

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Beschreibung des Gesamtkollektivs

In die Versuchsreihen I–III wurden insgesamt 94 männliche Wistarratten eingeschlossen. Die Tiere waren alle vor den Versuchen gesund und verhaltensnormal und wurden mit einem Enzephalopathiescore von 5 Punkten eingestuft. Narkose und Operation waren bei allen eingeschlossenen Tieren komplikationslos verlaufen.

Jede Versuchsreihe wird aus jeweils mindestens einer Therapie- und einer Kontrollgruppe gebildet. In Tabelle 3.1 sind die Versuchsreihen I–III mit den einzelnen Versuchsgruppen aufgeführt. Die Ausgangsdaten der Versuchsgruppen innerhalb der Reihen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Das mittlere Gewicht aller Tiere vor dem Versuch belief sich auf  $272 \pm 24$  g. Das Gewicht der resezierten Leberanteile (Resektat) betrug alle Gruppen gemittelt  $8,8 \pm 1,0$  g. Die Viabilität der zur Implantation verwandten Hepatozytensuspensionen variierte zwischen 93% und 97% .

Für eine subtotalen Leberteilresektion und anschließende subperitoneale Zellimplantation in Versuchsreihe I waren ab Hautschnitt bis Ende der Hautnaht minimal 25 bis maximal 29 min notwendig. Die subtotalen Leberteilresektion mit folgender lienaler Zellimplantation der Versuchsreihe II dauerte 42 bis 51 min. Für das zweizeitige Vorgehen in der Versuchsreihe III wurden für die alleinige lienale Zellimplantation einen Tag vor der subtotalen Leberteilresektion (Tag –1) 17 bis 23 min, für die subtotalen Leberteilresektion (Tag 0) 21 bis 28 min gemessen.

| Versuchsreihe  | Implantationsort u. -tag | Zellzahl u. -art | (Kurzbez.)  |
|----------------|--------------------------|------------------|---|
| I              | subperitoneal            | 0                | 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl)                     |
| I              | subperitoneal            | 0                | $24 \times 10^6$ Hepatozyten (24 Mio Hep)         |
| II             | lienale                  | 0                | 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl)                     |
| II             | lienale                  | 0                | $24 \times 10^6$ Hepatozyten (24 Mio Hep)         |
| III            | lienale                  | –1               | 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl)                     |
| III            | lienale                  | –1               | $24 \times 10^6$ mononukleäre Zellen (24 Mio Mon) |
| III, erweitert | lienale                  | –1               | $16 \times 10^6$ Hepatozyten (16 Mio Hep)         |
| III            | lienale                  | –1               | $24 \times 10^6$ Hepatozyten (24 Mio Hep)         |
| III, erweitert | lienale                  | –1               | $32 \times 10^6$ Hepatozyten (32 Mio Hep)         |
| III, erweitert | lienale                  | –1               | $48 \times 10^6$ Hepatozyten (48 Mio Hep)         |

**Tabelle 3.1:** Aufbau der Versuchsreihen und -gruppen.

### 3.2 Versuchsreihe I: Subperitoneale Implantation

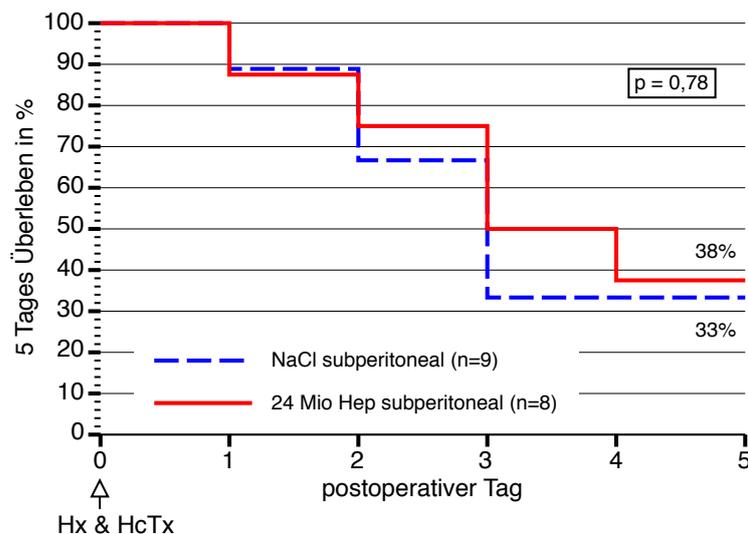
Nach einer subtotalen Leberteilresektion wurde eine Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten unter die Serosa des Peritoneums vorgenommen. In der Kontrollgruppe diente eine 0,9%ige Kochsalzlösung gleichen Volumens anstelle der Zellsuspension als Injektat. Insgesamt wurden 8 Tiere in die Therapie- und 9 Tiere in die Kontrollgruppe eingeschlossen. In der Tabelle 3.2 sind die Ausgangsdaten zusammengefaßt.

| Gruppe     | Anzahl | Ausgangsgewicht [g] | Resektat [g]  |
|------------|--------|---------------------|---------------|
| NaCl       | 9      | $279 \pm 6$         | $9,6 \pm 0,5$ |
| 24 Mio Hep | 8      | $269 \pm 10$        | $9,5 \pm 0,3$ |

**Tabelle 3.2:** Ausgangsdaten der Versuchsreihe I.

Das Überleben in der Kontrollgruppe belief sich auf 3 von 9 Tieren (33%) mit einer mittleren Überlebenszeit von  $3,2 \pm 1,5$  d. Hingegen überlebten nach Beladung der Tiere mit  $24 \times 10^6$  Hepatozyten in der Therapiegruppe 3 von 8 Tieren (entspricht 38%) den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen mit einer mittleren Überlebenszeit von  $3,5 \pm 1,5$  d. Im Log-Rank-Test war bei einem  $p = 0,78$  kein signifikanter Unterschied erreicht.

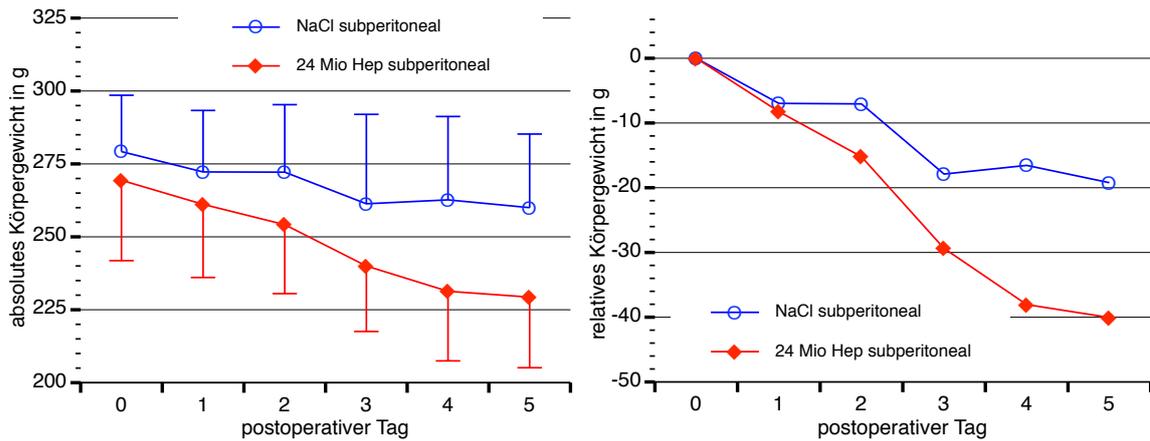
Ein Überlebensvorteil war somit nicht zu zeigen. In Abbildung 3.1 sind die Kaplan-Meier-Überlebenskurven aufgezeichnet. In ihr zeigt sich ein nahezu paralleler Verlauf der Therapie- zur Kontrollgruppe.



