

Aus der Abteilung der Allgemein- Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Evaluation der Applikationsrouten für die
Leberzelltransplantation im Großtiermodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kirsten Eva Annedore Steinz

aus

Gießen

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. I.M. Sauer
 2. Prof. Dr. med. S. Jonas
 3. Priv.-Doz. Dr. med. U. Teichgräber

Datum der Promotion: 03.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Lebertransplantation	1
1.2 Die Leberzelltransplantation	1
1.2.1 Vergleich von Leberzell- und Ganzorgantransplantation	2
1.2.2 Geschichtliche Entwicklung der Leberzelltransplantation	3
1.3 Applikationsrouten	4
1.3.1 Zellintegration	5
1.3.2 Nachweismethoden transplanteder Hepatozyten	6
1.4 Leberzelltransplantation im Tiermodell	8
1.4.1 Leberzelltransplantation im Großtiermodell	9
1.4.3 Leberzelltransplantation in die Milz am Großtier	10
1.5 Fragestellung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Herstellernachweis der Reagenzien	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellisolierung, Zellmarkierung und Zelltransplantation	15
2.1.3 Geräte- und Softwarenachweis	16
2.1.4 Herstellernachweis der Antikörper	17
Primärantikörper	17
Sekundärantikörper	17
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-Sonden	17
2.2 Verwendete Tiere	17
2.2.1 Spendertiere	18
2.2.2 Empfängertiere	18
2.3 Explantation der Spenderleber	18
2.3.1 Zellisolierung	19
2.3.2 In vitro Markierung der Hepatozyten mit Eisenoxid-Partikeln	21
2.4 Zelltransplantation	22
2.4.1 Applikation via V. portae	23
2.4.2 Applikation via A. gastroepiploica	23
2.4.3 Intrasplenische Applikation	24
2.5 Medikation der Versuchstiere	24
2.6 Histologische Aufarbeitung der Gewebeprobe	25
2.6.1 Organentnahme und Fixierung der Gewebeprobe	25

2.6.2 Paraffinschnitte	26
2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
2.6.4 Berliner-Blau-Färbung	27
2.6.5 Immunhistologie an Paraffinschnitten	28
2.6.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung	30
2.6.7 Elektronenmikroskopie	31
2.6.8 Polymerase Kettenreaktion	31
2.7 In vitro Analyse	32
2.7.1 Partikelbeladung	32
2.8 Bildgebende Verfahren	32
2.9 Statistische Analyse	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Zellisolierung	34
3.2 Charakterisierung der Spenderhepatozyten vor Transplantation	34
3.3 Evaluation der Applikationsrouten	35
3.3.1 Evaluation der Zelladministration mittels bildgebender Verfahren	36
3.3.2 Klinische Auswirkungen der Applikationsroute	37
3.4 Untersuchung der Applikationsrouten anhand histologischer Ergebnisse	39
3.4.1 Zellapplikation via V. portae	40
3.4.2 Zellapplikation per direkter Milzinjektion	42
3.4.3 Zellapplikation via A. gastroepiploica	44
3.4.4 Eindeutige Verifizierung der Spenderhepatozyten	46
3.5 Komplikationen	48
3.6 Abschließender Vergleich der Applikationsrouten der LCT	49
4 Diskussion	51
4.1 Hepatozelluläre Transplantation im Großtiermodell	51
4.1.2 Vorbedingungen der Versuchsdurchführung	51
4.1.3 Immunsuppression	53
4.1.4 Zellmarkierung mit MPIO-Partikeln	55
4.1.5 Nachweismethoden transplanteder Hepatozyten	55
4.2 Intraportale Zelltransplantation	56
4.2.1 Zelltransplantation in die Milz	58
4.2.2 Hepatozytentranslokation über das portovenöse System im Empfängerparenchym	61
4.2.3 Verbleib nicht integrierter Spenderhepatozyten	61
4.3 Ausblick	62

5 Zusammenfassung	64
6 Literaturverzeichnis	66
7 Publikationsliste	75
8 Danksagung	76
10 Selbständigkeitserklärung	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leberexplantation und Zellisolierung	20
Abbildung 2: Medikationsplan für alle Empfängertiere	25
Abbildung 3: Rekultur nativer und markierter porciner Hepatozyten im SlideObserver	34
Abbildung 4: In vitro Daten der porcinen Hepatozyten	35
Abbildung 5 : Zelldetektion im MRT	37
Abbildung 6: Transaminasen, Thrombozyten, Leukozyten und Harnstoff der Versuchstiere	39
Abbildung 7: Histologische Auswertung nach intraportaler LCT	40
Abbildung 8: Gewebeproben nach intraportaler LCT	41
Abbildung 9: Histologische Auswertung nach intrasplenischer LCT	42
Abbildung 10: Histologische Gewebeproben aus der Milz	43
Abbildung 11: Histologische Auswertung nach intraarterieller LCT	44
Abbildung 12: Gewebeproben nach intraarterieller LCT	45
Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Milzgewebsprobe	46
Abbildung 14: Histologische Korrelation der Signalauslöschung in der Leber nach intraportaler Applikation, ausgelöst durch MPIO	47
Abbildung 15: Vergleich der Zellintegration in die Leber nach den verschiedenen Applikationsrouten	48
Abbildung 16: Vergleich der Applikationsrouten	50
Abbildung 17: Cyclosporin A Serumspiegel der Empfängertiere	55

1 Einleitung

1.1 Die Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) ist derzeit die einzig etablierte Therapie und somit Goldstandard zur Behandlung eines terminal akuten oder chronischen Leberversagens^{1,2}. Diese Behandlungsform ist jedoch mit einer relevanten Morbidität und Mortalität behaftet^{3,4}. Darüber hinaus besteht eine Diskrepanz zwischen Bedarf und Angebot an Spenderlebern und somit ein ausgeprägter Organmangel⁵. Die Vergabe von Spenderorganen erfolgt in Deutschland sowie Niederlande, Belgien, Luxemburg, Österreich, Slowenien und Kroatien durch die Organisation Eurotransplant. Im Jahr 2010 warteten 2695 Patienten im Gebiet von Eurotransplant auf eine OLT, dem standen 2415 registrierte Organspender gegenüber. Nicht alle Spender eigneten sich zur Leberspende. 2010 wurden 1734 Lebern transplantiert; zahlreiche Patienten verstarben im selben Jahr, in welchem sie auf eine Spenderleber warteten. Darüber hinaus werden nicht alle gespendeten Lebern auch transplantiert; 128 registrierte Spenderlebern konnten 2010 nicht verwendet werden⁶. Diese Organe werden meist aufgrund der schlechten Organqualität abgelehnt, die oft erst bei der Organentnahme vollständig beurteilt werden kann. So führen z.B. eine Steatosis hepatis von mehr als 30% sowie ausgeprägte Fibrose⁷ oder vorher unbekannte Malignome zu einer Ablehnung. Außerdem wurde die Indikation zur OLT in den letzten Jahren breiter gefasst, wodurch sich die Zahl der potentiellen Empfänger erhöht hat. In Anbetracht des Mangels an Spenderorganen und der Risiken einer OLT werden alternative Therapieoptionen immer wichtiger. Die Leberzelltransplantation (LCT) stellt eine für bestimmte Erkrankungen potentielle Alternative zur OLT dar^{8,9}.

1.2 Die Leberzelltransplantation

Die LCT zielt auf eine Repopulation des geschädigten Organs mit autologen oder allogenen Zellen ab. Nach Leberzellisolierung aus einer Spenderleber oder einem Lebersegment erfolgt die Applikation von isolierten Leberzellen meist über Infusion in ein Blutgefäß oder direkt ins Organparenchym. Die applizierten Zellen sollen entweder in der Leber oder ektopen Transplantationsorten anwachsen und die

Lebersynthese, aber auch die Detoxifikationsfunktion der Leber, unterstützen. Diese Therapie kann zu einer verbesserten Stoffwechsellage führen; fehlende Lebersyntheseprodukte können so gebildet werden. Die Indikation zur LCT wird im Rahmen von Studien bei genetisch bedingten metabolischen Lebererkrankungen, chronisch terminaler Leberinsuffizienz, beim akuten Leberversagen und bei hepatischer Insuffizienz nach Leberteileresektion gestellt ¹⁰.

1.2.1 Vergleich von Leberzell- und Ganzorgantransplantation

Bei einer LCT könnte im Gegensatz zur OLT ein kleinerer Anteil der Leber für eine Therapie ausreichend sein. Ein Spenderorgan könnte so für mehrere Empfänger ausreichen. Zudem können beispielsweise bei klinischer/ laborchemischer Verschlechterung des Patienten mittels LCT Zellen wiederholt und mit zeitlichem Abstand transplantiert werden. Die LCT erweitert auch den Anwendungsbereich der Leberlebenspende, da nur ein Teil der Leber benötigt werden würde. Ferner könnten Leberzellen zur zeitlichen Überbrückung bis zur OLT, dem so genannten „Bridging to transplantation“, dienen. Dies ermöglicht eine längere Wartezeit auf ein Spendeorgan oder ermöglichen der Patientenleber eine Regeneration. Während bei einer OLT die Spendeleber in einem Zeitraum von 16-24 Stunden transplantiert werden muss, können isolierte Leberzellen in einer Zellkultur oder mittels Kryokonservierung gelagert und so bei Bedarf verwendet werden ^{11,12}. Im Gegensatz zur OLT beinhaltet die LCT einen wesentlich kleineren chirurgischen Eingriff, die Applikation der Zellen kann über einen Venenkatheter oder laparoskopisch bzw. über eine Minilaparotomie erfolgen. Dies verringert eine mögliche Morbidität. Ferner kostet eine LCT nur etwa 10% einer OLT. Ein Teil der Lebern, der für die OLT nicht zu verwenden ist, könnte als Zellquelle für die LCT dienen ¹³. Bei einer LCT verbleibt die eigene Leber *in situ*. Ebenso kann die Leber im Falle einer metabolischen Grunderkrankung als Reservoir für eine zukünftige homologe LCT nach z.B. Gentherapie dienen. Die LCT hat zum Ziel, die metabolische Dysfunktion zu korrigieren, ohne das Organ als Ganzes zu ersetzen ⁹. Weltweit wurden über 80 Fällen berichtet, in denen die LCT eine humane Anwendung fand ⁹. Die Anzahl der bisher mit LCT behandelten Patienten ist ebenso durch den Organmangel limitiert. Als alternative Zellquelle können allerdings zusätzlich Lebersegmente verwendet werden, die bei einer Organspende mit einem Splitleberverfahren nicht transplantiert werden (Segment IV). Ein Vorteil so gewonnener Zellen ist eine höhere Zellviabilität

im Vergleich zu Zellen aus abgelehnten Spenderorganen^{14,15}. In Anbetracht der geschilderten Vorteile erscheint die LCT als vielversprechende Alternative in der Therapie vieler Erkrankungen der Leber. Für ein besseres Verständnis der Mechanismen nach Transplantation und der Komplikation je nach Applikationsart bedarf es weiterer Studien.

1.2.2 Geschichtliche Entwicklung der Leberzelltransplantation

Der Grundstein für die LCT wurde bereits in den 1930er Jahren gelegt. Leberteilstücke wurden im Tierversuch auf Empfängertiere übertragen¹⁶. Böck und Popper transplantierten Leberfragmente in die vordere Augenkammer¹⁷. Die transplantierten Leberfragmente degenerierten und waren schon bald nicht mehr nachzuweisen. Ein Meilenstein in der Weiterentwicklung der LCT war 1969 die Etablierung eines Protokolls zur Leberzellisolierung von Berry und Friend und seine Modifikation nach Seglen^{18,19}. Nach diesem Protokoll wurde die Leberzellisolierung mittels *in situ* Kollagenaseperfusion durchgeführt. Initiale Versuche zur LCT wurden mit den so gewonnenen Zellen vorgenommen. Am Modell der Gunn-Ratte wurden Leberzellen in die Portalvene oder subkutan appliziert. Gunn-Ratten tragen einen dem Crigler-Najjar-Syndrom ähnlichen Gendefekt, der zu einer Hyperbilirubinämie führt. Die Stoffwechsellage der Versuchstiere konnte signifikant verbessert werden^{20–22}. Mito *et al.* berichteten über die erste LCT beim Menschen 1992. 10 Patienten mit Leberzirrhose oder chronifizierter Hepatitis wurden in Japan mittels LCT behandelt. Die Leberzellen wurden direkt ins Milzparenchym injiziert²³. Ein Jahr später wurden fetale humane Hepatozyten in den Peritonealraum von Patienten mit fulminantem Leberversagen transplantiert, mit einer verbesserten Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LCT²⁴. Die erste Transplantation via Arteria (A.) gastroepiploica erfolgte bei einem Kollektiv von vier Patienten mit chronisch-terminaler Leberinsuffizienz und akuter Dekompensation, sowie neun Fällen von fulminantem hepatischem Versagen. Alle Patienten erhielten die Zelltransplantation in Erwartung einer OLT. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte jedoch kein signifikanter Vorteil in der Mortalität festgestellt werden. Bei einigen Patienten führte die LCT zu einer Verbesserung der klinischen Parameter, wie Harnstoff im Serum, zerebrale Durchblutung und dem Enzephalopathie-Score. Die Implantation erfolgte in Portalvene, Milz und andere ektopye Orte¹³. Mit der ersten humanen Lebertransplantation 1963 trat des Forschungsinteresse im Bereich der LCT erstmal

wieder in den Hintergrund ²⁵. Die OLT als Goldstandard verzögerte eine weitere Forschung im Bereich der LCT.

1.3 Applikationsrouten

Die Ätiologie der Lebergrunderkrankung bedingt unterschiedliche Anforderungen an eine Therapie mittels LCT, da der Zustand der Patienten und des Leberparenchyms stark variieren. Patienten mit metabolischer Lebererkrankung sind teilweise in ihrem Gesundheitszustand nur wenig beeinträchtigt und haben keine zirrhotischen Veränderungen, während Patienten im chronisch-terminalen Leberversagen Veränderung der Leberinnenarchitektur aufweisen. Dies kann wesentliche Auswirkungen auf die Konditionen und den Erfolg einer Übertragung von Hepatozyten haben ¹². Der am häufigsten verwendete Applikationsweg einer LCT ist die Portalvene. Dieser Weg ist jedoch insbesondere bei Behandlung des chronisch-terminalen Leberversagens kritisch. Da die Leberzirrhose häufig eine portale Hypertension verursacht, könnte die zusätzlicher Applikation von Hepatozyten dieses Phänomen noch verstärken. Darüber hinaus kann es zur Embolisation von Zellen im Lungengewebe kommen ^{26,27}. Muraca *et al.* untersuchten den Aspekt der Quantität der intraportalen Zellapplikation und die Korrelation mit portaler Hypertension und hämodynamischen Auswirkungen sowohl in der Portalvene als auch im pulmonalen System am Schwein. Es zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen Zellzahl und Portaldruck und eine inverse Korrelation zwischen Zellzahl und Portalvenenfluss. Der Portalvenenfluss sank um 23-63% von den Basiswerten. Außerdem zeigten sich Hepatozyten in Lungensinusoiden, in einem Fall kam es zum basalen Lungeninfarkt. Bis zu 2,4% der totalen Lebermasse könnten demnach im Großtiermodell infundiert werden ²⁸. In der zirrhothischen Leber ist die Integration der Hepatozyten mangels normaler Leberumgebungsfaktoren ebenfalls gestört. Es ist nicht sicher geklärt, ob Hepatozyten über einen längeren Zeitraum im abnormalen zirrhothischen Lebergewebe funktionieren können ^{8,9,23,29}. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Gefahr der Bildung von Mikroembolisationen. In einer klinischen Anwendung der LCT von Quaglia *et al.* fanden sich bei fünf von sieben Patienten nach einer repetitiven Hepatozyteninfusion intrahepatische Thrombosen. Diese fast das gesamte Gefäßlumen obliterierende Thromben waren bis zu 197 Tage nach LCT sichtbar. Auch in Tierstudien wurden Mikrothromben nach intraportaler LCT festgestellt ^{30,31}. Intrahepatische porto-portale Shunts in der zirrhothischen Leber könnten einen

effizienten Austausch zwischen Hepatozyte und Blutplasma verhindern. Die Applikation von weiteren Hepatozyten wäre in diesem Fall fraglich³². Auch bei einer nicht zirrhotischen Leber können Komplikationen wie portale Hypertension und Mikrothrombenbildung entstehen. Wegen der beschriebenen Probleme wurden alternative Applikationsorte untersucht: die Milz, das Pankreas, die subrenale Kapsel, die Magenschleimhaut, omental, subkutan oder peritoneal^{5,12,33–36}. Die ektopye Transplantation von Hepatozyten birgt im Vergleich zur intraportalen Applikation den Vorteil, dass in den alternativen Transplantationsorten meist eine große Quantität an Zellen, teils mit minimal-invasiver Technik, transplantiert werden kann³⁵. Die Milz stellt eine adequate Alternative insbesondere bei Patienten mit chronisch-terminalen Leberversagen dar¹². Sie bietet eine große Kapazität als Transplantationsort, v.a. bei zirrhotisch veränderter Lebermikroarchitektur. Nachteil einer Applikation in die Milz könnte jedoch das immunologische Umfeld sein³². Der Applikationsweg per direkter Injektion ins Parenchym oder in die Milzarterie wirkt sich unterschiedlich auf den Erfolg einer Implantation aus³³. Die Milz hat sich unter allen nicht hepatischen Organen als bester Applikationsort erwiesen. Obwohl der Applikationsweg der Hepatozyten für den Erfolg der LCT mitentscheidend ist^{33,37}, ist nicht eindeutig geklärt, welche Applikationsroute die geringsten Nebenwirkungen hat. Der effizienteste und sicherste extrahepatische Transplantationsort für das akute und chronische Leberversagen ist noch nicht identifiziert³⁷. Für die weitere klinische Anwendung der LCT ist es wichtig, im Tiermodell mögliche Applikationsrouten, insbesondere auf Mikrothrombenbildung, der portalen und lienealen Thrombose und letztlich der Nidation der transplantierten Hepatozyten zu untersuchen.

1.3.1 Zellintegration

Die Leber bietet natürlicherweise eine ideale Umgebung für transplantierte Hepatozyten, da hier die entsprechende extrazelluläre Wachstumsmatrix, Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Interaktion vorhanden sind. Bei intraportaler Applikation oder Translokation von Zellen ins Portalstromgebiet besteht ein grundlegendes Problem in der Translokation der Zellen von den Portalsinusoiden in die Mikroumgebung der Leber. In der Leber angekommen können transplantierte Hepatozyten lange überleben^{38–40}. Ein Hepatozyt ist durchschnittlich 20–40 µm groß und bleibt in den Sinusoiden mit einer Fensterung von ca. 6–9 µm hängen. Dies verursacht hämodynamische Veränderungen und einen transienten Ischämie-

Reperfusionsschaden. Kupfferzellen werden aktiviert, und es kommt zur Freisetzung von TNF-alpha, die vaskuläre Permeabilität wird erhöht. Dadurch können sich Hepatozyten am aktivierten Endothel festheften und translozieren^{27,41,42}. Bei der Zellisolierung und Vorbereitung wird durch die Manipulation an den Zellen und die Leberischämiezeit Apoptose induziert. Die LCT erfolgt daher mit einer Mischung aus vitalen und avitalen Hepatozyten. Im Rattenmodell wurde gezeigt, dass 60-70% der transplantierten Zellen im Portalstromgebiet verbleiben^{43,44}. Viele transplantierte Hepatozyten translozieren nicht in die Empfängerleber, sondern werden vom retikuloendothelialen System beseitigt oder verlieren bereits nach der Transplantation im Portalstromgebiet ihre Vitalität. Das Ergebnis einer LCT hängt also wesentlich von der Translokation der Hepatozyten ins Lebergewebe oder der Induktion eines Wachstumsvorteils der transplantierten Hepatozyten ab⁴⁵. Insgesamt überleben weniger als 20-30% der transplantierten Hepatozyten in der Leber der Empfängertiere⁴⁶. Ein Hindernis in vielen bisherigen Studien war die non-invasive Überwachung der transplantierten Leberzellen. Je nach Applikationsweg sind die Quantität der translozierten Hepatozyten und die verbleibenden Emboli im Portalgebiet von zentraler Bedeutung für den Erfolg der LCT. Wenig ist bisher bekannt über die Mechanismen, die der Zellapplikation in der Milz folgen, obwohl die Milz einer der häufigsten ektopen Transplantationsorte für die LCT ist^{8,9}.

1.3.2 Nachweismethoden transplantierter Hepatozyten

Der exakte Mechanismus für das Anwachsen der Zellen nach LCT ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Marker zur Detektion und Verfolgung der transplantierten Zellen sind deswegen unerlässlich. Die Verfolgung der Hepatozyten nach LCT ist eine der großen Herausforderungen für die regenerative Therapie^{47,48}. Bei metabolischen Erkrankungen der Leber kann die Funktion der transplantierten Hepatozyten anhand der Veränderungen der Serummetaboliten des zugrundeliegenden Defektes nachgewiesen werden. Dies bietet aber keinen verlässlichen Schluss auf die Anzahl und Verteilung der Hepatozyten⁴⁹. In ektopen Organen ist die Lokalisation der Leberzellen durch lichtmikroskopischen Nachweis mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung gelungen⁵⁰. Die Verfolgung der transplantierten Hepatozyten in der Leber ist schwierig. In verschiedenen transgenen Tiermodellen wurden genetische Marker entwickelt, so z.B. im Dipeptidylpeptidase-IV-Fischer-344 Rattenmodell und in einem transgenen Mausmodell mit der Expression des Hepatitis

B Oberflächen-Antigens. In einem Mausmodell wurden Mäuse mit β -Galactosidase Gen Expression generiert ^{40,51,52}. Exogene Zellmarker wie der Fluoreszenzfarbstoff Diocetadecyl-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat wurden untersucht. Der Nachteil dieser Markierung ist, dass er in transplantierten Hepatozyten nur eine kurzfristige Nachverfolgung der Zellen erlaubt, da er metabolisiert wird ⁵³. Die transplantierten Hepatozyten können im Lebergewebe durch Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Diese Methoden können allerdings beim Menschen nicht angewendet werden, da sie nicht zugelassen sind. Bei einer kreuzgeschlechtlichen Transplantation kann schließlich das Y-Chromosom als Marker, im Rahmen einer FISH-Untersuchung, verwendet werden ^{54,55}. Ein Nachteil dieser Zellmarker ist, dass die Darstellung der transplantierten Hepatozyten nur durch invasive Maßnahmen, wie z.B. eine Probenbiopsie oder Laparotomie, möglich ist. Ein Nachweis *in vivo* ist nicht durchführbar. Eine Biopsie ist verbunden mit einem Morbiditätsrisiko, gleichzeitig kann nur ein kleiner Ausschnitt der Leber und nur zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen werden ⁵⁶. Gupta *et al.* verwendeten die Radioisotope, wie ¹¹¹-Indium oder ^{99m}-Technetium ^{57,58}. Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der *in vivo* Beobachtung der LCT. Allerdings ist auch hier die Verfolgung nur für eine kurze Zeit nach der Transplantation möglich, da sich die Isotope auf andere Zellen übertragen können und zerfallen ⁵⁹. Darüber hinaus bedeutet diese Methode eine Strahlenbelastung für den Patienten. Die Zellmarkierung mit *in vitro* Kontrastmitteln und Zelldetektion *in vivo* im Magnetresonanztomographen (MRT) stellt zur Zeit den wohl vielversprechendsten Ansatz dar ^{56,60}. Eine solche Zellmarkierung ist mit superparamagnetischen-Eisenoxid Partikeln (SPIO) möglich. Die Markierung mit SPIOs führt zu einem hypointensen Signal in der T2/ T2*-Wichtung und ermöglicht eine *in vivo* Darstellung der SPIO markierten Zellen im MRT ⁶¹. Die Detektion von Hepatozyten durch Techniken, die auch beim Menschen unter klinischen Bedingungen verwendet werden, insbesondere entsprechende Magnetresonanztomographen, Magnetspulen oder Untersuchungssequenzen erfordert eine hohe Relaxivität. Im Vergleich zu SPIO weisen mikroskalige-Eisenoxid Partikel (MPIO) bei gleichem Eisengehalt eine höhere Relaxivität auf ⁶². Mit der Verwendung von MPIO Partikeln war in Studien eine Einzelzelldarstellung möglich ⁶³. Ein Protokoll zur Markierung primärer humaner Hepatozyten mit MPIOs wurde bereits etabliert, ohne negative Auswirkungen auf Zellviabilität, Zellschädigung oder metabolische Aktivität ⁶⁴. Vorteil einer Zellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln ist die

dauerhafte histologische Kontrolle der MRT Ergebnisse mit einer Anfärbung in Berliner-Blau^{64,65}. Die langfristige Verfolgung von Hepatozyten nach LCT ist eine Herausforderung und bietet die Möglichkeit, vor weiterer klinischer Anwendung die Applikationswege in Bezug auf ihre Auswirkungen auf Milz, Leber und andere Organe zu untersuchen.

