

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Campus Virchow-Klinikum)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Modulation von Pfortaderdruck und Leberregeneration
durch Terlipressin und Splenektomie
im Tiermodell (Wistar-Ratte)**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Weiland
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Heise
 2. Prof. Dr. med. U. P. Neumann
 3. Prof. Dr. med. J.-M. Langrehr

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1. Einleitung	3
Kapitel 2. Material und Methoden	7
1. Versuchstiere	7
1.1. Abdomen-Situs der Ratte	7
1.1.1. Anatomie der Rattenleber	7
1.1.2. Topographische Anatomie der Rattenmilz	9
2. Operationsmethoden	9
2.1. Narkose	9
2.2. Leberteilresektion	9
2.2.1. 70-prozentige Leberteilresektion	10
2.2.2. 90-prozentige Leberteilresektion	12
2.3. Splenektomie	12
2.4. Implantation der Mikropumpe	14
2.4.1. Terlipressingabe über die osmotische Mikropumpe	14
3. Biometrische Untersuchungen	15
3.1. Messungen und Untersuchungen zum Zeitpunkt der Operation	15
3.2. Messungen und Untersuchungen zum Versuchsendpunkt	15
4. Laborparameter	15
5. Histologische Untersuchungen	16
5.1. Quantitative Untersuchungen	16
5.1.1. Ki-67	16
5.1.2. BrdU	18
5.2. Qualitative Untersuchungen	19
5.2.1. HE	19
5.2.2. PAS	20
5.2.3. Berliner Blau	20
5.3. Histologische Auswertung	21
6. Statistische Auswertung	22

Kapitel 3. Ergebnisse	23
1. Überleben	24
2. Biometrische Daten	24
2.1. Körpergewicht	24
2.2. Lebergewicht	24
2.3. Milzgewicht	26
2.4. Pfortaderdruck	27
2.5. Aszites	27
2.6. Dünndarmhyperämie	28
3. Laborparameter	28
3.1. Kreatinin	29
3.2. Bilirubin	29
3.3. Harnstoff	29
3.4. Protein	29
3.5. Albumin	30
3.6. Quick-Wert (Thromboplastin-Zeit)	31
4. Histologische Untersuchung	32
4.1. Quantitative Untersuchungen: Immunhistochemische Färbungen	32
4.1.1. Ki-67	32
4.1.2. BrdU	33
4.1.3. Zusammenschau BrdU und Ki-67	33
4.2. Qualitative Untersuchungen	35
4.2.1. Blutstauung und sinusoidale Dilatation	35
4.2.2. Steatose	38
4.2.3. Zelluntergang und Entzündung	40
Kapitel 4. Diskussion	41
Kapitel 5. Zusammenfassung	58
Literaturverzeichnis	60

KAPITEL 1

Einleitung

Verbesserte anatomische Kenntnisse, chirurgisch-technische Innovationen und eine moderne intensivmedizinische Betreuung ermöglichen immer extensivere Leberteilresektionen. Limitierender Faktor ist dabei weniger die technische Durchführbarkeit der Operation als vielmehr die postoperativ verbleibende Leberfunktion. Bis heute gibt es trotz vielversprechender Versuche [21, 69] keinen etablierten Leberfunktionstest, anhand dessen präoperativ verlässliche Aussagen darüber getroffen werden können, wie hoch das maximal zulässige Resektionsausmaß ist [50]. Trotz der Suche nach allgemeingültigen Algorithmen [48] ist diese Entscheidung noch immer weitgehend von der Erfahrung des Operateurs abhängig [77]. Die postoperative Leberfunktion ist einer der entscheidenden prognostischen Faktoren für die Morbidität und Mortalität der Patienten [2]. Bei einer nicht oder nur milde steatotischen und nicht zirrhotischen Leber gelten 25 bis 30 Prozent des ursprünglichen Volumens als mindestens zu belassene Restorgangröße, die eine Regeneration sicherstellt [9, 26]. Bei vorerkrankten Lebern, wie sie in der Tumorchirurgie die Regel sind, lassen sich funktionelle Reserve und maximal zulässiges Resektionsausmaß weitaus schwieriger abschätzen. In diesen Fällen wird von einem minimalen Residualvolumen von 40 bis 50 Prozent der ursprünglichen Lebergröße ausgegangen [9, 83].

Die meisten der derzeit evaluierten und praktizierten Therapiekonzepte zur Verbesserung der postoperativen Leberfunktion beruhen auf der Optimierung der intensivmedizinischen Betreuung. Gegenstand von Studien sind außerdem perioperative Strategien zur Unterstützung der Leberregeneration, wie zum Beispiel die Embolisierung der Pfortader oder des arteriellen Zuflusses zweizeitig vor der eigentlichen Hepatektomie, wodurch in den später zu belassenden Lebersegmenten schon vor der Operation eine Hypertrophiereaktion induziert werden soll [20]. Trotz der präoperativen Sicherheitsvorkehrungen und trotz aller Therapieversuche kommt es jedoch in einigen Fällen Tage nach einer extensiven Leberteilresektion zu einer ausgeprägten Leberdysfunktion. Diese ist geprägt von Hyperbilirubinämie, Hypoglykämie, Koagulopathie, Hypalbuminämie, Hypoproteinämie, Leberzellhydrops, hämodynamischen Veränderungen und Aszitesproduktion. Ein konsekutiver Ausfall weiterer Organe, vor allem Nieren- und

Lungenversagen sowie Hirnödemen [71, 84], führt zu einer drastischen Verschlechterung der Prognose dieser Patienten.

Die Forderung nach einem hohen Resektionsausmaß von Leberparenchym entsteht klassischerweise in der Tumorchirurgie. Gleichzeitig zwingt eine steigende Zahl von Indikationen zur Lebertransplantation bei unveränderter Knappheit von Spenderorganen [23] zum Nachdenken sowohl über eine Ausweitung der Split-Leber-Transplantationen, bei denen ein Spenderorgan zwei Empfängern zugute kommt, als auch der Leber-Lebendspenden. Die dadurch riskierte, in der Transplantationsmedizin als *Small-for-Size-Syndrom* bezeichnete Situation, ist geprägt von der relativen Hyperperfusion einer für den Gesamtorganismus zu kleinen Leber [55, 19, 83] und ähnelt der eines zu kleinen Residualorgans nach einer extensiven Leberteilresektion. Zusätzlich zu der mit dem fehlenden Parenchymvolumen ausfallenden Synthese- und Detoxifikationsleistung für den Organismus scheint eine akut erhöhte Druck- und Volumenbelastung die Regenerationsfähigkeit des zu kleinen Organs entscheidend zu verschlechtern. Transplantate, die nicht mindestens eine Größe von 40 bis 50 Prozent der für den Empfänger optimalen Lebergröße (*Standard Liver Volume*) beziehungsweise eine *Graft to Recipient Weight Ratio* von weniger als einem Prozent haben, zeigen postoperativ eine deutlich schlechtere Funktion und sind für ihre Empfänger mit einer höheren Morbidität und Mortalität verbunden [54]. Im Fall der Leber-Lebendspenden für erwachsene Empfänger, für die beim Spender üblicherweise eine rechtsseitige Hemihepatektomie durchgeführt wird, was einer Entnahme von etwa 60 Prozent des ursprünglichen Lebervolumens entspricht [88], wird ein bis dato gesunder Mensch einem erheblichen Risiko ausgesetzt. Dies ist der Hauptgrund für den zurückhaltenden Einsatz der Leber-Lebendspende, weshalb, anders als bei den Nierentransplantationen, unter denen die Lebendspenden im Jahr 2009 im Eurotransplant-Gebiet einen Anteil von über 21 Prozent hatten, dieser Anteil bei den Lebertransplantationen nur bei etwa 5 Prozent lag [23].

Die Suche nach Möglichkeiten, die Leberregeneration in der Situation relativer Hyperperfusion zu verbessern, steht noch immer in ihren Anfängen. Bisher ist keine Intervention gefunden worden, die kurzfristig Aussicht hätte, sich als therapeutischer Standard durchzusetzen. Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Experiment, in dem zwei bereits bekannte Möglichkeiten, den Pfortaderdruck zu senken, im Tiermodell Ratte auf ihre Fähigkeit, die postoperative Leberregeneration zu verbessern, untersucht wurden. Diese beiden klinisch in ganz unterschiedlichen Situationen verwendeten Interventionen sind Terlipressingabe und Splenektomie.

Terlipressin ist ein synthetisches Analogon des Peptidhormons Vasopressin (ADH), das im Hypophysenhinterlappen gespeichert wird. Terlipressin wie Vasopressin erhöhen über V1-Rezeptorwirkung den systemischen Gefäßwiderstand mit Wirkmaximum im splanchnischen Gebiet und können so effektiv Blutdruck und Hyperämie sowohl in der Pfortader als auch in den portokavalen Umgehungskreisläufen verringern. Klinische Komplikationen können vor allem durch die gleichzeitige Kontraktion der glatten Muskulatur kardialer Gefäße entstehen. Physiologischerweise bewirkt das durch die Reize Hyperosmolarität oder Volumenmangel sezernierte Vasopressin nach dem derzeitigen Erkenntnisstand noch weitere Reaktionen: eine Wasserretention über V2-Rezeptor-Wirkung im distalen Nephron und in den Sammelrohren der Niere, vermehrte Thrombozytenaggregation und Freisetzung von Gerinnungsfaktoren sowie, sezerniert in den hypophysären Portalkreislauf, eine Erhöhung der ACTH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen über V3-Rezeptor-Wirkung. Terlipressin zeichnet sich gegenüber Vasopressin durch eine längere Wirkdauer aus, hat im Vergleich zu diesem nur minimale antidiuretische Eigenschaften und außerdem eine geringere, jedoch protrahierte Vasopressor-Wirkung. Klinische Anwendungsgebiete für Terlipressin sind wegen seiner Fähigkeit, beim Menschen den Druck in der Pfortader durch Vasokonstriktion im splanchnischen Gebiet zu erniedrigen, vor allem die Therapie akuter gastrointestinaler Varizenblutungen [22, 6, 59] sowie des hepatorenalen Syndroms [81, 53, 25] als Komplikationen des chronischen Leberversagens, außerdem septische Schockzustände, die auf Katecholamine nicht ansprechen [49, 68, 75]. Speziell im Rattenmodell ist ein drucksenkender Effekt von Terlipressin allein oder in Kombination mit anderen vasoaktiven Substanzen im Pfortaderstromgebiet belegt [12, 38, 39].

Die Splenektomie beziehungsweise eine Verkleinerung des funktionellen Milzgewebes durch Ligatur oder Embolisierung sind bislang ebenfalls kein therapeutischer Standard bei portaler Hypertension, sondern eher Gegenstand von Einzelfallberichten [9, 58]. Beim Menschen gibt es außerdem erfolgreiche Versuche, portalvenöse Druckerhöhungen unterschiedlichster Genese durch Splenektomie zu therapieren, sowohl im Rahmen von Transplantationen, meist beim *Small-for-Size-Syndrom* [82, 76, 40, 85, 66], aber auch bei Patienten mit Pfortaderhochdruck als Komplikation von meist zirrhotisch vorerkrankten Lebern [42, 4, 89, 73]. Der erhöhte portalvenöse Druck konnte teilweise signifikant gesenkt werden, die Leberregeneration war erleichtert, klinische Parameter waren verbessert, Hyperbilirubinämie und Aszites fielen geringer aus [85, 32]. Jedoch sind alle diese Eingriffe, allen voran die Splenektomie als chirurgische Maximalvariante, mit ihren eigenen intra- und postoperativen Risiken behaftet, zum anderen

herrscht bislang Uneinigkeit bezüglich der Indikationsstellung [16]. Für das Rattenmodell jedoch besteht seit den 1980er Jahren die allgemeine Überzeugung, daß eine Splenektomie zusätzlich zur Hepatektomie die Regeneration der verbleibenden Leber verbessert [61, 44].

In dieser Arbeit wurde im Tiermodell untersucht, ob Terlipressingabe und Splenektomie potentielle Therapiemöglichkeiten in der Situation einer chirurgisch induzierten portalen Hyperperfusion mit konsekutiver Leberdysfunktion darstellen.

Zwei Arbeitshypothesen wurden wie folgt formuliert:

- (1) Sowohl Terlipressingabe als auch Splenektomie sind geeignete Maßnahmen, um den akut erhöhten portalvenösen Druck nach extensiver Leberteileresektion zu verringern.
- (2) Sowohl durch Terlipressingabe als auch durch Splenektomie wird die strukturelle und funktionelle Regeneration der Leber nach extensiver Teilresektion begünstigt.

Zu diesem Zweck wurde die Situation der portalen Hyperperfusion im Rattenmodell durch eine erweiterte Leberteileresektion (70 oder 90 Prozent) induziert und im Therapieschritt der Versuch unternommen, diese Situation durch Splenektomie beziehungsweise Terlipressinggabe zu verbessern. Am Versuchsende wurden der portalvenöse Druck ermittelt und die Regeneration der Leber anhand biometrischer, laborchemischer und histologischer Parameter eingeschätzt.

KAPITEL 2

Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 6-8 Wochen alte männliche Wistar-Ratten, die über die Firma Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen und im Tierversuchsstall auf dem Campus Virchow-Klinikum der Charité unter Normbedingungen bei Standardlaborfutter und Wasser *ad libitum* gehalten wurden. Sie wogen bei ihrer Ankunft durchschnittlich 196,5 g und hatten vor ihrer Operation eine Adaptationszeit von mindestens einem Tag. Als postoperative Schmerztherapie erhielten die Tiere 20 mg Metamizol pro 100 g Körpergewicht intramuskulär (Novaminsulfon, Firma Lichtenstein). Alle Tiere, die den mit ihrer Gruppenzugehörigkeit festgelegten Versuchsendpunkt erreichten, starben in Narkose infolge der aortalen Punktion zur Blutentnahme.

Dieser Tierversuch wurde am 21.09.2004 durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt. Die Aktennummer lautet G 0166/04.

1.1. Abdomen-Situs der Ratte. Nach Eröffnung des Peritoneums wird der unveränderte Bauchsitus der Ratte (Abb. 1) folgendermaßen begrenzt: kranial von Leber und Xiphoid, auf der linken Seite vom Magen und dem verhältnismäßig großen Blinddarm, kaudal von der Harnblase und auf der rechten Körperseite vom Dünndarm. Von der Leberoberfläche sind ohne weitere Manipulationen der mediane, der links-laterale sowie der rechts-laterale Lobus in Teilen sichtbar. Die Milz befindet sich an der links-lateralen Bauchwand in einer Loge dorsal des Magens. Wie beim Menschen liegt die Bauchaorta der Ratte im Retroperitoneum und ist erst nach Auslagerung der Darmschlingen punktierbar.

1.1.1. *Anatomie der Rattenleber.* Ratten besitzen eine vierfach gelappte, rot-braune Leber ohne Gallenblase. Die großen Leberlappen, der links- und der rechts-laterale, der mediane Lobus sowie der Lobus caudatus sind alle bis auf den links-lateralen Lobus wiederum in Lobuli unterteilt (Abb. 2).

Herkunft und Verlauf der die Leber versorgenden Gefäße ähneln der Situation beim Menschen und unterliegen einer gewissen Variabilität [57, 63]. Die Pfortader entsteht wie beim

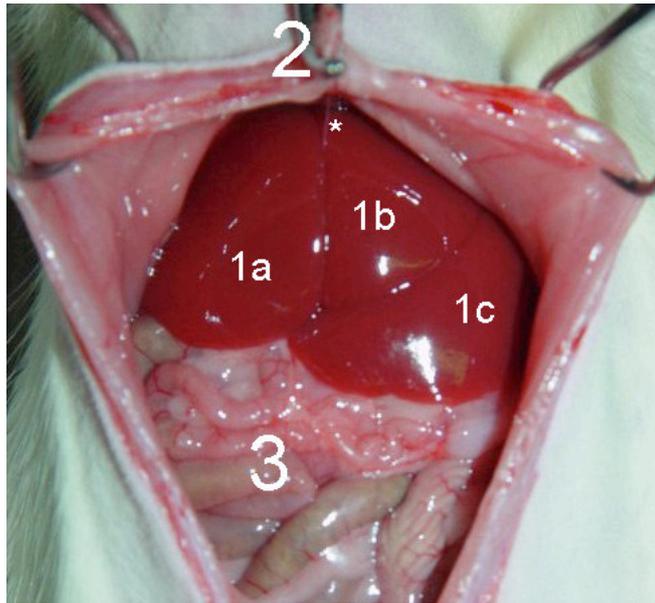


Abbildung 1. **Abdomen-Situs der Ratte:** Auf den ersten Blick sichtbar ist die Leber mit dem rechten (**1a**) und dem linken Anteil (**1b**) des Lobus medianus, der über das zarte Ligamentum falciforme hepatis (*) mit dem Diaphragma verbunden ist und den linkslateralen Lobus (**1c**) teilweise verdeckt. Kranial der Leber sieht man das angeklebte Xiphoid (**2**), kaudal Dünndarmschlingen (**3**).

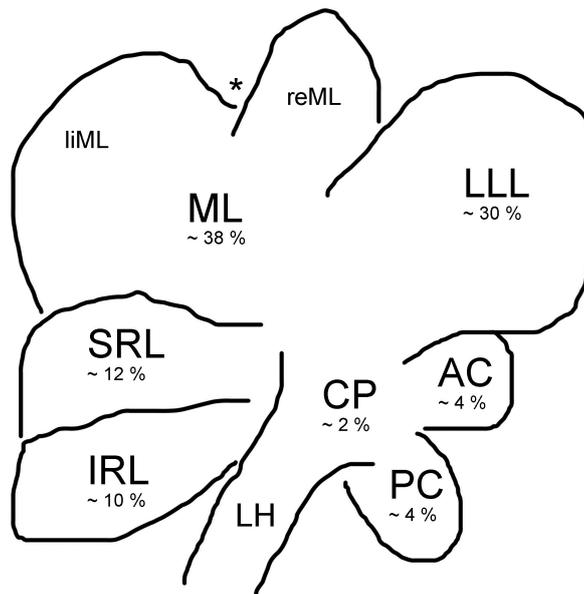


Abbildung 2. **Leber einer Ratte:** Die vier großen Leberlappen sind der links-laterale Leberlappen (**LLL**), der mediane Leberlappen (**ML**), bestehend aus einem linken (**liML**) und einem rechten Anteil (**reML**) und über das Ligamentum falciforme hepatis (*) mit dem Diaphragma verbunden; der superiore (**SRL**) zusammen mit dem inferioren (**IRL**) rechten Leberlappen sowie der Lobus caudatus medial vom Leberhilus (**LH**), bestehend aus anteriorem (**AC**) und posteriorem (**PC**) Anteil sowie dem Processus caudatus (**CP**). Abbildung modifiziert nach *Martins und Neuhaus* [63].

Menschen aus den venösen Abflüssen von Magen, Milz, Pankreas, Dün– und Dickdarm und wird in ihrem Verlauf von den Verzweigungen der Arteria hepatica begleitet.

1.1.2. *Topographische Anatomie der Rattenmilz.* Die Milz der Ratte ist ein sichelförmig gebogenes, rotbraunes Organ. Sie befindet sich in einer Loge hinter dem Magen und ist mit dessen großer Krümmung bindegewebig verbunden. In den nach medial gerichteten Milzhilus laufen fünf bis sieben Arterien und parallel zu diesen ebensoviele Venen. Diese separaten Zu– und Abflüsse entsprechen der inneren Segmentierung der Rattenmilz (vgl. Abb. 8). Intersegmentale Venen erlauben einen Austausch von Blut zwischen den Kompartimenten etwa bei Abflußbehinderungen eines Segmentes oder bei portaler Hypertension [8]. Nach Vereinigung zu einer gemeinsamen Vene konfluieren die Abflüsse der Milz mit der Vena mesenterica superior zur Pfortader.

2. Operationsmethoden

2.1. Narkose. Alle Eingriffe erfolgten in Inhalationsnarkose. Nach Rasur und Desinfektion der Bauchhaut mit PVP-Jodlösung (B. Braun, Melsungen) wurden die Ratten mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Lachgas (beides von Linde, Unterschleißheim) sowie Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden) bei einem Fluß von 300 ml/min mit initial 3-4 Prozent, im Operationsverlauf 1,5-2 Prozent Isofluran in 200 ml Sauerstoff und 100 ml Lachgas pro Minute narkotisiert, was eine komplette Analgesie bei minimaler Kreislaufdepression gewährleistete. Die Tiere wurden auf dem Rücken gelagert und ihre Extremitäten mit Klebeband fixiert. Die Narkosetiefe während des Eingriffs wurde durch den Operateur anhand der Herz– und Atemfrequenz kontrolliert.

