

AUS DER KLINIK FÜR  
ALLGEMEIN-, VISZERAL- UND TRANSPLANTATIONSSCHIRURGIE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

DISSERTATION

Untersuchung zur Effizienz von  
auxiliarer autologer Hepatozytentransplantation  
nach chirurgisch induzierter Leberinsuffizienz  
im Rattenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Gereon Gäbelein  
aus Bamberg

- Gutachter:**
1. PD Dr. med. Matthias Glanemann
  2. Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk
  3. PD Dr. med. Wolfgang Thasler

**Datum der Promotion:** 1. Juni 2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Geschichtlicher Überblick zur Leberzelltransplantation . . . . .	6
1.2 Durch Hepatozytentransplantation behandelbare Erkrankungen . . . . .	7
1.2.1 Das akute Leberversagen . . . . .	8
1.2.2 Die chronische Leberinsuffizienz im Endstadium . . . . .	8
1.2.3 Genetisch bedingte metabolische Lebererkrankungen . . . . .	9
1.2.4 Die postoperative Leberinsuffizienz . . . . .	9
1.3 Hepatozytentransplantation als Therapieoption . . . . .	10
1.4 Hepatozytentransplantationsmodelle . . . . .	11
1.4.1 Induktion eines Leberversagens . . . . .	11
1.4.2 Geeignete Implantationsorte . . . . .	11
1.4.3 Implantationszeitpunkt, -sequenz und Zellzahl . . . . .	12
1.5 Fragestellung . . . . .	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Versuchstiere und ihre Haltung . . . . .	14
2.2 Definition anatomischer Strukturen . . . . .	14
2.3 Operationsvorbereitung und Narkose . . . . .	16
2.4 Operative Technik und subtotale Leberteileresektion . . . . .	17
2.5 Isolation primärer Hepatozyten . . . . .	20
2.5.1 Explantation der Leber . . . . .	20
2.5.2 Kollagenaseperfusionstechnik . . . . .	21
2.6 Gewinnung mononukleärer Zellen . . . . .	22
2.7 Subperitoneale Implantation . . . . .	22
2.8 Lienale Implantation . . . . .	23
2.9 Beobachtungszeit und Nachbetreuung . . . . .	25
2.10 Organentnahme und Probenasservierung . . . . .	26
2.11 Histologische Aufarbeitung . . . . .	27
2.12 Datendarstellung und statistische Auswertung . . . . .	28

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Beschreibung des Gesamtkollektivs . . . . .	29
3.2	Versuchsreihe I: Subperitoneale Implantation . . . . .	30
3.3	Versuchsreihe II: Einzeitige lienale Implantation . . . . .	34
3.4	Versuchsreihe III: Zweizeitige lienale Implantation . . . . .	37
3.4.1	Kontrolle gegen 0,9%ige Kochsalzlösung . . . . .	37
3.4.2	Kontrolle gegen mononukleäre Zellen . . . . .	40
3.5	Erweiterte Versuchsreihe III: Dosisfindung . . . . .	42
3.6	Darstellung der postoperativen Leberinsuffizienz . . . . .	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Neue Möglichkeiten durch Hepatozytentransplantation . . . . .	47
4.2	Vorbedingungen zur Versuchsdurchführung . . . . .	48
4.3	Erörterung der Ergebnisse . . . . .	50
4.3.1	Subperitoneale Implantation . . . . .	50
4.3.2	Einzeitige lienale Implantation . . . . .	51
4.3.3	Zweizeitige lienale Implantation . . . . .	52
4.3.4	Variation der implantierten Zellzahl . . . . .	54
4.3.5	Gewichtsverlauf und Enzephalopathiescore . . . . .	55
4.3.6	Laborchemische Analysen . . . . .	56
4.3.7	Leberregeneration nach subtotaler Leberteilresektion . . . . .	57
4.4	Bedeutung des Modells . . . . .	58
4.5	Zukunft der Hepatozytentransplantation . . . . .	59
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>71</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>72</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>73</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>74</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>75</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Alb	Albumin
ALT	Alaninaminotransferase
AST	Aspartataminotransferase
Bili	Bilirubin
CHE	Cholinesterase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>g<sub>e</sub></i>	Erdbeschleunigung
GGT	Gammaglutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Glu	Glucose
HcTx	Hepatozytentransplantation
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hep	Hepatozyten
hRL	hinterer rechter Leberlappen
Hx	subtotale Leberteileresektion
KG	Körpergewicht
LL	linker Leberlappen
Mio	Millionen
ML	mittlerer Leberlappen
Mon	mononukleäre Zellen
NaCl	0,9%ige Kochsalzlösung
oLTx	orthotope Lebertransplantation
oOL	oberer omentaler Leberlappen
Quick	Thromboplastinzeit
SD	Standardabweichung
uOL	unterer omentaler Leberlappen
vRL	vorderer rechter Leberlappen

## Zusammenfassung

Als Basis für zukünftige Studien sind Tiermodelle notwendig, um Fragen, die sich aus der Leberzellforschung und aus ihrer klinischen Anwendung ergeben, zu beantworten. Ziel der Arbeit war es, ein derartiges Modell zu entwickeln.

Im Überlebensmodell der Wistarratte wurde durch eine subtotale Leberteilresektion ein akutes Leberversagen induziert. Die postoperative Beobachtungszeit betrug 5 Tage. In den Versuchsreihen I–III wurde eine allogene Hepatozytentransplantation durchgeführt, indem Implantationsort, -zeitpunkt und Zellzahl variiert wurden. In den Kontrollgruppen wurde eine 0,9%ige Kochsalzlösung statt des Zellsuspensats injiziert.

Maßgeblich war das Überleben einer Gruppe. Daneben wurden Verlaufsparemeter wie Körpergewicht und ein eigens entwickelter Enzephalopathiescore bestimmt. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurde den Tieren Blut für weitere Analysen entnommen und ihre Organe zur histologischen Aufarbeitung asserviert.

Als neue Herangehensweise ist in der Versuchsreihe I eine Implantation unter die Serosa des parientalen Peritoneums untersucht worden. Eine Verbesserung des Überlebens konnte nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten gegenüber der Kontrollgruppe nicht gezeigt werden (38% versus 33%;  $p = 0,78$ ).

In der Versuchsreihe II wurde direkt nach der subtotalen Leberteilresektion eine Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten in die Milz durchgeführt. Vermutlich aufgrund rheologischer Probleme verschlechterte sich das Überleben deutlich gegenüber der Kontrollgruppe (0% versus 20%).

Daraufhin erfolgte in der Versuchsreihe III die Implantation der  $24 \times 10^6$  Hepatozyten in die Milz in einer eigenständigen Operation einen Tag vor der subtotalen Leberteilresektion. In der Therapiegruppe konnte hiernach ein hoch signifikant besseres Überleben gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden (72% versus 29%;  $p = 0,009$ ). Die weiteren erhobenen Parameter wiesen ebenso einen tendenziell, teils signifikant besseren postoperativen Verlauf auf.

Durch eine Variation der Zellzahl in einer erweiterten Versuchsreihe III mit  $16 \times 10^6$ ,  $32 \times 10^6$  und  $48 \times 10^6$  Hepatozyten wurde nur eine tendenzielle jedoch keine signifikante Verbesserung des Überlebens gegenüber der Kontrollgruppe erreicht.

Hiermit wurde ein Modell etabliert, mit dem durch geeignete Modifikation neue Zellquellen oder neue Konservierungsmethoden *in vivo* evaluiert werden können, um sie langfristig auf einen klinischen Einsatz vorzubereiten.

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Anatomie der Rattenleber . . . . .	15
2.2	Operationsplatz . . . . .	16
2.3	Subtotale Leberteileresektion . . . . .	19
2.4	Apparatur zur Hepatozytenisolation . . . . .	21
2.5	Subperitoneale Implantation . . . . .	23
2.6	Lienale Implantation . . . . .	24
3.1	Überlebenskurven der Versuchsreihe I . . . . .	30
3.2	Körpergewichtsverlauf der Versuchsreihe I . . . . .	31
3.3	Enzephalopathiescoreverlauf der Versuchsreihe I . . . . .	31
3.4	Laborparameter der Versuchsreihe I . . . . .	32
3.5	Nach subperitonealer Implantation, Tag 5 . . . . .	32
3.6	Hypertrophierte Restleber, Tag 5 . . . . .	33
3.7	Überlebenskurven der Versuchsreihe II . . . . .	34
3.8	Körpergewichtsverlauf der Versuchsreihe II . . . . .	35
3.9	Enzephalopathiescoreverlauf der Versuchsreihe II . . . . .	35
3.10	Nach einzeitiger lienaler Implantation, Tag 0 . . . . .	36
3.11	Überlebenskurven der Versuchsreihe III . . . . .	37
3.12	Körpergewichtsverlauf der Versuchsreihe III . . . . .	38
3.13	Enzephalopathiescoreverlauf der Versuchsreihe III . . . . .	38
3.14	Laborparameter der Versuchsreihe III . . . . .	39
3.15	Nach zweizeitiger lienaler Implantation, Tag 5 . . . . .	40
3.16	Überlebenskurven der Versuchsreihe III mit mononuklären Zellen . . . . .	41
3.17	Verlaufparameter der Versuchsreihe III mit mononukleärer Zellen . . . . .	41
3.18	Überlebenskurven der erweiterten Versuchsreihe III . . . . .	43
3.19	Verlaufparameter der erweiterten Versuchsreihe III . . . . .	43
3.20	Laborparameter der gesamten Versuchsreihe III . . . . .	44
3.21	Nach zweizeitiger lienaler Implantation, Tag 0 . . . . .	45
3.22	Restleber nach vorzeitiger Tötung, Tag 3 . . . . .	46
4.1	Organknappheit in Deutschland . . . . .	47
4.2	Verteilungsmuster lienal implantiertes Zellen . . . . .	53

