nicht. Die Zellen sind nach Implantation als Depot auf den Raum, der durch den Druck beim Einbringen geschaffen wurde, beschränkt. Eine gute Erreichbarkeit von kapillären Gefäßstrukturen war hier offensichtlich nicht ausreichend gegeben. In der Folge starben die Zellen ab; histologisch war kaum vitales Lebergewebe nachzuweisen. Auf eine Implantation von Suspensaten unterschiedlicher Zellzahl oder eine zeitliche Trennung der Implantation von der Leberteilektomie wurde daraufhin verzichtet.

Es wäre jedoch denkbar, daß das Überleben der Zellen durch Maßnahmen wie nach Aufbringen auf kollagenbeschichtete Trägermaterialien, sogenannte *scaffolds*, wie es Demetriou *et al.* zur intraperitonealen Implantation angewandt hat, gesteigert werden könnte.[59]

### 4.3.2 Einzeitige lienale Implantation

Die Versuchsreihe II mit subtotaler Leberteilektomie und direkt folgender Zellimplantation in die Milz war vielversprechend. Im Tiermodell war dieser Implantationsort bereits bei anderen Leberschädigungsmustern wie nach toxisch induzierter Leberzirrhose erfolgreich angewandt worden. Nagata *et al.* wiesen ein Überlebensvorteil nach, indem sie Schweinehepatozyten in die Milz der Ratte injizierten. Zur Leberschädigung ging eine 4 wöchige Zufütterung von Phenobarbital und Tetrachlorkohlenstoff voraus.[64] Pilichos *et al.* erreichten nach Induktion eines Leberversagens im Modell der Wistar-ratte durch einmalige Gabe einer letalen Dosis von Tetrachlorkohlenstoff und folgender lienaler Implantation von  $10 \times 10^6$  primären Rattenhepatozyten ein deutlich gesteigertes Überleben von 0% auf 72% bezogen auf die Kontrollgruppe. Die Beobachtungszeit belief sich über 10 Tage, wobei ab Tag 6 keine der Ratten mehr verstarb.[58]

Um so überraschender war das Ergebnis der Therapiegruppe der Versuchsreihe II: Nach einzeitiger subtotaler Leberteilektomie und anschließender Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten in die Milz überlebte keines der Tiere die ersten Stunden nach dem Eingriff. Vor dem Verschuß des Abdomens wie auch zur Obduktion nach dem Tode waren als Zeichen einer Stase im Portalkreislauf massiv gestaute Darmvenen zu beobachten (Abbildung 3.10 auf Seite 36). Das Resultat der ersten drei Tiere machte es haltlos, die Therapiegruppe auf eine vorgesehene Zahl von 10 Tieren zu erweitern. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte einen der Kontrollgruppe nach subperitonealer Implantation ähnlichen Verlauf.

Der Verdacht lag nahe, daß ein rheologisches Problem im Pfortadergefäßbett dieses Phänomen bedingte. Durch eine subtotale Leberteilresektion wird der Pfortadergesamtquerschnitt bereits deutlich verkleinert. In der Folge wird ein portaler Hypertonus entstehen. Nach dem Entfernen der Klemmen zum Verschluß der hilären Gefäße der Milz 5 min nach der Implantation war ein Loslösen eingebrachter Zellen aus der durch die Implantation ballonierten Milz nicht vollständig zu vermeiden. Dies führte dazu, daß ein Teil der implantierten Zellen mit dem Blutstrom mitgerissen wurde und über die *Vena lienalis* in die Pfortader und in die sich anschließenden Aufzweigungen translozierten. Hier ist es, wie histologisch nachgewiesen, in kleineren Ästen der Pfortader über den gesamten Querschnitt zu Okklusionen gekommen, die den Widerstand des intrahepatischen Pfortadersystems nochmals sprunghaft erhöhten.

