

**Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité -
Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum und dem Institut für
Arbeitsmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin, Freien Universität Berlin -
Fachbereich Veterinärmedizin & Humboldt- Universität Berlin**

**Etablierung der kombinierten Transplantation syngener Hepatozyten mit allogenen
Lebertransplantat im Rattenmodell zur Untersuchung der Toleranzinduktion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Henriette Irmgard Ilse Karin Riedel

Tierärztin

aus Essen

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3656

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Priv.- Doz. Dr. Christian Große-Siestrup
Zweiter Gutachter: Priv.- Doz. Dr. Igor Maximilian Sauer
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

liver transplant, liver cells, transplantation, liver regeneration, rats, animal models,
tolerance, stem cell

Tag der Promotion: 24.10.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-397-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zielsetzung	4
1.2	Fragestellung	5
2	LITERATURÜBERSICHT	6
2.1	Lebertransplantation	6
2.1.1	Die Entwicklung der Lebertransplantation	6
2.2	Probleme der Transplantationsmedizin	8
2.3	Hepatozytentransplantation	14
2.3.1	Hintergrund und Entwicklung der Hepatozytentransplantation	14
2.3.2	Präklinische Studien zur Hepatozytentransplantation	16
2.4	Anatomie der Rattenleber	20
2.4.1	Makroskopische Aufbau der Rattenleber	20
2.4.2	Anatomie und Physiologie der Gefäßversorgung	22
2.4.3	Mikroskopischer Aufbau der Rattenleber	23
2.4.4	Klinische Studien zur Hepatozytentransplantation	26
2.5	Leberregeneration und hepatische Progenitorzellen	30
2.5.1	Extrahepatische Stammzellen als alternative Zellquellen	33
2.6	Operationale Toleranz	34
2.6.1	Präklinische Untersuchungen zur Toleranzinduktion	35
2.6.2	Klinische Studien zur Toleranzinduktion	36
3	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	Wahl der Ratte als Versuchstier	38
3.1.1	Aufbau des Rattenmodells	39
3.1.2	Tierhaltung	39
3.2	Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf	40
3.3	Operative Vorbehandlungen und chirurgische Eingriffe	42
	Operationsaufbau	42

3.3.1	Narkose und Analgesie	43
3.3.2	Hemmung des hepatischen Zellteilungszyklus der Donorleber durch Retrorsin	44
3.3.3	<i>In situ</i> Proliferationsaktivierung hepatischer Progenitorzellen (2-AAF/PH-Modell)	44
Hepatektomie für die Isolierung adulter Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen		46
3.4	Kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation (= cLTx)	48
3.4.1	Lebertransplantation	48
	Kombinierte Leberzelltransplantation adulter Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen in das Milzparenchym (= <i>combined Liver Cell Transplantation</i> , cLCTx)	53
3.5	Immunsuppression	54
3.6	Finalisierung der Empfängertiere	54
3.7	Isolierung adulter Rattenhepatozyten und hepatischer Progenitorzellen	55
	Isolierung primärer Rattenhepatozyten	56
3.7.1	Isolierung der hepatischen Progenitorzellen	57
3.8	Histologie und Immunhistochemie	58
3.8.1	Präparation von Gewebeproben	59
	Entparaffinieren und Rehydratation der Gewebeproben	59
3.8.2	Übersichtsfärbungen der Gewebeproben mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und CK18	60
3.8.3	Immunhistologische Proliferationsanalysen	60
3.8.4	Immunhistologischer Nachweis hepatischer Progenitorzellen	61
3.9	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FisH)	64
3.10	Statistische Auswertungen	66
4	ERGEBNISSE	67
4.1	Ergebnisse der cLTx	67
4.1.1	Gruppenübersicht	67
4.1.2	Überlebensraten der cLTx- Empfängertiere	67
4.1.3	Vergleich der Zelltransplantationszeitpunkte	68
4.1.4	Zum vorzeitigen Versuchsausschluss führende Komplikationen der cLTx-Tiere	69
4.1.5	Laborergebnisse der Blutuntersuchungen	71
4.2	Isolierungen der adulten Hepatozyten und hepatischen Progenitorzellen	82
4.2.1	Beurteilung des Isolierungserfolges und Auswahl der Spendertiere nach dem Iso-Score	83
4.3	Histologische Auswertungen	84
4.3.1	Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin nach Mayer und CK-18	84

4.3.2	Proliferationsanalysen	85
4.4	Immunhistologische Auswertungen zum Nachweis hepatischer Vorläuferzellen	91
4.4.1	Thymus-Zell-Antigen (Thy-1)	91
4.4.2	Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)	91
4.4.3	OV-6	92
4.5	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FisH)	93
5	DISKUSSION	101
5.1	Beurteilung der generellen Durchführbarkeit einer kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation	103
5.2	<i>Engraftment</i> der transplantierten adulten Hepatozyten und hPC	104
5.2.1	Ergebnisdiskussion der Isolierungen primärer adulter Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen	104
5.2.2	Bewertung der kombinierten Transplantation adulter Hepatozyten und hPC (cLCTx)	105
5.2.3	Bewertung des im Rattenmodell geschaffenen Selektionsvorteils bezüglich des <i>Engraftments</i>	106
5.2.4	Bewertung immunhistologischer Proliferationsnachweise der transplantierten hPC im Retrorsin-vorbehandeltem allogenen Lebertransplantat	107
5.3	Bewertung des Repopulationserfolges des allogenen Lebertransplantates durch die transplantierten syngenen adulten Hepatozyten und hPC anhand der Langzeitdetektion mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	108
5.4	Limitationen des etablierten Rattenmodells und Anregungen für weitere Forschungsvorhaben	110
5.5	Bewertung des etablierten Tiermodells NHL als Ausgangspunkt für weitere Studien zur Induktion einer operationalen Toleranz	111
6	ZUSAMMENFASSUNG	113
7	SUMMARY	115
8	LITERATURANGABEN	128
9	DANKSAGUNG	140
10	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	141

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-AAF	2-Acetylaminofluorene
A. hep.	Arteria hepatica
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Feto-Protein
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
alb-uPA ⁺	<i>Albumin-Uroplasminogen-Activator</i>
ALF	<i>Acute Liver Failure</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APAAP	Alkalischen-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase
AZ	klinischer Allgemeinzustand
BE	Blutentnahme
Bili	Bilirubin
Ca ⁺⁺	Calcium
CBD	<i>Common Bile Duct</i>
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CK-18	Creatin-Kinase
cLCTx	<i>combined Liver Cell Transplantation</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratmeter
CN I	Crigler-Najjar-Syndrom Typ-I
CNI	Calcineurininhibitoren
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
com.	communis
CsA	Cyclosporin A
d	Tag
DA	Dark Agouti

DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
dext.	dexter
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dors.	dorsal
DPPIV	Dipeptidylpeptidase-IV-defizienz
ECD	<i>Extended Criteria Donors</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ESC	embryonale Stammzellen
FAH	Fumarylacetoacetat-Hydrolasedefizienz
FCS	fetales Kälberserum
FH	familiäre Hypercholesterinämie
FisH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GA	Gauge
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde und <i>Society for Laboratory Animal Science</i>
h	Stunde
HBs-Ag	Hepatitis-B-Oberflächenantigen
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HcTx	Hepatozytentransplantation
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
hPC	hepatische Progenitorzellen
HSC	hämatopoetische Stammzellen
I.E.	Internationale Einheiten
IHVC	intrahepatische Vena cava caudalis
IL-2	Interleukin-2
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IQR	<i>Interquartile Range</i>
IS	Immunsuppression
ITN	<i>Immune Tolerance Network</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

Krea	Kreatinin
l	Liter
lat.	lateral(is)
LCTx	<i>Liver Cell Transplantation</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLTx	<i>Living-Donor-Liver-Transplantation</i>
Lew	Lewis
Lig.	Ligamentum
Lob. hep.	Lobus hepatis
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
LTx	Lebertransplantation
M	Mittelwert
MAC	<i>Minimal Alveolar Clearance</i>
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MP	Methylprednisolon
MSC	mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl
NaCl 0,9 %	isotonische Kochsalzlösung
NF-AT	<i>Nuklear Faktor of Activated T-Cells</i>
NH ₃	Ammoniak
NHBD	<i>Non-Heart-Beating-Donors</i>
NHL	neo-hybrides Lebertransplantat
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NPC	nicht-parenchymale Zellen
O ₂	Sauerstoff
OC	Ovalzellen
OLT	orthotope Lebertransplantation

OP	Operation
OT	Objektträger
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PH	partielle Hepatektomie
PI	Perfusionslösung-I
pod	post-operativer Tag
Proc.	Processus
prop.	propia
PTLD	<i>Post Transplant Lymphoproliferative Disorder</i>
Rag2 ⁻	<i>Recombination-Activation Gene 2- Deficiency</i>
RISSET	<i>Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
s. c.	subkutan
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
sec.	Sekunde
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SHVC	suprahepatischen Vena cava caudalis
sin.	sinister
SSC	<i>Sodium Citrat Standard</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-Buffered-Saline</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
Thy-1	Thymus-Zell-Antigen-1
TPG	Transplantationsgesetz
U	Unit
UDP	Bilirubin-Uridin-Diphosphoglucuronat
Urea	Harnstoff
V.	Vena
V. jug. ext.	Vena jugularis externa
Vol.	Volumen
µm	Mikrometer

1 Einleitung

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) stellt die Standardtherapie bei terminalem Leberversagen dar. Um eine Transplantatabstoßung zu vermeiden, ist eine lebenslange Immunsuppression notwendig. Die massiven Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie führen jedoch zur Entwicklung von Folgekrankheiten wie Diabetes mellitus, terminaler Niereninsuffizienz und *de novo* Malignomen. Die Lebenserwartung und –qualität von Transplantationspatienten wird dadurch erheblich vermindert und beeinträchtigt die Langzeitergebnisse.

Chronische Abstoßungsreaktionen treten bei etwa 15 % der lebertransplantierten Patienten auf. Sie führen zu irreversiblen Organschäden und Retransplantation oder zum Tod des Patienten.

Der ausgeprägte Spenderorganmangel ist ein weiteres Hauptproblem der Transplantationsmedizin. Um die Ergebnisse der OLT langfristig zu verbessern, beschäftigt sich die klinisch-experimentelle Forschung intensiv mit alternativen Therapieoptionen für Patienten mit Leberversagen. Die Leber bietet dabei aufgrund ihrer einzigartigen Regenerationsfähigkeit nach Organschädigung durch die Proliferationskapazität adulter Hepatozyten ideale Voraussetzungen.

Eine potenzielle Alternative zur Ganzorgantransplantation stellt die Hepatozytentransplantation (= HcTx) dar. Durch eine HcTx können Leberfunktionsverluste ausgeglichen werden und eine Regeneration der erkrankten Leber wird ermöglicht.

Die HcTx kann des Weiteren zur klinischen Stabilisierung der Patienten zur Überbrückung der Wartezeit genutzt werden.

Zur Leberzellisolierung können die explantierten Lebern bei der OLT sowie abgelehnte Donororgane genutzt werden, Hepatozyten, die aus erkrankten Lebern isoliert werden zeigen eine höhere metabolische Aktivität im Vergleich zu gesunden Organen. Sofern die Proliferationskapazität adulter Hepatozyten nach massiven Gewebeerlusten nicht zur Regeneration der geschädigten Leber ausreicht, kommt es zur Stimulation von hepatischen Progenitorzellen (= hPC). Diese weisen Charakteristika somatischer Leberstammzellen auf und können die Leberregeneration somit maßgeblich unterstützen. Damit transplantierte Leberzellen ihren therapeutischen Nutzen entfalten können, muss es zur erfolgreichen Besiedelung der Leber (= *Engraftment*) kommen.

Darüber hinaus eignet sich die Leber als immunprivilegiertes Organ durch ihr tolerogenes Potenzial zur Erforschung verbesserter immunsuppressiver Therapien und der Entstehung operationaler Toleranz. Unter operationaler Toleranz versteht man eine stabile Transplantatfunktion ohne kontinuierliche Immunsuppression. Spontan entstandene operationale Toleranz kann nach Patienten-Incompliance, exzellenter HLA-Übereinstimmung oder Spender-Chimärismen auftreten. Eine reproduzierbare Toleranzinduktion nach Lebertransplantation ist klinisch bislang noch nicht etabliert.

Um die Langzeitergebnisse der Lebertransplantation zu verbessern, soll in der vorliegenden Arbeit die Idee verfolgt werden, durch eine Transplantation autologer adulter Hepatozyten und hPC in ein allogenes Lebertransplantat eine teilweise „Autologisierung“ des Transplantates zu erreichen. Die für die kombinierte Leberzelltransplantation (cLCTx) benötigten autologen Zellen können dabei aus den erkrankten Explantaten isoliert werden (siehe **Abb. 1.1**), wodurch man proliferative Leberzellen erhält. Die gemeinsame Transplantation differenzierter metabolisch aktiver Hepatozyten und hPC soll die Proliferation der transplantierten Zellen im Wirtsparenchym begünstigen. Das Lebertransplantat dient dabei als biologische Matrix für die Repopulation durch die Leberzellen. Dieses vollkommen neue Konzept soll so zur Entstehung eines *in vivo* generierten Neo-Hybriden Lebertransplantats (= NHL) führen.

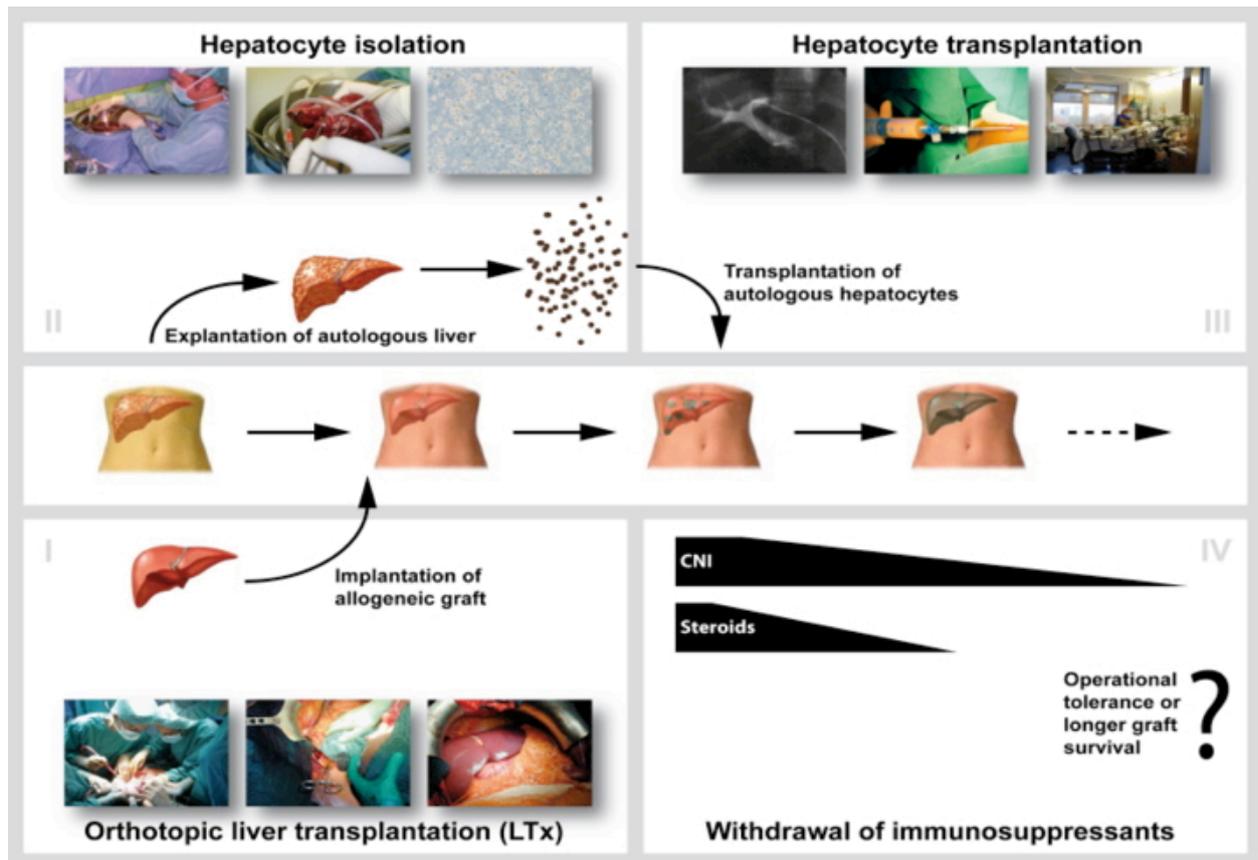


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der einzelnen Projektschritte zur Generierung des NHL.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Realisierbarkeit dieses innovativen Ansatzes und soll anhand der Etablierung eines experimentellen Rattenmodells als Basis für die Bearbeitung grundlegender klinischer Fragestellungen zur Verbesserung der Langzeitergebnisse nach Lebertransplantationen beitragen. Zur Untersuchung des Konzeptes des NHL ist die Etablierung eines geeigneten Kleintiermodells unabdingbar, da diese Fragestellung nur im Organverbund und insbesondere anhand der immunologischen Reaktion des Empfängerorganismus untersucht werden kann. Das *in vivo* im Rattenmodell entwickelte NHL soll aufgrund des erworbenen autologen Charakters eine geringere Inzidenz von Rejektionsreaktionen haben und die Induktion operationaler Toleranz in zukünftigen Versuchen begünstigen.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation im Rattenmodell zur Bearbeitung klinisch-experimenteller Fragestellungen. Durch die Transplantation syngener Hepatozyten und hPC in ein allogenes Lebertransplantat soll untersucht werden, inwieweit es durch die Repopularisierung der Spenderleber zur „Autologisierung“ des Transplantats kommt. Der Leberdonor wird mit einem leberspezifischen Mitose-Inhibitor (Retrorsin) vorbehandelt. Die Zellsuspension aus adulten Hepatozyten und hPC erhält dadurch einen Selektionsvorteil im Retrorsin-vorbehandelten Lebertransplantat aufgrund der gesteigerten Proliferationskapazität der transplantierten Leberzellen. Durch die Repopularisierung mit syngenem proliferierenden Leberzellen wird die Entstehung eines Neo-Hybriden Lebertransplantats ermöglicht.

1.2 Fragestellung

1) Ist die Transplantation einer syngenon Leberzellsuspension in ein allogenes Lebertransplantat chirurgisch und klinisch möglich?

→ Mögliche Problempunkte bestehen in der zu hohen Belastung des Empfängertieres durch zwei sehr invasive chirurgische Eingriffe innerhalb eines kurzen Zeitraums und die gesteigerte Thrombosegefahr durch die infundierten Leberzellen, insbesondere in der V. portae.

2) Können die transplantierten Hepatozyten und hepatischen Progenitorzellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Transplantat nachgewiesen werden oder werden sie eliminiert?

→ Problem ist die Phagozytose des Großteils der transplantierten Zellen durch Abwehrzellen der Leber in bereits existierenden Studien zur Hepatozytentransplantation sowie die langfristige Detektierbarkeit der Zellen im Lebertransplantat.

3) Sind die transplantierten Zellen in der Lage das Lebertransplantat zu repopularisieren?

→ Problem ist die geringe Repopularisierungsrate transplantierte Zellen im allogenen Transplantat bei fraglichem Selektionsvorteil der autologen Leberzellen.

4) Kommt es durch die Proliferation der transplantierten Zellen im Transplantat zur „Autologisierung“ und zur Entstehung eines Neo-Hybriden Lebertransplantats?

→ Problem ist die erfolgreiche Integration der syngenon Leberzellen in das Parenchym des allogenen Transplantats und die Proliferation der transplantierten Zellen.

5) Bietet die Etablierung dieses Rattenmodells einen geeigneten Ausgangspunkt zur Untersuchung des Immunsuppressions-*Weaning* („Ausschleichen“) und der Induktion operationaler Toleranz in zukünftigen experimentellen Fragestellungen?

→ Problem ist die Steuerung der Immunsuppression anhand klinischer und laborchemischer Parameter im DA-Lew-Modell.

2 Literaturübersicht

2.1 Lebertransplantation

2.1.1 Die Entwicklung der Lebertransplantation

Die Entdeckung der Blutgruppen 1901 durch Karl Landsteiner und die Etablierung von Gefäßnähten durch Alexis Carrel 1902 markieren wichtige Ausgangspunkte für die Entwicklung der Lebertransplantation^{1,2}. Die erste erfolgreiche Lebertransplantation erfolgte 1963 durch Thomas E. Starzl in Denver³. Nicht nur die Operationstechniken, sondern auch die Organperfusion und –konservierung entwickelten sich stetig weiter. 1975 gelang eine 24-stündige Leberperfusionskonservierung⁴.

Der Durchbruch für den klinischen Alltag sollte allerdings erst 1976 mit der Entdeckung des Immunsuppressivums Cyclosporin A durch J.F. Borel folgen^{5,6}. Mit der klinischen Einführung von Cyclosporin A 1979 durch R.Y. Calne konnten die Ergebnisse durch Verminderung der Abstoßungsreaktionen nochmals erheblich verbessert werden⁷. Die stete Weiterentwicklung der chirurgischen Technik führte zur Etablierung der orthotopen Lebertransplantation über die bisherigen klinischen Studien hinaus. Seit der National Institutes of Health Consensus Development Conference 1984 gilt die Lebertransplantation (= LTx) als Standardverfahren bei terminaler Lebererkrankung⁸.

Mit der Einführung der Wisconsin-Konservierungs-Lösung 1988 verbesserten sich die Konservierungsbedingungen der Transplantate⁹. Diese und weitere Aspekte bilden Grundsteine für die Weiterentwicklung bis hin zum heutigen Forschungsstand im Bereich der Lebertransplantation.

Aktueller Stand der Lebertransplantation

Die OLT stellt derzeit die Standardtherapie bei terminaler Leberschädigung dar. Die Indikationen für eine Lebertransplantation umfassen unter anderem Leberzirrhosen unterschiedlichen Ursprungs, akutes Leberversagen, cholestatische Lebererkrankungen, vaskuläre Störungen, von der Leber ausgehende maligne Neoplasien, sowie primäre und sekundäre Stoffwechselerkrankungen der Leber. Die derzeit häufigsten Indikationen zur OLT sind Alkoholabusus und Virushepatitis bedingte Leberzirrhosen im Endstadium, sowie das

Hepatozelluläre Karzinom (= HCC). Es wurden 2011 in Deutschland 1199 Lebern transplantiert, davon stammten 71 Organe aus Leberlebendspenden (Quelle: www.dso.de). In den USA wurden 2011 insgesamt 6342 Lebertransplantationen durchgeführt. Aktuell befinden sich in den USA 15.935 Patienten auf der Warteliste für eine Lebertransplantation (Stand 11.12.2012, Quelle: <http://optn.transplant.hrsa.gov>).

Die 1-Jahres-Überlebensrate nach OLT beträgt für alle Indikationen über 80 % und die 5-Jahres-Überlebensrate über 70 %^{10,11}.

Die Verteilung der Spenderorgane basiert auf Allokationssystemen und erfolgt im Eurotransplant-Raum seit dem 16.12.2006 auf Grundlage des MELD (= *Model for End-Stage Liver Disease*) -Scores.

Dieser beruht auf Alter, Bilirubin, Kreatinin und INR (= *International Normalized Ratio*) des Patienten und berechnet die statistische Wahrscheinlichkeit, während der folgenden 3 Monate zu versterben. Je mehr Punkte ein Patient erlangt, desto höher ist die Dringlichkeit zur Transplantation, so wird auch vom „*Sickest First*“-Prinzip gesprochen¹².

Um jedoch Patienten, die ohne medizinische Dringlichkeit bezüglich des Überlebens dennoch in hohem Maße von einer zeitnahen Lebertransplantation profitieren, sind *Standard Exceptions* eingeführt worden. Insbesondere bei hepatozellulären Karzinomen, die die 1996 von Mazzaferro¹³ eingeführten Mailand-Kriterien einhalten, ergibt sich die Dringlichkeit zur Transplantation aus der günstigen Prognose nach OLT, da dieser Tumor primär auf die Leber beschränkt bleibt.

In besonders dringlichen Fällen, wie beispielsweise bei akutem Leberversagen (*Acute Liver Failure*= ALF) oder primärer Nichtfunktion des Transplantats erfolgt eine Allokation nach *High Urgency*-Prinzip unabhängig vom labormedizinisch basierten MELD-Score¹⁴.

Mit Einführung des MELD-Score-basierten Allokationssystems konnte die Sterblichkeitsrate auf der Warteliste zunächst deutlich reduziert werden.

2.2 Probleme der Transplantationsmedizin

Organmangel und Gegenmaßnahmen zur Verringerung

Das gravierendste Problem der Transplantationsmedizin ist die begrenzte Anzahl geeigneter Spenderorgane. Durch die rasante Weiterentwicklung der Lebertransplantation vom experimentellen Status hin zum etablierten Standardverfahren bei irreversibler Lebererkrankung hat sich die Schere zwischen den Patienten auf der Warteliste und den verfügbaren Spenderorganen drastisch erweitert¹⁰. Der Erfolg und die Reproduzierbarkeit der positiven Ergebnisse der Lebertransplantation haben zu einer Erweiterung der Indikationen zur OLT geführt. Durch die Verbesserung der medizinischen Versorgung und die Erfahrungen der interdisziplinären Teams haben sich vormalige absolute Kontraindikationen, wie z. B. ein Spenderalter von > 70 Jahren und eine HI-Virusinfektion zu relativen Kontraindikationen entwickelt^{15,16}. Diesen Entwicklungen kann die Anzahl der postmortal gespendeten Lebern nicht standhalten und so sind Lösungsansätze erforderlich, um die Sterberate von Patienten auf der Warteliste zu reduzieren.

Das 1997 in Kraft getretene Transplantationsgesetz (= TPG) regelt in Deutschland die Spende, Entnahme, Vermittlung und Übertragung von Organen, die nach dem Tode oder zu Lebzeiten gespendet wurden. Aktuell schreibt das TPG in Deutschland eine erweiterte Zustimmungsregelung vor, bei der der Verstorbene vor seinem Tode einer Organentnahme z. B. durch einen Organspendeausweis zugestimmt haben muss. Liegt keine Zustimmung vor, können Angehörige auf der Entscheidungsgrundlage des ihnen bekannten oder des mutmaßlichen Willens des Verstorbenen über eine Organspende entscheiden.

Um den gravierenden Organmangel zu minimieren, wurde immer wieder eine Gesetzesänderung hin zur erweiterten Widerspruchslösung diskutiert, jedoch lehnte der Ethikrat bereits 2007 die Einführung ab. Als neueste Änderung verabschiedete der Bundestag im Juni 2012 nach einer Gesetzesinitiative vom 02. März 2012 eine Änderung der bisherigen Praxis. Im Rahmen der sogenannten „Entscheidungsregelung“ soll zukünftig jeder Bundesbürger mindestens einmal nach seiner Meinung zur Organspende befragt werden. Auf diese Weise soll die Zahl der Organspender erhöht werden.

Um den Spenderorganpool zu erweitern, werden verschiedene Strategien entwickelt. Eine Möglichkeit, der Organknappheit entgegenzuwirken ist die Einbeziehung von *Extended Criteria Donors* (= ECD), also Spendern, die nicht primär in die Auswahlkriterien für eine postmortale Leberspende fallen, dazu gehören ältere Patienten (> 65 Jahre)¹⁵. Auch die

transplantatassoziierten erweiterten Spendekriterien werden in Betracht gezogen, beispielsweise bei einer fortgeschrittenen Steatose, einer verlängerten kalten Ischämiezeit, sowie einer Virusinfektion mit Hepatitis B oder C¹⁷. Durch die Verwendung marginaler Organe, kann zwar der Spenderorganmangel reduziert werden, doch muss der mögliche negative Einfluss der Marginalitätskriterien auf die Resultate nach OLT berücksichtigt werden. Feng et al. haben zur besseren Charakterisierung von marginalen Organen den *Donor Risk Index* etabliert¹⁸.

Um den gravierenden Mangel an Spenderlebern zu minimieren, ist ein weiteres Szenario denkbar, das in einigen Ländern bereits einen experimentellen Status erlangt hat, aber bisher in Deutschland verboten ist: die Organspende von *Non-Heart-Beating-Donors* (= NHBD), also Patienten mit Kreislaufstillstand¹⁹. Es wird zwischen *controlled*-NHBD und *uncontrolled*-NHBD unterschieden, wobei das kontrollierte Einleiten des Herzstillstandes durch Abstellen lebenserhaltender Maßnahmen zu besseren Ergebnissen nach OLT führt. Generell ist zu betonen, dass die Verwendung von NHBD zu einer Zunahme an postoperativen Komplikationen führt, insbesondere zu primärer Nicht-Funktion des Transplantats und biliären Strikturen²⁰. Ein Großteil dieser Komplikationen ist auf die verlängerte warme Ischämiezeit der Transplantate zurückzuführen. Um die Aussichten für Empfänger eines NHBD-Spenderorgans zu verbessern, sind umfangreiche wissenschaftliche Forschungen in diesem Bereich der Transplantationsmedizin unumgänglich, da Organe von NHBD die kritische Situation des begrenzten Organpool erheblich entlasten könnten.

Eine weitere Methode, die Anzahl der für eine Transplantation zur Verfügung stehenden Organe zu erhöhen und die Wartelistenmortalität zu vermindern, ist die Leber-Lebendspende oder *Living-Donor-LTx* (= LDLTx), bei der Angehörige einen Teil ihrer Leber für eine Transplantation zur Verfügung stellen¹². Die Teillebertransplantation hat beim Menschen nur einen geringen Anteil an der Gesamtheit der Lebertransplantationen erreicht (79/920 im Jahr 2012; <http://statistics.eurotransplant.org>). Während die Teilleber-Lebendspende insbesondere für Kinder ein durchaus etabliertes Verfahren darstellt, werden die Teillebertransplantation als Lebendspende für Erwachsene, wie auch die Teillebertransplantation nach Leichenspende in Deutschland nur an spezialisierten Zentren vereinzelt durchgeführt. Grund ist der erhöhte logistische Aufwand, die deutlich höhere leberchirurgische Expertise, das erhöhte Empfängerrisiko für eingriffsbezogene Komplikationen und natürlich das Spenderrisiko bei der Lebendspende^{21,22}.

Trotz der vielversprechenden Entwicklung der LDLTx hin zu einem Routineverfahren sind seit einigen Jahren im Eurotransplantraum (in Japan fast ausschließlich LDLTx) abnehmende

Zahlen zu verzeichnen und der prozentuale Anteil beträgt derzeit ca. 3-4 % der Lebertransplantationen^{10,12}. Insbesondere das Operationsrisiko des Spenders bei der LDLTx ist kritisch zu hinterfragen. Dieses Spenderrisiko übertrifft das Risiko für die Entnahme einer Niere zur Nierenlebendspende-Transplantation erheblich, weltweit wurden auch vereinzelt Todesfälle von Leberlebendspendern berichtet^{23,24}. So scheint die Teillebertransplantation, zumindest im Eurotransplant-Raum nicht geeignet, dem wachsenden Organmangel zu begegnen.

Die Split-Lebertransplantation, bei der die postmortal gespendete Leber auf zwei Empfänger aufgeteilt wird, ist insbesondere für pädiatrische Patienten, die den kleineren linkslateralen Teil erhalten, eine aussichtsreiche Alternative zur Ganzorgantransplantation²⁵. Durch den hohen technischen Anspruch der Split-LTx und die dadurch resultierenden Schwierigkeiten für adulte Empfänger muss diese Methode noch weiter etabliert werden²⁶.

Immunbiologie der akuten und chronischen Transplantatabstoßung

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems besteht im Schutz des Organismus vor schädlichen Fremdeinflüssen durch Krankheitserreger. Es wird zwischen der angeborenen (unspezifischen) und der erworbenen (spezifischen) Immunität unterschieden, wobei letztere die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses zur Folge hat. Einer der Kernpunkte des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“.

Der *Major Histocompatibility Complex* (= MHC), also der Hauptgewebeverträglichkeitskomplex umfasst eine Gengruppe, die Proteine codiert, welche die Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen durch körpereigene Antigene als zum Körper gehörig kennzeichnen. Der MHC ist ausschlaggebend für das Regulationssystem der Immunabwehr. Beim Menschen wird der MHC auch *Human Leucocyte Antigen* (= HLA) genannt. Die Unterscheidung zweier genetisch differenter Individuen einer Spezies erfolgt über die MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche der Körperzellen²⁷.

Bei allogenen Transplantationen werden Organe oder Gewebe eines Individuums auf ein genetisch nicht identisches Individuum der gleichen Art übertragen. Das transplantierte Material wird vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und induziert eine Immunantwort, die ohne den Einsatz immunsuppressiver Maßnahmen zur Abstoßung des Transplantats führt.

Die Transplantatabstoßung ist eines der Hauptprobleme der Transplantationsmedizin, somit stellt die Erforschung verbesserter Möglichkeiten zum Schutz des übertragenen Organs durch

transplantatspezifische Immunsuppression ein Kernziel der transplantatimmunologischen Wissenschaft dar.

Die wichtigsten Zellen der spezifischen Immunabwehr sind die T-Lymphozyten. Sie erfahren eine klonalen Deletion im Thymus, wobei durch positive Selektion nur solche T-Lymphozyten erhalten bleiben, die in der Lage sind, die eigenen MHC-Moleküle zu erkennen. In der T-Zellmembran befindliche T-Zellrezeptoren (*T-Cell Receptor* = TCR) sind verantwortlich für die Alloantigenerkennung, sofern diese durch MHC-Moleküle präsentiert werden.

Es werden zwei mögliche Signalwege zur Aktivierung der naiven T-Lymphozyten beschrieben²⁸. Der direkte Weg der Alloantigenerkennung erfolgt durch die Detektion von Allo-MHC-Molekülen durch die T-Lymphozyten des Empfängers. Die an das Transplantat gebundenen und mitübertragenen antigenpräsentierenden Zellen (*Antigen Presenting Cells*= APC) oder auch „*Passenger Leucocytes*“ sind ausschlaggebend für diese Form der T-Zellaktivierung, da sie bei der Interaktion mit den T-Lymphozyten des Empfängers den benötigten kostimulatorischen Reiz liefern²⁹. Man geht außerdem davon aus, dass eine Kreuzreaktivität zwischen spezifischen TCRs und den Allo-MHC-Molekülen vorliegt²⁷. Dieser direkte Weg der Alloantigenerkennung führt primär zur akuten Transplantatabstoßung durch die T-zellvermittelte Aktivierung von gewebeschädlichen Effektorzellen, wie beispielsweise den B-Lymphozyten, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (= NK). Diese zytotoxischen Effektorzellen führen zum Funktionsverlust des Transplantats.

Der indirekte Signalweg zur Alloantigenerkennung basiert auf der Endozytose allogener MHC-Moleküle durch die APCs des Empfängers. Darauf folgt die Zerlegung zu Peptiden und deren Präsentation durch die MHC-Klasse-II-Moleküle des Individuums an die eigenen T-Lymphozyten. Die indirekte T-Zellaktivierung dominiert bei der chronischen Transplantatabstoßung^{28,30}.

Immunsuppressive Therapien und ihre Nebenwirkungen

Um die Zerstörung des Transplantats im Zuge einer Abstoßungsreaktion zu verhindern, ist die Unterdrückung der Immunantwort des Empfängers notwendig. Immunsuppressive Medikamente sind für die Erhaltung des transplantierten Organs obligat.

Hauptangriffspunkt der immunsuppressiven Therapie in der Transplantationsmedizin ist die Unterdrückung der T-Zellaktivierung. Eine sehr potente Gruppe der Immunsuppressiva sind die Calcineurininhibitoren (= CNI), zu denen Cyclosporin A (= CsA) und Tacrolimus

(= FK 506) gehören. Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer selektiven Bindung an Immunophilinen und einer Komplexbildung, die eine Aktivierung des Enzyms Calcineurin verhindert³¹. Calcineurin dephosphoryliert den *Nuklear Faktor of Activated T-Cells* (= NF-AT), einen Transkriptionsfaktor der T-Lymphozyten, der dadurch in den Zellkern transloziert werden kann³². Im Nukleus wird nach der Translokation des NF-AT die Expression verschiedener Gene veranlasst, die für die Zytokinsynthese insbesondere von Interleukin-2 (= IL-2) codieren³³. IL-2 ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen und ohne diesen kann ein Übergang in die aktivierte Form nicht stattfinden. Die naiven T-Zellen verbleiben in der G₀-Phase des Zellzyklus. Eine Inhibition der IL-2-Sekretion hat somit eine verminderte T-Zellaktivierung zur Folge³³. Jedoch ergeben sich aus der nichtselektiven Unterdrückung der Immunantwort des Empfängers, trotz der Schutzfunktion für das Transplantat, verschiedene Probleme. Die Abwehr gegenüber verschiedenen exogenen Krankheitserregern wird herabgesetzt und steigert demzufolge die Infektionsanfälligkeit für Transplantationspatienten.

Mit der Einnahme der CNI gehen unerwünschte Nebenwirkungen einher, wobei insbesondere die Nephrotoxizität eine zentrale Rolle einnimmt. Durch hämodynamische Effekte der CNI wird eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen induziert, die zu einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate führt. Klinisch wird ein Anstieg des Serumkreatinins als Ausdruck der Nierenschädigung beobachtet³⁴.

Transplantationspatienten haben durch die benötigte Immunsuppression ein erhöhtes Risiko an *de novo* Malignomen zu erkranken, da sie anfälliger für Infektionen mit onkogenen Viren sind und einige immunsuppressive Medikamente selbst eine onkogene Wirkung haben³⁵.

Außerdem wirken Calcineurininhibitoren diabetogen durch die von ihnen ausgelöste Verminderung der Insulinsekretion und die Induktion von Insulinresistenzen³⁶. Der Posttransplantationsdiabetes hat schwerwiegende Folgen für das Patienten- und Transplantatüberleben³⁷.

Andere häufig beobachtete Nebenwirkungen der CNI sind Neurotoxizität, Hypertonie, Hyperlipidämie und Hyperglykämie^{33,38}.

Weitere in der Transplantationsmedizin angewandte Immunsuppressiva sind antiinflammatorische Corticosteroide, die die Zytokinaktivierung inhibieren. Aufgrund des nichtselektiven Wirkmechanismus sind immunsuppressive Therapien mit Corticosteroiden von einer Bandbreite massiver Nebenwirkungen begleitet, wie insbesondere der Cushing-Induktion, diabetogener Wirkung und Hypertension³⁹.

Azathioprin ist ein Prodrug und führt über die intrazelluläre Inhibition der DNA- und

RNA-Synthese zur Hemmung der T-Zellproliferation. Es wird in Kombinationstherapien zur Vermeidung der Transplantatabstoßung verwendet, jedoch wird die Anwendung durch schwerwiegende Nebenwirkungen in Form von Knochenmarkstoxizität beschränkt ⁴⁰.

Das als Anti-Metabolit wirkende Mycophenolat-Mofetil (= MMF) ist ein selektiver Inhibitor der *de novo* Purinsynthese, welche für die B- und T-Zellaktivierung essentiell sind und wird in Kombinationstherapien zur Vermeidung von Rejektionsreaktionen nach soliden Organtransplantationen verabreicht. MMF führt zu unerwünschten Nebenwirkungen auf den Magen-Darm-Trakt und zur Knochenmarkssuppression ⁴¹.

Polyklonale Antikörper, wie beispielsweise das aus Kaninchenserum gewonnene Thymoglobulin, bewirken eine zellvermittelte T-Lymphozytendepletion und führen aufgrund der nicht-selektiven Immunsuppression zu einer gesteigerten Infektionsanfälligkeit. Außerdem werden Serumkrankheit, Thrombozytopenie und die Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (= *Post Transplant Lymphoproliferative Disorder*, PTL) als Nebenwirkungen dieses Präparats beschrieben ⁴².

Dieser kurze Überblick über die häufigsten Komorbiditäten nach Organtransplantationen verdeutlichen die Notwendigkeit der Erforschung verbesserter Immunsuppressionsregimen um die Lebensqualität von Transplantationspatienten langfristig zu erhöhen.

2.3 Hepatozytentransplantation

Die OLT bietet derzeit die einzige etablierte Therapiemöglichkeit für Patienten mit akutem und chronischen Leberversagen, sowie genetisch bedingten Stoffwechselerkrankungen. Der ausgeprägte Spenderorganmangel und die damit einhergehende Wartelistenmortalität veranschaulichen jedoch die Limitierungen der OLT. Daraus ergibt sich die Dringlichkeit der Entwicklung geeigneter Alternativmethoden zur Ganzorgantransplantation. Die experimentelle Transplantation autologer oder allogener Leberzellen zur Unterstützung der Leberfunktion erkrankter Organe ist seit einiger Zeit Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Die Hepatozytentransplantation (HcTx) stellt eine aussichtsreiche Alternative zur OLT dar und wurde bereits vereinzelt in der Klinik angewandt ⁴³.

2.3.1 Hintergrund und Entwicklung der Hepatozytentransplantation

Der Hepatozyt übernimmt als kleinste Funktionseinheit der Leber die zentralen metabolischen Aufgaben. Die HcTx verbessert die Leberfunktion von erkrankten Organen und kann sich somit potenziell zu einer weiteren Therapieoption bei fulminantem Leberversagen entwickeln. Der derzeitige Kenntnisstand zur HcTx basiert hauptsächlich auf den Forschungsergebnissen zahlreicher tierexperimenteller Studien, von denen einige bereits in kleineren klinischen Studien belegt werden konnten und somit das Potenzial der therapeutischen Anwendung der HcTx unterstreichen ⁴⁴.

Der Ausgangspunkt für die HcTx ist die erfolgreiche Isolierung von physiologisch intakten adulten Hepatozyten aus Lebergewebsresektaten oder Organen, die für eine Lebertransplantation abgelehnt wurden. Dazu wird das Leberparenchym durch enzymatischen Kollagenaseverdau aufgespalten und durch Dichtegradientenzentrifugation bis zur Gewinnung einer Hepatozytensuspension aufgereinigt ⁴⁵. Die isolierten Zellen werden anschließend intraportal oder intrasplenal über einen Katheter appliziert und gelangen mit dem Blutstrom in die distalen Portalvenenaufzweigungen ⁴⁶. Hepatozyten haben einen Durchmesser von ca. 24 μm und werden bedingt durch den Größenunterschied in den etwa 7 μm großen Lebersinusoiden gefangen. Dadurch kommt es zu einer vorübergehenden portalvenösen Druckerhöhung. Die Einschwemmung der Leberzellen führt zu einer Aktivierung der leberspezifischen Abwehrzellen, der Kupfferzellen, die einen Großteil (ca. 70 %) der transplantierten Hepatozyten in den Lebersinusoiden phagozytieren ⁴⁷. Die

restlichen Hepatozyten verbleiben zunächst überwiegend in den periportalen Regionen der Leberlobuli⁴⁸.

Nur ein sehr geringer Prozentsatz der ursprünglich applizierten Zellen durchdringt innerhalb von 24 h die Endothelbarriere und interagiert durch die Ausbildung von *Gap Junctions* und Gallenkanälchen mit den benachbarten Leberzellen des Empfängers. Nach der Integration ins Wirtsparenchym (= *Engraftment*) übernehmen die transplantierten Hepatozyten ihre metabolischen Funktionen, sie synthetisieren Albumin und speichern Glykogen⁴⁸.