1.4 Leberzelltransplantation im Tiermodell

Nach erfolgreichen initialen Versuchen an Kleintieren mit metabolischen Erkrankungen oder mit chronischem bzw. bei akutem Leberversagen war die Erwartung einer baldigen, ähnlich erfolgreichen Anwendung im humanen Bereich sehr hoch. Es gibt verschiedene Mausmodelle mit transgenen Tieren, die metabolischen Erkrankungen beim Menschen ähnlich sind. Eine spontane Mutation der Gunn-Ratte wird als Modell für das Crigler-Najjar-Syndrom Typ I verwendet, wie 1976 von Matas *et al.* Im Gunn-Ratten Modell wurde nachgewiesen, dass durch die intraportale LCT mit Hepatozyten, die heterozygot für die Diphosphonat-Gluconeryltransferase waren, eine Reduktion im Plasmabilirubinspiegel erzielt werden konnte²¹. Am Watanabe-Hasen, einem Tiermodell mit vererbbarer Hyperlipidämie, führte die LCT mit allogenen Hepatozyten zu einer sechsmonatigen Reduktion des Serumcholesterolspiegels um 40%^{66,67}. Kobayashi *et al.* führten Studien an Ratten durch, an einem Modell des chronischen Leberversagens mit zirrhotisch verändertem Leberumbau. Die intrasplenisch durchgeführte LCT führte zur signifikanten Verbesserung der Prothrombinzeit, des Bilirubinspiegels, des Ammoniakspiegels und des Enzephalopathiescores. Die intrasplenische LCT verbesserte die Leberfunktion und verlängerte das Überleben⁶⁸. In einer Studie an der Long-Evans-Cinnamon-Ratte, einem Modell für den Morbus Wilson, wurde nach intrasplenischer LCT eine Verbesserung der Serumceruloplasminspiegel nachgewiesen. Es kam zu einer Leberrepopulation mit transplantierten Hepatozyten, was zu einer nachhaltigen Verbesserung der Kupfer-Homöostase führte⁶⁹. Viele Kleintierstudien haben Erkenntnisse über die Leberrepopulation mit transplantierten Hepatozyten gegeben. Genetisch modifizierte Hepatozyten wurden transplantiert und eine Vielzahl an Schädigungsmodellen etabliert⁷⁰⁻⁷⁴. Hepatozyten wurden in verschiedene Applikationsorte transplantiert (vgl. Abschnitt 1.3). Beim Kleintier erfolgte die Applikation der Zellen meist intrasplenisch. Obwohl im Kleintiermodell die Effektivität der LCT in der Behandlung metabolischer Lebererkrankungen und

des Leberversagens nachgewiesen wurde, bleiben die Ergebnisse in der humanen Anwendung hinter den Erwartungen aus den Tierversuchen zurück. Es bleiben viele Fragen in Bezug auf Zellintegration, technische Verbesserungen oder Langzeitüberleben der transplantierten Hepatozyten offen^{8,9,29,30,66,75}.

1.4.1 Leberzelltransplantation im Großtiermodell

Bei weitem die meisten Experimente zur LCT wurden am Kleintier durchgeführt. Für die Entwicklung und Verbesserung von sicheren klinischen Protokollen ist die Anwendung am Großtier unerlässlich⁷⁶. Zu Beginn der 80er Jahre wurden erste Versuche an Großtieren durchgeführt. Verschiedene Applikationswege, Methoden der Zelltherapie und Zelnachverfolgung wurden getestet. Grossmann *et al.* untersuchten die Applikation via *V. mesenterica inf.* am nicht-humanen Primaten. Als kurzfristige Nebenwirkungen ergab sich ein transients portaler Hypertonus. In der drei- bis sechsmonatige Nachüberwachungsphase kehrten alle Laborwerte innerhalb einer Woche nach Eingriff zu Normwerten zurück³¹. In weiteren Experimenten wurde die Applikation via *V. mesenterica inf.* mit einer teilweisen Embolisation kombiniert, um einen Proliferationsvorteil für die transplantierten Zellen zu schaffen^{77,78}. Die intraportale Applikation wurde an verschiedenen Großtieren untersucht. Kocken *et al.* wiesen bei Hunden einen drei- bis vierfachen Anstieg des portalen Druckes, sowie ein Absinken des Portalvenenflusses nach. Eine repetitive Applikation von Hepatozyten nach zwei Wochen führte bei allen Versuchstieren durch portale Hypertension und Portalvenenthrombose zum Tod, eine Applikation nach acht Wochen wurde toleriert²⁶. Auch Muraca *et al.* untersuchten die hämodynamischen Nebenwirkungen einer intraportalen Applikation und wiesen ähnliche Ergebnisse auf²⁸. Androletti *et al.* führten die portale Applikation in Kombination mit einer *ex vivo* Gentherapie im Affenmodell durch. Die Zellinfusion erfolgte mittels eines Portalvenenkatheters. Vier Tage nach der Transplantation konnte bei einem Affen ein Anteil von 0,5-2% der Lebermasse an transplantierten Zellen nachgewiesen werden⁷⁹. Experimente zur Verteilung und Integration von Hepatozyten nach intraportaler Applikation an Primaten wurden von Vons *et al.* durchgeführt. Sie zeigten keine histologischen Anzeichen für Leberschädigung. Allerdings konnten nur bei einem Teil der Tiere markierte Hepatozyten nachgewiesen werden; bei drei von 13 Versuchstieren wurde ein maximaler Anteil von 0,5-1,8% gefunden⁸⁰. Auf Basis eines Polyvinyl-Alkoholschwammes als prävasikularisiertes Implantationsbett für die

LCT führten Takeda *et al.* Versuche am Dalmatiner durch. Dalmatiner haben einen genetischen Defekt mit erhöhten Harnsäureserumspiegel und erhöhter Harnsäureausscheidung im Urin (Unfähigkeit Harnsäure zu Allantoin zu metabolisieren). Als Wachstumsmatrix für die Hepatozyten wurden die oben genannten Schwämme im Omentum oder Mesenterium platziert, eine Woche später erfolgte die LCT mit allogenen Spenderzellen. Nach zwei und sechs Wochen konnte eine signifikante Reduktion der Harnsäure im Urin nachgewiesen werden, nach 12 Wochen fanden sich keine viablen Hepatozyten. In vorhergehenden Versuchen an Schweinen wurden Polyvinyl-Alkohol-Schwämme subkutan und präperitoneal platziert. Subkutan war durch erhöhten Druck keine Implantation der Zellen möglich, bei mesenterialer Applikation kam es zur Adhäsionsbildung und mesenterialen Reizung^{81,82}. Einkapselte Hepatozyten wurden xenogen und allogenen ebenfalls ins Peritoneum transplantiert, und ihre Funktion konnte für 15 Tage nachgewiesen werden⁸³. Chen *et al.* wählten die direkte mehrfache Leberpunktion als Transplantationsort für genetisch modifizierte Hepatozyten⁸⁴. Im Kleintier wurde die intrasplenische Applikation mit widersprüchlichen Ergebnissen bevorzugt. Beim Großtier hingegen untersuchten nur wenige Studien diesen Applikationsweg und seine Komplikationen.

1.4.3 Leberzelltransplantation in die Milz am Großtier

Grundlagen der Großtierstudien zur ektopen LCT mit Zellapplikation in die Milz wurden von Nordlinger *et al.* gelegt. Donor- und Empfängertiere waren Schweine. Bei 18 Tieren erfolgte eine Zellapplikation direkt ins Milzparenchym, bei drei Tieren in eine akzessorische Milzarterie. Wie im Kleintiermodell nachgewiesen, war das Ziel dieser Studie, die Milz als auxiliäre Leber zu verwenden. In einem Versuchstier wurden Hepatozyten bis zu sieben Monaten nach LCT nachgewiesen. Andererseits konnten bei fünf Versuchstieren nach drei- bis sechs Monaten keine Hepatozyten in der Milz dargestellt werden. Diese Tiere hatten eine vergleichsweise geringe Zellquantität, im Vergleich zu den anderen Tieren, transplantiert bekommen. Bei allen Tieren mit intraarterieller Injektion, trat eine Milznekrose auf und sie verstarben⁸⁵. Rivas *et al.* führten Studien an Hunden zur LCT durch und applizierten Zellen in Milzparenchym und die Portalvene, mit minimaler Mortalität und Morbidität. Nach der intrasplenischen Applikation kam es zur Bildung von Mikrothromben im Portalstromgebiet⁸⁶. Nagata *et al.* untersuchten an Schweinen und Affen die

Auswirkung des Applikationsweges auf die Implantation. Dabei wurden an je zwei Schweinen die Milzarterie und das Milzparenchym als Applikationsort verglichen. Es stellte sich heraus, dass bei direkter Injektion die Zellen vermehrt in der Milz implantieren. In der Versuchsgruppe mit intraarterieller Injektion kam es hingegen zu Magenerosion und zu großflächigen Milznekrosen, wohl bedingt durch retrograden Fluss von Hepatozyten, die eine Magenarterie verstopften und gleichzeitig eine Gefäßokklusion in der Milz verursachten. Der Applikationsweg hatte entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Nidation der Hepatozyten in die Milz ³³. Weiterhin untersuchten Nagata *et al.* die Xenotransplantation per direkter Milzinjektion im Affenmodell ⁷⁵. Das akute Leberversagen wurde in einem Schweinemodell, bei hepatektomierten Tieren, von Ambrosino *et al.* untersucht. In dieser Studie wurde die direkte Milzapplikation mit einer porcinen Biomatrix für Hepatozyten, die ins Peritoneum transplantiert wurden, verglichen. Bei den Tieren mit Milzinjektion stellte sich ein signifikanter Überlebensvorteil im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LCT dar, allerdings verstarben alle Tiere nach drei Tagen im hepatorenalem Syndrom. Ein Tier verstarb an einer ausgedehnten Milznekrose nach LCT. Die Tiere mit Biomatrixapplikation zeigten, verglichen mit der Milzinjektion, wiederum einen signifikanten Überlebensvorteil ¹. In einem Modell des chronischen Leberversagens bei einem Affen mit porto-cavalem-Shunt führte eine Implantation per direkter Milzinjektion zu einer Verbesserung der Enzephalopathie und einer Ausbildung von gangartigen Strukturen der transplantierten Hepatozyten in der Milz für acht Monate ⁸⁷. Auch Rosenthal *et al.* untersuchten die Milz als auxiliären Implantationsort. In einer Studie mit 40 Empfängerschweinen stellte sich heraus, dass nur der laparoskopische Zugang zur Milz und die direkte Injektion von Zellen ins Milzparenchym mit zufriedenstellenden Ergebnissen in Bezug auf Komplikationen und Implantationseffizienz verbunden waren. Rosenthal folgerte, dass die Milz als Portal der Zellapplikation für die Leber dienen könnte, die Leber aber der optimale Ort für die Implantation der Zellen sei ⁸⁸. Benedetti *et al.* transplantierten zehn Dalmatiner. Diese erhielten eine LCT mit autologen Mischlingshundhepatozyten per Injektion ins Milzparenchym. Zwei der zehn Versuchstiere verstarben bereits kurz nach der Transplantation an portaler Hypertension und Blutung. Diese beiden Tiere hatten die höchste Zellquantität von $9-10 \times 10^9$ Zellen erhalten. Bei den verbleibenden acht Versuchstieren reduzierte sich das Harnsäureniveau signifikant um 30% für bis zu 90 Tage nach Applikation. Die transplantierten Hepatozyten waren bis zu sechs

Monate nach LCT nachweisbar ⁸⁹. Die widersprüchlichen Ergebnisse der bisherigen Großtierstudien mit lienaler Zellapplikation zeigen, dass ein weiterer Forschungsbedarf besteht. Im Kleintiermodell ist die Milz der häufigste Applikationsort mit vielversprechenden Ergebnissen. Die Studien von Rosenthal *et al.* und Benedetti *et al.* ^{88,89} zeigen, dass die Milz auch im Großtier eine Alternative darstellt. Dennoch bleiben Fragen offen, insbesondere zu den Komplikationen bei den verschiedenen Milzrouten aber auch im Hinblick auf den Implantationserfolg in die Leber. Forschung über ektope Applikationsorte ist unerlässlich, weil in vielen Fällen eine intraportale LCT nicht möglich ist.

1.5 Fragestellung

In bisherigen Großtierstudien wurde gezeigt, dass die LCT durchführbar ist und ektope Transplantationswege eine Alternative zur intraportalen Applikation darstellen. In der klinischen Anwendung beim Menschen ist insbesondere der Applikationsweg kritisch zu bedenken. Ein für das Engraftment der Zellen optimaler Applikationsweg ist in Abhängigkeit von der Grunderkrankung des Patienten unter Umständen mit einem zu hohen Risiko für den Patienten behaftet. So zeigte sich, dass es bei Patienten im akuten Leberversagen bei der interventionellen Anlage eines Katheters in die Pfortader mittels eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shuntsystems aufgrund des vulnerablen Leberparenchyms zu intrahepatischen Blutungen kommen kann ⁹⁰. Mit dieser Arbeit wird eine Bewertung verschiedener Applikationswege vorgenommen, indem der Implantationsort von MPIO markierten Hepatozyten im Großtiermodell variiert wird. Im Detail befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Evaluierung der verschiedenen Applikationsarten via Pfortader, A. gastroepiploica oder durch intrasplenische Applikation von Hepatozyten im Schweinmodell. Was sind die Auswirkungen der LCT und der Applikationsroute im Hinblick auf eine mögliche Leberschädigung oder die Lebersynthese? Was sind die Komplikationen der verschiedenen Applikationsweisen? Welche Rolle spielt die Applikationsart bei der Zellintegration in die Leber und wie lässt sich dies quantifizieren? Wie entwickelt sich der Einfluß der LCT und der Zellen auf die Leber im Zeitraum von drei bis 56 Tagen? Können eindeutig transplantierte Hepatozyten im Empfängertier nachgewiesen werden? Eine weitere wichtige Fragestellung ist der Einfluss der Markierung der Zellen mit MPIO-Partikeln auf die zu transplantierende Zelle. Hat eine Markierung von porcinen Hepatozyten Auswirkung auf den

Zellmetabolismus? Haben markierte Hepatozyten *in vivo* nachteilige Effekte im Vergleich zu nativen Hepatozyten?

Es erfolgt eine Evaluierung der klinischen Komplikationen im Hinblick auf die Applikationsroute und die Zellmarkierung. Welches ist der schonendste Weg, die LCT durchzuführen?

2 Material und Methoden

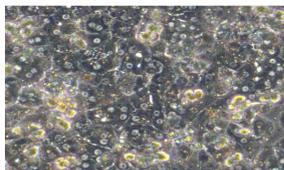
Isolierung, Charakterisierung, Markierung und Transplantation Hepatozyten



Entnahme des Spenderorgans



Isolierung der Hepatozyten

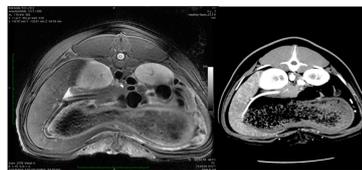


Markierung der Hepatozyten

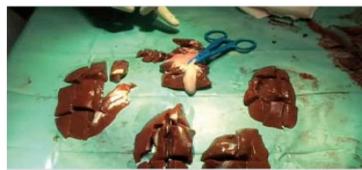


Applikation der markierten Hepatozyten (hier: Pfortader)

Zelldetektion der transplantierten Hepatozyten im MRT und histologische Untersuchung



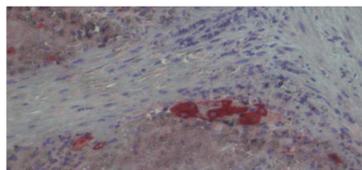
MRT und CT zum Nachweis der markierten Hepatozyten



Gewinnung repräsentativer Proben aus allen Organsegmenten (hier: Leber)



Probennahme Milz



Histologischer Nachweis der markierten Hepatozyten (hier: Milz)

2.1 Herstellernachweis der Reagenzien

In den nachfolgend beschriebenen Versuchsdurchführungen wurden die hier aufgeführten Reagenzien verwendet (in alphabetischer Reihenfolge):

- Aqua dest.: gefiltertes Leitungswasser, Filtersystem Mill-Q® Reagent Water System, Fa. Millipore Molsheim, Frankreich
- Berliner-Blau-Kit: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- BSA (Bovine Serum Albumin): Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- Collagenase P: Fa. Roche Mannheim
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

- Eukitt: Eindeckmedium, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- FCS (Fetales Kälberserum): Fa. Biochrom AG, Berlin
- Fluconazol: Fa. Pfizer Pharma GmbH, Berlin
- Fortecortin: Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- Gadolinium
- Gentamycin: Fa. BioWhittaker Europe, Essen
- Glucose: Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- HEPES Buffer: Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- Histoacryl: Fa. BI Braun, Melsungen
- $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O}$: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Insulin (Human): Biochrom AG, Berlin
- KCL: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- KH_2PO_4 : Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- L-Alanyl-L-Glutamin: Fa. Biochrom AG, Berlin
- $\text{MgSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- NaCl: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Natrium-Pyruvat: Fa. Biochrom AG, Berlin
- NobiFlow GOT-IFCC, HITADO, Möhnesee, Deutschland
- NobiFlow GPT-IFCC, HITADO, Möhnesee, Deutschland
- NobiFlow Harnstoff-UF, HITADO, Möhnesee, Deutschland
- PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, Fa. PAA, Österreich
- Penicillin G: Fa. Yamanouchi Pharma B.V., Niederlande
- Tris: Fa. Serva GmbH, Heidelberg
- Tween: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Vancomycin: Fa. Abbott Deutschland, Ludwigshafen
- Williams' Medium E: Fa. Biochrom AG, Berlin
- Williams' Medium E Waschmedium: Genaxxon Biosciences, Biberach
- Xenetrix 350, Guerbet GmbH, Sulzbach

2.1.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellisolierung, Zellmarkierung und Zelltransplantation

- Auslaufpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml): Falcon® Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- CryoPure Tube (1,8 ml): Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Darmrohr: Ratiomed®, Megro, Wesel

- Deckgläser: Menzel Gläser, Braunschweig
- Einbettkassetten: Fa. Sanowa, Leimen
- Falcon® Röhrchen (50 ml): Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Gasfilter: Sartorius Minisart®: Fa. Sartorius AG, Göttingen
- Heidelberger Verlängerung: Fa. B.Braun AG, Melsungen
- Kulturflaschen: Falcon® Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- MPIOs (micron sized iron oxide particles): Bangs Laboratories, USA
- Neubauerzählkammer: Fa. Brand Gläser, Wertheim
- Prolene® (3-0): nicht-resorbierbares Nahtmaterial, Ethicon®, Fa. Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt
- Safe Seal Tube Micro Tube (1,5 ml): Sarstedt, Nümbrecht
- Super Frost® Plus Objektträger: VWR International, Belgien
- Tabotamp®:
- Venenverweilkatheter (18G, 20G): Vasofix® Braunüle®, Fa. B.Braun AG, Melsungen
- Vicryl® (3-0, 5-0): resorbierbares Nahtmaterial, Ethicon®, Fa. Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt
- Zentraler Venenkatheter (dreilumig 16G, 18G, 18G): Certofix® Trio, Fa. B.Braun AG, Melsungen

2.1.3 Geräte- und Softwarenachweis

- Begasungssystem: DASGIP AG, Jülich
- Brutschrank: Heraeus Instruments, Hanau
- CT: Light speed VCT, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA
- Deltagraph: Version 5.0.1 for Apple Macintosh OS X
- Elektronenmikroskop: EM 906, Zeiss, Jena
- Entwässerungsautomat
- Excel: Microsoft Excel für Mac, Version 2004, V11.3.6. Microsoft Inc.
- Mikroskop Axiovert 40 CFL, Zeiss, Göttingen
- Mikroskop (Licht- und Fluoreszenz) Zeiss, Axio Imager M1, Jena
- Mikrotom
- MRT-Auswertung: OsiriX Version 3.3, www.osirix-viewer.com
- MRT-Scanner: Signa 3T94, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA
- Rollerpumpe: Multiflow Rollerpumpe, Stöckert Instrumente, München

- Sauger: Vacusafe Biosciences, Fa. Integra Biosciences AG, Schweiz
- Software: AxioVision LE software Zeiss, Jena
- SPSS: SPSS Inc., Chicago, IL, USA
- Sterilbank: LaminAir®: HBB 2448, Heraeus Instruments, Hanau
- Vortexer: Neolab® 7-2020, neoLab Migge Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg
- Wasserbad: Köttermann GmbH & CoKG Labortechnik, Uetze
- Zentrifuge: Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Thermo Fisher, UK

2.1.4 Herstellernachweis der Antikörper

Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Cytokeratin 18	Maus, monoklonal	1:20	Abcam 668
Calprotectin	Maus, monoklonal	1:500	Abcam 22506

Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Maus	Kaninchen, monoklonal	1:25	Dako Cytomation, ZO259
Anti-Maus	Schwein, monoklonal	1:25	Dako, Cytomation ZO

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-Sonden

Chromosom s		Bezugsquelle
Y-Chromosom	Porcine IDetect™ IDPR1065	ID Labs Incorporation, London, Ontario, Kanada

2.2 Verwendete Tiere

Alle unternommenen Versuche wurden gemäß den Bestimmungen nach §8 Abs. 1 TierSchG von der Tierversuchskommission geprüft und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, (Genehmigungsnummer: G0110/08) genehmigt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem 24-Stunden Tag/ Nacht Rhythmus innerhalb der tierexperimentellen Einrichtung der

Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum. Die Versuchstiere erhielten das Standardfutter und Wasser *ad libitum*.

2.2.1 Spendertiere

Als Spendertiere zur Gewinnung primärer Hepatozyten für die Transplantation wurden 17 acht Wochen alte männliche Hausschweine der Landrasse (kastriert) mit einem Gewicht von 15-20 kg verwendet. Die Absatzferkel wurden von der Tierhandlung Wolfgang Günther, in Neuenhagen, bezogen.

2.2.2 Empfängertiere

Als Empfängertiere der hepatozellulären Transplantation wurden 51 ca. 18 Monate alte, weibliche Miniaturschweine mit einem Gewicht von ca. 25-31 kg gewählt. Diese wurden von Ellegard A/S Dänemark bezogen.

2.3 Explantation der Spenderleber

Die Spendertiere wurden 15 Stunden vor dem Eingriff nüchtern gehalten, bei Zugang zu Wasser *ad libitum* bis zwei Stunden vor Beginn der Explantation. Die Prämedikation der Spendertiere erfolgte durch intramuskuläre (i.m.) Injektion mit Xylazin (Rompun®, Bayer Vital GmbH 4,8- 5,3 ml), Ketamin (Ursotamin®, Serumwerk 7,6- 8,6 ml) und Azaperon (Stresnil®, JANSSEN Animal Health, 3 ml). Zusätzlich wurden 0,5-0,8 ml 1% Atropin verabreicht. Diese Prämedikation erfolgte nach Standard Operating Procedure (SOP) der Forschungseinrichtung für experimentelle Chirurgie (FEM) der Charité. Ein intravenöser (i.v.) Venenverweilkatheder (20G, Braun) wurde je nach Gefäßstatus entweder am Ohr oder Hinterlauf gelegt. Zur Intubation wurde 2-7 mg/kg Propofol 1% (MCT Fresenius) i.v. verabreicht. Es erfolgte eine mechanische Ventilation und eine Isofluran/Fentanyl-Narkose. Isofluran (0,8- 1,2% (F_i-O_2 variabel von 0,3 bis 1) und Fentanyl (1-3 µg/kg Fentanyl-Bolus zur Anflutung, zur Aufrechterhaltung 1-4 µg/kg/h). Es erfolgte eine mediane Laparotomie vom Processus xyphoideus bis auf Höhe der Harnblase. Das Ligamentum (Lig.) hepatoduodenale wurde dargestellt. Die Portalvene wurde freipräpariert, distal und proximal wurde eine lose Schlinge gelegt (Vicryl 3-0). Die V. splenica wurde aufgesucht, ligiert (Vicryl 3-0) und abgesetzt. Je nach anatomischen Gegebenheiten des Tieres wurde auch die A. hepatica dexter und die V. mesenterica sup. ligiert und abgesetzt. Anschließend erfolgte die Darstellung der V. cava caudalis sie wurde locker angeschlungen (Vicryl 3-0). Die V. cava inferior wurde freigelegt und die

apikalen Haltebänder der Leber durchtrennt. Apikal im Lig. hepatoduodenale wurde der Ductus choledochus aufgesucht. Zunächst wurden zwei Overholts nah nebeneinander aufgesetzt, dazwischen erfolgte die Durchtrennung und Liagtur an beiden Enden (Vicryl 3-0). Austretende Galleflüssigkeit wurde aufgenommen. Danach wurde die A. hepatica communis aufgesucht und die Gefäßscheide dargestellt, sie wurde angeschlungen (Vicryl 3-0). Alle weiteren Strukturen des Lig. hepatoduodenale wurden durchtrennt. In einem Perfusionssystem erfolgte parallel die sterile Vorbereitung einer drei Liter Ringer-Infusion mit 30.000 Einheiten (U) Heparin. Es erfolgte zusätzlich eine systemische Heparinisierung. Der distale Teil der V. portae wurde ligiert (Vicryl 3-0), der proximalen Anteil wurde mit einer Pinzette fixiert. Die V. portae wurde mit einem Skalpell eröffnet und mit einem Darmrohr kanüliert. Das Darmrohr wurde unter Tastkontrolle vorgeschoben und durch Fixation (Vicryl 3-0) in seiner Position gesichert. Anschließend begann die Spülung mit der Ringer-Heparin-Infusion. Sofort nach Beginn der Spülung wurde die V. cava caudalis und die A. hepatica communis ligiert (Vicryl 3-0) und durchtrennt; die V. cava superior distal des Diaphragmas abgesetzt. Zur weiteren Entblutung der Leber wurde mit einem zweiten Beutel drei Liter Ringerlösung ohne Heparin gespült. Das Spendertier entblutete bei diesem Arbeitsschritt unter der Narkose. Die kaudalen Haltebänder der Leber wurden durchgeschnitten. Dann erfolgte die Exstirpation der Leber. Die Leber wurde unter sterilen Bedingungen in den Laborbereich überführt (Abb. 1a und b).

2.3.1 Zellisolierung

Die Isolierung der Hepatozyten erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von van de Kerkhove *et al.*⁹¹ in einer Sterilarbeitsbank. Die Leber wurde in einen mit Gaze überzogenen Glastrichter gegeben. Das Darmrohr, mit dem die V. portae kanüliert wurde, verblieb in der Vene, über dieses erfolgte der Anschluss des Spenderorgans an ein Perfusionssystem zur Zellisolierung (Abb. 1b). Der Perfusionskreislauf wurde durch eine Rollerpumpe angetrieben.