2.2. Leberteilresektion. Das Abdomen wurde durch eine vom Xiphoid bis zum Unterbauch reichende mediane Laparotomie mit der gebogenen stumpf-stumpfen Schere in zwei Schritten eröffnet: Zunächst wurde die Haut bis zur Subkutis durchtrennt und parallel zur Körperoberfläche 1-2 cm weit seitlich vom Schnitt mobilisiert, danach die gesamte Bauchmuskulatur mitsamt dem Peritoneum mit einem Schnitt entlang der Linea alba eröffnet. Die Wundränder wurden mit spitzen Klemmen erfaßt und nach lateral gezogen, die Klemmen mit Nadeln auf der Unterlage fixiert. Der knorpelige Processus xiphoideus wurde mit einer Rundklemme nach kranial gezogen. Für eine bessere Sicht auf die extrahepatischen Gefäße wurden die Dünndarmschlingen und das Zäkum zwischen zwei Wattestäbchen aus dem Bauchraum heraus in

eine sterile Komresse links vom Tier verlagert. Das Ligamentum falciforme hepatis war hiermit freigelegt und konnte bis zum Diaphragma vorsichtig durchtrennt werden, wodurch die Leber Vorderfläche mobilisiert wurde (Abb. 3). Nach Durchtrennung der links-lateralen Leberbänder

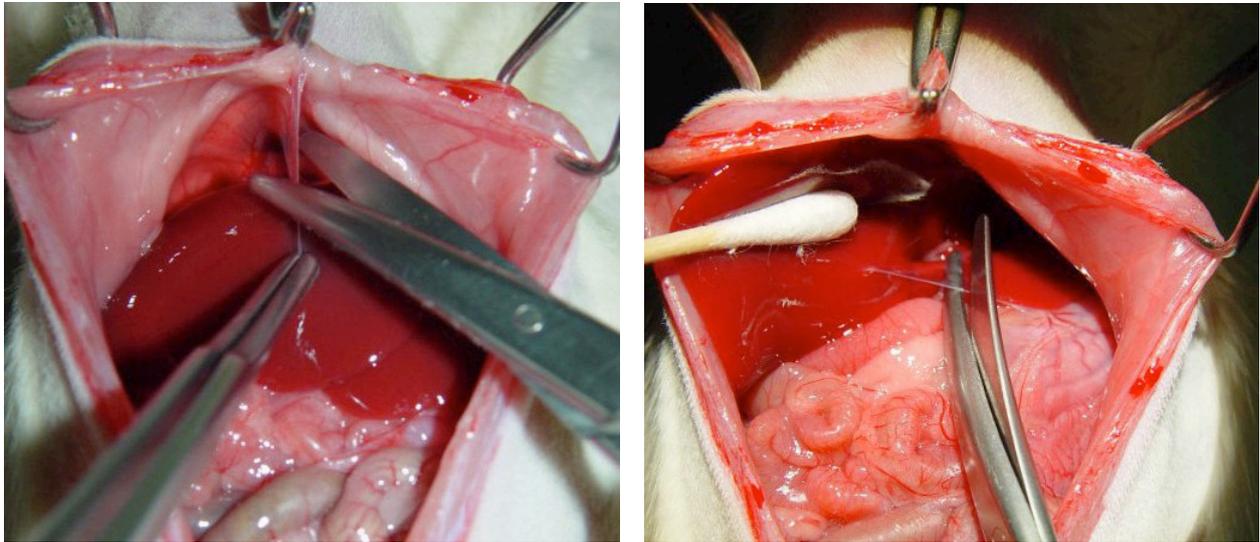


Abbildung 3. **Mobilisierung der vorderen Leberlappen:** Durchtrennung des Ligamentum falciforme hepatis zur Lösung des medianen Leberlappens vom Diaphragma (**linkes Bild**) und Durchtrennung der Leberbänder zwischen links-lateralem und medianem Leberlappen (**rechtes Bild**) vor der Ligatur beider Leberlappen.

der (Abb. 3) wurde der Lobus caudatus mobilisiert. Die Präparation des Leberhilus begann mit der Darstellung der präpylorischen Vene, es folgten die 70- beziehungsweise 90-prozentige Leberteileresektion wie im Anschluß beschrieben.

Bei den Interventionsgruppen erfolgten Leberteileresektion und Splenektomie beziehungsweise Implantation einer Mikropumpe zur Terlipressin-Applikation einzeitig. Die Dauer der Operation betrug etwa 20 Minuten für die technisch einfachere Resektion von 70 Prozent des Leber volumens, 25 Minuten für die 90-prozentige Leberteileresektion sowie jeweils noch etwa 10 Minuten zusätzlich für die Splenektomie beziehungsweise für das Einbringen der Mikropumpe. Nach der Blutstillung folgte der Verschluss von Bauchdecke und Haut in zwei Schritten mit Vicryl 4.0 (Ethicon, Norderstedt) in fortlaufender Naht.

2.2.1. 70-prozentige Leberteileresektion. Für die 70-prozentige Leberteileresektion wurden das Ligamentum falciforme hepatis zwischen Diaphragma und parietaler Leberoberfläche sowie das Leberband zwischen links-lateralem Leberlappen und dem Lobus caudatus mit der Schere vorsichtig durchtrennt. Anschließend wurden der gesamte mediane sowie der links-laterale Lobus per Massenligatur der Pfortader- und Leberarterienäste mit Vicryl 5.0 (Ethicon, Norderstedt) abgebunden und mit der Schere entfernt (Abb. 4). Der mediane und der

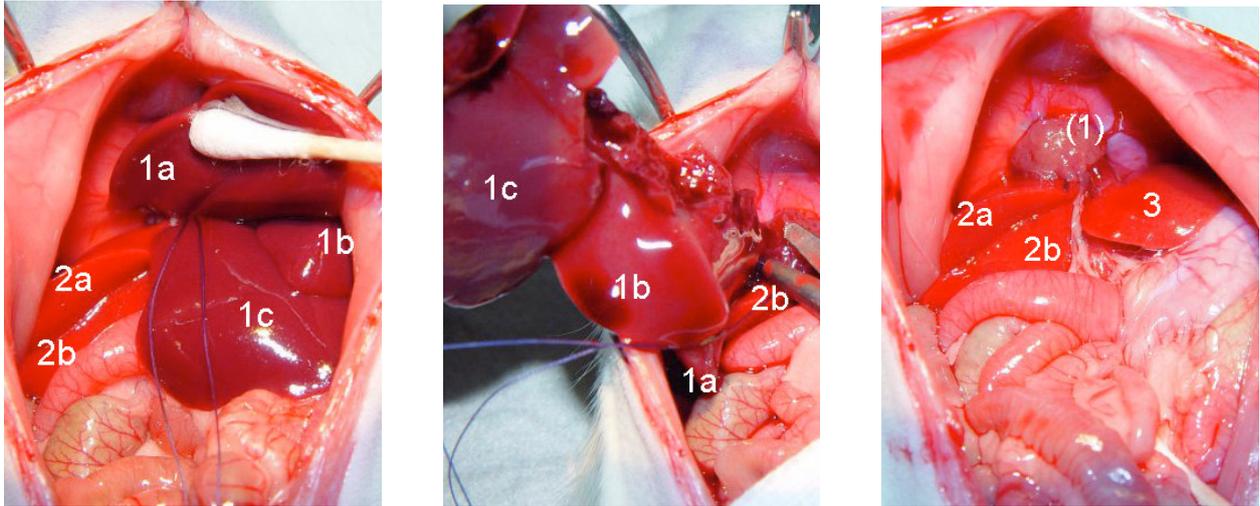


Abbildung 4. **70-prozentige Leberteileresektion:** Nach einer Ligatur des rechten (**1a**) und linken (**1b**) Anteils des Lobus medianus sowie des linkslateralen Leberlappens (**1c**) läuft das Gewebe sichtbar blau an (**linkes Bild**) und kann mit der Schere hilusnah abgetrennt werden (**mittleres Bild**). Deutlich erkennbar ist der Farbunterschied zum vitalen rechts-lateralen Leberlappen mit seinem superioren (**2a**) und inferioren (**2b**) Anteil. Nachdem das ligierte Gewebe bis auf einen Stumpf (**[1]**) entfernt ist, kommt der Lobus caudatus (**3**) zum Vorschein (**rechtes Bild**).

links-laterale Leberlappen haben einen Anteil von etwa 38 beziehungsweise 30 Prozent am Gesamtgewicht der Rattenleber [63] (Abb. 5).

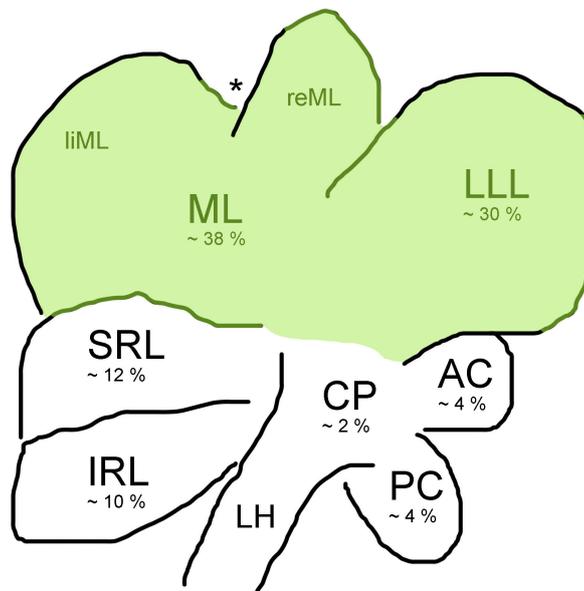


Abbildung 5. **70-prozentige Leberteileresektion schematisch:** Entfernt werden der gesamte links-laterale sowie beide Anteile des medianen Leberlappens.

2.2.2. *90-prozentige Leberteilresektion.* Zur Entfernung von 90 Prozent des Lebervolumens wurde zunächst die 70-prozentige Leberteilresektion durchgeführt, danach folgte in einem zweiten Schritt die gemeinsame Ligatur und Entfernung des superioren und des inferioren Anteils des rechts-lateralen Leberlappens unter Belassung des medial vom Leberhilus gelegenen Lobus caudatus (Abb. 6). Dieser besteht aus drei Lobuli (Processus caudatus sowie der

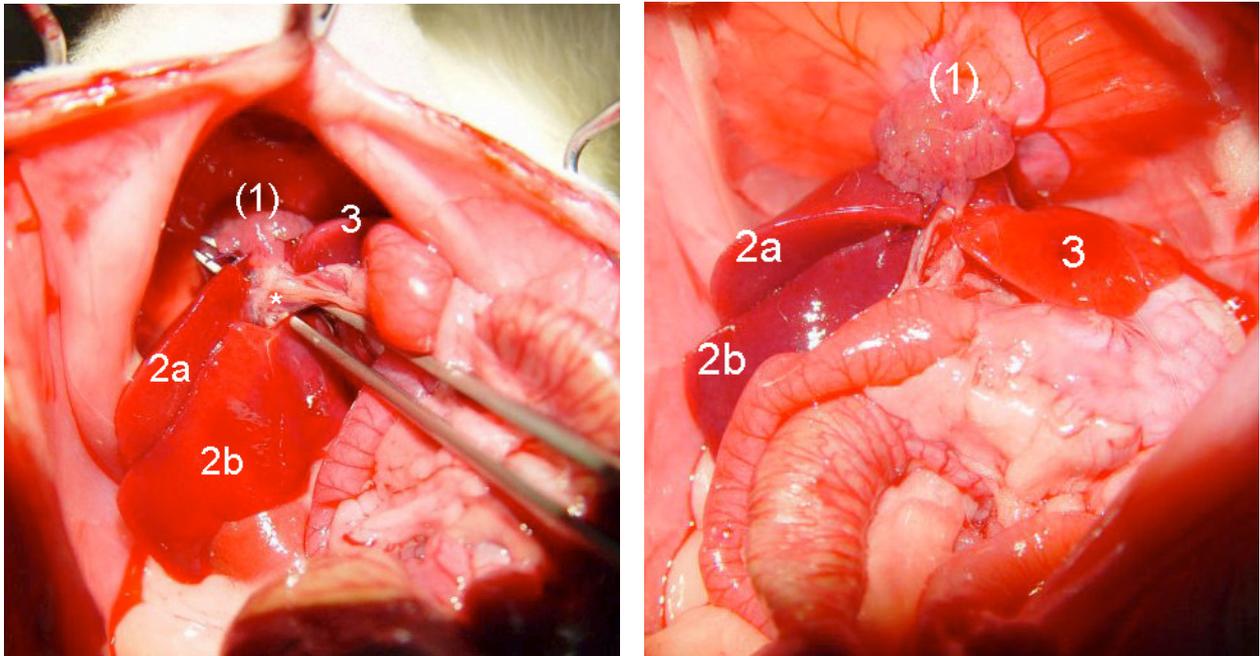


Abbildung 6. **90-prozentige Leberteilresektion:** Mit einer gebogenen Pinzette wurde der Raum zwischen Vena cava inferior und Leberhilus (*) dargestellt, um eine Ligatur hindurchzuführen (**linkes Bild**). Kranial ist der gemeinsame Stumpf des links-lateralen und des medianen Leberlappens nach 70-prozentiger Leberteilresektion sichtbar ([1]). Nach Abbinden der beiden rechts-lateralen Leberlappen (**2a** und **2b**) verbleiben mit dem Lobus caudatus (**3**) nur noch etwa 10 Prozent vitales Gewebe (**rechtes Bild**; vgl. auch Abb. 7).

anteriore und der posteriore Lobus caudatus) mit einem Anteil von insgesamt etwa 10 Prozent am Lebergesamtwicht (Abb. 7).

Zur Vermeidung hypoglykämischer Episoden wurden den Ratten nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion noch in Narkose einmalig 10 ml fünfprozentiger Glukoselösung subkutan injiziert und postoperativ zehnpromtente Glukoselösung als Trinkwasser angeboten.

2.3. Splenektomie. Nach der erfolgten Leberteilresektion wurde der Milzhilus aufgesucht. Anders als bei der menschlichen Milz müssen für eine Splenektomie mehrere etwa gleichstarke Gefäße, die von medial in einen länglichen Hilus eintreten, jeweils einzeln ligiert werden. Eine weitere Besonderheit ist die Lage dieser Gefäße in einem Netz, das auch das Pankreas trägt. Das Pankreas wirkt, anders als beim Menschen, nicht wie ein solides Organ, sondern besteht aus einer Ansammlung von feinen Gewebsteilen, die in ebendem Netz liegen, das

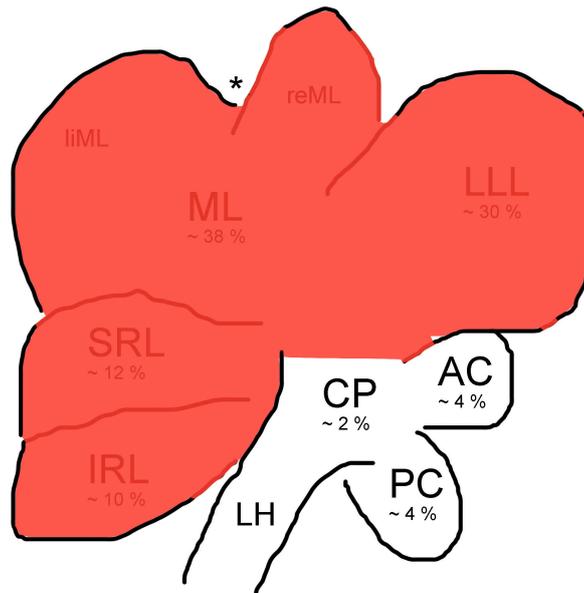


Abbildung 7. **90-prozentige Leberteilresektion schematisch:** Entfernt werden zusätzlich zum links-lateralen und medianen Lobus der rechts-laterale Leberlappen, bestehend aus superiorem (SRL) und inferiorem (IRL) Anteil. Die drei verbleibenden Lobuli des Lobus caudatus (CP, AC und PC) bilden zusammen etwa 10 Prozent des Lebervolumens.

zur Ligatur der Milzgefäße an mehreren Stellen durchtrennt werden muß. Die Milzgefäße wurden hilusnah dargestellt, mit Prolene 7.0 (Ethicon, Norderstedt) unterbunden und durchtrennt (Abb. 8).

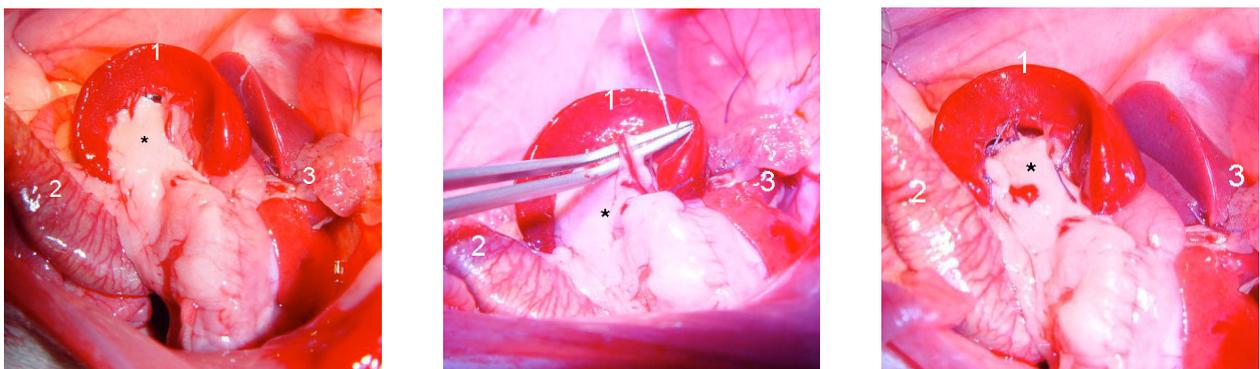


Abbildung 8. **Splenektomie:** Zunächst muß die Milz (1) aus ihrer Loge hinter dem Magen mobilisiert werden (**linkes Bild**), danach erfolgen Darstellung und Einzelligaturen der Gefäße, die in den Hilus eintreten (**mittleres Bild**), bevor die Milz von dem Netz, das auch das Pankreas trägt (*), getrennt werden kann (**rechtes Bild**). Kaudal der Milz erkennt man Dünndarmschlingen (2), kranial den rechts-lateralen Leberlappen sowie den Stumpf der bei einer 70-prozentigen Leberteilresektion resezierten Lobus (3).

2.4. Implantation der Mikropumpe. Zur Implantation der Mikropumpe wurde nach dem kompletten Verschluss der Laparotomiewunde unter sterilen Bedingungen mit der Operationschere die Haut der linken Leiste durch einen etwa einen Zentimeter langen Schnitt eröffnet und eine subkutane Tasche stumpf präpariert. Die zuvor unter sterilen Kautelen befüllte Pumpe wurde mit der chirurgischen Pinzette in diese Hauttasche geschoben. Die Wunde wurde in Einzelknopfnah mit Vicryl 4.0 (Ethicon, Norderstedt) verschlossen und erneut desinfiziert.

2.4.1. Terlipressingabe über die osmotische Mikropumpe. Als Terlipressinpräparat wurde in diesem Versuch Haemopressin (Curatis Pharma, Meduna, Isernhagen) genutzt, das als Pulver in einer Durchstechflasche mit Wasser zubereitet wird. Es wurden 1 mg des Pulvers in 5 ml H₂O gelöst und von dieser Lösung je 200 µl in das Reservoir einer osmotischen Mikropumpe (Alzet, Modell 2001, vertrieben durch Charles River Laboratories, Sulzfeld) gefüllt. Diese Pumpen ermöglichen nach subkutaner Implantation die kontinuierliche Verabreichung des Medikaments im Reservoir, indem interstitielle Flüssigkeit durch eine semipermeable Membran in die Pumpe eindringt und eine osmotische Schicht quellen läßt, die wiederum das Reservoir komprimiert (Abb. 9).

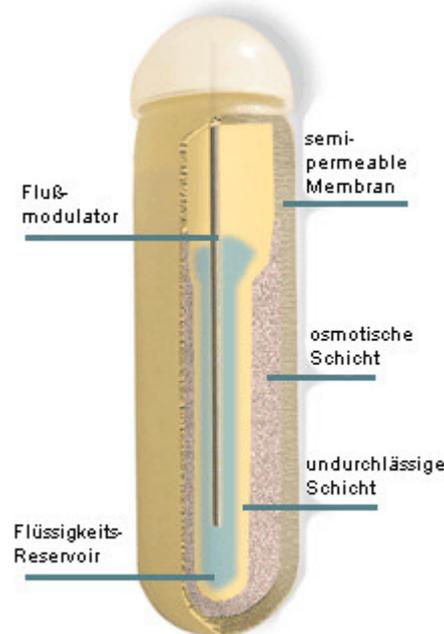


Abbildung 9. **Aufbau der osmotischen Mikropumpe**

Im Fall des verwendeten Modells 2001 wurden die 200 µl Flüssigkeit aus dem Reservoir kontinuierlich über eine Woche hinweg verabreicht, entsprechend einer Pumprate von etwa 1 µl Flüssigkeit beziehungsweise 0,2 µg Terlipressin pro Stunde.