Die Leber bietet den Hepatozyten die erforderlichen Bedingungen, wie eine extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren und Zell-Zellinteraktionen für das erfolgreiche *Engraftment* in das Leberparenchym⁴⁹.

Die HcTx weist verschiedene Vorteile gegenüber der Ganzorgantransplantation auf, was zusätzliche Anreize für die Weiterentwicklung dieser experimentellen Methode liefert. Mit den aus einem Organ oder Resektat isolierten Hepatozyten können, im Gegensatz zur OLT, unter Umständen mehrere Empfänger behandelt werden. Dadurch ließe sich der ausgeprägte Spenderorganmangel reduzieren. Hepatozyten tolerieren eine Kryokonservierung, was eine Lagerung in Zellbanken zur späteren Verwendung ermöglicht⁴⁶. Insbesondere in hochakuten Fällen, bei denen nicht schnell genug ein geeignetes Spenderorgan gefunden werden kann, ist die Bereitstellung einer Hepatozytenreserve in Zellbanken entscheidend. Außerdem ist die HcTx ein bedeutend weniger invasiver Eingriff als die OLT und mit einem entsprechend geringeren finanziellen Aufwand durchführbar.

Ein denkbares und teilweise schon in klinischen Studien verfolgtes Szenario ist die Überbrückung (*Bridging*) der Wartezeit bis hin zur OLT durch eine HcTx, um die eingeschränkte Organfunktion der erkrankten Leber zu verbessern und ein vorzeitiges Versterben der Patienten abzuwenden⁵⁰. Daraus ergibt sich ein weiterer Vorteil, denn durch die mittels HcTx erreichte Steigerung der Leberleistung wird der eigenen Leber die Regeneration bis hin zur Wiederherstellung der vollen Organfunktion ermöglicht (*restitutio ad integrum*). Insbesondere für Patienten mit hereditären Stoffwechselerkrankungen, wie beispielsweise dem Crigler-Najjar-Syndrom, der familiären Hypercholersterinämie und der Tyrosinämie Typ 1, bietet die HcTx einen aussichtsreichen kurativen Ansatz durch die Verbesserung der Synthese- und Detoxifikationsleistung der Leber⁴⁵.

Die HcTx stellt aufgrund der dargestellten Vorteile gegenüber der Lebertransplantation eine aussichtsreiche Perspektive dar. Um das Verständnis der molekularen Mechanismen der Integration der Leberzellen, der funktionellen Repopulation des Empfängerorgans und der Leberregeneration weiter zu vertiefen, existieren verschiedene experimentelle Tiermodelle.

2.3.2 Präklinische Studien zur Hepatozytentransplantation

Der Grundstein zur Erforschung der Hepatozytentransplantation wurde mit der Etablierung der Zwei-Schritt-Perfusionstechnik zur Isolierung vitaler Hepatozyten 1976 durch Seglen gelegt⁵¹.

Nachweis der transplantierten Zellen

Eines der grundlegenden Probleme bei der Erforschung der HcTx besteht in der Detektierbarkeit der transplantierten Hepatozyten in der Empfängerleber. Man versuchte zunächst dieses Problem zu umgehen, indem man die Hepatozyten in ektope Organe, wie das Peritoneum, die Nierenkapsel und die Milz transplantierte, um sie anhand der morphologischen Unterschiede histologisch nachweisen zu können⁵². Abgesehen vom Milzparenchym, das sich hinsichtlich des Überlebens und der Proliferation der transplantierten Zellen als vielversprechend erwies, waren die Auswirkungen der ektope Transplantation für die Leberzellen jedoch negativ⁵².

Es folgten Bemühungen, exogene Zellmarkierungsmöglichkeiten wie Radioisotope oder Fluoreszenzfarbstoffe zu etablieren^{53,54}. Die Lokalisation der transplantierten Hepatozyten war so für einen kurzen Zeitraum möglich, da jedoch die Markierungssubstanzen bei Zellteilungsprozessen der Leberzellen mitabgebaut werden, eignen sich diese Methoden nicht für die Langzeitdetektion⁵⁵.

Durch die Entwicklung von transgenen murinen Hepatozyten, die das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (= HBs-Ag) exprimieren und nach der Transplantation durch in-situ-Färbemethoden eindeutig zu identifizieren sind, konnten erstmals verlässliche Langzeiterhebungen zur Funktion und Effizienz der HcTx veröffentlicht werden⁵⁶. Es konnte hierdurch gezeigt werden, dass intrasplenal transplantierte Hepatozyten in die Leber transportiert wurden und sich unter Aufnahme ihrer physiologischen Zellfunktionen ins Leberparenchym integrierten. Die Entdeckung des Dipeptidylpeptidase-IV-defizienten (= DPPiV) Fischer-344-Rattenstammes durch Thompson 1991 und die dadurch ermöglichte Etablierung eines syngenem Transplantationsmodells zum Nachweis der transplantierten Wildtyp-Hepatozyten führten zu weiteren essentiellen Aussagen über die Repopulationskapazität^{46,57,58}.

Eine weitere Möglichkeit der Detektion transplantierten Zellen besteht in der Verwendung männlicher Zellspender bei der Transplantation in ein weibliches Empfängerindividuum.

Durch die Verwendung von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit DNA-Sonden, die speziell an die Y-Chromosomen binden, konnten so die männlichen Zellen im Gewebe sichtbar gemacht werden^{59,60}.

Metabolische Erkrankungen

Mit der Etablierung von speziellen transgenen Tiermodellen zur experimentellen Untersuchung der Anwendbarkeit von Zelltherapien bei definierten metabolischen Lebererkrankungen wurde der Weg hin zur klinischen Anwendung der HcTx geebnet. Eines dieser Tiermodelle untersucht das Crigler-Najjar-Syndrom Typ-I (= CN I), dem eine sehr seltene hereditäre Mutation des UGT1A1-Gen zugrunde liegt, die sich durch eine Inaktivität der Bilirubin-Uridin-Diphosphoglucuronat (= UDP) -Glucuronyltransferase äußert. Folglich akkumuliert unkonjugiertes Bilirubin im Serum. Die ausgeprägte Hyperbilirubinämie hat eine erhebliche neurotoxische Wirkung und kann zum Kernikterus führen. Die Gunn-Ratte kann aufgrund eines genetischen Enzymdefekts Bilirubin nicht glukuronidieren, was ebenfalls in einer Hyperbilirubinämie resultiert⁶¹. Durch die Transplantation von physiologisch intakten Hepatozyten konnte bei Gunn-Ratten eine signifikante Senkung des Bilirubinspiegels und das Vorliegen konjugierten Bilirubins nachgewiesen werden⁶². Es konnte gezeigt werden, dass die transplantierten Hepatozyten die Leberfunktion maßgeblich unterstützen.

Das Watanabe-Kaninchen verfügt über einen *Low Density Lipoprotein*- (= LDL)Rezeptormangel und ist ein Tiermodell der familiären Hypercholesterinämie (= FH). Nach HcTx konnten beim Watanabe-Kaninchen sowohl Serumcholesterin, als auch LDL signifikant gesenkt werden⁶³. Nagase-Ratten (= *Nagase Albumenic Rat*) weisen einen Gendefekt der Albuminsynthese auf und zeigten nach HcTx physiologische Albuminwerte⁶⁴.

Selektionsvorteil

Aus den präklinischen Studien zur HcTx geht hervor, dass vielversprechende Ergebnisse der Leberzelltherapie insbesondere beim Vorliegen eines Selektionsvorteils der transplantierten Hepatozyten erzielt werden konnten. Die erfolgreiche Repopulation der Wirtsleber ist von zentraler Bedeutung für den therapeutischen Nutzen der HcTx. Das transgene Albumin-Uroplasminogen-Activator (= alb-uPA⁺) Mausmodell ist ein geeignetes Tiermodell zur Analyse der Repopulation der Leber nach HcTx, da die transplantierten Hepatozyten einen ausgeprägten Selektionsvorteil gegenüber den chronisch geschädigten Wirtsleberzellen

aufweisen ⁶⁵. Durch die Kreuzung von alb-uPA-Mäusen mit immundefizienten Stämmen (z.B. *Recombination-Activation Gene 2* (= Rag2⁻) -mutante Mäuse) wurde ein Modell etabliert, das die xenogene HcTx untersucht und die therapeutische Repopulation durch humane Hepatozyten nachweist ⁶⁶. Eine extensive Leberrepopulation durch transplantierte Hepatozyten wurde auch in Ratten gezeigt, die zuvor durch die Gabe des Pyrollizidin-Alkaloids Retrorsin, einem leberspezifischen Mitose-Inhibitor, in Kombination mit partieller Hepatektomie (= PH) vorbehandelt wurden. Die chemische Hemmung der Leberzellfunktion einerseits, in Kombination mit einem Proliferationsstimulus durch die PH andererseits, gewährleistet den transplantierten Leberzellen einen Wachstumsvorteil bei der Integration in das Leberparenchym ⁶⁷.

Proliferationsfähigkeit

Neben der Integration der transplantierten Hepatozyten in das Leberparenchym des Empfängers ist die Proliferationsfähigkeit der übertragenen Leberzellen entscheidend für den langfristigen therapeutischen Nutzen der HcTx. In experimentellen Tiermodellen mit konstanter Depletion der Wirtshepatozyten replizieren die transplantierten Hepatozyten in hohem Maße ^{68,69}. Das Mausmodell mit einer Mutation am Gen der Fumarylacetoacetat-Hydrolase (= FAH-Maus) zur Untersuchung des Krankheitsbild der Tyrosinämie Typ 1, hat sich als besonders effizient für Studien zur Proliferation und Regenerationskapazität der transplantierten Wildtyp-Hepatozyten erwiesen, da es einen Selektionsvorteil gegenüber den endogenen Hepatozyten gewährleistet ⁷⁰.

Akutes Leberversagen

Um die vielversprechenden therapeutischen Möglichkeiten der HcTx bei akutem Leberversagen (*Acute Liver Failure*, ALF) zu untersuchen, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert. Eine Möglichkeit zur Induktion eines ALF besteht in der Gabe von Toxinen, wie D-Galaktosamin, was eine fulminante Leberzellschädigung zur Folge hat ⁷¹. Des Weiteren kann ein akutes Leberversagen chirurgisch durch eine subtotale Leberteilektomie, die einer ca. 90 %-igen Hepatektomie entspricht, induziert werden ⁷². Vorteil dieser Methode besteht in der zeitlich exakt bestimmbar Leberschädigung und der genauen Reproduzierbarkeit des Ausmaßes der Leberschädigung. Außerdem hat die chirurgische Induktion des ALF keinen Einfluss auf die transplantierten Leberzellen durch

leberstoffwechselrelevante Toxine. Die Überlebensrate der Tiere, die nach der Induktion des ALF eine Leberzelltransplantation erhalten haben, war, unabhängig von der Art der Vorbehandlung, signifikant höher als die der Kontrollgruppe ohne HcTx^{73,74}.

Die experimentellen Tiermodelle zur Untersuchung des therapeutischen Potenzials der Hepatozytentransplantation verdeutlichen, dass die transplantierten Leberzellen für die Repopulation der Leber einen Selektionsvorteil gegenüber den endogenen Hepatozyten benötigen. Dieser Wachstumsvorteil wird durch Genmutationen erreicht, die zur Akkumulation von toxischen Metaboliten oder zu leberzellschädigenden Mechanismen führen. Die Verwendung transgener Tiermodelle hat zu fundierten zellbiologischen Kenntnissen der HcTx geführt und bildet die Basis für das klinische Therapiekonzept.

Problematik der Hepatozytentransplantation

Neben den zukunftssträchtigen Ergebnissen, die eine klinische Anwendung bei hereditären Leberfunktionsstörungen und der Behandlung des akuten Leberversagens möglich machen, sind Untersuchungen zur Zelltherapie bei chronischen Lebererkrankungen notwendig.

Durch Abnormalitäten der Leberarchitektur insbesondere bei zirrhotischen Krankheitsbildern, kann das Mikroenvironment, das die transplantierten Hepatozyten für die Integration benötigen, gestört sein⁴⁶. Außerdem muss von einer erhöhten Komplikationsrate durch die veränderten hämodynamischen Bedingungen in der Leber und den versorgenden Gefäßstrukturen ausgegangen werden. Durch die Zelltransfusion bei der HcTx kommt es zur vorübergehenden Hypertension im portalvenösen System⁵². Die applizierten Zellen können zu einer Portalvenen- oder Portalarterienthrombose führen. Eine Translokation der transplantierten Leberzellen in fremde Organe, insbesondere in die Lunge kann durch das Abwandern der Hepatozyten in die pulmonaren Kapillaren zu Embolien führen⁷⁵.

Im Rattenmodell von Laconi et al. konnte 1995 nach der Induktion von massiven fibrotischen Leberläsionen durch das Pyrrolizidinalkaloid Lasiocarpine eine signifikant bessere morphologische Struktur und Größe der Leber bei Tieren gezeigt werden, die eine intrasplenische Transplantation von 1×10^6 Hepatozyten erhalten hatten⁷⁶. Ratten mit einem portocavalen Shunt zeigten eine signifikante Verbesserung des hepatischen Enzephalopathiegrades einhergehend mit strukturellen Veränderungen des Corpus Striatum nach HcTx in die Milz⁷⁷. Nach der chemischen Induktion einer chronischen Leberzirrhose bei Ratten durch die Gabe von Phenobarbital und Tetrachlorkohlenstoff (= CCl₄) konnten Kobayashi et al. und Gagandeep et al. verlängerte Überlebenszeiten bis zu 128 Tage nach

HcTx bei signifikanter Verbesserung der klinischen Leberfunktionsparameter (Serumbilirubin und- albumin, Prothrombinzeit, Ammoniak (= NH₃)-Spiegel, Expression von Glucose-6-Phosphatase und Glykogen) zeigen ⁷⁸. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die transplantierten Hepatozyten die zirrhotische Leber im Rattenmodell repopularisieren und nach einem Jahr noch histologisch nachweisbar waren ⁷⁹. Weitere präklinische Studien zur Untersuchung der HcTx bei chronischen Lebererkrankungen sind notwendig um die Anwendbarkeit dieser Therapieoption zu evaluieren.

2.4 Anatomie der Rattenleber

Da die Fragestellung der vorliegenden Arbeit im Rattenmodell untersucht wurde, wird im folgenden Abschnitt auf die tierartspezifische Anatomie der Leber eingegangen.

2.4.1 Makroskopische Aufbau der Rattenleber

Die Leber liegt hauptsächlich im intrathorakalen Bereich der Bauchhöhle direkt unter dem Diaphragma. Sie nimmt eine zentrale Rolle als Stoffwechselorgan ein und stellt als Produktionsort der Gallenflüssigkeit die größte exokrine Drüse des Körpers dar ^{80,81}.

Bei der Lewis-Ratte ist beschrieben, dass das Lebergewicht 3 % vom Gesamtkörpergewicht ausmacht ⁸². Die Leberränder der einzelnen Leberlappen sind bei der Ratte scharf abgegrenzt. Die konvexe Facies diaphragmatica liegt direkt kaudal des Zwerchfells an dessen Facies abdominalis. Die Facies visceralis ist konkav und bedeckt den Magen, Teile des Duodenum descendens, Teile des Colon transversum, das Pancreas, die rechte Niere und die rechte Nebenniere.

Lobulierung der Rattenleber

Die Nomenklatur der Leberlappen wird in der Literatur uneinheitlich beschrieben ^{80,83-86}. Die multilobulierte Leber wird jedoch konstant in 4 Leberlappen (Lobi hepatici) eingeteilt, die durch Fissuren unterteilt sind. Im Folgenden die Nomenklatur und Einteilung der Lobi hepatici nach Martins et al. ⁸⁷:

- 1) Lobus hepatis sinister lateralis (= *Left Lateral Lobe*, LLL)
- 2) Lobus hepatis medianus (= *Median Lobe*, ML), der unterteilt wird in
 - a) Lob. hep. med. sin. (= *Left Median Lobe*, LML) und
 - b) Lob. hep. med. dext. (= *Right Median Lobe*, RML)
- 3) Lobus hepatis dexter lateralis (= *Right Lateral Lobe*, RLL), der unterteilt wird in
 - a) Lob. hep. dext. lat. superior (= *superior RLL*) und
 - b) Lob. hep. dext. lat. inferior (= *inferior RLL*)
- 4) Lobus hepatis caudatus (= *Caudate Lobe*, CL), der unterteilt wird in
 - a) Processus caudatus (= *Caudate Processus*, CP)
 - b) Processus papillaris anterior (*Anterior Caudate Lobe* = AC)
 - c) Processus papillaris posterior (*Posterior Caudate Lobe* = PC)

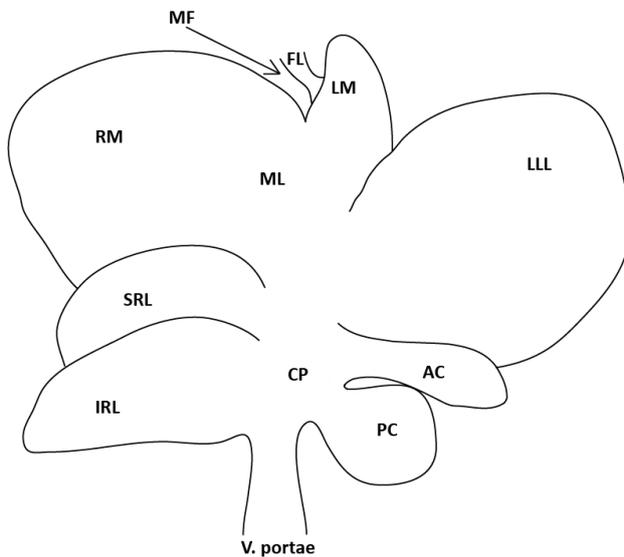


Abb. 2.1: Lobulierung der Rattenleber modifiziert nach Martins et al. 2008⁸⁷.

Der trapezförmige Lobus hepatis medianus ist durch die Fissura umbilicalis (= *Median Fissure*, MF) in einen größeren RML und einen kleineren LML unterteilt. Er ist durch das Ligamentum falciforme (= *Falciform Ligament*, FL) am Diaphragma und der Bauchwand fixiert. Der Lobus hepatis dexter wird durch eine horizontale Fissur in die pyramidenförmigen SRL und IRL unterteilt. Der IRL liegt der rechten Niere direkt an und weist dadurch eine Impressio renalis auf. Der rhombenförmige Lobus hepatis sinister ist nicht durch Fissuren unterteilt und wird teilweise vom ML bedeckt. Der Lobus hepatis caudatus befindet sich hinter dem LLL, links der infrahepatischen V. cava caud. und der V. portae.

Die paracavale Verbindung zwischen den Procc. papp. und dem Lobus hepatis dexter lateralis entspricht dem Processus caudatus (= CP).

Zwischen den beiden scheibenförmigen Procc. papp. verläuft der Oesophagus. Der Proc. pap. anterior (= AC) liegt dem Magen auf.

Leberkapsel und Leberbänder

Die Leberkapsel (Capsula fibrosa hepatis) ist ein bindegewebiger Peritoneumüberzug und wird von subserösem Bindegewebe, der Glisson'schen Kapsel, unterlagert. Die Leber wird durch fünf Leberbänder (Ligamenta hepatica) gehalten. Das sichelförmige Lig. falciforme zieht ventral von beiden Teiles des Lobus medianus hepatis ans Diaphragma und enthält die obliterierte V. umbilicalis als Lig. teres hepatis. Das Lig. coronarium hepatis stellt eine weitere Verbindung zum Zwerchfell dar. Es entspringt ventral und lateral des Austritts der suprahepatischen V. cava caudalis aus der Leber. Das Lig. triangulare dext., bzw. sin. zieht jeweils dorsolateral vom Lob. hep. dext. lat. superior bzw. linken Leberlappen an das Zwerchfell. Die Leberpforte wird durch das aus den Ligamenta hepatogastricum und hepatoduodenale gebildeten kleinen Netz (Omentum minus) mit der kleinen Krümmung des Magens (Curvatura ventriculi minor) verbunden.

Gallengang

Da die Rattenleber keine Gallenblase besitzt wird die Gallenflüssigkeit über die in den Leberlappen verzweigten Gallengänge gesammelt und dem Ductus choledochus zugeführt. Der Hauptgallengang (*Common Bile Duct*= CBD) verläuft im Ligamentum hepatoduodenale dorsal vom Duodenum und im Bereich der Bauchspeicheldrüse. Der Ductus choledochus mündet in der Papilla duodeni major ca. 20 mm vom Pylorus entfernt⁸⁵.

2.4.2 Anatomie und Physiologie der Gefäßversorgung

Die Leber weist die Besonderheit der dualen Gefäßversorgung auf, bei der die arterielle und portalvenöse Blutversorgung voneinander getrennt sind. Das mit Nährstoffen aus den unpaaren Bauchorganen angereicherte, aber sauerstoffarme Blut gelangt über die V. portae in die Leber (funktionelle Blutversorgung). Das sauerstoffreiche Blut wird über den Truncus

coeliacus in die A. hepatica communis (A. hep. com.) und durch die A. hepatica propria (A. hep. prop.) der Leber zugeführt. Die A. hep. com. verläuft im Pancreasgewebe und teilt sich auf Höhe der Pfortader in die A. hep. prop. und die A. gastroduodenalis. Die A. hep. prop. hat einen Durchmesser von 0,2-0,5 mm und ist ca. 5 mm lang⁸⁶. Sie verläuft dorsal der V. portae und unterhalb des CBD. Die V. portae und die A. hep. prop. treten zusammen mit dem Gallengang in der Leberpforte ein und verlaufen gemeinsam als Lappen- und Segmentäste. Die weitere Aufzweigung der Gefäße erfolgt in Aa. und Vv. interlobulares, die zusammen mit den Ästen des Gallenganges im Periportalfeld der Leberläppchen die Glisson-Trias bilden. Erst in den Lebersinusoiden vermischt sich das arterielle mit dem portalvenösen Blut. Die Lebersinusoiden bilden das Kapillargebiet der Lebergefäße und das kapillare Blut wird von den Zentralvenen (Vv. centrales) der Leberläppchen aufgenommen. Die Zentralvenen führen das Blut über Sammelvenen (Vv. sublobulares) den Vv. hepaticae zu. Die Vv. hepaticae schließen sich lappen- und segmentweise zusammen und münden in die V. cava caudalis.

2.4.3 Mikroskopischer Aufbau der Rattenleber

Die Leber übernimmt als Zentrallaboratorium des Körpers verschiedene Aufgaben. Zum einen ist sie maßgeblich am Metabolismus der aus dem Darm resorbierten Nährstoffe beteiligt und für die Synthese von körpereigenen Substanzen verantwortlich. Zum anderen findet in der Leber ein Teil des Kohlenhydratstoffwechsel mit der Speicherung von Glykogen statt, sowie der Proteinstoffwechsel mit der Biosynthese von Plasmaproteinen, insbesondere von Albumin und verschiedenen Gerinnungsfaktoren.

Als Detoxifikationsorgan obliegt der Leber die Biotransformation von endogenen (Steroiden, Bilirubin) und exogenen (Alkohol, Pharmaka) Schadstoffen in eine ausscheidungsfähige Form. Sie ist Hauptsyntheseort von Cholesterin, das zusammen mit den Gallensalzen, Bilirubin, Elektrolyten und Wasser die Gallenflüssigkeit bildet. Trotz der metabolischen Heterogenität werden alle diese Aufgaben von einem einzigen Zelltypus, den Leberzellen (= Hepatozyten) übernommen. Die Hepatozyten enthalten gemäß ihrer Aufgaben einen adäquaten Zellorganellenbestand (hohe Anzahl von Mitochondrien) und weisen meist mehrere polyploide Zellkerne auf. Die sechseckigen Leberläppchen (Lobuli hepatici) bilden die anatomische und funktionelle Grundeinheit der Leber. Ausläufer der Leberkapsel ziehen als feines Bindegewebsgerüst in das Leberinnere und teilen das Parenchym in Leberläppchen ein. Das interlobuläre Bindegewebe umschließt die Lobuli hepatici und die Strukturen der

Glisson-Trias, welche aus den Aa. und Vv. interlobulares und den interlobularen Gallengängen (Ductus interlobularis bilifer) gebildet werden. Die Glisson-Trias liegt jeweils an den Kanten benachbarter Leberläppchen im Periportalfeld.

Die Leberläppchen werden durch Leberzellplatten bestehend aus bis zu zwei Hepatozytenlagen gebildet, die radiär zur abführenden Zentralvene angeordnet sind. Zwischen den Hepatozytenbalken liegen netzartig die Leberkapillaren (= Sinusoide), sodass jede Leberzelle mit dem Kapillarnetz kommuniziert. Die Sinusoide sind mit einschichtigem, gefenstertem Epithel ausgekleidet und besitzen keine Basalmembran, sodass ein makromolekularer Stoffaustausch zwischen den Hepatozyten und den Sinusoiden möglich ist. Dieser findet im Disse-Raum statt, der sich zwischen den Endothelzellen der Sinusoiden und den Hepatozyten befindet.

Ein weiteres Konzept zur Strukturierung des Leberparenchyms ist das nach Rappaport⁸⁸, der den Leberazinus als funktionelle Einheit der Leber beschreibt. Diese Einteilung basiert auf der funktionell-metabolischen Gliederung der Leber und beschreibt die mikrozirkulatorische Bedeutung des Leberazinus. Der Azinus bildet eine Geweberegion, deren Achse aus einem Gefäßbündel der Terminaläste der Strukturen des Portalfeldes ausgeht. Diese vaskuläre Grenzscheide entspricht einer Seite des hexagonalen Leberläppchens und wird jeweils von einem Glisson-Dreieck begrenzt. Zwei sich gegenüberliegende Zentralvenen bilden die Peripherie des Azinus. Die Sinusoide ziehen strahlenförmig von der Azinusachse zu den Zentralvenen. Da sowohl die Blutflussgeschwindigkeit als auch der Sauerstoff- und Nährstoffgehalt des Blutes zur Zentralvene hin abnehmen ergibt sich eine Aufteilung in 3 Zonen. Die periportale Zone 1 wird schnell von gut oxygeniertem und substratreichem Blut durchströmt. Die zweite Zone bildet einen Übergangsbereich zur perizentralen Zone 3, welche mit nährstoff- und sauerstoffarmen Blut gespeist wird. Zone 3 entspricht dem azinären Konzentrationsgradienten zufolge die mikrozirkulatorische Peripherie des Azinus und so wird deutlich, warum die hier liegenden Hepatozyten am vulnerabelsten auf Hypoxie reagieren und sich hypoxisch bedingte Leberschäden in dieser Zone manifestieren. Die Hepatozyten weisen gemäß ihrer zonalen Anordnung morphologische und funktionelle Unterschiede auf.

Das dritte Konzept zur Strukturierung des Leberparenchyms beschreibt das Portalvenenläppchen und stellt den funktional-sekretorischen Drüsencharakter der Leber in den Vordergrund. Im Zentrum des Portalvenenläppchen liegt das Glisson-Dreieck mit dem interlobulären Gallengang. Die äußere Begrenzung erfolgt durch drei Zentralvenen⁸¹.

Gallengangssystem

Die in den Hepatozyten gebildete Gallenflüssigkeit wird über ein netzartiges Drainagesystem abgeleitet. Die Flussrichtung der Galle ist der des arteriellen und portalvenösen Bluts entgegengesetzt.

Die kleinste Einheit bilden die Gallenkanälchen (Canaliculi biliferi), die schlauchartig miteinander anastomosieren und keine Endothelien besitzen. In der Läppchenperipherie gehen die Canaliculi biliferi in größere Ductuli biliferi über, die mit einschichtigem isoprismatischem Epithel ausgekleidet sind. Diese ziehen aus den Leberläppchen ins interstitielle Bindegewebe und vereinigen sich hier zum Ductus interlobularis bilifer, der Teil des Glisson-Trias ist. Der Zusammenfluss der interlobularen Gallengänge führt in den Ausführungsgang, den Ductus hepaticus, der die Leber in der Pforte verlässt und extrahepatisch als Ductus choledochus die Gallenflüssigkeit zur Papilla duodeni major abführt.⁸¹

2.4.4 Klinische Studien zur Hepatozytentransplantation

Die vielversprechenden Ergebnisse der HcTx in tierexperimentellen Studien führen dazu, die gewonnenen Erkenntnisse in klinischen Studien am Menschen zu belegen, insbesondere in Hinblick auf die Etablierung von Alternativmethoden zur OLT. Klinische Studien zur HcTx werden seit 1992 durchgeführt, jedoch in geringer Fallzahl und bei definierten Einzelfällen, da die OLT weiterhin den Goldstandard bei der Behandlung irreversibler Leberschäden darstellt. Dennoch konnten bei einigen Patienten mit der Transplantation autologer und allogener humaner Hepatozyten im Rahmen klinischer Studien zukunftsweisende Resultate insbesondere bei stoffwechselbedingten Lebererkrankungen und akutem Leberversagen erzielt werden.

2.4.4.1 Hepatozytentransplantation bei erblich bedingten Erkrankungen des Leberstoffwechsels

Bei Lebererkrankungen, denen ein hereditärer Defekt des hepatischen Metabolismus zugrunde liegt, scheint die Leberzelltherapie eine gute Alternative zur Transplantation solider Organe darzustellen, da transplantierte allogene Hepatozyten einen Selektionsvorteil gegenüber den endogenen Hepatozyten aufweisen können. Allogene Donorhepatozyten exprimieren die betroffenen Gene, sodass ihre therapierelevante Funktion anhand der synthetisierten Metaboliten nachgewiesen werden kann. Die vielversprechenden Resultate der bereits umfassend erforschten Tiermodelle für metabolische Lebererkrankungen konnten allerdings bisher nur bedingt in klinischen Studien am Menschen belegt werden. Insgesamt wurde die HcTx zur Behandlung von hereditären Leberstoffwechseldefekten bisher bei 21 pädiatrischen Patienten in klinischen Studien angewandt⁴³.

Die Behandlung eines 10-jährigen Mädchen mit Crigler-Najjar-Syndrom Typ 1 (CN-I) im Jahre 1998 durch Fox et al. konnte erstmals das langfristige Überleben bei metabolischer Funktionsfähigkeit der wiederholt intraportal applizierten allogenen Hepatozyten nachweisen. Bis zur HcTx erfolgte eine tägliche Phototherapie von 10-12 h und der Bilirubinspiegel im Serum lag zwischen 25-26,5 mg/dl. Der Patientin wurden über einen Zeitraum von 15 h fraktioniert insgesamt $7,5 \times 10^9$ Hepatozyten über einen transkutanen Portalvenenkatheter appliziert. Es traten keine unerwünschten Nebenwirkungen oder Komplikationen auf. Der portalvenöse Druck wurde während der Prozedur kontinuierlich gemessen. Der

pulmonalarterielle Druck und die O₂-Sättigung blieben konstant, sodass eine umfangreiche Translokation der applizierten Hepatozyten in die Lunge ausgeschlossen werden konnte. Die immunsuppressive Therapie erfolgte durch die Gabe von Methylprednisolon (= MP) und Tacrolimus. Der Serumbilirubinspiegel sank innerhalb von 35 Tagen signifikant auf Werte zwischen 10,6–14,0 mg/dl und die Phototherapie konnte auf 6-8 h täglich reduziert werden. Über einen Beobachtungszeitraum von 11 Monaten post-HcTx lagen die Serumbilirubinwerte durchschnittlich bei 14 mg/dl und außerdem konnte ein geringer Prozentsatz konjugierten Bilirubins nachgewiesen werden⁸⁹. In 3 weiteren Fällen des CN-I konnte ebenfalls eine Reduktion des Bilirubinspiegels um 30-50 % gezeigt werden⁴³.

Beim erblich bedingten Harnstoffzyklusdefekt liegt ein Mangel der Ornithin-Transcarbamylase (= OTC) vor, sodass NH₃ nicht adäquat in den Leberzellen zu Harnstoff verstoffwechselt und über die Niere ausgeschieden werden kann. Die daraus entstehende Hyperammonämie hat neurotoxische Effekte. Bei insgesamt 4 pädiatrischen Patienten mit hereditärem OTC-Mangel wurde eine HcTx durchgeführt⁴³. In drei Fällen normalisierte sich der NH₃-Spiegel und es konnte auf eine proteinreduzierte Diät verzichtet werden. Es konnte in einem Zeitraum von 11 Tagen bis 7 Monaten eine OTC-Aktivität anhand von Leberbiopsien nachgewiesen werden^{90,91}. Ein Patient verstarb innerhalb von 42 Tagen aufgrund eines septischen Schocks. Die anderen Patienten erhielten mehrere Monate nach der HcTx eine Lebertransplantation.

Die allogene HcTx wurde des Weiteren bei pädiatrischen Patienten mit Faktor VII-Defizienz (n=2), Glykogenspeicherkrankheit Typ Ia (n=2), infantilem Refsum-Syndrom (n=1) und bei progressiver familiärer intrahepatischen Cholestase (n=2) angewendet und führte in der Mehrheit der Fälle zur Reduktion der unerwünschten Metaboliten, jedoch ohne Langzeiterfolge, sodass eine OLT durchgeführt wurde⁴³. Grossman et al. untersuchten ab 1994 die HcTx zur Behandlung familiärer Hypercholesterinämie in Kombination mit *ex vivo*-Gentherapie der autologen Hepatozyten. In der klinischen Studie wurde 5 Patienten mit homozygoter FH das linke Lebersegment reseziert und die daraus isolierten Hepatozyten exprimierten durch Transduktion mit einem rekombinanten Retrovirus anschließend das Gen für den LDL-Rezeptor. Die HcTx erfolgte intraportal 3 Tage nach der Resektion, um den Proliferationsreiz maximal auszunutzen. Bei 3 Patienten wurde post-HcTx eine Reduktion des Serumcholesterinspiegels um 20 % gemessen. Tumorerkrankungen oder Infektionen traten in einem Beobachtungszeitraum von 2 Jahren nicht auf. Die Expression der transgenen LDL-Rezeptoren betrug jedoch nach 4 Monaten lediglich noch < 5 %^{92,93}.

2.4.4.2 Hepatozytentransplantation bei akutem Leberversagen

Ein Großteil der klinischen Studien zur HcTx beschäftigt sich mit dem Anwendungsgebiet des akuten Leberversagens unterschiedlicher Ätiologie. Dabei steht die Überbrückung des Patienten durch eine Leberzelltherapie bis zur Regeneration der Leberfunktion oder OLT im Vordergrund.

Strom et al. untersuchten 1997 die Allotransplantation unmodifizierter humaner Hepatozyten bei ALF verschiedener Ätiologie zum *Bridging* bis zur OLT in einer klinischen Studie mit 5 Patienten. Alle Patienten hatten eine Enzephalopathie-Grad IV, sowie eine ausgeprägte Hyperammonämie. Die Applikation der Hepatozyten erfolgte über die Milzarterie. Nach der HcTx verbesserten sich der NH_3 -Spiegel bis zum Erreichen physiologischer Werte, der intrakranielle Druck wurde halbiert und die zerebrale Perfusionsrate regulierte sich bei allen Patienten. 3 Patienten konnten erfolgreich nach 2-10 Tagen einer OLT zugeführt werden und überlebten diese für mindestens 20 Monate. In einer Kontrollgruppe mit Patienten, deren ALF ein vergleichbares Ausmaß annahm und die keine HcTx erhielten, überlebte kein Patient länger als 3 Tage ⁵⁰.

In einer weiteren klinischen Studie 1999 konnten 6 von 9 Patienten mit ALF durch die HcTx erfolgreich einer OLT zugeführt werden und bei einer Patientin mit Hepatitis-B-induziertem akutem Leberversagen zeigte sich eine umfassende Leberregeneration post-HcTx, sodass sie ohne OLT entlassen werden konnte ⁹⁴.

Bilir et al. haben 2000 eine klinische Studie mit 5 Patienten durchgeführt, die ein ALF hatten, aber nicht den Kriterien für eine OLT entsprachen. Alle Patienten wurden intensivmedizinisch betreut und hatten einen Enzephalopathie-Grad III-IV. Als weitere klinische Parameter wurden eine ausgeprägte Hyperbilirubinämie, sowie ein Faktor-V-Spiegel von < 5 U/ml erhoben. Nach der Applikation von 10^9 - 10^{10} allogenen Hepatozyten über die Milzarterie und/oder die V.portae konnte bei 3 Patienten eine Verbesserung der Werte nachgewiesen werden und sie überlebten 12, 28 bzw. 52 Tage nach der HcTx ⁹⁵. Bei einer 64-jährigen Patientin mit ALF aufgrund einer Knollenblätterpilzvergiftung regenerierte sich die Leber nach HcTx innerhalb von 8 Wochen vollständig ohne OLT (*restitutio ad integrum*). Die einmalige intraportale Transplantation von 8×10^9 kryokonservierten allogenen Hepatozyten erfolgte über einen Intervall von 30 h und *post transplantationem* zeigten sich stetige Verbesserungen der klinischen Parameter innerhalb von 36 h. Die Immunsuppression mit CsA konnte nach 12 Wochen abgesetzt werden ⁹⁶. Die Behandlung des akuten Leberversagens in klinischen Studien mit der Transplantation humaner Hepatozyten in 37 Fällen konnte zeigen, dass dieses

Alternativverfahren zur Überbrückung bis zur OLT und in 6 Fällen sogar zur vollständigen Regeneration der geschädigten Leber führen kann. Nach der HcTx wurden in der überwiegenden Anzahl der Fälle signifikante Verbesserungen der Leberfunktionsparameter gemessen, somit konnte die therapeutische Wirksamkeit gezeigt werden⁴³. Zukünftig müssen klinische Studien mit größeren Fallzahlen und einheitlichen Zellapplikationsprotokollen durchgeführt werden, um statistisch signifikante Aussagen zur klinischen Anwendbarkeit der HcTx treffen zu können.

2.4.4.3 Hepatozytentransplantation bei chronischem Leberversagen

Das chronische Leberversagen bzw. die zirrhotisch bedingte Leberfunktionsstörung stellt aufgrund der pathologischen Gewebe- und Gefäßarchitektur der Leber einen Sonderfall bei der klinischen Untersuchung der HcTx dar. Durch die häufige Shuntbildung und die portale Hypertonie müssen auch ektope Applikationsorte für eine HcTx gewählt werden, wobei sich die Milz aufgrund der bei chronischen Lebererkrankungen typischen Hypertrophie als Applikationsort anbietet⁵⁰.

Im Gegensatz zu der morphologisch intakten Leber muss davon ausgegangen werden, dass die zirrhotische Leber ungünstigere Repopulationsbedingungen für die transplantierten Hepatozyten bietet. Mito et al. führten 1992 eine klinische Studie mit 10 Probanden durch, denen das linkslaterale zirrhotische Segment reseziert und zur Isolierung der autologen Hepatozyten genutzt wurde. Die Applikation der isolierten Leberzellen erfolgte direkt ins Milzparenchym und die durch Technetium 99 markierten Hepatozyten konnten in einem Zeitraum von 1-11 Monaten nachgewiesen werden. Eine signifikante Verbesserung der hepatischen Enzephalopathie trat jedoch nicht auf⁹⁷.

Auch weitere Anwendungen der HcTx für Patienten mit Leberzirrhose konnten bislang keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern. Es bleibt zu klären, ob eine wiederholte Applikation unmodifizierter allogener Hepatozyten bessere Resultate liefert und ob zirrhotische Organe generell als Zellquelle für die humane HcTx in Frage kommen. Sollte sich in zukünftigen Forschungsergebnissen eine Tendenz abzeichnen, dass Organe mit fortgeschrittener Zirrhose keine adäquate Hepatozytenqualität für eine HcTx liefern, beschränkt dies die Ressourcen für die klinische Anwendung der HcTx erheblich. Auch wenn mit der Zellausbeute einer Isolierung theoretisch mehrere Patienten behandelt werden können und die Möglichkeit der Kryokonservierung besteht, ist die Zahl der Donorlebern für eine HcTx begrenzt.

2.5 Leberregeneration und hepatische Progenitorzellen

Die einzigartige Regenerationskapazität der Leber nach Zell- oder Gewebeverlust beruht auf dem proliferativen Potenzial adulter Hepatozyten. Diese hoch differenzierten Zellen reagieren auf einen Regenerationsstimulus (Tumorresektion, Nekrosen bedingt durch akute Lebererkrankungen) indem sie proliferieren und durch eine kompensatorische Hyperplasie den Zellverlust funktionell ausgleichen können⁹⁸.

Die $\frac{2}{3}$ Leberteilektomie (PH) ist das bekannteste Tiermodell um die Regenerationskapazität adulter Hepatozyten zu untersuchen. Nach 1-2 Zellzyklen der verbliebenen proliferativen Hepatozyten wird die ursprüngliche Lebermasse durch weitestgehend unbekannte Regulationsmechanismen wiedererlangt, wobei die anatomische Grundstruktur jedoch nicht erhalten bleibt⁹⁹. Versuche mit transgenen uPA⁺-Mäusen und FAH⁻-Mäusen, bei denen eine kontinuierliche Leberzellschädigung vorliegt, zeigten nach wiederholter Transplantation von Wildtyp-Hepatozyten, dass adulte Hepatozyten unter diesen Voraussetzungen bis zu 69 Zellzyklen durchlaufen und ein nahezu unlimitiertes Proliferationspotenzial haben. Das geschädigte Leberparenchym konnte durch die transplantierten Hepatozyten unter Wiederherstellung der normalen Läppchenstruktur repariert werden^{68,69}.

Michalopoulos et al. konnten 2005 in einem Rattenmodell zeigen, dass adulte Hepatozyten bei Vorliegen einer massiven Cholestase in der Lage sind, sich zu Cholangiozyten zu transdifferenzieren und neue Gallengangäste zu bilden. Adulte Hepatozyten können somit unter bestimmten experimentellen Bedingungen als Leberstammzellen fungieren¹⁰⁰.

Zu den charakteristischen Eigenschaften von Stammzellen zählen Selbsterneuerung, Multipotenz bezogen auf die Fähigkeit, sich in mindestens 2 Zelltypen differenzieren zu können sowie Wiederherstellung (Reparatur) beschädigten Gewebes und die Möglichkeit zur wiederholten Transplantation¹⁰¹. Adulte Hepatozyten stellen somit die optimale Zellquelle für Leberzelltransplantationen zur regenerativen Therapie bei Leberversagen dar. Allerdings ist die Verfügbarkeit adulter humaner Hepatozyten begrenzt, und bisherige *in vitro* Kultivierungsversuche zur Vermehrung unter Erhalt metabolisch und proliferativ aktiver Zellen verliefen erfolglos¹⁰². Jedoch konnte gezeigt werden, dass insbesondere aus vorgeschädigten Lebern, die nicht für eine Transplantation in Frage kamen, isolierte Hepatozyten eine erhöhte metabolische Aktivität aufweisen¹⁰³.

Ist die Regenerationskapazität adulter Hepatozyten durch massive Leberzellnekrosen oder chronisch degenerative Lebererkrankungen blockiert, kommt es zu einer Proliferationsinduktion der hepatischen Progenitorzellen (= hPC)¹⁰⁴. Die Schwere der

Lebererkrankung steht dabei in direktem Verhältnis zur Anzahl der aktivierten Vorläuferzellen¹⁰⁵. Von herausragender Bedeutung für die Erforschung alternativer Zellquellen für die Leberzelltransplantation (LCTx) sind die erstmals 1956 von Farber im Tiermodell beschriebenen „*Oval Cells*“ (= OC). Es handelt sich dabei um kleine bipotente Zellen mit charakteristischem ovalem Zellkern und einem hohen Nucleus-Cytoplasma-Verhältnis^{99,106}.

Ovalzellen differenzieren, unter Voraussetzung einer Proliferationsinhibition adulter Hepatozyten, *in vivo* sowohl zu Hepatozyten als auch zu Gallengangsepithelzellen¹⁰⁷. Es besteht eine Präkursor-Produkt-Beziehung zwischen OC und reifen Hepatozyten¹⁰⁸.

In tierexperimentellen Studien konnten mehrere OC-Aktivierungsprotokolle etabliert werden, wobei eine toxische Blockade der Hepatozytenproliferation mit einem generellen Regenerationsreiz kombiniert wird. Besonders effizient erwies sich dabei im Rattenmodell das Solt-Farber-Protokoll, eine Kombination des mitoinhibitorischen Agens 2-Acetylaminofluorene (= 2-AAF) mit einer PH¹⁰⁹⁻¹¹¹. Das 2-AAF kann nur von reifen Hepatozyten metabolisiert werden und reichert sich intrazellulär als toxisches Derivat ab, welches den Zellzyklus blockiert. Hepatische Progenitorzellen (insb. OC) sind nicht in der Lage, 2-AAF zu verstoffwechseln und haben somit einen Proliferationsvorteil gegenüber den mitoinhibierten Hepatozyten. Die Dauer des Vorbehandlungszeitraumes (2-AAF und PH bis zur Isolierung der hPC) variiert in der Literatur und als optimaler Zeitpunkt wird eine Leberzellisolierung zwischen dem 9. und 11. Tag nach der Leberteilektomie beschrieben^{110,112-114}.

Weitere Methoden der OC-Aktivierung umfassen die Verwendung von Ethionin, D-Galactosamin oder einer Cholin-armen Diät in Verbindung mit der Proliferationsinduktion durch Carbontetrachlorid (= CCl₄) oder einem Allylalkohol⁹⁹. Die Tatsache, dass hepatische Progenitorzellen nicht ohne eine Blockade der adulten Hepatozyten proliferieren und somit nicht unter ständiger Selbsterneuerung stehen, prägte den Begriff der „fakultativen hepatischen Stammzellen“^{99,107,115}.

Genexpressionsanalysen der an der Leberregeneration beteiligten hepatischen Stammzellen zeigten, dass es sich um ein heterogenes Zellkompartiment handelt, in dem Zellen mit variablem Differenzierungsgrad verschiedene Oberflächenantigene exprimieren. Bisher konnte im Rahmen der OC-Aktivierungsprotokolle kein spezifischer „Universalmarker“ identifiziert werden¹¹⁶. Die Tatsache, dass sowohl Oberflächenmerkmale fetaler Hepatozyten (α -Fetoprotein =AFP) als auch Marker adulter Hepatozyten (Albumin, Creatin-Kinase =CK-18) und adulter Gallengangszellen (CK-7, Ovalzellmarker =OV-6) parallel von

hepatischen Stammzellen exprimiert werden, bestätigt die Annahme, dass zum gleichen Zeitpunkt ein breites Spektrum an phänotypisch intermediären Zelltypen verschiedener Reifestufen vorliegt¹¹⁷. In älteren Veröffentlichungen wurde der Ursprung der OC hinsichtlich der Expression verschiedener für die hämatopoetischen Stammzellen spezifischer Oberflächenproteine wie (Thymus-Zell-Antigen=) Thy-1, c-kit und (*Cluster of Differentiation*=) CD-34 kontrovers diskutiert¹¹⁸. Überwiegende Einigkeit besteht darin, dass die OC in den Herringschen Kanälen lokalisiert sind, ein Knochenmarkursprung aufgrund der spezifischen Oberflächenmarker aber nicht auszuschließen sei^{115,119}.

Yovchev et al. konnten jedoch 2008 durch eine detaillierte Untersuchung der OC-Genexpression zeigen, dass *Epithelial Cell Adhesion Molecule* =EpCAM positive (EpCAM⁺) Zellen des Ovalzellkompartiments leberspezifische Stammzellen sind und Thy-1⁺-Zellen eine getrennte Zellpopulation darstellen¹¹⁴. In dieser präklinischen Studie konnte des Weiteren bewiesen werden, dass OC in der Lage sind, mit Retrorsin vorbehandelte Rattenlebern erfolgreich zu repopularisieren und somit maßgeblich zur Leberregeneration beitragen können, wenn adulte Hepatozyten aufgrund schwerwiegender Parenchymschädigungen dazu nicht in der Lage sind¹¹⁴. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte LCTx (*combined Liver Cell Transplantation*= cLCTx) von adulten Hepatozyten und OC eine verbesserte Repopularisierung des Empfängerorgans gegenüber der Transplantation von adulten Hepatozyten allein bewirkt¹²⁰. Die in den Nagermodellen gewonnenen Erkenntnisse konnten bislang nur teilweise auf den Menschen übertragen werden. Zum einen wird eine Detektion der humanen hPC erschwert, da es keine klinisch anwendbaren Aktivierungsprotokolle für die fakultativen Stammzelle der humanen Leber gibt, zum anderen muss von speziesspezifischen Unterschieden der Oberflächenproteine ausgegangen werden, sodass bisher kein spezifischer Marker identifiziert werden konnte. Eine bessere Aufreinigung der isolierten hPC beispielsweise durch immunologische Zellsortierung und weitere sensitive molekulare Nachweismethoden mit anschließenden Klonalitätsanalysen werden in Zukunft mehr Aufschluss über den Ursprung der fakultativen Stammzellen der Leber und deren Rolle in der Leberregeneration geben¹²¹.

Die Nomenklatur der an der Leberregeneration beteiligten hPC ist uneinheitlich, aber die häufig verwendeten Termini „*Ductular Reaction*“, „*Ductular Hepatocytes*“ und „*Ductular Proliferative Cells*“ verdeutlichen den Ursprung der proliferativen Zellen in den Terminalästen der Cholangiolen¹¹⁶. Trotz morphologischer Unterschiede geht man davon aus, dass die in chronisch erkrankten Lebern oder Lebern mit massiver Nekrose gefundenen Zellen ein humanes Pendant zu den OC sind¹²². Diese Zellen weisen bipolare Strukturen auf

und können phänotypisch in zwei Polregionen mit jeweils überwiegend hepatozyten- bzw. cholangiozytenähnlichen Merkmalen und einer Intermediärzone eingeteilt werden ¹²³.

Schmelzer et al. isolierten EpCAM⁺-hPC, die sich anhand der weiterführenden Markerexpression als bipotent erwiesen und nach erfolgreicher Repopulation der Lebern von SCID (= *Severe Combined Immunodeficiency*)-Mäuse zu adulten humanen Hepatozyten differenzierten ¹²⁴.

Zukünftig werden weitere umfangreiche Untersuchungen des humanen Stammzellkompartiment der Leber nötig sein, um deren Potenzial für die Leberzelltherapie besser einschätzen zu können und ihre Rolle in der Leberregenerationsmedizin zu evaluieren.

2.5.1 Extrahepatische Stammzellen als alternative Zellquellen

Zu den extrahepatischen an der Leberregeneration beteiligten Stammzellen zählen mesenchymale Stammzellen (= MSC) aus dem Knochenmark und aus Nabelschnurblut, sowie hämatopoetische Stammzellen (= HSC) des Knochenmarks und embryonale Stammzellen (= ESC).

Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks werden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in Hepatozyten, ihres hohen Proliferationspotenzials und den vergleichsweise einfachen Kultivierungsbedingungen als alternative Zellquelle für die Leberunterstützungstherapie diskutiert ¹²⁵. Aurich et al. transplantierten humane MSC mit Knochenmarksursprung in Mäuselebern, wo diese zu Hepatozyten differenzierten und sich ins Leberparenchym integrierten ¹²⁶. Die gemeinsame Expression mesenchymaler und epithelialer Oberflächenmarker von hepatischen Progenitorzellen deutet ebenfalls darauf hin, dass MSC als alternative Zellquelle für die Leberzelltherapie in Frage kommen ¹¹⁴. Allerdings muss ihr therapeutisches Potenzial gegenüber der bereits belegten Bedeutung adulter Hepatozyten und Leberprogenitorzellen für die Leberregeneration in zukünftigen Versuchen bewiesen werden.

HSC des Knochenmarks gelten ebenfalls als vielversprechende Kandidaten für die zellbasierte Leberregenerationstherapie. Die Identifikation verschiedener bisher als hämatopoetische Stammzellmarker bekannter Oberflächenproteine der OC und die Transdifferenzierung zu Hepatozyten hat zu der weiterführenden Untersuchung des Knochenmarks als möglichen Zellursprung der hPC geführt. Bei der Transplantation von männlichen HSC in weibliche Empfänger, konnten Y-Chromosomen in den Hepatozyten der

Empfänger nachgewiesen werden¹²⁷. Die Transplantation autologer CD133⁺ HSC aus dem Knochenmark führte in einer klinischen Studie bei Embolisation des rechten Pfortaderasts zu einer verstärkten regenerativen Volumenzunahme des linken Leberlappens¹²⁸. Die Repopulationseffizienz transplanteder HSC mit Knochenmarksursprung und der therapeutische Effekt auf FAH-Mäuse war jedoch verglichen mit einer Hepatozytentransplantation gering¹²⁹. Die Bedeutung der HSC für die komplexen Leberregenerationsprozesse werden weiterhin kontrovers diskutiert, da eine Zellfusion die Ursache für die Transdifferenzierung sein kann und es sich somit um polyklonale Zellen handelt, die nur unter bestimmten experimentellen Bedingungen zu Hepatozyten differenzieren^{130,131}.

ESC sind totipotente Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste, deren kontrollierte Differenzierung *in vitro* und *in vivo* entlang der Leberzelllinie möglich ist. Aufgrund der ethischen Vorbehalte und des ungeklärten Risikos zur Teratombildung durch transplantierte ESC spielen sie als alternative Zellquelle für die klinische Leberzelltherapie eine untergeordnete Rolle¹⁰².

2.6 Operationale Toleranz

Die Leber zählt aufgrund der geringen Inzidenz (hyper-)akuter Abstoßungsreaktionen, der geringen benötigten Immunsuppressionsdosis und der Entstehung spontaner Toleranz zu den immunprivilegierten Organen. Verglichen mit den Transplantationsergebnissen anderer Organe, können Lebertransplantationen auch bei geringer HLA-Übereinstimmung vorgenommen werden. Die Leber ist in der Lage, sich nach Abstoßungsreaktionen zu regenerieren ohne weitreichende Parenchymschäden oder Funktionsverluste zu erleiden¹³². Lebertransplantate haben einen immunmodulatorischen Effekt, wenn sie zusammen mit weiteren Organen transplantiert werden (z.B. Leber-Nieren-Transplantation) und es wird davon ausgegangen, dass sie selbst an der Entstehung operationaler Toleranz beteiligt sind¹³³. Das spezielle Mikroenvironment der Leber, die aufgrund der Anatomie ihrer Blutversorgung einer kontinuierlichen Exposition mit Antigenen unterliegt, begünstigt das tolerogene Potenzial der leberständigen T-Zellen¹³⁴. Das Auftreten spontaner Toleranz wurde zunächst in Tiermodellen mit MHC-I-histoinkompatiblen Stammkombinationen beobachtet¹³⁵. Als operationale Toleranz hingegen bezeichnet man eine donor-spezifische Toleranz des

allogenen Transplantats bei Aufrechterhaltung der Immunkompetenz gegenüber sonstigen Fremdanigenen ohne kontinuierliche Gabe von Immunsuppressiva¹³⁶. Die Leber ist bestens geeignet, um die Mechanismen zur Entstehung der operationalen Toleranz zu untersuchen. Ziel dieser Studien ist es, die Nebenwirkungen der Immunsuppression mit den aufgeführten Komorbiditäten und der damit einhergehenden Einschränkung der Lebensqualität zu minimieren. Die klinisch induzierbare operationale Toleranz nach solider Organtransplantation stellt das Optimum für Transplantationspatienten dar. Sie ist Kern aktueller Forschungsvorhaben zur Identifikation der beteiligten Mechanismen für die Etablierung eines reproduzierbaren Protokolls in der Klinik. Die exakten Mechanismen zur Entstehung operationaler Toleranz sind bis dato nicht geklärt, sicher ist jedoch, dass T-Zellen dafür von zentraler Bedeutung sind.

Für die Toleranzinduktion ist ein Gleichgewicht zwischen zytotoxischen T-Zellen und solchen mit immunregulatorischen Eigenschaften bedeutend. Die Tregs (CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Lymphozyten) scheinen aktiv an der Toleranzentstehung beteiligt zu sein¹³⁷. Die mit dem Lebertransplantat übertragenen löslichen MHC-I-Moleküle führen zur Apoptose von alloreaktiven T-Zellen und schützen das Transplantat vor Abstoßungsreaktionen. Außerdem werden mit dem Transplantat Leukozyten des Donors übertragen (*Passenger Leucocytes*), die zur Ausbildung von Mikrochimärismen führen und so die Toleranzinduktion unterstützen. Es wird angenommen, dass eine Kombination dieser Reaktionen zur Entstehung der operationalen Toleranz führt¹³⁶.

2.6.1 Präklinische Untersuchungen zur Toleranzinduktion

Die spontane Toleranz nach Lebertransplantation ist aus verschiedenen Tiermodellen und Stammkonstellationen einer Tierart bekannt. In experimentellen Modellen konnten den Rezipienten nach der Toleranzinduktion weitere Gewebetransplantate desselben Donors transplantiert werden, ohne eine Abstoßungsreaktion hervorzurufen. Gewebe einer dritten Partei wurden jedoch akut abgestoßen^{138,139}.

Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen sind insbesondere Rattenmodelle toleranter Stammkombinationen bedeutsam. Dresske et al. haben die Beteiligung der vom Transplantat selbst ausgehenden Reaktionen durch lösliche MHC-I-Moleküle und *Passenger Leucocytes* an der Toleranzentstehung im toleranten Lewis- (= LEW) zu Dark Agouti

(= DA)-Lebertransplantationsmodell nachweisen können ¹⁴⁰. In Versuchen mit der gleichen Stammkombination konnte die tolerogene Wirkung von löslichen MHC-I-Antigenen durch die induzierte Apoptose alloreaktiver T-Zellen anhand verlängerter Transplantatüberlebenszeiten belegt werden ¹⁴¹.

Otto et al. gelang der Nachweis der immunregulatorischen Funktion intrahepatischer Tregs und deren Beteiligung an der Toleranzinduktion im DA auf Lew Lebertransplantationsmodell ¹⁴². Huang et al. untersuchten in einer Rattenstudie mit jeweils einer toleranten Stammkombination und einer Stammkombination, die zu Rejektionen führt, den Einfluss von CsA und MP auf die Toleranzausprägung. Diese experimentelle Studie zeigte, dass CsA eine Abstoßungsreaktion verhindert ohne die Toleranzinduktion zu inhibieren. Ein Immunsuppressionsregime mit MP hingegen unterdrückte die Toleranzentstehung, da die benötigte vom Transplantat ausgehende primäre Immunantwort ausblieb. Die Auswahl der Immunsuppression beeinflusst also die Ausprägung der operationalen Toleranz ¹⁴³.

2.6.2 Klinische Studien zur Toleranzinduktion

Das Auftreten spontaner Toleranz nach OLT durch *Non-Compliance* der Patienten wurde erstmals 1993 von Starzl untersucht und konnte in 6 Fällen eine mehrjährige normale Leberfunktionen ohne Gabe von IS zeigen ¹⁴⁴. Ein temporäres Absetzen der IS ist beim Auftreten von PTLD oder massiven Infektionen nach OLT erforderlich. Die Ergebnisse klinischer Studien hierzu konnten zeigen, dass eine vorübergehende Unterbrechung der IS ohne ein erhöhtes Risiko des Transplantatverlustes möglich ist. Beim Auftreten von Rejektionsreaktionen wurde die IS wieder begonnen ^{145,146}. Die Untersuchung der ausschleichenden Gabe von Immunsuppressiva (Entwöhnung= *Weaning*) bis zum vollständigen Absetzen wurde mit ausgewählten LTx-Patienten untersucht. Die Patientenauswahl für diese klinischen Studien variiert jedoch stark bezüglich der Indikationen zur OLT, Zeitraum nach OLT und Dauer des *Weanings* sowie der Auswahl der immunsuppressiven Medikation.

Patienten mit immunologisch bedingten Lebererkrankungen wurden von klinischen Studien zur Untersuchung der Induktion der operationalen Toleranz ausgeschlossen. Abstoßungsreaktionen wurden häufig allein anhand klinischer Parameter ohne histologische Bestätigung durch Leberbiopsien diagnostiziert. Die Bedeutung der Toleranzinduktion für pädiatrische Lebertransplantationspatienten wurde bisher nur in 2 klinischen Studien

untersucht, obwohl insbesondere diese Patienten vom *Weaning* hinsichtlich der Langzeitergebnisse nach OLT profitieren können. Auch der Vergleich zwischen LDLT und DDLT bezüglich der Auswirkungen auf die klinische Induktion operationaler Toleranzen ist bis dato nicht hinreichend untersucht worden¹³³. Die Ergebnisse bisheriger klinischer Studien konnten zusammenfassend zeigen, dass ein *Weaning* bis zum mehrjährigen vollständigen Absetzen der Immunsuppression (= IS) bei ca. 25 % (n= 168) der untersuchten Lebertransplantationspatienten möglich ist. Die auftretenden Fälle akuter Abstoßungsreaktionen waren voll reversibel und mit dem Wiedereinsetzen der IS zu behandeln^{147,148}.

Um die Langzeitergebnisse und die Lebensqualität von Lebertransplantationspatienten verbessern zu können sind weitreichende klinische Studien zur Entstehung operationaler Toleranzen nach OLT notwendig. In Europa formte sich das multinationale Projekt Riset (= *Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance*, <http://www.nds.ox.ac.uk/riset/>) und wie auch die amerikanische Organisation ITN (= *Immune Tolerance Network*, <http://www.immunetolerance.org/>) evaluieren diese klinischen Forschungskonsortien die Ergebnisse internationaler Studien, um klinisch anwendbare Protokolle zur Toleranzinduktion zu etablieren. Weitere Forschungsschwerpunkte sind die Identifikation eines immunologischen Phänotyps anhand von Biomarkern und Assays, um für das Absetzen der IS infragekommende Patienten zu bestimmen.

3 Material und Methoden

3.1 Wahl der Ratte als Versuchstier

Die von der Wildform *Rattus norvegicus* abstammende Laborratte wurde als Versuchstier ausgewählt, da sie verschiedene Vorzüge in Hinblick auf die Durchführbarkeit des Projekts mit sich bringt. Bei der Beurteilung des sinnesphysiologischen Differenzierungsgrades wurde die Ratte der Maus aufgrund der Größenverhältnisse, die für eine OLT notwendig sind, vorgezogen.

Die Gesamtbelastung der Tiere wurde soweit wie möglich reduziert durch Handling vor Beginn der Versuche, durch optimierte Operationsmethoden, sowie eine engmaschige postoperative Überwachung.

Die Verabreichung der stoffwechselbelastenden Substanzen wie Retrorsin und 2-AAF wurden in für den Versuchsaufbau notwendigen Minimaldosierungen gehalten. Das *Environment* der Tiere wurde durch *Cage Enrichment* in Form von Röhren und Nestbaumaterial an die Bedürfnisse der Ratten angepasst. Die Haltung von Laborratten ist neben den bereits genannten ethischen Aspekten aus ökonomischen Gründen einem Großtiermodell vorzuziehen.

Des Weiteren ist die Verfügbarkeit von Inzucht- Stämmen aus Bruder-Schwester-Verpaarungen über mindestens 20 Generationen essentiell für die Fragestellung des Neo-Hybriden Lebertransplantats, da sie eine Abstoßung innerhalb des gleichen Tierstammes ausschließt und die Isolierung syngener Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen ermöglicht. Die Transplantation syngener Leberzellen soll im Versuchsaufbau die Möglichkeit der Autologisierung der Donorleber zeigen. Dieser Versuchsaufbau entspricht der Transplantation autologer (humaner) Hepatozyten im Rahmen zukünftiger klinischer Studien.

Zum anderen ist ein bestehendes Rejektionsmodell, beispielsweise die histoinkompatible Transplantation einer Dark Agouti-Spenderleber auf ein Lewis-Empfängertier, notwendig um die Vorteile der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation *in vivo* untersuchen zu können.

3.1.1 Aufbau des Rattenmodells

Alle Versuchstiere wurden von der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland bezogen.

Das Tiermodell umfasst 3 Rattenstämme:

Männliche, ingezüchtete Lewis-Ratten des Lew/HanTM Hsd-Stamms (Haplotyp RT1^l) mit einem Gewicht von ca. 200-230 g und einem Alter von 8-10 Wochen. Die männlichen Lew-Ratten dienten als syngene Hepatozyten- und Leberprogenitorzellspender. Zur Proliferationsinduktion der hPC wurden die Zellspender mit einer Kombination aus 2-AAF und einer 60 %-igen PH vorbehandelt.

Weibliche, ingezüchtete Lewis-Ratten des Lew/HanTM Hsd-Stamms (gleicher Haplotyp RT1^l wie männliche Leberzellspender = syngen) mit einem Gewicht von ca. 200-220 g und einem Alter von 9-12 Wochen. Die weiblichen Lew-Ratten waren Empfänger der cLTx.

Weibliche Dark-Agouti (= DA)-Ratten des RT1^{av1}-Stamms mit einem Gewicht von ca. 160-180 g und einem Alter von 9-12 Wochen. Die DA-Ratten dienten nach einer Vorbehandlung mit Retrorsin als Donoren/Spender des allogenen Lebertransplantats.

Tab. 1: Zusammenfassung der verwendeten Rattenstämme und deren Verwendung im Versuchsaufbau.

Stamm	Geschlecht	Gewicht	Verwendung
Lew Han TM Hsd	männlich	200-230 g	Leberzellspender
Lew Han TM Hsd	weiblich	200-220 g	Empfänger cLTx
DA RT1 ^{av1}	weiblich	160-180 g	Leberdonor

Abk.: cLTx= kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation, DA= Dark Agouti, g= Gramm, Lew= Lewis.

3.1.2 Tierhaltung

Alle Versuchstiere wurden tierschutzgerecht in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum gehalten. Die Unterbringung erfolgte gruppenweise zu 3-5 Tieren in Typ-IV-Makrolonkäfigen, welche mit *Enrichment* (Röhren, Häuschen, Nagehölzer) ausgestattet wurden und mit hygienisch einwandfreier, standardisierter Einstreu gefüllt waren. Die Fütterung erfolgte mit V1534-000 ssniff R/M-H Alleinfutter für Ratten und Trinkwasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die physikalische Umwelt der Tiere wurde ihren Bedürfnissen angepasst, wobei eine konstante Raumtemperatur von 22+/- 2 °C

bei einer Luftfeuchte von 40-70 % herrschte. Es wurde ein Tag-Nachtrhythmus von 12 h eingehalten. Die Beleuchtung erfolgte gemäß den Ansprüchen der Albinotiere bei <60 lux im Käfig sowie < 250 lux im Raum.

Nach operativen Eingriffen wurden die Tiere zunächst für 24 h einzeln in Typ-III-Makrolonkäfige gesetzt, um ein postoperatives Monitoring zu erleichtern und eventuellen Stress durch Gruppentiere zu reduzieren.

Die in diesem Projekt geplanten Tierversuche wurden nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter der Nummer G 0417/09 bei der zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) genehmigt.

3.2 Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf

Wie in Abb. 3.1 zu sehen ist, umfasst der Versuchsablauf verschiedene Arbeitsschritte, deren zeitlicher Ablauf aufeinander abzustimmen war. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Vorbehandlungen und Operationen erfolgt in den Kapiteln 3.3 und 3.4.

Die weiblichen Dark Agouti Ratten (Leberspender) wurden zweimalig im Abstand von 14 Tagen insgesamt zwischen 45-50 Tagen vor der Leberexplantation mit Retrorsin vorbehandelt.

Für die Proliferationsinduktion der hPC erfolgte die Behandlung der männlichen Lewis-Ratten (Leberzellspender). Dazu wurde den Tieren an Tag 0 ein 2-AAF-Pellet subcutan appliziert, welches fortan eine kontinuierliche Dosis freisetzte. Am 6. Tag nach der 2-AAF-Applikation erfolgte eine 60 %-ige partielle Hepatektomie als zusätzlicher Proliferationsstimulus. Die Leberzellisolierung der adulten Hepatozyten und hPC dieser Tiere erfolgte am 15. Tag nach Beginn der Vorbehandlung (9 Tage nach der PH) bzw. dem Tag der kombinierten Lebertransplantation.

Den weiblichen Lewis-Empfängertieren wurden, nach der erfolgreichen orthotopen Lebertransplantation mit arteriellem Wiederanschluss, entweder intraoperativ oder am ersten postoperativen Tag (1. pod), die isolierten Leberzellen in das Milzparenchym appliziert (Transplantation der syngenen hPC und adulten Hepatozyten). Die Immunsuppression erfolgte ab dem Tag der kombinierten Lebertransplantation einmal täglich bis zur Finalisierung der Tiere.

Die geplanten Finalisierungszeitpunkte der weiblichen Lewis-Ratten wurden zum zeitlich

versetzten Nachweis (Tag 8, Tag 15, Tag 30 und Tag 90 nach cLTx) der Repopulation gewählt und die Tiere demnach in Gruppen eingeteilt (Tab. 2).

Bei allen Tieren erfolgte ab Versuchsbeginn= erste Behandlung eine tägliche Kontrolle des klinischen Allgemeinzustandes= AZ. Bei eventuellen Auffälligkeiten gemäß des *Score Sheet* angelehnt an die Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter (2. Auflage vom 22. Juli 2009) wurden diese Tiere eingehend untersucht und gegebenenfalls behandelt. Ein erheblich reduzierter AZ führte aus Gründen des Tierschutzes (*Humane Endpoints*) zur vorzeitigen Finalisierung und zum Versuchsausschluss. Bei diesen Tieren wurde eine Sektion, eine Blutentnahme durchgeführt und histologische Untersuchungen des bei der Sektion gewonnenen Gewebes angefertigt, um mögliche Ursachen für die Erkrankung zu finden.

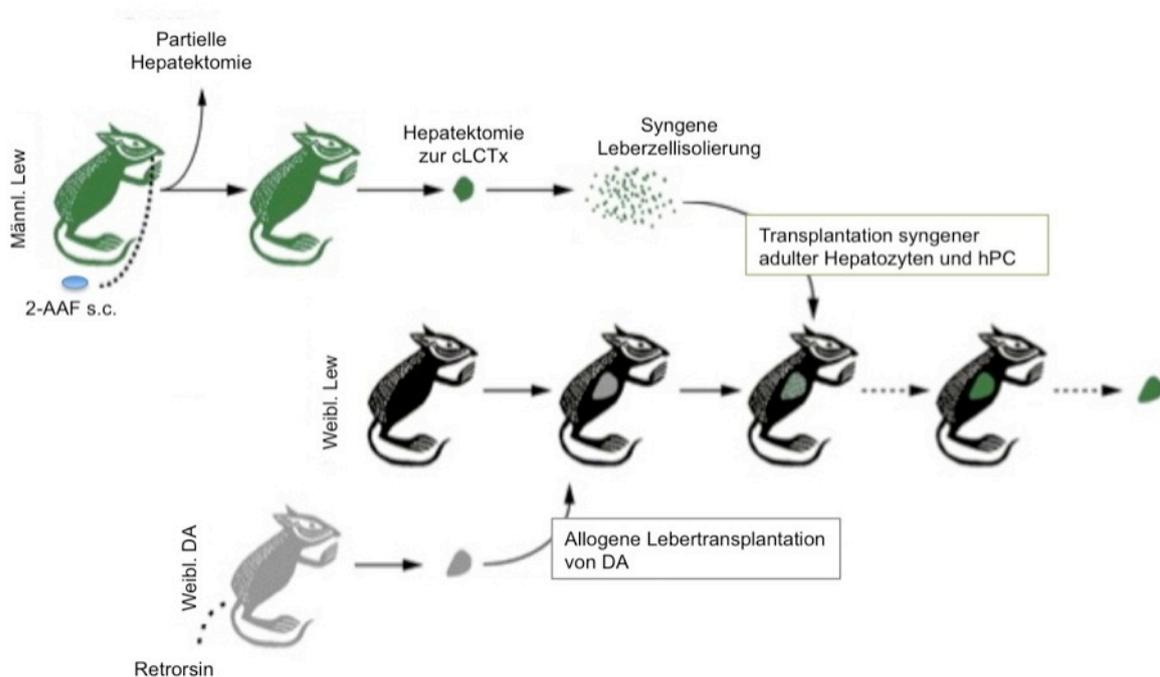


Abb. 3.1: Schematische Übersicht des Versuchsablaufs mit dem jeweiligen Rattenstamm, dessen Verwendung und den durchgeführten Eingriffen.

Die Gruppeneinteilung der cLTx-Empfängertiere erfolgte anhand der jeweiligen Finalisierungszeitpunkte. Diese Zeitpunkte wurden so gewählt, um die verschiedenen Punkte der Fragestellung bezüglich der Integration der transplantierten Zellen in das Leberparenchym im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Außerdem sollte im Versuchsverlauf eine Aussage zum Proliferationscharakter der transplantierten hPC und adulten Hepatozyten gewonnen werden.

Tab. 2: Gruppeneinteilung der cLTx-Empfängertiere nach den Finalisierungszeitpunkten.

Gruppe: weibl Lewis-Ratten	Tag 0	Tag 8	Tag 15	Tag 30	Tag 90
Gruppe A (5 + 1 Kontr.)	cLTx	Finalisierung			
Gruppe B (5 + 2 Kontr.)	cLTx	Blutentnahme (BE)	Finalisierung		
Gruppe C (5 + 3 Kontr.)	cLTx	BE	BE	Finalisierung	
Gruppe D (7 + 1 Kontr.)	cLTx	BE	BE	BE	Finalisierung
Immunsuppression CsA	4 mg/kg KG	2 mg/kg KG	2 mg/kg KG	2 mg/kg KG	2 mg/kg KG

Abk.: cLTx= kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation, Kontr.= Kontrolltier, BE= Blutentnahme, CsA= Cyclosporin A, KG= Körpergewicht.

3.3 Operative Vorbehandlungen und chirurgische Eingriffe

Operationsaufbau

Alle Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen im mikrochirurgischen Kleintier-OP der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (= FEM) am Campus Virchow-Klinikum der Charité Berlin durchgeführt.

Der Operationstisch wurde mit einem sterilen Abdecktuch abgedeckt und ein ca. 30 x 40 cm großes, mit einer saugfähigen Unterlage umspanntes Korbbrett, darauf positioniert. Unter dem Korbbrett befand sich eine Wärmematte, um eine Hypothermie während der Operation zu vermeiden. Die Narkosemaske wurde mit gelben 20 GA-Kanülen mittig auf dem oberen Ende des Korbbretts fixiert. Es wurden 4 Klebestreifen mit ca. 10 cm Länge bereitgestellt, die der Fixierung der Extremitäten auf dem Korbbrett dienen. Die benötigten Verbrauchsmaterialien wie Mullkompressen, Wattestäbchen mit einseitigem Wattekopf, 1 ml-Spritzen, 10 ml-Spritzen, 27 GA-Kanülen und chirurgisches Nahtmaterial für die Gefäßligaturen wurden bereitgelegt. Physiologische Kochsalzlösung wurde in einem Babykonservenwärmer auf ca. 37,5 ° C angewärmt. Für die mikrochirurgischen Eingriffe wie LTx, Hepatektomie und PH stand ein Operationsmikroskop mit sechs- bis 40-facher Vergrößerung bereit.

3.3.1 Narkose und Analgesie

Alle operativen Eingriffe wurden in Isofluran-Inhalationsnarkose durchgeführt, die über einen Verdampfer bzw. Vapor mit Sauerstoff als Trägergas geregelt wurde. Die Vorzüge der Inhalationsnarkose liegen in der hohen Narkosepotenz (*Minimal Alveolar Clearance* = MAC 1,35 bei der Ratte) bei genauer Steuerung der Narkose durch schnelle Induktion (Anflutung) und Ausleitung (Abflutung). Das Narkosegas wird komplett abgeatmet und muss aufgrund der sehr geringen Blutlöslichkeit nicht systemisch abgebaut werden (Metabolisierungsrate 0,2 %), somit wird der Lebermetabolismus geschont. Außerdem ist die kardiovaskuläre und respiratorische Depression geringer als bei Injektionsnarkosen, sodass längere chirurgische Eingriffe (LTx) ermöglicht werden ¹⁴⁹.

Zur Narkoseinduktion wurden die Ratten in eine transparente Plexiglas-Induktionsbox gesetzt und mit 3,5-4,5 % Isofluran bei 700 ml O₂/min bis zum Eintritt der Hypnose begast. Daraufhin wurden sie auf dem vorbereiteten OP-Feld über eine Narkosemaske mit einer Erhaltungsdosis von 2 % Isofluran bei 700 ml O₂/min bei Aufrechterhaltung der Spontanatmung begast. Die Narkosemaske verfügte des Weiteren über eine angeschlossene Absaugungsvorrichtung. Um eine ausreichende Narkosetiefe mit der entsprechenden chirurgischen Toleranz und Analgesie zu gewährleisten erfolgte eine Überprüfung der Reflexe. Dazu wurde das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes beidseits an den Hintergliedmaßen und des Cornealreflexes getestet. Eine für Kleinnager sehr gefährliche Hypothermie wurde vermieden, indem die Ratten auf einer abgedeckten Wärmematte gelagert und alle Lösungen vor der Applikation auf Körpertemperatur angewärmt wurden. Die peri- und postoperative Analgesie richtete sich nach den Angaben der GV-SOLAS (= Gesellschaft für Versuchstierkunde und *Society for Laboratory Animal Science*: „Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren“, Juni 2010). Dazu erfolgte intraoperativ 30 min vor dem Narkoseende eine subkutane (= s.c.) Gabe von 4-5 mg/kg Carprofen und 100 mg/kg Metamizol. Je nach Belastung wurde die Analgesie bis zu 3 Tage (d) post-OP fortgeführt und bei Schmerzreaktionen individuell angepasst.

3.3.2 Hemmung des hepatischen Zellteilungszyklus der Donorleber durch Retrorsin

Retrorsin ist ein Pyrrolizidinalkaloid, das als Proliferationshemmer die Mitose der Hepatozyten verhindert¹⁵⁰. Retrorsin ist als Pulver der Firma Sigma erhältlich und wurde mit destilliertem Wasser (=Aqua dest.) in einem 2:1 Verhältnis zu einer Lösung verarbeitet. Um die Löslichkeit des Pulvers zu verbessern, wurde die Lösung unter Rühren auf 37 °C erwärmt. Zusätzlich wurde der pH-Wert auf einen pH von 2,5 justiert. Nach dem vollständigen Lösen wurde der finale pH von 6,5 eingestellt. Die so hergestellte Retrorsinlösung wurde anschließend über einen Flüssigkeits-Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße filtriert. Bis zur Verwendung wurde die sterile Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

Den weiblichen Dark Agouti Ratten wurde zweimal im Abstand von 14 Tagen 30 mg/kg KG der Retrorsinlösung intraperitoneal appliziert. Die Ratten wurden dafür kurzzeitig in der Induktionskammer mit einer 4 Vol. %igen Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt, um unnötigen Fixierungsstress zu vermeiden. Die narkotisierten Ratten wurden im Nacken fixiert und leicht kopfüber gehalten, um das Darmkonvolut nach kranial zu verlagern und eine versehentliche Perforation der abdominalen Organe zu verhindern. Die Applikation erfolgte paramedian nach kurzer Aspiration im unteren rechten Quadrat mit Einstichrichtung auf das gegenüberliegende Ellenbogengelenk und in einem Winkel von 40°. Nach einer kurzen Aufwachphase und Kennzeichnung durch eine atraumatische Schwanzmarkierung kamen alle so behandelten Ratten bis zur weiteren Verwendung in den Tierstall. Die Leberspende der vorbehandelten Tiere erfolgte 45-50 d nach der ersten Retrorsinapplikation. Eine klinische Auswirkung der Behandlung auf die Tiere war nicht zu verzeichnen.

3.3.3 *In situ* Proliferationsaktivierung hepatischer Progenitorzellen (2-AAF/PH-Modell)

Für die cLCTx wurde eine Suspension aus adulten Hepatozyten und hepatischen Progenitorzellen benötigt. Zur Proliferationsaktivierung der hepatischen Progenitorzellen mussten die adulten Hepatozyten zunächst inhibiert werden. Dazu wurde eine bereits in zahlreichen Versuchsaufbauten beschriebene Kombination der chemischen Inhibition durch ein 2-AAF-Agens in Kombination mit einem generellen Regenerationsstimulus durch eine 60 %-ige PH verwendet.

Applikation des 2-AAF- Pellet

Den Leberzellspendern (männliche Lewis-Ratten) wurde ein 2-AAF-Pellet subkutan appliziert, das eine konstante Dosis von 1,7 mg pro Tag abgibt. Die männlichen Lewis-Ratten wurden per Isofluran-Inhalationsnarkose anästhetisiert und atraumatisch in Bauchlage fixiert. Das Fell wurde im Schultergürtelbereich geschoren (ca. 2x2 cm) und mit einer Braunoderm-Alkohollösung desinfiziert. Es erfolgte ein 1 cm langer Hautschnitt im dorsalen Bereich des Schultergürtels und die Haut wurde stumpf mit einer gebogenen Fischer-Pinzette von der Subkutis gelöst um eine Tasche für das 2-AAF-Pellet zu präparieren. Nach Eingabe des Pellet wurde der Hautschnitt durch 2-3 Einzelhefte mit einem 4-0 Vicryl-Faden verschlossen und abschließend desinfiziert. Die Tiere wurden durch Schwanzmarkierungen identifiziert und erhielten eine der Belastung angemessene Analgesie mit 4 mg/kg Carprofen s.c.. Für die Aufwachphase kamen die Tiere in einen mit Zellstoff ausgelegten Typ-III-Käfig unter eine Rotlichtlampe und wurden bis zum vollständigen Wiedererhalt der Motorik beobachtet. Anschließend wurden sie im Tierstall zurück in die Gruppenkäfige gesetzt.

Partielle Hepatektomie

Sechs Tage nach der 2-AAF-Gabe erfolgte die 60 %-ige PH. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer mit 3-4 Vol.-% Isofluran begasten transparenten Narkosekammer. Anschließend wurde der Leberzellspender über eine Narkosemaske mit 2 Vol.-% Isofluran in Inhalationsnarkose gehalten.

Vor Beginn der etwa 30-minütigen Operation wurde den Tieren 5 mg/kg Carprofen s.c. appliziert, damit der gewünschte Wirkspiegel in der Aufwachphase gewährleistet war. Die Fixierung in Rückenlage erfolgte mit Klebestreifen um die Extremitäten auf einem mit einer saugfähigen Unterlage umspannten Korbbrett. Das Abdomen wurde kaudal des Diaphragmas bis auf Höhe der Transversalebene der Kniegelenke geschoren und mit einer Braunoderm-Alkohollösung desinfiziert.

Anschließend erfolgte eine mediane Laparotomie. Der Hautschnitt erfolgte vom Nabel ausgehend bis auf Höhe des Xyphoids. Die Bauchmuskulatur wurde entlang der Linea alba durchtrennt und seitlich mit Tuchklemmen fixiert, um möglichst freie Sicht auf die Leber zu bekommen. Das Ligamentum falciforme wurde mit einer mikrochirurgischen Schere bis zum Ansatz an der SHVC durchtrennt, um die Mobilisierung der Leberlappen zu erleichtern. Der

OP-Situs wurde mit angewärmter NaCl 0,9 %-Lösung während der gesamten Operation feucht gehalten, um ein Austrocknen der Strukturen und eine Unterkühlung des Tieres zu verhindern. Der rechte Anteil des Medianlappens wurde mit einem nicht resorbierbaren 4-0 Vicryl-Faden bis kurz vor der suprahepatischen Vena cava caudalis umschlungen und ligiert. Dabei schnitt der Faden in das Leberparenchym ein und die intralobulären Gefäße wurden abgebunden, um ein Nachbluten nach Absetzen des Leberlappens zu verhindern. Der stehengebliebene Leberlappenstumpf wurde sorgfältig auf eventuelle Blutungen kontrolliert und die Schnittfläche mit isotonischer Kochsalzlösung gespült. Auf gleiche Weise schloss sich das Absetzen des SRL und des IRL an.

Einer erneuten Kontrolle auf Blutungen aus den Schnittflächen folgte das Auflegen eines 1x1 cm großen resorbierbaren Gentamicinpad auf den größten Leberlappenstumpf, um eine bakterielle Infektion und eine lokale Abszessbildung zu verhindern. 1 cm² enthält 1,10-1,43 mg Gentamicin. Für den Volumenausgleich des Blutverlustes wurde den Tieren 4-5 ml auf Körpertemperatur angewärmte NaCl 0,9%-Lösung intraperitoneal verabreicht. Der Wundverschluss der Muskel- bzw. Faszienschicht und der Haut erfolgte mit 4-0 Vicryl-Fäden in fortlaufender überwendlicher Technik.

Hepatektomie für die Isolierung adulter Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen

Die Leberzellgewinnung aus den wie oben beschriebenen vorbehandelten männlichen Lewis-Ratten erfolgte 9 d nach der PH. Die Operation erfolgte in Isofluran-Narkose und die Tiere wurden für die Laparotomie in Rückenlage fixiert. Der Zugang erfolgte median, entlang der Linea alba durch Auftrennen der vorhandenen Laparotomienarbe. Durch seitliche Entlastungsschnitte auf Höhe des kaudalen Rippenbogens wurde eine gute Exposition der Leber und der für die Leberzellisolierung benötigten anatomischen Strukturen gewährleistet. Nach Auflegen eines mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchteten Gazetupfers auf die Leberoberfläche, wurden die nach der PH entstandenen Verwachsungen, durch abwechselnde stumpfe Präparation mit Wattestäbchen und scharfer Präparation durch die mikrochirurgische Schere, gelöst. Die seitlichen Leberbänder (Lig. triangulare dext. et sin.) wurden ebenfalls mit der mikrochirurgischen Schere durchtrennt.

Die V. phrenica, die links aus der SHVC abgeht, wurde doppelt mit einem 6-0 Seidenfaden ligiert und durchtrennt. Die Leber wurde anschließend mit der feuchten Mullkompressen angehoben und nach kranial auf ihre Facies diaphragmatica gelegt, um den Leberhilus zu

exponieren. Dem Freipräparieren der V. portae bis hin zur V. lienalis, folgte die Durchtrennung der V. pylorica zwischen den Ligaturen. Der infrahepatische Bereich der V. cava caud., der zwischen dem Lobus caudatus und der V. renalis dext. sichtbar war, wurde freipräpariert und mit einer gebogenen mikrochirurgischen Pinzette unterfahren. Es wurde eine Ligatur vorgelegt, der chirurgische Knoten aber noch nicht angezogen. Bevor die Leber perfundiert wurde, wurden 1.500 I.E. Heparin über die Penisvene (V. penis dors.) appliziert, um eine vorzeitige intrahepatische Gerinnung zu verhindern und das vollständige Entbluten der Leber zu gewährleisten.

Die Perfusionslösung I (= PI) bestand aus einer sterilen Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure (= EGTA) und wurde auf 37,5 °C angewärmt. Die Ca⁺⁺-freie PI diente, neben dem Entbluten der Leber, als Ca⁺⁺-Chelatbinder. So wurde das Lösen der Zell-Zell-Adhäsionen durch den anschließenden Collagenaseverdau erleichtert. Die PI wurde mit einer Venenverweilkanüle verbunden und erhöht aufgehängt.

Um ein Kanülieren der Pfortader zu erleichtern, wurde die 16 GA-Venenverweilkanüle mit einem Skalpell diagonal zum Lumen auf die Länge von ca. 1,5 cm gekürzt. Die Pfortader wurde mit einer mikrochirurgischen Gefäßklemme distal der Ligatur der V. pylorica unter Einbindung der V. lienalis geklemmt und im 45° Winkel „fischmaulartig“ eingeschnitten. Unter langsamen Tropfen der PI, wurde die Kanüle in die V. portae eingeführt und mit einer geraden mikrochirurgischen Pinzette fixiert. Die Perfusion der Leber begann nun zügig, wobei die PI fließend laufen gelassen wurde und sofort eine Druckentlastung der Leber durch Einschneiden der leberdistalen V. cava caudalis erfolgte. Hatte sich die Leber vollständig entfärbt, wurde die Tropfgeschwindigkeit auf etwa 15 ml/min reduziert.

Die Kanüle wurde mit 6-0 Seidenfaden an der Pfortader fixiert, sodass ein Anheben der Leber möglich war und die Kanüle sicher in der V. portae verblieb. Die SHVC und das Zwerchfell wurden eingeschnitten. Anschließend wurde die Ligatur um die IHCV zugezogen. Die übrigen noch an der Leber befindlichen Strukturen, wie der Gallengang und die dorsalen Leberbänder, wurden durchtrennt. Die Leber wurde entnommen und anschließend, unter ständigem Tropfen der PI, in einem sterilen Behälter zur Bench gebracht. Dort folgten die übrigen Schritte der Leberzellisolierung wie in Kapitel 3.7 beschrieben modifiziert nach Seglen (1972) ⁵¹.

3.4 Kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation (= cLTx)

Die mit Retrorsin vorbehandelten Donorlebern wurden den weiblichen Lew-Empfängertieren orthotop mit arteriellem Wiederanschluss transplantiert. Zusätzlich zu dem allogenen Lebertransplantat erhielten die Empfängerratten isolierte adulte Hepatozyten und hPC von einem männlichen Leberzellspender. Die männlichen Lew-Ratten wurden zur Proliferationsinduktion der Leberzellen mit 2-AAF und 60 %-iger PH vorbehandelt (siehe Kapitel 3.3.3).

3.4.1 Lebertransplantation

Die Lebertransplantation erfolgte modifiziert nach der Beschreibung von Lee 1975¹⁵¹. Es erfolgte ein arterieller Wiederanschluss, um bezüglich der zu untersuchenden Fragestellung möglichst physiologische hämatologische Bedingungen für das transplantierte Organ zu schaffen. Von bekannten Lebertransplantationsmodellen, bei denen die Tiere ohne arteriellen Wiederanschluss operiert wurden, wurde abgesehen um häufige Komplikationen wie Gallengangsstenosen und -nekrosen zu vermeiden. Da die dieser Arbeit zugrundeliegende Etablierung einer kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation im Rattenmodell ein vollkommen neues Konzept darstellt, wurde versucht die möglichen Risiken insbesondere hinsichtlich der Belastung der kürzlich anastomosierten Gefäße zu minimieren.

Leberexplantation der Donortiere

Die mit Retrorsin vorbehandelten weiblichen Dark Agouti-Ratten wurden in einem Zeitraum von 45-50 d nach der ersten Applikation als Leberspender verwendet. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere ein Körpergewicht von 165-180 g.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 4 % Isofluran bei 700 ml O₂/min und wurde nach Eintritt der Hypnose auf die Erhaltungsnarkose mit 2,5 % Isofluran bei 700 ml O₂/min reguliert. Das Abdomen der Tiere wurde großzügig geschoren und desinfiziert. Die Fixierung in Rückenlage erfolgte durch Klebestreifen um die Extremitäten, die auf dem Korbbrett mit 20 GA Kanülen befestigt wurden. Nach Überprüfung der Reflexe und Bestätigung der chirurgischen Toleranz erfolgte ein Hautschnitt median zwischen Xyphoid und der Transversalebene der

Kniegelenke. Die Bauchhöhle wurde durch einen Muskelschnitt entlang der Linea alba eröffnet. Im Bereich des Rippenbogens erfolgten laterale Entlastungsschnitte und die so entstandenen Gewebelappen wurden mit 20 GA Kanülen seitlich auf das Korbbrett gespannt um eine gute Übersicht zu erhalten. Der Situs wurde mit angewärmter 0,9 %-iger NaCl-Lösung gespült und während der gesamten Operation feucht gehalten. Die Manipulation der Leber und der umliegenden Strukturen erfolgte so schonend wie möglich. Der Processus xyphoideus wurde mit einer gebogenen Arterienklemme nach kranial gelagert und durch Kanülen auf dem Korbbrett fixiert. Das dadurch gespannte Lig. falciforme konnte so mit der mikrochirurgischen Schere durchtrennt werden. Es schloss sich das Durchtrennen der hepatophrenischen und hepatorenenalen Ligamente an. Die Ligaturen zum Absetzen der nachfolgenden Gefäße erfolgten mit einem 6-0 Seidenfaden. Zunächst wurde die von der suprahepatischen V. cava caud. (= SHVC) ausgehende V. phrenica doppelt ligiert und abgesetzt. Anschließend wurde die Leber durch Unterfahren mit einer angefeuchteten Mullkompressen im Hilusbereich angehoben und auf ihre Facies diaphragmatica gelagert damit die Facies visceralis einsehbar war. Die dadurch exponierte Ösophagealvene wurde ligiert und abgesetzt. Die Leberbänder im kleinen Netz wurden mit der mikrochirurgischen Schere durchtrennt damit AC und PC des Lobus hep. caudatus frei beweglich waren. Das linksseitige Auslagern des Darmkonvoluts in einer feuchten Mullkompressen diente der besseren Exposition des Hilusbereichs.

Durch die stumpfe Freipräparation der V. portae zwischen der Leberhilus und der V. lienalis spannte sich die im 90° Winkel aus der Pfortader austretende V. pylorica und konnte nach doppelter Ligatur abgesetzt werden. Der an der V. portae verbliebene Stumpf konnte durch Greifen des chirurgischen Knotens mit der geraden mikrochirurgischen Pinzette zur Mobilisierung und Fixierung der Pfortader genutzt werden und erleichterte die nachfolgende Präparation im Hilusbereich.

Der Gallengang wurde stumpf unterfahren und distal der Leber wurde ein einseitig schräg angeschnittener ca. 1 cm langer 24 GA Teflonsplint in ein Inzisionsloch eingeführt und mit einem 6-0 Seidenfaden fixiert. Die A. gastroduodenale wurde doppelt ligiert und abgesetzt. Dem Verlauf des Truncus coeliacus wurde bis zu seinem Ursprung in der Aorta abdominalis durch stumpfes Präparieren gefolgt und die Bauchaorta wurde stumpf unterfahren. Die A. gastrica sin. und A. lienalis wurden gemeinsam doppelt ligiert abgesetzt ohne dabei das Lumen der A hep. communis zu verlegen. Es folgte die Entfernung des retroperitonealen Fettgewebes im Bereich zwischen der rechten Nierenvene und der intrahepatischen Vena cava caudalis (= IHVC). Durch Anheben der rechten Leberlappen konnte die V. suprarenalis dext.

ligiert werden. Das Absetzen erfolgte erst beim finalen Herausnehmen der Spenderleber mit Belassen der Ligatur am Explantat.

Anschließend wurde ein mikrochirurgischer Gefäßclip auf den leberdistalen Pfortaderabschnitt kurz vor der V. lienalis gesetzt und die V. portae fischmaulartig eingeschnitten. Eine 16 GA Venenverweilkanüle wurde mit langsam tropfender 4 °C-kalter NaCl 0,9 %-Lösung eingeführt. Sobald die Kanüle proximal des Leberhilus in der V. portae saß wurde die mit der Perfusion der Leber begonnen. Die IHVC wurde distal der V. renalis dext. durchgeschnitten um eine Druckentlastung zu gewährleisten. Zusätzlich wurden das Diaphragma und die Herzkammer eröffnet. Es wurde bis zum vollständigen Entbluten der Leber perfundiert und sobald die Leber gleichmäßig helllehmfarben erschien wurde die Venenverweilkanüle mit Verbleib in der V. portae durchgeschnitten. Eine ummantelte Moskitoklemme wurde proximal der V. renalis dext. auf die IHVC gesetzt. Die IHVC wurde so abgesetzt, dass die Hinterwand länger als die Vorderwand stehen bleibt, um die spätere Anastomosierung zu erleichtern.

Der Aortenpatch wurde durch Anheben der Aorta und beidseitiger Durchtrennung proximal und distal des Truncus coeliacus präpariert, sodass mittig die kreisförmige Mündung zu sehen war. Die SHVC wurde leberfern senkrecht zum Gefäß durchgeschnitten, sodass das Lumen gut einsehbar war. Es wurden leicht medial gelegen in der Hinterwand 7-0 Prolene Eckfäden in der SHVC vorgelegt, damit eine gute Exposition bei der Anastomose möglich war. Nun wurden die noch an der Leber fixierten Strukturen so durchtrennt, dass kein offenes Gefäßlumen am Explantat blieb und das Spenderorgan in 4 °C NaCl 0,9 %- Lösung im Kühlschrank gelagert. Die kalte Ischämiezeit betrug ca. 2-3 h.

Orthotope Lebertransplantation mit arteriellem Wiederanschluss der Empfängertiere

Die weiblichen Lew-Ratten wogen bei der Lebertransplantation ca. 180-200 g. Die Narkose, Operationsvorbereitung und Fixierung entsprach dem Vorgehen der Spenderoperation. Zur Thermoregulation wurde eine Wärmematte untergelegt und körperwarme NaCl 0,9 %-Lösung verwendet. Die Empfängertiere erhielten eine s.c. Analgesie mit 5 mg Carprofen/kg KG und 100 mg Metamizol/kg KG. Ein intraoperativer Flüssigkeitsverlust wurde über wiederholte s.c. Applikation von isotonischer Kochsalzlösung verhindert. Zudem wurde der Situs stets feucht gehalten und auf eine vorsichtige Manipulation der Strukturen geachtet.

Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte median entlang der Linea alba zwischen

Proc. xyphoideus und der Transversalebene der Kniegelenke. Auf seitliche Entlastungsschnitte wurde verzichtet. Zur besseren Exposition der Leber wurden lateral atraumatische Plastikbauchdeckenhaken, sowie eine nach kranial gespannte Klemme auf dem Proc. xyphoideus angebracht. Die hepatophrenischen Leberligamente wurden mit der mikrochirurgischen Schere durchtrennt. Die V. phrenica sin. wurde doppelt mit 6-0 Seidenfaden ligiert und abgesetzt. Anschließend erfolgte die Präparation im Hilusbereich, wobei zunächst die hepatogastrischen Ligamente durchtrennt wurden und die V. oesophagealis abgesetzt wurde.

Nun konnte das Darmkonvolut in eine mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtete Mullkompressen eingeschlagen und nach links ausgelagert werden. Die V. pylorica wurde, unter Berücksichtigung des Erhalts eines zur Mobilisierung der V. portae geeigneten Haltestumpfs doppelt ligiert und abgesetzt. Der Gallengang wurde proximal der Leber einfach ligiert und erst bei der Hepatektomie lebernah durchtrennt, wobei ein langes Fadenende zur besseren Fixierung stehen gelassen wurde. Die A. gastroduodenalis und A. hep. prop. wurden jeweils doppelt ligiert und mit Haltefäden versehen abgesetzt, sodass sich eine Y-artige Aufzweigung mit einer mittigen Position der A. hep. comm. darstellte. Um einen arteriellen Wiederanschluss zu erleichtern wurde der proximale Abschnitt der A. hep. comm. freipräpariert. Die IHVC wurde zwischen Leber und V. renalis dext. unterfahren und vom umliegenden Fettgewebe mobilisiert. Die V. suprarenalis dext. wurde leberfern einfach ligiert und beim Herausnehmen der Leber verblieb die Ligatur im Empfängertier. Die dorsalen Leberbänder wurden durchtrennt.

Nach Bereitstellung der explantierten Leber wurde eine ummantelte Moskitoklemme proximal der V. renalis dext. auf die IHVC gesetzt. Eine Satinsky-Klemme wurde diaphragmanah auf die SHVC gesetzt. Die kritische anhepatische Phase begann mit dem Setzen des Mikrogefäßclips auf die V. portae proximal der V. lienalis und sollte 20 min nicht überschreiten. Wegen des jetzt stark reduzierten venösen Rückstroms zum Herzen wurde die Isoflurannarkose auf 0,6 %/700 ml O₂/min reguliert.

Die V. portae, die SHVC und die IHVC wurden unter Erhalt eines möglichst langen Gefäßstumpfs jeweils lebernah mit der mikrochirurgischen Schere abgesetzt und die Leber entnommen. Die Ratte wurde samt Korbbrett um 180° gedreht, sodass der Kopf zum Operateur zeigte. Die Spenderleber wurde anschließend orthotop im Empfängertier positioniert und mit der Anastomose der SHVC begonnen. Dazu wurden die bereits am Implantat vorgelegten 7-0 Prolene^{*}-Eckfäden verwendet und in fortlaufender Nahttechnik wurde mit der Hinterwand begonnen. Beim Erreichen des Eckknotens wurde dieser außerhalb

des Lumens umfahren und die Stichrichtung beim anschließenden fortlaufenden Nähen der Vorderwand geändert, um eine Verlegung des Lumens durch Zuziehen der Naht zu vermeiden. Vor Abschluss der Anastomosen wurden mögliche Luftblasen, die eine Embolie verursachen könnten, durch Spülen mit kalter NaCl 0,9 % Lösung entfernt. Das OP-Feld wurde zurückrotiert und die Leber nach kranial auf ihre Facies diaphragmatica gelagert. Für die End-zu-End-Anastomose der V. portae wurde 8-0 Prolene* in fortlaufender mikrochirurgischer Nahttechnik verwendet. Nach Abschluss der Pfortaderanastomose wurden die Klemmen von V. portae und SHVC gelöst und es erfolgte die Reperfusion der Leber. Die gleichmäßige Einfärbung der wieder durchbluteten Leber und die Durchblutung der Darmschlingen wurden sichtbar. Damit wurde die anhepatische Phase beendet und die Narkose konnte auf 2 % Isofluran angepasst werden. Im Anschluss erfolgte die End-zu-End-Anastomose der IHVC mit 8-0 Prolene* in fortlaufender mikrochirurgischer Nahttechnik und die Moskitoklemmen wurden abschließend entfernt.

Daraufhin wurde der Aortenpatch aufgesucht und die Y-artige Leberarterienaufzweigung an den Haltefäden mit Arterienklemmen gespannt. Das Lumen der A. hep. comm. wurde, nach dem distalen Setzen eines mikrochirurgischen Gefäßclip, mittig inzidiert und ein 24 GA Teflonsplint eingeführt und mit einer Seidenfadenligatur fixiert. Der Aortenpatch wurde nun so über den Splint gezogen, dass dieser in den Truncus coeliacus mündete und ebenfalls mit einer Ligatur fixiert. Es schloss sich die Gallengangsrekonstruktion an. Der distale Abschnitt des Empfängergallengangs wurde quer eingeschnitten und der im Implantat befindliche Gallengangssplint eingeschoben. Die beiden Enden wurden durch 3-4 Einzelknopfhefte mit 8-0 Prolene* fixiert. Das Abdomen wurde abschließend auf eventuelle Blutungen oder Leckagen im Bereich der Anastomosen inspiziert. Anschließend wurde das Darmkonvolut mit warmer Kochsalzlösung gespült und zurückgelagert. Der Wundverschluss erfolgte zweischichtig in fortlaufender Nahttechnik mit 4-0 PDS II. Nach dem Abstellen der Isoflurannarkose wurden die Ratten in einen mit Zellstoff ausgelegten Einzelkäfig unter eine Rotlichtlampe gelegt. Sie erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Postoperativ wurde 3 Tage lang eine s.c. Analgesie mit 4 mg/kg Carprofen und 100 mg/kg Metamizol verabreicht.

Kombinierte Leberzelltransplantation adulter Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen in das Milzparenchym (= *combined Liver Cell Transplantation*, cLCTx)

Die Milz wurde aufgrund der bereits aufgeführten Ergebnisse präklinischer Studien und wegen des Thromboserisikos der anastomosierten Pfortader als ektopter Implantationsort für die isolierten adulten Hepatozyten und hPC gewählt. Alternativ wurde den Empfängerratten der Kontrollgruppe 1 ml phosphatgepufferte Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*= PBS) in die Milz appliziert. Die weiblichen Lew-Ratten wurden in mehrere Gruppen aufgeteilt, sodass die Zelltransplantation folgendermaßen durchgeführt wurde:

Für die cLCTx wurden die Ratten in Isoflurannarkose gelegt und in Rückenlage auf dem OP-Feld fixiert. Die Laparotomienarbe wurde mit einer Schere eröffnet und der Situs auf eventuelle Auffälligkeiten inspiziert. Die linke Bauchwand wurde mit einem Plastikwundhaken auf dem Korbbrett fixiert. Die Milz wurde mit einem angefeuchteten Wattestäbchen vorgelagert und eine 7-0 Seidenfadenligatur um den kaudalen Milzpol vorgelegt. Die Zellsuspension aus adulten Hepatozyten und hPC von einem syngenen männlichen Lewisspendertier wurde langsam innerhalb von ca. 3 min über eine 1 ml Spritze mit 24 GA Kanüle mittig in den kaudalen Milzpol injiziert. Beim Herausziehen der Kanüle nach Abschluss der Zelltransplantation wurde die vorgelegte Ligatur zugezogen um Nachblutungen zu verhindern. Die Leber wurde auf eventuelle Durchblutungsstörungen (unregelmäßige Parenchymfärbung) kontrolliert und die Bauchhöhle abschließend mit 10 ml warmer NaCl 0,9% Lösung gespült. Anschließend erfolgte der zweischichtige Wundverschluss in fortlaufender Nahttechnik. Die Tiere erhielten eine der Belastung angepasste s.c. Analgesie und wurden bis zum Beobachten von Komfortverhalten unter einer Rotlichtlampe gelagert.

3.5 Immunsuppression

Die Empfängertiere erhielten nach der kombinierten Transplantation eine Immunsuppression mit Cyclosporin A (= CsA). Als Initialdosis erhielten die Tiere für einen Zeitraum von 8 Tagen beginnend am Operationstag jeweils 4 mg CsA/kg KG subkutan. Anschließend wurde die Immunsuppression konstant mit einer reduzierten Dosis von 2 mg/kg KG s.c. bis zum Finalisierungstag fortgeführt. Der CsA-Wirkspiegel im Blut wurde stichprobenartig bei einzelnen Tieren der jeweiligen Versuchsgruppe gemessen und gegebenenfalls angepasst.

3.6 Finalisierung der Empfängertiere

Die weiblichen Lewis-Ratten wurden je nach Gruppeneinteilung am 8., 15., 30., oder 90. Tag nach cLTx zur Leber- und Milzgewebebegewinnung finalisiert. Die Tiere wurden im Versuchsverlauf nach der LTx täglich auf ihren klinischen Allgemeinzustand kontrolliert und bei ausgewählten Tieren (Beispieltiere aus den Versuchsgruppen) wurden Blutentnahmen durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in eine Isofluran-Inhalationsnarkose gelegt und eine Blutentnahme aus der V. jug. ext. vorgenommen um die Leberfunktionsparameter und den CsA-Wirkspiegel zu bestimmen. Am Finalisierungstag wurden die Ratten in eine tiefe Isoflurannarkose (4 Vol-%) gelegt und eine abschließende Blutentnahme erfolgte aus der V. jug. ext.. Der Laparotomiebereich wurde geschoren und desinfiziert. Es wurden mit den einzelnen Leberlobibezeichnungen versehene Histokinetten und eine andersfarbige Histokinette für die zu entnehmende Milz bereit gelegt. Ein Urincup mit 4 %-iger Formalinlösung diente später der Aufbewahrung der Gewebeproben bis zur weiteren Verarbeitung. Nach medianer Eröffnung der Bauchhöhle entlang der Linea alba wurde das Xyphoid nach kranial fixiert und der Situs mit besonderer Aufmerksamkeit auf eventuelle Auffälligkeiten der Leber und der Milz inspiziert. Die IHVC und SHVC wurden zur Entblutung des Tieres eröffnet und durch Einschneiden des Diaphragmas wurde ein Pneumothorax forciert. Zusätzlich wurde die Leber über die IHVC oder die V. portae, sofern diese nicht zu tief ins Gewebe integriert und das Lumen verlegt wurde, mit ca. 10 ml 0,9 % NaCl blutleer gespült. Die Leber und die Milz wurden aus dem Situs freipräpariert und auf einem mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchteten Gazetupfer gelagert. Nachdem die Atmung und der Herzschlag des Tieres nicht mehr zu vernehmen waren, wurde die

Isoflurannarkose abgestellt und das Tier vorschriftsmäßig entsorgt. Die Leber wurde mit einem Skalpell in die einzelnen Lobi aufgeteilt und die Gewebeprobe inklusive der Milz wurden mit einer Maximaldicke von 5 mm in die gekennzeichneten Histokinnetten sortiert. Alle gewonnenen Gewebeprobe wurden zunächst für min. 24 h und max. 48 h in 4 %-iger Formalinlösung bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.7 Isolierung adulter Rattenhepatozyten und hepatischer Progenitorzellen

Am 15. Tag nach dem Beginn der Vorbehandlung der männlichen Lew-Ratten durch die s.c. Implantation des 2-AAF-Pellet bzw. 9 Tage nach der PH zur Proliferationsinduktion der Leberzellen wurde die Isolierung der adulten Hepatozyten und hPC vorgenommen.

Die Abb. 3.2 zeigt den schematischen Ablauf der einzelnen Isolierungsschritte.

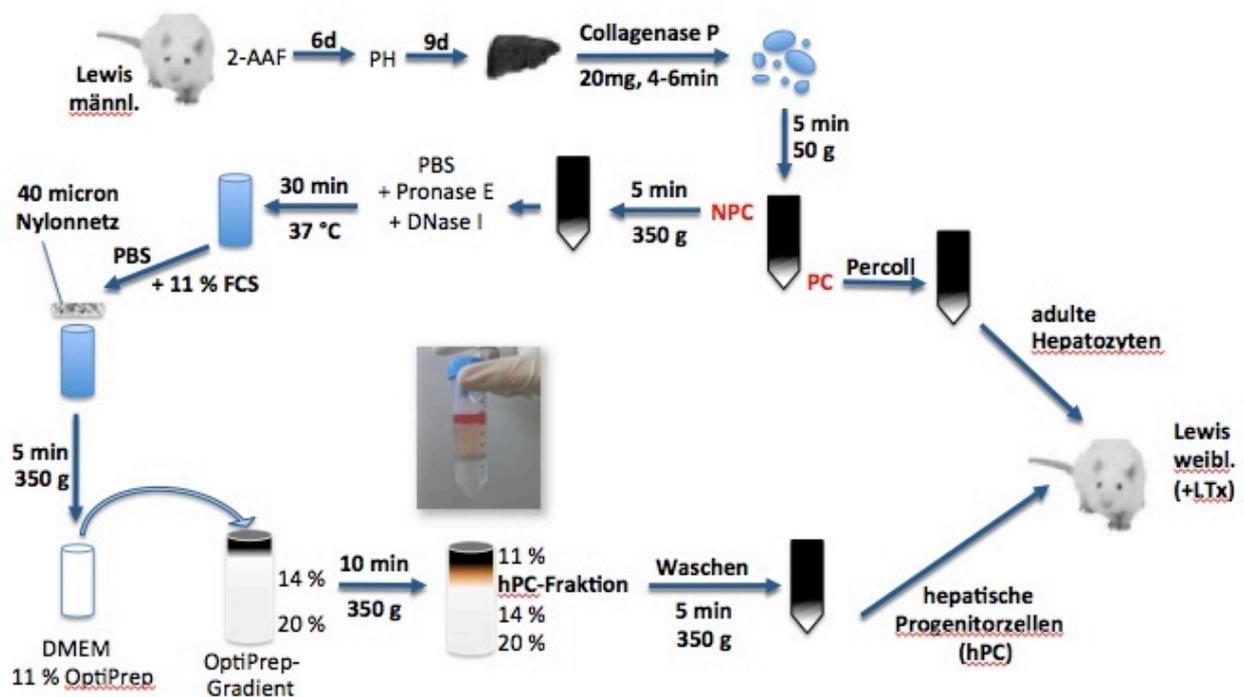


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte für die Zellisolierung hepatischer Progenitorzellen und adulter Hepatozyten aus vorbehandelten, männlichen Lewis-Ratten zur cLCTx.

Isolierung primärer Rattenhepatozyten

Die Leberzellen wurden durch enzymatischen Kollagenaseverdau aus der hepatektomierten und mit EGTA perfundierten Leber isoliert.

Der Isolierungsaufbau umfasste ein Wasserbad, eine Flüssigkeitspumpe, ein Schlauchsystem und eine Oxygenierungsvorrichtung. Das Wasserbad war auf 39 °C temperiert, um die darin befindlichen steril in Glasflaschen filtrierten Perfusionslösungen auf Körperwärme zu halten. Die Lösungen wurden mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ oxygeniert. Die hepatektomierte und *in situ* blutleer gespülte Leber wurde unter der Clean Bench über die in der Pfortader befindliche Venenverweilkanüle in einen Trichter gelegt, über das Schlauchsystem an eine Glasflasche mit steriler PI angeschlossen und mit 100 ml PI durchspült.

Anschließend erfolgte eine Perfusion mit 90 ml Leffert's Puffer. Daraufhin wurde der enzymatische Gewebeaufschluss mit der zirkulierenden Kollagenaselösung für 6-9 min durchgeführt. Das Fortschreiten des Gewebeverdaus wurde durch vorsichtiges Eindrücken der Leberkapsel mit einer stumpfen Pinzette überprüft. Beim Erreichen der optimalen Konsistenz wurde die zirkulierende Kollagenaseperfusion angehalten und die Leber in eine sterile Petrischale überführt. Hier erfolgte die mechanische Zerkleinerung mit Hilfe eines Skalpells. Endgültig wurde der enzymatische Kollagenaseverdau zur vollständigen Gewebedesintegration der Leberzellen durch das Übergießen mit 4 °C kalter CaCl-Lösung gestoppt. Die Gewebereste der Leber wurden mit einem Spatel ausgeschüttelt und anschließend wurde die Zellsuspension durch ein mit einem Gazetupfer (Porengröße 200 µm) ausgelegten Trichter in ein 50 ml Falcon gefiltert.

Die Zellsuspension wurde bis zum ersten Zentrifugationsschritt bei 50 g und 4 °C auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Überstand mit der Fraktion der nicht-parenchymalen Zellen (= NPC), die auch die hPC enthält, über den Leberzellpellets aus den Falcons abgenommen und separat aufbereitet (siehe Kapitel 3.7.1). Die Hepatozytenpellets wurden mit *Dulbecco's Modified Eagle Medium*= DMEM-Medium gepoolt.

Die erste Zellzählung erfolgte vor der Zellseparation durch Zentrifugation (bei 1474 g à 20 min) mit dem Dichtegradienten mit 25 % Percoll (5 ml der Percoll-Stammlösung + 15 ml PBS + 5 ml Zellsuspension). Dabei wurde die Zellviabilität anhand einer 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Unterscheidung der vitalen und toten Zellen erfolgte anhand einer Blaufärbung der beschädigten Zellen. Als vitale Zellen zählen lediglich nicht gefärbte Zellen, da diese über eine intakte Membran verfügen, durch die der Farbstoff nicht in die Zelle eindringen kann.

Nach dem Auszählen der 4 Quadrate ergaben sich auf Grundlage der folgenden Formel die jeweiligen Zellzahlen für vitale und tote Zellen:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{4} \times 1,5 \times 10^4 = \text{Zellen in Suspension} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right]$$

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Hepatozytenpellets mit je 30 ml PBS in den Falcons überschichtet. Anschließend wurde erneut bei 50 g à 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Pellets mit DMEM-Medium gepoolt, sodass in einem Falcon eine Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von ca. 30 ml entstand. Jetzt erfolgte die Zellzählung nach der Zellseparation durch 25 % Percoll und 1 Mio/ml der isolierten Rattenhepatozyten wurden auf kollagenbeschichteten Kulturplatten ausgesät. Die Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm wurden mit 3 ml Kollagen über Nacht im Brutschrank inkubiert und dadurch beschichtet.

Die Kultivierung der isolierten Hepatozyten mit 10 ml DMEM erfolgte für 3 d und diente der Kontaminationskontrolle. Die für die Zelltransplantation vorgesehenen primären Hepatozyten wurden dreifach mit Hilfe einer PBS-Lösung gewaschen und im Anschluss zentrifugiert. So konnten die Hepatozyten von Mediumresten und Serumbestandteilen befreit werden. Anschließend wurden sie zur kombinierten Leberzelltransplantation mit je 0,5 ml PBS und den separat isolierten hepatischen Progenitorzellen steril in einer 1 ml Spritze aufgezogen. Um ein Absetzen der Zellen zu vermeiden wurden sie bis zur Applikation bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Gesamtzellzahl der zu transplantierenden primären Hepatozyten betrug 5×10^6 Zellen.

3.7.1 Isolierung der hepatischen Progenitorzellen

Die in der nicht-parenchymalen Zell-Fraktion (NPC-Fraktion) befindlichen hepatischen Progenitorzellen (hPC) wurden zunächst bei 350 g à 5 min zentrifugiert. Das dadurch erhaltene Pellet wurde in 10 ml der Enzymlösung (Pronase E (0,1 %) + DNase I (0,004 %) + 1x PBS) resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1,24 ml fetales Kälberserum (= FCS) mit einer Endkonzentration von 11% zugeführt und die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße gefiltert. Das Eluat wurde auf 30 ml Gesamtvolumen mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert (350 g à 5 min). Nach zweifacher

Wiederholung der Reinigungsschritte (PBS und Zentrifugation), wurde das Zellpellet der hepatischen Progenitorzellen mit 2,5 ml DMEM-Medium resuspendiert und mit 1,5 ml 30 %-iger Optiprep-Lösung auf 11 % äquilibriert. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 350 g à 10 min durch eine jeweilige Übersichtung von 15 ml der 20 %-igen Optiprep-Lösung mit 15 ml von der 14 %-igen und abschließend 4 ml der äquilibrierten Zellsuspension. Dadurch erhielt man eine Interphase zwischen 11 % und 14 %, in der sich die hepatischen Progenitorzellen befanden. Anschließend konnten diese nun in ein 50 ml Tube überführt werden und anhand einer zweifach wiederholten Zentrifugation (350 g à 5 min) mit 25 ml PBS gewaschen werden.

Das Pellet der hPC wurde anschließend mit DMEM resuspendiert und die Zellzählung durch Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Es erfolgte eine Reinigung der hPC durch dreifache Waschung mit PBS und anschließenden Zentrifugationen. Für die kombinierte Zelltransplantation wurden mindestens 13 % der NPC-Fraktion mit den darin enthaltenen hepatische Progenitorzellen mit 0,5 ml PBS steril in eine 1 ml Spritze aufgezogen und als Zellsuspension mit den adulten Hepatozyten transplantiert. Die gleiche Menge hPC wurden für 3 Tage zur Kontaminationskontrolle auf einer kollagenbeschichteten 10 cm Petrischale bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. Eine genaue quantitative Aussage der hPC-Zellzahl war bis zum Abschluss der vorliegenden Studie nicht möglich.

3.8 Histologie und Immunhistochemie

Als Ausgangspunkt für den späteren immunhistologischen Nachweis der einzelnen Zellarten und Differenzierungsgrade dienten die zu den ausgewählten Finalisierungszeitpunkten gewonnenen Gewebeproben der weiblichen Lewis-Ratten nach cLTx.

Mit der Immunhistochemie konnten ausgewählte Proteine (= Antigen, Ag) mit den entsprechenden Antikörpern (Ak) sichtbar gemacht werden. Die verwendeten Antikörper wiesen eine Affinität zu den nachzuweisenden Gewebeeigenschaften auf und es kam zu Ag-Ak-Reaktionen durch spezifische Bindungen. Indirekte immunhistochemische Methoden basieren auf einem spezifisch an das Ag bindenden Primärantikörper, an dem der enzymkonjugierte Sekundärantikörper bindet. Der anschließend aufgebrauchte Farbstoff (Substrat) reagiert mit dem Enzym des Sekundärantikörpers und macht so den Ag-Ak-Komplex sichtbar.

3.8.1 Präparation von Gewebeproben

Entwässerung der Gewebeproben

Zur weiteren Verarbeitung mussten die Gewebeproben zunächst entwässert werden. Dazu wurde die Formalinlösung mit PBS von den Gewebeproben gewaschen. Darauf folgte die jeweils zweistündige Lagerung der Histokinetten in Alkohollösungen (mit Methyl-Ethyl-Keton vergällte Ethanollösung) mit ansteigender Konzentration (50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 99,8 %) auf einem Schüttler. Abschließend wurden die Gewebeproben 3 h in Xylol geschüttelt und danach für weitere 3 h temperiert bei 60 °C in flüssiges Paraffin überführt. Die entwässerten Gewebeproben wurden für weitere Arbeitsschritte in Paraffinblöcke eingebettet. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 2 µm dicke Schnitte von den Paraffinblöcken abgeschnitten und auf Objektträgern bei 60 °C hitzefixiert. Von jedem Gewebestück wurde eine Serie an Schnitten angefertigt, um verschiedene Färbungen an aufeinanderfolgenden Gewebestücken anfertigen zu können.

Entparaffinieren und Rehydratation der Gewebeproben

Um die in Paraffin konservierten Gewebeschnitte weiter verarbeiten zu können, mussten sie zunächst entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Dazu wurde das Paraffin auf den Objektträgern bei 65 °C verflüssigt und durch zweimaliges Waschen in einem Xylolbad herausgelöst. Die Rehydratation der Gewebeschnitte erfolgte anhand einer absteigenden Alkoholreihe mit einer Ethanolkonzentration von jeweils 99,8 %, 96 %, 80 %, 70 %, 60 %, und 50 %. Abschließend wurden die Gewebeproben mit Aqua dest. gespült und je nach Färbung weiter verarbeitet.

3.8.2 Übersichtsfärbungen der Gewebeproben mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und CK18

Um einen histologischen Überblick zu bekommen, wurden zunächst Hämatoxylin-Eosin (= HE)-Färbungen der Gewebeproben angefertigt. Dazu wurden die Gewebeschnitte 10 min. in Hämatoxylin nach Mayer gestellt. Das „Bläuen“ der Zellkerne erfolgte unter fließendem Leitungswasser. Dann wurden die Schnitte für 30 sec. in alkoholisches Eosin gestellt und abermals in Leitungswasser geschwenkt. Anschließend folgte das Einstellen der Schnitte zunächst für 1 min. in 96% Alkohol, dann 2x1 min. in 100% Alkohol und 2x1 min. in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte eingedeckt, luftgetrocknet und bis zur mikroskopischen Analyse bei Raumtemperatur gelagert.

Diese immunhistologische Färbung erfolgte mit der APAAP-Methode. Die CK-18 Ak-Färbung diente dem Nachweis von Hepatozyten und Lebertorläuferzellen mit Hepatozytencharakter. Sie wurde des Weiteren als Übersichtsfärbung der Gewebeschnitten verwendet. Der CK-18 Primärantikörper wurde in einer 1:20 Verdünnung angewendet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Objektträger wurden mehrfach mit TBS gespült und anschließend wurde der Anti-Maus-Ak in einer 1:25 Verdünnung für 30 min inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit TBS folgte die 30-minütige Inkubation mit dem APAAP-Komplex, ebenfalls in einer 1:25 Verdünnung. Die Inkubationen mit dem Sekundär-Ak und dem APAAP-Komplex wurden jeweils noch einmal für 10 min wiederholt. Danach wurden die Objektträger erneut mit TBS gewaschen und mit einer Fuchsin-Chromogen-Färbung gefärbt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in Hämatoxylin gegengefärbt und die Kerne unter fließendem Leitungswasser „gebläut“. Nach dem Eindeckeln der Gewebeproben wurden diese für 30-45 min luftgetrocknet. Die CK-18 positiven Areale konnten anhand der Rotfärbung ausgewertet und von den blau angefärbten Kernen deutlich unterschieden werden.

3.8.3 Immunhistologische Proliferationsanalysen

Für den Proliferationsnachweis der transplantierten hPC wurden die Gewebeproben immunhistologisch mit *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (= PCNA) angefärbt. PCNA ist ein Ringklemmprotein, welches die in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen markiert und so proliferierende Zellen sichtbar macht.

Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen

Die PCNA-Ak-Färbung erfolgte mit der Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (= LSAB), die auf den Prinzip der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin basiert. Ein unkonjugierter Primärantikörper wird mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und einem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex kombiniert.

Nach der hitzebasierten Demaskierung der Gewebeschnitte in einer EDTA-Lösung erfolgten zusätzlich ein Peroxidase-Block für 10 min und ein Protein-Block für 20 min. Der PCNA-Primärantikörper wird in einer Verdünnung von 1:400 über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend werden die Gewebeschnitte mit Tris-Buffered-Saline (= TBS) gewaschen.

Die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundär-Ak erfolgte bei Raumtemperatur und nach dem erneuten Spülen mit TBS, wurden die Gewebeproben mit der Streptavidin-Peroxidase für die gleiche Dauer inkubiert. Anschließend erfolgte die Chromogen-DAB-Färbung und die Gegenfärbung mit „Hämatoxylin nach Mayer“. Abschließend wurden die Gewebeschnitte eingedeckelt und luftgetrocknet. Bei der Auswertung erschienen die PCNA-positiven Zellareale braun und die Zellkerne blau.

3.8.4 Immunhistologischer Nachweis hepatischer Progenitorzellen

3.8.4.1 Thy-1/ CD90

Die immunhistologische Antikörperfärbung von Thy-1-positiven Zellen in den Gewebeschnitten diente dem Nachweis von Stammzellen hämatopoetischen Ursprungs, bzw. Ovalzellen. Die Thy-1 spezifische Ak-Färbung wurde unter Verwendung der Alkalischen-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-(= APAAP) Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf präformierten löslichen Enzym-Ak-Komplex und weist eine hohe Sensitivität auf.

Durch die vorangegangene Formalinfixierung des Gewebes kam es zur Verdeckung der Epitope der Antigene, sodass diese in ihrer Struktur verändert bzw. überlagert wurden (maskiert) und vom Primärantikörper nicht mehr gebunden werden können. Eine Demaskierung durch Hitze oder proteolytische Vorbehandlungen der Gewebeschnitte sollte eine korrekte Bindung des Primärantiköpers gewährleisten. Die hitzebasierte Demaskierung der in Objektträgerhaltern platzierten Gewebeschnitte erfolgte für 5 min siedend in

EDTA-Lösung (10-fach Lösung: 25 ml der 10x Lösung werden in 200 ml Aqua dest. vermengt und der pH-Wert auf 9 eingestellt) in einem Dampfkochtopf.

Nach Abkühlen der Gewebeschnitte wurde der monoklonale Primär-Ak Thy-1 in einer 1:20 Verdünnung aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einfacher Tris-Buffered-Saline (=TBS) gespült und trocken gelassen.

Danach wurde der, auch als Brücken-Ak bezeichnete Sekundär-Ak, in einer 1:25 Verdünnung aufgetragen und für 30 min inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden erneut mit TBS-Puffer gewaschen und der APAAP-Komplex aufgetragen und für 30 min inkubiert. Um eine Signalverstärkung zu erreichen wurden die Inkubation mit dem Brücken-Ak und dem APAAP-Komplex jeweils für 10 min wiederholt.

Abschließend wurde das Substrat- Chromogen-System (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride= BCIP/NBT-Substrat) aufgetragen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden dann mit Aqua dest. gespült und zur Gegenfärbung des umliegenden Gewebes 5 min in Hämatoxylin nach Mayer gestellt. Das Bläuen der Gewebeschnitte erfolgte unter fließendem Leitungswasser und wurde in Aqua dest. gestoppt. Die Gewebeschnitte wurden abschließend zur Konservierung mit Microscopy Aquatex eingedeckelt und luftgetrocknet. Die anhand der Immunreaktionen sichtbar gemachten Thy-1⁺-Areale färbten sich dunkelblau und konnten mikroskopisch ausgewertet werden.

3.8.4.2 EpCam

Diese Ak-Färbung diente dem Nachweis leberspezifischer Stammzellen des Ovalzellkompartiments. Sie erfolgte ebenfalls nach der APAAP-Methode. Die Gewebeschnitte wurden nach der Entparaffinierung und Rehydrierung durch proteolytische Vorbehandlung mit Proteinase K demaskiert.

Der EpCam-Primärantikörper wurde in einer 1:100 Verdünnung inkubiert. Nach dem Spülen mit TBS-Puffer wurde der Sekundärantikörper in einer 1:25 Verdünnung für 30 min inkubiert und erneut mit TBS-Puffer gespült. Der APAAP-Komplex wurde nach dem Auftragen ebenfalls für 30 min inkubiert und mit TBS-Puffer abgewaschen. Nach den Wiederholungsinkubationen mit dem Brücken-Ak und dem APAAP-Komplex für jeweils 10 min mit anschließendem TBS-Puffer Waschungen erfolgte die Fuchsin-Chromogen-

Färbung. Zur Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte 10 min in Hämatoxylin nach Mayer gestellt, gebläut und mit Aqua dest. gespült. Für die Konservierung der fertig immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitte wurden diese mit Microscopy Aquatex bedeckt. EpCam⁺-Zellareale waren anhand der roten Färbung mikroskopisch zu identifizieren.

3.8.4.3 OV-6

Die OV-6-Ak-Färbung diente dem Nachweis von Ovalzellen in den Gewebeschnitten und erfolgte mit Hilfe der LSAB-Methode. Die Gewebeschnitte wurden nach der Entparaffinierung und Rehydrierung durch proteolytische Vorbehandlung mit Proteinase-K demaskiert. Es folgten ein 10-minütiger Peroxidaseblock und ein 20-minütiger Proteinblock. Anschließend wurde der OV-6-Primärantikörper in einer 1:30 Verdünnung aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Gewebeproben mit TBS-Puffer gespült und der Sekundärantikörper aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit TBS-Puffer und das Auftragen der im Kit enthaltenen Streptavidin-Peroxidase (30 min) und Dako-AEC Substrat-Färbung für 10 min. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin nach Mayer für 10 min gegengefärbt, gebläut und konserviert. Die OV-6⁺-Zellareale färbten sich rot an.

