

Aus dem der Klinik für Allgemein- Viszeral- und
Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nutzung von Organen von Leberempfängern zur Isolierung primärer humaner
Leberzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Daniel Kehr

Datum der Promotion:

30.11.2023

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht:

- „Transplantation Proceedings“ unter dem Titel: „A novel cannulation technique for isolation of human hepatocytes from explanted diseased whole livers.“, (Transplant Proc. 2012 May;44(4):999-1001; Kehr DC, Raschzok N, Sauer IM.),

- „Journal of Artificial Organs“ unter dem Titel: „Evaluation of primary human liver cells in bioreactor cultures for extracorporeal liver support on the basis of urea production.“ (Pless G, Steffen I, Zeilinger K, Sauer IM, Katenz E, Kehr DC, Roth S, Mieder T, Schwartlander R, Müller C, Wegner B, Hout MS, Gerlach JC.; Artif Organs. 2006 Sep;30(9):686-94)

Inhalt

Vorwort	2
Darstellungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung	7
Abstract	9
Einleitung.....	11
Gewinnung primärer humaner Leberzellen.....	11
Tierische Leberzellen.....	12
Primäre humane Leberzellen aus erkrankten Organen	12
Perspektiven	13
Aufgabenstellung.....	14
Versuchsaufbau / Methodik.....	15
Ethikantrag.....	15
Vaskulärer Zugang.....	15
Organtransport und Lagerung.....	15
Kanülierungstechnik.....	16
Laboranalysen	21
Statistische Analyse.....	21
Perfusionslösungen	23
Perfusionskreislauf.....	25
Organisatorische Voraussetzungen.....	27
Ergebnisse.....	28
Einfluss von Ischämiezeiten auf die Zellvitalität.....	29
Einfluss der Kollagenaseeinwirkzeit auf die Zellvitalität.....	30
Effektivität des Organverdaus.....	31
Zusammenhang zwischen Organgewicht und Zellulärer Ausbeute.....	33
Zusammenhang zwischen Organgewicht und der Menge vitaler Zellen	35
Veränderung der Zellvitalität durch Aufreinigung der Zellsuspension.....	36
Zellzahl / Zellvitalität.....	37
Zellpelletvolumen und Vitalzellzahl	38
pH Werte im Isolierungsverlauf.....	40
Zusammenhang zwischen Zellvitalität und Sauerstoffpartialdruck	43

Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck und Vitalzellzahl	44
Diskussion und Ausblick	45
Leberzellschädigung durch unzureichende Konservierung	45
Konservierungslösungen	46
Hemmung der Kollagenaseaktivität durch UW-Lösung	47
Kollagenaseaktivität / Verdau	47
Verlauf des pO ₂ , pCO ₂ und des pH	52
Fortschreitender Zelluntergang nach Zellisolierung	55
Aufreinigung der Zellsuspension	56
Determinierung der Organzersetzung	57
Literaturrecherche	58
Vorausgegangene Arbeiten und Ausblick	59
Schlussfolgerung	60
Quellen	61
Eidesstattliche Versicherung	67
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	68
Lebenslauf	69
Publikationsliste / Originalarbeiten	71
Danksagung	73

Darstellungsverzeichnis

Tab. 1: Perfusionslösungen.....	23
Abb. 1a: Erkranktes Organ im Perfusionskreislauf, mit Foley-Kathetern kanüliert....	24
Abb. 1b: Foley-Katheterballons auf Höhe der Bifurkation der v. portae	24
Abb. 2: Perfusionskreislauf zur Leberzellisolierung aus Ganzorganen	25
Abb. 3: retrograde Perfusion mit Foley-Kathetern	26
Abb. 4: Ischämiezeit der Organe	29
Abb. 5: Beziehung zwischen Ischämiezeit und Zellvitalität	29
Abb. 6: Einwirkzeit von Kollagenase bei gesunden und erkrankten Organen.....	30
Abb. 7: Zellvitalität und Kollagenaseeinwirkzeit	30
Abb. 8: Organgewicht vor Zellisolierung / Gewicht der Organüberreste	31
Abb. 9: Abnahme des Organgewichts durch Zellisolierung.....	31
Abb. 10: Auswirkung von Organgewicht vor Zelliso. auf Gewicht Organüberreste...	32
Abb. 11: Zellzahlen nach Ende der Zellisolierung	33
Abb. 12: Einfluß des Organgewichts auf die isolierte Zellzahl	34
Abb. 13: Prozentuale Abnahme des Organgewichts und isolierte Zellzahl	34
Abb. 14: Auswirkung des Organgewichts auf die Anzahl vitaler Zellen.....	35
Abb. 15: Veränderung der Zellvitalität durch Aufreinigung der Zellsuspension.....	36
Abb. 16: Zusammenhang zwischen Zellzahl und Zellvitalität	37
Abb. 17: Volumen des Zellpellets nach Aufreinigung und Zentrifugation (85g).....	38
Abb. 18: Auswirkung des Volumens der Zellsuspension auf Anzahl vitaler Zellen ..	38
Abb. 19: pH Werte der Isolierungslösungen im Isolierungsverlauf	40
Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der O ₂ und CO ₂ Partialdrücke im Isolierungsverlauf	41
Abb. 21: Sauerstoffpartialdruck vor- und während Organverdau und Zellvitalität	43
Abb. 22: Sauerstoffpartialdruck nach während Reperfusion und Zellvitalität	44

Abkürzungsverzeichnis

ARFI	Acoustic radiation force impulse
CG	Kontrollgruppe (Control Group)
DG	Erkrankte Organe (Diseased Grafts)
DMCU	Dimethylcasein degrading units
DSO	Deutsche Stiftung für Organtransplantation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESAO	European Society for Artificial Organs
iE	internationale Einheiten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTK	Histidin-tryptophan- α -ketoglutarat
PBS	phosphate buffered saline solution (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
UW	University of Wisconsin

Zusammenfassung

Die Verwendung primärer humaner Leberzellen hat sich in den letzten Jahren zu einem Goldstandard entwickelt. Der momentane Bedarf an primären humanen Leberzellen wird größtenteils aus Leberteilresektaten gewonnen, die bei tumorchirurgischen Eingriffen reseziert werden. Eine weitere anerkannte Methode ist die Zellisolierung aus Organen, die aus unterschiedlichen Gründen nicht zur Transplantation zugelassen wurden.

Sorgen bezüglich einer Kontamination der gewonnenen Leberzellen mit Tumorzellen bzw. die Verfügbarkeit von abgelehnten Spenderorganen hat bisher eine breitere Verwendung dieser Zellquellen eingeschränkt. Ziel dieser Arbeit ist, die Nutzung erkrankter Organe von Transplantatempfängern zur Zellisolierung zu evaluieren.

Leberzellen aus 10 erkrankten (DG) und aus 12 abgelehnten Spenderorganen primär gesunder Spender (CG) wurden unter Anwendung eines standardisierten fünfstufigen Kollagenase-Perfusionsprotokolls isoliert. Zur Verkürzung der warmen Ischämiezeit wurde die Perfusionsmethode unter Verwendung von Foley-Kathetern optimiert.

Ergebnisse

Das Ausgangsgewicht der erkrankten Organe war mit $1621 \pm 586\text{g}$ signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($1963 \pm 336\text{g}$, $p=0,048$).

Die durchschnittliche Ischämiezeit von $40 \pm 14,1$ min konnte durch Anwendung der Blasenkatheter-Methode signifikant auf $12 \pm 5,2$ min reduziert werden ($p=0,0001$).

Die Vitalität der isolierten Leberzellen war bei DG ($57 \pm 16\%$) vergleichbar mit der Zellvitalität von CG ($66 \pm 13\%$ ($p= 0,26$)). Zellaufreinigung führte zu einer Verringerung der Vitalität um 9% (DG) bzw. 12% (CG) und führte somit zu einem signifikanten Vitalitätsunterschied ($p=0,04$).

Die Zellisolierung führte bei den Organen der Kontrollgruppe zu einer signifikanten Gewichtsreduktion vor- und nach Zellisolierung ($p=0,001$), bei erkrankten Organen führte die Zellisolierung zu keiner nennenswerten Gewichtsabnahme ($p=0,564$).

Ein höheres Ausgangsgewicht der Organe führte nicht zu einer höheren Zellausbeute (CG: $p=0,36$; DG: $p=0,535$) oder zu einer höheren Anzahl vitaler Zellen (CG: $p=0,536$; DG: $p=0,462$).

Bei erkrankten Organen war jedoch bei höheren Zellausbeuten tendenziell eine höhere Zellvitalität feststellbar (DG: $p=0,069$ vs. CG: $p=0,301$)

Interessanterweise zeigte sich in der Gruppe der erkrankten Organe eine Korrelation zwischen Volumen des Zellpellets (Volumen der Zellsuspension nach dreimaliger Zentrifugation und zweimaliger Resuspension) und der Zellvitalität (DG: $p=0,007$; CG: $p=0,083$).

Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Isolierung von vitalen Zellen aus erkrankten Organen grundsätzlich möglich ist. Der Einfluss von Zellaufreinigung auf die Zellvitalität zeigt die Notwendigkeit die Zellaufreinigung zu optimieren, da höchstwahrscheinlich steatotische Zellen während der Wasch- und Resuspensionsintervalle mit dem Überstand abgegossen werden. Die in beiden Gruppen nicht nachweisbare Korrelation zwischen Ausgangsgewicht der Organe und den gemessenen Zellzahlen könnte auf einen unzureichenden Organverdau hinweisen und sollte ebenso in zukünftigen Studien untersucht werden, wie der Einfluss der Zellpelletgröße auf die Zellvitalität.

Abstract

The demand for research purpose primary human liver cells is mostly covered by liver specimen obtained during liver tumor surgery or –with greater technical and logistical efforts- the use of livers rejected from the transplant program. To meet the growing demand, the isolation of liver cells from livers of transplant graft recipients was evaluated in this study.

Liver cells were isolated according to a standardized five-step collagenase perfusion protocol as published before. 10 diseased livers obtained from liver transplant recipients (diseased grafts; DG) and 12 livers rejected from transplantation (control group CG) were included in this study. To minimize warm ischemic time a new cannulation method using standard foley catheters had to be established.

Diseased grafts were significantly lighter ($1679 \pm 606\text{g}$) as compared to healthy organs ($1963 \pm 336\text{g}$; $p=0.048$). Due to the novel cannulation method using foley catheters ischemic time of diseased grafts was significantly reduced from 40 ± 14.1 min to 12 ± 5.2 min ($p=0.0001$).

Mean ischemic time was $2.4 \pm 1.2\text{h}$ in DG and ($10.9 \pm 4.3\text{h}$) in CG ($p=0.00022$) and did not show any impact on cell viability in either group (DG: $p=0.437$; GC: $p=0.801$).

No correlation could be found between oxygen consumption and the total number of vital cells (DG: $p=0.906$ vs. CG: $p=0.066$)

Post isolation cell vitality did not differ in either group. (DG $57\% \pm 16\%$ vs. CG: $66 \pm 13\%$, $p= 0.26$). Cell purification led to a lower vitality in both groups and yielded a significant difference in cell vitality (DG: $48\% \pm 9\%$ vs. CG: $56\% \pm 12\%$, $p= 0.04$). Cell isolation led to a significant reduction of organ weight in CG ($p=0.001$), whereas no significant pre/post isolation weight change could be observed in DG. A higher graft weight did not result in a higher cell yield (CG: $p=0.36$; DG: $p= 0.535$) or a higher number of vital cells (CG: $p= 0.536$; DG: $p=0.462$).

Interestingly, a significant correlation between cell vitality and cell pellet volume (volume of cell suspension after centrifugation and re-suspension steps) could be observed in DG (DG: $p=0.007$; CG: $p=0.083$).

Conclusion:

This study demonstrates, that cell isolation from diseased whole human livers is possible. The impact of cell purification processes on cell vitality shows, that future projects have to focus on cell purification, since steatotic liver cells are most likely to be discarded during washing steps. The insignificant correlation between organ weight and cell counts might indicate insufficient organ digestion.

Einleitung

Die Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie der Chirurgische Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow Klinikum beschäftigt sich seit 1994 mit der Isolierung von primären humanen Leberzellen. In verschiedenen Studien konnte der Nutzen von primären humanen Leberzellen in Hohlfaserkapillarbioreaktoren gezeigt werden. Auf dieser Basis wurden verschieden große Bioreaktoren entwickelt, deren Nutzen auch in einer klinischen Studie gezeigt werden konnte. Verschiedene neue Forschungsansätze verdeutlichen den wachsenden Bedarf an primären humanen Leberzellen. So entwickelt sich seit einigen Jahren, neben der Verbesserung von Bioreaktorsystemen als „*bridging to transplant*“ Verfahren, zunehmend die Leberzelltransplantation zu einem zukünftigen Nutzungsbereich primärer humaner Zellen. Erste Versuche in unserer Arbeitsgruppe hierzu verliefen erfolgversprechend^{1,2}. Die Nutzung primärer humaner Leberzellen für Fragestellungen der Leberzellforschung und in geringem Umfang auch für klinische Untersuchungen im Hinblick auf Leber-Ersatztherapie hat sich somit in den letzten Jahren zu einem Goldstandard entwickelt.³ Darüber hinaus ist auf Grund der 2007 in Kraft getretenen EU Chemikalien Verordnung (REACH) von einem weiter steigenden Leberzellbedarf auszugehen, da laut Verordnung nun seitens der Hersteller nachgewiesen werden muss, dass in Umlauf gebrachte Produkte weder die menschliche Gesundheit noch die Umwelt negativ beeinflussen⁴. Daher ist auch für die zu erwartende zunehmende Zahl von Toxizitätsuntersuchungen in den nächsten Jahren mit einem weiter steigenden Bedarf an primären humanen Leberzellen zu rechnen.³

Gewinnung primärer humaner Leberzellen

Bisher konnte der Bedarf an primären humanen Leberzellen größtenteils durch Leberteilresektate gedeckt werden. Hierbei werden Leberzellen aus Leberteilresektaten nach Tumorenukleation gewonnen.

Der zunehmende Bedarf an primären humanen Leberzellen kann jedoch zukünftig nicht ausschließlich durch Leberteilresektate gedeckt werden. Neben Bedenken bezüglich einer Kontamination der Zellen mit Tumorgewebe, begrenzt die vergleichsweise geringe Zellausbeute die intensivere Nutzung von Leberzellen aus Resektaten. Dies führt insbesondere bei Experimenten mit mehreren Versuchsreihen

– bedingt durch zu geringe Zellzahlen – zu zeitversetzten Experimenten mit Leberzellen aus verschiedenen Organen und somit zu einer mangelnden Vergleichbarkeit. Das Erstellen von „Pool-Leberzellkulturen“, wie es bei der Gewinnung von Blutplasma üblich ist, scheint auch für Leberzellkulturen möglich; dies konnte in orientierenden Versuchen durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt werden. Die zeitlich begrenzte Vitalität von Leberzellen in Kultur und der hohe technische Aufwand sprechen jedoch insgesamt gegen eine „stand-by“ Haltung von Leberzellkulturen.

Der Bedarf an größeren Mengen Leberzellen konnte bisher lediglich durch die Gewinnung von Zellen aus zur Transplantation abgelehnten Spenderorganen gedeckt werden.⁵ Abgelehnte Spenderorgane werden, sofern von den Spendern zu Lebzeiten hierfür freigegeben, von der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) zur Verfügung gestellt.⁵ Die geringe Verfügbarkeit dieser Spenderorgane machen diese jedoch zu einer unzuverlässigen Zellquelle.

Tierische Leberzellen

Tierische Zelllinien und immortalisierte humane Zelllinien stellen in Hinblick auf die unbegrenzte Verfügbarkeit und einen hohen Standardisierungsgrad der Zellqualität eine nahezu ideale Zellquelle dar. Darüber hinaus zeigen Hepatozyten verschiedener Tierspezies auch eine *in vitro* Zellteilungsaktivität. Auf Grund mangelnder Vergleichbarkeit tierischer Leberzellen mit primären humanen Zellen bezüglich des Metabolismus von Arzneimitteln und Toxinen⁶ sowie der grundsätzlich stark eingeschränkten metabolischen Aktivität von immortalisierten Zelllinien, stellen beide Zellquellen keinen zufriedenstellenden Ersatz für primäre humane Leberzellen dar.

Primäre humane Leberzellen aus erkrankten Organen

Die Isolierung von primären humanen Leberzellen aus erkrankten Organen wurde von unserer Arbeitsgruppe 2003 erstmals erfolgreich durchgeführt und auf der 31. Jahrestagung der *European Society for Artificial Organs* (ESAO) in Warschau 2004 vorgestellt.

Parallel zu den Bemühungen unserer Arbeitsgruppe konnte die Arbeitsgruppe um Bhogal et al. erfolgreich Leberzellen aus Resektaten erkrankter, während der Organtransplantation entnommener Lebern isolieren.⁷

Perspektiven

Bedingt durch die Erfolge der im Tiermodell durchgeführten Leberzelltransplantationen in den letzten Jahren, gewinnt dieser Ansatz zunehmend an Bedeutung.⁸ Verschiedene Arbeitsgruppen arbeiten daran, durch repetitive^{9,10}, bildgebungsgestützte Leberzellinjektion eine metabolische Reserve in der Milz oder Leber bei Patienten mit vererbten Leberstoffwechselkrankheiten zu schaffen. Bisher kann mit diesem experimentellen Ansatz keine dauerhafte Heilung erreicht werden. In Hinblick auf Lebensqualität und metabolische Aktivität sind (repetitive) Leberzelltransplantationen, insbesondere bei pädiatrischen Patienten, mittlerweile erfolgversprechend.^{11,12}

Die enzymatische Isolierung von Leberzellen aus Ganzorganen ist bedingt durch einen hohen apparativen und personellen Aufwand mit hohen Kosten verbunden. In einer weiteren Studie wurde daher untersucht, welche Parameter als Surrogatparameter für eine erfolgreiche Zellisolierung dienen können, um somit wenig erfolgversprechende Organe von der Zellgewinnung auszuschließen.¹³ Wegen besserer Verfügbarkeit und problemlosem Zugang zu Spenderdaten wurde diese Untersuchung an Leberteileresektaten, die bei medizinisch notwendigen Leberteileresektionen entnommen wurden, durchgeführt.

Aufgabenstellung

Der ständig weiter steigende Bedarf an primären humanen Leberzellen bei eingeschränkter Verfügbarkeit von primärem humanen Leberzellgewebe machte die Exploration einer neuen bisher nicht erschlossenen Zellquelle notwendig.

