

Aus dem
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin
Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
Direktor: Professor Dr. med. Peter Neuhaus

Habilitationsschrift

Innovative Strategien zur Therapie des Leberversagens – artifizielle, bioartifizielle und biologische Leberunterstützungskonzepte

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Igor Maximilian Sauer
Geboren am 19.10.1970 in Berlin

Abschluß des
Verfahrens 10. Dezember 2008

Dekan: Professor Dr. med. M. Paul
1. Gutachter: Professor Dr. med. H. Lang (Mainz)
2. Gutachter: Professor Dr. med. A. Bader (Leipzig)

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	3
1.1	Artifizielle Leberunterstützungssysteme	5
1.2	Bioartifizielle und biologische Leberunterstützungskonzepte	7
1.2.1	Leberzellkultur	7
1.2.2	Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme	9
1.2.2.1	<i>Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD)</i>	9
1.2.2.2	<i>HepatAssist System</i>	10
1.2.2.3	<i>Academisch Medisch Centrum Bioartificial Liver (AMC-BAL)</i>	12
1.2.3	Grenzen derzeitiger bioartifizieller Konzepte	12
1.3	Hepatozytentransplantation	14
II.	Darstellung der eigenen Arbeiten	17
2.1	<i>Single Pass Albumin Dialysis (SPAD)</i>	17
2.2	Gewinnung primärer humaner Leberzellen	21
2.3	Erweiterung des <i>CellModule</i> Bioreaktorsystem zum <i>Modular Extracorporeal Liver Support (MELS)</i> Konzept sowie dessen klinische Evaluierung	24
2.4	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells für die Optimierung zellbasierter Leberunterstützungsverfahren – der <i>SlideReactor</i>	28
2.5	Optimierung der Kryokonservierung primärer humaner Hepatozyten	33
2.6	Markierung primärer humaner Hepatozyten zur non-invasiven Detektion mittels MRT nach Transplantation	35
III.	Zusammenfassung	39
IV.	Genehmigungen	43
V.	Danksagung	44
VI.	Literatur	45
VII.	Eidesstattliche Erklärung	49

I Einleitung

Eine schwere Leberfunktionsstörung äußert sich klinisch durch Ikterus, hepatische Enzephalopathie, Gerinnungsstörungen und häufig auch Beeinträchtigung weiterer Organfunktionen (z.B. hepato-renales Syndrom). Das Leberversagen kann ohne vorbestehende Lebererkrankung erfolgen (akutes Leberversagen, ALV) oder im Sinne einer akuten Dekompensation eines chronischen Leberversagens („acute-on chronic liver failure“, AoCLF) auftreten. Trotz unterschiedlicher pathophysiologischer Mechanismen führt das Leberversagen durch den Ausfall der vielfältigen Synthese-, Detoxifikations- und Regulationsleistungen der Leber jeweils zu einem vergleichbaren, komplexen Krankheitsbild. Gerinnungsstörungen, Hypoglykämie und hypotone, hyperdynamische Kreislaufreaktionen, Enzephalopathie, Hirnödem, renales und pulmonales Versagen sowie septische Komplikationen tragen zur schlechten Prognose betroffener Patienten bei.

Die erfolgreichste Therapieoption stellt heute die Lebertransplantation (LTx) dar. Aufgrund des zunehmenden Mangels an geeigneten Organen können die notwendigen Transplantationen jedoch häufig nicht rechtzeitig durchgeführt werden. Für betroffene Patienten besteht daher Bedarf an einer temporären unterstützenden Maßnahme bis zur Lebertransplantation („*bridging-to-transplantation*“) oder aber – im Idealfall – bis zur Regeneration des erkrankten Organs („*bridging-to-regeneration*“).

Ein ideales Leberunterstützungsverfahren sollte

- die drei Hauptfunktionen der Leber – Detoxifikation, Regulation und Synthese – übernehmen sowie
- unkompliziert,
- kostengünstig und
- ohne unerwünschte Wirkungen klinisch eingesetzt werden können.

Drei wesentliche Strategien der Leberunterstützung befinden sich derzeit in der klinisch-experimentellen Erprobung: extrakorporale artifizielle und bioartifizielle Leberunterstützungssysteme sowie – als biologisches Verfahren – die Leberzelltransplantation. Die im Rahmen dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten beschäftigen sich mit der Entwicklung und Evaluierung von wesentlichen Teilaspekten dieser Verfahren.

Die Akkumulation von wasserlöslichen Substanzen (z.B. Ammoniak, Mercaptane) und einer Vielzahl von albumingebundenen, wasserunlöslichen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren, kurzkettige Fettsäuren und aromatische Aminosäuren) im Rahmen des Leberversagens wird im kausalen Zusammenhang mit der hepatischen Enzephalopathie sowie der Dysfunktion einer Vielzahl von Organen bei Patienten im Leberversagen gesehen. Auf Basis dieser pathophysiologischen Zusammenhänge wurden Systeme entwickelt,

welche die im Blut der Patienten kumulierenden Toxine entfernen sollen. Derartige entgiftende Systeme werden als **artifizielle Leberunterstützungssysteme** bzw. Detoxifikationssysteme bezeichnet.

Komplexe regulative Prozesse und insbesondere die Synthese von lebenswichtigen Substanzen vermögen artifizielle Leberunterstützungssysteme nicht zu leisten – für diese Funktionen werden Leberzellen benötigt. Systeme, die diese biologische Komponente extrakorporal bereitstellen, werden als **bioartifizielle Leberunterstützungssysteme** bezeichnet.

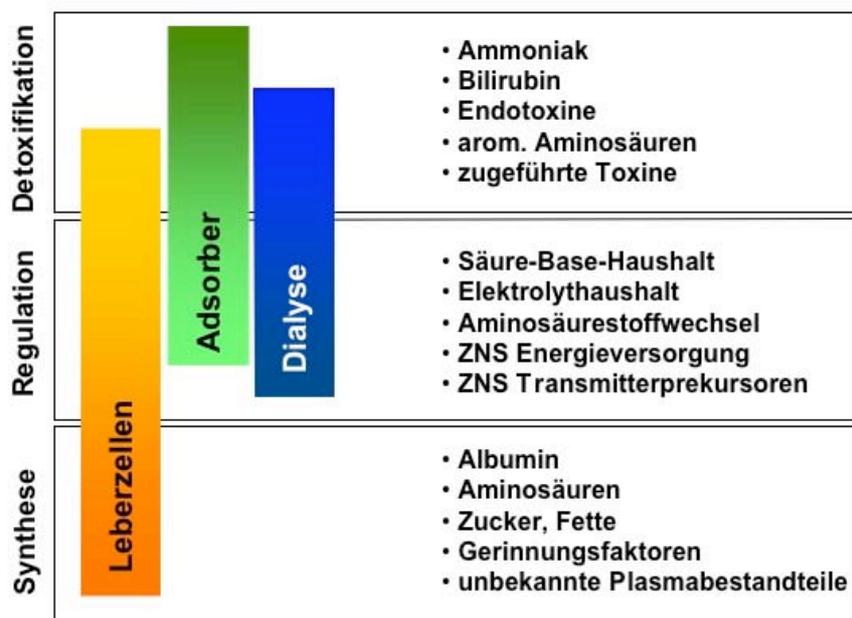


Abbildung 1: Anforderung an Leberunterstützungsverfahren: Regulation und Detoxifikation können durch Adsorber und Dialysetechniken adressiert werden. Komplexe regulatorische Prozesse und Synthese können dagegen nur Leberzellen leisten.

Das Ziel einer Zelltherapie – so beispielsweise die Transplantation isolierter Hepatozyten – ist die Unterstützung oder Wiederherstellung der biologischen Funktion des geschädigten Organs. Das Prinzip der klinischen **Leberzelltransplantation** beruht auf der Isolierung primärer humaner Leberzellen aus abgelehnten Spenderorganen. Die physiologisch intakten Hepatozyten werden dem Patienten über einen Katheter in das Pfortader-Stromgebiet der Leber oder aber in andere Organe wie die Milz infundiert. Die erfolgreiche Transplantation von Hepatozyten erfolgte bisher im Wesentlichen bei Patienten mit leberspezifischen Stoffwechselstörungen sowie bei Patienten im akuten Leberversagen.

1.1 Artificielle Leberunterstützungssysteme

Zu den künstlichen, zellfreien Leberunterstützungssystemen gehören Filtrations- und Adsorptionsverfahren mit rein entgiftender Funktion wie insbesondere Hämoperfusion, aber auch Hämofiltration, Plasmapherese und Hämodialyse. Ziel dieser Verfahren ist es, die fehlende Entgiftungsfunktion der Leber durch Filtration und Adsorption der Toxine zu ersetzen. Bei der Hämoperfusion wird das Patientenblut oder -plasma über Aktivkohlefilter geleitet. Aktivkohle adsorbiert eine Vielzahl von Molekülen, denen eine Rolle in der Entstehung neurologischer Komplikationen beim Leberversagen zugesprochen wird. Zahlreiche klinische Studien wurden während der 70er und 80er Jahre des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Anfängliche Probleme stellten die Bioinkompatibilität, eine starke Thrombenbildung, der Verlust von Thrombozyten und die Gefahr einer disseminierten intravasalen Gerinnung dar. Viele dieser Probleme wurden durch eine Vermeidung des direkten Kontaktes zwischen Aktivkohlepartikeln und Plasma, sowie durch die Verwendung von Prostacyclin gemindert. Das Konzept wurde anfangs mit vielversprechenden Ergebnissen in diversen Zentren angewendet. Kontrollierte randomisierte klinische Studien zeigten jedoch, dass die Aktivkohleperfusion keinen Überlebensvorteil erbrachte. Auch bei Verwendung anderer Verfahren wie Hämodialyse, Plasmapherese und Austauschtransfusion sowie Kombinationen dieser Konzepte wurden individuelle biochemische und klinische Besserungen beobachtet; ein signifikanter Überlebensvorteil für die behandelten Patienten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.¹

Die Entwicklung komplexer Filtrations- und Adsorptionssysteme basiert auf der Überlegung, dass für die vielfältigen klinischen Symptome beim Leberversagen vorwiegend die mangelnde Entgiftungsfunktion der Leber und somit der zunehmende Anfall von Toxinen im Körper verantwortlich ist. Diese Konzepte basieren auf der Hypothese, dass sich die Elimination von lipophilen, albumingebundenen Stoffen wie Bilirubin, Gallensäuren, aromatischen Aminosäuren, kurzkettigen Fettsäuren und Cytokinen günstig auf den klinischen Verlauf der Erkrankung auswirkt.

Derzeit sind zwei wesentliche Konzepte in der klinischen Erprobung: Das *Molecular Adsorbent Recirculation System* (MARS) sowie das auf der *Fraktionierten Plasma-Separation und Adsorption* (FPSA) basierende *Prometheus*-System.

Bezüglich des MARS wurden neben zwei kontrollierten Studien eine Vielzahl von Kasuistiken und kleinen Patientenserien zum Einsatz des Systems bei Patienten im Leberversagen veröffentlicht. In einer ersten randomisierten Studie wurden 13 Patienten mit einer akuten Exazerbation eines chronischen Leberversagens mit hepatoreanalem Syndrom Typ I behandelt. Fünf Patienten erhielten neben der konventionellen Intensivtherapie eine

Haemodiafiltrationsbehandlung (Kontrollgruppe). In der MARS-Gruppe (n = 8) erfolgte zusätzlich die Behandlung mit MARS. Die Sieben-Tage-Mortalität in der Kontrollgruppe betrug 100%, in der MARS-Gruppe hingegen 62,5%. Nach 30 Tagen waren in der MARS-Gruppe 75% der Patienten verstorben. Wie auch in sonstigen Kasuistiken und unkontrollierten Studien zur MARS-Therapie zeigte sich eine – teilweise signifikante – Verbesserung pathologisch veränderter laborchemischer Parameter und der hämodynamischen Situation der Patienten.²

In einer weiteren Studie wurden an zwei Zentren 24 Patienten mit AoCLF und nachgewiesener Hyperbilirubinaemie (Bilirubin [total] > 20mg/dl) in eine Kontrollgruppe (konventionelle Intensivtherapie) oder die MARS-Gruppe (konventionelle Intensivtherapie und zusätzliche Behandlung mit MARS) randomisiert zugeteilt. Dabei zeigte sich unter MARS-Therapie eine signifikante Verbesserung des 30-Tages-Überlebens (11/12 versus 6/11 in der Kontrollgruppe); die Drei-Monats-Mortalität beider Gruppen war jedoch identisch.³ Die Studie wurde aus nicht näher erläuterten Gründen nach Einschluss der Hälfte der ursprünglich geplanten Patienten vorzeitig abgeschlossen.

Derzeit wird in Europa eine randomisierte, multizentrische, kontrollierte Studie bei Patienten im AoCLF durchgeführt. In den USA wurde eine Studie bezüglich des Einflusses einer MARS-Therapie auf den Schweregrad der Enzephalopathie abgeschlossen und kürzlich publiziert. 70 Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose und schwerer Enzephalopathie wurden in die Studie eingeschlossen. 39 Patienten wurden zusätzlich zur intensivmedizinischen Betreuung mit MARS behandelt. Die Autoren zeigten eine signifikante Verbesserung des Enzephalopathiegrades – sowohl absolut als auch hinsichtlich der Zeitspanne bis zur Besserung – in der mit MARS behandelten Patientengruppe.⁴

Bezüglich der klinischen Evaluation der Single Pass Albumindialyse existieren bisher lediglich Kasuistiken.

Da das *Prometheus*-System erst vor wenigen Jahren vorgestellt wurde, liegen nur wenige klinische Daten vor. In einer Phase II-Studie mit 11 Patienten mit einer akuten Exazerbation eines chronischen Leberversagens mit konsekutivem Nierenversagen konnten signifikante Besserungen zuvor pathologisch veränderter laborchemischer Parameter nach Therapie mit dem Prometheus-System gezeigt werden. Abgesehen von hypertonen Phasen nach Anschluss bei zwei Patienten und Blutungen bei einem Patienten konnte die Biokompatibilität und Sicherheit des Systems gezeigt werden.⁵ In einer randomisierten *Crossover*-Studie bei fünf Patienten mit AoCLF wurde alternierend mit MARS und Prometheus behandelt und die Reduktionsrate (*reduction ratio*: 1 abzüglich Substanzspiegel nach Therapie, dividiert durch Substanzspiegel vor Therapie) für Bilirubin als Markersubstanz für albumingebundene Toxine und den wasserlöslichen Harnstoff bestimmt.

Dabei zeigte Prometheus für beide Substanzen eine signifikant höhere Reduktionsrate als MARS und erscheint daher als das effizientere System.⁶

Eine fundierte Aussage zum Einfluss der Systeme auf den klinischen Verlauf der Erkrankung ist aufgrund der noch unzureichenden Datenlage zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zulässig. Das Konzept der direkten Aufreinigung der patienteneigenen Albuminfraktion sowie der Hämodialyse im Primärkreislauf lassen jedoch eine höhere Effizienz des Prometheus-Konzepts erwarten. Der Einsatz des Systems beim akuten Leberversagen wird derzeit im Rahmen einer europäischen, prospektiven, randomisierten und kontrollierten multizentrischen Studie (HELIOS) erprobt. Dabei sollen insgesamt 204 Patienten mit einer akuten Exazerbation eines chronischen Leberversagens eingeschlossen werden. Primärer Endpunkt der Studie ist das 28-Tages- sowie das Drei-Monats-Überleben. Erste Ergebnisse werden für 2008 erwartet.

1.2 Bioartifizielle und biologische Leberunterstützungskonzepte

1.2.1 Leberzellkultur

Frühe Konzepte zur biologischen Leberunterstützung basierten auf Techniken der extrakorporalen Leberperfusion (*extracorporeal liver perfusion*, ECLP). Dabei wird das Blut des Patienten durch eine explantierte – humane oder xenogene – Leber in einer sterilen Kammer geleitet. *Otto* und Mitarbeiter führte eine derartige Therapie 1958 erstmals im Tiermodell durch. Die erste klinische Anwendung erfolgte nicht – wie häufig berichtet – durch *Eiseman* sondern durch *Sen* an der Universität in Bombay, Indien. Er behandelte fünf Patienten unter Verwendung humaner Lebern. Vier Patienten starben nach weniger als zwei Tagen, ein Patient zeigte eine *restitio ad integrum* nach akutem Leberversagen. *Eiseman* setzte nur einen Monat später die extrakorporale Perfusion porciner Lebern erstmals klinisch ein. In den folgenden vier Dekaden wurde die ECLP nur sporadisch, aber insgesamt bei mehr als 270 Patienten, durchgeführt. Eine Metaanalyse aller publizierten Fälle zeigte allerdings keinerlei Vorteile gegenüber einer konventionellen intensivmedizinischen Behandlung der Patienten.

Wesentlicher Nachteil des ECLP-Verfahrens ist die komplexe Logistik: Im Bedarfsfalle muss entweder ein geeignetes humanes Organ zur Verfügung stehen oder aber die Explantation einer xenogenen Leber (meist porcinen Ursprungs) durchgeführt werden. Unter sterilen Bedingungen müssen die Organe dann in Perfusionskammern kanüliert und mit dem Blut des Patienten perfundiert werden. Neben immunologischen und mikrobiologischen Risiken (z.B. die Gefahr von Xenozoonosen bei der Verwendung xenogener Organe) waren insbesondere das komplexe Verfahren zum Anschluss an den Blutkreislauf des Patienten

und unzureichende Bevorratungsmöglichkeiten von im Bedarfsfalle einsetzbaren Organen ausschlaggebend für die Entwicklung so genannter hybrider Systeme. Dabei handelt es sich um Systeme, welche aus künstlichen Materialien (Kunststoffgehäuse, Membranen und standardisierte, aus der Dialysetechnik bekannte Schlauchverbindungen) und biologischen Komponenten (Leberzellen) bestehen. Derartige Bioreaktoren bieten insbesondere den Vorteil der leichteren Handhabung (geschlossene, transportable Einheiten, Kombinierbarkeit mit Plasmaseparatoren dank standardisierter *Luer-Lock*-Konnektoren). Die erste klinische Anwendung eines bioreaktorbasierten Leberunterstützungssystems erfolgte im Jahre 1987 durch *Matsumura* und Mitarbeiter. Das System basierte auf einer Hämodialyse gegen eine Suspension von 10×10^9 ehemals kryokonservierter Kaninchenhepatozyten. Das Blut des Patienten war dabei durch eine Zellulosemembran von den Hepatozyten getrennt. Ein Patient im Leberversagen bei inoperablem Gallengangskarzinom wurde mit diesem System behandelt und überlebte dem Bericht zufolge ohne Nebenwirkungen.⁷

Praktisch alle im weiteren Verlauf entwickelten und klinisch evaluierten extrakorporalen Leberunterstützungssysteme basieren auf Hohlfaserkapillaren, durch die das Nährmedium oder das Patientenplasma geleitet wird. Zwischen den Hohlfaserkapillaren werden die Leberzellen angesiedelt. Vergleichbare in speziellen Kunststoffkartuschen eingebettete Hohlfaserkapillaren werden bereits im Rahmen der Nierenersatztherapie (Dialyse) verwendet. Der Substanztransfer zwischen dem Plasma des Patienten und den Leberzellen erfolgt dabei über die Poren der Hohlfasermembran. Ein direkter Kontakt des Patientenblutes mit biologischer Masse im Zellkompartiment des Bioreaktors kommt also nicht zustande. Dies ermöglicht eine gewisse immunologische Barriere, limitiert aber andererseits den Stoffaustausch und damit potentiell die Effizienz des Systems.

