

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und
Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Leberresektion bei Diabetes mellitus- Untersuchungen zur Organregeneration bei Mäusen und zum perioperativen Risiko bei Menschen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Reuter

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. O. Guckelberger
 2. Prof. Dr. med. A. Nüssler
 3. Prof. Dr. med. J. Schulte am Esch

Datum der Promotion: 24.02.2012

0	Inhalt.....	3
	0.1. Inhaltsverzeichnis	3
	0.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	5
	0.3. Abkürzungsverzeichnis	7
	0.4. Zusammenfassung	9
1	Einleitung.....	12
	1.1. Leberregeneration	12
	1.1.1. Trigger der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie	15
	1.1.2. Hepatocyte Growth Factor	17
	1.1.3. TNF- α und IL-6	18
	1.1.4. GH und IGF-1	19
	1.1.5. EGF	20
	1.1.6. TGF- α	20
	1.1.7. Norepinephrin	21
	1.1.8. Insulin	21
	1.1.9. Prostaglandine	22
	1.1.10. Synopsis der Leberregeneration	22
	1.1.11. Stopp der Leberregeneration	24
	1.2. Klinische Leberresektion	24
	1.3. Diabetes mellitus	26
	1.3.1. Allgemeines zum Diabetes mellitus	26
	1.3.2. Diabetes mellitus Typ I	27
	1.3.3. Diabetes mellitus Typ II	28
2	Fragestellung.....	29
3	Material und Methoden.....	30
	3.1. Tierexperiment	30
	3.1.1. Versuchstiere	30
	3.1.2. Induktion des Diabetes mellitus Typ I	31
	3.1.3. Das LIRKO-Mausmodell (Diabetes mellitus Typ II)	31
	3.1.4. Blutglukosebestimmung	32
	3.1.5. Experimentelle Leberresektion	33
	3.1.6. Materialgewinnung	36
	3.1.7. Histologie	37
	3.1.7.1. Hämatoxilin-Eosin-(HE) Färbung	37
	3.1.7.2. BrdU-Färbung	37
	3.1.8. Auswertung der Präparate	40
	3.1.8.1. Hämatoxylin Eosin (HE)- gefärbte Präparate	40
	3.1.8.2. BrdU-gefärbte Präparate	40
	3.1.9. Histologische Aufnahmen	41
	3.1.10. Serumparameter (IGF-1/IL-6/GH)	46
	3.2. Klinische Studie	47
	3.2.1. Patienten	47
	3.2.2. Definitionen	47
	3.2.3. Weitere Variablen	48
	3.3. Statistik	49
4	Ergebnisse.....	50
	4.1. Experimentelle Leberregeneration	50
	4.1.1. Überlebenstafeln	50
	4.1.1.1. DM Typ I (STZ)	50

4.1.1.2. DM Typ II (LIRKO)	51
4.1.2. Blutglukose	52
4.1.2.1. DM Typ I (STZ)	51
4.1.2.2. DM Typ II (LIRKO)	52
4.1.3. Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht	53
4.1.4. Mitoseindex Hepatozyten	55
4.1.5. Mitoseindex sinusoidale Endothelzellen	58
4.1.6. Laborparameter	60
4.1.6.1. IGF-1	60
4.1.6.2. IL-6	62
4.1.6.3. GH	64
4.2. Ergebnisse der klinischen Studie	66
4.2.1. Patientencharakterisierung	66
4.2.2. Perioperative Mortalität	68
4.2.3. Postoperative Morbidität	71
5 Diskussion.....	73
5.1. Diskussion der tierexperimentellen Studie	74
5.1.1. Diskussion der L/B-weight ratios bei Mäusen mit DM	74
5.1.2. Mitoseindices des DM Typ I und II Mausmodells	75
5.1.3. Zur Rolle von Insulin bei der Leberregeneration	76
5.1.4. Diskussion der Rolle von IGF-1	78
5.1.5. Diskussion der Rolle von GH	80
5.1.6. Diskussion der Rolle von IL-6	82
5.1.7. Diskussion der Überlebensraten	84
5.2. Diskussion der klinischen Studie	85
6 Schlussfolgerungen.....	88
 Literaturverzeichnis	 90
Erklärung	108
Curriculum Vitae	109
Danksagung	110

0.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb.1: Schemazeichnung des mikroskopischen Leberaufbaus	14
Abb.2: Synopsis der Mito- und Komitogene	23
Abb.3: Synopsis des Glukosestoffwechsels (bei schwerem DM)	27
Abb.4: Anatomie der Mäuseleber	33
Abb.5: Anatomie der Mäuseleber nach 2/3 Resektion	35
Abb.6: Strukturformel von BrdU und Thymidin	38
Abb.7: murines Lebergewebe in der HE-Färbung, 48h postOP	41
Abb.8: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung vor Beginn der Regeneration	42
Abb.9: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung, gewonnen 48h postOP	43
Abb.10: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung zum Zeitpunkt hoher Regeneration	44
Abb.11: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung, 96h postOP	45
Abb.12: Lebersegmente nach Couinaud	47
Abb.13: Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht (DM Typ I)	54
Abb.14: Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht (DM Typ II)	54
Abb.15: Mitoseindices der Hepatozyten (Wt vs. STZ)	56
Abb.16: Mitoseindices der Hepatozyten (IR ^{Lox-Lox} vs. LIRKO)	57
Abb.17: Mitoseindices der BrdU gefärbten sinusoidalen Endothelzellen (Wt vs. STZ)	59
Abb.18: Mitoseindices der BrdU gefärbten sinusoidalen Endothelzellen (IR ^{Lox-Lox} vs. LIRKO)	59
Abb.19: IGF-1 Konzentration (Wt vs. STZ)	60
Abb.20: IGF-1 Konzentration (IR ^{Lox-Lox} vs. LIRKO)	61
Abb.21: IL-6 Konzentration (Wt vs. STZ)	62
Abb.22: IL-6 Konzentration (IR ^{Lox-Lox} vs. LIRKO)	63
Abb.23: GH Konzentration (Wt vs. STZ)	64
Abb.24: GH Konzentration (IR ^{Lox-Lox} vs. LIRKO)	65

Tabelle 1: Versuchstiere (DM Typ I)	50
Tabelle 2: Versuchstiere (DM Typ II)	51
Tabelle 3: Blutglukose Wt / STZ	52
Tabelle 4: Blutglukose IR ^{Lox-Lox} / LIRKO	52
Tabelle 5: Körpergewichte der Versuchstiere vor der Leberresektion (präOP)	55
Tabelle 6: Indikationen für Leberresektionen	67
Tabelle 7: Charakterisierung von diabetischen und nichtdiabetischen Patienten	69
Tabelle 8: Die perioperative Mortalität signifikant beeinflussende Variablen	71
Tabelle 9: Postoperative Morbidität	72

0.3. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
ALS	Acid-Labile Subunit
BG	Blutglukosewert
BrdU	Bromodeoxyuridine
dest.	destilliert
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelial Cell
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GH	Growth Hormon
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCC	Hepatocelluläres Karzinom
HE	Hämatoxilin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPF	High power field
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	IGF-Bindeprotein
IL-6	Interleukin-6
KG	Körpergewicht
LIRKO	Liver insulin receptor knock-out
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOV	Multiorganversagen
NF	Nuclear factor
PBS	Phosphate-buffered saline
PG	Prostaglandin
PH	Partial Hepatectomy
postOP	postoperativ
präOP	präoperativ
RNA	Ribonukleinsäure

SD	Standardabweichung
sEC	sinusoidale Endothelzelle
SEM	Standard Error of the Mean
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STZ	Streptozotozin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
uPA	urokinase Plasminogenaktivator
V.	Vene
vs.	versus
Wt	Wildtyp

0.4. Zusammenfassung

Von dem Wissen über die bemerkenswerte Fähigkeit der Leber, selbst nach ausgedehnten Traumata wieder vollständig zu genesen, ist bereits in Mythen des antiken Griechenland zu lesen. In den letzten Jahrzehnten haben sich aufgrund der hohen klinischen Relevanz vermehrt Wissenschaftler den Mechanismen der Leberregeneration gewidmet. Aufgrund der Komplexität der ineinander spielenden Mediator-Kaskaden bleiben aber auch nach Jahren der Forschung essentielle Fragen unbeantwortet.

Für Patienten mit bestehendem Diabetes mellitus (DM) wurde wiederholt eine erhöhte Mortalität und Morbidität nach Leberteileresektionen beschrieben. Ursächlich wurde eine durch die diabetische Stoffwechsellage gestörte Leberregeneration postuliert.

Es liegen aber auch Studien vor, die für diabetische und nichtdiabetische Patienten von gleichen Ergebnissen berichten. Da die Patientenkollektive oft nach Grunderkrankungen selektiert wurden, könnten die widersprüchlichen Daten möglicherweise durch die Auswahl der Patienten bedingt sein und nicht primär durch Auswirkungen des Diabetes mellitus.

Darum wurde eine multivariate Analyse eines großen, nicht selektierten Patientenstammes durchgeführt, um den unabhängigen, prognostischen Wert des Diabetes mellitus in der Leberchirurgie zu eruieren. Aus einer prospektiven Datenbank wurden 633 erwachsene Patienten ausgewählt, die einer Leberresektion unterzogen wurden und weder große Bauchoperationen noch Chemotherapien erhalten hatten. Neben dem Diabetes mellitus wurden sowohl demographische Daten, als auch Variablen der funktionellen Leberreserve, sowie der chirurgischen Technik auf ihre Auswirkungen auf Morbidität und Mortalität nach Leberteileresektion analysiert. 75 Patienten des Gesamtkollektivs hatten einen Diabetes mellitus (11,8 %) und 96 Patienten (15,2 %) litten an einer Leberzirrhose. Im Vergleich zu allen nichtdiabetischen Patienten zeigte sich, dass ein bestehender Diabetes mellitus in der univariaten Analyse mit einer erhöhten Mortalität korreliert (10,7 % vs. 5,3 % $p = 0,047$). Diabetische Patienten waren jedoch auch signifikant älter und hatten eine höhere Prävalenz an Leberzirrhose. Das multivariate Modell identifizierte als unabhängige Variablen mit Auswirkungen auf die perioperative Mortalität schließlich nur das Alter des Patienten, die Albuminkonzentration im Serum, den Zirrhosestatus, das Ausmaß des chirurgischen Eingriffs und die Ära des Eingriffs. Insgesamt wurden Komplikationen bei diabetischen und nichtdiabetischen Patienten in vergleichbarer Frequenz beobachtet (44 % vs. 36 %, $p = 0,179$). Ebenso wenig gab es signifikante Unterschiede bei der Dauer des stationären Aufenthaltes in den beiden Gruppen ($18,5 \pm 1,7$ vs. $17,7 \pm 1,0$ Tage, $p = 0,119$). Die Raten postoperativen Nierenversagens, prolongierten Aszites und Pneumonien waren jedoch bei der

Gruppe der diabetischen Patienten höher als in der Vergleichsgruppe. Folgt man etablierten kardiopulmonalen und chirurgischen Selektionskriterien, so ist der Diabetes mellitus kein unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte perioperative Mortalität nach Leberteileresektionen. Obwohl insgesamt die postoperative Morbidität bei diabetischen und nichtdiabetischen Patienten nicht unterschiedlich war, so fiel doch ein spezielles Komplikationsmuster der diabetischen Patienten auf.

Für die genauere Untersuchung des Einflusses eines Diabetes mellitus (DM) auf die Leberregeneration wurden Leberresektionen in verschiedenen diabetischen Tiermodellen durchgeführt.

Im Mausmodell des DM Typ I erfolgte die Diabetesinduktion durch Streptozotozin (STZ). Mäuse mit fehlender Expression von Insulinrezeptoren auf den Hepatozyten (LIRKO) dienten als Mausmodell der hepatischen Insulinresistenz.

Diese Tiere und entsprechende Kontrollen wurden einer 2/3 Leberresektion unterzogen und die anschließende Leberregeneration zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6 bis 96 Stunden postoperativ) beobachtet.

Als Parameter der Leberregeneration wurden Mitoseindices mit Hilfe der Bromodeoxyuridin-Färbung (BrdU-Färbung) aufgestellt und zusätzlich das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht (L/B-weight ratio) bestimmt. Um Hinweise auf beteiligte Signalkaskaden zu erlangen, wurden im Serum die Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6), Wachstumshormon (GH) und Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) bestimmt.

Die mit STZ behandelten Mäuse zeigten 96h nach der Leberresektion vergleichbare L/B-weight ratios wie die unbehandelten Wildtypmäuse. Dennoch fand sich zu diesem Zeitpunkt bei den mit STZ behandelten Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl BrdU positiver Hepatozyten ($4,6 \pm 0,6\%$, $p = 0,037$) und sinusoidaler Endothelzellen (sEC, $11,0 \pm 2,1\%$, $p = 0,037$). Die Kontrolltiere hatten ihre Ausgangswerte 96h postoperativ wieder erreicht. Damit konnte Insulin als Comitogen bestätigt werden.

Bei den LIRKO-Mäusen zeigte die L/B-weight ratio den Trend einer inkompletten Regeneration 84h postoperativ ($0,025 \pm 0,002$ nach 84h vs. $0,028 \pm 0,001$ präoperativ, $p = 0,089$). Die Kontrolltiere hatten zu diesem Zeitpunkt ihr initiales Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht wieder erreicht. Korrespondierend zur verzögerten Hepatozytenproliferation war 84h nach der Operation bei den LIRKO-Mäusen eine erhöhte Anzahl von BrdU-positiven Hepatozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe ($13,3 \pm 3,5\%$ vs. $2,6 \pm 0,2\%$, $p = 0,006$) zu beobachten. Die Anzahl der BrdU-positiven sinusoidalen Endothelzellen (sEZ) unterschied sich nicht.

Die Serumkonzentrationen von IL-6 und GH zeigten vergleichbare Werte sowohl bei den mit STZ behandelten diabetischen Mäusen als auch bei den LIRKO-Tieren, jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Während es keinen Unterschied der IGF-1 Serumkonzentrationen bei den mit STZ behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren gab (48h: $3349 \pm 548\text{ng/ml}$ vs. $3725 \pm 58\text{ng/ml}$), zeigten die LIRKO-Mäuse signifikant erniedrigte Werte im Vergleich zu den Kontrollen (48 h: $580 \pm 136\text{ng/ml}$ vs. $4209 \pm 128\text{ng/ml}$, $p < 0,001$).

Obwohl sowohl der Insulinmangel als auch die Insulinresistenz im Tiermodell zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Leberregeneration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe führte, zeigte sich in der klinischen Studie der Diabetes mellitus nicht als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität nach einer Leberteileresektion beim Menschen. Eine suffiziente perioperative Insulinbehandlung, wie sie die Patienten erhielten, scheint in der Lage, die im Tiermodell gezeigten Konsequenzen eines Diabetes mellitus zu verhindern.

1 Einleitung

1.1. Leberregeneration

Die Leber ist ein Organ, welches über bemerkenswerte Fähigkeiten zur Regeneration verfügt. Denkbar ist, dass sich diese während der Evolution entwickelten, um Wildtiere vor den tödlichen Folgen eines Leberversagens durch Lebensmittelgifte aus der Natur zu bewahren (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Die Regenerationsfähigkeit der Leber ist bereits seit der Antike bekannt, wie uns im Mythos des Prometheus überliefert wird.

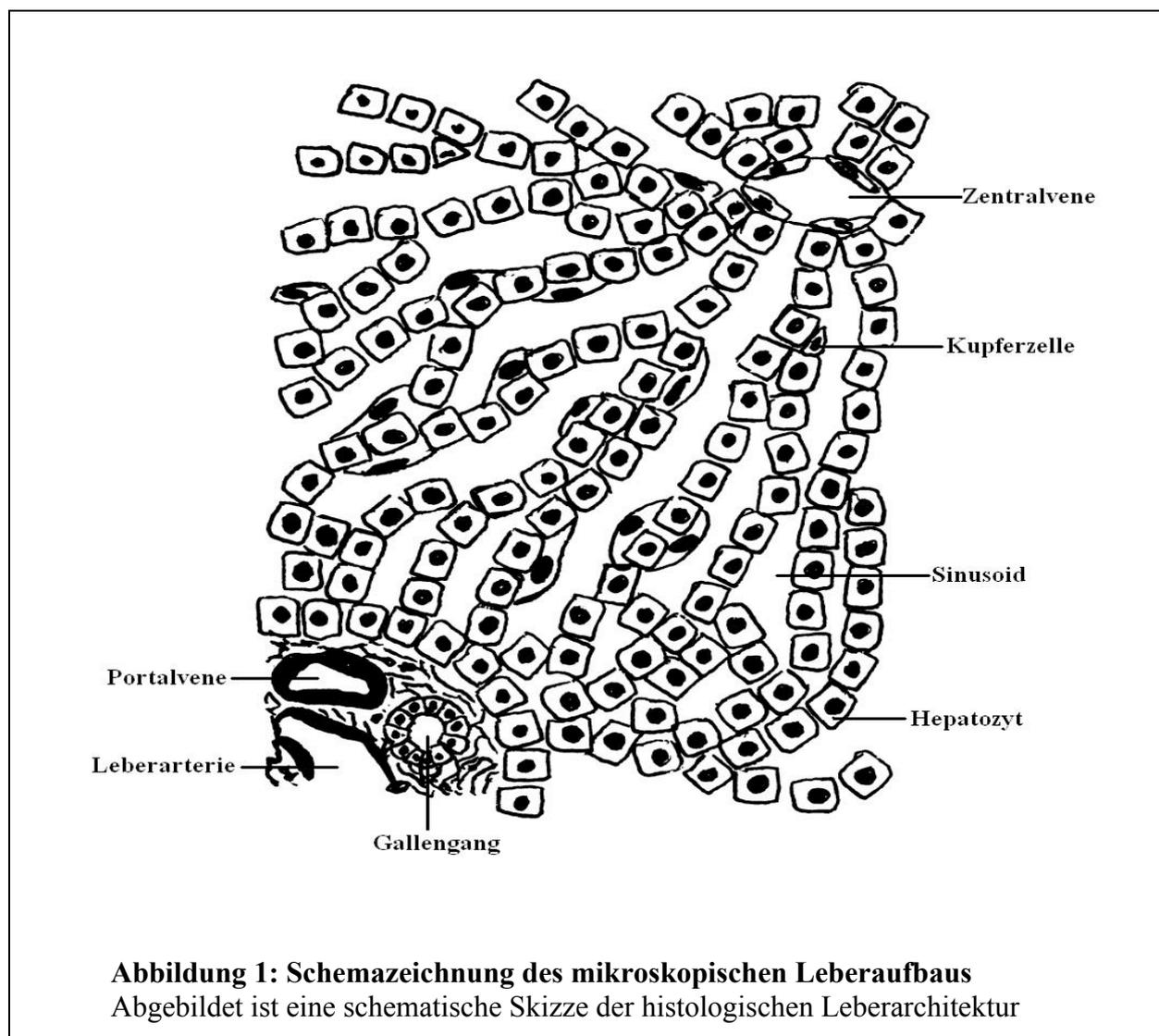
Prometheus, in der griechischen Mythologie der Freund und Kulturstifter der Menschheit, hatte das Geheimnis des Feuers den Göttern des Olymp gestohlen, um es den Menschen zu bringen. Zur Strafe ließ der Göttervater Zeus den Titanen mit Ketten an einen Felsen schmieden. Täglich sandte Zeus einen Adler, der die Leber des Titanen fraß. Prometheus' Qualen wiederholten sich Tag für Tag, denn nachts wuchs die Leber wieder nach. Auf diese Weise verdammt Zeus den Unsterblichen bis in alle Ewigkeit.

In den letzten Jahren haben sich viele Arbeitsgruppen mit dem komplexen Thema der Leberregeneration beschäftigt. Das aktuell am meisten etablierte experimentelle Modell zur Erforschung der Regeneration ist die Operationsmethode von Higgins und Anderson (Higgins GM und Anderson RM). Hierbei wird eine 2/3 Hepatektomie (PH) vorgenommen, ohne die in situ verbleibenden Lappen zu schädigen. In den folgenden Tagen vergrößern sich diese kompensatorisch, um die resezierten Lappen funktionell zu ersetzen. Im Vergleich zu anderen Methoden, welche Lebergifte (wie z.B. CCl_4) benutzen, induziert die Hepatektomie keine Entzündungsreaktion und schädigt auch nicht das verbleibende Lebergewebe (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Zudem ist der Zeitpunkt des Regenerationsbeginns durch die Entfernung der Leberlappen genau definiert. Verschiedene Studien belegen eine exakte Steuerung des Lebergewichtes. So ist eine Verkleinerung des Organs zu beobachten, wenn man die Leber eines großen Hundes in einen kleinen transplantiert (Francavilla A et al., 1988). Andererseits vergrößert sich eine Pavianleber, transplantiert man sie in einen Menschen, innerhalb einer Woche auf die für den größeren Organismus benötigte Kapazität (Starzl TE et al., 1993). Bereits eine Resektion von unter 10% der Lebermasse hat in Studien zu einer nachweisbaren Regeneration geführt (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Im Gegensatz zu anderen zur Regeneration befähigten Geweben, ist die Leberregeneration nicht von einer kleinen Gruppe von Progenitor oder Stammzellen abhängig. Werden die reifen Leberzellen jedoch an der Teilung gehindert, treten ebenfalls Stammzellen in großen Mengen auf (Thorgeirsson SS, 1996). Außerdem gibt es Hinweise, dass sich in solch einer Situation

zwei bis drei Tage nach einer PH Gallengangsepithelien zu sogenannten „oval-cells“ ausbilden können, welche wiederum in der Lage sind, sich zu Hepatozyten zu differenzieren (Evarts RP et al., 1996). Während im Labor die Hepatozyten mit N-Acetylamino-fluorene an der Teilung gehindert werden können, findet man in der Klinik vergleichbare Situationen bei fulminanten Hepatitiden (Michalopoulos GK, 2007). In der Regel teilen sich aber die reifen Zellen, die in ihrer Komposition die Leber ausmachen und sorgen so für eine Regeneration. Hierzu zählen die Hepatozyten, die den Großteil der Lebermasse bilden, die Gallengangsepithelien, welche die Gallengänge auskleiden und die Endothelzellen, die als spezielle Form in der Leber auftreten. Sie besitzen große Spalten im Zytoplasma (Fenestrae), um möglichst ausgiebigen Kontakt zwischen dem zirkulierenden Blut und den Leberzellen zu ermöglichen. Auf diese Weise entstehen die Lebersinusoide, in deren Lumen sich als weitere Zelltypen die vom Monozyten- Makrophagensystem abstammenden Kupfer- oder Sternzellen befinden. Die sogenannten Ito-Zellen umgeben mit langen Ausläufern die Leberzellen. Sie sind in der Lage Vitamin A zu speichern, verschiedene „connective-tissue“- Proteine zu synthetisieren und mehrere Wachstumsfaktoren zu bilden (Gressner AM, 1995). All diese reifen Zellen beginnen sich nach einer Resektion zu teilen. Das Intervall zwischen der Leberläsion und dem Regenerationsbeginn ist abhängig von einer Vielzahl verschiedener Faktoren: Hierzu zählen neben den im Folgenden beschriebenen Parametern am Tage vorkommende Lichtreize und verschiedene Fütterungsmuster (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Auch gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies. Nach einem adäquaten Stimulus verlassen 95% der Hepatozyten das G₀-Stadium und durchlaufen innerhalb von 48h den Mitosezyklus. Beachtenswert ist, dass die Leber auch während dieses Zeitraumes in der Lage ist, ihren vielfältigen Funktionen nachzukommen (Michalopoulos GK, 2007). So bleibt die Glukosehomöostase gewahrt und die Synthese der Gerinnungsfaktoren, der Galle und des Albumins bleibt ebenfalls erhalten. Diese Leistung kann die Leber bis zu einer ca. 2/3-Resektion aufrechterhalten. Wird mehr reseziert, oder befinden sich mehr als 90% der Zellen in der Mitose, können Veränderungen in diesen Parametern beobachtet werden. Ein Grund für die hohe Syntheseleistung ist die Chromosomenzahl der reifen Leberzellen. Bei der durchschnittlichen Ratten- oder Menschenleberzelle findet sich ein vierfacher Chromosomensatz, bei vielen Zellen sogar ein noch höherer (Nadal C und Zajdela F, 1996). Die Leberteilresektion bewirkt eine schnelle Induktion von mehr als 100 Genen, welche in einer gesunden Leber nicht exprimiert werden (Taub R, 1996). Diese Gene steuern direkt oder indirekt den Eintritt der Hepatozyten in die

G₁-Phase und ermöglichen es der Leber trotz verminderten Volumens die metabolische Homöostase aufrecht zu halten (Michalopoulos GK, 2007).

Die Leber ist sowohl beim Menschen als auch bei der Maus aus Leberläppchen aufgebaut. Diese Läppchen werden peripher von Ästen der V. portae und der A. hepatica (Abbildung 1) versorgt. Zusammen mit den Gallengängen bilden diese beiden Gefäße die Glissonsche Trias. Die V. portae, die das venöse Blut vom Intestinum zur Leber fördert, versorgt die Leber mit Nährstoffen für ihre zahlreichen Synthesefunktionen. Dieses Blut mischt sich mit dem sauerstoffreichen Blut der A. hepatica. Vorbei an den Hepatozyten fließt dieses Blutgemisch durch die Sinusoide in Richtung Zentralvene. Zwischen den Hepatozyten liegen röhrenförmige, durch Tight Junctions seitlich verschlossene Spalten ohne eigene Wand, welche Canaliculi biliferi genannt werden. Sie leiten die von den Hepatozyten gebildete und sezernierte Galle den abführenden Gallenwegen zu.



Die Leberregeneration beginnt periportal (Rabes HM et al., 1976) und setzt sich nach zentral fort. Als letztes teilen sich die Hepatozyten um die Zentralvene (Gebhardt R et al., 2007). Die Hepatozyten beginnen nach einer PH vor den anderen Zellen Zeichen der Teilung zu zeigen. Erst Stunden später beginnen auch die anderen Zellen mit der Synthese des Erbgutes. Oben beschriebene Kinetik der Zellregeneration legt nahe, dass wachstumsfaktorenproduzierende Leberzellen die anderen in der Leber vorkommenden Zellen zur Teilung stimulieren (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Bei der Maus ist das ursprüngliche Lebergewicht nach wenigen Tagen wieder erreicht. Die Leberläppchen sind zu diesem Zeitpunkt noch vergrößert. Es findet jedoch in der folgenden Zeit eine Reorganisation der Läppchen statt, sodass die Histologie schließlich nicht mehr von der einer nativen Leber zu unterscheiden ist (Wagenaar GT et al., 1993).

Hinsichtlich der Teilungskapazität bestätigen Studien die im Mythos von Prometheus beschriebene, nahezu unendliche Regenerationsreserve (Michalopoulos und DeFrances, 1997). So kam es beispielsweise nach der 12maligen Leberteilesektion bei einer Ratte jedes Mal zu einer vollständigen Regeneration (Stocker E et al., 1973). In anderen Studien wurde gezeigt, dass 1000 gesunde Leberzellen in eine kranke Leber injiziert ausreichen, um gesunde Leberläppchen zu bilden und so die ganze Leber zu retten (Rhim JA et al., 1994).

Mathematische Überlegungen ergeben, dass ein einzelner Hepatozyt, teilt er sich 34 mal, $1,7 \times 10^{10}$ Zellen hervorbringt (Grompe M et al., 1996). Da eine Rattenleber aus ca. 3×10^8 Hepatozyten besteht, ist ein einzelner Hepatozyt theoretisch in der Lage, über 50 Rattenlebern zu generieren. Alle diese Forschungsergebnisse zeigen, dass Hepatozyten keine terminal differenzierten Zellen sind, sondern, ganz im Gegenteil, sich fast ohne Limit teilen können. Umso erstaunlicher ist dieser Vorgang angesichts der komplexen Funktionen der reifen Leberzellen.

1.1.1. Trigger der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie

Dass sich die Leberregeneration triggernde Substanzen im Blut befinden, zeigte ein Experiment mit Ratten, deren Blutkreisläufe verbunden waren. Wurde bei einer der Ratten eine Leberteilesektion durchgeführt, konnte bei der anderen Ratte ebenfalls eine Induktion der Leberzellteilung beobachtet werden (Jirtle RL und Michalopoulos GK, 1982).

Obwohl die Leberresektion aufgrund der Unversehrtheit der verbleibenden Lappen keine klassische Wunde darstellt, sind doch viele der biochemischen Abläufe nach PH mit denen einer Wundheilung zu vergleichen (Michalopoulos GK, 2007). Ein Grund dafür könnte der

erhöhte Scherstress in den Kapillaren aufgrund des verminderten Gesamtquerschnittes sein (Sokabe T et al., 2004). So ist eine der frühesten biochemischen Veränderungen die erhöhte Aktivität des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (uPA) fünf Minuten nach der Teilresektion. Wie bei der Wundheilung sorgt der uPA auch in der Leber für eine Aktivierung des Matrixremodellings (Michalopoulos GK, 2007). 30 Minuten nach der PH kann eine Aktivierung der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) beobachtet werden (Kim TH et al., 2000). In der Matrix der Leber sind viele Wachstumsfaktoren, wie z.B. der Hepatocyte Growth Factor (HGF), gebunden. Durch die MMP9 wird dieser aus der Matrix gelöst und durch den uPA aktiviert (Mars WM et al., 1993, 1995). Als Folge des erhöhten HGF Spiegels kommt es 30-60 Minuten nach PH zur Aktivierung des entsprechenden Rezeptors cMet (Stolz DB et al., 1999). Außerdem steigen innerhalb der ersten Stunde die Konzentrationen des Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) und der Hyaluronsäure im Serum an, welche ebenfalls aus der Matrix der Leber stammen (Michalopoulos GK, 2007). TGF β 1 ist ein bekannter Mitosehemmer (Houck KA et al., 1988). Dieser hat in der gesunden Leber wahrscheinlich die Aufgabe, die an die Matrix gebundenen Wachstumsfaktoren in ihrer Wirkung zu neutralisieren und die Zellen in der G₀ Phase zu halten (Michalopoulos GK, 2007). Durch das Matrixremodelling wird dieses Gleichgewicht verschoben. Es werden Wachstumsfaktoren freigesetzt und TGF β 1 gelangt vermehrt in den Blutstrom, wo es von α -2-Makroglobulin inaktiviert wird (LaMarre J et al., 1991). Wie der Rezeptor von HGF (cMet) wird auch der Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR) aktiviert (Stolz DB et al., 1999). Die ebenfalls ansteigende Norepinephrinkonzentration verstärkt den Effekt von HGF und EGF über α -1-Rezeptoren. Außerdem steigen die Konzentrationen von Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) (Yamada Y et al., 1998), Gallensäuren (Huang W et al., 2006), Interleukin-6 (IL-6) (Cressman DE et al., 1996), Insulin-Like-Growth-Factor-Bindungsprotein-1 (IGFBP1) (Mohn KL, 1990) und Serotonin (Lesurtel M et al., 2006). Neben den beschriebenen extrazellulären Vorgängen gibt es auch intrazelluläre Veränderungen. 15-30 Minuten nach PH erscheinen β -Catenin (Monga SP et al. 2001) und Notch-1 Intracellular Domain (NICD) (Kohler C et al., 2004) im Zellkern der Hepatozyten. Ebenfalls innerhalb der ersten Minuten wird der Transkriptionsfaktor STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3) aktiviert (Cressman DE et al., 1995) und der Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) (Cressman DE et al., 1994) lässt sich in der Leberzelle nachweisen. NF- κ B und STAT3 werden dann in den Zellkern transportiert, wo sie aktivierend auf die Promoterregionen vieler der sogenannten „immediate early genes“ einwirken (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Die gesteigerte Expression von STAT3 und NF- κ B ist wahrscheinlich ein Hauptfaktor der

intrazellulären Aktivierungskaskade, welche zur DNA-Synthese führt. Auch während der Fetalperiode vorhandene Marker wie α -Fetoprotein und Hexokinase steigen in ihrer Konzentration an (Bonney RJ et al., 1973). Darüber hinaus sind Konzentrationsänderungen vieler weiterer, zum größten Teil mit dem Zellzyklus assoziierte Proteine wie Enzyme zur DNA-Synthese, zu beobachten (Michalopoulos und DeFrances, 1997). All diese Parameter erreichen im Mausmodell ungefähr nach fünf Tagen wieder ihre Ausgangswerte. Einige der wichtigsten Parameter sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.1.2. Hepatocyte Growth Factor

Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist mit seinem Rezeptor cMet (Nakamura T et al., 1984) einer der Schlüsselfaktoren der Leberregeneration (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Er wird sowohl von den Sternzellen (Schirmacher P et al., 1993), als auch von den Endothelzellen (LeCouter J et al., 2003) gebildet. Die Bedeutsamkeit von HGF und cMet wird an homozygoten knock-out Mäusen deutlich, welche aufgrund einer unterentwickelten Leber als Embryo sterben (Schmidt C et al., 1995). HGF ist ein direktes Mitogen (Michalopoulos GK, 2007). Es scheint von allen die Leberregeneration beeinflussenden Faktoren am wenigsten ersetzbar zu sein (Michalopoulos GK, 2007). Nach einer PH wird es von der MMP9 aus der Matrix gelöst und aufgrund starker Ähnlichkeit von der inaktiven HGF-Form zu Plasminogen durch den uPA aktiviert. In den ersten Stunden nach PH stammt das gesamte HGF aus den Matrixspeichern. Erst nach drei Stunden beginnt die „de novo Synthese“ (Pediaditakis P et al., 2001), welche u.a. von IL-6 und Norepinephrin stimuliert wird (Brotan J et al., 1999). HGF findet sich jedoch nicht nur in der Leber. In der Matrix von Lunge, Plazenta, Milz und Gehirn ist es ebenfalls gebunden und steigt nach einer PH in seiner Konzentration an (Stella MC und Comoglio PM, 1999; Liu Y et al., 1994). cMet findet sich an verschiedenen Zellen und vermittelt die promitogenen Effekte von HGF (Naldini L et al., 1991). Außerdem inaktiviert cMet den Fas-Rezeptor und hat so eine anti-apoptotische Wirkung. Wird der cMet nach PH künstlich gestört, führt dies zu einem vollkommenen Sistieren des Zellzyklus (Wang X et al., 2002).