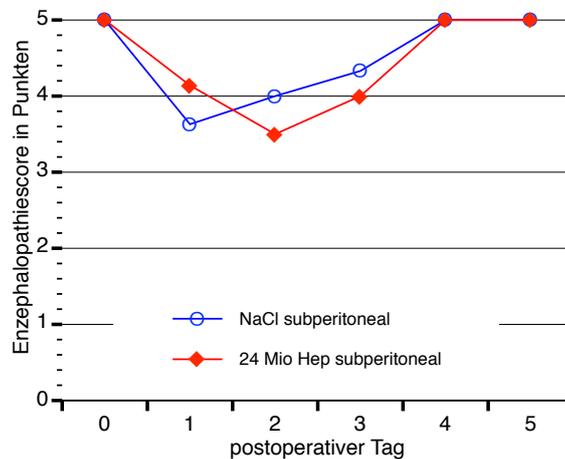
**Abbildung 3.1:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach einzeitiger subtotaler Leberteilresektion und subperitonealen Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

### 3 Ergebnisse

Sowohl im Gewichtsverlauf als auch im Verlauf des Enzephalopathiescores sind nur tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen. Ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen des relativen Körpergewichts an Tag 5 bestand bei einem  $p = 0,44$  nicht (Abbildung 3.2). Die Kontrollgruppe erfuhr im gemittelten Enzephalopathiescore eine frühere Stabilisierung zum Ende des Beobachtungszeitraums sowie ein früheres Durchschreiten der Talsohle (Abbildung 3.3).



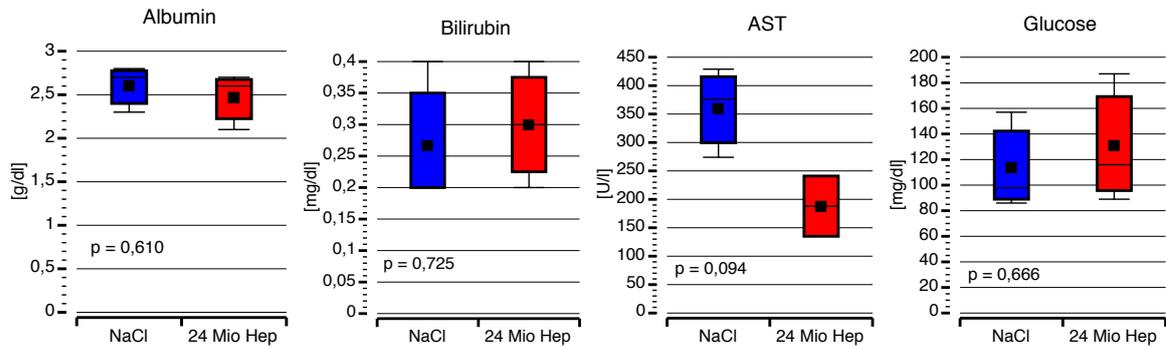
**Abbildung 3.2:** Körpergewichtsverlauf nach einseitiger subtotaler Leberteilresektion und subperitonealer Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.



**Abbildung 3.3:** Enzephalopathiescoreverlauf nach einseitiger subtotaler Leberteilresektion und subperitonealer Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

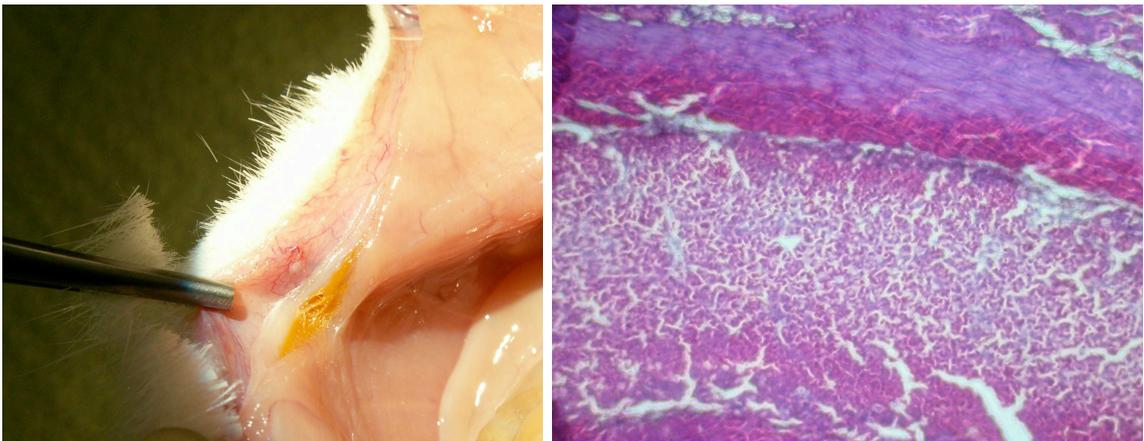
### 3 Ergebnisse

Als laborchemische Parameter sind Albumin, Bilirubin, Glucose sowie AST aufgeführt. Bei den Parametern Albumin und Bilirubin sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Auffällig hingegen ist, daß AST in der Kontrollgruppe ein fast doppelt so hohes Niveau erreicht wie in der Therapiegruppe. Dieser Unterschied ist jedoch mit einem  $p = 0,094$  nicht signifikant.



**Abbildung 3.4:** Laborparameter nach subperitonealer Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

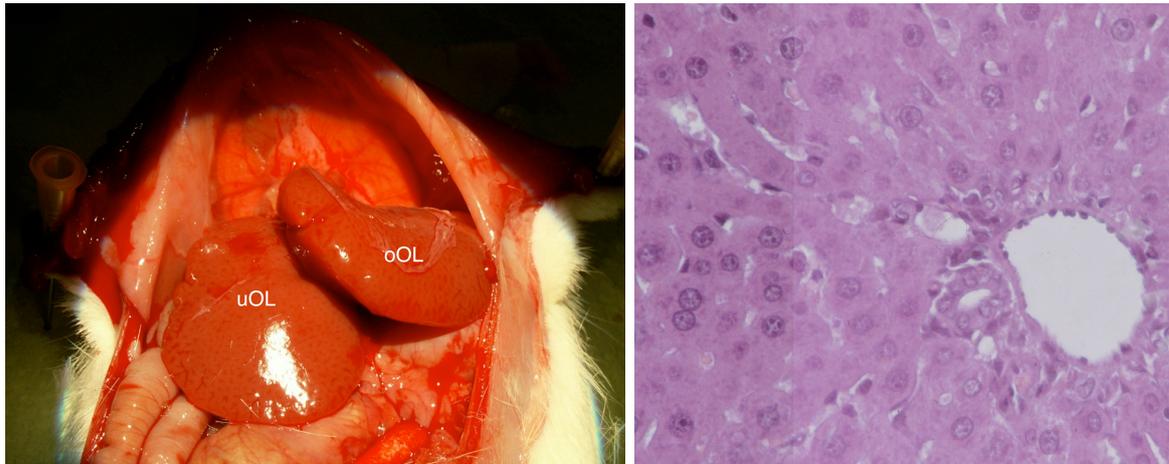
In der histologischen Aufarbeitung der Areale des Peritoneums, an dem die Implantation stattfand, waren massive Nekrosen mit Zeichen entzündlicher Umgebungsreaktion zu erkennen. Nur wenige Areale erfüllten die Kriterien vitaler Leberzellen (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** Aufgelockertes und nekrotisches Gewebe Tag 5 nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten subperitoneal (HE  $\times 200$ ).

### 3 Ergebnisse

Die Leber aller überlebenden Tiere, gleich ob Kontroll- oder Therapiegruppe, war zur Tötung am Ende der Beobachtungszeit deutlich hypertrophiert. Das Gewicht der Restleber, nach Entfernung der ligierten nekrotischen rechten Leberlappen, unterschied sich mit  $6,2 \pm 0,6$  g in der Therapiegruppe kaum von dem der Kontrollgruppe  $5,9 \pm 0,3$  g. In Abbildung 3.6 wird anschaulich, welche Größe die omentalen Leberlappen in der kurzen Zeitspanne erreicht hatten. Diese hypertrophierten omentalen Leberlappen zeigten sich bei allen überlebenden Tieren auch in den folgenden Versuchsreihen II und III, unabhängig ob Therapie- oder Kontrollgruppe.