3.9 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FisH)

Um eine Repopularisierung der transplantierten Zellen im Parenchym der Empfängerleber nachzuweisen werden die Y-Chromosomen in den Zellkernen der männlichen Zellen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH) angefärbt. Das „FisH-Typing“ ist eine molekularbiologische Methode zum DNA-Nachweis in Zellen. Das Prinzip beruht auf einer künstlich hergestellten Nukleinsäure-Sonde, die über komplementäre Basenpaarung an die gewünschten Zielsequenzen auf der DNA in der Gewebeprobe bindet. Zum Nachweis der transplantierten Leberzellen im Parenchym der Spenderleber, wurde die Geschlechtsdifferenz im Versuchsaufbau ausgenutzt. Die Y-Chromosomen in den Zellkernen stellen somit die Zielsequenzen dar (Y-Chromosomen-positive Zellkerne). Um eine komplementäre Bindung zu ermöglichen, muss es durch Denaturierung zum Öffnen des DNA-Doppelstranges kommen. Die Sonden sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und ermöglichen so eine direkte Visualisierung des hybridisierten Präparats unter einem Fluoreszenzmikroskop. Es wurden industriell gefertigte Hybridisierungssonden verwendet.

Die Objektträger (OT) wurden 35 min im Citratpuffer bei 80 °C inkubiert, was zur Permeabilisierung der Zellmembran beitrug und dem Aufspalten der Doppelhelix diente. Nach einer Abkühlungsphase wurden sie zweimal in einem doppelten Natrium Citrat Standard-(2x SSC) Puffer auf einem Schüttler gewaschen und abschließend mit Aqua dest. gespült.

Für den anschließenden Pepsinverdau, der dem Freilegen der Y-Chromosomen im Zellkern dient, wurden die Gewebeschnitte jeweils 20 min schüttelnderweise in einer salzsauren Pepsinlösung inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 2x SSC.

Die Proben wurden anschließend in einer 0,05 %-igen Formalinlösung inkubiert, die durch ihre starke Polarität die Wasserstoffbrückenbindungen schwächt und dadurch den Schmelzpunkt der Denaturierung herabzusetzen. Es schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit 2x SSC an. Abschließend wurde eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %) durchgeführt und die Gewebeprobe n wurden luftgetrocknet.

Für die Hybridisierung der Gewebeschnitte wurden jeweils 10 µl der Sondenlösung (3 µl Sonden in 7 µl Hybridisierungspuffer) blasenfrei auf die OT pipettiert. Dann wurde ein Deckglas aufgelegt und mit Fixogum-Kleber versiegelt. Nach vollständiger Trocknung des Klebers wurde die DNA bei 80 °C für 15 min auf einer Heizplatte denaturiert und anschließend für min. 5 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C mit der Sonde hybridisiert.

Für die Arbeitsschrte zum Gegenfärben der Gewebeschnitte wurden das Fixogum und die

Deckgläser entfernt. Die OT wurden in zwei isotonischen Waschlösungen gewaschen, wobei die erste Waschlösung auf 73 °C temperiert war. Nach dem Spülen mit Aqua dest. schloss sich erneut eine aufsteigende Alkoholreihe an. Nach der Lufttrocknung der Gewebeschnitte erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit ca. 10 µl einer gebrauchsfertigen 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (= DAPI)-Lösung. Durch die Interkalierung der DAPI-Lösung in adenin- und thymineiche Regionen doppelsträngiger DNA erscheinen die Zellkerne blau.

Anschließend konnten die Gewebeschnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Dazu wurde der an die Sonden gekoppelte Fluorochrom bei 548 nm angeregt (Emission bei 573 nm) und auf einem anderen Kanal wurde DAPI bei 358 nm angeregt (Emissionsmax. 461 nm). Die schwarz-weißen Fotos des jeweiligen Kanals wurden unter Verwendung der entsprechenden Software (Image- Pro Plus 5.1) erstellt. Farbige Bilder erhielt man durch die Konvertierung und das Übereinanderlegen der DAPI- und Sonden-Signalsbilder der Software.

Der mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops zur Emission von rotem Licht im sichtbaren Bereich angeregte sondengekoppelte Fluorochrom weist die Y-Chromosomen in den männlichen Zellkernen nach. Positive Zellen konnten anhand eines roten Signals im blauen Zellkern detektiert werden.

Zur Etablierung dieser Methode wurden zunächst jeweils Positiv-Kontrollen mit männlichen Gewebeproben und Negativ-Kontrollen mit weiblichen Gewebeproben durchgeführt. Für die Auswertung wurden von jedem Tier mindestens 3 Leberläppchen verwendet. Von jedem Lobus erfolgten mindestens 2 Färbungen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Leberareale nicht zu nah aneinander ausgewählt wurden, um eine aussagestarke Übersicht zu erhalten. Pro gefärbten Gewebeschnitt wurden mindestens 6 Areale ausgezählt. Die Areale wurden randomisiert in dem jeweiligen Schnitt verteilt. Für jeden Leberlobus wurden mindestens 12 Einzelwerte ermittelt, was pro Versuchstier ca. 40 Einzelarealen entsprach.

3.10 Statistische Auswertungen

Der **Mittelwert** (= arithmetisches Mittel, *Mean*, \bar{X}) beschreibt den statistischen Durchschnitt einer Stichprobe. Dieser ergibt sich aus der Addition der Einzelwerte geteilt durch die Anzahl

dieser Einzelwerte: $\bar{X} = \frac{\text{Einzelwerte addiert}}{\text{Anzahl } n \text{ der Einzelwerte}}$

Die **Standardabweichung** (*Standard Deviation* =SD) gibt an, wie weit die Beobachtungswerte vom Mittelwert abweichen. Sie ist ein Maß für die Streubreite der Werte eines Merkmals rund um dessen arithmetisches Mittel. $SD = \sqrt{\text{Var}(X)}$

Der **Standardfehler** (*Standard Error of Mean*= SEM) ergibt sich aus der Dividende der SD und der Wurzel aus der Anzahl n der Events. Der SEM ergibt so die durchschnittliche Abweichung des geschätzten vom wahren Parameterwert des Stichprobenumfangs.

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Univariante Varianzanalyse/ One-way Analysis of Variance (1-way ANOVA)

Für die grafische Darstellung der Blutparameter im Verlauf des Beobachtungszeitraums wurde auf Basis der in Kapitel 4.1.5.4 erhobenen Blutanalysen eine univariante Varianzanalyse (= *One-way Analysis of Variance, 1-way ANOVA*) erstellt. Es wurde das Programm Prism 5 for Mac, Version 5. Oc 2009 der Firma Graph Pad Software Inc. verwendet.

Grafische Darstellung der Y-Chromosomendetektion durch FisH

Für die Veranschaulichung der Mittelwerte mit den jeweiligen SEM bei der Auswertung der FisH zur Y-Chromosomendetektion wurden *Bonferroni's Multiple Comparison Test* des Programms Prism 5 for Mac von der Firma Graph Pad für die Erstellung der Säulendiagramme angewendet.

Um die Verteilung der Y-positiven Zellkerne im Gewebe grafisch darzustellen wurde ein nicht-parametrischer Zweistichproben t-Test nach Mann-Whitney angewendet. Die Verteilungsdiagramme erscheinen als Kastendiagramme (Box-Plots).

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der cLTx

4.1.1 Gruppenübersicht

Die Empfängertiere der cLTx (= Kombi-Tiere) wurden nach den Finalisierungszeitpunkten in die Versuchsgruppen eingeteilt. Pro Gruppe wurde den Kontrolltieren anstelle der Leberzellen PBS in das Milzparenchym appliziert. Die Tab. 3 veranschaulicht die Anzahl der Tiere pro Gruppe nach Kombi- und Kontrolltieren getrennt. Die Tiere der Gruppe A wurden am 8. postoperativen Tag (pod) nach cLTx zur Probengewinnung finalisiert. Insgesamt zählten 6 Tiere (Anzahl n=6) zur Versuchsgruppe A. Die 6 Tiere der Versuchsgruppe B wurden am 15. pod nach der cLTx finalisiert. Weitere Finalisierungszeitpunkte waren der 30. pod nach cLTx (Gruppe C) mit 6 Tieren und der 90. pod nach cLTx (Gruppe D) mit 8 Tieren.

Tab. 3: Anzahl der Empfängertiere in den Gruppen eingeteilt nach den Finalisierungszeitpunkten (Tage nach cLTx), cLCTx und Kontrolltieren.

Gruppeneinteilung	Finalisierung d post LTx	Anzahl cLCTx	Kontrolltiere	Anzahl pro Gruppe
Gruppe A	8 d	n= 5	1	n= 6
Gruppe B	15 d	n= 5	2	n= 7
Gruppe C	30 d	n= 5	3	n= 8
Gruppe D	90 d	n= 7	1	n= 8

Abk.: cLTx= kombinierte Leber-und Leberzelltransplantation, n= Anzahl der Versuchstiere.

4.1.2 Überlebensraten der cLTx- Empfängertiere

Insgesamt wurden n= 36 Lebertransplantationen durchgeführt, davon waren n= 29 kombinierte Leber- und Leberzelltransplantationen (cLTx). Die durchschnittliche Dauer der anhepatischen Phase bei der Leberimplantation betrug 15,06 min. Alle vorgenommenen Lebertransplantationen, bei denen die Empfängertiere bis zum geplanten Finalisierungszeitpunkt klinisch unauffällig blieben, wurden in die weitere Auswertung einbezogen. Die Tab. 4 zeigt die prozentualen Komplikationsraten bezogen auf die insgesamt durchgeführten Lebertransplantationen und die cLTx. Von den insgesamt durchgeführten Lebertransplantationen verliefen n= 29 ohne Komplikationen, was einem prozentualen Anteil

von 80,56 % entsprach. Von den cLTx verliefen n= 22 ohne Komplikationen. Das entsprach einer Überlebensrate der cLTx-Empfängertiere von 75,86 %. Bei n= 7 Tieren der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation traten Komplikationen auf, die zum vorzeitigen Ausscheiden aus dem Versuch führten. Das entsprach einer Ausfallrate von 24,14 % bei den cLTx-Empfängertieren.

Tab. 4: Gesamtübersicht der durchgeführten Lebertransplantationen und cLTx mit prozentualer Angabe der auswertbaren Empfängertiere.

Auswertung cLTx	Anzahl der Tiere	Anteil (%)
LTx insg. durchgeführt	n= 36	100,00
LTx komplikationslos	n= 29	80,56
cLTx insg.	n= 29	100,00
cLTx komplikationslos	n= 22	75,86
Verluste cLTx	n= 7	24,14

Abk.: cLTx= kombinierte Leber-und Leberzelltransplantation, n= Anzahl Versuchstiere, insg.= insgesamt.

4.1.3 Vergleich der Zelltransplantationszeitpunkte

Die kombinierte Leberzelltransplantation= cLCTx erfolgte entweder am Tag der Lebertransplantation (0 d, *intra operationem*) oder am 1. pod. Die Tab. 5 zeigt die Anzahl der cLCTx nach Gruppen und Zelltransplantationszeitpunkten sortiert. Insgesamt wurden n= 13 cLCTx am Tag der Lebertransplantation und n= 9 am ersten postoperativen Tag durchgeführt.

Tab. 5: Übersicht der pro Gruppe durchgeführten cLCTx nach den Zelltransplantationszeitpunkten (cLCTx-Zeitpunkten).

Gruppeneinteilung	Anzahl cLCTx 0 d	Anzahl cLCTx 1. pod	Anzahl cLCTx
Gruppe A	2	3	n= 5
Gruppe B	5	0	n= 5
Gruppe C	2	3	n= 5
Gruppe D	4	3	n= 7
Anzahl pro Zelltransplantationszeitpunkt	n= 13	n= 9	n= 22

Abk.: cLCTx= kombinierte Leberzelltransplantation adulter Hepatozyten und hPC, pod= post-operativer Tag.

4.1.4 Zum vorzeitigen Versuchsausschluss führende Komplikationen der cLTx-Tiere

Bei insgesamt 7 Tieren der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation traten Komplikationen auf, die zum Versuchsausschluss dieser Tiere führten. Dazu zählten OP-technische Komplikationen, die innerhalb von 3 Tagen nach cLTx zum vorzeitigen Tod der Empfängertiere führten, ein Herz-Kreislauf-Stillstand aufgrund von notwendigen weiteren Eingriffen und eine vorzeitige Finalisierung wegen einer klinischen Verschlechterung der Ratten. Das entsprach einer Komplikationsrate von 24,14 % bei insgesamt 29 durchgeführten kombinierten Leber- und Leberzelltransplantationen (cLTx).

Ein hochgradiger Blutverlust mit anschließendem Herz-Kreislaufstillstand *intra operationem* oder ein Versterben der Tiere innerhalb von 3 Tagen nach cLTx, traten bei vier Empfängertieren der cLTx auf (57,14 % der beobachteten Komplikationen bzw. 13,79 % aller cLTx-Tiere) und führten zum Ausschluss von der Auswertung. Von diesen ausgeschlossenen vier Empfängertieren, wurde bei drei Tieren die cLCTx intraoperativ durchgeführt, was einem prozentualen Anteil dieser Komplikation von 75 % entsprach. Gemessen an den insgesamt 13 durchgeführten intraoperativen cLCTx betrug die Komplikationsrate 23,08 %, bezieht man die Ausfälle auf alle 29 durchgeführten cLTx betrug sie 10,34 %. Die am 1. postoperativen Tag durchgeführten cLCTx (n= 9) führten bei einem Tier zum vorzeitigen Tode durch operationsbedingte Komplikationen. Bezogen auf alle durchgeführten cLTx bedeutete dies eine Komplikationsrate von 3,45 %, hinsichtlich der neun am 1. postoperativen Tag durchgeführten cLCTx entsprach dieser Verlust einem prozentualen Anteil von 11,11 %.

Zwei Empfängertiere starben aufgrund von Komplikationen bei der Blutentnahme (= BE) am 70. bzw. 73. Tag nach cLTx, zeigten jedoch vorher einen guten klinischen Allgemeinzustand (= AZ). Das entsprach einem Anteil von 28,57 % gemessen an den insgesamt aufgetretenen Komplikationen. Hinsichtlich der insgesamt 29 durchgeführten cLTx betrug der Anteil des Ausscheidens aufgrund von weiteren Eingriffen 6,90 %. Ein Empfängertier musste aufgrund des starken Gewichtsverlusts und stark verminderten AZ vorzeitig (13 d post cLTx) finalisiert werden (entspricht einem Anteil von 14,29 % der Komplikationen). Bei der anschließenden Sektion fielen Verwachsungen am Duodenum, gelb gefärbte Bereiche an der rechten Niere und den kaudalen Leberlappen, eine Pfortaderstauung und eine Gallengangsstenose auf. Der Ausschluss aufgrund eines klinisch schlechten AZ kam in 3,45 % der durchgeführten cLTx vor. Alle Tiere, die vorzeitig ausschieden, waren Empfänger der cLTx. Die nachfolgende Tab. 6 gibt einen Überblick über die anteilig beobachteten Komplikationen.

Tab. 6: Übersicht der zum Versuchsausschluss führenden Komplikationen bei den Empfängertieren der cLTx.

Komplikationen	Anzahl (n)	Komplikationsrate (%)	Anteil an n= 29 cLTx (%)
Verluste cLTx insgesamt	7	100,00	24,13
Blutentnahme (70. + 73. pod)	2	28,57	6,90
Herz-Kreislaufversagen OP-bedingt bis 3. pod	4	57,14	13,79
Klinisch schlechter Allgemeinzustand (13. pod)	1	14,29	3,45
Verluste cLTx OP-bedingt bis 3. pod	4	100,00	13,79
davon cLCTx intraoperativ	3	75,00	10,34
davon cLCTx am 1. pod	1	25,00	3,45

Abk.: cLTx= kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation, cLCTx= kombinierte Leberzelltransplantation, pod= post-operativer Tag, n= Anzahl.

In Abb. 4.1 wird anhand einer Kaplan-Meier-Kurve veranschaulicht, zu welchen von den Finalisierungszeitpunkten abweichenden Tagen Versuchstiere ungeplant verstarben. Dabei wird deutlich, dass abgesehen von den Komplikationen bei der Blutentnahme an pod 70 und 73 alle anderen Tiere vor dem zweiten Finalisierungszeitpunkt (15 d) verstarben.

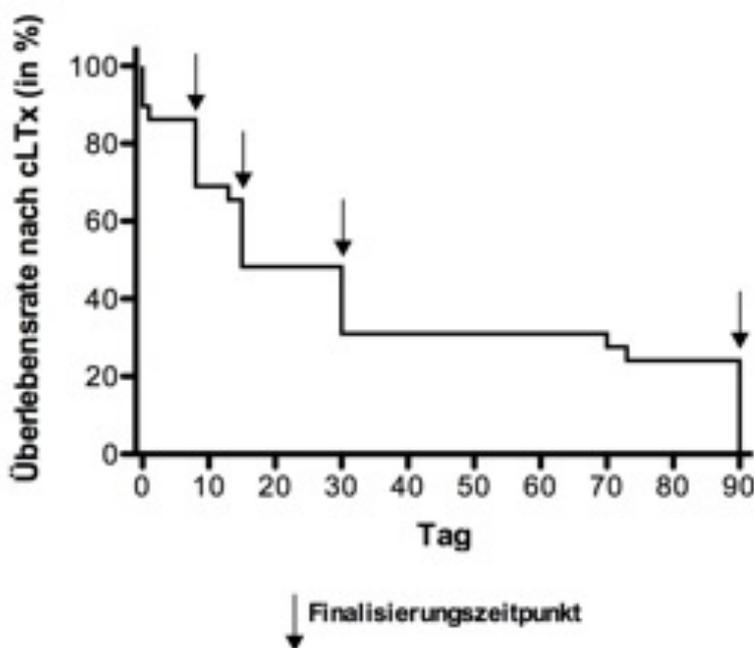


Abb. 4.1: Kaplan-Meier-Kurve mit der Überlebensrate der cLTx-Tiere nach Tagen in Prozent.

4.1.5 Laborergebnisse der Blutuntersuchungen

Zur Kontrolle der Leberfunktionsparameter, der Harnstoff- und Kreatininwerte und des Cyclosporin A-Spiegels wurde den Versuchstieren Blut aus der V. jugularis ext. entnommen. Die Analysen der Blutproben erfolgten durch das Zentrallabor der Charité, Campus Virchow Klinikum. Es wurden folgende Parameter bestimmt: die Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (= AST) und Alanin-Aminotransferase (= ALT), Bilirubin (= Bili) als Parameter für die Gallenfunktion, Harnstoff (= Urea), Kreatinin (= Krea) und der Cyclosporin A-Spiegel (= CsA).

Harnstoff und Kreatinin wurden bestimmt um etwaige Arzneimittelnebenwirkungen des CsA auf die Nierenfunktion zu überprüfen. Um eine Aussage über den klinischen Status und die Leberfunktion der Tiere nach LTx zu erhalten, wurde ein Zeitpunkt ausgewählt, zu dem bei den meisten Tieren kurz nach der Lebertransplantation Blut entnommen wurde. Innerhalb der ersten Woche wurde eine Analyse der Blutparameter bei insgesamt 11 Ratten durchgeführt.

Bei den Ratten der Gruppen A bis C war es aufgrund der kurzen Beobachtungszeit bis zur Finalisierung nicht möglich, mehrmalige Blutentnahmen durchzuführen, da dies eine zu große Belastung für die Tiere dargestellt hätte. Um einen Verlauf der erhobenen Blutparameter untersuchen zu können, wurde den Tieren der Gruppe D an insgesamt 5 verschiedenen Kontrollzeitpunkten Blut entnommen. Diese Zeitpunkte waren Woche 1, 7, 9, 10 und 12 nach cLTx. Aus labortechnischen Gründen, beispielsweise bei zu geringem Blutvolumen oder Koageln in der Probe, konnten nicht bei jeder Blutentnahme alle Parameter bestimmt werden. Die Ergebnisse der Blutanalysen wurden nach Entnahmewoche, dem jeweiligen Versuchstier und den einzelnen Laborparametern sortiert. Von den erhobenen Einzelwerten wurde für jeden Parameter pro Woche der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) ermittelt.

Die Referenzwerte wurden dem Datasheet der Lewis-Ratten der Firma Harlan entnommen:

AST \leq 121 U/l

ALT \leq 65 U/l

Bili \leq 0,4 mg/dl

Urea \leq 34,23 mg/dl

Kreatinin \leq 0,5 mg/dl

(http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/lewis_inbred_rat.hl)

Cyclosporin-A

Der CsA-Spiegel sollte in der Initialphase (bis zum 8. pod) bei 225-300 µg/l liegen und nach Reduktion auf die Erhaltungsdosis bei 100-150 µg/l. Die Blutanalyse des CsA-Spiegels zeigte erwartungsgemäß individuell stark schwankende Werte. In der Initialphase wurden Werte in einem Bereich von 82-839 µg/l gemessen. Zwar normalisierten sich die Blutspiegel im Verlauf der Kontrollwochen, aber auch in Woche 12 wurden stark variierende Werte, z.T. weit außerhalb der Erhaltungsdosis, gemessen. Der Mittelwert in Woche 12 betrug 331,00 µg/l bei einer SD von 133,57 µg/l und einem SEM von 59,74 µg/l, was die starke Varianz zwischen den Einzelwerten belegte. Bei den Tieren D2 und D3 wurde vermerkt, dass die s.c Gabe des Cyclosporins wenige Stunden vor der Blutentnahme stattfand, sodass in diesen beiden Fällen kein Talspiegel vorlag.

Tab. 7: Cyclosporin-A-Einzelwerte nach Gruppen und Erhebungswoche.

CsA µg/l		Woche				
Gruppen	Tier	1	7	9	10	12
Gruppe A	Kontr.	82				
	A1					
	A3	424				
Gruppe B	Kontr.	410				
	B1	378				
	B2	33				
	B3					
Gruppe C	C1	108				
Gruppe D	Kontr.		183	87		340
	D1	483		114	49	223
	D2	128		35	100	283
	D3	839		65	83	557
	D4		114		65	252
	D5	98	133	170		
Mittelwert		298,30	143,33	94,20	74,25	331,00
SD		254,65	35,64	51,35	22,08	133,57
SEM		80,53	20,58	22,96	11,04	59,74

Abk.:Kontr.= Kontrolltier; SD= *Standard Deviation*, Standardabweichung und SEM= *Standard Error of Mean*, Standardfehler.

Ergebnisse der Blutanalyse in der ersten Woche nach LTx

In der ersten Woche nach der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation wurde bei insgesamt 11 Versuchstieren aus Gruppen A bis D eine Blutentnahme aus der V. jugularis externa zur Kontrolle des klinischen Zustandes der Tiere nach der Lebertransplantation durchgeführt. Da in der ersten Woche nach LTx bei Gruppe C nur dem Tier C1 Blut entnommen wurde, konnten hier keine vergleichbaren Auswertungen erfolgen. Für den Kontrollparameter Kreatinin wurden in Woche 1 lediglich zwei Einzelwerte für die Auswertung erhoben.

Die Einzelwerte der jeweiligen erhobenen Parameter unterscheiden sich zum Teil stark zwischen den Versuchstieren innerhalb der ersten Woche nach der Lebertransplantation (siehe Tab. 8). Die Mittelwerte der AST lagen bei Gruppe A (201,33 U/l) und D (193,25 U/l) deutlich über dem Referenzwert. Abgesehen von der Gruppe D lagen die Mittelwerte der ALT in der ersten Woche nach LTx innerhalb des Referenzbereiches. Der extrem hohe Mittelwert der ALT-Analyse in Woche 1 von Gruppe D war auf die beiden Einzelwerte von Tier D1 (691 U/l) und D5 (211 U/l) zurück zu führen, die stark von den übrigen Laborergebnissen abwichen.

Das bestätigten auch die Standardabweichung von 311,82 U/l bzw. der Standardfehler von 155,91 U/l für ALT. Abb. 4.2 (C) veranschaulicht den hohen Bilirubin-Mittelwert (1,07 mg/dl) in Gruppe A verglichen zu Gruppe B und D. Bei der Blutanalyse von Tier C1 konnte der Bilirubin-Wert in Woche 1 nicht evaluiert werden. Die Mittelwerte von Harnstoff und Kreatinin lagen zu diesem Zeitpunkt im Referenzniveau.

Tab. 8: Ergebnisse der Blutanalyse in Woche 1 nach LTx gruppenübergreifend nach Parametern statistisch evaluiert.

Woche 1	Tier	AST U/l	ALT U/l	Bili mg/dl	Urea mg/dl	Krea mg/dl
Gruppe A	Kontr.	165	61	1,7	14	
	A1	243	44	0,2	32	0,37
	A3	196	58	1,3	23	0,25
	Mittelwert	201,33	54,33	1,07	23,00	0,31
	SD	32,07	7,41	0,64	7,35	0,06
	SEM	18,51	4,28	0,37	4,24	0,04
Gruppe B	Kontr.	95	33	0,4		
	B1	133	28	0,2	26	0,14
	B2	103	34	0,8	33	0,24
	Mittelwert	110,33	31,67	0,47	29,50	0,19
	SD	16,36	2,62	0,25	3,5	0,05
	SEM	9,44	1,52	0,14	2,47	0,04
Gruppe C	C1	152	51		34	
Gruppe D	D1	199	691	1,4	31	
	D2	74	24	0,1	30	
	D3	194	38	0,2	31	
	D5	306	211		41	
	Mittelwert	193,25	241,00	0,57	33,25	0,17
	SD	94,81	311,82	0,72	5,19	0,12
	SEM	47,40	155,91	0,42	2,59	0,04

Abk.:Kontr.= Kontrolltier; SD= *Standard Deviation*, Standardabweichung und SEM= *Standard Error of Mean*, Standardfehler.

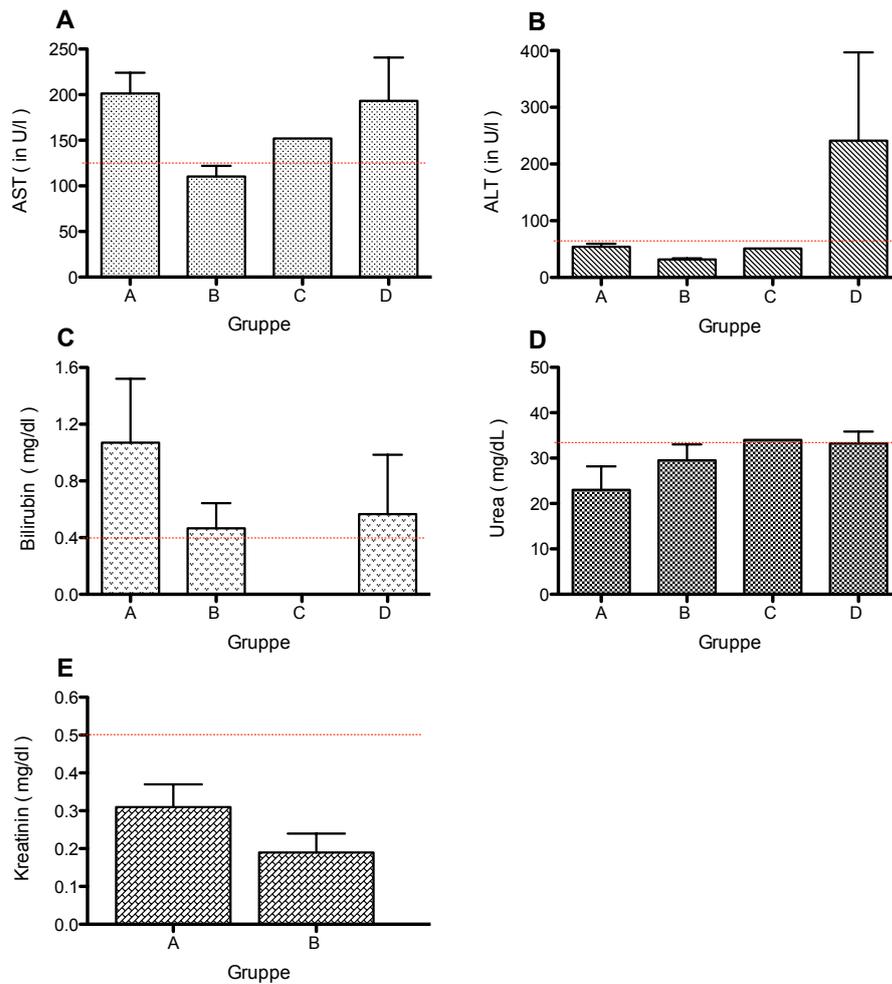


Abb. 4.2: Mittelwerte aller Blutparameter in Woche 1 nach Gruppen sortiert mit Angabe des Referenzbereichs (rote Linie) und des SEM. A= AST; B= ALT; C= Bilirubin; D= Harnstoff; E= Kreatinin.

Ergebnisse der Blutuntersuchung der Gruppe D im Verlauf der Wochen 7-12 nach LTx

Für die Darstellung des Verlaufs der Transaminasen (AST und ALT), Bilirubin als Gallenfunktionsparameter und den Nierenfunktionsparametern Harnstoff und Kreatinin wurden Woche 7, 9, 10 und 12 ausgewählt um einen Vergleich möglich zu machen.

Da es aus organisatorischen Gründen nicht möglich war, zu jedem dieser Zeitpunkte bei allen Versuchstieren Blut zu entnehmen, unterscheidet sich die Anzahl der pro Woche erhobenen Blutwerte. Bei den Tieren D1, D2 und D3 wurden jeweils vier Einzelwerte für die untersuchten Parameter erhoben, sodass eine Verlaufsbeurteilung der Leberzellfunktion und der Nierenfunktion über den gesamten Beobachtungszeitraum möglich war.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen alle erhobenen Einzelwerte der Transaminasen, des Bilirubins und der Nierenfunktionsparameter zu den festgelegten Kontrollzeitpunkten.

Auf Grundlage der in Tab. 9 bis Tab. 13 aufgeführten Einzelwerte der Blutparameter pro Woche wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) errechnet, sodass eine Verlaufsbeurteilung von Woche 7 bis zum Finalisierungszeitpunkt in Woche 12 möglich war. Die Mittelwerte der Leberenzyme zeigten eine Reduktion der Transaminasen von Woche 7 bis Woche 9. In Woche 9 wurde sowohl für die AST als auch die ALT ein Mittelwert im Referenzbereich ermittelt, der bis zur Woche 12 nur geringfügig wieder anstieg.

Tab. 9: AST-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.

AST U/l					
Woche	Tier	7	9	10	12
Gruppe D	Kontr.	144	135		123
	D1	172	173	207	226
	D2	202	66	116	91
	D3	160	71	113	102
	D4			115	159
	D5	145	153		
	Mittelwert	164,60	119,60	137,75	140,20
	SD	23,89	48,58	46,18	54,52
	SEM	10,68	21,72	23,09	24,38

Abk.:Kontr.= Kontrolltier; SD= *Standard Deviation*, Standardabweichung und SEM= *Standard Error of Mean*, Standardfehler.

Tab. 10: ALT-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.

ALT U/l					
Woche	Tier	7	9	10	12
Gruppe D	Kontr.	66	78		66
	D1	89	85	104	94
	D2	103	49	71	53
	D3	79	60	72	67
	D4			81	98
	D5	57	72		
	Mittelwert	78,80	68,80	82,00	75,60
	SD	18,23	14,38	15,34	19,48
	SEM	8,15	6,43	7,67	8,71

Abk.:Kontr.= Kontrolltier; SD= *Standard Deviation*, Standardabweichung und SEM= *Standard Error of Mean*, Standardfehler.

Der Bilirubinwert wurde erhoben um eine Aussage über die Funktion des Gallenmetabolismus zu erhalten und mögliche cholestatische Hepatopathien erkennen zu können. Wie in Tab. 11 zu sehen ist sank der Bilirubin-Mittelwert kontinuierlich von anfangs 0,43 mg/ dl auf ein Niveau von 0,15 mg/dl in Woche 12 nach der cLTx, sodass es keinerlei Anhaltspunkte für eine hepatische Störung des Gallenabflusses gab. Der hohe Einzelwert (1,3 mg/dl) von Tier D5 in Woche 7 erklärt die SD von 0,43 mg/dl und den SEM von 0,18 mg/dl. In Woche 9 hat sich der gemessene Bilirubinspiegel bei diesem Tier wieder reguliert. Zum Ende des Beobachtungszeitraums (Woche 9-12) liegt keiner der Einzelwerte mehr über dem Referenzbereich.

Tab. 11: Bilirubin-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.

Bili mg/dl					
Woche	Tier	7	9	10	12
Gruppe D	Kontr.	0,3			0,2
	D1	0,4	0,3	0,1	0,2
	D2	0,2	0,4	0,1	0,1
	D3	0,2	0,1		
	D4	0,2		0,2	0,1
	D5	1,3	0,3		
	Mittelwert	0,43	0,28	0,13	0,15
	SD	0,43	0,13	0,06	0,06
	SEM	0,18	0,06	0,03	0,03

Abk.:Kontr.= Kontrolltier; SD= *Standard Deviation*, Standardabweichung und SEM= *Standard Error of Mean*, Standardfehler.

Die Harnstoff- und Kreatininwerte wurden erhoben um eine mögliche Nierenfunktionsstörung durch die nephrotoxischen Nebenwirkungen der Immunsuppression überprüfen zu können. Da der Cyclosporin-A-Spiegel individuell sehr stark zwischen den Blutentnahmen variierte (siehe Tab. 7), ließen sich daraus auch die im Verlauf vergleichsweise unregelmäßigen Mittelwerte der Nierenfunktionsparameter ableiten.

Anders als bei den übrigen erhobenen Parametern ist hier kein konstanter Verlauf über den Beobachtungszeitraum zu erkennen. Der in Abb. 4.2 sichtbare Anstieg der Mittelwerte der Nierenfunktionsparameter in Woche 12 konnte jedoch auf die stark von der Erhaltungsdosis abweichenden Cyclosporinspiegel bezogen werden. Die Mittelwerte des Harnstoffs wichen im Verlauf von Woche 7 bis Woche 12 geringfügig vom Referenzwert (34,21 mg/dl) ab.

Die Kreatinin-Mittelwerte lagen über den gesamten Beobachtungszeitraum unterhalb des Referenzwertes.

Keines der Tiere zeigte klinische Auffälligkeiten, die auf eine Nierenfunktionsstörung hindeutete.

Tab. 12: Harnstoff-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.

Urea mg/dl					
Woche	Tier	7	9	10	12
Gruppe D	Kontr.	24	24		24
	D1	36	35	29	40
	D2	73	68	25	44
	D4			32	38
	D5	22	27		
	Mittelwert	38,75	38,50	28,67	36,50
	SD	23,66	20,21	3,51	8,70
	SEM	11,83	10,10	2,03	4,35

Abk.:Kontr.= Kontrolltier; SD= *Standard Deviation*, Standardabweichung und SEM= *Standard Error of Mean*, Standardfehler.

Tab. 13: Kreatinin-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.

Krea mg/dl					
Woche	Tier	7	9	10	12
Gruppe D	Kontr.	0,19			0,24
	D1	0,59	0,32	0,28	0,49
	D2	0,65	0,18	0,28	0,54
	D3	0,45	0,18	0,32	0,43
	D4	0,29	0,24	0,26	0,3
	D5	0,29	0,17		0,29
	Mittelwert	0,41	0,22	0,29	0,38
	SD	0,18	0,06	0,03	0,12
	SEM	0,08	0,03	0,01	0,05

Abk.:Kontr.= Kontrolltier; SD= *Standard Deviation*, Standardabweichung und SEM= *Standard Error of Mean*, Standardfehler.

Grafische Darstellung des Verlaufs der Einzelparameter in Gruppe D nach Wochen

Für die grafische Darstellung der Einzelparameter im Verlauf des Beobachtungszeitraums wurde auf Basis der in Kapitel 4.1.5 erhobenen Blutanalysen eine univariante Varianzanalyse (= *One-way Analysis of Variance, 1-way ANOVA*) erstellt.

Die Abb. 4.3 zeigt die Mittelwerte mit SEM für die Parameter AST (A); ALT (B); Bilirubin (C); Harnstoff (D); und Kreatinin (E). Anhand dieser Werte wurde eine 1-way ANOVA durchgeführt um eventuelle signifikante Unterschiede zwischen den Wochen für die einzelnen Parameter zu zeigen. Die Mittelwerte der jeweiligen Blutparameter mit dem SEM werden für die vier Untersuchungszeitpunkte zwischen Woche 7 und Woche 12 dargestellt. Bei den Transaminasen AST und ALT konnte ein ähnlicher Verlauf der Mittelwerte festgestellt werden. In Woche 9 lagen die Mittelwerte der Transaminasen innerhalb des Referenzbereiches und bis zu Woche 12 konnte ein leichter Anstieg der Mittelwerte festgestellt werden. Hervorzuheben ist hier, dass die in Woche 9 bis 12 erhobenen SEM der AST-Mittelwerte im Vergleich zu denen der ALT deutlicher höher ausfielen und somit eine stärkere Varianz zwischen den AST-Einzelwerten herrschte. Die Serumspiegel des leberspezifischeren Parameters ALT verliefen über die Erhebungswochen konstanter als die der AST. Der leichte Anstieg der Transaminasen zwischen Woche 9 und Woche 12 zeigte keine klinische Manifestation im Allgemeinzustand der Versuchstiere.

Der Verlauf des Bilirubinspiegels (C) zeigt deutlich, dass sich die Mittelwerte im Beobachtungszeitraum regulierten und es keine starken Varianzen zwischen den Einzelwerten gab. Nach der ersten Woche lagen die erhobenen Mittelwerte ausschließlich im Referenzbereich. Die Nierenfunktionsparameter Harnstoff (D) und Kreatinin (E) zeigten in Woche 7, sowie in Woche 10 und Woche 12 einen vergleichbaren Verlauf. In Woche 9 hingegen fällt auf, dass der Harnstoffmittelwert zum vorherigen Kontrollzeitpunkt konstant über dem Referenzwert lag und einen hohen SEM von 10,10 aufwies. Der Kreatininmittelwert hingegen fiel im Vergleich zu Woche 7 stark ab, zeigte in Woche 9 einen geringen SEM von 0,03 und lag innerhalb des Referenzbereichs. Der Verlauf der Kreatinin-Mittelwerte (E) zeigte zudem einen signifikanten Unterschied zwischen den in Woche 9 und Woche 12 errechneten Mittelwerten mit einem p-Wert von 0,0436.

Bei keinem der übrigen untersuchten Parameter wurden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kontrollwochen festgestellt.

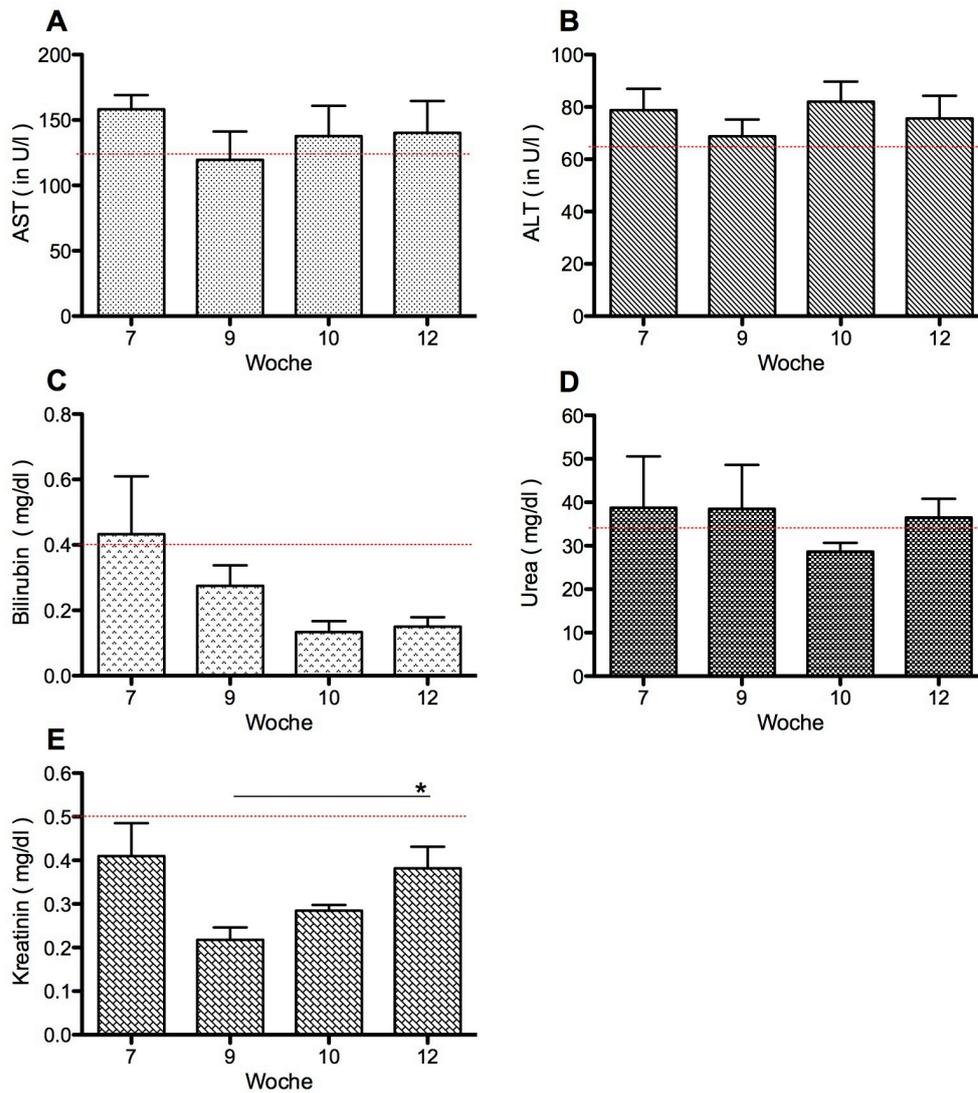


Abb. 4.3: Mittelwerte und SEM der Leber- und Nierenfunktionsparameter der Gruppe D im Wochenverlauf (rote Linie = Grenze des Referenzbereichs). A= AST; B= ALT; C= Bilirubin; D= Harnstoff; E= Kreatinin.

4.2 Isolierungen der adulten Hepatozyten und hepatischen Progenitorzellen

Insgesamt wurden 10 Leberzellisolierungen vorgenommen. Pro Leberzellspender (Lew_1 bis Lew_10) konnten bis zu 4 weiblichen Empfängertieren die isolierten adulten Hepatozyten und hPC transplantiert werden. Den Empfängertieren wurden 5×10^6 Leberzellen transplantiert, wobei der Anteil der hPC pro Tier zwischen 13 % und 50 % der Nicht-parechymalen-Zellfraktion (= NPC) betrug.

Der Erfolg der Isolierung wurde anhand von verschiedenen Faktoren beurteilt. Für eine optimale Proliferationsstimulation der hPC war die Dauer der Vorbehandlung (2-AAF und PH) ausschlaggebend. In der Tab. 14 ist dieses Kriterium als Anzahl der Tage nach PH angegeben. Die Leberzellisolierungen fanden zwischen Tag 8 und Tag 15 nach der PH statt. Es wurde sich an einem optimalen Isolierungszeitpunkt von 9 Tagen nach der PH orientiert.

Ein weiterer Faktor zur Beurteilung des Isolierungserfolges war die prozentuale Viabilität der adulten Hepatozyten und hPC. Im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll unmittelbar vor der cLCTx lagen die Viabilitäten der isolierten Leberzellen in einem Bereich von 59,80-91,30 % und der Mittelwert aller Isolierungen betrug 73,18 %.

Das dritte Kriterium zur Beurteilung des Isolierungserfolges für die Auswahl der infrage kommenden Leberzellspender war die Zellausbeute. Diese wird in Tab. 14 als Gesamtzahl der vitalen Zellen in Millionen vor dem Zelltransplantationszeitpunkt angegeben.

Diese drei aufgeführten Beurteilungskriterien wurden zu einem „Iso(lierungs)-Score“ zusammengefasst, der für die Auswahl der Spendertiere herangezogen wurde. Wichen zwei oder mehr Kriterien des Iso-Scores deutlich vom jeweiligen Mittelwert ab kam es zum Ausschluss des entsprechenden Spendertieres von der weiteren Auswertung. Folglich wurden die Empfängertiere, mit Ausnahme der Tiere B4 und D6, bei denen eine PCNA-basierte Auswertung der hPC Proliferation erfolgte, von der Auswertung ausgeschlossen (siehe Kapitel 4.3.2.1).

Tab. 14: Zuordnung der Zellspender zu den Empfängertieren mit Angabe der Beurteilungskriterien.

Bezeichnung männlicher Leberzellspender	Bezeichnung weiblicher Empfängertiere	Tage nach PH	Viabilität der adulten Hepatozyten und hPC (%)	Anzahl vitaler Zellen vor cLCTx ($\times 10^6$)	Anteil hPC/NPC-Fraktion (%)
Lew_1	D1, D2, D3	15	71,70	67,45	17,00
Lew_2	D6, K9	14	59,80	12,35	
Lew_3	D4	12	73,80	65,93	25,00
Lew_4	C1, C2, D5	8	76,40	42,98	25,00
Lew_5	B1, B2	9	63,80	74,57	50,00
Lew_6	A1	9	71,50	11,30	25,00
Lew_7	A2, A3	9	79,90	48,40	25,00
Lew_8	K29, K30, B4, K32	15	71,00	6,27	13,00
Lew_9	C3, C4, B3	15	72,60	19,13	25,00
Lew_10	C5	11	91,30	9,40	25,00
Mittelwert		11,70	73,18%	35,78	25,00%

Abk.: PH= Leberteilresektion, hPC= hepatische Progenitorzellen, cLCTx= kombinierte Leberzelltransplantation, NPC= nicht-parenchymale Zellen; Beurteilungskriterien des Iso-Scores: Anzahl der Vorbehandlungstage nach PH =Vorbehandlungszeitraum, Zellviabilität (%) und der Anzahl der vitalen Zellen bei der Leberzellisolierung ($\times 10^6$)= Zellausbeute.

4.2.1 Beurteilung des Isolierungserfolges und Auswahl der Spendertiere nach dem Iso-Score

Bei Berücksichtigung der drei Auswahlkriterien des Iso-Scores wird deutlich, warum die Spendertiere Lew_2 und Lew_8 aus der Auswertung ausgeschlossen wurden, da bei beiden Tieren sowohl der optimale Vorbehandlungszeitraum deutlich überschritten wurde als auch die Zellausbeute mit einer Gesamtanzahl der vitalen Zellen von $12,35 \times 10^6$ und $6,27 \times 10^6$ unbefriedigend ausfiel. Zudem betrug die Zellviabilität bei Lew_2 lediglich 59,80 %.

Das Tier Lew_1 wurde zwar 15 Tage lang vorbehandelt, aber die Viabilität war zufriedenstellend und die Zellausbeute war wie in Tab. 14 zu sehen ist mit $67,45 \times 10^6$ vitalen Zellen sehr gut, sodass dieses Tier in die Auswertung einging.

Die Isolierung von Lew_5 war hinsichtlich der Viabilität mit 63,80 % zwar in diesem Kriterium vom Mittelwert abweichend, jedoch entsprachen der Zeitraum der Vorbehandlung und die sehr hohe Zellausbeutung den Anforderungen um die Empfängertiere dieser Leberzellspende weiter auszuwerten. Das Tier Lew_6 kam als Spendertier trotz der vergleichsweise geringen Zellausbeute von nur $11,30 \times 10^6$ vitalen Zellen infrage, da die

beiden anderen Kriterien in den Anforderungen erfüllt wurden. Der 15-tägige Vorbehandlungszeitraum von Lew_9 wurde durch die zufriedenstellende Zellausbeute und die Viabilität von 72,60 % ausgeglichen. Das Spendertier Lew_10 wurde aufgrund der sehr hohen Zellviabilität von 91,39 % trotz der geringen Zellausbeute mit nur $9,40 \times 10^6$ Zellen in die Auswertung integriert

4.3 Histologische Auswertungen

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der histologischen Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin nach Mayer und CK-18 sowie die immunhistologische Proliferationsanalyse mit dem *Proliferation-Cell-Nuclear-Antigen* (= PCNA) zusammenfassend dargestellt.

4.3.1 Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin nach Mayer und CK-18

Die histologische Färbung mit HE diene als Übersichtsfärbung um den Zustand des Lebergewebes nach der cLTx einordnen zu können wie in Abb. 4.4 (A-C) zu sehen ist.

Der immunhistologische Marker CK-18 färbt sowohl adulte Hepatozyten als auch fetale Leberzellen an und diene als zusätzliche Übersichtsfärbung des Leberparenchym neben der HE-Färbung (Abb. 4.4 (D-F)).

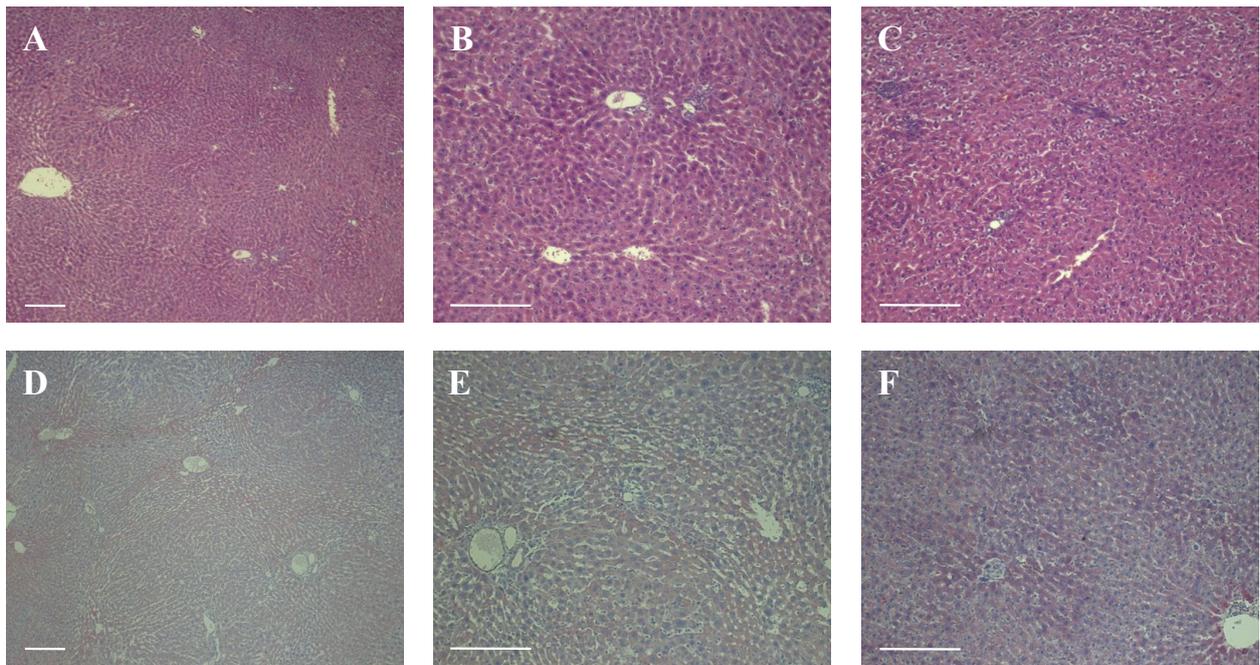


Abb. 4.4: (A+B) HE-Färbung von (A) Tier D1 in 50-facher, (B) Tier D1 in 100-facher Vergrößerung und (C) Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung. (D+E) CK-18-Färbung von (D) Tier D1 in 50-facher, (E) in 100-facher Vergrößerung und (F) Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung.

4.3.2 Proliferationsanalysen

Zur Veranschaulichung der Proliferationsrate in den Gewebeschnitten wurden immunhistologische Färbungen mit *Proliferation-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) der cLTx-Tiere und der Kontrolltiere zum Vergleich vorgeommen.

4.3.2.1 Proliferation-Cell-Nuclear-Antigen

Das *Proliferation-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) ist ein immunhistochemischer Indikator für die Zellproliferation. Die Proliferationsrate wurde als prozentuales Verhältnis der PCNA-positiven Zellen zu der Gesamtzellzahl im jeweiligen Areal ermittelt. In jedem Lobus wurden mindestens fünf Areale ausgewählt und die darin befindlichen PCNA-positiven Zellen, sogenannte „Events“ oder „Spots“ ausgezählt. Pro LTx-Empfängertier wurden mindestens drei Leberlappen ausgewertet. Von dem erhaltenen prozentualen Verhältnis der PCNA⁺-Zellen zur Gesamtzellzahl wurden der Mittelwert (M), die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) pro Lobus und Versuchstier erhoben. In den Gruppen A, B und

D wurden je drei cLTx-Tiere und ein Kontrolltier mit der PCNA-Immunhistochemie auf die Proliferationsrate der Zellen zum Finalisierungszeitpunkt untersucht. In der Gruppe C wurden zwei cLTx-Empfängertiere und ein Kontrolltier ausgewertet. Die Abb. 4.5 zeigt die mit dem immunhistologischen Oberflächenmarker PCNA angefärbten Gewebeschnitte von jeweils einem cLTx-Tier jeder Gruppe (A-D) und einem Kontrolltier pro Gruppe (E-F) in 100-facher Vergrößerung.

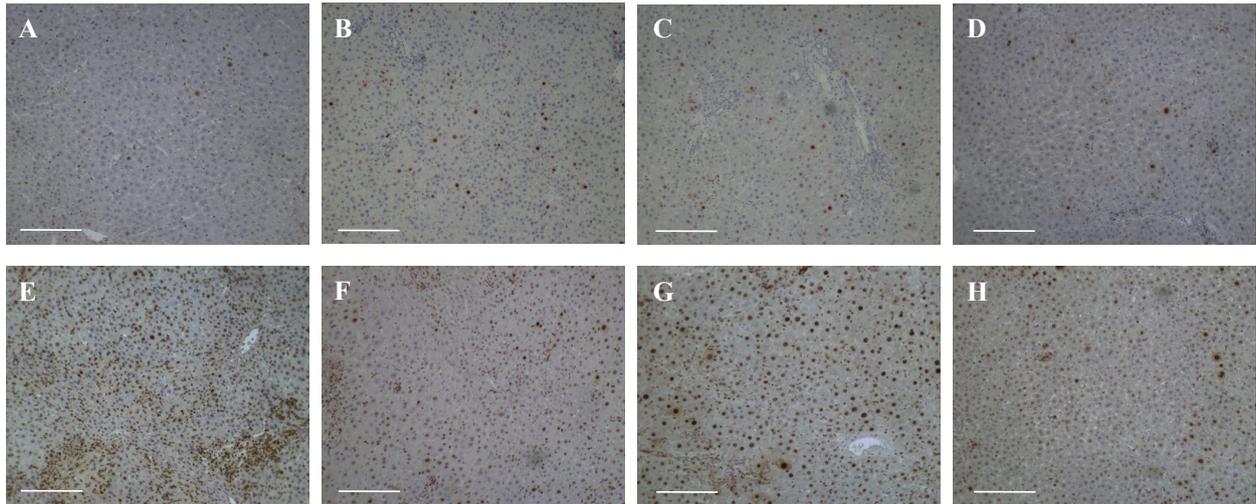


Abb. 4.5: Immunhistologiebilder der PCNA-Auswertung in 100-facher Vergrößerung mit je einem cLTx-Kombitier (A= A1, B= B1, C= C1, D= D1) und einem Kontrolltier (E-H) pro Gruppe.

PCNA-Auswertung Gruppe A

In der Gruppe A wurden drei cLTX-Empfängertiere und ein Kontrolltier ausgewertet. Die erhobenen Einzelwerte und die Anzahl der ausgewerteten Lobi sind der Tab. 15 zu entnehmen. Es ergab sich für die cLTx-Tiere der Gruppe A ein Mittelwert von 28,76 % PCNA-positiver Zellen zur Gesamtzellzahl mit einem SEM von 4,35 % (siehe Tab. 15).

Tab. 15: Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe A (8 d).

Gruppe A						
Tier	Lobus	M(%)	SD(%)	Maller Lobi (%)	SD aller Lobi (%)	SEM aller Lobi (%)
A1	1	26,09	3,22	22,80	7,42	3,71
	2	14,35	9,92			
	3	9,09	3,74			
	4	28,08	5,35			
A2	1	24,28	2,10	24,00	0,34	0,19
	2	23,80	5,07			
	3	9,71	1,39			
A3	1	42,00	3,29	39,40	3,87	1,94
	2	41,27	6,67			
	3	18,88	6,37			
	4	34,95	3,10			
Kontr.	1	35,17	3,42	37,80	3,74	2,64
	2	40,45	14,07			

Abk.: Kontr.= Kontrolltier, M= Mittelwert, SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler.

PCNA-Auswertung Gruppe B

In der Gruppe B wurden insgesamt vier Tiere ausgewertet und pro Tier wurden 3 Lobi ausgezählt. Es ergab sich ein Gruppenmittelwert von 14,39 % PCNA-positiver Zellen (Tab. 16).

Tab. 16: Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe B (15 d).

Gruppe B						
Tier	Lobus	M(%)	SD (%)	Maller Lobi (%)	SD aller Lobi (%)	SEM aller Lobi (%)
B1	1	5,91	1,33	5,50	0,58	0,33
	2	5,10	0,58			
	3	21,27	3,07			
B2	1	9,99	3,22	9,20	1,06	0,61
	2	8,49	2,72			
	3	31,05	3,30			
B4	1	35,32	3,01	28,40	17,08	9,86
	2	41,00	33,57			
	3	8,98	3,09			
Kontr.	1	9,75	2,73	39,50	1,83	1,06
	2	38,25	9,60			
	3	40,84	13,73			

Abk.: Kontr.= Kontrolltier, M= Mittelwert, SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler.

PCNA-Auswertung Gruppe C

Für die Auswertung der Gruppe C wurden zwei cLTx-Empfängertiere und ein Kontrolltier herangezogen. Wie in der Tab. 17 zu sehen ist wurden pro Tier drei bis vier Lobi ausgezählt. Es ergab sich ein Gruppenmittelwert von 14,38 % PCNA-positiver Zellen der cLTx-Tiere.

Tab. 17: Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe C (30 d).

Gruppe C						
Tier	Lobus	M(%)	SD (%)	Maller Lobi (%)	SD aller Lobi (%)	SEM aller Lobi (%)
C1	1	5,48	2,81	21,86	9,12	4,56
	2	29,43	3,13			
	3	24,41	5,75			
	4	11,73	2,97			
C2	1	6,59	2,90	6,90	0,44	0,26
	2	7,21	1,66			
	3	19,15	9,78			
Kontr.	1	21,14	8,57	31,71	9,88	5,71
	2	40,71	4,35			
	3	33,29	3,13			

Abk.: Kontr.= Kontrolltier, M= Mittelwert, SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler.

PCNA-Auswertung Gruppe D

In der Gruppe D wurden drei kombiniert transplantierte Tiere mit jeweils vier Lobli ausgewertet und ein Kontrolltier, bei dem ein Lobus ausgezählt wurde. Der durchschnittliche Anteil der PCNA-positiven Zellen betrug bei den cLTx-Tieren dieser Gruppe 7,62 % mit einem SEM von 3,23 % (siehe Tab. 18).

Tab. 18: Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe D (90 d).

Gruppe D						
Tier	Lobus	M(%)	SD (%)	M aller Lobli (%)	SD aller Lobli (%)	SEM aller Lobli (%)
D1	1	4,26	1,73	4,91	1,45	0,73
	2	3,39	1,03			
	3	5,20	3,25			
	4	6,78	2,40			
D3	1	3,03	1,39	2,53	1,30	0,65
	2	1,05	0,33			
	3	3,51	1,87			
	4	6,36	1,98			
D6	1	4,05	1,17	15,41	13,02	6,51
	2	2,68	0,83			
	3	52,38	7,91			
	4	12,05	3,05			
Kontr.	1	18,92	8,70	18,92	8,70	8,70

Abk.: Kontr.= Kontrolltier, M= Mittelwert, SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler.

Gruppenvergleich der statistischen Auswertung der PCNA-Ergebnisse

Anhand der Einzelauswertung der PCNA-positiven Zellen zur Zellgesamtheit pro Tier wurden in Tab. 19 jeweils die statistischen Erhebungen aller Tiere und gesondert die der cLTx-Empfängertiere hervorgehoben. Dabei wird deutlich, dass die Mittelwerte der PCNA-positiven Kerne in der Gesamtgruppenauswertung aller Gruppen höher ausfallen, als bei der Auswertung der cLTx-Tiere allein. Außerdem zeigte sich eine prozentuale Abnahme der Mittelwerte von Gruppe A bis Gruppe D.

Tab. 19: PCNA-Auswertung statistisch ausgewertet und nach Gruppen sortiert mit Hervorhebung der cLTx-Tiere.

PCNA-Auswertung		M(%)	SD(%)	SEM(%)
Gruppe A	alle Tiere	31,02	8,79	4,40
	nur cLTx	28,67	9,24	5,33
Gruppe B	alle Tiere	20,86	16,09	8,05
	nur cLTx	14,39	12,30	7,10
Gruppe C	alle Tiere	20,16	12,49	7,21
	nur cLTx	14,38	10,58	7,48
Gruppe D	alle Tiere	10,44	7,95	3,98
	nur cLTx	7,62	6,85	3,96

Abk.: cLTx= kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation, M= Mittelwert, SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler.

4.4 Immunhistologische Auswertungen zum Nachweis hepatischer Vorläuferzellen

Durch die immunhistologischen Färbungen der gewonnenen Gewebeprobe mit spezifischen Oberflächenmarkern für die hepatischen Vorläuferzellen sollte eine Identifizierung und eventuelle Charakterisierung der hPC am 90. pod ermöglicht werden. Es wurde für jeden Oberflächenmarker ein cLTx-Empfängertier der Gruppe D in 50-facher und 100-facher Vergrößerung anhand von Immunhistologiebildern in Abb. 4.6 dargestellt. Zudem wurde zum Vergleich ein Kontrolltier aus Gruppe D in 100-facher Vergrößerung abgebildet.

4.4.1 Thymus-Zell-Antigen (Thy-1)

Die immunhistologische Antikörperfärbung von Thy-1-positiven Zellen in den Gewebeschnitten diente dem Nachweis von Leberstammzellen sowie Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Die Abb. 4.6 (A-C) zeigt Immunhistologiebilder der Thy-1-positiv angefärbten dunkelblauen Zellen in den Gewebeprobe der cLTx-Tiere und des Kontrolltieres. Die Bilder (A+B) stammen von dem Tier D1 und wurden in 50-facher bzw. 100-facher Vergrößerung wiedergegeben. In (B) wurde exemplarisch ein Thy-1-positives Zellareal mit einem Pfeil markiert. Das Bild (C) stellt die Thy-1-Färbung eines Kontrolltiers zum Vergleich dar.

4.4.2 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)

Diese Antikörper-Färbung diente dem Nachweis leberspezifischer Stammzellen des Ovalzellkompartiments im Lebergewebe. EpCAM⁺-Zellen färbten sich wie in Abb. 4.6 (D-F) zu sehen ist rot an. In Bild (E) wurde zur Veranschaulichung ein EpCam⁺ gefärbtes Zellareal des Tier D1 in 100-facher Vergrößerung mit einem Pfeil hervorgehoben. Das Bild (F) zeigt den Gewebeschnitt eines Kontrolltiers in 100-facher Vergrößerung.

4.4.3 OV-6

Dieser Oberflächenmarker diente dem Nachweis hepatischer Vorläuferzellen mit Ovalzellcharakter. Die OV-6-positiven Zellen färbten sich rot im immunhistologisch untersuchten Gewebe an (siehe Abb. 4.6 (G-I)). In den Bildern (G+H) ist das Tier D1 in 50- bzw. 100-facher Vergrößerung zu sehen und der Pfeil in (H) markiert ein OV-6 positiv angefärbtes Zellareal. Das Bild (I) zeigt die 100-fache Vergrößerung des Gewebeschnitts eines Kontrolltiers.

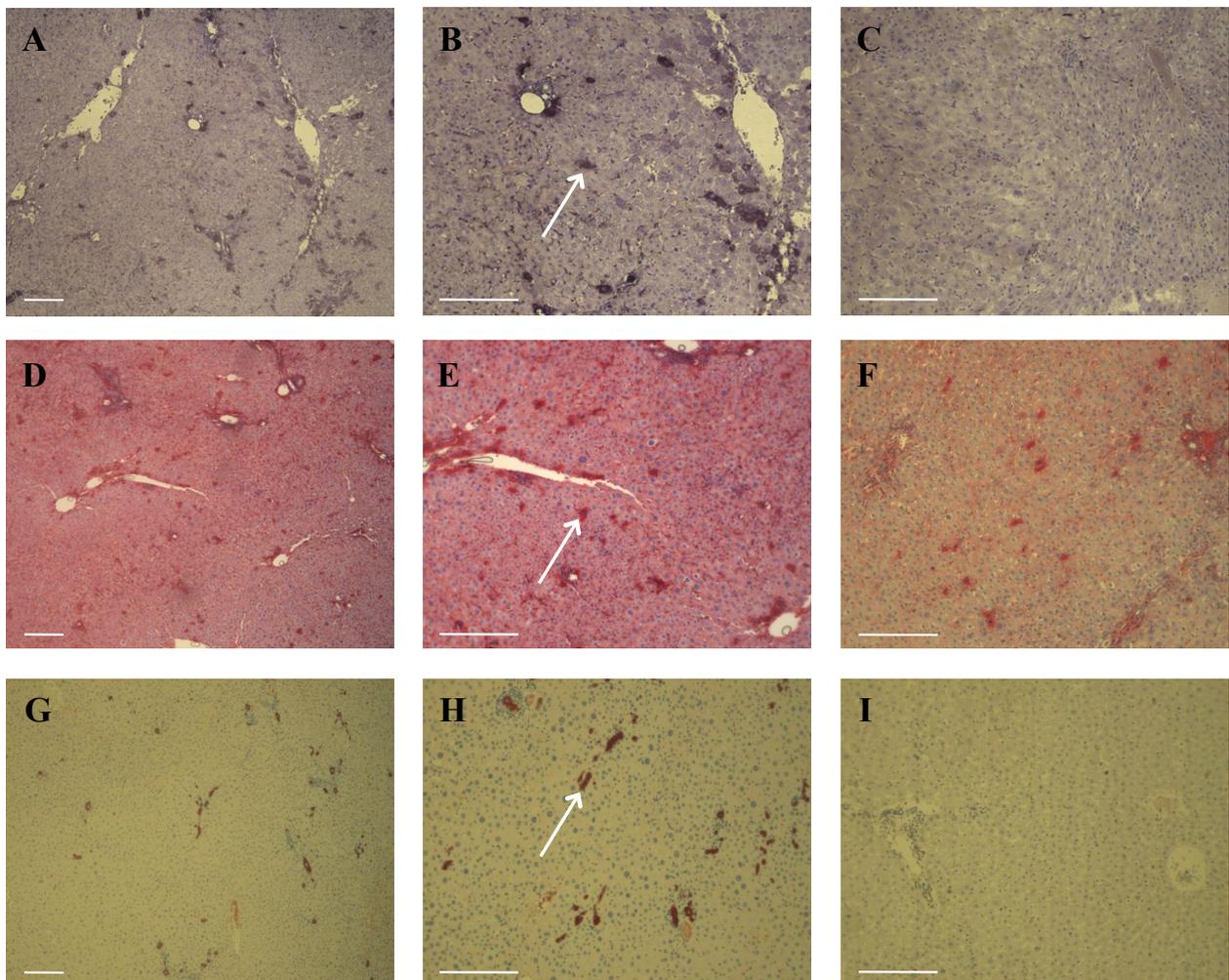


Abb. 4.6: (A-C) Immunhistologiebilder der Thy-1-Antikörperfärbung von (A) Tier D1 in 50-facher, (B) Tier D1 in 100-facher Vergrößerung und (C) Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung.

(D-F) Immunhistologiebilder der EpCam-Antikörperfärbung von (D) Tier D1 in 50-facher, (E) Tier D1 in 100-facher Vergrößerung und (F) einem Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung.

(G-I) Immunhistologiebilder der OV-6-Antikörperfärbung von (G) Tier D1 in 50-facher und (H) Tier D1 in 100-facher Vergrößerung und (I) Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung.

4.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FisH)

Zum Nachweis der transplantierten Leberzellen wurden die Y-Chromosomen in den Zellkernen der männlichen Spendertiere im Leberparenchym der weiblichen cLTx-Empfängertiere per Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FisH) nachgewiesen. Durch das in Kapitel 3.9 beschriebene Auftragen der DNA-Sonden konnten die Y-Chromosomen im Lebergewebe detektiert werden. Die Abb. 4.7 zeigt Beispielbilder der FisH-Auswertung von einem Kontrolltier und je einem cLCTx-Tier pro Gruppe. Die Anzahl der Y-Chromosomen enthaltenden FisH-positiven Zellkerne wurde prozentual zu der Gesamtheit der Zellkerne im Areal berechnet (Y-positive Kerne in %). Es wurden, wie in Tab. 20 zu sehen ist, pro Tier zwischen 18 und 87 Einzelwerte in einem Areal erhoben. Aus den so ermittelten Einzelwerten wurde der Mittelwert, die SD und der SEM der Y-positiven Zellkerne für jedes Tier berechnet. In Gruppe A und B wurden jeweils drei Tiere ausgewertet, fünf Tiere in Gruppe C und vier Tiere in Gruppe D. Des Weiteren erfolgte die Berechnung des Mittelwertes der Y-positiven Kerne in Prozent für die gesamte Gruppe anhand der Auszählung aller Areale (siehe Tab. 20).

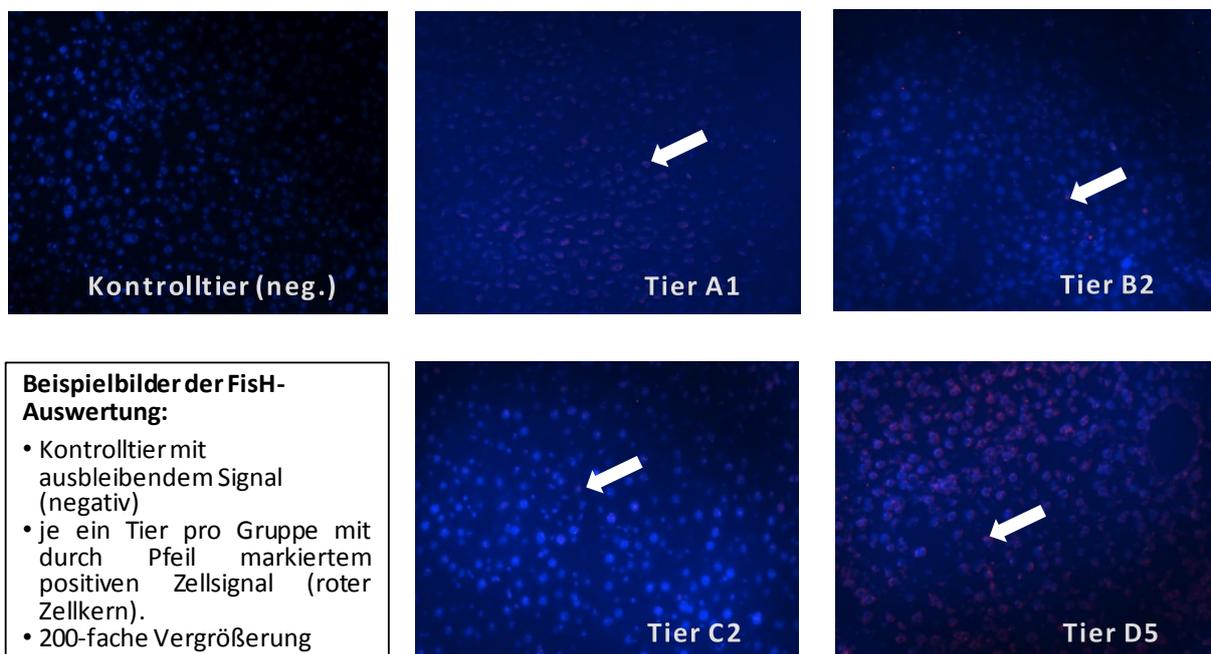


Abb. 4.7: Beispielbilder der FisH-Auswertung mit Kennzeichnung der Y-Chromosomen-positiven Zellkerne (Pfeil).

Tab. 20: Auswertung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit Mittelwert, SD und SEM pro Tier nach Gruppen eingeteilt unter Angabe der ausgezählten Areale.

Gruppe	Tier	Mittelwert Y-positive Kerne (%)	SD (%)	SEM (%)	Anzahl Areale (n)
A	A1	10,52	9,01	1,34	45
	A2	4,63	3,77	0,77	24
	A3	6,71	9,13	1,32	48
B	B1	9,09	10,94	1,17	87
	B2	8,30	9,89	1,43	36
	B3	2,47	2,25	0,50	20
C	C1	10,50	15,88	2,76	33
	C2	9,99	13,41	2,24	36
	C3	10,92	10,89	1,56	49
	C4	9,71	11,45	1,77	42
	C5	9,28	5,29	1,25	18
D	D1	14,94	10,09	1,64	38
	D3	20,39	7,91	1,34	35
	D4	23,36	11,11	1,36	67
	D5	17,08	9,59	1,40	47

Abk.: SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler, n= Anzahl.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung-Auswertung in der Gruppe A

Die Abb. 4.8 (A) veranschaulicht anhand eines Säulendiagramms die jeweiligen Mittelwerte der Y-positiven Kerne in Prozent mit dem SEM für die in Gruppe A ausgewerteten Tiere (A1, A2 und A3). Für das Tier A1 wurden insgesamt 45 Areale ausgezählt und der Mittelwert der Y-positiven Kerne betrug 10,52 % mit einem SEM von 1,34 %. Die Auswertung des Tier A2 basierte auf 24 ausgezählten Arealen der erhobene Mittelwert betrug 4,63 % mit einem SEM von 0,77 % und wie im Säulendiagramm A zu sehen ist, unterscheidet sich der Mittelwert der Y-positiven Zellkerne von Tier A2 signifikant (* $p = < 0,05$) von Tier A1. Das Tier A3 (n= 48 Areale) wies einen Mittelwert von 6,71 % mit einem SEM von 1,32 % auf.

Hinsichtlich der Verteilung der Y-Chromosom-positiven Zellkerne im Leberparenchym der ausgewerteten Areale wurden, wie in Abb. 4.8 (B) zu sehen ist, Box-Plots erstellt. Der Median der Zellverteilung (Y-positiv) lag für Tier A1 bei 7,96 % mit einem 75 %-Quartil bei 18,31 % und einem 25 %-Quartil bei 2,22 %. Die obere Antenne des Box-Plots, also der prozentuale Maximalwert der Y-positiven Zellkerne in einem ausgewerteten Areal betrug 31,93 %. Die Verteilung bei Tier A2 wies einen Median von 4,50 % mit einem 75 %-Quartil

bei 6,28 % und einem 25 %-Quartil bei 1,28 % auf. Allerdings wurden bei Tier A2 zwei Ausreißerwerte mit einem Maximalwert von 14,74 % ermittelt.

Bei dem Tier A3 wurde ein Median von 1,65 % ermittelt, das 75 %-Quartil betrug 10,92 % und das 25 %-Quartil lag bei 0,09 %. Auch bei diesem Tier wurde ein extrem hoher Ausreißerwert von 47,90 % Y-positiver Zellkerne in einem Areal ermittelt. Der Signifikanztest der Mediane zeigte einen p-Wert von 0,0201 zwischen Tier A1 zu Tier A2. Zwischen Tier A1 und A3 betrug der signifikante Unterschied der Mediane $p = 0,0023$.

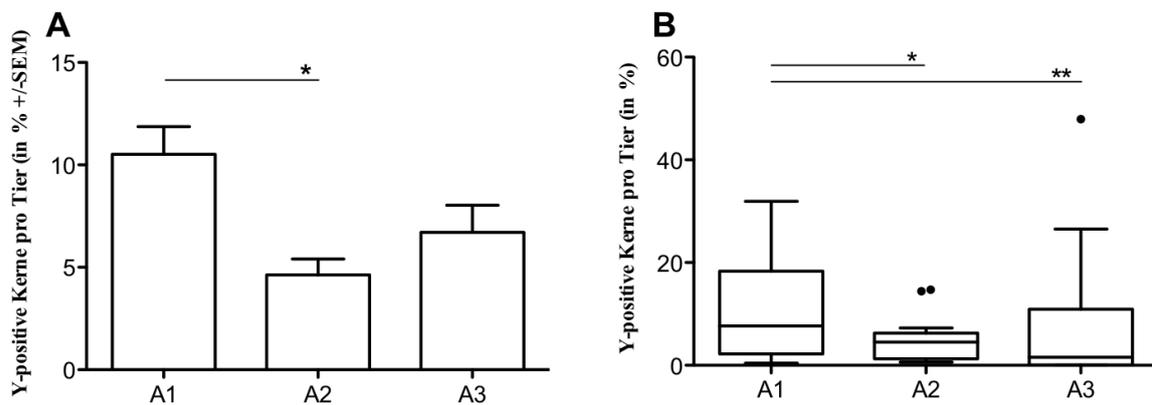


Abb. 4.8: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe A. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe A. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung-Auswertung in der Gruppe B

In Gruppe B wurden 3 Tiere ausgewertet (B1, B2 und B3). Die Abb. 4.9 (A) zeigt die Säulendiagramme der Mittelwerte mit dem jeweiligen SEM der Tiere in Gruppe B.

Zur Erhebung des Mittelwertes von 9,09 % bei Tier B1 wurden 87 Areale ausgezählt und der SEM betrug 1,17 %. Bei dem Tier B2 basierte der Mittelwert von 8,30 % mit einem SEM von 1,65 % auf der Auszählung von 36 Arealen. Wie in Abb. 4.9 (A) deutlich zu erkennen ist weicht der Mittelwert der 20 ausgezählten Areale bei Tier B3 mit 2,47 % und einem SEM von 0,50 % signifikant ($p < 0,05$) von Tier B1 ab.

Das in Abb. 4.9 (B) zu sehende Verteilungsdiagramm mit den Box-Plots für das jeweilige Tier der Gruppe B zeigt, dass sich die Mediane in dieser Gruppe nicht signifikant voneinander unterscheiden. Der Median der Y-positiven Zellkerne lag bei Tier B1 bei 1,88 %, bei Tier B2 betrug er 2,07 % und bei Tier B3 2,62 %.

Unterschiede lagen in den 75 %-Quartilen, die bei Tier B1 und B2 bei 20,86 % bzw. 19,98 % lagen, bei Tier B3 hingegen lediglich bei 4,03 %. Auch die erhobenen prozentualen Maximalwerte der Y-positiven Kerne im Leberparenchym lagen bei den Tieren B1 und B2 mit 32,94 % und 27,63 % in einem ähnlichen Bereich. Der Maximalwert betrug bei Tier B3 lediglich 7,48 %.

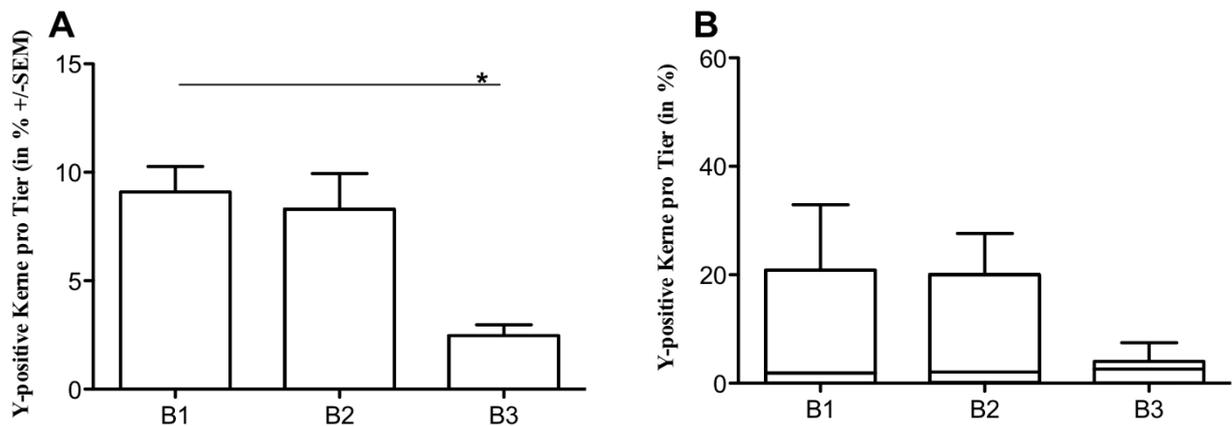


Abb. 4.9: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe B. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe B. (* $p < 0,05$)

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung-Auswertung in der Gruppe C

In der Gruppe C wurden 5 Tiere ausgewertet. Wie in Abb. 4.10 (A) veranschaulicht wird, lagen die Mittelwerte der Tiere C1, C2, C3, C4 und C5 in einem Bereich von 9,29 % bis 10,92 % ohne, dass sich die Werte signifikant voneinander unterschieden. Die Anzahl der ausgezählten Areale variierte von $n=18$ (C5) bis $n=49$ (C3). Das Verteilungsmuster der Mediane der Y-positiven Zellkerne im Leberparenchym hingegen unterschied sich zwischen den Tieren C1 und C5 signifikant (p -Wert $<0,05$) siehe Abb. 4.10 (B). Das Tier C1 zeigte einen Median von 1,69 %, bei dem Tier C5 hingegen betrug der Median 9,66 %. Die Länge der Box des Kastendiagramms wird auch Interquartilsabstand (*Interquartile Range, IQR*) genannt und die IQR variierte deutlich zwischen den Tieren dieser Gruppe. Am geringsten fiel er bei dem Tier C5 aus, welches auch keine Ausreißerwerte aufwies. Zwar ist der IQR bei Tier C2 (Bereich 0,00 % bis 11,71 %) ebenfalls vergleichsweise gering, allerdings wurden bei diesem Tier insgesamt 7 Ausreißerwerte festgestellt mit einem Maximum von 40,95 % in einem der ausgezählten Areale.

Bei Tier C1 lag das Maximum sogar bei 52,87 % Y-Chromosomen-positiver Zellen in einem Areal (siehe obere Antenne des Box-Plots in Abb. 4.10 (B)).

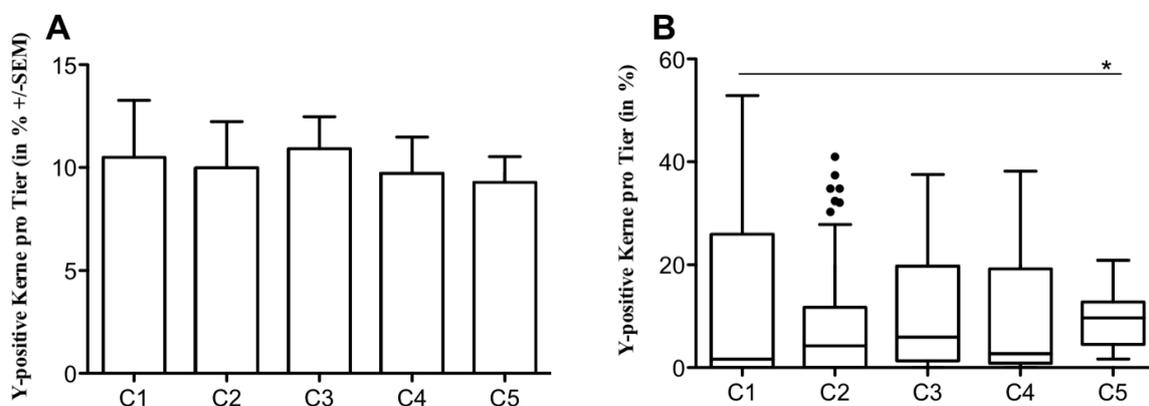


Abb. 4.10: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe C. B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe C. (* $p < 0,05$)

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung-Auswertung in der Gruppe D

Die FisH-Auswertung der Gruppe D umfasst 4 Tiere (D1, D3, D4 und D5). Es wurden zwischen 35 und 67 Arealen pro Tier ausgezählt. Alle Mittelwerte dieser Gruppe lagen über denen der übrigen Gruppen, der niedrigste Mittelwert wurde mit 14,94 % bei Tier D1 gemessen und der höchste bei Tier D4 mit 23,36 % Y-Chromosomen-positiver Zellkerne. Wie in Abb. 4.11 (A) zu sehen ist, bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Tieren D1 und D4 ($p < 0,001$), sowie zwischen Tier D4 und D5 mit einem p -Wert $< 0,05$.

Die Abb. 4.11 (B) veranschaulicht die Verteilung der Y-positiven Zellkerne im Lebergewebe. Dem Box-Plot von Tier D1 ist zu entnehmen, dass der Median mit 13,80 % zwar im Vergleich zu den anderen Tieren dieser Gruppe niedriger lag, allerdings sind zwei Ausreißerwerte mit einem Maximalwert bei 44,51 % gemessen worden. Den höchsten Median wies Tier D4 mit 20,10 % auf, sodass die Hälfte der ausgezählten Areale mehr als 20,20 % Y-positiver Zellkerne bei diesem Tier beinhalteten. Bei Tier D4 gab es keine Ausreißerwerte und die obere Antenne des Box-Plots befand sich bei 51,18 %. Der Median von Tier D1 sowohl zu Tier D3 mit einem p -Wert $< 0,01$ als auch zu Tier D4 mit einem p -Wert $< 0,001$ signifikant unterschiedlich. Der Signifikanztest zwischen den Tieren D4 und D5 ergab einen p -Wert $< 0,01$.

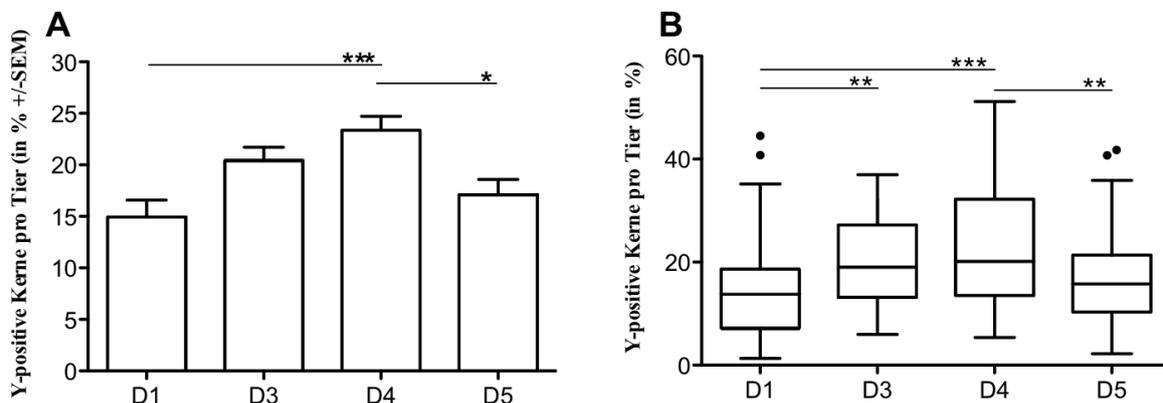


Abb. 4.11: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe D. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe D. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Gruppenübergreifender Vergleich der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung-Auswertung

Nach der tierindividuellen FisH-Auswertung zur Y-Chromosomen Detektion im vorangegangenen Abschnitt, folgt in diesem Teil der Gruppenvergleich zur Beurteilung des Transplantationserfolges der adulten Hepatozyten und hPC in Kombination mit der allogenen LTx. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Finalisierungszeitpunktes der Gruppen A-D, verdeutlicht die Tab. 21 eine Zunahme des prozentualen Mittelwertes der Y-positiven Zellen im Verlauf der Beobachtungszeit.