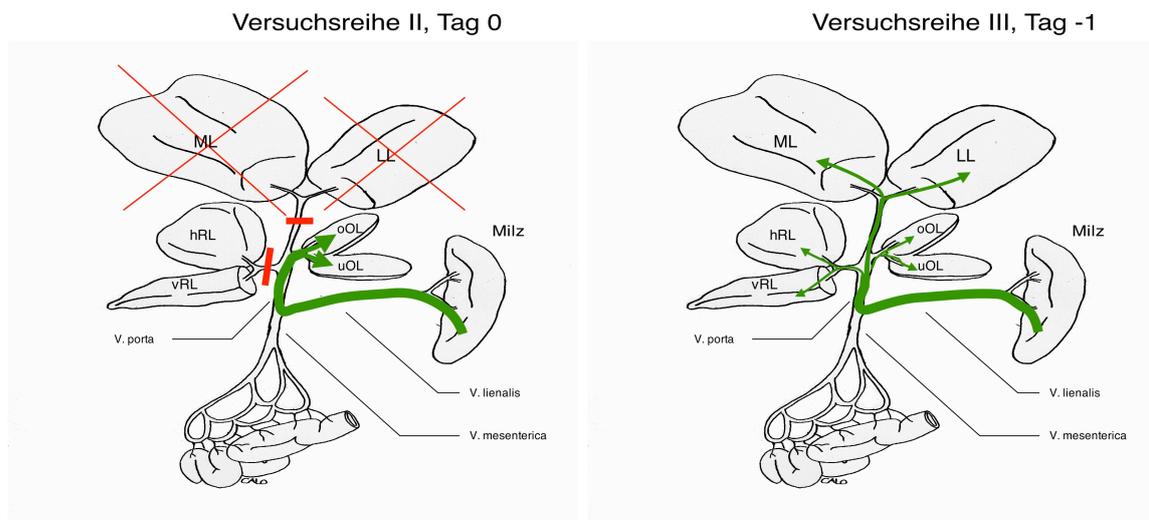
Letztlich kam es zu der oben beschriebenen Stauung oder gar Stase in den der Pfortader vorgeschalteten Gefäße, die venösen Darmgefäße eingeschlossen. Die histologisch nachweisbaren intrahepatischen Nekrosen und eine feintropfige Verfettung des Lebergewebes, die bereits in der kurzen Zeitspanne zwischen Implantation und Tod einsetzten, lassen auf eine ausgeprägte Ischämie rückschließen. Unterstützt wird diese These dadurch, daß in der Kontrollgruppe nach Injektion der Kochsalzlösung eine Stauung nicht beobachtet wurde.

Daß die Tiere unter Entwicklung neurologischer Symptome verstorben sind, läßt deutlich werden, wie ausgeprägt die Perfusionsstörung gewesen sein muß. Das im Abschnitt 3.3 beschriebenen abnorme Verhalten kurz vor dem Tod ist mit einem sich entwickelnden Hirnödem mit konsekutiver Hirnstammeinklemmung zu vereinbaren, was auf eine fatale Störung des Glucosestoffwechsels zurückgeführt werden kann, wie es auch nach einer totaler Hepatektomie zu beobachten ist.

### 4.3.3 Zweizeitige lienale Implantation

Nachdem nun in der Therapiegruppe der Versuchsreihe II der verheerende Ausgang als Folge der kombinierten Resektion und Implantation interpretiert worden war, wurde die Entscheidung getroffen, die Implantation von der Resektion zeitlich zu trennen und sie einen Tag vor der Resektion durchzuführen. So treffen die translozierenden Zellen auf ein noch nicht im Durchmesser reduziertes portales Gefäßbett in der Leber und verteilen sich auf den vollen Querschnitt. Zum zweiten gibt man den Zellen nach der Implantation Zeit, sich zu reorganisieren und mit der neuen Umgebung zu interagieren.