Um zusätzlich Zellen in ausreichender Menge zu gewinnen, sollte daher die Möglichkeit überprüft werden, primäre humane Leberzellen aus erkrankten Organen, die von Transplantatempfängern zur Verfügung gestellt wurden, zu isolieren.

Aufgrund der transplantationsbedingten Explantation stehen diese Organe vergleichsweise häufiger, als die von der DSO bereitgestellten Spenderorgane, zur Verfügung.

Normalerweise werden erkrankte Organe nach histopathologischer Untersuchung verworfen. Da die Daten aller potentieller Transplantationspatienten bereits vor den transplantationschirurgischen Eingriffen erfasst sind, ist eine Identifikation potentiell geeigneter, bzw. ungeeigneter Organe (z.B. infektiöse Organe) leicht möglich. Dabei konnte die Logistik des Transplantationsbüros zur Benachrichtigung des Zellisolierungsteams genutzt werden. Es musste jedoch sichergestellt werden, dass vor der Zellisolierung dennoch wesentliche Bestandteile des Organs einer pathologischen Begutachtung zugänglich gemacht werden, wozu etablierte Abläufe der klinischen Routine genutzt werden konnten.

Außerdem musste für einen reibungslosen Ablauf von der Organannahme direkt nach Explantation, bis hin zur Zellisolierung gesorgt sein, um die Ischämiezeiten so kurz wie möglich zu halten. Darüber hinaus war eine Anpassung des Zellisolierungsverfahrens an die meist zirrhotischen und nicht von Blutbestandteilen befreiten Organe notwendig.

Die Kanülierung der Lebergefäße zur Perfusion der erkrankten Organe war mittels konventioneller Kanülierungstechnik durch sehr kurze Gefäßenden erschwert, so dass eine neuartige Kanülierungstechnik etabliert werden musste.

Es galt zu überprüfen, ob eine Isolierung von vitalen Leberzellen aus erkrankten, zirrhotischen humanen Ganzorganen unter Verwendung der in unserer Abteilung für die Zellisolierung aus abgelehnten Spenderorganen etablierten fünfstufigen Isolierungsmethode möglich ist.

Versuchsaufbau / Methodik

Ethikantrag

Die Nutzung der humanen Lebern für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt (88/2002 und 37/2003). Die Patienten wurden über die Art der Nutzung ihrer Organe ausführlich aufgeklärt und haben dieser per Unterschrift zugestimmt.

Vaskulärer Zugang

Die Isolierung primärer humaner Leberzellen basiert auf einer fünfstufigen Leberperfusionsmethode. Zur Perfusion wird das Organ üblicherweise kanüliert und mit Perfusionslösungen gereinigt, zum Kollagenaseverdau vorbereitet und schließlich mittels Kollagenase in seine zellulären Bestandteile aufgelöst (siehe unten). Bei abgelehnten Spenderorganen, die von der DSO zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt werden, ist eine Kanülierung problemlos möglich, da bei Kadaverspendern die Organe mit langen Gefäßenden explantiert werden.

Im Unterschied dazu ist bei Organen, die von Transplantatempfängern zur Verfügung gestellt werden, eine Kanülierung mit herkömmlichen Kanülen auf Grund der geringen Gefäßlängen nicht ohne großen Zeitaufwand möglich. Da die bei Organempfängern durchzuführenden Gefäßanastomosen möglichst langer Lebergefäße bedürfen, bzw. möglichst viel autologes Gefäßmaterial *in situ* belassen werden soll, ist die V. portae der explantierten, erkrankten Organe häufig auf Niveau der Bifurkation reseziert. Die bei einer Zellisolierung in die Gefäße eingeführten Kanülen können folglich nicht durch eine Ligatur in ihrer Position gesichert werden. Bei steigendem Perfusionsdruck kommt es deshalb häufig zur Dislokation der Kanülen.

Organtransport und Lagerung

Die im Rahmen einer Transplantation bei Transplantatempfängern explantierten Organe werden üblicherweise durch Pathologen begutachtet und dann verworfen. Eine Perfusion mit Konservierungslösung findet nicht statt. Auch in unserem experimentellen Aufbau wurde auf eine Perfusion mit Konservierungslösung verzichtet. Nach Explantation wurde das Organ in Empfang genommen, steril

verpackt und mit eisgekühlter Konservierungslösung („University of Wisconsin Solution“) bedeckt.

Anders als bei gesunden Spenderorganen oder abgelehnten Spenderorganen, ist bei erkrankten Organen nicht von längeren Transportzeiten und somit längeren kalten oder warmen Ischämiezeiten auszugehen, da eine labortechnische Weiterverarbeitung unmittelbar im Anschluss an die Explantation stattfindet. Die mittlere kalte Ischämiezeit der erkrankten Spenderorgane ist als deutlich kürzer anzunehmen, als die durchschnittliche Ischämiezeit von abgelehnten Spenderorganen. Da die Organe bis zur Weiterverarbeitung nicht gespült werden, befindet sich blutiges Sekret im Spenderorgan. Neben einer Thrombosierung der Gefäße ist die Entstehung von Sauerstoffradikalen durch Blutbestandteile einer der limitierenden Faktoren für die Funktions- und Lebensfähigkeit der Leberzellen. Daher ist das Einhalten einer kurzen Ischämiezeit, insbesondere bei erkrankten Spenderorganen zwingend. Um ischämiebedingte Schädigungen zu vermeiden, ist bis zur enzymatischen Zersetzung des Organskeletts möglichst schnell eine adäquate Perfusion und Sauerstoffversorgung zu etablieren. Zeitaufwendige Kanülierungsversuche und Gefäßrekonstruktionen sollten in dieser Phase vermieden werden.

Kanülierungstechnik

Zur Verkürzung der Ischämiezeit wurde eine neuartige Kanülierungstechnik der Lebergefäße mittels handelsüblicher Foley Katheter erfolgreich etabliert.¹⁴

Silikon Blasenkateter (Foley-Katheter) werden üblicherweise zum Drainieren von Urin oder – in selteneren Fällen - zum Drainieren oder Spülen von intraabdominellen Flüssigkeitsverhalten genutzt. Zum Schutz des umliegenden Gewebes ist die Spitze des Katheters verschlossen und abgerundet. Seitliche Perforationen gewährleisten den Abfluss von Sekreten.

Zur Optimierung des Gefäßzugangs werden handelsübliche Silikon Blasenkateter in die Abgänge der V. portae und der A. hepatica eingeführt und die Blockerballons mit NaCl geblockt. Hierdurch können aufwändigere Ligaturen oder Tabaksbeutelnähte zum Sichern der Kanülen vermieden werden. Die Katheter werden nun durch die flüssigkeitsgefüllten Ballons im Gefäß fixiert (**Abb. 1a, 1b**).

Bei fibrotisch oder zirrhotisch umgebauten Lebern ist während der Perfusion zur Leberzellisolierung analog zur Situation *in situ* mit höheren Perfusionswiderständen

zu rechnen. Um einen möglichst laminaren Fluss zu ermöglichen und den Flusswiderstand zu reduzieren, wird die Katheterspitze vor dem Einführen in die Lebergefäße abgetrennt.

Um vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können, wurden beide Kanülierungstechniken ausschließlich bei erkrankten Organen mit komplett resezierten Venae portae durchgeführt.

Zellisolierung

Im Operationssaal wird das Organ entgegengenommen, steril verpackt und in University of Wisconsin Lösung (Belzer UW® Bridge to life Lösung, Bridge to Life LTD, 1225 Laurel Street, Columbia, SC 29201) auf Crushed Ice ins Labor transportiert. Hiernach wird das Organ gewogen und Proben zur histopathologischen Untersuchung entnommen.

Von der DSO zur Verfügung gestellte abgelehnte Spenderorgane werden in eisgekühlter University of Wisconsin Lösung oder in Histidin-tryptophan- α -ketoglutarat Lösung (HTK, Custodiol ®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) Lösung transportiert. Eine Perfusion dieser Organe mit Konservierungslösung wird bei allen abgelehnten Spenderorganen seitens des Explantationsteams durchgeführt.

Zur Zellisolierung wird, basierend auf der von unserer Arbeitsgruppe etablierten Methodik, eine fünfstufige Kollagenase- Perfusionsmethode durchgeführt.¹⁵

An einem Laminar Airflow Arbeitsplatz wird die Leber in zwei ineinander liegende Edelstahlsiebe mit einer Porengröße von 3 mm und 400 μ m gegeben, die sich in einem mit Perfusionsflüssigkeit gefülltem Edelstahlreservoirgefäß befinden. Dieser Aufbau sorgt dafür, dass das Organ permanent von gewärmter Perfusionslösung umgeben ist. Die Perfusionslösung wird mittels Rollerpumpen aus dem Reservoirgefäß angesaugt, durch einen Wärmetauscher erwärmt und schließlich via Foleykatheter in die Organe gepumpt. Die aus der V. Cava austretende Perfusionslösung sammelt sich erneut im Reservoirgefäß (**Abb. 2**).

Die Oxygenierung der Organe wird über ein im Boden der Edelstahlschüssel befindlichen perforierten Schlauch (Perlator), über den Druckluft und Sauerstoff verperlt werden, sichergestellt (Eigenanfertigung der Arbeitsgruppe).

Während der Zellisolierung werden regelmäßig Proben von Perfusionslösungen entnommen und der pH-Wert mit einem klinischen Blutgasanalysegerät (Radiometer, Kopenhagen) bestimmt. Durch Titration mit NaHCO_3 wird der pH während des gesamten Zellisolierungsvorgangs auf einen Wert zwischen 7,0 und 7,5 eingestellt.

Zunächst erfolgt die Reinigung des Organs von verbliebenen Blutbestandteilen und ein EDTA vermittelter Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen. Hierzu werden der Perfusionslösung, auf Grund des höheren Anteils verbliebenen Blutes in erkrankten Organen entgegen dem Standardprotokoll 8300 IE Heparin/l zugesetzt. Die

Perfusion wird mit EDTA- haltiger Perfusionslösung (siehe Tabelle 1, Lösung A) für je 2 bis 3 min beliebig oft wiederholt, bis die Perfusionslösung makroskopisch frei von Blutbestandteilen erscheint. Perfusionslösung A wird verworfen.

Anschließend wird die Perfusion mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freier Lösung (Tab. 1, Lösung B) fortgesetzt, um verbleibende EDTA-Bestandteile zu entfernen.

Während der 20-minütigen Perfusion mit 3l Perfusionslösung B (Tab. 1) kann es, bedingt durch den Ca^{2+} und Mg^{2+} Entzug zu einer ödematösen Schwellung des Organs kommen. Perfusionslösung B wird verworfen.

Nach stöchiometrischem Hinzufügen von Ca^{2+} und Mg^{2+} während der einminütigen Perfusion mit- und dem anschließenden Verwerfen von Lösung C (Tab.1) erfolgt schließlich die Perfusion mit 0,25%iger Kollagenaselösung (Collagenase P, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in Perfusionslösung D (Tab. 1). Auf Grund von Lieferschwierigkeiten wird bei einem Organ die enzymatische Zersetzung mit 1500U Kollagenase (NB1) und 150 DMCU (Dimethylcasein degrading units) Neutraler Protease (beide Nordmark Pharma, Uetersen, Deutschland) durchgeführt. Neutrale Protease ist ein essentieller Kofaktor von Kollagenase. Da es sich bei Kollagenase NB1 um eine hochaufgereinigte Kollagenase handelt, ist eine Supplementierung von neutraler Protease zur Initiierung des Verdauvorgangs zwingend notwendig. Kollagenase P enthält produktionsbedingt bereits ausreichende Mengen neutraler Protease, so dass eine Supplementierung von neutraler Protease nicht notwendig ist.

In Ermangelung von objektivierbaren Parametern, wird die Kollagenaseperfusion beendet, sobald nach digitalem Druck auf die Leberoberfläche ein Abdruck auf der Leberoberfläche entsteht. Die Kollagenaselösung wird verworfen. Dann wird die Kollagenaseaktivität durch die Zugabe von gekühlter (4°C) Ca^{2+} und Mg^{2+} freier PBS-Lösung unterbrochen. Der Entzug der Kollagenase-Kofaktoren, Kalzium und Magnesium, führt zu einer drastischen Abnahme der Enzymaktivität und sollte somit zu einem Sistieren des Organverdaus führen.

Die Organkapsel wird eröffnet und die Leberzellflüssigkeit manuell von unverdauten Leberbestandteilen (Bestandteile der großen Gefäße, vollständig fibrotisch umgebaute Organbestandteile, sowie nicht perfundierte Areale) getrennt. In einem zweiten Schritt wird nun die Zellsuspension durch hintereinander gereihte Siebe (Porengröße 3 mm und $400\ \mu\text{m}$) von weiteren nicht gelösten Bestandteilen getrennt.

Danach wird die Zellsuspension aus dem Reservoirbehälter abgelassen. Es erfolgen zügig drei Waschintervalle, die der Entfernung von avitalen Zellbestandteilen, Organmatrix und verbleibender kollagenasehaltiger Spülflüssigkeit dienen. Hierzu werden die Zellsuspensionen in rascher Abfolge drei Mal bei 85 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand jeweils abgegossen und die Zellen nach jeder Zentrifugation in gekühlter PBS-Lösung resuspendiert.

Die nichtverdauten Organüberreste werden gewogen und das Volumen des Zellpellets wird nach der dritten Zentrifugation gemessen. Die Zellzahl des Zellpellets wird mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt, und die Anzahl vitaler Zellen anhand der Impermeabilität vitaler Zellen für Trypanblau-Farbstoff festgestellt.

Laboranalysen

Zur Qualitätssicherung werden vor- und nach Zellisolierung mikrobiologische und biochemische Proben von der Konservierungslösung sowie der Zellsuspension entnommen.

Während der gesamten Zellisolierung werden mittels eines Blut-Gas Analysegerätes (Radiometer, Kopenhagen) alle 5min Sauerstoff und CO₂ Partialdrücke, HCO₃ und pH-Werte der Perfusionslösungen gemessen. Die Sauerstoff- und Druckluftsubstitution über den Perlator wird auf Grundlage der ermittelten Partialdrücke gesteuert. Es wird ein Sauerstoffpartialdruck über 150mmHg angestrebt. Der CO₂ Partialdruck wird nach Möglichkeit unter 70mmHg gehalten. Um eine ausreichende Kollagenaseaktivität zu gewährleisten, wurde der pH-Wert unter Zugabe von Natriumbicarbonat im Zielbereich zwischen 7,0 und 7,5 gehalten.

Laboranalysen mit klinischen Routineanalysegeräten werden entnommen:

1. nach 15 min Kollagenaseperfusion
2. aus dem Überstand des Zellpellets nach dem letzten Waschschrift

Folgende Parameter werden überprüft:

K⁺; Na⁺; CA²⁺; PO₄; Harnstoff, Glucose, Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), Alkalische Phosphatase (AP), Laktatdehydrogenase (LDH); Glutamatdehydrogenase (GLDH); Albumin.

Darüber hinaus werden weitere Proben entnommen und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Später wurden diese Proben in einem weiteren Schritt zur Bestimmung der Albuminkonzentration mittels eines sensitiveren ELISA Tests (Exocell Inc., Philadelphia, PA, USA) erneut überprüft.

Statistische Analyse

Die Daten wurden in Excel für Mac Version 2008 (Microsoft Corporation Redmont, Washington State, USA) erfasst und mit R Version 2.15.3 "The R Foundation for Statistical Computing" (<http://www.r-project.org>) analysiert.

Auf Grund von geringer Stichprobenzahl wurden ausschließlich nichtparametrische Tests durchgeführt.

Metrische unabhängige Größen wurden mit dem Wilcoxon-Test und verbundene Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Der Zusammenhang zweier

metrischer Größen wurde mit Hilfe des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten (ρ) analysiert. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe von Boxplots und Streudiagrammen.

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p \leq 0,05$ festgelegt.

Perfusionslösungen¹⁵

Substanz	Lösung A	Lösung B	Lösung C	Lösung D	Lösung E
NaCl	110 mM				
KCl	5 mM				
Phosphatpuffer	25 mM				
Glucose	5 mM				
Fructose	5 mM				
L- Glutamat	0,5 mM				
L- Glycin	0,5 mM				
L- Serin	0,5 mM				
L- Alanin	0,5 mM				
L- Arginin	0,1 mM				
Gentamycin	6 mg/l				
Amphotericin	2.5 mg/l				
Penicillin G	100.000 IE/l				
+ CaCl ₂			1 mM	1 mM	
+ MgCl ₂			1 mM	0,5 mM	
EDTA	1 mM				
NaHCO ₃	2,2 g/l				
HEPES					10 mM

Tab. 1: Zusammensetzung der Perfusionslösungen

Zur besseren Auflösung von verbliebenen Blutbestandteilen werden in der Gruppe der erkrankten Organe 8300 iE Heparin pro Liter Perfusionsflüssigkeit der LSG A supplementiert.

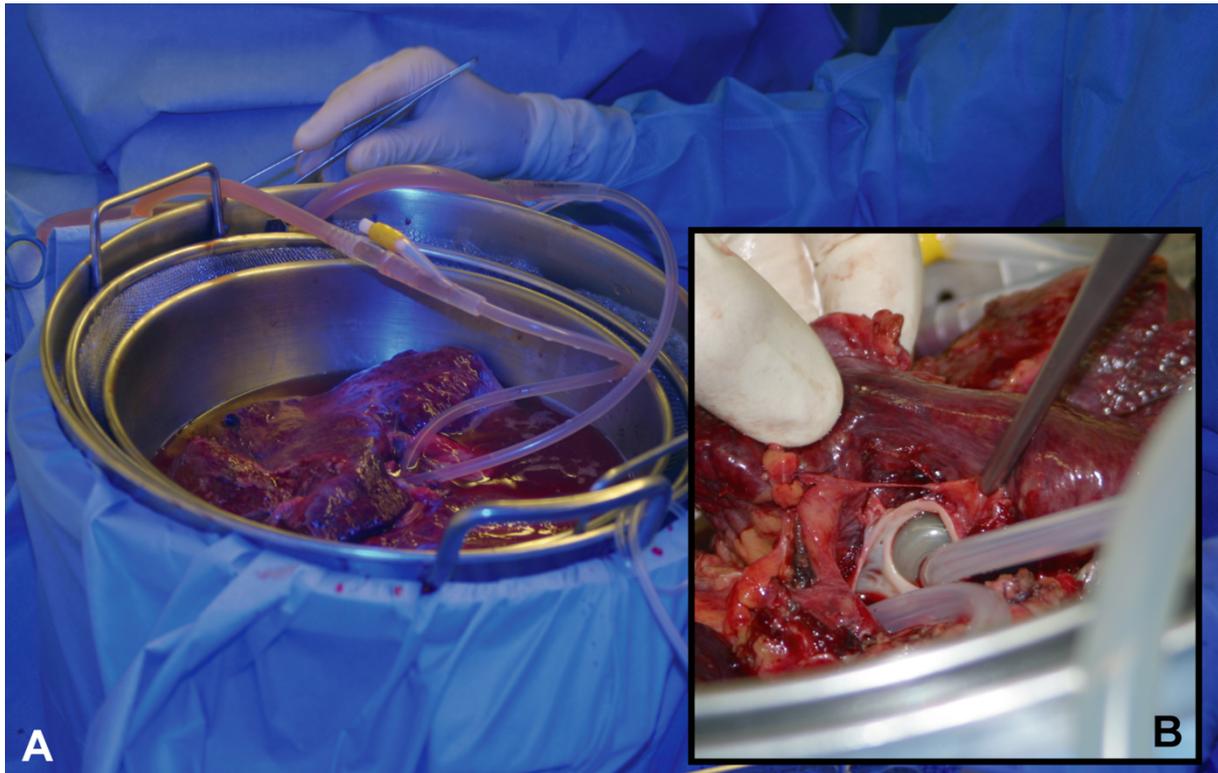


Abb. 1a: Erkranktes Organ im Perfusionskreislauf, mit Foley-Kathetern kanüliert¹⁴

Das hier dargestellte Organ ist von gewärmter Perfusionslösung umgeben und wird durch geblockte Foleykatheter mittels Rollerpumpe perfundiert.