**Abbildung 3.6:** Deutlich hypertrophierte omentale Leberlappen eines überlebenden Tieres am Ende des Beobachtungszeitraumes (HE  $\times 200$ ).

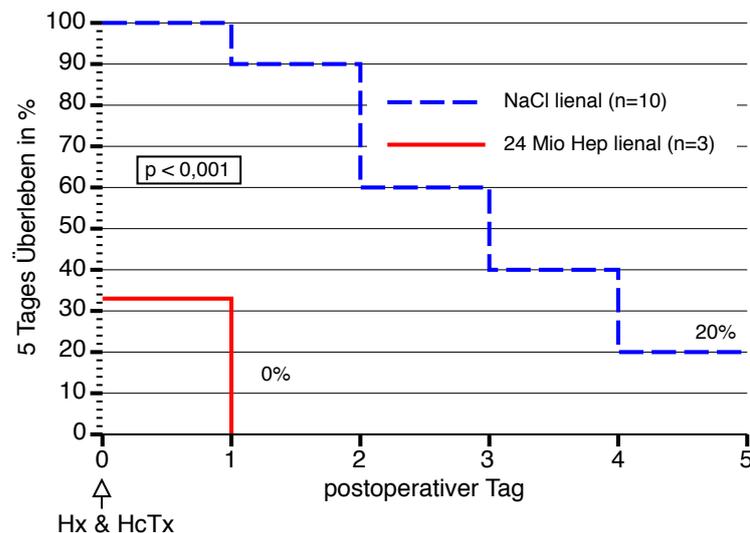
### 3.3 Versuchsreihe II: Einzeitige lienale Implantation

Nach einer subtotalen Leberteileresektion wurde eine Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten in die Milz vorgenommen. In der Kontrollgruppe diente eine 0,9%ige Kochsalzlösung gleichen Volumens anstelle der Zellsuspension als Injektat. In die Kontrollgruppe wurden 10 Tiere eingeschlossen. Mit nur 3 Tieren ist die Therapiegruppe vorzeitig abgebrochen worden. In der Tabelle 3.3 sind die weiteren Ausgangsdaten zusammengefaßt.

| Gruppe     | Anzahl | Ausgangsgewicht [g] | Resektat [g]  |
|------------|--------|---------------------|---------------|
| NaCl       | 10     | $253 \pm 20$        | $8,3 \pm 0,8$ |
| 24 Mio Hep | 3      | $232 \pm 19$        | $7,5 \pm 0,3$ |

**Tabelle 3.3:** Ausgangsdaten der Versuchsreihe II.

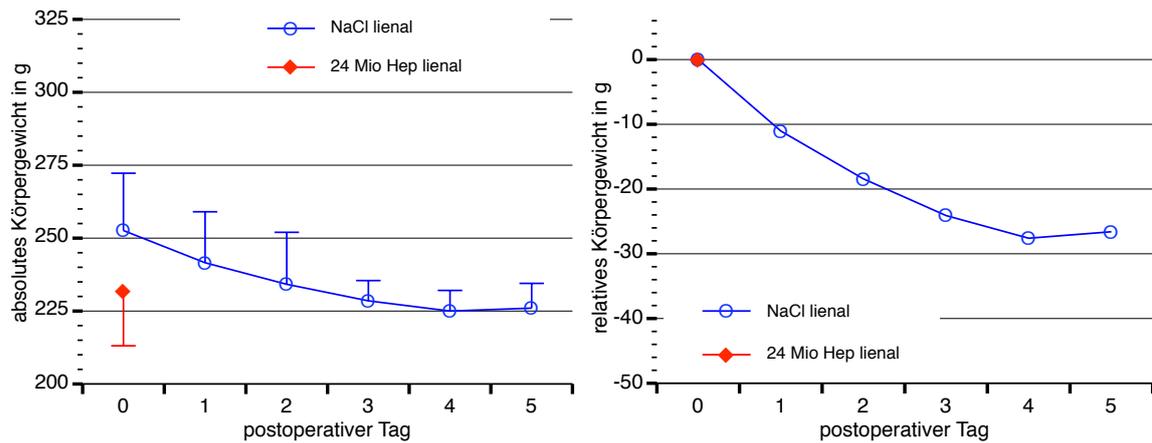
Der Verlauf der Kontrollgruppe ähnelt dem der Kontrollgruppe nach subperitonealer Implantation; 2 der 10 Tiere überlebten den Beobachtungszeitraum. Das mittlere Überleben belief sich auf  $3,1 \pm 0,4$  d. Die 3 Tiere der Therapiegruppe verstarben alle bereits wenige Stunden nach der Operation. Das mittlere Überleben ergibt rechnerisch  $0,3 \pm 0,3$  d. Der Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit einem  $p = 0,0006$  statistisch höchst signifikant (Abbildung 3.7).



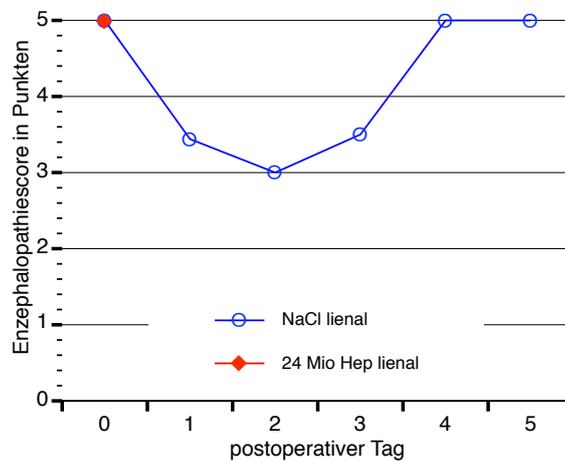
**Abbildung 3.7:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach einzeitiger subtotaler Leberteileresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

### 3 Ergebnisse

Im Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe war ein abflachender Abfall zu verzeichnen, der am Tag 4 seinen Tiefpunkt erreichte. Am Tag 5 kam es zu einem minimalen Anstieg (Abbildung 3.9). Alle überlebenden Tiere wiesen ab Tag 4 einen Enzephalopathiescore von 5 auf. Der Tiefpunkt wurde an Tag 2 mit einem Enzephalopathiescore von 3 erreicht (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.8:** Körpergewichtsverlauf nach einzeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.



**Abbildung 3.9:** Enzephalopathiescoreverlauf nach einzeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

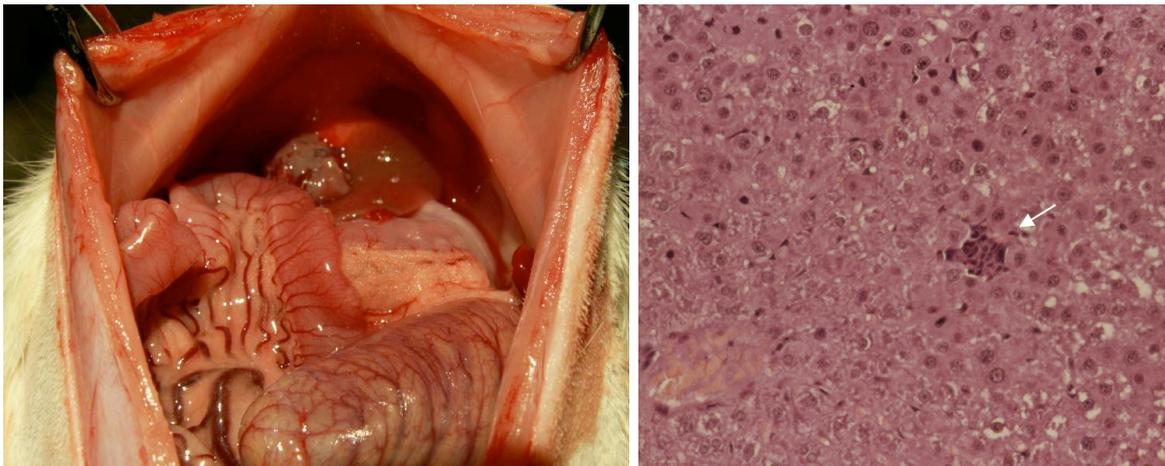
Zur Tötung der Kontrolltiere an Tag 5 war, wie bereits nach subperitonealer Implantation aufgefallen war, eine deutliche Hypertrophie der omentalen Leberlappen zu verzeichnen. Das Restlebergewicht belief sich auf  $5,7 \pm 0,4$  g.