Schließlich erwies sich das Vorgehen, einen Tag vor der subtotalen Leberteilresektion die Implantation von  $24 \times 10^6$  Zellen in die Milz vorzunehmen, als erfolgreich (Versuchsreihe III). Das Überleben konnte signifikant von 29% auf 72% gesteigert werden ( $p = 0,009$ ).



**Abbildung 4.2:** Verteilungsmuster translozierender Zellen nach einzeitiger (links) und zweizeitiger lienaler Zellimplantation (rechts).

Kritisch zu diskutieren ist der Verlust eines Großteils der translozierten Zellen mit der subtotalen Leberteilektomie bei einem zweizeitigen Vorgehen. Das Verhältnis der translozierten zu den in der Milz verbleibenden Zellen kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur geschätzt werden. Es sind keine Arbeiten gefunden worden, die das Verhältnis der translozierten zu den ansässig bleibenden Zellen systematisch analysieren.

Es bleibt zu postulieren, daß die Summe der in der Milz verbliebenen und der translozierten Zellen, die nicht durch die Leberteilektomie entfernt wurden, genügt, eine ausreichende Leberunterstützung zu geben, um einen Überlebensvorteil zu erzielen. In Versuchsreihe III war dies nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten möglich, wodurch sich die Implantation in die Milz somit als ein erfolgreiches Vorgehen auch nach einer chirurgisch induzierten Leberinsuffizienz erweist. Ob letztlich die in der Milz ansässigen und noch am Tag 5 histologisch nachweisbaren Hepatozyten oder die in die Leber translozierten Hepatozyten oder beide die Funktion übernahmen, bleibt offen.

Als zweite Kontrolle wurde eine Gruppe mit zweizeitiger Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen eingeführt. Sie hatte einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrollgruppe nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung. Auch zu dieser Gruppe war im Log-Rank-Test der Unterschied zur Therapiegruppen nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten signifikant ( $p = 0,03$ ). Ein positiver Effekt, der auf eine Implantation von Zellen auch ohne hepatische Eigenschaften zurückgeführt hätte werden können, wurde somit ausgeschlossen.

Weiter bleibt zu diskutieren, ob das gesteigerte Überleben der Behandlungsgruppe nicht etwa nur durch einen im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigeren Pfortaderdruck entstanden ist. Theoretisch könnte eine Implantation der Zellen – ähnlich wie zu einer Milzarterienembolisation – durch Verschluß von Gefäßen in der Milz zu einer Flußwiderstandserhöhung der Milz geführt haben, die den Pfortaderzufluß reduziert.[78] Jedoch sind weder makroskopisch noch in der histologischen Auswertung Infarkt- oder Nekroseareale in der Milz zu erkennen gewesen.

Es muß davon ausgegangen werden, daß tatsächlich die eingebrachten Zellen durch eine Unterstützung mit ihrer Funktion als Hepatozyten ausschlaggebend für das verbesserte Überleben waren. Durch die Implantation ist eine kritische Zellmasse in diesem labilen Überlebensmodell nach subtotaler Leberteilresektion überschritten worden, die notwendig war, um das Überleben signifikant zu steigern.

### 4.3.4 Variation der implantierten Zellzahl

Das in dieser Arbeit genutzte Modell der subtotalen Leberteilresektion nach Eguchi *et al.* entspricht dem einer 90%igen Leberteilresektion. In beiden Fällen bleiben 10% des funktionellen Lebergewebes zurück. Panis *et al.* [79] konnten zeigen, daß bei einer Resektion ab 85% des Lebergewebes in der Ratte die Leberinsuffizienz in ein akutes Leberversagen mit steigender Letalität übergeht. Folgerichtig war die Bestrebung durch eine Hepatozytentransplantation diese 5% Differenz nach subtotaler Leberteilresektion zu ersetzen. Da das Lebergewicht der Ratte etwa 4% ihres Körpergewichtes beträgt [80] und 1 g Rattenleber etwa  $40 \times 10^6$  Parenchymzellen enthalten[81], errechnen sich bei einer Ratte mit einem Körpergewicht von 300 g genau  $24 \times 10^6$  Leberzellen, die diesen 5% entsprechen. Diese Zellzahl war die Ausgangsdosis in den Versuchsreihen I–III.