Neben der klinisch-technischen Notwendigkeit (Verbindung mit dem Plasmafilter), werden die Hohlfasern zur Schaffung möglichst physiologischer Kulturbedingungen für die anspruchsvollen Leberzellen benötigt: Während in unbeschichteten Schalen- und Suspensionskulturen primärer humaner Hepatozyten bereits nach wenigen Stunden die Stoffwechselaktivität erlischt, konnten diverse Techniken deutlich zur Steigerung von Stoffwechselraten und zu einer Verlängerung der Aktivität beitragen: Die zur erfolgreichen Kultur erwünschte Zellimmobilisierung sowie die Vergrößerung der Adhäsionsoberfläche und Zell-Matrixkontakte wurde durch Kollagenbeschichtung der Zellträger (Kulturschalen, Glasplatten), Doppelbeschichtung von Zellträger und Monolayer (Sandwichkulturen), Zelleinbettung in Matrixgele oder Agarose, Adhäsion auf Microcarriern, Adhäsion auf Polymerschwämmen, Sphäroidbildung nach Geleinbettung sowie durch Aggregatkulturen auf Hohlfasermembranen erreicht. Eine bessere Nährstoffversorgung der Zellen erfolgte durch die Rotation von Flaschen- und Schalenkulturen. Die Sauerstoffversorgung konnte durch Integration von Oxygenierungsmembranen verbessert werden.

Monolayerkulturen bieten einen optimalen Oberflächenkontakt für den Stoffaustausch. Es lassen sich bis zu 3×10^5 Zellen pro cm^2 kultivieren. Um Kulturen mit höherer Zelldichte aufrechterhalten zu können, wurden Bioreaktoren entwickelt, die das Perfusionsgerüst des Organs ersetzen und eine dezentrale Sauerstoffversorgung ermöglichen. Sie bieten die Voraussetzungen für den mehrwöchigen funktionellen und morphologischen Erhalt von Leberzellkulturen bieten: Ein Bioreaktor schafft eine Umgebung, in dem ein stabiles Perfusionsgerüst eine adäquate Nähr- und Sauerstoffversorgung gewährleistet und zudem eine Zellimmobilisierung erleichtert. Die dabei in der Regel verwendeten Kapillarmembranen teilen den Bioreaktor in intra- und extrakapilläre Kompartimente ein. Die kultivierten Leberzellen ordnen sich im extrakapillären Kompartiment zu Aggregaten an und adhären auf der äußeren Oberfläche der Kapillaren. Bei einigen wenigen Systemen wurden die Zellen auch im Intrakapillärraum, also in den Hohlfasern kultiviert. Die geringe Porengröße der Kapillaren verhindert ein Entweichen der Leberzellen aus dem Zellkompartiment des Bioreaktors, ermöglicht jedoch den Stoffaustausch. Bei einigen Systemen wird das Medium vor Durchströmen des Bioreaktors mit Sauerstoff angereichert; bei anderen Konzepten werden spezielle, gaspermeable und hydrophobe Oxygenierungsmembranen eingesetzt. Das Innere dieser Membranen wird dabei während der gesamten Kultivierungszeit kontinuierlich von einem Gasgemisch durchströmt und erlaubt somit eine Oxygenierung der Zellen über Diffusion in unmittelbarer Zellumgebung.

1.2.2 Bioartifizielle Extrakorporale Leberunterstützungssysteme

1.2.2.1 Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD)

Beim *Extracorporeal Liver Assist Device* (ELAD) der ersten Generation befanden sich ca. 200g Zellen einer humanen Hepatocyten-Tumorzelllinie (C3A) im Dialysatraum von insgesamt vier, auf modifizierten Dialysefiltern basierenden Bioreaktoreinheiten (50g Zellen je Kartusche). Die verwendete Zelllinie ist ein Klonderivat der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2. Die semipermeable Membran, welche die C3A-Zellen vom Blut des Patienten trennt, hat einen *cut-off* von 70 kDa und ist somit nicht für Immunglobuline oder Leukozyten permeabel. Das Blut der Patienten wird durch die Kapillaren des Filters gepumpt und nach Passage zweier Zellfilter dem Patienten zurückgegeben. Die Zellfilter sollen das Verschleppen von Zelldetritus oder gar vitaler C3A-Zellen in den Körper des Patienten verhindern.

Im Rahmen einer Phase-I-Studie zeigten 10 von 11 behandelten Patienten eine Besserung bestimmter klinischer und biochemischer Parameter. Vier Patienten wurden erfolgreich transplantiert, und in einem Fall konnte wegen der Regeneration der Leberfunktion auf eine Transplantation verzichtet werden. Problematisch war die wiederholte Gerinnung des Blutes innerhalb des extrakorporalen Kreislaufsystems, welche zu einem aggressiveren

Heparinisierungs-Regime führte.⁸ In einer kontrollierten Pilotstudie wurden 24 Patienten mit akutem Leberversagen entsprechend des vorhergesagten klinischen Verlaufs in zwei Gruppen stratifiziert. In Gruppe I (n = 17) wurden Patienten mit substantieller Chance auf Erholung (30-50%) zusammengefasst; Gruppe II (n = 7) umfasste Patienten, die bei stationärer Aufnahme die Kriterien für eine Lebertransplantation mit höchster Dringlichkeit (*high urgency liver transplantation*, HU-LTx) erfüllten. Diese Patienten wurden zwei Therapiearmen zugeteilt: Konventionelle Intensivtherapie (Kontrollarm) und konventionelle Intensivtherapie in Kombination mit ELAD-Therapie. Patienten der Gruppe I überlebten zu 75% unter konventioneller Intensivtherapie (Kontrollarm) und zu 78% bei zusätzlicher ELAD-Therapie. In Gruppe II überlebten 25% im Kontroll- und 33% im ELAD-Arm.

Das ELAD wurde nach dieser Studie technisch modifiziert und in einer Pilotstudie klinisch evaluiert. Beim modifizierten System werden 100g Zellen in jede der vier Hohlfaserkartuschen gefüllt und anstelle Vollbluts mit Ultrafiltrat (Membran mit *cut-off* von 120 kDa) perfundiert. Die Flussrate pro Kartusche wurde von 150-200 ml/min auf 500 ml/min erhöht. Fünf Patienten mit akutem Leberversagen oder primärer Nichtfunktion eines Lebertransplantats wurden in eine erste monozentrische Studie eingeschlossen und für 12-107 Stunden behandelt. Unerwünschte Wirkungen des Systems wurden nicht beobachtet. Alle Patienten konnten erfolgreich bis zur Transplantation überbrückend behandelt werden – ein Patient verstarb allerdings zwei Tage nach LTx.⁹

1.2.2.2 HepatAssist System

Das *HepatAssist*-System wurde von *Demetriou* und Mitarbeitern entwickelt und ist das bisher im Rahmen klinischer Studien am besten evaluierte bioartifizielle Leberunterstützungssystem. Bei diesem Konzept werden $5-7 \times 10^9$ ehemals kryokonservierte porcine Hepatozyten in den Extrakapillärraum eines hohlfaserbasierten Bioreaktors gefüllt. Plasma des Patienten wird zunächst durch eine Aktivkohleeinheit und einen Oxygenator geleitet, bevor der Bioreaktor perfundiert wird.^{10,11} In einer frühen Phase-I-Studie zur Evaluation der Sicherheit und Biokompatibilität wurden neun Patienten im akuten Leberversagen und ein Patient mit primärer Nichtfunktion behandelt. Acht Patienten wurden erfolgreich bis zur LTx therapiert, zwei Patienten wurden nicht transplantiert und verstarben. Unter Therapie konnte bei sechs Patienten eine rasche Normalisierung eines deutlich erhöhten intrakraniellen Druckes und bei allen behandelten Patienten eine Besserung pathologisch veränderter biochemischer Parameter beobachtet werden. Auch dieses System erwies sich als biokompatibel.¹² In einer Verlaufsbeobachtung wurden 39 Patienten in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe I (n = 26) umfasste Patienten im ALV mit Indikation zur LTx, Gruppe II-Patienten (n = 3) zeigten eine Primäre Nichtfunktion (PNF) nach LTx und in Gruppe III (n = 10) wurden Patienten mit akuter Exazerbation eines chronischen

Leberversagens zusammengefasst. In Gruppe I wurden 18 Patienten (69%) erfolgreich bis zur LTx therapiert, einer dieser Patienten verstarb allerdings sieben Tage nach erfolgter Transplantation. Sechs Patienten (23%, davon fünf mit Paracetamol-induziertem ALV) erholten sich ohne LTx. In Gruppe II wurden alle Patienten erfolgreich bis zur Re-LTx therapiert. In Gruppe III zeigten alle behandelten Patienten eine temporäre klinische Besserung – acht Patienten (80%) verstarben allerdings binnen 21 Tagen nach erster Bioreaktortherapie.¹³

Demetriou und Mitarbeiter schlossen in der bisher größten Studie insgesamt 171 Patienten mit fulminantem/subfulminantem Leberversagen und primärer Nichtfunktion nach Lebertransplantation ein. 86 Patienten wurden konventionell intensivtherapeutisch betreut, 85 Patienten wurden zusätzlich mit dem *HepatAssist* System behandelt (*HepatAssist*-Gruppe). Unter Betrachtung der gesamten Studienpopulation betrug dabei das 30-Tages-Überleben in der Kontrollgruppe 62%, in der *HepatAssist*-Gruppe 71% ($p = 0,26$). Nach Ausschluss aller Patienten mit primärer Nichtfunktion des Transplantates (somit $n = 147$) betrug das 30-Tages-Überleben in der Kontrollgruppe 59% sowie 73% in der *HepatAssist*-Gruppe ($p = 0,12$). Da die Lebertransplantation einen wesentlichen Einfluss auf den klinischen Verlauf hat, wurde auch das relative Risiko (RR) betrachtet: Das RR für eine LTx während der ersten 30 Tage war 0,31 ($p = 0,0001$). Die Mehrzahl der Patienten (55%) wurde während der 30 Tage nach Einschluss in die Studie transplantiert. Bei Betrachtung aller transplantierten Patienten überlebten 89% in der *HepatAssist*-Gruppe und 80% in der Kontrollgruppe ($p = 0,22$). Bei den nicht transplantierten Patienten überlebten 50% in der *HepatAssist*-Gruppe und 38 % in der Kontrollgruppe ($p = 0,38$). Das RR bezüglich der Behandlung mit dem *HepatAssist*-System betrug bei Betrachtung aller ($n = 171$) Patienten 0,67. Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit fulminantem/subfulminantem Leberversagen (also unter Ausschluss der Patienten mit primärer Nichtfunktion des Transplantates, $n = 147$) betrug das RR 0,56 ($p = 0,048$). Bei Betrachtung der Dauer bis zum Eintreten des Todes kam es erst unter Ausschluss der Patienten mit primärer Nichtfunktion des Transplantates sowie Patienten mit unbekannter Aetiologie ($n = 83$) zu einem signifikant ($p = 0,009$) verlängerten Überleben.¹⁴ Trotz der Notwendigkeit statistischer Subanalysen zum Nachweis signifikanter Unterschiede ist festzuhalten, dass diese Studie die erste große, randomisierte, kontrollierte, multizentrische, prospektive Studie bezüglich eines bioartifiziellen Leberunterstützungsystems darstellt und dabei die Sicherheit des Systems und in der Teilgruppe der Patienten mit fulminantem/subfulminantem Leberversagen eine verbesserte Überlebensrate gezeigt werden konnte.

1.2.2.3 Akademisch Medisch Centrum Bioartificial Liver (AMC-BAL)

Die Konfiguration der AMC-BAL unterscheidet sich von den meisten anderen Bioreaktorsystemen im Aufbau und Perfusionsmodus des Zellkompartiments im Bioreaktor: 10×10^9 porcine Hepatozyten erhalten die Möglichkeit, an einem Netzwerk aus hydrophilen Polyesterfäden zu adhären. Diese Matrix wird von der Oxygenierung dienenden Hohlfaserkapillaren durchzogen. Das mittels eines Plasmafilters gewonnene Plasma wird direkt durch das Zellkompartiment des Bioreaktors geleitet. Anders als bei den übrigen hohlfaserbasierten Systemen kommt es beim AMC-BAL also zu einem direkten Kontakt des Plasmas mit den Zellen.^{15,16}

In einer Phase I Studie wurden 12 Patienten im akuten Leberversagen behandelt. Alle Patienten zeigten eine Enzephalopathie Grad II-IV und waren als Kandidaten für eine Lebertransplantation mit höchster Dringlichkeit registriert. Dabei wurden 11 von 12 Patienten erfolgreich bis zur Lebertransplantation überbrückend behandelt. Ein Patient erholte sich unter der Therapie ohne dass es eine Lebertransplantation bedurfte. Die Behandlungsdauer betrug 8-35 Stunden. Vier Patienten starben binnen eines Monats nach zunächst erfolgreicher Lebertransplantation. Die übrigen acht Patienten zeigten ein Sechs-Monats-Überleben von 66%.¹⁷

1.2.3 Grenzen derzeitiger bioartifizieller Konzepte

Die bisherigen klinischen Anwendungen extrakorporaler Leberunterstützungssysteme belegen, dass die Konzepte auch bei schwerkranken Patienten im Leberversagen sicher anwendbar sind. Erste Studien zeigen nachweisbare klinische Effekte und insbesondere einen – wenn auch bescheidenen – Überlebensvorteil der Patienten, die mit extrakorporalen Leberunterstützungssystemen behandelt wurden. Verglichen mit den Auswirkungen einer Lebertransplantation auf den klinischen Verlauf des Patienten sind die Leistungen der extrakorporalen Systeme allerdings derzeit noch als zu gering einzustufen. Bei der alleinigen Verwendung artifizieller Systeme werden bei fehlender biologischer Komponente nur entgiftende Leistungen bereitgestellt. Im Idealfall wird der *circulus vitiosus* unterbrochen und die geschädigte Leber kann regenerieren. Komplexe regulative Prozesse oder gar synthetische Leistungen können von diesen Systemen nicht erwartet werden. Bei der Verwendung biologischer Komponenten weisen jedoch alle bisher entwickelten und klinisch eingesetzten Systeme konzeptionelle Einschränkungen auf:

- Je nach Konzept werden dem Patienten 50-600g Leberzellen extrakorporal zur Verfügung gestellt. Die durchschnittliche Leberzellmasse eines erwachsenen Menschen beträgt jedoch rund 1500g. Klinische Erfahrung bezüglich der erforderlichen Zellmasse konnte im Rahmen der Lebendspende-Lebertransplantation gemacht werden. Aufgrund der Organknappheit werden in ausgewählten Fällen

freiwillige, gesunde und blutgruppenkompatible Spender herangezogen, deren Leber teilweise reseziert und dem Patienten im Leberversagen transplantiert wird. Wesentliches Problem ist dabei die erforderliche Mindestmasse an zu transplantiertem Gewebe. Es zeigte sich in diesem Kontext, dass ein Transplantat mit einer Masse von weniger als 40% der idealen Lebermasse des Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Transplantatversagen verbunden ist.¹⁸

- Das Problem wird noch deutlicher wenn man bedenkt, dass die Zellmasse in Bioreaktoren durch – je nach Konzept ein bis zwei – Membranen vom Blut des Patienten getrennt wird. Der notwendige Stoffaustausch wird dabei durch die Membranbarrieren je nach *cut-off* mehr oder weniger deutlich eingeschränkt. Künstliche Kapillaren sind als Ersatz für Gefäße in Bioreaktoren technisch notwendig, können aber bezüglich ihrer Permeabilität und rheologischen Eigenschaften nicht mit dem Endothel des intrahepatischen Gefäßsystems konkurrieren. Die Problematik eines limitierten Stoffaustauschs wird durch das pro Zeiteinheit prozessierte Blut- bzw. Plasmavolumen noch verstärkt: Die Leber eines erwachsenen Menschen *in situ* wird mit durchschnittlich 1500ml Blut pro Minute perfundiert. Je nach Konzept werden die extrakorporal betriebenen Bioreaktoren aus technisch-rheologischen Gründen mit lediglich 100-500ml/min Plasma durchströmt.¹⁹
- Das größte Problem biologischer extrakorporaler Leberunterstützungssysteme ist jedoch die Zellquelle: Xenogene Zellen – obschon durch einfache Logistik und gute Verfügbarkeit gekennzeichnet – bergen das Risiko von Zoonosen. Dies führte insbesondere in Bezug auf die möglicher Übertragung porciner endogener Retroviren (PERV) auf den Menschen zu intensiven Diskussionen und einem Moratorium bezüglich der Verwendung dieser Zellen in vielen Ländern. Zusätzlich bestehen zwischen Schwein und Mensch – entgegen erster Erwartungen – Unterschiede bezüglich relevanter Stoffwechselprozesse.²⁰ Eine nur eingeschränkte Kompatibilität biologischer Prozesse limitiert den Nutzen porciner Hepatozyten bei der Therapie von Patienten im Leberversagen.²¹ Ähnliches gilt für Tumorzelllinien. Trotz des humanen Ursprungs, ist die leberspezifische metabolische Kapazität der Zellen verglichen mit primären Leberzellen um ein Vielfaches reduziert. Trotz der extrakorporalen Anwendung und dem Einsatz diverser Sicherheitsfilter besteht zudem grundsätzlich das Risiko des Transfers von Tumorzellen in den Blutkreislauf des Patienten und somit die Gefahr der Entstehung von Tumoren.

