

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

DISSERTATION

**Beeinträchtigung der Leberregeneration durch simultane
intraabdominelle Infektionen: eine experimentelle
Untersuchung im Rattenmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Si-Young Ria Cho
aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

A Abstrakt

B Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Leber	1
1.1.1 Anatomie der Leber	2
1.1.2 Leberfeinbau	3
1.1.3 Physiologische Funktionen der Leber.....	4
1.2 Mechanismen der Leberregeneration	4
1.3 Bedeutung der postoperativen Infektion nach Leberresektion	10
1.4 Verminderte Leberregeneration nach Infektion im Tiermodell	11
1.6 Ziele der Arbeit	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Geräte.....	14
2.1.2 Labormaterial.....	14
2.2 Substanzen	15
2.2.1 Chemikalien	15
2.3 Puffer	17
2.4 Antikörper	18
2.5 Tierversuche	18
2.5.1 Versuchstiere	18
2.6 Operationstechnik	19
2.7 Primäroperation	19
2.7.1 Sham-Operation	19
2.7.2 Leberresektion (LR).....	19
2.7.3 Coekale Ligatur und Punktion (CLP)	20
2.8 Sekundäroperation	20
2.9 Versuchsgruppen	20
2.10 Histologie	21
2.10.1 H.E.-Färbung, Mitoseindex	21
2.10.2 Ki-67 - Immunhistologie	21
2.10.3 BrdU - Immunhistologie	23

2.11 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.11.1 RNA-Isolierung	24
2.11.2 Reverse Transkription.....	24
2.11.3 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	25
2.11.4 Agarosegel-Elektrophorese	29
2.11.5 Auswertung der Gele	29
2.12 Proteinbestimmung.....	29
2.13 Myeloperoxidase-Assay	30
2.14 Blut- und Serumparameter	31
2.15 Relatives Lebergewicht	31
2.16 Statistik	32
3. ERGEBNISSE.....	33
3.1 Beurteilung der Leberregeneration	33
3.1.1 Ki-67	33
3.1.2 Mitosen	33
3.1.3 BrdU.....	36
3.1.4 BrdU – Nicht-Parenchymzellen.....	37
3.1.5 Relatives Lebergewicht.....	38
3.2 Beurteilung der Leberfunktion.....	39
3.2.1 Albumin.....	39
3.2.2 Bilirubin	40
3.3 Beurteilung des Leberzellschadens	41
3.3.1 TNF- α	41
3.3.2 IL-6.....	42
3.3.3 Leukozyten	43
3.3.4 MPO.....	44
4. DISKUSSION	45
4.1 Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	45
4.2 Diskussion der Methoden.....	46
4.2.1 Experimentelle Modelle zur Untersuchung der Sepsis im Tiermodell	46
4.2.2 Modelle zur Untersuchung der Leberzellregeneration.....	47
4.3 Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	51
4.3.1 Leberregeneration	51
4.3.2 Leberdysfunktion	55
4.3.3 Inflammation	56
5. ZUSAMMENFASSUNG	60

6. LITERATUR	62
7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	67
8. LEBENSLAUF	69
9. VERÖFFENTLICHUNGEN	70
10. DANKSAGUNG	71

Abstrakt

Einleitung: Bisherige Untersuchungen konnten eine Beeinflussung einer Infektion auf die Leberregeneration beobachten. Es fehlte jedoch bislang eine systematische Untersuchung der Beeinflussung der Leberregeneration nach Resektion durch eine simultane Infektion. In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss einer enterogenen intraabdominellen Infektion auf die Leberregeneration *in vivo* untersucht werden.

Methoden: Hierzu wurde ein Modell an Ratten verwendet, welches die Kombination aus einem etablierten Regenerationsmodell, der 70 % Leberteilresektion, und einem bekannten Sepsismodell, der Coekalen Ligatur und Punktion, darstellte. Im Anschluss wurden postoperativ zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Parameter zur Beurteilung der Leberregeneration, der Leberfunktion und des Leberzellschadens bestimmt. Die Leberregenerationskapazität wurde anhand verschiedener Marker der Zellproliferation bewertet, hierzu gehören die Bestimmungen von Ki-67, BrdU, der Mitoserate sowie des Lebergewichts. Zur Beurteilung der Leberfunktion dienten die Bestimmung von Albumin und Bilirubin. Der Leberzellschaden wurde durch die Bestimmung der Zytokine TNF- α und IL-6 sowie durch die Messung der Leukozytenzahl und der Myeloperoxidase (MPO)- Aktivität bemessen.

Ergebnisse: Die maximale Hepatozytenproliferation, gemessen an Ki-67, BrdU und an der Mitoserate, wurde in der Gruppe der simultan gesetzten Infektion im Gegensatz zur alleinig leberresezierten Gruppe um 24 h verspätet erreicht. Ein signifikant höheres Lebergewicht erreichte die Kombinationsgruppe nach 96 h. Die Leberregeneration ist, zusammenfassend gesagt, auf zellulärer Ebene bei gleichzeitig ablaufender Infektion verzögert und insgesamt durch eine signifikant verminderte Zellteilung der Hepatozyten charakterisiert. Die Kombinationsgruppe zeigte in der Spätphase der Regeneration eine signifikant verminderte Albuminsynthese sowie signifikant erhöhte Bilirubinkonzentrationen. Dies entspricht einer geminderten Funktionsleistung der regenerierenden Leber bei Infektion. In beiden Gruppen lässt sich zu allen Zeitpunkten eine nahezu gleiche Invasion an MPO- positiven neutrophilen Granulozyten nachweisen. TNF- α und IL-6 konnten nach 24 h in der Leberresektionsgruppe mit CLP jeweils einen signifikanten und für jeweils beide Gruppen einen maximalen Anstieg vorweisen.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend konnte im *in vivo* Tiermodell der negative Einfluss einer Infektion auf die Leberregeneration auf zellbiologischer und molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass eine simultane Infektion nach Leberresektion nicht nur einen negativen Effekt bezüglich der Sepsis-assoziierten postoperativen Morbidität und Mortalität hat, sondern über proinflammatorische Zytokine eine verringerte Leberregeneration mit sich bringt.

Abstract

Introduction: Previous studies indicate an influence of infection on liver regeneration. However, so far a systematic study of the effect of a simultaneous infection on liver regeneration after resection is lacking. In the present study, the influence of enterogenic intra-abdominal infection on liver regeneration was investigated *in vivo*.

Methods: Rats were used as model, combining an established regeneration model (the 70% liver resection) and a well-known model of sepsis (the cecal ligation and puncture). Various parameters for assessing liver regeneration, liver function and liver cell damage were determined post-operatively at different times. The regeneration capacity of the liver was evaluated using various markers of cell proliferation, including determination of Ki-67, BrdU, the mitotic rate and liver weight. Albumin and bilirubin concentrations were determined in the two groups in order to evaluate the liver function. The liver cell damage was measured based on the cytokines TNF-alpha and IL-6 as well as the leukocyte count and the myeloperoxidase activity.

Results: The maximum hepatocyte proliferation (based on Ki-67, BrdU and the mitotic rate) was achieved 24 h later in the combined treatment (resection and infection) than in the resection-only treatment. Liver weight was significantly higher in the combined treatment after 96 h. At the cellular level, liver regeneration was delayed and characterized by a significantly decreased total cell division rate of the hepatocytes when resection and infection occurred simultaneously. The combined treatment showed significantly reduced albumin synthesis and significantly elevated bilirubin levels in the late phase of regeneration. This finding corresponds to an impaired functional capacity of the regenerating liver after infection. Both treatments showed an almost identical

invasion of MPO-positive neutrophilic granulocytes at all sampling times. TNF-alpha and IL-6 reached a maximum level after 24 h in both treatment groups, and in the combined treatment the increase was significant.

Conclusion: In summary, this study showed a negative impact of infection on liver regeneration at both the cellular and molecular level in an in vivo animal model. A simultaneous infection after liver resection not only had a negative effect with respect to the sepsis-associated post-operative morbidity and mortality, but also caused decreased liver regeneration due to proinflammatory cytokines.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Aqua dest.	Aqua destillata
as	<i>Antisense</i>
av	<i>Average</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridin
CASP	Colon ascendens Stent Peritonitis
CCAAT	<i>Cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBP/β	<i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>
CLP	Coekale Ligatur und Punktion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CuSO ₄	Kupfersulfat
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>

<i>g</i>	Zentripetalbeschleunigung der Erde
G1-Phase	Gap 1-Phase
G2-Phase	Gap 2-Phase
h	Stunde
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HOCl	Hypochlorige Säure
HPF	<i>High power field</i>
HPI	<i>Hepatic proliferation inhibitor</i>
HSC	<i>Hepatic stellate cell</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-6	Interleukin 6
kg	Kilogramm
KPE	Kaliumhydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
LR	Leberresektion
LR+CLP	Leberresektion und Coekale Ligatur und Punktion
LT	Linfotoxine
M	Molarmasse
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl

NF-kB	Nukleärer Faktor Kappa B
OP	Operation
p	Statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PBS	<i>Phosphat-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
S-Phase	Synthese-Phase
SEM	<i>Standard error of mean</i>
s	<i>Sense</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
SAPK	<i>Stress-activated Proteinkinase</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T3	Trijodthyronin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrose-Faktor α
TNFR-1	Tumornekrosefaktorrezeptor 1
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

1.1 Die Leber

Die Leber umfasst eine Vielzahl an Funktionen im Gesamtorganismus. Sie hat eine zentrale Stellung im Stoffwechsel, ist unentbehrlich in ihrer Funktion als Entgiftungsstation, stellt den Bildungsort zahlreicher Zytokine und der Gallenflüssigkeit dar und hat eine wesentliche Aufgabe in der Regulation der Immunabwehr und des Säure-Basen-Haushalts.^{1,2} Neben all diesen Funktionen beeindruckt die Leber zusätzlich mit der einzig nur diesem Organ vorbehaltenen Fähigkeit zur Regeneration. So vermag die Leber sich bei einem jungen Menschen nach einer Hemihepatektomie innerhalb von 6-12 Monaten zur ihrer ursprünglichen Größe, Funktion und Struktur wiederherzustellen, bei einer Ratte nach einer 2/3-Resektion bereits nach etwa 7 Tagen.^{3,4}

Die Ursachen einer Lebererkrankung sind vielfältig und reichen von Infektionen, Autoimmunkrankheiten, hereditären Leberstörungen über alkoholtoxische, alimentäre, traumatische oder toxische Veränderungen der Leber bis hin zu malignen Lebertumoren.⁵ Trotz des deutlichen Fortschritts in der Diagnostik und in den Therapiemöglichkeiten besteht für Patienten mit einer akut fulminanten oder chronisch fortgeschrittenen Lebererkrankung oder mit einem Malignom nur noch die Möglichkeit einer Resektion des entsprechenden Leberabschnittes oder einer Lebertransplantation. Aufgrund der Regenerationsfähigkeit des verbliebenen Lebergewebes sind Resektionsvolumina von 70-80 % des ursprünglichen Lebergewichts möglich, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Regeneration kommt.⁶ Die Leberregeneration ermöglicht neben der klassischen Organspende einer gesamten Leber auch die Transplantation eines Leberteils, sodass Leberlebendspende ebenso wie die Transplantation einer Split-Leber möglich sind. Unter einer Split-Leber-Transplantation versteht man die Aufteilung einer Spenderleber auf zwei Empfänger. Die Leberlebendspende wird vor allem in der pädiatrischen Lebertransplantation angewendet. Studien haben gezeigt, dass sich nach etwa einem Monat nach einer Leberlebendspende das Volumen der transplantierten Leber im Empfänger rasant

Einleitung

vergrößert. Nach zwei Monaten hat die transplantierte Leber nahezu ein Normalvolumen erreicht.^{7,8}

1.1.1 Anatomie der Leber

Die Leber ist die größte Drüse des menschlichen Körpers. Sie hat ein durchschnittliches Gewicht von 1,4-1,8 kg und füllt das rechte Hypochondrium aus. Makroskopisch wird die Leber in den rechten und den linken Leberlappen unterteilt, wobei der rechte Lappen größer ist als der linke. Die Trennlinie bilden auf der konvexen Seite das Ligamentum falciforme hepatis, auf der konkaven Seite die Fissura ligamenti teres hepatis und die Fissura ligamenti venosi.

Die Pfortader (V. portae hepatis) führt das Blut aus den unpaaren Bauchorganen (Dünndarm, Dickdarm, Milz, Pankreas, Magen). Die V. portae hepatis wird von der A. hepatica propria begleitet, welche die arterielle Versorgung der Leber gewährleistet. An der Porta hepatis treten beide Gefäße zusammen in die Leber ein. Mit den aus der Leber tretenden Gallengängen, vereint zum Ductus hepaticus communis, wird dieser gemeinsame Verlauf der Gefäße als portale Trias bezeichnet. Die Venae hepaticae, die den Abfluss des Blutes von der Leber in den systemischen Kreislauf gewährleisten, verlaufen nicht gemeinsam mit den Pfortaderästen. Die Hauptstämme der Lebervenen verlaufen zwischen den Segmenten und dienen als chirurgische Leitlinie.

Entsprechend der Aufzweigung der einzelnen portalen Gefäße in je zwei Hauptäste kann eine von der anatomischen Leberaufteilung abweichende, funktionelle Gliederung in zwei Lappen vorgenommen werden, in die Pars dextra und die Pars sinistra der Leber. Die Binnengliederung erfolgt in acht Segmente. Diese Einteilung ist makroskopisch nicht sichtbar, da eine bindegewebige Unterteilung fehlt, und erfolgt mittels der Gefäßversorgung und der Gallengänge. Die daraus resultierenden Segmente sind funktionell nahezu unabhängig. Daher ist eine chirurgische Resektion einzelner Segmente problemlos möglich.^{9, 10}

Die Leber der Ratte lässt sich, ähnlich der Leber des Menschen, in einzelne Lappen untergliedern. Die beiden größten Anteile bilden der mittlere Leberlappen und der linke Leberlappen. Zusammen bilden diese beiden Lappen ca. 70 % des Gesamtvolumens

Einleitung

der Rattenleber. Unterhalb dieser beiden Leberlappen finden sich rechts der Vena cava der vordere rechte Leberlappen und der hintere rechte Leberlappen. Links der Vena cava liegen die beiden kleinen omentalen Leberlappen, welche zusammen den Lobus caudatus bilden. Der linke, der rechte sowie die beiden omentalen Leberlappen weisen jeweils einen Hauptfortaderast sowie je eine Lebervene auf, während der mittlere Leberlappen über zwei Pfortaderäste sowie drei eigene Lebervenen verfügt. Basierend auf diesem Verzweigungsmuster der Gefäße lassen sich übliche Segmenteinteilungen der menschlichen Leber auch auf die Leber der Ratte übertragen.¹¹

1.1.2 Leberfeinbau

In der Leber kommen verschiedene Zelltypen vor. Hepatozyten sind die eigentlichen Parenchymzellen. Sie lagern sich in typischen, mindestens einschichtigen Zellplattenverbänden an, die radiär zur Zentralvene verlaufen. Die Kupffer-Zellen sind antigenpräsentierende Makrophagen, welche sich auf der luminalen Seite des Sinusepithels befinden. Sie phagozytieren unter anderem gealterte Erythrozyten, Bakterien und andere Fremdkörper. Hepatic stellate cells (HCS, früher Itozellen genannt) sind fettspeichernde Sternzellen im Disse-Raum, welche Vitamin A speichern. Pit-Zellen sind leberspezifische Lymphozyten, natürliche Killerzellen, die an den Endothelzellen haften.^{12,9}

Das Leberparenchym wird in Lobuli hepatis unterteilt, die Leberläppchen, in deren Zentrum sich je eine V. centralis befindet. Ein im Winkel mehrerer Leberläppchen entstehender Bindegewebsspalt wird periportales Feld genannt und beinhaltet jeweils die Vv. interlobulares aus der V. portae und die Aa. interlobulares aus der A. hepatica propria sowie ableitende Gallenwege, die Ductuli interlobulares. Zusammengefasst bilden diese Gefäße die Glissonsche Trias.

Der gesamte Stoffaustausch in der Leber findet in den Lebersinusoiden statt. Hierbei handelt es sich um erweiterte Kapillaren mit gefenstertem Endothel, welche sich zwischen den Leberzellbälkchen befinden und das periportale Feld mit der Zentralvene verbinden. Unterhalb des Endothels befindet sich der Disse-Raum, in welchen die

Einleitung

Mikrovilli der Hepatozyten ragen. Durch das Endothel tritt Blutplasma in den Disse-Raum über und kann in Oberflächenkontakt mit den Hepatozyten treten.

1.1.3 Physiologische Funktionen der Leber

Die Leber umfasst eine Vielzahl an Aufgaben. Unter anderem spielt sie durch die Glykogensynthese, die Glukoneogenese, die Glykogenolyse und die Glykolyse eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel. In der Leber wird der Großteil an Plasmaproteinen, wie Albumin, Gerinnungsfaktoren, Lipoproteine und Transferrin gebildet. Sie ist der Ort der Harnstoffsynthese und reguliert den Ammoniakstoffwechsel. Die Leber ist mittels der Biotransformation in der Lage, körpereigene und -fremde Stoffe in wasserlösliche Verbindungen zu inaktivieren oder umzuwandeln. Die Leber hat außerdem eine wichtige Abwehrfunktion, sie bildet eine Reihe an Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteine. Die Kupffer-Zellen und leberspezifische Killerzellen sind an der Immunabwehr beteiligt. Mit der Gallenproduktion und Gallensäuresekretion ist die Leber die größte menschliche Drüse.^{1, 10, 9}

1.2 Mechanismen der Leberregeneration

Die Regenerationskapazität des Lebergewebes ist eine einzigartige Eigenschaft. Sie beruht hauptsächlich auf einer gesteigerten Zellteilung, in weitaus geringerem Ausmaß auf der Differenzierung und Replikation der Lebevorfürerzellen. Damit unterscheidet sich die Regeneration der Leber grundlegend von der Regeneration anderer Gewebe, da sie auf einem Wiedereintritt von reifen Hepatozyten in den Zellzyklus beruht und nur in geringem Umfang ihren Ausgang von undifferenzierten Vorläuferzellen oder Stammzellen nimmt.¹³

Sowohl Hepatozyten als auch Nicht-Parenchymzellen, wie die sinusoidalen Zellen, die Kupffer-Zellen, die HSC und die Gallengangepithelien, sind in diesen Regenerationsprozess eingebunden und sichern nach Regenerationsende die Herstellung der vollständigen ursprünglichen Leberarchitektur.^{4,14}

Einleitung

In der Regel teilt sich ein normaler ausdifferenzierter Hepatozyt einer ungeschädigten Leber nur äußerst selten, 1- bis 2- mal im Leben eines Tieres, und verharrt für gewöhnlich in einer Ruhephase, der G₀-Phase, zur Ausübung seiner jeweiligen spezifischen Funktion. Diese geringe Mitoserate kann jedoch durch chemische, toxische oder traumatische Schädigung, wie z. B. die Resektion eines genügend großen Leberanteils von mindestens 10 %, kurzfristig drastisch angehoben werden.¹⁴ Jede Zelle für sich durchläuft auf dieses Signal hin die einzelnen Phasen des Zellzyklus (G₁-, S-, G₂- und M-Phase) und liefert als Ergebnis zwei Tochterzellen.

Die Proliferationskapazität eines Hepatozyten wurde durch serienmäßige Transplantation isolierter Hepatozyten bereits nachgewiesen. Eine definierte Anzahl an isolierten Hepatozyten wurden in ein Tier transplantiert, nach einer bestimmten Zeit wieder entnommen und erneut in ein Empfängertier transplantiert. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Es ließ sich nachweisen, dass ein Hepatozyt in der Lage ist, sich bis zu 69 Mal zu teilen.¹⁵

Die Leberregeneration ist derartig reguliert, dass sie ausschließlich bis zum Erreichen der frühen Ausgangsmasse (+/- 15 %) vollzogen wird. Bisherige Studien haben gezeigt, dass die zu regenerierende Lebergröße sich an dem Verhältnis zwischen Leber- und Körpermasse orientiert, welches dem Organismus eine optimale Stoffwechselversorgung ermöglicht. So führte eine Transplantation der Leber eines großen Hundes in einen kleinen Hund zu einer Volumenabnahme der transplantierten Leber.^{7, 16} Umgekehrt führte die Transplantation der Leber eines Affen in einen Menschen zu einem Wachstum der Leber.¹⁷

Der Ablauf der Regeneration von Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen wird von einer Vielzahl an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und -inhibitoren sowie deren komplexem Zusammenwirken reguliert. Ein enges Zusammenspiel zwischen der extrazellulären und der intrazellulären Matrix ist eine Voraussetzung für die Leberregeneration.¹⁸

Die bedeutendsten Vertreter der Stimulatoren sind HGF (Hepatocyte growth factor), EGF (Epidermal growth factor), TGF- α (Transforming growth factor), TNF- α (Tumornekrose-Faktor α), IL-6 (Interleukin-6), ferner auch Noradrenalin, Insulin und T₃ (Trijodthyronin). Die wichtigsten Inhibitoren sind TGF- β (Transforming growth factor β) und HPI (Hepatic proliferation inhibitor).^{4,18,14}

Einleitung

Als Regenerationsreiz nach Resektion werden verschiedene Mechanismen hypothetisiert. Einerseits scheint eine relevante Erhöhung des Pfortaderdrucks durch Verlust an Querschnittfläche einen Reiz auf die Endothelzellen auszuüben, die daraufhin Endothelin und TNF- α abgeben. Auch scheint eine vermehrte Invasion von Granulozyten einen stimulatorischen Reiz auszuüben.^{19, 20} Einen entscheidenden Beitrag leistet auch der Urokinase Plasminogen Activator (uPA) mit dem Abbau der extrazellulären Matrix. Hierdurch wird HGF freigesetzt.²¹ Diese Reaktionen haben einerseits eine Stimulation von Nicht-Parenchymzellen zur Folge (z. B. Kupffer-Zellen und HSC), die wiederum Zytokine wie IL-6 freisetzen. Andererseits haben sie eine direkte Wirkung auf die Hepatozyten.