Nachdem nun in der Versuchsreihe III die Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten zu einem erfolgreichen Ergebnis geführt hatte, sollte in einer Erweiterung dieser Versuchsreihe geklärt werden, ob eine Reduktion der Zellzahl auf  $16 \times 10^6$  oder Steigerung auf  $32 \times 10^6$  bzw.  $48 \times 10^6$  das Überleben zusätzlich verbessert.

Die Versuchsgruppen der erweiterten Versuchsreihe III zeigten zwar ein tendenziell besseres Ergebnis zu den Kontrollgruppen, jedoch konnte das Ergebnis der Versuchsgruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Zellen nicht erreicht werden. Weder zur Kontrollgruppe nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung noch zur Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen waren die Unterschiede im Überleben signifikant. Als einziger sich signifikant unterscheidender Parameter ist die GLDH in der Versuchsgruppe nach Implantation von  $16 \times 10^6$  Zellen zur Kontrollgruppe nach Injektion von 0,9% Kochsalzlösung aufzuführen.

Ob nach Implantation von  $32 \times 10^6$  und  $48 \times 10^6$  Hepatozyten eine zunehmende Okklusion kleinerer portaler Venen der Grund für den schlechteren Therapieerfolg war, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Im Falle der implantierten  $16 \times 10^6$  Hepatozyten scheint die zu geringe Zellzahl der limitierende Faktor gewesen zu sein.

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung zu diskutieren, die bei allen Tieren der Gruppe nach Implantation von  $48 \times 10^6$  Zellen gemacht wurde. Nach Laparotomie zur Resektion einen Tag nach Implantation imponierte die Leber gescheckt. Teils punktförmige, teils konfluierende entfärbte Areale waren auf ihrer Oberfläche auszumachen (Abbildung 3.21 auf Seite 45). Von diesen Leberresektaten war eine histologische Aufarbeitung erfolgt.

Das Bild ähnelte den Präparaten, wie sie nach einzeitiger lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Rattenhepatozyten (Versuchsreihe II) angefertigt wurden: kleinere Pfortaderäste waren okkludiert. Die nachgeschalteten Peripherien waren offensichtlich minderperfundiert, was sich makroskopisch und mikroskopisch in kleinen verfetteten Arealen widerspiegelte. Im Gegensatz zur Therapiegruppe der Versuchsreihe II war jedoch das Ausmaß der okkludierten Pfortaderäste bei weitem nicht so stark ausgeprägt.

Die Tiere verhielten sich sowohl direkt nach der Implantation, als auch am Resektionstag normal. Dies bleibt der Tatsache geschuldet, daß die implantierten Zellen – im Gegensatz zum einzeitigen Vorgehen der Versuchsreihe II – auf einen noch nicht verkleinerten Querschnitt des Pfortadergefäßbettes trafen, was sich somit unmerklich auf die Rheologie auswirkte und inapparent blieb. Zeichen einer Stauung der venösen Darmgefäße waren weder direkt nach der Implantation noch am folgenden Tag zur Resektion aufgefallen.

### 4.3.5 Gewichtsverlauf und Enzephalopathiescore

Die Gewichtsverläufe erwiesen sich als ein guter Indikator für den Therapieerfolg einer Gruppe. Da der direkte Vergleich der absoluten Gewichtsverläufe nur eingeschränkt möglich war, wurde das relative Körpergewicht bezogen auf das Gewicht vor der Leberteilresektion an Tag 0 gebildet. Hiernach läßt sich der Unterschied im Verlauf der Gruppen deutlicher aufzeigen. Statistisch getestet wurde das relative Körpergewicht der überlebenden Tiere am Ende der Beobachtungszeit ( $\Delta KG_{\text{Tag } 5}$ ).