1.3 Hepatozytentransplantation

Die Transplantation autologer oder allogener Hepatozyten stellt eine Möglichkeit zur Zelltherapie bei bestimmten Lebererkrankungen dar. Insbesondere hereditäre Stoffwechseldefekte wie das Crigler-Najjar-Syndrom, Defekte der Harnstoffsynthese oder die familiäre Hypercholesterinämie aber auch das akute Leberversagen und das Leberversagen nach erweiterter Leberteilresektion sind mögliche Indikationen.

Eine Hepatozytentransplantation wurde bisher im Rahmen klinischer Studien bei mehr als 100 Patienten durchgeführt.²² Ziel dieser Anwendungen war eine Überbrückungsbehandlung bis zur Lebertransplantation oder aber – im Idealfall – bis zur Wiederherstellung einer ausreichenden Leberleistung.

Weltweit wurden bei 21 Kindern Hepatozyten zur Korrektur metabolischer Störungen transplantiert. Darunter waren zwei Brüder mit einem Faktor-VII- Mangel, die kryokonservierte Leberzellen - entsprechend ca. 5% der Leberzellmasse – via V. porta infundiert erhielten. Postinterventionell zeigten sie bis zum Zeitpunkt der Durchführung einer Lebertransplantation nach sechs Monaten eine Reduktion der erforderlichen exogenen Faktor VII Gabe um 80%.²³ Zwei Kinder mit einer Glykogenspeicherkrankheit Typ IA wiesen nach Zelltransplantation einen signifikant verbesserten Glukosstoffwechsel ohne dietätische Einschränkung auf.²⁴

Das Crigler-Najjar-Syndrom Typ I basiert auf einer Mutation des UGT1A1-gens, welches für die Konjugation des Bilirubins verantwortlich ist. Vier Kinder mit dieser Erkrankung wurden mittels Hepatozytentransplantation behandelt. Die intraportale Infusion von kryokonservierten primären humanen Leberzellen (ca. 5% der Leberzellmasse) führte zu einer Reduktion der Hyperbilirubinämie um 30-50%, zu einem geringeren Risiko des Auftretens eines Kernikterus' und zu einer bis annähernd drei Jahre anhaltenden Bilirubinkonjugation.^{25,26}

Insgesamt 37 Patienten wurden aufgrund eines akuten Leberversagens mit unfraktionierten, genetisch nicht modifizierten Leberzellen behandelt. Zehn Kinder im Alter von drei Monaten bis 16 Jahren wurden mittels Hepatozyteninfusion in die Pfortader sowie in einem Falle in die Peritonealhöhle behandelt. Drei Patienten wurden erfolgreich bis zur Lebertransplantation überbrückend behandelt; zwei Patienten erholten sich, ohne dass eine LTx erfolgen musste. Trotz Multiorganversagen in Folge der schweren Leberschädigung konnte bei acht von 10 Kindern nach Hepatozytentransplantation eine signifikante Senkung des Ammoniakspiegels sowie eine Besserung der bestehenden Enzephalopathie beobachtet werden.²⁷

Von 15 erwachsenen Patienten mit akutem medikamentenassoziierten Leberversagen konnte bei zehn Patienten eine Besserung des Enzephalopathiegrades sowie des Ammoniakblutspiegels nachgewiesen werden. Die Transplantation von Leberzellen in die Milz wurde als Überbrückungsbehandlung bis zur Lebertransplantation bei zwei Patienten erfolgreich durchgeführt. Drei Patienten erholten sich nach Hepatozytentransplantation (n=2

intrahepatisch, n=1 intraperitoneal) ohne Notwendigkeit einer LTx. Die übrigen Patienten verstarben in der Regel an einer Sepsis. Zwei Patienten mit idiopathischem akutem Leberversagen wurden mittels Transplantation von Hepatozyten in die Milz behandelt. Ott und Mitarbeiter berichteten über die erfolgreiche Behandlung einer Patientin mit Knollenblätterpilzvergiftung: Zwölf Wochen nach Transplantation der Zellen über die Pfortader wurde die Immunsuppression bei *restitutio ad integrum* der Leberleistung beendet. Desweiteren wurden acht Patienten mit viral bedingtem akutem Leberversagen sowie ein Patient nach Trisektorektomie behandelt.

Zur Therapie von Patienten im chronischen Leberversagen wurde in der Regel die Milz als Implantationsort gewählt. Die Milz eines Patienten mit Leberzirrhose kann ein Volumen von 800-1200g aufweisen (im akuten Leberversagen dagegen i.d.R. nur 100-150g) und ermöglicht die sichere Unterbringung von 6×10^8 bis 6×10^9 Zellen.²⁸ Nachdem *Mito* et al. im Kleintiermodell erfolgreich die Langzeitfunktion der Zellen sowie die „Hepatisierung“ der Milz nachweisen konnten, führten sie die ersten Behandlungen von an Leberzirrhose erkrankten Patienten mittels Autotransplantation von aus Leberteilresektaten gewonnenen Hepatozyten in die Milz durch. Die transplantierten Hepatozyten wurden mittels Tc99m-Markierung bis zu sechs Monate nachgewiesen. Ihr Einfluss auf die Besserung der Enzephalopathie der Patienten wurde von den Autoren allerdings als gering eingestuft.²⁹ Zehn weitere Patienten erhielten Zell-Allotransplantate von Spenderlebern ohne Zirrhose.

Voraussetzung für eine klinisch erfolgreiche Hepatozytentransplantation sind transplantierbare Hepatozyten mit einer ausreichende Vitalität und Funktionalität. Primäre humane Hepatozyten werden aus nicht zur Transplantation geeigneten Spenderlebern oder Leberteilresektaten isoliert und können entweder direkt zur Zelltransplantation therapeutisch eingesetzt oder zwischenzeitlich in Zellbanken kryokonserviert gelagert werden. Der erfolgreiche klinische Einsatz der Hepatozytentransplantation setzt einerseits die Optimierung der logistischen Prozesse, maßgeblich der Kryokonservierung isolierter Leberzellen, andererseits Erkenntnisse hinsichtlich der Eingliederung der Zellen in das Zielgewebe (*Engraftment*) voraus. Idealerweise kommt es durch die Proliferation der transplantierten Zellen in der Empfängerleber zu einem teilweisen oder vollständigen Ersatz des erkrankten Parenchyms durch transplantierte metabolisch uneingeschränkt aktive Zellen. Wenig ist bislang über das Schicksal transplantierte Zellen nach deren intravasalen Applikation bekannt. Klinische Methoden zum Nachweis transplantierte Zellen basieren auf histologischen Untersuchungen oder dem Einsatz von Radioisotop-markierten Zellen. *Soriano* et al. konnten unter Berücksichtigung des Y-Chromosoms bei Transplantation männlicher Zellen in weibliche Empfänger nicht nur den Umfang der Eingliederung transplantierte Leberzellen in die Leber mittels quantitativer Echtzeit-

Polymerasekettenreaktion sondern auch die Integration in das Leberparenchym demonstrieren.³⁰

Die geschilderten Verfahren basieren entweder auf invasiven Methoden zur Gewinnung von Lebergewebe oder aber den Einsatz radioaktiver Substanzen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellt dagegen eine sichere, nicht-invasive Untersuchungsmethode dar. Die Möglichkeit der Zellverfolgung mittels MRT wäre ein wertvolles Werkzeug für die Grundlagenforschung im Bereich der zellbasierten Regenerativen Medizin diene zudem – im Falle des klinischen Routineeinsatzes – der individuellen Qualitätskontrolle.

2.1 *Single Pass Albumin Dialysis (SPAD)*

I.M. Sauer, M. Goetz, I. Steffen, G. Walter, D.C. Kehr, R. Schwartlander, Y. J. Hwang, A. Pascher, J. C. Gerlach, P. Neuhaus: In vitro comparison of the Molecular Adsorbent Recirculation System (MARS) and Single Pass Albumin Dialysis (SPAD) Hepatology; 2004, 39: 1408 – 1414

Bei der Albumindialyse wird das Blut des Patienten durch die Hohlfaserkapillaren eines *Highflux*-Dialysefilters geleitet. An der Außenseite der Hohlfaserkapillaren wird eine mit Albumin angereicherte Dialyselösung vorbeigeleitet. Das Albumin dient dabei als Akzeptorsubstanz für wasserunlösliche Toxine. Diese sind im Patientenblut überwiegend an Albumin gebunden und sollen über die Dialysemembran in die Albuminlösung übergehen.

Beim *Molecular Adsorbent Recirculating System* (MARS) zirkuliert eine Albuminlösung durch einen nicht albumin-permeablen *Highflux*-Hämodialysefilter vom Patientenblut getrennt in einem geschlossenen Kreislauf (Abb. 2a). Diese Albuminlösung durchströmt einen Anionenaustauscher und einen Aktivkohlefilter. Sie wird danach zusätzlich durch eine Standarddialyselösung nach dem Prinzip der kontinuierlichen veno-venösen Hämodialyse (CVVHD) oder der kontinuierlichen veno-venösen Hämodiafiltration (CVVHDF) dialysiert. Dieser Kreislauf dient der Aufnahme albumingebundener Toxine aus dem Patientenblut durch Bindung an das zirkulierende Albumin und der anschließenden Regeneration des zirkulierenden Albumins durch Übernahme der Toxine in die Anionenaustauscher- und Aktivkohleeinheit. Die Dialyse dient der Entfernung wasserlöslicher Substanzen.

Beim auf der FPSA-Methode (*Fractionated Plasma Separation and Adsorption*) basierenden *Prometheus*-System wird das Plasma durch einen albumindurchlässigen Filter separiert und anschließend durch Kartuschen mit Ionenaustauscher und Neutralharz geleitet (Abb. 2c). Diese dienen einer direkten Aufreinigung der Albuminfraktion des Patienten. Nach Passage des albumindurchlässigen Filters wird das Blut zusätzlich durch einen *Highflux*-Dialysefilter geleitet und direkt (im Primärkreislauf) dialysiert.

Die Kosten für eine Behandlungseinheit von durchschnittlich 6 Stunden betragen für MARS und Prometheus ca. 2200,- Euro. Neben dem großen apparativen Aufwand gestalten sich Aufbau und Betrieb der Systeme auf der Intensivstation als sehr aufwändig.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit erstmals systematisch untersuchten *Single Pass Albumin Dialysis* (SPAD) besteht eine einfache und mit ca. 700,- Euro Materialkosten eine kostengünstige Alternative zum MARS-Konzept: Bei der SPAD wird das Patientenblut unter Verwendung einer einfachen CVVHDF-Dialyseapparatur ebenfalls durch die Hohlfasern eines *Highflux*-Dialysefilters geleitet. Die Außenseite der Filtermembranen wird in Analogie zum MARS mit einer Albuminlösung im Gegenstromprinzip umspült. Diese Albuminlösung wird allerdings nach dem Passieren des Filters verworfen und nicht – wie im MARS-Konzept

– wieder aufbereitet (Abb. 2b). Das Konzept SPAD ermöglicht die Kombination mit einer CVVHDF über den *Highflux*-Dialysefilter und somit auch die effiziente Entfernung von wasserlöslichen Substanzen.

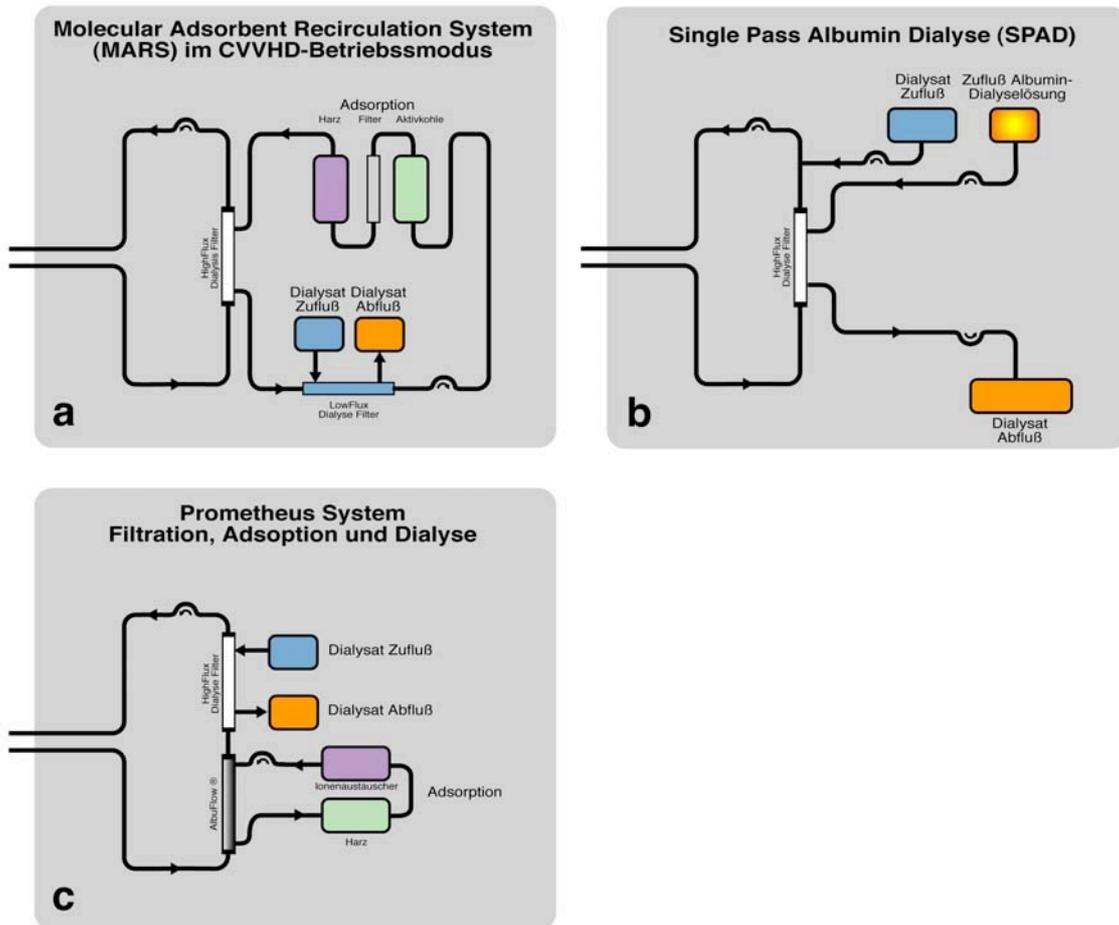


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Detoxifikationssysteme MARS (a), SPAD (b) und Prometheus (c)

MARS, SPAD und das Nierenersatzverfahren CVVHDF wurden hinsichtlich ihrer Detoxifikationsleistungen unter standardisierten und vergleichbaren *in vitro*-Bedingungen evaluiert: Zur Simulation eines Patienten im akuten Leberversagen wurde humanem Plasma Giftstoffe hinzugesetzt, welche eine Rolle in der Pathophysiologie des Leberversagens sowie als relevante klinische Markersubstanzen spielen: Gallensäuren, Bilirubin, Harnstoff, Ammoniumchlorid und Kreatinin. Das toxinbeladene Plasma wurde anschließend jeweils 6,5 Stunden mit MARS, SPAD und konventioneller veno-venösen Hämodiafiltration prozessiert und die Entgiftungsleistungen der Systeme verglichen.³¹

Die Analyse der Eliminationskapazität der unterschiedlichen Systeme für wasserlösliche Toxine zeigte eine signifikante Überlegenheit der SPAD und der CVVHDF gegenüber MARS. Dieser Unterschied ist vermutlich dadurch bedingt, dass beim MARS-Konzept die Dialyse im Sekundärkreislauf stattfindet. Dieser technische Umstand führt dazu, dass nicht das

Patientenblut direkt, sondern die rezirkulierende Albuminlösung von wasserlöslichen Toxinen befreit wird. Bei der diesbezüglich effektiveren SPAD und CVVHDF hingegen findet die Dialyse im Primärkreislauf statt. Dadurch ist eine signifikant bessere Entfernung wasserlöslicher Toxine aus dem Plasmakreislauf möglich. Hinsichtlich der Eliminationsfähigkeit der Systeme für albumingebundene Toxine ergibt sich ein signifikanter Vorteil für das SPAD- und das MARS-Konzept gegenüber dem herkömmlichen CVVHDF-Verfahren. Die Ursache hierfür ist die beim MARS- und SPAD-Konzept der Dialyselösung zugesetzte Akzeptorsubstanz Albumin. Der zeitliche Verlauf der Detoxifikationskapazität für albumingebundene Toxine ist durch Unterschiede zwischen dem SPAD- und dem MARS-Konzept gekennzeichnet: Zu Beginn weisen beide eine vergleichbare Entgiftungskapazität auf. Diese nimmt jedoch beim MARS-Verfahren im Versuchsverlauf stetig ab, während sie bei der SPAD-Methode annähernd gleich bleibt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die im Verlauf des Betriebs zunehmende Sättigung der beim MARS verwendeten Adsorber. Im Vergleich dazu zeigt das SPAD-System unter kontinuierlicher Zugabe freier Adsorbermoleküle eine weitgehend konstant bleibende Detoxifikationsleistung. Die Anwendungsdauer des MARS-Verfahren ist somit durch seine Konzeption limitiert: Durch die aus dem Blut entfernten Substanzen werden die Adsorberkartuschen nach einem gewissen Zeitraum gesättigt. Sie müssten ausgetauscht werden, wollte man die Behandlung auf dem gleichen Leistungsniveau fortführen. Das SPAD-Verfahren kann hingegen ohne Zeitbegrenzung durch die kontinuierliche Zugabe frischer Humanalbuminlösung fortgeführt werden. Mögliche Limitationen bestehen allerdings durch einen abnehmenden Stoffaustausch über die Kapillaren des Dialysefilters durch das Ausbilden so genannter Sekundärmembranen oder durch einfaches Verstopfen des Filters im Rahmen der Blutgerinnung bei Kontakt mit Fremdmaterialien.