Der Prozess der Regeneration vollzieht sich in mehreren Stufen: 1. Initiationsphase/ Priming Phase, 2. Proliferationsphase, 3. Inhibitions- /Terminalphase (Beendigung des Leberwachstums).¹⁸ Im Anschluss bedarf es einer komplexen Rekonstruktion des Leberläppchens.²²

Die Initialphase kann in eine primäre und in eine sekundäre Phase unterteilt werden. In der primären Phase erfolgt der Übertritt von der G₀-Phase in die G₁-Phase. Dies vollzieht sich z. B. bei Ratten nach Hepatektomie innerhalb von 4 Stunden. Dieser Prozess wird hauptsächlich von TNF- α und IL-6 eingeleitet. Diese werden nach Leberschädigung von Nichtparenchymzellen und Hepatozyten neben Linfoxinen (LT- β) und IL-1 gebildet.¹⁸ Untersuchungen bestätigen im Besonderen die Relevanz von IL-6 und TNF- α , da gezeigt werden konnte, dass IL-6- und Tumornekrosefaktor Rezeptor 1 (TNF-R1) -defiziente Mäuse nach Leberschädigung keine ausreichende Einleitung einer Regeneration auszuführen vermögen.²³ Diese Zytokine scheinen im Nachfolgenden die Hepatozyten auch für Wachstumsfaktoren zu sensibilisieren, da gezeigt werden konnte, dass eine alleinige Infusion von Wachstumsfaktoren, wie TGF- α , EGF und HGF, keine ausreichende Regenerationsantwort auszulösen vermag.²⁴

Die Rezeptorbindung von TNF- α initiiert die Translokation des nukleären Faktors Kappa-B (NF- κ B), der an der Expression von Zytokin-kodierenden Genen und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist sowie eine antagonistische Wirkung auf die Apoptose der Hepatozyten ausübt.²⁵ Dies ist für die folgende Proliferation relevant, da TNF- α in der Leber auch über weitere Kaskaden eine proapoptotische Funktion hat, die

Einleitung

dadurch supprimiert wird. Ein weiterer Effekt des TNF- α ist die Aktivierung der stress-activated Proteinkinase (SAPK).²⁶

IL-6 ist ein wesentliches Signal für die Transduktion und Aktivierung von STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription). STAT3 wird durch die Bindung von IL-6 an den gp130- Rezeptor aktiviert und wirkt auch als Inhibitor auf die Apoptose durch Hemmung von Caspase 3 und 8. Weiterhin führt STAT3 zu einer Aktivierung von Fas, einem Bestandteil der Apoptoseregulation. Dies verbessert die Überlebensrate der Hepatozyten während des Regenerationsprozesses.²⁷

Die Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors, C/EBP- β (CCAAT/enhancer-binding protein beta), durch IL-6 markiert den sekundären Abschnitt der Initiationsphase, den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. Die Aktivierung aller drei Transkriptionsfaktoren, NF- κ B, STAT3 und C/EBP- β , leitet die Initialisierung verschiedenster Pro-Onkogene, unter anderem c-Myc, c-fos, c-Has, c-met, c-Erb, ein.²⁵ IL-6 führt zur Bildung des membrangebunden Rezeptors IGFBP-1 (Insulin-like growth factor BP-1). An diesen bindet außerhalb der Leber gebildetes IGF. Diese Bindung resultiert auch in einer gesteigerten Proliferation der Hepatozyten.²⁸ Der Übertritt in die S-Phase erfolgt innerhalb von 24 h.^{18, 29}

Die Proliferationsphase wird durch die Wachstumsfaktoren HGF, TGF- α , EGF, VEGF (Vascular endothelial growth factor) sowie FGF (Fibroblast growth factor) und Angiopoetin 1 und 2 eingeleitet. Untersuchungen haben gezeigt, dass HGF die Differenzierung von Stammzellen in Hepatozyten fördert³⁰ und eine wichtige Rolle in der Einleitung der Proliferation einnimmt.²² TGF- α führt zur Proliferation von Hepatozyten und Endothelzellen durch Bindung an den epidermal growth factor receptor (EGFR).²⁴ Es wird angenommen, dass Hepatic stimulator substance (HSS), ein in der Leber spezifischer Wachstumsfaktor, durch seine Wirkung auf den EGF-Rezeptor das Wachstum und die Reparaturprozesse während der DNA-Synthese induziert.³¹

Die eigentliche Proliferation verläuft autonom. Der Durchlauf durch die einzelnen Zellzyklusphasen wird einzig von Cyclinen und den mit diesen assoziierten Cyclinkinasen, CDK (cyclin dependent kinases), reguliert. Bestimmte Vertreter dieser beiden Proteingruppen werden bei Erreichen der jeweiligen Zellzyklusphase gebildet und führen durch Komplexbildung eines Cyclins mit einer CDK zur Aktivierung des

Einleitung

jeweiligen Cyclins, welches wiederum zur Einleitung in die nächste Zellzyklusphase führt.¹³ Dieser Ablauf ist prinzipiell für alle sich in Teilung befindenden Zellen gleich.

Die letzte Stufe der Leberregeneration, die Terminalphase, wird wesentlich durch TGF- β , Zytokin supprimierende Faktoren (SOCS, suppressor of cytokine signalling) und IL-1 β koordiniert. Vermutet wird, dass die durch HGF zum Wachstum stimulierten Hepatozyten letztendlich den Wachstumsprozess auch wieder terminieren. So wird die IL-6- induzierte SOCS3- Aktivierung als negativer Feedbackmechanismus angesehen.^{18, 22}

Der Eintritt in die verschiedenen Zellzyklusphasen verläuft stets synchron und in einer bestimmten zeitlichen Abfolge. Der Beginn der DNA-Synthese bei Ratten ist ca. 12-16 h nach Hepatektomie, das Maximum ist nach 22-24 h erreicht. Nach weiteren 6-8 h vollzieht sich die Mitose. Nicht-Parenchymzellen durchlaufen um ca. 24 h verspätet diese Phasen, angeführt von den Gallengangsepithelien, gefolgt von den Kupfer-Zellen und HSC und zuletzt von den sinusoidalen Endothelzellen.^{4, 32} Die Regeneration beginnt nahe der Periportalfelder und erreicht in 36-48 h die Lebervene.²²

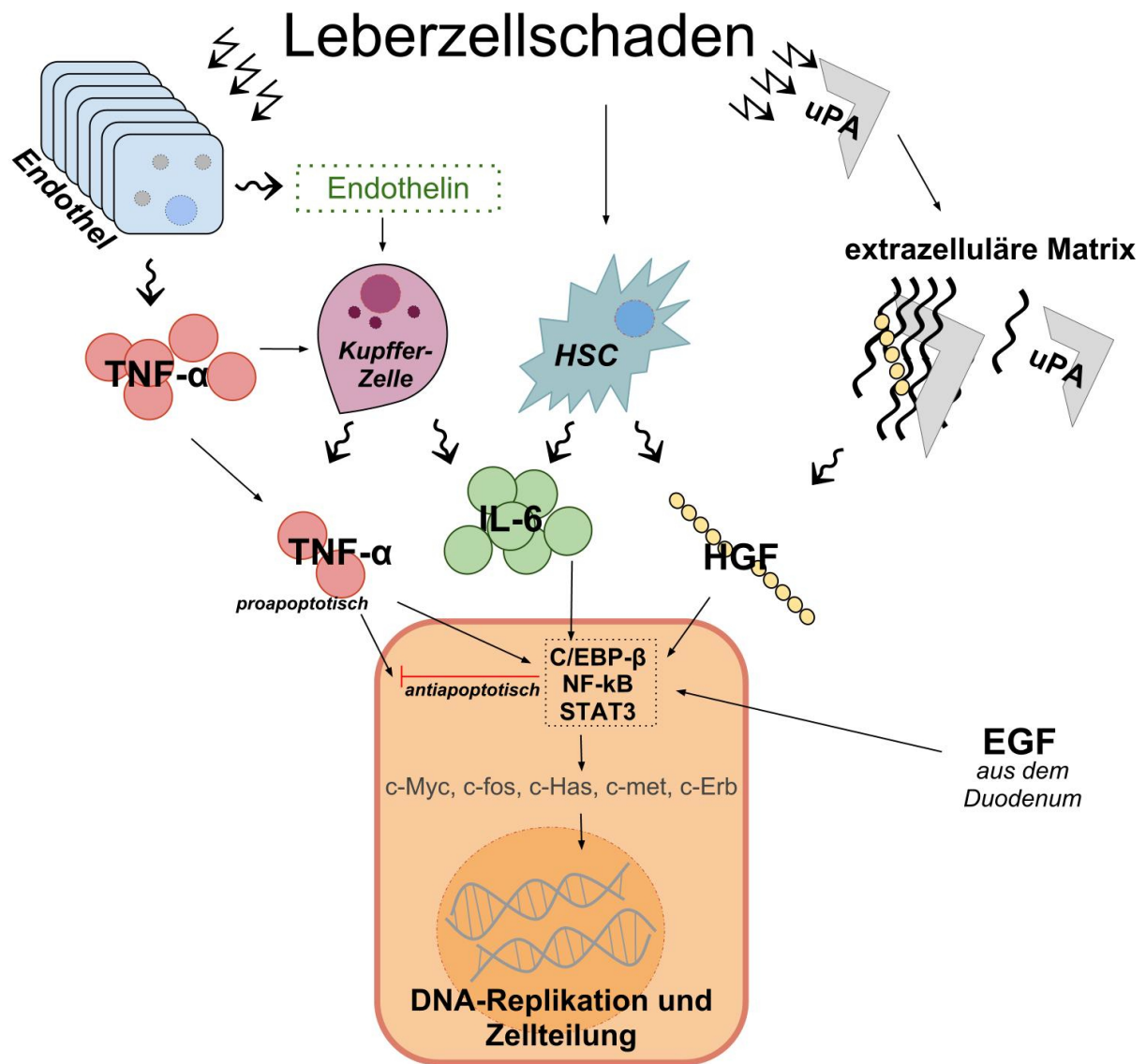


Abbildung 1 Leberregeneration^{33 34}

Durch Untergang von Lebergewebe setzen Endothelzellen Endothelin und TNF- α frei, die Invasion von Leukozyten wird initiiert und uPA aktiviert. UPA bedingt den Abbau von extrazellulärer Matrix, welches HGF freisetzt. Kupffer-Zellen und HSC werden stimuliert und führen zur Zytokinfreisetzung von TNF- α und IL-6. Diese aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT3 und C/EBP- β , die ihrerseits wieder verschiedene Proonkogene initiieren und letztendlich eine DNA-Replikation und Zellteilung nach sich ziehen.

1.3 Bedeutung der postoperativen Infektion nach Leberresektion

Postoperative Infektionen haben nach wie vor eine große Bedeutung in der heutigen Medizin und stellen eine ernste Komplikation für den Erfolg einer Behandlung nach einer Operation dar. Sie beeinflussen die Leberfunktion und Regeneration, verschlechtern die postoperative Prognose und erhöhen die Mortalität.

In einer Arbeit von Shigeta et al.³⁵ wurden retrospektiv 407 Fälle untersucht, in denen Patienten einer Leberresektion unterzogen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass in 11 % der untersuchten Fälle nach Leberresektion eine Bakteriämie nachzuweisen war; von diesen entwickelten 54 % der Patienten ein Leberversagen, 48 % ein Multiorganversagen. Die Mortalität der Patienten, die eine Bakteriämie aufwiesen, lag bei 43 %, dagegen bei Patienten ohne Bakteriämie bei 4 %. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Arbeiten gefunden werden.³⁶

Nach Leberresektion lassen sich häufig bakterielle Infektionen, ausgelöst durch Enterokokken, nachweisen. E. coli ist ebenfalls ein häufiger Vertreter.³⁶

Leberresektionen initiieren die Translokation von enterischen Bakterien in den Extraintestinalraum. Als Pathomechanismus hierfür werden ein übermäßiges intestinales Bakterienwachstum, eine geschwächte Immunabwehr und Störungen in der intestinalen Permeabilität angesehen.³⁷

Das Auftreten einer Infektion wird unter anderem beeinflusst durch die Dauer des operativen Eingriffs, das Alter des Patienten, durch das Bestehen eines obstruktiven Ikterus und das Spektrum an Nebenerkrankungen des Patienten.³⁵ Einerseits stellt der Eingriff an der Leber selbst ein Risiko für eine Infektion dar, eine bevorstehende Funktionsbeeinträchtigung der Leber erhöht aber auch das postoperative Risiko einer Infektion.³⁸ Das Ausmaß einer Infektion korreliert mit der Größe des Resektats.³⁶ Patienten mit Malignomen weisen nach einer Leberresektion häufiger Infektionen auf als Patienten mit nicht malignen Erkrankungen.³⁹

1.4 Verminderte Leberregeneration nach Infektion im Tiermodell

In der Literatur finden sich tierexperimentelle Arbeiten, die eine Beeinträchtigung der Regeneration durch gleichzeitig ablaufende Infektionen beobachten konnten.

In der Arbeit von Nelson et al.⁴⁰ sollte der gegenseitige Einfluss einer partiellen Leberresektion und einer kompensatorischen Hyperplasie nach Dünndarmresektion untersucht werden. Hierbei wurden Mäuse, die einer 50 %- Dünndarmresektion unterzogen wurden, partiell leberreseziert. Eine Verstärkung der intestinalen Regeneration konnte nicht festgestellt werden, allerdings konnte beobachtet werden, dass eine Dünndarmresektion zu einer Beeinträchtigung der Leberregeneration führt.

Miyazaki et al.⁴¹ untersuchten die Auswirkungen einer gleichzeitigen Darmresektion und Leberresektion auf die Leberregeneration. Dabei wurden Ratten einer 70 %- Leberteileresektion, kombiniert mit einer Ileocoecalresektion oder einer Colon-Transversumresektion, unterzogen. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur alleinig leberresezierten Gruppe bei der simultanen Leber- und Darmresektion eine verminderte Leber-DNA-Synthese und eine verzögerte hepatische Proteinsynthese zu verzeichnen war. Die postoperative Anastomoseninsuffizienz und Mortalität traten in der kombinierten Gruppe vermehrt auf. In dieser Arbeit konnte eine Hemmung der Leberregeneration durch gleichzeitige Resektion des Darms beobachtet werden. Die hepatische Proteinsynthese war verzögert, aber insgesamt erhöht.

Weiss et al.⁴² untersuchten in einer Arbeit die Leberregeneration nach einfacher und zweifacher Punktion nach Coekalligatur ohne vorangegangene Leberresektion. Die Regenerationsrate wurde anhand des BrdU-Einbaus in DNA gemessen und zeigte, dass diese in der Gruppe der einfachen Darpunktion im Vergleich zur doppelten Darpunktion signifikant erhöht war. Die Anzahl an apoptotischen Zellen war in beiden Gruppen gleich. Die Lebernekrose gemessen anhand des α - Glutathion- S-Transferase-Spiegels (α -GST) war in der Gruppe der zweifachen Darpunktion signifikant erhöht im Vergleich zur Gruppe der einfachen Punktion. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine fulminante Sepsis durch doppelte Punktion eine verminderte Leberregeneration nach sich zieht.

Einleitung

In vielen Arbeiten wurde eine Beeinträchtigung der Leberregeneration durch eine gleichzeitig ablaufende Infektion beobachtet; eine systematische Untersuchung der Beeinflussung der Leberregeneration nach Teilresektion der Leber durch Infektion fehlte bislang.

1.6 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwieweit eine enterogene intraabdominelle Infektion die Leberregeneration *in vivo* beeinflusst. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein geeignetes Rattenmodell angewandt, welches aus der Kombination eines bekannten Lebergenerationsmodells, der 2/3-Leberresektion, mit einem ebenfalls bekannten Sepsismodell, der Coekalen Ligatur und Punktion (CLP), besteht. Die 2/3-Leberresektion ist eine beliebte und gängige Methode, die es ermöglicht, nahezu gleichbleibend große Resektionsvolumina von 70 % zu erzielen, die in der Ausführung relativ einfach ist und eine gute Vergleichbarkeit zu bereits bestehenden Arbeiten ermöglicht.^{43, 44} Das Modell der Coekalen Ligatur und Punktion ermöglicht die Auslösung einer persistierenden Infektion durch endogene, gramnegative Bakterien, welches der klinischen Realität einer postoperativen Komplikation sehr nahe kommt.^{45, 46} Im Anschluss wurden zu bestimmten Zeitpunkten spezifische Parameter der Leberregeneration, der bakteriellen Infektion und der Leberfunktion gemessen und bewertet.

Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

- 1.) Wie ist der Ablauf der Leberregeneration quantitativ und zeitlich nach einer alleinigen Leberresektion im Vergleich zu einer Kombination aus Leberresektion und intraabdominaler Infektion charakterisiert?
- 2.) Wie groß ist das Ausmaß der Leberschädigung nach einer Leberresektion und einer kombinierten Resektion, gemessen anhand definierter Entzündungsparameter?
- 3.) In welchem Verhältnis steht die Leberfunktion zur Regeneration oder Entzündung?
- 4.) Ergeben sich Unterschiede in der Regeneration der Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Durchlichtmikroskop BH-2	Olympus (Hamburg)
Elektrophoresekammer Mini PROTEAN III Cell	Biorad (Hercules, USA)
Feinwaage AC 121 S	Sartorius (Göttingen)
Mikrowelle Cookmate	Quick
Photometer FLUOstar Galaxy	BMG Labtech (Ortenberg)
Sofortbildkamera DS 34	Polaroid (Waltham, USA)*
Thermocycler PTC-100	Biorad (Hercules, USA)
Ultraturrax T10	IKA (Staufen)
Vortex Mixer 7-2020	Neolab (Heidelberg)
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2 Labormaterial

96-Well-Mikrotiterplatte	Nunc (Langenselbold)
NucleoSpin-Filter	Macherey-Nagel (Düren)
Punktionskanüle 22G Microlance	Becton Dickinson (Spanien)
Zentrifugenröhrchen	Nunc (Langenselbold)
Nahtmaterial Vicryl 4/0	Johnson&Johnson (Norderstedt)

2.2 Substanzen

2.2.1 Chemikalien

5-Bromo-2-deoxyuridin	Roche Diagnostics (Penzberg)
Aceton	Riedel de Haen / Honeywell (Seelze)
Agarose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aqua dest.	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Bicinchoninic-Acid-Lösung (BCA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
BrdU Labeling and Detection Kit II	Roche Diagnostics (Penzberg)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Citronensäure	Carl Roth (Karlsruhe)
CuSO ₄	Merck (Darmstadt)
DAB+ Chromogen	DAKO (Hamburg)
DEPC	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNase I	Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA)
dNTP	Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA)
DTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Fluka (St. Louis, USA)
Ethyldiamintetraessigsäure (K ₂ EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Formalin	Carl Roth (Karlsruhe)
H ₂ O ₂	Merck (Darmstadt)
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hämatoxylin (Harris)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Material und Methoden

HClO ₄	Merck (Darmstadt)
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isofluran	Baxter (Unterschleißheim)
Isotone Kochsalzlösung NaCl 0,9%	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
KCl	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth (Karlsruhe)
NaCl	Carl Roth (Karlsruhe)
NaOH	Baker (Mumbai, Indien)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)
Novaminsulfon	Ratiopharm (Ulm)
NucleoSpinRNA II- Isolierungskit	Macherey-Nagel (Düren)
Oligo dT	Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA)
Paraffin	Merck (Darmstadt)
Peroxidase Blocking Reagenz	DAKO (Hamburg)
Rinder-Serum-Albumin	Merck (Darmstadt)
RNAasin	Promega (Mannheim)
Stickstoff, flüssig	Linde (Pullach)
Streptavidin, Peroxidase-konjugiert	DAKO (Hamburg)
Super-Script-Reverse-Transkriptase	Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA)
TaqPolymerase	Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Material und Methoden

Tramadol	Grünenthal (Aachen)
Tris-Base	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Xylol	Merck (Darmstadt)

2.3 Puffer

Citrat-Puffer	21,01 g/l Citronensäure → 9 ml 29,41 g/l Natriumcitrat → 41 ml 450 Aqua dest.
DAB+ Substratpuffer	DAKO (Hamburg)
Kaliumhydrogenphosphat (KPE)-Puffer	6,81 g/l KH_2PO_4 4 g/l $\text{K}_2\text{-EDTA}$
KPE+HTAB-Puffer	KPE-Puffer 0,5% HTAB
Membrane Desalting Buffer (MDB)	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleospin RNA II Lysepuffer	Macherey-Nagel (Düren)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	8,0 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,15 g/l Na_2HPO_4 0,2 g/l KH_2PO_4
PCR-Puffer	Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA)
TBE-Puffer	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TBS-Puffer	0,9 g/l Tris-Base 6,85 g/l Tris-HCl 8,78 g/l NaCl

2.4 Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Hersteller
Ki-67	MIB-5(2)	Maus, IgG1	DAKO (Hamburg)
murines IgG / biotinyliert	k.A.	Hase, k.A.	DAKO (Hamburg)
Anti-BrdU-Antikörper	k.A.	Maus, k.A.	Roche Diagnostics (Penzberg)
murines IgG / gekoppelt an alkalische Phosphatase	k.A.	k.A.	Roche Diagnostics (Penzberg)

2.5 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden vom Tierschutzgesetz, Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, genehmigt. Sämtliche Tierversuche wurden in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie Charité Campus Virchow Berlin durchgeführt. (Tierversuchsnummer G 003/05)

2.5.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague Dawley Ratten (Harlan-Winkelmann, Bochum) mit einem Gewicht von 200-300 g verwendet. Es wurden je 4-6 Ratten pro Käfig bei konstanter Raumtemperatur und 12 h Tag/Nachtrhythmus gehalten. Freier Zugang zu Trinkwasser und Standardrattenfutter wurde gewährleistet. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche zur Gewöhnung auf diese Weise gehalten, bis sie in die jeweilige Versuchsgruppe randomisiert wurden.

2.6 Operationstechnik

Für die Operation wurden die Tiere einer tiefen Narkose mittels Inhalation von Isofluran unterzogen. Alle Eingriffe erfolgten unter sauberen, jedoch nicht sterilen Kautelen. Die Bauchdecke wurde mit einer medianen Laparatomie eröffnet und nach Beendigung der Operation mit einer zweireihigen fortlaufenden Naht mit Vicryl 4/0 (Johnson&Johnson, Norderstedt) wieder geschlossen. Die Schmerzmedikation bestand in der subkutanen Injektion von Novaminsulfon (Ratiopharm, Ulm) und Tramadol (Grünenthal, Aachen) und der zusätzlichen postoperativen Trinkwasseranreicherung mit den genannten Analgetika. Zur Vermeidung einer Dehydratation der Tiere wurde diesen zusätzlich 5 ml isotone Kochsalzlösung injiziert.

2.7 Primäroperation

2.7.1 Sham-Operation

Bei der Sham-Operation erfolgte weder eine Resektion der Leber noch eine Ligatur oder Punktion des Coekums, wie es in den anderen beiden Operationstechniken der Fall war. Die Tiere wurden lediglich einer Öffnung der Bauchdecke mit anschließender Trennung der Ligamente der Leber und Mobilisierung sowie Auslagerung des Coekums unterzogen.

2.7.2 Leberresektion (LR)

Die Leberresektion erfolgte nach dem Modell von Minato et al.⁴⁷, einer Resektion des medialen und linken lateralen Leberlappens nach Mobilisierung der Leber durch Ligaturen an den Gefäßstämmen mit 4/0 Vicryl. Der entnommene Leberanteil betrug durch dieses Vorgehen nahezu immer 70 %^{11, 47}.

2.7.3 Coekale Ligatur und Punktion (CLP)

Nach Mobilisierung des Coekums wurde eine Ligatur unterhalb der Mündungsstelle des terminalen Ileums gesetzt. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass der ligierte Coekumabschnitt eine Länge von 1 cm hatte, um eine erhöhte postoperative Mortalität zu verhindern. Anschließend wurde mit einer 22- Gauge- Kanüle (Microlance, Becton Dickinson, Spanien) das Coekum punktiert und manuell Druck ausgeübt, bis aus der Punktionsstelle sichtbar Darminhalt austrat.

2.8 Sekundäroperation

Nach der Primäroperation erfolgte zu definiertem Zeitpunkt je nach Gruppenzugehörigkeit des Versuchstieres eine Zweitoperation. 30 Minuten vor erneutem Operationsbeginn wurde den Tieren 100 mg 5-Bromo-2-deoxy-uridin (BrdU, Roche) pro kg Körpergewicht injiziert. Die Tiere wurden anschließend relaparotomiert, durch aortale Punktion wurde Blut entnommen und das Lebergewebe in seiner Gesamtheit entnommen. Das Lebergewicht wurde unmittelbar nach dem Eingriff gewogen und das Nassgewicht auf das Gesamtkörpergewicht bezogen. Gewebeproben aus der Leber, der Lunge und dem Dünndarm wurden in Formalin fixiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

2.9 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden randomisiert und in drei verschiedene Versuchsgruppen mit den entsprechenden Untergruppen aufgeteilt:

Gruppe	OP-Methode	6 h	12 h	18 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	Sham	n=6						
2	LR	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6

3	LR + CLP	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
---	----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

2.10 Histologie

2.10.1 H.E.-Färbung, Mitosenindex

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient insbesondere der Untersuchung der morphologischen Veränderungen. Es wird zwischen azidophilen (Zellplasmaproteine) und basophilen (Zellkern, DNA) Strukturen unterschieden, die mithilfe der zwei Farbstoffe unterschiedlich angefärbt werden. Nach Färbung erscheinen die Zellkerne blau und das Zytoplasma rosa (siehe Abbildung 3B).

Für die H.E.-Färbung wurden die in Formalin fixierten Gewebeproben in Paraffin eingebettet und auf 5 µm Schichtdicke geschnitten. Nach Trocknen der Schnitte wurden diese nach folgendem Schema entparaffiniert: 10 Minuten in Xylol (Merck, Darmstadt), je 2 Minuten in den verschiedenen Alkoholverdünnungen einer absteigenden Ethanolreihe (Carl Roth, Karlsruhe, 100 %, 90 %, 70 %) und Abspülen der Überstände mit destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden für 5 Minuten in Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) belassen, nach Abspülen mit Leitungswasser für 30 Sekunden in Eosin-Lösung (Merck) inkubiert und erneut mit Leitungswasser gespült. Die fertig gefärbten Schnitte wurden zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, durch Xylol entalkoholisiert und schließlich eingebettet.

Mithilfe dieser Schnitte wurde der Mitoseindex durch Auszählen der Mitosen bei 400-facher Vergrößerung in 20 Gesichtsfeldern bestimmt und auf 2000 Hepatozyten bezogen. Die Auszählung erfolgte verblindet von stets demselben Untersucher.

2.10.2 Ki-67- Immunhistologie

Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, das in allen aktiven Zellzyklusphasen exprimiert wird, G1, S, G2 und Mitose, während es in der G0-Phase nicht nachgewiesen werden kann. Damit dient dieses Protein als Marker der Proliferation.

Material und Methoden

Das Prinzip der verwendeten Ki-67-Färbung beruht auf einer Markierung einer Streptavidin-Biotin-Verbindung. Hierzu wird das Gewebe zunächst mit einem Primärantikörper gegen das Ki-67-Antigen (DAKO, Hamburg) inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Inkubation eines biotinylierten Antikörpers gegen murine Immunglobuline (DAKO) und zuletzt mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (DAKO). Hierbei bindet sich ein biotinyliertes Antikörpermolekül an Peroxidase-konjugierte Streptavidinmoleküle. Diese Streptavidin-Biotin-Verbindung wird mittels DAB+ Chromogen (DAKO) sichtbar gemacht. Diese Oxidierung äußert sich in einer sichtbaren Braunfärbung (siehe Abbildung 2A).

Für die Ki-67- Färbung wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte verwendet. Diese wurden nach Fixierung durch mehrstündiges Trocknen im Wärmeschrank bei 56-58 °C in Xylol (15 min) und Alkohol in absteigenden Konzentrationen (100 %, 96 %, 70 % je 10 min) entparaffiniert. Die anschließende Epitopdemaskierung erfolgte im Dampfdrucktopf in einer Citratpufferlösung (10 mM, pH 6,0) für 12 Minuten. Vorhandene endogene Peroxidase wurde mittels eines Peroxidase Blocking Reagenz (DAKO) blockiert, welches 5 Minuten inkubierte und mit Aqua dest. abgespült wurde. Anschließend wurde der Primärantikörper gegen das Ki-67-Antigen (DAKO) in einer 1:25 Verdünnung aufgetragen und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 3 Minuten) mit TBS-Puffer wurde ein Antikörper gegen murines IgG (DAKO) für 10 Minuten inkubiert, nach erneutem zweimaligen Waschen mit TBS-Puffer wurde das Streptavidin für 10 Minuten inkubiert und ebenfalls zweimal gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit DAB+ Substrat Chromogen System (DAKO) für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Die Gegenfärbung wurde mit Harris Hämatoxylin (25 sec) gestaltet. Die fertigen Präparate wurden schließlich in Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckt.

Die Auszählung der Ki-67- positiven Zellen erfolgte in 400-facher Vergrößerung. Hierzu wurden je 20 Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert an positiven Hepatozyten pro Gesichtsfeld auf 2000 ausgezählte Hepatozyten bezogen. Die gesamte Zählung erfolgte verblindet und von stets demselben Untersucher.

2.10.3 BrdU-Immunhistologie

BrdU (Bromodeoxyuridin) wurde den Versuchstieren 30 Minuten vor der Sekundäroperation und damit vor der Gewebeentnahme intraperitoneal verabreicht. Es dient ebenso wie Ki-67 als Marker der Leberregeneration, da es in die DNA anstelle von Thymidin eingebaut wird. Im Gegensatz zu Ki-67 geschieht dieses jedoch ausschließlich in der S-Phase des Zellzyklus. Die Zellkerne in der S-Phase färben sich durch dieses Verfahren braun an. Die BrdU-Immunhistologie ermöglicht aufgrund der gut erkennbaren Kernmorphologie und Zelllage eine Unterscheidung zwischen Hepatozyten und Nichtparenchymzellen.

Zum Nachweis wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (BrdU Labeling and Detection Kit II, Roche Diagnostics, Penzberg) nach Anweisungen des Herstellers benutzt. Hierfür wurden 4 µm Gewebeschnitte verwendet. Diese wurden nach Fixierung durch Trocknen und Entparaffinieren (Xylol für 30 Minuten, absteigende Alkoholreihe: 100 % 5 Minuten, 90 % 4 Minuten, 80 % 4 Minuten, 70 % 4 Minuten, Aqua dest. 10 Minuten) in 200 ml Citratpuffer (10 mM, pH 5,95) in der Mikrowelle bei 360 W zweimal für 5 Minuten zur Epitopdemaskierung erhitzt. Die Schnitte wurden in TBS (pH 7,6) und PBS gespült. Anschließend wurde ein muriner Anti-BrdU-Antikörper (Roche Diagnostics) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde ein Antikörper gegen murines IgG, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist (anti-Maus AP, Roche Diagnostics), ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurde auf die Schnitte der filtrierte Substratpuffer gegeben und nach 18 Minuten mit PBS abgespült. Die Gegenfärbung wurde mit 1:3 verdünntem Hämatoxylin für 45 Sekunden vorgenommen, anschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült und in Kaisers Gelatine eingebettet.

Die Auszählung wurde für alle Tiere von einem Untersucher verblindet durchgeführt. Es wurden bei 400-facher Vergrößerung die positiven Hepatozyten in 20 Gesichtsfeldern gezählt und auf 1000 Hepatozyten bezogen.

Die positiven Nichtparenchymzellen wurden ebenfalls ausgezählt und angegeben als positive Zellen pro Gesichtsfeld von insgesamt 20 Gesichtsfeldern.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Lebergewebe wurde unter Verwendung des kommerziellen NucleoSpinRNA II-Isolierungskits (Machery-Nagel, Düren) bei Raumtemperatur nach Anleitung des Herstellers vorgenommen. Hierfür wurde je 20-30 mg des Lebergewebes in 350 µl Lysepuffer in einem 12 ml Turrax-tube mit einem Ultraturax (Ika, Staufen) homogenisiert. Nach Zugabe von 3,5 µl Mercaptoethanol wurde dieses auf die NucleoSpin-Filter (Machery-Nagel) gegeben. Das erhaltene Lysat wurde mit 350 µl Ethanol versetzt, erneut durch eine NucleoSpin-Säule gefiltert und nach Zugabe von 350 µl MDB-Puffer (Machery-Nagel) mit DNase I (Invitrogen) behandelt. Nach drei Waschvorgängen wurde die so aufgereinigte RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.11.2 Reverse Transkription

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wird als Vorlage eine DNA benötigt. Diese Umschreibung der isolierten RNA in die einsträngige cDNA erfolgte mithilfe einer Reversen Transkriptase. Hierzu wurden je 10 µl der totalen RNA (01,µg/µl) vorgelegt und mit je 1 µl Oligo dT (Gibco Invitrogen) und 1 µl RNAsin (Promega) versetzt. Nach Inkubierung für 10 Minuten bei 70 °C im Thermocycler wurden die Proben auf Eis gestellt und ein Mix angesetzt, von dem jeweils 7 µl zu jeder Probe gegeben wurde.

Material und Methoden

Einfacher cDNA-Synthese-Ansatz:

2 µl 10*PCR-Puffer

2 µl 25 mM MgCl₂

2 µl 10 mM dNTP

2 µl 0,1 M DTT

Die Proben wurden für 5 Minuten bei 42 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend nach Zusatz von je 1 µl Super-Script-Reverse-Transkriptase (Gibco Invitrogen) erneut für 50 Minuten bei 42 °C und 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Zum Ausschluss einer Verunreinigung der RNA durch genomische DNA wurden stets Negativkontrollen ohne Reverse-Transkriptase-Zusatz angesetzt. Die cDNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.11.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der Amplifikation eines gezielten Nucleinsäureabschnittes. Benötigt werden hierfür neben dem zu amplifizierenden Genbereich zwei Primer, die diesen Bereich eingrenzen, sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase, die sogenannte Taq-Polymerase, Nucleotide und Pufferlösungen, die den idealen pH- Bereich für die Enzyme einstellen. Diese Amplifizierung verläuft in der Regel in Zyklen (ca. 30), durch die nach jedem Durchgang theoretisch eine Verdopplung der vorhandenen DNA-Menge erreicht wird. Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht damit einen exponentiellen und selektiven Anstieg der gewünschten DNA-Sequenz.

Ein Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen: Denaturierung, Anheftung der Oligonukleotide und Elongation. Durch Erhitzen der Doppelstrang-DNA wird diese in ihre Einzelstränge aufgebrochen (Denaturierung) und nach Herabsetzung der Temperatur lagern sich die Primer an (Annealing). Durch Temperaturerhöhung auf ca. 72 °C vervielfältigt die Taq-Polmerase den markierten Genabschnitt (Elongation).

Material und Methoden

Zur Überprüfung der synthetisierten cDNA aus der Gesamt-RNA wurde stets als erstes eine β -Actin-PCR vorgenommen. Erst im Anschluss erfolgte die PCR mit TNF- α - und IL-6- Primern.

Primersequenz β -Actin:

sense (s): 5`CTG AAC CCT AAG GCC AAC`3

antisense (as): 5`CGG AAC CGC TCA TTG CC`3

Primersequenz IL-6:

sense: 5`GGA ACG AAA GTC AAC TCC ATC TGC`3

antisense: 5`GGT AGA AAC GGA ACT CCA GAA GAC`3

Primersequenz für TNF- α :

sense: 5`CGA GTG ACA AGC CCG TAG CC`3

antisense: 5`GGA TGA ACA CGC CAG TCG CC`3

Einfacher PCR-Ansatz für β -Actin:

2 μ l cDNA

2 μ l 10* PCR-Puffer

1 μ l dNTP's

1 μ l Primer as

1 μ l Primer s

0,3 μ l TaqPolymerase

1 μ l MgCl₂

11,7 μ l DEPC Wasser

Einfacher PCR-Ansatz für IL-6:

2 µl cDNA
2 µl 10* PCR-Puffer
0,5 µl dNTP's
1 µl Primer as
1 µl Primer s
0,2 µl TaqPolymerase
0,6 µl MgCl₂
12,7 µl DEPC Wasser

Einfacher PCR-Ansatz für TNF-α:

2 µl cDNA
2 µl 10* PCR-Puffer
0,5 µl dNTP's
0,5 µl Primer as
0,5 µl Primer s
0,3 µl TaqPolymerase
0,6 µl MgCl₂
13,6 µl DEPC Wasser

Material und Methoden

PCR-Programm für β -Actin

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1.	Denaturierung	94 °C	3 min	1
2.	Denaturierung	94 °C	1 min	29
3.	Annealing	58 °C	1 min	
4.	Elongation	72 °C	2 min	
5.	Final Elongation	72 °C	10 min	1
6.	Kühlung	4 °C	∞	1

PCR-Programm für IL6

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1.	Denaturierung	96 °C	3 min	1
2.	Denaturierung	96 °C	30 sec	34
3.	Annealing	62 °C	30 sec	
4.	Elongation	72 °C	90 sec	
5.	Final Elongation	72 °C	10 min	1
6.	Kühlung	4 °C	∞	1

PCR-Programm für TNF- α

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1.	Denaturierung	94 °C	4 min	1
2.	Denaturierung	94 °C	1 min	33
3.	Annealing	62 °C	1 min	
4.	Elongation	72 °C	2 min	
5.	Final Elongation	72 °C	7 min	1
6.	Kühlung	4 °C	∞	1

Material und Methoden

Zu jeder 20 µl PCR-Reaktion wurde 4 µl Ladepuffer Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) gegeben. Von diesem Gemisch wurde je 3 µl auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei jedem Lauf wurden eine Negativkontrolle sowie ein Basenpaarleiter 100 bp/ 50 bp mitgeführt.

2.11.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Darstellung der DNA erfolgt mithilfe eines unter UV-Licht fluoreszierenden Farbstoffes, dem Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert. Für die Herstellung der Agarosegele wurde je 1 g Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 100 ml 0,5* TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle zweimal aufgeköcht, bis diese Lösung schlierenfrei war. Nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid wurde diese ausgehärtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 90 Minuten bei 80 V in einer mit 0,5*TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Die einzelnen DNA-Fragmente bewegen sich aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld. Je größer ein DNA-Fragment ist, umso langsamer ist dessen Laufgeschwindigkeit, bzw. je kleiner, desto schneller bewegt es sich. Zur genauen Skalierung lief stets ein Basenpaarleiter mit.

2.11.5 Auswertung der Gele

Die Auftrennung der DNA-Fragmente ist im UV-Licht sichtbar und kann nach dem Fotografieren mithilfe des Programms UN-SCAN-IT (Silk Scientific, Orem, USA) densitometrisch ausgewertet werden.

2.12 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt im Lebergewebe wurde als Bezugsgröße für die Myeloperoxidasemessung bestimmt. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Tatsache, dass es in alkalischer Lösung zur Ausbildung einer Komplexbildung zwischen

Material und Methoden

der Peptidbindung und Kupfer-II-Ionen kommt (Biuret-Reaktion). Die Kupfer-II-Ionen werden zu Kupfer-I-Ionen reduziert, von denen wiederum ein Ion mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bildet. Die Absorption dieses Komplexes kann bei 562 nm gemessen werden. Da die gemessene Extinktion proportional zur Proteinkonzentration ist, kann so der Proteingehalt mithilfe einer gleichzeitig angefertigten Standardkurve bestimmt werden.