3. Biometrische Untersuchungen

3.1. Messungen und Untersuchungen zum Zeitpunkt der Operation. Vor der Operation wurde das Gewicht jedes Versuchstiers und anschließend das Gewicht des Leberresektats registriert, um anhand der Folgedaten die Entwicklung beider Parameter beurteilen zu können. Außerdem konnte so der Anteil des Lebergewichts am Körpergesamtwicht der Ratten ermittelt werden. Weiterhin wurden die den Tieren aus der Splenektomiegruppe entnommenen Milzen gewogen. Ihr Gewicht diente als Anhaltspunkt für die Einschätzung des Zustandes derjenigen Milzen, die bei den Tieren der Terlipressin- und Kontrollgruppe dem Einfluß einer akuten portalen Hyperperfusion ausgesetzt waren.

3.2. Messungen und Untersuchungen zum Versuchsendpunkt. Vor der zweiten Operation, die den Endpunkt der Beobachtungen darstellte und der Probenentnahme diente, wurden die Tiere erneut gewogen und äußere Auffälligkeiten registriert. In Vorbereitung auf die BrdU-Färbung wurde allen Tieren 30 Minuten vor Kreislaufstillstand intraperitoneal Bromdesoxyuridin-Lösung (BrdU) injiziert. Nach Wiedereröffnung des Abdomens erfolgte eine Beurteilung des Dünndarmes hinsichtlich Zeichen von Hyperämie auf einer Skala von 0 (makroskopisch nicht vorhanden) über 1 (mäßig) und 2 (stark) bis 3 (sehr stark). Außerdem wurde bei sichtbarem Aszites eine millilitergenaue Beurteilung durch Entnahme der Flüssigkeit mit einer Einwegspritze vorgenommen. Im nächsten Schritt wurde der Pfortaderdruck etwa einen Zentimeter entfernt vom Leberhilus mit einer Kanüle gemessen (Abb. 10) und auf einer Skala in Millimeter Wassersäule ermittelt (1 mmWS entspricht etwa 9,8 Pa).

Es folgte eine arterielle Blutentnahme aus der Aorta mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle (Citrat- und Heparinatblut). Die Regeneratlebern und Milzen wurden gewogen und in einer vierprozentigen gepufferten Formaldehydlösung (Herbeta, Berlin) asserviert.

4. Laborparameter

Aus dem gewonnenen Citrat-Blut wurde im Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (ZLP) am Campus Virchow-Klinikum der Charité der TPZ-Wert bestimmt. Im Heparinat-Blut wurden die Werte für konjugiertes und Gesamt-Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff, Protein und Albumin ermittelt.

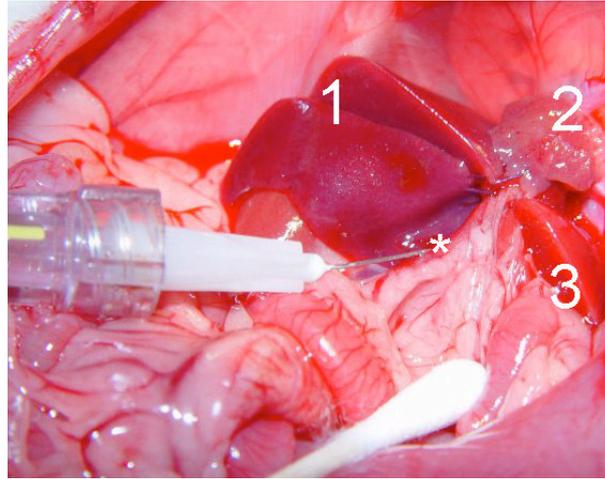


Abbildung 10. **Messung des Pfortaderdrucks mittels Kanülierung:** Die Kanüle wurde in der Pfortader (*) etwa einen Zentimeter kaudal des Leberhilus platziert. Oberhalb der Pfortader sind die unterbundenen Lobuli des rechts-lateralen Leberlappens zu sehen (1), kranial unter dem Diaphragma der Stumpf der bei einer 70-prozentigen Leberteilresektion entfernten Leberlappen (2). Rechts unten im Bild ist der Lobus caudatus (3) sichtbar, der als einziger Leberlappen nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion verbleibt.

5. Histologische Untersuchungen

Die an den Versuchsendpunkten entnommenen Lebern wurden sofort nach dem Wiegen für mehrere Tage in vierprozentiger gepufferter Formaldehydlösung (Herbeta, Berlin) konserviert. Anschließend wurde jedem Organ mit dem Skalpell ein zentrales Stück von etwa einem Kubikzentimeter Volumen entnommen, in einem Hypercenter XP (Shandon, Ashmoor, UK) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und an einer Einbettstation (Microm, Walldorf) in einen Paraffinblock (Paraffin von Merck, Darmstadt) gegossen. Mit einem Schlittenmikrotom (Leica SM 200R, Leica, Wetzlar; Microtome Blades R35 von pfm, Köln) wurden Schnitte von je nach beabsichtigter Färbemethode unterschiedlicher Stärke angefertigt und auf Objektträger gezogen (SuperFrost für Standardfärbungen und SuperFrost Plus mit Poly-L-Lysin-Beschichtung für die beiden immunhistochemischen Färbungen, beides von Menzel, Braunschweig). Die Paraffinschnitte trockneten mindestens einen Tag bei Raumtemperatur und wurden anschließend manuell nach den anschließend beschriebenen Protokollen für drei Routinefärbungen für das Organ Leber (HE, PAS und Berliner Blau) beziehungsweise für die immunhistochemischen Färbungen Ki-67 und BrdU weiterverarbeitet.

5.1. Quantitative Untersuchungen.

5.1.1. *Ki-67.* Die Ki-67-Färbung ist eine etablierte immunhistochemische Methode, um die Proliferationsfraktion verschiedenster Gewebe sichtbar zu machen. Sie findet vor allem

in der Tumordiagnostik Verwendung. Diese Färbung zeigt keine tatsächlichen Zellteilungen, sondern prinzipiell teilungsbereite Zellen an. Für die Ki-67-Färbung wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus von Menzel, Braunschweig) aufgebracht. Die Präparate wurden über Nacht bei 37 °C und anschließend für 30 Minuten bei 56 °C getrocknet. Nachdem sie wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie 30 Minuten lang in Xylol (J.T. Baker, Deventer) auf dem Kreisschüttler entparaffiniert, dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100, 90, 80 und 70 Prozent Ethanol für je fünf Minuten) rehydriert. Während die Präparate abschließend in destilliertem Wasser ruhten, wurde Citratpuffer (10 mM) aus den Stammlösungen A mit 21,01 g Zitronensäure pro Liter Aqua dest. und B mit 29,41 g Natriumcitrat pro Liter Aqua dest. sowie aus destilliertem Wasser in einem Verhältnis von [A : B : Aqua dest.] = [1 : 4,56 : 50] hergestellt und unter Hinzufügen von HCl- beziehungsweise NaOH-Lösung (beides von Merck, Darmstadt) mit Hilfe eines pH-Meters auf pH = 5,95 eingestellt. Die entparaffinierten und rehydrierten Präparate wurden in einer Küvette mit diesem Citratpuffer in der Mikrowelle bei 900 Watt erhitzt, fünf Minuten gekocht und nach einer fünfminütigen Pause erneut für fünf Minuten gekocht. Die auf diese Weise hitzedemaskierten Präparate kühlten 30 Minuten lang im Eiswasserbad ab und wurden anschließend in destilliertes Wasser gestellt. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger fünf Minuten lang mit Peroxidase Blocking Reagent (Dako Code No. S2001, Hamburg) bedeckt und diese Lösung mit destilliertem Wasser wieder abgespült. Nun wurden die Präparate 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Dako mouse-anti-rat Ki-67, Code No. M7248, Hamburg) inkubiert, der kurz zuvor im Verhältnis von 1 : 25 mit PBS-Waschpuffer (Sigma-Aldrich, Steinheim) verdünnt zubereitet worden war. Auf jedem Objektträger wurden 100 µl dieser Lösung verteilt und die geringe Menge an Flüssigkeit mit Parafilm (Brand, Wertheim) gegen Verdunstung geschützt. Der Primärantikörper wurde entfernt, indem mit einer Pipette vorsichtig TBS (0,05 M, pH = 7,6) über jeden Objektträger gegeben, dieser drei Minuten lang in TBS gestellt und der gesamte Vorgang wiederholt wurde. Nach dem Primärantikörper wurden 20 µl eines biotinylierten Sekundärantikörpers gegen Ratten- und Maus-Antigen (Dako, LSAB 2-Kit HRP, Code No. K0609) für zehn Minuten als *Link* zum Tertiärantikörper auf jedes der Präparate gegeben und diese im Anschluß wie zuvor mit TBS gespült. Den Tertiärantikörper stellte ein mit Meerrettich-Peroxidase (**HorseRadish Peroxidase**, HRP) verbundener Streptavidin-Antikörper aus demselben Kit wie der biotinylierte Sekundärantikörper dar, von dem ebenfalls 20 µl auf jedes Gewebestück aufgebracht und dort für zehn Minuten belassen wurden. Aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin verbinden sich mehrere

Streptavidin-Moleküle mit dem gewebegebundenen biotinylierten Antikörper. Die an das Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase erzeugt, nachdem überschüssiger Tertiärantikörper wie bereits zweimal zuvor mit TBS ab gespült wurde, durch die Reaktion mit dem Substrat (Liquid DAB Substrat Chromogen System K3466, Dako, Hamburg), das großzügig auf die Schnitte verteilt 30 Minuten lang einwirkte, am Ort des gebundenen Primärantikörpers eine bräunlich-violette Färbung. Nachdem die Reaktion beendet war, wurde die Substratlösung mit Leitungswasser ab gespült. Vor und nach der Gegenfärbung mit Harris-Hämatoxylin (90 Sekunden auf dem Schüttler, das Hämatoxylin wurde zuvor im Verhältnis 1 : 3 mit Aqua dest. verdünnt) lagerten die Präparate in destilliertem Wasser und wurden abschließend mit Glyceringelatine nach Kaiser (Merck, Darmstadt), die im Wasserbad auf 57 °C erhitzt worden war, eingedeckt.

5.1.2. *BrdU*. 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) ist ein Analogon des Pyrimidin-Nukleosids Thymidin und wird während der S-Phase des Zellzyklus' an dessen Stelle in die neusynthetisierte DNA inkorporiert. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU können Zellen, in denen dies geschehen ist, nach Demaskierung des Antigens detektiert werden. Anders als Ki-67 ist BrdU ein exogener Marker mit einer Halbwertszeit von nur etwa 0,5-1 Stunde und wurde im vorliegenden Experiment eine halbe Stunde vor Kreislaufstillstand der Tiere intraperitoneal injiziert (BrdU labeling medium, BrdU Detection and Labeling Kit II, n. 11299964001, Roche, Mannheim, vorbereitet nach Herstellerangaben für das *in-vivo-labeling*). Somit gilt die Aussage der BrdU-Signale über die Proliferationsfraktion des betrachteten Gewebes für ein ungleich kleineres Zeitfenster als die der Ki-67-Färbung. Gleichzeitig ist die Aussage über die tatsächlich stattgehabte DNA-Synthese aber exakter.

Wie für die Ki-67-Färbung wurden auch hier 4 µm dicke Schnitte aus den Paraffinblöcken auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht, in gleicher Weise getrocknet, mit Xylol entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe gewässert, im Citratpuffer hitzedemaskiert und wieder abgekühlt. Aus dem Eiswasserbad gelangten die Präparate für jeweils fünf Minuten zuerst in TBS-, dann in PBS-Puffer und wurden anschließend mit der Primärantikörper-Lösung (mse-anti-BrdU aus dem oben genannten Kit von Roche, Mannheim, vorbereitet nach Herstellerangaben) bedeckt. Mit Parafilm gegen Verdunstung geschützt verblieben sie so für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Die Lösung mit dem Primärantikörper enthält in dem benutzten Kit auch eine Mischung von Nukleasen, die ss-DNA erzeugen, also zusätzlich zur Hitzedenaturierung Epitope freilegen, an die der Primärantikörper binden kann. Nach Ende der Inkubationszeit wurde überschüssiger Antikörper entfernt, indem zuerst PBS mit einer Pipette über die Präparate gespült und diese dann für fünf Minuten in PBS gelagert

wurden. Dieser Spülgang wurde dreimal wiederholt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper (Anti-mouse Igalkaline Phosphatase aus dem oben genannten Kit von Roche, Mannheim, vorbereitet nach Anleitung des Herstellers) bedeckt und die Objektträger wiederum bei 37 °C in der feuchten Kammer 30 Minuten lang inkubiert. Wie zuvor wurde überschüssiger Antikörper in drei Spülgängen mit PBS entfernt. Nach Herstellerangaben wurde nun die Lösung zur Detektion vorbereitet und großzügig über die Präparate verteilt. Diese Lösung enthält NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat), wobei letzteres das eigentliche Substrat für die alkalische Phosphatase darstellt, mit der der Sekundärantikörper markiert ist. Nach der Dephosphorylierung von BCIP wird es mit NBT als Oxidationsmittel zu einem Indigofarbstoff oxidiert. NBT wird mit dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff und verstärkt die Signalintensität am Reaktionsort. Die Entwicklung dauerte bei Raumtemperatur durchschnittlich 18 Minuten und erfolgte unter visueller Kontrolle am Mikroskop. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Spülen der Objektträger in PBS-Lösung abgebrochen. Abschließend wurden die Präparate mit verdünntem Harris-Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, Steinheim) gegengefärbt und, wie bei der Ki-67-Färbung, mit Glyceringelatine nach Kaiser eingedeckt.

5.2. Qualitative Untersuchungen.

5.2.1. *HE*. Die HE-Färbung dient als weitverbreitete Routinefärbung einem ersten Überblicksgewinn, ermöglicht durch ein klares Zellbild in den meisten Geweben aber auch schon morphologische Untersuchungen. Durch Hämatoxylin und Eosin werden Zellkerne bläulich-schwarz, Erythrozyten orange bis rot und das Zytoplasma von Hepatozyten in verschiedenen Pink-Tönen gefärbt. Das Vorgehen war wie folgt: Zunächst wurde das Paraffin mit Paraclear (Quartett, Berlin) durch zwei je 20 Minuten dauernde Schritte aus den Präparaten gelöst, diese wurden dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 80 und 70 Prozent Ethanol, hergestellt aus 100 Prozent vergälltem Ethanol, Herbeta, Berlin) je fünf Minuten lang gewässert und anschließend in destilliertem Wasser (Fresenius, Bad Homburg) gespült. Im ersten Durchgang wurden die Schnitte 20 Minuten lang auf einem Kreisschüttler in Harris-Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, Steinheim) gefärbt, überschüssiges Hämatoxylin wurde durch vorsichtiges Spülen unter lauwarmem, fließendem Leitungswasser entfernt. Nach einem anschließenden zweiminütigen Färbegang in frisch filtriertem Eosin aqueos (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit 100 µl Eisessig (Merck, Darmstadt) pro 200 ml Eosin-Lösung wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser geschwenkt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80, 96 und 100 Prozent Ethanol für je

zwei Minuten) wieder entwässert, nochmals mit Paraclear gereinigt und abschließend mit Entellan neu (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die Schichtdicke der Präparate für die HE-Färbung betrug 1 µm.

5.2.2. *PAS*. Der Färbemethode PAS liegt als Prinzip die selektive Oxidierung von Glukoseresten mit Periodsäure zu Aldehyden zugrunde, die anschließend mit dem Schiff'schen Reagens eine rote Farbe bilden. Mit ihr färben sich demzufolge Glykogen, Muzin und einige Basallamina rot bis lila. Die Gegenfärbung mit Hämalan erzeugt blaue Zellkerne und einen blauen Hintergrund. Mit dieser Färbung läßt sich die Glykogenspeicherung in Geweben beurteilen, auch Fettvakuolen sind als Aussparungen deutlicher als in anderen Färbungen sichtbar. Wie für die HE- wurden auch die Gewebstücke für die PAS-Färbung erst mit Paraclear entparaffiniert und in der gleichen absteigenden Alkoholreihe entwässert. Aus dem destillierten Wasser gelangten sie für zehn Minuten in frisch zubereitete, einprozentige Perjodsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim) und wurden anschließend in 70-prozentigem Ethanol gespült. Der nächste Schritt bestand aus einem 15-minütigen Bad in Schiff'schem Reagens (Sigma-Aldrich, Steinheim). Hierin färbten sich die Gewebsschnitte zuerst zartrosa, während der folgenden fünf Minuten unter fließendem warmem Leitungswasser dann tiefrot. Als Gegenfärbung wurden die Präparate abschließend fünf Minuten lang in Hämalanlösung (Mayers Hämalan, Sigma-Aldrich, Steinheim) auf dem Kreisschüttler gebläut. Wie die HE-Färbung schloß auch diese Färbung mit einer aufsteigenden, entwässernden Alkoholreihe und einem letzten Schritt in Paraclear, bevor die Objektträger mit Entellan eingedeckt wurden. Die Schichtdicke der PAS-gefärbten Schnitte betrug 2-3 µm.

5.2.3. *Berliner Blau*. Mit der Berliner-Blau-Färbung wird dreiwertiges Eisen im Gewebe durch eine Reaktion mit saurem Ferrocyanid sichtbar gemacht. Ablagerungen von Ferritin, Hämosiderin und Hämatoidin erscheinen leuchtend blau, Kerne rot und Zytoplasma pink. Die vor- und nachbereitenden Schritte zur Entparaffinierung, Wässerung und Entwässerung sowie das Eindecken der Schnitte entsprechen denen in den oben beschriebenen Routine-Färbungen HE und PAS.

Aus dem destillierten Wasser am Ende der absteigenden Alkoholreihe gelangten die Präparate für fünf Minuten in eine zehnprozentige wässrige Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat-II-trihydrat (Merck, Darmstadt) und wurden direkt daraus in ein 30-minütiges Bad überführt, das zu gleichen Teilen aus zehnprozentiger Kaliumhexacyanoferrat-II-trihydrat- und zweiprozentiger HCl-Lösung (beides von Merck, Darmstadt) bestand. Nach einer kurzen Spülung in

destilliertem Wasser schloß diese Färbung mit einem zehnmütigen Bad in einer Aluminiumsulfatlösung ab (Kernechtrot von Carl Roth, Karlsruhe), die Kerne und Zytoplasma in Rottönen färbte. Für diese Färbung wurden die Präparate 5 µm dick geschnitten.

5.3. Histologische Auswertung. Die histologische Auswertung aller Färbungen erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit mit Hilfe standardisierter Protokolle, die erst in einem zweiten Schritt den einzelnen Tieren zugeordnet wurden. Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte am Durchlichtmikroskop (Leica DM RA2, Leica, Wetzlar) bei 40-facher Vergrößerung mit einem Rasterokular von 10 x 10 Feldern, das eine Orientierungshilfe gab. Gezählt wurden die Signale im Bereich dieses projizierten Rasters von insgesamt 20 Gesichtsfeldern. Um die Zahl der Signale trotz unterschiedlicher Gewebedichten in den Präparaten vergleichbar zu machen, wurde außerdem die Gesamtzahl aller sichtbaren Kerne parenchymaler Zellen aus jeweils zehn Gesichtsfeldern eines jeden Präparates ermittelt, der Durchschnitt gebildet und die durchschnittliche Zahl der Signale auf diesen bezogen. Die Leber-Routinefärbungen wurden am selben Durchlichtmikroskop ausgewertet. Zunächst wurde mit Hilfe einer Übersichtsvergrößerung (10-fach) die Qualität von Schnitt und Färbung beurteilt und anschließend, wenn das Präparat für geeignet befunden worden war, bei 40-facher Vergrößerung nach den morphologischen Mustern von Verfettung, Nekrose, Blutstauung sowie Entzündungsreaktionen gesucht.

Zur Quantifizierung der Leberzellverfettung wurde auf eine Komponente des etablierten Scores für Patienten mit NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) zurückgegriffen, der den Anteil verfetteter Hepatozyten an der Gesamtzahl aller Hepatozyten in vier Grade unterteilt: 0 = weniger als 5 Prozent; 1 = 5 bis 33 Prozent; 2 = über 33 bis 66 Prozent, 3 = über 66 Prozent [56]. Nach Art der Verfettung wurden ein mikrovesikuläres, ein makrovesikuläres und ein gemischtes Bild unterschieden. Drittens wurden Lokalisation und Verteilung fetthaltiger Hepatozyten unterteilt in periportal, *bridging* (die Portalfelder verbindend), perivenös und panazinär.