Gruppen, die bezüglich des Überlebens tendenziell oder signifikant besser abschnitten, konnten auch im Gewichtsverlauf eine frühere Rekonvaleszenz aufweisen. Deutlich kann dies in der Versuchsreihe III nachvollzogen werden: Alle Versuchsgruppen, die mit Hepatozyten beladen wurden, lagen nicht nur in den Überlebenskurven über der Kontrollgruppe, sondern konnten auch im Gewichtsverlauf eine frühere Stabilisierung oder sogar eine Gewichtszunahme verzeichnen, die sich im Falle nach Implantation von

$24 \times 10^6$  Hepatozyten zur Kontrollgruppe nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung mit einem  $p = 0,007$  hoch signifikant unterschied. Auch zur zweiten Kontrollgruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen war ein signifikanter Unterschied im relativen Körpergewicht nachzuweisen ( $p = 0,03$ ).

Der initiale Gewichtsabfall von Tag 0 auf Tag 1, der in allen Versuchsgruppen zu beobachten ist, kann primär auf den Gewichtsverlust durch die Entfernung der großen Leberlappen zurückgeführt werden und betrug alle Gruppen gemittelt  $7 \pm 31$  g (von  $270 \pm 23$  g auf  $263 \pm 21$  g). Das deckt sich in etwa mit dem über alle Gruppen gemittelten Resektatgewicht von  $8,8 \pm 1,0$  g. Die Diskrepanz von über 1 g könnte auf perioperative Flüssigkeitsverschiebungen in den Extravasalraum mit Ausbildung von Ödemen erklärbar sein, die zum Ausgleich des intravasalen Volumens zu einem vermehrten Trinken anregen. Der Gewichtsabfall der folgenden Tage muß als ein prognostisch schlechtes Zeichen aufgefaßt werden und erklärt sich als Folge von Schwäche und Kachexie, die in der Leberinsuffizienz begründet liegen. Ein sehr starker Gewichtsabfall muß als Folge einer unzureichenden Flüssigkeitszufuhr interpretiert werden.

Die deutliche Gewichtszunahme, wie sie in der Gruppe nach zweizeitiger lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten zu verzeichnen war, ist erstaunlich. Das relative Körpergewicht an Tag 0 vor der Resektion ( $266 \pm 22$  g) wurde zum Ende der Beobachtungszeit an Tag 5 ( $267 \pm 21$  g) mit einer Differenz von  $1 \pm 30$  g sogar überschritten. Ein initialer Gewichtsabfall in dieser Gruppe um  $8 \pm 31$  g wurde somit vollständig kompensiert. Das Resektat zur Leberresektion bemaß sich in dieser Gruppe auf  $8,9 \pm 0,8$  g, das Restlebergewicht belief sich nach Entfernung der nekrotischen rechten Leberlappen auf  $6,6 \pm 0,6$  g. Bei allen anderen Gruppen war es trotz ähnlicher Zunahme der Restleber, allenfalls zu einer Stabilisierung des Gewichts auf einem niedrigen Niveau gekommen. Es darf postuliert werden, daß durch eine reduzierte Symptomatik ein besserer Verlauf mit einem besser kompensierten Flüssigkeitshaushalt einhergeht.

Der Enzephalopathiescore erwies sich als Parameter, der gleichsinnig mit dem Überleben interpretierbar ist. Neben besseren Überlebensverläufen hatten die Tiere einen früheren Anstieg des Enzephalopathiescores, während in den Kontrollgruppen – mit Ausnahme der Kontrollgruppe in der Versuchsreihe II – erst verzögert ein Anstieg zu verzeichnen war und ein späteres Erreichen der vollen Punktzahl eintrat. Die Verläufe der Therapie- und Kontrollgruppen lagen jedoch eng zusammen und ließen nur tendenzielle Unterschiede, vor allem im Zeitpunkt einer Rekonvaleszenz erkennen.