Für diese Bestimmung wurden die Leberproben in 0,05 M KPE-Puffer+0,5 % HTAB homogenisiert, mit 300 µl HClO₄ versetzt und mit A. dest und Aceton (Riedel de Haen, Seelze) gewaschen. Nachdem die entstandenen Pellets über Nacht trockneten, wurde zu diesen je 1 ml NaOH (Baker, Mumbai, Indien) gegeben und im Wasserbad bei 65 °C aufgelöst. Zu jeder Probe wurde Bicinchonin-Acid-Lösung (BCA) (Sigma-Aldrich) und 4 % CuSO₄ (Merck) gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Photometer bei 562 nm. Die Standardkurve wurde mithilfe einer Rinder-Serum-Albumin BCA (2000 µg/ml) (Merck) erstellt, welche in einer 1:2 Verdünnung bis zur gewünschten 62,5 µg/ml Konzentration verdünnt wurde: 1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5 µg/ml.

2.13 Myeloperoxidase-Assay

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein in hoher Konzentration in neutrophilen Granulozyten vorkommendes Enzym und Teil der unspezifischen Immunabwehr. Sie katalysiert die Oxidierung von Chloridionen mittels Wasserstoffperoxid zur Hypochlorsäure (HOCl), welche Erreger intrazellulär abzutöten vermag. Da die MPO-Aktivität in einem Gewebe mit der Konzentration an neutrophilen Granulozyten korreliert, kann die Myeloperoxidase als Marker für Entzündungsaktivitäten hinzugezogen werden. Hierfür wurden je 100-150 mg der kryokonservierten Lebergewebeproben in 2 ml 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer mit 0,5 % HTAB mittels Ultraturrax dismembriert und bei 3500 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes pipettiert, bei 60 °C für 2 Stunden inkubiert und nach Abkühlen der Proben erneut für 2 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden für die Messung benutzt. Je 25 µl des Leerwerts, Standards und der Proben wurden in eine 96-well-

Material und Methoden

Mikrotiterplatte pipetiert. In jedes Well wurde 200 µl TMB (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, bei 37 °C 10 Minuten dunkel inkubiert und anschließend mit je 50 µl Stopplösung (2 M H₂SO₄) versehen. Die Messung der Extinktionsänderung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm vorgenommen. Die Standardkurve für das Photometer wurde mit einer Myeloperoxidase in folgenden Konzentrationen erstellt: 15,7 – 31,25 – 62,5 – 125 – 250 – 500 mU/ml. Als Leerwert diente ein 0,05 M KPE-Puffer. Die Myeloperoxidase-Konzentrationen konnte nun aus der Extinktionsänderung mithilfe der Standardkurve errechnet werden.

2.14 Blut- und Serumparameter

Das nach der Sekundäroperation gewonnene Blut wurde zur Albumin- und Bilirubinbestimmung genutzt. Albumin und Bilirubin dienen zur Verlaufsbeurteilung der Synthese- und Funktionsleistung der Leber. Auf infektiöse Schädigung des Parenchyms kann die Leber zum einem mit einem Abfall der Serum-Albuminkonzentration, zum anderen mit einer erhöhten Bilirubinausscheidung reagieren.

Durch maschinelle Blutbilderstellung wurde ebenfalls die Leukozytenzahl bestimmt und als Parameter für das Ausmaß der Infektion genutzt.

Die Messungen wurden in der Abteilung Klinische Chemie der Charité Campus Virchow Berlin mit handelsüblichen automatisierten Kits (Roche Elecsys System) durchgeführt.

2.15 Relatives Lebergewicht

Nach Primäroperation wurde das Gewicht des resezierten Leberanteils und das der Versuchstiere bestimmt und anschließend der Quotient aus beiden Werten gebildet. Ebenso wurde nach der Zweitoperation verfahren, indem das Gewicht der Restleber abgewogen und auf das Körpergewicht bezogen wurde.

2.16 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) angewandt. Aus den Einzelwerten wurden das arithmetische Mittel und der Standard Error of Mean (SEM) errechnet. Signifikante Unterschiede wurden anhand des Mann-Whitney- U-Test errechnet. Ein p-Wert größer als 0,05 wurde als nicht signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Beurteilung der Leberregeneration

3.1.1 Ki-67

Mittels der Ki-67-Immunhistologie-Färbung wurden die Hepatozyten detektiert, die sich zum Zeitpunkt der Tötung des Tieres in einer aktiven Zellzyklusphase befanden. Ki-67 ist ein Parameter für die stattfindende Regeneration des Gewebes. Während nach alleiniger LR in den ersten Untergruppen (6 h, 12 h, 18 h) kaum Veränderungen wahrnehmbar waren, war nach 24 h ein erster deutlicher Anstieg zu beobachten (siehe Abbildung 2). Die Gruppe der alleinig Leberresezierten erreichte ihr Proliferationsmaximum nach 24 h ($23,89 \pm 1,94$ %) und wies damit eine signifikant und fast vierfach höhere Regenerationsaktivität zur LR+CLP-Gruppe ($6,71 \pm 3,12$ %) auf ($n=6$; $p<0,05$). Das Maximum trat bei der LR+CLP-Gruppe verzögert nach 48 h auf ($41,38 \pm 7,40$ %) und war im Vergleich zur sinkenden Ki-67-positiven Hepatozytenanzahl der LR-Gruppe ($20,78 \pm 4,73$ %) signifikant erhöht ($n=6$; $p<0,05$). In den darauf folgenden Stunden nahm die Zahl der Ki-67-positiven Hepatozyten in beiden Gruppen kontinuierlich ab.

3.1.2 Mitosen

Anhand von H.E. gefärbten Schnitten wurden die Mitosen mikroskopisch ausgezählt. Es wurden die Mitosen in 20 Gesichtsfeldern gezählt und auf 2000 Hepatozyten bezogen. Die Mitoserate dient als Maß der Regenerationsaktivität eines Gewebes. Der maximale Mitoseindex war bei der LR-Gruppe bei 24 h zu verzeichnen ($82,5 \pm 19,56$ %) und zeigte eine signifikante Erhöhung um das Achtfache im Gegensatz zur LR+CLP-Gruppe ($10,63 \pm 5,75$ %, $n=6$; $p<0,05$) (siehe Abbildung 3). Auch hier wurden innerhalb der ersten 18 h keine relevanten Mitosen beobachtet. Das Maximum der Mitoseaktivität der LR+CLP- Gruppe ist nach 48 h erreicht, jedoch im Vergleich zur LR-Gruppe nicht signifikant verändert.

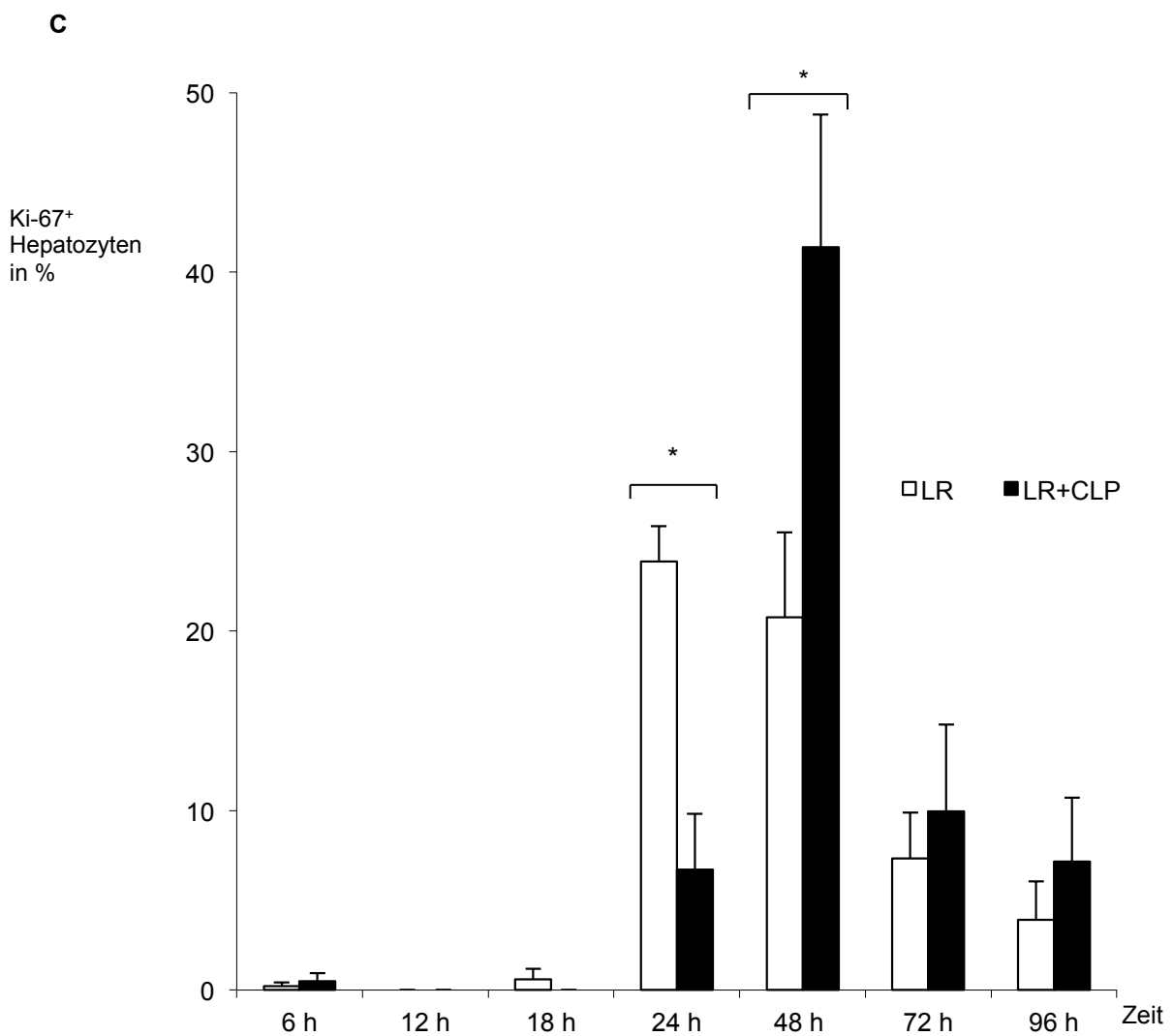
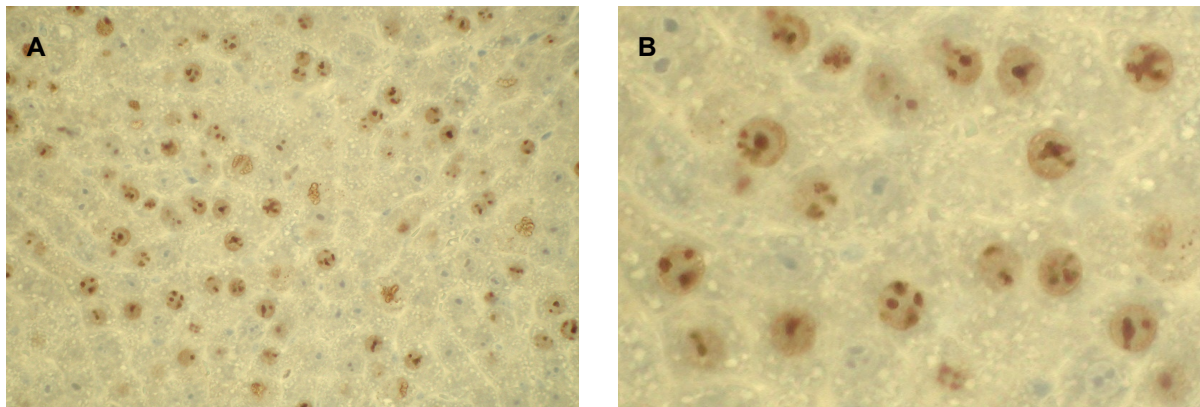


Abbildung 2 Ki-67 Färbung

A Beispielhafte Darstellung von Leberparenchym mit Ki-67-Färbung. *B* Ausschnittvergrößerung: bräunlich getüpfelte Ki-67-positive Hepatozyten. *C* Der Anstieg des Prozentsatzes der Ki-67-positiven Hepatozyten bei 24 h signifikant und maximal für die Gruppe der alleinig Leberresezierten. Bei 48 h besteht ein signifikantes Maximum der Gruppe der kombinierten Resektion mit CLP im Vergleich zur LR .

Ergebnisse

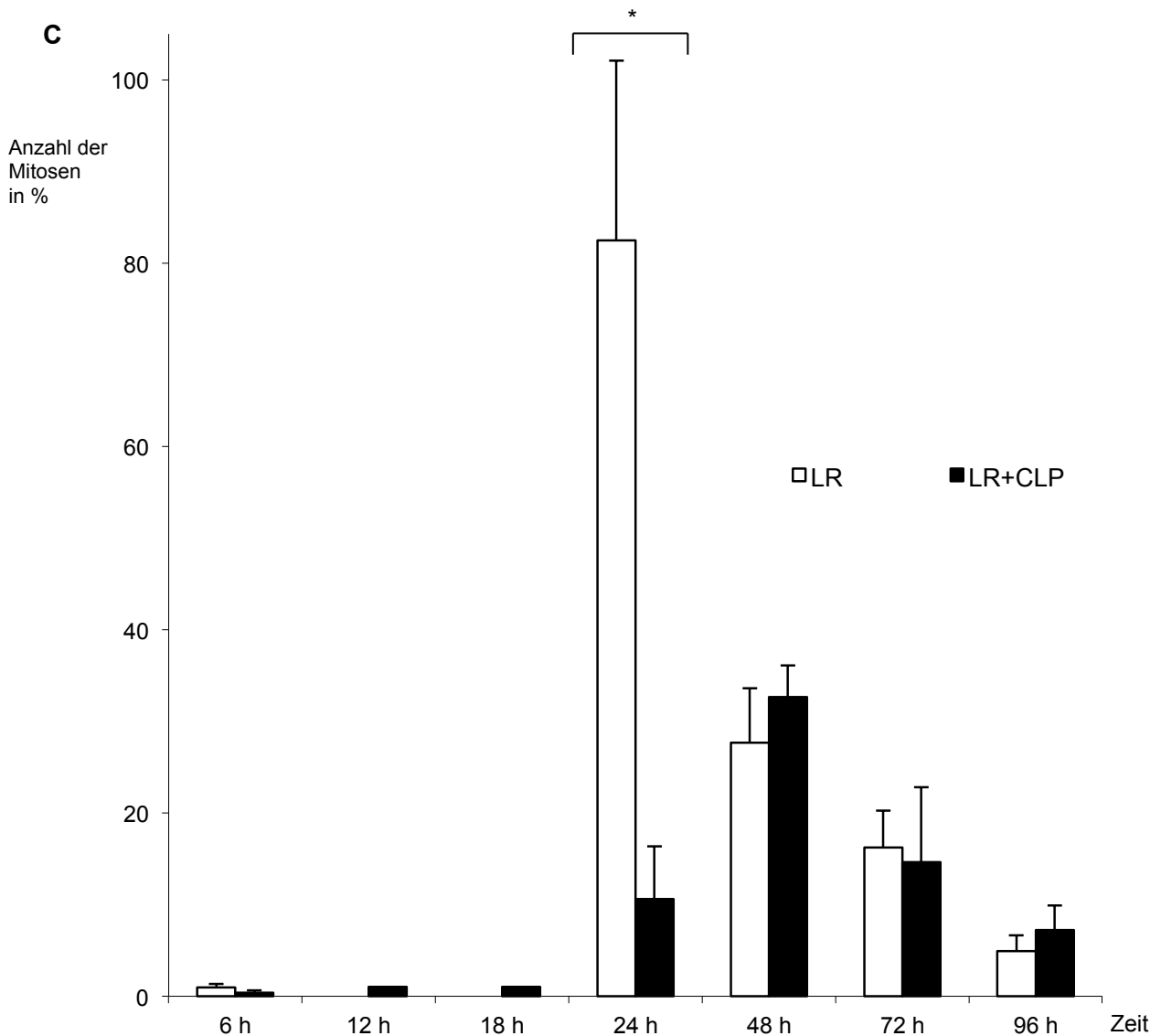
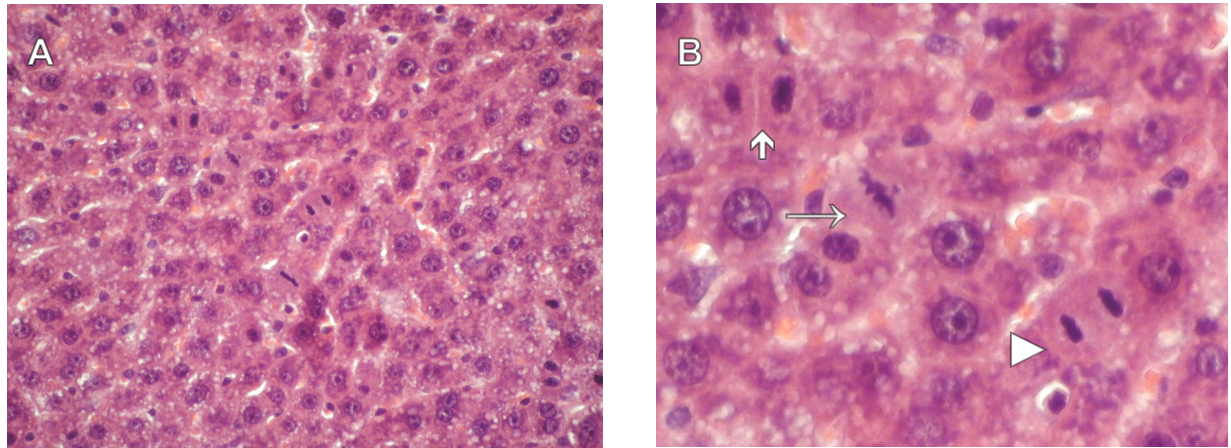


Abbildung 3 Mitosen in H.E. Färbung

A Beispielhafte Darstellung einer H.E. Färbung von Leberparenchym. B Ausschnittvergrößerung einer Zelle in Metaphase (→), Telophase (▶) und abgeschlossener Zellteilung (▲). C Es besteht ein signifikanter Anstieg und gleichzeitiges Maximum der Mitoserate für die LR-Gruppe nach 24 h

Ergebnisse

3.1.3 BrdU

Mit BrdU konnten immunhistochemisch ausschließlich die Zellen angefärbt werden, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befanden. Ebenso wie Ki-67 stellt BrdU einen Marker der Proliferationsaktivität dar. Die Anzahl an BrdU⁺ Hepatozyten war bei 24 h sowohl für die nach LR als auch für die nach LR+CLP operierten Gruppen maximal. In beiden Gruppen nahm schließlich die Anzahl der BrdU⁺ Zellen kontinuierlich ab. Der Anteil an BrdU⁺ Hepatozyten war bei der allein leberresezierten Gruppe ($0,16 \pm 0,021$ %) bei 24 h zur Vergleichsgruppe ($0,10 \pm 0,008$ %) signifikant erhöht ($n=6$; $p<0,05$), nach 48 h (LR: $0,042 \pm 0,002$ % zu LR+CLP: $0,083 \pm 0,008$ %; $n=6$ und $p<0,05$) und 96 h (LR: $0,005 \pm 0,001$ % zu LR+CLP: $0,020 \pm 0,003$ %; $n=6$ und $p<0,05$) signifikant erniedrigt.