Die Präparate wurden außerdem auf das Vorhandensein von Eisenablagerungen, Councilman-Körperchen (als Zeichen von Einzelzellnekrosen), inflammatorischen Infiltraten und dilatierten Sinusoiden untersucht. Auf die Auszählung sichtbarer Mitosen wurde verzichtet, da deren Aussage neben der Zahl von BrdU- und Ki-67-Signalen sowie deren Quotienten redundant und weniger genau ist.

Die Präparate wurden exemplarisch fotodokumentiert (Kamera Insight Color 2 von Visitron Systems, Puchheim, am oben genannten Mikroskop der Firma Leica).

6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und zur Erstellung der Graphiken wurden die Programme SPSS 11.0 der Firma SPSS (Chicago, Illinois) respektive SigmaPlot 11.0 der Firma SYSTAT (San Jose, California) sowie Excel 2007 der Firma Microsoft (Redmont, Washington) genutzt. Um die Normalverteilung der Werte zu prüfen, wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test, zum Testen auf Signifikanz im Falle einer Normalverteilung von quantitativen Daten der ANOVA-Test, andernfalls der Kruskal-Wallis-Test genutzt. Für die kategoriellen Daten wurde der Rank Sum Test nach Wilcoxon und Mann-Whitney verwendet. Auf dichotome Daten wurde gemäß der Gruppenstärken von $n = 8$ beziehungsweise $n = 10$ der Fisher's Exact Test angewendet. Unterschiede auf einem Niveau von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

KAPITEL 3

Ergebnisse

Der Versuch bestand aus zwei großen Armen: Im ersten wurden 70, im zweiten 90 Prozent des ursprünglichen Lebervolumens reseziert. Da zu erwarten war, daß weniger Tiere aus dem Versuchsarm mit der 90-prozentigen Leberteilresektion bis zum festgelegten Versuchsendpunkt überleben würden, wurde die Stärke jeder der drei Gruppen für diesen Versuchsteil auf $n = 10$ festgelegt, während sie im anderen Arm mit einer Resektion von 70 Prozent des Lebervolumens nur jeweils $n = 8$ betrug. Somit wurden über alle drei Versuchsendpunkte hinweg im 70-Prozent-Arm 72 Tiere operiert, im 90-Prozent-Arm dagegen insgesamt 90 (Abb. 1).

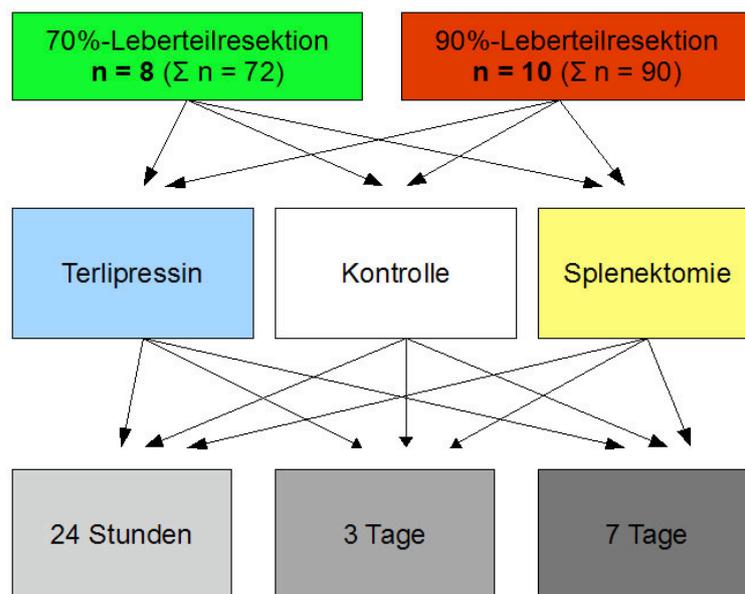


Abbildung 1. Studiendesign.

Abgesehen von der Gruppenstärke waren beide Versuchsarme gleichermaßen aufgebaut: Die Tiere wurden randomisiert und in zufälliger Reihenfolge einer der beiden Interventionsgruppen (Terlipressingabe beziehungsweise Splenektomie) oder der Kontrollgruppe sowie einem der drei Versuchsendpunkte zugeführt (Abb. 1). Ihr Gewicht wurde vor der Resektions-Operation und am Versuchsende registriert. Außerdem wurden das Gewicht des Leberresektats, des Leberregenerats sowie der Milz ermittelt, der portale Druck mittels Kanülierung gemessen, makroskopisch erkennbare Dünndarmhyperämie anhand eines Scores sowie Aszites

quantitativ bestimmt. Laboruntersuchungen im Blut und eine mikroskopische Auswertung der Regeneratlebern schlossen sich dem operativen Teil des Experiments an.

1. Überleben

Als Versuchsendpunkte wurden die postoperativen Tagen 1, 3 und 7 festgelegt. Unter den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren starb kein einziges Individuum vor dem zuvor bestimmten Tag.

Im Versuchsaarm mit den zu 90 Prozent leberteilresezierten Ratten (pro Gruppe n = 10) erreichten bis auf ein Tier aus der Kontrollgruppe alle übrigen den Tag 1. Bereits an Tag 3 jedoch lebten in diesem extensiveren Modell nur noch zwei Tiere aus beiden Interventionsgruppen im Gegensatz zu drei Tieren aus der Kontrollgruppe. An Tag 7 lebte aus jeder Gruppe nur noch jeweils ein einziges Tier.

Signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen hinsichtlich des Überlebens bestanden weder bei den zu 70 noch bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren.

2. Biometrische Daten

2.1. Körpergewicht. Zusätzlich zum Körpergewicht am Operationstag (KG_1) beziehungsweise Todestag (KG_2) wurde die postoperative Gewichtsänderung eines jeden Tieres in Prozent ermittelt:

$$(1) \quad \frac{KG_2 - KG_1}{KG_1} \cdot 100$$

Bei den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren waren diesbezüglich weder an den Tagen 1, 3 noch 7 signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen feststellbar. Dagegen fiel bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Ratten bereits an Tag 1 ein signifikanter Unterschied in der Gewichtsänderung zwischen der Terlipressin- und der Kontrollgruppe auf. Hatten die Tiere aus der Kontroll- beziehungsweise Splenektomiegruppe durchschnittlich 0,7 respektive 1 Prozent ihres ursprünglichen Gewichts zugelegt, betrug der durchschnittliche Gewichtsge-
winn bei den mit Terlipressin behandelten Tieren 5 Prozent ($p = 0,01$; Abb. 2).

Wegen der geringen Zahl überlebender Tiere ließen sich gleich- oder gegensinnige Aussagen zu den Versuchstagen 3 und 7 nicht treffen, so daß diese Beobachtung an den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren auf den postoperativen Tag 1 beschränkt bleiben muß.

2.2. Lebergewicht. Zur Ermittlung der gewichtsmäßigen Leberregeneration nach der Teilresektion wurden am Operationstag das Gewicht des Leberresektats und zum Versuchsende

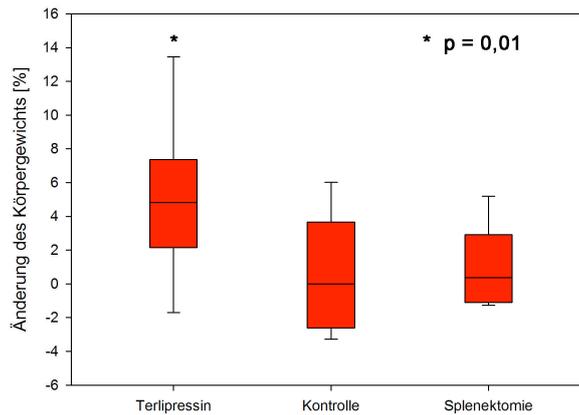


Abbildung 2. **Durchschnittlicher Zuwachs an Körpergewicht** der zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 1 in Prozent.

dasjenige des Regenerats bestimmt. Berechnet wurde weiterhin das Verhältnis von Regeneratgewicht zum Körpergesamtwicht am Versuchsendpunkt. Weder zwischen den Versuchsgruppen der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere an den Tagen 1, 3 und 7 noch zwischen den drei Gruppen mit der 90-prozentigen Resektion an Tag 1 konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich dieses Quotienten festgestellt werden.

Weiterhin wurde, ebenso wie beim Körpergewicht, die prozentuale Gewichtsänderung der regenerierenden Leber zwischen Operationstag (LG_1) und Versuchsende (LG_2) ermittelt:

$$(2) \quad \frac{LG_2 - LG_1}{LG_1} \cdot 100$$

Bei den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren gab es für die postoperativen Tage 1 und 3 keine signifikanten Unterschiede. An Tag 7 allerdings fiel der Gewichtszuwachs der regenerierenden Lebern in der Terlipressin- gegenüber der Kontrollgruppe signifikant geringer aus ($p=0,01$; Abb. 3). Bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren zeigte sich dieser Unterschied an Tag 1 nicht. Wiederum waren wegen der geringen Zahl überlebender Individuen im Versuchsarm mit der 90-prozentigen Leberteilresektion für die Tage 3 und 7 keine Aussagen von statistischer Signifikanz möglich. In der Literatur ist beschrieben, daß das Gewicht der Rattenleber einen Anteil von etwa 5 Prozent am Gesamtkörpergewicht haben kann, das ist doppelt so viel wie beim Menschen [63]. Bei den in diesem Experiment operierten Ratten reichte das Spektrum der anhand des Resektatgewichts extrapolierten Lebermassen von 4,11 bis 12,56 g (durchschnittlich 8,11 g). Dies entspricht einem Anteil am Gesamtkörpergewicht von 2,57 bis 5,83, durchschnittlich 4,14 Prozent.

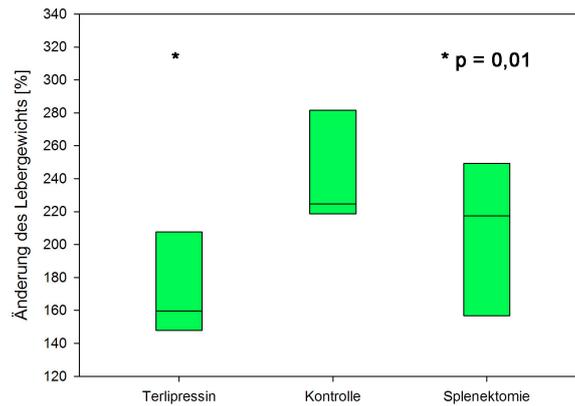


Abbildung 3. **Durchschnittliche Gewichtsänderung der regenerierenden Lebern** in der Gruppe der zu 70 Prozent hepatektomierten Tiere an Tag 7 in Prozent.

2.3. Milzgewicht. Die in der Splenektomiegruppe einzeitig mit der Hepatektomie entnommenen Milzen wurden gewogen, um das Normalgewicht vor dem Einsetzen der portalen Hypertension einschätzen zu können. Sie wogen durchschnittlich 0,6 g (0,4-0,8 g).

Am Versuchsende wurde das Gewicht der den Tieren der Kontroll- und Terlipressingruppe entnommenen Milzen ermittelt. Im Versuchsarm mit der 70-prozentigen Leberteileresektion war das Durchschnittsgewicht der am Operationstag als Nullwert entnommenen Organe aus der Splenektomiegruppe signifikant höher sowohl als das derjenigen aus der Kontroll- als auch aus der Terlipressingruppe an Tag 1 ($p = 0,001$; Abb. 4).

Ein ähnliches Bild zeigte sich im 90-Prozent-Versuchsarm an Tag 1: Auch hier war das Gewicht der einzeitig mit der Leberteileresektion entnommenen Milzen aus der Splenektomiegruppe signifikant höher als das der einen Tag später entnommenen Organe der Kontroll- und Terlipressingruppe ($p = 0,001$). Die Werte der Terlipressingruppe unterschieden sich dabei nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe (Abb. 4).

Für die übrigen Versuchstage ergaben sich hinsichtlich des Milzgewichts im 90-Prozent-Versuchsarm wie bereits zuvor keine weiteren signifikanten Unterschiede. Dagegen kehrten sich im 70-Prozent-Versuchsarm an Tag 7 die Verhältnisse in bezug auf den Nullwert um: Das ursprüngliche Gewicht der Milzen aus der Splenektomiegruppe war nun signifikant geringer als das Gewicht der Organe in der Kontrollgruppe ($p = 0,01$; Abb. 4). Das Gewicht der Milzen aus der Terlipressingruppe unterschied sich an diesem Endpunkt von keiner der anderen beiden Gruppen signifikant.

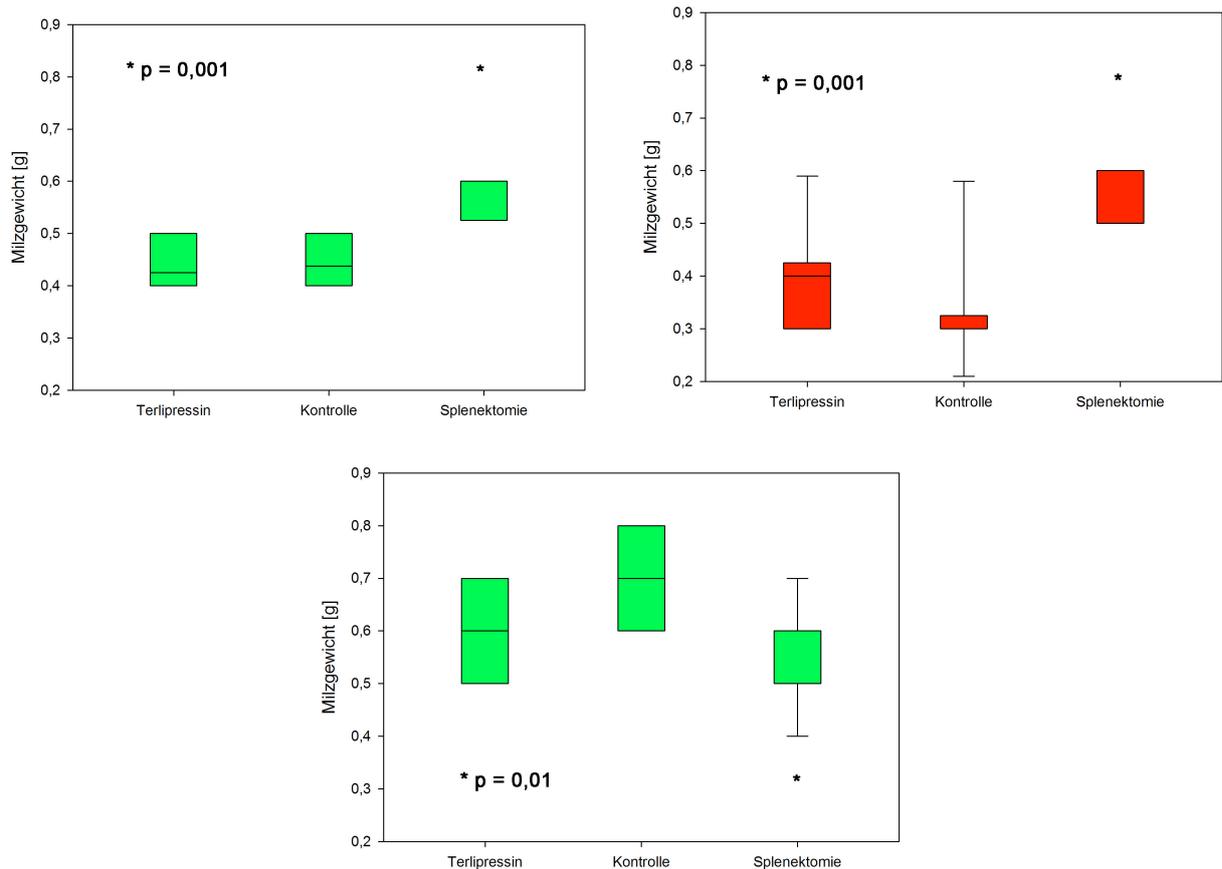


Abbildung 4. **Postoperative Änderung des Milzgewichts** bei den zu 70 Prozent (**Bild oben links**) und bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren an Tag 1 (**Bild oben rechts**) sowie bei den 70 Prozent leberteilresezierten Tieren an Tag 7 (**Bild unten**) in Prozent.

2.4. Pfortaderdruck. In keinem der beiden Arme konnte der am Versuchsendpunkt gemessene portalvenöse Druck in den Interventionsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant gesenkt werden. Die Werte lagen bei durchschnittlich 8 mm H₂O (3-15) für die zu 70 Prozent und bei durchschnittlich 13 mm H₂O (6-20) für die zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere.

2.5. Aszites. Aszites war bei den zu 70 Prozent leberteilresezierten Ratten zu keinem der drei Versuchsendpunkte vorhanden. Bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren jedoch fanden sich in der Peritonealhöhle von insgesamt zwei Dritteln aller Tiere makroskopisch sichtbare Aszitesmengen. Hierbei gab es einen Unterschied zwischen den Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe: Waren unter den jeweils 13 überlebenden Tieren, die mit Terlipressin oder Splenektomie behandelt worden waren, in beiden Fällen fünf Tiere (ca. 38 Prozent) frei von Aszites, waren es in der Kontrollgruppe unter den ebenfalls insgesamt 13 überlebenden Individuen nur drei Tiere (ca. 23 Prozent). Das geforderte Signifikanzniveau wurde damit jedoch

nicht erreicht. Auch ein Vergleich der auf einen halben Milliliter genau gemessenen Aszitesmengen der Tiere an Tag 1 erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Terlipressin-, Splenektomie- und Kontrollgruppe.

2.6. Dünndarmhyperämie. Bei den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im Vergleich der Hyperämie-Scores. Diese lagen mit einem Durchschnittswert aller Gruppen von 1,7 an Tag 1 deutlich unter dem Durchschnitt der zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere von 2,3. An Tag 3 war dieser Wert bei den Tieren mit 70-prozentiger Leberteilresektion bereits auf 1,5 gesunken, an Tag 7 konnten überhaupt keine Zeichen von Dünndarmhyperämie mehr festgestellt werden. Dagegen gab es im Versuchssarm mit der 90-prozentigen Leberteilresektion an Tag 1 deutliche Unterschiede. Hier erhielten die mit Terlipressin behandelten Tiere verglichen mit den Tieren aus der Kontrollgruppe signifikant niedrigere Werte ($p = 0,016$), während sich die splenektomierten Tiere in diesem Parameter nicht von der Kontrollgruppe unterschieden (Abb. 5). Dies setzte sich als Tendenz an Tag 3 fort, war jedoch statistisch nicht signifikant. Alle drei überlebenden Individuen an Tag 7 — aus jeder Gruppe stammte jeweils ein Tier — waren vollständig frei von klinischen Zeichen der Dünndarmhyperämie.

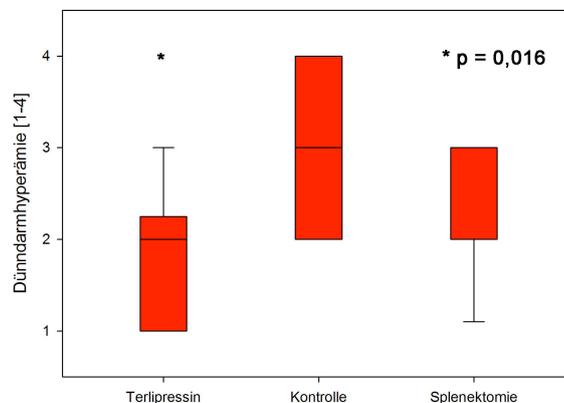


Abbildung 5. Verteilung der Scorewerte für Dünndarmhyperämie bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren an Tag 1.

3. Laborparameter

Wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, wurde den Tieren am Versuchsende Blut aus der Aorta entnommen, um anhand laborchemischer Parameter die Synthese- und Detoxifikationsfähigkeit der regenerierenden Lebern einzuschätzen.

3.1. Kreatinin. Hinsichtlich der Kreatinin-Werte konnten weder im 70– noch im 90-Prozent-Versuchsarm zu einem der Versuchsendpunkte signifikante Unterschiede zwischen Interventions– und Kontrollgruppen festgestellt werden.

3.2. Bilirubin. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für das konjugierte Bilirubin.

Anders beim Gesamtbilirubin: Hier gab es einen einzigen statistisch signifikanten Unterschied. Die Werte der einer 70-prozentigen Leberteilresektion unterzogenen Tiere waren an Tag 7 in der Terlipressin– höher als in der Kontrollgruppe ($p = 0,02$; Abb. 6). An den übrigen Versuchstagen wie auch im anderen Versuchsarm gab es keine gleich– oder gegensinnigen Unterschiede auf Signifikanzniveau.