Die erste Generation von Detoxifikationssystemen zur Elimination von lipophilen und wasserlöslichen Toxinen nutzt exogenes (MARS, SPAD) oder endogenes (Prometheus) Albumin als Akzeptorsubstanz bzw. Transportmolekül. Trotz aller Optimierungsbemühungen sind bei der Verwendung von Albumin die hohen Kosten, die Komplexität der Verfahren und die geringe Effizienz von Nachteil.

Humanes Albumin ist ein Protein mit einer hohen Bindungskapazität auch für im Leberversagen anfallende Toxine und kann daher als Akzeptorsubstanz bzw. Adsorbent in der Albumindialyse eingesetzt werden. Zur therapeutischen Verwendung wird Albumin in der Regel aus menschlichem Plasma gewonnen, industriell aufgearbeitet und sterilisiert mit Stabilisatoren (z.B. Fettsäuren) versetzt als pharmazeutisches Produkt vertrieben. Für die Anwendung in Entgiftungssystemen sind die Stabilisatoren allerdings nachteilig, da sie die Toxin-Bindungskapazität des Albumins beeinträchtigen. In den letzten Jahren kam es zu

einem deutlichen Rückgang der Zahl an kommerziellen Plasmapheresezentren. So haben die im internationalen Industrieverband organisierten Unternehmen in den letzten Jahren ihr Plasmavolumen von 11,5 Mio. Liter auf 8,1 Mio. Liter gesenkt und außerdem die Fraktionierkapazität um 13% reduziert, was zum Teil durch Stilllegung von Anlagen erfolgte.³² Dies führte zu deutlichen Preissteigerungen (bis zu 135 Euro pro 100ml Humanalbumin 20%) und somit zu einer Erhöhung der Betriebskosten albuminbasierter Systeme. Naheliegenderes Ziel ist es daher, Albumin durch alternative Akzeptorsubstanzen zu ersetzen, um nicht nur den Prozess der Toxinentkopplung zielgerichteter und effektiver gestalten zu können, sondern gleichzeitig ein effizientes Blutreinigungsverfahren entscheidend preisgünstiger zur Verfügung zu stellen.

2.2 Gewinnung primärer humaner Leberzellen

I.M. Sauer, K. Zeilinger, N. Obermayer, G. Pless, A. Pascher, T. Mieder, S. Roth, M. Goetz, D. Kardassis, A. Mas, P. Neuhaus, J.C. Gerlach: Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support – a preliminary report. International Journal of Artificial Organs; 2002, 25(10): 1001-1005

F.W.R. Vondran, E. Katenz, R. Schwartlander, M.H. Morgul, N. Raschzok, X.B.Gong, X.D. Cheng, D. Kehr, I.M. Sauer: Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy – Criteria for identification of the most promising liver specimen. Artificial Organs 2008, 32: 205-213

Die Entwicklung von Methoden der Leberzellisolierung basiert im Wesentlichen auf Erfahrungen im Kleintiermodell (Ratte). Das erste Protokoll für eine erfolgreiche Isolierung intakter Hepatozyten mittels kombinierter mechanisch-enzymatischer Verdauungstechnik wurde in den Sechziger Jahren durch *Howard* et al. beschrieben. Mittels dieser Methode konnten jedoch lediglich 3-5% der ursprünglichen Zellmasse als isolierte vitale Zellen gewonnen werden. Die Methode wurde daher im weiteren zeitlichen Verlauf durch *Berry* und *Friend* modifiziert und durch *Seglen* im Sinne eines zweistufigen Kollagenase-Perfusionsverfahrens optimiert. Diverse Modifikationen dieser Methode wurden in den folgenden Jahren publiziert. Insbesondere die Enzyme waren dabei Gegenstand von Untersuchungen. So erfolgten Leberzellisolierungen mit Kollagenase, Hyaluronidase, Trypsin, Pronase und Dispase. Wesentliche Faktoren für den Erfolg des Isolierungsprozesses sind dabei neben der Wahl geeigneter Enzyme und deren Konzentrationsverhältnisse insbesondere die Einwirkzeit und die Pufferbedingungen. Die Mehrzahl der Protokolle basiert auf Kollagenasepräparationen mit Clostridopeptidase A sowie Proteasen, Polysaccharidasen und Lipasen. Ideale Mischungsverhältnisse mit Proteasen sind von wesentlicher Bedeutung für das Isolierungsergebnis: Die Verwendung von Liberase (hochaufgereinigte Kollagenase mit definierten neutralen Proteasen) führte zu einer hohen Ausbeute viabler Hepatozyten bei Ratte und Schwein. Vorteile der Verwendung von Liberase sind die qualitative Konsistenz von Charge zu Charge, eine reproduzierbare Isolierungsleistung, ein relativ milder enzymatischer Verdau und niedrige Endotoxinspiegel. Insbesondere bakterielle Endotoxine sind relevante Kontaminationen der traditionell verwendeten Kollagenasen und wurden als wesentliche Ursache für eine reduzierte Zellviabilität nach Isolierung identifiziert. Eine weitere Optimierung der Isolierungsprozedur wurde durch die Kontrolle der proteolytischen Aktivität der Enzyme durch Zugabe von Humanalbumin erzielt. Bessere Ergebnisse – insbesondere bei der Isolierung von Zellen aus vollständigen humanen Lebern – konnten durch die Stabilisierung des pH sowie durch eine Oxygenierung der Isolierungslösungen erreicht werden.

Wesentliches Problem ist das limitierte Angebot an geeignetem Spendermaterial für die Zellisolierung primärer humaner Hepatozyten. Entnommenes Lebergewebe nach medizinisch indizierter Leberteilresektion ist eine verhältnismäßig zuverlässige Zellquelle.

Um die Bereitstellung von humanen Leberzellen aus Leberteilresektaten zu optimieren, wurde der Einfluss einer Vielzahl von Spendercharakteristika auf das Ergebnis der Zellisolierung untersucht. Wie aufgrund der pathophysiologischen Zusammenhänge zu vermuten, konnte die höchste Anzahl vitaler Zellen aus Gewebe von Patienten mit gutartigen Lebererkrankungen isoliert werden. Lebergewebe von Spendern mit bösartigen Erkrankungen im Sinne von primären und sekundären Tumoren zeigen eine deutlich reduzierte Zellausbeute. Die Isolierung primärer humaner Leberzellen aus Leberteilresektaten erfolgt in der Regel mittels einer modifizierten, zweiphasigen Kollagenaseperfusion (Abb. 3): In der ersten Phase erfolgt die Perfusion mit calciumfreier Lösung, die mit einem Chelatbildner (beispielsweise EDTA) angereichert ist. Diese Phase dient der Unterbrechung desmosomaler Verbindungen zwischen den Zellen sowie dem Herausspülen von intravasal verbliebenem Blut. Nachfolgend wird die Leber zur Desintegration des Gewebes mit calciumhaltiger Kollagenaselösung perfundiert. Mittels dieser Techniken erreicht man bei der Isolierung von Zellen aus Resektaten, welche bei leberchirurgischen Eingriffen anfallen, eine Zellviabilität von 80-90% und eine Zellausbeute von bis zu $1-2 \times 10^7$ Zellen pro Gramm Lebergewebe.

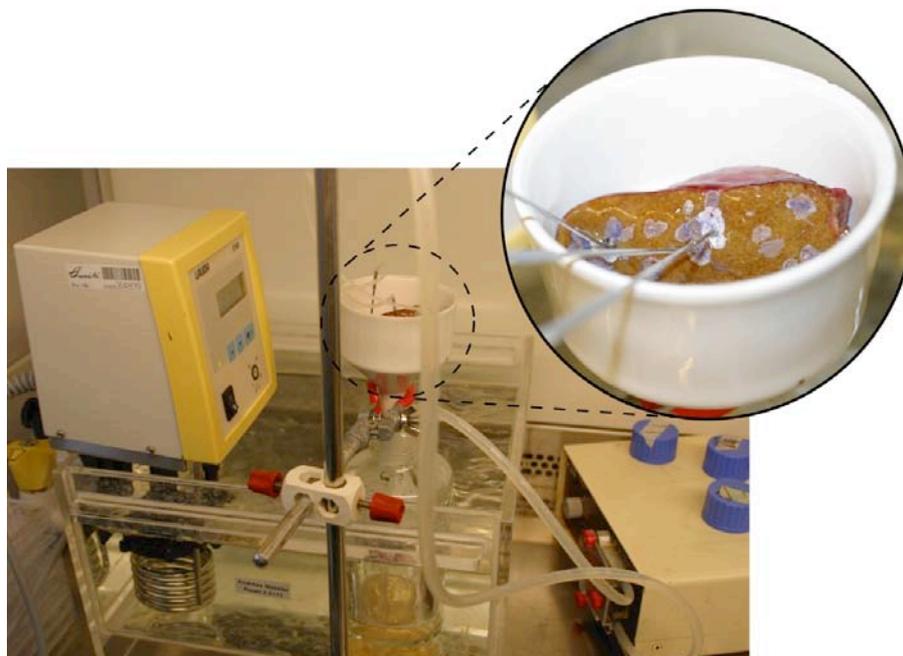


Abbildung 3: Aufbau der Perfusionseinrichtung zur Isolierung primärer humaner Leberzellen aus einem Leberteilresektat.

Auch die erfolgreiche Isolierung von Leberzellen aus vollständigen Organen wurde beschrieben. Zur Verfügung stehen dabei Organe, die für eine Lebertransplantation freigegeben wurden, dann aber aufgrund einer Vorschädigung als nicht transplantierbar beurteilt werden. Gründe für derartige Ablehnungen sind Steatosis hepatis, Zirrhose, Fibrose oder aber – in seltenen Fällen – Verletzungen des Organs. Die Ergebnisse der Zellisolierung

aus diesen Organen sind aufgrund der Vorschädigung schlechter als bei Resektaten oder porcinen Lebern. Insbesondere bei deutlicher Steatosis oder Zirrhose führten die zweistufigen Isolierungsverfahren zu inakzeptablen Ergebnissen.

Zur Isolierung von Zellen aus vollständigen Organen wurde auf Basis des ursprünglichen Zweistufen-Verfahrens ein Fünfstufen-Verfahren unter simultaner Perfusion des portalvenösen und arteriellen Stromgebietes der Leber entwickelt. Im Rahmen der Isolierung von Zellen aus der porcinen Leber konnte eine mittlere Viabilität von 76% und eine mittlere am Ausgangsgewicht der Leber gemessene Zellausbeute von 82% erreicht werden.³³ Bei der Isolierung von Zellen aus vorgeschädigten und daraufhin abgelehnten Spenderorganen ist die durchschnittliche Viabilität der Zellen nach Isolierung dagegen nur 55%.³⁴

Die Mehrzahl der bisher klinisch eingesetzten zellbasierten Leberunterstützungssysteme basiert aus logistischen Gründen auf porcinen Zellen oder aber auf Linien humaner Tumorzellen. Tumorzelllinien bergen das Risiko einer metastatischen Tumoraussaat und sind hinsichtlich hepatozytenspezifischer Stoffwechselprozesse metabolisch weniger aktiv als primäre Zellen. Porcine Zellen dagegen sind durch eine teilweise bestehende metabolische Inkompatibilität und Infektionsrisiken gekennzeichnet. Die Verwendung primärer humaner Leberzellen ist demgegenüber aus physiologischen Gründen ideal. Für die Gewinnung primärer humaner Hepatozyten werden Leberteilresektate sowie Organe herangezogen, die für eine Organtransplantation freigegeben wurden, jedoch aufgrund von Organveränderungen (z.B. Verfettung, Zirrhose, Verletzung) nicht transplantiert werden können. Bei Verwendung von abgelehnten Spenderorganen als Zellquelle für klinisch einsetzbare Systeme stellen sich zwei Probleme: Die Verfügbarkeit eines abgelehnten Spenderorgans ist nicht planbar und eine ideale Deckung des Bedarfs an therapeutisch einsetzbaren Bioreaktoren ist daher nicht möglich. Zusätzlich weist jedes genutzte Organ eine individuelle Art und Intensität der Schädigung auf. Dementsprechend ist auch ein zellgefüllter Bioreaktor individuell zu charakterisieren, um die leistungsfähigen und somit klinisch am Patienten einsetzbaren Bioreaktoren zu identifizieren.

2.3 Erweiterung des *CellModule* Bioreaktorsystem zum *Modular Extracorporeal Liver Support* (MELS) Konzept sowie dessen klinische Evaluierung

I.M. Sauer, D. Kardassis, K. Zeillinger, A. Pascher, A. Gruenwald, G. Pless, M. Irgang, M. Kraemer, G. Puhl, J. Frank, A.R. Müller, Th. Steinmüller, J. Denner, P. Neuhaus, J. C. Gerlach: Clinical extracorporeal hybrid liver support – phase I study with primary porcine liver cells. Xenotransplantation; 2003, 10: 460-469

I.M. Sauer, J.C. Gerlach: Modular Extracorporeal Liver Support (MELS). Artificial Organs; 2002; 26(8): 703-706

I.M. Sauer, K. Zeillinger, G. Pless, D. Kardassis, T. Theruvath, A. Pascher, M. Goetz, P. Neuhaus, J. C. Gerlach: Extracorporeal Liver Support based on Primary Human Liver Cells and Albumin Dialysis – Treatment of a Patient with Primary Graft Non-Function. Journal of Hepatology; 2003, 39 (4): 649 – 653

Der von Gerlach et al. entwickelte *CellModule* Bioreaktor (zunächst als *Berlin Extracorporeal Liver Support*, BELS bezeichnet) basiert auf drei in einander verwobenen und in ein Polyurethangehäuse eingegossenen Kapillarbündeln. Die drei Kapillarbündel können unabhängig voneinander perfundiert werden und dienen unterschiedlichen Zwecken: Aus Polyethersulfon bestehende Hohlfasermembranen dienen der Perfusion mit Nährmedium oder – während der Therapie – mit Plasma des behandelten Patienten. Hydrophobe Kapillaren dienen der dezentralen Oxygenierung. Die drei Membranbündel sind im Innenraum des Polyurethangehäuses so miteinander verwoben, so dass ein regelmäßiges Muster von identischen Versorgungsstrukturen (Medium- und Oxygenierungskapillaren) entstehen kann. Das Zellkompartiment, also der Raum zwischen den Hohlfaserkapillaren, kann mit bis zu 600g Leberzellen gefüllt werden. In der initialen Phase wurde das System mit porcinen Zellen bestückt. Aufgrund unzureichender Kompatibilität bezüglich metabolischer und regulatorischer Prozesse sowie dem grundsätzlichen Risiko der Übertragung von Xenozoonosen bei Verwendung porciner Zellen wurden im weiteren Verlauf primäre humane Leberzellen eingesetzt.

In einer klinischen Phase I Studie bezüglich des *CellModule* Bioreaktors wurden 8 Patienten im akuten Leberversagen nach Meldung zur Lebertransplantation mit höchster Dringlichkeit für einen Zeitraum von 8-46 Stunden mit porcinen Zellen behandelt. Ziel dieser ersten klinischen Studie war insbesondere der Nachweis der Sicherheit des Systems und der Biokompatibilität. Dabei wurde Plasma kontinuierlich vom Vollblut des Patienten separiert, das Bioreaktorsystem mit einem Fluss von 200-250ml/min perfundiert und schließlich dem Patienten zurückgegeben. Alle acht Patienten konnten erfolgreich überbrückend bis zur Transplantation behandelt werden. Während der Therapie wurden keine gravierenden unerwünschten Wirkungen beobachtet worden – das System erwies sich also als biokompatibel. Das Fünf-Jahres-Überleben der Patienten ist 100%. Bei keinem der Patienten konnte eine Infektion mit porcinen endogenen Retroviren (PERV) nachgewiesen werden.^{35,36}

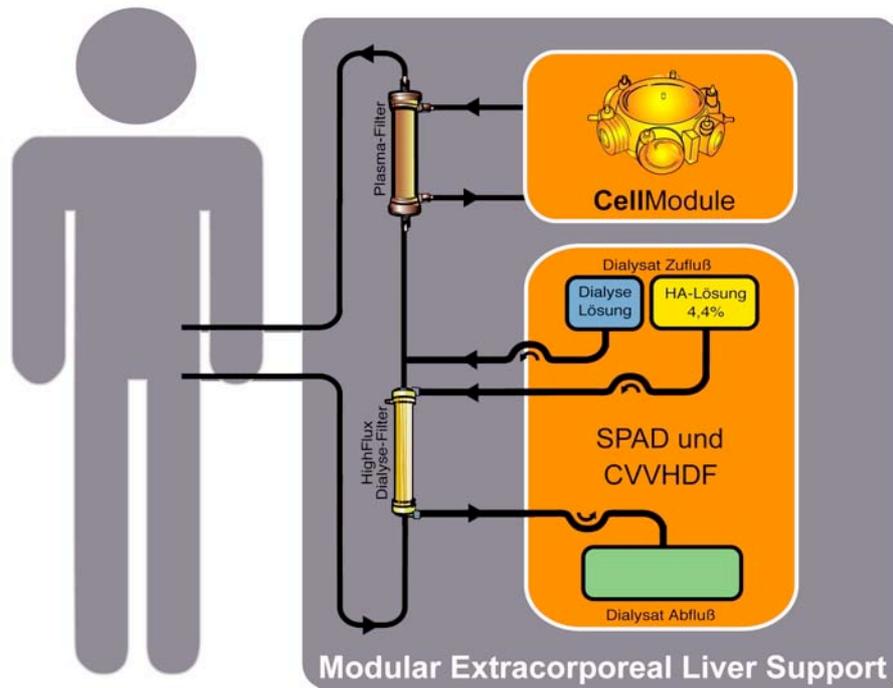


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Modular Extracorporeal Liver Support (MELS) Konzepts