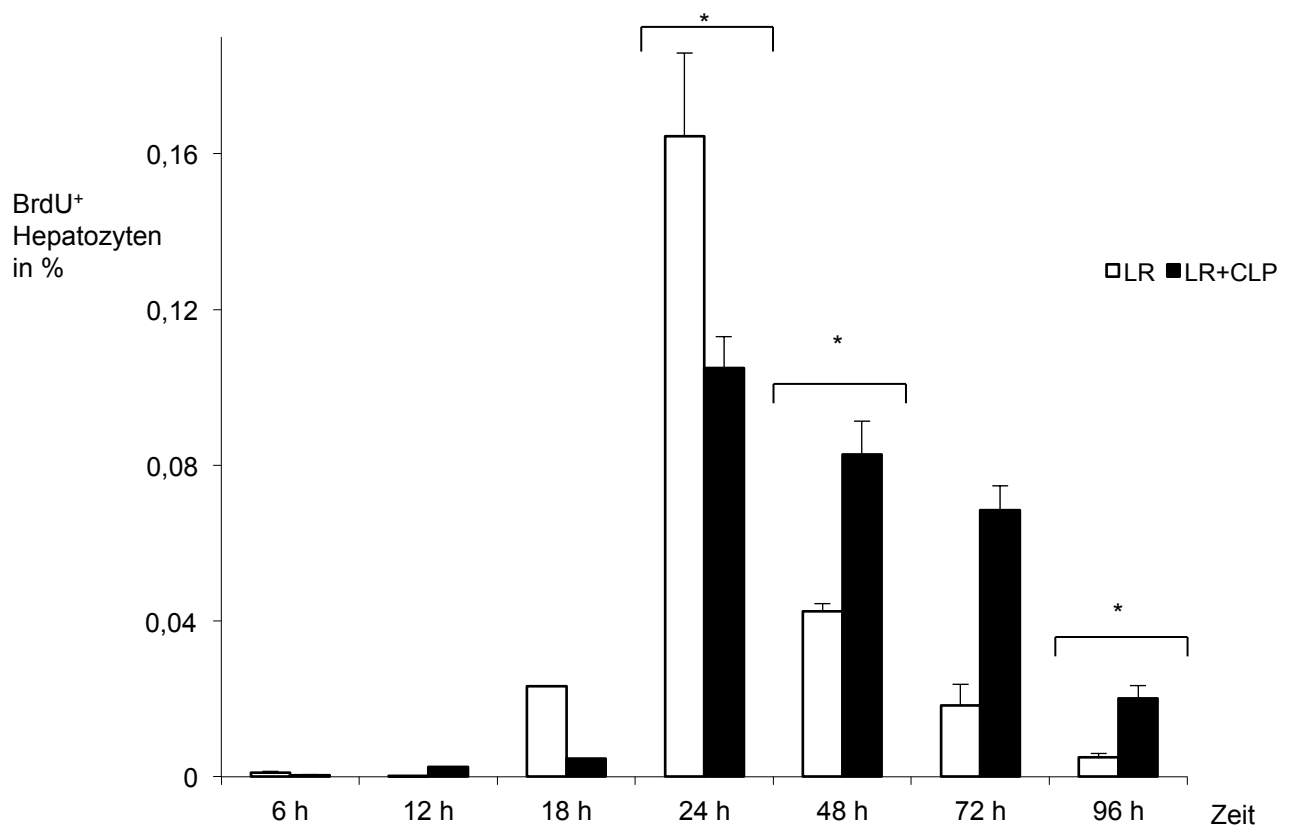


Abbildung 4 BrdU-Färbung

Die Anzahl an BrdU-positiven Hepatozyten war bei 24 h für die LR-Gruppe signifikant erhöht und maximal. LR+CLP erreichte hier ebenfalls ihr Maximum, wies zur Vergleichsgruppe aber zu diesem Zeitpunkt niedrigere Werte auf, bei 48 h und 96 h jedoch im Vergleich signifikant erhöhte Werte.

Ergebnisse

3.1.4 BrdU – Nicht-Parenchymzellen

Im Gegensatz zu den Hepatozyten wurde der erste deutliche Anstieg der sich in der S-Phase befindenden Zellzahl für beide Gruppen erst bei 48 h erreicht. Bei 48 h konnte eine signifikante Erhöhung der BrdU⁺ Zellen für die LR-Gruppe verzeichnet werden ($21,3 \pm 3,87 \%$), die zu dem Zeitpunkt im Vergleich zur LR-CLP-Gruppe ($11,2 \pm 0,35 \%$) einen nahezu doppelten Wert erreichte ($n=6$, $p<0,05$).

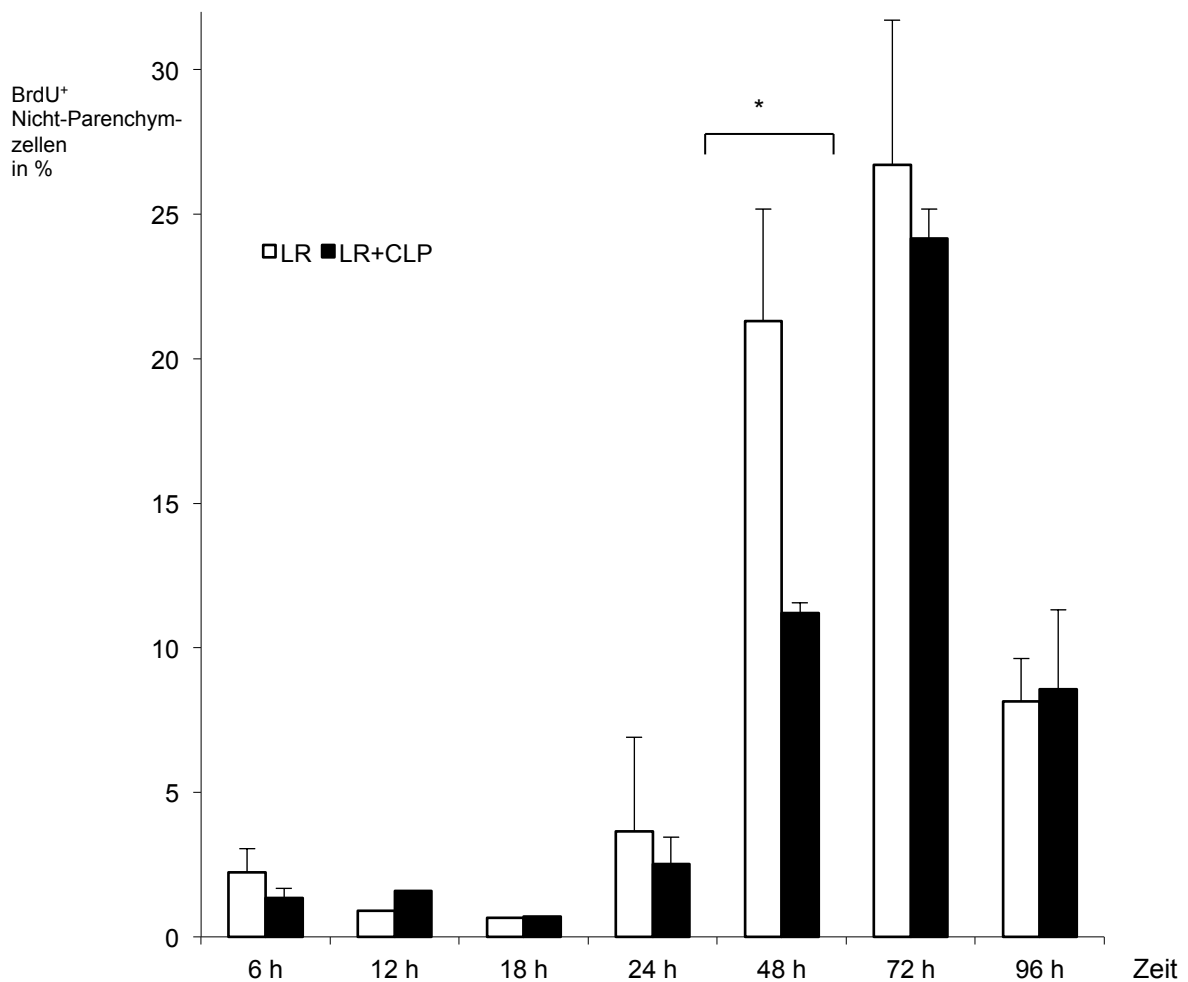


Abbildung 5 BrdU Nichtparenchymzellen

Es besteht eine signifikante Erhöhung der Anzahl an BrdU⁺ Nicht-Parenchymzellen bei 48 h für die LR-Gruppe. Die LR+CLP-Gruppe erreicht ihr Maximum nach 24 h Verzögerung ohne relevante Unterschiede zur LR-Gruppe.

Ergebnisse

3.1.5 Relatives Lebergewicht

Der in der Erstoperation resezierte Leberanteil wurde unmittelbar nach dem Eingriff gewogen und auf das Gesamtkörpergewicht bezogen. Ebenso wurde nach der Zweitoperation mit der regenerierten Restleber vorgegangen. Es zeigte sich, dass das Lebergewicht nach alleiniger LR ($1,78 \pm 0,037 \%$) im Gegensatz nach LR+CLP ($1,57 \pm 0,045 \%$) bei 24 h signifikant erhöht war ($n=6$, $p<0,05$). Nach 96 h erreichte die kombiniert operierte Gruppe LR+CLP ($3,05 \pm 0,08 \%$) im Durchschnitt ein signifikant höheres Lebergewicht als ihre Vergleichsgruppe ($2,67 \pm 0,11 \%$, $n=6$, $p<0,05$).

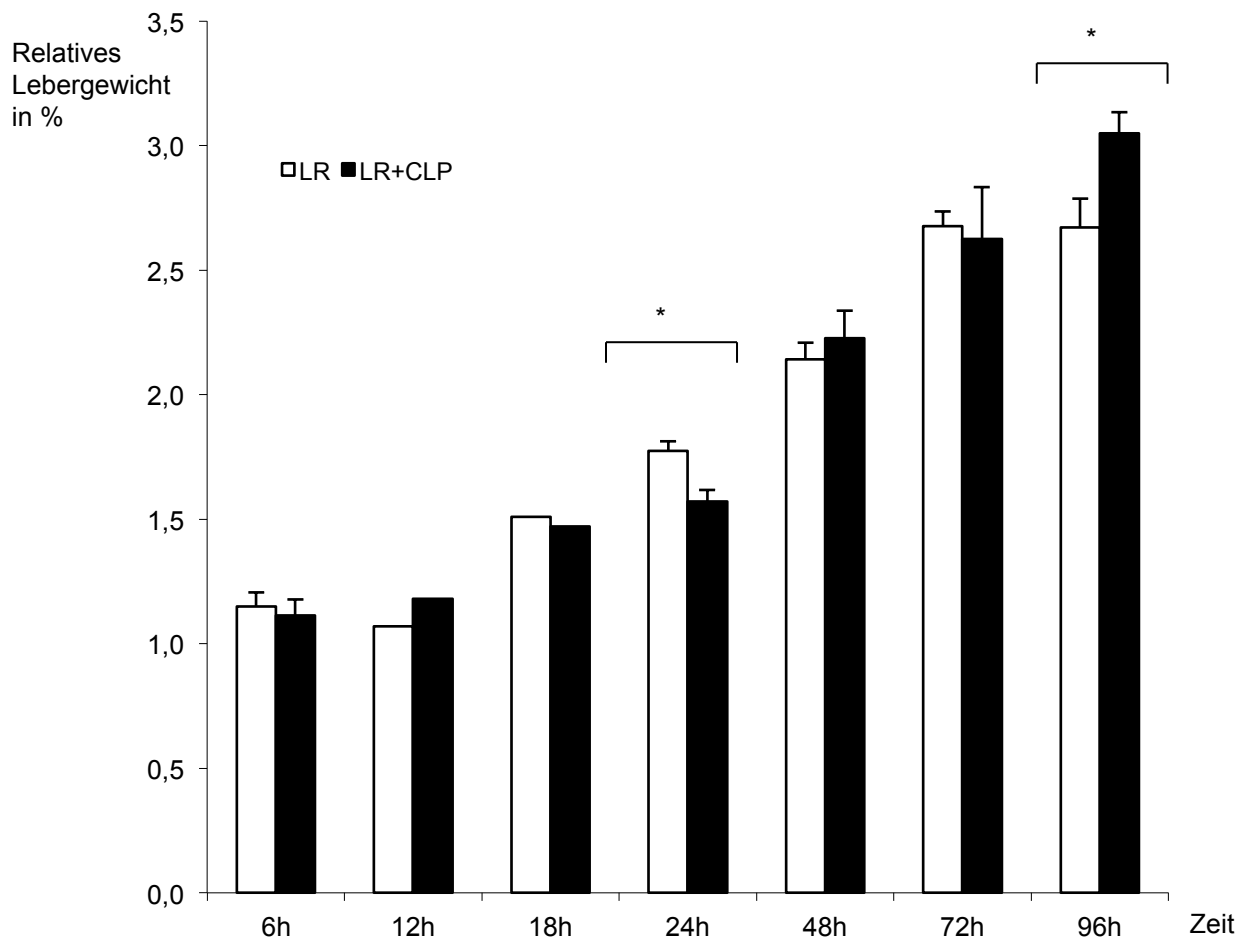


Abbildung 6 Relatives Lebergewicht

Nach 24 h ist das Lebergewicht der LR-Gruppe signifikant erhöht. Nach 96 h besteht ein höheres durchschnittliches Lebergewicht für LR+CLP.

3.2 Beurteilung der Leberfunktion

3.2.1 Albumin

Die Syntheseleistung der Leber wurde stellvertretend anhand der Bestimmung von Albumin beurteilt. In der Gruppe der kombinierten Operation war die Albuminsynthese nach 48 h ($2,73 \pm 0,09$ %) und 96 h ($2,3 \pm 0,10$ %) signifikant schlechter als bei der allein leberresezierten Gruppe (LR 48 h: $3,22 \pm 0,06$ %; LR 96 h: $3,1 \pm 0,06$ %; jeweils $n=6$ und $p<0,05$).

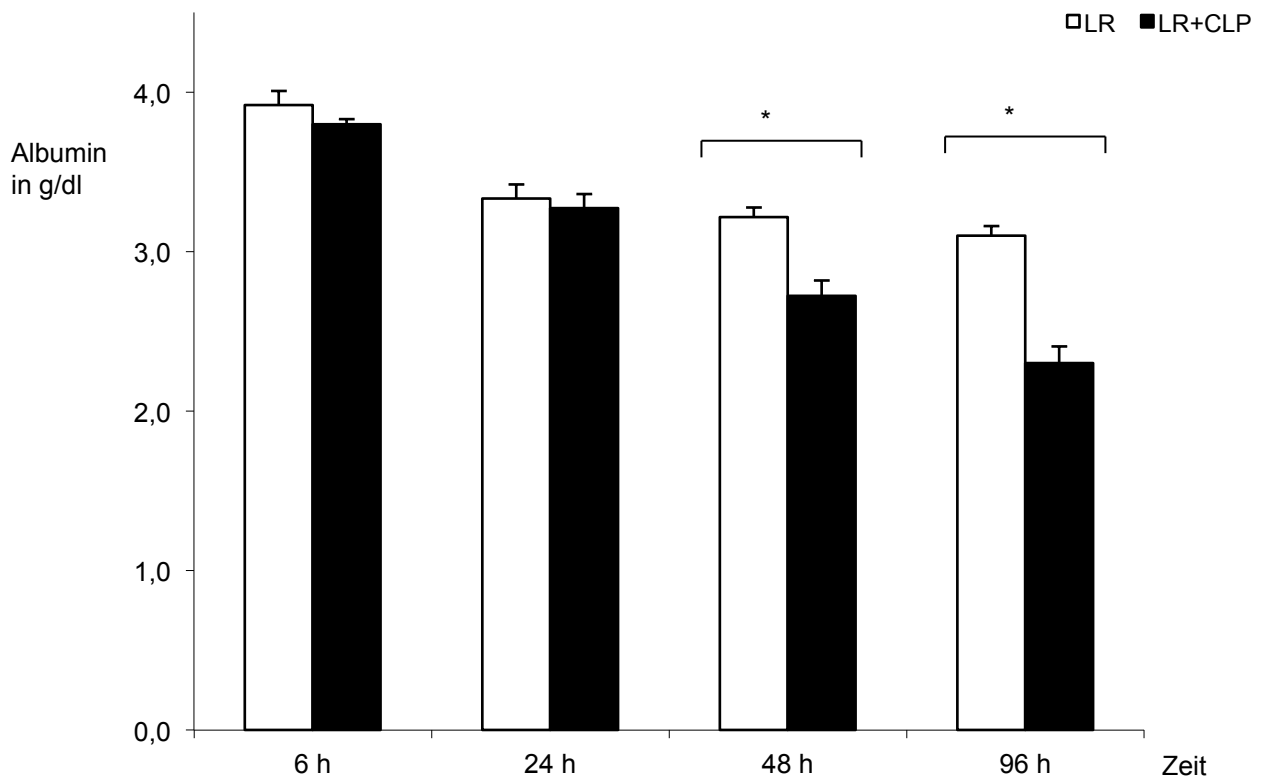


Abbildung 7 Albuminsynthese

Signifikant geringere Albuminkonzentration nach 48 h und 96 h in der kombiniert operierten Gruppe als in der allein leberresezierten Gruppe.

Ergebnisse

3.2.2 Bilirubin

Der Bilirubingehalt diente zur Beurteilung der Leberfunktionsstörung und wies in der kombiniert operierten Gruppe bei 24 h ($0,61 \pm 0,17$ %) und 48 h ($0,46 \pm 0,07$ %) eine signifikante Erhöhung auf (LR 24 h: $0,28 \pm 0,03$ %; LR 48 h: $0,22 \pm 0,2$ %); (jeweils $n=6$ und $p<0,05$). Sonst bestanden keine signifikanten Unterschiede.

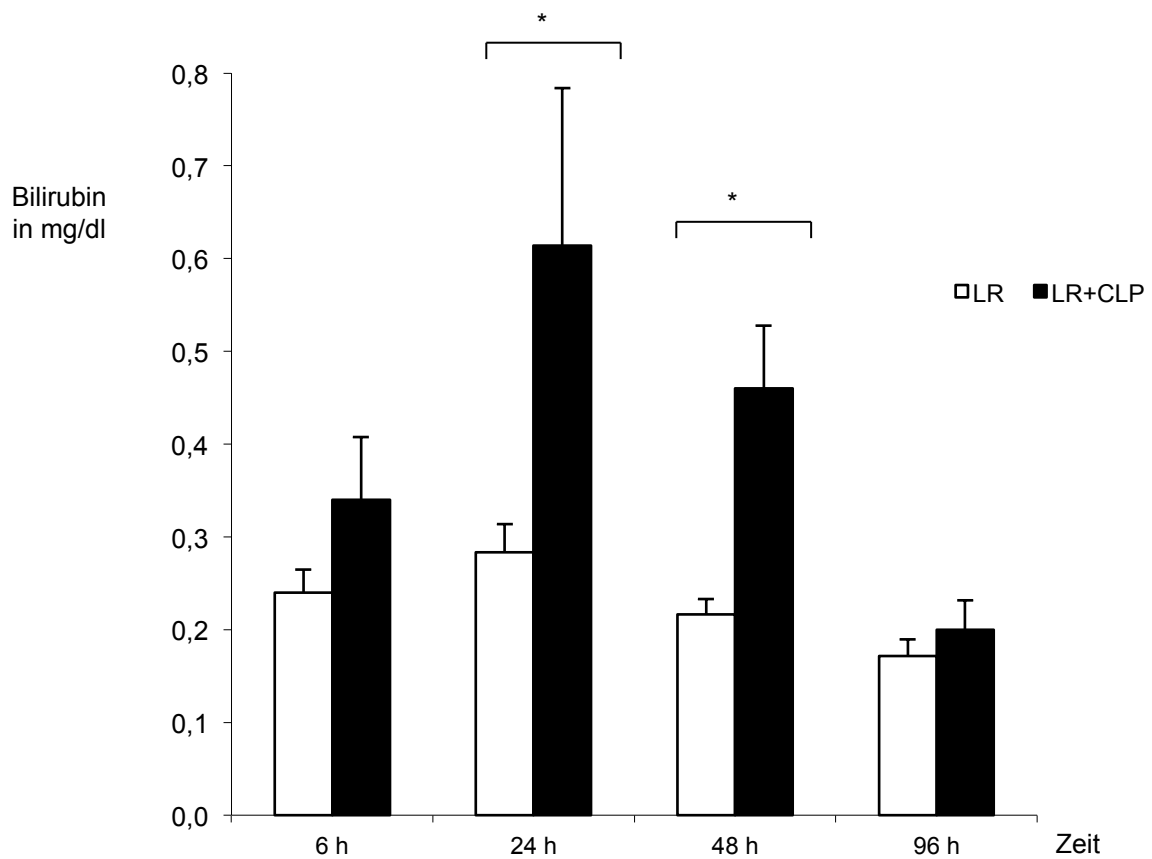


Abbildung 8 Bilirubin

Die Bilirubinwerte waren bei 24 h und 48 h für die LR+CLP- Gruppe signifikant erhöht.

3.3 Beurteilung des Leberzellschadens

3.3.1 TNF- α

TNF- α stellt ein proinflammatorisches Zytokin dar, welches von einer Vielzahl an Zellarten gebildet wird. Neben der zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen nimmt TNF- α des Weiteren eine wichtige Stellung als Mediator in der Immunantwort auf verschiedenste bakterielle Infektionen ein und diente im Folgenden als ein Parameter zu Untersuchung des Leberzellschadens.