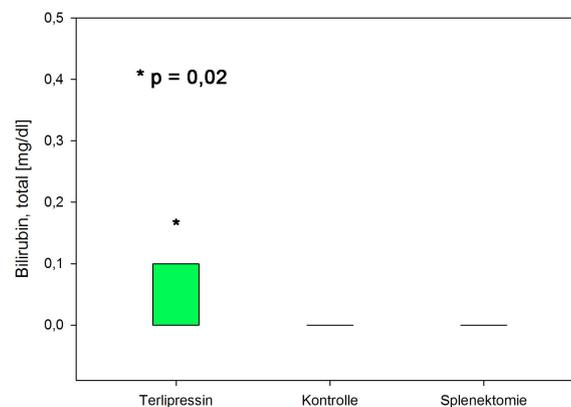


Abbildung 6. **Werte für Gesamtbilirubin** der zu 70 leberteilresezierten Tiere an Tag 7.

3.3. Harnstoff. Die Werte für Harnstoff ergaben mehrfach Unterschiede zwischen Interventions– und Kontrollgruppen: Bei den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren lagen diese Werte an Tag 7 sowohl in der Terlipressin– ($p = 0,041$) als auch in der Splenektomiegruppe ($p = 0,009$) signifikant über denen der Kontrollgruppe (Abb. 7). An den anderen beiden Versuchsendpunkten, den Tagen 1 und 3, waren statistisch signifikante Unterschiede nicht vorhanden. Im Gruppenvergleich der zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 1 unterschieden sich die Interventionsgruppen zwar nicht signifikant von der Kontrollgruppe, jedoch voneinander ($p = 0,001$). Wie im anderen Versuchsarm waren die Werte der Terlipressingruppe hierbei deutlich erhöht (Abb. 7).

3.4. Protein. Die Werte für den Parameter Protein zeigten bei den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren an den Versuchstagen 1 und 3 keine signifikanten Unterschiede. An Tag 7

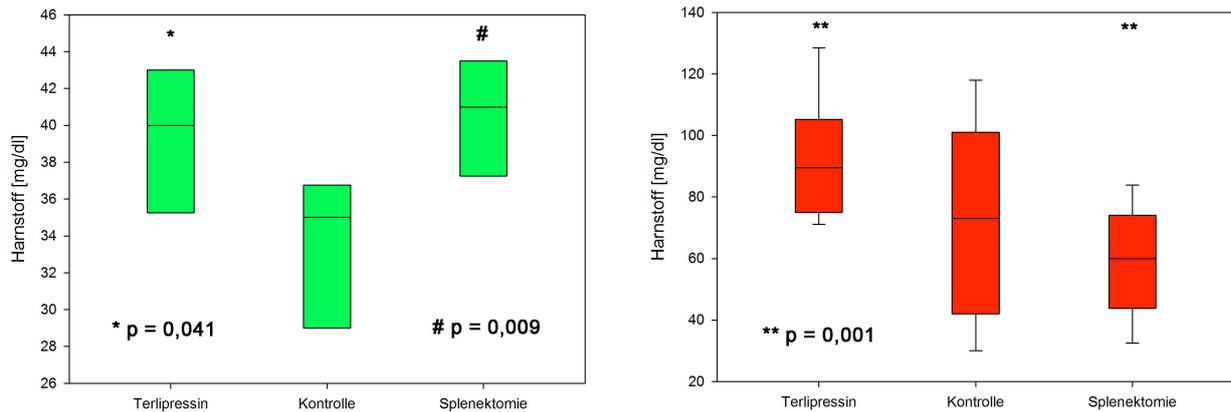


Abbildung 7. **Harnstoffwerte** der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 7 (**Bild links**) und der zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 1 (**Bild rechts**).

waren die Proteinwerte in den Interventionsgruppen niedriger als in der Kontrollgruppe, allerdings erreichte nur der Unterschied zwischen den mittels Splenektomie behandelten Tieren und denen aus der Kontrollgruppe hierbei das festgelegte Signifikanzniveau ($p = 0,05$; Abb. 8).

Nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion waren die Verhältnisse an Tag 1 genau entgegengesetzt: Hier lagen die Werte für Protein in den Interventionsgruppen höher als in der Kontrollgruppe; nur die Terlipressingruppe unterschied sich darin jedoch signifikant von der Kontrollgruppe ($p = 0,024$; Abb. 8).

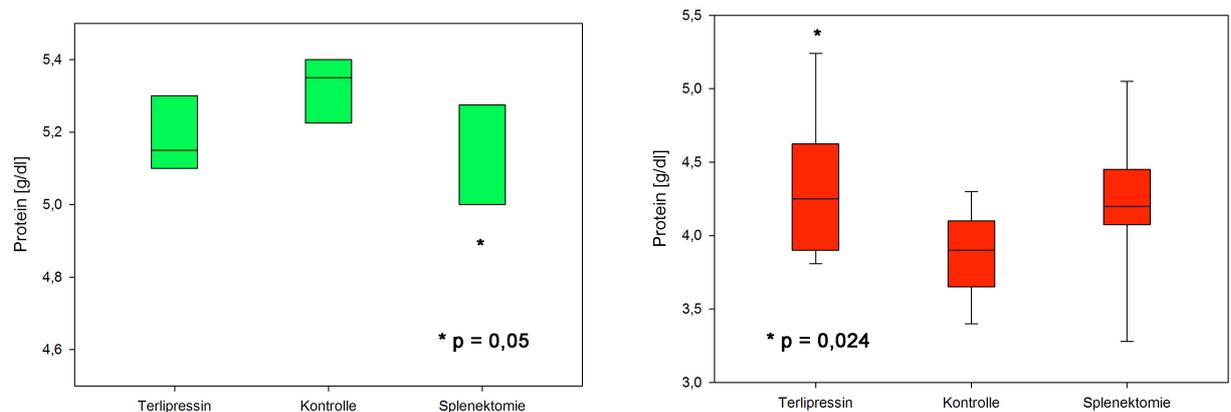


Abbildung 8. **Proteinwerte** der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 7 (**Bild links**) sowie der zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 1 (**Bild rechts**).

3.5. Albumin. Beim Parameter Albumin gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Tiere aus der Terlipressin- und der Kontrollgruppe mit einer 70-prozentigen Leberteilresektion an Tag 3 ($p = 0,001$; Abb. 9). Weder an den Tagen 1 und 7 noch

im Versuchsarm mit der 90-prozentigen Leberteileresektion wurden weitere statistisch signifikante Unterschiede gefunden. Die niedrigeren Albuminwerte der Terlipressingruppe an Tag 3 entsprechen den tendenziell ebenfalls niedrigeren Proteinwerten zum gleichen Versuchsendpunkt. Dieser Unterschied verfehlte das geforderte Signifikanzniveau jedoch ($p = 0,628$; vgl. Abb. 9).

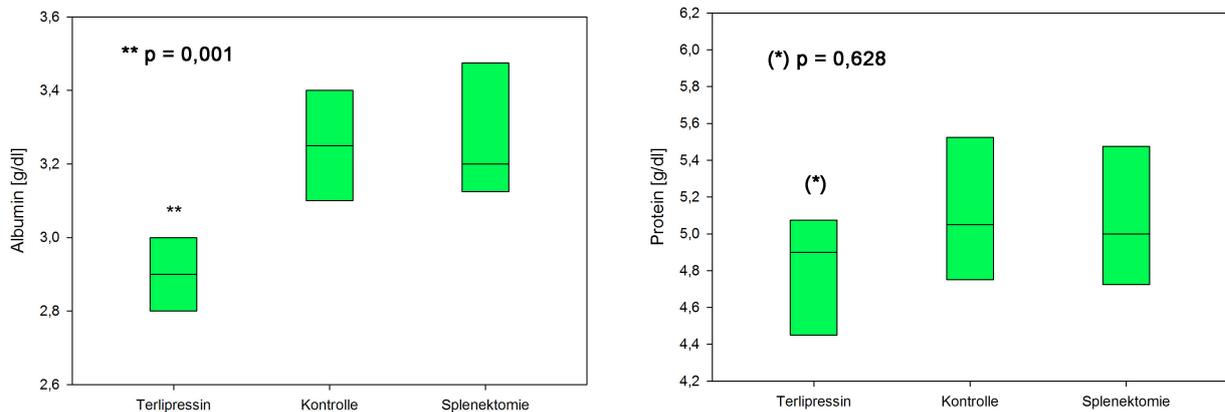


Abbildung 9. **Albuminwerte** der zu 70 Prozent leberteilesezierten Tiere an Tag 3 (**Bild links**) und die **Proteinwerte** derselben Gruppe (**Bild rechts**).

3.6. Quick-Wert (Thromboplastin-Zeit). Der Quick-Wert war unmittelbar postoperativ in allen Gruppen gleichermaßen und deutlich erniedrigt, hatte jedoch an den beiden folgenden Versuchsendpunkten wieder zugelegt. Hierbei gab es statistisch signifikante Unterschiede bei den zu 70 Prozent leberteilesezierten Tieren an den Tagen 3 und 7: Die Werte waren an Tag 3 in der Terlipressingruppe niedriger als in der Kontrollgruppe ($p = 0,001$; Abb. 10), ebenso an Tag 7 ($p = 0,049$; Abb. 10). Bereits am ersten Versuchstag war dieser Unterschied als Tendenz zu erkennen, ohne jedoch das geforderte Signifikanzniveau zu erreichen ($p = 0,576$; Abb. 10).

Die Tiere der Splenektomiegruppe erreichten an allen drei Versuchstagen Werte, die denen der Kontrollgruppentiere nahekamen.

Nach einer 90-prozentigen Leberteileresektion konnten hinsichtlich des Quick-Wertes für keinen Versuchstag statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

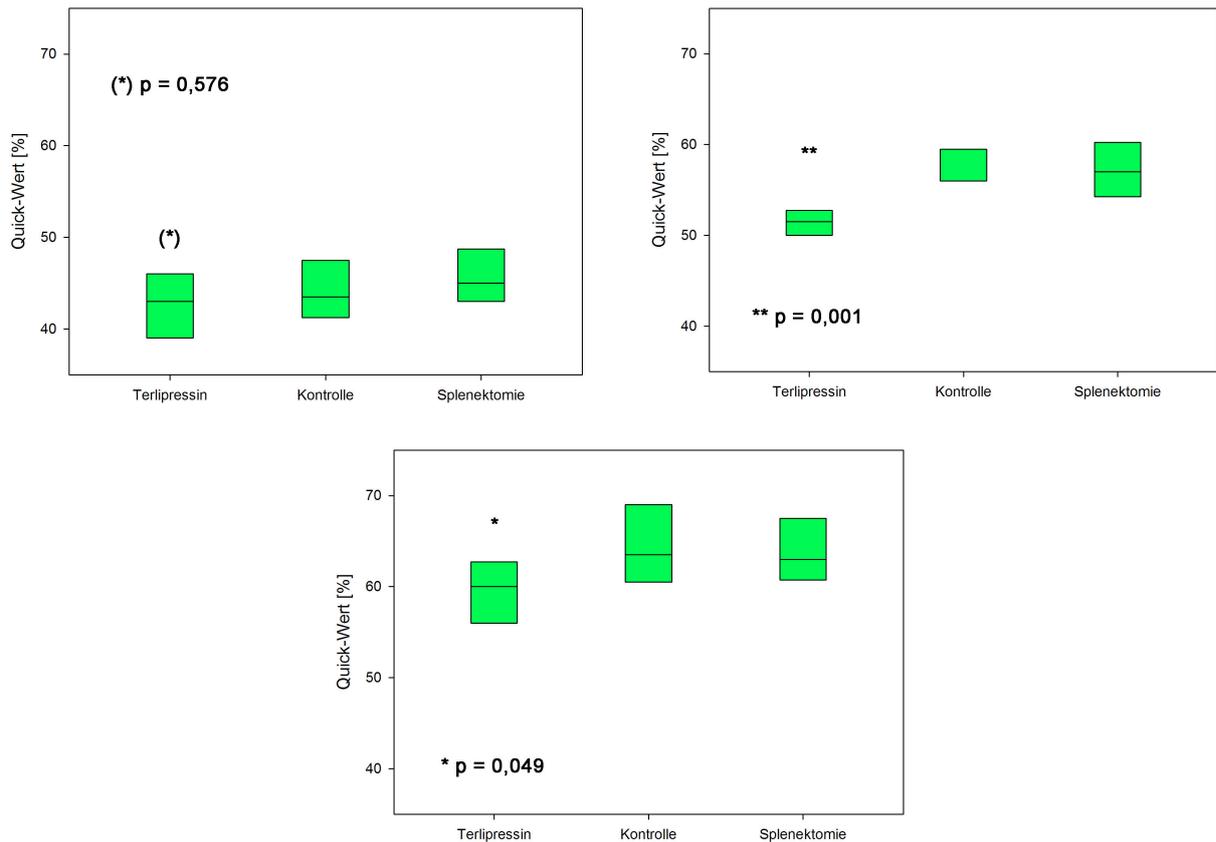


Abbildung 10. **Quick-Werte** der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere an den postoperativen Tagen 1 (**Bild oben links**), 3 (**Bild rechts oben**) und 7 (**Bild unten**).

4. Histologische Untersuchung

4.1. Quantitative Untersuchungen: Immunhistochemische Färbungen.

4.1.1. *Ki-67*. Hinsichtlich der Ki-67-Signale gab es im 90-Prozent-Versuchsarm keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion jedoch konnte an den Tagen 1 und 7 festgestellt werden, daß die mit Terlipressin behandelten Tiere signifikant höhere Werte als die Tiere der Kontrollgruppe erreichten ($p = 0,022$ für Tag 1; $p = 0,019$ für Tag 7). Dagegen ähnelten die Werte der Tiere aus der Splenektomiegruppe zu allen Versuchsendpunkten denen der Kontrollgruppe (Abb. 11). Am Versuchsendpunkt Tag 3 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe. Interessant ist in diesem Fall ein Blick auf den Verlauf dieses Parameters in der Zusammenschau der drei Gruppen von Tieren mit der 70-prozentigen Leberteilresektion (Abb. 11): Während die Expression von Ki-67 in den Hepatozyten der Tiere sowohl aus der Splenektomie- als auch der Kontrollgruppe am ersten postoperativen Tag weit unter dem Niveau der Terlipressingruppe liegt und im Verlauf zunächst zunimmt, zeigt sich bei

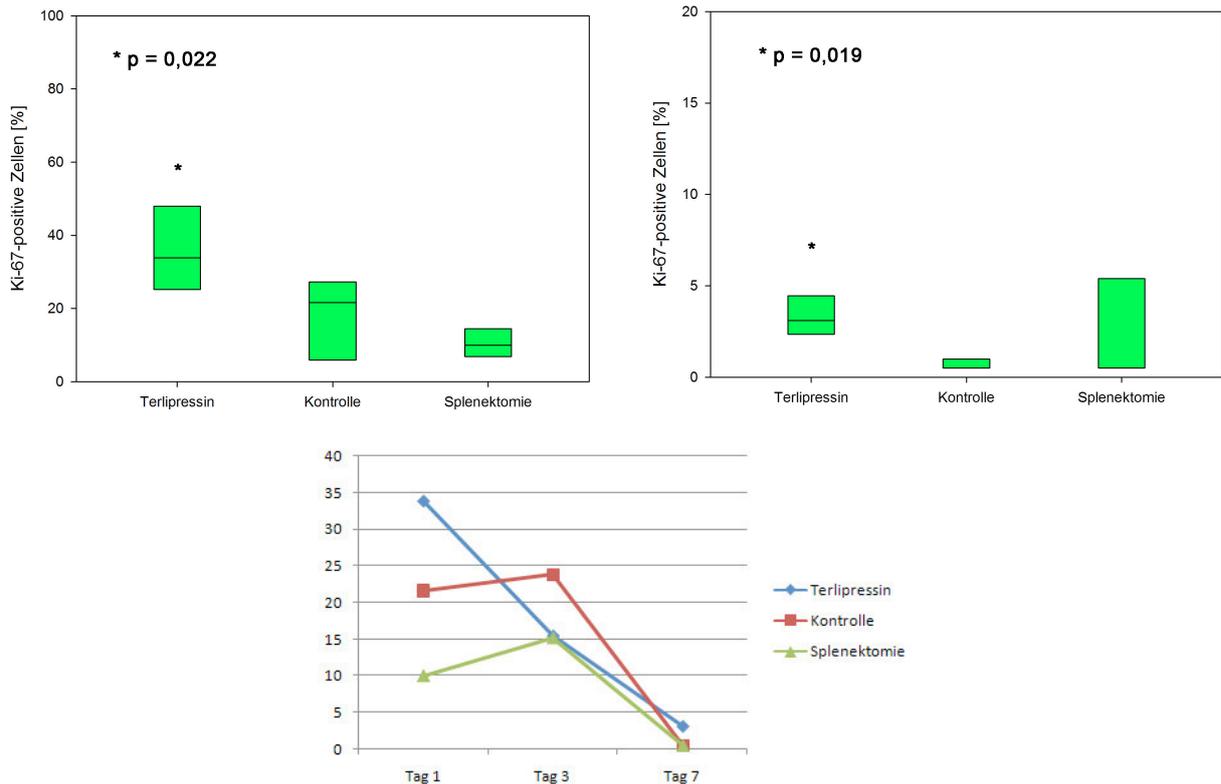


Abbildung 11. **Zahl der Ki-67-Signale pro 100 parenchymale Zellkerne** der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere an den Tagen 1 (**Bild oben links**) und 7 (**Bild oben rechts**) sowie im Verlauf über alle drei Versuchszeitpunkte hinweg (**Bild unten**).

der Terlipressingruppe eine ganz andere Entwicklung mit einem frühen Erreichen eines hohen Expressionsniveaus und einem steten Abfall bis zum Tag 7, an dem die Werte dieser Gruppe für den Anteil der Ki-67-Signale an der Gesamtzellzahl, zwar in einer kleineren Dimension, aber dennoch signifikant über den Werten der Kontroll- und der Splenektomiegruppe liegen (vgl. auch Abb. 12).

4.1.2. *BrdU*. Die Zahl BrdU-positiver Zellkerne pro 100 parenchymale Zellen erbrachte Unterschiede auf Signifikanzniveau nur im Fall der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 3: Hier zeigten die Präparate der mit Terlipressin behandelten Tiere signifikant mehr Signale als die der Kontrollgruppentiere ($p = 0,05$; Abb. 13). An Tag 1 hatten die Organe der Kontroll- und der Terlipressingruppentiere ein ähnlich hohes Expressionsniveau für BrdU-Signale, das sich allerdings nicht signifikant von dem niedrigeren Niveau der Splenektomiegruppe unterschied. An Tag 7 waren in allen Gruppen kaum noch Zellteilungen nachweisbar (Abb. 14).