Basierend auf Untersuchungen zur *Single Pass Albumindialyse* (SPAD) wurde der Bioreaktor im weiteren Verlauf durch dieses artifizielle Detoxifikationsverfahren ergänzt und zum *Modular Extracorporeal Liver Support* (MELS) System erweitert.³⁷ Bei diesem Konzept wird das Blut des Patienten zwecks Entzugs albumingebundener, nicht wasserlöslicher Toxine via SPAD zunächst durch eine Highflux-Dialysekartusche geleitet. Eine kontinuierliche veno-venöse Hämodiafiltration (CVVHDF) über dieselben Hohlfaserkapillaren ermöglicht neben der Entfernung wasserlöslicher Toxine auch die Volumenreduktion im Sinne der Nierenersatztherapie. Nach Passage des Dialysefilters wird in einem weiteren Filter das Plasma des Patienten von den korpuskulären Anteilen des Blutes getrennt und mit 200-250 ml/min durch die Hohlfaserkapillaren des nunmehr mit humanen Leberzellen gefüllten *CellModule* Bioreaktors geleitet (Abb. 4). Die artifizielle Komponente dient der einfachen und effizienten Entfernung von albumingebundenen und wasserlöslichen Toxinen und reduziert damit auch die Toxinbelastung der Zellen im Bioreaktor. Von einem Teil der Entgiftungslast befreit, können die Leberzellen im Idealfall komplexere regulatorische und synthetische Prozessen übernehmen. Die humanen Leberzellen wurden aus Organen gewonnen, die für eine Lebertransplantation freigegeben wurden, dann aber aufgrund histopathologischer Veränderungen (z.B. Steatosis hepatis, Fibrose, Zirrhose) nicht für eine Transplantation in Betracht kamen.³⁸

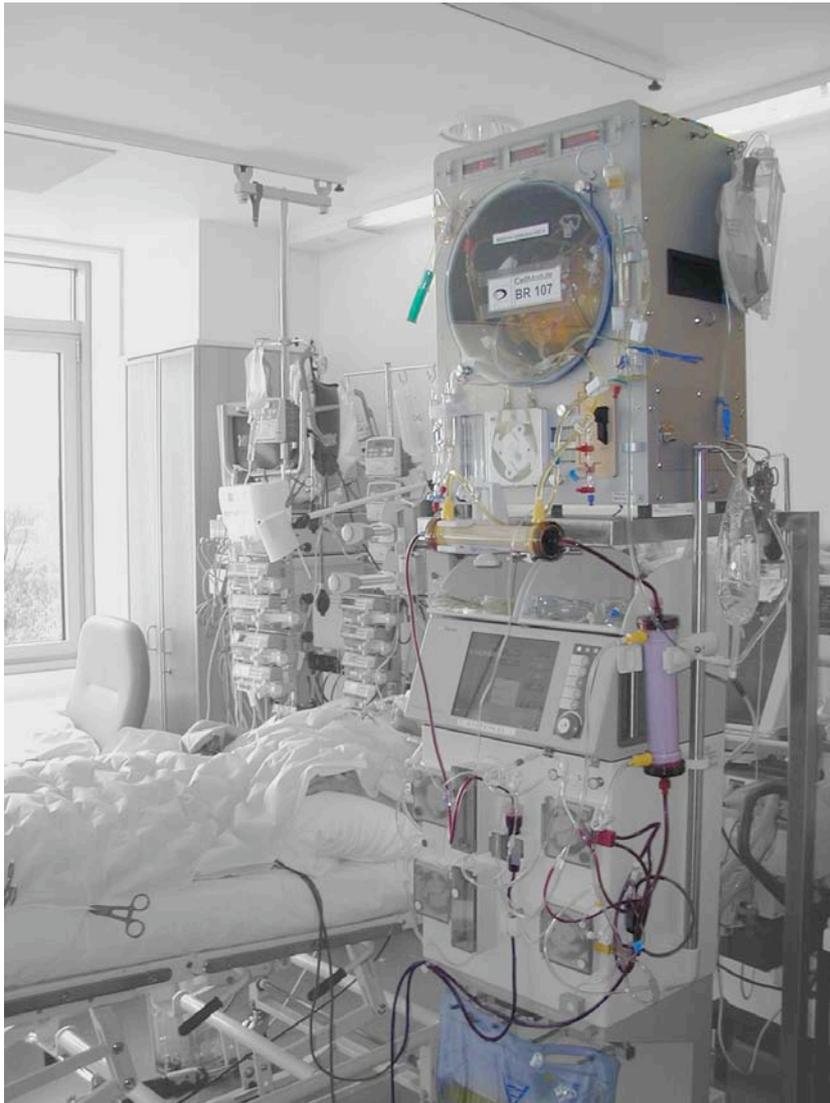


Abbildung 5: Intensivmedizinischer Einsatz des *Modular Extracorporeal Liver Support System* (MELS). Die blut- und plasmaführenden Leitungen, der Bioreaktor sowie Plasma- und Highflux-dialysefilter sind farbig hervorgehoben.

In einer Phase I Studie bezüglich des MELS Konzeptes unter Verwendung primärer humaner Leberzellen wurden bisher 12 Patienten mit akutem Leberversagen ($n = 3$), primärer Nichtfunktion ($n = 3$) und akuter Exazerbation eines chronischen Leberschadens ($n = 6$) für einen Zeitraum von 10-207 Stunden behandelt (Abb. 5). Alle Patienten mit ALV und PNF wurden erfolgreich bis zur Transplantation überbrückend therapiert. Drei der Patienten mit akuter Exazerbation des chronischen Leberversagens verstarben bei Kontraindikationen zur Lebertransplantation in den ersten drei Monaten nach Therapie. Insgesamt konnte während der Behandlung eine kontinuierliche Verbesserung der Neurologie, der Nierenfunktion sowie der pathologisch veränderten biochemischen Parameter beobachtet werden. Auch der um SPAD erweiterte extrakorporale Kreislauf des MELS-Konzepts erwies sich dabei als biokompatibel und sicher in der Anwendung bei dieser schwerstkranken Patientenpopulation.³⁹ Im Rahmen der extrakorporalen Therapie kam es allerdings zu einem Abfall der Thrombozytenzahl (Abb. 6). Dieser Effekt ist der Perfusion des Plasmafilters sowie der

Highflux-Dialysekartusche zuzuschreiben und stellt eine unerwünschte Wirkung extrakorporaler Blutreinigungsverfahren im Allgemeinen dar.

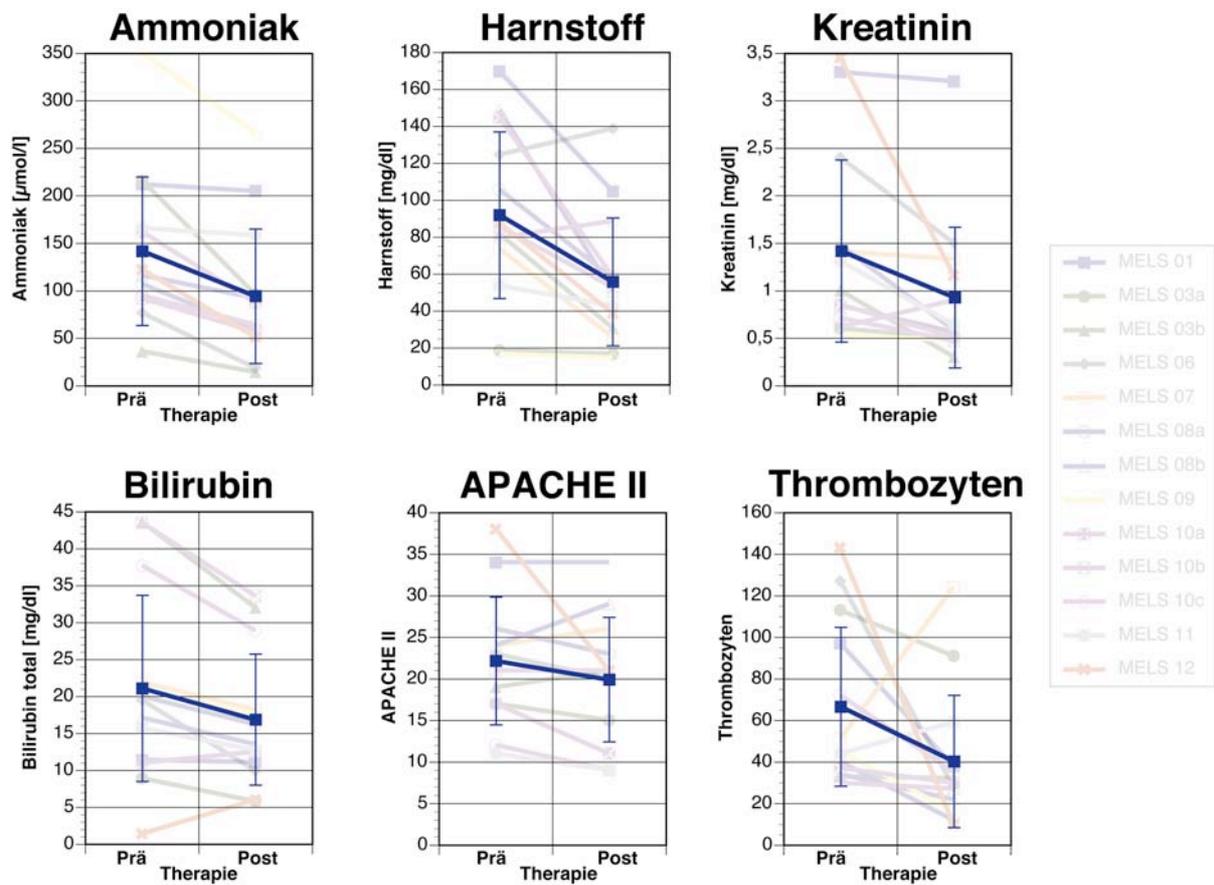


Abbildung 6: Auswahl laborchemischer Parameter sowie des APACHE II Scores vor und nach Therapie mit MELS (Mittelwerte und Standardabweichung).

2.4 Etablierung eines *in vitro* Modells für die Optimierung zellbasierter Leberunterstützungsverfahren – der *SlideReactor*

R. Schwartlander, J. Schmid, B. Brandenburg, E. Katenz, F.W.R. Vondran, G. Pless, X. Cheng, A. Pascher, P. Neuhaus, I.M. Sauer: *Continuously microscopically observed and process controlled cell culture within the SlideReactor – proof of a new concept for cell characterization. Tissue Engineering 2007, 13: 187-196*

Für die erfolgreiche Kultur primärer humaner Zellen sind spezielle Umgebungsbedingungen wesentliche Voraussetzungen. So haben sich dreidimensionale Hohlfasersysteme für die Kultur von humanen Hepatozyten *in vitro* den herkömmlichen Schalenkulturen überlegen gezeigt. Im *SlideReactor* durchziehen Hohlfaserkapillaren ein von Mediumzu- und -ablauf getrenntes Zellkompartiment, in welchem die Zellen adhärent kultiviert werden. Anders als bei bisher verwendeten Hohlfaserbioreaktoren ermöglicht der Aufbau dieses Systems die (videozeitraffer-) mikroskopische Beurteilung der Zellen während der gesamten Kulturperiode unter kontrollierten Studienbedingungen. Eine programmierbare rückgekoppelte Steuerung ermöglicht die Aufrechterhaltung gewünschter Kulturbedingungen z.B. von Temperatur, Gaszusammensetzung oder pH-Wert. Ein derartig automatisiertes Zellkultursystem ist essentiell bei der Entwicklung neuer Techniken der Regenerativen Medizin. Potentielle Anwendungsgebiete sind pharmakologische Studien, die Modifikation von Zellen (z.B. die Markierung von Zellen mit Nanopartikeln zur Detektion nach Zelltransplantation) sowie die Entwicklung von Kulturmedien (beispielsweise zur hypothermen, hypometabolen Langzeitkultur primärer humaner Leberzellen).

Herkömmliche Kultivierungsverfahren für Leberzellen, wie zum Beispiel die häufig eingesetzte Monolayerkultur, setzen Zellen einer Umgebung aus, die nicht ihrer natürlichen Situation *in vivo* gleicht. Elektronenmikroskopische sowie histologische Untersuchungen von in Monolayerkultur gehaltenen Leberzellen zeigen deutliche Abweichungen in der intrazellulären Struktur der Hepatozyten. Durch höhere Zelldichten⁴⁰ sowie der Möglichkeit einer freien dreidimensionalen Reorganisation der Zellen konnte ein Mikrohabitat geschaffen werden, das mehr der physiologischen Umwelt der Leberzellen *in vivo* gleicht. Der Zell/Zell-Kontakt innerhalb der Aggregate ermöglicht sowohl die Reorganisation wichtiger funktioneller Komplexe als auch die Orientierung des Zytoskeletts und der Zellorganellen *in vitro*. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Formation von lebergewebsähnlichen Strukturen die zelluläre Orientierung und die metabolische Funktionalität der Zellen fördert.⁴¹

Um eine für den klinischen Einsatz angemessene Menge an Zellen in Kultur zu halten, ist die Verwendung von Hohlfaserkapillaren in modifizierten Dialyse- und Plasma-Separations-Kartuschen oder komplexeren Bioreaktorsystemen erfolgreich etabliert worden. Die Hohlfaserkapillaren ermöglichen zusätzlich zur Zellimmobilisierung einen geeigneten Gasaustausch, die Substratversorgung der Zellen mittels einer permeablen Kontaktfläche,

sowie die Abfuhr von metabolischen Abfallprodukten.⁴² Die Leberzellen werden in den extrakapillären Raum inokuliert und kultiviert. Durch die Verwendung von Hohlfaserkapillaren wird die Struktur der natürlichen Leber imitiert, in welcher die Hepatozyten in engem Kontakt mit den intrahepatischen Blutgefäßen stehen. Da es bei diesen Systemen nicht möglich ist, zeitgleich die Zellen zu kultivieren und deren Reorganisations- und Wachstumsverhalten zwischen den Kapillaren zu analysieren, ist nur wenig über die histologische und morphologische Entwicklung der Zellen in Bioreaktoren bekannt.⁴³ Proben für histologische Untersuchungen zu entnehmen, würde die Integrität der Systeme zerstören und mit hoher Wahrscheinlichkeit die Hohlfasern verletzen. Demnach sind histologische Untersuchungen erst nach der Termination der Kultur möglich. Um die Beobachtung der Reorganisation des Gewebes zwischen den Hohlfasern über die gesamte Kulturperiode zu ermöglichen, muss ein Bioreaktor konstruiert werden, der auf Hohlfasern basiert, aber dennoch für die mikroskopische Analyse geeignet ist. *Gloeckner* et al. entwarfen einen miniaturisierten Bioreaktor, der Hohlfasern für die Perfusion mit Medium und Membranen für die Oxygenierung enthält.⁴⁴ Auch dieses System lässt durch die Anordnung der Kapillaren sowie der hohen Schichtdicke nur eine sehr beschränkte Beobachtung der Zellen zu.

Das *SlideReactor*-Konzept beruht ebenso wie das Bioreaktorsystem des MELS auf Hohlfaserkapillaren.⁴⁵ Die Kapillaren durchziehen das Zellkompartiment, in welchem die Zellen adhärent kultiviert werden. Anders als bei den bisher verwendeten Hohlfaserbioreaktoren ermöglicht der Aufbau dieses Systems die mikroskopische Beurteilung der Zellen sowie das Erstellen von Zeitraffervideos, die der Charakterisierung der Kulturen unter Studienbedingungen dienen. Grundlegender Unterschied des *SlideReactors* zu anderen Bioreaktoren ist die Art der Oxygenierung: In größeren Systemen werden die Zellen häufig dezentral im Zellkompartiment über spezielle hydrophobe Hohlfaserkapillaren mit Sauerstoff versorgt. Die Oxygenierung der Zellen im *SlideReactor* erfolgt indirekt über eine Oxygenierung des in den Hohlfaserkapillaren zirkulierenden Nährmediums.

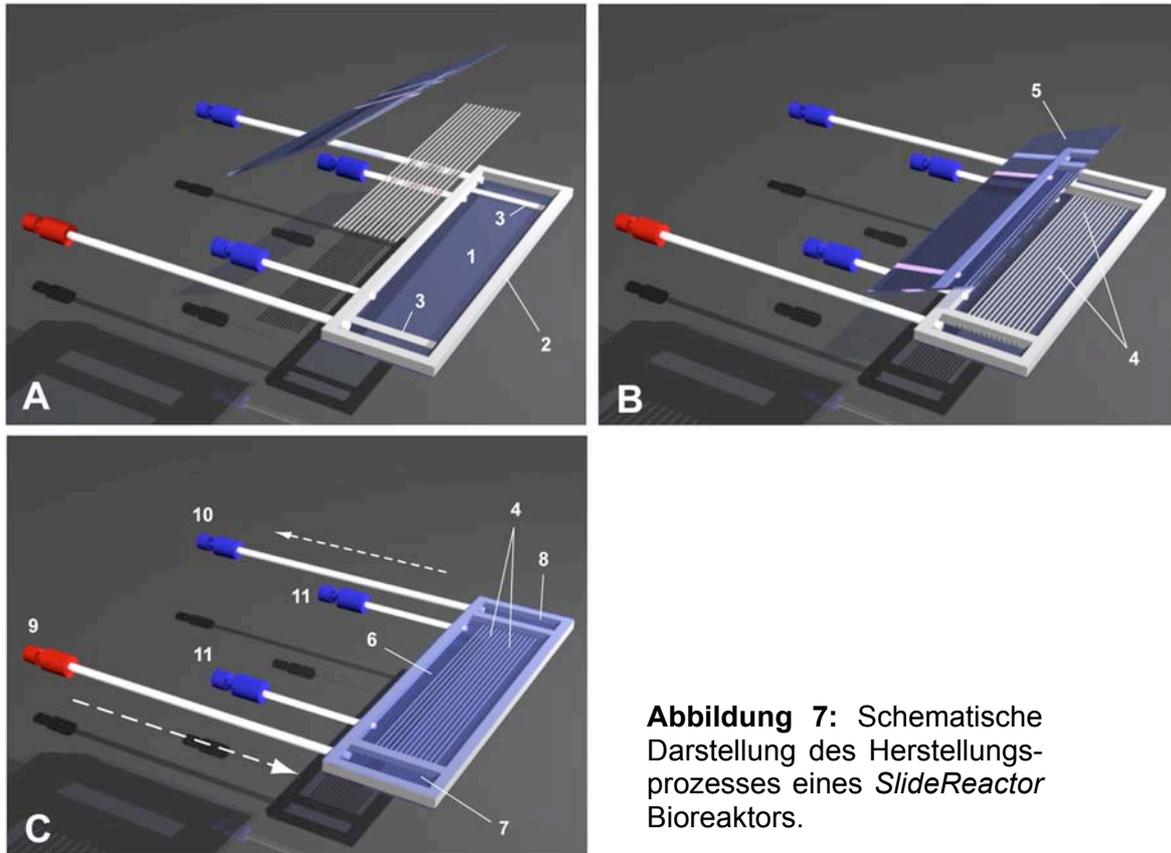


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses eines *SlideReactor* Bioreaktors.