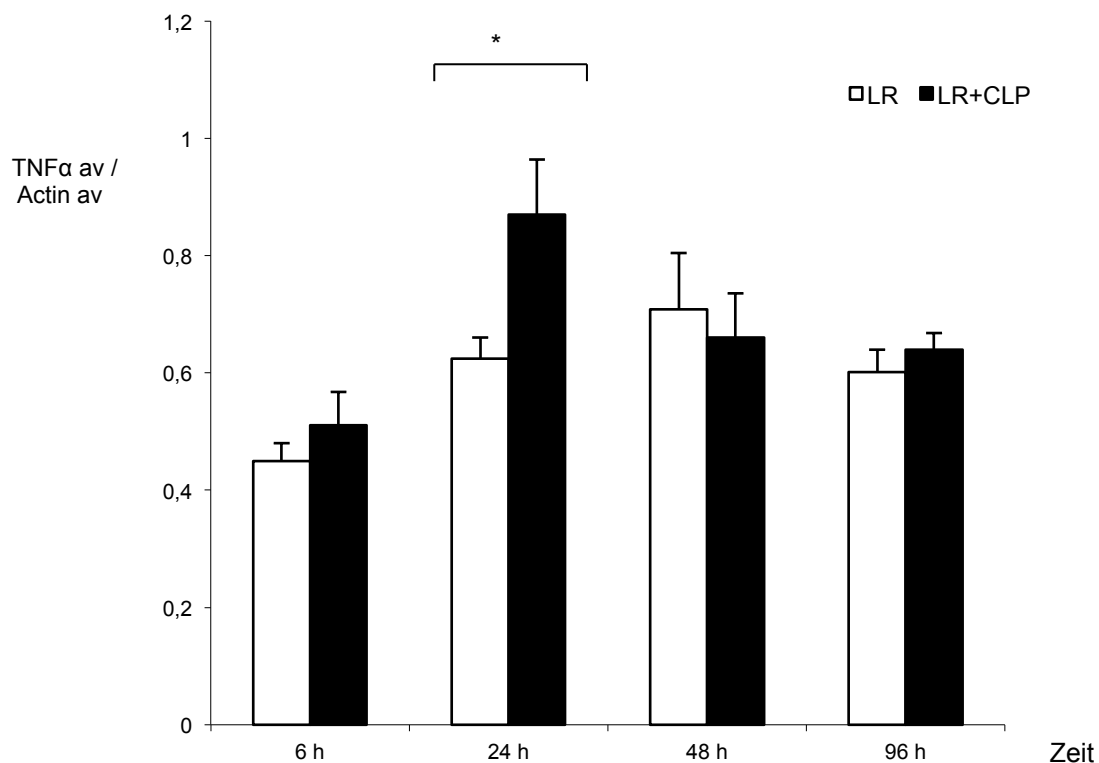


Abbildung 9 TNF- α

Aktivität von TNF- α ist nach 24 h für die kombiniert operierte Gruppe im Vergleich zur allein leberresezierten Gruppe signifikant erhöht. (*av* = *average*)

Die 24 h Messung in der kombiniert operierten Gruppe ($0,87 \pm 0,09$ %) zeigte einen deutlichen signifikanten Anstieg der TNF- α -Expression gegenüber der allein leberresezierten Gruppe ($0,62 \pm 0,04$ %; $n=6$; $p<0,05$).

3.3.2 IL-6

Das Zytokin IL-6 hat eine bedeutende Funktion in der Regulation der Immunantwort und der Entzündungsreaktion von Geweben und wird ebenso von einer Vielzahl an Zellarten sezerniert. Es trägt zur Differenzierung von B-Zellen und Antikörperproduktion bei, stimuliert die Entwicklung von Megakaryozyten und stellt einen wichtigen Induktor für die Expression von hepatischen Akute-Phase-Proteinen dar. In den folgenden Versuchen wurde IL-6 zur Quantifizierung der Entzündungsreaktion herangezogen.

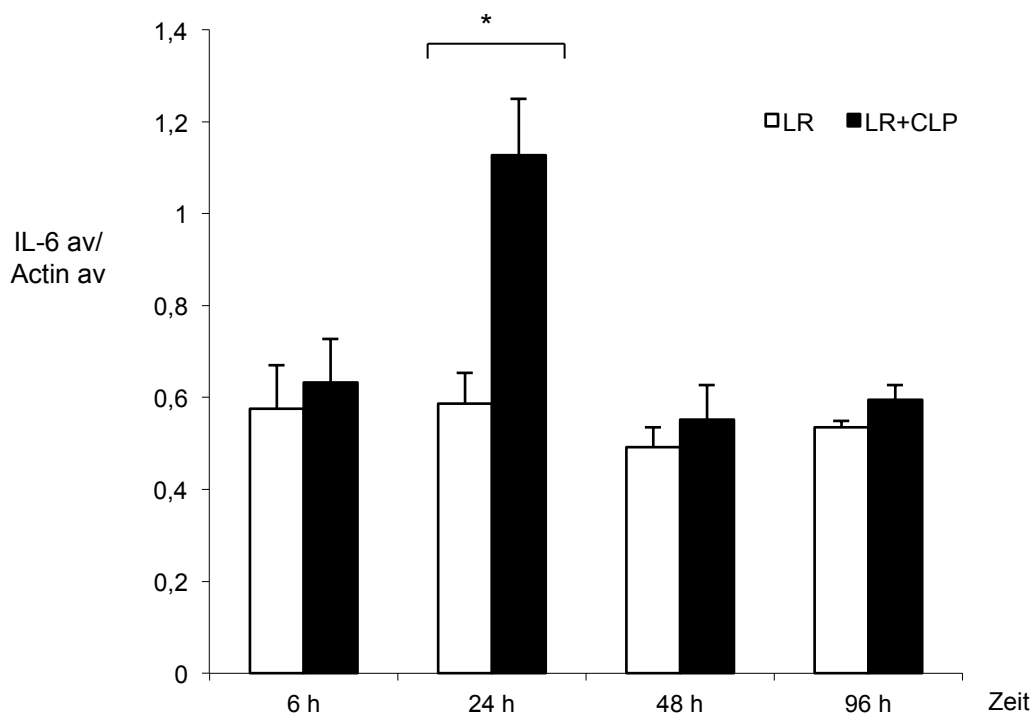


Abbildung 10 IL-6

Nach 24 h war eine signifikante Erhöhung mit einer mehr als doppelten IL-6-Aktivität im Vergleich zur kombiniert operierten Gruppe zu verzeichnen.

Beide Gruppen zeigten überwiegend keine wesentlichen Unterschiede in der IL-6-Expression. Lediglich nach 24 h erreichte die Kombinationsgruppe ($1,13 \pm 0,12$ %) eine signifikante Erhöhung mit einer über zweifachen IL-6-Expression gegenüber ihrer Vergleichsgruppe ($0,59 \pm 0,07$ %, $n=6$; $p<0,05$).

3.3.3 Leukozyten

Leukozyten stellen eine weite pleotrope Gruppe an Zellen dar, die zügig mediatorvermittelt an Orte ablaufender Entzündungsprozesse migrieren, um sich an diesen in vielschichtigster und verschiedenster Weise an den Entzündungsreaktionen zu beteiligen. Die Höhe des Anstieg der Leukozytenzahl im Blut spiegelt daher das Ausmaß einer Entzündung wider und diente hier der Beurteilung des Leberzellschadens. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikant unterschiedliche Leukozytenzahl in beiden Untersuchungsgruppen.

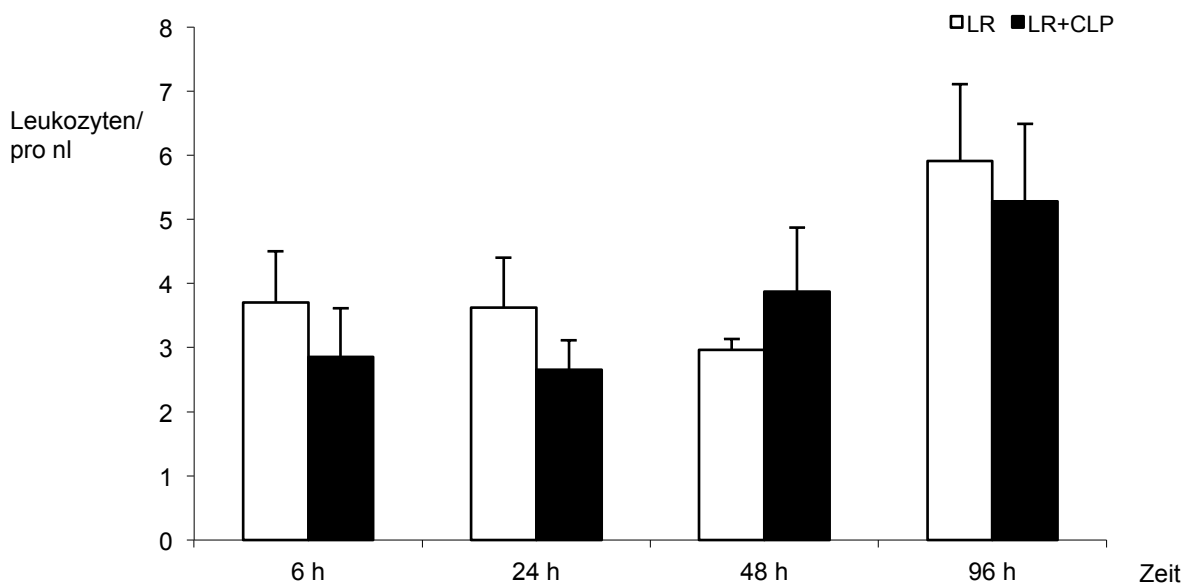


Abbildung 11 Leukozytenzahl

Die Leukozytenzahl stieg langsam an, war jedoch zu keinem Zeitpunkt von statistischer Signifikanz.

3.3.4 MPO

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein in neutrophilen Granulozyten vorkommendes Enzym und beteiligt sich an verschiedenen Immunprozessen. Da die Konzentration an MPO in einem Gewebe mit dem jeweiligen Entzündungsgrad korreliert, dient deren Bestimmung zur Quantifizierung der ablaufenden Entzündung in einem Gewebe.

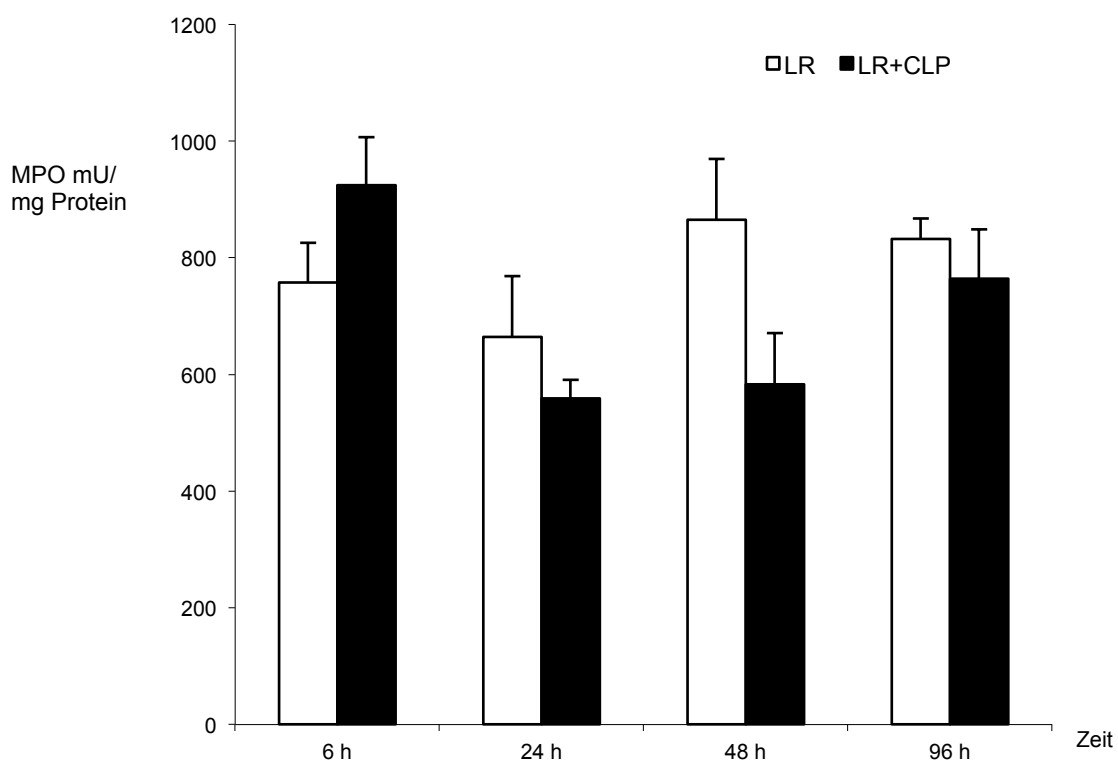


Abbildung 12 Myeloperoxidase

Über den gesamten Zeitraum waren keine signifikanten Unterschiede in der MPO-Aktivität für beide Gruppen nachweisbar.

Über den gesamten gemessenen Zeitraum ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen nachweisen.

4. Diskussion

4.1 Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine bakterielle Infektion die Leberregeneration bei Ratten beeinflusst. Dass bakterielle Infektionen die Leberfunktion negativ beeinträchtigen, ist bekannt.⁴⁰⁻⁴² In welchem Maße nach Leberresektion die Leberregeneration durch eine Infektion beeinflusst wird, ist nicht untersucht.

Hierzu wurden Ratten in zwei verschiedene Versuchsgruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde einer alleinigen Leberresektion unterzogen, die zweite Gruppe erhielt die Kombination aus Leberresektion und Coekaler Ligatur mit Coekalpunktion. Beide Gruppen wurden zu insgesamt sieben verschiedenen Zeitpunkten nach Erstoperation einer Zweitoperation unterzogen, bei der eine Blutentnahme erfolgte, das Lebergesamtwicht bestimmt wurde und Lebergewebeproben gewonnen wurden.

Anhand verschiedener Parameter wurden die Leberregeneration, die Leberfunktion und die Leberschädigung gemessen und miteinander verglichen.

Die Leberregenerationskapazität wurde anhand verschiedener Marker der Zellproliferation bewertet, hierzu gehören die Bestimmungen von Ki-67, BrdU, der Mitoserate sowie des Lebergewichts.

Hierbei zeigte sich, dass die maximale Hepatozytenproliferation, gemessen an Ki-67, BrdU und an der Mitoserate, in der Gruppe der simultan gesetzten Infektion im Gegensatz zur alleinig leberresezierten Gruppe um 24 h verspätet erreicht wurde.

Ein signifikant höheres Lebergewicht erreichte die Kombinationsgruppe nach 96 h.

Die Kombinationsgruppe wies zum Zeitpunkt ihrer maximalen Hepatozytenproliferation nach 48 h signifikant niedrigere Syntheseparameter auf, gemessen an der Serumalbuminkonzentration, sowie eine verminderte Detoxifikationsrate, gemessen an signifikant erhöhten Bilirubinkonzentrationen.

Als Zeichen der Entzündung diente stellvertretend die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α im Lebergewebe, die via PCR bestimmt

Diskussion

wurden. Sowohl TNF- α als auch IL-6 waren in der Kombinationsgruppe nach 24 h maximal im Vergleich zur Gruppe der alleinigen Leberresektion.

Ferner wurden die Leukozytenzahl und die Myeloperoxidase gemessen. Diese zeigten in beiden Gruppen zu allen Messzeiten keine relevanten Unterschiede.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Experimentelle Modelle zur Untersuchung der Sepsis im Tiermodell

Zur experimentellen Untersuchung einer Sepsis existieren viele verschiedene Modelle.

Lipopolysaccharid Applikation

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der Wand gramnegativer Bakterien und spielt eine wichtige Rolle in der Initiierung einer gramnegativen Sepsis. Die intravenöse oder peritoneale Verabreichung von LPS als Bolus oder kontinuierlich mittels Pumpensystemen zur Infektionssimulation ist sehr verbreitet und leicht in der Ausführung. Untersuchungen zeigen, dass experimentell durch Endotoxin ausgelöste Infektionen nicht die Mannigfaltigkeit an metabolischen oder Kreislaufveränderungen wiedergeben können.⁴⁶

Intraperitoneale Injektion von Bakterien

Durch eine intraperitoneale Injektion von Bakterien können Untersuchungen zur Wirtantwort auf ein Pathogen angestellt werden. Da es aber nach Injektion selbst hoher Dosen von Bakterien zu einer raschen Lyse der Bakterien kommt, wird keine relevante Infektionsreaktion ausgelöst. Eine messbare inflammatorische Reaktion wird nicht ausgelöst.⁴⁸

Colon ascendens Stent Peritonitis

Bei der Colon ascendens Stent Peritonitis (CASP) wird nach Laparatomie in das Colon ascendens nach Inzision ein Stent eingesetzt, durch welchen Fäzes in die Peritonealhöhle gelangt. In Studien wurde gezeigt, dass durch diese Methode im Vergleich zur CLP eine schwerere systemische Reaktion mit diffuser Peritonitis ausgelöst wird, welche im Versuch mehr Todesfälle mit sich bringt.⁴⁶

Coekale Ligatur und Punktion

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Modell der Coekalen Ligatur und Punktion wurde erstmals 1968 von Clowes et al. an Hunden angewandt.⁴⁵ Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Sepsis auf das respiratorische System wurde damals die Coekale Ligatur angewandt. Dabei wird eine definierte Länge des Coekums ligiert und punktiert. Hierdurch wird eine kontinuierliche Abgabe von gramnegativen, endogenen Darmbakterien gewährleistet, welche zur Ausbildung einer Peritonitis führt. Durch die dauerhafte Abgabe wird ein persistierender Infektfokus erzeugt. Im Vergleich zu anderen Modellen werden durch diese Durchführung ein Zytokinmuster exprimiert und Kreislaufveränderungen induziert, die dem klinischen Bild einer Sepsis deutlich näher kommen als andere Vergleichsmodelle.⁴⁶ Durch die CLP wird im Vergleich zu anderen Modellen der Sepsis eine mildere Form der Infektion ausgelöst.⁴⁹ In Abhängigkeit der ligierten Coekumlänge, vom Kanüldurchmesser sowie von der Anzahl der Punktionen variiert die Mortalitätsrate.⁵⁰ Die in dieser Arbeit angewandte Kombination aus ligierter Darmlänge, Kanüldurchmesser und einmaliger Punktion erfüllt die für den Versuch erforderlichen Bedingungen an Infektionsschwere und Überlebensrate der Versuchstiere. Eine wie in Studien beschriebene starke Einschränkung bis Hemmung der Regeneration durch fulminante Sepsisverläufe nach z. B. zweifacher coekaler Punktion war nicht erwünscht.⁴²

4.2.2 Modelle zur Untersuchung der Leberzellregeneration

Zur experimentellen Untersuchung der Leberregeneration existieren eine Vielzahl an Modellen, bei welchen durch einen äußeren Reiz eine Zellproliferation ausgelöst wird.

Diskussion

Unterschieden wird zwischen chirurgischen, direkt mitogen induzierten und pharmakologischen Modellen sowie den Modellen bei Vorschädigung der Leber.

Chirurgische Modelle

Partielle Leberresektion:

Experimentell erstmals nachgewiesen wurde die Regenerationsfähigkeit der Leber durch das 2/3-Leberresektion-Modell an Ratten von Higgins und Anderson 1931.⁴³ Es wurde gezeigt, dass sich nach einer 2/3-Leberresektion die Restleber nach 5 bis 7 Tagen wieder bis zur Ausgangsgröße vergrößerte. Dieses Modell hat in der Vergangenheit breite Akzeptanz und Beliebtheit gefunden. Es werden hierzu nach Mobilisierung und Ligatur des entsprechenden Gefäßstamms der mittlere und linke Leberlappen entfernt.