Vom ersten Kontrollzeitpunkt (8 d) der Gruppe A mit einem Mittelwert von 7,75 % in insgesamt 117 ausgezählten Arealen, nimmt der Mittelwert über den Zeitraum bis zu 90 Tagen nach cLTx stetig zu, sodass in Gruppe D ein Mittelwert von 19,61 % Y-positiver Zellen in 180 ausgezählten Arealen zu sehen war.

Die Abb. 4.12 (A) veranschaulicht, dass die Zunahme der Mittelwerte von den Gruppen A-C jeweils signifikant von dem für Gruppe D erhobenen Mittelwert mit einem p-Wert < 0,001 abwichen (***). Die Standardfehler des Mittelwerts der einzelnen Gruppen (siehe Tab. 21 bzw. Abb. 4.12 (A)) lagen gruppenübergreifend in einem ähnlichen Bereich von 0,79-0,91 %.

Tab. 21: Gruppenbasierte statistische Auswertung der FisH zur Y-Chromosomen Detektion im Leberparenchym.

Gruppe	Mittelwert (%)	SD (%)	SEM (%)	n Areale/Gruppe	n Tiere/Gruppe
A	7,75	8,54	0,79	117	3
B	7,97	10,12	0,85	143	3
C	10,2	12,11	0,91	178	5
D	19,61	10,49	0,78	180	4

Abk.: SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler, n= Anzahl.

Die Abb. 4.12 (B) zeigt die Verteilungsmuster der durch die FisH detektierten Zellen innerhalb der Gruppen. Gruppe A wies einen Median von 5,00 % auf und das Maximum der beiden Ausreißerwerte lag bei 47,90 %. Der IQR der Gruppen B und C fiel im Vergleich zu denen der Gruppen A und D größer aus. Der Median der Gruppe B war mit 1,99 % der niedrigste im Gruppenvergleich, gefolgt von dem Median Gruppe C mit 3,92 %. In Gruppe C wurde allerdings ein Ausreißerwert von 52,87 % Y-positiver Zellkerne in einem der ausgezählten Areale verzeichnet. Den höchsten Median wies die Gruppe D mit 17,33 %

Y-positiven Zellen auf. In dieser Gruppe wurden zwei Ausreißerwerte mit einem Maximum von 51,18 % Y-positiver Zellen pro Areal gemessen. Es zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede der Mediane beim Vergleich der Gruppen untereinander. Gruppen A-C sind jeweils mit einem p-Wert $< 0,001$ signifikant unterschiedlich zur Gruppe D. Zusätzlich weichen die Mediane der Gruppe B und C mit einem p-Wert von 0,038 signifikant voneinander ab.

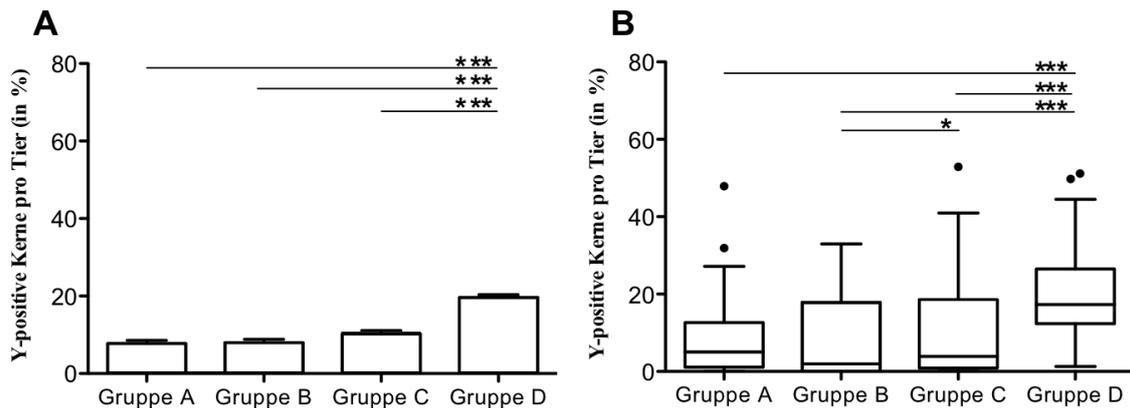


Abb. 4.12: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Gruppen A-D. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppen A-D. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

5 Diskussion

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) stellt derzeit den Goldstandard der Therapieoptionen bei terminalem Leberversagen dar. Der ausgeprägte Spenderorganmangel und die eingeschränkten Langzeitergebnisse der OLT aufgrund der z.T. massiven Nebenwirkungen der notwendigen Immunsuppression, erklären die wissenschaftlichen Bestrebungen zur Etablierung von geeigneten Alternativtherapien. Eine vielversprechende Therapieoption bei fulminanten Lebererkrankungen, die bereits in klinischen Studien angewandt wurde, stellt die Hepatozytentransplantation dar⁴³.

Die Leber nimmt bei der Erforschung der therapeutischen Zelltransplantation durch ihre einzigartige Fähigkeit zur Regeneration aufgrund der Proliferationskapazität adulter Hepatozyten eine Sonderstellung im Vergleich zu anderen Organen ein. Sind die adulten Hepatozyten aufgrund von massiven Gewebenekrosen nicht in der Lage, die geschädigte Leber zu regenerieren, kommt es zur Ausprägung hepatischer Vorläuferzellen (hepatischer Progenitorzellen, hPC)¹⁰⁴.

Aufgrund ihres Stammzellcharakters (Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Multipotenz, Reparatur geschädigten Gewebes und die Möglichkeit der wiederholten Transplantation), wird bei den hPC auch von somatischen Leberstammzellen gesprochen¹⁰¹.

Eines der Hauptprobleme bei der klinischen Anwendung der Leberzelltransplantation, liegt in der erfolgreichen Integration der transplantierten Zellen in das Wirtsparenchym. Damit es zum therapeutisch relevanten *Engraftment* kommt, benötigen die transplantierten Leberzellen einen Selektionsvorteil gegenüber den endogenen Hepatozyten⁶⁷.

Die vorliegende Arbeit verfolgt den innovativen Ansatz, durch die Kombination der Transplantation autologer adulter Hepatozyten und hPC in ein allogenes Lebertransplantat die nötigen Voraussetzungen für die erfolgreiche Bearbeitung klinisch-experimenteller Fragestellung zur therapeutischen Leberzelltransplantation zu schaffen. Der für ein erfolgreiches *Engraftment* der transplantierten Leberzellen obligate Selektionsvorteil soll in diesem Tiermodell zum einen durch die Verwendung syngener Leberzellen (= genetisch identische Zellen, die vom Immunsystem des Empfängertieres nicht als fremd erkannt werden) und zum anderen durch die Präkonditionierung der allogenen Spenderleber mit dem leberspezifischen Mitosehemmer Retrorsin erreicht werden. Es wird zudem postuliert, dass eine kombinierte Zelltransplantation metabolisch aktiver adulter Hepatozyten und hPC die Proliferation der Leberzellen im Gewebe und somit die Repopulation der Spenderleber

begünstigt¹²⁰. Das allogene Lebertransplantat fungiert dabei als biologische Matrix für die einwandernden syngenen Zellen und es kommt zu einer „Autologisierung“ des fremden Organs im Sinne eines *in vivo* generierten Neo-Hybriden Lebertransplantats (= NHL).

Die Untersuchung der prinzipiellen Durchführbarkeit der Kombination einer allogenen Lebertransplantation mit der Transplantation syngener adulter Hepatozyten und hPC erfolgt im Rattenmodell. Als Leberzellspender dienen männliche Lewis (=Lew)-Ratten desselben Inzuchtstammes (= identischer Haplotyp, syngen) wie dem der weiblichen Lew-Empfängertiere der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation (cLTx). Die adulten Hepatozyten werden gemeinsam mit den hPC nach einer Proliferationsstimulation aus der Leber der männlichen Lew-Ratten isoliert. Das weibliche Lewis-Empfängertier erhält ein allogenes Lebertransplantat einer weiblichen Dark Agouti (=DA)-Ratte. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Rejektionsmodell bei der Lebertransplantation¹⁵².

Da zunächst die generelle Realisierbarkeit der Kombination zweier invasiver chirurgischer Techniken insbesondere in Hinblick auf die Repopulation der Spenderleber untersucht werden soll, wurde eine konstante Immunsuppression der Lew-Empfängertiere mit Cyclosporin A durchgeführt. Die DA-Ratten werden vor der Organspende mit Retrorsin behandelt, einem pflanzlichen Pyrrolizidinalkaloid, das leberspezifisch zu einer Blockade des Zellzyklus führt und somit den transplantierten Leberzellen einen Selektionsvorteil gewährleisten soll⁶⁷. Durch die Transplantation syngener adulter Hepatozyten und hPC in ein allogenes Lebertransplantat soll es zu einer erfolgreichen Repopulation im Sinne eines NHL kommen. Durch eine Entstehung des NHL werden optimale Voraussetzungen für die klinische Erforschung der Leberzelltransplantation als Alternativtherapie bei terminalem Leberversagen geschaffen.

Da die Leber, neben der Fähigkeit zur Regeneration, zudem ein immunprivilegiertes Organ mit nachweislich tolerogenem Potenzial ist, bietet dieses neu etablierte Rattenmodell des Weiteren eine Grundlage für die zukünftige Untersuchung der Induktion einer operationalen Toleranz.

5.1 Beurteilung der generellen Durchführbarkeit einer kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation

Grundvoraussetzung für die weitere Bearbeitung klinisch-experimenteller Fragestellungen des vorliegenden Rattenmodells, war die Möglichkeit der Kombination zweier aufwendiger chirurgischer Eingriffe: der orthotopen Lebertransplantation und der intrasplenalen Leberzelltransplantation. Einzeln betrachtet handelt es sich dabei um etablierte Tiermodelle, die als Ausgangspunkt für klinische Studien dienen^{44,153}.

Zunächst einmal musste in der vorliegenden Studie evaluiert werden, ob die Ratten die extreme Belastung der miteinander kombinierten invasiven Methoden tolerierten. Die hohe Kreislaufbelastung bei der orthotopen Lebertransplantation ist bedingt durch die Ischämiezeit des Transplantates, die anhepatische Phase des Empfängers und die daraus resultierenden Pathomechanismen. Durch die erforderlichen Gefäßanastomosen verändern sich die Strömungsverhältnisse des Blutes unmittelbar nach der Reperfusion der Leber insbesondere im Bereich der V. portae. Die intraoperativ bzw. innerhalb von 24 h nach der LTx erfolgte Transplantation der Hepatozyten und hPC in die Milz wurde zunächst als zusätzliche Belastung für den Kreislauf und die Leberfunktion gewertet. Die aus dem Milzparenchym anflutenden transplantierten Zellen führen zu einer Veränderung der intrahepatischen Druckverhältnisse sowie einem erhöhten Thromboserisiko⁵².

Da es sich bei der kombinierten Transplantation von isolierten Leberzellen in ein allogenes Lebertransplantat um ein völlig neues Konzept handelt, war eine Berufung auf bereits durchgeführte Versuche nicht möglich. Von den in der vorliegenden Studie insgesamt 29 durchgeführten kombinierten Leber- und Leberzelltransplantationen (cLTx) verliefen 22 komplikationslos, sodass eine Überlebensrate von 75,86 % (siehe Kapitel 4.1.2) die generelle Durchführbarkeit dieses Konzepts beweist.

Es traten lediglich bei 13,79 % der weiblichen Empfängertiere direkt in Verbindung mit der cLCTx stehende Komplikationen auf. Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes bis zur planmäßigen Finalisierung zeigte eines der Tiere einen klinisch reduzierten Allgemeinzustand mit Gewichtsverlust und Apathie, der einen Ausschluss aus dem Versuch am 13. postoperativen Tag nach sich zog.

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen von Leber- und Gallenfunktionsparametern sowie Nierenfunktionsparametern in Kapitel 4.1.5 beweisen eine Stabilisierung der klinische relevanten Blutwerte nach der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation. Die oberhalb der Referenzgrenze liegenden Analysewerte der untersuchten Parameter in der

ersten Woche nach der cLTx unterstreichen die zu erwartende sehr hohe Belastung für die Tiere. Die gemessenen Transaminasenwerte lagen in Woche 1 nach cLTx zwar zum Teil deutlich über dem Referenzbereich, entsprechend einem auch beim Menschen zu beobachtenden Ischämie-Reperfusionsschaden. Die Werte normalisierten sich jedoch, wie anhand der Blutuntersuchungen der Gruppe D von Woche 7 bis zum Finalisierungszeitpunkt in Woche 12 zu sehen war. Insgesamt ließ der Verlauf der Transaminasen auf eine konstante Leberfunktion nach der cLTx schließen. Auch der Bilirubinspiegel lag nach der ersten postoperativen Woche konstant unterhalb des Referenzwerts (siehe Kapitel 4.1.5 Tab. 11). Der Gallenmetabolismus der cLTx-Empfängertiere war somit trotz der hohen Belastung durch die cLTx ungestört.

5.2 *Engraftment* der transplantierten adulten Hepatozyten und hPC

5.2.1 Ergebnisdiskussion der Isolierungen primärer adulter Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen

Die erfolgreiche Isolierung geeigneter Spenderzellen stellte einen wichtigen Ausgangspunkt dieses Forschungsvorhabens dar. Die Leberzellspender wurden zur Proliferationsinduktion der hPC nach dem Solt-Farber-Protokoll mit einer Kombination aus chemischer Inhibierung der adulten Hepatozyten durch 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) und einem generellen Regenerationsstimulus durch eine 60 %-ige Leberteileresektion (*Partial Hepatectomy*, PH) unterzogen¹⁰⁹⁻¹¹¹. Die männlichen Lew-Leberzellspender tolerierten diese Vorbehandlung sehr gut und zeigten bis zur Isolierung der Leberzellen am Tag 8-15 nach der PH keine klinischen Auffälligkeiten. Die für die cLCTx verwendeten Leberzellspender wurden auf Grundlage der in Kapitel 4.2.1 aufgeführten Beurteilung der Isolierungserfolge anhand der Dauer der Vorbehandlung, der Zellviabilität und der Zellausbeute ausgewählt.

Die durchschnittliche Viabilität der transplantierten Leberzellen betrug 73,18 % und der Mittelwert der Zellausbeute lag bei $35,78 \times 10^6$ Zellen pro Isolierung. Die Menge der transplantierten hepatischen Progenitorzellen wurde anteilig an der nicht-parenchymalen Zellfraktion berechnet und betrug im Durchschnitt 25 %. Durch die erfolgreiche Isolierung und Aufreinigung der adulten Hepatozyten und hPC war es möglich, aus der

Leberzellisolierung die zu transplantierenden Zellen für bis zu 3 weibliche Lew-Empfängertiere zu erhalten (siehe Kapitel 4.2 Tab. 14), sodass die benötigte Versuchstierzahl zur Bearbeitung der Fragestellung reduziert werden konnte.

5.2.2 Bewertung der kombinierten Transplantation adulter Hepatozyten und hPC (cLCTx)

Die kombinierte Transplantation der metabolisch aktiven und proliferativen Leberzellen erfolgte entweder intraoperativ nach Abschluss der erfolgreichen orthotopen Lebertransplantation oder am ersten postoperativen Tag (1. pod) in das Milzparenchym. Die Auswahl des Applikationsweges über die Milz wurde mit den in der Literatur beschriebenen intrasplenalen Transplantationserfolgen und der hohen Gefahr einer Portalvenenthrombose bei intraportaler Zelltransplantation begründet ⁷⁵. Die Zelltransplantation ins Milzparenchym birgt außerdem geringere Risiken einer Nachblutung und ist in der praktischen Umsetzung vergleichsweise einfach durchzuführen.

Die in die Milzpulpa transplantierten Leberzellen werden über das portalvenöse System in die Leber geschwemmt und sind hier nach Durchschreiten der Endothelbarriere in der Lage sich über direkten Zell-Zellkontakt in das Wirtsparenchym zu integrieren ^{46,48}. Die cLCTx kann in Kombination mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden bedingt durch die vorangegangene OLT zu einer portalen Hypertension aufgrund der rheologisch schlechteren Eigenschaften des zellreichen Milzvenen-Effluates und dem Größenmissverhältnis der transplantierten Zellen mit den Lebersinusoiden führen ¹⁵⁴. In der vorliegenden Studie wurde eine eher geringe Menge von 5×10^6 adulter Hepatozyten pro Tier transplantiert, da eine höhere Anzahl transplantiertes Zellen die Thrombosegefahr im portalvenösen Gefäßsystem steigern könnte. Insbesondere wegen der unmittelbar zuvor durchgeführten Lebertransplantation mit erheblicher Volumenschwankung bei anhepatischer Phase und Reperfusion sowie dem dazugehörigen Ischämie-Reperfusionsschaden waren Komplikationen nach cLCTx durchaus zu erwarten.

So kam es zu einem Anstieg der Transaminasen in der ersten Woche nach der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation (cLCTx) und in 13,79 % der Fälle traten Komplikationen auf, die zum Verlust der weiblichen Empfängertiere führten (siehe Kapitel 4.1.4 Tab. 6). Bei der detaillierten Betrachtung dieser vier Tiere wurde deutlich, dass 10,34 % eine intraoperative cLCTx erhielten und nur einem Tier (3,45 %) die Leberzellen am ersten

postoperativen Tag nach der Lebertransplantation appliziert wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die cLTx generell eine in der Praxis umsetzbare Methode darstellt, wobei die zeitversetzte kombinierte Leberzelltransplantation am ersten postoperativen Tag im Vergleich zur intraoperativen cLCTx bedeutend besser toleriert wurde. Von den insgesamt 29 durchgeführten cLTx verliefen 75,86 % komplikationsfrei.

5.2.3 Bewertung des im Rattenmodell geschaffenen Selektionsvorteils bezüglich des *Engraftments*

Die Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Engraftment der Zellen liegt darin, dass die in das Milzparenchym transplantierten Leberzellen mit dem Blutstrom in die distalen Portalvenenaufzweigungen der Leber gelangen⁴⁶. Der Größenunterschied zwischen den transplantierten Hepatozyten (ca. 24 µm) und den Lebersinusoiden (7 µm), in denen sich die applizierten Leberzellen zunächst verfangen, führt zu einer vorübergehenden portalvenösen Hypertension. Die in der Literatur beschriebene Phagozytoserate durch das lebereigene Abwehrsystem aus Kupfferzellen und anderen Fresszellen liegt bei ca. 70 % der transplantierten Zellen⁴⁷. Die verbliebenen Hepatozyten befinden sich zunächst überwiegend in den periportalen Regionen der Leberlobuli. Die Endothelbarriere muss durchbrochen werden, damit die transplantierten adulten Hepatozyten und hPC sich anhand von Zell-Zellkontakten und der Ausbildung von *Gap Junctions* ins Leberparenchym integrieren⁴⁸. Das *Microenvironment* der Leber bietet dennoch ideale Bedingungen, wie eine extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren und Zell-Zellinteraktionen für das erfolgreiche *Engraftment* der transplantierten syngenen Zellen in das Leberparenchym⁴⁹.

Laconi et al. bewiesen 1998, dass eine Vorbehandlung der Leber mit Retrorsin eine erfolgreiche Repopulation durch die transplantierten Leberzellen ermöglicht⁶⁷. Des Weiteren zeigten Matsusaka et al. 2000, dass die cLCTx mit adulten Hepatozyten und hPC eine verbesserte Repopularisierung des Empfängerorgans gegenüber der Transplantation von adulten Hepatozyten allein bewirkt¹²⁰.

Durch die Transplantation von syngenen proliferativen Zellen und die Präkonditionierung der Spenderleber mit dem leberspezifischen Mitosehemmer Retrorsin wurde hinsichtlich des Selektionsvorteils in dem zu etablierenden Rattenmodell eine optimale Basis für die Repopulation des allogenen Lebertransplantats geschaffen.

5.2.4 Bewertung immunhistologischen Proliferationsnachweise der transplantierten hPC im Retrorsin-vorbehandeltem allogenen Lebertransplantat

Die in Kapitel 4.3.2.1 aufgeführten Ergebnisse der Proliferationsanalysen mit dem immunhistologischen Indikator *Proliferation-Cell-Nuclear-Antigen* (= PCNA) zeigten, dass zu jedem Kontrollzeitpunkt PCNA-positive Zellen im Gewebe nachzuweisen waren. Allerdings nahm der prozentuale Anteil der als proliferativ markierten Zellen zur Zellgesamtheit im Verlauf des Beobachtungsraumes von Gruppe A (8 d) mit 28,76 % PCNA-markierten Zellen bei den cLTx-Tieren zu Gruppe D (90 d) mit 7,62 % stetig ab. Die mit dieser immunhistologischen Färbung untersuchten Gewebeproben der Kontrolltiere in den jeweiligen Gruppen zeigten erstaunlicherweise höhere Mittelwerte der PCNA-positiven Zellen als die cLTx-Empfängertiere, was durch eine Färbung hämatopoetischer Vorläuferzellen bedingt sein kann. Dies bestätigte sich in den immunhistologischen Färbungen mit Thy-1, einem Marker, der kontrovers diskutiert wurde und sowohl auf hämatopoetischen Stammzellen, als auch Ovalzellen nachweisbar ist^{114,118,155,156}.

Die Kontrolltiere zeigten auch bei der Thy-1-Färbung z.T. eine stärkere Expression, als die cLTx-Empfängertiere, was möglicherweise auf eine Einwanderung hämatopoetischer Zellen nach Ischämie und Reperfusion zurückzuführen ist. Weitere Analysen zur genaueren Bestimmung des hämatopoetischen Kompartimentes wurden nicht durchgeführt.

Zur Identifikation der verschiedenen hepatischen Vorläuferzellen wurden zudem weitere in Kapitel 4.4 aufgeführte immunhistologische Untersuchungen der Gewebeproben durchgeführt. Dabei waren bei allen cLTx-Empfängertieren die durch die gezielte Proliferationsinduktion stimulierten leberspezifischen Stammzellen des Ovalzellkompartiments (OV-6-positive Zellen, EpCAM-positive Zellen) in den Lebergewebeproben nachweisbar. Die immunhistologisch nachgewiesenen hPC befanden sich nicht nur in den periportalen Regionen der Leberläppchen, sondern wanderten auch weiter in das Leberparenchym ein, was als Zeichen des erfolgreichen *Engraftment* gewertet wurde. Dieser qualitative immunhistologische Nachweis der verschiedenen hepatischen Progenitorzellen zeigte auch nach dem 90. pod eine Proliferation im Leberparenchym der cLTx-Empfängertiere.

5.3 Bewertung des Repopulationserfolges des allogenen Lebertransplantates durch die transplantierten syngenen adulten Hepatozyten und hPC anhand der Langzeitdetektion mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Um eine langfristige Detektion der transplantierten Zellen im Lebergewebe zu ermöglichen, musste eine Methode gewählt werden, bei der dies trotz der hohen Proliferationsrate und des Beobachtungszeitraums von bis zu 90 d gewährleistet werden konnte. Eine Darstellung der transplantierten Zellen im Gewebe kann durch Zellmarkierung mit Farbstoffen oder Radioisotopen stattfinden oder wird durch die Verwendung transgener Tiermodelle ermöglicht. Der Nachteil bei der Verwendung von exogenen Zellmarkern liegt in dem durch den Zellumsatz bedingten Signalverlust, welcher eine Langzeitbeobachtung der transplantierten Zellen verschlechtert⁵⁴.

Das Rattenmodell zur Validierung des NHL-Konzeptes nutze die Geschlechtsdifferenz des weiblichen Empfängertieres zum männlichen Leberzellspender aus. Durch die Y-Chromosomen in den Zellkernen der transplantierten adulten Hepatozyten und hPC war ein eindeutiger Nachweis des Zellursprungs zu jeder Zeit möglich. Die transplantierten männlichen Zellen wurden durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FisH) mittels Y-Chromosomen-spezifischer DNA-Sonden im Lebergewebe des weiblichen Empfängertieres sichtbar gemacht. Bei der FisH-Auswertung in Kapitel 4.5 wurden die detektierten Y-Chromosomen-positiven Kerne (aus der cLCTx stammend) ins Verhältnis zur Gesamtkernzahl gesetzt.

Der Gruppenvergleich der FisH-Auswertung in Kapitel 4.5 zur Beurteilung der Repopulationsrate unter Berücksichtigung des jeweiligen Finalisierungszeitpunktes der Gruppen A-D verdeutlicht anhand der Tab. 21 eine Zunahme des prozentualen Mittelwertes der Y-positiven Zellen im Verlauf der Beobachtungszeit. Vom ersten Kontrollzeitpunkt (8 d) der Gruppe A mit einem Mittelwert von 7,75 % Y-positiver Kerne nimmt der Mittelwert über den Zeitraum bis zu 90 Tagen nach cLTX konstant zu, sodass in Gruppe D ein Mittelwert von 19,61 % Y-positiver Kerne zu sehen war. Die Abb. 4.12 (A) veranschaulicht zudem, dass die Mittelwerte von den Gruppen A-C jeweils signifikant von dem für Gruppe D erhobenen Mittelwert mit einem p-Wert < 0,001 abwichen, wobei die Standardfehler in einem Bereich von 0,79-0,91 % lagen.

Diese Ergebnisse liefern den Beweis der erfolgreichen Repopulation des allogenen Lebertransplantats durch die transplantierten männlichen Leberzellen, da im Verlauf der Beobachtungsdauer ein signifikanter Anstieg der ins Wirtsparenchym integrierten Zellen

mittels der Y-Chromosomen-Detektion nachgewiesen wurde. Der signifikant höhere ($p < 0,001$) Mittelwert der Y-Chromosomen-positiven Zellen in der Gruppe D im Vergleich zu den früheren Kontrollzeitpunkten belegt des Weiteren eine hohe Proliferationsrate der gemeinsam transplantierten adulten Hepatozyten und hPC.

Die Abb. 4.12 (B) in Kapitel 4.5 gibt anhand der Verteilungsmuster der Y-positiven Kerne im Gewebe Rückschlüsse über die Homogenität der Zellverteilung. Der Interquartilenabstand (*Interquartile Range*, IQR) der Gruppen B und C fiel im Vergleich zu denen der Gruppen A und D größer aus, die Verteilung der Y-Chromosomen-positiven Zellkerne im Gewebe in den Gruppen A und D fiel also gleichmäßiger aus, als in den Gruppen B und C. Auch der Median der Gruppe D war mit 17,33 % der höchste Wert ($p < 0,001$). Zusätzlich waren die Mediane der Gruppe B und C signifikant unterschiedlich ($p = 0,038$).

Dies zeigt also, dass die Hälfte der per FisH-Analyse ausgezählten Areale am 90. pod mehr als 17,33 % transplantierte männliche Zellen enthielten. Einzelne Werte der Gruppen A und C wurden als Ausreißer gewertet, da sie mit bis zu 52,87 % detektierten Zellkernen eine überdurchschnittlich hohe Repopularisierung zeigten.

Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse zur Repopularisierung des Transplantates durch die transplantierten Zellen lässt sich durch verschiedene Phänomene erklären. Es zeigt sich zum einen eine sehr unterschiedliche Anflutung der transplantierten Zellen über das portalvenöse System in die verschiedenen Leberlappen. Neben den anatomischen Gegebenheiten, wie unterschiedlichen Volumina der einzelnen Läppchen, sind auch Strömungsunterschiede durch Mikro-, oder Makrothrombosen nach Ganzorgantransplantation entscheidend. Diese wurden jedoch nicht genauer histologisch evaluiert.

Die besseren Ergebnisse der Zelltransplantation im zeitlichen Abstand zur Organtransplantation unterstreichen diese Unterschiede. Weiterhin ist sicherlich die Zellqualität entscheidend, die wiederum direkt von der Viabilität der Zellen nach Isolierung abhängig ist, jedoch auch von der unmittelbaren Handhabung vor Zelltransplantation. Durch den gewählten Versuchsansatz ist außerdem das Einzelschicksal der transplantierten Zellen während der Standzeit der Empfängertiere nicht genauer zu untersuchen.

Vorstellbar ist, dass beispielsweise vorübergehende Entgleisungen des Cyclosporinspiegels direkten Einfluss auf Abstoßung und Phagozytose einzelner Zellen haben und somit die sehr unterschiedlichen Repopularisierungsraten zum Zeitpunkt der Finalisierung einzelner Tiere bedingen.

Insgesamt beweisen die aufgeführten Ergebnisse eine erfolgreiche Etablierung des Neo-Hybriden Lebertransplantats im Rattenmodell durch die kombinierte Transplantation

syngener adulter Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen in ein allogenes Lebertransplantat. Das etablierte Tiermodell stellt somit einen vielversprechenden Ausgangspunkt für spätere klinische Studien zur Erforschung zellbasierter Therapieoptionen für die Leberregeneration dar.

5.4 Limitationen des etablierten Rattenmodells und Anregungen für weitere Forschungsvorhaben

Eines der Probleme bei der Beurteilung des Repopulationserfolges bestand in der variierenden Anzahl der isolierten hPCs. Es wurde lediglich der prozentuale Anteil der hPC von der nicht-parenchymalen Zellfraktion bestimmt, somit erfolgte keine genaue Quantifizierung. Um eine genauere Aussage über die Repopulationsrate treffen zu können, wäre eine Methodenetablierung zur quantitativen Bestimmung der Vorläuferzellen wünschenswert, wie beispielsweise durch FACS-Analysen. Zudem ergaben die Leberzellisolierungen unterschiedliche Viabilitäten der transplantierten adulten Hepatozyten und hPC, sodass auch hier Varianzen bei der Beurteilung des Zelltransplantationserfolges berücksichtigt werden mussten. Während die Viabilitäten der verwendeten Zellisolate in einem durchweg guten Bereich zwischen 59,80 % und 91,30 % lagen, könnte eine Mindestanforderung von 85 % Viabilität einer Zellisolierung erforderlich sein, um einen noch einheitlicheren Ausgangspunkt zu schaffen.

Eine quantitative Aussage über die Menge der transplantierten hPC wäre indiziert für die genaue Bestimmung der Repopulationsrate. Bei der zur Etablierung dieses Rattenmodells angewendeten Methode der FisH zur Langzeitdetektion der transplantierten Zellen im Zielgewebe handelt es sich um eine semiquantitative Methode. Eine Quantifizierung, z.B. mittels RT-PCR von Genen der transplantierten Zellen, könnte zur Überprüfung hilfreich sein. Denkbar wäre auch eine Änderung der Detektionsmethode z.B. durch Verwendung von *Green Fluorescent Protein* (GFP)-Labeling in Kombination mit spezifischen Oberflächenmarkern für die hPC und die adulten Hepatozyten. Dadurch könnte eine eventuelle Differenzierung der hPC zu verschiedenen Zelltypen im Versuchsverlauf überprüft werden.

Generell kann, abgesehen von der Zunahme der Y-Chromosomen-positiven Zellkerne im Leberparenchym des weiblichen Empfängertieres, keine eindeutige Aussage darüber

getroffen werden, ob die beobachtete Proliferation der transplantierten Leberzellen nur von den applizierten hPC allein ausgeht, oder ob es zur Einwanderung mittransplantiertes hämatopoetischer Stammzellen in das Lebertransplantat kam. Ein möglicher Regenerationsstimulus könnte beispielsweise auch von nicht-parenchymalen mittransplantierten Cytokinen und anderen immunmodulatorischen Zellen ausgehen. Diese heterogenen Zellen sind mit an der Heilung des Ischämie/Reperfusionsschadens beteiligt und könnten auch einen Einfluss bei der Leberregeneration haben¹⁵⁷.

Optimal für die Beurteilung der Proliferationsrate wäre eine Methode zur quantitativen Erhebung der Proliferationsrate der hPC im Lebergewebe in Verbindung mit den immunhistologischen Nachweisen der spezifischen Oberflächenmarker.

Zudem ist eine Umstellung des Rattenmodells auf ausschließlich männliche Tiere denkbar, sodass die operativen Eingriffe aufgrund der Körpergröße vereinfacht und somit Komplikationsraten minimiert würden. Da die in der Etablierungsstudie beobachteten Komplikationen vermehrt bei der intraoperativen Transplantation der Leberzellen auftraten, sollte die kombinierte Leberzelltransplantation in zukünftigen Studien zeitversetzt zur Lebertransplantation durchgeführt werden.

5.5 Bewertung des etablierten Tiermodells NHL als Ausgangspunkt für weitere Studien zur Induktion einer operationalen Toleranz

Mit der diesem Promotionsvorhaben zugrundeliegenden Etablierung eines geeigneten Rattenmodells zur Untersuchung der möglichen Kombination einer autologen Leberzelltransplantation mit einer allogenen Lebertransplantation wurde ein vielversprechender Ausgangspunkt für zukünftige Forschungsvorhaben zur Induktion einer operativen Toleranz geschaffen. Ob der von der Präkonditionierung der Spenderleber und der Verwendung syngener Leberzellen ausgehende Selektionsvorteil auch in einem Folgeprojekt, das ohne die konstante Immunsuppression auskommt, für die erfolgreiche Repopulation ausreicht, muss in weiteren Studien untersucht werden. Denkbar ist hier eine ausschleichende Gabe der zum Erhalt des Transplantats benötigten Immunsuppression („*Weaning*“), sodass im Verlauf des Versuches die potenziellen positiven Auswirkungen der transplantierten syngenen Zellen ohne artifiziellen Selektionsvorteil auf das allogene Lebertransplantat untersucht werden kann.

Sollte die Transplantation von syngenen Zellen auch nach dem *Weaning* der Immunsuppression zu einer konstanten Leberfunktion ohne Abstoßungsreaktionen führen, belegte das die Induktion einer operationalen Toleranz. Ein im Langzeitversuch rejektionsfreies ursprünglich allogenes Neo-Hybrides Lebertransplantat, würde die „Autologisierung“ des Lebertransplantats durch die transplantierten Zellen abschließend bestätigen. Um eine zukünftige Übertragung der in den Tiermodellen gewonnen Erkenntnisse in den klinischen Alltag zu realisieren, muss die Unbedenklichkeit des Versuchsaufbaus für den Menschen in umfassenden weiteren experimentellen Studien zugesichert werden können.

6 Zusammenfassung

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) stellt den Goldstandard bei der Therapie terminaler Lebererkrankungen dar. Die zum Transplantaterhalt obligate Immunsuppression geht mit einer Bandbreite an unerwünschten Nebenwirkungen einher und schränkt die Langzeitergebnisse der OLT dadurch maßgeblich ein.

Eines der Hauptprobleme der Ganzorgantransplantation ist des Weiteren der ausgeprägte Mangel an geeigneten Spenderorganen. Die Hepatozytentransplantation ist eine vielversprechende alternative Therapieoption bei irreversiblen Leberschäden und wurde bereits in klinischen Studien untersucht.

Ziel des vorliegenden Promotionsvorhabens ist die Kombination einer allogenen Lebertransplantation mit der Transplantation autologer Leberzellen. Die Isolierung geeigneter Spenderzellen aus den erkrankten Explantaten der Patienten hat den Vorteil des Erhalts autologer metabolisch aktiver Hepatozyten und idealerweise zusätzlich exprimierter hepatischer Progenitorzellen (*hepatic Progenitor Cells*, hPC). Eine gemeinsame Transplantation dieser Zelltypen (*combined Liver Cell Transplantation*, cLCTx) begünstigt die Integration der Leberzellen in das Wirtsparenchym und ermöglicht die erfolgreiche Repopulation der allogenen Spenderleber. Es wird postuliert, dass es durch das *Engraftment* der transplantierten Leberzellen zur teilweisen „Autologisierung“ des Lebertransplantats kommt und dadurch eine Reduktion der Immunsuppression möglich ist. Ziel dieser Studie ist die Generierung eines *in vivo* rejektionsfreien Neo-Hybriden Lebertransplantats (NHL).

Um diese Hypothese zu untersuchen und eine Grundlage für die spätere klinische Umsetzung zu schaffen, soll das Konzept des NHL im Rattenmodell etabliert werden. Um die generelle Durchführbarkeit zu überprüfen wurde eine allogene Lebertransplantation einer, zuvor mit dem leberspezifischen Mitose-Inhibitor Retrorsin vorbehandelten, weiblichen Dark Agouti-Spenderleber in eine weibliche Lewis-Empfängerratte vorgenommen. Zusätzlich zu dem allogenen Lebertransplantat erhielt das weibliche Empfängertier eine kombinierte Transplantation syngener Hepatozyten und hPC eines männlichen Lewis-Zellenspenders. Die Proliferationsstimulation der metabolisch aktiven Hepatozyten und hPC erfolgte durch eine Vorbehandlung des Zellspenders mit 2-Acetyl-Aminofluorene (2-AAF) in Kombination mit einer 60%-igen Leberteileresektion (*Partial Hepatectomy*, PH). Die cLCTx in das Milzparenchym erfolgte entweder direkt im Anschluss an die OLT (intraoperativ) oder zeitversetzt in einem Abstand von maximal 24 h zur Lebertransplantation. In Anschluss an die

kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation (cLTx) erhielten die Empfängertiere eine konstante Immunsuppression mit Cyclosporin A (CsA).

Durch die selektive Blockade des Zellzyklus in der allogenen Spenderleber, soll es zum umfangreichen *Engraftment* der syngenen Hepatozyten und hPC und somit zur erfolgreichen Repopulation im Sinne eines NHL kommen. Zum Nachweis der Integration der transplantierten Leberzellen in das Parenchym des allogenen Transplantats wurden immunhistologische Markierungen der hPC-spezifischen Oberflächenantigene Thy-1, OV-6 und EpCam vorgenommen. Außerdem erfolgte anhand der immunhistologischen PCNA-Färbung eine Proliferationsanalyse der transplantierten Leberzellen als Bestätigung des *Engraftments*. Für die Detektion der syngenen Hepatozyten und hPC im weiblichen Lebertransplantat wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FisH) zum Nachweis der Y-Chromosomen-positiven Zellkerne zu festgelegten Zeitpunkten (Tag 8, 15, 30 und 90) nach der cLTx durchgeführt. Über den Beobachtungszeitraum zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme des prozentualen Anteils Y-Chromosomen-positiver Kerne im Lebergewebe mit 7,75 % +/- 0,79 % SEM an Tag 8, 7,97 % +/- 0,85 % SEM an Tag 15, 10,20 % +/- 0,91 % SEM an Tag 30 und 19,61 % +/- 0,78 % SEM an Tag 90 nach der cLTx.

Die erfolgreiche Repopulation des allogenen Lebertransplantat durch die transplantierten syngenen Hepatozyten und hPC zeigte sich anhand des im Zeitverlauf zunehmenden prozentualen Anteils der mittels FisH nachgewiesenen transplantierten Leberzellen. Im Vergleich zu den übrigen Gruppen zeigte Gruppe D (längster Beobachtungszeitraum mit 90 Tagen) jeweils einen signifikant unterschiedlichen prozentualen Mittelwert der Y-Chromosomen-positiven Zellkerne mit einem p-Wert < 0,001. Die Überlebensrate von 75,86 % bei 29 durchgeführten cLTx belegt die erfolgreiche Etablierung dieses Rattenmodells.

Der durch die cLTx erworbene syngene Charakter des Neo-Hybriden Lebertransplantats macht dieses innovative Rattenmodell zu einer vielversprechenden Grundlage für die zukünftige Untersuchung der Induktion einer operativen Toleranz.

7 Summary

Establishment of the combined transplantation of syngeneic hepatocytes with an allogeneic liver graft in a rat model for the investigation of tolerance induction

Liver transplantation (LTx) is the standard therapy for patients with terminal liver failure. Nonetheless long-term survival is still affected by serious side effects of immunosuppression. Hepatocyte transplantation (HcTx), a possible alternative to LTx until now has not shown long-lasting clinical success. The aim of this study was to create a novel rat model for investigating the feasibility of combining an orthotopic LTx and transplantation of autologous liver cells isolated from the patient's own diseased liver. Therefore, we performed allogeneic LTx with Retrorsin-pretreated liver grafts from female donors (Dark Agouti) into female recipients (Lewis). Following this procedure syngeneic hepatocytes and hepatic progenitor cells (hPC) were isolated from 2-AAF/PH -preconditioned male Lewis rats and these combined liver cells were transplanted into the recipient's spleen (cLCTx). Once these cells have engrafted, it is postulated that these syngeneic cells will repopulate the allogeneic liver graft as they have a selective advantage over the donor tissue. It is hypothesized that this will lead to a *neo-hybrid liver graft* (NHL), reducing the necessity of immunosuppression and possibly inducing tolerance to both the entire engrafted tissue and the allogeneic donor matrix. Aim of this study was to investigate the feasibility of the NHL concept in the Dark Agouti/Lewis rat model under stable immunosuppression (cyclosporin A). Animals were sacrificed at four different time-points (day 8, 15, 30, 90) after LTx. In order to analyse the degree of cell engraftment and repopulation, Y-chromosome detection of transplanted male cells was performed by Fluorescence *in situ* Hybridisation (FisH). Immunohistochemical analyses of hPC specific markers (OV-6, Thy-1 and EpCam) in combination with proliferation specific staining (PCNA) were used to identify transplanted cells. Correlating immunohistochemical results of hPC specific markers and proliferation stains with FisH demonstrated efficient engraftment of transplanted cells.

The results of FisH-based detection of the transplanted liver cells were as follows: day 8 with 7.75% +/- 0.79% SEM, day 15 7.97% +/- 0.85% SEM, day 30 10.20% +/- 0.91% SEM and day 90 with 19.61% +/- 0.78% SEM after combined cLCTx and LTx. The percentage of Y-chromosome-positive cell nuclei obtained on day 8, 15 and 30 each demonstrated significant difference ($p < 0,001$) in comparison to day 90.