Im Rahmen der Herstellung eines *SlideReactors* wird die aus Polystyren bestehende Bodenplatte (Abb. 7, 1) mit Silikon (2) umrandet. Die der Perfusion dienenden zu- und abführenden Silikonschläuche (9, 10) sowie die Zugangsschläuche zum Zellkompartiment (11) werden eingesetzt. Das Zellkompartiment (6) wird durch zwei zusätzliche Barrieren aus Silikon (3) von den Medienkompartiments (7,8) getrennt. Die Hohlfaserkapillaren (4) werden in diese Wände eingelassen. Die aus Kalknatronglas bestehende Deckplatte (5) wird aufgesetzt und schließt das System ab. Das System wird durch die längeren Schläuche (9, 10) perfundiert, die kurzen Schläuche (11) ermöglichen den direkten Zugang zum Zellkompartiment: das Gewebe kann über diese Zugänge bestimmten Substanzen ausgesetzt, fixiert und gefärbt werden.

Um wichtige Kenngrößen wie den Sauerstoffpartialdruck, den pH-Wert und die Temperatur kontinuierlich beobachten zu können, wurde eigens für diesen Aufbau ein Mediumreservoir entworfen, das zugleich das Einbringen von zwei Sonden, den Zu- und Ablauf von Medium und den erforderlichen Druckausgleich ermöglicht. Alle Öffnungen besitzen Normgewinde, wodurch alle handelsüblichen Deckel und Dichtungen verwendet werden können. Die von den Sonden gemessenen Werte werden in einen Analog-Digitalwandler (Sensor Module pH/pO₂, DasGip, Jülich, Germany) eingespeist. Mit dem *SlideObserver* (Abb. 8) wurde ein definiert perfundier- und begasbares, auf Hohlfaserkapillaren beruhendes Bioreaktorsystem

verwirklicht, welches neben einer (zeitraffer-video-)mikroskopischen Beurteilung der inokulierten Zellen eine programmierbare, automatisierte und rückgekoppelte Steuerung relevanter Prozessparameter während der Kulturphase ermöglicht.

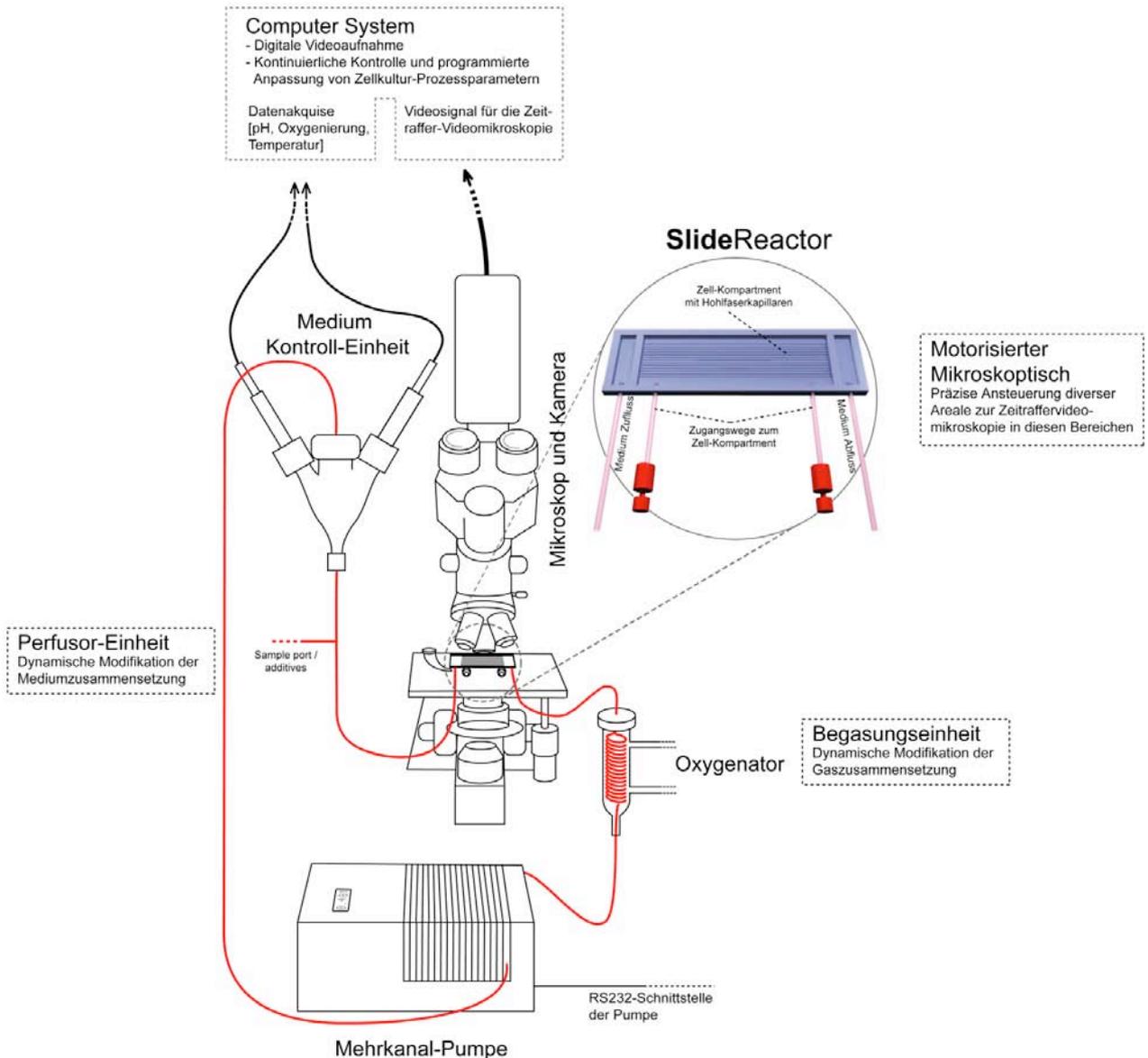


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Betriebskonzepts *SlideObserver* für *SlideReactor*-Bioreaktoren.

Zur Evaluation des Systems wurden Tests mit diversen primären humanen Zelltypen sowie Tumorzelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden sowohl während der Kultur (morphologisch) als auch nach Beendigung der Kultur (immunhistologisch) analysiert und mit Monolayer-Kontrollkulturen verglichen.⁴⁶ Kulturen von Tumorzelllinien sind durch ihre hohe Proliferationsaktivität optimal um die Möglichkeit zeitraffer-videomikroskopischer Aufnahmen im *SlideReactor* zu demonstrieren (Abb. 9). Für die Aufnahmen wurde eine digitale

Videokamera an das Mikroskop angeschlossen. Durch eine geeignete Software kann das aufgenommene Video in digitaler Form gespeichert werden.

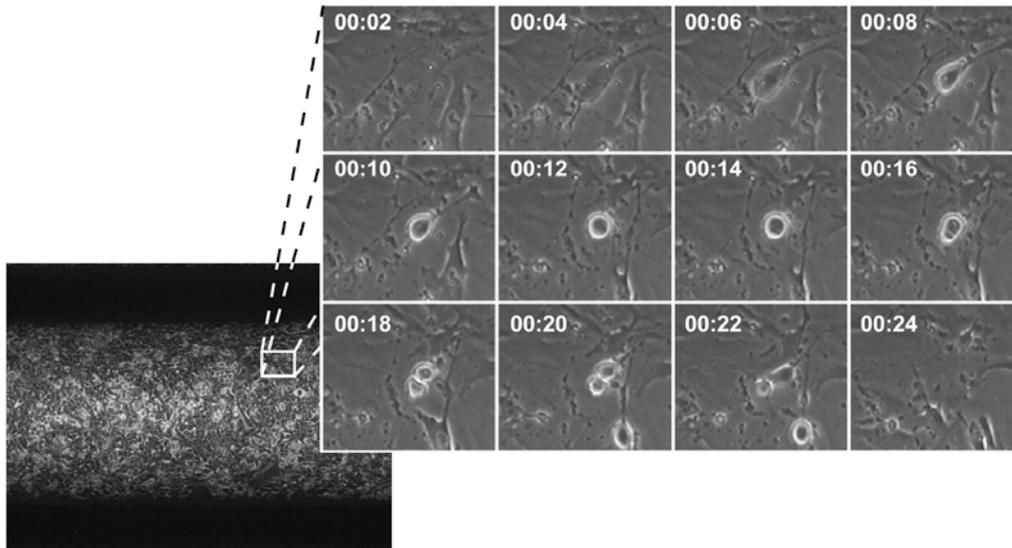


Abbildung 9: Zeitrafferaufnahmen von SkHep1-Zellen im *SlideReactor*. Darstellung einer Zellteilung

2.5 Optimierung der Kryokonservierung primärer humaner Hepatozyten

E. Katenz, F.W.R. Vondran, R. Schwartlander, G. Pless, X.B. Gong, X.D. Cheng, P. Neuhaus, I.M. Sauer: Cryopreservation of primary human hepatocytes – the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. Liver Transplantation 2007, 13: 38-45

Die aus metabolischer Sicht idealen primären humanen Leberzellen sind nach Gewinnung nur unzureichend konservierbar. Die Lagerung in der Kälte, meist bei Temperaturen knapp über dem Gefrierpunkt, ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Vorratshaltung von Zellen und Geweben für wissenschaftliche und vor allem für klinische Zwecke. Obwohl die Kälte hierbei in vielen Fällen zur Hemmung des Stoffwechsels und zur Verlangsamung schädigender Prozesse unabdingbar ist, hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass Kälte selbst eine erhebliche Zellschädigung hervorrufen kann.^{47, 48} Initiale Versuche mit Kulturen primärer humaner Leberzellen in Hohlfaser-Bioreaktoren unter hypothermen Bedingungen zeigten eine hochgradige Schädigung der Zellen sowie der Integrität des Gewebes, welche mit einer deutlichen, irreversiblen Verminderung der metabolischen Aktivität einhergingen.⁴⁹

Eine langfristige Lagerbarkeit biologischen Materials von mehreren Monaten bis Jahren kann nur durch Einfrieren erreicht werden. Allerdings ist dabei bei einigen Zelltypen wie beispielsweise Hepatozyten und vor allem in komplexen Systemen (dreidimensionale Bioreaktorstrukturen, Gewebe) die Überlebensrate der Zellen nach dem Auftauen erheblich vermindert. Ein großes Problem bei Hepatozyten stellt zudem eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit der nach dem Auftauen überlebenden Zellen dar. Die schwere Schädigung der Zellen beim Einfrieren wird primär auf die Folgen intrazellulärer Eiskristallbildung sowie auf ein osmotisches Ungleichgewicht bei Zugabe/Entfernung von Kryoprotektiva bzw. bei (langsamer) extrazellulärer Eiskristallbildung zurückgeführt.

Obschon in den letzten Jahren signifikante Fortschritte in der Entwicklung geeigneter Kryokonservierungs-Protokolle erzielt wurden, bestehen weiterhin Einschränkungen hinsichtlich der Zellfunktion nach dem Wiederauftauen. Die meisten Kryokonservierungsprotokolle basieren auf der Kombination von Dimethylsulfoxid (DMSO) in unterschiedlichen Konzentrationen (5-20%) mit fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) in einer Konzentration bis zu 90%.⁵⁰ DMSO dient dabei der Protektion der Zellen vor einer exzessiven Dehydratation sowie der Ausbildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses.⁵¹ FCS hat einen protektiven Einfluss auf die Auswirkungen freier Sauerstoffradikale.⁵²

Diversen Sacchariden wurde auf Basis der Stabilisierung der Zellmembran sowie von Proteinen während des Einfriervorgangs eine zusätzliche protektive Funktion attestiert.⁵³ So können verschiedene Organismen ein Austrocknen bis zu einem Verlust von mehr als 99% ihres Körperwassers überleben.⁵⁴ Zu diesen Organismen gehören neben weiteren Pilzen und Bakterien die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sowie die Nematode *Aphelenchus*.

Diese Spezies synthetisieren in bestimmten Stresssituationen das Disaccherid Trehalose. Insbesondere bezüglich der Bäckerhefe zeigten verschiedene Studien, dass die Zugabe von Trehalose zum Kryokonservierungsmedium positiv mit den Überlebensraten der Zellen nach Kryokonservierung bzw. nach Dehydation korreliert.^{55,56} Hinsichtlich der Optimierung des Kryokonservierungsverfahrens humaner Leberzellen wurde der Einfluss des Disaccharids Trehalose untersucht. Zellen wurden in Kulturmedium mit 10% DMSO und 10% FCS sowie Trehalose in unterschiedlicher Konzentration kryokonserviert. Als Kontrollgruppe dienten Zellpräparationen mit Kulturmedium, 10% DMSO und 10% FCS ohne Trehalose. Die Zellen wurden nach dem Auftauen hinsichtlich der Viabilität, der „*plating efficiency*“ sowie metabolischer Parameter analysiert.

In der Gruppe mit 0,2M Trehalose zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der Viabilität ($62,9 \pm 13$ vs. $46,9 \pm 11$ %, $p < 0,01$) sowie der „*plating efficiency*“ nach dem Auftauen, also dem Anteil der Zellen, der nach der Zellaussaat tatsächlich angewachsen ist ($41,5 \pm 18$ vs. $17,6 \pm 13$ %, $p < 0,01$). Zudem führte die Zugabe der Trehalose während des Kryokonservierens zu einem signifikant höheren Gesamtproteinniveau, einer höheren Albuminsynthese und einer geringeren Freisetzung von Transaminasen als Indikator für eine geringere Schädigung der zellulären Integrität der Hepatozyten.

2.6 Markierung primärer humaner Hepatozyten zur nicht-invasiven Detektion mittels MRT nach Transplantation

M.H. Morgul, N. Raschzok, R. Schwartlander, F.W.R. Vondran, R. Michel, L. Stelter, J. Pinkernelle, A. Jordan, U. Teichgraber, I.M. Sauer: Tracking of primary human hepatocytes with clinical MRI – initial results with TAT-peptide modified superparamagnetic iron oxide particles. International Journal of Artificial Organs 2008, 31: 252-257

Wenig ist bislang über das Schicksal transplantierte Zellen nach deren intravasalen Applikation bekannt. Klinische Methoden zum Nachweis transplantierte Zellen basieren auf histologischen Untersuchungen oder dem Einsatz von radioisotopmarkierten Zellen. Diese Verfahren erlauben lediglich einmalige oder zeitlich sehr begrenzte Untersuchungen und sind in ihrer Aussagekraft hinsichtlich der dynamischen Prozesse während einer Zelltransplantation limitiert. Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellt eine sichere, nicht-invasive Untersuchungsmethode dar. Moderne Geräte ermöglichen – eine geeignete Markierung vorausgesetzt – die Detektion kleiner Zellverbände sowie vereinzelter Zellen. Ziel war daher die Etablierung eines Verfahrens zur Markierung primärer humaner Hepatozyten mit Eisenoxidpartikeln sowie der anschließende Nachweis ihrer Detektierbarkeit mittels handelsüblicher, klinisch eingesetzter Magnetresonanztomographie. Die Möglichkeit der Zellverfolgung mittels MRT stellt ein wertvolles Werkzeug für die Grundlagenforschung im Bereich der zellbasierten Regenerativen Medizin dar und dient – im Falle des klinischen Routineeinsatzes – der individuellen Qualitätskontrolle.

Primäre humane Leberzellen wurden aus im Rahmen von Leberteilresektionen gewonnenem Gewebe isoliert. Im Anschluss daran erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung der Leberzellsuspension. Die Viabilität betrug $75,72 \pm 1,42\%$ (*standard error of mean*, SEM). Die Kultur der Zellen erfolgte in einem supplementierten Williams' E Medium. Zur magnetresonanztomographischen Untersuchung *in vitro* wurden die Zellen mit einer 0,25/0,02% Trypsin/EDTA-Lösung resuspendiert und anschließend in 1% Agarose-Gel eingebettet. Die Visualisierung der Zellen erfolgte mittels eines klinisch eingesetzten MRT bei einer Feldstärke von 3,0T (Signa 3T94, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) unter einer T2*-Wichtung (*2D gradient-echo pulse sequence, repetition time (TR): 100 ms, echo time (TE), flip angle: 20°*).

Für die Zellmarkierung wurden Partikel unterschiedlicher Größe evaluiert. Initial (n=6) erfolgte die Markierung mit nanoskaligen Aminosilan-ummantelten superparamagnetischen Partikeln (MagForce Applications GmbH, Berlin, Germany). Diese Partikel wiesen einen mittleren Durchmesser von 100nm auf und waren mit Tat-Peptiden (Biosynton Gesellschaft für Bioorganische Synthese mbH, Berlin, Germany) und FITC-Gruppen konjugiert. Immunfluoreszenzmikroskopisch zeigte sich eine zufriedenstellende intrazelluläre

Partikelaufnahme ohne Veränderung der Zellmorphologie. Die Markierung erlaubte beim Auflösungsvermögen des 3 Tesla-MRT jedoch keine Darstellung einzelner Zellen.

Zur effizienteren Markierung wurden daher sogenannte *Micron-sized polymer encapsulated iron oxide particles* (MPIO, Bangs Laboratories, IN, USA) verwendet. Bei diesen superparamagnetischen Partikeln handelt es sich um durch Polystyren/Divinyl ummantelte Microsphären mit einem Durchmesser von durchschnittlich 1,6 μm und einem Eisengehalt von ca. 1,1pg/Partikel. Die Partikel sind zudem mit Dragon Green fluoreszenzmarkiert. Aufgrund des größeren Eisenkerns zeigen die Partikel eine höhere Relaxivität als nanoskalige Eisenoxid-Partikel.⁵⁷

Die hohe Stabilität und Biokompatibilität des Polymermantels soll den Abbau durch intrazelluläre Lysosomen verhindern und damit eisenvermittelten oxidativen Stress verhindern.⁵⁸ Initiale Dosisfindungsstudien zur Markierung primärer humaner Hepatozyten zeigten, dass nach einer 18-stündigen adhären Phase eine vierstündige Inkubation mit 30×10^6 Partikeln pro 10^6 Zellen zu einer Aufnahme von $18 (\pm 1)$ Partikel/Zelle und einer Markierungseffizienz (*labelling efficiency*: Anzahl der erfolgreich markierten Zellen multipliziert mit 100, dividiert durch die Gesamtzahl der Zellen) von 97,34% ($\pm 0,7$) führte. MRT-Studien mit in Agarose eingebetteten Zellen zeigten die Detektierbarkeit einzelner markierter Zellen mittels klinischem MRT. Die Signale grenzen sich eindeutig von nicht markierten Zellen (keine MPIO) oder freien Partikeln in Agarose (keine Zellen) ab (Abb. 10).