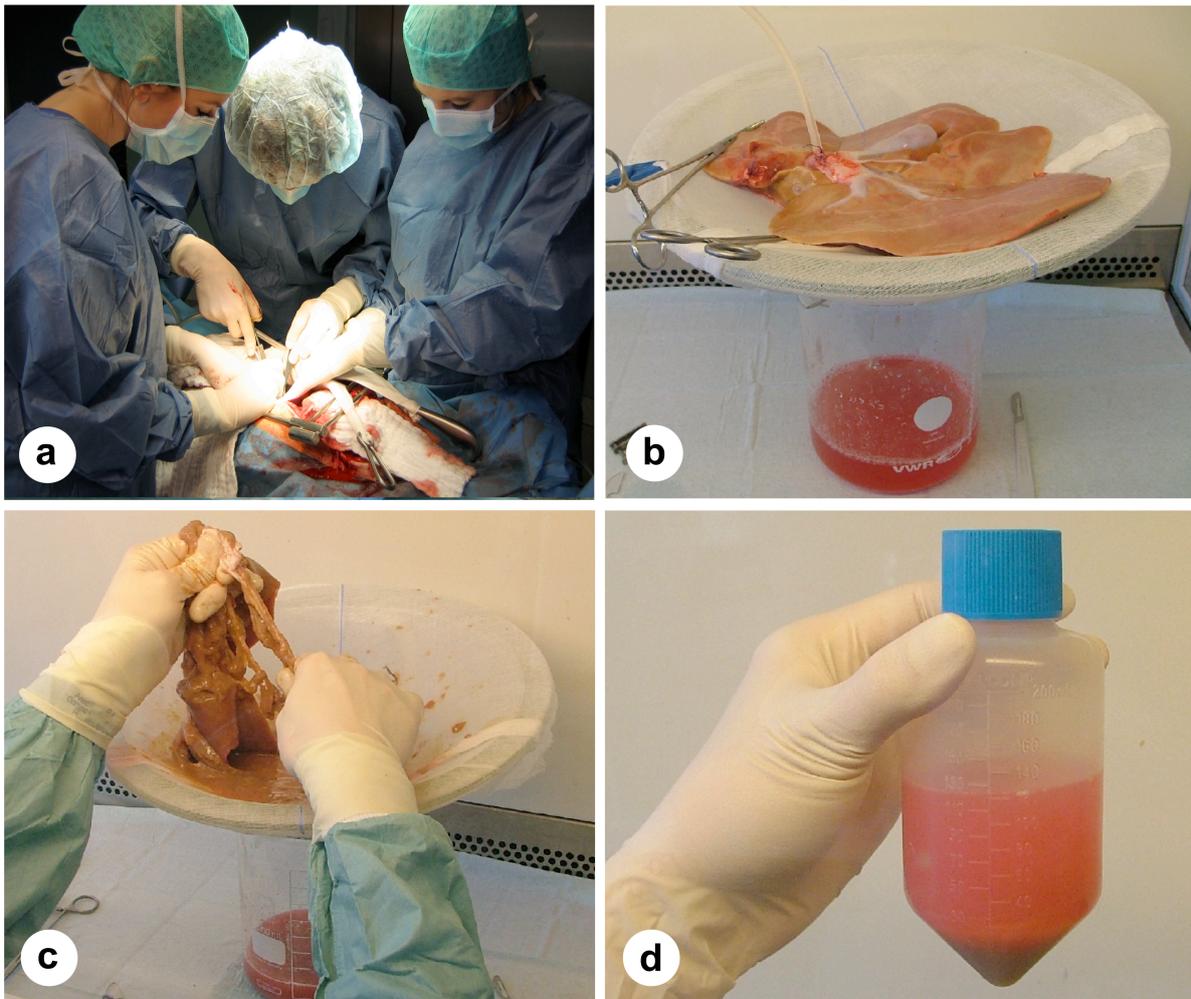


Abbildung 1: Leberexplantation und Zellisolierung: Leberexplantation im OP-Bereich (a), Sterilarbeitsbank mit explantierter Spenderleber bei Durchspülung mit Ca^{++} -freier Lösung (b). Manuelle mechanische Lösung des Zellverbandes (c). Zelllösung nach Verdauung

Zunächst wurde das Spenderorgan mit 2000 ml Calcium(Ca^{++})-freier Lösung perfundiert, die in einem Wasserbad auf physiologische 37°C erwärmt wurde (Flussrate von 200 ml/min). Die Ca^{++} -freie Lösung diente der Lockerung der Zell-Zell-Kontakte. Anschließend erfolgte der enzymatische Verdau mittels 800 ml Kollagenasepuffer. Unmittelbar vor der Verwendung wurde der Pufferstammlösung 400 mg Kollagenase P (Roche, Mannheim) hinzugefügt. Da die Kollagenase nur eine sehr kurze Wirkungsdauer hat, konnte dieser Schritt erst kurz vor Isolierung vorgenommen werden. Danach wurde die Lösung steril filtriert und im Wasserbad ebenfalls auf 37°C erhitzt. Calcium- und Magnesium wurden hinzugefügt. Das Perfusionssystem wurde wieder über eine Rollerpumpe mit einer Geschwindigkeit von 150-200 ml/min betrieben; diesmal erfolgte die Rezirkulation der Lösung über ein zweites Schlauchsystem. Die Pufferlösung wurde über einen Gasfilter oxygeniert

(DasGip®: 95% O₂, 5% CO₂). Der Verdauvorgang dauerte ca. 10-15 min, je nach Beschaffenheit und Perfusion des Spenderorgans. Anhand der Konsistenz wurde der Verdaustand abgeschätzt. Der Verdau wurde mithilfe von 750 ml kalter (4°C) Hanks Pufferlösung gestoppt, danach erfolgte eine mechanische, manuelle Lösung der Zellen und ihre Filtration mittels Gaze. (Abb. 1c,d). Als nächster Schritt wurde die dreimalige Zentrifugation bei 3 min und 50g in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge durchgeführt. Das verbliebene Zellsediment wurde jeweils mit 100 ml Williams` Medium E resuspendiert. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die verbleibenden Zellen mit einem Gesamtvolumen von 300 ml wurden in William`s Medium E (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) überführt. Nach Resuspension wurde ein Aliquot für die Bestimmung der Vitalität und zur Quantifizierung genommen. Die Zellen wurden mit Trypanblau (0,1%ig) angefärbt und in einer Neubauerzählkammer lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Trypanblaufärbung durchdrang nur die Membran toter oder geschädigter Hepatozyten. Durch die stärkere Anfärbung ließen sich avitale von vitalen Zellen unterscheiden. Die gewonnenen Zellen wurden in Kulturflaschen (A=175cm², Falcon®) kultiviert. Die Zellsuspension wurde mit einer Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/ml ausgesät. Das Gesamtvolumen in der Kulturflasche wurde mit 18 ml Williams` Medium E aufgefüllt. Dieses war zuvor mit 1 µM Insulin, 1µM Dexamethason/Fortecortin, 100 U/ml Penicillin G, 40 µg/ml Gentamycin, 100 µg/ml Vancomycin, 2 µg/ml Fluconazol, 1 mM Natrium (Na⁺)-Pyruvat, 15 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-`2-Ethan Schwefelsäure Puffer (HEPES), 4mM L-Glutamin und 50 ml 10%-iges fetales Kälber Serum (FCS) supplementiert worden. Zur Verbesserung der Adhäsion wurden die Kulturflaschen zuvor mit Kollagen beschichtet. Hierzu wurde phosphatgepufferte Salzlösung (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamtphosphat) (PBS) verwendet. Die Flaschen wurden mit Kollagen (1:50) beschichtet und für 30 min bei 37 °C in einem Brutschrank (5% CO₂) inkubiert. Die Inkubationszeit der Zellkultur betrug 18 Stunden bei 37°C. Anschließend erfolgte eine Waschung mit PBS. Abschliessend wurde die Zellkultur erneut mit frischem Williams` Medium E (9 ml, 37 °C) bedeckt.

2.3.2 In vitro Markierung der Hepatozyten mit Eisenoxid-Partikeln

Zur Markierung der Hepatozyten wurden 1,6 µm große superparamagnetische, mikroskalige MPIO-Partikel (Bangs Laboratories, IN, USA) verwendet. Ein MPIO hatte einen durchschnittlichen Eisengehalt von 1,1 pg/Partikel. Zur Zellmarkierung

wurde eine MPIO-Williams' Medium E Lösung mit der Konzentration 60×10^6 Partikel/ml erstellt. Nach mehrfacher Resuspension, zur gleichmäßigen Verteilung der Partikel, wurde die Zellkultur mit der Lösung bedeckt. Anschließend erfolgte für weitere vier Stunden eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C . Im Anschluss an die Partikelinkubationsphase folgte ein Waschschrift, um freie, nicht endozytierte Partikel zu entfernen. Jede Kulturflasche wurde dreimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen. Die markierten Zellen wurden mittels Trypsinierung gelöst. Vorgewärmtes Trypsin/EDTA (10 ml, 37°C , Biochrom AG, Berlin) wurde auf den Zellkulturrasen gegeben und vier Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml kaltem William's Medium E (4°C) wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins gestoppt. Die gewonnene Zellsuspension wurde pro Empfängertier auf 18 Falcon-Tubes® mit jeweils 30 ml Volumen verteilt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (3 min, 50g bei 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit gekühltem PBS (4°C) resuspendiert. Um eine anaphylaktische Reaktion durch das mit FCS supplementierte William's Medium E zu verhindern, erfolgte die Transplantation der Zellen gelöst in PBS. Alle Zellsedimente wurden auf Viabilität und Zellzahl überprüft. Das Zellsediment wurde mit PBS auf 30 ml Volumen aufgefüllt und in eine Perfusorspritze überführt. Die nun für die Transplantation fertigen Zellen wurden steril in den Operationsbereich gebracht. Für jedes der folgenden Empfängertiere wurden Markierung und Bereitstellung wiederholt.

2.4 Zelltransplantation

Die Operationsvorbereitung der Empfängertiere glich der Vorbereitung bei einer Leberexplantation. Beatmung und Narkose erfolgten nach dem gleichen Protokoll (Vgl. Abs. 2.3). Es erfolgte eine Blutabnahme zur Probenasservierung vor dem Eingriff. Unter der Narkose wurden alle Tiere mit einem Gebläse auf 37°C gewärmt. Alle Eingriffe wurden in Rückenlage mit medianer Laparotomie vom Processus Xiphoideus bis auf Höhe Harnblase durchgeführt. Bei allen Prozeduren erhielten die Empfängertiere jeweils 30 ml einer Zell- oder Partikelsuspension. Sowohl Zell- als auch Partikelsuspension wurden in einer sterilen 50 ml Perfusorspritze vorbereitet und bis zur Applikation bei 4°C in einem Kühlschrank gelagert. Bei allen Prozeduren wurde ein Verschluss des Situs in drei Schichten vorgenommen. Eine nicht-fortlaufende Faziennaht (Vicryl 1 Plus) schloss den Peritonealraum. Anschließend wurde eine fortlaufende subkutan Naht (Vicryl 2-0), gefolgt von einer Haunaht

(Prolene 3-0), durchgeführt. Während der Aufwachphase wurden die Tiere in ihrem Stall mit Rotlichtbestrahlung gewärmt und engmaschig überwacht.

2.4.1 Applikation via *V. portae*

Nach Auslagerung der Milz und des Dünndarms wurde das Lig. hepatoduodenale dargestellt. Die *V. portae* wurde freigelegt, die Portalvenenscheide wurde auf einer Fläche von ca. 3 cm Durchmesser eröffnet. Anschließend wurde eine Tabaksbeutelnaht (Vicryl 5-0) vorgelegt. Danach erfolgte die Kanülierung der *V. portae* mit einem dreilumigen gespülten Zentralen Venenkatheter (ZVK) (16G, 18G, 18G). Der distale Schenkel des ZVKs (16G) wurde nicht verwendet, über den medialen Schenkel (18G) wurde die Zell-/Partikelsuspension über 5 min verabreicht. Parallel dazu wurde über einen proximalen Schenkel (18G) 30 ml einer NaCl-Heparin Lösung (500 U) injiziert. Die Stammlösung wurde hergestellt aus 5000 U Heparin, das mit einer NaCl (0,9%) Lösung 1:10 verdünnt wurde. Für die intraoperative Anwendung wurde 1 ml der Stammlösung mit 29 ml NaCl (0,9%) versetzt. Nach Applikation wurde die *V. portae* dekanüliert, während der Katheder langsam zurückgezogen wurde, wurde die vorher aufgesetzte Tabaksbeutelnaht zugezogen. Bei Bedarf wurden Blutungen übernäht (Vicryl 5-0). Schließlich erfolgte nach Erzielung der Hämostase der Bauchdeckenverschluß.

2.4.2 Applikation via *A. gastroepiploica*

Nach Eröffnung des Abdomens stellte sich die Milz auf dem Corpus gaster liegend dar. Die gastroepiploischen Gefäße wurden präpariert. Beide Venen wurde ligiert und abgesetzt. Die *A. gastroepiploica* wurde doppelt angeschlungen (Vicryl 3-0), der distale Anteil wurde ligiert, der proximale Teil verblieb offen. Eine Vasotomie mittels eines Einmalskalpells und einer Pottscherer wurde durchgeführt, anschließend wurde das Gefäß mit einer Braunüle® kanüliert (18G). An die Kanüle wurde eine vorgespülte Heidelberger Verlängerung angeschlossen. Zur Spülung der Milz wurden über 250 ml NaCl-Heparin Lösung (500 U) infundiert. Diese Lösung wurde im vorhinein aus 5000 U Stammlösung, Verdünnung mit NaCl (0,9%) 1:10 hergestellt. Vor der Applikation wurde 1 ml der Stammlösung mit 249 ml NaCl verdünnt. Das Gefäßpaket mit *A. und V. lienalis* am unteren Milzpol wurde aufgesucht und mit einer Femoralisklemme abgeklemmt. Die Zell-/ oder Partikelapplikation erfolgte retrograd in Richtung der Milz. Ein Volumen von ca. 10 ml/min der Zellsuspension wurde über 3 min appliziert, für weitere 2 min blieben die Polgefäße verschlossen. 15 ml NaCl

wurden nachgespült. Nach Abschluss der Applikation erfolgte die Dekanülierung und proximale Ligatur der A. gastroepiploica. Hämostase wurde mit einer Bipolarpinzette und Ligaturen (Vicryl 3-0) erzielt. Abschließend wurde die Bauchdecke wie oben beschrieben verschlossen und es erfolgte eine sterile Wundversorgung.

2.4.3 Intrasplenische Applikation

Nach Eröffnung des Situs stellte sich die Milz, auf dem Corpus gaster liegend, dar. Die gastroepiploischen Gefäße wurden aufgesucht und mittels einer Klemme unterbunden. Hiernach erfolgte Injektion der Zell/- oder Partikelsuspension mittels einer 20G Kanüle und einer Heidelberger-Verlängerung. Es wurden jeweils drei Injektionen mit einem Volumen von ca. 10 ml respektive gesetzt. Die Injektion erfolgte unter kontinuierlicher Retraktion der Kanüle. Injektionsstellen waren auf Höhe der A. gastroepiploica mit Pointieren der Kanülenspitze in kaudaler Richtung, auf Höhe der A. gastroepiploica in apikaler Orientierung und im apikalen Milzpol in apikaler Richtung. Es wurde mit 15 ml NaCl nachgespült. Die Hämostase der Milz wurde durch Versiegeln mit einer Bipolar-Pinzette, mit Tabotamp® oder ggf. Übernähung der Blutungsquelle erzielt. Nach 5 min. wurden die Klemmen an epiploischen- und Polgefäßen entfernt. Anschließend wurde die Bauchdecke verschlossen und die Wunde steril versorgt.

2.5 Medikation der Versuchstiere

Alle Empfängertiere erhielten zwei Wochen vor dem Eingriff eine Mycoplasmen (*Mycoplasma hypopneumoniae*) Prophylaxe, um einen ausreichenden Immunstatus vor der folgenden Immunsuppression zu gewährleisten (M⁺Pac). Des weiteren erfolgte die Gabe von Tulathromycin 2,5mg/kg/KG (Draxxin 10% ®), einem Makrolid, durch i.m. Applikation, eine Breitbandantibiose. Zwei Tage vor der LCT erhielten die Zellempfänger Metclopamid (Paspertin ® 2-2,5mg/10kg Körpergewicht (KG)) p.o. zur Steigerung der Magen-Darm Motilität und im Verlauf auch als antiemische Therapie. Die Immunsuppression erfolgte ebenfalls ab 48h vor der Zellapplikation (Abb. 2). Die Dosierung des Calcineurininhibitors erfolgte bis zur Bestimmung des Serumspiegels von Cyclosporin A nach Schema, dann individualisiert. Intraoperativ erhielten alle Tiere eine einmalige Dosis Piperacilin und Tazobactam (Tazobac® 4,5mg) i.v., eine Breitbandantibiose, gerichtet gegen ein weites Spektrum von gram-

positiven und gram-negativen Erregern, insbesondere zur Prophylaxe von Infektionen des Bauchraums. Zur Immunsuppression wurden 250 mg Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat (Urbason® soluble forte, Sanofi Aventis) i.v. verabreicht. Zur Schmerztherapie wurde Fentanyl (TAD®) transdermal appliziert. Alle anderen Medikamente wurden nach Plan verabreicht (Abb. 2) Am Operationstag und den später folgenden Magnet-Resonanztomographie (MRT) Terminen, bei denen die Tiere sediert wurden, wurden alle Medikamente i.v. oder i.m. verabreicht.

Tag	Uhrzeit	Paspertin® 10mg/2ml Metoclopramid Injektsg. 2ml Amp./Tropfen	Baytril® 10% Enrofloxacin 10% injektsg./Tabl. 50mg	Fentanyl TAD® 75µg/Stck. Fentanyl Pflaster	Temgesic® 0,3mg/ml Buprenorphin Injektsg.	Novaminsulfon® 2,5mg/5ml Metamizol Injekt.lsg./Tabl	Ranitic® 150mg/Tbl. Ranitidin 1Tbl/Tier	Sandimmun® Saft: 100mg/ml Injektsg: 50mg/ml Ciclosporin A Injektsg (50mg/ml)/ Saft (100mg/ml)	Solu-Decortin®/ Decortin H® 25mg/ml 10mg/Tbl. Prednisolon Injektsg./ Tabletten
-2	8:00	2 Tropfen/Tier p os						0,05ml X KG p.o.	0,5mg X KG p.o.
	16:00							0,05ml X KG p.o.	0,5mg X KG p.o.
-1	8:00	2 Tropfen/Tier p os						0,05ml X KG p.o.	0,5mg X KG p.o.
	16:00							0,05ml X KG p.o.	0,5mg X KG p.o.
1 (OP)		1ml i.v.		kleben	1ml s.c.	1ml i.v.		0,2ml X KG i.m.	1mg X KG i.v.
2	8:00	1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m.		1ml i.m.	1ml i.m.		0,05ml X KG p.o.	0,5mg X KG p.o.
								0,05ml X KG p.o.	0,5mg X KG p.o.
3 (MRT)	ca. 14:30	1ml i.v.	0,5-0,75ml i.v.	kleben	1ml i.v.	1ml i.m.		nach Spiegel i.m.	1mg X KG i.v.
4	8:00	2 Tropfen/Tier p.o. ODER 1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m. ODER 1-1,5 Tabl. 50mg p.o.		bei Bedarf i.m.	1g p.o.	gemörsert in Futterbrei	nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.
	16:00							nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.
5	8:00	2 Tropfen/Tier p.o. ODER 1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m. ODER 1-1,5 Tabl. 50mg p.o.		bei Bedarf i.m.	1g p.o.	gemörsert in Futterbrei	nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.
	16:00							nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.
6	8:00	2 Tropfen/Tier p.o. ODER 1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m. ODER 1-1,5 Tabl. 50mg p.o.			1g p.o.	gemörsert in Futterbrei	nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.
	16:00							nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.
...									
27	8:00	2 Tropfen/Tier p.o. ODER 1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m. ODER 1-1,5 Tabl. 50mg p.o.			bei Bedarf	gemörsert in Futterbrei	nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.
	16:00							nach Spiegel p.o.	0,5mg X KG p.o.

Abbildung 2: Medikationsplan für alle Empfängertiere: Die Gabe von Antibiotika, analgetischer Therapie und Kortison erfolgte standardisiert. Der Spiegel von Cyclosporin A wurde am zweiten postoperativen Tag bestimmt und dann an das Individuum angepasst. An Tagen mit MRT Untersuchung erfolgte die Medikationsgabe in Narkose i.m. oder i.v.

2.6 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben

2.6.1 Organentnahme und Fixierung der Gewebeproben

Die Finalisierung der Versuchstiere erfolgte in festen Zeitintervallen am 2., 7., 14., 28. und 56. postoperativen Tag. Die Schweine wurden wie in Kapitel 2.3 geschildert sediert und in tiefer Narkose mittels Kaliumchloridlösung finalisiert. Die mediane Laparotomienarbe wurde eröffnet. Milz, Leber, Nieren, Herz und Lungen wurden exstirpiert. Organproben wurden in der Größe von ca. 0,5 x 0,5 cm systematisch entnommen. Jeweils eine entnommene Gewebeprobe wurde in eine vorher eindeutig

beschriftete Einbettkassette gebracht und in 5%iges Formalin überführt. Eine zweite Probe wurde in ein vorher beschriftetes Kryoröhrchen eingebracht und in flüssigen Stickstoff gegeben.

2.6.2 Paraffinschnitte

Die Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte mithilfe eines Mikrotoms auf eine Dicke von 2-4 µm. Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger aufgebracht und im Wärmeschrank bei 38°C 60 min fixiert. Anschließend erfolgte eine kühle lichtgeschützte Lagerung bis zur histologischen Aufarbeitung.

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur morphologischen Beurteilung des Gewebes wurden Gewebeproben der Versuchstiere standardmäßig mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefärbt. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen, wie den Nucleus mit Desoxyribonukleinsäure und das endoplasmatische Retikulum, blau an. Eosin hingegen färbt acidophile Zellstrukturen, wie Zellplasmaprotein. Die Proben auf den Objektträgern wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert. Dazu wurden die Objektträger in eine Reihe von Küvetten zweimal eine Minute eingestellt. Begonnen mit Xylol, danach in absolutem Alkohol, in 96%igem Alkohol, in 80%igem Alkohol, in 70%igem Alkohol und schließlich 50%igem Alkohol. Eine Rehydrierung in Aqua dest. erfolgte für 3 Minuten. Im ersten Schritt erfolgte die Kernanfärbung für zehn Minuten mit Hämatoxylin nach Mayer. Unmittelbar nach diesem Vorgang wurden die Proben für die Dauer von fünf Minuten mittels warmen Leitungswassers differenziert. Im zweiten Schritt erfolgte die Plasmaanfärbung mit Eosin. Dafür wurden die Proben für 30 Sekunden in alkoholisches Eosin eingestellt und wiederum für drei Sekunden in Leitungswasser differenziert. Zur Konservierung der Schnitte wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt® eingedeckt. Es erfolgte eine Lufttrocknung der Proben für 30-45 Minuten. Die Proben wurden in einem kombinierten Licht- und Fluoreszenzmikroskop oder einem Konfokalmikroskop bewertet und auf Inflammation und Nekrose und sonstige auffällige Gewebeveränderungen untersucht. Die Proben wurden als positiv auf Inflammation/ Nekrose gewertet, wenn mehr als fünf inflammatorisch veränderte/ nekrotische Areale gefunden wurden. Dies diente dazu, ein möglichst realistisches Bild der veränderten Gewebeproben zu erlangen, so dass einzelne physiologische Veränderungen nicht das Gesamtbild des morphologischen Zustandes verzerrten.

Dieses Vorgehen sowie die Auswertung der Proben wurden mit unserem Referenzpathologen aus dem pathologischen Institut der Charite Universitätsmedizin, Campus Mitte, besprochen und eingeübt. Von jedem Versuchstier wurden 42 Proben in HE Färbung bewertet. Die Einteilung der Schweregrade der Nekrose/ Inflammation erfolgte in Absprache mit dem Pathologen:

1. Keine Nekrose/ Inflammation, wenn 0 Schnitte positiv waren
2. Milde Nekrose/ Inflammation, wenn bis zu 5 Schnitte positiv waren
3. Mittlere Nekrose/ Inflammation, wenn zwischen 6-15 positiv waren
4. Schwere Nekrose/ Inflammation, wenn mehr als 15 Schnitte positiv waren

2.6.4 Berliner-Blau-Färbung

In allen Versuchsgruppen wurden mit MPIO-Partikeln markierte Leberzellen transplantiert. Die Markierung mit Eisenoxidpartikeln erlaubt die Darstellung mithilfe einer Berliner Blau Färbung. Die Berliner Blau Färbung führt zu einer Reaktion von Fe^{3+} mit dem Reaktionsgemisch zu einem blauen Pigment, dem so genannten Berliner Blau. Diese Färbung wurde als quantitativer Indikator für das Vorhandensein von transplantierten Zellen/ Zellfragmenten im Lebergewebe gewertet. Wie im Abschnitt 2.6.3 beschrieben, wurden die Proben entparaffinisiert und in Aqua dest. rehydriert. Für die Färbung wurde ein Färbeset für Berliner Blau verwendet. Im ersten Schritt des Färbevorgangs wurden die Proben in Lösung eins eingestellt (Gemisch zu gleichen Anteilen aus 20%iger Salzsäure und 10%iger Kaliumhexacyanoferratlösung). Danach Hydrierung in Aqua dest. für eine Minute und einstellen in Lösung 2 (Kernechtrotfärbung) zur Darstellung der Zellkerne für sechs Minuten. Anschließend erfolgte die nochmalige Hydrierung in Aqua dest. für zwei Minuten. Die Fixierung erfolgte für eine Minute in absolutem Alkohol und anschließendem Einstellen für zweimal eine Minute in Xylol. Die Schnitte wurden mittels Eukitt® eingedeckt. Die Proben wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Fand sich mindestens eine blaue Zelle im Schnitt, wurde der Schnitt als positiv gewertet. In dieser Färbung stellen sich Fe^{3+} blau da, während das Zytoplasma und der Zellkern rot erscheinen.

Diese Färbung konnte nur in der Leber durchgeführt werden, da in der Milz physiologischerweise viele Zellen einen erhöhten Eisengehalt haben und positiv auf

Berliner Blau Färbung reagieren. Von jedem Empfängertier wurden mindestens 42 Leberproben in Berliner Blau Färbung bewertet.

2.6.5 Immunhistologie an Paraffinschnitten

Immunhistologische Färbungen mit zwei Primärantikörpern wurden durchgeführt. Die Vorbereitung der Gewebeproben war bei beiden Antikörpern gleich. Bei jeder Färbung wurden jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle mitgefärbt. Die Positivprobe wurde behandelt wie die Gewebeproben der Versuchstiere. Bei der Negativprobe erfolgte die gleiche Bearbeitung, mit Ausnahme der Primärantikörperdilatation. Auf den Negativschnitt wurde nur Diluent gegeben. In Vorbereitung auf die Immunhistologie wurden die zu färbenden Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe sorgfältig entparaffinisiert. Hierzu wurden sie von einem Xylobad in Küvetten, gefüllt mit absolutem, 96%igem und 70%igem Alkohol, überführt. Schließlich wurden sie in destilliertem Wasser feucht gehalten. Als Waschpuffer wurde Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,4-7,6) eingesetzt. Die Inkubation des Primär- und Sekundärantikörpers erfolgte in einer feuchten Kammer. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämatoxylin nach Mayer verwendet.