1.1.3. TNF- α und IL-6

TNF- α und IL-6 sind keine direkten Hepatozytenmitogene. TNF- α verstärkt, anders als IL-6, die Effekte von direkten Mitogenen (Webber EM et al., 1998). Beide Substanzen werden von Kupferschen Sternzellen gebildet. Diese reagieren auf die relativ erhöhte Endotoxinbelastung der Darmbakterien pro verbliebener Leber nach PH unter anderem mit einer erhöhten Freisetzung dieser Substanzen.

Auch wenn sein Name das Gegenteil suggeriert (tumor necrosis factor- α), hat der TNF- α unter gewissen Bedingungen einen promitogenen Effekt (Kirillova I et al., 1999). Wirken die gegebenen Umstände eher begünstigend auf eine NF- κ B Aktivierung, so hat TNF- α im Konzert mit anderen Wachstumsfaktoren eine promitogene Wirkung (Michalopoulos GK, 2007). Lässt sich NF- κ B nicht aktivieren, ist die Antwort auf TNF- α eine Apoptose (Iimuro Y et al. 1998). Bei dem einleitend beschriebenen Matrixremodeling entstehen durch Integrine (transmembranäre Proteine, die Zellen mit der extrazellulären Matrix verbinden) Signale, welche TNF- α eine promitogene Wirkung verleihen.

IL-6 ist bekannt als eines der wichtigsten Signale zur Produktion von Akut-Phase-Proteinen während einer Entzündungsreaktion (Gauldie J et al., 1992).

Die Produktion von IL-6 wird durch zahlreiche Stimuli wie Zytokine, Viren, Lipopolysaccharide, aber auch mitogene Reize gefördert. Nach einer PH kann ebenfalls ein Anstieg der IL-6 Serumkonzentration beobachtet werden (Ping C et al., 2006). Neuere Studien zeigen, dass IL-6 als Mitogen auf die Epithelien der Gallengänge wirkt (Liu Z et al., 1998) und Bedeutung für die Integrität der intrahepatischen Gallengänge hat (Demetris AJ et al., 2006).

Der Einfluss beider Substanzen auf die Leberregeneration wird deutlich, wenn sie geblockt werden. Appliziert man vor der Operation (PH) Antikörper gegen TNF- α , so sinkt, genau wie bei Mäusen mit IL-6 Defizit, die DNA-Synthese zusammen mit anderen regenerationsassoziierten Faktoren ab (Diehl AM et al., 1994; Blindenbacher A et al., 2003). Diese Defekte in der Regenerationsantwort können durch die Injektion von IL-6 aufgehoben werden. Das lässt vermuten, dass die Regulation der IL-6 Sekretion eine Aufgabe von TNF- α ist (Michalopoulos und DeFrances, 1997). IL-6 und TNF- α nehmen nach aktuellem Kenntnisstand nicht nur eine die Regeneration initiiierende sondern das komplexe Regenerationsorchester unterstützende Rolle ein.

1.1.4. GH und IGF-1

Growth Hormon (GH) ist ein aus einem Polypeptid bestehendes Zytokin (Stocker E et al., 1973), welches in der Hypophyse synthetisiert und gespeichert wird. Von dort wird es unter der Kontrolle des hypothalamischen Somatostatins und GH-Releasing Faktors in den Blutstrom abgegeben. Die von GH vermittelten Wirkungen sind sehr vielfältig. Sie können eingeteilt werden in direkte und indirekte, wobei der indirekte Effekt vom endokrinen Mediator Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) vermittelt wird (Pennisi PA et al., 2004). GH ist der wichtigste Regulator der IGF-1 Synthese und Sekretion aus den Hepatozyten. Im Gegenzug reguliert IGF-1 das GH im Sinne eines klassischen negativen Feedbacks (Pennisi PA et al., 2004). Während der Zirkulation im Blutkreislauf ist IGF-1 an spezifische IGF-Bindungsproteine gebunden (IGFBP). 70-80% des zirkulierenden IGF-1 bilden zusammen mit der Acid-Labile Subunit (ALS) und dem IGFBP-3 einen Dreifachkomplex. Ein kleinerer Anteil (15-20%) zirkuliert gebunden an andere IGFBP als Zweifachkomplex, und weniger als 5% des IGF-1 befindet sich in freier Form. Die IGFBPs modulieren die Wirkungen des IGF-1 (Leu JI et al., 2003) indem sie durch Konzentrationsänderungen die Bioverfügbarkeit des IGF-1 verändern. Die IGFBPs wiederum werden in ihrer Bindungsstärke zu IGF-1 von spezifischen Proteasen beeinflusst, die durch proteolytische Spaltung zu einer verminderten Affinität führen. Die Folge ist eine erhöhte Bioverfügbarkeit von IGF-1. Die Hepatozyten, Hauptquelle für das zirkulierende IGF-1 und IGFBPs, exprimieren selbst keinen Rezeptor für IGF-1 (Liu YY et al., 1999). Nicht-parenchymale Zellen, wie Kupfersche Sternzellen exprimieren jedoch auf ihrer Oberfläche den IGF-1 Rezeptor (Scharf JG et al., 1998, Gressner AM et al., 1995). Dies lässt vermuten, dass IGF-1 eine parakrine Wirkung der Kupferschen Sternzellen auslösen könnte (Skrtic S et al., 1997). IGFBP-1 gehört zu den nach einer Leberresektion am schnellsten induzierten Proteinen (Mohn KL et al., 1991, Ghahary A et al., 1992). IGFBP-1 knock-out Mäuse wiesen eine normale Entwicklung auf, zeigten aber nach einer Leberresektion Lebernekrosen sowie eine reduzierte und verzögerte DNA Synthese in den Hepatozyten (Leu JI et al., 2003).

Neben den indirekten vermittelt GH auch direkte Wirkungen auf die Leberzellen. Es gibt Hinweise, dass GH einerseits die Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) sowie andererseits die Signalkaskade von zytokinbeeinflussenden Proteinen regulieren kann (Thompson BJL et al., 2000). Ebenso wurde gezeigt, dass GH die Tyrosinphosphorylierung des EGFR in Leberzellkulturen stimuliert (Yamauchi T et al., 1997). Daher kann von einer wichtigen Verbindung zwischen dem GH-Rezeptor und dem EGF-Rezeptor während der Leberregeneration ausgegangen werden

1.1.5. EGF

Epidermal Growth Factor (EGF) wird als primäres Mitogen für Hepatozyten in der Kultur angesehen. In vivo wird EGF kontinuierlich von den Brunnerschen Drüsen des Duodenums produziert und der Leber über die Pfortader zugeführt (Skov Olsen P et al., 1988).

Entsprechend führt eine ausgedehnte Leberteileresektion zu einer proportionalen EGF Konzentrationssteigerung im verbliebenen Lebergewebe. Zusätzlich werden die Brunnerschen Drüsen durch Norepinephrin, welches ebenfalls nach einer PH induziert wird, zur vermehrten Produktion von EGF stimuliert (Skov Olsen P. et al., 1985). Kurz nach der PH kommt es zu Tyrosinphosphorylierungen des EGF-Rezeptor (Rubin RA et al., 1982), was auf einen Effekt von EGF in der frühen Leberregeneration hindeuten könnte (Michalopoulos und DeFrances, 1997).

1.1.6. TGF- α

Wie EGF ist auch Transforming Growth Factor (TGF- α) ein primäres Mitogen für kultivierte Hepatozyten. Während EGF seine mitogene Rolle unmittelbar nach der PH entfaltet, erhöht sich die Konzentration der TGF- α mRNA in den Hepatozyten erst einige Stunden nach der Teilresektion (Mead JE et al., 1989). TGF- α wird von den Hepatozyten selbst synthetisiert, weshalb es als autokrines Mitogen bezeichnet wird. Eine durch Substitution künstlich erhöhte TGF- α Serumkonzentration führt zu einer gesteigerten Synthese von Hepatozyten-DNA, in einigen Fällen sogar zur Tumorentwicklung (Webber EM et al., 1994, Lee GH et al., 1992). Andererseits zeigen Mäuse mit einer homozygoten Deletion des TGF- α Gens eine normale Leberregeneration (Russel et al., 1996).

1.1.7. Norepinephrin

In Hepatozytenkulturen sorgt Norepinephrin (Noradrenalin, NA) über α 1-Rezeptoren (Cruise JL et al., 1985) für eine Verstärkung des mitogenen Signals von EGF und HGF.

Norepinephrin steigt im Serum nach einer Leberteilektomie innerhalb einer Stunde stark an (Cruise JL et al., 1987). Des Weiteren stimuliert NA neben der EGF-Sekretion der Brunnerschen Drüsen auch die HGF-Synthese in Myofibroblasten (Brotten J et al., 1999). So hat es vermutlich einen indirekten Effekt auf die Mitoseinduktion der Hepatozyten (Skov Olsen P et al. 1985).

Durch Inhibition des mitosehemmenden TGF- β 1 (Houck KA et al., 1989) verschiebt Norepinephrin das Gleichgewicht zwischen pro- und antimitogen wirkenden Substanzen zu Gunsten der promitogenen Mediatoren. Der α 1-Rezeptor-Antagonist Prazosin bewirkt, ähnlich einer Leberdenervation, eine DNA-Synthesehemmung nach PH (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Die verzögerte DNA-Synthese wird jedoch bei den meisten Versuchstieren im Versuchszeitraum wieder aufgeholt (Cruise JL et al., 1987).

1.1.8. Insulin

Insulin nimmt bezüglich der Leberregeneration auf die Hepatozyten am ehesten die Rolle eines Komitogens ein. Sinkt die Konzentration des Insulins in der Portalvene, zum Beispiel wegen eines Shunts zwischen Portalvene und V. cava inferior, so atrophiert die Leber (Starzl TE et al., 1973) oder zeigt eine verzögerte Regeneration (Aznar A et al., 1991). Die Injektion von Insulin verhindert diesen Prozess oder macht ihn sogar durch Hepatozytenreplikation rückgängig (Starzl TE et al. 1976). Wird Insulin unbehandelten Tieren injiziert, so hat es keine mitogenen Effekte auf Hepatozyten. Die Zahl der proliferierenden Hepatozyten in einer Kultur wird durch die Einwirkung von Insulin erhöht. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die vom Insulin benutzte Signalkaskade von anderen Mediatoren vorbereitet sein muss, damit Insulin seine Wirkung entfalten kann.

Nach einer PH sinkt die Insulinkonzentration im Plasma deutlich ab, während die Glukagonkonzentration ansteigt. Diese Beobachtung kann man als physiologische Antwort auf das verminderte Glukoseangebot durch die Leber nach PH deuten (Michalopoulos und DeFrances, 1997).

1.1.9. Prostaglandine

Nach einer Leberteileresektion verringert sich die Summe der Gefäßdurchmesser deutlich, die Flussgeschwindigkeit nimmt zu und der Scherstress in den einzelnen Gefäßsegmenten der verbliebenen Leber steigt. Die erhöhte Flussgeschwindigkeit induziert Stickstoffmonoxyd (NO), welches die Gefäße kompensatorisch weitet. (Schuett H et al, 2007). Zudem wird postuliert, dass auch Prostaglandine aufgrund des veränderten Verhältnisses von Blutfluss zu Lebermasse vermehrt freigesetzt werden und als ein weiterer Faktor die Leberregeneration triggern. C-Fos-mRNA, gemessen 15 Minuten nach PH, gilt als ein Index der aktivierten Leberregenerationskaskade. Sowohl die Gabe des NO- Inhibitors l-NAME (Schoen Smith JM et al, 2005), als auch die Applikation von Cyclooxygenasehemmern hemmen die c-Fos-Kinetik nach PH. Die zusätzliche Gabe von NO-Donatoren oder Prostaglandinen können den Effekt aufheben.

1.1.10. Synopsis der Leberregeneration

Ein Überblick über die beschriebenen Regenerationsmechanismen und ihre Interaktionen ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Die Hepatozyten werden zur Teilung stimuliert und treten von der G₀- in die G₁- und S-Phase des Zellzyklusses ein. Der Beitrag der einzelnen Komponenten fällt verschieden groß aus. Mit Ausnahme von HGF kommt es zumindest auch in Abwesenheit einzelner der oben beschriebenen Mitogene in der Kultur zur Zellteilung. Die anderen Zytokine spielen eher eine fakultative Rolle. Die durch Insulin, IL-6 und Norepinephrin generierten Signale haben eine komitogene Bedeutung. Bei Störungen in einer der Signalkaskaden, kann der damit verbundene verminderte Wachstumsreiz über andere Wege ausgeglichen werden.

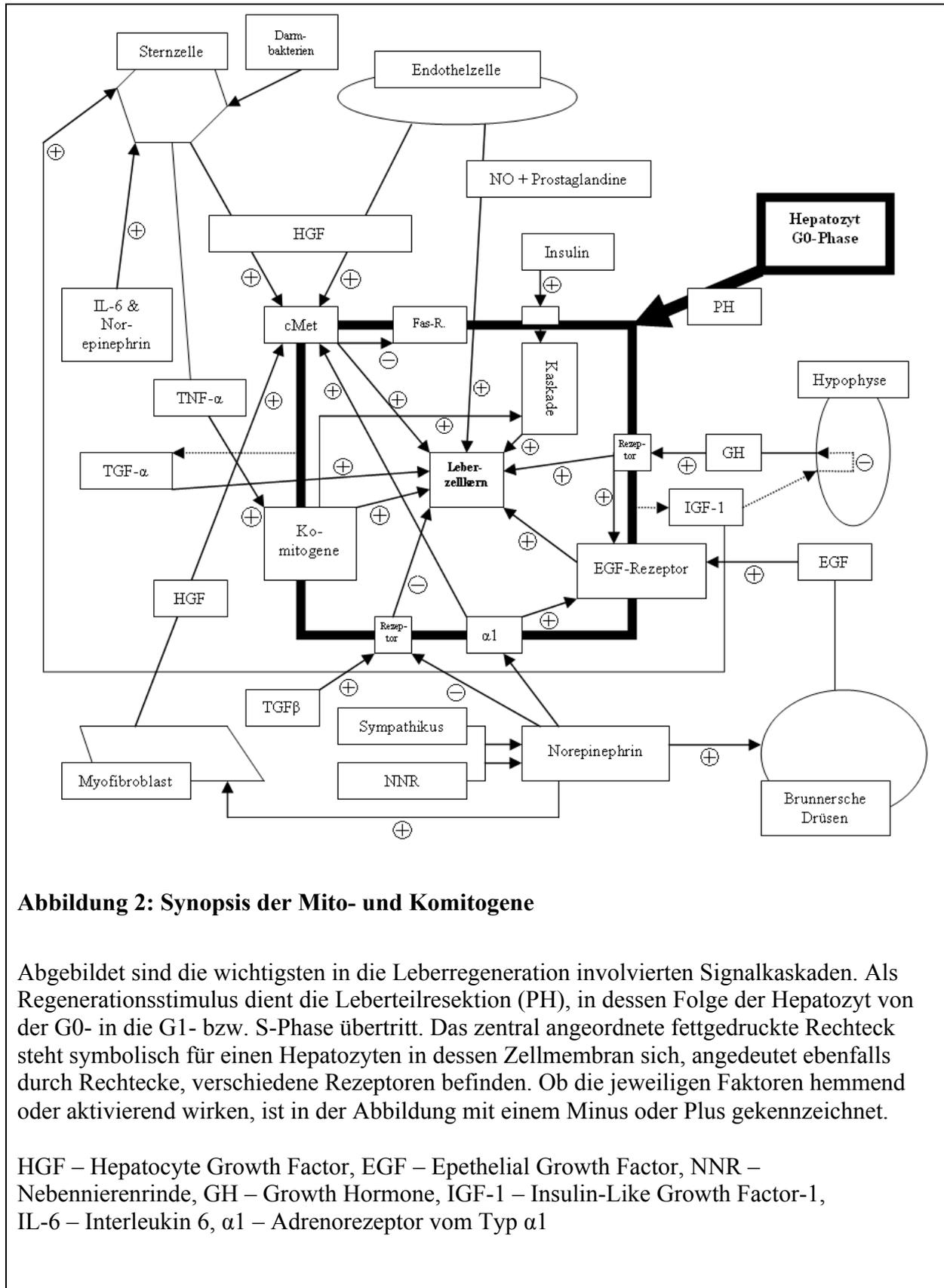


Abbildung 2: Synopsis der Mito- und Komitogene

Abgebildet sind die wichtigsten in die Leberregeneration involvierten Signalkaskaden. Als Regenerationsstimulus dient die Leberteilresektion (PH), in dessen Folge der Hepatozyt von der G0- in die G1- bzw. S-Phase übertritt. Das zentral angeordnete fettgedruckte Rechteck steht symbolisch für einen Hepatozyten in dessen Zellmembran sich, angedeutet ebenfalls durch Rechtecke, verschiedene Rezeptoren befinden. Ob die jeweiligen Faktoren hemmend oder aktivierend wirken, ist in der Abbildung mit einem Minus oder Plus gekennzeichnet.

HGF – Hepatocyte Growth Factor, EGF – Epethelial Growth Factor, NNR – Nebennierenrinde, GH – Growth Hormone, IGF-1 – Insulin-Like Growth Factor-1, IL-6 – Interleukin 6, α1 – Adrenorezeptor vom Typ α1

1.1.11. Stopp der Leberregeneration

Wie die Initiierung der Leberregeneration ist auch die Rückführung der beteiligten Zellen in die G₀-Phase ein komplex regulierter Ablauf. HGF und EGF sorgen im Labor für eine Induktion von TGF-β1 (Michalopoulos GK et al., 2001), welches im Serum von Ratten bis ca. 72h post-PH erhöht bleibt (Jakowlew SB et al., 1991). Die sich teilenden Hepatozyten sind aufgrund einer verminderten Expression der entsprechenden Rezeptoren unempfindlich gegenüber TGF-β1 (Michalopoulos GK, 2007). Der Grund für die Konzentrationserhöhung des für seine mitoseinhibitorischen Effekte bekannten Moleküls am Anfang der Regenerationsphase ist aufgrund der unvollständigen Forschungslage noch nicht abschließend geklärt. Wahrscheinlich spielt die durch TGF-β1 stimulierte Neuproduktion von extrazellulärer Matrix eine entscheidende Rolle. Diese leitet über verschiedene Wege konsekutiv das Ende der Leberregeneration ein. Vorstellbar ist zum einen, dass durch Integrine vermittelte Signale erneut eine Rolle spielen. Zum anderen ist denkbar, dass das in der entstehenden Matrix wieder in größeren Mengen gebundene TGF-β1 und HGF ein Gleichgewicht herstellt, welches die Hepatozyten in die G₀ Phase dirigiert. Außerdem ändert sich durch das größer werdende Lebervolumen der Blutstrom, die Scherkräfte nehmen ab und damit auch die promitogenen Stimuli.

1.2. Klinische Leberresektion

Dank weiter fortschreitender Operationsmethoden und verbesserter Untersuchungstechniken hat die Zahl der wegen Metastasen oder primärer Lebertumoren durchgeführten Leberresektionen in den letzten Jahren deutlich zugenommen (Adam U et al., 2005); bei einem deutlichen Rückgang der postoperativen Komplikationen (Dimick et al., 2004). Dies führt in der Folge zu einer erweiterten Indikationsstellung (Poon et al., 2004). Trotz der sukzessive optimierten Ergebnisse muss weiterhin eine strenge Patientenselektion gelten und insbesondere Rücksicht auf eventuelle Begleiterkrankungen genommen werden (Kooby und Jarnagin, 2004; Poon and Fan, 2004). Konservative Therapieansätze weisen in den letzten Jahren auch im onkologischen Bereich zunehmend verbesserte Ergebnisse auf (Kooby und Jarnagin, 2004) und beginnen mit den resektiven Verfahren zu konkurrieren. Insbesondere die Auswirkung des Diabetes mellitus auf die perioperative Morbidität bei Leberresektionen wurde kontrovers diskutiert. Diabetiker, die eine Leberresektion wegen Metastasen eines

Kolonkarzinoms erhielten, zeigten eine erhöhte perioperative Sterblichkeit im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes. Allerdings waren die Langzeitüberlebensraten nicht unterschiedlich (Little et al., 2002). Bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) war ein vorhandener Diabetes mellitus mit einer signifikant höheren Zahl von perioperativen Komplikationen verbunden (Ikeda et al., 1998; Shimada et al., 1998). Außerdem zeigte die Auswertung von Langzeitergebnissen wie Überlebenszeit, rezidivfreies Überleben (Ikeda et al., 1998) und Leberdekompensationsraten (Huo et al., 2003) eine ungünstigere Prognose für Diabetiker mit HCC. Ebenso zeigte sich der Diabetes mellitus auch als negativer prognostischer Faktor bei der konservativen Behandlung eines HCC (Huo et al., 2004). Eine andere Arbeit berichtet jedoch von einer vergleichbaren perioperativen Morbidität und gleichen Langzeitüberlebensraten bei diabetischen und nichtdiabetischen Patienten nach Leberresektion bei HCC (Poon et al., 2002).

Neuere (asiatische) Studien fassen Daten von Patienten zusammen, welche nach Grunderkrankungen, assoziiert mit verschiedenen Begleiterkrankungen, selektiert sind. Die Mehrzahl der japanischen Patienten präsentierte sich mit chronischer Hepatitis C (74%) (Ikeda et al., 1998), während 74% der Patienten aus Taiwan unter einer chronischen Hepatitis B litten (Huo et al., 2004). In einer anderen Studie gingen den Leberresektionen meist andere Bauchoperationen voran und beinahe die Hälfte der Patienten hatte präoperativ eine Chemotherapie erhalten, mit einem größeren Anteil unter den Diabetikern (Little et al., 2002). Daher kann postuliert werden, dass sich widersprechende Daten eher mit der Patientenauswahl, als mit den Auswirkungen des Diabetes mellitus erklären lassen. Hinsichtlich der Datenlage experimenteller Studien ist eine eingeschränkte Leberregeneration beim Diabetes mellitus zu erwarten (Johnston et al., 1986; Chin et al., 1995; Haber et al., 1995). Schreibt man der Rolle des Insulins bezüglich der Leberregeneration einen promotogenen Effekt zu, so würde man in der Klinik ein verändertes postoperatives Regenerationsverhalten erwarten.

1.3. Diabetes mellitus

1.3.1. Allgemeines zum Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine bereits in der Antike bekannte Erkrankung, die schon damals durch die dabei auftretende Polyurie und Glukosurie diagnostizierbar war. Die Bedeutung des Pankreas hinsichtlich des Zuckerstoffwechsels wurde jedoch erst Ende des 19. Jahrhunderts erkannt, nachdem Minkowski ein bereits im 16. Jahrhundert durchgeführtes, aber in Vergessenheit geratenes Experiment, wiederholte. Er zeigte, dass durch die Resektion der Bauchspeicheldrüse ein Diabetes mellitus induziert werden kann (Übersicht in Schadewaldt, 1975).

Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung, die durch absoluten oder relativen Insulinmangel und seine Auswirkungen auf den Stoffwechsel gekennzeichnet ist. Dabei wird neben dem Kohlenhydratstoffwechsel auch der Fett- und Eiweißstoffwechsel beeinflusst (Berger et al., 1992) (Abbildung 3).

Die Prävalenz des Diabetes mellitus liegt in Deutschland zurzeit bei 6,9% (Hauner H, 2001). Es gibt primäre und sekundäre Formen der Erkrankung, wobei die primäre Form mit über 99% gegenüber der sekundären deutlich dominiert. Der primäre Diabetes lässt sich einteilen in Typ I und den mit 95% dominierenden Typ II. Der Typ I Diabetes ist definiert als absolute Insulinmangelsituation aufgrund einer pathologischen Veränderung der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln. Beim Typ II Diabetes liegt ein relativer Insulinmangel vor. Hier reicht trotz normaler oder sogar erhöhter Insulinkonzentration im Blut die metabolische Antwort des Organismus nicht aus. Dies kann u.a. die Folge eines Rezeptor- oder Postrezeptordefektes sein. Der sekundäre Diabetes macht weniger als ein Prozent der Diabeteserkrankungen aus; er entsteht aufgrund medikamentöser Nebenwirkungen oder als Folge von anderen Erkrankungen, wie einer Pankreatitis oder Pankreas malignomen sowie Sekretionsstörungen von kontra-insulinären Hormonen (Berger et al., 1992; Eggstein u. Luft, 1994).

Sowohl der Diabetes mellitus Typ I als auch der Typ II sind heterogene, multifaktoriell vererbte Erkrankungen. Sie werden unabhängig voneinander weitergegeben und unterscheiden sich im Maße des Vererbungsgrades (Köberling u. Tillil, 1991).

Die klinische Unterscheidung von Diabetes mellitus Typ I und II erfolgt aufgrund der klinischen Symptome, der Familienanamnese sowie labordiagnostischer Untersuchungen.

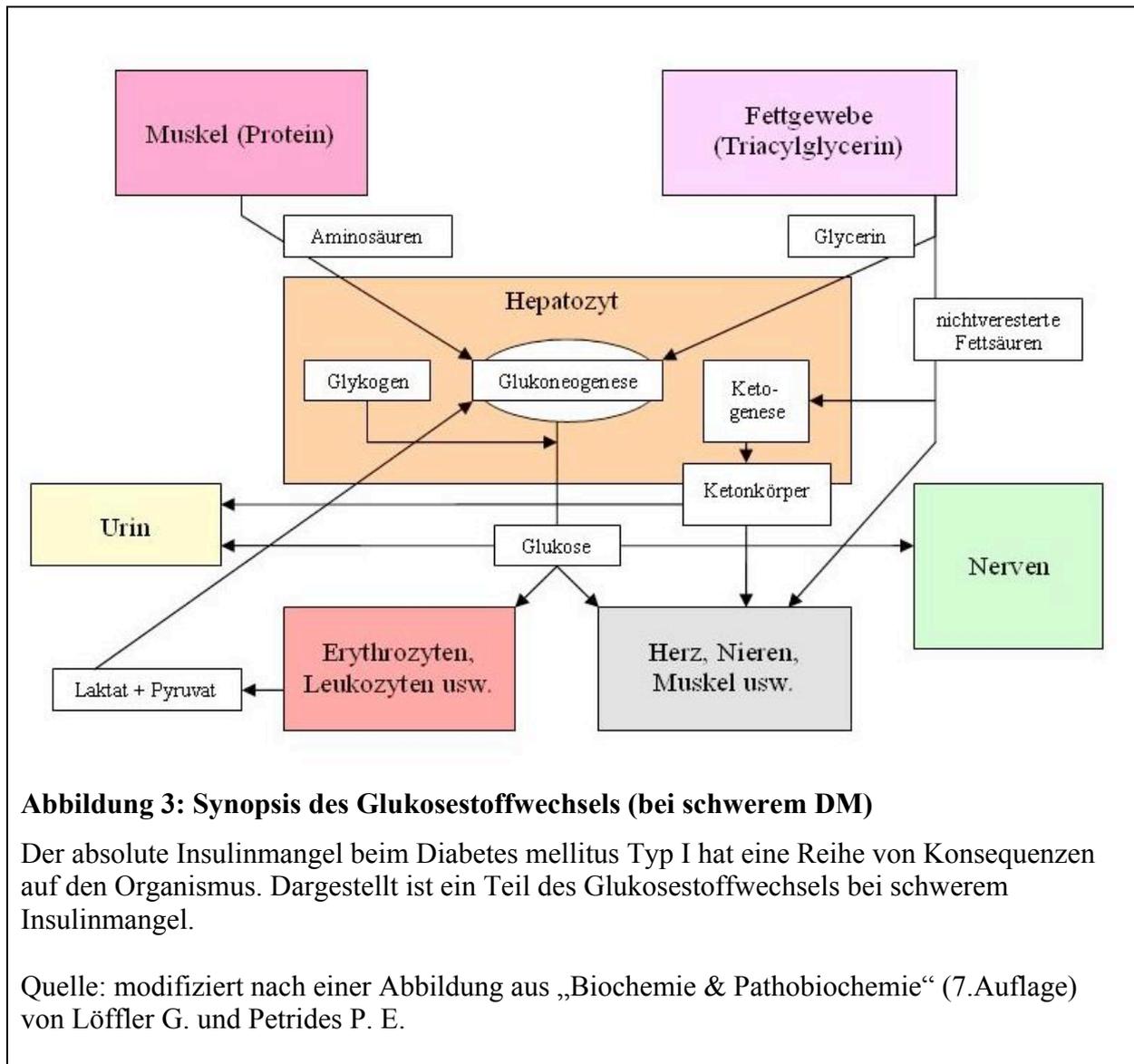


Abbildung 3: Synopsis des Glukosestoffwechsels (bei schwerem DM)

Der absolute Insulinmangel beim Diabetes mellitus Typ I hat eine Reihe von Konsequenzen auf den Organismus. Dargestellt ist ein Teil des Glukosestoffwechsels bei schwerem Insulinmangel.

Quelle: modifiziert nach einer Abbildung aus „Biochemie & Pathobiochemie“ (7.Auflage) von Löffler G. und Petrides P. E.

1.3.2. Diabetes mellitus Typ I

Bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ I werden die β -Zellen in den Langerhansschen Inseln durch eine autoimmun-bedingte Entzündung zerstört. Bei dieser sogenannten Insulitis werden spezifisch nur die β -Zellen destruiert, die anderen in den Inseln vorkommenden Zellen sind nur sehr selten mitbetroffen (Gepts u. Lecompte, 1981). Autoantikörper und spezifische T-Lymphozyten, die sich gegen Bestandteile der β -Zellen oder gegen Insulin direkt richten, können oft schon Jahre vor der Manifestation des Diabetes nachgewiesen werden (Harrison et al., 1993). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Insulitis ebenfalls schon vor der Manifestation des Diabetes besteht (Harrison et al. 1993), die Anzahl der β -Zellen jedoch noch ausreicht, um klinische Symptome zu verhindern. Erst bei

einem Verlust von mehr als 80-90% der funktionstüchtigen β -Zellen, kommt es zu einem symptomatischen Insulinmangel. Im Laufe der Zeit schreitet die chronisch-progressive Inselentzündung bis zur restlosen Zerstörung aller β -Zellen fort. Ist dieser Fall eingetreten, verschwinden im Folgenden auch konsekutive die Autoantikörper und die spezifischen T-Zellen (Kolb H, 1997). Der Patient bleibt jedoch lebenslang auf die exogene Zufuhr von Insulin angewiesen.

1.3.3. Diabetes mellitus Typ II

Beim Diabetes mellitus Typ II liegt pathophysiologisch eine bislang noch nicht abschließend geklärte Insulinresistenz vor. In den Industrieländern mit Über- und Fehlernährung sowie Bewegungsmangel tritt diese Form des DM mit steigender Tendenz auf. Sie ist die weltweit häufigste metabolische Erkrankung. In Deutschland liegt die Prävalenz zurzeit bei 4-10%; in den kommenden Jahren wird mit einem weiteren dramatischen Anstieg der Erkrankungshäufigkeit gerechnet (Zimmet P, 1995). Der Typ II Diabetes ist in erster Linie eine Zivilisationskrankheit. In Zeiten eines allgemeinen Nahrungsmittelmangels, etwa nach dem Zweiten Weltkrieg, trat die Krankheit kaum auf. Da trotz vergleichbarer Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten nicht alle Mitglieder einer Risikogruppe an einem DM Typ II erkranken, wurden schon lange prädisponierende genetische Faktoren vermutet. In den letzten beiden Jahren konnten insgesamt fünf Diabetesgene lokalisiert werden, mit denen 70% des genetischen Risikos erklärt werden können (Sladek R et al., 2007).

Die periphere Insulinresistenz, sowie die Dysfunktion der β -Zellen, sind wesentliche Ursachen der Hyperglykämie des Typ II Diabetes mellitus (Kahn CR 1994; DeFronzo RA 1988). Wegen der Insulinresistenz kommt es zu verminderter Glukoseutilisation in Insulinsensitiven Geweben. Initial gelingt es den β -Zellen, die herabgesetzte periphere Insulinempfindlichkeit durch eine vermehrte Insulinsekretion zu kompensieren (Weyer C et al., 1999). Im weiteren Verlauf der Erkrankung reicht die kompensatorische Mehrsekretion jedoch nicht mehr aus; es besteht ein relativer Insulinmangel, der eine persistierende, klinisch manifeste Hyperglykämie zur Folge hat (Kahn CR 1994; DeFronzo RA 1988). Beim Fortschreiten der Erkrankung kann die Insulinsekretion wegen einer dauerhaften Überlastung der β -Zellen unter die Normalleistung der gesunden Zellen sinken. Möglicherweise induzieren die Hyperglykämie und die damit einhergehende Hyperlipidämie eine Apoptose der β -Zellen und tragen auf diese Art zur Verminderung der Sekretionsleistung bei (D'Alessandris C et al, 2004).

2. Fragestellung

Dank der verbesserten operativen und perioperativen Möglichkeiten konnte die Anzahl der erfolgreich durchgeführten Leberresektionen in den letzten Jahren gesteigert werden.

Aufgrund der Ausweitung der Indikationsstellung für eine operative Therapie einerseits und die Verbesserung der nicht-operativen Therapieoptionen andererseits, erlangt die Risikobewertung von Begleiterkrankungen hinsichtlich der perioperativen Morbidität und Mortalität an Wichtigkeit. Ob der Diabetes mellitus als Risikofaktor angesehen werden muss ist wegen einer unklaren Datenlage ungewiss. Da die widersprüchlichen Studienergebnisse möglicherweise durch Selektionseffekte des Patientengutes zu erklären sind, soll in dieser Arbeit die Bedeutung des Diabetes mellitus im unselektierten Patientengut bewertet werden. Des Weiteren sollen die Auswirkungen des Diabetes mellitus auf die Leberregeneration im Tiermodell untersucht werden. Dazu werden bei einem Mausmodell mit absolutem Insulinmangel und bei einem Mausmodell mit Insulinresistenz eine 2/3 Leberresektion als Regenerationsstimulus durchgeführt. Für Hinweise auf die beteiligten Signalkaskaden während der Leberregeneration sollen die Zytokine IL-6, IGF-1 und GH im Serum der Tiere bestimmt werden. Die Arbeit soll sich den folgenden Fragen widmen:

1. Gibt es bei den Mäusen mit DM (Typ I und II) im Vergleich zur Kontrollgruppe Unterschiede der Liver-body-weight ratio im zeitlichen Verlauf der Leberregeneration?
2. Wie verhält sich der Hepatozytenmitoseindex nach Leberteilresektion bei Mäusen mit DM (Typ I und II) im Vergleich zur Kontrollgruppe?
3. Wie verhält sich der Mitoseindex der sinusoidalen Endothelzellen nach Leberteilresektion bei Mäusen mit DM (Typ I und II) im Vergleich zur Kontrollgruppe?
4. Gibt es Unterschiede in der Kinetik der IGF-1-Konzentrationen zwischen Mäusen mit DM (Typ I und II) und den Kontrollgruppen während der Leberregeneration?
5. Gibt es Unterschiede in der Kinetik der IL-6-Konzentrationen zwischen Mäusen mit DM (Typ I und II) und den Kontrollgruppen während der Leberregeneration?
6. Gibt es Unterschiede in der Kinetik der GH-Konzentrationen zwischen Mäusen mit DM (Typ I und II) und den Kontrollgruppen während der Leberregeneration?
7. Ist DM ein unabhängiger Risikofaktor für die perioperative Morbidität und Mortalität nach einer Leberteilresektion beim Menschen?

3 Material und Methoden

3.1. Tierexperimente

3.1.1. Versuchstiere

Für das Versuchsvorhaben wurden 56 männliche C57BL/6- Inzuchtmäuse (Taconic Germantown, NY, USA) sowie 49 männliche transgene Mäuse (LIRKO) und 43 Kontrollen (IR^{Lox-Lox}) (R.C. Kahn, Joslin Diabetes Center, HMS, Boston, MA, USA) verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Operation ca. 12 Wochen alt.

Alle Tiere wurden in einer pathogenfreien, durch die American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care akkreditierten Einrichtung und in Übereinstimmung mit den Anforderungen an eine humane Tierhaltung entsprechend den Richtlinien des United States Department of Agriculture und des United States Department of Health and Human Services gehalten. Die Versuchstiere waren einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt, wurden mit kommerziell erhältlicher Tiernahrung versorgt und hatten freien Zugang zu Trinkwasser. Alle experimentellen Protokolle wurden durch das Beth Israel Deaconess Medical Center Animal Care and Use Program, Boston, USA genehmigt.

In vielen Studien zu dem Thema Leberregeneration werden nicht Mäuse sondern Ratten als Versuchstiere verwendet. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Regeneration der Leber bei allen Nagetieren sehr ähnlich abläuft. Unterschiede gibt es jedoch bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Mitoseindices. So zeigen Ratten eine maximale DNA Synthese ca. 24h nach der Resektion, während Mäuse ihren maximalen Mitoseindex erst zwischen 36 und 40 h nach Resektion erreichen (Mangnall D et al., 2003).

3.1.2. Induktion des Diabetes Mellitus Typ I

Zur Induktion des DM Typ I wurde 36 C57BL/6-Mäusen Streptozotozin (STZ, Methylnitrosocarbamoyl- α -D-glucosamin, Sigma, St.Louis, MO, USA) injiziert. Aufgrund der toxischen Wirkung von Streptozotozin auf die β -Zellen des Pankreas, kommt es zu einem Verlust von ca. 97 % dieser Zellen (Dufrane D et al., 2006). Die Folge ist ein absoluter Insulinmangel. Auf die Leber oder andere Organe wirkt das für den beschriebenen Zweck schon lange etablierte STZ nicht toxisch.

Für eine suffiziente Zerstörung der β -Zellen wurden nach dem Single-dose-Schema 1 x 200 mg/kg KG Streptozotozin unmittelbar vor Anwendung in Citratpuffer (pH 4,5, 30 mM) gelöst und dann intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten eine Vehikel-Injektion, die im Volumen der STZ-Injektion entsprach. Die Applikation fand 24 Stunden vor der geplanten Operation statt.

3.1.3. Das LIRKO-Mausmodell (Diabetes mellitus Typ II)

Um die Stoffwechsellage beim Diabetes mellitus Typ II im Mausmodell zu simulieren, dienten Tiere mit einem knock-out des Insulinrezeptors auf den Hepatozyten (LIRKO, liver-specific insulin receptor knockout). Die LIRKO-Mäuse zeichnen sich durch eine ausgeprägte Glukoseintoleranz (Michael MD et al., 2000) und eine schwere Insulinresistenz aus (Simon J et al., 2003). Außerdem entsteht eine ausgeprägte Hyperinsulinämie, welche durch eine vermehrte Insulinsekretion und eine verminderte Insulin-clearance erklärt werden kann (Michael MD et al., 2000). Der erhöhte Blutzuckerspiegel erklärt sich durch eine verminderte Aufnahme des über die Nahrung zugeführten Zuckers in die Leber sowie die Unfähigkeit des Insulins, die Glukoneogenese in den Hepatozyten zu supprimieren.

Die verwendeten LIRKO-Mäuse und ihre Kontrollen (IR^{Lox-Lox}) wurden mit dem Cre/loxP-System (Metzger D, Chambon P., 2001) generiert und von R .C. Kahn freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.4. Blutglukosebestimmung

Am Vortag der geplanten Leberresektion wurde bei allen Tieren eine Messung der Blutglukosekonzentration (Prä-Glc) vorgenommen. Eine weitere Blutglukosebestimmung wurde vor der geplanten Entnahme der regenerierten Leber durchgeführt (Post-Glc). Dies geschah jeweils mittels Accu-Trend-Sensor Messgerätes (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) aus peripher gewonnenem Blut (Schwanzspitze). Der aus dem Gefäß austretende Blutstropfen wurde mit einem Accu-Trend Blutglukose-Meßstreifen (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) im nach Herstellervorschrift justierten Blutglukosegerät aufgenommen. Die Blutglukosekonzentration konnte nach wenigen Sekunden abgelesen werden. Die am Tag vor der Operation durchgeführte Messung diente auch als Bestätigung der diabetischen Stoffwechsellage bei den mit STZ behandelten Tieren. Während die nicht behandelten Tiere eine Blutzuckerkonzentration von unter 250 mg/dl aufwiesen, konnte bei den mit Streptozotozin behandelten Tieren ein Wert von über 300 mg/dl festgestellt werden.

3.1.5. Experimentelle Leberresektion

Die Nomenklatur der Leberlappen der Maus ist in der Literatur uneinheitlich. Die 3. Auflage der Nomina Anatomica Veterinaria (1983) legt folgende anatomische Termini fest: Lobus sinister lateralis und medialis, Lobus quadratus, Lobus dexter und Lobus caudatus mit Proc. caudatus und Proc. papillares (Abbildung 4).

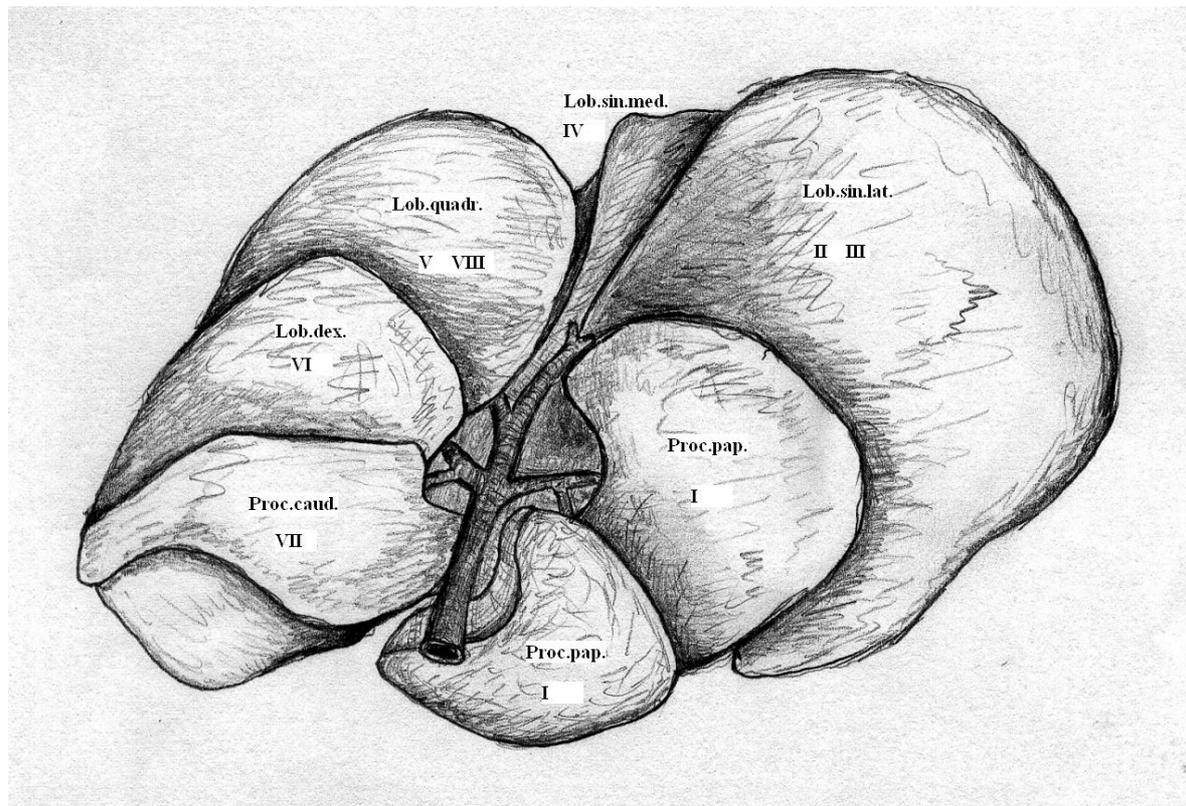


Abbildung 4: Anatomie der Mäuseleber

Ansicht von dorsocaudal auf die Leber einer Maus. Hier wird die ausgeprägte Lappung deutlich. Die Anatomie der Mäuseleber ermöglicht den Vergleich zu der in der Humanmedizin üblichen Segmenteinteilung nach Couinaud (1957).

Lob. sin. lat.	Lobus sinister lateralis
Lob. sin. med.	Lobus sinister medialis
Lob. quadr.	Lobus quadratus
Proc. pap.	Processus papillaris
Lob. dex.	Lobus dexter
Proc. caud.	Processus caudatus

Quelle: skizziert nach einem Vorbild von Födra C.

Die 2/3 PH erfolgte nach der von Higgins und Anderson (Higgins GM und Anderson RM, 1931) bereits 1931 beschriebenen Technik zur Leberteileresektion bei Ratten. Die Teilresektion der Leber ist ein Standardverfahren zur Induktion der Leberregeneration. Sie gilt als stärkster Regenerationsreiz der Leber und hat gegenüber der Leberparenchymschädigung mit toxischen Substanzen den entscheidenden Vorteil, dass die verbleibenden Hepatozyten durch diesen Eingriff nicht geschädigt werden (Bucher, 1991). Die Fähigkeit zur Regeneration bleibt auch nach mehrfachen Hepatektomien erhalten (Fausto, 2001).

Die Anzahl der von der G₀ Phase in die G₁ Phase übertretenden Zellen ist proportional zum resezierten Lebergewebe (Bengmark et al., 1973).

Die Entscheidung fiel aus zwei Gründen auf eine 2/3 Resektion. Diese bietet auf der einen Seite einen sehr starken Regenerationsreiz, andererseits aber auch hohe postoperative Überlebensraten. In der Literatur schwanken die Werte meist zwischen 90 und 100% für gesunde Tiere (z.B. Greene et al., 2003).

Aufgrund der ausgeprägten Lappung der Mäuseleber ist es mit dieser Technik möglich, ein definiertes Volumen an Leberparenchym mit relativ kleiner Resektionsfläche und geringem Blutungsrisiko zu entfernen. Die Operation wurde in Vorversuchen solange trainiert, bis eine Op-Zeit von 13±3 Minuten erreicht wurde.

Die Operation erfolgte mittels mikrochirurgischer Instrumente (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (stereoskopisches Zoommikroskop SMZ-U, Nikon, Melville, NY, USA).

Die Versuchstiere wurden mittels Pentobarbital (40-70 µg /gKG, Nembutal, Abbott, North Chicago, IL, USA) intraperitoneal narkotisiert. Anschließend wurde das zu operierende Tier auf dem Rücken liegend auf dem Operationstisch fixiert und unter semi-sterilen Bedingungen eine 1cm messende, am Xiphoid beginnende mediane Laparotomie durchgeführt. Nach Eröffnung der Bauchdecke wurden der Lobus lateralis sinister, der Lobus quadratus, sowie der Lobus medialis sinister hervorluxiert. Anschließend wurde eine basisnahe Ligatur (Seide, 6/0, Ethicon, Somerville, NJ, USA) um die drei Lappen platziert und mittels Schere das Parenchym reseziert.

Auftretende Blutungen wurden sorgfältig mit dem Elektrokauter gestillt.

Das verbleibende Leberrestgewebe (Abbildung 5), bestehend aus Lobus dexter, Processus caudatus und Processus papillaris, betrug ca. 1/3 des ursprünglichen Lebergewichtes (Bengmark et al., 1973).

Die Bauchdecke wurde mit fortlaufender Naht (Seide, 4/0, Ethicon, Somerville, NJ, USA) verschlossen. Das Trinkwasser der Tiere wurde post operationem zur Analgesie mit Buprenorphin versetzt (0,01 mg/ml, Buprenex, Reckitt & Colman, Richmond, VA, USA).

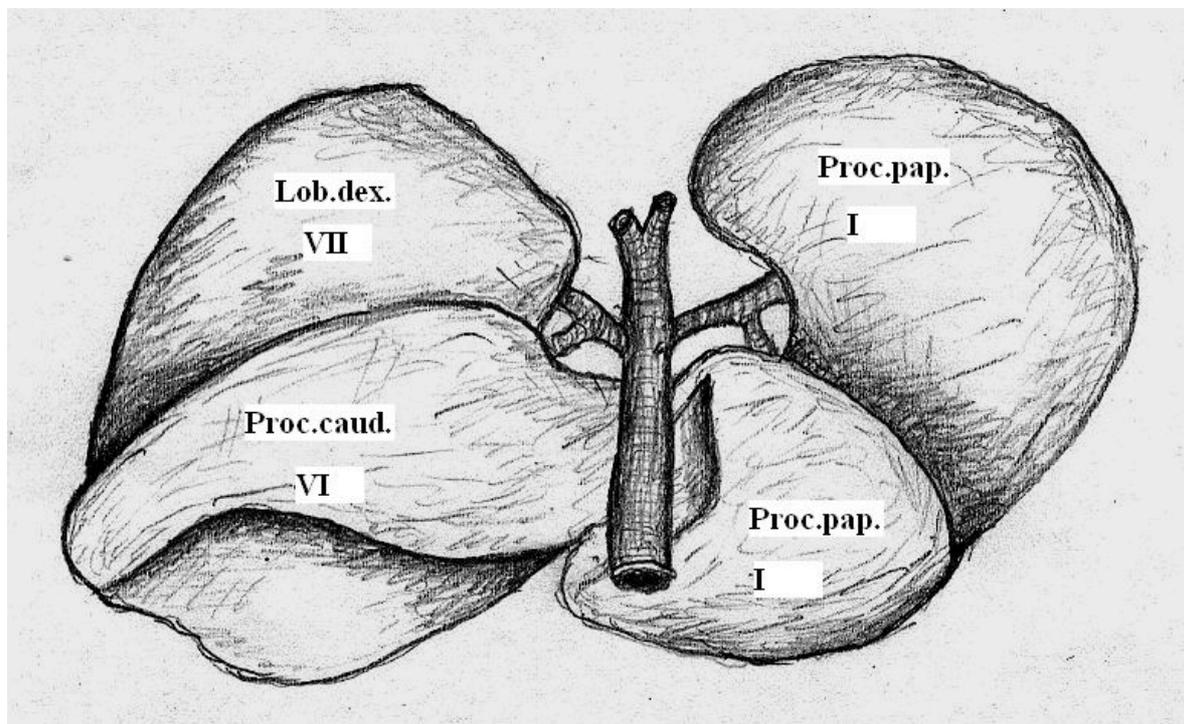


Abbildung 5: Anatomie der Mäuseleber nach 2/3 Resektion

Ansicht von dorsocaudal auf die resezierte Leber einer Maus.

Proc. pap.:	Processus papillaris
Lob. dex.:	Lobus dexter
Proc. caud.:	Processus caudatus

Quelle: skizziert nach einem Vorbild von Födra C.

3.1.6. Materialgewinnung

Nach Einleitung der Anästhesie (Pentobarbital 40-70 µg /gKG, Nembutal, Abbott, North Chicago, IL, USA) wurden die Tiere gewogen und auf dem Rücken liegend unter dem Operationsmikroskop fixiert. Dann wurde über eine mediane Laparotomie die Peritonealhöhle eröffnet und die regenerierte Leber entnommen und gewogen.

Neben den Ausgangswerten (ohne vorangegangene Leberresektion) zum Zeitpunkt 0, wurden die Proben je nach Gruppenzugehörigkeit 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Leberteileresektion (Mausmodell zum DM Typ I) bzw. 6, 24, 48 und 84 Stunden nach der Teilresektion (Mausmodell zum DM Typ II) gewonnen.

Zur Aufbewahrung bis zur Durchführung der Analysen wurden die Gewebeprobe(n) entweder in Formalin fixiert oder in flüssigem Stickstoff, teilweise unter Verwendung eines Gefriermediums (TBS, American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA) konserviert. Außerdem wurde mit einer heparinisierten Spritze das gesamte zirkulierende Blut aus der V. cava inferior entnommen. Die zentrifugierten Serumproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur endgültigen Analyse aufbewahrt.

3.1.7. Histologie

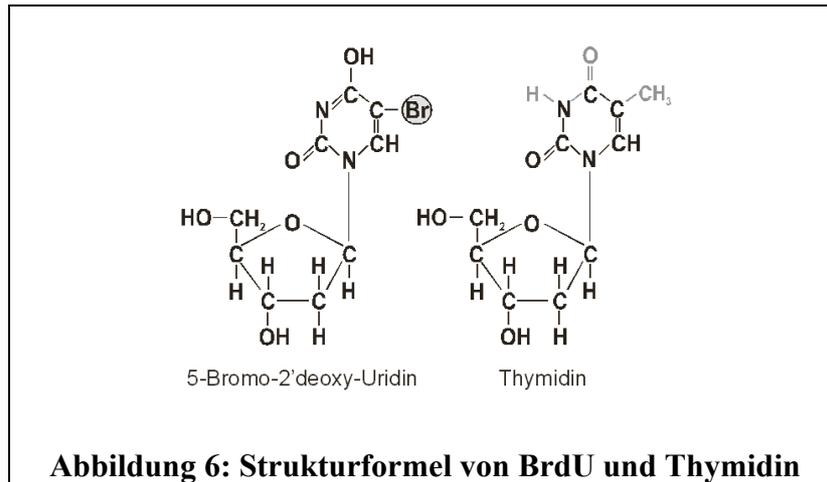
3.1.7.1. Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbung

Wie bei der Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Präparate beschrieben (3.1.7.2.), erfolgte die Trennung der Gewebestücke vom Formalin. Anschließend wurden die in Paraffin gebetteten Präparate am Mikrotom geschnitten (Dicke: 5 µm) und auf Objektträger gebracht. Dann wurden sie 15 bis 20 Sekunden in Hämatoxylin (Gill's II) (Kernfärbung) gebadet und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurden die Präparate dreimal in HCL-Alkohol (70%EtOH, 1%HCl) getaucht und im Folgenden mit heißem Leitungswasser gut gespült. Nun wurde das Zytoplasma mittels Eosin angefärbt (zwei bis fünf Sekunden). Zur Dehydratation der Präparate wurden sie wiederholt Alkohol ausgesetzt (Ethanol 95% (1 min), Ethanol 95% (1 min), Ethanol 100% (1 min), Ethanol 100% (1 min), Ethanol 100% (1 min), Xylene (1 -3 min), Xylene (1 -3 min)). Anschließend wurden die Leberschnitte mit „Mounting Medium“ eingedeckt und durch Aufbringen eines Deckglases geschützt. Alle für die HE-Färbung notwendigen Reagenzien wurden von American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA bezogen.

3.1.7.2. BrdU-Färbung

1982 entwickelte Gratzner (Gratzner HG, 1982) eine Methode zum Nachweis proliferierender Zellen: Die Inkorporation und den immunzytochemischen Nachweis von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU). BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon (Abbildung 6), das in gleicher Weise wie Thymidin dem Thymidinstoffwechsel (Thymidinkinase) unterliegt und in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzykluses kompetitiv anstelle von Thymidin in die Zell-DNA eingebaut wird.

Durch Gabe eines primären Antikörpers gegen BrdU schafft man die Bindungsstelle für einen weiteren Antikörper. Dieser sekundäre Antikörper bewirkt durch ein assoziiertes Enzym schließlich die Färbung der sich teilenden Zelle.



Diese Methode ermöglicht es, durch Bestimmung des Anteils der Zellen die sich in der S-Phase befinden, Aussagen über die Anzahl der sich teilenden Zellen zu machen. Setzt man die mit BrdU angefärbten Zellen mit den nicht angefärbten Zellen ins Verhältnis, so erhält man den Mitoseindex.

60 Minuten vor der Materialgewinnung erhielten die Versuchstieren 200 mg/kg KG Bromodeoxyuridin als intraperitoneale Injektion.

Das Lebergewebe wurde direkt nach der Operation in Formalin (Formalin 10% mit Phosphatpuffer, American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA), fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Präparate im „Tissue Processor“ (Tissue Processor, Thermo Shandon, Waltham, MA, USA) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 2x 95%, 3x 100% Ethanol und 3x Xylene [American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA]) vom Formalin getrennt und dehydriert. Dieser Vorgang erstreckte sich auf ca. 8-10 Stunden. Dann wurden die Gewebestücke in Paraffin eingebettet, zugeschnitten (5 µm) und auf Objektträger aufgebracht. Um das Gewebe vom Paraffin zu befreien, wurden die Präparate zweimal für jeweils vier Minuten in Xylene gelegt. Um das Xylene zu entfernen, wurden die Präparate für dreimal drei Minuten in 100%iges Ethanol und anschließend zweimal für jeweils drei Minuten in 95%iges Ethanol verbracht. Ein zweimaliges Waschen mit H₂O schloss diesen Schritt ab.

Im Folgenden wurden die Präparate, um die DNA zu denaturieren, unter hohem Druck für 10 Minuten heißem Citratpuffer (unterhalb des Siedepunktes) (Citratpuffer 10mM pH6.0 [American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA und USA]) ausgesetzt. Durch die DNA-Denaturierung wurde das als Antigen wirkende in die DNA eingebaute BrdU freigelegt. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Präparate für 15 bis 20 Minuten in Eiswasser. Daraufhin wurden die Proben für zweimal 5 Minuten in Phosphate-Buffered Saline (PBS /

Phosphat gepufferte Salzlösung, American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA) getaucht und dann mit Pferdeserum (7% in PBS, American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA) geblockt. Nach 30 Minuten wurde dieses entfernt und der primäre Antikörper über Nacht bei vier Grad Celsius hinzu gegeben (1:50 in PBS) (KI67, rat anti mouse, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Im nächsten Schritt wurden die Präparate zweimal mit PBS gespült, anschließend mit H₂O₂ in PBS 1:100 für 15 Minuten geblockt und wieder zweimal mit PBS gespült. Dann wurde der sekundäre Antikörper (biotinylated rabbit anti rat IgG, Vector Lab., Burlingame, CA, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Weiterhin wurde AB complexHRP in TRIS Puffer (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) der Anleitung entsprechend vorbereitet und bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf die Gewebe gegeben. Die Farbe wurde mit DAB Substrat (Vector Lab., Burlingame, CA, USA) entwickelt. Als Gegenfärbung diente Gill's II Hämatoxylin (American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA), welches für 5 Sekunden einwirken musste. Dann wurde erneut mit Xylene dehydriert, mit „Mounting Medium“ (Clear Mount, American Master Tech Scientific Inc., Lodi, CA, USA) fixiert und abschließend das Deckglas aufgebracht.

3.1.8. Auswertung der Präparate

3.1.8.1. Hämatoxylin Eosin (HE)-gefärbte Präparate

Die HE-gefärbten Präparate wurden angefertigt, um mit ihrem hohen Kontrast zur Bewertung der regenerierten Leber beizutragen und eine Gesamtübersicht zu liefern (Abbildung 7). Mit ihnen war es im Vergleich zu den BrdU-gefärbten Präparaten besser möglich, Veränderungen der Leberarchitektur zu beurteilen. Zur Untersuchung diente ein Mikroskop der Firma Leitz (Ortholux II, Leitz, Wetzlar, Deutschland).

3.1.8.2. BrdU-gefärbte Präparate

Die Präparate wurden mit einem Mikroskop (Ortholux II, Leitz, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Dazu wurden bei 400-facher Vergrößerung die BrdU-positiven sowie -negativen Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen in zehn Gesichtsfeldern eines jeden Präparates ausgezählt. Die Fotodokumentation erfolgte mit einer hochauflösenden Digitalkamera (DXC- 930P, Sony, Tokyo, Japan). Zur Demonstration des Bildmaterials sind im Folgenden einige BrdU gefärbte Leberschnitte, aufgenommen in verschiedenen Regenerationsstadien, exemplarisch dargestellt (Abbildung 8 bis 11).

3.1.9. Histologische Aufnahmen

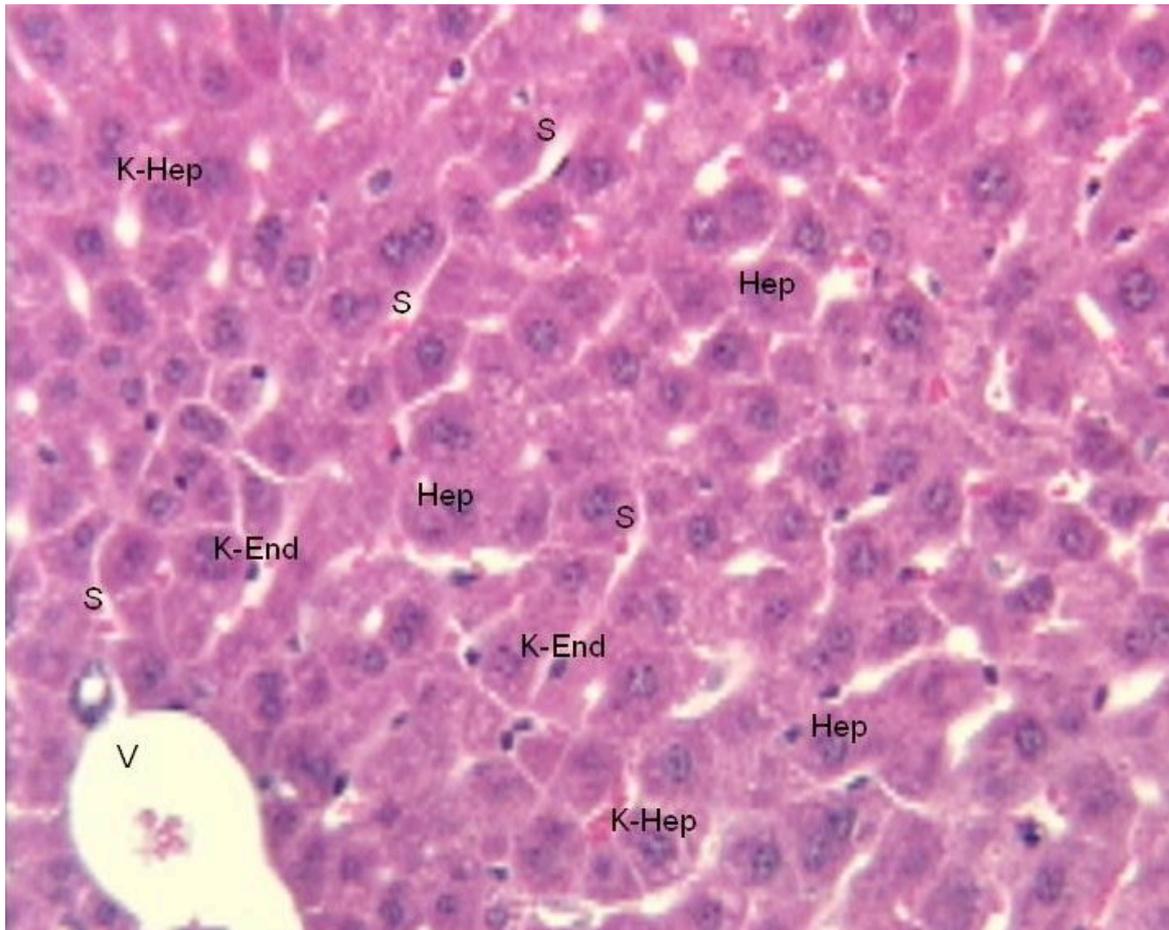


Abbildung 7: murines Lebergewebe in der HE-Färbung, 48h postOP

Zu sehen sind Lebersinus (S), gebildet von Hepatozyten (Hep), die auf die V. centralis (V) zulaufen. Des Weiteren können die Kerne von Endothelzellen (K-End) und Hepatozyten (K-Hep) unterschieden werden. Diese Färbung dient der Übersichtsgewinnung. So kann festgestellt werden, ob die Architektur des regenerierten Lebergewebes mit dem einer unbehandelten Leber übereinstimmt oder Differenzen z.B. in der Zellgröße aufweist.

Lebersinus (S)
Hepatozyten (Hep)
Vena centralis (V)
Kern einer Endothelzelle (K-End)
Kern eines Hepatozyten (K-Hep)

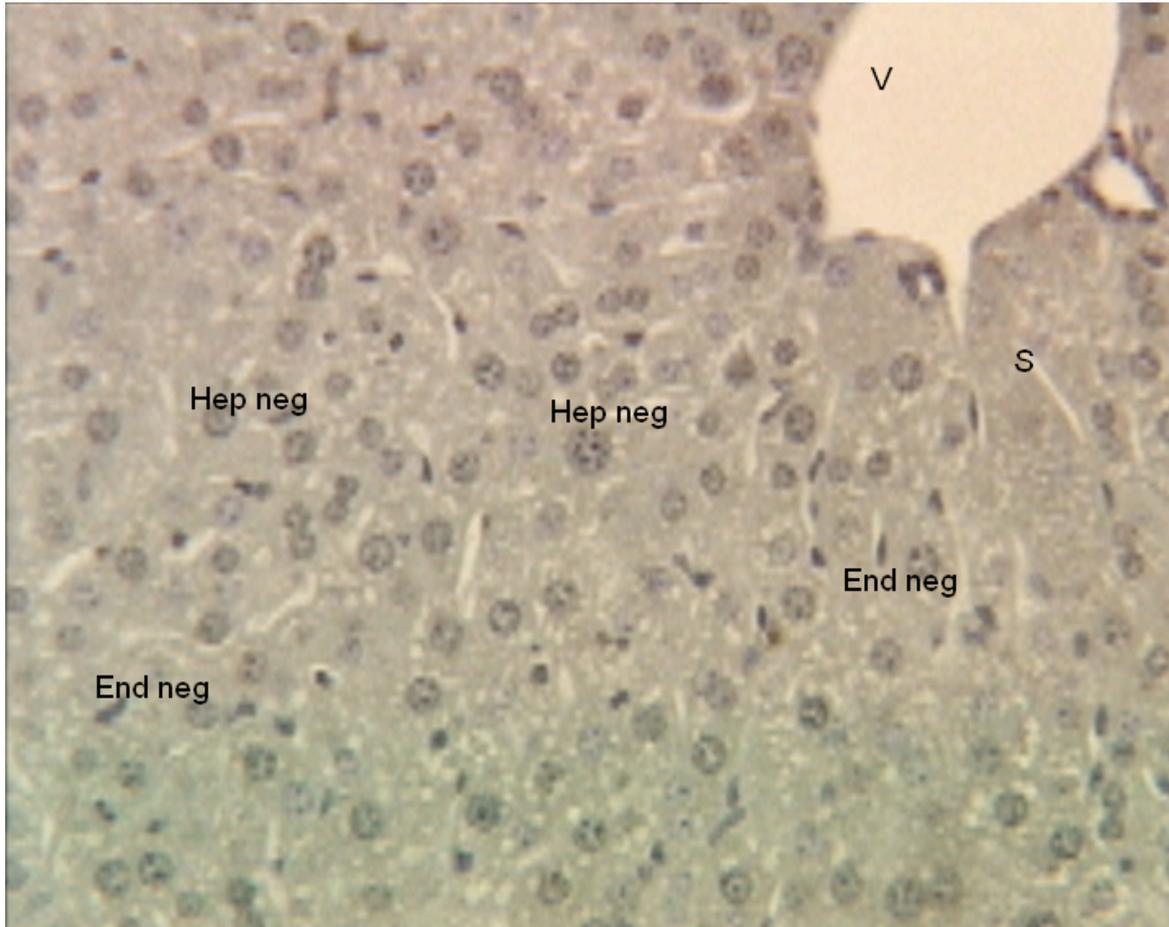


Abbildung 8: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung vor Beginn der Regeneration

BrdU-gefärbtes Leberpräparat, gewonnen zum Zeitpunkt vor Beginn der Regeneration. Dementsprechend sind keine mit BrdU gefärbten Zellen zu identifizieren.

- Negativer Hepatozyt (Hep neg)
- Negative Endothelzelle (End neg)
- Vena centralis (V)
- Lebersinus (S)

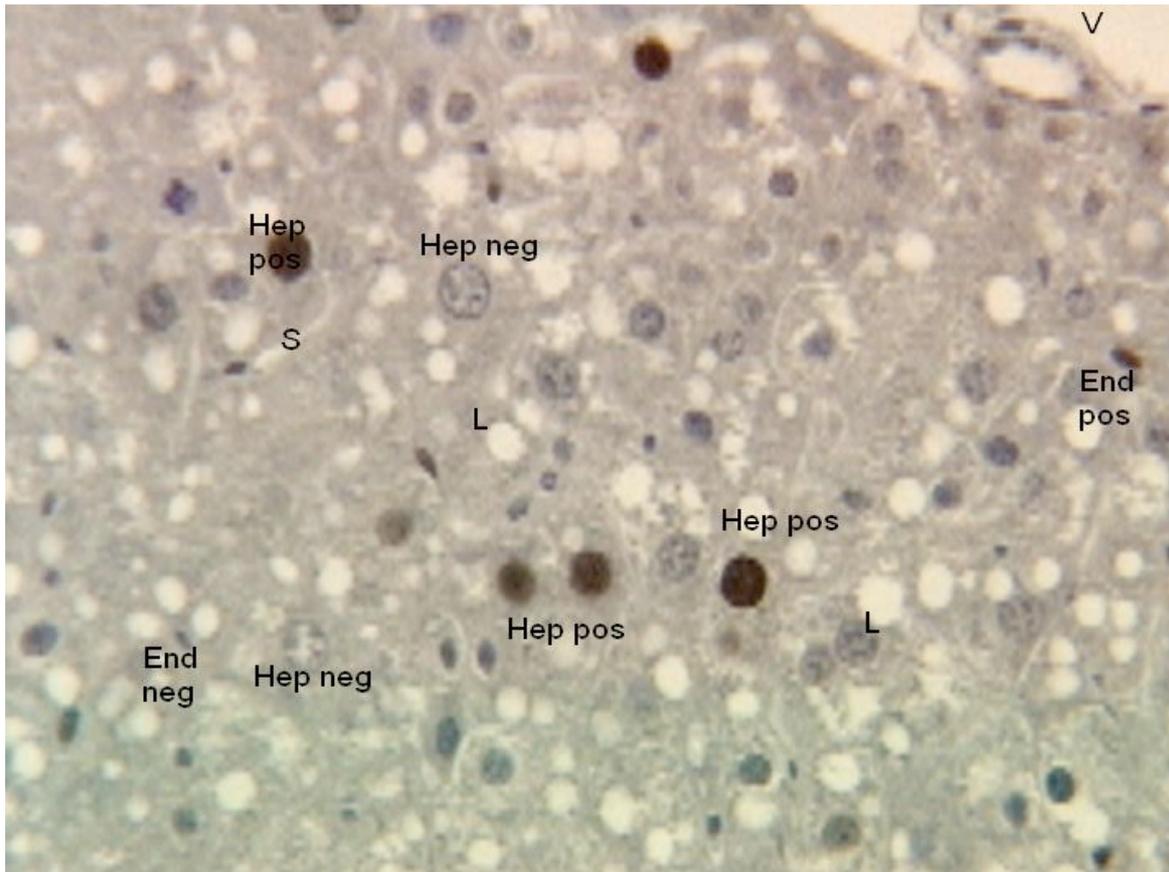


Abbildung 9: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung, gewonnen 48h postOP

Zu sehen ist ein BrdU-gefärbtes Leberpräparat. Hier fällt die hohe Anzahl von Lipidgranula (L) innerhalb der Leberzellen auf.

- Lipidgranula (L)
- Positiver Hepatozyt (Hep pos)
- Negativer Hepatozyt (Hep neg)
- Positive Endothelzelle (End pos)
- Negative Endothelzelle (End neg)
- Vena centralis (V)
- Lebersinus (S)

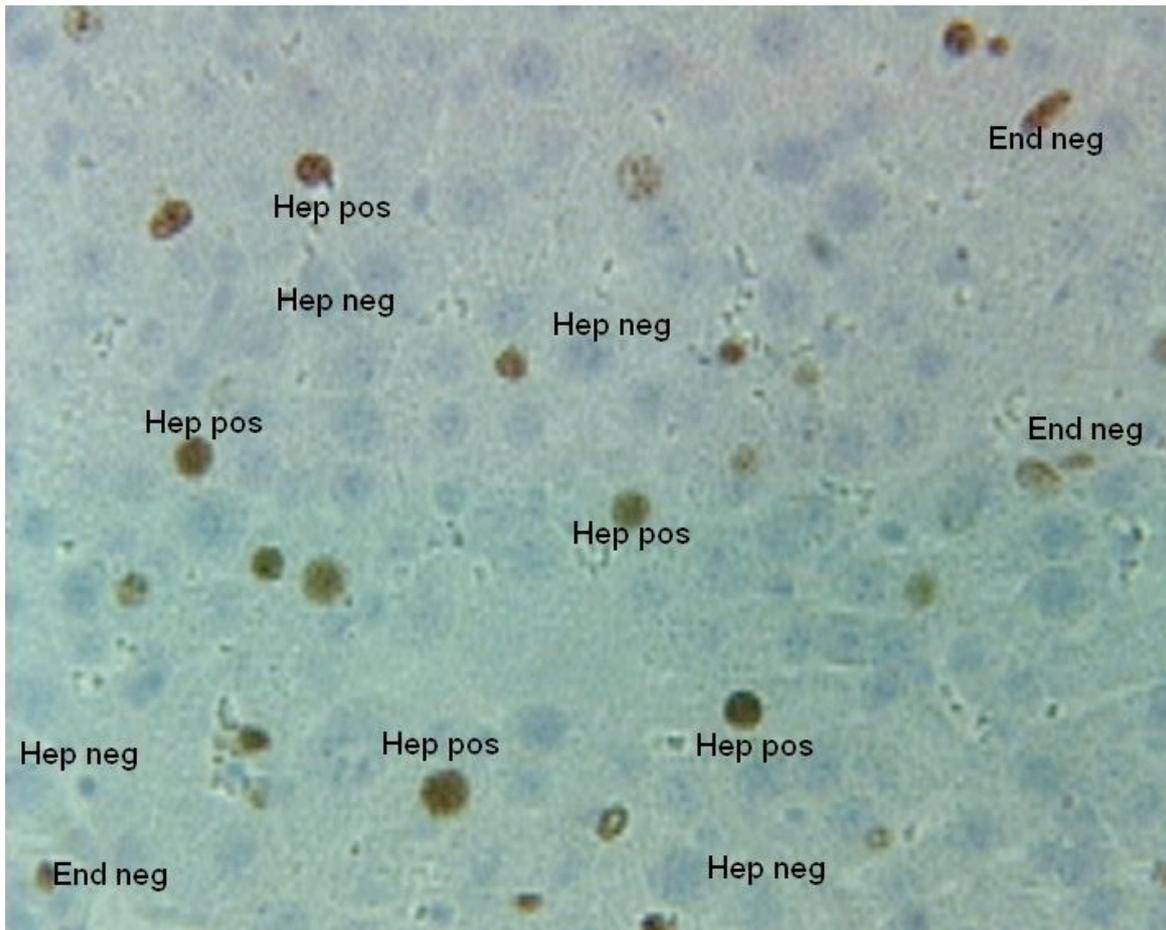


Abbildung 10: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung zum Zeitpunkt hoher Regeneration

Die sich in der Mitose befindenden Zellen sind braun gefärbt und werden als „positiv“ bezeichnet. Ruhende Zellen (G_0 -Phase) nehmen kein BrdU auf. Sie sind hier hellblau gefärbt und werden als „negativ“ bezeichnet.

In diesem Präparat fällt die hohe Anzahl der positiven Zellen auf. Es wurde zum Zeitpunkt sehr hoher Regeneration gewonnen, also im Moment einer sehr hohen Zellteilung.

- Positiver Hepatozyt (Hep pos)
- Negativer Hepatozyt (Hep neg)
- Positive Endothelzelle (End pos)
- Negative Endothelzelle (End neg)

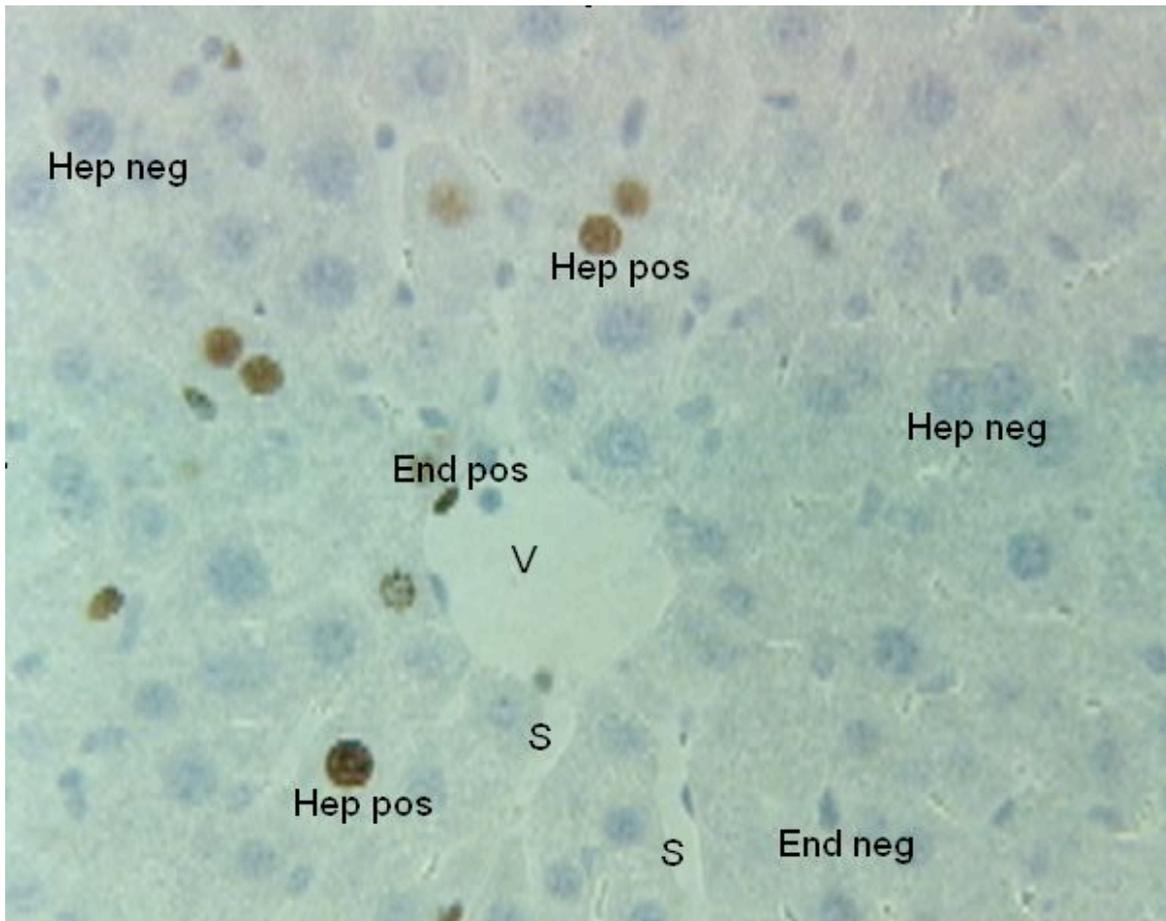


Abbildung 11: murines Lebergewebe in der BrdU-Färbung, 96h postOP

Das BrdU-gefärbte Präparat zeigt eine angeschnittene Zentralvene, welche einige gut sichtbare Endothelzellen in ihrem Lumen aufweist. Die sich in der Regeneration befindenden Endothelzellen nehmen analog zu den Hepatozyten BrdU auf und stellen sich demzufolge bräunlich dar.

- Positiver Hepatozyt (Hep pos)
- Negativer Hepatozyt (Hep neg)
- Positive Endothelzelle (End pos)
- Negative Endothelzelle (End neg)
- Vena centralis (V)
- Lebersinus (S)

3.1.10. Serumparameter (IGF-1 / IL-6 / GH)

Aus den Versuchsgruppen STZ und LIRKO und den jeweiligen Kontrollen (Wt und IR^{Lox-Lox}) wurde bei drei zufällig ausgewählten Tieren IL-6, IGF-1 sowie GH zu den Zeitpunkten 24 und 48 bzw. 6 und 48 Stunden nach der Leberteilresektion im Serum bestimmt.

Die Quantifizierung der GH, IGF-1 und IL-6 Konzentration im Serum der Versuchsmäuse wurde jeweils mit einem „one-step“, „sandwich-type“ ELISA (Mouse / Rat Growth hormone ELISA DSL-10-72100 ACTIVE, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA / Quantikine Mouse IGF-I Immunoassay, Catalog Number MG100, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA / Quantikine Mouse IL-6 Immunoassay, Catalog Number M6000B, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) nach den Herstellerangaben vorgenommen.

Folgende Vorgehensweise kam dabei, beispielhaft für die GH-Konzentrationsbestimmung beschrieben, zur Anwendung:

Die mitgelieferten Standards, Kontrollen und das Testserum wurden in verschiedene Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, welche mit anti-Maus-GH-Antikörpern beschichtet waren, gegeben. Zusätzlich kamen freie anti-GH-Antikörper hinzu, die an einem Ende das Enzym Meerrettichperoxidase gebunden hatten. Nach der Inkubation wurde die Platte gewaschen und anschließend Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Dies diente als Substrat für die Peroxidase und wurde in einem definierten Zeitabschnitt teilweise in einen Farbstoff verwandelt. Die Intensität des entstandenen Farbstoffes wurde fotometrisch bei 450 und 620 nm gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration des in seiner Konzentration zu bestimmenden Wachstumshormons.

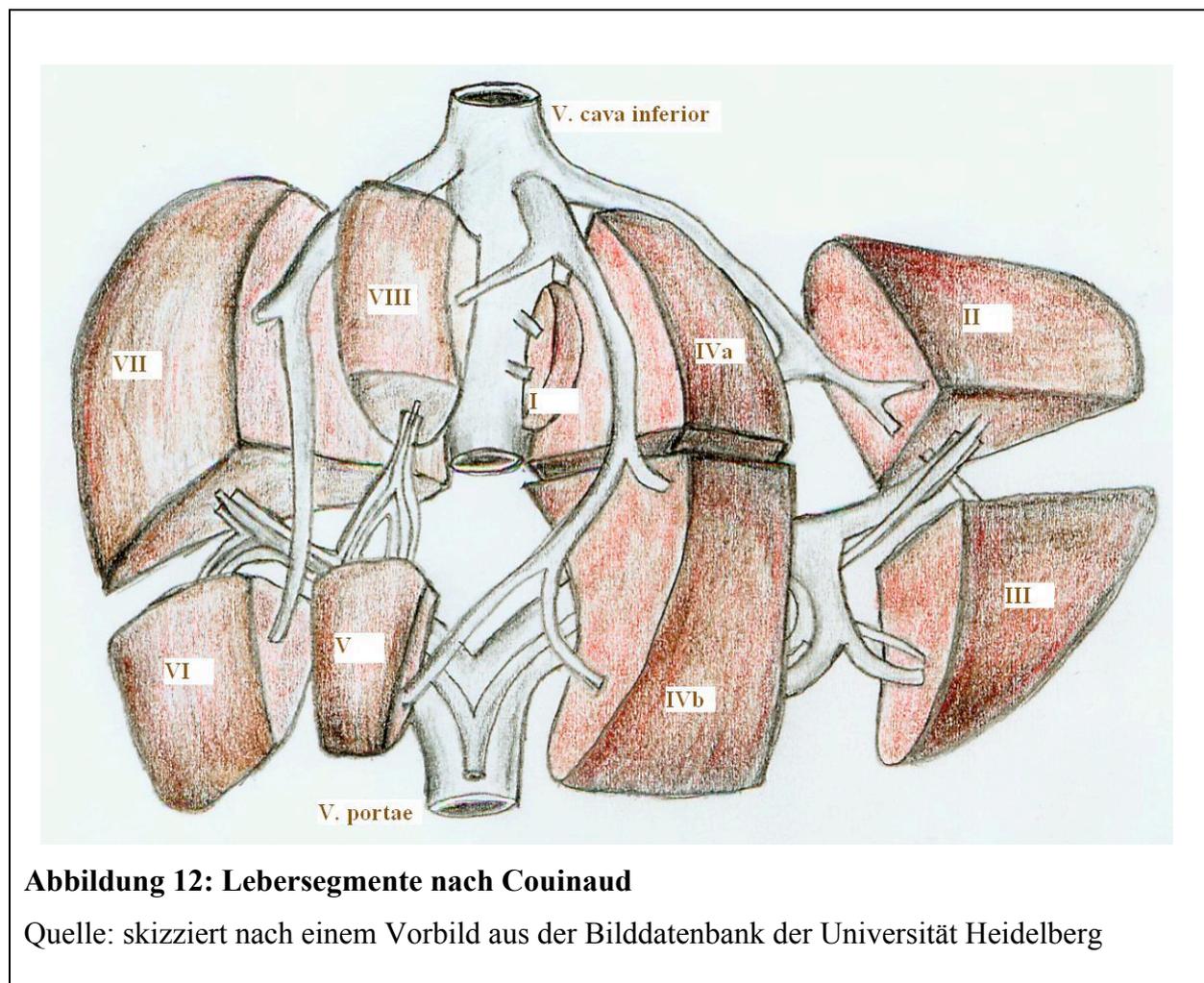
3.2. Klinische Studie

3.2.1. Patienten

Im Zeitraum von Januar 1989 bis Dezember 2003 sind konsekutive 2369 Leberresektionen erfasst worden. 633 Patienten, welche weder eine große Bauchoperation noch eine Chemotherapie in der Vorgeschichte erhalten hatten, wurden ausgewertet. Patienten nach Leberlebenspende oder mit multivisceralen Resektionen wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen.

3.2.2. Definitionen

Das Ausmaß der Leberresektion wurde nach den in die Operation involvierten Couinaud-Segmenten (Couinaud, 1954) klassifiziert (Abbildung 12).



Die Klassifikation der Leberzirrhose erfolgte vor der Operation nach dem Child-Pugh Score (Pugh et al., 1973). Um eine mögliche Hepatitis B (HBV) oder C (HCV) zu diagnostizieren, wurde das Hepatitis B surface-Antigen bzw. Hepatitis C Antikörper im präoperativ gewonnenen Patientenserum bestimmt. Die Menge des täglichen Alkoholkonsums stützte sich auf anamnestische Angaben. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus wurde definiert als ein Nüchternblutzuckerwert von über 126 mg/dl oder durch die Notwendigkeit blutzuckerkontrollierender Medikamente. Als perioperativer Tod wurden tödlich verlaufende Komplikationen während des stationären Aufenthaltes oder innerhalb der ersten 30 Tage nach der Operation bewertet. Als Komplikation wurden solche Ereignisse definiert, die den Krankenhausaufenthalt des Patienten beeinflussten, wie z. B. die Notwendigkeit endoskopischer, radiologischer und chirurgischer Eingriffe, oder eine verlängerte stationäre oder intensivpflichtige Behandlung erforderten.

3.2.3. Weitere Variablen

Demographische Basisdaten wie Alter zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs, Geschlecht, chirurgische Diagnose, das Jahr der Operation und die Todesursache wurden ebenfalls dokumentiert.

Weitere präoperative Variablen, die in die Studie einfließen, sind Gesamtbilirubin, Albuminkonzentration und Prothrombinzeit (Quick). Ein klinisch vorhandener Ikterus oder ein Aszites wurden ebenso registriert wie das temporäre intraoperative Abklemmen des Lig. hepatoduodenale und der darin verlaufenden Gefäße (Pringle Manöver [Pringle, 1908]) während der Resektion.

3.3. Statistik

Für alle Daten, soweit nicht anderes angegeben, wird der Median mit Minimum und Maximum des Messbereichs oder der Mittelwert \pm der Standardabweichung (SD) angegeben. Kontinuierliche Variablen mit Gauss'scher Normalverteilung wurden mit dem Students-unpaired-t-test verglichen. Für kategorische Variablen wurden der χ^2 -Test benutzt. Kontinuierliche Variable ohne Gauss'sche Normalverteilung wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz überprüft. Um Zusammenhänge zwischen perioperativer Mortalität und möglichen Patientenselektionskriterien zu bestimmen, wurde ein multivariates logistisches Regressionsmodell verwendet. Schrittweise wurden so unabhängige Risikofaktoren ermittelt. Alle Variablen mit signifikantem Einfluss in der univariaten Analyse wurden in das Regressionsmodell einbezogen. Alle Berechnungen wurden mit der Software SPSS (Version 12.0 für Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1. Experimentelle Leberregeneration

4.1.1. Überlebenstabeln

4.1.1.1. DM Typ I (STZ)

Insgesamt wurden 56 männliche C57BL/6- Inzuchtmäuse operiert. Von den operierten Tieren verstarben innerhalb des Versuchszeitraumes 22. 20 davon stammten aus der mit STZ behandelten Gruppe der diabetischen Mäuse. Die anderen beiden Tiere waren Wildtypmäuse aus der Vergleichsgruppe. Damit ergibt sich eine Überlebensrate von 90% bei den unbehandelten Mäusen und von 44,44% bei den mit STZ behandelten Tieren. In der Gruppe der diabetischen Mäuse sind von den insgesamt verstorbenen Tieren vier infolge perioperativer Blutungen verstorben.

Werden die aufgrund technischer Komplikationen verstorbenen Tiere nicht mit einbezogen, so ergibt sich eine Überlebensrate von 55,6% in der Gruppe der diabetischen Mäuse (Tabelle 1).

	Wildtyp	STZ
Tiere insgesamt	20	36
Gestorben:		
insgesamt	2	20
intra OP	0	4
innerhalb der Regenerationszeit	2	16
innerhalb von 24h	0	6
innerhalb von 48h	2	10

Tabelle 1: Versuchstiere (DM Typ I)

Die Tabelle gibt die Todeszeitpunkte der mit Streptozotizin (STZ) behandelten Tiere und der Vergleichsgruppe (Wildtyp) wieder.

4.1.1.2. DM Typ II (LIRKO)

Im Rahmen des Experimentes wurden insgesamt 92 Mäuse operiert, 43 Kontrolltiere ($IR^{Lox-Lox}$) sowie 49 Mäuse mit einem knock-out des Insulinrezeptors auf den Hepatozyten (liver-specific insulin receptor knockout, LIRKO). Von den operierten Tieren verstarben innerhalb des Versuchszeitraumes 17 Tiere. 10 der Tiere gehörten zur Gruppe der LIRKO-Mäuse, die übrigen sieben gehörten zur Kontrollgruppe. Sechs weitere Tiere (drei aus der Gruppe der LIRKO-Mäuse und drei aus der Kontrollgruppe) mussten aus operativ technischen Gründen ausgeschlossen werden. Für die LIRKO-Mäuse ergibt sich eine Überlebensrate von 81,6%, in der Kontrollgruppe überlebten 86,1% den Versuchszeitraum (Tabelle 2).

	$IR^{Lox-Lox}$	LIRKO
Tiere insgesamt	43	49
aus technischen Gründen ausgeschlossen	3	3
Gestorben:		
insgesamt	7	10
intra OP	2	1
innerhalb der Regenerationszeit	5	9
innerhalb von 24h	2	3
innerhalb von 48h	2	3
innerhalb von 72h	1	3

Tabelle 2: Versuchstiere (DM Typ II)

Die Tabelle gibt die Todeszeitpunkte der LIRKO-Tiere und der Vergleichsgruppe ($IR^{Lox-Lox}$) wieder.

4.1.2. Blutglukose

4.1.2.1. DM Typ I (STZ)

Die prä- und post- operativen Blutglukosekonzentrationen der diabetischen- und Wildtyp Mäuse zeigen erwartungsgemäß signifikante Unterschiede (Glukosekonzentration präOP Wildtyp (Prä-Glc Wt) vs. Glukosekonzentration präOP STZ (Prä-Glc STZ): $159,6 \pm 37,2$ mg/dl vs. $393,4 \pm 92,2$ mg/dl; $p < 0,001$ / Glukosekonzentration postOP Wildtyp (Post-Glc Wt) vs. Glukosekonzentration postOP STZ (Post-Glc STZ): $101,2 \pm 42,4$ mg/dl vs. $347,6 \pm 106,0$ mg/dl; $p < 0,001$) (Tabelle 3).

Die Blutglukosekonzentration der vorzeitig verstorbenen Tiere scheint im Mittel in beiden Gruppen über den Werten der übrigen Tiere zu liegen. Es besteht jedoch keine Signifikanz

(Differenz der Mittelwerte: Wt: 59,9 mg/dl, $p = 0,062$; STZ 55,3 mg/dl, $p = 0,179$).

Versuchsgruppe	Prä-Glc (mg/dl)	Post-Glc (mg/dl)
Wt überlebt	159,6 ± 37,2	101,2 ± 42,4
Wt verstorben	219,5 ± 84,0	
STZ überlebt	393,3 ± 92,2	347,6 ± 106,0
STZ verstorben	448,7 ± 72,9	

Tabelle 3: Blutglukose Wt / STZ

Die Tabelle gibt für beide Versuchsgruppen (Wt = Wildtyp (Kontrolle), STZ = Streptozotocin induzierter DM) die prä- und postoperativen Blutglukosekonzentrationen (Prä-Glc und Post-Glc) wieder (Mittelwert ± Standardabweichung). Für die während der Regeneration verstorbenen Tiere wird die präoperative Glukosekonzentration angegeben.

4.1.2.2. DM Typ II (LIRKO)

Bei der Gegenüberstellung der Blutzuckerkonzentrationen der beiden Gruppen bestätigt sich der erwartete Unterschied zwischen der Versuchsgruppe (LIRKO) und der Kontrollgruppe ($IR^{Lox-Lox}$). Die Tiere mit Insulinresistenz zeigen präoperativ eine höhere Blutglukosekonzentration (Prä-Glc $IR^{Lox-Lox}$ vs. Prä-Glc LIRKO: $160,8 \pm 77,8$ vs. $296,6 \pm 170,4$; $p < 0,001$). Postoperativ findet sich kein signifikanter Unterschied (Post-Glc $IR^{Lox-Lox}$ vs. Post-Glc LIRKO: $82,2 \pm 23$ vs. $107,8 \pm 77,4$; $p = 0,126$).

Versuchsgruppe	Prä-Glc (mg/dl)	Post-Glc (mg/dl)
$IR^{Lox-Lox}$ überlebt	160,8 ± 77,8	82,2 ± 23
$IR^{Lox-Lox}$ verstorben	147,7 ± 74,9	
LIRKO überlebt	296,6 ± 170,4	107,8 ± 77,4
LIRKO verstorben	273,3 ± 158,7	

Tabelle 4: Blutglukose $IR^{Lox-Lox}$ / LIRKO

Die Tabelle gibt für beide Versuchsgruppen ($IR^{Lox-Lox}$ = Kontrolle und LIRKO = Mausmodell für DM Typ II) die prä- und postoperativen Blutglukosekonzentrationen (Prä-Glc und Post-Glc) wieder (Mittelwert ± Standardabweichung). Für die während der Regeneration verstorbenen Tiere ist die präoperative Glukosekonzentration angegeben.

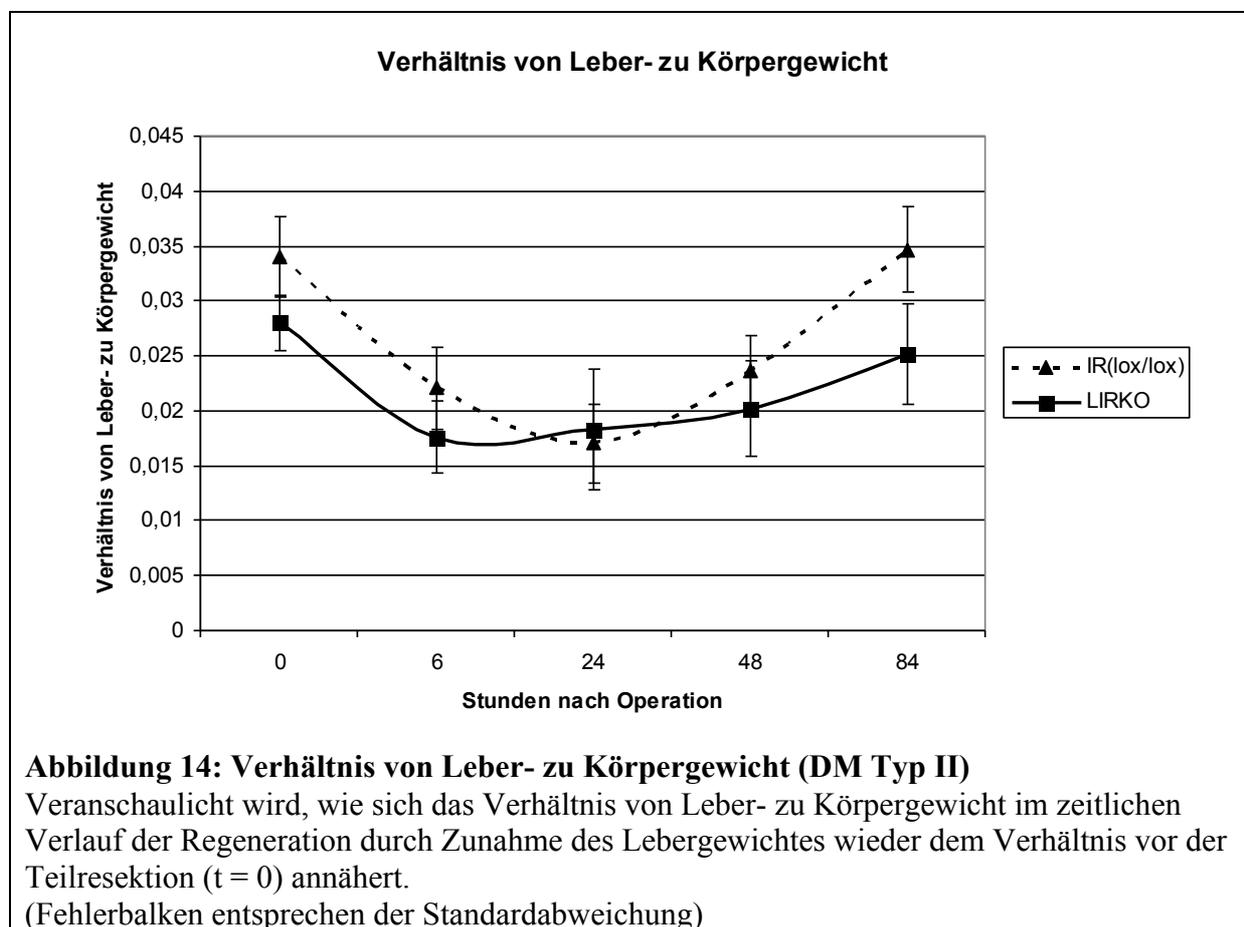
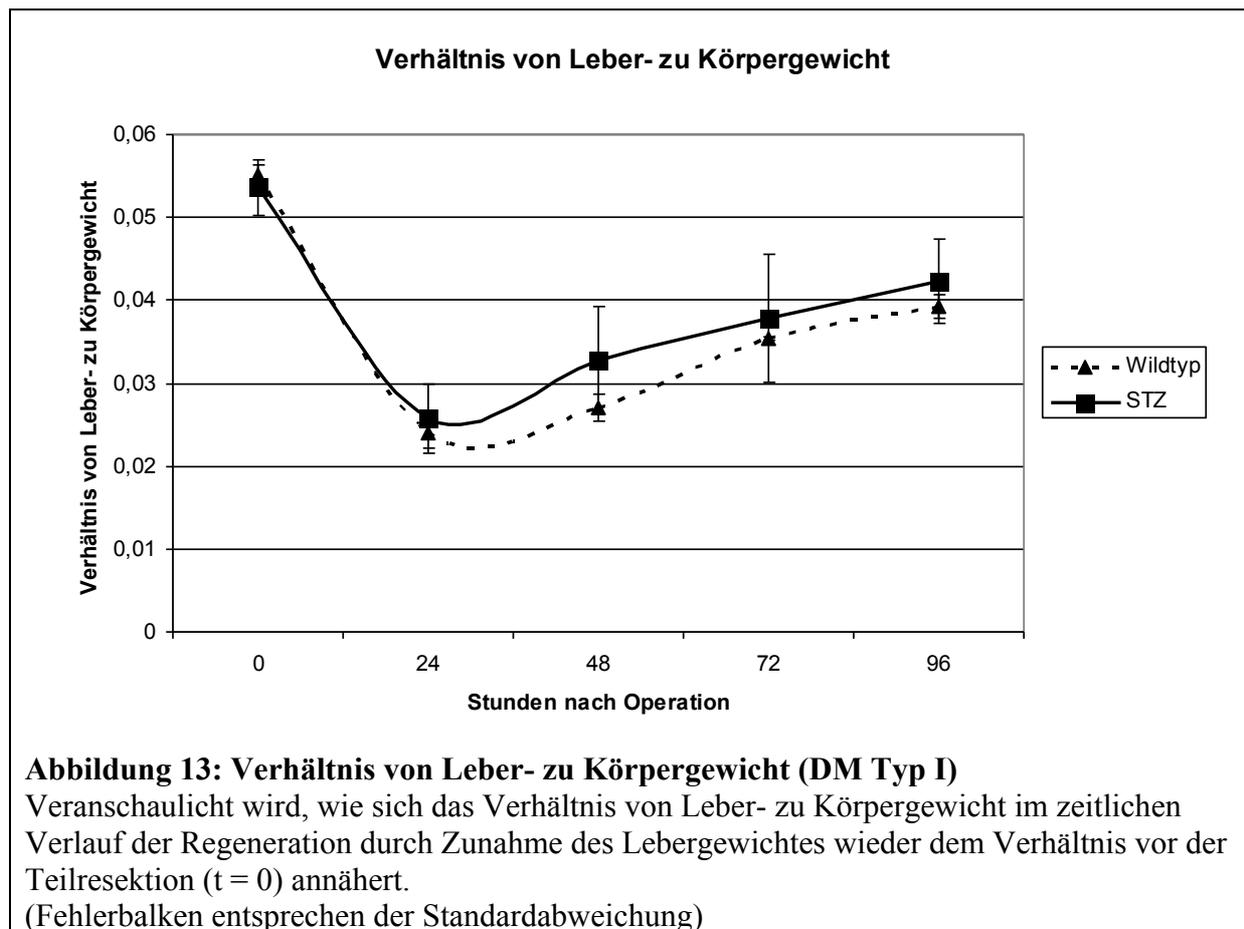
4.1.3. Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht

Um einen Ausgangswert für das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht (liver-body-weight-ratio, L/B ratio) zu erhalten, wurde in beiden Versuchs- und den entsprechenden Kontrollgruppen die L/B ratio bei nicht operierten Tieren ermittelt.

Beim Vergleich der Körpergewichte vor der Operation fiel auf, dass die Mäuse mit einem induziertem Diabetes mellitus Typ I bei ähnlichen Standardabweichungen im Schnitt um 3,9 Gramm leichter waren als die gesunden Kontrollmäuse. Auch die Tiere mit dem Insulinrezeptor-knock-out auf den Hepatozyten (LIRKO) wiesen ein um 3,2g leichteres Durchschnittsgewicht als die Kontrollgruppe auf.

Die mit STZ behandelten Mäuse zeigten 96h nach der Leberteileresektion vergleichbare L/B ratios wie die unbehandelten Wildtypmäuse. Auch die Ausgangswerte der Tiere stimmten in beiden Versuchsgruppen, trotz der unterschiedlichen initialen Körpergewichte in den beiden Populationen, überein. Der Kurvenverlauf beider Gruppen verläuft weitestgehend kongruent zueinander (Abbildung 13).

Bei den LIRKO-Mäusen zeigt die liver-body-weight-ratio 84h nach der Leberresektion einen Trend zu inkompletter Regeneration ($0,025 \pm 0,0045$ nach 84h vs. $0,028 \pm 0,0024$ nach 0 h, $p = 0,089$). Die Vergleichsgruppe erreicht im selben Zeitraum wieder den Ausgangswert (Abbildung 14).



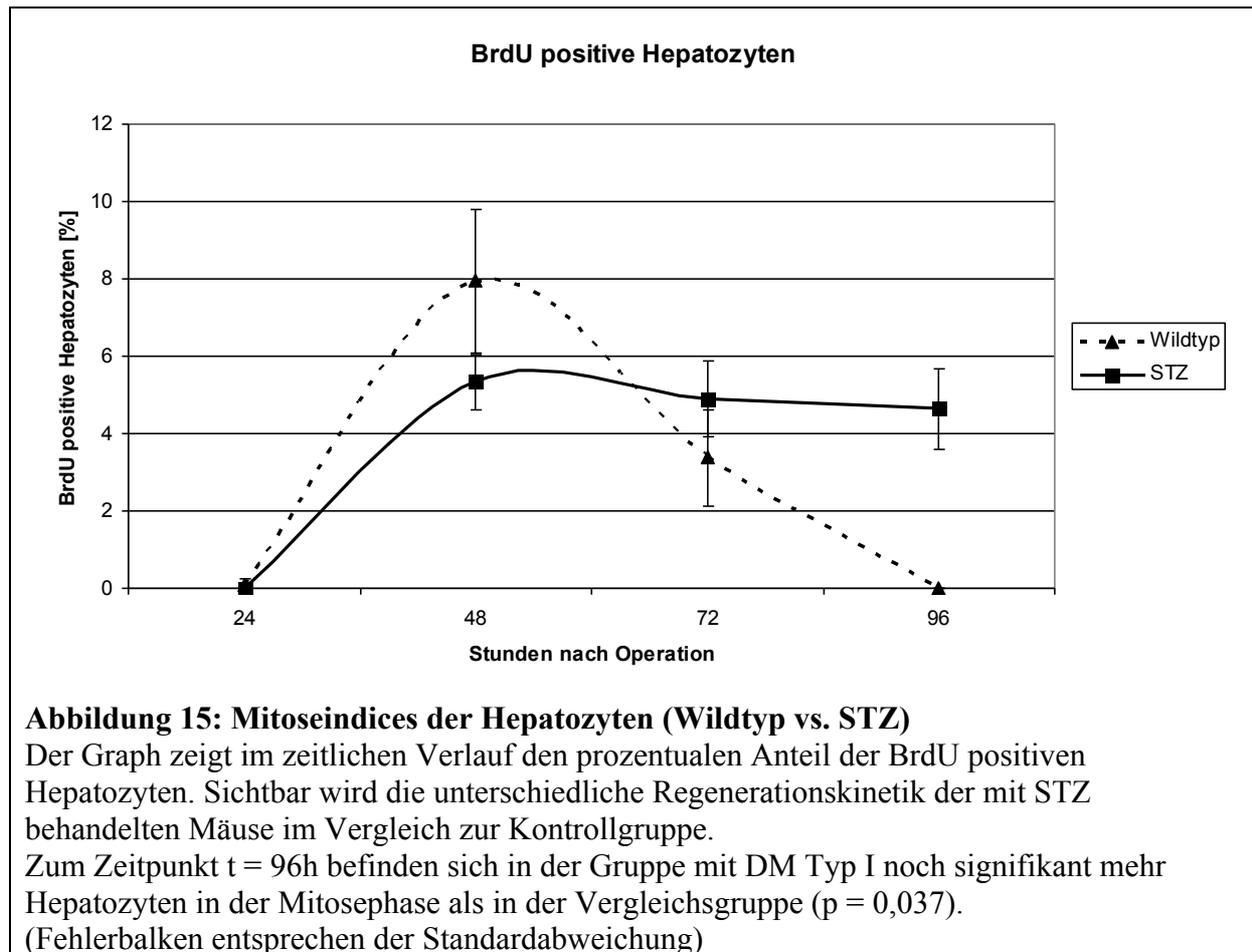
Versuchsgruppe	präOP-Körpergewicht (Mittelwert) ± Standardabweichung
STZ	21,6 ± 3,7
Wt	25,5 ± 3,6
LIRKO	28,5 ± 2,7
IR ^{Lox-Lox}	31,7 ± 5,7

Tabelle 5: Körpergewichte der Versuchstiere vor der Leberresektion (präOP)

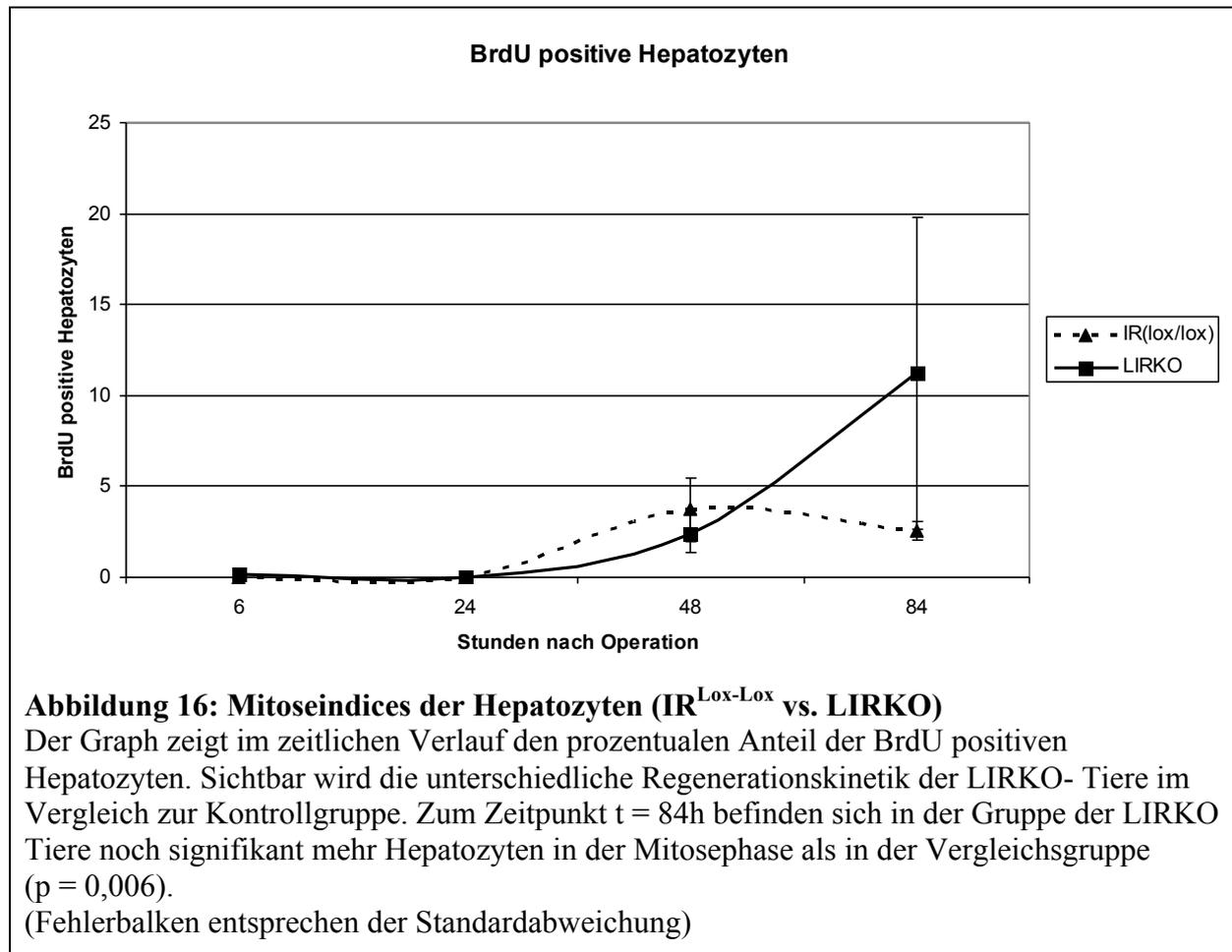
Angegeben sind die durchschnittlichen Körpergewichte jeder Versuchsgruppe, bestimmt unmittelbar vor der Leberresektion.

4.1.4. Mitoseindex Hepatozyten

Während bei den mit Streptozotozin (STZ) behandelten Mäusen nach 24h noch keine BrdU positiven Hepatozyten sichtbar waren, sind bei den unbehandelten Tieren (Wildtyp) erste Zellteilungen zu finden (24h: Wildtyp 0,08%, SD ± 0,16, STZ 0%). Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht ($p = 0,386$). Beide Populationen erreichen nach 48h die maximale Zellproliferation. Die an Diabetes mellitus Typ I leidenden Tiere erreichen dabei jedoch einen geringeren maximalen Mitoseindex als die gesunde Vergleichsgruppe (48h: Wildtyp 7,94%, SD ± 1,84, STZ 5,33%, SD ± 0,7, $p = 0,034$). Dementsprechend dauert die Leberregeneration der diabetischen Tiere länger und der Mitoseindex fällt langsamer ab (72h: Wildtyp 3,37%, SD ± 1,24, STZ 4,89%, SD ± 0,98, $p = 0,165$). Die unbehandelten Tiere erreichen nach 96h wieder ihren Ausgangswert, während sich bei den mit STZ behandelten Tieren zu diesem Zeitpunkt noch signifikant ($p = 0,037$) mehr Hepatozyten in der Mitosephase befinden (96h: Wildtyp 0%, STZ 4,64%, SD ± 1,03) (Abbildung 15).



Während in der Versuchsgruppe der LIRKO-Mäuse in den ersten 24 Stunden nach der Teilresektion bereits einige BrdU positiven Hepatozyten in den Präparaten zu finden sind, gibt es bei der Vergleichsgruppe (IR^{Lox-Lox}) nach 24h noch keine Zellteilungen (6h: IR^{Lox-Lox} 0%, LIRKO 0%, p = 1,00; 24h: IR^{Lox-Lox} 0%, LIRKO 0,5%, SD ± 0,58, p = 0,131).
 Es fällt auf, dass die Tiere aus der gesunden Vergleichsgruppe (IR^{Lox-Lox}) zum Zeitpunkt t = 48h nach der Operation einen höheren Mitoseindex aufweisen als die LIRKO-Tiere (48h: IR^{Lox-Lox} 3,74%, SD ± 1,76, LIRKO 2,14%, SD ± 1,07, p = 0,248) (Abbildung 16). Der maximale Proliferationsindex wird bei den LIRKO-Mäusen erst deutlich später erreicht, er liegt möglicherweise außerhalb des beobachteten zeitlichen Rahmens. 84h nach der Operation sind bei den LIRKO-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe noch signifikant (p = 0,006) mehr Hepatozyten BrdU positiv (84h: IR^{Lox-Lox} 2,6%, SD ± 0,2%, LIRKO 13,34%, SD ± 8,5) (Abbildung 16).

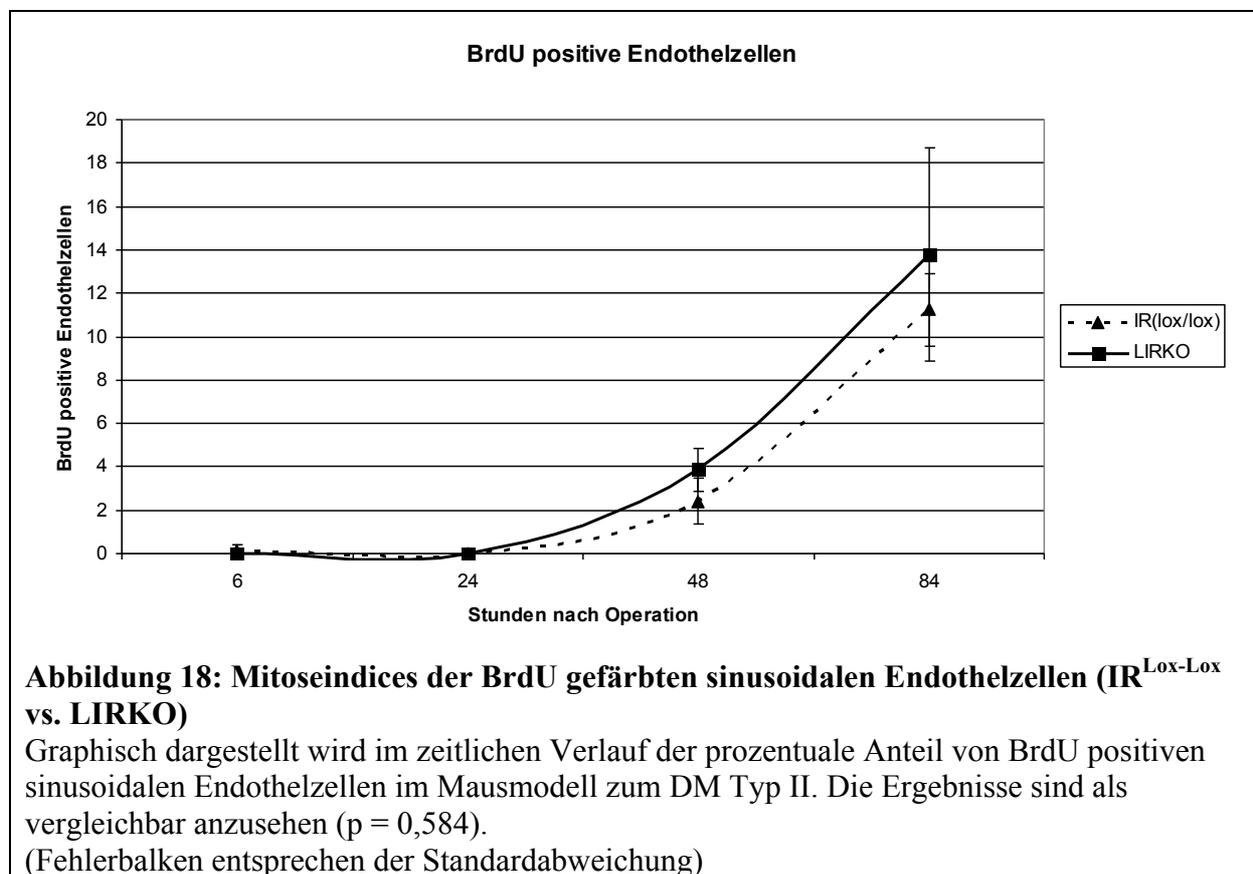
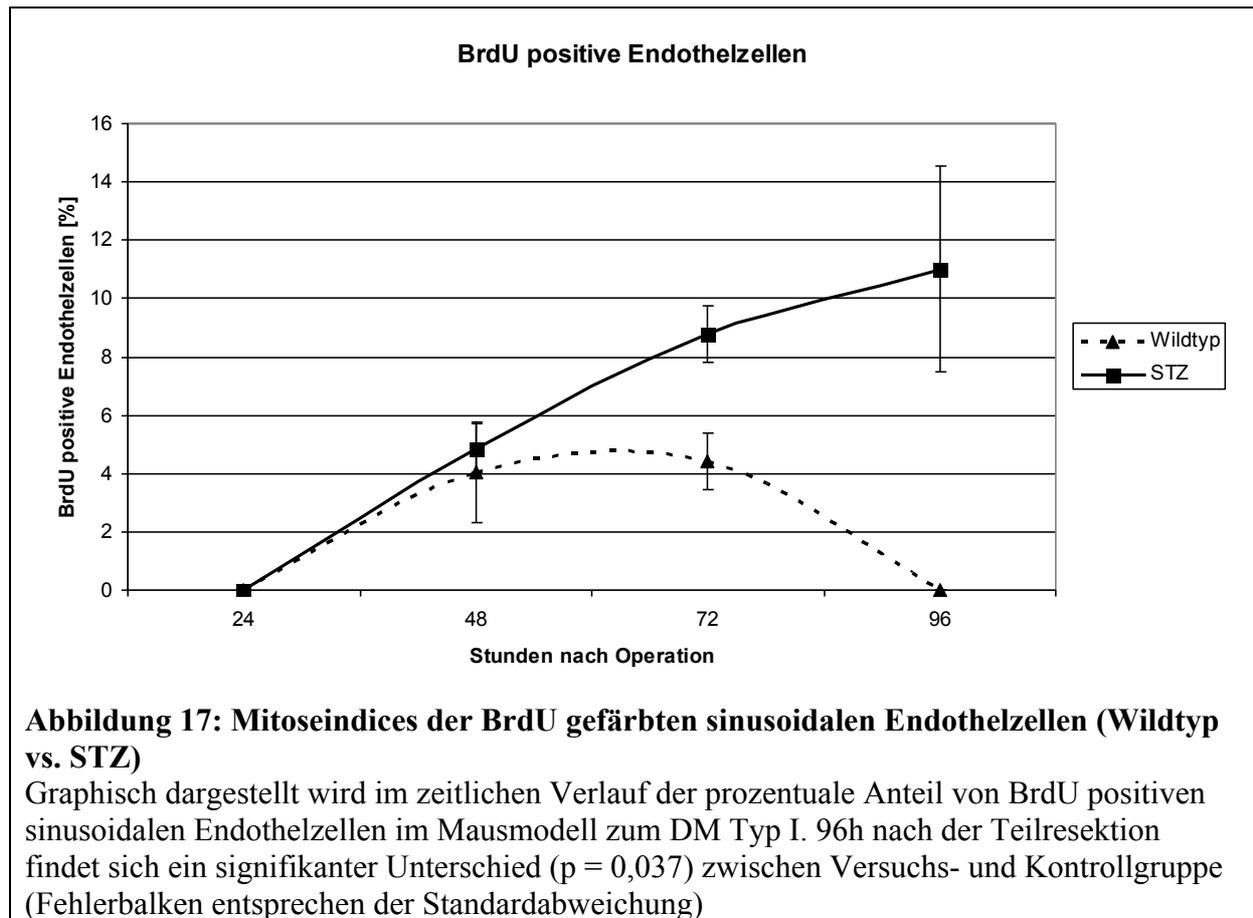


4.1.5. Mitoseindex sinusoidale Endothelzellen

Bei den Mitoseindices der sinusoidalen Endothelzellen fallen insbesondere bei den mit STZ behandelten Tieren im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe Unterschiede auf.

In beiden Versuchsgruppen (STZ vs. Wildtyp und LIRKO vs. IR^{Lox-Lox}) sind nach 24h keine BrdU positiven sinusoidalen Endothelzellen nachweisbar (24h: Wildtyp 0%, STZ 0%; 24h: IR^{Lox-Lox} 0%, LIRKO 0%). 48h nach der Leberteileresektion sind in beiden Versuchsgruppen sich in Teilung befindliche Zellen auffindbar (48h: Wildtyp 4,05%, SD ± 1,73, STZ 4,87%, SD ± 0,85, p = 0,480; 48h: IR^{Lox-Lox} 2,42%, SD ± 1,06, LIRKO 3,86%, SD ± 0,99, p = 0,081). In der Versuchsgruppe zum Diabetes mellitus Typ I liegt der Anteil der positiven sinusoidalen Endothelzellen bei der unbehandelten Vergleichsgruppe 72h nach der Operation auf vergleichbarem Niveau wie zum vorherigen Auswertungszeitpunkt. Die mit STZ behandelten Tiere zeigen eine deutlich höhere Teilungsaktivität (72h: Wildtyp 4,43%, SD ± 0,97, STZ 8,76%, SD ± 0,96, p = 0,064). Während 96h nach der Operation die Regeneration in der Gruppe der unbehandelten Tiere abgeschlossen ist, weisen die an Diabetes mellitus Typ I leidenden Mäuse den höchsten bestimmten Mitoseindex auf (96h: Wildtyp 0%, STZ 11,01%, SD ± 3,54, p = 0,037). Damit besteht zum Zeitpunkt t=96h ein signifikanter Unterschied der Regenerationskinetik zwischen den mit STZ behandelten Tieren und der gesunden Vergleichsgruppe (Abbildung 17).

Die Teilungsaktivitäten der sinusoidalen Endothelzellen unterscheiden sich bei der Tierstudie zum Diabetes mellitus Typ II kaum, die Ergebnisse der Mitoseindices 84h nach der Leberteileresektion sind in den Versuchsgruppen als vergleichbar anzusehen (84h: IR^{Lox-Lox} 11,24%, SD ± 1,68, LIRKO 13,76%, SD ± 4,92, p = 0,584) (Abbildung 18).



4.1.6. Laborparameter

4.1.6.1. IGF-1

Die IGF-1 Konzentrationen sind im Mittel bei den mit STZ behandelten diabetischen Tieren und den entsprechenden gesunden Kontrolltieren als vergleichbar anzusehen. Die Werte verändern sich auch im zeitlichen Verlauf nicht (24h: Wildtyp 3640,67 pg/ml, SD \pm 501,73, STZ 3638,67 pg/ml, SD \pm 551,95; 48h: Wildtyp 3725 pg/ml, SD \pm 100,57, STZ 3348,67 pg/ml, SD \pm 949,62) (Abbildung 19).

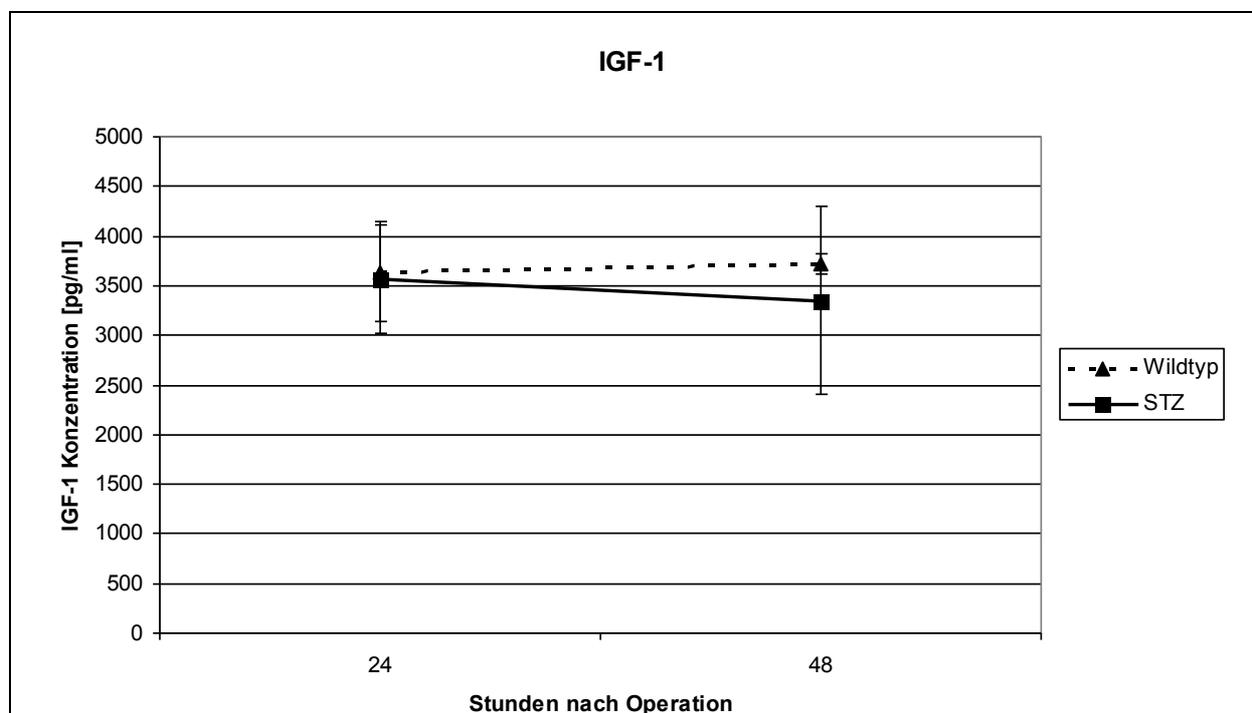
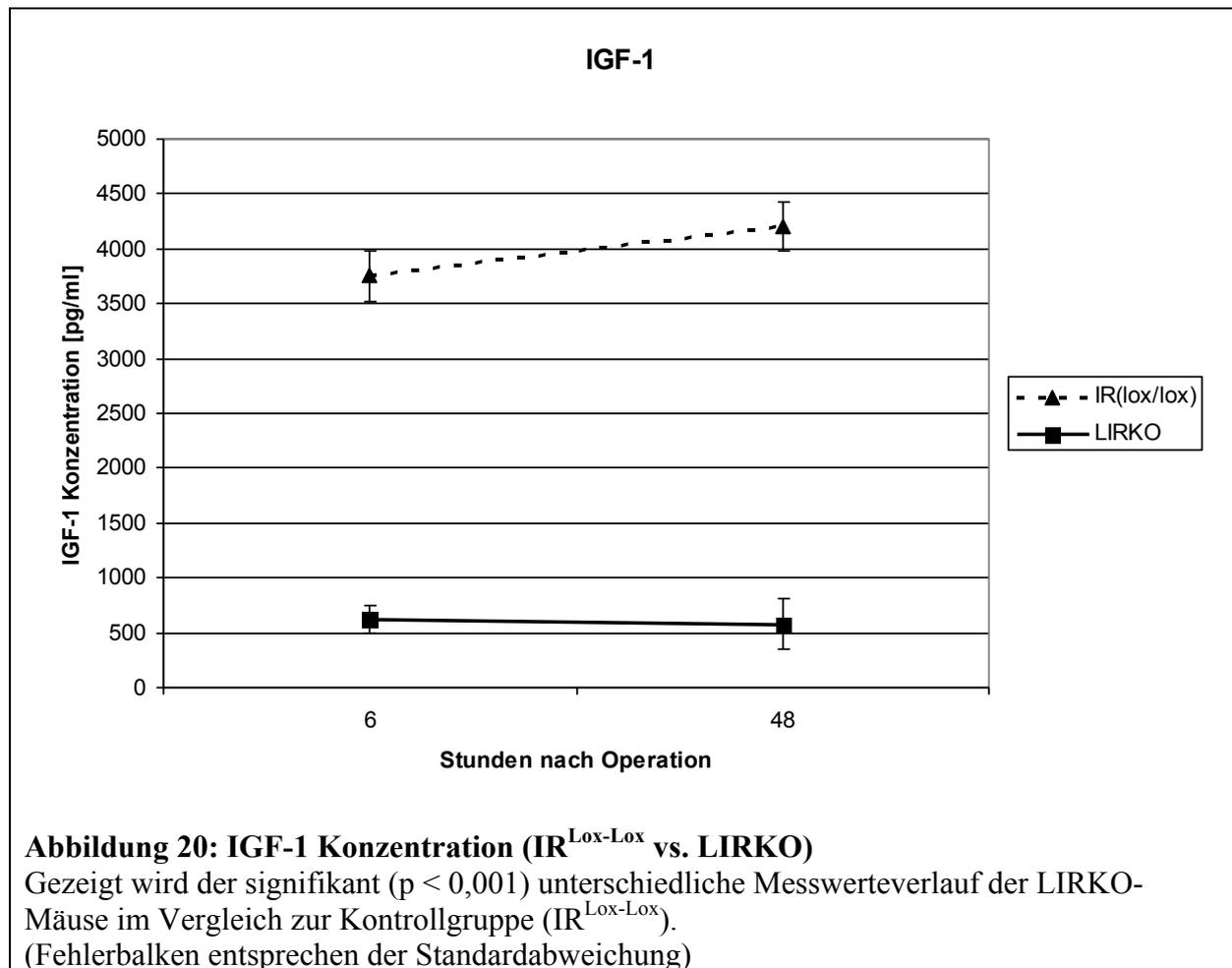


Abbildung 19: IGF-1 Konzentration (Wildtyp vs. STZ)

Gezeigt wird die IGF-1 Konzentration im zeitlichen Verlauf (24h und 48h) nach der Operation. Deutlich wird der sehr ähnliche Messwerteverlauf der mit Streptozotozin (STZ) behandelten diabetischen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wildtyp). (Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

In der Gruppe der LIRKO-Mäuse wird im Vergleich zur Kontrollgruppe ($IR^{Lox-Lox}$) eine deutliche IGF-1 Konzentrationsdifferenz sichtbar. Die Tiere mit dem Insulinrezeptor Knock-out auf den Hepatozyten (LIRKO) zeigen sowohl 6 als auch 48 Stunden post operationem eine signifikant ($p < 0.001$) geringere IGF-1 Serumkonzentration (6h: $IR^{Lox-Lox}$ 3750,32 pg/ml, SD \pm 224,56, LIRKO 619,13 pg/ml, SD \pm 127,65; 48h: $IR^{Lox-Lox}$ 4208,67 pg/ml, SD \pm 220,76, LIRKO 580,27 pg/ml, SD \pm 235,06) (Abbildung 20).

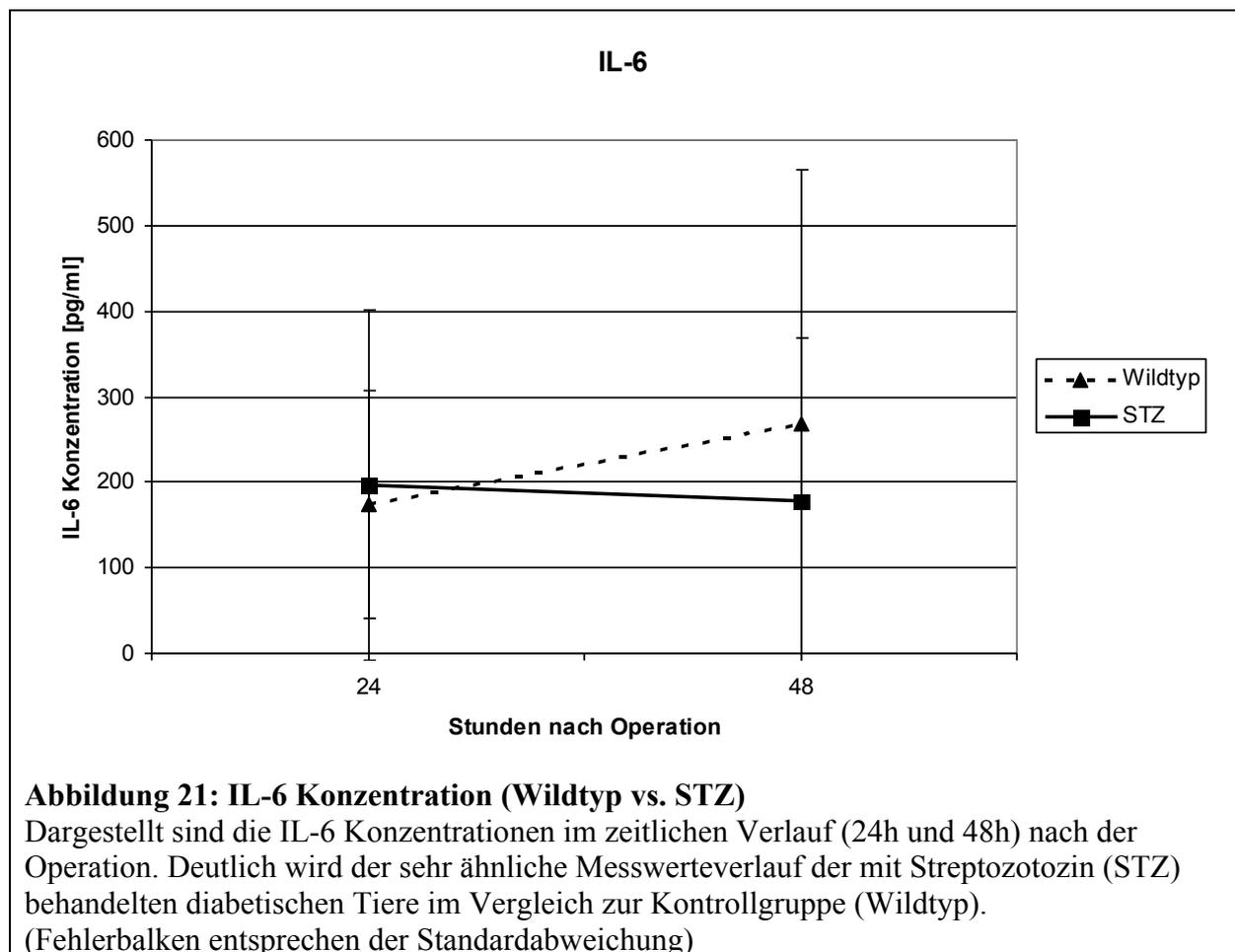


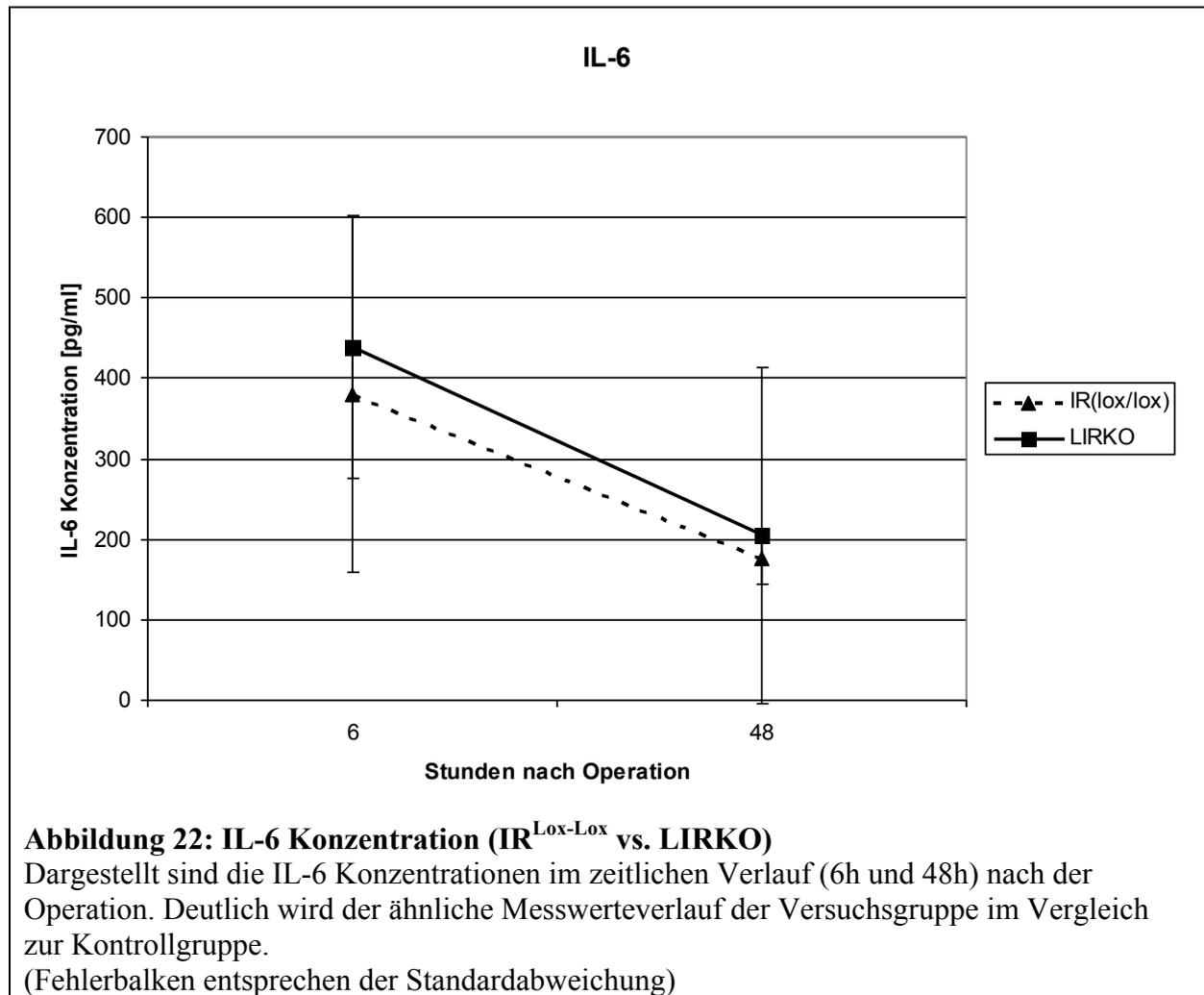
4.1.6.2. IL-6

Die IL-6 Serumkonzentrationen zeigen im Versuchsmodell zum Diabetes mellitus Typ I keinen signifikanten Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Es ist auch im Regenerationsverlauf kein Trend in eine Richtung erkennbar (24h: Wildtyp 173,06 pg/ml, SD \pm 133,12, STZ 195,83 pg/ml, SD \pm 204,70; 48h: 268,78 pg/ml, SD \pm 296,26, STZ 177,45 pg/ml, SD \pm 190,52) (Abbildung 21).

Im Vergleich hierzu scheint die Gruppe der LIRKO-Mäuse und der entsprechenden Kontrolltiere bei fortschreitender Regeneration eine Tendenz zu geringerer IL-6 Konzentrationen zu zeigen. Bei diesem Vergleich muss allerdings der unterschiedliche Messzeitpunkt und die hohe Standardabweichung beachtet werden (Abbildung 22).

(6h: IR^{Lox-Lox} 380,51 pg/ml, SD \pm 221,52, LIRKO 438,40 pg/ml, SD \pm 161,59; 48h: IR^{Lox-Lox} 176,12 pg/ml, SD \pm 32,17, LIRKO 204,91, SD \pm 209,02).





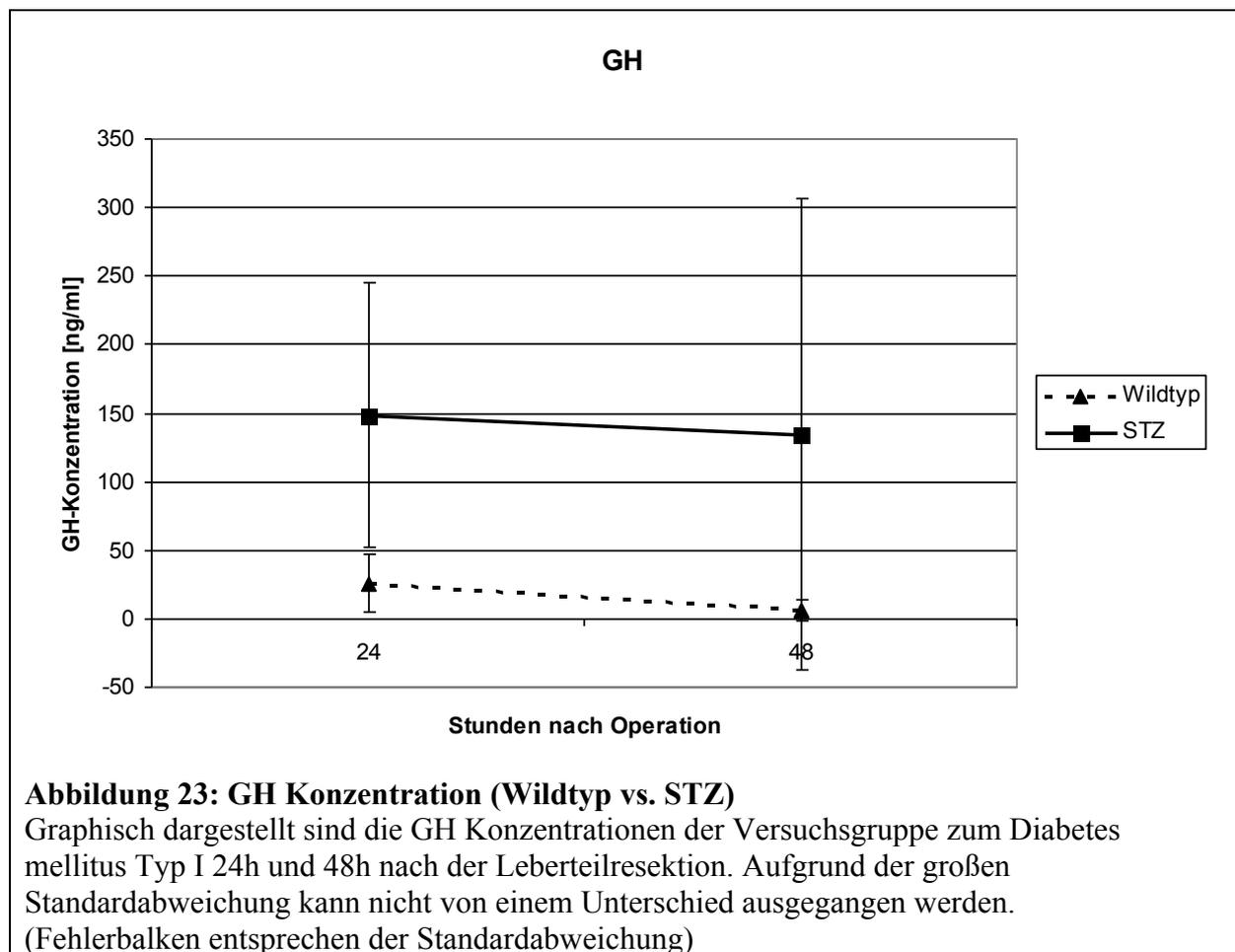
4.1.6.3. GH

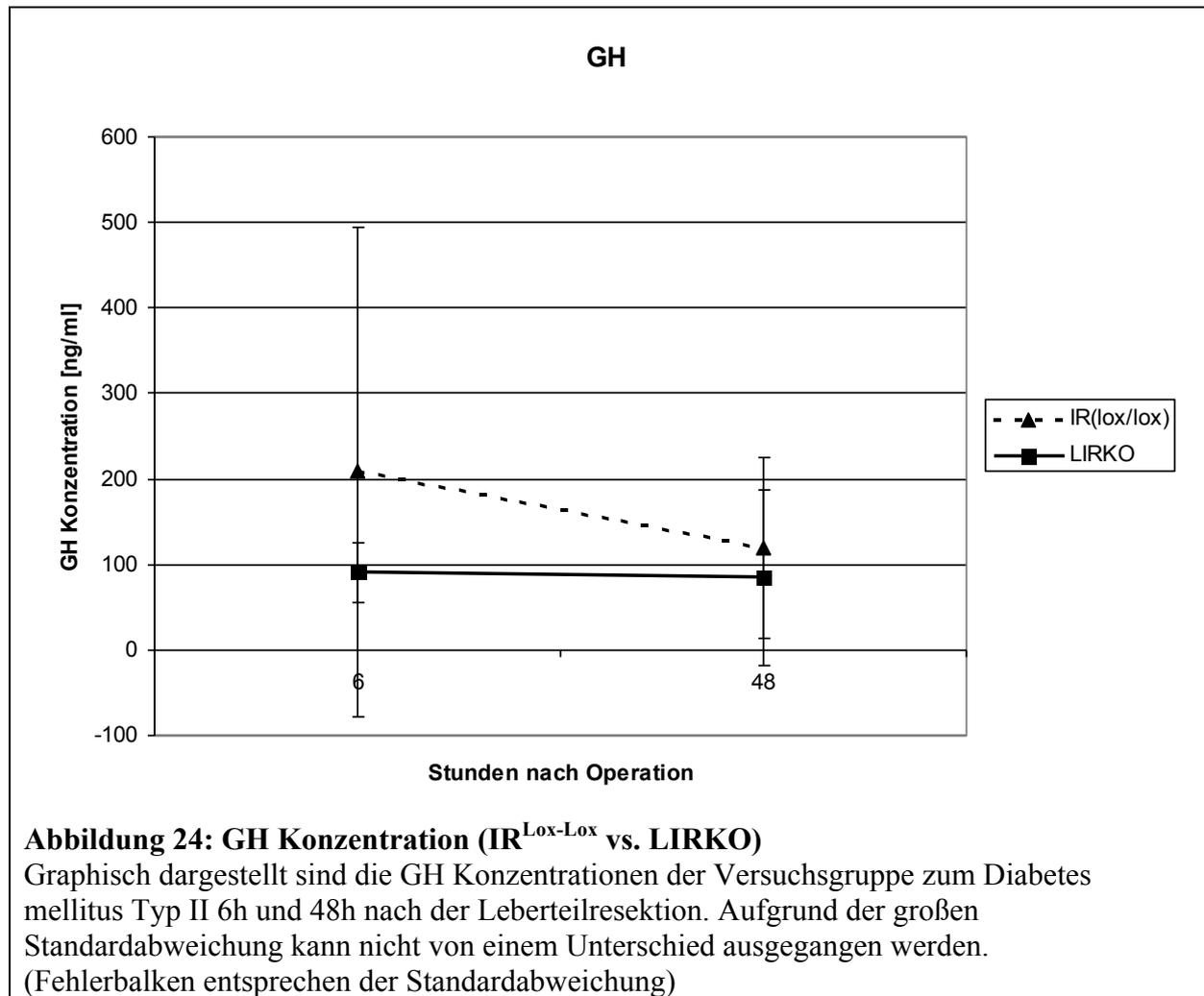
Die Konzentration des Wachstumshormons (GH) zeigt in beiden Versuchsgruppen (LIRKO vs. IR^{Lox-Lox} und STZ vs. Wildtyp) keinen sicheren Unterschied (Abbildung 23 [STZ vs. Wt] und 24 [LIRKO vs. IR^{Lox-Lox}]). Obwohl bei den mit STZ behandelten Tieren die mittlere Serumkonzentration über der der Kontrollgruppe liegt, kann aufgrund der hohen Standardabweichung (SD) nicht auf einen deutlichen Unterschied geschlossen werden. Auch im Verlauf der Regeneration fällt keine Veränderung zu einer höheren oder niedrigeren GH-Serumkonzentration auf. Im Tiermodell zum Diabetes mellitus Typ I ergaben sich folgende Ergebnisse: 24h: Wildtyp 25,86 ng/ml, SD ± 21,30, STZ 148,43 ng/ml, SD ± 96,21; 48h: Wildtyp 6,29 ng/ml, SD ± 7,97, STZ 134,55 ng/ml, SD ± 172,36.

Das Tiermodell zum Diabetes mellitus Typ II lieferte folgende Werte:

6h: IR^{Lox-Lox} 208,23 ng/ml, SD ± 286,50, LIRKO 90,70 ng/ml, SD ± 35,08;

48h: IR^{Lox-Lox} 119,06 ng/ml, SD ± 105,60, LIRKO 84,54 ng/ml, SD ± 102,20





4.2. Ergebnisse der klinischen Studie

4.2.1. Patientencharakterisierung

Die in die Studie eingeschlossenen Patienten waren zwischen 18 und 88 Jahre alt, mit einem Median von 57 Jahren. 355 der Patienten waren weiblich (56,1%) und 278 (43,9%) waren männlich. Die eine Leberresektion notwendig machenden Diagnosen lassen sich hauptsächlich in maligne und benigne Erkrankungen sowie Gallengangsdefekte einteilen (Tabelle 6). Bei 96 Patienten fand sich eine Leberzirrhose (15,2%; Child-Pugh-Score A: 84 [13,3%], Child-Pugh-Score B: 10 [1,6%], Child-Pugh-Score C: 2 [0,3%]) mit einer Prävalenz des Diabetes mellitus von 27,1%. 75 der 633 Patienten (11,8%) wurden als Diabetiker angesehen (Typ I: n=2, Typ II: n=73). Eine Hepatitis B bzw. C wurde bei 39 Patienten (6,2%) bzw. 41 Patienten (6,5%) diagnostiziert. Das Ausmaß der Leberresektion lag zwischen einem und sieben Segmenten (Median: 4).

Diagnose	Nichtdiabetisch (n=558) (n[%])	Diabetisch (n=75) (n[%])	
maligne Erkrankungen	HCC	189 (34%)	51 (68%)
	CCC	48 (9%)	
	Metastasen	12 (2%)	
	Gallenblasen-Ca	16 (3%)	1 (1%)
	Klatskin-Tumor	39 (7%)	5 (7%)
	andere	5 (1%)	
benigne Erkrankungen	FNH	67 (12%)	
	Adenome	17 (3%)	
	Hämangiome	45 (8%)	2 (3%)
	Zysten	45 (8%)	1 (1%)
	Hydatidenzysten	27 (5%)	2 (3%)
	andere	12 (2%)	1 (1%)
Gallengangsdefekte	Caroli-Syndrom	4 (1%)	
	Gallengangszysten	13 (2%)	
	Sklerosierende	4 (1%)	
	Cholangitis		
Andere	Abszesse	9 (2%)	2 (3%)
	Traumata	3 (1%)	
	andere	3 (1%)	

Tabelle 6: Indikationen für Leberresektionen

Wiedergegeben sind die Indikationen, die bei den 633 in die Studie eingeschlossenen Patienten zur Leberresektionen geführt haben. Die Diagnosen sind für diabetische und nicht-diabetische Patienten getrennt aufgeführt.

HCC: hepatozelluläres Karzinom, CCC: cholangiozelluläres Karzinom, Gallenblasen-Ca: Gallenblasenkarzinom, FNH: fokal noduläre Hyperplasie

4.2.2. Perioperative Mortalität

Die perioperative Mortalität lag bei 5,5% (n=35). Die große Mehrheit der Todesfälle ist auf eine postoperative Leberinsuffizienz zurückzuführen, die dann konsekutiv zu einem Multiorganversagen führte (MOV, n=28). Zwei weitere Patienten entwickelten ein progressives Leberversagen, welches schließlich ebenfalls zum Tode führte. Septische Komplikationen (Ileus, Pneumonie, Peritonitis) mündeten bei vier weiteren Patienten in einem Multiorganversagen. Ein Patient verstarb einen Tag nach Entlassung aus dem Krankenhaus, obwohl er einen unauffälligen Verlauf gezeigt hatte. Die berichteten Symptome ließen eine fulminante Lungenembolie vermuten, da jedoch keine Autopsie vorgenommen wurde, muss die Todesursache als unbekannt angesehen werden.

Patienten mit Diabetes mellitus zeigten in der univariaten Analyse eine zweifach erhöhte Mortalität im Vergleich zu nichtdiabetischen Patienten (10,7% vs. 5,3%, $p = 0,047$). Zwei Drittel der diabetischen Patienten wurden wegen eines HCC der Leberresektion unterzogen, eine Leberzirrhose fand sich bei 39% der Diabetiker im Vergleich zu 14% bei allen anderen Patienten ($p = 0,001$). Ebenso war ein präoperativer Ikterus bei den diabetischen Patienten (22%) im Vergleich zu den nichtdiabetischen Patienten (12%, $p = 0,041$) deutlich häufiger. Auch waren die diabetischen Patienten häufiger männlichen Geschlechts und deutlich älter als die Vergleichsgruppe. Die perioperative Mortalität unterschied sich aber nicht zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Patienten in Gruppen von Patienten mit HCC (12% vs. 8%, $p = 0,335$), mit Leberzirrhose (14% vs. 13%, $p = 0,99$), mit Ikterus (7% vs. 18%, $p = 0,335$), mit Lebererkrankungen alkoholischer Genese (8% vs. 9%, $p = 0,88$), mit Hepatitis C (20% vs. 19%, $p = 0,977$), oder ob männliches (11% vs. 9%, $p = 0,544$) oder weibliches (10% vs. 3%, $p = 0,08$) Geschlecht.

Variable	Nichtdiabetisch (n=558)	Diabetisch (n=75)	p-Wert
Alter (Jahre)	54 (18–85)	67 (37–88)	< 0,001
Geschlecht (m : w)	1 : 1,5	2,6 : 1	< 0,001
Hepatitis B	7%	3%	0,178
Hepatitis C	7%	7%	0,951
Alkohol	6%	20%	< 0,001
Segmente (n)	3,2 ± 0,06	3,1 ± 0,18	0,848
Ära [n, '89-'98: '99-'03]	337 : 221	18 : 33	0,466
Pringle-Manöver	79%	80%	0,895
Zirrhose	14%	39%	< 0,001
Ikterus	12%	22%	0,041
Aszites	3%	5%	0,051
Bilirubin [mg/dl]	1,5 ± 0,16	1,4 ± 0,22	0,752
Albumin [g/dl]	4,6 ± 0,18	4,8 ± 0,65	0,067
Quick [%]	100 ± 0,8	99 ± 1,9	0,475

Tabelle 7: Charakterisierung von diabetischen und nichtdiabetischen Patienten

Tabellarisch werden die in die Studie eingeschlossenen Patienten näher charakterisiert. Die aufgeführten Variablen beschreiben die zwei gegebenen Populationen (diabetisch vs. nichtdiabetisch).

Die Variable „Geschlecht“ gibt das Verhältnis von männlich (m) zu weiblich (w) an.

Die bei Hepatitis B, Hepatitis C oder Alkohol angegebenen Werte geben in jeder Gruppe die Prävalenz der entsprechenden Krankheit bezüglich zugrunde liegender Lebererkrankung an.

Die Variable „Segmente“ bezieht sich auf die Lebersegmente nach Couinaud, die in die Operation involviert waren.

Ära beschreibt das Verhältnis von Patienten, welche im Zeitraum von 1989 bis 1998 oder 1999 bis 2003 operiert wurden.

Das Pringle-Manöver beschreibt einen temporären intraoperativen Verschluss der zuführenden Lebergefäße zur Reduktion des Blutverlustes bei Eingriffen an der Leber.

In der Zeile Zirrhose, Ikterus und Aszites wird die Prävalenz der entsprechenden Symptome genannt.

Alle anderen Werte sind angegeben als Medianwert oder Mittelwert ± Standardabweichung für die jeweilige Patientengruppe.

Das Alter der überlebenden unterschied sich im Mittel von dem der perioperativ verstorbenen Patienten (Alter: 56 Jahre [18-88] vs. 67,5 Jahre [39-78], $p < 0,001$). Männliche Patienten wiesen im Gegensatz zu weiblichen eine höhere Mortalität auf (9,0% vs. 3,1%, $p = 0,001$). Um die Leberreserve einschätzen zu können, wurde präoperativ das Gesamtbilirubin, die Albuminkonzentration und der Quick-Wert bestimmt. Hier waren in univariaten Analysen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der überlebenden und nichtüberlebenden Patienten nachweisbar.

Dementsprechend war die Mortalität bei den Patienten mit Leberzirrhose höher als bei den Patienten ohne Zirrhose (13,6% vs. 4,1%, $p < 0,001$). Bezüglich der zugrunde liegenden Krankheit fiel auf, dass eine HCV-Infektion mit einer höheren Mortalität verbunden war (19,5% vs. 4,4%, $p < 0,001$), während HBV-Infektion und chronischer Alkoholkonsum ohne Einfluss blieben. Das Ausmaß der durchgeführten Leberresektion war bei den Patienten, die nicht überlebten größer, als bei denen, die überlebten.

Patienten, die zu einem früheren Zeitpunkt operiert worden waren, wiesen eine höhere Mortalität auf als jene, die erst in jüngerer Zeit einer Leberresektion unterzogen wurden (Ära 1: 1989 bis 1998, $n=379$; Ära 2: 1999 bis 2003; $n=254$; Mortalität: 7,4% vs. 3,2%, $p = 0,024$). Alle Variablen mit signifikantem Einfluss auf die perioperative Mortalität in univariaten Tests fanden Eingang in ein multivariates logistisches Regressionsmodell (Diabetes mellitus, Alter, Geschlecht, Gesamtbilirubin, Albumin, Quick-Wert, Child-Pugh-Klassifikation, Zirrhose, Ikterus, Hepatitis C, involvierte Lebersegmente, Ära). Schließlich stellten sich nur das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Operation, die Albuminkonzentration vor der Operation, das Vorhandensein einer Leberzirrhose, die Anzahl der in die Operation involvierten Lebersegmente und die Ära, in der die Operation durchgeführt wurde, als unabhängige Variablen heraus, die die perioperative Mortalität signifikant beeinflussen (Tabelle 8). Diabetes mellitus wurde im sechsten (von acht) Schritten als unabhängige, die perioperative Mortalität beeinflussende Größe, ausgeschlossen.

Unabhängige Variable	Mortalität odds ratio	95% Konfidenzintervall	p Wert
Alter [pro 1 Jahr]	1,071	1,022-1,122	0,004
Albumin [pro 1g/dl]	0,229	0,108-0,485	<0,001
Leberzirrhose [ja vs. nein]	3,289	1,195-9,047	0,021
Segmente [pro Segment]	1,458	1,045-2,036	0,027
Ära ['89-'98 vs. '99-'03]	0,218	0,073-0,649	0,006

Tabelle 8: Die perioperative Mortalität signifikant beeinflussende Variablen

Aufgeführt sind die signifikanten Risikofaktoren für die perioperative Mortalität. Um die unabhängigen Risikofaktoren für die perioperative Mortalität zu ermitteln, wurde ein multivariates binäres logistisches Regressionsmodell benutzt. Alle Variablen mit signifikantem Einfluss in univariaten Analysen wurden eingeschlossen. Die Odds ratio, das Konfidenzintervall (95%) und der p-Wert für jede unabhängige Variable sind angegeben.

4.2.3. Postoperative Morbidität

Postoperative Komplikationen wurden bei diabetischen und nichtdiabetischen Patienten in vergleichbarer Häufigkeit registriert (33 diabetische Patienten [44%] im Vergleich zu 201 nichtdiabetischen Patienten [36%], $p = 0,179$). Zu den am häufigsten beobachteten Komplikationen gehörten die Leberinsuffizienz, Gallengangsleckagen, Nierenversagen und eine notwendig gewordene Reintubation. Weitere Komplikationen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Inzidenz von postoperativem Nierenversagen, Aszites und pulmonalen Infektionen war bei Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Patienten ohne DM erhöht. Dementsprechend zeigte sich bei den diabetischen Patienten ein Trend zu einer erhöhten Rate notwendiger Reintubationen ($p > 0,05$). Andere Infektionen, insbesondere eine sekundäre Wundheilungsstörung, zeigte sich mit gleicher Frequenz bei Patienten mit und ohne DM. Ebenso gab es zwischen den Patienten mit und ohne DM keine signifikanten Unterschiede bei der Dauer der stationären Aufenthalte, ebenfalls ein guter Surrogatparameter für postoperative Komplikationen.

Komplikation	Nichtdiabetisch (n = 558)(n [%])	Diabetisch (n = 75)(n [%])	p-Wert
Leberinsuffizienz	64 (11,5)	12 (16,0)	0,257
Gallengangsleck	41 (7,4)	4 (5,3)	0,524
Nierenversagen	35 (6,3)	10 (13,3)	0,025
Reintubation	34 (6,1)	9 (12,0)	0,056
sekundäre Wundheilung	31 (5,6)	4 (5,3)	0,937
postoperative Aszites	22 (4,8)	7 (9,3)	0,036
postoperative Blutung	27 (4,8)	2 (2,7)	0,398
Cholangitis	15 (2,7)	5 (6,7)	0,064
Pneumonie	14 (2,5)	5 (6,7)	0,048
Pleuraerguß	17 (3,1)	2 (2,7)	0,856
Peritonitis	10 (1,8)	0 (0,0)	0,243
Total	201 (36,0)	33 (44,0)	0,179

Tabelle 9: Postoperative Morbidität

Aufgeführt sind alle häufiger als 10-mal vorkommenden postoperativen Komplikationen. Insgesamt entwickelten 234 von 633 Patienten 468 Major- oder Minor-Komplikationen.

5 Diskussion

Die Regeneration der Leber ist ein sehr komplexer Vorgang, welcher aufgrund der hohen klinischen Relevanz und verbesserter technischer Möglichkeiten in den letzten Jahren verstärkt Thema internationaler Forschungsanstrengungen geworden ist.

Obwohl heute bereits eine große Zahl der in die Leberregeneration involvierten Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone bekannt ist, sind viele Zusammenhänge nach wie vor ungeklärt. Für diesen Umstand sind mehrere Gründe verantwortlich. Neben reinen Mitogenen, wie dem HGF, existieren auch eine Reihe Comitogene, welche die Regeneration modellieren. Außerdem scheint es verschiedene Signalkaskaden zu geben, die zum Teil auf eine bis jetzt meist unbekannte Weise miteinander interagieren. Ein weiterer erschwerender Aspekt ist die Tatsache, dass nach einer Teilresektion nicht nur die Steuerungsprozesse der Leberregeneration in Gang gesetzt werden, sondern auch die zur Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase notwendigen Vorgänge aufgrund des Parenchymverlustes eine Anpassung erfahren müssen. Hierbei ist besonders an die Aufrechterhaltung einer physiologischen Glukosekonzentration zu denken. Die Koordinierung all dieser unterschiedlichen Abläufe lässt eine Konzentrationsänderung vieler Hormone und Enzyme notwendig werden. Auch der reduzierte Gefäßquerschnitt geht mit Veränderungen einher, der, wie die für den Organismus Stress bedeutende Operation selbst, biochemische Konsequenzen hat.

Die vorliegende Arbeit nähert sich der Erforschung der Leberregeneration bei Diabetes mellitus Typ I und II mittels eines tierexperimentellen sowie klinischen Ansatzes.

Im Tierexperiment kamen an Diabetes mellitus Typ I leidende Mäuse zum Einsatz sowie zur Simulation eines Diabetes mellitus Typ II Mäuse mit einer genetisch bedingten Insulinresistenz. In beiden Versuchsgruppen wurde der zeitliche Verlauf der Mitoseindices von Hepatozyten und Endothelzellen während der Regeneration jeweils einer gesunden Vergleichsgruppe gegenübergestellt. Außerdem wurde das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht und die Serumkonzentration von Interleukin-6 (IL-6), Growth Hormon (GH) und Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) verglichen. Die klinische Studie beschäftigt sich mit der Auswirkung von Diabetes mellitus auf die perioperative Morbidität und Mortalität nach Leberresektion.

5.1. Diskussion der tierexperimentellen Studie

5.1.1. Diskussion der liver-body-weight-ratios bei Mäusen mit DM

Die Bestimmung des Verhältnisses von Leber- zu Körpergewicht (liver-body-weight-ratio) ist eine einfache, wenn auch ungenaue Methode, um einen Eindruck für den Fortschritt der Leberregeneration zum Zeitpunkt der Materialentnahme zu erhalten. Vergleicht man die liver-body-weight-ratios der mit STZ behandelten diabetischen Mäuse mit denen der gesunden Kontrollgruppe, so findet man einen im Regenerationszeitraum vergleichbaren Verlauf. Auffällig zum Zeitpunkt der letzten Messung ist, dass einerseits das ursprüngliche Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht in beiden Gruppen fast wieder dem Ausgangswert entspricht, andererseits in der Gruppe der diabetischen Tiere jedoch noch ein signifikant höherer Mitoseindex besteht. Die Regeneration ist folglich in dieser Gruppe noch nicht abgeschlossen, auch wenn dies durch die liver-body-weight-ratio suggeriert wird. Der Konflikt zwischen diesen beiden Ergebnissen kann über verschiedene Ansätze erklärt werden. Da es in der Literatur keinen Hinweis auf eine über den Ausgangswert reichende Zunahme des Lebergewichtes bei diabetischen Tieren gibt, ist wahrscheinlich, dass sich das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht während der Regeneration durch einen weiteren Mechanismus verschoben hat. Dies ist entweder über eine Zunahme des Lebergewichtes, welche nicht durch Zellteilung herrührt, oder durch eine Körpergewichtsabnahme während der Regeneration zu erklären. Beides ist theoretisch möglich, denn durch den Insulinmangel kommt es peripher zur Lipolyse, welche zu einer vermehrten Ansammlung von Lipidgranula (Abb.9) in den Hepatozyten (Johnston DG et al., 1986) führen kann. Auch wenn ein morphologisches Korrelat nicht in allen histologischen Präparaten der diabetischen Mäuse mit bloßem Auge sichtbar war, so ist dieser Mechanismus doch recht wahrscheinlich mitverantwortlich für die beschriebenen Ergebnisse. Zu bedenken ist weiterhin, dass die diabetischen Tiere über den gesamten Regenerationszeitraum unbehandelt waren. Bedingt durch die sehr hohen Blutglukosekonzentrationen ist eine osmotische Diurese und in der Folge eine Dehydratation anzunehmen. Ebenfalls zur Abnahme des Körpergewichtes tragen die erwähnte periphere Lipolyse und die mit der katabolen Stoffwechsellage einhergehende Proteolyse bei. Es kommt zu einer Verschiebung der liver-body-weight-ratio und zu einer relativen Zunahme des Lebergewichtes.

Die Ergebnisse der Tierstudie zum Diabetes mellitus Typ II ergaben einen Trend zu einer inkompletten Leberregeneration in der Gruppe der LIRKO-Mäuse. Dieses Resultat ist gut vereinbar mit der Auswertung der Mitoseindices und dem oben diskutierten DM Typ I

Mausmodells. Da bei den LIRKO-Mäusen nur ein relativer Insulinmangel bestand, ist im Gegensatz zu den Tieren mit DM Typ II die periphere Lipolyse und Katabolie weniger ausgeprägt. Dies gilt auch für die osmotische Diurese, welche wegen der durchschnittlich geringeren Blutglukosekonzentration in der Gruppe der LIRKO-Mäuse nicht so ausgeprägt ist. Die für die Gruppe der mit STZ behandelten Tiere beschriebene relative Zunahme des Lebergewichtes ist hier folglich in diesem Umfang nicht zu erwarten.

5.1.2. Mitoseindices des DM Typ I und II Mausmodells

Die Bestimmung der Mitoseindices von Hepatozyten und Endothelzellen bei diabetischen und gesunden Mäusen ergab im zeitlichen Verlauf der Leberregeneration Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Während sich der Proliferationsbeginn der untersuchten Zelltypen in den unterschiedlichen Gruppen ähnlich darstellt, gibt es deutliche Unterschiede bei den Maxima der Mitoseraten. In der Gruppe der an DM Typ I erkrankten Mäuse fiel eine abgeschwächte maximale Mitoserate der Hepatozyten sowie eine insgesamt verlangsamte Regeneration beider untersuchter Zelltypen auf. Der Mangel an Insulin beim Diabetes mellitus Typ I führt folglich nicht zu einer deutlich verzögerten Einleitung der Regeneration, sondern beeinflusst die maximale Mitoserate und Regenerationsgeschwindigkeit im Sinne eines Comitogens.

Die LIRKO-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine veränderte Regenerationskinetik. Der Zeitpunkt, zu dem die ersten Zellen BrdU aufnehmen, ist wie bei den an Diabetes mellitus Typ I leidenden Versuchsmäusen ähnlich. Im weiteren Verlauf liegen die Mitoseindices der LIRKO-Mäuse erst unterhalb der Kontrollgruppe, steigen dann jedoch zwei Tage postoperativ über den zu diesem Zeitpunkt schon wieder abnehmenden Wert der Vergleichstiere. Auffällig ist die unbeeinflusste Regeneration der sinusoidalen Endothelzellen in der Gruppe der LIRKO-Mäuse. Man könnte erwarten, dass die Endothelzellen sich bei einer verzögerten Regeneration der Hepatozyten aufgrund mangelnder parakrin wirkender Wachstumsfaktoren ebenfalls langsamer teilen. In der Literatur (Qiao JG et al., 2005) gibt es jedoch Hinweise, dass Insulin, welches im Gegensatz zur Diabetes mellitus Typ I Tierstudie in diesem Experiment theoretisch eher über den physiologischen Werten gelegen haben wird, die erwartete Regenerationsverzögerung der Endothelzellen über eine vermehrte Induktion von VEGF und dessen Rezeptor Flt-1 ausgeglichen haben könnte.

Der komplette Verlust des Insulinrezeptors auf den Leberzellen (LIRKO) beeinflusst folglich die Regeneration der Hepatozyten; die Regenerationskinetik der sinusoidalen Endothelzellen wird nicht verändert.

5.1.3. Zur Rolle von Insulin bei der Leberregeneration

Zur Rolle des Insulins bei der Leberregeneration gibt es in der Literatur verschiedene, sogar konträre Ergebnisse. Während eine Studie (Mola PW et al., 1996) über signifikant höhere Mitoseraten bei diabetischen Ratten 24h nach der Teilresektion berichtet, sieht eine andere Arbeit (Johnston DG et al., 1986) eher die metabolischen Konsequenzen, die ein Insulinmangel mit sich bringt, als Grund für eine beobachtete verlangsamte Regeneration. Die Arbeitsgruppe Chin et al. ging der Frage nach, ob Insulin ein Wachstumsfaktor in der sich regenerierenden Leber ist, oder lediglich eine unterstützende Rolle durch seinen Einfluss auf die metabolische Homöostase einnimmt (Chin S et al., 1995).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben bei den mit STZ behandelten diabetischen Mäusen ein signifikantes Ergebnis und bestätigen damit die derzeit in der Literatur mehrheitlich angenommene Bedeutung von Insulin als Comitogen bei der Leberregeneration. Hierbei wird, gemäß der Definition eines Comitogens, die Regeneration bei Verlust des Comitogens nicht verhindert, sondern lediglich verzögert.

Neben der Funktion als Wachstumsfaktor übernimmt das Insulin auch eine wichtige Rolle in der metabolischen Homöostase. Als ein Beleg dafür können der bei den Tieren mit Insulinmangel im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl präoperativ als auch postoperativ deutlich eingeschränkte Gesundheitszustand sowie die höheren Sterberaten in der frühen Regenerationsphase angesehen werden (siehe Kapitel 5.1.7. „Diskussion der Überlebensraten“). Durch die Gabe von STZ wurde innerhalb kurzer Zeit ein Diabetes mellitus Typ I induziert und im Anschluss daran sofort die beschriebene Operation durchgeführt. Auch unabhängig von der Operation hätten die diabetischen Mäuse klinische Symptome entwickelt, weshalb es als Folge des Insulinmangels zu einer Schwächung des Organismus gekommen wäre. Die Operation ist als weiterer belastender Faktor anzusehen. In der Summe ist es denkbar, dass die Konzentration an Stresshormonen, besonders der Glukokortikoide, bei diesen Mäusen im Gegensatz zur gesunden Vergleichsgruppe erhöht war. Inwieweit dieser Umstand die Regeneration der Leber beeinflusst hat, ist nicht

abschließend zu beurteilen. Es gibt aber Hinweise, dass Glukokortikoide einen hemmenden Effekt auf die Leberregeneration haben (Debonera F et al., 2003).

Aufgrund der gezeigten wichtigen Rolle des Insulins bei der Leberregeneration ist ein Diabetes mellitus als Risikofaktor für die perioperative Mortalität beim Menschen zu erwarten. Ergebnisse älterer klinischer Studien (z.B. Shirabe et al., 1999; Little et al., 2002; Pocard et al., 2001) sind in diesem Sinne zu werten. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch aufgrund des multivariaten Designs der klinischen Studie gezeigt werden, dass Diabetes mellitus nicht als unabhängiger Risikofaktor zu sehen ist (siehe Kapitel 5.2. „Diskussion der klinischen Studie“). Auch wenn alle diabetischen Patienten der klinischen Studie prä- und postoperativ mit Insulin versorgt waren, ergeben sich durch die Art der Substitution Unterschiede im Vergleich zum gesunden Patienten. Auch bei optimaler Kombination von Insulinen mit langer und kurzer Halbwertszeit liegt die durchschnittliche Blutzuckerkonzentration über den physiologischen Normalwerten. Dies lässt sich zum Beispiel am höheren HbA1c Wert bei diabetischen Patienten ablesen. Hinzu kommt, dass im physiologischen Normalzustand das von den β -Zellen produzierte Insulin in die Portalvene abgegeben wird und dementsprechend in relativ hoher Konzentration die Lebersinusoide passiert. In der Leber entfaltet es seine verschiedenen Wirkungen und wird zum Teil durch Internalisierung aus dem Blut eliminiert. Diese Kinetik ist bei subkutaner Verabreichung in dieser Form nicht gegeben.

Dennoch ergeben sich auch mit diesem Wissen keine Alternativen für einen veränderten Versuchsablauf im Tierexperiment. Eine Insulinsubstitution bei den diabetischen Mäusen bzw. eine medikamentöse Behandlung der Glukoseintolleranz hätte den Einfluss von Insulin auf die Leberregeneration im Mausmodell vermutlich nicht hinreichend abgebildet.

Bei der klinischen Studie litten über 95% der in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten an Diabetes mellitus Typ II. Für Hinweise auf Beeinflussung der Regeneration durch Insulinresistenz sind daher besonders die Ergebnisse aus dem LIRKO- Mausmodell von Bedeutung.

Bei den LIRKO-Mäusen findet man im Versuchszeitraum einen Trend zu inkompletter Regeneration. Die liver-body-weight-ratio erreicht im Gegensatz zur Kontrollgruppe nach den beobachteten 84 Stunden nicht wieder den Ausgangswert. Während die an den Mitoseindices abzulesende Regenerationskinetik sowohl bei den LIRKO-Mäusen als auch bei den mit STZ behandelten Tieren jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verzögerung aufweist, ist eine periphere Lipolyse bei den Tieren mit Insulinresistenz im Gegensatz zu den mit STZ behandelten Tieren nicht zu erwarten. Eine Gewichtssteigerung des Leberparenchyms durch

Einlagerung von Lipiden ist bei den LIRKO-Mäusen deshalb unwahrscheinlich. Die osmotische Diurese, welche bei den an DM Typ I erkrankten Tieren zu einer Verschiebung der liver-body-weight-ratio geführt haben könnte, ist bei den LIRKO-Tieren in diesem Ausmaß aufgrund der nicht signifikanten postoperativen Blutzuckerkonzentrationsunterschiede ebenfalls nicht zu erwarten. Die beobachteten Unterschiede der liver-body-weight-ratio sind als Folge einer verlangsamten Regeneration zu sehen. Entsprechend zeigen die LIRKO-Mäuse 84h postoperativ im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Teilungsaktivität. Das Mausmodell zum Diabetes mellitus Typ II zeigt folglich ebenfalls eine verzögerte Regeneration der Hepatozyten. Anhand dieses Ergebnisses wäre ein erhöhtes perioperatives Risiko bei Patienten mit DM Typ II nach Leberresektion gut vereinbar.

5.1.4. Diskussion der Rolle von IGF-1

IGF-1 steht im Verdacht, eine Rolle bei der Regeneration der Leber zu spielen. Um etwaige Unterschiede im Vergleich zwischen gesunden und diabetischen Tieren hinsichtlich der Bedeutung von IGF-1 bei der Leberregeneration zu eruieren, wurde das Peptidhormon 6h bzw. 24h und 48h nach der Operation im Serum der Mäuse bestimmt. Die Ergebnisse der mit STZ behandelten diabetischen Tiere fielen ähnlich denen der gesunden Kontrollgruppe aus. Dies ist insbesondere im Vergleich zu den Resultaten des LIRKO Mausmodells interessant. Es zeigte sich, dass die 6h und 48h nach der Operation im Serum der Mäuse gemessene IGF-1 Werte sich signifikant unterschieden. So waren die Konzentrationen im Serum der LIRKO-Mäuse im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich niedriger. Die Werte der gesunden Kontrollgruppe waren mit den Tieren der Diabetes mellitus Typ I Studie vergleichbar. Ein Erklärungsansatz für dieses Ergebnis ist, dass durch den ausgeschalteten Insulinrezeptor auf den Hepatozyten der LIRKO-Mäuse die hemmende Wirkung des Insulins auf das ebenfalls in der Leber produzierte IGFBP-1 wegfällt. Dieses Bindeprotein für IGF-1 hat vermutlich mehrere Effekte, über die es zum Teil widersprüchliche Aussagen gibt. Sicher ist jedoch, dass dieses Protein die Wirkung von IGF-1 modulieren kann. Es gibt sowohl Ergebnisse, dass es die Wirkung von IGF-1 verstärkt (Elgin RG et al., 1987; Mohn KL et al., 1991), als auch die These, dass IGF-1 durch die Bindung an IGFBP-1 in seiner Wirkung gehemmt wird (Liu YY et al., 1999), zum Beispiel durch eine Minderung der Bioverfügbarkeit. Letzteres wird in der Literatur insgesamt für wahrscheinlicher angenommen. Würde also durch die geblockte Insulinwirkung die Konzentration von IGFBP-1 ansteigen und folglich die Wirkung von IGF-

1 dadurch eingeschränkt werden, so wäre eine erhöhte GH Konzentration zu erwarten, denn GH wird über einen negativen Feedbackmechanismus von IGF-1 gesteuert. Dies ist aber bei den LIRKO-Mäusen so nicht zu beobachten.

Die Wirkung von IGF-1 auf die Leberregeneration und die Kinetik, mit der es postoperativ seine Konzentration ändert, sind in der Literatur ebenfalls widersprüchlich beschrieben. So gibt es Studien, die von einer Erhöhung sprechen und andere Arbeitsgruppen, die eine Konzentrationsminderung beobachtet haben (Russell WE et al., 1985; Unterman TG et al., 1986). Zudem gibt es eine Studie, die über verstärktes Leberwachstum bei IGF-1 Knock-out Mäusen berichtet (Skrtic S et al., 2001). Als Erklärung wird die als Folge des aufgehobenen negativen Feedbacks erhöhte GH Konzentration angesehen. Eine derartige Erhöhung ist in der Gruppe der LIRKO-Mäuse jedoch trotz niedriger IGF-1 Konzentrationen nicht zu beobachten. Eine mögliche Erklärung für die nicht erhöhte GH Konzentration könnte das kurze Zeitintervall zwischen Operation und Gewinnung der Serumprobe sein. Ob das Wachstumshormon als Reaktion auf den Wegfall des negativen Feedbacks erst später ansteigt wurde nicht untersucht. Ebenfalls in die Interpretation eingeschlossen werden muss die geringe Gruppengröße in Verbindung mit der hohen Standardabweichung.

Interessant ist auch, dass bei einem vollkommenen Wegfall von IGF-1 eine gesunde Leber entstehen kann. IGF-1 scheint also nicht essentiell für das Wachstum einer gesunden Leber zu sein. Bei der Suche nach IGF-1 Rezeptoren auf den Hepatozyten stellt man fest, dass nur wenige zu finden sind. Dennoch ist die Wirkung von IGF-1 auf die Leber nicht zu unterschätzen. Begründet werden kann dies durch Hinweise, dass IGF-1 seine Wirkung evtl. auch über den Insulinrezeptor entfaltet (Liu YY et al., 1999). Ob sich daraus ein Erklärungsansatz für die oben beschriebenen Unterschiede zwischen dem Mausmodell zum Diabetes mellitus Typ I und II ergeben kann, wäre durch weiterführende Versuche zu ermitteln. Neben dem erwähnten Cross-talk von IGF-1 über den Insulinrezeptor sind auch bislang unbekannte Rezeptoren für IGF-1 auf den Leberzellen denkbar. Ebenfalls in Betracht gezogen werden muss, dass sowohl IGF-1, als auch das damit eng assoziierte IGFBP-1 Effekte auf die Endothelzellen haben. Diese wiederum könnten parakrine und autokrine Wirkungen entwickeln. Außerdem gibt es eine Studie (Skrtic S et al., 2001), deren in vitro Ergebnisse nahe legen, dass IGF-1 die Sternzellen zur Produktion von HGF stimuliert. All diese Thesen bekräftigt eine aktuelle Arbeit, die IGF-1 einen wichtigen Beitrag zur Leberregeneration zugesteht (Desbois-Mouthon C et al., 2006).

Welchen Stellenwert IGFBP-1 in der Regeneration einnimmt, muss als ungeklärt betrachtet werden. Bei Zuständen von Insulinmangel, wie zum Beispiel dem Diabetes mellitus Typ I

oder physiologisch geringen Insulinkonzentrationen, wie sie nach einer Leberteileresektion zu finden sind, wird dieses Protein vermehrt exprimiert (Mohn KL et al., 1991). Durch die Substitution von Insulin kann dieser Effekt revidiert werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es im Mausmodell für Diabetes mellitus Typ II einen Unterschied zu den Tieren mit Diabetes mellitus Typ I gibt, der die Serumkonzentration von IGF-1 signifikant beeinflusst. Ob der Unterschied auf die Präsenz von Insulin zurückzuführen ist, bleibt vorerst ungeklärt. Vorstellbar ist, dass Insulin parakrine Effekte, z.B. vermittelt über die nichtparenchymalen Zellen der Leber, auf die Hepatozyten hat. Ebenfalls möglich sind Effekte über andere Rezeptoren als den Insulinrezeptor. Eine weitere potentielle Option ist, dass der nicht vorhandene Insulinrezeptor, man denke an den oben erwähnten möglichen cross-talk von IGF-1 über den Insulinrezeptor, für den beobachteten Unterschied verantwortlich sein könnte.

5.1.5. Diskussion der Rolle von GH

Die Aufgabe von GH geht über die oben erörterten indirekten Wirkungen des IGF-1 hinaus. So löst es in einigen Organen, zu denen die Leber gehört, auch direkte Effekte aus. Diese bestehen unter anderem in der Fähigkeit, die Expression des EGF-Rezeptors zu beeinflussen (Thompson BJ et al., 2000).

Die im Serum der diabetischen Mäuse (Typ I) gemessenen GH Werte zeigten im Schnitt eine Tendenz zu höheren Konzentrationen als in der gesunden Kontrollgruppe. Bemerkenswert daran ist, dass die gemessenen IGF-1 Werte in beiden Gruppen vergleichbare Werte aufwiesen. Die erhöhten GH Werte bei den diabetischen Mäusen müssen also über einen anderen Mechanismus als das negative Feedback von IGF-1 erklärt werden können. Eine Studie zur Leberregeneration von Mäusen, die kein GH bilden konnten, ergab ein verlangsamtes Leberwachstum und ein dauerhaft reduziertes Lebergewicht im Vergleich zum Zeitraum vor der Operation (Patricia A et al., 2004). Eine Verzögerung der Leberregeneration würde man bei den Versuchstieren mit erhöhten GH-Konzentrationen folglich nicht erwarten. Eben ein solcher Trend war jedoch bei den mit STZ behandelten Tieren zu beobachten. Die vorliegende Arbeit kann diese Beobachtung ebenso wenig erklären wie eine Antwort auf die Frage geben, über welchen Mechanismus die GH Ausschüttung bei den diabetischen Tieren stärker stimuliert wird als bei der unbehandelten Kontrollgruppe. Natürlich müssen bei kleineren Versuchsgruppen, wie sie für diese Studie zur Verfügung standen, auch interindividuelle Unterschiede zwischen den Versuchsmäusen als mögliche Fehlerquelle in Betracht gezogen werden. Aufgrund der hohen Standardabweichung kann kein deutlicher Unterschied angenommen werden. Die beobachtete Tendenz müsste durch weitere Versuche verifiziert werden. Die GH Konzentration bei den LIRKO- Mäusen zeigt vergleichbare Werte zur Vergleichsgruppe. Dieses Ergebnis erstaunt jedoch, da aufgrund der signifikant geringeren IGF-1 Konzentrationen und dem damit verbundenem Wegfall des erwähnten negativen Feedbacks bei den LIRKO-Tieren, höhere Werte zu erwarten gewesen wären.

5.1.6. Diskussion der Rolle von IL-6

Ein weiterer in dieser Studie bestimmter Serumparameter ist das IL-6, welchem eine Rolle in der Leberregeneration zugeschrieben wird. Das jedenfalls lassen mehrere Studien vermuten, die es als wichtigen mitogenen Faktor für die Hepatozyten beschreiben (Streetz KL et al., 2000). Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass IL-6 knock-out Mäuse eine verlangsamte Regeneration sowie eine verlangsamte Synthese von DNS in den Hepatozyten aufweisen. In nichtparenchymalen Zellen ist dieser Vorgang nicht zu beobachten (Cressman DE et al., 1996).

Denkbar sind drei verschiedene Stimuli, die für eine IL-6 Erhöhung im Anschluss an eine Leberteileresektion sprechen.

So sorgt bereits die für die durchgeführte Operation notwendige Laparotomie nachweislich zu einer drei Stunden postoperativ beginnenden IL-6 Erhöhung (Fu ES et al., 1996). Diese erreicht 12 Stunden postoperativ ihren Maximalwert und ist erst nach sieben Tagen wieder auf die Ausgangswerte abgesunken.

Ein weiterer Stimulus ist der postoperativ deutlich verringerte Gefäßgesamtdurchmesser. Aufgrund der Resektion von 2/3 des Lebergewebes muss das durch die Leber strömende Blut nun deutlich schneller durch das verbleibende Drittel fließen. Dies geht nicht nur mit einem auf die Endothelzellen wirkenden gesteigerten Scherstress einher, sondern auch mit einem erhöhten intravasalen Druck. Dieser führt zu einer Dehnung der Kapillaren. Beide Faktoren - gesteigerter Scherstress und erhöhter intravasaler Druck - scheinen ebenfalls zu einer IL-6 Erhöhung zu führen (Kobayashi S et al., 2003).

Der dritte mögliche Reiz zur IL-6 Erhöhung beruht auf der Annahme, dass der unbehandelte Diabetes mellitus als Stressfaktor anzusehen ist. Mehrere Studien belegen, dass die IL-6 Ausschüttung sowohl bei zahlreichen akuten Ereignissen, wie Hypoxie (Ala Y et al., 1992), Intoxikationen, akuten Infektionen (Spittler et al., 2000) und Traumata (Müller CW et al., 2006) als auch bei chronischen Erkrankungen der Leber erhöht ist (Kakuma S et al., 1991; Genesca J et al., 1999).

Die in der vorliegenden Studie ermittelten IL-6 Serumkonzentrationen waren 24h nach der Operation bei den mit STZ behandelten diabetischen Mäusen im Durchschnitt etwas höher als bei der Kontrollgruppe.

Die 48h postoperativ gemessenen IL-6 Konzentrationen fielen bei den mit STZ behandelten Mäusen im Schnitt geringer als die nach 24h bestimmten Werte aus und lagen unter denen der gesunden Vergleichsgruppe. Hinzu kommt, dass die durchschnittliche IL-6 Serumkonzentration der gesunden Vergleichsgruppe 48h post operationem über der nach 24h

bestimmten Werte lag. Angesichts der bisherigen Ausführungen ist dieses Ergebnis am ehesten mit den kleinen Versuchsgruppen in Verbindung mit der hohen Standardabweichung zu erklären. Im Tiermodell zum Diabetes mellitus Typ II zeigen sich bei diesem Experiment IL-6 Konzentrationen, welche mit der oben beschriebenen Theorie konform sind. Die 48h nach der Teilresektion gemessenen Werte der LIRKO-Mäuse liegen ebenso wie die 6h post OP Werte über denen der gesunden Vergleichsgruppe. Des Weiteren ist der erwartete Abfall der IL-6 Konzentrationen in beiden Gruppen zu erkennen.

Interessante Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkungen erhöhter IL-6 Werte auf die Leberregeneration liefert eine Studie (Jin X et al., 2006), in der den Versuchstieren während der Leberregeneration IL-6 verabreicht wurde. Es zeigte sich, dass IL-6 die Zeit bis zur vollständigen Wiederherstellung des ursprünglichen Lebergewichtes verkürzt, wenn es über ein bis zwei Tage gegeben wird. Bei einer Verabreichung über fünf bis sieben Tage behindert es jedoch die Leberregeneration. Die dauerhaft erhöhten IL-6 Konzentrationen bei chronischen Lebererkrankungen führen somit zu einer eingeschränkten Leberregeneration. Folgt man der Theorie dieser Studie, so würden die Auswirkungen von erhöhten IL-6 Konzentrationen für den in dieser Arbeit beobachteten kurzen Zeitraum eher positive Effekte auf die Regeneration der Leber haben. Voraussetzung wäre jedoch, dass die Kombination von unbehandeltem Diabetes mellitus und Leberteilresektion zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Serumkonzentration führt. Dies wäre hinsichtlich der oben beschriebenen Beobachtungen durchaus möglich, ist aber aufgrund der verwendeten kleinen Versuchsgruppen nicht zuverlässig nachweisbar. Der beschriebene Mechanismus steht als Beispiel für die Komplexität der Leberregeneration. Die als Folge des verminderten Insulinspiegels bei den diabetischen Mäusen verlangsamte Regeneration der Leber würde nämlich zumindest teilweise durch das bei den diabetischen Tieren erhöhte IL-6 ausgeglichen werden und so die direkte Wirkung von Insulin verschleiern.

5.1.7. Diskussion der Überlebensraten

Dass die ca. 2/3 Leberresektion im Allgemeinen von den Mäusen gut toleriert wurde, zeigt sich in der ca. 90%igen Überlebensrate der gesunden Vergleichsgruppen beider Mausmodelle (DM Typ I & II). Diese Zahlen stimmen mit den Ergebnissen der Literatur weitgehend überein. So berichten Panis et al. (1997) zwar von einer 100%igen Überlebensrate bei 70%ig hepatektomierten Ratten, in anderen Studien finden sich jedoch ebenfalls Werte um die 90%. Sieht man von denen während der Operation aufgrund von Durchführungsfehlern verstorbenen Tieren ab, so erreicht man in der Gruppe der mit STZ behandelten Mäuse eine Überlebensrate von 55,6%.

Diese deutlich schlechteren Überlebensraten kann man zum Teil mit dem stark eingeschränkten Gesundheitszustand erklären, welche die metabolische Dysbalance mit sich bringt. Die Mäuse litten unter einem unbehandelten Diabetes mellitus Typ I mit stark erhöhten Blutzuckerwerten und den entsprechenden Folgen eines Insulinmangels. Dazu zählen Gewichtsverlust, Dehydratation aufgrund der osmotischen Diurese und weitere schwerwiegende Störungen. Auffällig ist, dass die durchschnittliche präoperative Blutglukosekonzentration in der Gruppe der verstorbenen diabetischen Mäuse deutlich höher lag als bei den diabetischen Mäusen, die den gesamten Versuchszeitraum überlebt haben. Es ist davon auszugehen, dass der Insulinmangel und die entsprechenden Folgeerscheinungen die Tiere derart geschwächt haben, dass sie den operativen Eingriff im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich schlechter tolerierten.

Des Weiteren scheint die Höhe des Blutzuckers einen Einfluss auf die perioperative Mortalität zu haben. Die trotz gleicher Behandlung im Schnitt unterschiedlichen Blutzuckerwerte sind durch interindividuelle Unterschiede der Tiere zu erklären.

Im Experiment zum Diabetes mellitus Typ II zeigt sich ebenfalls ein Trend zu geringeren Überlebensraten bei den diabetischen Tieren. Dieser fällt aber nicht so deutlich aus wie bei den Tieren mit Insulindefizit. Die mittlere Blutglukosekonzentration lag bei den LIRKO-Tieren deutlich unter den Werten der mit STZ behandelten Mäuse. Das Risiko für eine metabolische Entgleisung und der damit verbundenen perioperativen Gefahr ist daher auch geringer einzuschätzen. Darüber hinaus verhindert das vorhandene Insulin bei den LIRKO-Tieren die periphere Lipolyse und damit ein Anfluten von Fettsäuren in der von der Resektion geschwächten Leber. Die höheren Überlebensraten beim Diabetes mellitus Typ II Mausmodell im Vergleich zum Diabetes mellitus Typ I Mausmodell lassen sich auf diese Art teilweise erklären.

5.2. Diskussion der klinischen Studie

Im betrachteten Zeitraum (1989 bis 2003) ergab sich eine durchschnittliche perioperative Mortalität von 5,5%. Dieser Wert entspricht den publizierten Werten anderer Häuser. Die Auswertung eines in den USA durchgeführten Gutachtens ergab eine perioperative Mortalität von 5,8% in großen Krankenhäusern (Dimick et al., 2004).

In einem Patientenbestand, nicht sortiert nach Lebererkrankungen und ohne vorherige große Bauchoperationen oder Chemotherapien, zeigten die Diabetiker eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu den Patienten ohne Diabetes mellitus. Die diabetischen Patienten waren durchschnittlich jedoch älter und hatten eine höhere Prävalenz an Leberzirrhose als die Patienten ohne Diabetes mellitus. Mit dem multivariaten Ansatz konnte gezeigt werden, dass Diabetes mellitus keinen unabhängigen Risikofaktor für die perioperative Mortalität bei Leberresektionen darstellt. Das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Operation und das Vorliegen einer Leberzirrhose haben jedoch signifikante Bedeutung.

Auch wenn die Ergebnisse des Tierexperimentes eine perioperative Beeinträchtigung erwarten lassen und die Resultate anderer klinischer Arbeiten unterstützt (Shirabe et al., 1999; Little et al., 2002; Pocard et al., 2001), könnte in vorherigen Studien die Auswahl der Patienten nach zugrunde liegenden Krankheiten zu einer Überschätzung des Einflusses von Diabetes mellitus auf die perioperative Morbidität und Mortalität geführt haben. Alle diabetischen Patienten, die in der Studie von Little et al. nach einer Leberresektion aufgrund kolorektaler Metastasen verstorben sind, hatten präoperativ eine Chemotherapie erhalten (Little et al., 2002). Pocard et al. beschrieben (Pocard et al., 2001) eine nach Chemotherapie verzögerte Leberregeneration, verbunden mit einer fettigen Degeneration. Eine verzögerte Regeneration und ein damit verbundenes beeinträchtigtes perioperatives Ergebnis wäre somit keine Folgeerscheinung des Diabetes mellitus sondern der Chemotherapie.

Bei Patienten, bei denen wegen eines HCC eine Leberresektion vorgenommen wurde, erkannten Shirabe et al. DM als Risikofaktor für postoperatives Leberversagen. Ihre Ergebnisse zogen sie allerdings aus einem überwiegend HCV positiven Patientenstamm (Shirabe et al., 1999). Andererseits gibt es zwei Studien, die über einen überwiegend mit HBV positiven Patientenstamm berichten. Diesen Arbeiten zufolge hat der Diabetes mellitus keine Auswirkungen auf die perioperative Mortalität (Poon et al., 2002; Huo et al., 2004). In allen Studien wurden die Patienten jedoch vor der Operation nach kardiopulmonalen Einschränkungen, entsprechend bestehender Richtlinien, sortiert (Redai et al., 2004). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass eine unbekannte Anzahl von Patienten aufgrund der

durch den Diabetes mellitus verursachten kardiopulmonalen Einschränkungen von der Operation ausgeschlossen wurde.

Insgesamt war die Inzidenz von perioperativen Komplikationen in unserer Studie zwischen Diabetikern (44%) und nicht diabetischen Patienten (36%, $p=0,179$) ähnlich, obwohl Nierenversagen, postoperative Aszites und Lungenentzündungen bei Personen mit DM häufiger beobachtet wurden. Poon et al. berichteten ebenfalls über vergleichbare Komplikationsraten von 38,7% und 37,1% ($p=0,820$) bei Patienten mit oder ohne gleichzeitig bestehendem DM (Poon et al., 2002). Obwohl kein Fall von Nierenversagen beschrieben wurde, war die mittlere Kreatininkonzentration bei den diabetischen Patienten am siebten postoperativen Tag signifikant höher als bei den Patienten ohne Diabetes mellitus. Bei einem ebenfalls hauptsächlich mit HCV positivem Patientenstamm beschrieben Ikeda et al. eine höhere Inzidenz von postoperativen Komplikationen bei Diabetikern nach kurativen Leberresektionen bei HCC (Ikeda et al., 1998). In einer anderen Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde Diabetes mellitus als unabhängiger Risikofaktor für postoperative Morbidität bei kleinen Leberresektionen bei HCC beschrieben (Shimada et al., 1998). Beide Autoren folgten einer sehr regressiven Definition für eine postoperative Morbidität und berichteten nicht über die Verhältnisse der verschiedenen aufgetretenen Komplikationen zueinander.

Neben weithin bekannten Parametern der funktionellen Leberreserve (präoperative Albuminkonzentration, das Vorhandensein einer Leberzirrhose) und chirurgischen Faktoren (Ära, in der die OP durchgeführt wurde sowie das Ausmaß der Leberresektion), wurde auch das Alter als unabhängiger, prognostischer Wert für perioperative Mortalität identifiziert. Der Einfluss des Alters auf die perioperative Mortalität bei Leberresektionen wurde zwar in verschiedenen Studien angesprochen, man kam jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. Bei Studien jedoch, die verschiedene cut-off Punkte für altersspezifisch sortierte Gruppen benutzten (>65 Jahre [Ezaki et al., 1987; Yanaga et al., 1988; Chiappa et al., 2002; Wu et al., 2004] oder >69 Jahre [Takenaka et al., 1994; Hanazaki et al., 2001]), gab es entweder Unterschiede im Ausmaß der durchgeführten Operationen (Lui et al., 1999; Aldrighetti et al., 2004), oder es wurde über stark selektierte Patientenstämme berichtet (Melendez et al., 2001). Wir schlussfolgerten, dass unter Anwendung etablierter kardiopulmonaler und chirurgischer Patientenauswahlkriterien Diabetes mellitus kein unabhängiger Risikofaktor für perioperative Mortalität oder Morbidität bei Leberresektionen ist. Ebenso wenig fand sich ein Beleg für eine beeinträchtigte Leberregeneration bei Diabetes mellitus. Dennoch sollten Patienten mit DM vor einer Leberresektion besonderes sorgfältig auf Risikofaktoren untersucht werden, da

der DM auch immer als Folge einer Leberzirrhose oder eines chronischen Alkoholkonsums entstanden sein kann. Des Weiteren wurde ein spezielles Muster von Komplikationen bei diabetischen Patienten nach Leberresektion beobachtet. Aus diesem Grund sollte Patienten mit diabetischer Nephropathie besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Obwohl in dieser Studie kein genereller Einfluss von DM auf die perioperative Mortalität festgestellt wurde, könnte die Qualität der metabolischen Kontrolle, ebenso wie das Stadium und der Typ des Diabetes, bedeutsam sein. Um dies abzuklären, werden in der Zukunft weitere, detaillierte Untersuchungen nötig sein.

6 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den tierexperimentellen Modellen der unbehandelte Diabetes mellitus zu einer verzögerten Leberregeneration führt. Nach den Ergebnissen der klinischen Studie kann er jedoch nicht als unabhängiger Risikofaktor für die perioperative Mortalität oder Morbidität nach Leberresektionen beim Menschen angesehen werden. Die Rolle von Insulin als Comitogen wurde bestätigt und die wichtige Funktion in der Glukosehomöostase unterstrichen. Abschließend soll auf die in Kapitel zwei gestellten Fragen eingegangen werden.

1. Osmotische Diurese und periphere Lipolyse beeinflussen den Verlauf der Liver-body-weight-ratio im Modell des DM Typ I. Hinweise auf eine verzögerte Leberregeneration finden sich hier nicht. Im Modell des DM Typ II zeigt sich jedoch ein Trend zur inkompletten Leberregeneration.
2. Der Mitoseindex zeigt, sowohl im Mausmodell des Insulinmangels als auch der hepatischen Insulinresistenz, eine verzögerte Regenerationskinetik der Hepatozyten nach Leberteileresektion.
3. Im Modell des Insulinmangels zeigt sich parallel zur verzögerten Hepatozytenregeneration auch eine verzögerte Regeneration der sinusoidalen Endothelzellen (sEC). Die induzierte Insulinresistenz der Hepatozyten im Mausmodell zum DM Typ II hat keinen Einfluss auf die Mitoserate der sEC.
4. Während sich die postoperativ bestimmten IGF-1 Serumkonzentrationen der Tiere mit DM Typ I nicht von den Werten der Vergleichsgruppe unterscheiden, bestehen signifikante Konzentrationsminderungen bei den Mäusen mit Insulinresistenz.
5. Es besteht kein eindeutiger Unterschied der postoperativ gemessenen IL-6-Konzentrationen bei Mäusen mit DM (Typ I und II) im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

6. Es besteht kein eindeutiger Unterschied der postoperativ gemessenen GH-Konzentrationen bei Mäusen mit DM (Typ I und II) im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

7. Mittels eines multivariaten Ansatzes wird in der klinischen Studie gezeigt, dass kein eindeutiger Unterschied bezüglich des perioperativen Risikos von diabetischen zu Patienten ohne DM besteht. Diabetes mellitus kann daher nicht als unabhängiger Risikofaktor für die perioperative Mortalität oder Morbidität bei Leberresektionen angesehen werden.

Literaturverzeichnis:

- 1 Adam U, Makowiec F, Fischer E, Hopt UT, Sinkende Mortalität und Morbidität trotz Zunahme des Resektionsausmaßes bei Leberresektionen, German Medical Science; 2005. Doc 05dgch2625
- 2 Assy N, Minuk GY, Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. J Hepatol. Apr 1997; 26(4):945-52
- 3 Aznar Aznar A, Sánchez Cañizares T, Bentura Remacha ML, López Alonso A, Díaz Pavón L., Effect of alloxan-induced diabetes on hepatic regeneration. Rev Esp Enferm Dig. May 1991; 79(5):313-9
- 4 Blindenbacher, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH, Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice, Hepatology 2003; 38, p. 674
- 5 Bonney RJ, Hopkins HA, Walker PR, Potter VR, Glycolytic isoenzymes and glycogen metabolism in regenerating liver from rats on controlled feeding schedules. Biochem. J. 1973; 136, 115
- 6 Broten J, Michalopoulos G, Petersen B, Cruise J. Adrenergic stimulation of hepatocyte growth factor expression. Biochem Biophys Res Commun 1999; 262: 76-79
- 7 Chin S, Ramirez S, Greenbaum LE, Najj A, Taub R. Blunting of the immediate-early gene and mitogenic response in hepatectomized type 1 diabetic animals, Am J Physiol Oct 1995; 269 (4Pt 1):E691-700
- 8 Cressman DE, Diamond RH, Taub R, Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. Hepatology 1995; 21, 1443
- 9 Cressman DE, Greenbaum LE, Haber BA, Taub R, Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. J. Biol. Chem. 1994; 269, 30429

- 10 Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R.I., Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274, 1379
Cruise JL, Houck KA, Michalopoulos GK., Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. *Science* 1985; 227, 749
- 11 Cruise JL, Michalopoulos G., Norepinephrine and epidermal growth factor: dynamics of their interaction in the stimulation of hepatocyte DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.* 1985; 125, 45
- 12 Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger RR, Kuhn C, Michalopoulos G., Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 1987; 7, 1189
- 13 Chiappa A, Zbar AP, Biella F, Crotti C, Staudacher C. Validity of hepatic resection for cancer in the elderly. *Ann Ital Chir* 2002; 73: 397–401
- 14 Chin S, Ramirez S, Greenbaum LE, Najj A, Taub R. Blunting of the immediate- early gene and mitogenic response in hepatectomized type 1 diabetic animals. *Am J Physiol* 1995; 269: E691–E700
- 15 Couinaud C. Anatomic principles of left and right regulated hepatectomy: Technics. *J Chir (Paris)* 1954; 70: 933–966
- 16 D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G: Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J* 2004; 18:959-961
- 17 Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE, Aldeguer X, Que X, Shaked A, Olthoff KM. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation. *Dec* 2003; 38(6):1563-72

- 18 DeFronzo RA: Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37:667-687
Diehl AM, Yin M, Fleckenstein J, Yang SQ, Lin HZ, Brenner DA, Westwick J, Bagby G, Nelson S., Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol.* 1994; 267, G552
- 19 Demetris AJ, Lunz JG 3rd, Specht S, Nozaki I.. Biliary wound healing, ductular reactions, and IL-6/gp130 signaling in the development of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3512-3522
- 20 Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset C, Tronche F, Le Bouc Y, Holzenberger M., Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB J.* 2006 Apr; 20(6):773-5
- 21 Dimick JB, Wainess RM, Cowan JA, Upchurch GR Jr, Knol JA, Colletti LM. National trends in the use and outcomes of hepatic resection. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 31–38
- 22 Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels RM, Saliez A, Gianello P, Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *1: Transplantation* 2006; 15;81(1):36-45
- 23 Eggstein, M., Luft D Diabetes mellitus in: Gross R, Schölmerich P, Gerok W. (Hrsg.): *Die Innere Medizin* 8. Aufl., Schattauer, Stuttgart, 1994; S. 888-922
- 24 Elgin RG, Busby WH Jr, Clemmons DR, An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(10):3254-8
- 25 Evarts RP, Hu Z, Omori N, Omori M, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes: Comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2143-2151

- 26 Ezaki T, Yukaya H, Ogawa Y. Evaluation of hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the elderly. *Br J Surg* 1987; 74: 471–473
- 27 Fisher SJ, Kahn CR, Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production, *J. Clin. Invest.* 2003 ; 111:463-468
- 28 Francavilla A et al., Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *Transplant. Proc.* 1988; 20 494
- 29 Fu ES, Norman JG, Scharf JE, Burdash N., Effect of type of anesthesia and lower-abdominal laparotomy in mice on the cytokine response to acute stress. *Reg Anesth.* (1996 Sep-Oct);21(5):470-3
- 30 Gauldie J, Richards C, Baumann H, IL6 and the acute phase reaction. *Res. Immunol.* 1992; 143, 755
- 31 Gebhardt R, Baldysiak-Figiel A, Krugel V, Ueberham E, Gaunitz F. Hepatocellular expression of glutamine synthetase: An indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem* 2007; 41: 201-266
- 32 Genesca J, Gonzalez A, Segura R, Catalan R, Marti R, Varela E, Cadelina G, Martinez M, Lopez-Talavera JC, Esteban R, Groszmann RJ, Guardia J. Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 1999 Jan; 94(1):169-77
- 33 Gepts W, Lecompte PM: The pancreatic islets in diabetes. *Am. J. Med.* 1981; 70, 105-115
- 34 Ghahary A, Minuk G, Luo J, Gauthier A, Murphy LJ , Effects of partial hepatectomy on hepatic and renal insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Hepatology* 1992; 15, pp. 1125–1131
- 35 Gratzner, H.G . Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218(4571): 474-475

- 36 Greene AK, Puder M, Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg.* 2003 Mar-Apr; 16(2):99-102.
- 37 Gressner AM, Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J. Hepatol.* 1995; 22, 28
- 38 Gressner AM, Lahme B, Brenzel A, Molecular dissection of the mitogenic effect of hepatocytes on cultured hepatic stellate cells. *Hepatology* 1995; 22, pp. 1507–1518
- 39 Grompe M, Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M, Serial transplantation reveals stem cell line regenerative potential in parenchymal mouse hepatocytes. *Hepatology* 24, 256A (1996) Haber BA, Chin S, Chuang E, Buikhuisen W, Naji A, Taub R. High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes. *J Clin Invest* 1995; 95: 832–841
- 40 Hanazaki K, Kajikawa S, Shimozawa N, Shimada K, Hiraguri M, Koide N, Adachi W, Amano J. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the elderly. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 38–46
- 41 Harrison LC, Honeyman MC, Deaizpurua HJ, Schmidli RS, Colman PG, Tait BD, Cram DS: Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1993; 341, 1365-1269
- 42 Hauner H, Häufigkeit und medizinische Versorgung von Diabetes mellitus in Deutschland URL: <http://www.diabetesstiftung.de/studien.html> Stand: 21.10.2007
- 43 Higgins GM, Anderson RM, Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 1931; 12, 186
- 44 Houck KA, Cruise JL, Michalopoulos G. Norepinephrine modulates the growth-inhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* 1988; 135: 551-555

-
- 45 Houck KA, Michalopoulos GK, Michalopoulos, Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J. Cell. Physiol.* 1989; 141, 503
- 46 Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore DD. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 2006; 312: 233-236
- 47 Huo TI, Lui WY, Huang YH, Chau GY, Wu JC, Lee PC, Chang FY, Lee SD. Diabetes mellitus is a risk factor for hepatic decompensation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing resection: A longitudinal study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2293 –2298
- 48 Huo TI, Wu JC, LuiWY, Huang YH, Lee PC, Chiang JH, Chang FY, Lee SD. Differential mechanism and prognostic impact of diabetes mellitus on patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical and nonsurgical treatment. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1479–1487
- 49 Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, Brenner DA. 1998. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration [published erratum appears in *J Clin Invest* 1998 Apr 1;101(7):1541]. *J Clin Invest* 101: 802-811
- 50 Ikeda Y, Shimada M, Hasegawa H, Gion T, Kajiyama K, Shirabe K, Yanaga K, Takenaka K, Sugimachi K. Prognosis of hepatocellular carcinoma with diabetes mellitus after hepatic resection. *Hepatology* 1998; 27: 1567–1571
- 51 Jakowlew SB, Mead JE, Danielpour D, Wu J, Roberts AB, Fausto N. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in rat liver regeneration: Messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta. *Cell Regul* 1991; 2: 535-548

- 52 Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG., Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair., 1: Hepatology. 2006 Mar;43(3):474-84
- 53 Jirtle RL, Michalopoulos GK, Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. Cancer Res. 1982; 42, 3000
- 54 Johnston DG, Johnson GA, Alberti KG, Millward-Sadler GH, Mitchell J, Wright R., Hepatic regeneration and metabolism after partial hepatectomy in diabetic rats: effects of insulin therapy. Eur J Clin Invest 1986 Oct; 16(5):384-390
- 55 Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes 1994; 43:1066-1084
- 56 Kakumu S, Shinagawa T, Ishikawa T, Yoshioka K, Wakita T, Ito Y, Takayanagi M, Ida N. Serum interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis B. Am J Gastroenterol. 1991 Dec; 86(12):1804-8
- 57 Kan M, Huang JS, Mansson PE, Yasumitsu H, Carr B, McKeehan WL., Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1989; 86, 7432
- 58 Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. Hepatology 2000; 31: 75-82
- 59 Kirillova I, Chaisson M, Fausto N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. Cell Growth Differ 1999; 10: 819-828
- 60 Kobayashi S, Nagino M, Komatsu S, Naruse K, Nimura Y, Nakanishi M, Sokabe M., Stretch-induced IL-6 secretion from endothelial cells requires NF-kappaB activation, Biochem Biophys Res Commun 2003 Aug; 22;308(2):306-12

- 61 Köbberling J, Tillil H, Diabetestypen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede in: Drost H, Gries FA, Jahnke K (Hrsg.): Der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM). Ätiologische und therapeutische Probleme. Schattauer, Stuttgart, New York 1991; S. 50-65
- 62 Kohler C, Bell AW, Bowen WC, Monga SP, Fleig W, Michalopoulos GK. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 2004; 39: 1056-1065
- 63 Kolb, H. Diabetes in: Gemsa D, Kalden JR, Resch K(Hrsg.): Immunologie. Grundlagen-Klinik-Praxis 4. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York 1997; S. 540-547
- 64 Kooby DA, Jarnagin WR. Surgical management of hepatic malignancy. *Cancer Invest* 2004; 22: 283–303
- 65 Kraft, W, Reusch C, Endokrine Organe in: W. KRAFT (Hrsg.): Kleintierkrankheiten 2.Aufl., Ulmer, Stuttgart 1990; S. 469-507
- 66 LaMarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, Hussaini I, Hall SW, Gonias SL. An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice. *J Clin Invest* 1991; 87: 39-44
- 67 LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: Role of VEGFR-1. *Science* 2003; 299: 890-893
- 68 Lee GH, Merlino G, Fausto N., Development of liver tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice. *Cancer Res.* 1992; 52, 5162
- 69 Lesurtel M, Graph R, Aleil B, Walther B, Tian Y, Jochum W, Gaget C, Bader M, Clavien P. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006; 312: 104-107

- 70 Leu JI, Crissey MA, Craig LE, Taub R., Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. 1: Mol Cell Biol. 2003; 23(4):1251-9
- 71 Liu Y, Michalopoulos GK, Zarnegar R. Structural and functional characterization of the mouse hepatocyte growth factor gene promoter. J Biol Chem 1994; 269: 4152-4160
- 72 Liu YY, Rajkumar K, Murphy LJ., Hepatic regeneration in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. 1: J Hepatol. 1999 Apr; 30(4):674-80
- 73 Liu Z, Sakamoto T, Ezure T, Yokomuro S, Murase N, Michalopoulos G, Demetris AJ. Interleukin-6, hepatocyte growth factor, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice: Interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium. Hepatology 1998; 28: 1260-1268
- 74 Little SA, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Blumgart LH, Fong Y. Diabetes is associated with increased perioperative mortality but equivalent long-term outcome after hepatic resection for colorectal cancer. J Gastrointest Surg 2002; 6: 88–94
- 75 Lui WY, Chau GY, Wu CW, King KL. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in elderly cirrhotic patients. Hepatogastroenterology 1999; 46: 640–645
- 76 Mangnall D, Bird NC, Majeed AW, The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. Liver Int 2003; 23:124–138
- 77 Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. Hepatology 1995; 21: 1695-1701
- 78 Martin, S, Kolb H, Lampeter EF: Aktuelle therapeutische Strategie des Typ 1 Diabetes und seiner präklinischen Vorstadien. Internist 1996; 37, 1289-1304

- 79 Mead JE, Fausto N., Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Ibid.* 1989; 86, 1558
- 80 Melendez J, Ferri E, Zwillman M, Fischer M, DeMatteo R, Leung D, Jarnagin W, Fong Y, Blumgart LH. Extended hepatic resection: A 6-year retrospective study of risk factors for perioperative mortality. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 47–53
- 81 Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR., Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction, *Mol Cell* 2000; 6(1):87-97
- 82 Michalopoulos GK, Bowen WC, Mule K, Stolz DB. Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am J Pathol* 2001; 159: 1877-1887
- 83 Michalopoulos GK, DeFrances MC, Liver regeneration. *Science*.1997 Apr 4; 276(5309):60-6
- 84 Michalopoulos GK, Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007 Nov; 213(2):286-300
- 85 Mochida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, Fujiwara K., Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 226, 176
- 86 Mohn KL, Laz TM, Melby AE, Taub R, Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. Liver-specific induction patterns of gene 33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the jun, fos, and egr families. *J. Biol. Chem.* 1990; 265, 21914
- 87 Mohn KL, Melby AE, Tewari DS, Laz TM, Taub R: The gene encoding rat insulinlike growth factor-binding protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Mol Cell Biol.* 1991; 11(3):1393-1401

- 88 Mola PW, Sudha B, Paulose CS, Effect of insulin on DNA synthesis and kinetic parameters of thymidine kinase during liver regeneration. *Biochem Mol Biol Int.* Nov 1996; 40(5):1067-75
- 89 Monga SP, Padiaditakis P, Mule K, Stolz DB, Michalopoulos GK. Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* 2001; 33: 1098-1109
- 90 Müller CW, Sattler M, van Griensven M, Luepkemann M, Hildebrand F, Krettek C, Gerich T, Interleukin 6 in den ersten 30 Minuten nach Trauma - der bessere Traumascore?, *German Medical Science*; 2006. Doc E.6.2-147
- 91 Nadal C, Zajdela F, Somatic polyploid cells in rat liver. I. The role of binuclear cells in the formation of the polyploid cells. *Exp. Cell Res.* 1966; 42, 99
- 92 Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122(3) 1450 (1984); E. Gherardi and M. Stoker, *Nature* 346, 228, (1990); L. Naldini, et al., *Oncogene* 1991; 6, 501
- 93 Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 1991; 6: 501-504
- 94 NOMINA ANATOMICA VETERINARIA International Committee on Veterinari Gross Anatomical Nomenclature. 3. Aufl., Ithaka, New York 1983; 28-30
- 95 Panis Y, MC Cullan DM, Edmond JC, Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997; 121:142-149
- 96 Patricia A. Pennisi, John J. Kopchick, Snorri Thorgeirsson, Derek LeRoith and Shoshana Yakar, Role of Growth Hormone (GH) in Liver Regeneration, *Endocrinology* 2004; Vol. 145, No. 10 4748-4755

-
- 97 Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001; 34: 688-693
- 98 Pennisi PA, Kopchick JJ, Thorgeirsson S, LeRoith D, Yakar S., Role of growth hormone (GH) in liver regeneration. 1: *Endocrinology*. 2004 Oct; 145(10):4748-55
- 99 Ping C, Xiaoling D, Jin Z, Jiahong D, Jiming D, Lin Z., Hepatic sinusoidal endothelial cells promote hepatocyte proliferation early after partial hepatectomy in rats. 1: *Arch Med Res*. 2006 Jul; 37(5):576-83
- 100 Pocard M, Vincent-Salomon A, Girodet J, Salmon RJ. Effects of preoperative chemotherapy on liver function tests after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1406–1408
- 101 Poon RT, Fan ST. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: Patient selection and postoperative outcome. *Liver Transpl* 2004; 10: S39–S45
- 102 Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, Wong J. Improving perioperative outcome expands the role of hepatectomy in management of benign and malignant hepatobiliary diseases: Analysis of 1222 consecutive patients from a prospective database. *Ann Surg* 2004; 240: 698–710
- 103 Poon RT, Fan ST, Wong J. Does diabetes mellitus influence the perioperative outcome or long term prognosis after resection of hepatocellular carcinoma? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1480–1488
- 104 Pringle H. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908; 48: 541–549
- 105 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 646–649

- 106 Qiao JG, Wu L, Lei DX, Wang L, Insulin promotes sinusoidal endothelial cell proliferation mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol.* 2005 Oct; 14;11(38):5978-83
- 107 Rabes HM, Wirsching R, Tuzcek HV, Iseler G, Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet.* 1976; 9, 517
- 108 Redai I, Emond J, Brentjens T. Anesthetic considerations during liver surgery. *Surg Clin North Am* 2004; 84: 401–411 Shimada M, Takenaka K, Fujiwara Y, Gion T, Shirabe K, Yanaga K, Sugimachi K. Risk factors linked to postoperative morbidity in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 1998; 85: 195–198
- 109 Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL, Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263, 1149
- 110 Rubin RA, O'Keefe EJ, Earp HS., Alteration of epidermal growth factor-dependent phosphorylation during rat liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982; 79, 776
- 111 Russell WE, D'Ercole AJ, Underwood LE., Somatomedin C/insulinlike growth factor I during liver regeneration in the rat. *Am J Physiol* 1985; 248(5 Pt 1):E618-23
- 112 Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetkeke NC, Lee DC., Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol. Carcinog.* 1996; 15, 183
- 113 Schadewaldt, H (1975) *The History of Diabetes mellitus.* Aus: VON ENGELHARDT, D (Herausgeber) (1989) *Diabetes - Its medical and cultural history.* Springer-Verlag, 1. Aufl., Berlin
- 114 Scharf JG, Knittel T, Dombrowski F, Muller L, Salle B, Braulke T, Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27, pp. 1275–1284

- 115 Schirmacher P, Geerts A, Jung W, Pietrangelo A, Rogler CE, Dienes HP. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *Exs* 1993; 65: 285-299
- 116 Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C., Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373, 699
- 117 Schoen Smith JM, Lauth WW., The role of prostaglandins in triggering the liver regeneration cascade. 1: *Nitric Oxide* 2005; 13(2):111-7
- 118 Schuett H, Eipel C, Maletzki C, Menger MD, Vollmar B., NO counterbalances HO-1 overexpression-induced acceleration of hepatocyte proliferation in mice. 1: *Lab Invest.* 2007 Jun; 87(6):602-12
- 119 Shirabe K, Shimada M, Gion T, Hasegawa H, Takenaka K, Utsunomiya T, Sugimachi K. Postoperative liver failure after major hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the modern era with special reference to remnant liver volume. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 304–309
- 120 Skrtic S, Wallenius K, Sjögren K, Isaksson OG, Ohlsson C, Jansson JO., Possible roles of insulin-like growth factor in regulation of physiological and pathophysiological liver growth. *Horm Res.* 2001; 55 Suppl 1:1-6
- Skov Olsen P, Boesby S, Kirkegaard P, Therkelsen K, Almdal T, Poulsen SS, Nexø E., Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1988; 8, 992
- 121 Skov Olsen P., Poulsen S. S., Kirkegaard P., Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut* 1985; 26, 920
- 122 Skrtic S, Wallenius V, Ekberg S, Brenzel A, Gressner AM, Jansson JO, Insulin-like growth factors stimulate expression of hepatocyte growth factor but not transforming growth factor beta1 in cultured hepatic stellate cells. *Endocrinology* 1997; 138, pp. 4683–4689

- 123 Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P, A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445: 881-885
- 124 Sokabe T, Yamamoto K, Ohura N, Nakatsuka H, Qin K, Obi S, Kamiya A, Ando J. Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by fluid shear stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 2004; 287: H2027-H2034
- 125 Spittler A, Razenberger M, Kupper H, Kaul M, Hackl W, Boltz-Nitulescu G, Függer R, Roth E. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis.* 2000 Dec; 31(6):1338-42
- 126 Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, et al., Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341, (8837):65-71
- 127 Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH, Putnam CW, The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1973; 137, 179
- 128 Starzl TE, Watanabe K, Porter KA, Putnam CW. Effects of insulin, glucagon, and insuling/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portacaval shunt in dogs. *Lancet* 1976; 17; 1(7964):821–825
- 129 Stella MC, Comoglio PM. HGF: A multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1357-1362

- 130 Stocker E, Wullstein HK, Brau G, Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 1973; 14, 93
- 131 Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999; 59: 3954-3960
- 132 Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C., Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 2000 Aug; 47(2):309-12
- 133 Takenaka K, Shimada M, Higashi H, Adachi E, Nishizaki T, Yanaga K, Matsumata T, Ikeda T, Sugimachi K. Liver resection for hepatocellular carcinoma in the elderly. *Arch Surg* 1994; 129: 846–850
- 134 Taub R. Liver regeneration 4: Transcriptional control of liver regeneration. *Faseb J.* 1996; 10: 413-427
- 135 Thompson B JL, Shang CA, Waters M, Identification of genes induced by growth hormone in rat liver using cDNA arrays. *Endocrinology* 2000; 141:4321–4324
- 136 Thorgeirsson SS, Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J.* 1996; 10, 1249
- 137 Unterman TG, Phillips LS., Circulating somatomedin activity during hepatic regeneration. *Endocrinology* 1986; 119(1):185-92
- 138 Wagenaar GT, Chamuleau RA, Pool CW, de Haan JG, Maas MA, Korfage HA, Lamers WH. Distribution and activity of glutamine synthase and carbamoylphosphate synthase upon enlargement of the liver lobule by repeated partial hepatectomies. *J Hepatol* 1993; 17: 397-407
- 139 Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Pediaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. A mechanism of cell survival: Sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 2002; 9: 411-421

- 140 Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28: 1226-1234
- 150 Webber EM, Wu JC, Wang L, Merlino G, Fausto N., Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 1994; 145, 398
- 151 Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE: The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999; 104:787-794
- 152 Wu YL, Yu JX, Xu B. Safe major abdominal operations: Hepatectomy, gastrectomy and pancreatoduodenectomy in elder patients. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1995–1997
- 153 Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: Requirement for type 1 but not type 2 receptor [comment]. *Hepatology* 1998; 28: 959-970
- 154 Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, Honjo M, Takahashi M, Takahashi T, Hirai H, Tushima T, Akanuma Y, Fujita T, Komuro I, Yazaki Y, Kadowaki T Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 1997; 390:91–96
- 155 Yanaga K, Kanematsu T, Takenaka K, Matsumata T, Yoshida Y, Sugimachi K. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma in elderly patients. *Am J Surg* 1988; 155: 238–241
- 156 Zimmet P, McCarty D: The NIDDM epidemic: global estimates and projection:a look into the crystall ball. *IDF Bulletin* 1995; 40, 8-16

Quellen der Abbildungen:

Abbildung 3: modifiziert nach einer Abbildung aus „Biochemie & Pathobiochemie“ (7.Auflage) von Löffler G. und Petrides P. E.

Abbildung 4 und 5: skizziert nach Vorbildern von Födra C, Die Technik der partiellen, orthotopen Lebertransplantation im „small-for-size“-Modell an der Ratte im Vergleich zur orthotopen Ganzlebertransplantation unter besonderer Berücksichtigung laborchemischer Parameter. Med Diss Erlangen-Nürnberg 1991

Abbildung 12: skizziert nach einem Vorbild von der folgenden Internetseite:
<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Funktionelle-Leberresektion.4817.0.html> Stand: 10.01.2010

Die übrigen Abbildungen sind Eigenproduktionen.

Erklärung

Ich, Sebastian Reuter, erkläre, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
„Leberresektion bei Diabetes mellitus - Untersuchungen zur Organregeneration bei Mäusen
und zum perioperativen Risiko bei Menschen“ selbst verfasst und keine anderen als die
angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und
auch nicht in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. med. Olaf Guckelberger für die freundliche Überlassung des Themas, die Durchsicht des Manuskriptes und für die freundliche und geduldige Betreuung.

Herrn Simon C. Robson. M.D., Ph.D., FRCPE danke ich für die Bereitstellung von Versuchsraum und Geräten sowie die Ermöglichung des Aufenthaltes am Beth Israel Deaconess Medical Center der Harvard Medical School in Boston, MA.

Eva Csizmadia möchte ich für die zahllosen Tipps bei der Herstellung der histologischen Präparate danken.

PD Dr. med. Hussain Al-Abadi und Angelika Dürr, sowie Evelyn Hungerbühler gilt mein Dank wegen ihrer Hilfsbereitschaft bei der Präparateauswertung im Histologie- und Versuchslabor der Charite, Campus Virchow Klinikum.

Mein ausgesprochener Dank gilt meinen Eltern, Frau Krimhild Reuter und Herrn Dr. med. Wilfried Reuter, die mir mein Studium in dieser Form ermöglichten und mir während der Niederschrift des Manuskriptes zur Seite standen.