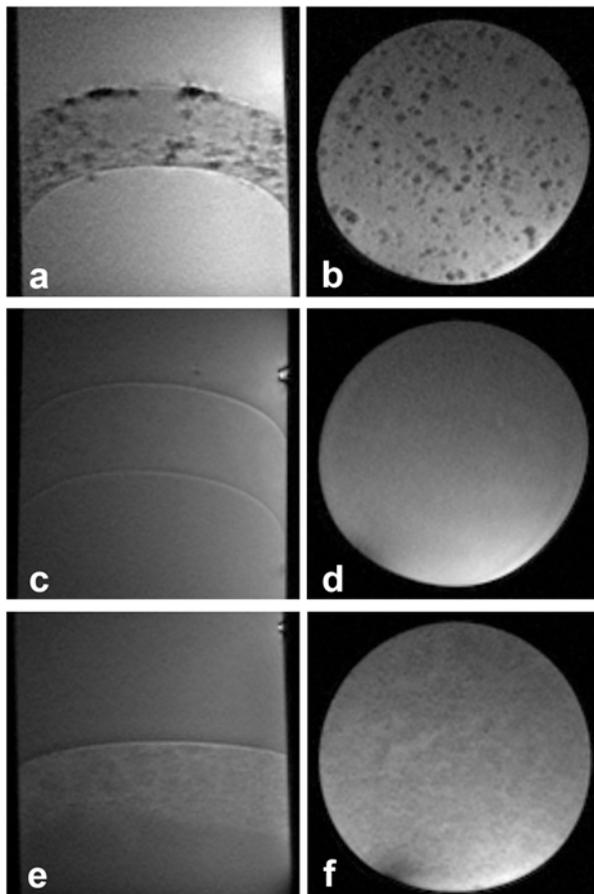


Abbildung 10: MRT-Untersuchungen der in Agarose eingebetteten Zellen bzw. Partikel in axialer und sagittaler Darstellung: 1000 Zellen mit 18 MPIO pro Zelle in 250 μl (a, b), dieselbe Anzahl an Zellen ohne Markierung (c, d), sowie eine entsprechende Anzahl an MPIO ohne Zellen (e, f).

Die intrazelluläre Lokalisation der Partikel konnte mittels Lichtmikroskopie, Immunfluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Abb. 11). Mögliche Einflussnahme des Markierungsprozesses auf Metabolismus und Integrität der Zellen wurden im Rahmen von fünftägigen Rekultur-Serien untersucht. Um eine Bereitstellung der in Adhäsion markierten Zellen für Transplantation zu untersuchen, wurden Gruppen von markierten und nicht-markierten Zellen enzymatisch resuspendiert. Unter Einwirkung von Trypsin konnten 52,17% (\pm 3,79) der nicht-markierten und 55,11% (\pm 6,5) der mit MPIO markierten Zellen erfolgreich resuspendiert werden. Die mittlere Viabilität der Zellen betrug 68,93% (\pm 3,24) für die nicht markierten und 72,53% (\pm 3-54) für die MPIO-markierten Zellen.

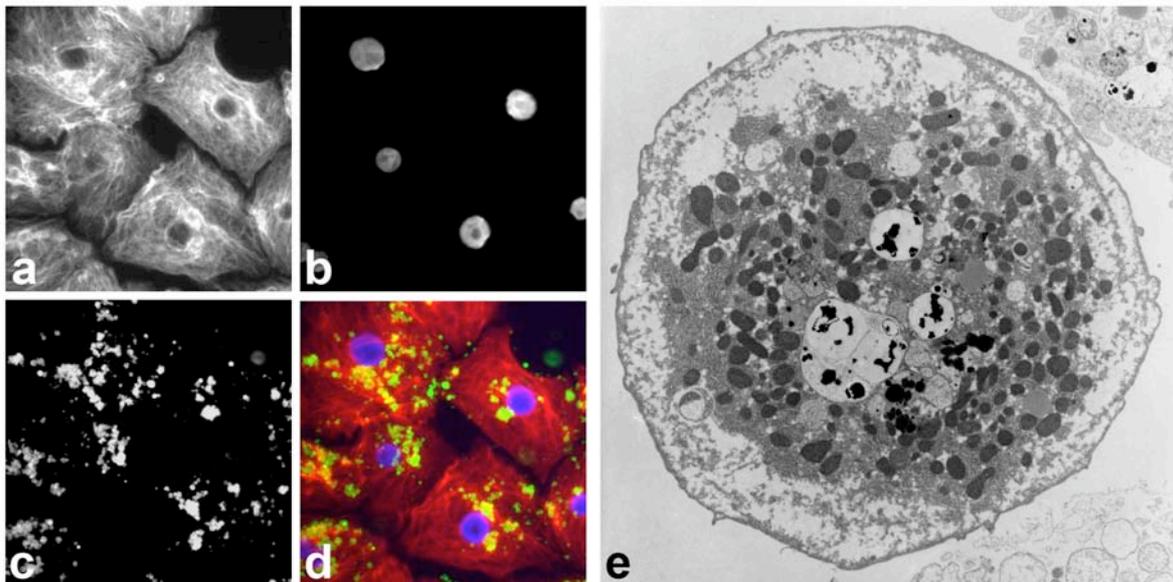


Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung primärer humaner Hepatozyten mit CK 18 (a, rot), Nuklei (blau) sowie MPIO (c, grün) und Überlagerung der Abbildungen a-c. Elektronenmikroskopische Darstellung primärer humanen Hepatozyten mit inkorporierten MPIO (e, 3597x Vergrößerung).

Anhand von MTT-Assays ließen sich keine Unterschiede in der metabolischen Aktivität der markierten und nicht-markierten Zellen feststellen. Die Bestimmung der Gesamtproteinmengen am Ende der Kulturperiode zeigte keinerlei Unterschied zwischen allen Versuchsgruppen. Die enzymatische Resuspendierung hatte keinen Einfluss auf die Partikelbeladung der Zellen, während der fünftägigen Rekultur kam es in keiner der Versuchsgruppen mit markierten Zellen zu einem Verlust der intrazellulären Partikel. Als Indikator für eine Zellschädigung wurde die AST- und LDH-Freisetzung verfolgt. Nach einem initialen Anstieg am zweiten Kulturtag erholten sich die resuspendierten Zellen im folgenden

Beobachtungszeitraum mit vergleichbaren Konzentrationen der untersuchten Transaminasen im Kulturmedium. Hinsichtlich der metabolischen Leistungsfähigkeit erfolgte die Bestimmung der Harnstoff- und Albuminsynthese. Auch hier zeigte sich eine auf die initiale Phase beschränkte Beeinträchtigung der resuspendierten Zellen. Bei keinem der untersuchten Parameter ließ sich eine Schädigung primärer humaner Hepatozyten durch die Markierung mit MPIOs feststellen (Abb. 12).

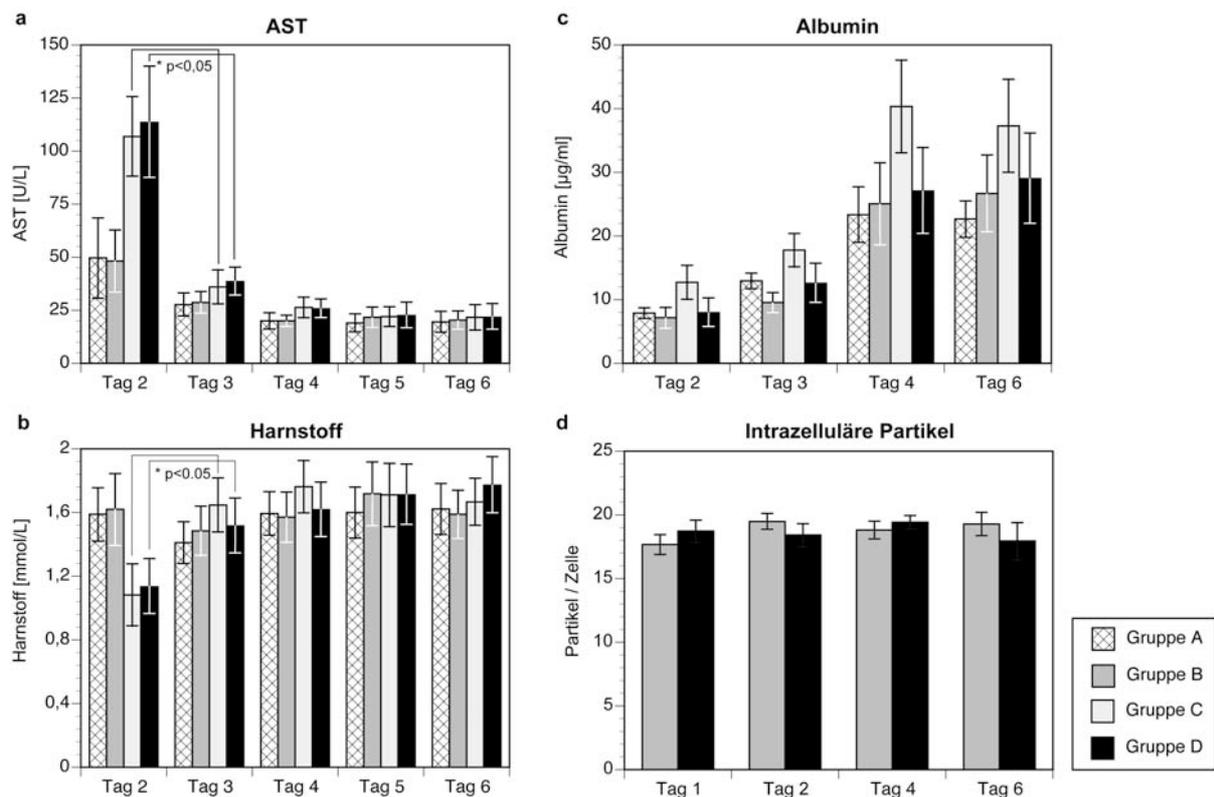


Abbildung 12: Laborchemische Parameter AST (a), Harnstoff (b) und Albumin (c) sowie die Anzahl der intrazellulären Partikel im Verlauf der Kulturphase von 6 Tagen:

- Gruppe A: kontinuierlich adhärenente Zellen, nicht markiert,
- Gruppe B: kontinuierlich adhärenente Zellen, MPIO-markiert,
- Gruppe C: resuspendierte Zellen, nicht markiert,
- Gruppe D: resuspendierte Zellen, MPIO-markiert.

Alle Angaben als Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$.

Es wurde eine Methode zur erfolgreichen Markierung primärer humaner Hepatozyten mit MPIO in Adhäsionskultur etabliert. Die Partikel Aufnahme wurde durch Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Die markierten Zellen waren mittels klinischem 3-Tesla-MRT *in vitro* eindeutig identifizierbar. Eine Schädigung der Zellen durch die Partikel Aufnahme oder die Resuspendierung konnte nicht festgestellt werden. Folgeprojekte stellen die Markierung der Zellen in Suspensionskultur und die Evaluation der Methode *in vivo* (Großtiermodell) dar.

III Zusammenfassung

Ein Leberunterstützungsverfahren sollte die drei Hauptfunktionen der Leber – Detoxifikation, Regulation und Synthese – adressieren. Die Überlegung, dass für die vielfältigen klinischen Symptome beim Leberversagen vorwiegend die mangelnde Entgiftungsfunktion der Leber und somit der zunehmende Anfall von Toxinen im Körper verantwortlich ist, führte zur Entwicklung von Filtrations- und Adsorptionssystemen. Derartige entgiftende Systeme werden als artifizielle Leberunterstützungssysteme bzw. Detoxifikationssysteme bezeichnet. Komplexe regulative Prozesse und insbesondere die Synthese von lebenswichtigen Substanzen vermögen artifizielle Leberunterstützungssysteme nicht zu leisten. Für diese Funktionen werden Leberzellen benötigt. Extrakorporale Systeme, die diese biologische Komponente extrakorporal bereitstellen, werden als bioartifizielle Leberunterstützungssysteme bezeichnet. Bei der Transplantation von isolierten Hepatozyten handelt es sich dagegen um eine rein biologische Unterstützungstherapie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden folgende Aspekte innovativer Strategien zur Therapie des Leberversagens adressiert:

1. Weiterentwicklung und Evaluation eines einfachen extrakorporalen Detoxifikationskonzepts (*Single Pass Albumin Dialysis* [SPAD]),
2. *In vitro* und klinische *in vivo* Evaluation des *Modular Extracorporeal Liver Support* (MELS) Systems, basierend auf SPAD als artifizielle und Leberzellen im *CellModule* Bioreaktor als bioartifizielle Komponente,
3. Entwicklung und Evaluation des hohlfaserbasierten *SlideReactor*-Systems als Werkzeug für Zellkulturexperimente unter kontrollierten Bedingungen und der Möglichkeit der kontinuierlichen (Zeitraffer-)videomikroskopischen Beobachtung ,
4. Entwicklung von Methoden zur Isolierung und Kryokonservierung primärer humaner Leberzellen,
5. Entwicklung einer Methode zur effizienten Markierung und Detektion primärer humaner Hepatozyten mittels eisenbasierter Partikel und MRT.

Die *Single Pass* Albumindialyse ist eine einfache und kostengünstige Variante der Albumin dialyse, die mit herkömmlichen CCVHDF-Geräten unter Zugabe von Humanalbumin ins Dialysat durchgeführt werden kann. SPAD wurde mit dem klinisch bereits etablierten *Molecular Adsorbent Recirculation System* sowie dem Nierenersatzverfahren CVVHDF hinsichtlich der Detoxifikationsleistungen unter standardisierten und vergleichbaren *in vitro* Bedingungen unter Verwendung von toxinbeladenem humanem Plasmas evaluiert und verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Überlegenheit von SPAD und CVVHDF

gegenüber MARS hinsichtlich wasserlöslicher Toxine. Bezüglich der Eliminationsfähigkeit der Systeme für albumingebundene Toxine ergab sich ein signifikanter Vorteil für das SPAD- und das MARS-Konzept gegenüber dem herkömmlichen CVVHDF-Verfahren. Dabei war SPAD wiederum signifikant effektiver als MARS bei der Entfernung von Bilirubin als Markersubstanz für albumingebundene Toxine. Der zeitliche Verlauf der Detoxifikationskapazität für albumingebundene Toxine ist durch Unterschiede zwischen dem SPAD- und dem MARS-Konzept gekennzeichnet: Zu Beginn weisen beide eine vergleichbare Entgiftungskapazität auf. Diese nimmt jedoch beim MARS-Verfahren im Versuchsverlauf stetig ab, während sie bei der SPAD-Methode annähernd gleich bleibt.

Wesentlicher Nachteil der Verfahren der extrakorporalen Leberunterstützung durch Leberperfusion ist ihre komplexe Logistik: Unter sterilen Bedingungen müssen die Organe in Perfusionskammern kanüliert und mit dem Blut des Patienten perfundiert werden. Neben immunologischen und infektiösen Risiken waren insbesondere das komplexe Procedere des Anschlusses an den Blutkreislauf des Patienten und die unzureichende Bevorratungsmöglichkeiten von einsetzbaren Systemen ausschlaggebend für die Entwicklung so genannter hybrider Systeme. Dabei handelt es sich um Systeme, welche aus künstlichen Materialien (Kunststoffgehäuse, Membranen, Schlauchverbindungen) und biologischen Komponenten (Leberzellen) bestehen. Sollen primäre humane Leberzellen in derartigen Bioreaktoren verwendet werden müssen effektive Methoden zur Isolierung, Lagerung und Kultur dieser Zellen geschaffen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein geeignetes Isolierungsverfahren für primäre humane Leberzellen aus für die Transplantation freigegebenen, dann aber abgelehnten Spenderorganen sowie aus im Rahmen von Leberteilresektionen gewonnenem Lebergewebe etabliert. Dabei wurden Studien zur Charakterisierung der Gewebemorphologie und der biochemischen Leistungsfähigkeit der Zellen in Hohlfaserbioreaktoren unter optimalen Kulturbedingungen sowie während der notwendigen Transporte vom Ort der Isolierung zum Ort der klinischen Anwendung durchgeführt. Mit dem *SlideReactor* wurde zudem ein System zur standardisierten und (zeitraffer-) videomikroskopisch überwachten Kultur primärer humaner Leberzellen in einem hohlfaserbasierten Bioreaktorsystem geschaffen. Zur Evaluation des Systems wurden Tests mit diversen primären humanen Zellen sowie Tumorzelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden sowohl während der Kultur (morphologisch) als auch nach Beendigung der Kultur (immunhistologisch) analysiert und mit Monolayer-Kontrollkulturen verglichen.

Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen zur *Single Pass* Albumindialyse wurde das Bioreaktorsystem mit der SPAD zum *Modular Extracorporeal Liver Support*

(MELS) System erweitert. Das Verfahren ermöglicht neben der Perfusion eines mit primären humanen Leberzellen gefüllten Bioreaktors die direkte Detoxifikation des Patientenbluts mittels SPAD sowie CVVHDF. Nach Etablierung eines Isolierungsprotokolls für primäre humane Leberzellen konnte das Stadium von *in-vitro*-Experimenten und Tiermodellen verlassen und die Phase klinischer Erprobung begonnen werden. Dabei zeigte sich, dass das Konzept auch bei schwer kranken Patienten im Leberversagen sicher anwendbar ist; ein positiver Einfluss auf relevante klinische und laborchemische Parameter konnte nachgewiesen werden. Im Rahmen klinischer Phase I Studien wurde das Bioreaktorsystem zunächst mit porcinen Hepatozyten allein sowie mit primären humanen Leberzellen im Sinne des MELS-Konzepts in Kombination mit der SPAD bei insgesamt 20 Patienten klinisch evaluiert.