Zur Detektion der transplantierten Hepatozyten in der Milz wurde ein Cytokeratin-18 Antikörper (CK-18) eingesetzt. Als Negativ- und Positivkontrolle wurde ein porciner Leberschnitt verwendet. Für diese Färbung wurden die entparaffinisierten Schnitte mittels eines EDTA-Puffers (pH 8) demaskiert. Hierzu wurde in einem Dampfkochtopf Aqua dest. zum Sieden gebracht, dann wurde eine mit kochendem EDTA Puffer befüllte Küvette mit den entsprechenden Schnitten in den Topf gegeben. Die Demaskierung erfolgte für 5 min, danach wurden die Schnitte im Puffer auf Raumtemperatur gekühlt. Es wurden 40µl der Primärantikörperverdünnung (1:20, Anti-Schwein-Maus IgG) auf den Schnitt gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte für zweimal drei Minuten in ein Tris-Pufferbad eingestellt. Die Entwicklung der Proben erfolgte mittels Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APPAP-Methode). Der verwendete Sekundärantikörper diente als Brückenantikörper zwischen Primärantikörper und dem Immunkomplex aus alkalischer Phosphatase und anti-Alkalischer Phosphatase (APAAP-Komplex). Der Sekundärantikörper ist gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet (Anti-Maus IgG, aus dem Kaninchen ZO259). Auf den Schnitt wurden 40µl Sekundärantikörper aufgebracht

und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal für jeweils drei Minuten in ein Tris-Pufferbad eingestellt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem APAAP-Komplex und die wiederholte Einstellung in den Tris-Puffer. Bei dieser Methode wurden die Proben ein zweites Mal mit Sekundärantikörper und APAAP-Komplex für jeweils zehn Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Sichtbarmachung mittels Substrat-Chromogenlösung (Substrat: Fuchsin), wobei an der Stelle des gesuchten Antigens ein rotes Präzipitat entsteht. Eine Kerngegenfärbung wurde für 4,5 min mit Hämatoxylin nach Mayer durchgeführt. Danach wurden die Objektträger für 5 min in kaltem Leitungswasser gebläut. Zur Konservierung wurden alle Schnitte mit wässrigem Eindeckmedium behandelt.

Zur Detektion von Makrophagen in der Leber wurde ein Primärantikörper (Anti-Schwein-Maus monoklonal) gegen Calprotectin verwendet. Die verwendete Entwicklungsmethode war die Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode). Die LSAB-Methode beruht auf der Affinität von Streptavidin zum Vitamin Biotin. Dies führt zur Kopplung von enzymmarkiertem Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) an einen biotinylierten Sekundärantikörper, der mit einem Substrat (3'3'-Diaminobenzidin) und Chromogen reagiert und ein farbiges, in diesem Falle braunes Präzipitat bildet. Nach sorgfältiger Entparaffinisierung in einer absteigenden Alkoholreihe, wurden die zu färbenden Proben für 5 min in eine Aqua. dest. Küvette eingestellt. In einer feuchten Kammer wurden die Proben für 10 min mit Peroxidaseblock beträufelt. Dies diente der Blockade der endogenen Peroxidase, die ohne Blockade mit dem Chromogen eine unspezifische Hintergrundfärbung verursachen kann. Die Demaskierung, die die Gewebeprobe auf den Primärantikörper vorbereiten soll, wurde mithilfe von Proteinase K erzielt. Die Demaskierungsdauer betrug 10 min bei Raumtemperatur. Die Demaskierung macht das Zielepitop für den Primärantikörper Calprotectin zugänglich. Danach wurden die Objektträger für zweimal drei Minuten in Aqua dest. rehydriert. Der Primärantikörper wurde in einer 1:500 Verdünnung mit Diluent versetzt und die Schnitte mit je 40µl bedeckt. Die Inkubationsdauer war 60 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Proben zweimal für drei Minuten in ein Trispufferbad eingestellt. Danach erfolgte die Weiterbearbeitung mit Sekundärantikörper. Hier erfolgte die Inkubation für 30 min. Die Proben wurden erneut für zweimal drei Minuten in ein Trispufferbad gestellt. Es folgte die Anfärbung des Epitops mit DAB/ Chromogen, bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Ein braunes Präzipitat markiert das Epitop. Die

Objektträger wurden für 2-4 Sekunden in Aqua. dest. und für 4,5 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer eingestellt. Danach erfolgte die Bläuung der Proben für fünf Minuten in warmem Leitungswasser. Zur Konservierung des Schnittes wurde er mit feuchtem Eindeckmedium behandelt.

Die Auswertung der Proben wurde an einem Lichtmikroskop durchgeführt. Die CK-18 gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch als positiv gewertet, wenn mindestens rotes Präzipitat nachzuweisen war. Die immunhistochemische Färbung mit Calprotectinantikörper wurde an einem Teil der Tiere durchgeführt, um im Vergleich mit der Berliner-Blau-Färbung Makrophagen auszuschließen oder zu bestätigen.

2.6.6 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Der sichere und eindeutige Nachweis der Migration transplantierte Donorhepatozyten wurde durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH-Typing) erbracht. Dies diente dem Nachweis von männlichen Herkunft der Zellen, anhand des Y Chromosoms in einer weiblichen Leber. Die Untersuchung wurde an Paraffinschnitten mittels porcinen Y-Chromosom Sonden (548/573 nm) durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden mit einer absteigenden Alkoholreihe deparaffinisiert und schließlich in Aqua Dest. überführt. Anschließend wurden die Proben für 35 Minuten in einem 80°C warmen Citratpuffer demaskiert und für 20 Minuten mittels Pepsin enzymatisch bei 37°C verdaut. Die Demaskierung ermöglichte die Verdauung der Zell- und Kernmembran, um den Y-Chromosom Sonden Zugang zur DNA zu ermöglichen. Die Schnitte wurden mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und abschließend luftgetrocknet. Die Denaturierung der DNA erfolgte mittels einer 15-minütigen Inkubation bei 80°C. Die DNA Sonden wurden aufgegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte vorsichtig mit Aqua dest. abgespült und mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Färbung (DAPI-Färbung) gegengefärbt. Die DAPI-Färbung erfolgt mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, der zur Anfärbung von DNA eingesetzt wird. Absorptionsmaximum bei 358 nm, Emissionsmaximum bei 461 nm. DAPI erscheint unter dem Fluoreszenzmikroskop blau. Die porcine Y-Chromosom Sonde erscheint hingegen rot. Das verwendete Mikroskop war ein kombiniertes Licht- und Fluoreszenzmikroskop. Um die Bilder darzustellen und zu fotografieren, wurde die Herstellersoftware AxioVision verwendet.

2.6.7 Elektronenmikroskopie

Nachdem im Milz- und Lebergewebe der Empfängertiere Hepatozyten mittels immunhistologischer Maßnahmen (CK-18 Färbung) oder Berliner-Blau-Färbung identifiziert wurden, wurde von diesen Gewebeproben eine elektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt. In Vorbereitung auf elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die entnommenen Gewebeproben in 60°C warmen Xylol inkubiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Die Proben wurden gewaschen und dann in einer aufsteigenden Reihe einer Epoxidharzlösung (Epon 812 und Propylenoxid) über Nacht infiltriert. Vollständig infiltrierte Proben wurden zur Polymerbildung in Plastikkapseln bei 60°C für 48 Stunden inkubiert. Die ultradünnen Schnitte wurden auf ein Kupfergitter aufgebracht und mit 4% Uranylacetat und Reynolds Bleicitrat gefärbt. Die Aufnahmen wurden von der elektronenmikroskopischen Abteilung der Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow angefertigt und mit einem Elektronenmikroskop (EM 906, Zeiss Jena) erstellt.

2.6.8 Polymerase Kettenreaktion

Die geschlechtsbestimmende Y-Gen (SRY) Region und das β -actin Gen der DNA wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) untersucht. Genomische DNA wurde aus kryokonservierten Leberproben isoliert (Nucleospin Tissue, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Die Gewebeisolate wurden auf männliche Zellen mit einem SRY spezifischem Primer (5-CGGG CAAGGCAGACCCCAAG-3; und 5-AGGG GAAGGCCGAGCCGTAG-3) untersucht. Ein für β -actin spezifischer Primer (5-CTGGA CTTCGAGCAGGAGA TG-3 und 5-TGTTCGACGTCGCACTT CATG-3) wurde als Kontrolle verwendet. Die PCR Behandlung begann mit einer initialen Erwärmung auf 94°C für 3 min, gefolgt von 60 Zyklen: Denaturierung bei 94°C für 30 s, Anlagerung bei 61.4°C (SRY Gen) oder 59.7°C (β -actin) für 30s und Elongation bei 72°C für 1 min. Kultivierte und resuspendierte männliche Spenderzellen wurden als Positivkontrolle für die SRY Region verwendet; Gewebeproben von weiblichen Schweinen, die nur MPIO-Partikel injiziert bekommen hatten, wurden als Negativkontrollen verwendet.

2.7 *In vitro* Analyse

Leberzellen nach Leberzellisolierung von 5 der Donortiere wurden für die *in-vitro* Analyse in vier Untersuchungsgruppen eingeteilt und für jeweils sechs Tage kultiviert:

Gruppe A: native Zellen/adhärente Zellkultur

Gruppe B: markierte Zellen/adhärente Zellkultur

Gruppe C: native Zellen/resuspendierte Zellkultur

Gruppe D: markierte Zellen/resuspendierte Zellkultur

Bei den adhärennten Gruppen wurden die Zellen nach der Zellisolierung in einem Williams` Medium E ausgesät. Gruppe B wurde zusätzlich am Tag eins nach Kultivierung mit MPIO Partikeln markiert. Gruppe C und D wurden am Tag eins enzymatisch gelöst und dann rekultiviert, wobei Gruppe D vor der Trypsinierung ebenfalls markiert wurde. Bei allen vier Gruppen wurden über zwei bis sechs Tage Schädigungs- und Syntheseparameter der Hepatozyten bestimmt.

Biochemische Parameter wurden aus dem Zellkulturüberstand an den Tagen zwei bis sechs täglich gemessen. Bestimmt wurden Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT) als Marker für die Leberzellschädigung (NobiFlow GOT-IFCC und GPT-IFCC). Weiterhin wurde die Harnstoffsynthese mittels eines enzymbasierten Detektionssystems bestimmt. (NobiFlow Harnstoff-UF). Die Proteinkonzentration wurde am letzten Tag der Zellkultur bestimmt. Hierfür wurden Zelllysate verwendet. Jede Messung wurde mindestens zweimal wiederholt.

2.7.1 Partikelbeladung

Die Partikelaufnahme pro Zelle und Partikelretention wurden anhand von in 6-well Platten kultivierten und markierten Zellen, die am zweiten, vierten, und sechsten Tag fotografiert und randomisiert worden waren von zwei unabhängigen Untersuchern bewertet.

2.8 Bildgebende Verfahren

Die Versuchstiere wurden für alle bildgebenden Verfahren sediert (Kapitel 2.3) und intubiert und bei erhaltener Spontanatmung untersucht. Atemstillstand konnte durch Verabreichung eines Propofolbolus erzielt werden. Alle Tiere wurden in Bauchlage examiniert. Als Kontrastmittel wurde Gadolinium verwendet (2 ml/sec), um eine Verstärkung der T1-gewichteten Sequenz zu erzeugen, die sogenannte LAVA (3D

Liver acquisition volume acquisition). Im direkten Anschluss an die Finalisierung wurde zur MRT-Kartierung ein einzelner Leberlappen mit Formalin perfundiert und unter Versuchsbedingungen magnettomographisch vermessen. Eine computertomographische Angiographie Untersuchung (CTA) wurde am siebten postoperativen Tag durchgeführt. Verwendet wurde hierfür ein 64-Zeilen CT (Light speed VCT, General Electric Healthcare), appliziertes Kontrastmittel war Xenetix 350 (Guerbet GmbH, Sulzbach, Germany). Die MRT-Daten wurden mit der Freeware OsiriX DICOM Viewer (Version 3.6.1, Osirix Stiftung, Genf, Schweiz [<http://www.osirix-viewer.com>]) ausgewertet.

2.9 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung (Stabw) oder Standard Error of mean (SEM) gegeben. Die statistischen Untersuchungen verwendeten den Wilcoxon, 2-teiligen Students t-test, chi-quadrat oder einteilig ANOVA, in einem Excel- oder SPSS Programm. Um eine Kumulation des Alphafehlers zu neutralisieren, wurde teils die Bonferoni Korrektur eingesetzt. Die graphischen Daten wurden mittels Deltagraph (Version 5.7.4, Red Rock Software Inc.) ausgewertet. Ein p -Wert von 0,05 oder weniger wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Zellisolierung

Die durchschnittliche Viabilität nach Zellisolierung und vor der Zellkultivierung lag bei einer durchschnittlichen Zellzahl von 2985×10^6 bei 77,5%. Die applizierte Zellzahl variierte zwischen den Spendertieren, war aber auch abhängig von Operationszeit, der Laborverwertung etc. Durchschnittlich wurden den Empfängertieren in den Versuchsgruppen $72,9 \times 10^6$ Zellen transplantiert (SEM: 3,66). In der Versuchsrouten mit intraportaler Applikation erhielten die Tiere $71,8 \times 10^6$, bei intraarterieller LCT wurden $77,5 \times 10^6$ Zellen appliziert, bei intraparenchymateller LCT $69,1 \times 10^6$ Zellen. In den Kontrollgruppen wurden im Mittel $65,8 \times 10^6$ native Hepatozyten appliziert (SEM: 0,97). Die applizierte Zellzahl der mit MPIO-markierten und nativen Hepatozyten war nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,4063$, Wilcoxon Test).

3.2 Charakterisierung der Spenderhepatozyten vor Transplantation

Die Spenderhepatozyten wurden 24h vor der Transplantation in Adhäsion kultiviert. Es erfolgte die in Abschnitt 2.3.2 beschriebene Markierung mit MPIO. Die durchschnittliche Viabilität der Hepatozyten nach Leberzellisolierung, Resuspension und Markierung lag bei $46,8 \pm 2,4\%$. Dies wurde durch Trypanblautestung bestimmt. Die Viabilität der MPIO-markierten Hepatozyten lag bei $49,5 \pm 2\%$.

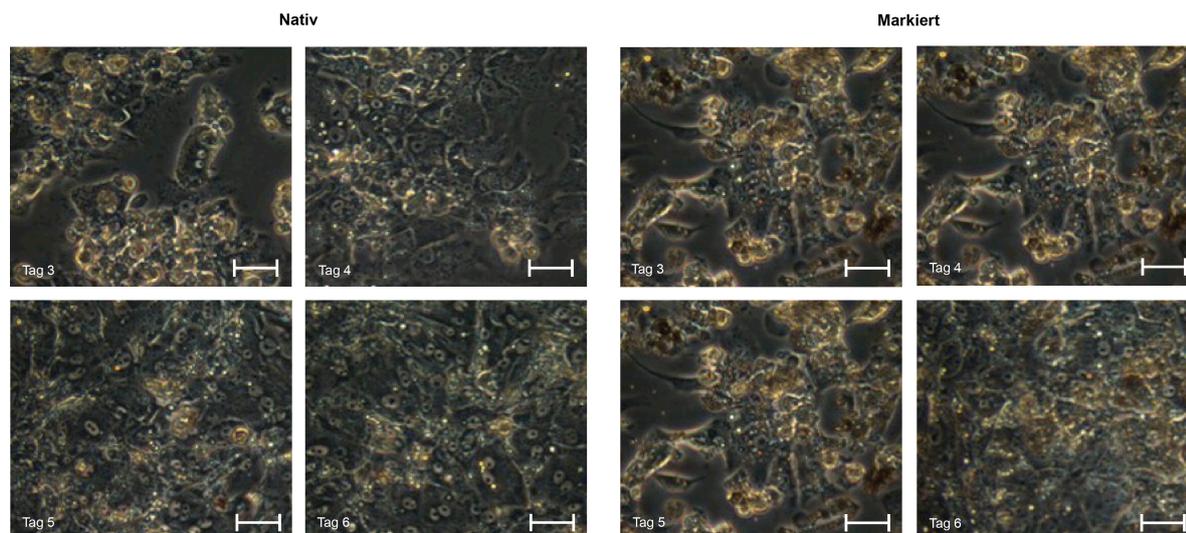


Abbildung 3: Rekultivierung nativer und markierter porciner Hepatozyten im SlideObserver: Native und markierte Zellen wurden im SlideObserver kultiviert. Keine morphologischen Unterschiede (Markierung $100 \mu\text{m}$)

Die Viabilität der nativen Hepatozyten lag bei $37,8 \pm 1,3\%$. Die Beurteilung der Zellen erfolgte im SlideReactor. Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede

aufgrund der Markierung (Abb.3). Um eine funktionelle Bewertung der Spenderhepatozyten zu erzielen, wurde eine *in vitro* Analyse (Abschnitt 2.7) über sechs Tage durchgeführt. Untersucht wurden Parameter der Leberzellschädigung (AST, ALT), der Leberzellsynthese (Harnstoff) und das Gesamtprotein. Für die Gruppe der resuspendierten Zellkultur ergab sich eine Erhöhung der Schädigungsparameter AST und ALT an Tag zwei, im Vergleich mit den adhärenen Zellkulturen. Dies ist wohl auf die vorherige enzymatische Behandlung mit Trypsin zurückzuführen. In der anschließenden Kontrollphase gab es keine Unterschiede. Leberschädigungsparameter (AST, ALT) und Lebersyntheseparameter zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4 A, B). Der unveränderte Harnstoffwert zeigte eine unbeeinträchtigte metabolische Funktion (Abb. 4C). Die MPIO Markierung hatte keine negativen Auswirkungen auf die porcinen Hepatozyten.

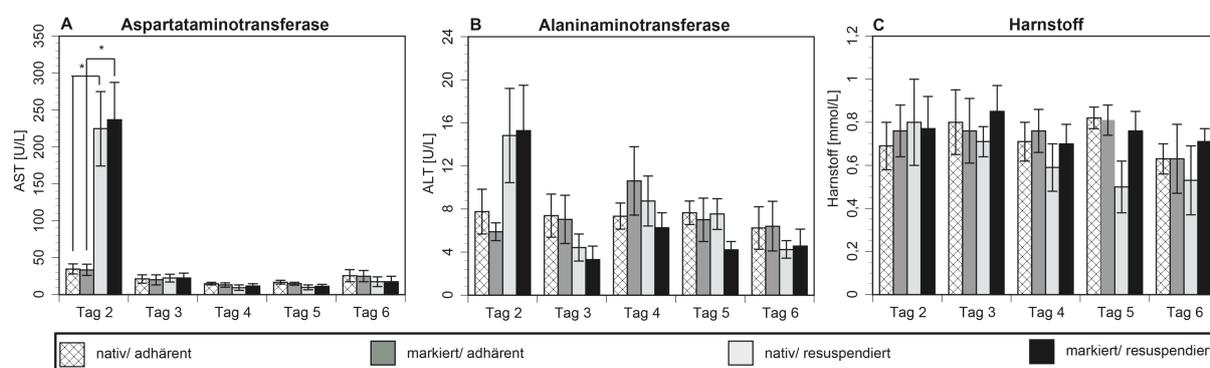


Abbildung 4: In vitro Daten der porcinen Hepatozyten: Die Zellmarkierung hatte keine Auswirkung auf die Leberzellschädigung (AST, ALT). Nach sechs Tagen gab es keine signifikante Differenz zwischen markierten und nativen Hepatozyten. Auch die metabolische Funktion blieb unbeeinflusst (Harnstoff). (* $p < 0,05$ einfacher ANOVA und Student t-test mit Bonferroni Korrektur). Daten wurden von fünf Spendertieren erhoben.

Die Zellmarkierung der Hepatozyten erfolgte nach der Zellisolierung mit MPIO Partikel in Adhäsionskultur. Die durchschnittliche Partikelbeladung pro Zelle lag bei 20 ± 1 , bei einer Markierungseffizienz von $94,6 \pm 0,8\%$. Der Nachweis der Inokulation der MPIO in die Hepatozyten erfolgte mittels Elektronenmikroskopie (EM) (Abb. 13). Die Zellmarkierung zeigte sich während der *in vitro* Überwachungsphase von sechs Tagen stabil und war unverändert auch nach Manipulationen wie z.B. Resuspension.

3.3 Evaluation der Applikationsrouten

In der vorliegenden Dissertationsschrift sollen die verschiedenen Applikationsrouten für die LCT im Großtier möglichst vollständig bewertet werden. Der Schwerpunkt soll jedoch auf der Auswertung der Ergebnisse der klinischen Labor- und histologischen

Daten liegen. Die Versuchstiere wurden deshalb einer sehr umfangreichen Diagnostik unterzogen. Einerseits erfolgte eine wiederholte extensive Bildgebung *in vivo* um die Auswirkungen der LCT und die Zelldetektion nachzuvollziehen, andererseits eine engmaschige Überwachung der klinischen Laborparameter. Die Laborkontrolle hatte einen Schwerpunkt auf Parameter für Lebersynthese, Leberschädigung und Infektionszeichen. Es gab eine ständige klinische Überwachung des Zustandes nach der operativen Prozedur, um mögliche Komplikationen frühzeitig zu erkennen. Eine Sektion am Ende des geplanten Untersuchungszeitraumes erfolgte standardisiert, um eine *ex vivo* Kontrolle der transplantierten Hepatozyten zu erhalten, Erkenntnisse über die Auswirkungen der LCT auf die Empfängerorgane zu gewinnen und den eindeutigen Beweis für die Herkunft der Spenderzellen zu erbringen.

3.3.1 Evaluation der Zelladministration mittels bildgebender Verfahren

Durch die Zellmarkierung mit MPIO Partikel sind Hepatozyten nach LCT *in vivo* detektierbar. Für die Leber wurde eine T1-Sequenz mit Gadolinium Verstärkung transversal (LAVA) verwendet. Vor LCT erstellte MRT-Bilder der Versuchstiere zeigten homogenes Lebergewebe (Abb. 5a). Nach intraportaler LCT traten Signalauslöschungen in der Leberperipherie auf (bei neun von zehn Tieren), Anzahl und Lokalisation blieben über zwei bis 56 Tage nach LCT unverändert (Abb. 5b,c). Eine computertomographische, angiographische Kontrolluntersuchung (CTA) sieben Tage nach LCT schloss Artefakte, wie Lufteinschlüsse, aus (Abb. 5d). Im Gegensatz dazu führte die Applikation nativer Zellen oder einer MPIO Partikelsuspension zu keiner Veränderung der Homogenität des Leberparenchyms (Abb. 5e,f). Es erfolgte eine eindeutige Korrelation der Signalauslöschungen im MRT mit histologischer Mikrothrombenbildung (Abschnitt 3.4). Für die Bildgebung der Milz wurde eine T2 gewichtete-Fast-Spin-Echo-Sequenz verwendet. Die intrasplenische LCT markierter Hepatozyten führte zu hypointensen Arealen um die Injektionsstellen bei neun von zehn Tieren. Per CTA wurden Hämatome ausgeschlossen.

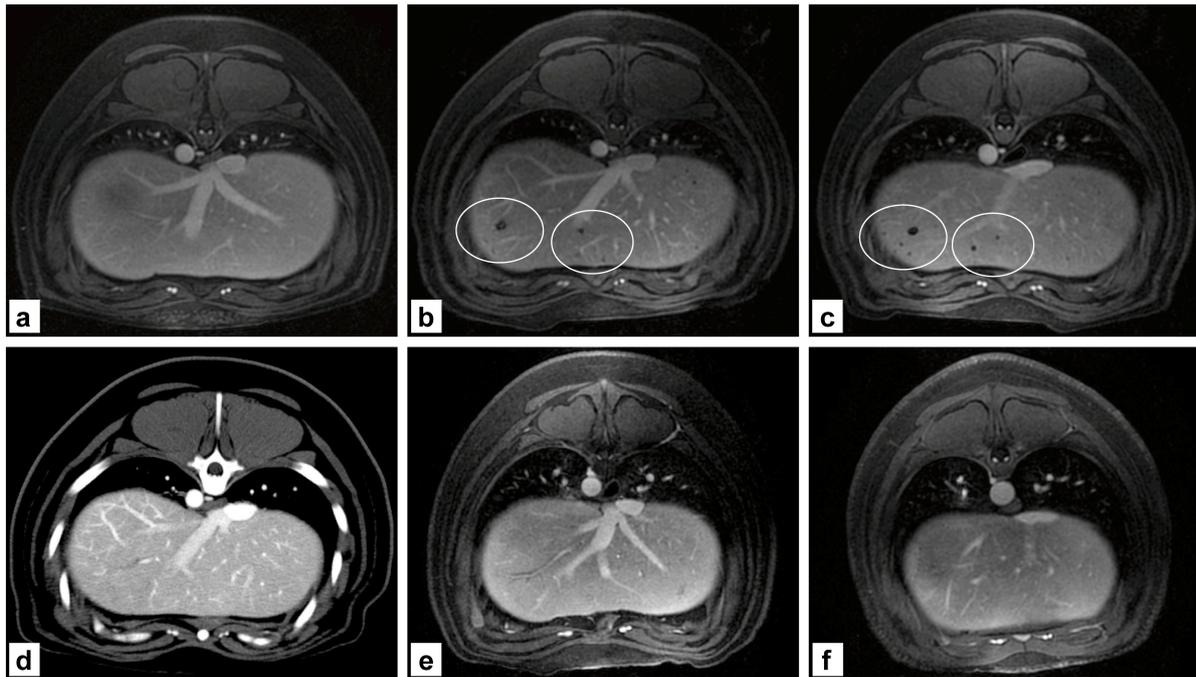


Abbildung 5 : Zelldetektion im MRT: Zellverfolgung nach intraarterieller LCT markierter Hepatozyten. MRT Darstellung vor LCT (a), nach sieben Tagen (b), nach 14 Tagen (c) Computertomographische, angiographische zum Ausschluss von Artefakten (d). Nach Applikation nativer Zellen (e), nach Partikelsuspension (f)

Die Lokalisation der hypointensen Areale blieb in der Untersuchungsperiode konstant. In der Leber fanden sich keine Signalveränderungen. Die intraarterielle Applikation markierter Hepatozyten führte zu keiner Signalveränderung in der Milz. In der Leber fanden sich nur in zwei Fällen Signalauslöschungen. Die histologische Auswertung korrelierte mit den MRT Ergebnissen und fand signifikant weniger Mikrothromben nach intraarterieller LCT im Vergleich zur intraportal LCT ($p = 0.005$).