#### 4.3.6 Laborchemische Analysen

Die erhobenen Laborparameter der Versuchsreihe I nach subperitonealer Implantation unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Das deckt sich mit der

Tatsache, daß in dieser Gruppe auch kein Überlebensvorteil gezeigt werden konnte und auch alle anderen Parameter keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Festzuhalten ist jedoch, daß in allen Versuchsreihen die bestimmten Parameter im Vergleich mit den verfrüht getöteten Tieren normalisiert erschienen. Es ist anzunehmen, daß tatsächlich die Talsohle der Leberinsuffizienz zum Zeitpunkt der Entnahme am Tag 5 durchschritten ist. Daß keines der Tiere aller Versuchsreihen nach dem Tag 4 verstarb, daß der Enzephalopathiescore sich normalisierte und daß die Gewichtsentwicklung der überlebenden Tiere sich bis dahin stabilisierte, unterstützt diese These.

Diskussionswürdig bleibt, daß in der Versuchsreihe III die ALT und GLDH der Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  und die GLDH nach Implantation von  $16 \times 10^6$  Hepatozyten als einzige Parameter eine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung aufwiesen. Beides sind Marker der Leberschädigung, deren Erhöhung mit einem Leberzelluntergang einher geht. Vielleicht erlaubt ein niedrigerer Wert dieser Parameter, auf eine regenerierte hepatische Funktion rückschließen zu können, denn auch in den Gruppen nach Implantation von  $16 \times 10^6$  und  $32 \times 10^6$  Zellen waren die Parameter deutlich niedriger als in den anderen Gruppen, jedoch ohne sich signifikant von der Kontrollgruppe zu unterscheiden.

### 4.3.7 Leberregeneration nach subtotaler Leberteileresektion

Bei allen Tieren, die den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen überlebten, hat die Restleber einen erstaunlichen Größenzuwachs erreicht (Abbildung 3.6 auf Seite 33). Das zur Tötung am Tag 5 gemessene Restlebergewebe lag – alle Gruppen gemittelt – bei  $6,1 \pm 0,5$  g (Tabelle 4.1 auf Seite 50), wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen waren. Unter der Annahme, daß 4% des Körpergewichts das Gewicht der gesunden Rattenleber beträgt [80], würden 6 g Lebergewebe bei einem Körpergewicht von 300 g die Hälfte der ursprünglichen Leber entsprechen.

Es ist plausibel, daß bei einer derartigen Volumen- und Gewichtszunahme der Leber die Gefahr zur Ausbildung einer Dekompensation zum Ende des Versuches gebannt ist. Von den insgesamt 94 Tieren starben nach der subtotalen Leberteileresektion am Tag der Operation 3 Tiere (3,2%), 8 Tiere bis zur Visite am Tag 1 (8,5%), 14 Tiere zum Tag 2 (14,9%), 25 Tiere zum Tag 3 (26,6%). Zur Visite am Tag 4 war mit 6 verstorbenen Tieren (6,4%) ein deutlicher Rückgang der Sterberate zu verzeichnen. Zur Visite am Tag 5 war keines der Tiere in allen Versuchsreihen verstorben – gleich ob Therapie- oder Kontrollgruppe. Alle 38 überlebenden Tiere (40,4%) hatten an Tag 5 die volle Punktzahl von 5 im Enzephalopathiescore erreicht. Der Gewichtsverlust stabilisierte sich zum Ende des Beobachtungszeitraums in allen Gruppen. Die überlebenden Tiere können somit als rekompensiert gelten.