Abb. 1b: Zwei geblockte Foley-Katheterballons auf Höhe der Bifurkation der v. portae

Geblockte Ballons der Katheter im Bereich der Bifurkation der v. portae. Wie bei allen von Transplantatempfängern zur Verfügung gestellten Organen, ist die vena portae extrem kurz abgesetzt. Eine Perfusion ist meistens nur durch separate Kanülierung der rami dexter et sinister venae portae möglich.

Perfusionskreislauf

Abbildung 1: Perfusionskreislauf

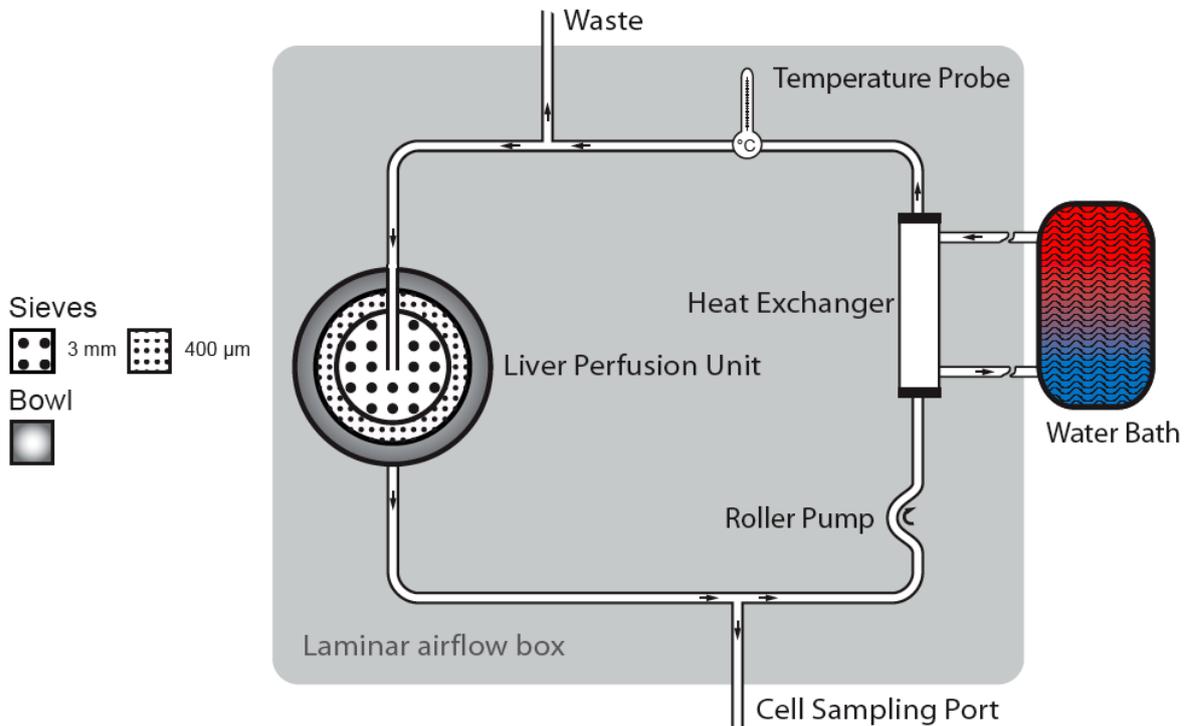


Abb. 2: Perfusionskreislauf zur Leberzellisolierung aus Ganzorganen

Die Perfusionslösungen befinden sich in der Edelstahlschüssel (Bowl) in der zwei ineinandergesteckte Siebe mit 3 mm und 400 μm Porengröße liegen.

Zur Zellisolierung wird das Organ in das innenliegende Sieb gegeben und an die Perfusionskatheter angeschlossen. Die aus dem Organ ausströmende Perfusionslösung sammelt sich in der die Siebe umgebenden Edelstahlschüssel und wird aus dieser über ein im Boden der Schüssel angebrachten Ansaugstutzen angesaugt. Die Perfusionslösungen werden über eine Rollerpumpe durch einen Wärmetauscher transportiert und in das Organ gepumpt.

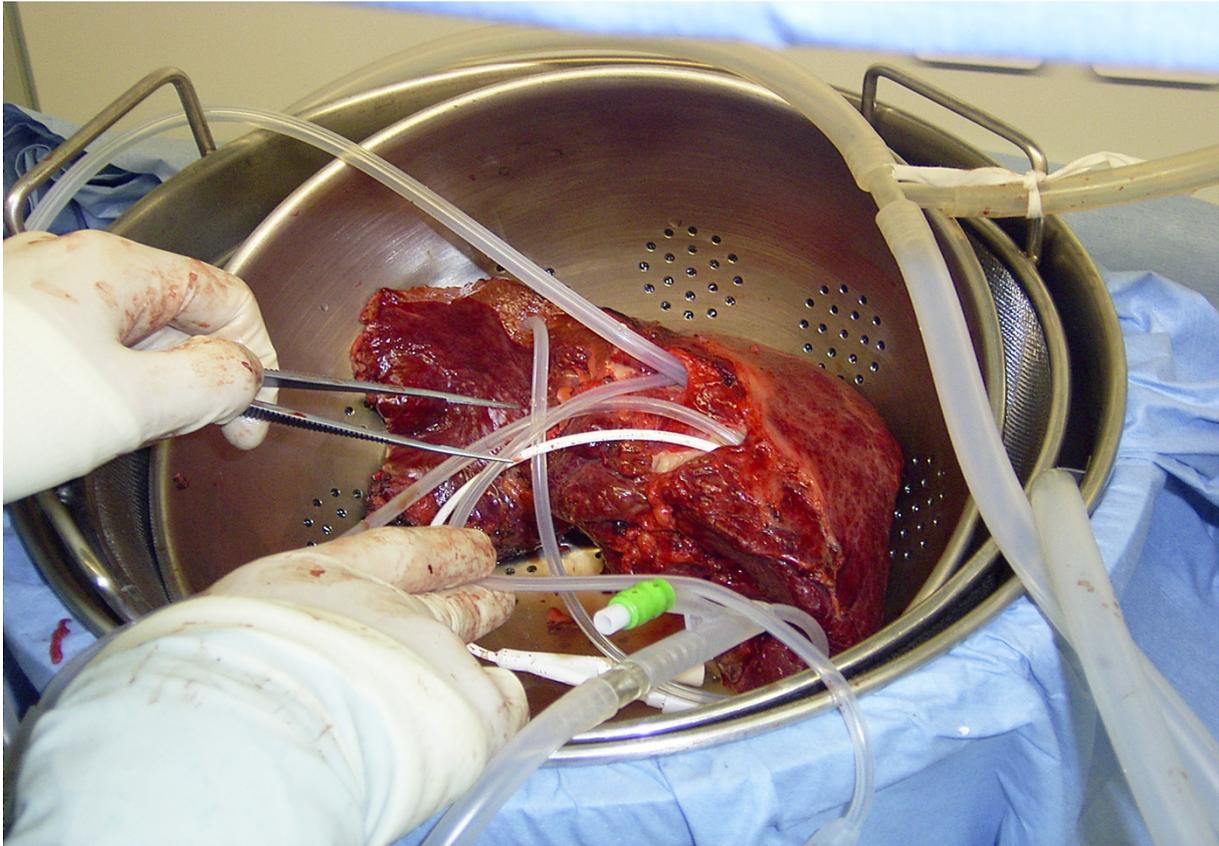


Abb. 3: Auch eine retrograde Perfusion ist durch die Katheterisierung mit Foley-Kathetern möglich. Alle für diese Arbeit genutzten Organe wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit jedoch anterograd perfundiert.

Die ineinander gestellten Siebe sind in dieser Aufnahme deutlich erkennbar. Durch den im rechten Bildrand unter dem feinen Sieb verlaufende Schlauch wird die Perfusionslösung aus der Reservoirschüssel angesaugt.

Organisatorische Voraussetzungen

Folgende organisatorische und technische Voraussetzungen mussten zur Isolierung von Leberzellen aus Ganzorganen geschaffen werden:

1. Entwicklung eines Konzeptes zur Isolierung von Leberzellen aus erkrankten Organen
2. Identifikation von in Frage kommenden Patienten anhand der Daten im Transplantationsbüro (Ausschluss von infektiösen Patienten)
3. Ständige Erreichbarkeit und 24h Verfügbarkeit des Laborteams
4. Koordination der Organentnahme mit dem Labor
5. Kurze Transportwege zwischen OP und Labor.
6. Etablierung eines auf die anatomischen Besonderheiten der erkrankten Organe zugeschnittenen Perfusionssystems.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 10 erkrankte Lebern und 12 abgelehnte Spenderorgane als Kontrollgruppe untersucht. In der Gruppe der erkrankten Organe musste ein Organ wegen unzureichender Datenerfassung von der Studie ausgeschlossen werden.

Die Spender der erkrankten Organe waren $52 \pm 6,4$ Jahre alt. Die Spender der abgelehnten Organe waren mit $60 \pm 10,8$ Jahren signifikant älter ($p=0,0175$).

In der Gruppe der erkrankten Organe konnte bei 5 Organen histologisch eine komplette Zirrhose gesichert werden. In vier weiteren Fällen wurde die Zirrhose nicht näher bezeichnet. In einem Fall lag eine Autoimmunhepatitis mit nicht näher beschriebener Zirrhose vor.

Bei den Spendern der Kontrollgruppe handelte es sich bis zur Organentnahme bedingenden Todesfeststellung um ansonsten gesunde Personen. 11 Organe aus der Kontrollgruppe wurden auf Grund von Steatose von der Transplantation ausgeschlossen. In einem Fall war die Weitervermittlung in ein anderes Transplantationszentrum auf Grund der fortgeschrittenen Ischämiezeit nicht mehr möglich.

Alle erkrankten Organe (10) stammten von männlichen Spendern. 75% der Organe der Kontrollgruppe stammten von männlichen, 25% von weiblichen Spendern.

Alle (10) erkrankten Organe wurden in University of Wisconsin (UW) Lösung (Viaspan®, Barr Laboratories Inc., Pomona, NY, USA) zum Labor transportiert. 6 (50%) Organe der Kontrollgruppe wurden ebenfalls mit UW-Lösung konserviert, 4 (33,3%) wurden mit HTK-Lösung konserviert. Bei 2 (16,7%) Organen konnte die Zusammensetzung der verwendeten Konservierungslösung nicht sicher festgestellt werden.

Der Einsatz der Foley-Katheter Perfusionsmethode stellt einen wesentlichen Bestandteil zur Reduktion der Kanülierungszeit und der damit verbundenen warmen Ischämiezeit dar ($12 \pm 5,2$ min vs. $40 \pm 14,1$ min, $p = 0,0001$). In vielen Fällen wird erst durch diese Technik der problemlose vaskuläre Zugang zu dem Organ ermöglicht. Es wurden 5 Organe mit konventionellen Kathetern kanüliert und mittels Ligatur fixiert. 10 Organe wurden mit geblockten Foley-Kathetern perfundiert.

Auch bei Flussraten von bis zu 2,3 l/min kam es, bei Verwendung eines 22ch Katheters, zu keiner Dislokation der geblockten Katheter.

Einfluss von Ischämiezeiten auf die Zellvitalität

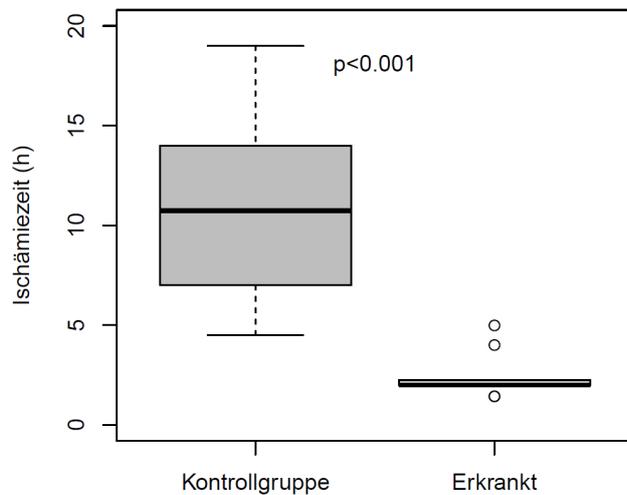


Abb. 4: Boxplot Darstellung der Ischämiezeit der Organe

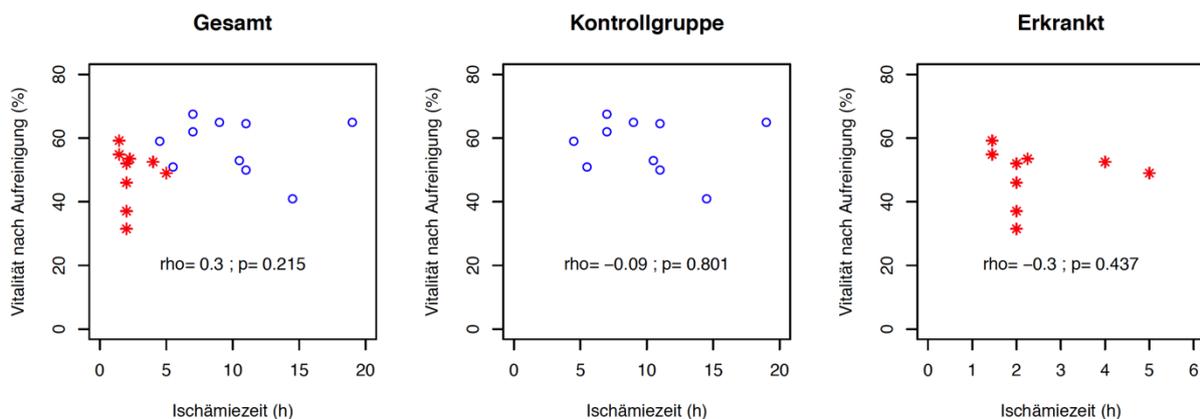


Abb. 5: Abhängigkeit zwischen Ischämiezeit und Zellvitalität nach Zellisolierung und Aufreinigung der Zellsuspension bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Als Ischämiezeit wurde die Zeit von Organexplantation bis zur Reperfusion festgelegt.

Die mittlere Ischämiezeit der erkrankten Organe war mit $2,4 \pm 1,2\text{h}$ hochsignifikant kürzer, als die der Kontrollgruppe ($10,9 \pm 4,3\text{h}$), ($p=0,00022$).

In keiner Gruppe konnte jedoch ein Einfluss der Ischämiezeit auf die Zellvitalität festgestellt werden.

Einfluss der Kollagenaseeinwirkzeit auf die Zellvitalität

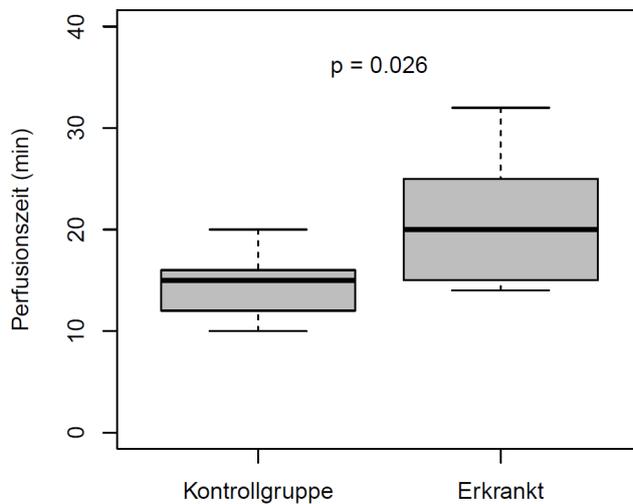


Abb. 6.: Einwirkzeit von Kollagenase bei gesunden und erkrankten Organen

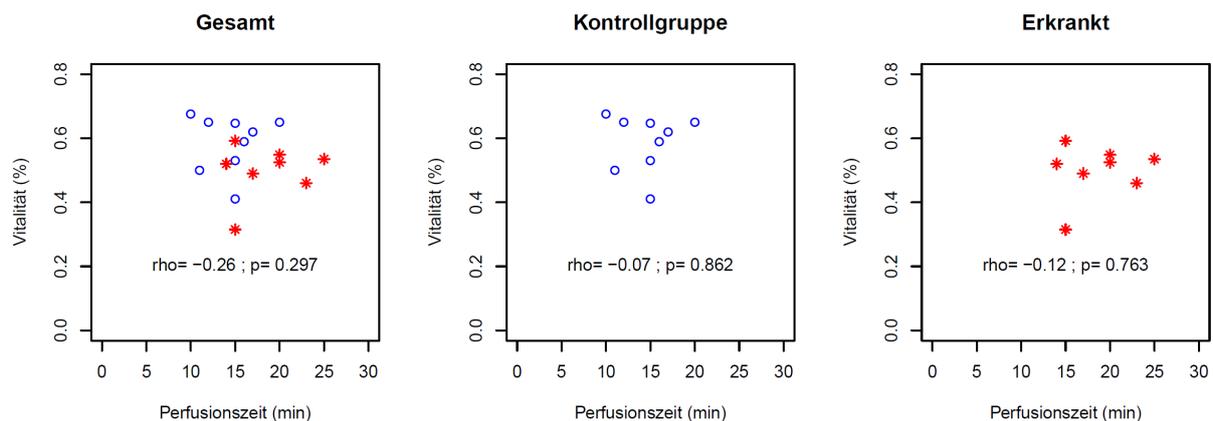


Abb. 7.: Darstellung der Zellvitalität in Abhängigkeit von der Einwirkzeit von Kollagenase bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Zur Zellsolierung war eine Kollagenaseperfusionzeit von $21,1 \pm 5,9$ min bei erkrankten Organen und $14,56 \pm 3,13$ min bei abgelehnten Spenderorganen notwendig ($p=0,026$).