3.3.2 Klinische Auswirkungen der Applikationsroute

Um einen Ausgangs- und Basiswert für die normalen Laborparameter der Versuchstiere zu haben, wurden vor der Manipulation Blutproben am Versuchstier entnommen. Die Entnahme erfolgte nach Tag 2, Tag 7 und Tag 14. Auch im Langzeitverlauf erfolgte eine Blutprobenentnahme. Diese Zeitpunkte wurden jedoch nicht für die statistische Auswertung verwendet.

Am zweiten Tag nach LCT kam es bei allen Versuchsgruppen zu einem Anstieg der Leberschädigungsenzyme (AST, ALT), der durch die Manipulation während der Operation zu erklären ist. Danach sanken die Werte in allen Versuchsgruppen (Abb. 6 A,B) wieder. Im Vergleich der Applikationswege ergaben sich während des

Zeitraumes von 14 Tagen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf AST und ALT zwischen der intraportalen, intrasplenischen und intraarteriellen LCT ($p > 0,05$ von Tag 0-14 t -test). In der jeweiligen Kontrollgruppe für alle Applikationsrouten gab es im Vergleich von MPIO-markierten zu nativen Hepatozyten in Bezug auf Leberschädigung (AST, ALT) ebenfalls keine signifikanten Differenzen ($p > 0,05$ von Tag 0-14 t -test). Die Applikation von markierten Zellen im Vergleich zu nativen Zellen hatte keine signifikante Auswirkung auf den klinischen Zustand der Tiere. Die Laktatdehydrogenase (LDH) persistierte nach LCT und kann sowohl auf die Operation mit Manipulation an der Leber als auch auf intraoperative Muskelschädigung (Laparatomie) zurückzuführen sein (Abb. 6C). In Bezug auf Lebersyntheseparameter zeigte sich keine Auswirkung der LCT auf die Leberfunktion. Der Serumalbuminwert blieb konstant. Der Harnstoffspiegel war bei intraarterieller Applikation an Tag 14 leicht erhöht (Abb. 6E), jedoch gibt es keine signifikanten Differenzen zwischen intraportaler, intrasplenischer und intraarterieller Route ($p > 0,05$ von Tag 0-14 t -test). Bei einem Tier nach intrasplenischer LCT MPIO-markierter Hepatozyten kam es zu einer Thrombozytopenie an Tag 2 nach LCT, eine Milzvenenthrombose wurde festgestellt. Dieser könnte durch die Prednisolgabe zur Immunsuppression oder durch Infektion erklärbar sein (Abb. 6D). Im Vergleich der Applikationsrouten zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen intraportaler/intraarterieller und intraarterieller/intrasplenischer LCT ($p > 0,05$ von Tag 0-14 t -test). Es gab eine signifikante Differenz zwischen intraportaler und intrasplenischer Applikation im Bezug auf Thrombozyten ($p = 0,026$ an Tag 2 t -test). Dies ist durch das Tier mit der konsekutiven Milzvenenthrombose zu erklären. Neben dem transienten Anstieg der Leberschädigungsparameter am zweiten Tag nach dem operativen Eingriff hatte die LCT, ob mit markierten oder nativen Hepatozyten, keine Auswirkung auf die Leberphysiologie. Da die Tiere unter dauernder Immunsuppression standen, wurden die Leukozyten regelmäßig überprüft, um einer möglichen Infektion früh begegnen zu können. Ein Tier mit intraportaler Applikation markierter Hepatozyten hatte 14 Tage nach LCT einen starken Anstieg der Leukozytenzahl, der sich jedoch bei der Laboruntersuchung am Tag 28 wieder normalisiert hatte (Abb. 6F). Zwischen den Applikationsrouten intraportal, intrasplenisch und intraarteriell ergab sich in Bezug auf Leukozyten oder Infektionserscheinungen ($p > 0,05$ von Tag 0-14 t -test) keine signifikante Differenz.

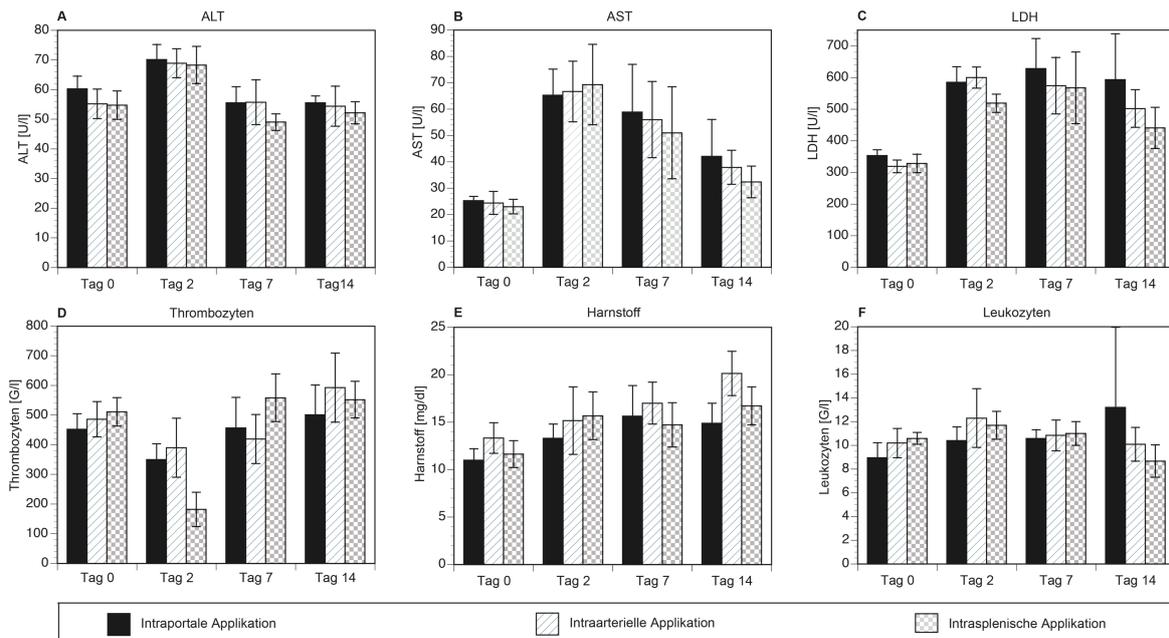


Abbildung 6: Transaminasen, Thrombozyten, Leukozyten und Harnstoff der Versuchstiere: Blutproben wurden an Tag 0, 2, 7 und 14 nach LCT entnommen (Abweichungen in Standard error of mean)

Der Vergleich der Applikationsrouten in Bezug auf die untersuchten laborchemischen Parameter der Versuchstiere zeigte keine signifikante Differenz.

3.4 Untersuchung der Applikationsrouten anhand histologischer Ergebnisse

Um die *in vivo* Datenerhebung zu vervollständigen, wurde eine Sektion der Versuchstiere mit ausführlicher Probennahme von den Empfängerorganen durchgeführt. Von jedem Empfängertier wurden 42 Lebergewebs- und sechs Milzproben entnommen. Eine Vielzahl histologischer Methoden wurde angewandt, um diese Gewebeproben zu analysieren. Die morphologische Auswertung der Gewebeproben erfolgte auf Basis einer HE-Färbung. Zum indirekten Nachweis der Hepatozyten erfolgte eine Berliner-Blau-Färbung, zum direkten Nachweis eine immunhistologische Färbung mit hepatozytenspezifischem CK-18 Antikörpern und FISH-Typing. Die Berliner-Blau-Färbung zeigt die Beladung von Zellen mit Eisenpartikeln (MPIO) an. In Verbindung mit dem FISH-Typing konnte exemplarisch bewiesen werden, dass die Berliner-Blau positiven Zellen ebenfalls ein Y-Chromosom des männlichen Spenders trugen. Diese Methode wurde vor allem in den Gewebeproben der Leber angewandt. (Abb.12). Im Milzgewebe ist die Identifizierung von Zellen als Leberzellen mittels CK-18 Färbung unternommen worden. Dies war in der Leber wegen des ubiquitären Vorkommens von CK-18 nicht

sinnvoll. In der Leber erfolgte der indirekte Nachweis von transplantierten Hepatozyten über die Berliner-Blau-Färbung zur Darstellung der Eisenoxid-Partikel Beladung. Für die Statistik wurden die Versuchstiere mit einer Standdauer von 14 Tagen ausgewertet, sechs Tiere in der Versuchsgruppe und drei in der Kontrollgruppe. Die anderen Standzeiten wurden histologisch ebenfalls aufgearbeitet, sind jedoch nicht Teil der Statistik. Auswertungsschema im Abschnitt 2.6.4.

3.4.1 Zellapplikation via *V. portae*

Auswirkung der Applikationsroute auf die Empfängerleber

Die Auswertung der Lebergewebsproben erfolgte im Hinblick auf den Effekt der Applikationsroute auf die Empfängerleber. Nekrose, Inflammation und Thrombenbildung wurden quantifiziert. 14 Tage nach LCT zeigte sich nach intraportaler Zellapplikation bei vier Tieren eine milde Nekrose, bei einem Tier eine mittlere Nekrose. Bei drei Tieren zeigte sich eine milde, bei zwei weiteren eine mittlere inflammatorische Reaktion (Abb. 7, Abschnitt 2.6.4 für genaue Einteilung der Klassifikation). Bei einem Tier mit einwöchiger Standdauer wurden sechs Mikrothromben nachgewiesen. Nach zweimonatiger Standzeit zeigte sich eine milde Nekrose und keine Inflammation. 77,8% aller Versuchstiere mit LCT markierten Hepatozyten wiesen eine oder mehrere Mikrothromben auf. Die Mikrothromben stellten sich positiv in der Berliner-Blau-Färbung dar.

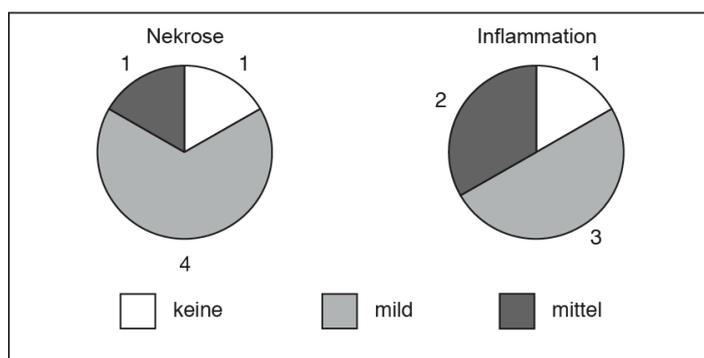


Abbildung 7: Histologische Auswertung nach intraportaler LCT: Leberschädigung zwei Wochen nach portaler LCT mit markierten Hepatozyten. (Ergebnisse in absoluter Anzahl der Versuchstiere, darum keine Angabe der Standardabweichung)

Bei Applikation nativer Hepatozyten ($n=3$) zeigten sich zwei Wochen nach LCT ein Tier mit milder Nekrose und zwei Tiere mit mittelschwerer Nekrose. Ein Tier zeigte eine mittelschwere Inflammation, die beiden anderen eine schwere Entzündungsreaktion. Im Vergleich der Zellapplikation von nativen und MPIO-markierten Hepatozyten ergab sich in Bezug auf Nekrose ($p=0,251$ t -Test) oder Inflammation ($p= 0,149$ t -Test) bei intraportaler Applikation kein signifikanter

Unterschied. Nach nativer Zellapplikation wies ein Tier zwei Mikrothromben auf. Die nach dieser Applikationsroute histologisch nachgewiesenen Mikrothromben führten nicht zum Kompletverschluss der Portalgefäße. Mit einer histologischen Analyse der Leber können immer nur einzelne Ausschnitte des Organs untersucht werden (42 Proben/ je Leber). Ein Bild aller Mikrothromben in Form von Hypointensitäten wurde radiologisch erhoben.

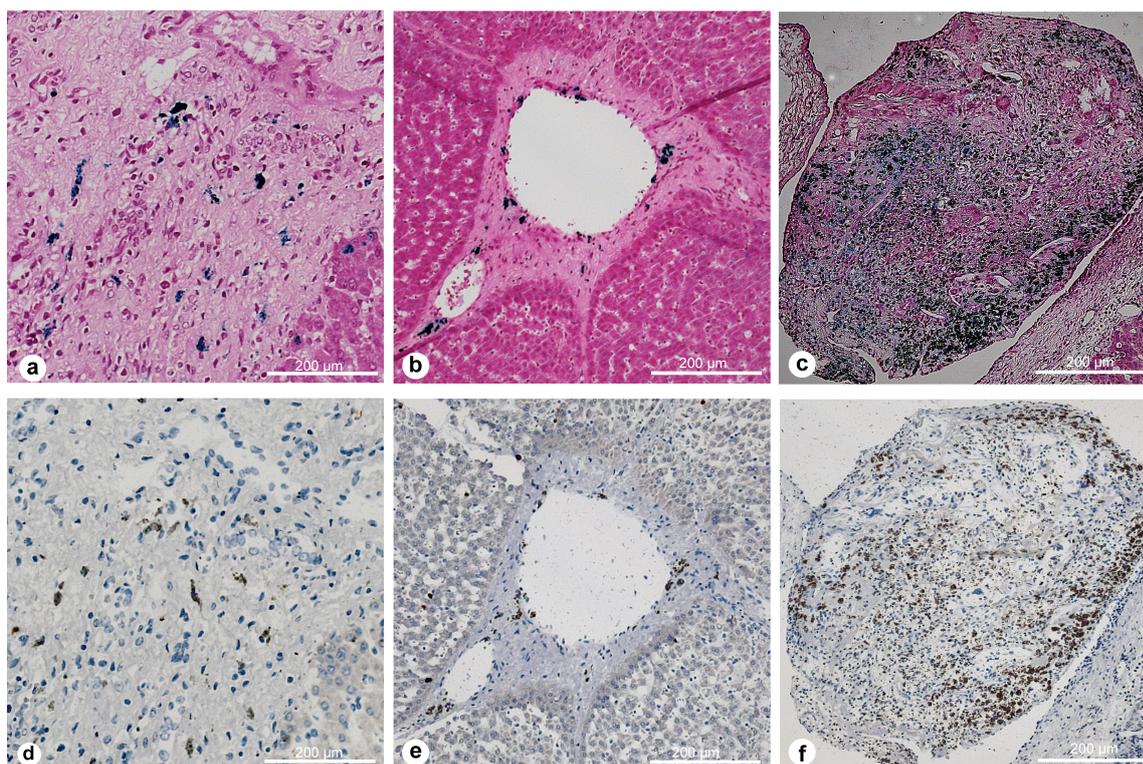


Abbildung 8: Gewebeproben nach intraportaler LCT: Histologische Auswertung der Gewebeproben des Lobus Quadratus und links medialen Lappen 14 Tage nach LCT, via V. portae, in Paraffin eingebettet a-c, Berliner-Blau-Färbung. d-e Immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen Makrophagen.

Die Mikrothromben wiesen in der histologischen Untersuchung eine positive Reaktion in der Berliner-Blau-Färbung auf (Abb. 8c Mikrothrombus im Portalast des links medialen Leberlappens). Im umliegenden periportal Gewebe der Leber wurde ebenfalls eine positive Berliner-Blau-Färbung gefunden und so indirekt der Nachweis einer Integration von transplantierten Hepatozyten erbracht (Abb. 7a,b). Eine immunhistologische Kontrolle mit einer makrophagenspezifischen Antikörperfärbung bewies eine Infiltration des Thrombus mit Makrophagen (Abb. 8d-f, Abb. 8f Thrombus positive immunhistologische Reaktion auf Makrophagen). Eine molekularbiologische Untersuchung erfolgte mittels FISH-Typing, die eine Besetzung der Peripherie des Thrombus mit FISH positiven Zellen nachweist. Diese Zellen reagierten nicht mehr auf eine immunhistologische Antikörperfärbung mit

hepatozytenspezifischem CK 18, wahrscheinlich wegen des Abbaus durch Makrophagen (Abb. 8 d).

Zellintegration

Die Zellintegration wurde mittels Berliner-Blau-Färbung und FISH-Typing bewertet. Zellen im periportal Gewebe zeigten sich positiv im Nachweis mit der FISH-Sonde. Dies bewies die Anwesenheit männlicher Zellen nach kreuzgeschlechtlicher Operation. $52,4 \pm 5,8\%$ (Abb. 16) aller Leberschnitte der Empfängertiere wiesen markierte Hepatozyten auf. Die MPIO Markierung interferierte nicht mit der Zellintegration, denn auch bei der Transplantation von nativen Zellen fanden sich ebenso viele FISH positive Hepatozyten im periportal Gewebe.

3.4.2 Zellapplikation per direkter Milzinjektion

Auswirkung der Applikationsroute auf die Empfängerleber

Bei der intrasplenischen Applikation gab es bei einem Tier eine schwere inflammatorische Reaktion und bei drei Tieren eine milde Nekrose und Inflammation, die verbleibenden Tieren zeigten eine unauffällige Lebermorphologie.

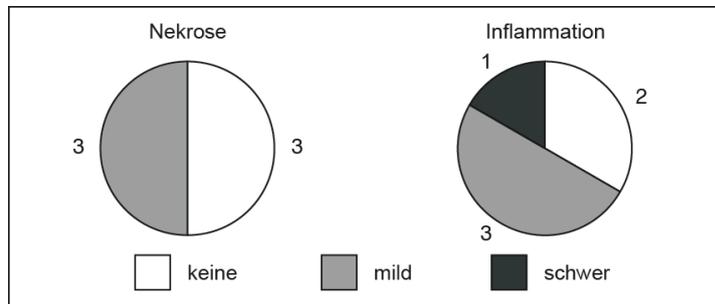


Abbildung 9: Histologische Auswertung nach intrasplenischer LCT: Histologische Auswertung der Leberschädigung zwei Wochen nach intrasplenischer LCT mit markierten Hepatozyten. (Ergebnisse in absoluter Anzahl der Versuchstiere, darum keine Angabe der Standardabweichung)

Bei einem Tier mit zweiwöchiger Standdauer wurden in den 42 Lebergewebsproben zwei Mikrothromben nachgewiesen. In der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes nach LCT trat nach einer Woche bei einem Tier eine milde Nekrose und Inflammation auf. Nach zweimonatigem Versuchszeitraum zeigte sich eine milde Nekrose und kein Zeichen einer Inflammation. Dieses Tier entwickelte auch einen Mikrothrombus. 33,3% aller Versuchstiere mit LCT markierter Hepatozyten wiesen histologisch Mikrothromben auf. In der Kontrollgruppe ($n=3$) hatte ein Tier eine mittlere Nekrose und Inflammation, zwei Tiere milde Nekrosen und mittlere Inflammation. In Bezug auf Nekrose ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Applikation nativer und markierter Hepatozyten. Nekrose bei markierten Hepatozyten $1 \pm 1,27$ (Standardabweichung) und bei nativen Hepatozyten $5,3 \pm 0,577$

(Standardabweichung) ($p=0,001$ t -Test). Die Inflamationsreaktion war bei Applikation nativer im Vergleich zu markierten Hepatozyten ($p=0,198$ t -Test) ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

Zellintegration

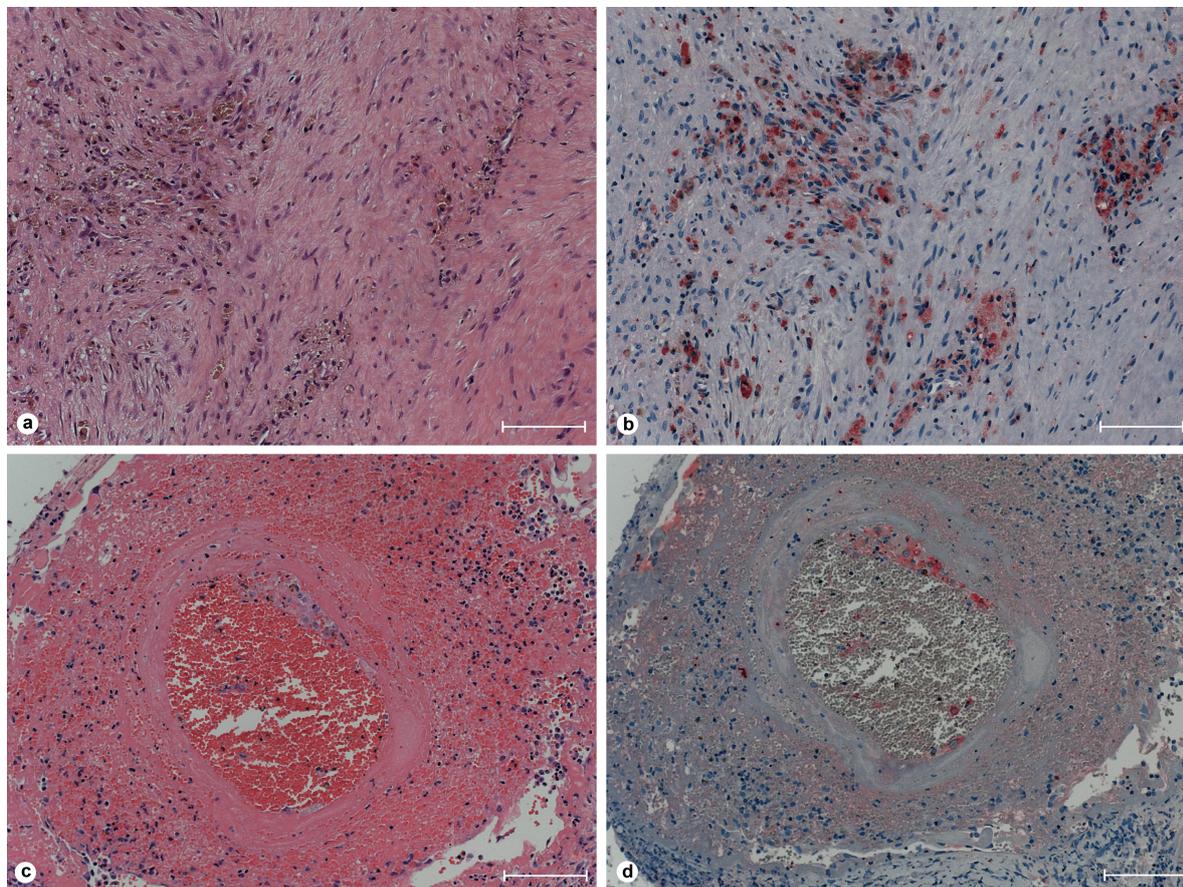


Abbildung 10: Histologische Gewebeproben aus der Milz: Milzgewebe in Paraffin eingebettet 14 Tage nach Transplantation Nachweis der Zellintegration (a und b). a) Milzproben zeigen Zellnester im Milzparenchym (HE Färbung) b) Immunhistologische Färbung der Gewebeprobe c) Milzvenenthrombose drei Tage nach intrasplenischer Applikation (HE Färbung) d) Immunhistologische Färbung der Gewebeprobe mit CK-18 Antikörper, Nachweis von Hepatozyten im Thrombus (Markierung 100 μ m)

Die intrasplenisch durchgeführte LCT führte zur Integration der Hepatozyten in die Empfängerleber und die Milz (Abb. a-b). In der Leber wurde mittels Berliner-Blau-Färbung die Zellintegration evaluiert. Ein Tier zeigte nach zwei Tagen eine schwere Milzvenenthrombose (Abb. 10 c-d). $18,3 \pm 4,29\%$ der Gewebeschnitte zeigten eine Zellintegration (Abb. 16).

Die Migration der Zellen ins Milzparenchym wurde durch hepatozytenspezifisches CK-18 evaluiert. Die CK-18 Färbung zeigte eine Zellintegration der Hepatozyten ins Milzparenchym; es bildeten sich Leberzellnester. Bei 66,67% aller Versuchstiere nach intrasplenischer LCT konnten nach zwei Wochen Hepatozyten im

Milzparenchym nachgewiesen werden. Im Elektronenmikroskop fanden sich MPIO in den Leberzellen; dies zeigt die weitere Partikelretention der transplantierten Hepatozyten nach Transplantation.

3.4.3 Zellapplikation via *A. gastroepiploica*

Auswirkung der Applikationsroute auf die Empfängerleber

Die LCT via intraarterieller Zellapplikation wurde wie die in den vorhergehenden Abschnitten besprochenen Applikationsrouten ausgewertet. Systematisch erfolgte die Beurteilung der jeweils 42 Lebergewebsproben und der sechs Milzproben pro Tier. Nach zweiwöchiger Integrationszeit zeigte sich bei drei von sechs Versuchstieren nach Applikation markierter Hepatozyten eine milde Nekrose, bei einem Tier kam es zu einer mittelschweren Nekrose. Bei jeweils zwei Tieren trat eine mittelschwere und eine milde inflammatorische Reaktion auf, bei einem Tier kam es zu einer schweren inflammatorischen Reaktion (Abb. 11). In der zeitlichen Untersuchung der Gewebeproben zeigte sich jeweils bei einem Tier eine Woche nach LCT eine milde Nekrose und mittlere Inflammation. In dem Versuchstier mit zweimonatiger Standzeit zeigte sich eine milde Inflammation und Nekrose. Mikrothrombenbildung konnte histologisch bei keinem der Tiere mit diesem Applikationsweg nachgewiesen werden. Die intraarterielle LCT führte verglichen mit der intraportalen Applikation ($p = 0.005$) zu signifikant weniger Mikroembolisationen in der Leber. In der Kontrollgruppe ($n=3$ Tiere) wies ein Tier eine milde Nekrose und mittelschwere Inflammation auf. Die beiden verbleibenden Tiere zeigten mittelschwere Nekrosen und Inflammation.

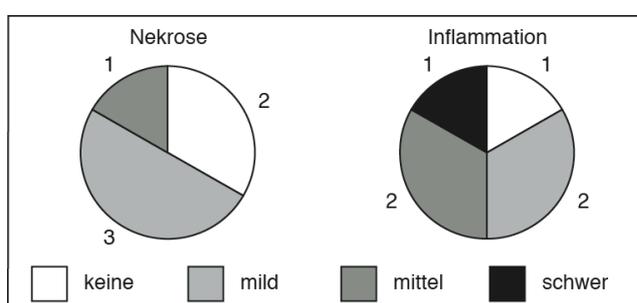


Abbildung 11: Histologische Auswertung nach intraarterieller LCT: Leberschädigung zwei Wochen nach intraarterieller LCT mit markierten Hepatozyten. (Ergebnisse in absoluter Anzahl der Versuchstiere, darum keine Angabe der Standardabweichung)

Die MPIO Markierung wirkte sich auch hier nicht auf die LCT aus. In der Kontrollgruppe kam es ebenfalls nicht zur Mikroembolisation. Die Applikation von nativen im Vergleich zu markierten Hepatozyten führte zu keiner signifikanten Differenz in Nekrose ($p=0,431$ t-Test) oder Inflammation ($p=0,72$ t-Test).