Der Enzephalopathiescore zur Einschätzung der Tiere war nicht nur als Verlaufsparemeter gedacht gewesen, sondern auch als objektivierbare Möglichkeit, den Versuch bei einem Tier vorzeitig abubrechen, wenn das Verhalten zum Zeitpunkt einer Visite mit einem Überleben bis zum Folgetag nicht mehr vereinbar war. Durch die frühzeitige Tötung konnten bemerkenswerte Daten erhoben werden, und zwar in der Situation einer Dekompensation der Leberinsuffizienz. Die Laborparameter waren teils extrem verändert und spiegeln das klinische Bild der Leberinsuffizienz wider. Bilirubin war im Vergleich zu den Tieren, die am Ende der Beobachtungszeit getötet wurden, deutlich erhöht, der Quick um bis über die Hälfte reduziert. Auch die GGT, die sich sonst über alle Versuchsgruppen sehr stabil bei 4 U/L hielt, war stark erhöht. Die um ein Vielfaches erhöhten AST- und ALT-Werte können aber auch auf den Gewebeerfall der nur legierten und nicht resezierten Leberlappen (vRL und hRL) zurückgeführt werden. Die Hypoglykämie gibt Zeugnis über die Inbalance des Energiehaushaltes.

Besonders eindrücklich ist die unter der metabolischen Last entstandene Verfettung der Leber, die einem unter dem Bild einer Leberinsuffizienz sterbenden Tier entnommen wurde (Abbildung 3.22 auf Seite 46). Die Leber hatte nur eine geringe Tendenz zur Hypertrophie. Es scheint, als wären die Lebern nicht in der Lage zu regenerieren.

### 4.4 Bedeutung des Modells

Die Motivation, Erkenntnisse auf dem Gebiet der Hepatozytentransplantation im Tiermodell zielgerichtet auf einen klinischen Einsatz vorzubereiten, ist hoch. Ob der Nachweis eines Überlebensvorteils bei dem gewählten Vorgehen in dieser Arbeit auf eine klinische Strategie übertragbar ist, muß differenziert betrachtet werden.

Den Implantationszeitpunkt vor einer Leberschädigung zu wählen, wäre in den wenigsten Fällen eine gängige Praxis in der Klinik. Eher relevant ist ein Reagieren auf eine Schädigung, die eine Dekompensation nach sich zieht, die unter konservativer Therapie nicht mehr aufzufangen ist. Im Falle einer ausreichenden Verfügbarkeit von Zellen mit hepatischen Eigenschaften wäre jedoch ein prophylaktischer Ansatz zum Beispiel vor ausgedehnten Leberteileresektionen durchaus denkbar. Eine Implantation in die Milz ist beim Menschen ein praktikables und bereits mehrfach erfolgreich durchgeführtes Vorgehen.[58, 82, 83] Dabei wird meist über einen minimalinvasiven Zugang, wie zu einer Angiographie, die Zellsuspension in die Milzarterie infundiert.

Die Bedeutung unseres Modells liegt jedoch nicht im Versuch, ein realistisches, in die Klinik übertragbares Szenario zu konstruieren. Vielmehr wurde ein Modell entwickelt, in dem Zellen als Alternative zu primären Hepatozyten, in einem standardisierten Verfahren auf ihre hepatischen Eigenschaften *in vivo* evaluiert werden können.

## 4.5 Zukunft der Hepatozytentransplantation

Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts ist die orthotope Lebertransplantation weiterhin mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Die Gründe hierfür sind vielfältig und zeigen gleichzeitig die Chancen der Hepatozytentransplantation auf:

1. Die Operation der orthotopen Lebertransplantation ist nicht zuletzt aufgrund ihres Ausmaßes und ihrer hohen Anforderung an chirurgische Technik und perioperatives Management mit Risiken verbunden. Eine Hepatozytentransplantation hingegen kann minimal-invasiv durchgeführt werden. Für die Infusion eines Zellsuspensats ist einzig ein geeigneter Gefäßzugang notwendig. Unter standardisierbaren Voraussetzungen kann das Verfahren sicher und ohne übermäßigen Aufwand angewandt werden.