## Tabellenverzeichnis

2.1	Punkteverteilung des Enzephalopathiescores . . . . .	25
2.2	Referenzbereiche der erhobenen Laborparameter . . . . .	26
3.1	Aufbau der Versuchsreihen und -gruppen . . . . .	29
3.2	Ausgangsdaten der Versuchsreihe I . . . . .	30
3.3	Ausgangsdaten der Versuchsreihe II . . . . .	34
3.4	Ausgangsdaten der Versuchsreihe III . . . . .	37
3.5	Ausgangsdaten der erweiterten Versuchsreihe III . . . . .	42
3.6	Laborwerte nach vorzeitiger Tötung . . . . .	46
4.1	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse . . . . .	50

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich während dieser Arbeit begleitet und fachliche sowie seelische Unterstützung geleistet haben. Vor allem zu bedanken habe ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Matthias Glanemann für die Überlassung des Themas, für seine Anregungen und für die wissenschaftliche Diskussion mit der er die Arbeit betreute. Danken möchte ich ihm ebenfalls für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der tierexperimentellen Versuche und das Heranführen an wissenschaftliches Denken und Arbeiten. Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. Andreas Nüssler für unschätzbare Anregungen, Diskussionen und Lösungsvorschläge, die die Arbeit mit seinem erfahrenen Weitblick auch in schweren Momenten vorankommen ließ.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus, daß ich diese interessante Arbeit an der Chirurgischen Klinik des Virchow Klinikums Berlin durchführen durfte.

Ich danke ganz besonders meiner Mitdoktorandin Felicitas Morgott für die freundschaftliche Hilfe. Ein besonderer Dank gebührt dem Team des Labors für experimentelle Chirurgie im Forschungshaus des Virchow-Klinikums mit Frau Anja Schirmeier und Frau Evelin Hungerbühler, die mich bei der Laborarbeit unterstützten. Danken möchte ich Herrn Dietrich Polens für die Anleitung zur tierexperimentellen Arbeit und bei Frau Angelika Dürr aus dem Zytologielabor für die Benutzung der Mikroskope. Herausragender Dank geht an Herrn Pin Yao, Frau Vera Merk, Frau Dr. Ekaterina Katenz, Frau Zeinab Kronberg und Frau Antje Lehmann, die nicht selten bis tief in die Abendstunden und an Wochenenden mit Teamgeist und Ausdauer diese Arbeit erst möglich machten.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Frau Dr. Birgit Rudolph aus der Pathologie Charité Campus Mitte, die bei der Auswertung der histologischen Schnitte behilflich war, sowie bei Dr. Konrad Neumann aus der Biometrie Charité Campus Mitte für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

An dieser Stelle geht mein besonderer Dank an meinen Vater, der mir das Studium durch seine Unterstützung ermöglichte. Bedanken möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Freundin Carmen Alonso, die nicht nur unverzichtbaren seelischen Beistand leistete, sondern auch wertvolle inhaltliche Anstöße gab.

# Selbständigkeitserklärung

Ich, Gereon Gäbelein, erkläre an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertationschrift mit dem Titel: „Untersuchung zur Effizienz von auxiliärer autologer Hepatocyten transplantation nach chirurgisch induzierter Leberinsuffizienz im Rattenmodell“ selbständig, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 1. November 2007

Gereon Gäbelein