4.1.3. *Zusammenschau BrdU und Ki-67*. Um den Anteil der tatsächlich stattgehabten Zellteilungen an den potentiell teilungsfähigen Zellen zu bestimmen, wurde der Quotient aus den

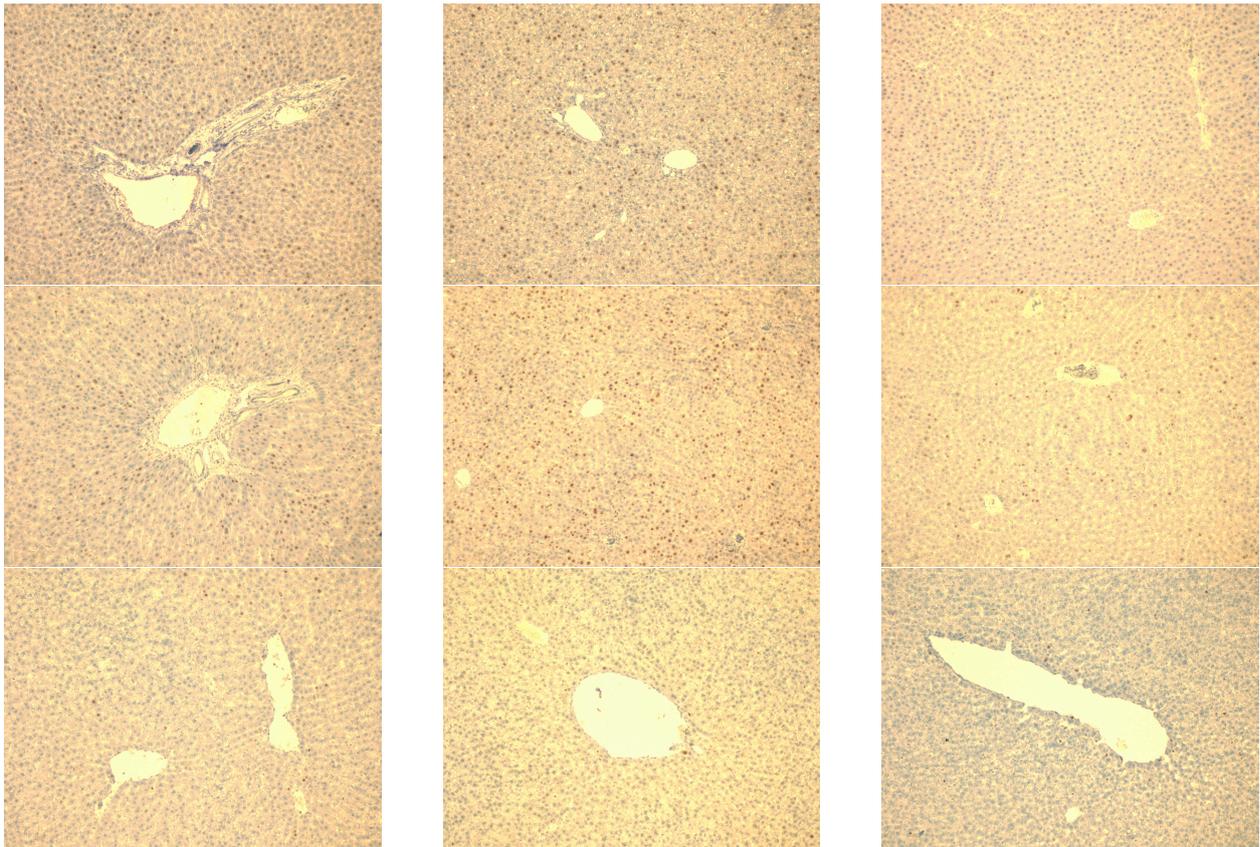


Abbildung 12. **Histologisches Bild nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion in der Ki-67-Färbung:** Repräsentative Bilder der Terlipressin-, Kontroll- und Splenektomiegruppen (von links nach rechts) an den Versuchsendpunkten Tag 1 (obere Reihe), Tag 3 (mittlere Reihe) und Tag 7 (untere Reihe). Die Ki-67-positiven Zellen zeigen einen dunkelbraunen Zellkern. *40-fache Vergrößerung.*

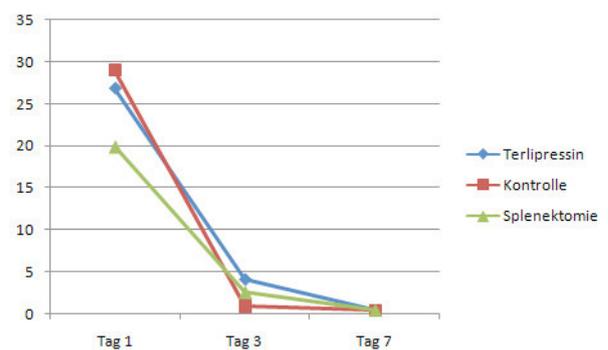
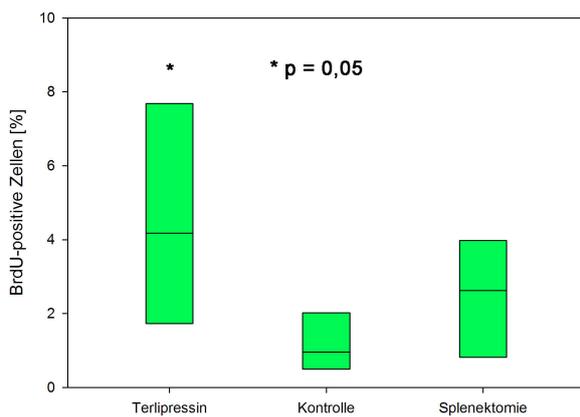


Abbildung 13. **Zahl der BrdU-Signale pro 100 parenchymale Zellkerne** der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere an Tag 3 (**Bild links**) und im Verlauf über alle drei Versuchsendpunkte hinweg (**Bild rechts**).

Anteilen der ausgezählten Signale beider Färbungen an der Gesamtzellzahl gebildet:

$$(3) \quad \frac{BrdU}{Ki - 67}$$

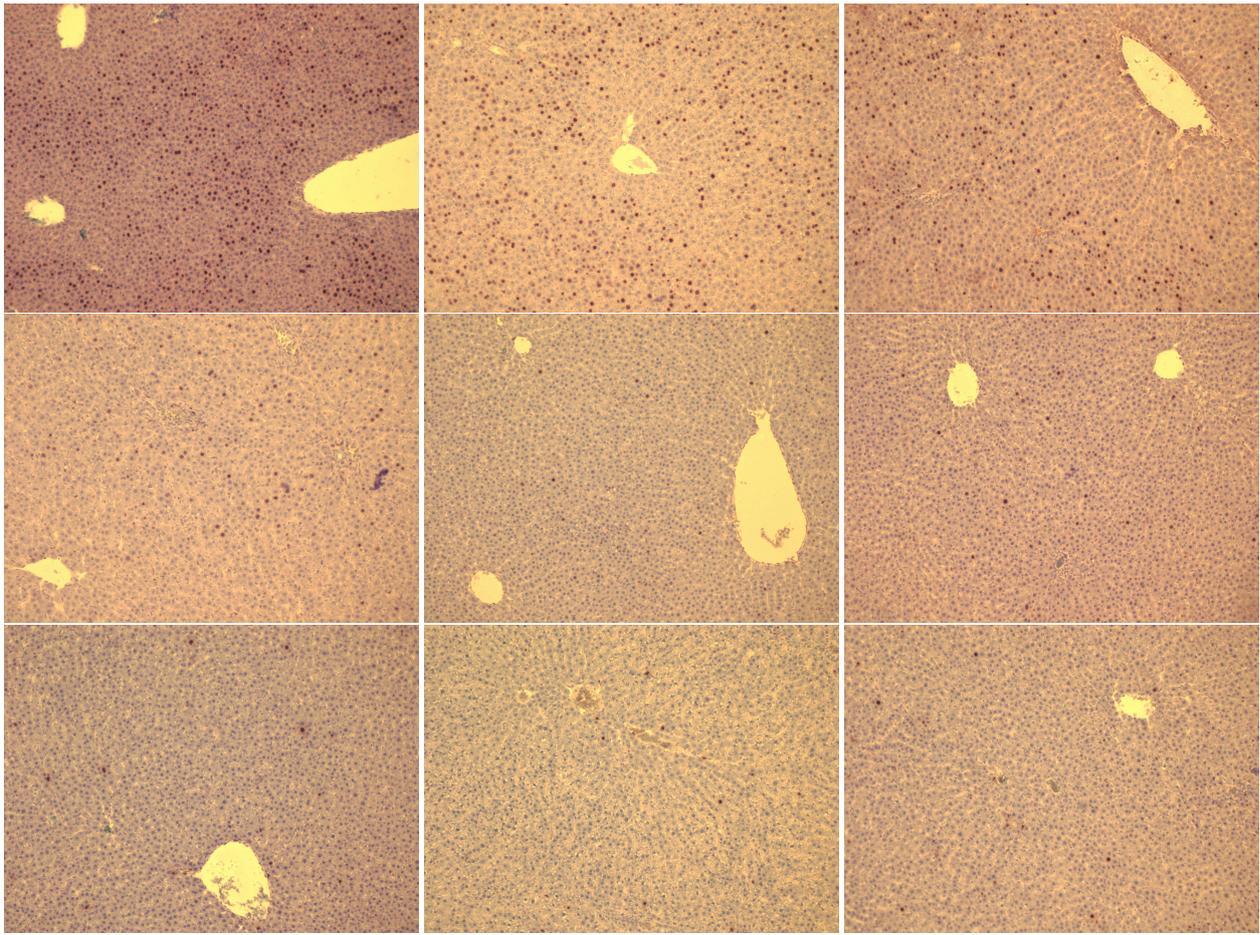


Abbildung 14. **Histologisches Bild nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion in der BrdU-Färbung:** repräsentative Bildausschnitte der Terlipressin-, Kontroll- und Splenektomiegruppe (von links nach rechts) zu den Versuchsendpunkten Tag 1 (**obere Reihe**), Tag 3 (**mittlere Reihe**) und Tag 7 (**untere Reihe**). Die BrdU-positiven Zellen zeigen einen braun-schwarzen Zellkern. *40-fache Vergrößerung.*

Während für den 90-Prozent-Versuchsarm erneut keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten, fielen unter den Werten der Tiere mit der 70-prozentigen Leberteilresektion wiederum diejenigen der Terlipressingruppe auf. Die Beträge dieses Quotienten ähnelten sich in allen drei Gruppen an Tag 1, doch gab es an den Tagen 3 und 7 signifikante Unterschiede zwischen Terlipressin- und Kontrollgruppe. Allerdings standen diese Unterschiede unter entgegengesetzten Vorzeichen: Während die Werte der Terlipressingruppe an Tag 3 signifikant über denen der Kontrollgruppe lagen ($p = 0,024$; Abb. 15), lagen sie an Tag 7 signifikant darunter ($p = 0,001$; Abb. 15). Wiederum ähnelten die Werte der Splenektomiegruppe in Höhe und Verlauf denen der Kontrollgruppe.

4.2. Qualitative Untersuchungen.

4.2.1. *Blutstauung und sinusoidale Dilatation.* Am Versuchsendpunkt Tag 1 zeigten fast alle Präparate beider Versuchsarme eine ausgesprägte sinusoidale Dilatation, die in der Gegend

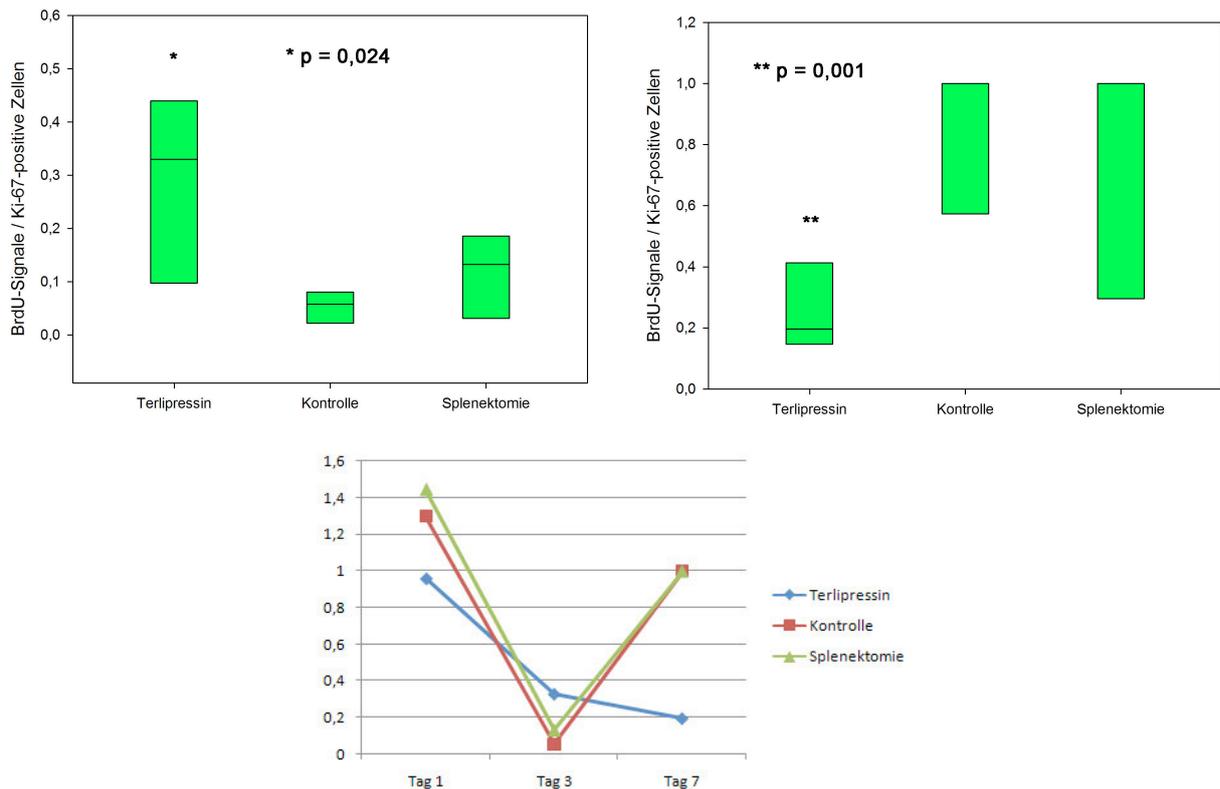


Abbildung 15. Werte für den Quotienten aus BrdU- und Ki-67-Signalen nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion an den Tagen 3 (**Bild oben links**), und 7 (**Bild oben rechts**) sowie im Verlauf über den gesamten Versuchszeitraum hinweg (**Bild unten**).

der Zentralvenen betont war. Mit steigendem zeitlichen Abstand zur Hepatektomie sank gruppenübergreifend die Inzidenz dilatierter Sinusoide im histologischen Bild (Abb. 16). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen gab es hierbei zu keinem Zeitpunkt.

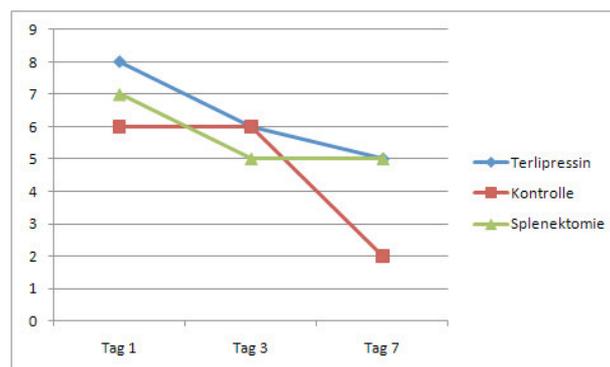


Abbildung 16. Anzahl der Tiere mit histologisch sichtbarer sinusoidaler Dilatation der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere über den gesamten Versuchszeitraum.

Die Berliner-Blau-Färbung zeigte pathologische Eisenpigment-Ablagerungen, neben der sinusoidalen Dilatation ein weiteres Stauungszeichen, sowohl bei den zu 70 als auch bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren an allen drei Versuchsendpunkten und über alle

Gruppen hinweg. Das Pigment fand sich vorwiegend im subkapsulären Bereich, entlang bindegewebiger Straßen und im subendothelialen Raum der Zentralvenen (Abb. 17). Träger des

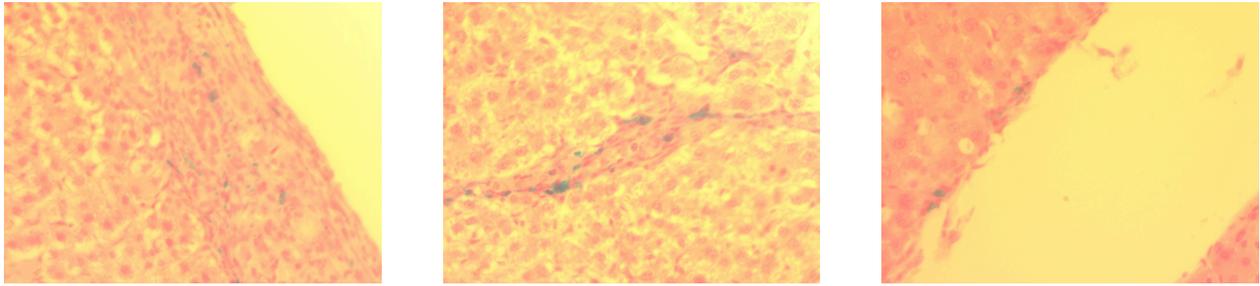


Abbildung 17. **Pathologische Ablagerungen von Eisenpigment** (blau angefärbt) waren vorwiegend im subkapsulären Bereich (**linkes Bild**), entlang bindegewebiger Straßen (**mittleres Bild**) und im subendothelialen Raum der Zentralvenen (**rechtes Bild**) lokalisiert. *Berliner-Blau-Färbung, 100-fache Vergrößerung.*

intrazellulären Pigments (Hämosiderin) waren, anders als bei den verschiedenen Formen der Hämochromatose, nicht die Hepatozyten, sondern die Makrophagen der Leber (Kupffersche Sternzellen). Die in der Literatur verwendeten histologischen Scores beziehen sich auf Muster von Eisenablagerungen in Hepatozyten im Rahmen von Eisenspeicherkrankheiten und ließen sich auf die Präparate des vorliegenden Versuchs nicht anwenden. Diese wurden zur Auswertung stattdessen in zwei Gruppen unterteilt, je nachdem, ob anfärbbares Pigment vorhanden war oder nicht. Unter den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren gehörten die meisten Tiere, in deren Lebern sich dieses Pigment fand, der Kontrollgruppe an und waren den Versuchstagen 1 und 3 zugeordnet, während sich nach einer Woche beziehungsweise unter den mit Terlipressin wie auch mit Splenektomie behandelten Tieren weniger oder überhaupt keine Eisenablagerungen nachweisen ließen (Abb. 18). Signifikant mehr Tiere mit diesen pathologischen Eisen-Ablagerungen hatte die Kontrollgruppe gegenüber den Interventionsgruppen an den Versuchsendpunkten Tag 1 ($p = 0,026$ für den Vergleich von Kontroll- und Splenektomiegruppe; zwischen Kontroll- und Terlipressingruppe wurde das vorab festgelegte Signifikanzniveau nicht erreicht) und Tag 3 ($p = 0,007$ für den Vergleich zwischen Kontroll- und Terlipressin-Gruppe; $p = 0,04$ für den Vergleich zwischen Kontroll- und Splenektomiegruppe). Sieben Tage nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion war derselbe Unterschied zwar noch vorhanden, jedoch nicht mehr statistisch signifikant (Abb. 18).

Im Versuchsarm mit der 90-prozentigen Leberteilresektion waren wegen der geringeren Zahl überlebender Individuen an den späteren Versuchsendpunkten nur die Ergebnisse von Tag 1 statistisch verwertbar. Nach dieser extensiveren Leberteilresektion ähnelten die Werte der mit Terlipressin behandelten Tiere denen der Kontrollgruppentiere stark (Abb. 19). Von

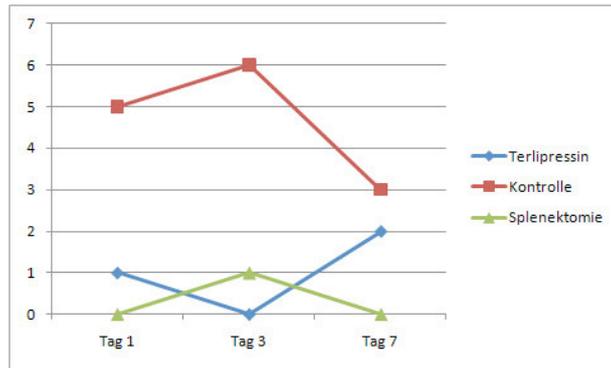


Abbildung 18. **Anzahl der Tiere mit nachweisbaren Eisenpigment-Ablagerungen in der Residualleber** nach einer 70-prozentigen Leberteileresektion über den gesamten Versuchszeitraum.

diesen beiden Gruppen unterschied sich die Splenektomiegruppe jedoch mit einer signifikant geringeren Zahl an Tieren, bei denen pathologische Eisenpigment-Ablagerungen in der Residualleber nachweisbar waren ($p = 0,01$ verglichen mit der Kontroll- und $p = 0,03$ verglichen mit der Terlipressingruppe).

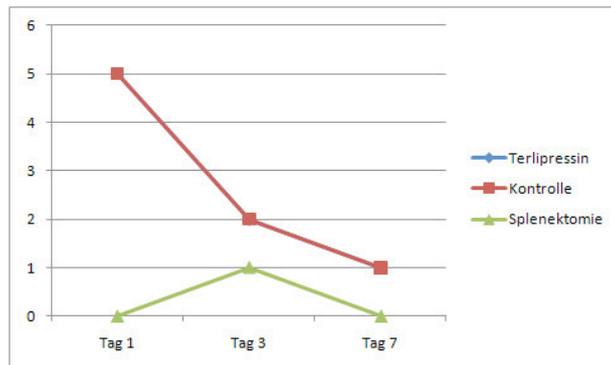


Abbildung 19. **Anzahl der Tiere mit nachweisbaren Eisenpigment-Ablagerungen in der Residualleber** nach einer 90-prozentigen Leberteileresektion. Von den anfänglich zehn Individuen pro Gruppe lebten am Versuchsendpunkt Tag 3 noch zwei (Interventionsgruppen) beziehungsweise drei Tiere (Kontrollgruppe); an Tag 7 lebte aus jeder Gruppe nur noch jeweils ein Tier. Der Graph der Terlipressingruppe ist identisch mit dem der Kontrollgruppe.