### 3 Ergebnisse

In der Therapiegruppe zeigte sich bereits intraoperativ, daß es nach Einbringen der Hepatozyten und Öffnen der Klemmen im Milzhilus zu einer massiven Stauung der venösen Darmgefäße kam (Abbildung 3.10 links). Die Tiere wachten verzögert aus der Narkose auf.

Zwei der drei Tiere der Therapiegruppe entwickelten kurz vor dem Tod eine akute neurologische Symptomatik. In vorerst minütigen und dann enger werdenden Abständen durchzog sie ein offensichtlich nicht kontrollierbares, den ganzen Körper ergreifendes ruckartiges Zucken. Schließlich verstarben die Tiere. Das dritte Tier der Gruppe wurde zur Visite am Tag 1 tot im Käfig aufgefunden.

Direkt post mortem wurden die Tiere obduziert. Eine chirurgische Komplikation konnte ausgeschlossen werden. Es zeigten sich, wie bereits intraoperativ festgestellt wurde, weiterhin Zeichen eines massiven portalen Hypertonus. In der histologischen Aufarbeitung der Leber konnten Okklusionen eines Großteils der kleineren portalen Gefäße nachgewiesen werden (Abbildung 3.10 rechts). Periportal sind Verfettung und teils Areale mit deutlichen Nekrosezeichen zu verzeichnen.



**Abbildung 3.10:** Gestaute venöse Darmgefäße nach einseitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation kurz vor Verschuß des Abdomens. Histologisch waren massenhaft okkludierte Pfortaderäste nachzuweisen (HE  $\times 200$ ).

### 3.4 Versuchsreihe III: Zweizeitige lienale Implantation

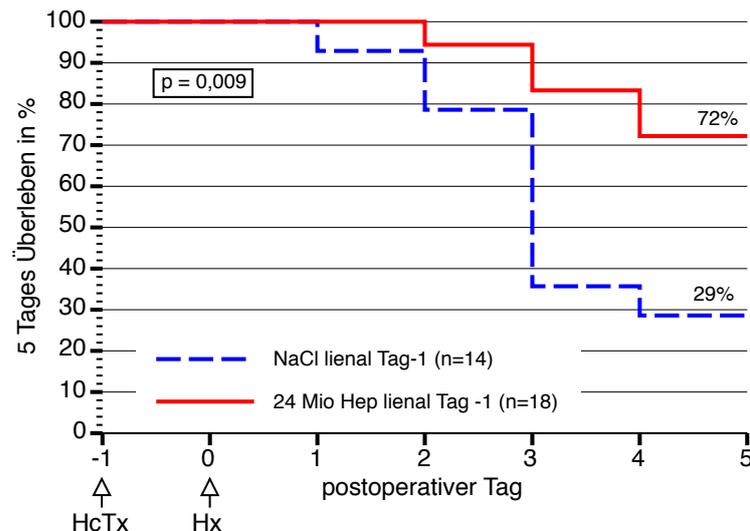
#### 3.4.1 Kontrolle gegen 0,9%ige Kochsalzlösung

Im Gegensatz zur vorherigen Verfahrensweise erfolgte nun die Implantation der  $24 \times 10^6$  Hepatozyten in die Milz einen Tag vor der subtotalen Leberteilresektion. Der Implantationstag wird Tag  $-1$  bezeichnet. In der Kontrollgruppe fungierte wieder eine 0,9%ige Kochsalzlösung statt der Zellsuspension als Injektat. Für die 18 Tiere der Therapiegruppe waren insgesamt 4 Zellisolationen notwendig. In der Kontrollgruppe waren 14 Tiere eingeschlossen worden. Über die weitere Spezifikation der an Tag 0 erhobenen Ausgangsdaten gibt die Tabelle 3.4 Auskunft.

| Gruppe     | Anzahl | Ausgangsgewicht [g] | Resektat [g]  |
|------------|--------|---------------------|---------------|
| NaCl       | 14     | $287 \pm 13$        | $7,7 \pm 0,8$ |
| 24 Mio Hep | 18     | $266 \pm 22$        | $8,9 \pm 0,8$ |

**Tabelle 3.4:** Ausgangsdaten zur Versuchsreihe III.

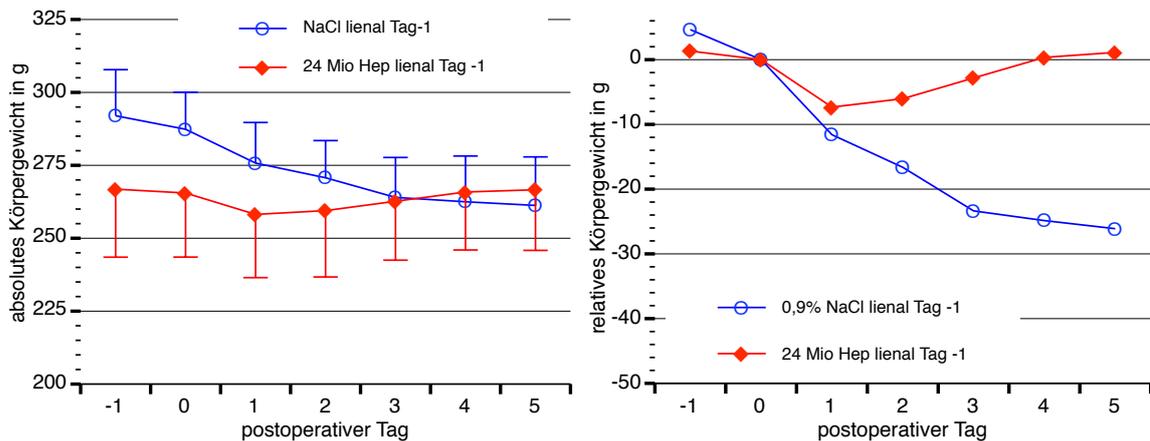
Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das Überleben in der Therapiegruppe deutlich gesteigert (Abbildung 3.11). Nach 5 Tagen Beobachtungszeit waren 13 der 18 behandelten Tiere noch am Leben (72%) mit einer mittleren Überlebenszeit von  $4,5 \pm 0,9$  d. In der Gruppe der 0,9%igen Kochsalzlösung injizierten Kontrolltiere überlebten hingegen 4 Tiere (29%) mit einem mittleren Überleben von  $3,4 \pm 1,6$  d. In der Log-Rank-Statistik konnte ein  $p = 0,009$  errechnet werden. Somit ist der Unterschied als hoch signifikant zu werten.



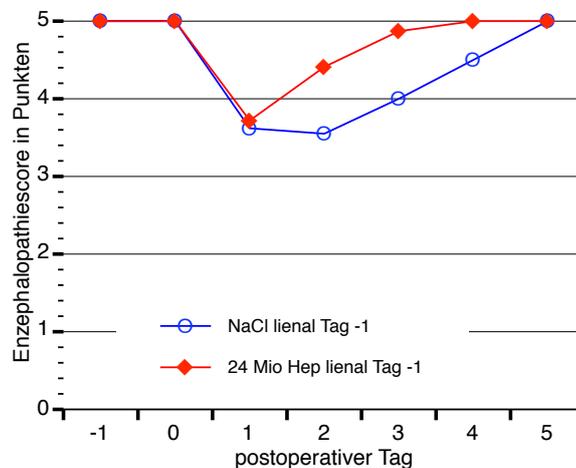
**Abbildung 3.11:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach zweizeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

### 3 Ergebnisse

In Abbildung 3.12 zeigt sich, daß der Gewichtsverlauf der Therapiegruppe zu dem der Kontrollgruppe verändert ist. Die Tiere stabilisierten sich nicht nur nach dem initialen Gewichtsabfall bereits an Tag 2, sondern steigerten kontinuierlich ihr Gewicht bis an das Ende des Beobachtungszeitraums, übertrafen ihr Ausgangsgewicht an Tag 0 und verfehlten das Gewicht von Tag -1 nur knapp. Der Unterschied des relativen Körpergewichts an Tag 5 ist mit einem  $p = 0,007$  hoch signifikant.