Zellintegration

In $43,7 \pm 11,43\%$ der untersuchten Gewebeproben aus der Leber fanden sich bei Auswertung mit Berliner-Blau-Färbung markierte Hepatozyten im periportal Gebiet. Bei vergleichbarer Zellintegration nach subsequenter Translokation zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen intraportaler und intraarterieller LCT ($p = 0,441$, chi-quadrat Test) (Abb.16). Bei 83,3% der Versuchstiere mit diesem Applikationsweg fanden sich in der immunhistologischen Auswertung mit hepatozytenspezifischem CK-18 Antikörper eine kleine Anzahl von Hepatozyten im Milzparenchym (Abb. 12 c-d).

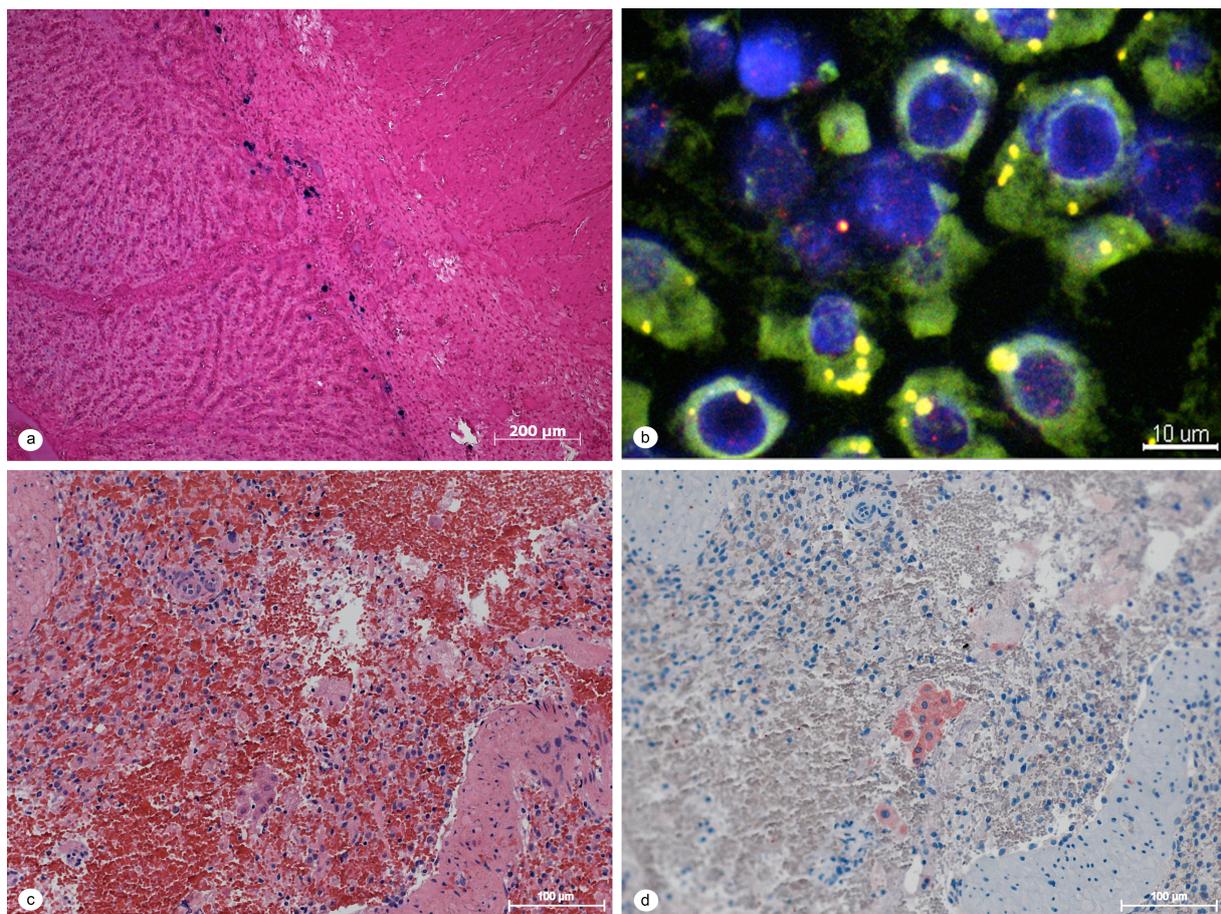


Abbildung 12: Gewebeproben nach intraarterieller LCT: Histologische Untersuchungen nach Zellapplikation über die A. gastroepiploica zwei Wochen nach Applikation. a) Hepatozyten im Lebergewebe (Berliner-Blau-Färbung) b) Darstellung mit Fish Typing zwei Wochen nach LCT c) Hepatozyten im Milzparenchym (HE) d) Immunhistologische Darstellung mit hepatozytenspezifischem Antikörper (CK 18) im Milzparenchym

Die Integration erfolgte vor allem in der roten Pulpa. Bei Durchführung der Zelltransplantation wurde der venöse Abstrom ins Portalsystem nicht unterbrochen. Es scheint zu einer Translokation der transplantierten Zellen ins portovenöse System gekommen zu sein. Eine eindeutige Verifikation der Anwesenheit von Spenderhepatozyten erfolgte mittels FISH Typing und PCR (Abb. 12 b und Abschnitt 3.3.4). Die Beladung der Spenderhepatozyten mit MPIO-Partikeln wurde

elektronenmikroskopisch verifiziert. Aus der Milzgewebsprobe eines Empfängertieres wurden Hepatozyten mit MPIO Beladung dargestellt (Abb. 13).

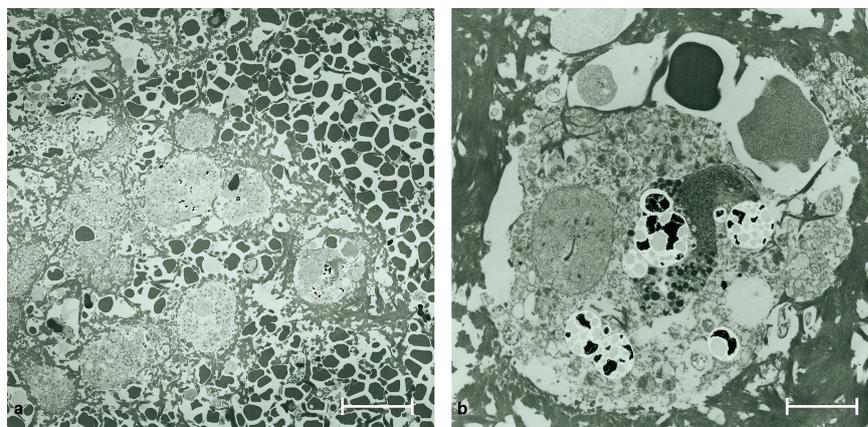


Abbildung 13:
Elektronenmikro-
skopische Aufnahme
einer Milzgewebsprobe:
Drei Tage nach intra-
arterieller Zelltrans-
plantation in die Milz. a)
Zellverband mit MPIO
Inokulation und b) MPIO
markierter Hepatozyt
(Markierung in a: 15,6 µm
in b: 2,96 µm).

3.4.4 Eindeutige Verifizierung der Spenderhepatozyten

Die kreuzgeschlechtliche Transplantation von männlichen Spenderhepatozyten in weibliche Empfängertiere ist ein diagnostischer Vorzug dieses Studiendesigns. Die transplantierten Spenderhepatozyten tragen ein Y-Chromosom und konnten so über den Einsatz von molekularbiologischen Techniken zweifelsfrei in den Organen der weiblichen Empfänger identifiziert werden. Eine Verifizierung der histologischen Daten erfolgte mittels FISH-Typing und Polymerasekettenreaktion (PCR). Im FISH-Typing stellt sich das Y-Chromosom durch eine rote Sonde dar (Abb. 14d). Der dargestellte Thrombus (Abb. 14a-d) korrelierte eindeutig mit hypointensen Areale in den bildgebenden MRT Befunden und dem histologischen Nachweis von Mikrothromben. Im Mikrothrombus fanden sich MPIO-beladene Zellen (Abb. 14a); hepatozytenspezifisches Antigen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um nicht mehr intakte Hepatozyten (Abb. 14b). Stattdessen zeigt sich eine Infiltration mit Makrophagen (Abb. 14c). Die FISH positive Reaktion weist die Herkunft der Zellen im Thrombus als männlich und somit Spenderhepatozyten nach. FISH-positive Zellen waren v.a. in der Peripherie der Mikrothromben lokalisiert (Abb. 14d). MPIO-markierte, FISH-positive Hepatozyten konnten im Periportalgebiet

bei $52,4 \pm 5,8\%$ Lebergewebebeurteilungen pro Empfänger gefunden werden.

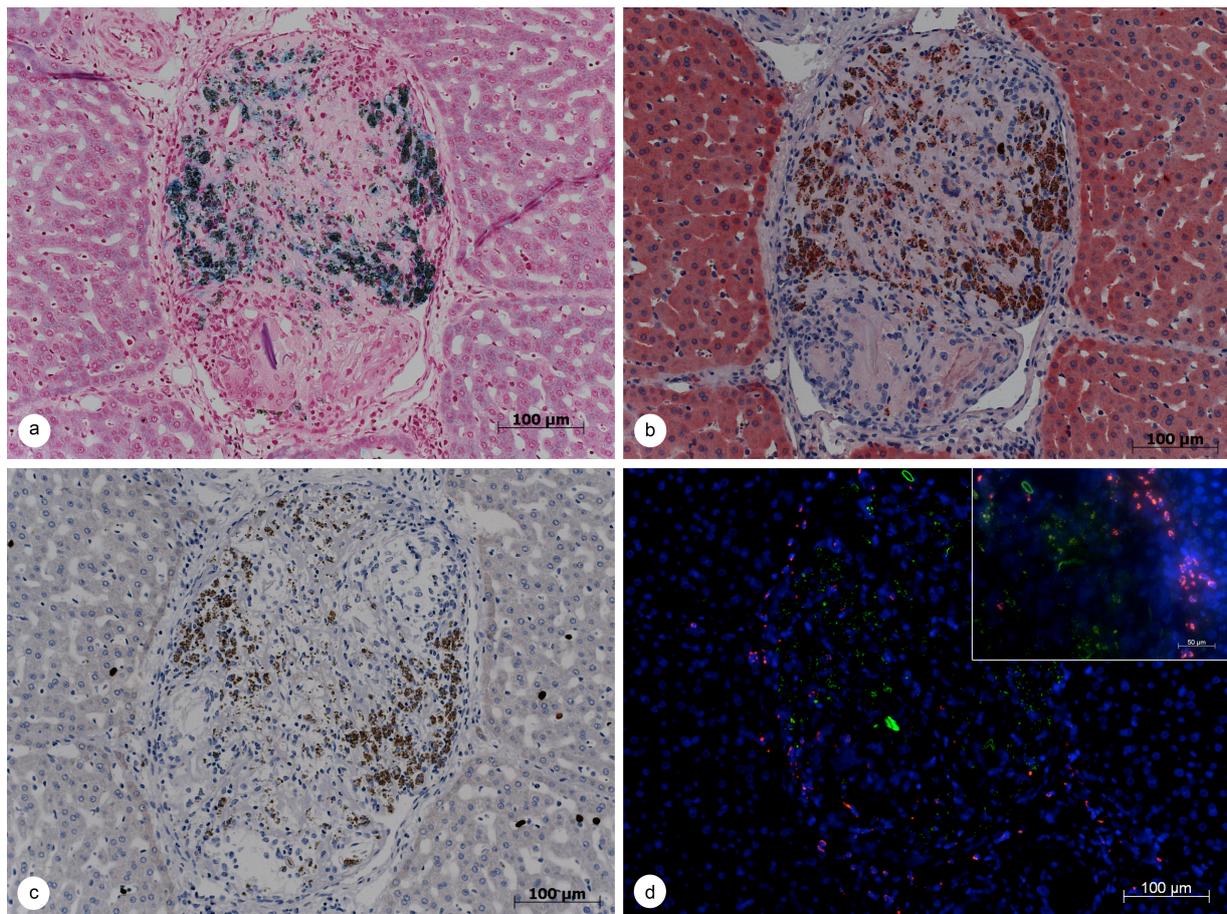


Abbildung 14: Histologische Korrelation der Signalauslösung in der Leber nach intraportaler Applikation, ausgelöst durch MPIO: dargestellt in Berliner-Blau. (a). Der Mikrothrombus ist nicht positiv auf hepatozytenspezifisches CK-18 Antigen 14-Tage nach LCT (b). c der Thrombus ist infiltriert von Makrophagen, Nachweis mit Makrophagen Antikörper. d Der Nachweis von Y-Chromosomen im Thrombus weist die Herkunft der Hepatozyten als männliche Donorzellen aus. Vergrößerung in der rechten oberen Ecke (Rot stellt die Y-Chromosomen dar)

Auch native FISH-positive Hepatozyten integrierten ins Periportalgebiet. Für den Nachweis der Spenderhepatozyten mittels PCR wurden kryokonservierte Lebergewebsproben ausgewertet. Die PCR für die geschlechtsbestimmende SRY Region verifizierte die Anwesenheit von männlicher DNA in der Leber nach intraarterieller und intraportaler Applikation, nicht nach intrasplenischer Applikation (Abb. 15).

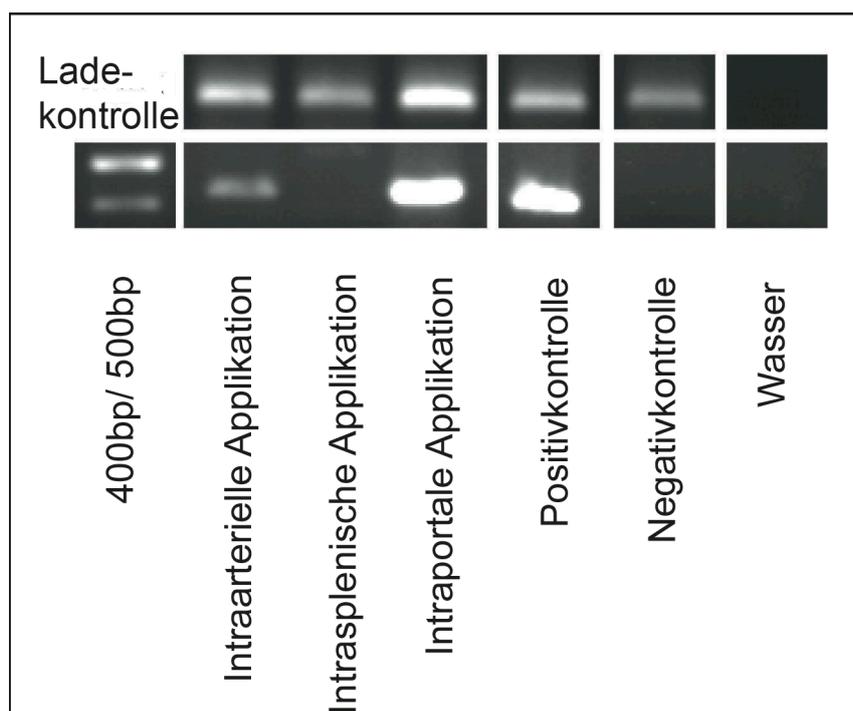


Abbildung 15: Vergleich der Zellintegration in die Leber nach den verschiedenen Applikationswegen: Die PCR Untersuchung der geschlechtsbestimmenden Region des SRY Genes zeigt die Anwesenheit von männlichen Zellen nach kreuzgeschlechtlicher LCT. Die Zellintegration wurde nach zwei Wochen und für drei Applikationsrouten bewertet (n=6 je Route)

3.5 Komplikationen

Die LCT birgt ein mit der operativen Durchführung verbundenes Morbiditätsrisiko. Die durch die LCT erforderliche Immunsuppression erhöht das Risiko für Infektionen, die Applikation der Hepatozyten birgt die schon in der Einleitung beschriebenen Risiken. Intraoperativ wurde bei einem Tier mit intraportaler Zellapplikation eine Gallengangsläsion verursacht, dies führte zu einer Erhöhung der γ -Glutamyl-Transferase auf 106 U/l drei Tage nach LCT, nach einer Woche sank der Wert wieder auf 92 U/l ab. Das Tier wurde planmäßig nach sieben Tagen ohne weitere Auffälligkeiten finalisiert. Bei einem anderen Tier mit intraportaler Zellapplikation zeigte sich bei Sektion eine Bridenbildung mit einer Fixierung der Milz in torquierter Position, allerdings ohne Milzinfarktzeichen. Dies dürfte ebenfalls eine Komplikation durch inadequate Rücklagerung der Organe nach dem Eingriff gewesen sein. Bei einem Tier mit Prozedur zur intraarteriellen LCT wurde beim operativen Verschluss des Abdomens versehentlich die Milz verletzt, was zu einem Milzabszeß und bei Sektion zu Zeichen einer Peritonitis führte. Die oben genannten Komplikationen sind wohl chirurgisch-technisch zu begründen.

Nach intrasplenischer LCT entwickelte ein Tier nach zwei Tagen eine fulminante Milzvenenthrombose und musste vorzeitig finalisiert werden. Immunhistologisch

fanden sich im Thromboseareal transplantierte Hepatozyten, die diese vermutlich ausgelöst haben (Abb. 10c-d). Ein weiteres Tier mit dieser Applikationsroute entwickelte eine Pfortaderthrombose. Eine radiologisch nachgewiesene Thrombose der großen Pfortader wurde bei 30% der Empfängertiere nach intrasplenischer oder intraportaler Applikation gefunden im Gegensatz dazu verursachte die intraarterielle Applikation keine Pfortaderthrombose.

3.6 Abschließender Vergleich der Applikationsrouten der LCT

Um die Applikationsrouten evaluieren zu können, wurden die drei Versuchsgruppen mit intraportaler, intraarterieller und parenchymataller Applikation 14 Tage nach LCT gegenübergestellt. Aus der Untersuchung der laborchemischen Parameter zeigte sich, dass alle Applikationsrouten ähnliche Auswirkungen haben. Laborchemisch ergab sich kein Hinweis auf einen möglichen Vorteil eines Zelladministrationsverfahrens. In der Auswertung der bildgebenden Verfahren ergaben sich signifikant mehr Mikrothromben und Thrombosen nach intraportaler und intrasplenischer Applikation als nach Applikation via A. gastroepiploica. Die intrasplenische LCT löste vermehrt nicht-operativ bedingte Komplikationen aus. Die Zellintegration, gemessen in der Anzahl der Berliner-Blau positiven Schnitte nach 14 Tagen ($n = 6$ Tiere), zeigte keine signifikante Differenz nach intraportaler oder intraarterieller Zellinfusion (chi-quadrat test $p = 0,441$). Die Zellintegration war nach intrasplenischer LCT verglichen mit portaler ($p = 0,007$) oder intraarterieller LCT ($p = 0,036$) (Abb. 16) signifikant niedriger. Mehr markierte Hepatozyten ließen sich also indirekt über die Berliner-Blau-Färbung bei intraportaler und intrasplenischer Applikation als bei intraparenchymataller Applikation nachweisen. Die intraportale Zelladministration löste jedoch mehr Mikrothromben aus. Zwischen allen drei Zelladministrationsrouten gab es keine signifikante Differenz bezogen auf Nekrose und Inflammation: Bei intraportaler Applikation, verglichen mit intraparenchymataller Applikation, ergibt sich ein p -Wert in Bezug auf die Nekrose von $p = 0,141$ und Inflammation von $p = 0,524$ (t-Test). Intraportale Applikation verglichen mit intraarterieller Applikation in Bezug auf Nekrose $p = 0,834$ und in Bezug auf Inflammation $p = 0,362$. Der Vergleich der beiden Milzrouten zeigt ebenfalls keine signifikante Differenz in den Auswirkungen auf die Leber (intraarterielle vs. intraparenchymatal) $p = 0,251$ für Nekrose und $p = 0,233$ für Inflammation. Histologisch gab es keine Zeichen einer malignen Transformation im Areal der Zellintegration.

Eine eindeutige Zelltranslokation und Zellintegration in die Leber erfolgte nach intraportaler und intraarterieller Injektion (Vgl. Abschnitt 3.3.4). Somit zeigt sich die Applikation via *A. gastroepiploica* als die komplikationärmste bei effizienter Zellintegration in die Leber.

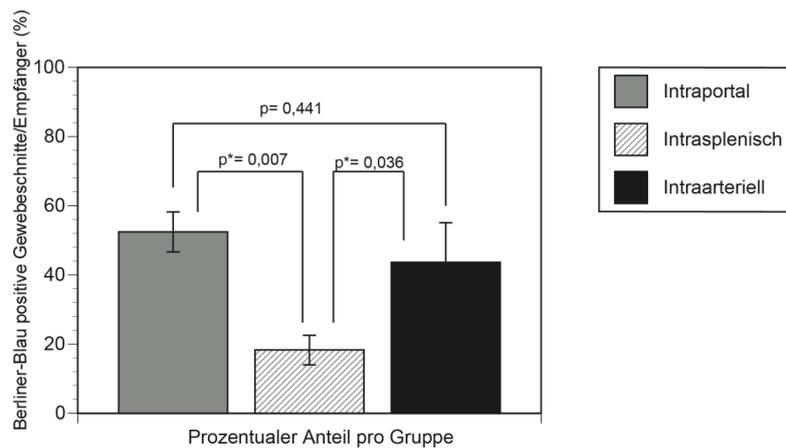


Abbildung 16: Vergleich der Applikationsrouten: prozentualer Anteil der Zellintegration 14 Tage nach LCT. p^* sind signifikant

4 Diskussion

4.1 Hepatozelluläre Transplantation im Großtiermodell

Zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der LCT sind verschiedene Tiermodelle erprobt worden. Vor allem im Kleintiermodell wurden extensive Untersuchungen unternommen (vgl. Einleitung, Abs. 1.4). Trotz der vielen Vorteile, die ein Kleintiermodell bietet, und obwohl sehr viel über das Immunsystem von Nagern bekannt ist, machen die Unterschiede zwischen der humanen Spezies und Nagern eine einfache Übertragbarkeit der Ergebnisse schwierig. Ein Kleintiermodell kann nicht ausreichend die Reaktion des menschlichen Organismus auf mögliche Therapieregime vorhersagen. Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) werden bei Nagern, im Gegensatz zum Menschen und zum Schwein, nur auf antigenpräsentierenden Zellen vorgefunden⁹². Die verwendeten Nager sind häufig sehr jung und mit einem noch nicht vollständig entwickelten Immunsystem ausgestattet. Im Vergleich zum Menschen haben Nager mit umgekehrtem Tag-Nacht Zyklus eine andere Chronobiologie. Großtierexperimente sind im Vergleich zum Kleintier teurer und aufwändiger. Sie bieten aber den Vorteil eines besseren Verständnisses für immunologische Hürden, ganz abgesehen von anatomischer Ähnlichkeit mit dem Menschen. Versuchstiere, wie die in der vorliegenden Studie verwendeten Miniaturschweine, werden häufig als Modelle im Transplantationsbereich genutzt, weil ihre physiologischen, anatomischen und immunologischen Eigenschaften dem menschlichen Organismus ähneln⁷⁶. Die in unserer Studie verwendeten Miniaturschweine hatten den Vorteil, dass sie mit zwei Jahren ein ausgereiftes Immunsystem hatten und bei einem Liefergewicht bis maximal 31 Kilo bereits ausgewachsen waren. Dies ermöglichte sowohl die operative Prozedur als auch die Vergleichbarkeit der bildgebenden Daten, da die Tiere in der zweimonatigen Studiendauer nicht weiter wuchsen.

4.1.2 Vorbedingungen der Versuchsdurchführung

Nach der ausführlichen Übung von chirurgischer Technik an toten Versuchstieren und der Etablierung der Leberzellisolierung in Vorversuchen wurde eine Versuchsreihe gestartet, in der ein Tier je Applikationsroute am 2., 7., 14., und 28. Tag untersucht wurde. Diese Standdauer wurden ebenfalls für Kontrolltiere mit Applikation nativer Hepatozyten entlang aller Applikationsrouten untersucht. Danach

erfolgte die Untersuchung der Versuchs- und Kontrollgruppen immer jeweils für zwei Wochen. Die Ausgangswerte von Gewicht und Serumproben der Versuchs- und Kontrolltiere lagen auf vergleichbarem Niveau. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Gruppen. Dies bietet die Basis für Ergebnisse mit verlässlicher Aussage. Alle durchgeführten Eingriffe erfolgten nach Laparotomie, die mit einem Risiko der großen Narbenhernie und Bridenbildung verbunden ist. Außerdem gibt es das Risiko einer Infektion beim Eingriff in den Peritonealraum. In der vorliegenden Studie wurde dennoch ein offener Zugang wegen der besseren chirurgischen Durchführbarkeit und der Gefahr der Blutung bei direkter Milzinjektion gewählt, die so besser kontrollierbar war. Rosenthal *et al.* untersuchten in einer Studie am Schwein die verschiedenen chirurgischen Möglichkeiten bei Applikation von allogenen porcinen Hepatozyten in die Milz. Dabei erfolgte der Milzzugang nach Laparotomie über retrograde Injektion von Zellen in die Milzvene, transarteriell, via intrasplenische Applikation, ferner als perkutane Applikation per direkter intrasplenische LCT und als laparoskopisch intrasplenische Applikation. Bei der perkutanen Applikation wurde jedoch laparoskopisch zusätzlich das Milzhilum temporär ligiert. Nach Laparotomie fanden sich bei intraarterieller LCT nur kleine Nekroseareale in der Milz, und es kam zum Teil zur Portalvenenthrombose. Die Applikation via Milzvene führte bei allen Tieren zur schweren Portalvenenthrombose. Nach der offenen Applikation ins Milzgewebe traten keine sofortigen chirurgischen Komplikationen auf, es zeigten sich aber schwere perisplenische Adhäsionen und in einem Fall eine Portalvenenthrombose. Bei einer geringeren Anzahl von 2×10^9 Hepatozyten waren die Auswirkungen mit eingeschränkten perisplenischen Adhäsionen und bei einem Tier mit Milzvenenthrombose weniger ausgeprägt. Bei der perkutanen Applikation stellte sich die Durchführung des Eingriffs problematisch dar, da es häufig zu einer Kapselruptur mit Blutungen und Abfluss der transplantierten Zellen ins Peritoneum kam. Nach laparoskopischer LCT stellten sich geringere perisplenische Adhäsionen dar und es kam in jeweils einem Tier zu einem Abszess und zu einer Portalvenenthrombose⁸⁸. In der vorliegenden Studie wurde die Laparotomie gewählt, um etwaige Blutungen, wie sie bei perkutaner Applikation auftraten, besser kontrollieren zu können. Nach intraportaler Zellapplikation kam es in einem Fall zu einer schweren perisplenischen Adhäsion. Diese Adhäsionen könnten vielleicht durch Spülung des Bauraumes nach dem Eingriff verringert werden, und eine sorgfältigere Rückverlagerung könnte die Fixation in einer

unphysiologischen Position möglicherweise verhindern. Bei einer intraarteriellen LCT zeigte sich ein Milzabszess, vermutlich durch einen chirurgischen Fehler, eine unabsichtliche Milzverletzung, hervorgerufen. Bei Rosenthal *et al.* trat diese Komplikation nach der laparoskopischen Anwendung und bei intrasplenischer Injektion auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass nach Milzinjektion oder Milzverletzung das Risiko für einen Milzabszess erhöht ist. Der laparoskopische Zugang verursachte ebenso wie die Laparotomie Adhäsionen⁸⁸. Diese Adhäsionen könnten auch durch die physiologische Haltung der Schweine bedingt sein. Sobald die Schweine aus der Narkotisierung erwachen, stehen sie auf. Dadurch erfolgt eine Verlagerung der Eingriffsstelle und die Organe werden gegen das Peritoneum oder andere Organe gepresst, was zu Adhäsionen führen könnte.

4.1.3 Immunsuppression

Die für diesen Versuch verwendeten Tiere wurden einer Transplantation mit allogenen Donorhepatozyten unterzogen. Eine Immunsuppression um eine Rejektion zu verhindern war dabei unerlässlich. Da das Immunsystem des Schweins dem menschlichen Immunsystem nahe steht, wurde es unter anderem in der vorliegenden Studie als Modell gewählt. Die Rejektionsreaktion beim Menschen kann durch Großtiermodelle nachgeahmt werden, die Immunreaktion im Schwein ist von den humanen ähnlichen T-Zellen abhängig. Schweine und Menschen zeigen gleichgerichtete physiologische Reaktionen auf Medikamente, allerdings ist die Stoffwechselung im Organismus anders, deswegen ist die Ableitung der Dosis aus Großtiermodellen nicht einfach⁷⁶. In Studien zeigte sich, dass bei oraler und intravenöser Verabreichung von Calcineurininhibitoren bei Minischweinen der Blutspiegel niedriger war als bei vergleichbarer Dosis beim Menschen. Dies ist durch ein beim Schwein erhöhtes Distributionsvolumen zu erklären. Schweine benötigen im Vergleich zum Menschen daher eine zwei- bis vierfach höhere Dosis an Calcineurininhibitoren und eine 10 bis 30 mal höhere Dosis an Steroiden⁹³. Die Problematik der Immunsuppression stand nicht im Zentrum der hier vorliegenden Studie, da nach Jahrzehnten Transplantationserfahrung am Menschen ausreichende Erfahrung existiert. In Studien zur Nierentransplantation am Miniaturschwein waren 10mg/ kg/ KG intravenöse Gabe von Cyclosporin A suffizient⁹⁴. In unserer Studie erhielten die Versuchstiere 5 mg/ kg/ Körpergewicht Cyclosporin A oral. Diese Medikation wurde 48h und 24h vor der geplanten Transplantation begonnen. An

Operationstagen und Tagen der bildgebenden Untersuchung erfolgte die Medikation mit Calcineurininhibitoren intramuskulär und mit Kortikosteroiden intravenös. An allen anderen Tagen erfolgte die Verabreichung wieder oral.

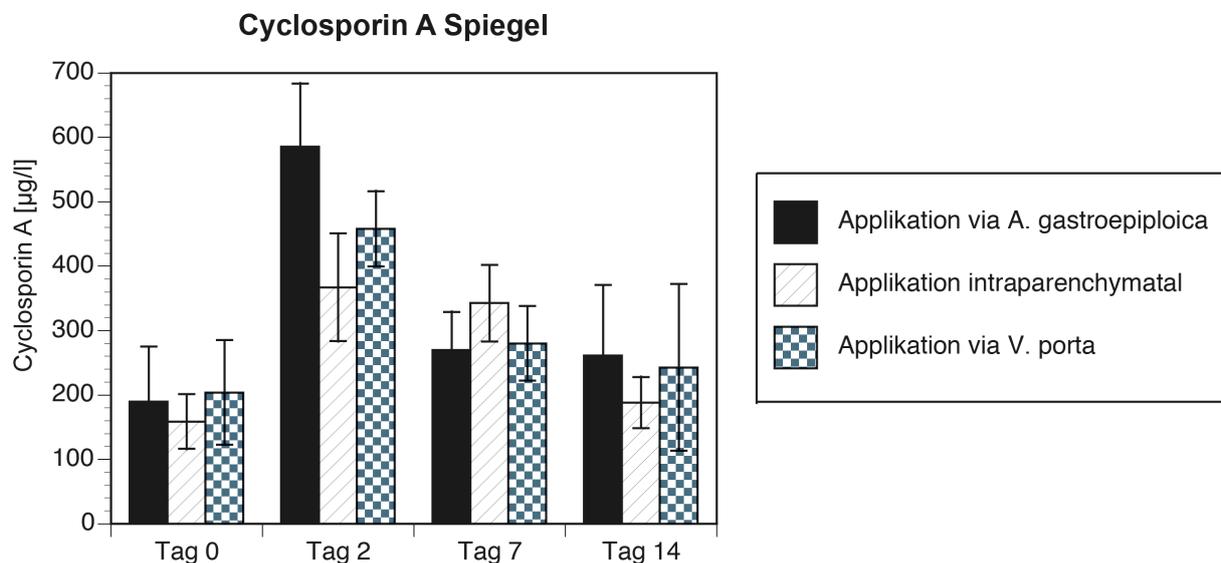


Abbildung 17: Cyclosporin A Serumspiegel der Empfängertiere: Am Tag der Operation wurde der Serumspiegel zum ersten Mal bestimmt, da an beiden Tagen vorher bereits eine Gabe des Medikamentes erfolgte (Abweichung in SEM)

Dabei ergaben sich Schwierigkeiten bei der eigentlichen Zuführung der Medikation. Die Tiere lebten in einer Herde von bis zu sechs Tieren, und die orale Gabe von Cyclosporin A und Prednisolon erfolgte in Form einer in der Nahrung platzierten Dosis. Bei der Verabreichung gingen Teile des Nahrungsmittelvektors verloren oder wurden in Teilen von anderen Tieren der Herde aufgenommen. Dies machte eine Dosierung auf gleichbleibendem Niveau schwierig. Teilweise wurden bei der Messung der Serumspiegel Schwankungen festgestellt (Abb. 17). An Tag zwei nach der Operation waren die Spiegel des Cyclosporin A relativ hoch; danach kam es zum Absinken des Wertes bei einzelnen Tieren. In einer untersuchten Herde könnten so unterschiedliche Dosierungen und eine korrespondierende erhöhte oder verringerte Infektionsanfälligkeit zustande gekommen sein. Dies könnte zu einer ungenügenden oder überhöhten Immunsuppression beigetragen haben. Möglicherweise bedingte dies einen Abbau der transplantierten Leberzellen bereits zwei Wochen nach LCT, wie in einigen Proben durch immunhistochemische Darstellung von Makrophagen gezeigt (Abb. 14c). Obwohl die gewebsständigen Hepatozyten ein positives Y-Chromosom in der FISH-Darstellung zeigten, waren sie zum Teil von Makrophagen bereits aufgenommen (Abb. 8d). Der indirekte Nachweis von transplantierten Hepatozyten mittels Berlin-Blau-Färbung erlaubt keinen Rückschluss, ob die Zellen

noch intakt sind. In weiterführenden Großtierversuchen sollte das Protokoll zur Immunsuppression optimiert werden.

4.1.4 Zellmarkierung mit MPIO-Partikeln

SPIO-Partikel sind für den humanmedizinischen Bereich in Deutschland zugelassen, da die Partikel im menschlichen Körper abgebaut werden können. Die Zelldetektion mit SPIO-Partikeln ist jedoch im MRT schlechter als mit MPIO-Partikeln, es kann keine Einzelzelldetektion auf Zellkulturebene erfolgen. Der in dieser Studie verwendete MPIO-Partikel hat einen größeren Eisengehalt, der eine größere Auswirkung im magnetischen Feld des MRT erzeugt^{61,63,95}. Im Moment gibt es jedoch für den humanmedizinischen Bereich in Deutschland keine klinische Zulassung für MPIO-Partikel. Der polymerversiegelte MPIO-Partikel ist nicht abbaubar und persistiert wahrscheinlich im menschlichen Körper. Dies könnte eine Hürde bei der klinischen Zulassung sein. Unabhängig von der weiteren klinischen Anwendbarkeit im humanmedizinischen Bereich stellt die Markierung mit MPIO-Partikeln ein wichtiges Werkzeug in weiteren Studien der noninvasiven Überwachung der LCT auf zellulärer Ebene dar. Insbesondere in weiteren, präklinischen Großtiermodellen können so grundlegende Mechanismen nach LCT, Komplikationen etc. überwacht werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden auch, um die Durchführbarkeit einer MPIO-Markierung und Zelldetektion *in vivo* zu beweisen, die drei verschiedenen Applikationsrouten der Zelladministration von Hepatozyten gewählt.

4.1.5 Nachweismethoden transplanteder Hepatozyten

Die Nachweismethode transplanteder Hepatozyten im Empfängerparenchym erfolgte bisher prinzipiell entweder durch Zellmarkierung mit Farbstoffen oder Radioisotopen oder durch die Verwendung mutagener Tiermodelle. Keine dieser Methoden erlaubte eine nachhaltige Zelldetektion ohne Strahlenbelastung. Landis *et al.* zeigten ebenfalls eine Methode der Zelldetektion mittels ³¹P spektroskopischer MRT Darstellung. Doch auch diese Methode erforderte einen *ex vivo* Gentransfer, der für die klinische Anwendung nicht zugelassen ist⁹⁶. In der vorliegenden Dissertation wurde ein Tiermodell mit weiblichen Miniaturschweinen als Empfängertiere und männlichen Hausschweinen als Organdonatoren verwendet. Durch die kreuzgeschlechtliche Transplantation ist sicher nachzuweisen, dass die untersuchten Zellen im Empfängerparenchym vom männlichen Donor stammen, da

weibliche Schweine die geschlechtsbestimmende Y-Region nicht aufweisen. Eine Zellmarkierung und *in vivo* Nachverfolgung von Zellen mittels MPIO-Markierung wurde untersucht. Die Beladung der Hepatozyten mit Eisenoxidpartikeln gewährleistete eine *in vivo* Bildgebung und in der histologischen Aufarbeitung eine einfache, indirekte Nachweismethode, um die Zellmigration der transplantierten Zellen im Gewebe nachzuvollziehen. Die Beladung mit MPIO-Partikel bringt allerdings keinen eindeutigen Nachweis, da die transplantierten Zellen auch von Abwehrzellen phagozytiert worden sein können. Der eindeutige molekularbiologische Nachweis ist sehr aufwändig und teuer. In dieser Studie wurden als eindeutige Nachweismethoden der transplantierten Hepatozyten im Empfängerorgan, molekularbiologische Maßnahmen (FISH-Typing) und PCR eingesetzt. Damit ist ein Langzeitnachweis der transplantierten Zellen im Empfängerparenchym möglich. In vorhergehenden Studien wurden alternative Verfahren wie die Markierung mit exogenen Substanzen, wie z.B. Dioctadecyl-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat, genutzt. Nachteil dieser Markierungsform ist, dass die verwendeten Stoffe abbauenden Prozessen unterliegen⁵³. Genetische Modelle, wie das der DPPIV--Fischer-344 Ratte, ermöglichen eine *in vivo* Darstellung mit einer Fluoreszenz Bildgebung⁷². Dieses Modell ist jedoch beim Menschen oder Großtier nicht anwendbar. In unserer Studie gelang zum ersten Mal der Nachweis der *in vivo* Zelldetektion von Hepatozyten mit nicht invasiven Maßnahmen im Großtier. Das Tiermodell des Miniaturschweines mit kreuzgeschlechtlicher Transplantation eignet sich für einen *ex vivo* Nachweis von transplantierten Hepatozyten. Die Markierung mit MPIO-Partikeln eignet sich sowohl zur *in vivo* Darstellung als auch zum indirekten *ex vivo* Nachweis⁶⁴.

4.2 Intraportale Zelltransplantation

Im humanen Bereich werden sowohl Leber als auch Milz als probate primäre Implantationsorte für die LCT gesehen. Die Leber als natürliches Umfeld bietet eine optimale Zellumgebung mit hepatotropen Faktoren als Zellintegrationsort von transplantierten Hepatozyten⁹. Ein Vorteil der intraportalen im Vergleich zur intrasplenischen Zellapplikation ist eine geringere Zeitverzögerung, bis transplantierte Hepatozyten das Gefäßbett der Leber erreichen. Bei intrasplenischer Applikation beträgt diese Verzögerung bis zu 48 Stunden, und nur eine Fraktion der

Zellen erreicht die Leber^{58,97}. Während der ersten 24 Stunden nach LCT kommt es jedoch zu einem Zellverlust an transplantierten Hepatozyten⁹⁸.

Vor der erfolgreichen Zellintegration ins Lebergewebe steht jedoch die sinusoidale Barriere, die von den transplantierten Hepatozyten überwunden werden muss, nachdem bereits eine Akkumulation in periportalen Gefäßen erfolgt ist. Teils kommt es in den intrahepatischen Gefäßen zur Formierung von Mikrothromben, die eine Teil- oder vollständige Okklusion bewirkt⁴¹. Die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie belegt, dass es möglich ist, in der MRT Darstellung Mikroembolisationen, verursacht durch MPIO-markierte Hepatozyten, darzustellen. Eine *in vivo* Differenzierung zwischen markierten Donorhepatozyten und in den Mikrothrombus infiltrierenden Makrophagen ist hingegen nicht möglich. Bisher war es noch in keiner Studien gelungen, eine Darstellung und genaue Korrelation der Mikrothromben *in vivo* zu erbringen³⁰. In unserer Studie erfolgte die genaue Korrelation und Identifikation mit Mikrothromben auf Basis der histologischen Gewebeproben. Eine Mikroembolisation trat bei fast allen Tieren nach intraportaler Zellapplikation auf. Im humanen Anwendungsbereich stellt die intraportale Applikationsroute die am häufigsten durchgeführte Prozedur dar. In unserer Studie wurden die Hepatozyten in eine Leberumgebung ohne Vorschädigung und somit in ein intaktes Gefäßbett transplantiert. Diese Situation ist der der angeborenen metabolischen Lebererkrankung sehr ähnlich. Quaglia *et al.* berichten über Mikroembolisationen in dieser Patientengruppe³⁰. Darüberhinaus wurde in bisherigen Großtierstudien ohne vorbereitendes Behandeln des Gefäßbettes der Empfängerleber, z.B. mit Retrorsin vor der LCT, eine Mikroembolisation *ex vivo* nachgewiesen^{28,79,80,99}. Denkbar wäre, dass in bisherigen Studien die temporäre Verbesserung der metabolischen Funktion in einigen Studien auf transplantierte Hepatozyten in Mikrothromben zurückzuführen sind, die nicht ins Gewebe integriert waren³⁰. Denn transplantierte Zellen, die zu Mikrothromben aggregieren, integrieren sich nicht dauerhaft in die Empfängerleber, sondern werden von der körpereigenen Abwehr abgeräumt. Eine Zellintegration zur Behandlung einer metabolischen Grunderkrankung wäre jedoch essentiell für einen dauerhaften Therapieerfolg. Unsere Studie bestätigt ein häufiges Auftreten von Mikrothromben nach intraportaler Zellapplikation. Es ist anzunehmen, dass dies die limitierten Ergebnisse in den bisherigen klinischen Studien der LCT mitbedingt. Um die Bildung von Mikrothromben zu verhindern, die Zellintegration in die Leber zu verbessern und die

Proliferation der transplantierten Zellen zu stimulieren, wurden vorbereitende Behandlungsstrategien der Leber und des Gefäßbettes untersucht. Ist das Gefäßbett durchlässiger, so ist die Zellintegration erleichtert. Möglichkeiten der Vorbehandlung sind portale Embolisation, Bestrahlung oder medikamentöse Leberschädigung. Eine Schädigung der Empfängerleber ist ein Proliferationsstimulus für eigene und transplantierte Hepatozyten^{77,78,100}. Eine weitere Alternative zur intraportalen Zellapplikation stellt die Zelladministration in die Leberarterie dar, welche kürzlich in einer Studie von *Khan et al.* mit humanen-fetalen Leberstammzellen durchgeführt wurde¹⁰¹. Auch die direkte Leberpunktion zur Behandlung eines Diabetes wurde im Tiermodell untersucht⁸⁴. Für die weitere klinische Anwendung zur Untersuchung der Zellintegration und zum Vergleich dieser drei Leberapplikationsrouten könnte die Zelladministration in die Leber, mit einer Teilfraktion von MPIO-markierten Hepatozyten und eine *in vivo* Zellüberwachung sehr interessant sein. Die Abwesenheit von Signalexstinktion könnte so eine Mikroembolisation ausschließen und bei Verbesserung der relevanten Laborparameter ein Indikator für eine erfolgreiche LCT mit Zellintegration sein.

4.2.1 Zelltransplantation in die Milz

Bisher wurde die Milz als ausgezeichneter ektopter Implantationsort für Hepatozyten, vor allem bei chronischen Lebererkrankungen, gesehen, da die Leberbinnenarchitektur eine adequate Hepatozytenimplantation verhindert⁹. Die Zelladministration in die Milz kann über zwei mögliche Routen durchgeführt werden: die direkte Milzpunktion und die intraarterielle Zelladministration. Eine etablierte Methode im Kleintiermodell des Nagetiers ist die Zelladministration über die Milz, nach der die Hepatozyten in die Leber translozieren⁴⁰. Vorteil einer intrasplenalen Zelladministration ist die geringere Rate an postoperativen Komplikationen. Insbesondere ist die Rate an Nachblutungen im Vergleich zur intraportalen Applikation geringer⁴⁶. Die Translokation und Zellimplantation von Hepatozyten in die Leber nach intraarterieller Zellapplikation fand bisher in der humanen Anwendung nur wenig Aufmerksamkeit^{102,103}. Um das Schicksal von Hepatozyten nach der LCT in die Milz zu untersuchen, verglichen wir beide Applikationsrouten und führten auch eine *in vivo* Bildgebung mittels MRT durch. Es fanden sich hypointense Bereiche nach intraparenchymatöser Injektion MPIO markierter Hepatozyten. Ein Großteil der Hepatozyten verblieb im Milzparenchym, während eine kleine Fraktion in der

Empfängerleber nachzuweisen war. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum Nagetiermodell. Die intraparenchymatale Zelladministration in die Milz ist hier der am meisten genutzte Administrationsort, um Leberzellen zur Leber zu translozieren. Die unterschiedlich erfolgreichen Ergebnisse der LCT in der Milz beim Nager im Vergleich zum Großtier könnten durch die Unterschiede in der Mikroarchitektur bedingt sein ¹⁰⁴. In der humanen Anwendung der intrasplenalen LCT ist die bevorzugte Zelladministrationsroute für die Milz, wegen des geringeren Risikos an Komplikationen, die intraarterielle Zellapplikation. In der MRT Bildgebung stellten wir keine hypointensen Bereiche fest. Dies korrelierte mit unseren histologischen Ergebnissen. Nach Analyse der Empfängermilz nach intraarterieller LCT zeigte sich bei dieser Administrationsroute nur eine geringe Anzahl von Hepatozyten. Eine Hepatisation der Milz konnten wir deshalb nicht nachweisen, dies wurde jedoch in anderen Studien beschrieben: Es fanden sich dort größere Areale im Milzparenchym in denen Hepatozyten nachgewiesen wurden. Dies wurde als einer der möglichen Ursache für die klinischen Verbesserungen nach LCT über die intraarterielle Zellinfusion aufgeführt ^{102,103,105}. Zellen translozierten über das portovenöse System in die Leber. Dies wurde in präklinischen Großtiermodellen der LCT bisher noch nicht beschrieben. Unsere histologische Auswertung der Gewebeproben aus der Leber zeigte eine effiziente Zellintegration im periportalen Feld. Mikrothromben wurden bei nur zwei Fällen nachgewiesen. Die erfolgreiche Zellintegration bewirkte keine Signaländerung im MRT. In weiteren klinischen Studien sollte die Zellintegration in die Leber nach intraarterieller LCT weiter untersucht werden. Ein weiterer, wichtiger Beweis des Erfolges der intraarteriellen LCT könnte eine Verbesserung der metabolischen Werte oder eine veränderte Enzymaktivität sein. Bei LCT via intraarterieller Route kam es zu einer Zelltranslokation in die Leber, die der der intraportalen Applikation entsprach, bei signifikant weniger Mikroembolisation. Diese Zelltranslokation über das portovenöse System in die Leber könnte ein grundlegender Mechanismus für die klinischen Verbesserungen nach einer LCT via Milz sein. Eine intraarterielle Zelladministration bewirkt möglicherweise einen allmählichen Abstrom von noch nicht festgewachsenen Hepatozyten über das portovenöse System aus der Milz und somit weniger Mikroembolisationen verglichen mit intraportaler Zellapplikation. Unsere Ergebnisse haben klinische Bedeutung, da bei Kindern mit metabolischer Lebererkrankung die LCT durch intraportale Zelladministration durchgeführt wird ⁹. Eine LCT via intraarterieller Applikationsroute

könnte eine erfolgreiche Zellintegration in die Leber bedingen und eine interessante Therapiealternative, mit weniger Mikroembolisation darstellen. Möglicherweise könnte so eine vorbereitende Behandlung des Gefäßbettes überflüssig oder verringert werden, da die Gefahr der Mikroembolisation geringer ist. Dies könnten die Langzeitergebnisse der LCT verbessern. Gleichzeitig könnten unsere Ergebnisse für weitere Forschung im Bereich der Stammzellapplikation in die Leber relevant sein ^{9,106}. Die Resultate unserer Studie sind durch die niedrige Zellzahl, die bei LCT appliziert wurde, limitiert. Durch die Zellmarkierung und Kultivierung der Hepatozyten in Zellkultur ging ein Teil der Zellen, verglichen mit einer Zellisolierung und unmittelbarer Transplantation verloren. Dies wäre in Hinsicht auf einen Mangel an Donorzellen bedenklich. Für die Zelldetektion im MRT wäre es aber auch denkbar, nur eine Fraktion der Zellen zu markieren und so einen geringeren Zellverlust durch Markierung in Kauf zu nehmen. Das Verhältnis von nativen und markierten Hepatozyten in einer solchen Prozedur sollte weiter untersucht werden. Die Zellapplikation von größeren Zellquantitäten über die intraarterielle Route hat in vorhergehenden Studien schwere Komplikationen hervorgerufen ^{33,88}, deshalb sollte die wiederholte Infusion von Zellen mit kleineren Zellquantitäten auf diesem Weg vor klinischer Anwendung weiter untersucht werden ¹⁰⁷. Ein weiterer, kritischer Punkt unserer Studie ist, dass unsere Versuchstiere lebergesund waren und keine Vorschädigung oder Änderung der Mikroarchitektur der Leber aufwiesen. Es gibt bereits Versuche, die eine solche Vorbehandlung der Leber, mit z.B. Bestrahlung, beschreiben ³⁷. Unsere Studie zeigt, dass LCT via intraarterieller Zelladministration zu effizienter Translokation der Zellen in die Leber und zu einer einschneidenden Reduktion der Mikroembolisation im Vergleich zur intraportalen Applikation führt. Diese Ergebnisse sind klinisch vor allem für die Behandlung der metabolischen Lebererkrankungen relevant. Die Versuchsbedingungen im Großtier ohne Vorschädigung der Leber sind den Krankheitsbedingungen bei metabolischer Lebererkrankung ähnlich, solange keine Änderung der Leberinnenarchitektur besteht. Die intraarterielle LCT in die Milz sollte in weitergehenden klinischen Studien, mit einer Fokussierung auf die Zellimplantation in die Leber und nicht auf eine Hepatisierung der Milz, untersucht werden.