Wesentliches Problem hinsichtlich zellbasierter Leberunterstützungssysteme – sowohl im Rahmen extrakorporaler Systeme, als auch bei der Hepatozytentransplantation – ist weiterhin die Quelle humaner Hepatozyten: Ohne Verfügbarkeit von auf fetalen oder adulten Vorläuferzellen basierenden Hepatozyten ist die Nutzung primärer humaner Leberzellen aus abgelehnten Spenderorganen erforderlich. Neben einer Methode der Zellisolierung wurde mit einem Trehalose-basierten Konzept ein effizientes Verfahren zur Kryokonservierung primärer humaner Leberzellen geschaffen: Eine langfristige Lagerbarkeit primärer humaner Leberzellen von mehreren Monaten bis Jahren kann nur durch Einfrieren erreicht werden. Basierend auf der Erkenntnis, dass verschiedene Organismen wie beispielsweise die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in bestimmten Stresssituationen wie Dehydratation und Kälteeinwirkung das zellprotektiv wirkende Disaccharid Trehalose synthetisieren, konnte erfolgreich der positive Einfluss dieser Substanz auf primäre humane Hepatozyten unter Kryokonservierung nachgewiesen werden.

Die Transplantation primärer humaner Hepatozyten stellt eine Therapieoption für bestimmte Lebererkrankungen dar. Eine Erweiterung des Indikationsspektrums setzt neben der Optimierung der logistischen Prozesse Erkenntnisse hinsichtlich der Eingliederung der Zellen in das Zielgewebe, das *Engraftment*, voraus. Klinische Methoden zum Nachweis transplantierte Zellen basieren auf histologischen Untersuchungen oder dem Einsatz von Radioisotop-markierten Zellen. Diese Verfahren erlauben lediglich einmalige oder zeitlich sehr begrenzte Untersuchungen und sind in ihrer Aussagekraft hinsichtlich der dynamischen Prozesse während einer Zelltransplantation limitiert. Die Magnetresonanztomographie stellt eine sichere, nicht-invasive Untersuchungsmethode dar. Moderne Geräte ermöglichen – eine geeignete Markierung vorausgesetzt – die Detektion kleiner Zellverbände sowie einzelner Zellen. Es wurde eine Methode zur erfolgreichen Markierung primärer humaner Hepatozyten

mit MPIO in Adhäsionskultur entwickelt. Die Partikelaufnahme wurde durch Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Die markierten Zellen waren mittels klinischem 3-Tesla-MRT *in vitro* identifizierbar. Eine Schädigung der Zellen durch die Partikelaufnahme oder die Resuspendierung konnte dabei nicht festgestellt werden. Als notwendiges Folgeprojekt wird die Methode derzeit *in vivo* im Großtiermodell hinsichtlich der sicheren klinischen Anwendung evaluiert.

IV Genehmigungen

Für die geschilderten Projekte wurden folgende Genehmigungen erteilt:

- „Nutzung von Leberteileresektaten zur Entwicklung von Methoden der hypothermen, oxygenierten Langzeitkultur primärer humaner Leberzellen in Perfusionsbioreaktoren“ Ethikkommission der Charité – Antragsnummer 32/2004
- „Gewinnung von Leberstammzellen aus im Rahmen der Lebertransplantation explantierten humanen Organen zur Entwicklung von zellbasierten Leberunterstützungstherapien“ Ethikkommission der Charité – Antragsnummer 88/2002
- „Therapeutischer Einsatz extrakorporaler hybrider Leberunterstützung bei Patienten im Leberversagen“ Ethikkommission der Charité – Antragsnummer 12/2002
- Vereinbarung mit der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO), Region Nord-Ost zur Nutzung von zur Organtransplantation freigegebener, nicht-transplantierbarer Lebern zur Zellisolierung und Nutzung im Modular Extracorporeal Liver Support System (MELS)
- „Prospektive, offene, kontrollierte Pilotstudie zur Untersuchung des Einflusses des Modularen Extrakorporalen Leberunterstützungssystems (MELS) auf den klinischen Verlauf von Patienten im Leberversagen“ Ethikkommission der Charité – Antragsnummer 37/2003
- „In vitro Vergleich der Effektivität verschiedener Detoxifikationstechniken zur Behandlung des Leberversagens“ Ethikkommission der Charité – Antragsnummer 228/2001

V Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Peter Neuhaus, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité – Campus Virchow, Universitätsmedizin Berlin, für seine stets großzügige und wohlwollende Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeiten, für zahlreiche Anregungen sowie die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. medic. Ruth Schwartländer, Frau Dr. rer. medic. Gesine Pless sowie Frau Dr. med. Ekaterina Katenz (Efimova). Ohne ihre Hilfe wären die wissenschaftlichen Untersuchungen aber auch das Einwerben der erforderlichen Drittmittel sowie die Organisation der Arbeitsgruppe nicht möglich gewesen.

Wesentlich zum Erfolg der Arbeitsgruppe haben die Studenten Herr Nathanael Raschok, Herr Haluk M. Morgül sowie Herr Florian W.R. Vondran beigetragen. Ohne die hervorragende Zusammenarbeit mit Frau Sabine Westecker, Frau Dipl. Ing. Nicole Obermayer, Herrn Dr. med. Dimitrios Kardassis, Herrn Dipl. Ing. Stephan Roth, Herrn Dipl. Ing. Ingo Steffen, Herrn Dipl. Pflgw. Ulrich H. Stumborg sowie den Schwestern, Pflegern und ärztlichen Kollegen der Intensivstation 21 am Campus Virchow Klinikum wären insbesondere die klinischen Studien nicht realisierbar gewesen. Hervorheben möchte ich auch die Leistung der Gastwissenschaftler Prof. Dr. med. Xiangdong Cheng, Dr. med. Xiaobing Gong, und Dr. med. Olaf van der Jagt.

Herrn Prof. Dr. med. Achim Jörres, Herrn PD Dr. med. Ulf Teichgräber und meinem langjährigen Kollegen Herrn PD Dr. med. Andreas Pascher möchte ich für die sehr produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit über viele Jahre hinweg danken. Überdies bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Robert A.F.M. Chamuleau, Frau Dr. Ruurdije Hoekstra und Herrn Dr. med. Paul P.C. Poyck vom Academish Medical Centrum, Amsterdam, bei Prof. Dr. med. Antoni Mas, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, sowie bei Frau Prof. Dr. med. Ursula Rauen, Universitätsklinikum Essen, für die wunderbare Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Emil Sebastian Bücherl, Herrn Dr. Ing. Jörn Frank sowie Herrn Prof. Dr. Yukihiro Nosé, MD, PhD, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, bin ich für hervorragende Förderung zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten – damals noch auf dem Gebiet des künstlichen Herzens – zu größtem Dank verpflichtet. Auch Herrn Prof. Dr. med. Jörg C. Gerlach möchte ich für die anfänglich sehr fruchtbare und interessante Zusammenarbeit danken.

Bedanken möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung der wissenschaftlichen Untersuchungen durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), die Europäische Kommission, Förderprogramme der Charité sowie durch die Fiebig-Stiftung. Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Jörg Vienken der Fresenius Medical Care AG für die Kooperation im Rahmen der klinischen Evaluierung des MELS-Konzeptes.

- ¹ Rifai K, Bahr MJ: Akutes Leberversagen. *Internist*, 2003; 44: 585-598
- ² Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Risler T, Erley CM, Bader BD, Berger ED, Lauchart W, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Loock J, Lohr JM, Liebe S, Emmrich J, Korten G, Schmidt R: Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transpl.* 2000; 6(3): 277-286
- ³ Heemann U, Treichel U, Loock J, Philipp T, Gerken G, Malago M, Klammt S, Loehr M, Liebe S, Mitzner S, Schmidt R, Stange J: Albumin dialysis in cirrhosis with superimposed acute liver injury: a prospective, controlled study. *Hepatology.* 2002; 36: 949-958
- ⁴ Hassanein TI, Tofteng F, Brown RS Jr, McGuire B, Lynch P, Mehta R, Larsen FS, Gornbein J, Stange J, Blei AT: Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis. *Hepatology*, 2007; 46: 1853-1862
- ⁵ Rifai K, Ernst T, Kretschmer U, Bahr MJ, Schneider A, Hafer C, Haller H, Manns MP, Fliser D: Prometheus - a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *J Hepatol.* 2003; 39(6): 984-990
- ⁶ Stadlbauer V, Krisper P, Beuers U, Haditsch B, Schneditz D, Jung A, Putz-Bankuti C, Holzer H, Trauner M, Stauber RE: Removal of bile acids by two different extracorporeal liver support systems in acute-on-chronic liver failure. *ASAIO J*, 2007; 53(2): 187-193
- ⁷ Matsumura KN, Guevara GR, Huston H, Hamilton WL, Rikimaru M, Yamasaki G, Matsumura MS: Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery*, 1987; 101(1): 99-103
- ⁸ Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH: The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif Organs*, 1994; 18(5): 390-6
- ⁹ Millis JM, Cronin DC, Johnson R, Conjeevaram H, Conlin C, Trevino S, Maguire P. Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation*, 2002; 74(12): 1735-1746
- ¹⁰ Demetriou AA, Rozga J, Podesta L, Lepage E, Morsiani E, Moscioni AD, Hoffman A, McGrath M, Kong L, Rosen H: Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1995; 208: 111-117
- ¹¹ Rozga J, Podesta L, LePage E, Hoffman A, Morsiani E, Sher L, Woolf GM, Makowka L, Demetriou AA: Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fulminant hepatic failure. *Lancet*, 1993; 342(8876): 898-899
- ¹² Rozga J, Podesta L, LePage E, Morsiani E, Moscioni AD, Hoffman A, Sher L, Villamil F, Woolf G, McGrath M: A bioartificial liver to treat severe acute liver failure. *Ann Surg.* 1994; 219(5): 538-544
- ¹³ Hui T, Rozga J, Demetriou AA: Bioartificial liver support. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001; 8(1): 1-15
- ¹⁴ Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS 2nd, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA: Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg*, 2004; 239(5): 660-667
- ¹⁵ Flendrig LM, Calise F, Di Florio E, Mancini A, Ceriello A, Santaniello W, Mezza E, Sicoli F, Belleza G, Bracco A, Cozzolino S, Scala D, Mazzone M, Fattore M, Gonzales E, Chamuleau RA: Significantly improved survival time in pigs with complete liver ischemia treated with a novel bioartificial liver. *Int J Artif Organs*, 1999; 22(10): 701-709
- ¹⁶ Sosef MN, Abrahamse LS, van de Kerkhove MP, Hartman R, Chamuleau RA, van Gulik TM: Assessment of the AMC-bioartificial liver in the anhepatic pig. *Transplantation*, 2002; 73(2): 204-209

- ¹⁷ van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, van Gulik TM: Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg*, 2004; 240(2): 216-230
- ¹⁸ Sakamoto S, Uemoto S, Uryuhara K, Kim Id, Kiuchi T, Egawa H, Inomata Y, Tanaka K: Graft size assessment and analysis of donors for living donor liver transplantation using right lobe. *Transplantation*, 2001; 71(10): 1407-1413
- ¹⁹ Iwata H, Ueda Y: Pharmacokinetic considerations in development of a bioartificial liver. *Clin Pharmacokinet*, 2004; 43(4): 211-212
- ²⁰ Hammer C: Xenotransplantation for liver therapy or: Can porcine hepatocytes generate physiological functions sufficient for a human patient in ALF? *Int J Artif Organs*, 2002; 25(10): 1019-1028
- ²¹ Pascher A, Sauer IM, Neuhaus P: Analysis of allogeneic versus xenogeneic auxiliary organ perfusion in liver failure reveals superior efficacy of human livers. *Int J Artif Organs*, 2002; 25(10): 1006-1012
- ²² Fisher RA, Strom SC: Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*, 2006; 82(4): 441-449
- ²³ Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, Arya R, Wade JJ, Verma A, Heaton ND, Rela M, Mieli-Vergani G: Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*, 2004; 78: 1812-1814
- ²⁴ Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB: Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet*, 2002; 359: 317-318
- ²⁵ Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC: Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1998; 338: 1422-1426
- ²⁶ Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A: Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *J R Soc Med*, 2005; 98: 341-345
- ²⁷ Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP: Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*, 1997; 63: 559-569
- ²⁸ Sterling RK, Fisher RA. Liver Transplantation: Living Donor, Hepatocyte, and Xenotransplantation. In: *Current Future Treatment Therapies for Liver Disease*. Clinics in Liver Disease. Gish R, ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001.
- ²⁹ Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc*, 1992; 24: 3052-3053
- ³⁰ Wang LJ, Chen YM, George D, Smets F, Sokal EM, Bremer EG, Soriano HE: Engraftment assessment in human and mouse liver tissue after sex-mismatched liver cell transplantation by real-time quantitative PCR for Y chromosome sequences. *Liver Transpl*, 2002; 8: 822-828
- ³¹ Sauer IM, Goetz M, Steffen I, Walter G, Kehr DC, Schwartlander R, Hwang YJ, Pascher A, Gerlach JC, Neuhaus P: In vitro comparison of the molecular adsorbent recirculation system (MARS) and single-pass albumin dialysis (SPAD). *Hepatology*. 2004; 39(5): 1408-1414
- ³² Ansprache Prof. Dr. Gregor Schulz (Vorsitzender des Vorstands der Biotest AG, Dreieich) vor den Aktionären der Biotest AG zur Hauptversammlung am 20. Mai 2005 in Frankfurt/Main (http://ir.biotest.de/biotest/biotest_Rede%20HV%202005%20Schulz_d.pdf), aufgerufen am 25.01.2008
- ³³ Gerlach JC, Brombacher J, Kloppel K, Schnoy N, Neuhaus P: Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers. *Transplantation*, 1994; 57(9): 1318-1322
- ³⁴ Sauer IM, Zeilinger K, Obermayer N, Pless G, Grunwald A, Pascher A, Mieder T, Roth S, Goetz M, Kardassis D, Mas A, Neuhaus P, Gerlach JC: Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support – a preliminary report. *Int J Artif Organs*, 2002; 25(10): 1001-1005

- ³⁵ Irgang M, Sauer IM, Karlas A, Zeilinger K, Gerlach JC, Kurth R, Neuhaus P, Denner J: Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol*, 2003; 28(2): 141-145
- ³⁶ Sauer IM, Kardassis D, Zeilinger K, Pascher A, Grunwald A, Pless G, Irgang M, Kraemer M, Puhl G, Frank J, Muller AR, Steinmuller T, Denner J, Neuhaus P, Gerlach JC: Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation*, 2003; 10(5): 460-469
- ³⁷ Sauer IM, Gerlach JC: Modular extracorporeal liver support. *Artif Organs*, 2002; 26(8): 703-706
- ³⁸ Sauer IM, Zeilinger K, Obermayer N, Pless G, Grunwald A, Pascher A, Mieder T, Roth S, Goetz M, Kardassis D, Mas A, Neuhaus P, Gerlach JC: Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support – a preliminary report. *Int J Artif Organs*, 2002; 25(10): 1001-1005
- ³⁹ Sauer IM, Zeilinger K, Pless G, Kardassis D, Theruvath T, Pascher A, Goetz M, Neuhaus P, Gerlach JC: Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis--treatment of a patient with primary graft non-function. *J Hepatol*, 2003; 39(4): 649-653
- ⁴⁰ Clayton DF, Harrelson AL, Darnell JE: Dependence of liver specific transcription on tissue organisation. *Mol Cell Biol*, 1985; 5(10): 2623-2632
- ⁴¹ Koide N, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Shinji T, Mori M, Tsuji T: Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Exp Cell Res*, 1990; 186(2): 227-235
- ⁴² Sauer I.M., Obermeyer N., Kardassis D., Theruvath T., Gerlach J.C. Development of a hybrid liver support system. *Ann N Y Acad Sci* 994, 308; 2001
- ⁴³ Gerlach JC, Zeilinger K, Grebe A, Puhl G, Pless G, Sauer IM, Grunwald A, Schnoy N, Muller C, Neuhaus P: Recovery of preservation-injured primary human hepatocytes and nonparenchymal cells to tissuelike structures in large-scale bioreactors for liver support: an initial transmission electron microscopy study. *J Invest Surg*, 2003; 16(2): 83-92
- ⁴⁴ Gloeckner H, Lemke HD: New miniaturized hollow-fiber bioreactor for in vivo like cell culture, cell expansion, and production of cell-derived products. *Biotechnol Prog*, 2001; 17(5):828-831
- ⁴⁵ Sauer IM, Schwartlander R, Schmid J, Efimova E, Vondran FW, Kehr D, Pless G, Spinelli A, Brandenburg B, Hildt E, Neuhaus P: The SlideReactor--a simple hollow fiber based bioreactor suitable for light microscopy. *Artif Organs*, 2005; 29(3): 264-267
- ⁴⁶ Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, Katenz E, Vondran FW, Pless G, Cheng X, Pascher A, Neuhaus P, Sauer IM: Continuously Microscopically Observed and Process-Controlled Cell Culture Within the SlideReactor: Proof of a New Concept for Cell Characterization. *Tissue Eng.*, 2007, 13: 187-196
- ⁴⁷ Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H: Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*, 1999; 13: 155-168
- ⁴⁸ Salahudeen AK, Huang H, Patel P, Jenkins JK: Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation*, 2000; 70: 1424-1431
- ⁴⁹ Sauer IM, Schwartlander R, van der Jagt O, Steffen I, Efimova E, Pless G, Kehr DC, Kardassis D, Fruhauf JH, Gerlach JC, Neuhaus P: *In vitro* evaluation of the transportability of viable primary human liver cells originating from discarded donor organs in bioreactors. *Artificial Organs*, 2005, 29: 141-151
- ⁵⁰ Lloyd TD, Orr S, Skett P, Berry DP, Dennison AR: Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell Tissue Bank*, 2003; 4: 3-15
- ⁵¹ Lovelock JE, Bishop MW: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 1959; 183: 1394-1395

- ⁵² Gutteridge JM, Quinlan GJ: Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidizing proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1993; 1156: 144-150
- ⁵³ Limaye LS, Kale VP: Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001; 10: 709-718
- ⁵⁴ Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM: Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 1992; 54: 579-599
- ⁵⁵ Cerrutti P, Segovia de Huergo M, Galvagno M, Schebor C, del Pilar Buera M: Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000; 54(4): 575-580
- ⁵⁶ Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM: Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol*, 1995; 61(10): 3592-3597
- ⁸⁰ Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP, Dunbar CE: Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood*, 2003; 102: 867-872
- ⁵⁸ Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP: In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med*, 2006; 55: 242-249

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift