

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. P. Neuhaus

Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

Experimentelle Untersuchung zur Beeinflussung der Leberregeneration nach Resektion durch Infektionen und Inflammationsreaktionen

zur Erlangung der Venia legendi

für das Fach

Chirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Daniel Seehofer

geboren am 05.11.1970 in München

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

eingereicht: Juli 2006

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 22.01.2007

Gutachter: 1. Prof. Dr. M.D. Menger, Homburg/Saar

2. Prof. Dr. A. Hirner, Bonn

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	6
1.1	Leberregeneration	6
1.1.1	Mechanismen der Leberregeneration	6
1.1.2	Zellzyklus der Hepatozyten	7
1.1.3	Beendigung der Leberregeneration	9
1.2	Störungen der Leberregeneration	11
1.3	Bakterielle Infektionen, Sepsis, SIRS	12
1.3.1	Bedeutung der Leber bei systemischen Entzündungsreaktionen	16
1.3.2	Bedeutung des Gastrointestinaltrakts bei septischen Zuständen	17
1.3.3	Limitierung der Entzündungsreaktion	17
2	Ziele der Untersuchung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Versuchstiere	20
3.2	Operationstechnik	20
3.2.1	Sham Operation	20
3.2.2	70% Leberresektion	20
3.2.3	Kolonstenose	21
3.2.4	Coekale Ligatur und Punktion (CLP)	21
3.2.5	Galleleck (GL)	22
3.2.6	Sekundäroperation	22
3.3	ICG-Clearance	23
3.4	Histologische Untersuchungen	23
3.4.1	HE-Färbung, Histomorphologie, Mitoseindex	23
3.4.2	BrdU Immunhistologie	24
3.4.3	Ki-67 Immunhistologie	25
3.4.4	In situ Apoptose Detektion	26
3.5	Zytokinbestimmungen	28
3.5.1	PCR	28
3.5.2	ELISA	29
3.5.2.1	IL-1 β im Serum	30
3.5.2.2	IL-1 β im Lebergewebe	30
3.6	Myeloperoxidase Messungen	30
3.7	Mikrobiologische Untersuchungen	31
3.8	Blut- und Serumparameter	32
3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA)	32
3.10	Unterprojekte und Versuchsgruppen	32
3.10.1	Unterprojekt 1: Leberresektion und enterogene Infektionen	32

3.10.2	Unterprojekt 2: Leberresektion und Galleleck	34
3.10.3	Unterprojekt 3: Präkonditionierung	34
3.11	Statistische Auswertung	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Unterprojekt 1: Enterogene bakterielle Infektionen	36
4.1.1	Vergleich der verwendeten enterogenen Infektionsmodelle	36
4.1.1.1	<i>Überlebensraten</i>	36
4.1.1.2	<i>Vergleich der Funktions- und Regenerationsparameter</i>	36
4.1.2	Körpergewicht und relatives Lebergewicht	39
4.1.3	Hämodynamik	41
4.1.4	Leberzellschaden	41
4.1.4.1	<i>Leberenzyme</i>	41
4.1.4.2	<i>Histomorphologie</i>	42
4.1.5	Leberfunktionsparameter	44
4.1.5.1	<i>Galleproduktion</i>	44
4.1.5.2	<i>Bilirubin, Albumin, Prothrombinzeit nach Quick</i>	45
4.1.5.3	<i>ICG-Clearance</i>	46
4.1.6	Regenerationsparameter	48
4.1.6.1	<i>M-Phase: Mitoseindex</i>	48
4.1.6.2	<i>S-Phase: BrdU-Labeling</i>	50
4.1.6.3	<i>Gesamt-Wachstumsfraktion</i>	53
4.1.7	Zytokine	55
4.1.7.1	<i>TNF-α</i>	55
4.1.7.2	<i>IL-6</i>	55
4.1.7.3	<i>TGF-β</i>	55
4.1.7.4	<i>ICAM-1</i>	55
4.1.7.5	<i>Interleukin-1β (IL-1β)</i>	55
4.1.8	Mikrobiologische Untersuchungen	57
4.1.9	Leukozytenakkumulation	58
4.1.9.1	<i>Blutbild</i>	58
4.1.9.2	<i>Myeloperoxidase Aktivität in der Leber</i>	59
4.1.9.3	<i>Myeloperoxidase Aktivität in der Lunge</i>	59
4.1.10	Apoptose	60
4.1.11	Zusammenfassung: Ergebnisse Unterprojekt 1	60
4.2	Unterprojekt 2: Galleleck	62
4.2.1	Allgemeine Parameter	62
4.2.2	Regenerationsparameter	62
4.2.3	Leberzellschaden	62
4.2.4	Leberfunktion	64
4.2.5	Leukozytenakkumulation, Zytokine, Mikrobiologie	67
4.2.6	Zusammenfassung Unterprojekt 2:	70

4.3	Unterprojekt 3: Präkonditionierung	71
4.3.1	Allgemeine Parameter	71
4.3.2	Regenerationsparameter	71
4.3.3	Leberfunktion und Leberzellschaden	74
4.3.4	Blutbild, Zytokine, Myeloperoxidase-Aktivität	76
4.3.5	Zusammenfassung Unterprojekt 3	77
5	Diskussion:	78
5.1	Experimentelle Modelle	78
5.1.1	Endotoxin (LPS) - Applikation	78
5.1.2	Modelle mit lebenden Mikroorganismen	79
5.1.3	Abakterielle Entzündungen	81
5.2	Leberregeneration und Infektionen / Entzündungen	81
5.2.1	Störungen der Regenerationskinetik	82
5.2.2	Kompensation von Regenerationsstörungen	84
5.2.3	Beeinflussung der Leberregeneration durch LPS	85
5.2.4	Zytokine als Inhibitoren der Leberregeneration	86
5.2.5	Andere Konditionen mit gestörter Leberregeneration	88
5.2.6	Inhibition der Zellzyklus-Progression	88
5.3	Bakterielle Infektionen und hepatozelluläre Dysfunktion	90
5.4	Galleleck	94
5.5	Präkonditionierung	95
5.6	Ausblick	98
6	Zusammenfassung	99
7	Literatur	102

Abkürzungen:

ALT	-	Alanin-Aminotransferase
BrdU	-	Bromodeoxyuridin
CLP	-	Coekale Ligatur und Punktion
DNA	-	Desoxy-Ribonukleinsäure
EGF	-	Epidermal Growth Factor
ELISA	-	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EPO	-	Erythropoetin
G-CSF	-	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GLDH	-	Glutamat-Dehydrogenase
HGF	-	hepatocyte growth factor
HSC	-	hepatic stellate cells
ICG	-	Indozyaningrün
MPO	-	Myeloperoxidase
IL	-	Interleukin
KG	-	Körpergewicht
LR	-	Leberresektion
LPS	-	Lipopolysaccharid (bakterielles Endotoxin)
n	-	Anzahl
PCR	-	Polymerase-Ketten-Reaktion
SEM	-	Standardfehler des Mittelwertes
Sham-OP	-	Scheinoperation
SIRS	-	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOCS	-	Suppressor of Cytokine Signalling
STAT 3	-	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF- β	-	Transforming Growth Factor β
TNF- α	-	Tumor Nekrose Faktor alpha
TUNEL	-	TdT terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling

8 Danksagung:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Peter Neuhaus, meinem Chef und Lehrer, für die hervorragende chirurgische Ausbildung in seiner Klinik. Ohne seine uneingeschränkte Förderung und Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Habilitationsschrift nicht möglich gewesen. Durch sein Vertrauen ermöglichte er mir eine selbstständige Arbeitsweise, jedoch nicht ohne mir zur richtigen Zeit mit Ideen und wertvollen Anregungen zur Seite zu stehen.

Auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas K. Nüssler und Prof. Dr. Michael D. Menger bin ich sehr verbunden. Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche waren von unschätzbarem Wert für mich.

Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe sowie sämtlichen Kollegen danken, die an den Experimenten beteiligt waren. Hierbei gilt mein ganz besonderer Dank Frau Anja Schirmeier, die mich durch ihren fortwährenden, unermüdlichen Einsatz bei der Asservierung und Aufarbeitung der Blut- und Gewebeproben unterstützt hat und maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Auch Herrn Dr. Martin Stockmann bin ich für seine Unterstützung, insbesondere bei der Durchführung der Leberfunktionsmessungen sehr verbunden. Ebenso Herrn Dr. Martin Koch aus dem Institut für Pathologie für den Beistand bei der Auswertung der histologischen Untersuchungen und Herrn Dr. Reinhold Schiller aus dem Institut für Mikrobiologie für die Unterstützung bei den mikrobiologischen Untersuchungen.

Ein Dankeschön geht auch an meine Doktorandinnen Ria Cho und Jessica Carter für ihr großes Engagement und ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente und der Laborarbeit. Daneben standen mir auch Sabine Boas-Knoop, Angelika Duerr, Evelyn Hungerbühler, Steffen Lippert und Dietrich Polenz stets hilfreich zur Seite. Außerdem möchte ich Herrn Leonhard und dem gesamten Team der Tierpfleger des biomedizinischen Forschungszentrums danken.

Meinen Kollegen, PD Dr. Matthias Glanemann, PD Dr. Ulf Neumann, Dr. Gereon Gäbelein, PD Dr. med. Hussein Al-Abadi sowie allen anderen Kollegen sei herzlich für ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit gedankt, ebenso wie Prof. Dr. Stig Bengmark, der mich durch viele Ideen und mit unvergleichlichem Enthusiasmus unterstützt hat.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau und Kollegin Nada Rayes für die unermüdliche Hilfe bei der Erstellung der Habilitationsschrift, sowie für ihr Verständnis und ihre Geduld während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

gemäß §4 Abs. 3(k) der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

Berlin 26.07.2006

.....
Unterschrift