The increasing quantity of Y-chromosome-positive cell nuclei detected during follow-up confirmed successful repopulation of the liver graft and thus leading to the establishment of a NHL. Animals surviving the first 3 days after combined liver transplantation and liver cell transplantation (cLTx) showed stable liver function until they were sacrificed. Survival rate after cLTx (n= 29) was 75.86% thus underlining the feasibility of this newly established rat model. The Neo-Hybrid Livergraft therefore provides a valuable foundation for future experimental research models regarding the induction of operational tolerance.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der einzelnen Projektschritte zur Generierung des NHL	3
Abb. 2.1: Lobulierung der Rattenleber modifiziert nach Martins et al. 2008 ⁸⁷	21
Abb. 3.1: Schematische Übersicht des Versuchsablaufs mit dem jeweiligen Rattenstamm, dessen Verwendung und den durchgeführten Eingriffen	41
Abb. 3.2: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte für die Zellisolierung hepatischer Progenitorzellen und adulter Hepatozyten aus vorbehandelten, männlichen Lewis-Ratten zur cLTx	55
Abb. 4.1: Kaplan-Meier-Kurve mit der Überlebensrate der cLTx-Tiere nach Tagen in Prozent	70
Abb. 4.2: Mittelwerte aller Blutparameter in Woche 1 nach Gruppen sortiert mit Angabe des Referenzbereichs (rote Linie) und des SEM. A= AST; B= ALT; C= Bilirubin; D= Harnstoff; E= Kreatinin	75
Abb. 4.3: Mittelwerte und SEM der Leber- und Nierenfunktionsparameter der Gruppe D im Wochenverlauf (rote Linie = Grenze des Referenzbereichs). A= AST; B= ALT; C= Bilirubin; D= Harnstoff; E= Kreatinin	81
Abb. 4.4: (A+B) HE-Färbung von (A) Tier D1 in 50-facher, (B) Tier D1 in 100-facher Vergrößerung und (C) Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung. (D+E) CK-18-Färbung von (D) Tier D1 in 50-facher, (E) in 100-facher Vergrößerung und (F) Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung	85
Abb. 4.5: Immunhistologiebilder der PCNA-Auswertung in 100-facher Vergrößerung mit je einem cLTx-Kombitier (A= A1, B= B1, C= C1, D= D1) und einem Kontrolltier (E-H) pro Gruppe	86
Abb. 4.6: (A-C) Immunhistologiebilder der Thy-1-Antikörperfärbung von (A) Tier D1 in 50-facher, (B) Tier D1 in 100-facher Vergrößerung und (C) Kontrolltier in 100-facher Vergrößerung	92
Abb. 4.7: Beispielbilder der FisH-Auswertung mit Kennzeichnung der Y-Chromosomen-positiven Zellkerne (Pfeil)	93
Abb. 4.8: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe A. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe A. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)	95

Abb. 4.9: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe B. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe B. (* $p < 0,05$).....	96
Abb.4.10: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe C. B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe C. (* $p < 0,05$).....	97
Abb.4.11: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Tiere der Gruppe D. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppe D. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).....	98
Abb.4.12: (A) Säulendiagramme der Mittelwerte der Y-positiven Kerne mit SEM (%) für die Gruppen A-D. (B) Box-Plots zur grafischen Darstellung der Verteilung der Y-positiven Kerne im Leberparenchym für die Tiere der Gruppen A-D. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).....	100

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammenfassung der verwendeten Rattenstämme und deren Verwendung im Versuchsaufbau.....	39
Tab. 2:	Gruppeneinteilung der cLTx-Empfängertiere nach den Finalisierungszeitpunkten.....	42
Tab. 3:	Anzahl der Empfängertiere in den Gruppen eingeteilt nach den Finalisierungszeitpunkten (Tage nach cLTx), cLCTx und Kontrolltieren.....	67
Tab. 4:	Gesamtübersicht der durchgeführten Lebertransplantationen und cLTx mit prozentualer Angabe der auswertbaren Empfängertiere.....	68
Tab. 5:	Übersicht der pro Gruppe durchgeführten cLCTx nach den Zelltransplantationszeitpunkten (cLCTx-Zeitpunkten).....	68
Tab. 6:	Übersicht der zum Versuchsausschluss führenden Komplikationen bei den Empfängertieren der cLTx.....	70
Tab. 7:	Cyclosporin-A-Einzelwerte nach Gruppen und Erhebungswoche.....	72
Tab. 8:	Ergebnisse der Blutanalyse in Woche 1 nach LTx gruppenübergreifend nach Parametern statistisch evaluiert.....	74
Tab. 9:	AST Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.....	76
Tab.10:	ALT-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.....	77
Tab.11:	Bilirubin-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.....	78
Tab.12:	Harnstoff-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.....	79
Tab.13:	Kreatinin-Werte von Woche 7 bis Woche 12 in Gruppe D.....	79
Tab.14:	Zuordnung der Zellspender zu den Empfängertieren mit Angabe der Beurteilungskriterien.....	83
Tab.15:	Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe A (8 d).....	87
Tab.16:	Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe B (15 d).....	88
Tab.17:	Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe C (30 d).....	88
Tab.18:	Prozentualer Anteil PCNA-pos. Kerne zur Gesamtzellzahl in der Gruppe D (90 d).....	89
Tab.19:	PCNA-Auswertung statistisch ausgewertet und nach Gruppen sortiert mit Hervorhebung der cLTx-Tiere.....	90

Tab.20: Auswertung der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit Mittelwert, SD und SEM pro Tier nach Gruppen eingeteilt unter Angabe der ausgezählten Areale.....	94
Tab.21: Gruppenbasierte statistische Auswertung der FisH zur Y-Chromosomen Detektion im Leberparenchym.	99

Materialliste

Geräte:		
Produktbezeichnung/ Art. Nr.	Hersteller	Herkunft
Babykonservenwärmer, BS19	Hartig&Helling	Bochum
Bench, Laminair Air Flow	Heraeus Instruments	Berlin
Feinwaage, AC 121 S	Sartorius	Elk Grove, U.S.A.
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 40CFL	Zeiss	Göttingen
Magnetrührer, RCT basic safety control	IKA®	Staufen
Leica-Linse, M651TM	Leica	Wetzlar
Operations-Mikroskop	Wild Heerbrugg	Arau
Pumpe, Cyclo II	Carl-Roth	Karlsruhe
Rotationsmikrotom, RM2255	Leica	Wetzlar
Schüttler, DSG 304/ M4	Heidolph	Medingen
Vapor	Völker GmbH	Kaltenkirchen
Wärmematte, Heating Pad Model-No. HK5510	AEG	Nürnberg
Wasserbad, Typ E 100	Lauda	Lauda-Königshofen

Verbrauchsmaterial		
Produktbezeichnung/ Art. Nr.	Hersteller	Herkunft
16 GA Venenverweilkanüle (Venoflon™ Pro)	BD	Heidelberg
20 GA Kanülen (Microlane™ 3, 0,9 x 40 mm)	BD	Heidelberg
24 GA Kanüle (Microlance™ 3)	BD	Drogheda, Irland
24 GA Neoflon™ Venenverweilkanüle	BD	Heidelberg
4-0 PDS II	Ethicon	Norderstedt
6-0 Seidenfaden	Resorba	Nürnberg
7-0 Prolene*	Ethicon	Norderstedt
8-0 Prolene*	Ethicon	Norderstedt
Abdecktuch (Folidrape® 75 cm x 90 cm)	Paul-Hartmann AG	Heidenheim
Braunoderm-Alkohollösung	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
chirurgisches Nahtmaterial (4-0 Vicryl*Plus)	Ethicon	Norderstedt
4-Wege-Hahn	Smith Medical Deutschland GmbH	Grasbrunn
Eukit 100 ml	Sigma-Aldrich	Buchs, Schweiz
Fixogum-Kleber	Marabu GmbH	Bietigheim-Bissingen
Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom IDYET™556)	ID Labs Biotechnology	London, Canada
Flüssigkeits-Sterilfilter (Minisart®)	Sartorius Stedim Biotech	Göttingen
Gentamicinpad (GENTA-COLLresorb®)	Resorba	Nürnberg
Histokinetten	Sanowa	Leimen
Hybridisierungssonden (Mouse and Rat I Detect™ Chromosome Paint Probes)	ID Labs Biotechnology	London, ON, Canada
Infusionsbesteck, Infudrop Air 21P	Fresenius Kabi	Bad Homburg
Isofluran (Forene®)	Abbot	Wiesbaden
Klebestreifen (Durapore™ 3M)	3M Healthcare	Neuss
Microscopy Aquatex, OC 464208	Merck KGaA	Darmstadt
Mullkompressen 8-fach, unsteril (10 x 10 cm)	Fuhrmann®	Much
Objektträgerhalter, S2029	Dako	Hamburg
sterile 10ml-Spritze (Discardit™ II)	BD	Heidelberg
sterile 1ml- Spritzen (Plastipak™)	BD	Heidelberg
sterile 27 GA Kanülen hellgrau (Microlance™)	BD	Heidelberg
Urin-Cup 100 ml	Sarstedt	Nümbrecht

Chirurgische Instrumente		
Produktbezeichnung	Hersteller	Herkunft
beschulte Moskitoklemme	Aesculap AG	Tuttlingen
chirurgische Pinzette	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg
gebogene mikrochirurgische Pinzette	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg
gerade mikrochirurgische Pinzette	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg
große gebogene Arterienklemme	Aesculap AG	Tuttlingen
Iris-Schere	Aesculap AG	Tuttlingen
mikrochirurgische Schere	Aesculap AG	Tuttlingen
Mikrogefäßclip	Dumont	Brüssel, Belgien
Nadelhalter makro- und mikrochirurgisch	Aesculap AG	Tuttlingen
Satinsky-Klemme	Aesculap AG	Tuttlingen
Tuchklemmen /oder Wundhaken	Aesculap AG	Tuttlingen

Medikamente		
Produktbezeichnung	Hersteller	Herkunft
Carprofen (Rimadyl [®] ad us. vet., Injektionslösung)	Pfizer	Berlin
Ciclosporin A (= CsA; Sandimmun [®] 50 mg/ml)	Novartis	Nürnberg
Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm [®] Injektionslösung)	Ratiopharm GmbH	Ulm
Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm [®] Injektionslösung)	Ratiopharm GmbH	Ulm

Chemikalien/ Lösungen		
Produktbezeichnung/ Art. Nr	Hersteller	Herkunft
2-AAF-Pellet (35 mg/ pellet, 21-day release)	Innovative Research of America	Sarasota, USA
Alkohollösungen (Methyl-Ethyl-Keton vergällte Ethanollösung)	Herbeta Arzneimittel	Berlin
Aqua dest., Milli-Q-Pak®1	Millipore	Billerica, U.S.A.
Collagenase, NB4G	Serva	Heidelberg
DAPI-Lösung	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> = DMEM-Medium	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Dnase I	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
EDTA-Lösung (10-fach Lösung), 00-3113	Zymed Medical Products Handel GmbH	Wien, Österreich
EGTA	Sigma-Aldrich	Buchs, Schweiz
fetales Kälberserum (= FCS)	Biochrom AG	Berlin
Formalinlösung (4%-ige)	Herbeta Arzneimittel	Berlin
Hämatoxylin nach Mayer, A4840,1000	Appllichem GmbH	Darmstadt
Hepes Puffer	Biochrom AG	Berlin
NaCl 0,9%, (1L Spüllösung, Plastipur®)	Fresenius	Bad Homburg v.d.H.
Optiprep-Lösung 100 ml, OPTI-MEM®	gibco® Lifetechnology	New York, U.S.A.
Paraffin	Merck KGaA	Darmstadt
PBS Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's PBS)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Percoll, Easycoll	Biochrom AG	Berlin
Pronase E (0,1%)	Merck KGaA	Darmstadt
Proteinase K, S3020	Dako	Hamburg
Retrorsinpulver, R 0382	Sigma-Aldrich Corporation	St.Louis, USA
Tris-Buffered-Saline (10-fach), 8382; 1.08219; 6404;	Merck KGaA	Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich	Buchs, Schweiz
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe

Puffer und Lösungen für die Lebezellisolierung**10x Leffert's Puffer:**

100 mM HEPES

30 mM KCl

1,3 M NaCl (75,96 g/l)

10 mM NaH₂PO₄

100 mM D-Glucose mit Aqua dest. auf 2 L aufgefüllt, pH 7,4, Lagerung: 4°C

10x EGTA (5 mM):

1,9 g EGTA in 100 ml 10 x Leffert's + 800 ml Aqua dest.

10 M NaOH

pH-Wert 7,4 auf 1 l aufgefüllt, Lagerung: 4°C

100x CaCl₂ (2,79%):

27,9 g CaCl₂ + 1 l Aqua dest.

sterilfiltriert, Lagerung: 4°C

1x Leffert's:

100 ml 10x Leffert's + 900 ml Aqua dest, pH7,4

100 ml sterilfiltriert (in 500 ml Schott-Flasche), Lagerung: 4°C

1x EGTA:

30 ml 10x EGTA + 270 mL 1x Leffert's, pH 7,4

200 ml in Infusionsbeutel (steril), Lagerung: 4°C

100 ml sterilfiltrieren (in 500 ml Schott-Flasche), Lagerung: 4°C

1x CaCl₂:

6 ml 100x CaCl₂ (2,79 %) + 600 ml 1x Leffert's, pH 7,4

400 ml sterilfiltriert, Lagerung: 4 °C

Restliche 200 ml werden für Collagenase-Lösung aufbewahrt (4°C)

Collagenase-Lsg.:

1x CaCl₂ in Wasserbad erwärmen (37°C)

18 mg Collagenase (Serva) oder 30 mg Collagenase P in Urinbecher einwiegen (Feinwaage)

in 100 ml angewärmter CaCl₂-Lösung gelöst und sterilfiltriert (500 ml Flasche)

Protease/DNase-Lsg. (hepatische Progenitorzellen):

10 mg Pronase E (0,1 %) und 2 mg DNase I (0,004 %) in Urinbecher eingewogen und mit 10 ml 1x PBS aufgefüllt

in 50 ml Falcon sterilfiltriert (Lagerung: 4°C)

Dichte-Gradienten:

Prim. Hepatozyten:

je 5 ml Percoll-Lösung à 1,125 g/ml in 4-6 Falcons steril pipettiert

je Falcon 15 ml 1x PBS steril hinzu pipettiert, Lagerung bis Gebrauch: 4°C

hPC:

Optiprep-Arbeitslösung (30 %): 1 vol. Stammlösung (60 %) + 1 vol. 1x PBS

20 %-Optiprep: 10 ml Arbeitslösung + 5 ml 1x PBS

14 %-Optiprep: 7 ml Arbeitslösung + 8 ml 1x PBS

Lagerung bis Gebrauch: 4°C

Puffer und Lösungen für FisH

Citratpuffer

Stammlösung: (a) 19,2 g/l Zitronensäure, 10 ml ansetzen (0,192 g)

oder 21 g/l Zitronensäure- Monohydrat, 10 ml ansetzen (0,21 g)

($M_{\text{Zitronensäure}} = 192,1 \text{ g/mol}$, $M_{\text{Zitronensäuremonohydrat}} = 210,1 \text{ g/mol}$)

(b) 29,41 g/l Natriumzitat- Dihydrat, 100 ml ansetzen (2,941 g)

Gebrauchslösung: (a) 8,5 ml Zitronensäurelösung

(b) 41,5 ml Natriumzitat-Dihydratlösung

mit Aqua dest. auf 500 ml, pH-Wert 6,0 einstellen

20x SSC (= saline sodium citrate)

87 g NaCl in 500 ml Aqua dest. lösen

(*Molare Masse NaCl = 58,44 g/mol, ergibt eine 3molare (3 M=3 mol/l) Lösung*)

44,1 g Natriumzitat- Dihydrat auf < 500 ml, pH- Wert 7,0 einstellen

(*Molare Masse = 294 g/mol, ergibt eine 0,3 M Lösung*)

2x SSC

1:10 Verdünnung des 20x SSC (100 ml 20x SSC, 900 ml Aqua dest.)

10 % Pepsinlösung

1 g Pepsin in 10 ml Aqua dest. lösen, Aliquots: 4 à 2,5 ml (oder 8 à 1,25 ml)

Formalinlösung (1 %)

100 ml ansetzen:

2,7 ml 37 % Formaldehyd

5 ml 1 M MgCl₂

(*Mol. Masse MgCl₂ Hexahydrat = 203,3 g/mol, 1,017 g auf 5 ml Aqua dest. ergibt 1 M Lösung*)

92,3 ml PBS

Waschlösung I

0,3 ml NP- 40 (! hoch viskos) in 99,7 ml 0,4x SSC ergibt 0,3 % NP- 40
(0,4x SSC: 2 ml 20x SSC in 98 ml Aqua dest.)

Waschlösung II

0,1 ml NP- 40 (! hoch viskos) in 99,9 ml 2x SSC ergibt 0,1 % NP- 40

8 Literaturangaben

1. Schwarz, HP & Dorner, F. Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. *British Journal of Haematology* **121**, 556-65 (2003).
2. Dutkowsky, P, De Rougemont, O & Clavien, PA. Alexis Carrel: Genius, Innovator and Ideologist. *American Journal of Transplantation* **8**, 1998-2003 (2008).
3. Starzl, T, Marchioro, TL, Vonkaulla, KN, Hermann, G, Brittain, RS & Waddell, WR. Homotransplantation of liver in humans. *Surg Gynecol Obstet.* **117**, 659-76 (1963).
4. Toledo-Pereyra, LH, Simmons, RL & Najarian, JS. Factors determining successful liver preservation for transplantation. *Ann Surg.* **181**, 289-98 (1975).
5. Starzl, TE, Klintmalm, GrBG, Porter, KA, Iwatsuki, S & Schröter, GPJ. Liver Transplantation with Use of Cyclosporin a and Prednisone. *New England Journal of Medicine* **305**, 266-9 (1981).
6. Borel JF, Feurer, C, Magnée, C & Stähelin, H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* **32**, 1017-25 (1977).
7. Calne, RY. Immunosuppression for organ grafting -- observations on cyclosporin A. *Immunol Rev.* **46**, 113-24 (1979).
8. National Institutes of Health Consensus Development Conference: liver transplantation. *R I Med J.* **67**, 73-6 (1984).
9. Kalayoglu, M, Sollinger, HW, Stratta, RJ, D'Alessandro, AM, Hoffmann, RM, Pirsch, JD & Belzer, FO. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* **1**, 617-9 (1988).
10. Adam, R & Hoti, E. Liver Transplantation: The Current Situation. *Semin Liver Dis.* **29**, 3-18 (2009).
11. Schrem, H, Till, N, Becker, T, Bektas, H, Manns, MP, Strassburg, CP & Klempnauer, J. Langzeit-Outcome nach Lebertransplantation. *Der Chirurg* **79**, 121-9 (2008).
12. Settmacher, U, *et al.* Living donor liver transplantation in adults in the MELD era in Germany – a multi-center retrospective analysis. *Transplant International* **24**, 904-11 (2011).
13. Mazzaferro, V, *et al.* Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis. *New England Journal of Medicine* **334**, 693-700 (1996).
14. Schlitt, HJ, *et al.* Aktuelle Entwicklungen der Lebertransplantation in Deutschland:

- MELD-basierte Organallokation und "Incentives" für Transplantationszentren. *Z Gastroenterol.* **49**, 30-8 (2011).
15. Borchert, DH, Glanemann, M, Mogl, M, Langrehr, J & Neuhaus, P. Adult Liver Transplantation Using Liver Grafts from Donors Over 70 Years of Age. *Transplant Proc.* **37**, 1186-7 (2005).
 16. Skagen, C, Lucey, M & Said, A. Liver transplantation: an update 2009. *Current Opinion in Gastroenterology* **25**, 202-8 (2009).
 17. Pratschke, J, Mittler, J & Neuhaus, P. Ausweitung des Spenderpools unter Verwendung marginaler Organe. *Der Chirurg* **79**, 130-4 (2008).
 18. Feng, S, *et al.* Characteristics Associated with Liver Graft Failure: The Concept of a Donor Risk Index. *American Journal of Transplantation* **6**, 783-90 (2006).
 19. Monbaliu, D, Pirenne, J & Talbot, D. Liver Transplantation Using Donation After Cardiac Death Donors. *J Hepatol.* **56**, 474-85 (2011).
 20. Abt, PL, *et al.* Survival Following Liver Transplantation From Non-Heart-Beating Donors. *Annals of Surgery* **239**, 87-92 (2004).
 21. Abecassis, M, Fisher, RA, Olthoff, KM, Freise, CE, Rodrigo, DR, Samstein, B, Kam, I & Merion, RM. A2ALL Study Group. Complications of Living Donor Hepatic Lobectomy—A Comprehensive Report. *American Journal of Transplantation* **12**, 1208-17 (2012).
 22. Ghobrial, RM, Freise, CE, Trotter, JF, Tong, L, Ojo, AO, Fair, JH, Fisher, RA, Emond, JC, Koffron, AJ, Pruett, TL, Olthoff, KM & A2ALL Study Group. Donor morbidity after living donation for liver transplantation. *Gastroenterology* **135**, 468-76 (2008).
 23. Cheah, Y, Simpson, MA, Pomposelli, JJ & Pomfret, EA. The incidence of death and potentially life-threatening "near miss" events in living donor hepatic lobectomy: A world-wide survey. *Liver Transplantation* (2012).
 24. Wakade, VA & Mathur, SK. Donor safety in live-related liver transplantation. *Indian J Surg.* **74**, 118-26 (2012).
 25. Emre, S & Umman, V. Split Liver Transplantation: An Overview. *Transplant Proc.* **43**, 884-7 (2011).
 26. Neuhaus, P. Live donor/split liver grafts for adult recipients: When should we use them? *Liver Transplantation* **11**, 6-9 (2005).
 27. Krukemeyer, MG & Alldinger, I. *Chirurgische Forschung*, (Georg Thieme Verlag, D-70469 Stuttgart, 2005).

28. Game, DS & Lechler, RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunology* **10**, 101-8 (2002).
29. Sanchez-Fueyo, A & Strom, TB. Immunologic Basis of Graft Rejection and Tolerance Following Transplantation of Liver or Other Solid Organs. *Gastroenterology* **140**, 51-64 (2011).
30. Rogers, NJ & Lechler, RI. Allorecognition. *American Journal of Transplantation* **1**, 97-102 (2001).
31. Post, DJ, Douglas, DD & Mulligan, DC. Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transplantation* **11**, 1307-14 (2005).
32. Ho, S, *et al.* The Mechanism of Action of Cyclosporin A and FK506. *Clinical Immunology and Immunopathology* **80**, 40-45 (1996).
33. Land, WG. *Immunsuppressive Therapie*, (Thieme, Stuttgart; New York, 2006).
34. Andoh, TF & Bennett, WM. Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **7**, 265-70 (1998).
35. Herrero, JI. Screening of de novo tumors after liver transplantation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **27**, 1011-6 (2011).
36. Penforhis, A & Kury-Paulin, S. Immunosuppressive drug-induced diabetes. *Diabetes Metab.* **32**, 539-46 (2006).
37. Samuelson, A, Lee, M, Kamal, A, Keeffe, E & Ahmed, A. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Mortality Following Liver Transplantation Independent of MELD Score. *Digestive Diseases and Sciences* **55**, 2089-94 (2010).
38. Henry, ML. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): A comparison of efficacy and safety profiles. *Clinical Transplantation* **13**, 209-20 (1999).
39. Perry, I & Neuberger, J. Immunosuppression: towards a logical approach in liver transplantation. *Clinical & Experimental Immunology* **139**, 2-10 (2005).
40. Breen, DP, Marinaki, AM, Arenas, M & Hayes, PC. Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. *Liver Transplantation* **11**, 826-33 (2005).
41. Moreno, J, Rubio, E, Pons, F, Velayos, B, Navarrete, E, Herreros de Tejada, A, López-Monclús, J, Sánchez-Turrión, V & Cuervas-Mons, V. Usefulness of mycophenolate mofetil in patients with chronic renal insufficiency after liver transplantation. *Transplant Proc.* **35**, 715-7 (2003).
42. Marks, WH, Ilesley, JN & Dharnidharka, VR. Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder in Kidney and Heart Transplant Recipients Receiving Thymoglobulin: A

- Systematic Review. *Transplant Proc.* **43**, 1395-404 (2011).
43. Fisher, RA & Strom, SC. Human Hepatocyte Transplantation: Worldwide Results. *Transplantation* **82**, 441-9 (2006).
 44. Weber, A, Groyer-Picard, MT, Franco, D & Dagher, I. Hepatocyte transplantation in animal models. *Liver Transpl.* **15**, 7-14 (2009).
 45. Leckel, K, Blaheta, RA & Markus, BH. Stand der Hepatozytentransplantation- Risiko oder Chance? *Zentralbl Chir.* **128**, 283-290 (2003).
 46. Christ, B & Fleig, W. Hepatozytentransplantation. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin* **100**, 650-5 (2005).
 47. Joseph, B, *et al.* Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* **123**, 1677-85 (2002).
 48. Gupta, S, *et al.* Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* **29**, 509-19 (1999).
 49. Gupta, S & Rogler, CE. Lessons From Genetically Engineered Animal Models VI. Liver repopulation systems and study of pathophysiological mechanisms in animals. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **277**, 1097-102 (1999).
 50. Strom, SC, *et al.* Hepatocyte Transplantation As A Bridge To Orthotopic Liver Transplantation in Terminal Liver Failure. *Transplantation* **63**, 559-69 (1997).
 51. Seglen, PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**, 29-83 (1976).
 52. Gupta, S, Bhargava, KK & Novikoff, PM. Mechanisms of Cell Engraftment During Liver Repopulation with Hepatocyte Transplantation. *Semin Liver Dis.* **19**, 15-26 (1999).
 53. Gupta, S, Lee, CD, Vemuru, RP & Bhargava, KK. 111 Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hepatology* **19**, 750-7 (1994).
 54. Markus, P, Koenig, S, Krause, P & Becker, H. Selective intraportal transplantation of DiI-marked isolated rat hepatocytes. *Cell Transplant.* **6**, 455-62 (1997).
 55. Malhi, H & Gupta, S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* **8**, 40-50 (2001).
 56. Gupta, S, Chowdhury, NR, Jagtiani, R, Gustin, K, Aragona, E, Shafritz, DA, Chowdhury, JR & Burk, RD. A novel system for transplantation of isolated hepatocytes utilizing HBsAg-producing transgenic donor cells. *Transplantation* **50**,

- 472-5 (1990).
57. Rajvanshi, P, Kerr, A, Bhargava, KK, Burk, RD & Gupta, S. Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: Cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule. *Hepatology* **23**, 482-96 (1996).
 58. Thompson, N, Hixson, DC, Callanan, H, Panzica, M, Flanagan, D, Faris, RA, Hong, WJ, Hartel-Schenk, S & Doyle, D. A Fischer rat substrain deficient in dipeptidylpeptidase IV activity makes normal steady-state RNA levels and an altered protein Use as a liver-cell transplantation model. *Biochem J.* **273**, 497–502 (1991).
 59. Elkhafif, N, Voss, B, Hammam, O, Yehia, H, Mansy, S, Akl, M, Boehm, S, Mahmoud, S, El Bendary, O & El Fandy, G. Homing of transplanted bone marrow cells in livers of Schistosoma mansoni-infected mice. *APMIS.* **118**, 277-87 (2010).
 60. Nagler, A, Ilan, Y, Amiel, A, Eid, A & Tur-Kaspa, R. Systemic chimerism in sex-mismatched liver transplant recipients detected by fluorescence in situ hybridization. *Transplantation* **57**, 1458-61 (1994).
 61. Chowdhury, J, Kondapalli, R & Chowdhury, NR. Gunn rat: a model for inherited deficiency of bilirubin glucuronidation. *Adv Vet Sci Comp Med.* **37**, 149-73 (1993).
 62. Bruni, S & Chang, TM. Kinetic analysis of UDP-glucuronosyltransferase in bilirubin conjugation by encapsulated hepatocytes for transplantation into Gunn rats. *Artif Organs.* **19**, 449-57 (1995).
 63. Eguchi, S, *et al.* Treatment of Hypercholesterolemia in the Watanabe Rabbit Using Allogeneic Hepatocellular Transplantation Under A Regeneration Stimulus. *Transplantation* **62**, 588-93 (1996).
 64. Oren, R, *et al.* Restoration of serum albumin levels in nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. *Hepatology* **29**, 75-81 (1999).
 65. Rhim, JA, Sandgren, EP, Palmiter, RD & Brinster, RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 4942-6 (1995).
 66. Petersen, J, Dandri, M, Gupta, S & Rogler, CE. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 310-5 (1998).
 67. Laconi, E, *et al.* Long-Term, Near-Total Liver Replacement by Transplantation of Isolated Hepatocytes in Rats Treated with Retrorsine. *Am J Pathol.* **153**, 319-29

- (1998).
68. Overturf, K, Al-Dhalimy, M, Ou, CN, Finegold, M & Grompe, M. Serial Transplantation Reveals the Stem-Cell-Like Regenerative Potential of Adult Mouse Hepatocytes. *American Journal of Pathology* **151**, 2135-43 (1997).
 69. Rhim, J, Sandgren, EP, Degen, JL, Palmiter, RD & Brinster, RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* **263**, 1149-52 (1994).
 70. Overturf K, a-DM, Ou, CN, Finegold, M & Grompe, M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol.* **151**, 1273-80 (1997).
 71. Gupta, S, Rajvanshi, P, Irani, AN, Palestro, CJ & Bhargava, KK. Integration and proliferation of transplanted cells in hepatic parenchyma following D-galactosamine-induced acute injury in F344 rats. *The Journal of Pathology* **190**, 203-10 (2000).
 72. Tuñón, M, Alvarez, M, Culebras, JM & González-Gallego, J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol.* **15**, 3086-98. (2009).
 73. Kim, W, Lee, JH, Han, SU, Jin, YM, Kwak, YS, Wang, HJ & Kim, MW. Systematic analysis of the effects of hepatocyte transplantation on rats with acute liver failure. *Hepatogastroenterology.* **47**, 371-4 (2000).
 74. Gabelein, G, *et al.* Intrasplenic or subperitoneal hepatocyte transplantation to increase survival after surgically induced hepatic failure? *Eur Surg Res.* **41**, 253-9 (2008).
 75. Gupta, S, *et al.* Studies on the Safety of Intrasplenic Hepatocyte Transplantation: Relevance to Ex Vivo Gene Therapy and Liver Repopulation in Acute Hepatic Failure. *Human Gene Therapy* **4**, 249-57 (1993).
 76. Laconi, E, Sarma, DSR & Pani, P. Transplantation of normal hepatocytes modulates the development of chronic liver lesions induced by a pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Carcinogenesis* **16**, 139-42 (1995).
 77. Mariani, P, Coudray-Lucas, C, Baudrimont, M, Ribeiro, J, Legendre, C, Delelo, R, Cynober, L, Balladur, P & Nordlinger, B. Glutamine metabolism and neuropathological disorders in experimental hepatic encephalopathy: effect of transplanted hepatocytes. *Surgery* **120**, 93-9 (1996).
 78. Kobayashi, N, *et al.* Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* **31**, 851-7 (2000).
 79. Gagandeep, S, Rajvanshi, P, Sokhi, RP, Slehria, S, Palestro, CJ, & Bhargava, KG, S. Transplanted hepatocytes engraft, survive, and proliferate in the liver of rats with

- carbon tetrachloride- induced cirrhosis. *Journal of Pathology* **191**, 78-85 (2000).
80. Hebel, R & Stromberg, MW. *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*, (BioMed Verlag., Wörthsee, 1986).
 81. König, HE & Liebich, HG. *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* (Schattauer, Stuttgart, New York, 2009).
 82. Waynforth, H & Flecknell, PA. *Experimental and Surgical Techniques in the Rat* (Academic Press, 1992).
 83. Gershbein, LL & Elia, H. Observation on the Anatomy of the Rat Liver. *Anat Rec.* **120**, 85-98 (1954).
 84. Kogure, K, Ishizaki, M, Nemoto, M, Kuwano, H & Makuuchi, M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* **6**, 171-5 (1999).
 85. Martins, PN & Neuhaus, P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int.* **27**, 384-92 (2007).
 86. Higgins, GM & Anderson, RM. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology* **12**, 186-202 (1931).
 87. Martins, PN, Theruvath, TP & Neuhaus, P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int.* **28**, 3-11 (2008).
 88. Brown, KA. Liver transplantation. *Current Opinion in Gastroenterology* **21**, 331-6 (2005).
 89. Fox, I, Roy-Chowdhury, J, Kaufman, SS, Goertzen, TC, Roy-Chowdhury, N, Warkentin, PI, Dorko, K, Sauter, BV & Strom, SC. Treatment of the Crigler- Najjar Syndrome Type I with Hepatocyte Transplantation. *N Engl J Med.* **338**, 1422-6 (1998).
 90. Horslen, SP, *et al.* Isolated Hepatocyte Transplantation in an Infant With a Severe Urea Cycle Disorder. *Pediatrics* **111**, 1262-7 (2003).
 91. Strom, S, Fisher, RA, Rubinstein, WS, Barranger, JA, Towbin, RB, Charron, M, Miele, L, Pizarov, LA, Dorko, K, Thompson, MT & Reyes, J. . Transplantation of Human Hepatocytes. *Transplant Proc.* **29**, 2103-2106 (1997).
 92. Grossman, M, Rader, DJ, Muller, DW, Kolansky, DM, Kozarsky, K, Clark, BJ 3rd, Stein, EA, Lupien, PJ, Brewer, HB Jr & Raper, SE. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med.* **1**, 1148-54 (1995).
 93. Raper, SE, *et al.* Safety and Feasibility of Liver-Directed Ex Vivo Gene Therapy for

- Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Annals of Surgery* **223**, 116-26 (1996).
94. Strom, SC, Chowdhury, JR & Fox, IJ. Hepatocyte Transplantation for the Treatment of Human Disease. *Semin Liver Dis.* **19**, 39-48 (1999).
 95. Bilir, BM, *et al.* Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transplantation* **6**, 32-40 (2000).
 96. Schneider, A, *et al.* Hepatocyte Transplantation in an Acute Liver Failure Due to Mushroom Poisoning. *Transplantation* **82**, 1115-6 (2006).
 97. Mito, M, Kusano, M & Kawaura, Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc.* **24**, 3052-3 (1992).
 98. Fausto, N, Campbell, JS & Riehle, KJ. Liver regeneration. *Hepatology* **43**, S45-S53 (2006).
 99. Oertel, M & Shafritz, DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1782**, 61-74 (2008).
 100. Michalopoulos, GK, Barua, L & Bowen, WC. Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology* **41**, 535-44 (2005).
 101. Potten, CS & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-20 (1990).
 102. Flohr, TR, Bonatti, HJR, Brayman, KL & Pruett, TL. The use of stem cells in liver disease. *Current Opinion in Organ Transplantation* **14**, 64-71 (2009).
 103. Gerlach, JC, *et al.* Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation* **76**, 781-6 (2003).
 104. Newsome, PN, Hussain, MA & Theise, ND. Hepatic Oval Cells: Helping Redefine a Paradigm in Stem Cell Biology. in *Current Topics in Developmental Biology* **61**, 1-28 (2004).
 105. Lowes, KN, Brennan, BA, Yeoh, GC & Olynyk, JK. Oval Cell Numbers in Human Chronic Liver Diseases Are Directly Related to Disease Severity. *Am J Pathol.* **154**, 537-41 (1999).
 106. Farber, E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **16**, 142-8 (1956).

107. Fausto, N & Campbell, JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of Development* **120**, 117–130 (2003).
108. Evarts, RP, Nagy, P, Marsden, E & Thorgeirsson, SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* **8**, 1737-40 (1987).
109. Solt, DB, Cayama, E, Sarma, DSR & Farber, E. Persistence of Resistant Putative Preneoplastic Hepatocytes Induced by N-Nitrosodiethylamine or N-Methyl-N-nitrosourea. *Cancer Research* **40**, 1112-8 (1980).
110. Tatematsu, M, Ho, RH, Kaku, T, Ekem, JK & Farber, E. Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol.* **114**, 418-30 (1984).
111. Solt, D, Medline, A & Farber, E. Rapid Emergence of Carcinogen-Induced Hyperplastic Lesions in a New Model for the Sequential Analysis of Liver Carcinogenesis. *Am J Pathol.* **88**, 595–618 (1977).
112. Petersen, BE, Zajac, VF & Michalopoulos, GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* **27**, 1030-8 (1998).
113. Shupe, TD, Piscaglia, AC, Oh, SH, Gasbarrini, A & Petersen, BE. Isolation and characterization of hepatic stem cells, or "oval cells," from rat livers. *Methods Mol Biol.* **482**, 387-405 (2009).
114. Yovchev, MI, *et al.* Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* **47**, 636-47 (2008).
115. Theise, N. Liver stem cells. *Cytotechnology* **41**, 139-44 (2003).
116. Fausto, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* **39**, 1477-87 (2004).
117. Bird, T, Lorenzini, S & Forbes, S. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell and Tissue Research* **331**, 283-300 (2008).
118. Petersen, BE, Goff, JP, Greenberger, JS & Michalopoulos, GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker thy-1 in the rat. *Hepatology* **27**, 433-45 (1998).
119. Theise, ND, *et al.* The canals of hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* **30**, 1425-33 (1999).
120. Matsusaka, S, *et al.* The Role of Oval Cells in Rat Hepatocyte Transplantation. *Transplantation* **70**, 441-6 (2000).

121. Dan, YY & Yeoh, GC. Liver stem cells: A scientific and clinical perspective. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **23**, 687-98 (2008).
122. Gerber, M, Thung, SN, Shen, S, Stromeyer, FW & Ishak, KG. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis, and nodular transformation of the liver. *Am J Pathol.* **110**, 70-4 (1983).
123. Fiel, M, Antonio, LB, Nalesnik, MA, Thung, SN & Gerber, MA. Characterization of ductular hepatocytes in primary liver allograft failure. *Mod Pathol.* **10**, 348-53 (1997).
124. Schmelzer, E, *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 1973-87 (2007).
125. Lee, KD, *et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* **40**, 1275-84 (2004).
126. Aurich, I, *et al.* Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* **56**, 405-15 (2007).
127. Alison, MR, *et al.* Cell differentiation: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* **406**, 257 (2000).
128. am Esch, JSI, *et al.* Portal Application of Autologous CD133+ Bone Marrow Cells to the Liver: A Novel Concept to Support Hepatic Regeneration. *STEM CELLS* **23**, 463-70 (2005).
129. Lagasse, E, Connors, H, Al-Dhalimy, M, Reitsma, M, Dohse, M, Osborne, L, Wang, X, Finegold, M, Weissman, IL & Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine* **6**, 1229-34 (2000).
130. Vassilopoulos, G, Wang, PR & Russell, DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-4 (2003).
131. Wang, X, *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901 (2003).
132. Lerut, J & Sanchez-Fueyo, A. An Appraisal of Tolerance in Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation* **6**, 1774-80 (2006).
133. Levitsky, J. Operational tolerance: Past lessons and future prospects. *Liver Transplantation* **17**, 222-32 (2011).
134. Kern, M, Popov, A, Kurts, C, Schultze, JL & Knolle, PA. Taking off the brakes: T cell immunity in the liver. *Trends in Immunology* **31**, 311-7 (2010).
135. Kamada, N. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology* **55**, 369-89 (1985).

136. Sanchez-Fueyo, A & Strom, TB. Immunological tolerance and liver transplantation. *J Hepatol.* **41**, 698-705 (2004).
137. Zheng, XX, Sanchez-Fueyo, A, Domenig, C & Strom, TB. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunological Reviews* **196**, 75-84 (2003).
138. Billingham, RE, Brent, L & Medawar, PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Transplantation* **76**, 1409-12 (2003).
139. Kamada, N. Animal Models of Hepatic Allograft Rejection. *Semin Liver Dis.* **12**, 1-15 (1992).
140. Dresske, B, Lin, X, Huang, DS, Zhou, X, Fändrich, F. Spontaneous Tolerance-Experience With the Rat Liver Transplant Model. *Human Immunology* **63**, 853–861 (2002).
141. Behrens, D, *et al.* Donor-Derived Soluble Mhc Antigens Plus Low-Dose Cyclosporine Induce Transplantation Unresponsiveness Independent of the Thymus By Down-Regulating T Cell-Mediated Alloresponses in A Rat Transplantation Model. *Transplantation* **72**, 1974-82 (2001).
142. Otto, C, *et al.* Mechanisms of Tolerance Induction After Rat Liver Transplantation: Intrahepatic CD4+ T Cells Produce Different Cytokines During Rejection and Tolerance in Response to Stimulation. *Journal of Gastrointestinal Surgery* **6**, 455-63 (2002).
143. Huang, WH, Yan, Y, De Boer, B, Bishop, GA & House, AK. A short course of cyclosporine immunosuppression inhibits rejection but not tolerance of rat liver allografts. *Transplantation* **75**, 368-74 (2003).
144. Starzl, TE, Demetris, AJ, Trucco, M, Murase, N, Ricordi, C, Ildstad, S, Ramos, H, Todo, S, Tzakis, A & Fung, JJ. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* **17**, 1127-52 (1993).
145. Massarollo, P, Mies, S, Abdala, E, Leitao, R & Raia, S. Immunosuppression Withdrawal for Treatment of Severe Infections in Liver Transplantation. *Transplant Proc.* **30**, 1472-4 (1998).
146. Takatsuki, M, *et al.* Weaning of Immunosuppression in Living Donor Liver Transplant Recipients. *Transplantation* **72**, 449-54 (2001).
147. Orlando, G, Soker, S & Wood, K. Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol.* **50**, 1247-57 (2009).
148. Di Cocco, P, *et al.* Clinical Operational Tolerance After Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc.* **41**, 1278-82 (2009).

149. Ludders, J. Advantages and guidelines for using isoflurane. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* **22**, 328-31 (1992).
150. Gordon, GJ, Coleman, WB, Hixson, DC & Grisham, JW. Liver Regeneration in Rats with Retrorsine-Induced Hepatocellular Injury Proceeds through a Novel Cellular Response. *Am J Pathol.* **156**, 607-19 (2000).
151. Lee, S, Charters, AC, Crane, A & Orloff, MJ. Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat. *The American Journal of Surgery* **130**, 38-40 (1975).
152. Zimmermann, F, Davies, HS, Knoll, PP, Gokel, JM & Schmidt, T. Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation* **37**, 406-10 (1984).
153. Ma, Y, Wang, G, Guo, Z, Guo, Z, He, X & Chen G. Surgical techniques of arterialized orthotopic liver transplantation in rats. *Chin Med J.* **120**, 1914-7 (2007).
154. Kohli, V, Selzner, M, Madden, JF, Bentley, RC & Clavien, PA. Endothelial Cell and Hepatocyte Deaths Occur By Apoptosis After Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Liver. *Transplantation* **67**, 1099-105 (1999).
155. Menthen, A, *et al.* Bone Marrow Progenitors Are Not the Source of Expanding Oval Cells in Injured Liver. *STEM CELLS* **22**, 1049-61 (2004).
156. Batusic, D, Cimica, V, Chen, Y, Tron, K, Hollemann, T, Pieler, T & Ramadori, G. Identification of genes specific to "oval cells" in the rat 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model. *Histochem Cell Biol.* **124**, 245-60 (2005).
157. Beldi, G, Enjoji, K, Wu, Y, Miller, L, Banz, Y, Sun, X & Robson, SC. The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. *Front Biosci.* **13**, 2588-603 (2008).

9 Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Christian Große-Siestrup danke ich für die Übernahme der Arbeit an der Tiermedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin und die Betreuung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Igor Maximilian Sauer möchte ich für die Möglichkeit danken, diese interdisziplinäre Arbeit in Zusammenarbeit mit der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum in der AG Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin durchführen zu können. Des Weiteren möchte ich ihm dafür danken, dass er die Betreuung der Arbeit übernommen hat.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Martina Mogl für die Vermittlung des Themas, die gewährte Unterstützung und freundliche Beratung, sowie die Durchsicht des Manuskripts und die ermutigenden Worte, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Dipl.-Ing. Susanne Rohn möchte ich mich herzlich für die moralische und tatkräftige Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt der gesamten AG Sauer für ihren unermüdlichen Einsatz und die freundliche, kompetente Hilfe, insbesondere bedanke ich mich bei Jan Schröder, Peter Tang, Kerstin Nehls und Dietrich Polenz.

Ich möchte meiner Familie danken, die einen unmessbar wertvollen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit durch ihre liebevolle Unterstützung, ihre bestärkenden Worte und ihren kompromisslosen Rückhalt in jeder Situation beigesteuert hat.

10 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 24.10.2013

Henriette Riedel