**Abbildung 3.12:** Körpergewichtsverlauf nach zweizeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

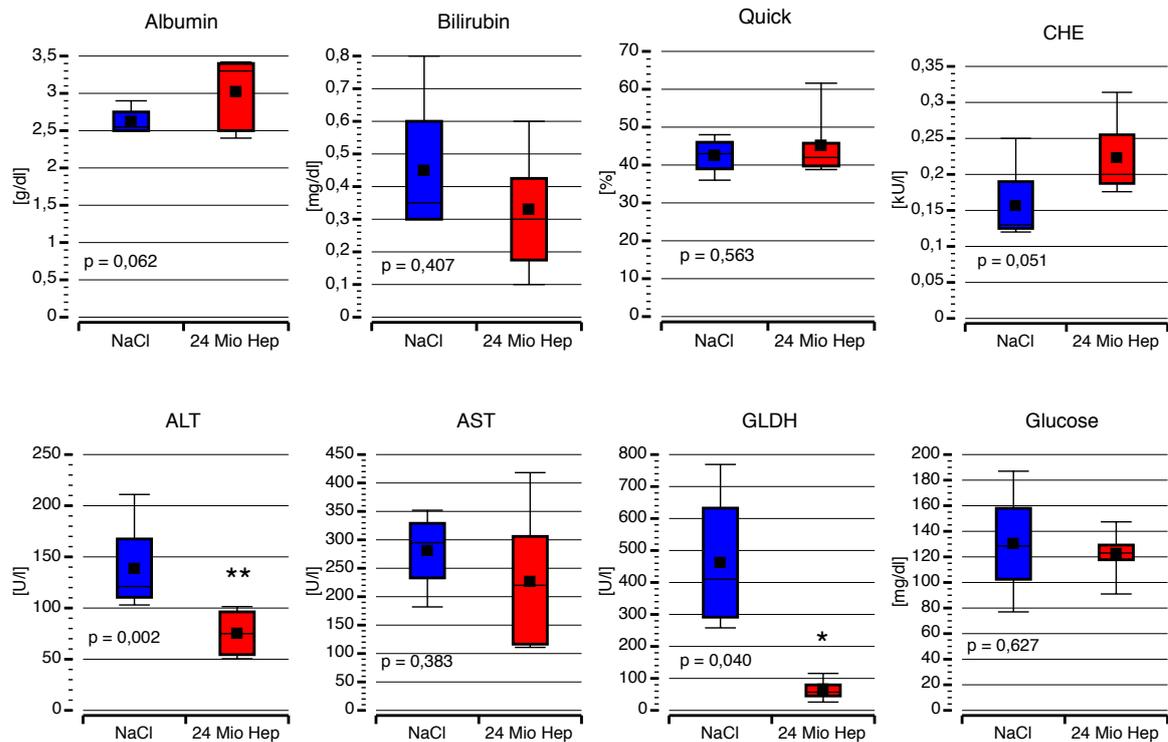


**Abbildung 3.13:** Enzephalopathiescore nach zweizeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.

Die Therapiegruppe verzeichnete bereits an Tag 2 einen Anstieg des Enzephalopathiescores und alle Tiere erreichten am Tag 4 die volle Punktzahl, während die Tiere der Kontrollgruppe erst ab Tag 3 anstiegen und an Tag 5 die maximale Punktzahl von 5 Punkten erzielten (Abbildung 3.13).

### 3 Ergebnisse

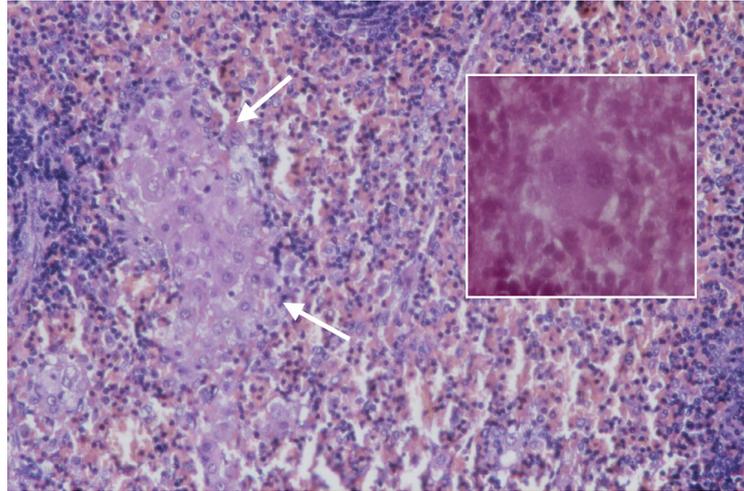
In Abbildung 3.14 sind die relevanten Laborparameter im Vergleich dargestellt. Die GGT erwies sich als ausgesprochen stabil mit einem Wert von  $4,2 \pm 0,2$  in der Therapiegruppe und  $4 \pm 0$  in der Kontrollgruppe und kommt hier nicht zur Darstellung. Signifikante Unterschiede hingegen waren im Falle der GLDH ( $p = 0,040$ ) und ALT ( $p = 0,002$ ) auszumachen; bei der CHE wurde das Signifikanzniveau nur knapp nicht erreicht.



**Abbildung 3.14:** Laborchemische Ergebnisse der Versuchsreihe nach zweizeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten.<sup>1</sup>

Das Gewicht der Restleber belief sich auf  $6,6 \pm 0,6$  g in der Therapiegruppe und  $6,1 \pm 0,3$  g in der Kontrollgruppe. In der histologischen Aufarbeitung der entnommenen Gewebeproben überlebender Tiere konnten Zellen in der Milz ausgemacht werden, die morphologisch als Hepatozyten identifiziert werden können. Die Abbildung 3.15 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der Milz mit Hepatozyten. In den histologischen Schnitten von der Lunge konnten keine Zellen gefunden werden, die Hepatozyten entsprechen hätten.

<sup>1</sup>Eine Kennzeichnung mit \* bedeutet signifikanter und mit \*\* hoch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.



**Abbildung 3.15:** Histologische Aufarbeitung der Milz an Tag 5 nach zweizeitiger lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten. Es sind Nester von Leberzellen zu erkennen (HE  $\times 200$  und  $\times 400$ ).

### 3.4.2 Kontrolle gegen mononukleäre Zellen

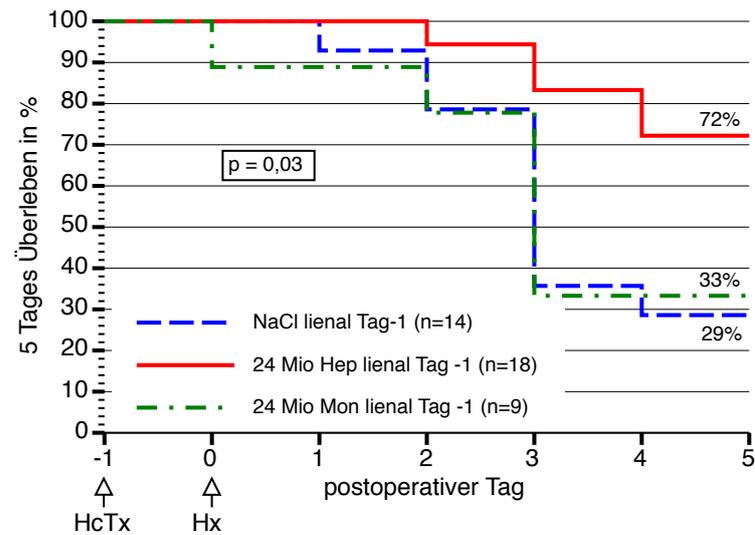
Da ausgeschlossen werden sollte, daß ein Therapieerfolg auf Implantation von Zellen gleichgültig welchen Ursprungs, nicht jedoch auf Hepatozyten zurückgeführt werden kann, war mit der Implantation von mononukleären Zellen – aus der Milz der Ratte gewonnen – eine zusätzliche Kontrollgruppe eingeführt worden. Analog des obigen Vorgehens erfolgte an Tag  $-1$  vorerst die Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen und an Tag 0 die subtotale Leberteilektomie. 9 Tiere wurden eingeschlossen. Alle Zellen wurden mit einer einzigen Zellisolation gewonnen. Die Viabilität belief sich auf 100%. Das Ausgangsgewicht der Tiere betrug  $261 \pm 12$  g, das Gewicht des Resektats  $9,5 \pm 0,2$  g.

Zur besseren Vergleichbarkeit kommen in den Abbildungen die Gruppen nach Implantation der  $24 \times 10^6$  Hepatozyten und Injektion von 0,9%igen Kochsalzlösung aus dem vorherigen Abschnitt mit zur Darstellung.

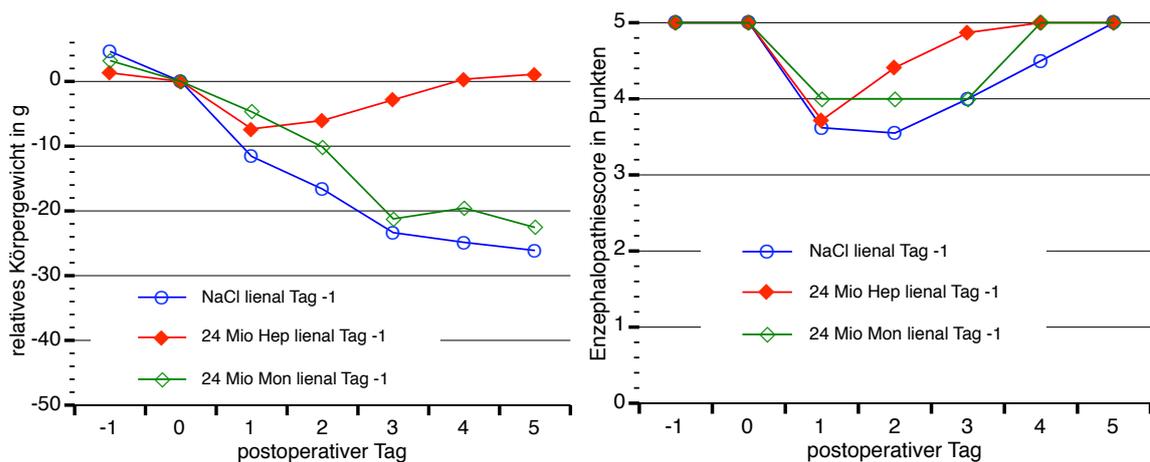
In der Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen überlebten 3 von 9 Tieren (33%) mit einem mittleren Überleben von  $3,2 \pm 1,6$  d. In der Log-Rank-Statistik war ein signifikanter Unterschied zur Therapiegruppe mit  $p = 0,03$  zu errechnen (Abbildung 3.16). Zu der Gruppe nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung ist ein nahezu paralleler Verlauf zu verzeichnen.

In Abbildung 3.19 sind der relative Gewichtsverlauf und der Verlauf des Enzephalopathiescores wiedergegeben. Auch hier zeigen sich Ähnlichkeiten zur vorherigen Kontrollgruppe nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung. Das relative Körpergewicht an Tag 5 war mit einem  $p = 0,03$  signifikant verändert zur Therapiegruppe. Der absolute Gewichtsverlauf wird hier nicht abgebildet.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.16:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach zweizeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen. Es besteht ein signifikanter Unterschied zur Therapiegruppe.



**Abbildung 3.17:** Relativer Körpergewichtsverlauf (links) und Enzephalopathiescore (rechts) nach zweizeitiger subtotaler Leberteilresektion und lienaler Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen.

Die Laborparameter können der zusammengefaßten Darstellung der Abbildung 3.20 im folgenden Abschnitt auf Seite 44 entnommen werden. In keinem Fall war ein signifikanter Unterschied zur Therapiegruppe nachzuweisen. Das Restlebergewicht belief sich auf  $5,9 \pm 0,2$  g.

### 3.5 Erweiterte Versuchsreihe III: Dosisfindung

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, daß ein deutlicher, signifikanter Überlebensvorteil nach zweizeitigem Vorgehen der Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten in die Milz gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden konnte. Es stellte sich die Frage, ob ein Überleben von 72% durch Variation der zu implantierenden Zellzahl noch übertroffen werden könnte. Hierfür wurde die Versuchsreihe III um Gruppen mit gestaffelter Zellzahl erweitert und unter dem Begriff Dosisfindung zusammengefaßt.

Das Vorgehen richtete sich bis ins Detail nach dem Procedere wie es zuvor in Abschnitt 3.4 beschrieben wurde. Als Staffelung wurden der bereits durchgeführten Gruppe mit  $24 \times 10^6$  implantierten Hepatozyten pro Tier nun Gruppen mit  $16 \times 10^6$  und  $32 \times 10^6$  sowie  $48 \times 10^6$  implantierten isolierten Hepatozyten hinzugefügt. In der Tabelle 3.5 sind die Ausgangsdaten zusammengefaßt.

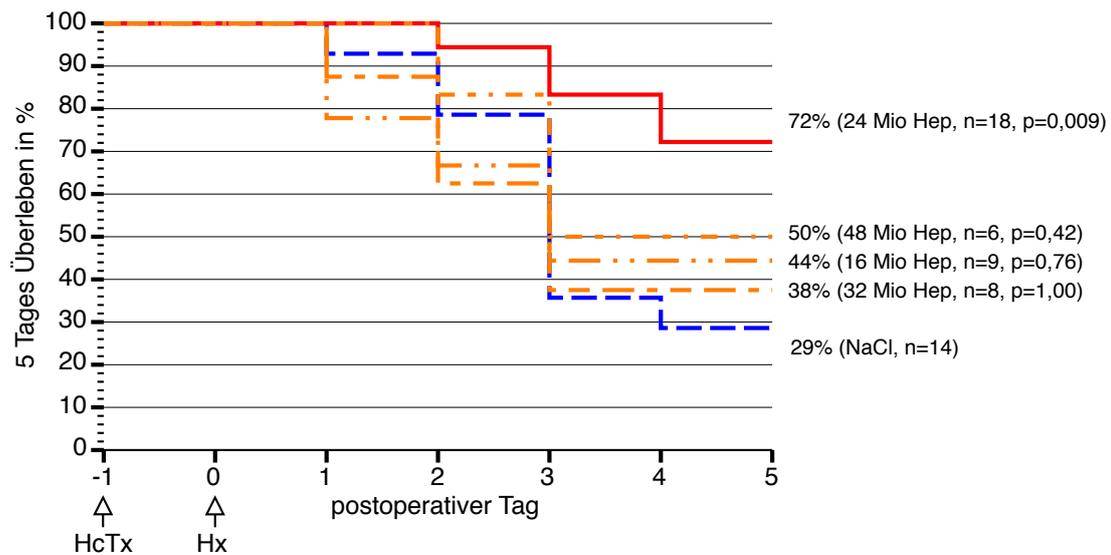
| Gruppe     | Anzahl | Ausgangsgewicht [g] | Resektat [g]  |
|------------|--------|---------------------|---------------|
| NaCl       | 14     | $287 \pm 13$        | $7,7 \pm 0,8$ |
| 16 Mio Hep | 9      | $292 \pm 14$        | $9,2 \pm 0,5$ |
| 24 Mio Hep | 18     | $266 \pm 22$        | $8,9 \pm 0,8$ |
| 32 Mio Hep | 8      | $276 \pm 10$        | $8,4 \pm 1,0$ |
| 48 Mio Hep | 6      | $257 \pm 19$        | $9,2 \pm 0,5$ |

**Tabelle 3.5:** Ausgangsdaten zur Versuchsreihe Dosisfindung.

Es erwies sich, daß in den neu eingeführten Gruppen das Überleben hinter der Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten zurückblieb. Bis auf die Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten erreichte keine der Gruppen in der Log-Rank-Statistik einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur 0,9%igen Kochsalzlösung: versus  $16 \times 10^6$  implantierten Hepatozyten:  $p = 0,76$ ; versus  $32 \times 10^6$ :  $p = 1,00$ ; versus  $48 \times 10^6$ :  $p = 0,42$ . Gleichfalls war der Test im Vergleich zur Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  mononukleären Zellen nicht signifikant: versus  $16 \times 10^6$ :  $p = 0,86$ ; versus  $32 \times 10^6$ :  $p = 0,93$  und versus  $48 \times 10^6$ :  $p = 0,53$ .

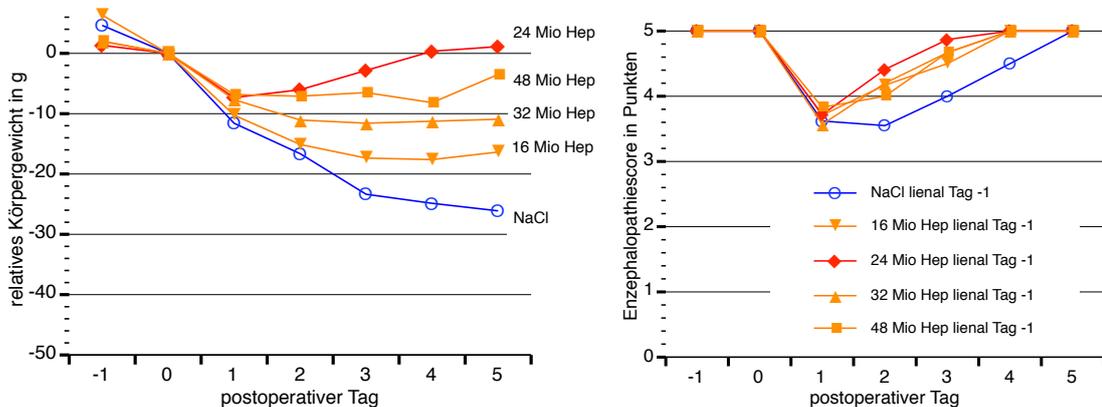
In der Darstellung des relativen Gewichtsverlaufes und des Enzephalopathiescores fällt auf, daß sich die neu eingeführten Gruppen im Kurvenverlauf zwischen der Kontrollgruppe nach Injektion 0,9%iger Kochsalzlösung und der Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten bewegen. Alle Gruppen der gestaffelten Zellimplantation erreichten, wie die Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten, den Tiefpunkt des Enzephalopathiescores bereits an Tag 1. Bis Tag 3 blieben sie unterhalb der Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten, erlangten aber wie diese bereits an Tag 4 die volle Punktzahl von 5.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.18:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach zweizeitiger subtotaler Leberresektion und lienaler Implantation von Hepatozyten unterschiedlicher Zahl. p bezieht sich auf die Kontrollgruppe nach Injektion einer 0,9%igen Kochsalzlösung.

Das relative Körpergewicht an Tag 5 war bei keiner der Gruppen zur Kontrollgruppe nach Implantation von 0,9%iger Kochsalzlösung signifikant unterschiedlich (versus  $16 \times 10^6$ :  $p = 0,84$ ; versus  $32 \times 10^6$ :  $p = 0,34$  und versus  $48 \times 10^6$ :  $p = 0,23$ ).



**Abbildung 3.19:** Relativer Körpergewichtsverlauf (links) und Enzephalopathiescoreverlauf (rechts) nach zweizeitiger subtotaler Leberresektion und lienaler Implantation.

Das Gewicht der Restleber bemaß sich in der Gruppe nach Implantation von  $16 \times 10^6$  Hepatozyten auf  $5,8 \pm 0,3$  g, in der Gruppe nach Implantation von  $32 \times 10^6$  Hepatozyten auf  $6,0 \pm 0,4$  g und in der Gruppe nach Implantation von  $48 \times 10^6$  Hepatozyten auf  $5,6 \pm 0,5$  g.

### 3 Ergebnisse

Die Laborparameter sind als Zusammenfassung der gesamten Versuchsreihe III in Abbildung 3.20 dargestellt. Die gekennzeichneten sich signifikant unterscheidenden Werte beziehen sich auf die Kontrollgruppe nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung. Neben den bereits beschriebenen Signifikanzniveaus der Gruppe nach Implantation von  $24 \times 10^6$  Hepatozyten ist einzig bei dem Parameter GLDH in der Gruppe nach Implantation von  $16 \times 10^6$  Hepatozyten ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit einem  $p = 0,035$  zu verzeichnen.

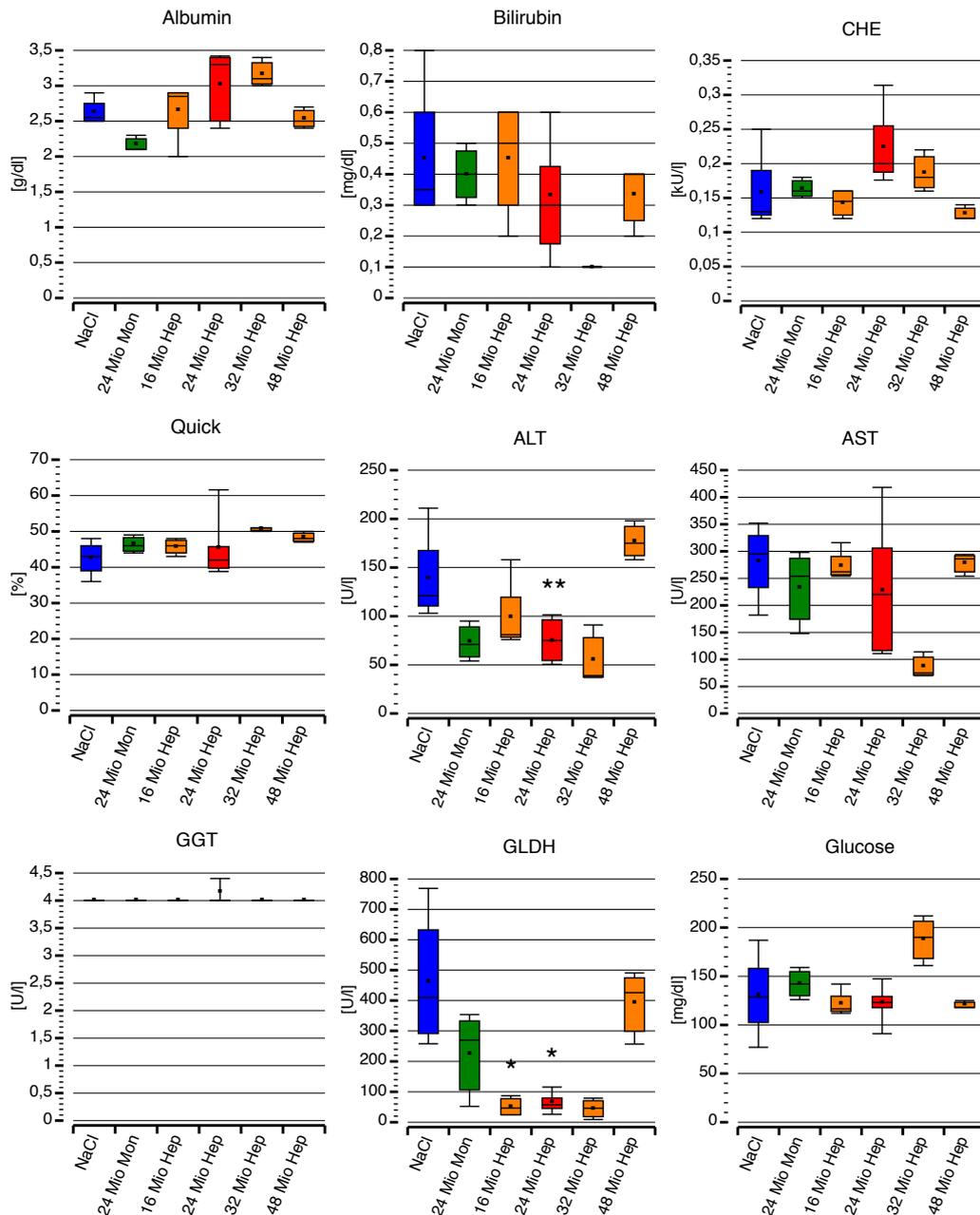
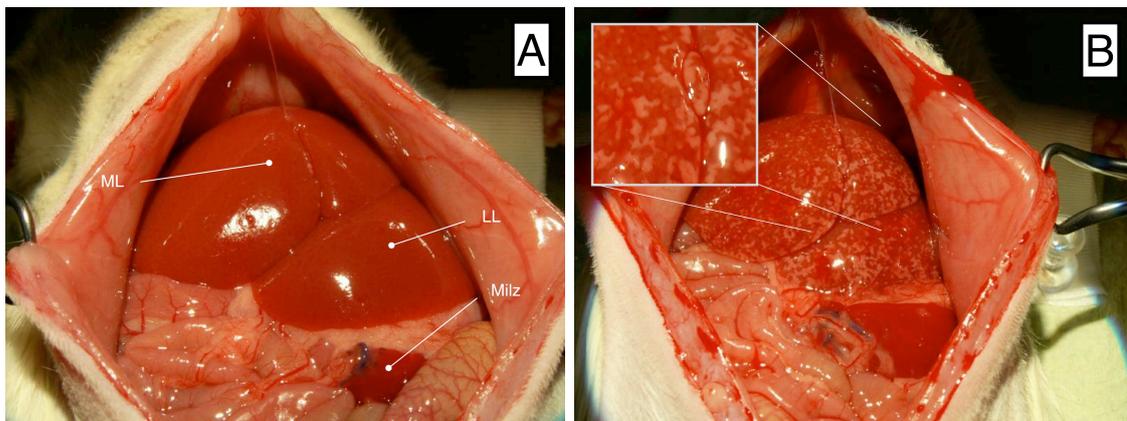


Abbildung 3.20: Laborparameter der gesamten Versuchsreihe III.

### 3 Ergebnisse

Bemerkenswert war eine Beobachtung, die nach Implantation von  $48 \times 10^6$  Zellen gemacht werden konnte. Zur Implantation und im Verlauf bis zum nächsten Tag waren keine Besonderheiten zu verzeichnen. Nach dem Öffnen des Abdomens zur subtotalen Leberteilresektion an Tag 0 zeigte sich jedoch bei allen Tieren dieser Gruppe, daß die Leberoberfläche übersät war mit weißen, punktförmigen, teils konfluierenden Arealen (Abbildung 3.21-B). In den histologischen Untersuchungen der an Tag 0 resezierten Leberanteile zeigten sich Verschlüsse der Pfortaderäste, ähnlich der Abbildung 3.10 rechts auf Seite 36. Das Ausmaß der Verschlüsse war jedoch nicht so ausgeprägt, wie kurz nach Implantation bei einzeitigem lienalen Vorgehen der Versuchsreihe II.

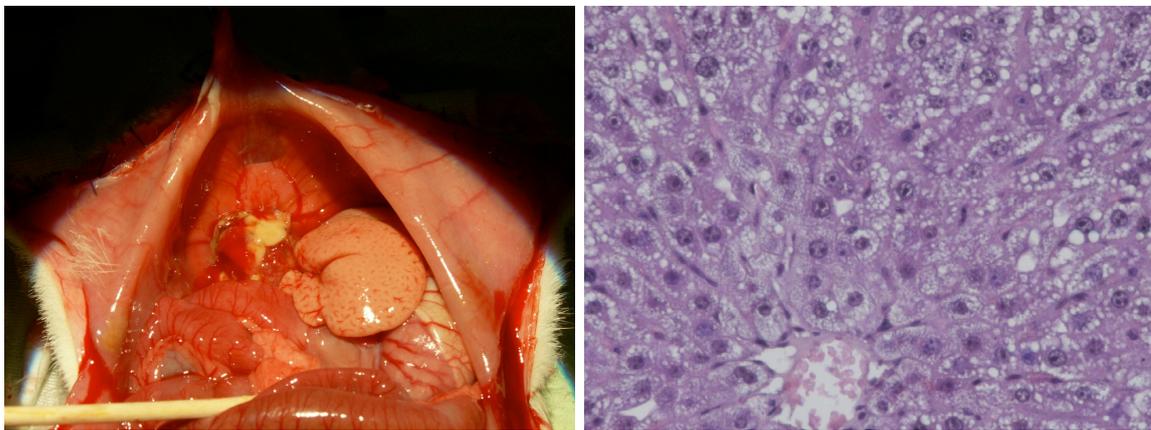


**Abbildung 3.21:** Ein Tag nach Implantation von  $24 \times 10^6$  (A) und  $48 \times 10^6$  Hepatozyten (B). Die Leber ist übersät mit weißen, teils konfluierenden kleinen Arealen.

### 3.6 Darstellung der postoperativen Leberinsuffizienz

Tiere, die im Verlauf mit einem Enzephalopathiescore von 1 Punkt oder darunter eingeschätzt wurden, sind vorzeitig getötet worden, da der Zustand mit einem Überleben bis zum folgenden Tag nicht vereinbar war (Abschnitt 2.9). Die vorzeitige Tötung wurde auf die gleiche Weise, wie im Abschnitt 2.10 beschrieben, durchgeführt.

Die Leber der vorzeitig getöteten Tiere hatte keine Tendenz zur Hypertrophie, selbst wenn die vorzeitige Tötung an Tag 3 vollzogen wurde. Die verbliebenen Leberlappen wirkten entfärbt. In Abbildung 3.22 ist beispielhaft eine solche Leber dargestellt. Das histologische Bild entspricht einer ausgeprägten metabolischen Belastung. Die nach frühzeitiger Tötung gewonnenen Laborwerte sind deutlich alteriert (Tabelle 3.6). Die Einheiten entsprechen denen wie in Tabelle 2.2 auf Seite 26 aufgeführt.



**Abbildung 3.22:** Dekompensierte Restleber bei einem Tier aus den Vorversuchsreihen. Die verbliebenen omentalen Leberlappen erscheinen verfettet (HE  $\times 200$ ).

| Gruppe           | Tag | Alb | Bili | Quick | ALT  | AST  | GGT | GLDH | CHE  | Glu |
|------------------|-----|-----|------|-------|------|------|-----|------|------|-----|
| Vorversuch       | 0   | 2,8 | 0,3  | 42    | 57   | 127  | 4   | 11   | 0,18 | 140 |
| Vorversuch       | 0   | 2,8 | 2,1  | 22    | 633  | 923  | 4   | 4600 | 0,16 | 47  |
| Vorversuch       | 3   | 3,0 | 3,7  | 20    | 2426 | 4265 | 26  | 2573 | 0,16 | 24  |
| Vorversuch       | 1   | 2,9 | 3,2  | —     | 1655 | 5310 | 6   | —    | 0,27 | 16  |
| I (NaCl)         | 3   | 2,4 | 4,5  | 21    | 1711 | 4137 | 9   | —    | 0,10 | 39  |
| III (24 Mio Hep) | 1   | —   | 8,1  | 25    | 50   | 1638 | 62  | —    | 0,22 | 12  |
| III (NaCl)       | 3   | 2,5 | 8,5  | 18    | 2307 | 5913 | 34  | —    | 0,16 | 32  |

**Tabelle 3.6:** Laborwerte der Tiere, die aufgrund eines niedrigen Enzephalopathiescores vorzeitig getötet wurden.