4.2.2. *Steatose*. In keinem der Präparate von Tieren der Kontroll- oder Interventionsgruppen waren einen Tag nach einer 90-prozentigen Leberteileresektion verfettete Hepatozyten zu finden, hingegen bei sämtlichen Tieren desselben Versuchsarms, die an den Versuchsendpunkten Tag 3 und 7 noch lebten. Dagegen zeigten die Lebern aller Tiere nach einer 70-prozentigen Leberteileresektion zu allen drei Versuchsendpunkten (Tag 1, 3 und 7) eine unterschiedlich stark ausgeprägte Verfettung. Unter allen 82 Präparaten mit verfetteten Hepatozyten

war eine Steatose dritten Grades (mehr als 66 Prozent der Hepatozyten betroffen) die häufigste Form (52,4 Prozent), gefolgt von der Steatose zweiten (33-66 Prozent aller Hepatozyten betroffen bei 30,5 Prozent dieser Tiere) und ersten Grades (5-33 Prozent aller Hepatozyten verfettet; 17,1 Prozent der Tiere). Auffällig war die Verteilung der Steatosegrade auf die Versuchsendpunkte: Der durchschnittliche Schweregrad der Verfettung nahm mit wachsendem zeitlichen Abstand zur Operation zu (Abb. 20). Die räumliche Verteilung verfetteter Hepatozyten

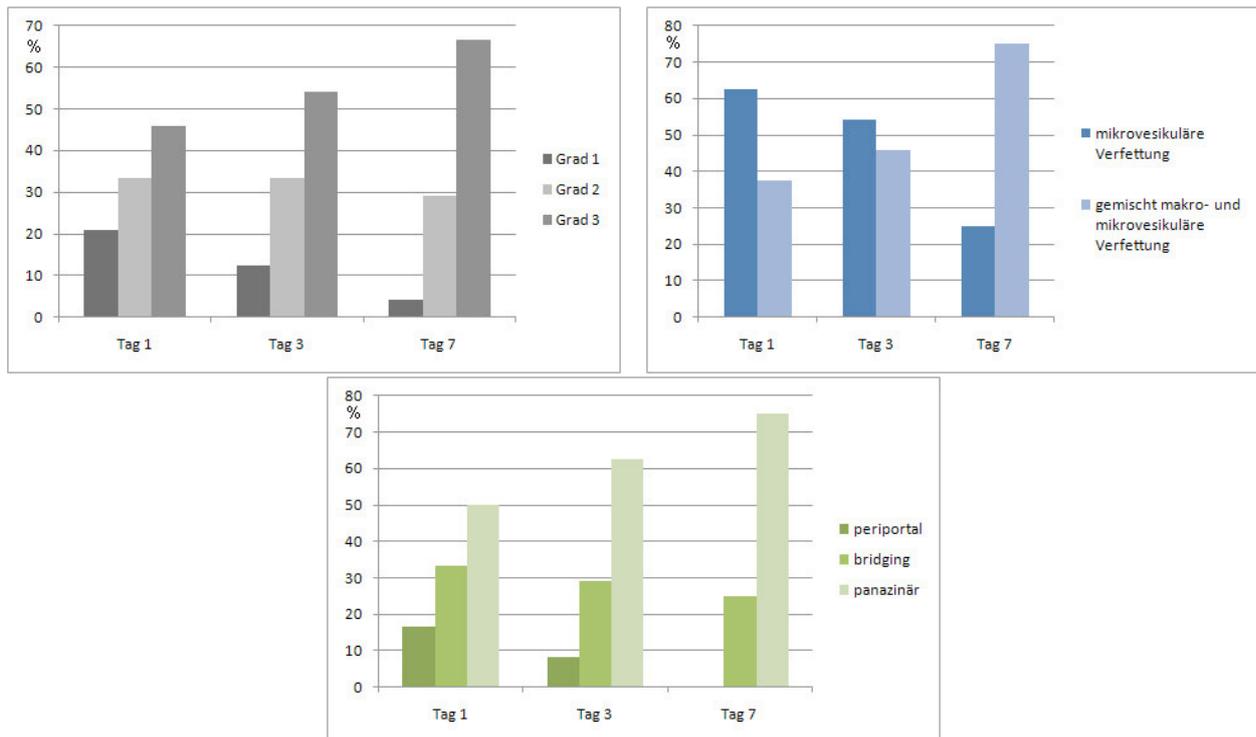


Abbildung 20. **Entwicklung der hepatozellulären Steatose** nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion. Mit wachsendem zeitlichem Abstand zur Hepatektomie wurden tendenziell höhergradige Steatosen im histologischen Bild der Residuallebern beobachtet (**Bild oben links**). In gleicher Weise änderten sich sowohl die Art der Steatose über die Zeit von einem mikrovesikulären hin zu einem gemischt mikro- und makrovesikulären Bild (**Bild oben rechts**) als auch die vorherrschende Lokalisation steatotischer Hepatozyten ausgehend von der periportalen Region über porto-portale Verbindungen (*bridging*) hin zu einer panazinären Verteilung (**Bild unten**). Unterschiede zwischen den Gruppen gab es hinsichtlich dieser drei Merkmale nicht. Dargestellt sind kumulativ die Werte der zu 70 Prozent hepatektomierten Tiere.

ging vom Portalfeld aus mit einer Beschränkung auf die periportale Region bei 11 Prozent, mit Verbindungsstraßen (*bridging*) zwischen den Portalfeldern bei 29,3 Prozent und einer Einbeziehung des gesamten Leberazinus bei der Mehrzahl der Präparate (59,7 Prozent). Auch hier, analog zum Schweregrad der Steatose, gab es eine Tendenz von der lokalisiert-periportalen zur panazinären Verbreitung der betroffenen Hepatozyten mit wachsendem zeitlichem Abstand zur Operation (Abb. 20).

Die überwiegenden Formen der in den Präparaten erkennbaren Verfettung, so vorhanden (n = 82), waren eine mikrovesikuläre (47,6 Prozent) beziehungsweise gemischt mikro- und makrovesikuläre Steatose (52,4 Prozent). Eine reine makrovesikuläre Verfettung trat nicht auf. Die Art der Steatose änderte sich über die drei Versuchsendpunkte hinweg mit einer Tendenz von einer eher mikrovesikulären hin zu einer Mischform aus mikro- und makrovesikulärer Steatose (Abb. 20).

Die Lebern der zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere zeigten an den Versuchsendpunkten Tag 1 und 3 überhaupt keine steatotischen Hepatozyten, jedoch war eine panazinäre, gemischt mikro- und makrovesikuläre Verfettung dritten Grades bei allen drei an Tag 7 überlebenden Tieren (aus jeder Gruppe stammte wie bereits beschrieben ein Tier) sichtbar.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Interventionsgruppen hinsichtlich Grad, Art oder Lokalisation der Steatose gab es weder bei den zu 70 Prozent noch bei den zu 90 Prozent hepatektomierten Tieren zu einem der drei Versuchsendpunkte.

4.2.3. *Zelluntergang und Entzündung.* In insgesamt nur fünf Präparaten der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere (n = 72) fanden sich Councilman-Körperchen, das Zeichen von Einzelzelluntergängen einer kritisch belasteten Leber. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gab es dabei nicht. Bei den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren dagegen waren am ersten postoperativen Tag neben dem bereits erwähnten völligen Fehlen von Steatose-Zeichen in allen Präparaten Councilman-Körperchen zu finden (Abb. 21). An Tag 3 waren diese nur noch in knapp der Hälfte der wenigen Präparate zu konstatieren; die Lebern der drei nach einer Woche noch lebenden Tiere mit einer 90-prozentigen Leberteilresektion waren komplett frei davon. Auch in diesem Versuchsarm verfehlten die Unterschiede zwischen den Gruppen das geforderte Signifikanzniveau. Entzündungszeichen waren in den Gebieten von Verfettung und Zelluntergang nicht zu finden.

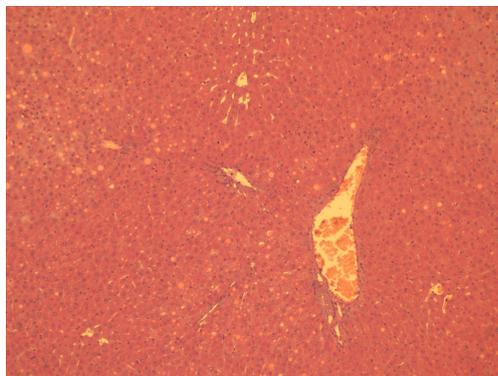


Abbildung 21. **Eosinophile Councilman-Körperchen (Apoptosen)** nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion. *HE-Färbung, 40-fache Vergrößerung.*

KAPITEL 4

Diskussion

Zusammenfassung der Ergebnisse. Die erste grundlegende Arbeitshypothese dieser Arbeit, daß Terlipressinggabe oder Splenektomie den Pfortaderdruck nach extensiver Leberteilresektion senken, konnte nicht belegt werden.

Weiterhin fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen hinsichtlich der Parameter Überleben, Verhältnis von Regeneratgewicht zum Körpergesamtgewicht am Versuchsendpunkt, Vorhandensein und Menge von Aszites, Kreatinin, konjugiertes Bilirubin, sowie den histologischen Zeichen von sinusoidaler Dilatation, hepatozellulärer Steatose, Zelluntergang und Inflammation.

Anhand der übrigen untersuchten Parameter biometrischer, laborchemischer und histologischer Art jedoch können für die beiden Interventionsgruppen in Abgrenzung zur Kontrollgruppe folgende Profile erstellt werden:

Die Tiere der **Terlipressinggruppe** zeigten nach 70-prozentiger Leberteilresektion an Tag 7 eine geringere Gewichtszunahme der regenerierenden Lebern und am gleichen Tag keine signifikant schwerere Milz als vor der Operation. Das Gesamtbilirubin an Tag 7 war erhöht, ebenso der Harnstoffwert. Die mit Terlipressin behandelten Tiere hatten nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion tendenziell niedrigere Protein- und Albuminwerte. Signifikant war dieser Unterschied für Albumin an Tag 3. Ebenso folgte auf die Behandlung mit Terlipressin charakteristischerweise ein niedrigerer postoperativer Quickwert, hierbei wurde an den Tagen 3 und 7 das Signifikanzniveau erreicht.

Im histologischen Bild zeigten sich bei den mit Terlipressin behandelten Tieren sowohl signifikant mehr teilungsbereite Zellen (Tag 1 und 7, Ki-67-Färbung) als auch mehr tatsächlich stattgehabte Zellteilungen (Tag 3, BrdU). In der Zusammenschau dieser beiden Färbungen — dargestellt als Anteil von tatsächlichen Zellteilungen an der Fraktion teilungsbereiter Zellen entsprechend einem Quotienten aus BrdU- und Ki-67-Signalen — ergibt sich in eine völlig andere Dynamik im Prozeß der Erhöhung der Zellzahl in den regenerierenden Lebern: Im Gegensatz zur Kontrollgruppe setzte dieser bei den mit Terlipressin behandelten Tieren zu einem früheren Zeitpunkt ein, fiel stetig ab und schien an Tag 7 weitgehend abgeschlossen zu sein. Es waren

bei den Tieren aus der Terlipressingruppe weniger pathologische Eisenpigmentablagerungen als in der Kontrollgruppe zu finden; an Tag 3 war dieser Unterschied signifikant.

Nach 90-prozentiger Leberteileresektion konnte bei den mit Terlipressin behandelten Tieren an Tag 1 ein signifikant höherer Gewinn an Körpergewicht verzeichnet werden. Der durchschnittlich erzielte Score für Dünndarmhyperämie war niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Harnstoffwerte lagen an Tag 1 signifikant über denen der Splenektomie-, nicht jedoch der Kontrollgruppe. Die Proteinwerte waren an Tag 1 signifikant höher.

Die Tiere der **Splenektomiegruppe** unterschieden sich nach 70-prozentiger Leberteileresektion von denen der Kontrollgruppe signifikant durch höhere Harnstoffwerte an Tag 7, niedrigere Proteinwerte am gleichen Tag, weniger pathologische Eisenablagerungen an den Tagen 1 und 3 wie auch durch weniger anfärbbares Eisen in den Lebern einen Tag nach einer 90-prozentigen Leberteileresektion. Hinsichtlich der übrigen Parameter sowie der Dynamik des mit den BrdU- und Ki-67-Signalen beschriebenen Regenerationsprozesses unterschieden sich die Werte der Splenektomiegruppe anders als die der Terlipressingruppe nicht von denen der Kontrollgruppe.

1. Arbeitshypothese. Die erste Arbeitshypothese postulierte, daß sowohl Terlipressingabe als auch Splenektomie geeignete Methoden seien, den Pfortaderdruck der so behandelten Tiere im Vergleich mit den Tieren einer Kontrollgruppe zu senken. Diese Hypothese konnte mit dem vorliegenden Experiment nicht belegt werden: Durch keine der beiden Interventionen ist es zu irgendeinem Zeitpunkt in einem der zwei Versuchsarme gelungen, den an den Versuchsendpunkten invasiv gemessenen Pfortaderdruck in den Interventionsgruppen signifikant zu senken.

Dies steht im Widerspruch zu mehreren Berichten der Forschungsliteratur über bisherige Experimente vor allem mit Milzarterienligatur, partieller Embolisierung der Milz beziehungsweise Splenektomie, aber auch über die Wirkungen von Terlipressin. Beim Menschen gibt es erfolgreiche Versuche, portalvenöse Druckerhöhungen unterschiedlichster Genese durch eine Splenektomie zu therapieren [82, 76, 40, 85, 66, 4, 73, 89]. Dennoch sind Splenektomie beziehungsweise Verkleinerung des funktionellen Milzgewebes durch Ligatur oder Embolisierung bislang nicht als therapeutischer Standard bei portaler Hypertension etabliert. Zum einen sind alle diese Eingriffe, allen voran die Splenektomie als chirurgische Maximalvariante, mit ihren eigenen intra- und postoperativen Risiken behaftet, zum anderen herrscht bislang Uneinigkeit bezüglich der Indikationsstellung und der therapeutischen Wirkung [16]. Für das Rattenmodell jedoch besteht seit den 1980er Jahren die allgemeine Überzeugung, daß eine

Splenektomie zusätzlich zur Hepatektomie die Regeneration der verbleibenden Leber verbessert [61, 44]. Die angenommene Ursache hierfür ist, daß mit der Milz der größte Zustrom der Pfortader entfernt wird. Neuerdings wird diese ältere Sichtweise als alleinige Erklärung jedoch infrage gestellt. So wird beispielsweise postuliert, daß der positive Effekt einer Splenektomie auf die Leberregeneration nach erweiterter Leberteilektomie im Rattenmodell vermutlich auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung zurückzuführen sei, da sich der Blutfluß durch die A. hepatica nach Splenektomie, also funktionellem Verschuß der A. splenica am Truncus coeliacus, erhöht [24]. Die Autoren dieser Studie schließen aus einem Gegenversuch mit gleichzeitig ligierter A. hepatica, daß alle vorteilhaften Effekte der Splenektomie auf der solchermaßen verbesserten Sauerstoffversorgung des regenerierenden Gewebes und nicht, wie bislang angenommen, auf einer Verminderung des Barotraumas für das Leberrestgewebe beruhen. Möglicherweise sind beide Effekte untrennbar miteinander verbunden, wie die Forschung über das sogenannte *Arterial Steal Syndrom* feststellt: Wird der arterielle Blutfluß durch eine präexistierende Splenomegalie hauptsächlich in die A. splenica gelenkt, erhält die A. hepatica dementsprechend geringere Anteile arterialisierten Blutes. Über die *Hepatic Artery Buffer Response* steigt kompensatorisch der portalvenöse Druck, und es kommt zur portalvenösen Hyperperfusion. Diese wird für die mikrozirkulatorischen Schädigungen im sinusoidalen Stromgebiet der Leber verantwortlich gemacht [11, 30]. Diese Darstellung der Pathogenese wird wiederum angezweifelt, gestützt durch die Beobachtung, daß in Organen mit relativ zu geringer Parenchymmasse wie nach einer Split-Leber-Transplantation oder einer Hepatektomie gleich zu Beginn eine akute portale Hyperperfusion einsetzt, die erst sekundär, ebenfalls über die *Hepatic Artery Buffer Response*, den Fluß in der A. hepatica erniedrigt [66]. Doch gleich, welcher Faktor den Ausschlag gibt — ein verkleinertes Strombett der Leber mit intrinsisch erhöhtem Widerstand gegen den portalen Blutfluß oder eine durch vorbestehende portalvenöse Kollateralen vergrößerte Milz, die ein höheres Blutvolumen in die Pfortader speist und so deren Druck erhöht — in beiden Fällen sollte der splanchnische Druck, der auf dem Leberparenchym lastet, rein mechanisch durch die Unterbindung des stärksten Pfortader-Astes, der V. splenica, zu verringern sein.

Für den Wirkstoff Terlipressin ist seine Fähigkeit, beim Menschen den Druck in der Pfortader durch Vasokonstriktion im splanchnischen Gebiet zu erniedrigen, ebenso belegt. Auch in Tierversuchen, vor allem im Rattenmodell, konnte ein drucksenkender Effekt von Terlipressin allein oder in Kombination mit anderen vasoaktiven Substanzen im Pfortaderstromgebiet gezeigt werden [12, 38, 39]. Die Frage ist angesichts dieser einstimmigen Berichte, wieso im

hier beschriebenen Experiment weder durch Terlipressingabe noch durch eine Splenektomie der Pfortaderdruck der so behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe signifikant gesenkt werden konnte, und zwar weder nach einer 70-prozentigen noch nach einer 90-prozentigen Leberteileresektion an einem der drei Versuchsendpunkte.

Im Tierversuch sind mehrere Arbeitsgruppen auf ein Phänomen gestoßen, das mit einer scheinbaren splanchnischen Hyposensitivität gegenüber dem Wirkstoff Glypressin (ein Terlipressin-Acetat wie auch das im vorliegenden Versuch verwendete Präparat Haemopressin) beschrieben wird [13, 18, 37, 36]. Als Ursache dieser fehlenden Ansprechbarkeit auf die vasokonstriktive Wirkung von Terlipressin wurden akute Blutungen identifiziert [86], die über einer Aktivierung der Nitrit-Oxid-Synthetase sowie des Bradykinin-Systems gefäßerweiternd wirken und somit der vasokonstriktiven Terlipressin-Wirkung im Splanchnikusgebiet direkt entgegenstehen. Zwar konnte der Stellenwert der beiden gefäßerweiternd wirkenden Hormonsysteme für die abgeschwächte Wirksamkeit von Terlipressin bislang nicht eindeutig geklärt werden [37, 13]. Auch existieren Daten, denenzufolge Terlipressin selbst wenigstens der induzierbaren Fraktion der Nitrit-Oxid-Synthetase (iNOS) entgegenwirkt [67]. Jedoch ist die Beobachtung, daß Terlipressin bei akuten Blutverlusten nicht seine erwartete Wirkung entfaltet, eine klinische und darüber hinaus seit zweieinhalb Jahrzehnten auch experimentell belegt [86]. Sie sollte zumindest in Betracht gezogen werden bei chirurgischen Arbeiten in Kleintiermodellen, die trotz aller Sorgfalt unumgängliche und bezogen auf das Körpergewicht auch relativ große Blutverluste für die Versuchstiere mit sich bringen.

Allerdings ist auf diesem Weg die gleichermaßen anscheinend ausgebliebene portal-hypotensive Wirkung der Splenektomie nicht erklärt, die ebenfalls im Widerspruch zu den Berichten der Forschungsliteratur steht. Signifikant höhere Pfortaderdruck-Werte der zu 90 Prozent gegenüber den nur zu 70 Prozent leberteilerezierten Tiere sprechen dagegen, daß die abweichenden Ergebnisse des hier beschriebenen Versuches auf einem systematischen Meßfehler beruhen. Allerdings wurde bei einer Untersuchung des *Small-for-Size-Syndroms* — ebenfalls im Rattenmodell [62] — festgestellt, daß eine tatsächliche Erhöhung des portalvenösen Druckes nur in der ersten Stunde nach der Transplantation einer Leber von zu geringer Größe (in diesem Fall 35 Prozent des ursprünglichen Lebervolumens) meßbar war. Dagegen waren Folgeschäden wie sinusoidale Dilatation, Verringerung der sinusoidalen Perfusionsrate und

ein Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen über den gesamten Versuchszeitraum von einer Woche hinweg zu beobachten. In der genannten Arbeit wurden also längerfristige mikrozirkulatorische Veränderungen im Stromgebiet der Leber auch nach einem nur vorübergehend meßbaren Pfortaderdruckanstieg festgestellt. Dies bietet einen möglichen Erklärungsansatz sowohl für das Ausbleiben von feststellbaren Pfortaderdruck-Unterschieden zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen im hier beschriebenen Experiment, durch dessen Versuchsaufbau frühestens 24 Stunden nach der Hepatektomie der Pfortaderdruck ermittelt wurde, als auch für die gleichzeitig durchaus vorhandenen Unterschiede auf biometrischer, histologischer und laborchemischer Ebene, die über den Versuchszeitraum von einer Woche hinweg beobachtet werden konnten.