Weder in der Gruppe der erkrankten Organe ($p=0,763$) noch in der Kontrollgruppe ($p=0,862$) konnte eine Abhängigkeit zwischen Kollagenaseperfusionzeit und Zellvitalität festgestellt werden.

Effektivität des Organverdaus

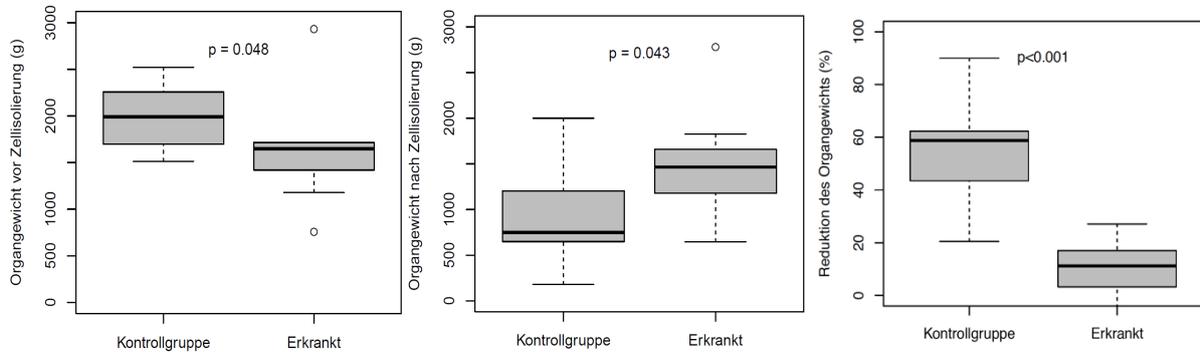


Abb. 8: Organgewicht vor Zellisolierung, sowie das Gewicht der Organüberreste nach Zellisolierung und die daraus resultierende Ausbeute dargestellt als Prozentuale Ausbeute ausgehend vom Organgewicht vor Zellisolierung (von links nach rechts)

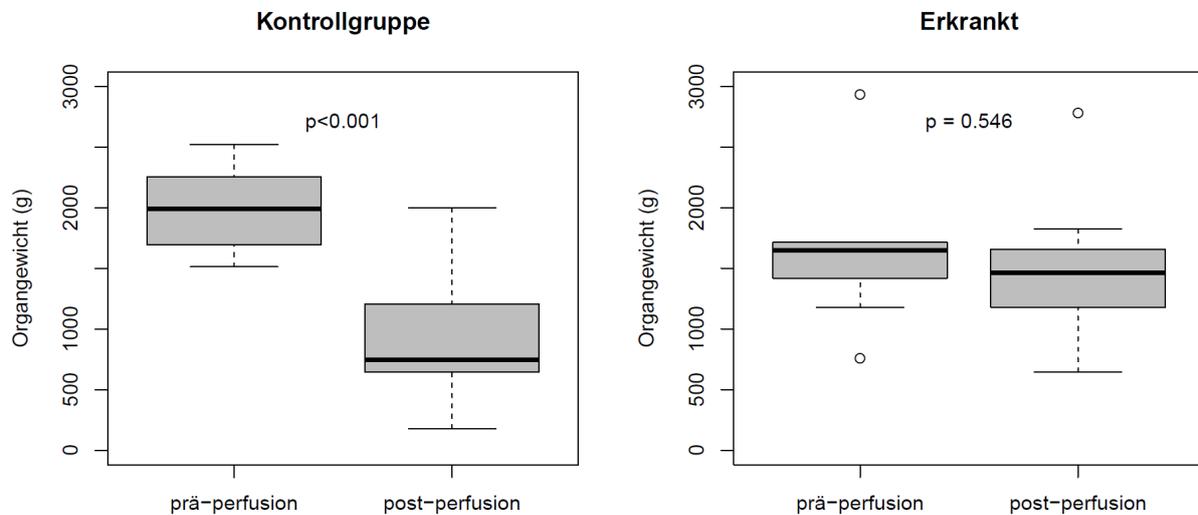


Abb. 9: Darstellung der Gewichtsunterschiede vor und nach Zellisolierung der erkrankten Organe und der Kontrollgruppe (von links nach rechts)

Die Organe der Kontrollgruppe (1963 ± 336 g) waren signifikant schwerer als die erkrankten Lebern (1621 ± 586 g) $p=0,048$. Nach Zellgewinnung war in der Kontrollgruppe (882 ± 508 g) jedoch ein signifikant **niedrigeres** Gewicht als bei den erkrankten Organen (1479 ± 606 g) festzustellen ($p=0,043$)

Das Gewicht der unverdauten Organüberreste unterschied sich in der Kontrollgruppe hochsignifikant vom Ausgangsgewicht ($p=0,0019$). Bei den erkrankten Organen war kein Unterschied festzustellen ($p=0,546$).

Bei deutlich höherem Ausgangsgewicht der Organe der Kontrollgruppe, unterscheidet sich nach enzymatischer Zersetzung das Gewicht der Organüberreste beider Gruppen kaum ($p=0,43$). Die mittlere prozentuale Gewichtsabnahme der erkrankten Organe war mit 8,8 % hochsignifikant geringer als in der Kontrollgruppe (55 %); teilweise lag das Gewicht der nicht verdauten Organanteile auch über dem Ausgangsgewicht des Ganzorgans.

Die Gewichtsspannweite der erkrankten Organe war demnach mit 2176 g vor- sowie 2135 g nach Zellisolierung sehr uneinheitlich. In der Kontrollgruppe zeigte sich bei einer Spannweite von 1009 g ein deutlich homogeneres Ausgangsgewicht. Nach Zellgewinnung betrug hier die Gewichtsspannweite 1821 g.

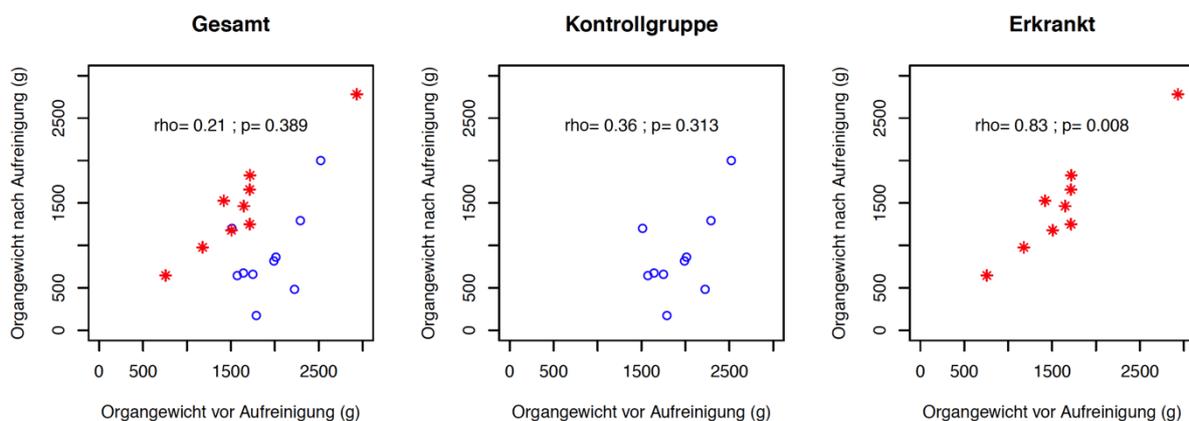


Abb. 10: Zusammenhang zwischen Organgewicht vor der Zellisolierung und dem Gewicht der Organüberreste nach Abschluss der Zellisolierung bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Bei erkrankten Organen ist ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Ausgangsgewicht der Organe und dem Gewicht der Organüberreste nach Zellisolierung zu erkennen ($p=0,008$). In der Kontrollgruppe ist dieser Zusammenhang nicht ($p= 0,313$) erkennbar.

Zusammenhang zwischen Organgewicht und Zellulärer Ausbeute

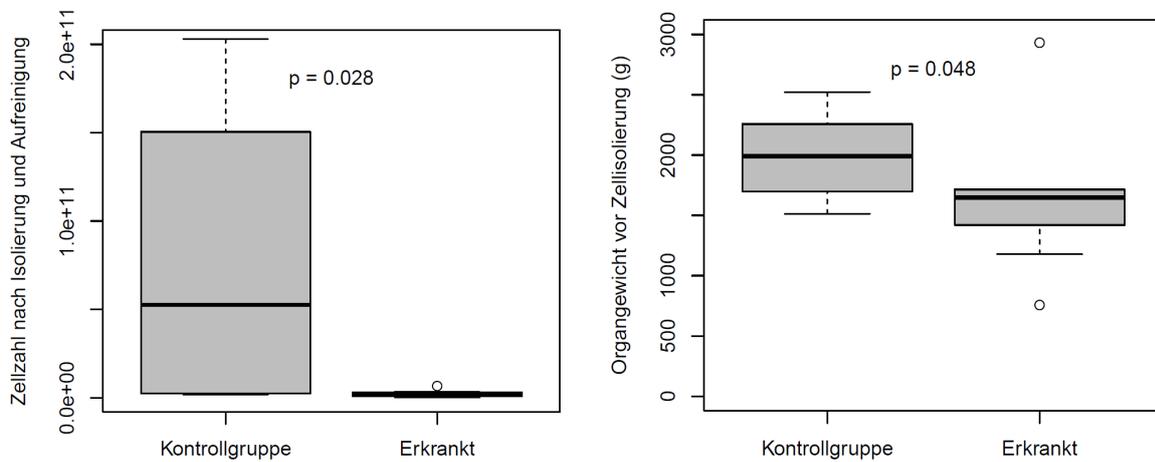


Abb. 11: Zellzahlen nach Ende der Zellisolierung, Aufreinigung und Zentrifugation der Zellsuspension verglichen mit dem Ausgangsgewicht der Organe (von links nach rechts)

Die isolierte Zellmenge war in der Gruppe der erkrankten Organe signifikant geringer ($2,33 \times 10^9 \pm 2,04 \times 10^9$) als in der Kontrollgruppe ($7,69 \times 10^{10} \pm 8,40 \times 10^{10}$), $p=0,028$. Auch das Ausgangsgewicht unterschied sich signifikant, der Unterschied war jedoch weniger stark ausgeprägt.

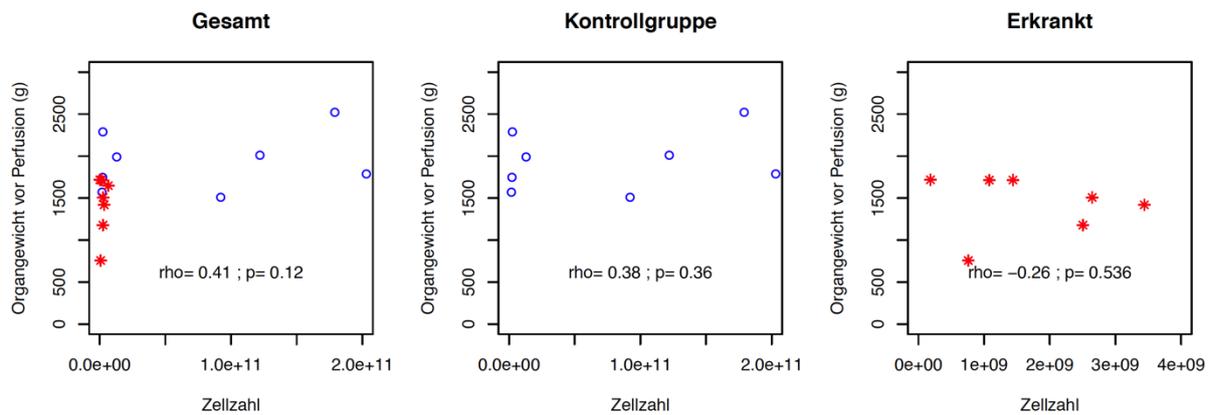


Abb. 12: Zusammenhang zwischen Organgewicht und isolierter Zellmenge bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

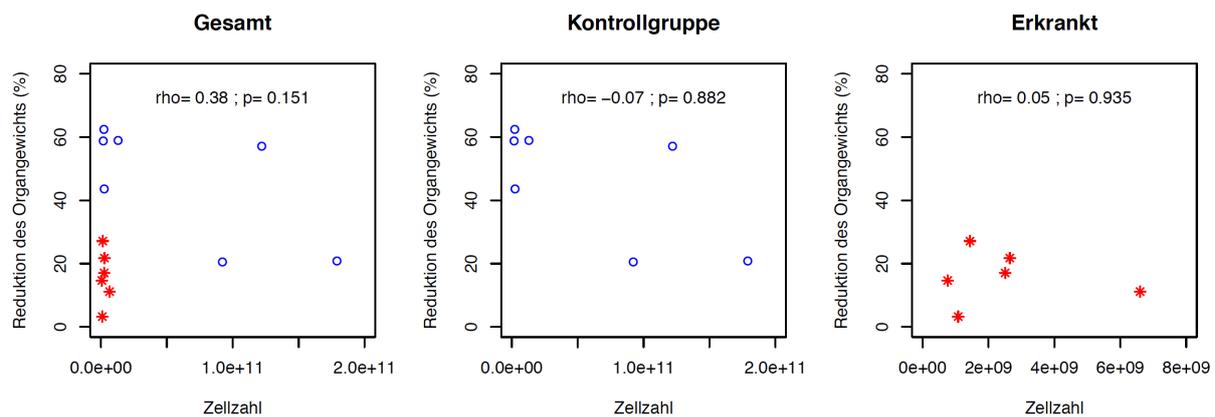


Abb. 13: Zusammenhang zwischen Zellzahl und prozentualer Abnahme des Organgewichtes, bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Interessanterweise ließ das Ausgangsgewicht der Organe, trotz vergleichbarer histopathologischer Ausgangsbefunde in den jeweiligen Gruppen, keinerlei Rückschluss auf die isolierte Zellmenge zu.

Ebenso war innerhalb der jeweiligen Gruppen kein Zusammenhang zwischen der relativen Gewichtsabnahme der Organe (vor und nach Zellisolierung) und der Zellzahl zu erkennen

Zusammenhang zwischen Organgewicht und der Menge vitaler Zellen

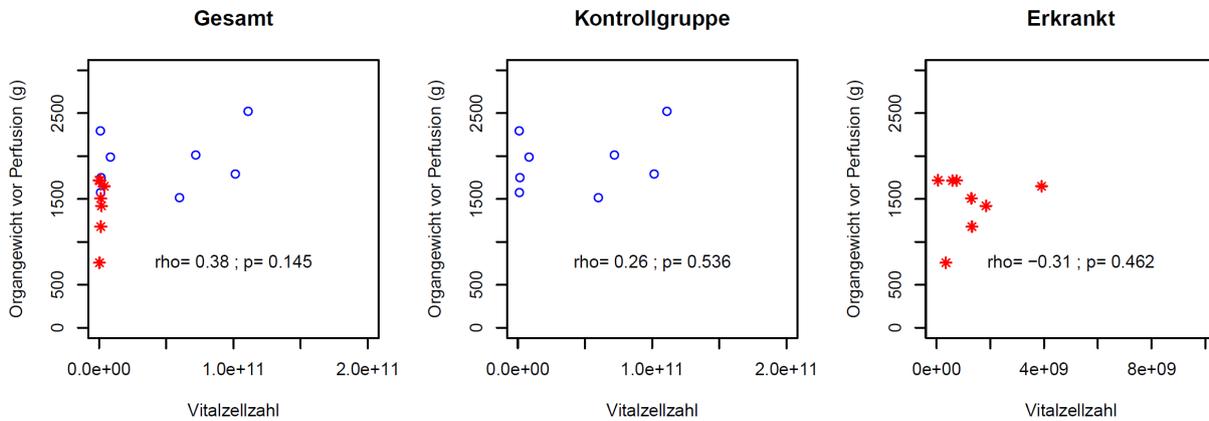


Abb. 14: Zusammenhang zwischen Organgewicht und Anzahl vitaler Zellen bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Auch bei ausschließlicher Berücksichtigung der isolierten vitalen Zellen konnte in keiner der Gruppen ein Zusammenhang zwischen Organgewicht und Vitalzellzahl abgeleitet werden.

Trotz der großen Gewichtsunterschiede der Organe und der zu erwartenden größeren Zellausbeute bei größeren Organen konnte kein Zusammenhang zwischen Organgewicht und Zellzahl festgestellt werden. Darüber hinaus bestand kein Zusammenhang zwischen der Anzahl vitaler Zellen und dem Ausgangsgewicht der Organe.

Veränderung der Zellvitalität durch Aufreinigung der Zellsuspension

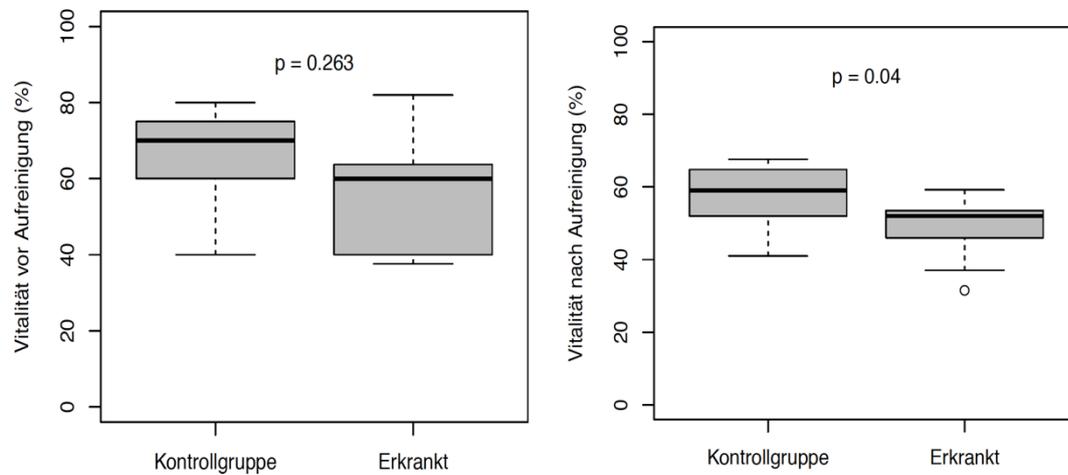


Abb. 15: Veränderung der Zellvitalität durch Aufreinigung der Zellsuspension nach Zellisolierung.

Die Vitalität der isolierten Leberzellen war bei erkrankten Lebern ($57 \pm 16\%$) zunächst nicht signifikant niedriger als bei abgelehnten Spenderorganen ($66 \pm 13\%$), ($p=0,26$). Nach den beschriebenen Waschsritten sank die Vitalität in beiden Gruppen um etwa 10% auf $48 \pm 9\%$ (erkrankte Organe) bzw. $56 \pm 12\%$ in der Kontrollgruppe ($p = 0,04$) und zeigte nun einen signifikanten Unterschied. Auch die Spannweite verkleinerte sich deutlich von 44% (erkrankte Organe) bzw. 40% (Kontrollgruppe) auf 28% bzw. 27%.

Zellzahl / Zellvitalität

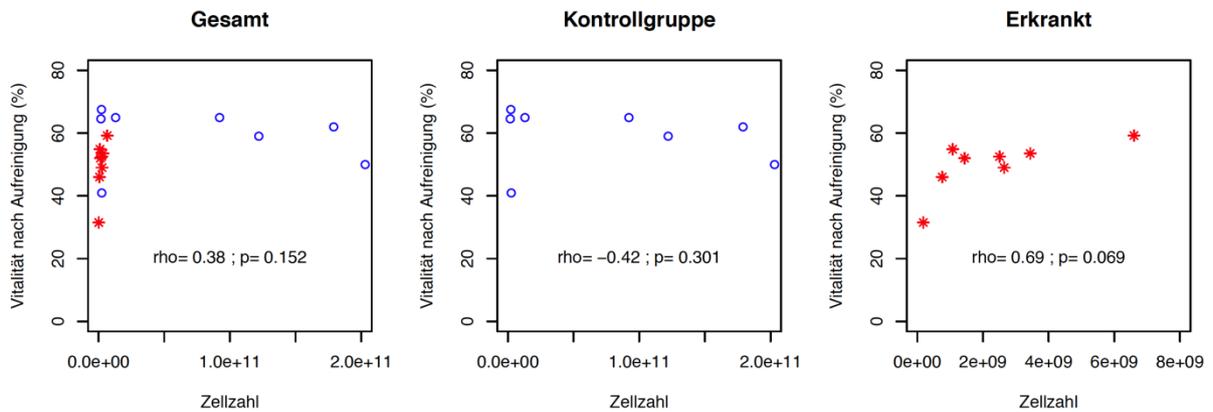


Abb. 16: Zusammenhang zwischen Zellzahl und Zellvitalität bei gesunden (blau) und erkrankten Organen (rot).

Bei erkrankten Organen schien ein Zusammenhang zwischen der Zellvitalität und Gesamtzellzahl zu bestehen ($p=0,069$). In der Kontrollgruppe bestand dieser Zusammenhang nicht ($p=0,3$).

Zellpelletvolumen und Vitalzellzahl

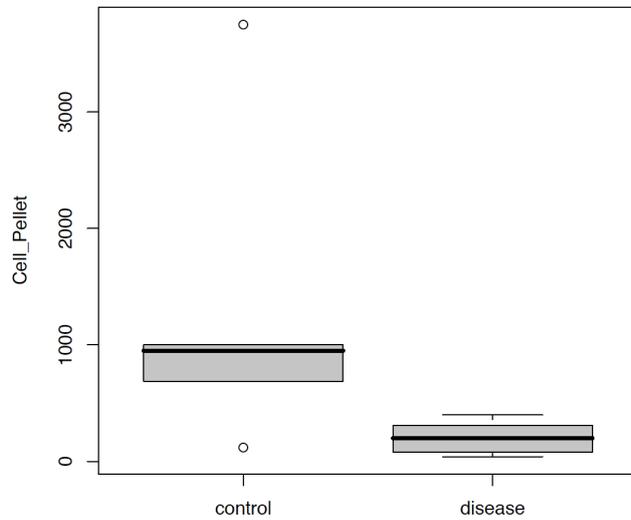


Abb. 17: Volumen des Zellpellets nach Aufreinigung und Zentrifugation (85g)

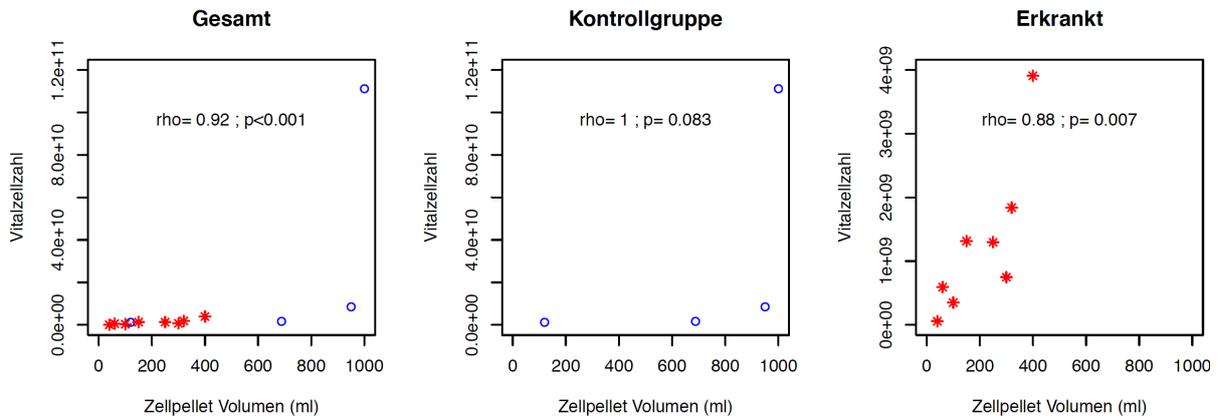


Abb. 18: Zusammenhang zwischen der Anzahl vitaler Zellen und dem Volumen der Zellsuspension nach Aufreinigung und Zentrifugation (85g) bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Das Zellpelletvolumen wurde definiert als das Volumen der Zellsuspension nach dreimaligem Waschen mit PBS-Lösung und Zentrifugation mit 85·g.

Das Volumen des Zellpellets bei erkrankten Organen war mit 202,5ml ± 133,4 ml signifikant (p=0,03) kleiner, als das der Kontrollgruppe mit 1301,6ml ± 1412,6 ml.

In der Gruppe der erkrankten Organe ein Zusammenhang zwischen dem Volumen des Zellpellets und der Menge vitaler Zellen festzustellen (p=0,0072). In der

Kontrollgruppe war lediglich eine Tendenz ($p=0,083$) festzustellen, allerdings war auf Grund von Dokumentations- und Abnahmefehlern, die Stichprobenzahl mit $n=4$ hier sehr gering.

pH Werte im Isolierungsverlauf

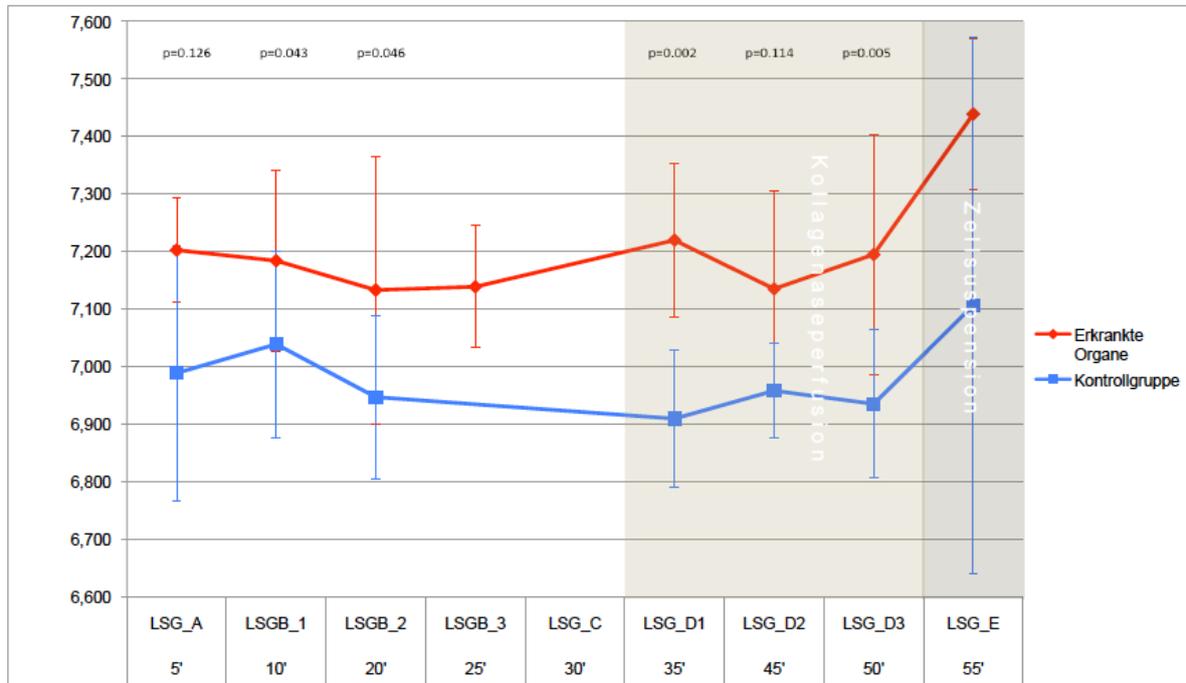


Abb. 19: pH-Werte der Isolierungslösungen im Isolierungsverlauf. P-Werte im oberen Bereich der Grafik. Kurvenverlauf als Mittelwertangaben \pm Standardabweichung.

Im Isolierungsverlauf war der pH Wert erkrankter Organen mit Ausnahme von Proben aus LSG A und LSG D2 signifikant (p-Werte im oberen Abschnitt der Grafik) höher als in der Kontrollgruppe.

Zur Korrektur von pH Werten unter 7,0 wurde bei 5 von 10 erkrankten Organen (50%) sowie bei 10 von 12 Organen der Kontrollgruppe (83,3%) Natriumbicarbonat supplementiert.

Während der Perfusion mit LSG B wurden in der Gruppe der erkrankten Organe zur Einstellung des pH Wertes über 7,0 durchschnittlich 19ml Natriumbicarbonat supplementiert. In der Kontrollgruppe mußten zum Erreichen eines pH über 7,0 im Mittel 30ml Natriumbicarbonat supplementiert werden.

Während der Perfusion mit LSG D wurden durchschnittlich 14ml NaHCO_3 -supplementiert. In der Kontrollgruppe wurden während desselben Perfusionschritt 22ml benötigt.

pO₂ und pCO₂ im Isolierungsverlauf

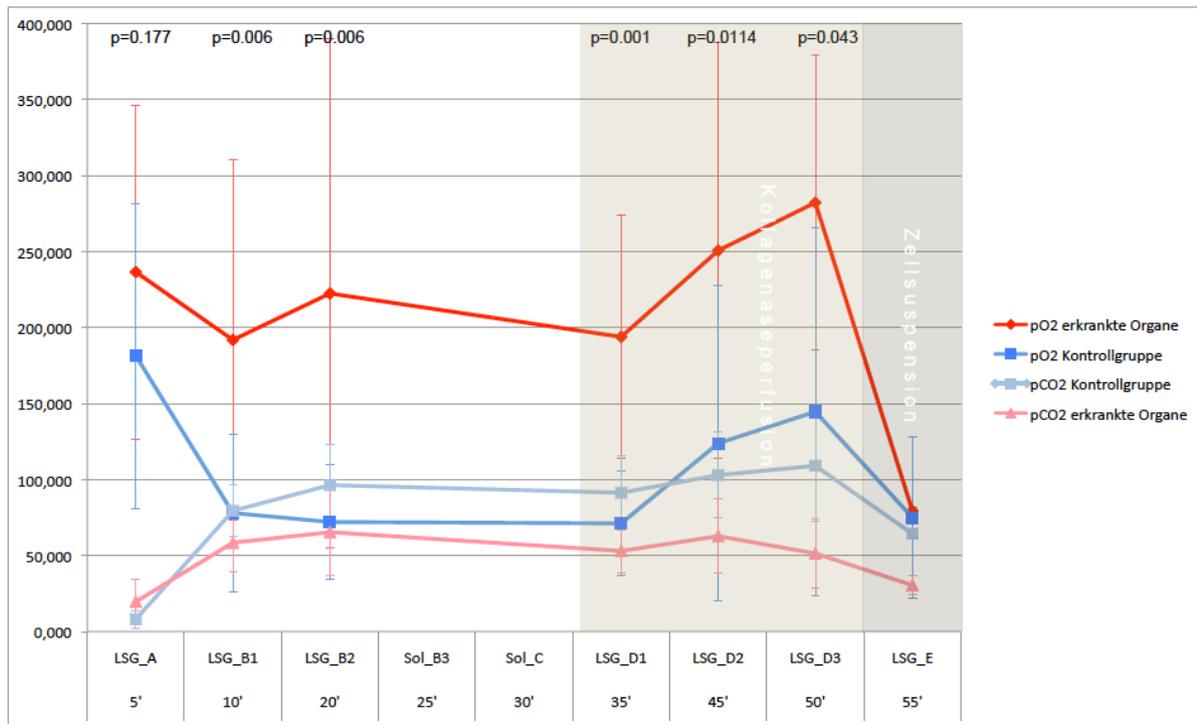


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der O₂ und CO₂ Partialdrücke während der Organperfusion. p-Werte der Sauerstoffpartialdrücke im oberen Bereich der Grafik angegeben. Kurvenverlauf als Mittelwertangaben ± Standardabweichung.

In Abb. 20 ist der zeitliche Verlauf von pCO₂ und pO₂ aufgetragen. Auffallend ist ein Anstieg des pCO₂ sowie insbesondere des pO₂ während der Kollagenaseperfusion. Im nahezu gesamten Perfusionsverlauf waren die pO₂ Werte der erkrankten Organe signifikant höher (p-Werte im oberen Abschnitt der Grafik).

Der Unterschied der CO₂ Werte fiel vergleichsweise geringer aus.

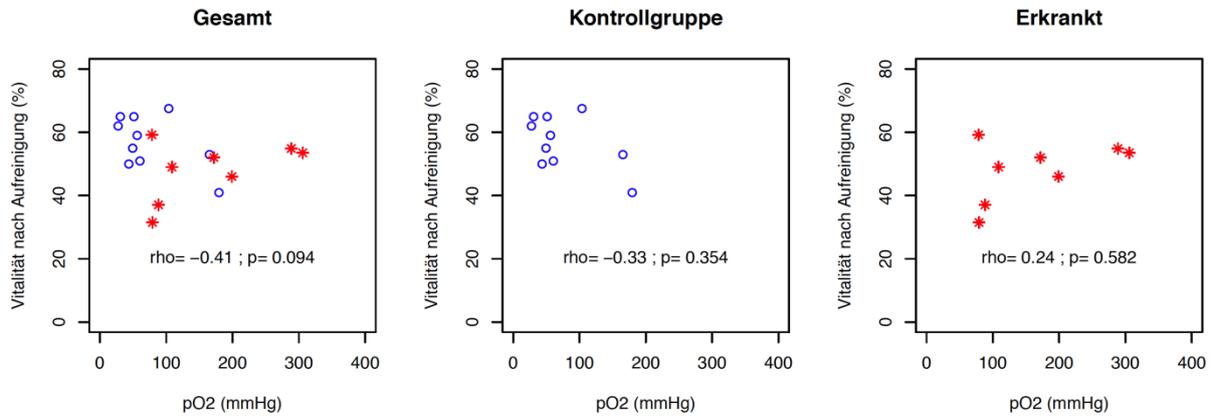
Nach Beendigung der Organperfusion kam es zu einem deutlichen Abfall des pO₂. Analog zum Verlauf der Sauerstoffpartialdrücke kam es während der Kollagenaseperfusion zu einem Anstieg der CO₂ Konzentration, die nach Beendigung des Verdauens und Abkühlens der Zellsuspension deutlich abfiel.

Auffallend war der niedrige AusgangspCO₂ der Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf stieg in beiden Gruppen der pCO₂ insbesondere während der Kollagenaseperfusion

zunächst an und fiel nach Beendigung des Kollagenaseverdaus deutlich ab, blieb jedoch über dem Ausgangsniveau.

Zusammenhang zwischen Zellvitalität und Sauerstoffpartialdruck

Vitalität und SpO₂ während der Perfusion mit Lösung B



Vitalität und SpO₂ während der Perfusion mit Kollagenase

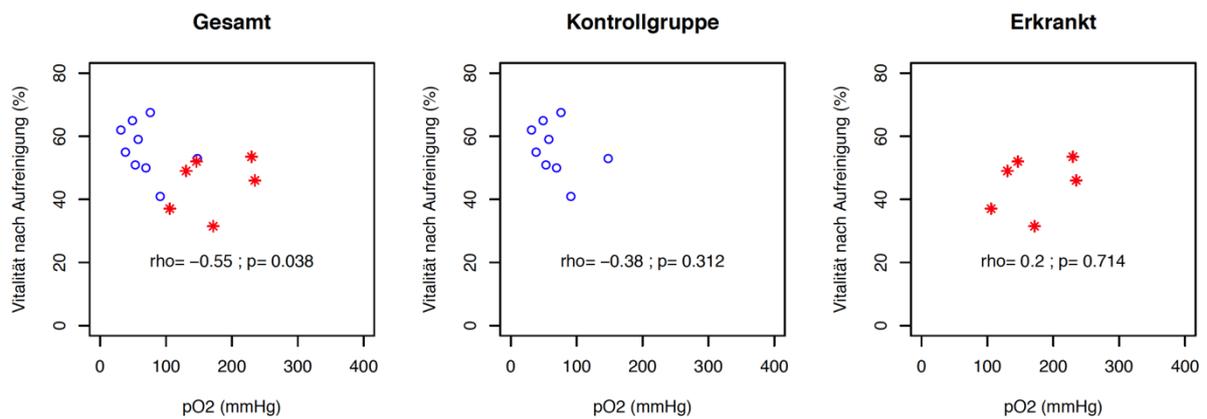


Abb. 21: Zusammenhang zwischen Zellvitalität und Sauerstoffpartialdruck während der Perfusion mit kollagenasefreier Perfusionsflüssigkeit – ca. 15min nach (blutfreier) Reperfusion im Labor (obere Reihe), sowie während Kollagenaseperfusion, ca. 40min nach Reperfusion (untere Reihe) bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Die während der Zellisolierung in den Perfusionsflüssigkeiten gemessenen Sauerstoffpartialdrücke ließen keinen Rückschluss auf die zu erwartende Zellvitalität zu.

Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck und Vitalzellzahl

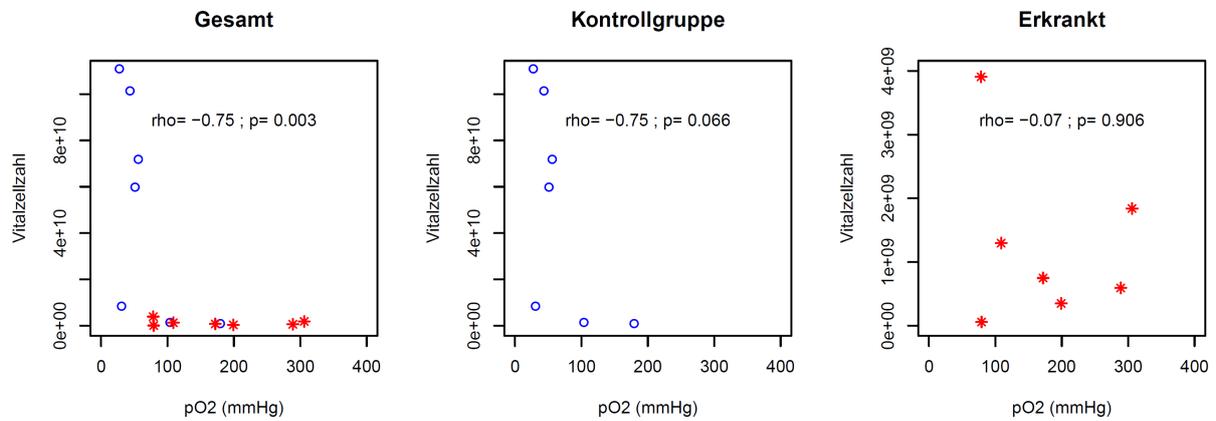


Abb. 22: Beziehung zwischen der nach Isolierung gemessenen Zahl vitaler Zellen und Sauerstoffpartialdruck während der Perfusion mit kollagenasefreier Perfusionslösung, ca. 15 min nach (blutfreier) Reperfusion im Labor bei gesunden (blau) und erkrankten (rot) Organen.

Bei ausschließlicher Berücksichtigung vitaler Zellen zeigt sich in der Kontrollgruppe ein tendenzieller Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck und Anzahl der vitalen Zellen nach Ende der Zellisolierung. Dieser Zusammenhang ist bei erkrankten Organen nicht erkennbar.

Diskussion und Ausblick

Leberzellschädigung durch unzureichende Konservierung

In der Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die Isolierung vitaler Leberzellen mittels fünfstufiger Perfusionsmethode aus erkrankten, während einer Lebertransplantation explantierten Ganzorganen, unter Berücksichtigung der organspezifischen Besonderheiten prinzipiell möglich ist.

Die erkrankten Organe wurden direkt im Operationsaal in Empfang genommen und im Labor weiterverarbeitet, eine Perfusion mit Konservierungslösung erfolgte nicht. Die Organe der Kontrollgruppe wurden unserem Labor, nach Ausschluss vom Transplantationsprogramm seitens der DSO zugeteilt und waren seitens des Explantationsteams bereits mit Konservierungslösungen behandelt. Aus logistischen und technischen Gründen konnte in der Gruppe der erkrankten Organe keine Perfusion mit Konservierungslösungen durchgeführt werden.

Mit Beenden der Organperfusion kommt es rasch zu einer O₂-Unterversorgung des Transplantats bzw. Explantats. Bei abnehmender Sauerstoffkonzentration bedarf es zur Aufrechterhaltung des Energiebedarfs einer Steigerung der anaeroben Glycolyse, die jedoch zur Produktion äquivalenter ATP Mengen, ca. 19x mehr Glucose benötigt, als die aerobe Glycolyse. Hierdurch kommt es schnell zu einer Abnahme der Glucosekonzentration. Infolge der energetischen Minderversorgung kommt es im weiteren Verlauf zu einem Ausfall der ATP-abhängigen Ionenpumpen und somit zu einem Verlust der Zellmembranpolarität. Einströmendes Natrium kann nicht mehr aus der Zelle befördert werden, das intrazelluläre Ödem nimmt zu und die Zellintegrität bricht schließlich zusammen. Eine bis heute durchgeführte Maßnahme besteht im Kühlen des Organs zur Reduktion der metabolischen Aktivität. Dennoch kommt es auch bei Hypothermie rasch zur Akkumulation saurer Metabolite, einer Erschöpfung der Energiereserven und einer Ausbildung von intrazellulärem Ödem. Diese Einschränkungen führten 1988 zur Entwicklung der University of Wisconsin Lösung (UW-Lösung), die bis heute in der Lebertransplantationschirurgie Anwendung findet¹⁶. Diese damals neuartigen Konservierungslösungen, basieren auf nicht resorbierbaren, körperfremden Zuckermolekülen, Raffinose und Laktobionsäure, zur Sicherstellung des extrazellulären osmotischen Drucks, sowie auf Hydroxyethylstärke zur Vermeidung von interstitiellen Ödemen.¹⁷ Hierdurch wird eine intrazelluläre Akkumulation von Wasser infolge der eingeschränkten

Barrierefunktion unter hypothermen Bedingungen und hierdurch hervorgerufenem Minimalstoffwechsel verhindert. Darüber hinaus sind diese Lösungen mit Adenosin, Glutathion und Allopurinol supplementiert, die als Antioxidantien das Auftreten freier Radikale verhindern sollen.

Die Entwicklung der UW-Lösung erlaubte somit erstmalig längere kalte Ischämiezeiten.

Die Überlegenheit der UW-Lösung verglichen mit Kochsalzlösungen oder Euro-Collins Konservierungslösung ist hinreichend bekannt.^{18,19}

Nach Explantation erfolgte in dem hier beschriebenen experimentellen Ansatz bis zur Reperfusion im Labor keinerlei Perfusion der erkrankten Organe mit Konservierungslösungen.

Der positive Effekt der Konservierungslösungen HTK und UW auf die Ischämietoleranz gegenüber der Anwendung von Kochsalzlösung oder Phosphat-Gepufferter Kochsalzlösung (PBS) ist auch bei einer Ischämiedauer von nur wenigen Minuten hinreichend belegt.^{20,21} Die Vitalität der aus erkrankten Organen isolierten Zellen war nach Aufreinigung mit 48% signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (58%, $p=0,041$). Diese Differenz zur Kontrollgruppe ist zumindest teilweise die Folge einer Zellschädigung der nicht perfundierten Organe durch Entstehung von Sauerstoffradikalen aus Blutbestandteile wie Hämoglobin. In zukünftigen Studien sollte nach einer Perfusion der erkrankten Organe mit Konservierungslösung mit einer Steigerung der Zellvitalität zu rechnen sein.

Konservierungslösungen

Die Auswirkung von Konservierungslösungen auf das Transplantationsergebnis war bisher ein wichtiger Fokus der Transplantationsforschung. In einigen Studien zeigte sich eine nicht signifikant geringere Häufigkeit von primärer Nichtfunktion des Transplantats in der HTK-Gruppe²², darüber hinaus zeigten sich in den meisten anderen klinischen Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen UW und HTK behandelten Organen, bzw. keine eindeutigen Ergebnisse.^{23,24,25,26} Auf Grund dieser uneindeutigen Datenlage wurden die Organe unabhängig von der benutzten Konservierungslösung in die Studie eingeschlossen.

Hemmung der Kollagenaseaktivität durch UW-Lösung

Eine (partielle) Hemmung der Kollagenaseaktivität durch UW-Konservierungslösung ist in einigen Studien beschrieben worden.²⁷ Da im hier dargestellten experimentellen Ansatz versucht wurde, die Verdauezeit an den Verdaufortschritt anzupassen, ist nicht von einem nennenswerten Einfluss der UW-Lösung auf den Isolierungserfolg auszugehen. Inwieweit sich die verlängerte Einwirkzeit, der ggf. minderwirksamen Kollagenase auch auf die Zellvitalität oder die Zellfunktion auswirkt, bleibt unklar.

Kollagenaseaktivität / Verdau

Eine Abnahme des Lebergewichts einhergehend mit reduzierter metabolischer Aktivität bedingt durch eine Abnahme der am Leberstoffwechsel beteiligten Zellen ist ein allgemein bekannter Prozess bei fortschreitender Zirrhose oder Fibrose.

Erwartungsgemäß war folglich in der Kontrollgruppe bei signifikant höherem Ausgangsgewicht eine signifikant höhere Zellausbeute feststellbar (**Abb. 8 + 9**).

Daher waren die Annahmen naheliegend, dass

- a. ein geringes Ausgangsgewicht der Organe eine geringe Zellmenge zur Folge haben müsste und
- b. ein hohes Organausgangsgewicht zu einer höheren Masse der Organüberreste nach Zellisolierung führen sollte.

Tatsächlich zeigte sich bei den erkrankten Organen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Organgewicht vor - und nach Zellisolierung und legte zumindest einen Zusammenhang zwischen Organgewicht und Zellausbeute nahe.

Dennoch spiegelt sich die lineare Beziehung zwischen Prä- und Postperfusionsgewichts (**Abb. 10**) der erkrankten Organe nicht in einem linearen Anstieg der Zellausbeute wider (**Abb. 10, 12-14**). In der Kontrollgruppe konnte für keinen dieser Parameter ein Zusammenhang festgestellt werden. Das Organgewicht lässt folglich weder innerhalb der Kontrollgruppe, noch innerhalb der Gruppe der erkrankten Organe einen Rückschluss auf die zu erwartende Zellmenge oder die Anzahl vitaler Zellen zu (**Abb. 12-14**).

Insbesondere im Hinblick auf die Kontrollgruppe erstaunt dieses Ergebnis, da diese Organe von primär Lebergesunden Spendern stammen.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde für beide Gruppen die gleiche Kollagenasekonzentration benutzt. Eines der Hauptprobleme stellte die Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für die Beendigung des Kollagenaseverdaus dar. Während der Perfusion war regelmäßig eine Zunahme der Organgröße zu erkennen, die bei erkrankten Organen deutlich ausgeprägter war. In einigen Fällen wiesen die Organüberreste nach erfolgreicher Isolierung von Zellen ein höheres Gewicht auf als vor Perfusionsbeginn (**Abb. 9**).

Als eine der Ursachen hierfür kommt der im ersten Schritt des 5-stufigen Isolierungsverfahrens vorgesehene Entzug von Ca^{2+} und Mg^{2+} mittels EDTA in Frage. Ziel dieses Verfahrensschrittes ist, die Kollagenfasern durch Entzug dieser für die Integrität der Kollagenstruktur wichtigen Moleküle aufzulockern und den Kollagenabbau mittels Kollagenase zu erleichtern.

Der EDTA vermittelte Ca^{2+} Entzug leistet darüber hinaus einen wesentlichen Beitrag zur Lösung der (kollagenvermittelten) desmosomalen interzellulären Bindungen.²⁸ Hierdurch kommt es zu einer zunehmenden interstitiellen Wasseransammlung, woraus nach Verdau ein höheres Restorgangewicht resultieren könnte. Bedingt durch den höheren Kollagenanteil zirrhotischer Lebern wird dieser Effekt zusätzlich verstärkt. In Folge des ausgeprägten Ödems ist nun die taktile Bestimmung des Zeitpunkts zur Beendigung des Kollagenaseverdaus erschwert, so dass die tatsächliche Verdauzeit nicht korrekt eingeschätzt werden kann. In den meisten Fällen wurde der Kollagenaseverdau ohne einen aussagekräftigen Tastbefund beendet, ein unzureichender Verdau ist somit sehr wahrscheinlich.

Das interstitielle Ödem führt darüber hinaus zu einer Zunahme des Verteilungsvolumens der Kollagenase und der während der enzymatischen Zersetzung stöchiometrisch zugesetzten essentiellen Kollagenasekofaktoren Ca^{2+} und Mg^{2+} und somit zusätzlich zu einer Reduktion der Kollagenaseaktivität.

Sedar et al. konnten bereits 1964 zeigen, dass der EDTA vermittelte Entzug von Ca^{2+} aus der Kollagenmatrix unter Calciumsubstitution reversibel ist, so dass von einer nennenswerten Ca^{2+} Bindung an frei gewordene Desmosomale- sowie an Kollagenbindungsstellen während der Perfusion mit Kollagenase- und Calciumhaltiger Lösung auszugehen ist und Ca^{2+} nun nicht mehr in ausreichender Menge als Kofaktor der Kollagenase zur Verfügung stehen könnte.

Ein Beleg für diese Annahme manifestiert sich insbesondere in nahezu unveränderten Gewichtsverläufen vor und nach Zellisolierung der erkrankten Organe,

mit naturgemäß deutlich höherem Kollagenanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 9**).

In weiteren Studien sollte die Kalziumkonzentration während des gesamten Isolierungsverlaufs überwacht werden, um den tatsächlichen Substitutionsbedarf zu ermitteln und den Organverdau zu verbessern.

In beiden Gruppen muss zusammenfassend von einer unzureichenden Organersetzung ausgegangen werden, wodurch die fehlende Beziehung zwischen Organgewicht und Zellausbeute erklärt werden kann (**Abb. 12 + 14**). Ein entsprechender Zusammenhang wäre jedoch zumindest für die von primär Lebergesunden Spendern stammenden Organe der Kontrollgruppe zu erwarten gewesen.

Auch die fehlende Korrelation zwischen prozentualer Gewichtsabnahme des Organs im Verlauf der Zellisolierung und der Zellausbeute unterstreicht die Hypothese des unzureichenden Organverdaus (**Abb. 13**). Interessanterweise fällt bei den erkrankten Organen diese (mutmaßlich) unzureichende enzymatische Zersetzung gleichbleibend aus (**Abb.10**): ein hohes Ausgangsgewicht führt zu einem großen Gewicht der unverdauten Organbestandteile. Auffallend ist jedoch, dass sich in der Kontrollgruppe ($p=0,313$) keinerlei Zusammenhang darstellt, obwohl hier von deutlich gesünderen Organen ausgegangen werden kann. Als Ursache kommt die im Verhältnis zum Organgewicht negativ-lineare Veränderung des Kollagenanteils der erkrankten zirrhotischen Organe in Frage:

Bei allen erkrankten Organen handelte es sich um eine histopathologisch gesicherte Leberzirrhose, die mit einem weitestgehenden fibrotischen Umbau des Organs einhergeht. Somit ist bei den Gewichtsunterschieden zwischen erkrankten Organen von nahezu linearen Veränderungen der absoluten Kollagenmenge auszugehen, was sich letztlich in einer klaren Korrelation ($p=0,08$) zwischen Ausgangs- und Endgewicht zeigt. Da keine histopathologischen Befunde der Kontrollorgane vorliegen, diese allerdings nach Überschreiten der Zeitgrenze oder nach visueller Untersuchung und der makroskopischen Diagnose einer Leberfibrose durch den Transplantationschirurgen abgelehnt wurden, handelt es sich bei dieser Gruppe, trotz primär gesunder Spender, um eine deutlich inhomogenere Gruppe, wodurch sich eine stärkere Streuung der Daten erklärt. Es zeigt sich durch die signifikant höhere Zellausbeute ($p=0,028$) sowie insbesondere in einer signifikant stärkeren

Gewichtsreduktion im Isolierungsverlauf in Höhe von 60% vs. 15% ($p=0.001$ vs. $p=0.546$) ein deutlich effektiverer Verdau des Organs (**Abb. 8, 9, 11**). Dennoch ist keinerlei lineare Beziehung zwischen Organgewicht vor und Organgewicht nach Aufbereitung zu erkennen. Eine mögliche Erklärung muss im Bereich eines unzureichenden Verdaus gesucht werden. Denkbar ist, wie aus Histopathologischen Untersuchungen bekannt, eine unterschiedliche Ausprägung der Leberfibrose bzw. Steatose und der damit einhergehenden uneinheitlichen Vaskularisierung²⁹ der Organe, bzw. die hieraus resultierenden Fibrosegrade. Hieraus könnte eine unzureichende Perfusion einzelner Leberareale oder ein unzureichender Verdau resultieren.

Auch in der Gruppe der erkrankten Organe zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Organgewicht und Zellausbeute; unklar bleibt daher wie sich die lineare Beziehung zwischen Organgewicht prä- und post Isolation vor dem Hintergrund der im Verhältnis zum Organgewicht nicht ansteigenden Zellausbeute erklärt.

Nach Beenden der Zellisolierung wird die Zellzahl und die Vitalität der isolierten Zellen mittels Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer gemessen; eine korrekte Zellzählung setzt jedoch bei avitalen Zellen eine zumindest noch mikroskopisch erkennbare Zellstruktur voraus, Zellbestandteile, z.B. lose Membranstrukturen können hier selbstverständlich nicht mitgezählt werden, jedoch konnten diese in beiden Gruppen gefunden werden. Ursächlich für die nicht mit dem Organgewicht ansteigende Zellzahl könnte somit eine kollagenasebedingte Zerstörung und weitestgehender Verdau bereits vorgeschädigter Zellen sein. Unklar bliebe allerdings weiter, wie es bei schwereren Organen zu einem höheren Anteil zerstörter Zellen käme.

Zur Optimierung der Zellisolierung könnte in zukünftigen Studien die Thermodilution eingesetzt werden, ein in der Intensivmedizin zur Ermittlung von extravaskulärem Lungenwasser und Volumenhaushalt von Patienten weitestgehend etabliertes Verfahren. Eine Messung der extrazellulären Wassermenge des Organs ließe analog zur intensivmedizinischen Ermittlung des extravaskulären Lungenwassers einen Rückschluss auf den extrazellulären Wassergehalt der Organe zu. In weiteren Versuchsreihen könnte die dem extrazellulärem Ödem entsprechende Menge Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie ggf. Kollagenase zugesetzt werden, um den Verdau zu verbessern.

Alternativ könnte das zunehmende interstitielle Volumen durch Volumenbestimmung der verworfenen Perfusionslösungen bestimmt und die Kollagenasekonzentration entsprechend angepasst werden. Da dieses Verfahren jedoch ein Ablassen der Perfusionslösungen voraussetzt und das Anmischen sowie die Sterilfiltration der Kollagenaselösungen zeitaufwendig ist, würde die Isolierungszeit und die Hypoxieperioden zwischen den einzelnen Perfusionsschritten unnötig verlängert.

In unserem experimentellen Ansatz wurde für alle Zellisolierungen nicht aufgereinigte Kollagenase („crude collagenase“, Collagenase P, Roche) verwendet, worin Trypsin- und Clostriapin- (Protease-) Aktivität nachgewiesen werden können.

Neutrale Protease weist in Kombination mit Kollagenase eine synergistische Aktivität auf³⁰ und scheint in unserem experimentellen Ansatz eine essentielle Rolle zu spielen. Eigene, unveröffentlichte Versuche deuten darauf hin, dass eine Isolierung von Leberzellen mit hochaufgereinigter Kollagenase ohne den Zusatz von neutraler Protease nicht möglich ist.

Unklarheit besteht bezüglich der korrekten Dosierung der mit Kollagenase synergistisch wirksamen neutralen Protease. Höhere Dosierungen von neutraler Protease können zu Schädigungen der Mikrovilli und letztlich zum Zelluntergang führen. Trypsin findet aus selbigem Grund keine Anwendung als ausschließliches proteolytisches Agens. Selbst hochaufgereinigte Kollagenasen mit stöchiometrisch zugesetzter neutraler Protease zeigt jedoch interessanterweise eine geringere proteolytische Aktivität. In zukünftigen Studien sollten Dosisfindungsversuche zur Optimierung des Kollagenverdaus beitragen. Darüber hinaus eröffnen neue Kollagenasen, wie Kiwi- Actinidin hier interessante Perspektiven.³¹

Befürchtungen bezüglich einer Zellschädigung durch verlängerte Kollagenaseeinwirkzeiten konnten nicht erhärtet werden (**Abb. 7**). Weder in der Gruppe der erkrankten Organe noch in der Kontrollgruppe war ein Einfluss der Kollagenaseeinwirkzeit auf die Vitalität feststellbar. Es konnte somit deutlich gezeigt werden, dass der Einfluss des enzymatischen Verdaus auf die Zellvitalität höchstwahrscheinlich überschätzt wird und in Zukunft eine längere enzymatische Zersetzung durchgeführt werden sollte. Unklar bleibt, inwieweit Schädigungen der zellulären Membranstruktur zu einem hier nicht erfassten, verzögerten Zelluntergang führen, sowie für eine Beeinträchtigung der Adhäsionsfähigkeit verantwortlich sein

könnten. Diese Veränderung könnte für den konsekutiven Zelluntergang infolge unzureichender Adhäsion an Oberflächen verantwortlich sein und Teil der häufig beobachteten Probleme bei Monolayerkulturen von primären humanen Leberzellen widerspiegeln, bei denen meist nach wenigen Tagen eine unzureichende Adhärenz mit entsprechendem Zelluntergang zu beobachten ist.

Verlauf des pO_2 , pCO_2 und des pH

Die Organe beider Gruppen wurden in gekühlter Konservierungslösung und auf Eis transportiert. Eine mehrere Stunden dauernde Kälteexposition führt zwangsläufig zu einem starken Absinken der metabolischen Aktivität.³² Der in LSG A gemessene niedrige pCO_2 und erhöhte pO_2 spiegelt folglich die noch erniedrigte metabolische Aktivität und den hierdurch bedingten verringerten Sauerstoffverbrauch kurz nach Beendigung der kalten Ischämie wider.

Die Organe der Kontrollgruppe wurden nach Explantation mit eisgekühlter Konservierungslösung perfundiert und bis zur Reperfusion unter hypothermen Bedingungen gelagert. Bei einer durchschnittlichen Ischämiezeit von 10,9 h ist von einer gleichmäßigen Hypothermie des gesamten Organs auszugehen. Die mit 2,4 h deutlich kürzere kalte Ischämiezeit der erkrankten Organe und die fehlende Perfusion mit gekühlter Konservierungslösung führt sehr wahrscheinlich zu einer nur unvollständigen Kühlung der Organe und somit zu einer unzureichenden hypothermiebedingten Reduktion der metabolischen Aktivität. Dies ließe einen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich niedrigeren pH der erkrankten Organe erwarten. Tatsächlich war jedoch der pH in der Gruppe der erkrankten Organe signifikant höher, was durch den geringeren Anteil vitaler Zellen zu erklären wäre.

In der Kontrollgruppe wird der niedrigere pH somit als Akkumulation saurer Metabolite während der mehrere Stunden dauernden Ischämiezeit der Organe interpretiert. Diese Tendenz setzt sich in den Organen der Kontrollgruppe im weiteren Perfusionsverlauf fort (LSG A: $p=0,126$; LSG B1: $p=0,043$) und deutet somit auf eine erhöhte Diffusion und Exkretion saurer Stoffwechselprodukte infolge einer zunehmenden metabolischen Aktivität nach re-etablieren einer normothermen Umgebung ebenso hin, wie auf eine höhere Anzahl vitaler Zellen und somit auf eine erhöhte CO_2 Produktion (siehe Verlaufsgrafik). 20 min nach Reperfusion kommt es dann schließlich zu einer Stabilisierung der CO_2 Produktion.

Der in beiden Gruppen im zeitlichen Verlauf der Kollagenaseeinwirkung ansteigende pO_2 könnte auf einen zunehmenden kollagenasebedingten Zelluntergang und einen daraus resultierenden geringeren Sauerstoffverbrauch hinweisen.

Interessanterweise hatte bei separater Betrachtung beider Gruppen der Sauerstoffpartialdruck während der Zellisolierung einen nicht signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität (**Abb. 21**). Bei gemeinsamer Betrachtung der Gruppen zeigte sich jedoch, dass ein niedriger SpO_2 einen positiv prädiktiven Wert für eine hohe Zellvitalität darstellte. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass der niedrige SpO_2 eine hohe Stoffwechselaktivität widerspiegelt. Insbesondere bei Betrachtung einzelner Organe mit besonders niedrigem SpO_2 zeigt sich regelmäßig eine besonders hohe Vitalität. Es bestätigt sich, dass Leberzellen bedingt durch das Umgebungsmilieu in der Leber (hoher Anteil an venösem Blut, niedriger SpO_2 , niedriger pH) gut an hypoxische Umgebungsbedingungen angepasst sind (**Abb. 21**).

Ein kollagenasebedingter Zelluntergang und in der Folge davon eine geringere Produktion saurer Metabolite ließe während des fortschreitenden Isolierungsverlaufs einen allmählichen Anstieg bzw. Normalisierung des pH erwarten. Tatsächlich veränderte sich der pH während der Kollagenaseperfusion in beiden Gruppen nur geringfügig, während der pO_2 in beiden Gruppen deutlich anstieg.

Der kurzzeitige pH Anstieg in der Kontrollgruppe und der dadurch bedingte gegensätzliche Verlauf der pH-Werte während der Kollagenaseperfusion ist darüber hinaus durch die Supplementierung von $NaHCO_3$ zum Puffern erniedrigter pH-Werte zu erklären.

Darüber hinaus war in der Kontrollgruppe trotz Pufferung mit $NaHCO_3$ ein konstant niedrigerer pH-Wert zu beobachten. Auch dies ist Ausdruck der metabolischen Aktivität der signifikant ($p=0,028$) höheren Zellzahl der Organe der Kontrollgruppe (**Abb. 11**).

Der pH erkrankter Organe verlief auf einem signifikant höheren Niveau, die geringere Zellzahl der erkrankten Organe scheint somit den signifikant geringeren Anfall saurer Metabolite zu bedingen.

Veränderungen der vaskulären Autoregulation ist ein bei Lebertransplantationen beschriebener Effekt, der auf Ischämie–Reperfusionen zurückgeführt wird.³³

Zu Beginn der Reperfusion kommt es zunächst in beiden Gruppen zu einem Absinken des pH.

Der in der Kontrollgruppe initial gemessene hohe pH-Wert nach langanhaltender kalter Ischämie, spiegelt hier möglicherweise eine noch unzureichende Perfusion des Organs bei anhaltender Vasokonstriktion wider. Ein allmähliches Abfallen des pH in der Kontrollgruppe im Verlauf der Perfusion könnte eine Verbesserung der postischämischen Organperfusion und eine dadurch hervorgerufene vermehrte Freisetzung saurer Metabolite andeuten. Ein zweiphasiger Verlauf der Gewebepfusion nach Ischämie und Reperfusion wurde von einigen Autoren beschrieben^{36;34}. Der pH Verlauf der Kontrollgruppe könnte diesen beschriebenen pH Verlauf andeuten (*zunächst vermehrte Freisetzung saurer Metabolite durch Vasodilatation von 5. bis 12. Perfusionsminute, im weiteren Verlauf dann Normalisierung der Perfusion. Eine erneute geringgradige Vasodilatation nach ca. 20min, wie durch Kazuo et. al. Beschrieben, bildet sich hier nicht ab*).

Studien zur postischämischen vaskulären Autoregulation bei mit Konservierungslösung behandelten Lebern und mehrere Stunden andauernder Ischämiezeit liegen allerdings bisher nicht vor. Außerdem wurde bisher in keiner experimentellen Studie der Einfluss von Hypothermie auf die vaskuläre Autoregulation überprüft.

Weitere Studien zu Ischämie-Reperfusionseffekten und zur postischämischen vaskulären Autoregulation könnten mittels einer kombinierten Weißlicht-Spektroskopie und Laser-Doppler-Flowmetrie erfolgen, die in der klinischen Routine bereits bei der intraoperativen Messung der zerebralen Perfusion neurochirurgischer Patienten genutzt wird. Mittels der Nahinfrarotspektroskopie könnte zusätzlich der Sauerstoffgehalt einzelner Leberareale festgestellt werden, wodurch zusätzlich Rückschlüsse auf die Mikroperfusion möglich wären.

Kollagenase zeigt, wie alle Enzyme, nur innerhalb eines definierten pH Spektrums (pH 7,5 bis 8,0) eine optimale enzymatische Aktivität. Um für einen optimalen Kollagenverdau zu sorgen und um pH abhängige Zellschäden zu verhindern, wurde das Perfusionsmedium während der Kollagenaseperfusion mit Natriumbicarbonat auf einen pH $\geq 7,0$ gepuffert. Der geringgradige Anstieg des pCO₂ lässt sich durch die pH abhängige NaHCO₃ Supplementierung hinreichend erklären. Auch der im

Vergleich zur Kontrollgruppe geringere pH Anstieg in der Gruppe der erkrankten Organe lässt sich durch den geringeren Einsatz von NaHCO_3 (50% der Fälle) gegenüber der Kontrollgruppe (83% d. F.) erklären.

Im Perfusionsverlauf kommt es in beiden Gruppen zunächst zu einem Absinken des pO_2 , der nach Beginn der Kollagenaseperfusion wieder deutlich ansteigt. Die zunächst sinkenden Sauerstoffpartialdrücke verdeutlichen in diesem Zusammenhang eine Zunahme der postischämischen metabolischen Aktivität der Leberzellen in beiden Gruppen. Durch Beginn des Kollagenasevermittelten Organverdaus kommt es nun im weiteren Verlauf zu einer zunehmenden Zerstörung von noch Vitalen Zellen mit der konsekutiven Abnahme des Sauerstoffverbrauchs und einem hieraus resultierenden Anstieg des pO_2 .

Zur Zellgewinnung wird am Ende der Kollagenaseperfusion die kollagenasehaltige Perfusionsflüssigkeit verworfen und die Organkapsel manuell eröffnet. Das starke Absinken des pO_2 unter den Ausgangswert am Ende der Zellisolierung wird offenbar durch das Unterbrechen der Sauerstoffzufuhr nach Eröffnen der Organkapsel verursacht. Auf ein Fortsetzen der Oxygenierung mit dem von uns eingesetzten Perlator wurde verzichtet. In nicht veröffentlichten Vorversuchen hatte die fortgesetzte Oxygenierung der Zellsuspension zu einer starken Schaumbildung geführt und die folgenden Aufreinigungsschritte und das Abfüllen der Zellsuspension erschwert.

Ein Absinken des pCO_2 nach Ende der Perfusion spiegelt darüber hinaus ein kältebedingtes Absinken des Metabolismus nach Stoppen der Kollagenaseaktivität durch gekühlte PBS, sowie das Zentrifugieren in 4°C Umgebung wider. Der gleichzeitige Anstieg des pH trotz beginnendem Sauerstoffmangel lässt sich durch den Einsatz der oben erwähnten phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) erklären.

Fortschreitender Zelluntergang nach Zellisolierung

Die unmittelbar nach Beendigen der Kollagenaseaktivität gemessene Zellvitalität war bei beiden Gruppen ca. 10% (9% DG, 12% CG) höher als nach Aufbereitung der Zellsuspension. Das Waschen zur restlosen Entfernung der Kollagenase ist jedoch unabdingbar, um eine fortschreitende Schädigung intakter Leberzellen zu minimieren. Die Daten zeigen, dass die Zellsuspension zwar aufgereinigt wird (abnehmende Spannweite), aber dennoch eine nennenswerte Zellmenge bei den

Wasch- und Re-Suspensionsschritten zerstört wird, so dass die Vitalität abnimmt (**Abb. 15**).

Insbesondere Organe mit primär niedriger Zellvitalität profitieren von den Aufreinigungsschritten und es kommt zu einer Verbesserung der Vitalität nach den Zentrifugations- und Resuspensionsschritten.

Die Zentrifugation wird auf Grund ihrer Größe von Leberzellen nicht gut vertragen, so dass alternative Verfahren zur Zellaufreinigung überprüft werden sollten. Ein weiteres Problem des Zentrifugationsverfahrens stellt der Verlust von steatotischen aber vitalen Zellen dar, die auf Grund ihres geringeren spezifischen Gewichts bereits vor Re-Suspension sehr wahrscheinlich mit dem Überstand abgegossen werden. Diese Hypothese wird durch die etwas stärkere Abnahme der Vitalität in der Kontrollgruppe gestützt, in der 11 von 12 Organen (S.21) auf Grund eines zu hohen Steatosegrades vom Transplantationsprogramm ausgeschlossen wurden.

In beiden Gruppen ist auch eine über das Beenden der Kollagenaseperfusion hinausgehende Kollagenaseaktivität denkbar, was einen fortlaufenden Zelluntergang zur Folge haben könnte. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein Großteil der von uns in kultivierten, primär vitalen Zellen in Monolayer-Zellkultur trotz kollagenbeschichteter Kulturschalen nicht adhäriert (unveröffentlichte Daten). Diese Zellen zeigen im Trypanblau Exklusionstest eine regelrechte Vitalität, die nach zweitägiger Kultur bei insuffizienter Adhärenz schnell nachlässt. Eine mögliche Schädigung der Zelloberfläche inklusive der Schädigung der für die Zellpolarität notwendigen Glykokalix könnte mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen überprüft werden. In weiteren Versuchsreihen könnte die Kollagenasekonzentration in der Zellsuspension nach Wasch- und Resuspensionsschritten gemessen werden, um eine mögliche Restaktivität zu ermitteln, um die Zellaufreinigung zu optimieren.

Aufreinigung der Zellsuspension

Die Perkoll Gradientenzentrifugation ist eine gängige Methode zur Trennung avitaler Zellbestandteile von vitalen Zellen auf Grundlage des spezifischen Gewichts. Diese Methode ließe einen höheren Aufreinigungsgrad der Zellsuspension sowie die selektive Resuspension steatotischer Zellen zu. Außerdem wären durch eine effektivere Auftrennung der Zellsuspension weniger Zentrifugationsschritte denkbar. Bisher liegen noch keine Erfahrungen mit Perkoll-Gradientenzentrifugation für die

Zellisolierung aus zirrhatischen Organen vor. Die Erfahrungen im Bereich der Zellisolierung aus Leberteilresektaten ließen sich voraussichtlich problemlos auf die Anforderungen bei ganzen Organen übertragen; bei diesem Vorgehen ist jedoch mit erheblich höheren Kosten zu rechnen.

Determinierung der Organzersetzung

Das Organgewicht ließ in beiden Gruppen keinerlei Rückschluss auf die zu erwartende Zellausbeute zu (**Abb.12–14**). Da innerhalb der jeweiligen Gruppe vergleichbare histopathologische Befunde vorlagen, sind andere Einflussfaktoren anzunehmen. In der Kontrollgruppe war außerdem im Vergleich zur Gruppe der erkrankten Organe eine stärkere Reduktion des Organgewichts festzustellen (55% versus 8,8%). Bei einem weitgehend fibrotischen Umbau der erkrankten Organe sollte trotz des geringeren Ausgangsgewichts eine stärkere Gewichtsreduktion durch Abbau der Kollagenfasern zu erwarten sein. Es kann daher, wie beschrieben, von einem unzureichenden Verdau ausgegangen werden. Die im Rahmen einer Leberzirrhose beginnende Einlagerung von Kollagen findet insbesondere durch Ablagerung von Kollagenreicher extrazellulärer Matrix und deren unzureichenden Abbau in Lebersinusoiden und periportalen Feldern statt. Da nun zunächst die das periportale Feld umgebenden Kollagenfasern abgebaut werden müssen, ist die Auflösung der kollagenbasierten Verbindungen der Parenchymzellen prolongiert und eine Auflösung des Organs in seine Bestandteile findet kaum statt.

Das Ende der Kollagenaseperfusion wurde in unserem experimentellen Ansatz durch digitale Untersuchung determiniert: Üblicherweise wird das Organ mit dem Finger „eingedrückt“ und die Perfusion beendet, wenn auf der Organoberfläche eine Druckmarke zu erkennen ist. Insbesondere in der Gruppe der erkrankten Organe war die Aussagekraft dieses Vorgehens auf Grund der oben beschriebenen Ödembildung und des zirrhatisch-fibrotischen Umbaus begrenzt. In der Gruppe der erkrankten Organe konnte das Gewebe in keinem Fall nachhaltig eingedrückt werden, dennoch wurde, da im Perfusionsverlauf keine Veränderung der Organfestigkeit festgestellt werden konnte, die Kollagenaseperfusion aus Rücksicht auf eine mögliche Zellschädigung nach max. 32 min beendet.

Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Imaging ist eine neuartige Ultraschall basierte Technik zur Bestimmung von Gewebefestigkeit (Gewebeelastographie), die

zur Evaluation der Leberfibrose zunehmend klinische Anwendung findet.³⁵ Verglichen mit der momentan noch verbreiteten klassischen Leberelastographie, ist eine Objektivierbarkeit der Untersuchungsbefunde möglich.³⁶ Tierexperimentelle Versuche zeigen auch bezüglich der Einschätzung und Stadieneinteilung des Steatosegrades von Organen vielversprechende Ergebnisse.³⁷ Mittels auf das Organ aufgelegten Ultraschallsonden könnte während der Kollagenaseperfusion unter Ausnutzung der ARFI Technik die Leberdicke bestimmt und der Verdauprozess überwacht und zu einem optimalen Zeitpunkt beendet werden. Hierdurch wäre eine deutlich größere Zellausbeute ohne Gefährdung der Zellvitalität zu erwarten.

Ein niedriger Sauerstoffpartialdruck sollte bei gleichbleibender Sauerstoffzufuhr in unserem Versuchsaufbau auf einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und somit auf eine hohe Anzahl vitaler Zellen hinweisen. Umso mehr erstaunt der nicht erkennbare Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck der Perfusionslösungen und Zellvitalität in der Kontrollgruppe. (**Abb. 21 + 22**). Auch hier ist ein unzureichender Verdau denkbar und somit bei Verbleib von vitalen Zellen in den Organüberresten anzunehmen und unterstreicht die Notwendigkeit die Gewebefestigkeit zur Determinierung des exakten Verdauzustandes zu objektivieren.

Literaturrecherche

Eine aktuelle online Literaturrecherche im PubMed Verzeichnis unter den Suchbegriffen „liver cell isolation whole liver primary human liver cells“ zeigte keine weiteren und aktuelleren Publikationen im Bereich der Isolierung von primären humanen Leberzellen aus erkrankten (explantierten) Organen.

Vorausgegangene Arbeiten und Ausblick

Die ersten Versuche³⁸ und Ergebnisse der Arbeit wurden auf der 31. Jahrestagung der European Society for Artificial Organs (ESAO) in Warschau 2004 (D.C. Kehr, G. Pless, R. Schwartlander, E. Efimova, M. Liu, S. Roth, J.C. Gerlach, P. Neuhaus, I.M. Sauer: „Diseased Organs – A potential cell source for cell based therapy concepts“) in Form eines Kurzvortrags vorgetragen – die zu diesem Zeitpunkt erste Veröffentlichung über die Bewertung und Nutzung erkrankter Leberorgane als Zellquelle.

Die Isolierung und 3D Zellkultur von primären humanen Leberzellen und deren Nutzung für Leberunterstützungsverfahren in Bioreaktoren konnten 2006 im Journal for Artificial Organs veröffentlicht werden: Pless G, Steffen I, Zeilinger K, Sauer IM, Katenz E, Kehr DC, Roth S, Mieder T, Schwartlander R, Müller C, Wegner B, Hout MS, Gerlach JC.: „Evaluation of primary human liver cells in bioreactor cultures for extracorporeal liver support on the basis of urea production.“ Artif Organs. 2006 Sep;30(9):686-94.

Grundlegende Arbeiten bezüglich der Optimierung der Zellisolierung (hier noch an Leberteilresektaten) wurden 2008 im Journal for Artificial Organs veröffentlicht (Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschok N, Gong X, Cheng X, Kehr D, Sauer IM.: Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen. Artif Organs. 2008 Mar;32(3):205-13. Zukünftig sollte die Übertragbarkeit der in dieser Versuchsreihe gewonnenen Erkenntnisse insbesondere bezüglich der Verbesserung der Isolierungsergebnisse auf die Isolierung von Zellen aus erkrankten Lebern in einer Studie überprüft werden.

Schlussfolgerung

In den Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die Isolierung von vitalen humanen Leberzellen aus Organen, die während einer Lebertransplantation explantiert und verworfen werden, trotz schwerer Parenchymveränderungen der Organe, grundsätzlich möglich ist. Trotz der signifikant niedrigeren Zellmengen in der Gruppe der erkrankten Organe, wurden beim Vergleich beider Gruppen keine signifikanten Vitalitätsunterschiede nach der Zellisolierung festgestellt. Damit bestätigen die Ergebnisse der Arbeit in vollem Umfang die Arbeitshypothese.

Die Verringerung der Zellvitalität durch die beschriebenen Waschschrirte unterstreicht die Notwendigkeit und das Potenzial zukünftiger Anstrengungen, die Zellaufreinigung zu optimieren.

Die Nutzung von Leberzellen aus erkrankten Organen kann somit zukünftig zur Bedarfsdeckung von primären humanen Leberzellen beitragen.

Quellen

1 Feasibility of fast dynamic MRI for noninvasive monitoring during ectopic liver cell transplantation to the spleen in a porcine model.

Raschzok N, Pinkernelle J, Billecke N, Nehls K, Powerski M, Sauer IM, Teichgräber U.

AJR Am J Roentgenol. 2012 Jun;198(6):1417-23. doi: 10.2214/AJR.11.7742.

2 Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography.

Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, Vondran FW, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM.

J Cell Mol Med. 2008 Aug;12(4):1384-94. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00343.x.

Epub 2008 Apr 9.

3 Primary hepatocyte cultures as prominent in vitro tools to study hepatic drug transporters.

Ramboer E, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M.

Drug Metab Rev. 2013 May;45(2):196-217. doi: 10.3109/03602532.2012.756010.

Epub 2013 Feb 1.

4 Primary hepatocyte cultures as in vitro tools for toxicity testing: quo vadis?

Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V.

Toxicol In Vitro. 2012 Apr;26(3):541-4. doi: 10.1016/j.tiv.2012.01.002. Epub 2012 Jan 12.

5 Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application.

Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, Schrem H, Manns MP, Bredehorn T, Net M, Vidal MM, Kafert-Kasting S, Arseniev L.

Cell Transplant. 2005;14(10):845-53.

6 Cross-species comparisons of transcriptomic alterations in human and rat primary hepatocytes exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

Black MB, Budinsky RA, Dombkowski A, Cukovic D, LeCluyse EL, Ferguson SS, Thomas RS, Rowlands JC.

Toxicol Sci. 2012 May;127(1):199-215. doi: 10.1093/toxsci/kfs069. Epub 2012 Feb 1

7 Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience.

Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, Williams KT, Reynolds GM, Newsome PN, Adams DH, Afford SC.

PLoS One. 2011 Mar 29;6(3):e18222. doi: 10.1371/journal.pone.0018222.

8 Hepatocyte isolation and transplantation in the pig.

Maruyama M, Totsugawa T, Kunieda T, Okitsu T, Shibata N, Takesue M, Kurabayashi Y, Oshita M, Nakaji S, Kodama M, Tanaka N, Kobayashi N.

Cell Transplant. 2003;12(6):593-8.

9 Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation.

Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC.

N Engl J Med. 1998 May 14;338(20):1422-6.

10 Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1.

Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, Caenazzo L, Basso S, Carraro P, Valente ML, D'Amico D, Zancan L, D'Antiga L.

Cell Transplant. 2005;14(2-3):151-7.

11 Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder.

Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, Fox IJ.

Pediatrics. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1262-7.

12 Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a.

Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB.

Lancet. 2002 Jan 26;359(9303):317-8.

13 Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen.

Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong X, Cheng X, Kehr D, Sauer IM.

Artif Organs. 2008 Mar;32(3):205-13. doi: 10.1111/j.1525-1594.2007.00524.x. Epub 2008 Jan 15.

14 A novel cannulation technique for isolation of human hepatocytes from explanted diseased whole livers.

Kehr DC, Raschzok N, Sauer IM.

Transplant Proc. 2012 May;44(4):999-1001. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.03.006.

15 Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers.

Gerlach JC, Brombacher J, Klöppel K, Schnoy N, Neuhaus P.

Transplantation. 1994 May 15;57(9):1318-22. doi: 10.1097/00007890-199405150-00005. PMID: 8184468

16 Preservation Solutions in liver Transplantation: What are the Options ?

Eghtesad B; Aucejo F, Fung JF

Liver transplantation 2006; 12: 196-198

17 Organ preservation.

Southard JH, Belzer FO.

Annu Rev Med. 1995;46:235-47.

18 The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials, intracellular calcium concentrations, and outcome following liver transplantation.

Cohen AJ, Burczynski FJ, Rosser BG, Lipschitz J, Minuk GY.

Am J Surg. 2000 Feb;179(2):154-60.

19 Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution.

Lutterová M, Kukan M, Vajdová K, Kuba D, Mislanová C, Kebis A, Danninger F, Mráz P.

Langenbecks Arch Surg. 2001 Feb;386(1):31-7.

20 Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and Celsior solutions.

Abrahamse SL, van Runnard Heimel P, Hartman RJ, Chamuleau RA, van Gulik TM. Cell Transplant. 2003;12(1):59-68.

21 Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution.

Lutterová M, Kukan M, Vajdová K, Kuba D, Mislanová C, Kebis A, Danninger F, Mráz P.

Langenbecks Arch Surg. 2001 Feb;386(1):31-7.

22 Preservation solutions for liver transplantation in adults: celsior versus custodiol: a systematic review and meta-analysis with an indirect comparison of randomized trials.

Lema Zuluaga GL1, Serna Agudelo RE, Zuleta Tobón JJ.

Transplant Proc. 2013 Jan-Feb;45(1):25-32. doi:

10.1016/j.transproceed.2012.02.031. Epub 2012 Sep 15.

23 Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in adult liver transplantation.

Rayya F, Harms J, Martin AP, Bartels M, Hauss J, Fangmann J.

Transplant Proc. 2008 May;40(4):891-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.03.044.

24 Value of energy substrates in HTK and UW to protect human liver endothelial cells against ischemia and reperfusion injury.

Janssen H, Janssen PH, Broelsch CE.

Eur Surg Res. 2004 Jan-Feb;36(1):26-32.

25 Comparison of HTK- and UW-solution for liver preservation tested in an orthotopic liver transplantation model in the pig.

Steininger R, Roth E, Holzmüller P, Reckendorfer H, Grünberger T, Sperlich M, Burgmann H, Moser E, Feigl W, Mühlbacher F.

Transpl Int. 1992;5 Suppl 1:S403-7.

26 Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in intestinal and multivisceral transplantation.

Mangus RS, Tector AJ, Fridell JA, Kazimi M, Hollinger E, Vianna RM.

Transplantation. 2008 Jul 27;86(2):298-302. doi: 10.1097/TP.0b013e31817ef074.

27 The effect of UW solution and its components on the collagenase digestion of human and porcine pancreas.

Contractor HH, Johnson PR, Chadwick DR, Robertson GS, London NJ.

Cell Transplant. 1995 Nov-Dec;4(6):615-9.

28 Effects of Calcium Depletion on the Junctional Complex Between Oxyntic Cells of Gastric Glands.

Sedar AW, Forte JG

J Cell Biol. 1964 Jul;22:173-88.

29 Govan DTG, Macfarlane PS, Callander R; Spezielle Pathologie; 1993; 256-257, Springer Verlag

30 Brandhorst H. , Friberg A., Andersson H.H., Felldin M., Foss A., Salmela K., Lundgren T., Tibell A., Tufveson G., Korsgren O., and Brandhorst D. (2009) The importance of tryptic-like activity in purified enzyme blends for efficient islet isolation. *Transplantation* 87, 370-375. 2009.

31 New procedure for epidermal cell isolation using kiwi fruit actinidin, and improved culture of melanocytes in the presence of leukaemia inhibitory factor and forskolin.

Yarani R1, Mansouri K, Mohammadi-Motlagh HR, Bakhtiari M, Mostafaie A.

Cell Prolif. 2013 Jun;46(3):348-55. doi: 10.1111/cpr.12028. Epub 2013 May 10.

32 Implication of mitochondrial dysfunction and cell death in cold preservation--warm reperfusion-induced hepatocyte injury.

Duval M, Plin C, Elimadi A, Vallerand D, Tillement JP, Morin D, Haddad PS.
Can J Physiol Pharmacol. 2006 May;84(5):547-54.

33 Recovery of blood flow and oxygen transport after temporary ischemia of rat liver.

Kazuo H, Nishida T, Seiyama A, Ueshima S, Hamada E, Ito T, Matsuda H.
Am J Physiol. 1998 Jul;275(1 Pt 2):H243-9.

34 Assessment of hepatic ischaemia reperfusion injury by measuring intracellular tissue oxygenation using near infrared spectroscopy.

El-Desoky AE¹, Delpy DT, Davidson BR, Seifalian AM.
Liver. 2001 Feb;21(1):37-44.

35 Non-invasive methods for the evaluation of liver fibrosis in clinical practice.

Friedrich-Rust M, Vermehren J.

Z Gastroenterol. 2013 Jan;51(1):43-54. doi: 10.1055/s-0032-1330411. Epub 2013 Jan 11.

36 Acoustic radiation force impulse elastography for chronic liver disease: comparison with ultrasound-based scores of experienced radiologists, Child-Pugh scores and liver function tests.

Kim JE, Lee JY, Kim YJ, Yoon JH, Kim SH, Lee JM, Han JK, Choi BI.

Ultrasound Med Biol. 2010 Oct;36(10):1637-43. doi:
10.1016/j.ultrasmedbio.2010.07.016.

37 Mouse Liver Dispersion for the Diagnosis of Early-Stage Fatty Liver Disease: A 70-Sample Study.

Barry CT¹, Hah Z², Partin A², Mooney RA³, Chuang KH¹, Augustine A⁴, Almudevar A⁵, Cao W³, Rubens DJ⁶, Parker KJ⁷.

Ultrasound Med Biol. 2014 Jan 9. pii: S0301-5629(13)01109-5. doi:
10.1016/j.ultrasmedbio.2013.10.016. [Epub ahead of print]

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Daniel Kehr versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nutzung von Organen von Leberempfängern zur Isolierung primärer humaner Leberzellen“ / „Isolation of primary human liver cells from livers of transplant graft recipients“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Daniel C Kehr hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Autoren: Daniel C Kehr, Nathaniel Raschzok, Igor M. Sauer
Titel: A novel cannulation technique for isolation of human hepatocytes from explanted diseased whole livers.
Zeitschrift: Transplant Proceedings
Erscheinungsjahr: 2012
Beitrag im Einzelnen:
- Konzeptentwicklung
- Versuchsplanung und Durchführung
- Datensammlung
- Auswertung
- Publikation

Alle in der Publikation erhobenen Daten, Versuchsplanung, Versuchsdurchführung Fotos, Ergebnisse sowie ein Großteil der Veröffentlichung werden von mir verantwortet.

Publikation 2:

Autoren: Gesine Pless, Ingo Steffen, Katrin Zeilinger, Igor M Sauer, Ekaterina Katenz, Daniel C Kehr, Stephan Roth, Tim Mieder, Ruth Schwartländer, Christian Müller, Brigitte Wegner, Mariah S Hout, Jörg C Gerlach
Titel: Evaluation of primary human liver cells in bioreactor cultures for extracorporeal liver support on the basis of urea production.
Zeitschrift: Artificial Organs
Erscheinungsjahr: 2006
Beitrag im Einzelnen:
- Zellisolierung
- Datenerhebung
- Zellkultur

Im Rahmen der von mir durchgeführten Zellisolierungsversuche für die Organe der Kontrollgruppe konnten primär humane Leberzellen gewonnen werden, die in 3D Hohlfaserkapillarbioreaktoren kultiviert wurden und zu den Ergebnissen der oben genannten Studie führten. Darüber hinaus wurden die Bioreaktoren teilweise von mir betreut, Proben wurden entnommen und Daten dokumentiert.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste / Originalarbeiten

1. A novel cannulation technique for isolation of human hepatocytes from explanted diseased whole livers.

Kehr DC, Raschzok N, Sauer IM.

Transplant Proc. 2012 May;44(4):999-1001.

2. Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen.

Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong X, Cheng X, **Kehr D**, Sauer IM.

Artif Organs. 2008 Mar;32(3):205-13. Epub 2008 Jan 15.

3. Evaluation of primary human liver cells in bioreactor cultures for extracorporeal liver support on the basis of urea production.

Pless G, Steffen I, Zeilinger K, Sauer IM, Katenz E, **Kehr DC**, Roth S, Mieder T, Schwartlander R, Müller C, Wegner B, Hout MS, Gerlach JC.

Artif Organs. 2006 Sep;30(9):686-94.

4. The SlideReactor--a simple hollow fiber based bioreactor suitable for light microscopy.

Sauer IM, Schwartlander R, Schmid J, Efimova E, Vondran FW, **Kehr D**, Pless G, Spinelli A, Brandenburg B, Hildt E, Neuhaus P.

Artif Organs. 2005 Mar;29(3):264-7.

5. In vitro evaluation of the transportability of viable primary human liver cells originating from discarded donor organs in bioreactors.

Sauer IM, Schwartlander R, Van der Jagt O, Steffen I, Efimova E, Pless G, **Kehr DC**, Kardassis D, Fruhauf JH, Gerlach JC, Neuhaus P.

Artif Organs. 2005 Feb;29(2):144-51.

6. In vitro comparison of the molecular adsorbent recirculation system (MARS) and single-pass albumin dialysis (SPAD).

Sauer IM, Goetz M, Steffen I, Walter G, **Kehr DC**, Schwartlander R, Hwang YJ, Pascher A, Gerlach JC, Neuhaus P.

Hepatology. 2004 May;39(5):1408-14.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Dipl. Ing. Ingo G. Steffen, der, selbst in einer ähnlichen Situation wie ich, nicht müde wurde sich meine Frustration wieder und wieder anzuhören und mir dennoch mit aufbauenden Worten und Rat und Tat zur Seite stand. Für seine großartige Unterstützung im Wissenschaftlichen, privaten und familiären Bereich und seinen unerschütterlichen Glauben an mich und meine Arbeit bin ich ihm unendlich dankbar.

Mindestens ebenso großer Dank gilt meiner Frau Dr. med. Jasmin Kehr, die den mittlerweile fünfzehnjährigen Prozess meiner Doktorarbeit und den zwanzigjährigen Prozess unserer Beziehung und meine Launen mit einer bewundernswerten Gelassenheit und großer emotionaler Aufbauarbeit betreut.

Wesentlich zum Erfolg der Forschungsarbeit haben Dr. rer. medic. Ruth Schwartländer, Dr. rer. medic. Stephan Roth, Dr. rer. medic. Gesine Pless und Marcus Liu als ständig helfende Hände beigetragen. Außerdem danke ich Dr. rer. nat. Harald Stachelscheid dafür, dass er nicht nachtragend ist.

Dr. med Christian Pille, Dr. med Kilian Tegethoff (†), Dr. med Dinah Jörres, Dr. med. Clemens de Grahl (†), danke ich dafür, dass sie meine Kollegen waren und ich gemeinsam von und mit- und von ihnen klinische Erfahrung sammeln durfte.

Meinem Betreuer Prof. Dr. med. Igor M. Sauer gilt für den gewährten Freiraum bei der Ausgestaltung der Arbeit mein Dank.

Isolierung primärer humaner Leberzellen aus erkrankten Lebern von Transplantatempfängern

Gewidmet:

Meinen Eltern

und

Prof. Dr. Teimouraz Vassilidze, meinem größten klinischen Lehrer und medizinischen Vorbild