2. Eine Risiko-Nutzen-Abwägung erlaubt die Durchführung einer orthotopen Lebertransplantation erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Leberinsuffizienz. Die durch das Fortschreiten der Erkrankung sich entwickelnden oder stattgehabten Komplikationen reduzieren den Behandlungserfolg. Das Verfahren der Hepatozytentransplantation kann hingegen geplant, dosierbar und gegebenenfalls in mehreren Zyklen vollzogen werden. Eine zu erwartende geringere Komplikationsrate spricht für ein frühes Eingreifen in ein Krankheitsgeschehen.[84]

3. Nach einer orthotopen Lebertransplantation ist unter einer lebenslangen Immunsuppression die Balance zwischen erhöhter Infektlabilität und dem Risiko einer Abstoßung zu halten. Nach einer temporären Unterstützung durch eine Hepatozytentransplantation kann in bestimmten Fällen die Immunsuppression, nachdem eine regenerierte Leber ihre Aufgaben wieder übernommen hat, abgesetzt werden. Die eingebrachten Zellen würden vom Körper als fremd erkannt und abgeräumt.

4. Es werden, um dem Mangel an Spenderorganen entgegenzuwirken, marginale Organe zur orthotopen Lebertransplantation verwandt, mit der Folge einer erhöhten Rate an Komplikationen.[85, 86] Mittlerweile ist es mehreren Forschungsgruppen gelungen, Zelllinien zu entwickeln, die als Anwärter für eine einsetzbare hepatozytenähnliche Zelle zur Zelltransplantation in Frage kämen. Als mögliche Zellquelle werden diskutiert:

- fötale Leberzellen [87],
- hepatische Vorläuferzellen oder Stammzellen [88, 89],
- immortalisierte Hepatozyten [44, 90, 91, 92, 93, 94],
- genetisch modifizierte autologe Hepatozyten [15, 84] und
- xenogene Leberzellen [74].

Eine durchaus vielversprechende Zellreihe ist in der Arbeitsgruppe um Ruhnke in Kiel entwickelt worden. In Veröffentlichungen von 2005 in *Transplantation* [95] und *Gastroenterology* [96] waren die Ergebnisse einer erfolgreichen Forschungsarbeit berichtet worden. Diese sogenannten NeoHep-Zellen zeichnen sich *in vitro* und *in vivo* durch eine metabolische Funktion aus, die quantitativ und qualitativ vergleichbarer primärer humaner Hepatozyten ist. Sie werden aus Monozyten des peripheren Blutes gewonnen und nach einer Dedifferenzierung zu hepatozytenähnlichen Zellen redifferenziert. Unter Verwendung von NeoHep-Zellen wäre analog zur präoperativen Eigenblutspende eine Eigenzellspende vor ausgedehnten Leberresektionen denkbar. Nach dem Differenzierungsprozeß könnten die NeoHep-Zellen im Falle einer dekompensierten postoperativen Leberinsuffizienz reimplantiert werden.

Konzeptionell erweitern lassen sich die Anwendungsmöglichkeiten, wenn die Hepatozytentransplantation von leberzellähnlichen Zellen mit dem Verfahren der Kryokonservierung kombiniert werden könnte. Eine zeitlich gut planbare Therapieoption aufgrund der Verfügbarkeit tiefgefrorener, hepatisch aktiver Zellen ließe ein Therapiergime zu, das das Risiko grenzwertiger Lebereingriffe minimiert.

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, ein Instrument für zukünftige Forschungsvorhaben zu entwickeln. Wir untersuchten im Modell der Wistarratte unterschiedliche Implantationsorte, -zeitpunkte und eruierten schließlich die ideale Zellzahl, um einen Überlebensvorteil nach Induktion einer subletalen Leberschädigung zu erreichen. Mit Hilfe dieses Modells ist es möglich, alternative Zellquellen und Konservierungsmöglichkeiten auf ihre Funktion *in vivo* zu evaluieren.