Ligatur eines Portalvenenastes:

Ein anderes Regenerationsmodell ist das der Ligatur eines Portalvenenastes, durch das eine Atrophie des ligierten Leberlappens und eine kompensatorische Volumenvergrößerung der Restleber angestrebt wird. Nachteilig ist die eingeschränkte Reproduzierbarkeit aufgrund einer nicht immer verlässlich einsetzenden Atrophie des ligierten Leberabschnittes und des unbeständigen Ausmaßes der kompensatorischen Hypertrophie. Es stellt ebenso wie die partielle Hepatektomie ein einfaches Modell dar, das im Gegensatz zu diesem aber reversibel ist und welches durch Optimierung der Operationstechnik, bei besonderer Schonung der nervalen und arteriellen Strukturen, seine eingeschränkte Reproduzierbarkeit erhöhen kann. Es eignet sich insbesondere für Fragestellungen, die sich mit der Untersuchung des Einflusses von portalem Blut auf die Leberregeneration befassen.⁵¹

Direkte mitogen induzierte Hyperplasie

Bei der direkten Hyperplasie wird eine DNA-Replikation in den Hepatozyten ohne vorausgegangenen Zelluntergang erreicht. Zur Einleitung dieser Hyperplasie wird

Diskussion

experimentell keine Aktivierung der für die kompensatorische Regeneration wichtigen Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- κ B), Protoonkogenen oder Wachstumsfaktoren (z. B. TNF- α) beobachtet. Jedoch benötigen die Hepatozyten zur Hyperplasie auch einen Auslöser. Hier konnten mit der Zeit eine Reihe an chemischen Stimuli, Mitogene, identifiziert werden. Diese stammen teilweise aus chemisch gänzlich unterschiedlichen Substanzgruppen ab: z. B. Bleinitrat, Ethylendibromid, 9-cis-Retinolsäure, Trijodthyronin. Aktuell werden in der Literatur zwei verschiedene Mechanismen der Hyperplasiestimulation favorisiert: einerseits die direkte Aktivierung von nukleären Rezeptoren, andererseits die Aktivierung von Nicht-Parenchymzellen, die eine Hyperplasie indirekt induzieren. Nach einer einmaligen Applikation durch die genannten Mitogene konnte nach 48 bis 72 Stunden eine verstärkte Proliferation der Hepatozyten mit DNA-Replikation nachgewiesen werden. Nach Entzug des Mitogens wird allerdings schnell wieder eine Apoptose des hyperplastischen Gewebes beobachtet, sodass am Ende wieder die Ursprungsgröße des Lebergewebes erreicht ist.⁵²

Pharmakologisch-toxische Modelle

Das Prinzip der pharmakologischen Modelle liegt in einer Parenchymschädigung, der eine Leberregeneration folgt. Die Gewebeschädigung wird durch verschiedene Toxine, wie z. B. Chlorkohlenwasserstoff, Ethanol und D-Galactosamin, Thioacetamid und Acetaminophen, verursacht. Im Gegensatz zu den chirurgischen Modellen sind diese einfacher durchzuführen und von größerer klinischer Relevanz durch bessere Simulierung verschiedener Lebererkrankungen. Es können je nach Toxin zentrilobuläre oder periportale Leberschäden ausgelöst werden.⁵¹

Diese Modelle weisen allerdings eine deutlich geringere Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit auf, da das Ausmaß der Leberschädigung und Leberregeneration stark variiert. Die systemische Wirkung der eingesetzten Pharmaka und ihre direkte Wechselwirkung mit den zellulären und molekularen Mechanismen der Leberregeneration sowie die erschwerte Unterscheidung zwischen den molekularen Veränderungen, die auf der Leberschädigung beruhen, und solchen, die der Leberreparatur zugeordnet werden können, kann ebenfalls problematisch sein.^{51, 53}

Modelle bei vorgeschädigter Leber

Zu den Leberregenerationsmodellen bei vorgeschädigter Leber gehören das Leberzirrhose-, das Cholestase-Modell und Modelle mit Tieren, die einen angeborenen Leberdefekt aufweisen. Die Modelle der Leberzirrhose werden unterteilt in das die Zirrhose bedingende Agens: toxisch, ernährungsbedingt durch eine fettreiche und proteinarme Diät, immunologisch, biliär durch eine Gallengangsligatur oder alkoholtoxisch. Das Cholestasemodell wird in der Regel durch eine Gallengangsligatur provoziert. Zur Untersuchung der Leberregeneration dienen auch Tiere, die einen hereditären Leberdefekt aufweisen, wie beispielsweise die Gunn-Ratten mit angeborenem Crigler-Najjar-Typ I oder Ratten mit Dubin-Johnson-Syndrom, die Nagase Analbuminämie Ratten oder die Watanabe Hasen mit angeborener Hyperlipidämie⁵¹.

In dieser Arbeit wurde zur Stimulation der Leberregeneration die 70 % Resektion nach Higgins und Anderson⁴³ angewandt. Vorteile liegen in der chirurgisch gesehen relativ einfachen Ausführbarkeit dieser Technik, in der durch die einheitliche Leberanatomie bedingten nahezu präzise gleichen Volumenresektion von ca. 70 % der Lebermasse und in der guten Reproduzierbarkeit. Zusätzlich geht die 70 % Resektion mit einer geringeren Mortalitätsrate einher, bei gleichzeitiger Auslösung eines hinreichenden Regenerationsreizes. Außerdem befinden sich zum Zeitpunkt der Regenerationsauslösung nahezu alle Hepatozyten in der G₀-Phase.

Eine Leberresektion eines geringeren Volumens vermag einen nicht ausreichenden Stimulus für die Regeneration auszulösen, eine ausgedehntere Leberresektion wie die 90 % Resektion führt zu einer erhöhten postoperativen Komplikationsrate mit akutem Leberversagen und konsekutiver Enzephalopathie und Koagulopathie.⁵¹

Bei regelrechter Ausführung dieser Methodik wird erreicht, dass der verbliebene Leberrest nicht direkt den Einflüssen einer Infektion ausgesetzt ist.

4.3 Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

4.3.1 Leberregeneration

Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass die Leberregeneration durch eine gleichzeitig ablaufende Infektion beeinflusst wird.⁴²

Allgemein ist die postoperative Mortalität nach großen leberchirurgischen Eingriffen und nachfolgenden septischen Episoden stark erhöht. Als Hauptursachen für die Infektion wird eine intraabdominelle Abszedierung oder eine Sepsis mit intraabdominellem Fokus angesehen. Die Sepsis beeinflusst die Regenerationsfähigkeit, während eine gestörte Leberfunktion ihrerseits wieder eine erhöhte Infektanfälligkeit bedingt.⁵⁴

Eine histologische Einteilung des Leberversagens nach Leberresektion erfolgt nach der Literatur in zwei Gruppen: in der cholestatischen und in der nicht-regenerativen Form. Die nicht-regenerative Variante zeigt eine erhöhte Apoptoserate von Hepatozyten mit starker Hyperbilirubinämie. Diese wird vor allem in der Transplantationschirurgie bei ischämischen Reperfusionstörungen beobachtet. Die cholestatischen Verläufe charakterisieren sich durch eine Regeneration der Hepatozyten mit einhergehender Fibrose des Disse'schen Raums. Cholestatische Verläufe finden sich gehäuft nach erweiterten Lebereingriffen und postoperativer Infektion.⁵⁵ In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die *in vivo* Leberregeneration nach Leberteilektomie und CLP anhand verschiedener Proliferationsmarker untersucht.

Die Wachstumsfraktion der Hepatozyten wurde mittels der Bestimmung von Ki-67 bestimmt.

Zusammenfassend ließ sich anhand der Ki-67-Bestimmung für die Gruppe der LR+CLP ein um 24 h verzögerter Regenerationseintritt nachweisen, mit einem größeren Anteil an proliferierenden Hepatozyten.

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Wachstumsfraktion der Hepatozyten erfolgte durch die Bestimmung des Mitoseindex nach H. E.-Färbung. Diese diente zur genaueren Differenzierung der Hepatozyten, die sich in aktiver Zellteilung befinden.

Diskussion

Auch hier fand sich erst nach 48 h eine maximale Mitoserate in der Gruppe der LR+CLP.

Zur Bestimmung der Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, diente die BrdU-Immunhistologie. Es wurden Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen untersucht. In der Untersuchung der Hepatozyten zeigte sich ein deutlicher Anstieg nach 24 h, welcher sowohl für die LR als auch für die LR+CLP maximal war. Die Nicht-Parenchymzellen zeigten einen um 24 h verzögerten Eintritt in den Zellzyklus.

In allen Versuchen zur Verlaufsbeobachtung der Zellregeneration zeigte sich ein nennenswerter Anstieg erst nach 24 h. Zellen nach LR+CLP – unabhängig, ob Hepatozyten oder nichtparenchymatöse Zellen - zeigten einen um 24 h verzögerten Verlauf. Die LR+CLP-Gruppe tritt nach Ki-67-Bestimmung verspätet in die aktive Zellphase über, hier allerdings in deutlich größerem Maße als die LR-Gruppe. Diese Zellen scheinen sich allerdings hinsichtlich des mangelnden Nachweises an mitotischen Zellen nicht im erhöhtem Maße zu teilen. Vielmehr findet sich diese Population in dem Anteil von Zellen wieder, die lange nach den LR-Hepatozyten noch in der S-Phase verharren.

Zusammenfassend bieten diese Ergebnisse auf zellulärer Ebene einen Hinweis auf eine verminderte Regenerationskapazität nach LR+CLP.

Ein wesentlicher Anteil an diesem Verhalten wird mit der Wirkung der proinflammatorischen Zytokine verbunden sein. In der Literatur zeigte sich, dass IL-6 die Regeneration einzuleiten vermag; ein Überschuss scheint allerdings den gegenteiligen Effekt zu haben.⁵⁶

Auch TNF- α ist als Wachstumsfaktor in der Initialphase der Regeneration essenziell.¹⁸ Es hat allerdings auch proapoptotische Wirkungen, welche in der Initialphase jedoch durch antiapoptotische Stimuli, z. B. NF- κ B-Aktivierung, gehemmt werden.²⁵ Eine überschießende TNF- α -Aktivierung könnte jedoch diesen Schutz überwinden und die Proliferation im Verlauf hemmen.

Viele Arbeiten in der Literatur befassten sich mit Teilaspekten einer bakteriellen Infektion und deren Einfluss auf die Leberregeneration. *Cornell et.al*⁵⁷ untersuchten in einer Arbeit aus den 90er Jahren den Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS). LPS ist ein Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Erreger, die zu einem Großteil in der

Diskussion

Darmflora zu finden sind. Die Gruppe applizierte bestimmte Mengen an LPS 24 h vor geplanter Hepatektomie. Die isolierte Applikation von LPS setzt sicherlich nur eine Infektion geringeren Ausmaßes in Gang im Vergleich zu durch gramnegative Erreger ausgelösten Infektionen, dennoch waren diese Ergebnisse bereits hinweisend. Die Leberregeneration wurde hier anhand des ^3H -Thymidin-Einbaus in die DNA kontrolliert. Es wurden drei Gruppen untersucht: zum einen durch orale, nichtresorbierbare Antibiotika darmsterilisierte Mäuse, athymische Mäuse sowie LPS-resistente Mäusestämme. Es zeigte sich, dass die Leberregeneration stark unterdrückt war in der Gruppe der darmsterilisierten und der athymischen Mäuse. Die Regeneration bei den LPS-resistenten Mäusen war deutlich verzögert. Weiterhin zeigte sich, dass durch LPS-Präkonditionierung bis zu einer Endotoxindosis von 100 ng/g vor Hepatektomie die Leberregeneration proportional gesteigert wurde. Dosissteigerungen über 100 ng/g führten zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Regeneration bis hin zu einer Hemmung gemessen am ^3H -Thymidineinbau in die DNA.

Ebenso wie die in der Arbeit von *Cornell et al.* beschriebene Negativbeeinflussung von LPS in hohen Einzeldosen auf die Leberregeneration zeigte sich ein ähnlicher Effekt auch in unserer Arbeit nach CLP. Anders als in der Arbeit von Cornell wurden in der vorliegenden Arbeit durch die CLP eine kontinuierliche Abgabe von Bakterien und damit in der Summe vermutlich auch höhere Spiegel von LPS in den Versuchstieren erreicht.

Weiss et al.⁴² zeigten in einer Arbeit zur kompensatorischen Leberregeneration, dass nach CLP- versus zweifach CLP-induzierter Sepsis eine verminderte Regeneration nach zweifacher CLP auftritt.

Die Untersucher beschrieben eine erhöhte Zellnekrose sowie einen schwereren klinischen Sepsisverlauf zusammen mit einer erhöhten Mortalitätsrate bei 2CLP. Die vorliegende Arbeit untersucht im Unterschied zu *Weiss et al.* die Regeneration nach Leberteileresektion. Es wird beschrieben, dass nach CLP eine milde Sepsisinduktion zustande kommt. Anhand der BrdU-Aufnahme ließ sich in der CLP-Gruppe eine stärkere Regeneration nachweisen als in der 2CLP-Gruppe. Da die Regeneration nach initialer Nekrose stattfand, wurde postuliert, dass dies als ein kompensatorischer Prozess anzusehen sei.

Auch in der vorliegenden Arbeit kann nach Kriterien der Arbeit von *Weiss et al.* von der Induktion einer milden Sepsis gesprochen werden. Wir verwendeten 22-G-Kanülen zur

Diskussion

CLP im Vergleich zu 18 G. Der wesentliche Unterschied liegt in der Methodik, da wir eine 2/3 Leberresektion vornahmen.

Bisher kam nur eine *in vivo* Untersuchung von *Yoshimoto et. al.*⁵⁸ der vorliegenden Arbeit methodisch am nächsten. Hier wurde Ratten nach 90%iger Hepatektomie täglich LPS verabreicht und diese wurden im Vergleich zu Kontrollgruppen untersucht. Auch hier zeigte sich nach LPS-Gabe eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die LPS-Gruppe zeigte ferner eine höhere Apoptoserate der Hepatozyten sowie eine geringere Regenerationsrate. Es zeigte sich ferner eine verstärkte perisinusoidale Fibrose. Dies entspricht den histologischen Kriterien der cholestatischen Form des Leberversagens nach Teilresektion.⁵⁵ Wurde der LPS-Gruppe zusätzlich ein Antikörper gegen einen wichtigen Inhibitionsfaktor der Regeneration, TGF- β , verabreicht, war die Regenerationsfähigkeit kaum eingeschränkt.

Diese Ergebnisse gehen mit denen aus der vorliegenden Arbeit einher. Es zeigte sich sowohl in unserer Arbeit nach LR+CLP sowie auch nach täglicher LPS-Applikation stellvertretend für eine gramnegative Sepsis anderer Arbeiten eine deutlich verringerte Regeneration des verbliebenen Lebergewebes.

Als abschließendes Maß wurde in der vorliegenden Arbeit das relative Lebergewicht zu allen Untersuchungszeitpunkten gemessen und zwischen den Gruppen verglichen. Es zeigte sich im Verlauf in beiden Gruppen eine relevante Gewichtszunahme. Jedoch während nach 24 h die LR-Gruppe ein signifikant höheres Gewicht aufwies, zeigten sich im Verlauf die Massen kaum unterschiedlich, bis nach 96 h die LR-CLP-Gruppe ein signifikant höheres relatives Lebergewicht aufwies. Dies scheint zunächst hinsichtlich der geringeren Regenerationsfähigkeit der LR+CLP-Gruppe ein diskrepantes Ergebnis darzustellen. Nachweislich stellt die LR+CLP-Gruppe nur einen geringen Anteil an mitotischen Zellen dar. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass dieses Phänomen auf kompensatorischer Zunahme der Zellvolumina basiert: Die Leber verfügt über verschiedene Kompensationsmechanismen zur Regeneration der Lebermasse. *Nagy et al.*⁵⁹ zeigten, dass eine Wiederherstellung der Lebermasse auch bei fehlender DNA-Synthese durch zelluläre Hypertrophie der periportalen Hepatozyten stattfindet. In dieser Arbeit erreichte die Restleber nach Leberteilektomie trotz Hemmung der Proliferation der Hepatozyten und Aktivierung der Sternzellen durch Dexamethason

oder durch Mitoseblockade mittels 5-FU nahezu ein gleiches Leberwachstum wie die Kontrollgruppe.

Auch dies kann in der vorliegenden Studie beobachtet werden; ein Großteil der LR+CLP-Zellen verbleibt scheinbar in den aktiven Zellzyklusphasen, ohne die Mitose zu durchlaufen. Neben einer Zellzahlzunahme im Sinne der kompensatorischen Hypertrophie erfolgte eine Volumenzunahme durch kompensatorischer Zellhypertrophie.

4.3.2 Leberdysfunktion

Zur Beurteilung der Leberfunktion im Verhältnis zur Leberregeneration wurden in der vorliegenden Arbeit Albumin und Bilirubin in beiden Gruppen bestimmt. Die Bilirubinkonzentrationen waren in der LR+CLP-Gruppe nach 24 h und 48 h signifikant erhöht.

In *ex vivo* Versuchen wurden nach LPS-Applikation die Leber auf ihre Fähigkeit zur Bilirubinclearance untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die biliäre Clearance stark eingeschränkt war.⁶⁰

Diese Ergebnisse passen zur klinisch häufig beobachteten endotoxinvermittelten Cholestase bei septischen Verläufen während Intensivaufenthalten. Als Ursache hierfür werden Störungen verschiedener hepatozellulärer Transporter für Bilirubin und Gallensäure mit konsekutivem Bilirubinanstieg angesehen. Es kommt zu einer Beeinträchtigung der kanalikulären Exportpumpen, MRP-2, für Bilirubin.⁶¹

In der vorliegenden Arbeit war zu allen Zeitpunkten die Albuminsyntheserate nach LR+CLP erniedrigt, nach 48 h und 96 h im Vergleich zur LR-Gruppe sogar signifikant.

Hypoalbuminämie wird häufig im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion in *in vivo* Tierversuchen beobachtet. Als Ursache hierfür werden die Verschiebung der Proteinsynthese zugunsten von Akute-Phase-Proteinen betrachtet als auch eine pathologisch erhöhte Gefäßpermeabilität mit konsekutivem Albuminverlust.⁶²

4.3.3 Inflammation

In der vorliegenden Arbeit erfolgte auch der Nachweis von proinflammatorischen Zytokinen im Zusammenhang mit der Entzündungsreaktion. IL-6 steht wohl wie kaum ein anderes Zytokin im Mittelpunkt einer akuten Inflammationsreaktion. Es nimmt rezeptorvermittelt Einfluss auf Immunantworten, indem es z. B. B- sowie T-Lymphozyten stimuliert sowie die Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen fördert. Es hat aber auch Wirkung auf viele andere Gewebe. Auch in der Leber spielt es eine physiologische Rolle als Induktor der Synthese von Akuten-Phase-Proteinen und des Primings der kompensatorischen Leberregeneration.⁶³ Proinflammatorische Zytokine scheinen in der Leberregeneration eine wichtige Rolle zu spielen. Wahrscheinlich bieten sie den Anreiz zur Hepatozytenproliferation über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren NF- κ B sowie STAT3. Ferner zeigt IL-6 eine antiapoptotische Wirkung auf Hepatozyten.⁵⁶ Als potenzielle Ursprungsorte der Zytokine werden die Kupffer-Zellen, aber auch der Darm diskutiert.⁶⁴ *Cressmann et al.*²³ zeigten die essenzielle Rolle von IL-6 in der Regeneration von Lebergewebe auf. IL-6-defiziente Mäuse waren nach Leberresektion im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe nicht in der Lage, STAT3 an die DNA der Hepatozyten zu binden. Die DNA-Synthese war in diesen Zellen vermindert, während Nicht-Parenchymzellen unverändert DNA synthetisierten. IL-6-defiziente Lebern waren massiv nekrotisch untergegangen. Es wurde daraufhin postuliert, dass IL-6 einen wichtigen Initiator der Regeneration darstellt, da die Verabreichung von IL-6 an defiziente Mäuse die Regeneration wieder befähigte. Neuere Studien belegen ferner auch eine Relevanz von IL-6 in der Spätphase der Regeneration. In Lebergewebe, das sich in Regeneration befand, konnte noch nach zehn Tagen über PCR eine vermehrte IL-6-Expression nachgewiesen werden.⁶⁵ Andere Untersuchungen konnten in Abhängigkeit von der Dauer der IL-6-Applikation auch einen nachteiligen Effekt nachweisen. So konnte eine Arbeit *in vivo* zeigen, dass die kurzzeitige Applikation von IL-6 für 48 h und eine anschließende Leberteilresektion zu einer schnelleren sowie stärkeren Zunahme des relativen Lebergewichtes in Mäusen führte. Wurden die Tiere allerdings länger mit IL-6 vorbehandelt, so war eine verstärkte Apoptoserate zu beobachten. Die Tiere hatten ferner eine drastisch gesteigerte Mortalität. Während eine Kurzzeitapplikation einen protektiven Effekt über die

Diskussion

Hochregulation verschiedener antiapoptotischer Proteine bewirkt, werden nach längerer Gabe wahrscheinlich mitochondriale proapoptotische Faktoren vermehrt sezerniert, sodass im späteren Verlauf der proapoptotische Effekt überwiegt.⁵⁶

Der beobachtete verzögerte Regenerationseintritt der Leber im vorliegenden Sepsismodell wird am ehesten über eine vermehrte IL-6-Präsenz erklärbar sein. Es ist bekannt, dass Kupffer-Zellen in der Frühphase der Sepsis vermehrt IL-6 sezernieren.⁶⁶

In unserem Modell ist anhand mRNA Nachweis zu jedem Zeitpunkt eine IL-6-Expression im Lebergewebe messbar, allerdings zeigt sich nach 24 h ein signifikanter Anstieg in der LR+CLP-Gruppe. Dies repräsentiert einerseits den größeren Gewebeschaden in der Gruppe und wird ein Faktor sein, der zur Verzögerung des Regenerationseintritts beiträgt. Ferner wird IL-6 im Rahmen der septischen Infektion im relevanten Anteil auch durch das Immunsystem sezerniert. Zum Beispiel vermitteln aktivierte Makrophagen via IL-6-Lymphozyten.⁶⁷ Dieses IL-6 wird im Rahmen der Blutzirkulation auch einen Einfluss auf das Leberparenchym haben. Dieser systemische IL-6-Anteil wird eine relevante Rolle spielen. Der Blutspiegel an IL-6 wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht bestimmt, aber es ist bekannt, dass während einer bakteriellen Sepsis erhöhte IL-6-Serumspiegel nachweisbar sind.⁶⁸

Unsere Ergebnisse sind hinweisend, dass der in anderen Arbeiten beschriebene proapoptotische Effekt von IL-6 ein relevanter Faktor in der Beeinträchtigung der Regeneration ist.

Analog zu dem Verlauf von IL-6 ist die mRNA-Expression von TNF- α . Auch hier ist ein signifikantes Maximum der LR+CLP-Gruppe nach 24 h dokumentiert. Auch TNF- α spielt eine wichtige Rolle in der Initiierung der Leberregeneration. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass TNF- α zu einer Beeinträchtigung der Leberregeneration führt.

In einem LPS-Sepsismodell wurde Mäusen 24 h vor Leberresektion intraperitoneal LPS verabreicht. Nach Leberresektion wurden TNF- α , TGF- β und Plasmakallikrein-Aktivität bestimmt. Insgesamt ließ sich ein verringertes Leberregenerationsvermögen nachweisen. Als Pathomechanismus wurde postuliert, dass LPS durch Kupfferzellaktivierung die vermehrte Sezernierung von TNF- α begünstigt. Dies wiederum bewirkte eine gesteigerten Plasmakallikrein-Aktivität auf der Oberfläche der

Diskussion

Kupffer-Zellen, welche ihrerseits zu einer Aktivierung latenter TGF- β führt.⁶⁹ TGF- β hat einen inhibierenden Effekt auf die Leberregeneration.

Unter bestimmten Umständen vermag also auch TNF- α die Hemmung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie durch Induktion von TGF- β zu bewirken. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird dieser Mechanismus wahrscheinlich neben der IL-6 vermittelten Suppression in der Regenerationsverzögerung eine wichtige Rolle spielen.

Es könnte sicher im Rahmen weiterer Experimente von Interesse sein, die Expression von TGF- β zu bestimmen. Ferner könnte auch von Relevanz sein, auf zellulärer Ebene die Apoptoserate der Hepatozyten zu quantifizieren.

Es erfolgte auch die Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) im Lebergewebe zur Bestimmung des Ausmaßes der Infiltration durch neutrophile Granulozyten. Die Myeloperoxidase ist ein in neutrophilen Granulozyten vorkommendes Enzym. Die Konzentration an MPO korreliert mit dem Entzündungsgrad. Zu allen Zeitpunkten konnte in beiden Gruppen ein etwa gleichbleibend hoher Anteil des Enzymes nachgewiesen werden.

Untersuchungen ergaben, dass eine alleinige LPS-Applikation im Sinne einer systemischen Endotoxinämie bei Mäusen nach 6 h die MPO-Aktivität in verschiedenen Geweben zu steigern vermag. Nachgewiesen wurde dieser Effekt in Ileum-, Lungen- sowie Nierengewebe. Im Leberparenchym ließ sich hierbei kein signifikanter Anstieg der MPO-Konzentration nachweisen.⁷⁰

Allerdings ist durch Untersuchungen von Ischämie-Reperfusionsschäden der Leber bekannt, dass durch Kupferzellaktivierung proinflammatorische Zytokine sezerniert werden; besonders sind in diesem Zusammenhang IL-12 sowie TNF- α zu nennen. Letzteres vermag Chemokine und Chemotaxine zu sezernieren, die eine Neutrophileninvasion zur Folge haben. Dies tritt allerdings erst in einer Spätphase der Inflammation auf.⁷¹ Dies entspricht unseren Untersuchungen.

Ferner ist die Leukozytenzahl im Vergleich LR zu LR+CLP zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert.⁷²

Diskussion

Es gibt zusammenfassend starke Hinweise darauf, dass die MPO-Expression im Lebergewebe auf Neutrophileninvasion zurückzuführen ist und als allgemeine Antwort auf den Regenerationsreiz zu werten ist und sich nicht durch die gleichzeitige Infektion beeinflussen lässt.

Als eine alternative Quelle der MPO wären die Kupffer-Zellen als ortsständige Lebermakrophagen denkbar. Hierzu ist die Datenlage derzeit allerdings kontrovers:

2001 gelang *Brown et al.* der Nachweis von Myeloperoxidasesekretion in Kupffer-Zellen.⁷³ Während eine aktuelle Studie von 2011 immunohistochemisch sowie auf RNA-Ebene Lebergewebe analysierte und dies nicht bestätigen konnte.⁷²

Untersucht wurde hier gesundes Gewebe im Vergleich zu Lebergewebe, das chemisch oder durch Bestrahlung akut geschädigt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass MPO nur in elastase-positiven neutrophilen Granulozyten nachweisbar war. Parenchymzellen, Nichtparenchymzellen sowie mononukleäre Zellen exprimieren demnach kein MPO.

5. Zusammenfassung

Bisherige Untersuchungen konnten eine Beeinflussung einer Infektion auf die Leberregeneration beobachten. Es fehlte jedoch bislang eine systematische Untersuchung der Beeinflussung der Leberregeneration nach Resektion durch eine simultane Infektion.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer enterogenen intraabdominellen Infektion auf die Leberregeneration *in vivo* untersucht werden.

Hierzu wurde ein Modell an Ratten verwendet, welches die Kombination aus einem etablierten Regenerationsmodell, der 70 % Leberteileresektion, und einem bekannten Sepsismodell, der Coekalen Ligatur und Punktion, darstellte.

Im Anschluss wurden postoperativ zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Parameter zur Beurteilung der Leberregeneration, der Leberfunktion und des Leberzellschadens bestimmt.

Die Regenerationsaktivität wird bei der Gruppe der simultan gesetzten Infektion im Vergleich zur alleinig leberresezierten Gruppe um 24 h verzögert und weist nach 48 h die signifikant maximale Anzahl an proliferierenden Hepatozyten auf, gemessen an Ki-67. Insgesamt treten weniger Zellen aus der Gruppe der Leberresektion mit simultaner CLP in die Mitose ein und es finden sich zum Zeitpunkt des ersten relevanten Regenerationsbeginns nach 24 h im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Hepatozyten in der S-Phase des Zellzyklus. Zu späteren Zeitpunkten nach 48 h und 96 h waren es jedoch signifikant mehr als in der Vergleichsgruppe. Die Gruppe der kombinierten Leberresektion mit CLP erreichte letztendlich nach 96 h ein signifikant höheres Lebergewicht. Neben der üblichen kompensatorischen Hypertrophie wird dies in der Kombinationsgruppe wohl am ehesten durch eine Zellhypertrophie erreicht. Die Leberregeneration ist, zusammenfassend gesagt, auf zellulärer Ebene bei gleichzeitig ablaufender Infektion verzögert und insgesamt durch eine signifikant verminderte Zellteilung der Hepatozyten charakterisiert. Nicht-Parenchymzellen weisen ein ähnliches Bild auf, allerdings in beiden Gruppen um 24 h verzögert.

Zusammenfassung

Die Kombinationsgruppe zeigte in der Spätphase der Regeneration eine signifikant verminderte Albuminsynthese sowie nach 24 h und 48 h signifikant erhöhte Bilirubinkonzentrationen. Dies entspricht einer geminderten Funktionsleistung der regenerierenden Leber bei Infektion.

Der Leberzellschaden wurde durch die Bestimmung der Zytokine TNF- α und IL-6 sowie durch die Messung der Leukozytenzahl und der Myeloperoxidaseaktivität bemessen. In beiden Gruppen lassen sich zu allen Zeitpunkten eine nahezu gleiche Invasion an MPO-positiven neutrophilen Granulozyten nachweisen.

TNF- α und IL-6 konnten nach 24 h in der Leberresektionsgruppe mit CLP jeweils einen signifikanten und für jeweils beide Gruppen einen maximalen Anstieg vorweisen. Es ist bekannt, dass sowohl TNF- α als auch IL-6 neben ihrer Funktion als Induktor der Akute-Phase-Reaktion und der Initiierung der Regeneration auch eine inhibierende und sogar proapoptotische Wirkung besitzen. Der beobachtete verspätete Regenerationseintritt der Gruppe der Leberresektion mit CLP wird durch die vermehrte TNF- α und IL-6-Präsenz bedingt sein.

Primär scheinen proinflammatorische Zytokine, die bei gleichzeitig ablaufender Infektion vermehrt nach 24 h auftreten, den Regenerationseintritt zu verzögern und zu supprimieren.

Es konnte im *in vivo* Tiermodell der negative Einfluss einer Infektion auf die Leberregeneration auf zellbiologischer und molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass eine simultane Infektion nach Leberresektion nicht nur einen negativen Effekt bezüglich der Sepsis-assoziierten postoperativen Morbidität und Mortalität hat, sondern über proinflammatorische Zytokine eine verringerte Leberregeneration mit sich bringt.

6. Literatur

1. Despopulos A, Silbernagl S. Color atlas of physiology. 5. ed. Stuttgart u.a.: Thieme; 2003.
2. Gerok W, Andus T. Hepatologie. 2. Aufl. ed. München u.a.: Urban & Schwarzenberg; 1995.
3. Chen MF, Hwang TL, Hung CF. Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography. *Annals of surgery*. 1991; **213**(3): 227-9.
4. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997; **276**(5309): 60-6.
5. Grundmann R, Pichlmaier H. [Hepatic resection for tumors, trauma and Echinococcus]. *Langenbecks Archiv für Chirurgie*. 1983; **359**(3): 181-90.
6. Markus PM, König S, Liersch T, Becker H. Die Leberregeneration. *Der Onkologe*. 2000; **6**: 348-55.
7. Kawasaki S, Makuuchi M, Ishizone S, Matsunami H, Terada M, Kawarazaki H. Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *Lancet*. 1992; **339**(8793): 580-1.
8. Nakagami M, Morimoto T, Itoh K, Arima Y, Yamamoto Y, Ikai I, et al. Patterns of restoration of remnant liver volume after graft harvesting in donors for living related liver transplantation. *Transplant Proc*. 1998; **30**(1): 195-9.
9. Benninghoff A, Fleischhauer K. Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. München: Urban & Schwarzenberg; 1994.
10. Löffler G. Biochemie und Pathobiochemie mit 192 Tabellen ; [+ online specials]. 8., vollst. neu bearb. Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2007.
11. Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 1999; **6**(2): 171-5.
12. Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M. Histologie mit 17 Tabellen ; [neue Approbationsordnung]. 6., neu übers., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2005.
13. W. Gerok HEB. Hepatologie. 2. Aufl. ed. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg; 1995.
14. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006; **43**(2 Suppl 1): S45-53.
15. Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M, Grompe M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am J Pathol*. 1999; **155**(6): 2135-43.
16. Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M, et al. Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc*. 1988; **20**(1 Suppl 1): 494-7.
17. Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*. 1993; **341**(8837): 65-71.

Literatur

18. Tarla MR, Ramalho FS, Ramalho LN, Silva Tde C, Brandao DF, Ferreira J, et al. A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir Bras*. 2006; **21 Suppl 1**: 58-62.
19. Niiya T, Murakami M, Aoki T, Murai N, Shimizu Y, Kusano M. Immediate increase of portal pressure, reflecting sinusoidal shear stress, induced liver regeneration after partial hepatectomy. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 1999; **6(3)**: 275-80.
20. Sato Y, Tsukada K, Hatakeyama K. Role of shear stress and immune responses in liver regeneration after a partial hepatectomy. *Surgery today*. 1999; **29(1)**: 1-9.
21. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*. 2006; **312(5770)**: 104-7.
22. Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; **19 Suppl 4**: iv6-10.
23. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996; **274(5291)**: 1379-83.
24. Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology*. 1994; **19(2)**: 489-97.
25. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology*. 2001; **48(38)**: 556-62.
26. Hata S, Namae M, Nishina H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ*. 2007; **49(2)**: 163-70.
27. Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, et al. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest*. 2003; **112(7)**: 989-98.
28. 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. *Mol Cell Biol*. 2003; **23(4)**: 1251-9.
29. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2000; **32(1 Suppl)**: 19-31.
30. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*. 2003; **112(2)**: 160-9.
31. An W, Liu XJ, Lei TG, Dai J, Du GG. Growth induction of hepatic stimulator substance in hepatocytes through its regulation on EGF receptors. *Cell Res*. 1999; **9(1)**: 37-49.
32. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer research*. 1962; **22**: 842-9.
33. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *Journal of cellular physiology*. 2007; **213(2)**: 286-300.
34. Tanimizu N, Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration. *International review of cytology*. 2007; **259**: 1-48.

Literatur

35. Shigeta H, Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Sano T, Yamamoto H, et al. Bacteremia after hepatectomy: an analysis of a single-center, 10-year experience with 407 patients. *Langenbecks Arch Surg.* 2002; **387**(3-4): 117-24.
36. Wang X, Andersson R, Soltesz V, Bengmark S. Bacterial translocation after major hepatectomy in patients and rats. *Arch Surg.* 1992; **127**(9): 1101-6.
37. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Journal of medicine.* 1992; **23**(3-4): 217-44.
38. Wacha H, Hau T, Dittmer R, Ohmann C. Risk factors associated with intraabdominal infections: a prospective multicenter study. Peritonitis Study Group. *Langenbecks Arch Surg.* 1999; **384**(1): 24-32.
39. Shinagawa N, Hisada M, Ishihara H, Suzui K, Hori K, Mashita K, et al. [Postoperative infection control in patients with hepatic, biliary tract, and pancreatic cancers]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1992; **19**(2): 173-7.
40. Nelson LA, O'Brien DP, Kemp CJ, Williams JL, Dunke-Jacobs E, Erwin CR, et al. Intestinal and hepatic response to combined partial hepatectomy and small bowel resection in mice. *Am J Surg.* 2002; **183**(4): 435-40.
41. Miyazaki M, Kohda S, Itoh H, Kaiho T, Kimura F, Ambiru S, et al. Inhibition of hepatic regeneration after 70% partial hepatectomy by simultaneous resection of the bowel in rats. *Eur Surg Res.* 1995; **27**(6): 396-405.
42. Weiss YG, Bellin L, Kim PK, Andrejko KM, Haaxma CA, Raj N, et al. Compensatory hepatic regeneration after mild, but not fulminant, intraperitoneal sepsis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; **280**(5): G968-73.
43. Higgins G, Anderson R. Experimental Pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archiv Pathol.* 1931; **12**: 186-202.
44. Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research.* 2003; **16**(2): 99-102.
45. Clowes GH, Jr., Zuschnid W, Turner M, Blackburn G, Rubin J, Toala P, et al. Observations on the pathogenesis of the pneumonitis associated with severe infections in other parts of the body. *Annals of surgery.* 1968; **167**(5): 630-50.
46. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery.* 2005; **4**(10): 854-65.
47. Minato M, Houssin D, Morin J, Szekely AM, Bismuth H. Surgically induced acute hepatic failure in the rat. *Eur Surg Res.* 1983; **15**: 129-135.
48. Cross AS, Opal SM, Sadoff JC, Gemski P. Choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infection and immunity.* 1993; **61**(7): 2741-7.
49. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock.* 2004; **21**(6): 505-11.
50. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res.* 2003; **35**(6): 486-91.

Literatur

51. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*. 2004; **25**(9): 1601-11.
52. Columbano A, Shinozuka H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1996; **10**(10): 1118-28.
53. Nostrant TT, Miller DL, Appelman HD, Gumucio JJ. Acinar distribution of liver cell regeneration after selective zonal injury in the rat. *Gastroenterology*. 1978; **75**(2): 181-6.
54. D'Amico D, Cillo U. Impact of severe infections on the outcome of major liver surgery: a pathophysiologic and clinical analysis. *J Chemother*. 1999; **11**(6): 513-7.
55. Takeda K, Togo S, Kunihiro O, Fujii Y, Kurosawa H, Tanaka K, et al. Clinicohistological features of liver failure after excessive hepatectomy. *Hepatogastroenterology*. 2002; **49**(44): 354-8.
56. 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. *Hepatology*. 2006; **43**(3): 474-84.
57. Cornell RP, Liljequist BL, Bartizal KF. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology*. 1990; **11**(6): 916-22.
58. Yoshimoto N, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Saito S, Nagano Y, et al. Role of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in endotoxin-induced hepatic failure after extensive hepatectomy in rats. *Journal of endotoxin research*. 2005; **11**(1): 33-9.
59. Nagy P, Teramoto T, Factor VM, Sanchez A, Schnur J, Paku S, et al. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology*. 2001; **33**(2): 339-45.
60. Roelofsen H, van der Veere CN, Ottenhoff R, Schoemaker B, Jansen PL, Oude Elferink RP. Decreased bilirubin transport in the perfused liver of endotoxemic rats. *Gastroenterology*. 1994; **107**(4): 1075-84.
61. Canbay G. *Die Leber in der Intensivmedizin - Ein praxisorientierter Leitfadentext*: Aesopus Verlag; 2010.
62. O'Leary MJ, Koll M, Ferguson CN, Coakley JH, Hinds CJ, Preedy VR, et al. Liver albumin synthesis in sepsis in the rat: influence of parenteral nutrition, glutamine and growth hormone. *Clin Sci (Lond)*. 2003; **105**(6): 691-8.
63. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995; **86**(4): 1243-54.
64. Yang S, Koo DJ, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. Gut-derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; **279**(6): G1274-81.
65. Pachowka M, Zegarska J, Ciecierski R, Korczak-Kowalska G. The role of IL-6 during the late phase of liver regeneration. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*. 2008; **13**(1): 15-9.
66. Ayala A, Perrin MM, Wang P, Chaudry IH. Sepsis induces an early increased spontaneous release of hepatocellular stimulatory factor (interleukin-6) by Kupffer cells in both endotoxin tolerant and intolerant mice. *J Surg Res*. 1992; **52**(6): 635-41.

Literatur

67. Janeway T, Walport, Shlomchik. Immunobiology- the immune system in health and disease. 2005; **6th Edition**.
68. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*. 1989; **74**(5): 1704-10.
69. Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, et al. Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterology*. 2002; **123**(1): 352-64.
70. Allcock GH, Allegra M, Flower RJ, Perretti M. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. *Clinical and experimental immunology*. 2001; **123**(1): 62-7.
71. Clarke CN, Kuboki S, Tevar A, Lentsch AB, Edwards M. CXC chemokines play a critical role in liver injury, recovery, and regeneration. *Am J Surg*. 2009; **198**(3): 415-9.
72. Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, Ramadori G. Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. *Histochemistry and cell biology*. 2011; **135**(3): 305-15.
73. Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. *Am J Pathol*. 2001; **159**(6): 2081-8.

7. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Si-Young Ria Cho, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Beeinträchtigung der Leberregeneration durch simultane intraabdominelle Infektionen: eine Experimentelle Untersuchung im Rattenmodell" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Si-Young Ria Cho hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Seehofer D, Schirmeier A, Bengmark S, **Cho, S. Y.**, et al. Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intraabdominal infection in rats. *J Surg Res* 2010;159:497-502.

Beitrag im Einzelnen: Die Doktorandin führte sowohl die histologischen und immunhistologischen Färbungen, als auch die molekularbiologischen Analysen (RT-PCR) und deren Auswertungen durch

Publikation 2: Seehofer D, Neumann UP, Schirmeier A, Carter, J., **Cho, S. Y.**, et al. Synergistic effect of erythropoietin but not G-CSF in combination with curcumin on impaired liver regeneration in rats. *Langenbecks Arch Surg* 2008;393:325-32.

Beitrag im Einzelnen: Die Doktorandin führte sowohl die histologischen und immunhistologischen Färbungen, die molekularbiologischen Analysen (RT-PCR) als auch den Myeloperoxidase- Assay und deren Auswertungen durch.

Publikation 3: Seehofer D, Stockmann M, Schirmeier A, Nussler, A. K., **Cho, S. Y.**, et al. Intraabdominal bacterial infections significantly alter regeneration and function of the liver in a rat model of major hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:273-84.

Beitrag im Einzelnen: Die Doktorandin führte sowohl die histologischen und immunhistologischen Färbungen, als auch den Myeloperoxidase- Assay und deren Auswertungen durch.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

8. Lebenslauf

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

9. Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht:

1. Seehofer D, Schirmeier A, Bengmark S, **Cho, S. Y.**, et al. Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intraabdominal infection in rats. *J Surg Res* 2010;159:497-502.
2. Seehofer D, Neumann UP, Schirmeier A, Carter, J., **Cho, S. Y.**, et al. Synergistic effect of erythropoietin but not G-CSF in combination with curcumin on impaired liver regeneration in rats. *Langenbecks Arch Surg* 2008;393:325-32.
3. Seehofer D, Stockmann M, Schirmeier A, Nussler, A. K., **Cho, S. Y.**, et al. Intraabdominal bacterial infections significantly alter regeneration and function of the liver in a rat model of major hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:273-84.

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Daniel Seehofer für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung.

Ich danke Frau Anja Schirmeier für die außergewöhnlich engagierte und produktive Hilfe und Unterstützung bei allen Experimenten.

Meiner Familie und allen Freunden, die mich während der Erstellung der Dissertationsschrift sehr unterstützt haben, ein großes Dankeschön.