4.2.2 Hepatozytentranslokation über das portovenöse System im Empfängerparenchym

Nach intrasplenischer Transplantation lassen sich bereits nach einer Stunde Zellen in den portalen Sinusoiden nachweisen¹⁰⁸. In der hier diskutierten Untersuchung wurde erstmals am Großtier die Translokation der Hepatozyten von der Milz in die Leber bei einer geringeren Nebenwirkung von Mikroembolisationen gezeigt. Im Kleintiermodell wurde darüber bereits berichtet^{30,31,72}. Bisher hatten Nagata *et al.* in Studien am Schwein nicht über eine Translokation von Hepatozyten ins Portalgebiet berichtet. Entweder wurde die Leber nicht auf diesen Gesichtspunkt hin untersucht, oder die Daten hierzu fanden keine Veröffentlichung. Es fand sich, dass die Applikation von Zellen in die Milzarterie zu Erosionen im Magen und zu großen Nekrosearealen in der Milz führt³³. In unserer Studie erbrachte diese Applikationsroute hingegen die wenigsten Komplikationen. Durch eine veränderte Applikationstechnik der Zellen, mit retrograder Ligatur der gastroepiploischen Gefäße, ist anzunehmen, dass gastrische Erosionen durch retrograden Zellfluß der transplantierten Hepatozyten ausgeschlossen ist. Die Studie von Nagata *et al.*³³ umfasste nur zwei Versuchstiere auf diesem Applikationsweg, während in unserer Studie neun Tiere so behandelt wurden (sechs Tiere mittels MPIO markierten Hepatozyten und drei Tiere mit nativen Hepatozyten). Keines der Tiere zeigte große Nekrosegebiete in der Milz. Andererseits wurden bei diesen neun Tieren weniger Zellen transplantiert als in der oben genannten Studie von Nagata *et al.*

4.2.3 Verbleib nicht integrierter Spenderhepatozyten

In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass transplantierte Hepatozyten, abhängig von der Applikationsroute zum Teil im Portalstromgebiet verbleiben. Nur eine kleine Fraktion der transplantierten Hepatozyten überlebt im Empfängerparenchym^{41,109}. Nicht integrierte Spenderhepatozyten waren bis zu 56 Tage nach Transplantation nachzuweisen; sie formten Mikroembolisationen. Es ist vermutlich multifaktoriell bedingt, dass nicht alle transplantierten Hepatozyten in die Leber migrieren. Die einzelnen Zellen formten Aggregate. Wir wiesen in den Bestandteilen des Embolus eindeutig Zellen mit Herkunft aus den männlichen Spendern nach. Diese Zellaggregate reduzieren durch eine Gefäßobliteration die Perfusion des abhängigen Lebergewebes. Dies ruft eine Aktivierung von Entzündungsmediatoren hervor und induziert die Apoptose im Lebergewebe und in

den Emboli. Weiterhin bedingen die entstandenen Emboli vermutlich eine direkte Apoptose der Donorhepatozyten ¹¹⁰. In der histologischen Aufarbeitung der Lebergewebsproben zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Applikationsroute (Vgl. Abschnitt 3.5). Auch im zeitlichen Verlauf von 3 bis 56 Tagen zeigte sich bei vielen Tieren nach LCT eine Entzündungsreaktion. Eine Entzündungsreaktion und Nekrose wird wahrscheinlich nicht nur spezifisch von Hepatozyten ausgelöst, sondern auch durch ein Perfusionsdefizit. Dies aktiviert die Abwehrfunktion der Leber, und es kommt zum Abbau der Hepatozyten, vermutlich durch aktivierte Kupfferzellen, die leberspezifische Makrophagen sind, und neutrophile Granulozyten ^{42,111,112}. Die Anwesenheit von Zellen im Gefäßbett führt darüber hinaus unweigerlich zu einer Entzündungsreaktion mit Gewebsschädigung und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, wie vaskulärem, endothelalem Wachstumsfaktor (VEGF), welche aber gleichzeitig die Gefäßpermeabilität erhöhen und dadurch die Zellintegration erleichtern ^{72,41}.

4.3 Ausblick

Trotz des chirurgisch-technischen und immunologischen Fortschrittes bleibt die OLT mit einem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko verbunden. Der Eingriff zum Austausch der gesamten Leber setzt ein großes Maß an Erfahrung sowohl in der operativen Technik als auch in der perioperativen Therapie voraus. Eine LCT kann laparoskopisch mit geringerem perioperativem Risiko durchgeführt werden. Die LCT ist deshalb bei bestimmten Erkrankungen eine interessante Alternative zur OLT. Insbesondere auch bei dem vorherrschenden Mangel an Donorlebern und der zunehmenden Verwendung von marginalen Donorlebern ^{113,114}. In vorhergehenden Studien wurde demonstriert, dass Erscheinungen von metabolischen Defekten korrigiert werden konnten ⁶⁶. Am Menschen wurden bereits Versuche gemacht, Glykogenspeichererkrankungen ¹¹⁵ oder Gerinnungsstörungen zu therapieren ¹¹⁶. Es gab einen beachtlichen Fortschritt hin zur klinischen Anwendung, dennoch gibt es eine Vielzahl an Forschungsfragen zur Verbesserung der klinischen Anwendung. Mit dem hier angewandten Modell wurde eine Methode zur Quantifizierung von transplantierten Hepatozyten im Großtiermodell entwickelt als auch eine *in vivo* Zelldetektion ermöglicht. Zur weiteren Evaluation der Applikationsrouten im Großtier wäre es erforderlich, ein Leberkonditionierungsmodell zu untersuchen, um die metabolischen Eigenschaften der transplantierten Hepatozyten anhand klinischer

Parameter weiterbewerten zu können. Diese Konditionierung der Leber als Vorbereitung auf die LCT ist im Hinblick auf die humane Anwendung von großer Bedeutung. Das Ergebnis einer LCT ist bis heute durch die geringe Effektivität der Zellintegration ins Empfängerparenchym limitiert, da mehr als 70% der transplantierten Zellen im portalen Stromgebiet verbleiben und von Kupferzellen und Neutrophilen abgeräumt werden ⁴⁷. Eine adequate Konditionierung, um den transplantierten Hepatozyten einen Proliferationsvorteil zu verschaffen und die Zellintegration zu erleichtern, wie z.B. durch eine Bestrahlung, die zur Auflockerung der Endothelbarriere führt, ist erforderlich ¹⁰⁰. Ein anderer Aspekt, der Anlass zur Untersuchung gibt, ist die Verwendung und Entwicklung von klinisch zugelassenen MPIO-Partikeln, z.B. auch in Kombination mit einer Stimulation der Zellproliferation. Hierzu wird zur Zeit eine Studie in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Konservierung der Hepatozyten in geeigneten Zellkultursystemen bleibt ein wichtiges Thema, um bei der Verwaltung und Haltbarmachung von Hepatozyten einen möglichst geringen Zellverlust und geringe Zellschädigung zu erzielen. Dies würde es ermöglichen den, Therapiezeitpunkt besser zu planen und vorzubereiten. Aber nicht nur Zellverwaltung und Speicherung sondern auch die Zellquellen sind ein wichtiges Thema. Eine Therapie der geschädigten Leber könnte auch über intrahepatische Stammzellen, extrahepatische Stammzellen aus dem Knochenmark, immortalisierte Hepatozyten, genetisch modifizierte autologe Leberzellen oder xenogenen Hepatozyten erzielt werden ^{5,47,117,118}. Das Potential der Stammzellapplikation in Bezug auf Proliferationskapazität, aber auch Risiken der Entartung, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung im Bereich der regenerativen Lebertherapie.

5 Zusammenfassung

Die LCT stellt eine vielversprechende alternative Therapie zur OLT für bestimmte Formen des Leberversagen dar. Der bisher gängige intraportale Applikationsweg kann jedoch nicht immer klinisch angewendet werden. Und erscheint hinsichtlich einer gefahrlosen und effizienten Implantation der Spenderhepatozyten im Empfängerparenchym nicht optimal. Aus diesem Grunde sind alternative Applikationsrouten und ektoper Implantationsorte zu evaluieren. Im Kleintiermodell wurde die ektoper Hepatozytentransplantation in die Milz erfolgreich durchgeführt, während es im Großtiermodell widersprüchliche Ergebnisse gibt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Applikationsrouten via Portalvene, via A. gastroepiploica und per direkter Milzinjektion von allogenen Donorhepatozyten im Großtiermodell evaluiert. Dabei wurde die Zellintegration ins Leberparenchym im präklinischen Großtiermodell des Miniaturschweines untersucht. Männliche Spenderhepatozyten von Landrasseschweinen wurden mit MPIO-Partikeln *in vitro* in Adhäsionskultur markiert, danach erfolgte die LCT über die drei Applikationsrouten. Die Empfängertiere wurden wiederholt zur *in vivo* Zelldetektion im 3.0 Tesla MRT und computertomographisch für einen Zeitraum von bis zu acht Wochen nach LCT untersucht. Im MRT und korrelierenden histologischen Untersuchungen zeigten sich Mikroembolisationen der Donorhepatozyten. Eine Zelldetektion *in vivo* im MRT war möglich. Die Zellapplikation per direkter Milzinjektion, verglichen mit intraarterieller Zellapplikation via A. gastroepiploica, führte zu einer Zellretention in der Milz und einer geringeren Translokation in das Leberparenchym der Empfängertiere. Nach intraportaler Zellapplikation kam es vermehrt zur Bildung von Mikrothromben im Portalstromgebiet, die bis zu acht Wochen nach LCT persistierten. Die Zelladministration via A. gastroepiploica führte zu signifikant weniger Thrombenbildung. Die Zellintegration der Donorhepatozyten ins Leberparenchym wurde mittels Berliner-Blau-Färbung, FISH-Typing und PCR untersucht. Dabei wurde eine vergleichbare Quantität an transplantierten Hepatozyten in die Leber bei intraportaler und intraarterieller Zelladministration nachgewiesen. Die Zellmenge nach Milzinjektion war signifikant geringer. Nach Milzinjektion kam es zur Bildung von Hepatozytennestern im Milzparenchym. Dies konnte mittels immunhistologischer Färbung mit hepatozytenspezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Nach Applikation der Zellen via A. gastroepiploica konnten nur einzelne wenige Zellen in der Milzpulpa dargestellt werden. Die Entzündungsreaktion und Nekrose im

Empfängerparenchym unterschied sich nicht signifikant bei den drei Applikationsrouten. Diese Ergebnisse zeigen relevante Mechanismen in der klinischen Anwendung der LCT auf und suggerieren, dass die Applikationsroute via. A. gastroepiploica weiter evaluiert werden sollte. Diese Ergebnisse stellen einen vielversprechenden Ansatz in der ektopen Transplantation von Hepatozyten dar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* Zelldetektion eine frühzeitige Erkennung von möglichen Komplikationen durch transplantierte Hepatozyten ermöglicht.

6 Literaturverzeichnis

1. Ambrosino G, Varotto S, Basso S, u. a. Hepatocyte transplantation: an experimental study to treat acute liver failure in pigs. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):62–5.
2. Calise F, Di Florio E, Mancini A, u. a. Intrasplenic hepatocyte transplantation in the pig: new technical aspects. *Transplant Proc* 1997;29(4):1999–2001.
3. Adam R, McMaster P, O’Grady JG, u. a. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003;9(12):1231–43.
4. Vogt DP, Henderson JM, Carey WD, Barnes D. The long-term survival and causes of death in patients who survive at least 1 year after liver transplantation. *Surgery* 2002;132(4):775–80; discussion 780.
5. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2004;40(6):878–86.
6. Oosterlee A, Rahmel A. Eurotransplant International Foundation Annual Report 2010. In; 2011:77-84. Leiden: 2010.
7. Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology* 2003;124(2):568–71.
8. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006;82(4):441–9.
9. Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 2009;266(4):339–57.
10. Lee S-W, Wang X, Chowdhury NR, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation: state of the art and strategies for overcoming existing hurdles. *Ann Hepatol* 2004;3(2):48–53.
11. Markus PM, Becker H. [Hepatocellular transplantation--from the beginning to clinical application]. *Chirurg* 1999;70(2):162–8.
12. Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol* 2010;640:525–34.
13. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999;19(1):39–48.
14. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, u. a. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004;77(10):1614–6.

15. Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, u. a. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant* 2003;12(1):69–74.
16. Cameron GR, Oakley CL. Transplantation of liver. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1934;38(1):17–28.
17. Böck J, Popper H. Über Lebertransplantation in die Vorderkammer des Auges. *Virchows Arch path Anat* 1937;299(1-2):219–34.
18. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969;43(3):506–20.
19. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* 1973;82(2):391–8.
20. Groth CG, Arborgh B, Björkén C, Sundberg B, Lundgren G. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1977;9(1):313–6.
21. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, u. a. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* 1976;192(4242):892–4.
22. Rugstad HE, Robinson SH, Yannoni C, Tashjian AH Jr. Transfer of bilirubin uridine diphosphate-glucuronyltransferase to enzyme-deficient rats. *Science* 1970;170(957):553–5.
23. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992;24(6):3052–3.
24. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994;58(8):951–2.
25. Hakim NS, Danovitch GM. *Transplantation surgery*. Springer; 2001.
26. Kocken JM, Borel Rinkes IH, Bijma AM, u. a. Correction of an inborn error of metabolism by intraportal hepatocyte transplantation in a dog model. *Transplantation* 1996;62(3):358–64.
27. Weber A, Groyer-Picard M-T, Franco D, Dagher I. Hepatocyte transplantation in animal models. *Liver Transpl* 2009;15(1):7–14.
28. Muraca M, Neri D, Parenti A, u. a. Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study. *Transplantation* 2002;73(6):890–6.
29. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, u. a. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004;78(12):1812–4.

30. Quaglia A, Lehec SC, Hughes RD, u. a. Liver after hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders in children. *Cell Transplant* 2008;17(12):1403–14.
31. Grossman M, Raper SE, Wilson JM. Transplantation of genetically modified autologous hepatocytes into nonhuman primates: feasibility and short-term toxicity. *Hum Gene Ther* 1992;3(5):501–10.
32. Nussler A, Konig S, Ott M, u. a. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol* 2006;45(1):144–59.
33. Nagata H, Ito M, Shirota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation* 2003;76(4):732–4.
34. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004;77(10):1481–6.
35. Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001;79(11):617–30.
36. Kakihara N, Takeshita K, Naka S, Ishibashi H. Gastric submucosa as the safer and repeatable site for hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 2009;41(1):425–8.
37. Soltys KA, Soto-Gutiérrez A, Nagaya M, u. a. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2010;53(4):769–74.
38. Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM. Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin Liver Dis* 1999;19(1):15–26.
39. Gupta S, Gorla GR, Irani AN. Hepatocyte transplantation: emerging insights into mechanisms of liver repopulation and their relevance to potential therapies. *J Hepatol* 1999;30(1):162–70.
40. Ponder KP, Gupta S, Leland F, u. a. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(4):1217–21.
41. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, u. a. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999;29(2):509–19.
42. Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* 2002;123(5):1677–85.
43. Weber A, Groyer-Picard M-T, Dagher I. Hepatocyte transplantation techniques: large animal models. *Methods Mol Biol* 2009;481:83–96.

44. Malhi H, Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8(1):40–50.
45. Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol* 2010;640:525–34.
46. Gupta S. Hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl 3:S287–93.
47. Puppi J, Strom SC, Hughes RD, u. a. Improving the Techniques for Human Hepatocyte Transplantation: Report from a Consensus Meeting in London. *Cell Transplant* [Internet] 2011 [zitiert 2011 Juni 24]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457616>
48. Fisher RA, Mas VR. Cell transplant techniques: engraftment detection of cells. *Methods Mol Biol* 2009;481:97–105.
49. Mas VR, Maluf DG, Thompson M, Ferreira-Gonzalez A, Fisher RA. Engraftment measurement in human liver tissue after liver cell transplantation by short tandem repeats analysis. *Cell Transplant* 2004;13(3):231–6.
50. Kusano M, Mito M. Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 1982;82(4):616–28.
51. Thompson NL, Hixson DC, Callanan H, u. a. A Fischer rat substrain deficient in dipeptidyl peptidase IV activity makes normal steady-state RNA levels and an altered protein. Use as a liver-cell transplantation model. *Biochem J* 1991;273 (Pt 3):497–502.
52. Gupta S, Vemuru RP, Lee CD, Yerneni PR, Aragona E, Burk RD. Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: implications for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1994;5(8):959–67.
53. Markus PM, Koenig S, Krause P, Becker H. Selective intraportal transplantation of Dil-marked isolated rat hepatocytes. *Cell Transplant* 1997;6(5):455–62.
54. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, u. a. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 1992;340(8824):876–7.
55. Krishna Vanaja D, Sivakumar B, Jesudasan RA, Singh L, Janardanasarma MK, Habibullah CM. In vivo identification, survival, and functional efficacy of transplanted hepatocytes in acute liver failure mice model by FISH using Y-chromosome probe. *Cell Transplant* 1998;7(3):267–73.
56. Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM. Technology insight: in vivo cell tracking by use of MRI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3(10):554–62.
57. Bohnen NI, Charron M, Reyes J, u. a. Use of indium-111-labeled hepatocytes to determine the biodistribution of transplanted hepatocytes through portal vein infusion. *Clin Nucl Med* 2000;25(6):447–50.

58. Gupta S, Vasa SR, Rajvanshi P, Zuckier LS, Palestro CJ, Bhargava KK. Analysis of hepatocyte distribution and survival in vascular beds with cells marked by ^{99m}Tc or endogenous dipeptidyl peptidase IV activity. *Cell Transplant* 1997;6(4):377–86.
59. Mizuguchi T, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Hepatocyte transplantation for total liver repopulation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005;12(5):378–85.
60. Modo M. Noninvasive imaging of transplanted cells. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13(6):654–8.
61. Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A Jr. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997;7(1):258–63.
62. Slotkin JR, Cahill KS, Tharin SA, Shapiro EM. Cellular magnetic resonance imaging: nanometer and micrometer size particles for noninvasive cell localization. *Neurotherapeutics* 2007;4(3):428–33.
63. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med* 2006;55(2):242–9.
64. Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, u. a. Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography. *J Cell Mol Med* 2008;12(4):1384–94.
65. Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, u. a. In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage* 2008;40(2):973–83.
66. Eguchi S, Rozga J, Lebow LT, u. a. Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus. *Transplantation* 1996;62(5):588–93.
67. Wilson JM, Chowdhury NR, Grossman M, u. a. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(21):8437–41.
68. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, u. a. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000;31(4):851–7.
69. Malhi H, Irani AN, Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 2002;122(2):438–47.
70. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 2000;119(6):1720–30.
71. Guha C, Parashar B, Deb NJ, u. a. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology* 2002;36(2):354–62.

72. Koenig S, Krause P, Hosseini ASA, u. a. Noninvasive imaging of liver repopulation following hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 2009;18(1):69–78.
73. Merle U, Encke J, Tuma S, Volkmann M, Naldini L, Stremmel W. Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease. *Scand J Gastroenterol* 2006;41(8):974–82.
74. Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox IJ. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology* 2003;124(2):422–31.
75. Nagata H, Nishitai R, Shirota C, u. a. Prolonged survival of porcine hepatocytes in cynomolgus monkeys. *Gastroenterology* 2007;132(1):321–9.
76. Dehoux J-P, Gianello P. The importance of large animal models in transplantation. *Front Biosci* 2007;12:4864–80.
77. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard M-T, u. a. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 2009;49(3):950–9.
78. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, u. a. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 2006;82(8):1067–73.
79. Andreoletti M, Loux N, Vons C, u. a. Engraftment of autologous retrovirally transduced hepatocytes after intraportal transplantation into nonhuman primates: implication for ex vivo gene therapy. *Hum Gene Ther* 2001;12(2):169–79.
80. Vons C, Loux N, Simon L, u. a. Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation* 2001;72(5):811–8.
81. Takeda T, Murphy S, Uyama S, Organ GM, Schloo BL, Vacanti JP. Hepatocyte transplantation in Swine using prevascularized polyvinyl alcohol sponges. *Tissue Eng* 1995;1(3):253–62.
82. Takeda T, Vacanti JP. Hepatocyte transplantation in the dalmatian dog model of hyperuricosuria. *Tissue Eng* 1995;1(4):355–60.
83. Benoist S, Sarkis R, Barbu V, u. a. Survival and functions of encapsulated porcine hepatocytes after allotransplantation or xenotransplantation without immunosuppression. *Surgery* 2001;129(5):606–16.
84. Chen NKF, Wong JS, Kee IHC, u. a. Nonvirally modified autologous primary hepatocytes correct diabetes and prevent target organ injury in a large preclinical model. *PLoS ONE* 2008;3(3):e1734.
85. Nordlinger B, Bouma ME, Wang SR, u. a. High-yield preparation of porcine hepatocytes for long survival after transplantation in the spleen. *Eur Surg Res* 1985;17(6):377–82.

86. Rivas PA, Fabrega AJ, Schwartz D, u. a. Transplantation of hepatocytes: an in-vitro and in-vivo study in canines. *Cell Transplant* 1994;3(2):193–201.
87. Kasai S, Sawa M, Kondoh K, Ebata H, Mito M. Intrasplenic hepatocyte transplantation in mammals. *Transplant Proc* 1987;19(1 Pt 2):992–4.
88. Rosenthal RJ, Chen SC, Hewitt W, u. a. Techniques for intrasplenic hepatocyte transplantation in the large animal model. *Surg Endosc* 1996;10(11):1075–9.
89. Benedetti E, Kirby JP, Asolati M, u. a. Intrasplenic hepatocyte allotransplantation in dalmation dogs with and without cyclosporine immunosuppression. *Transplantation* 1997;63(9):1206–9.
90. Information aus Gespräch mit PD. Dr. Sauer, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, Klinik für Allgemein- Visceral und Transplantationschirurgie. 2011;
91. van de Kerkhove MP, Poyck PPC, van Wijk ACWA, u. a. Assessment and improvement of liver specific function of the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 2005;28(6):617–30.
92. Choo JK, Seebach JD, Nickleit V, u. a. Species differences in the expression of major histocompatibility complex class II antigens on coronary artery endothelium: implications for cell-mediated xenoreactivity. *Transplantation* 1997;64(9):1315–22.
93. Frey BM, Sieber M, Mettler D, Gänger H, Frey FJ. Marked interspecies differences between humans and pigs in cyclosporine and prednisolone disposition. *Drug Metab Dispos* 1988;16(2):285–9.
94. Rosengard BR, Ojikutu CA, Guzzetta PC, u. a. Induction of specific tolerance to class I-disparate renal allografts in miniature swine with cyclosporine. *Transplantation* 1992;54(3):490–7.
95. Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, u. a. Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography. *J Cell Mol Med* 2008;12(4):1384–94.
96. Landis CS, Yamanouchi K, Zhou H, u. a. Noninvasive evaluation of liver repopulation by transplanted hepatocytes using ³¹P MRS imaging in mice. *Hepatology* 2006;44(5):1250–8.
97. Spinelli SV, Rodríguez JV, Quintana AB, Mediavilla MG, Guibert EE. Engraftment and function of intrasplenically transplanted cold stored rat hepatocytes. *Cell Transplant* 2002;11(2):161–8.
98. de Roos WK, von Geusau BA, Bouwman E, van Dierendonck JH, Borel Rinkes IH, Terpstra OT. Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Transplantation* 1997;63(4):513–8.
99. Maruyama M, Totsugawa T, Kunieda T, u. a. Hepatocyte isolation and transplantation in the pig. *Cell Transplant* 2003;12(6):593–8.

100. Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N, et al. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. *Hepatology* 2009;49(1):258–67.
101. Khan AA, Shaik MV, Parveen N, et al. Human fetal liver-derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end-stage decompensated liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2010;19(4):409–18.
102. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000;6(1):32–40.
103. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997;63(4):559–69.
104. Steiniger B, Barth P, Herbst B, Hartnell A, Crocker PR. The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. *Immunology* 1997;92(2):307–16.
105. Sterling RK, Fisher RA. Liver transplantation. Living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clin Liver Dis* 2001;5(2):431–60, vii.
106. Haridass D, Narain N, Ott M. Hepatocyte transplantation: waiting for stem cells. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13(6):627–32.
107. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, et al. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation* 2009;87(5):636–41.
108. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule. *Hepatology* 1996;23(3):482–96.
109. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology* 1996;111(4):1092–102.
110. Gupta S, Rajvanshi P, Malhi H, et al. Cell transplantation causes loss of gap junctions and activates GGT expression permanently in host liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(4):G815–26.
111. Puhl G, Schaser K-D, Pust D, et al. Initial hepatic microcirculation correlates with early graft function in human orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11(5):555–63.
112. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181(2):160–6.
113. Kulkarni S, Cronin D-C 2nd. Ethical tensions in solid organ transplantation: the price of success. *World J Gastroenterol* 2006;12(20):3259–64.

114. Foster R, Zimmerman M, Trotter JF. Expanding donor options: marginal, living, and split donors. *Clin Liver Dis* 2007;11(2):417–29.
115. Muraca M, Gerunda G, Neri D, u. a. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002;359(9303):317–8.
116. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, u. a. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003;111(6 Pt 1):1262–7.
117. Cai J, Ito M, Nagata H, u. a. Treatment of liver failure in rats with end-stage cirrhosis by transplantation of immortalized hepatocytes. *Hepatology* 2002;36(2):386–94.
118. Tada K, Roy-Chowdhury N, Prasad V, u. a. Long-term amelioration of bilirubin glucuronidation defect in Gunn rats by transplanting genetically modified immortalized autologous hepatocytes. *Cell Transplant* 1998;7(6):607–16.

7 Publikationsliste

Raschzok N, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, Schmeisser S, Adonopoulou M, Morawietz L, Hiebl B, Schwartlander R, Rüdinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM. Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging. *Cell Medicine, Part B of Cell Transplantation*, Vol. 1, pp. 123–135, 2010

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und Dank an diejenigen richten, die mich während der Durchführung und Vollendung der Promotion angetrieben, unterstützt und inspiriert haben.

Allen voran gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Igor Sauer. In den Jahren unserer Zusammenarbeit habe ich ihn nicht nur als ausgezeichneten kreativen Forscher, sondern viel mehr Menschen und wichtigen Gesprächspartner kennengelernt. Immer wieder ist es ihm auf diese ihm eigene Weise gelungen mich, mich zu leiten, aber nicht zu drängen und mich als mein Mentor zu begleiten. Es ist der schmale Grad zwischen Anleitung und Ermutigung, auf dem eigenständiges Denken gedeiht.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Dr. Nathanael Raschzok. Sein wissenschaftlicher Ehrgeiz war Anreiz, seine Ideen und Ansätze waren Leitlinien Neues zu wagen und über Altes erneut kritisch nachzudenken. Vielen Dank für die intensive Unterstützung und Beratung.

Darüber hinaus gilt mein Dank all jenen, die in dieser Zeit mich und mein Wirken im Labor und im Tierstall direkt und indirekt beeinflusst haben. Danken möchte ich PD Dr. Lars Morawietz und Gabriele Fernahl für die Anleitung und technische Unterstützung im histologischen Gebiet, bei Frau Anja Zielinski für die enge Zusammenarbeit und gegenseitige moralische Unterstützung und natürlich allen die hier ungenannt bleiben. Herr Dr. Haluk Morgul möchte ich danken für die intensive Einführung und Vorbereitung, er hat mir das wissenschaftliche „Laufen“ beigebracht. Mein größter Dank gebührt aber meiner Familie, sowie meinem Freund Leander. Ihre Geduld, Liebe und Leidenschaft machten diese Arbeit erst möglich, dafür danke ich Ihnen von ganzem Herzen. Meinen Eltern danke ich, da sie immer alle Entscheidungen in meinem Leben mitgetragen haben, auch wenn mein Weg oft nicht nur geradeaus ging.

10 Selbständigkeitserklärung

Erklärung

Ich, Kirsten Steinz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation der Applikationsrouten für die Leberzelltransplantation im Großtiermodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Hamburg, den 15.12.2011