2. Arbeitsypothese. Als biometrische Daten wurden das Körpergewicht jedes Tiers zu Beginn und Ende des Versuchs sowie das Gewicht von Milz, Leberresektat und -regenerat ermittelt, außerdem neben dem bereits genannten Pfortaderdruck der Grad der Dünndarmhyperämie und schließlich eventuell vorhandene Aszitesmengen bestimmt. Anhand der Werte für Körper-, Leber- und Milzgewicht in Gramm sollten Aussagen über den gesundheitlichen Zustand der operierten Ratten getroffen werden. Dabei ist zu hinterfragen, ob das reine Körper- und Lebergewicht gerade nach einer Hepatektomie hinreichend aussagekräftige Indikatoren für den Zustand der Tiere sein können, da auch Ödeme und Aszites diese Parameter erhöhen. Gerade für die Leber ist bekannt, daß ödematöse Schwellungen und interstitielle Leckagen durch das Barotrauma nach einer akut einsetzenden portalen Hyperperfusion einen beträchtlichen Anteil am vermeintlichen Gewichtszuwachs einer regenerierenden Leber in der frühen postoperativen Phase haben können [70]. Deshalb wurden neben der Gewichtsänderung zwischen Operationstag und Versuchsendpunkt auch der prozentuale Anteil des Lebergewichts am Körpergewicht und dessen Veränderung über den Versuchszeitraum hinweg ausgewertet. Letztlich gab es jedoch hinsichtlich der biometrischen Parameter nur eine geringe Zahl signifikanter Unterschiede. Die splenektomierten Tiere unterschieden sich unter diesen Gesichtspunkten zu keinem Zeitpunkt von den Tieren der Kontrollgruppe. Bei den mit Terlipressin behandelten Tieren war nach sieben Tagen ein geringerer Gewichtszuwachs der regenerierenden Lebern nach einer 70-prozentigen Leberteileresektion zu verzeichnen; nach der 90-prozentigen Hepatektomie hatten die Tiere der gleichen Gruppe am ersten postoperativen Tag einen signifikant größeren Zugewinn an Körpergewicht als die Tiere der Kontrollgruppe. Eine direkte antiproliferative Wirkung von Terlipressin, die den geringeren Gewichtsgewinn der Residualleber erklären könnte, ist bislang nicht bekannt. Führt man den Gedanken weiter, daß

ein erhöhter portalvenöser Druck nach Leberteilresektionen nicht nur als Noxe, sondern auch als Proliferationsreiz auf das verbliebene Leberparenchym wirkt [45], könnte hinter dem geringeren Gewichtszuwachs der Lebern der zu 70 Prozent hepatektomierten und mit Terlipressin behandelten Tiere gegenüber den beiden Vergleichsgruppen tatsächlich ein erniedrigter portalvenöser Druck stehen, der eventuell nicht registriert wurde — entweder, weil die erste Messung nach der oben genannten Hypothese zu spät erfolgte oder weil die Druckunterschiede zu subtil waren, um sie nach den Methoden des Versuchs mittels direkter Pfortaderkanülierung festzustellen. Zur Verifizierung dieser Vermutung sind allerdings weitere Versuche nötig. Wie die Tatsache, daß die mit Terlipressin behandelten Tiere am ersten postoperativen Tag im Gegensatz zu den Tieren der beiden anderen Gruppen deutlich an Körpergewicht zugenommen hatten, zu werten ist, bleibt angesichts des singulären Werts in diesem Versuchsarm unklar. Da die mit Terlipressin behandelten Tiere im Gruppenvergleich nicht durch vermehrte Aszitesmengen auffielen und zudem signifikant höhere Proteinwerte als die Tiere der Kontrollgruppe zeigten, ist eine Erklärung der erhöhten Gewichtszunahme durch Wassereinlagerungen in diesem Fall nicht wahrscheinlich, sie könnte also Zeichen einer positiven postoperativen Entwicklung sein. Jedoch wäre angesichts der in den Folgetagen generell niedrigen Überlebensraten auch in der Terlipressingruppe die Aussagekraft dieses Unterschieds auf den ersten Tag beziehungsweise die unmittelbare postoperative Zeit zu beschränken. Auch in diesem Fall wären weitere Versuchsendpunkte in den ersten drei Tagen nach der Hepatektomie sinnvoll, um diese nun einzeln stehenden Auffälligkeit besser interpretieren zu können.

Das Einbeziehen eines Vergleichs der Milzgewichte zwischen Terlipressin- und Kontrollgruppen fußt auf der klinischen Beobachtung, daß Leberteilresektionen das Milzvolumen erhöhen [15]. Dieser Vorannahme widerspricht zunächst die Feststellung, daß die der Splenektomiegruppe entnommenen und als Normalwert gewogenen Milzen signifikant schwerer waren als die einen Tag später entnommenen Organe, die der akuten portalen Hyperperfusion 24 Stunden lang ausgesetzt waren. Jedoch ist dieses scheinbare Paradoxon erklärbar durch die vielen Vertebraten mögliche Kontraktion der Milz durch alpha-1-Agonisten [10], die durch Blutverluste oder schlicht den Streß einer Bauchoperation vermehrt in der Zirkulation vorhanden sein dürften. Sieben Tage nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion fiel auf, daß die Tiere der Kontrollgruppe verglichen mit den als Normalwert entnommenen Organen signifikant vergrößerte Milzen hatten, die der Terlipressingruppe jedoch nicht. Den Theorien folgend, daß erstens eine Hepatektomie über erhöhte portalvenöse Druckverhältnisse zur Vergrößerung der Milz führt und zweitens das Ausmaß der Milzvergrößerung in direktem Zusammenhang

zum Resektionsausmaß steht [41, 1], kann das Ausbleiben einer signifikanten Vergrößerung der Milz nach sieben Tagen in der Terlipressingruppe bei gleichzeitigem Vorhandensein dieses Effekts in der Kontrollgruppe als weiteres indirektes Zeichen eines niedrigeren portalvenösen Druckes gewertet werden. Diese Beobachtung stützt die oben ausgeführte Bewertung eines geringeren Regeneratgewichts derselben Gruppe zum selben Zeitpunkt als Zeichen eines nicht ermittelten, aber möglicherweise doch vorhandenen niedrigeren portalvenösen Druckes, also eines schwächeren Proliferationsreizes, bei den mit Terlipressin behandelten Tieren. Eine andere Studie, die den postoperativen Verlauf von 109 Spender-Hepatektomien auswertete [41], stieß auf denselben Zusammenhang: ein signifikant höherer Anstieg des Milzvolumens nach sechs Monaten war mit einer höheren Wahrscheinlichkeit verbunden, daß die regenerierende Leber des Spenders ihre ursprüngliche Größe mindestens vollständig wiedererlangte. Dieser direkte Zusammenhang von Leber- und Milz-Vergrößerung nach extensiver Hepatektomie wird hypothetisch durch eine ähnliche Ansprechbarkeit beider Organe auf einen gemeinsamen Wachstumsfaktor [3] oder über die durch eine Hepatektomie induzierte portale Hypertension erklärt, die mit dem Resektionsausmaß steigt und als Triggerfaktor für Leberregeneration wie Milzvergrößerung gleichermaßen gilt [41].

Als letzter biometrischer Wert, der einen signifikanten Unterschied aufwies, ist der Score für Dünndarmhyperämie, die — wie auch ein Aszites — ausschließlich nach einer 90-prozentigen Leberteileresektion auftrat, zu nennen. Er erreichte nach Terlipressingabe signifikant niedrigere Werte sowohl als in der Kontroll- als auch in der Splenektomiegruppe an Tag 1 und immerhin noch deutlich niedrigere Werte an Tag 3, für den wie beschrieben wegen der geringen Zahl überlebender Individuen keine Aussagen von statistischer Signifikanz getroffen werden konnten. Tierversuche mit experimentell induzierter portaler Hypertonie haben gezeigt, daß diese Situation zu einer deutlichen Hyperämie der oberen und unteren Anteile des Gastrointestinaltrakts führt [7]. Eine geringer ausgeprägte Hyperämie des Dünndarms in der Terlipressingruppe kann ebenso wie die beiden zuvor genannten Punkte — der geringere Gewichtszuwachs der regenerierenden Leber sowie der Milz — als indirektes Zeichen eines verminderten portalvenösen Druckes gewertet werden.

Unter den ermittelten Laborparametern sollen die Werte für Harnstoff, Gesamtbilirubin, Protein und Albumin sowie die Thromboplastinzeit (Quick-Wert) diskutiert werden, anhand derer sich die drei Gruppen an verschiedenen Tagen voneinander unterschieden.

Die typische klinische Situation eines Patienten mit erhöhten Harnstoffwerten wäre das Nierenversagen mit gleichzeitig erhöhten Kreatininwerten und einer erniedrigten glomerulären

Filtrationrate, die jedoch für die in diesem Experiment operierten Ratten grundsätzlich nicht anzunehmen ist und angesichts der gruppenübergreifend unauffälligen Kreatinin-Werte weitgehend ausgeschlossen werden kann. Von den zahllosen selteneren Ursachen für einen erhöhten Harnstoffwert kommen im Rahmen dieses Experiments vor allem die prärenalen Ätiologien in Frage, genauer gesagt ein gesteigerter Eiweißkatabolismus durch Zellzerfall und, ganz allgemein, die postoperative Situation. Nach einer Operation ist durch Streßhormone wie Glukagon und Cortisol die Harnstoffsynthese der Leber gesteigert, und der Körper verliert auf diesem Wege erhebliche Mengen Stickstoff für die Proteinsynthese [34]. Die Harnstoffsynthese aus dem Endprodukt des Eiweißabbaus, dem Ammoniak, stellt eine der wichtigsten Detoxifikationsaufgaben der Leber für den Säugetierorganismus dar. Die Leber ist dabei metabolisch zониert: die Harnstoffsynthese findet vor allem in den periportal gelegenen Hepatozyten statt [46], die im Falle einer akut erhöhten portalvenösen Perfusion dem Scherstreiß als erste ausgesetzt sind. Wenn man annimmt, daß die Menge des zu degradierenden Proteins nach einer standardisierten Leberteilresektion gruppenübergreifend etwa die gleiche sein müßte, spricht ein hoher Harnstoffwert in dieser Konstellation für eine gute Detoxifikationsleistung der Leber. Nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion wurden bei den Tieren sowohl der Terlipressin- als auch der Splenektomiegruppe an Tag 7 signifikant höhere Harnstoffwerte als in der Kontrollgruppe festgestellt. Nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion unterschied sich die Terlipressingruppe am postoperativen Tag 1 in gleicher Weise signifikant nur von der Splenektomie-, nicht aber von der Kontrollgruppe. Interessant ist ein Blick auf die Dimensionen, in der sich die Werte bewegten. Vergleicht man diesbezüglich den erwähnten Tag 7 nach der 70-prozentigen Leberteilresektion mit dem ersten postoperativen Tag nach der 90-prozentigen Leberteilresektion, so fällt auf, daß sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Terlipressingruppe der Median der Werte etwa verdoppelte, während er in der Splenektomiegruppe deutlich weniger gestiegen war. Der anfangs genannten Theorie zufolge wäre die Aussage dieser Unterschiede, daß die periportalen Hepatozyten der mit Terlipressin behandelten Tiere in einem höheren Ausmaß als die der Kontrollgruppentiere zur Harnstoffsynthese in der Lage waren. Für die Tiere der Splenektomiegruppe träfe dies nur für die Situation nach einer 70-prozentigen Leberteilresektion zu.

Bei den Tieren der Splenektomiegruppe gingen die an Tag 7 nach der 70-prozentigen Leberteilresektion erhöhten Harnstoffwerte mit einem Serumproteinwert einher, der niedriger war als in der Kontrollgruppe. Anders sah es unter der Behandlung mit Terlipressin nach der 90-prozentigen Leberteilresektion aus: Hier waren die Proteinwerte am ersten postoperativen

Tag signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Vergleicht man wiederum die Dimensionen, in denen sich diese Werte bewegten, fällt auf, daß nach einer 90-prozentigen Leberteileresektion das Serum-Protein der mit Terlipressin behandelten Tiere am wenigsten stark gefallen war, was für eine im Vergleich gut erhaltende Lebersyntheseleistung dieser Gruppe oder, im Gegenschluß, für eine beeinträchtigte Lebersyntheseleistung der Splenektomiegruppe sieben Tage nach einer 70-prozentigen Leberteileresektion spricht. Die Proteinfraction des Säugetierblutes besteht aus mehr als 100 verschiedenen Molekülen, die, abgesehen von Faktor VIII und den Immunglobulinen, alle im Leberparenchym gebildet werden. Eine Hypoproteinämie ist im Fall dieser Versuchstiere mit höchster Wahrscheinlichkeit auf eine Verringerung der mit 60 Prozent am Gesamteiweiß anteilmäßig stärksten Fraktion, des in der Leber synthetisierten Albumins, zurückzuführen, die sich nicht durch Blutverdünnungseffekte, sondern durch eine insuffiziente Lebersynthesekapazität erklärt [31]. Eine signifikante Hypalbuminämie unter den zu 70 Prozent leberteileresezierten Tieren wurde jedoch ausgerechnet bei der Terlipressin-Gruppe an Tag 3 festgestellt, die allerdings am gleichen Versuchstag keine signifikante Hypoproteinämie zeigte und sonst, wie erwähnt, durch höhere Proteinwerte einen Tag nach der 90-prozentigen Leberteileresektion aufgefallen war. Die Entwicklung des Albuminwerts nach einer Hepatektomie wird kontrovers diskutiert. Die Synthese von Albumin als negatives Akute-Phase-Protein wird nach einer Leberteileresektion wie auch, allerdings in geringerem Maße, nach einer Schein-Operation auf RNA-Ebene herabreguliert, wie aus Arbeiten im Rattenmodell bekannt ist [60]. Dabei wurde weiterhin festgestellt, daß die Albuminsynthese zwar bezogen auf das Körpergewicht, nicht jedoch auf das Lebertrockengewicht der hepatektomierten Tiere verglichen mit den scheinoperierten erniedrigt war [52]. Eine andere Studie stellte dagegen fest, daß nach einer Donor-Hemihepatektomie die Albuminwerte der Patienten in der ersten postoperativen Woche trotz eines Abfalls um mehr als ein Drittel des Ausgangswertes in keiner Korrelation zum resezierten Lebervolumen standen, dieser Zusammenhang zeige sich wegen der langen Plasma-Halbwertszeit von Albumin von etwa 17-20 Tagen erst nach drei Wochen [78]. Eine Studie, die mit Hydrocortison, Glukagon und Noradrenalin die postoperative Streßantwort bei Gesunden provozierte, konnte zwar eine negative Eiweißbilanz, jedoch keine derart induzierbare Hypalbuminämie feststellen [79]. Im vorliegenden Versuch wurde eine offenbar transiente relative Hypalbuminämie bei den mit Terlipressin behandelten Tieren drei Tage nach einer 70-prozentigen Leberteileresektion festgestellt, deren Bedeutung gerade angesichts der langen Plasma-Halbwertszeit von Albumin nicht ohne weitere Versuche geklärt werden kann.

Das Gesamt-Bilirubin war bei den einer 70-prozentigen Leberteilektomie unterzogenen und mit Terlipressin behandelten Tieren nach sieben Tagen gegenüber den Werten der Kontrollgruppe erhöht. Für die Splenektomiegruppe war dieser Unterschied nicht feststellbar. Daß nach der extensiven Entfernung von Leberparenchym die Bilirubinwerte steigen, entspricht den Erwartungen. Bekannt ist auch ein Zusammenhang zwischen der Masse entfernten Parenchyms und der Höhe des Anstiegs: so zeigen beispielsweise klinische Studien, daß das Gesamtbilirubin nach einer rechtsseitigen Donor-Hemihepatektomie signifikant höher liegt als nach der weniger umfangreichen linksseitigen [41]. Maximal erhöht sind die Werte am dritten postoperativen Tag und wieder normalisiert eine Woche nach einer blande verlaufenden Spender-Hemihepatektomie [14, 74]. Erst ab einer bestimmten Höhe der Werte sind weitere Komplikationen, wie zum Beispiel pathologische Flüssigkeitsansammlungen, assoziiert [74]. Die Art der Hyperbilirubinämie nach Leberteilektomien wird als vornehmlich konjugierte Hyperbilirubinämie charakterisiert [17], überhaupt sollte das konjugierte eher als Gesamtbilirubin für eine Zustandsbeschreibung der Leber herangezogen werden [5]. Im vorliegenden Versuch konnte jedoch für das konjugierte Bilirubin allein kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Für die Situation nach einer Leberteilektomie, die über das für Patienten übliche Maß hinausgeht und in der deutlich weniger Hepatozyten zur Verfügung stehen, um das anfallende Bilirubin zu glucuronidieren, ist die Situation, wie sie sich im vorliegenden Experiment ergeben hat, durchaus logisch: wegen fehlender Kapazitäten zur Glucuronidierung nach der Hepatektomie steigt zwar durch die Anlagerung an Albumin das indirekte, also auch das Gesamtbilirubin, jedoch nicht das konjugierte Bilirubin. Daß der Unterschied hinsichtlich des Gesamtbilirubins Signifikanzniveau erreichte, fußt allerdings auf der Tatsache, daß in der Kontrollgruppe (wie auch in der Splenektomiegruppe) überhaupt kein Bilirubin mehr meßbar war, während drei Tiere aus der Terlipressingruppe gerade den kleinsten mit den Methoden des Labors meßbaren Wert (0,1 mg/dl) erreichten. Daher ist es aufschlußreich, diese Daten dem in dieser Arbeit verwendeten Test für kategorielle Daten zu unterziehen, dem Fisher's Exact Test. Dieser weist für denselben Datensatz dann einen p-Wert von 0,19 statt 0,02 aus und relativiert die scheinbare Signifikanz des Unterschiedes angesichts der Labormethoden, die hier eine dichotome Situation erzeugten. Da es zudem an den übrigen Versuchsendpunkten in beiden Armen keine weiteren gleich- oder gegensinnigen Unterschiede gab, muß die Aussagekraft dieses singulären Ereignisses in Zweifel gezogen werden.

Gemeinsam mit den Werten für Bilirubin (und Kreatinin) bildet eine sich verschlechternde Koagulopathie (gemessen als TPZ-Wert beziehungsweise INR) die Berechnungsgrundlage

des MELD-Scores (*Model of End Stage Liver Disease*; [47]) zur Beschreibung des Schweregrades einer hepatischen Dysfunktion und zur Allokation von Transplantatlebern, der den Child-Turcotte-Pugh-Score seit 2002 zunehmend abgelöst hat und weiter präzisiert wird [5]. Ein erniedrigter TPZ-Wert zeugt von einer eingeschränkten Aktivität oder Quantität der Faktoren II, V, VII, X oder I (Fibrinogen), deren häufigste nicht-iatrogene Ursachen Lebererkrankungen mit eingeschränkter Synthesefunktion der Hepatozyten sind. Fibrinogen hat unter diesen Faktoren die längste biologische Halbwertszeit von bis zu fünf Tagen, ein Mangel entsteht auch durch Verbrauchs- und Verlustkoagulopathien, ein Überschuß als Funktionsprotein in Akute-Phase-Reaktionen auf Entzündungen wie zum Beispiel durch chirurgische Manipulation, wodurch dieses Protein für sich genommen im vorliegenden Versuchsaufbau keine spezifische Aussage enthielte. Auch Faktor II, Prothrombin, hätte, obwohl ein spezifischer Marker für die Lebersynthesefunktion, eine im Hinblick auf den Aufbau des Experiments recht lange Halbwertszeit von zwei bis drei Tagen. Gleiches gilt für Faktor X (HWZ 32 bis 43 Stunden). Jedoch sind die Faktoren V und VII mit 12 bis 15 beziehungsweise 2 bis 5 Stunden biologischer Halbwertszeit geeignet, Störungen der Lebersynthesefunktion bereits sehr früh anzuzeigen. Der mit dem Quick-Test gemessene Effekt, die Fibrinbildung, entsteht nur durch das Zusammenspiel aller einzelnen Faktoren und wurde als für die Belange dieses Experimentes spezifisch genug erachtet. Im vorliegenden Versuch zeigten die Tiere der Terlipressingruppe an jedem Versuchstag niedrigere Quick-Werte, also eine verlängerte Thromboplastinzeit, als die Tiere der Kontrollgruppe; an den Tagen 3 und 7 erreichte dieser Unterschied Signifikanzniveau und kann als Zeichen einer verminderten Lebersyntheseleistung für prokoagulatorische Faktoren gewertet werden.

Auf histologischer Ebene gab es Unterschiede hinsichtlich der mit der Berliner-Blau-Färbung sichtbar gemachten Eisenablagerungen in den Regeneratlebern und schließlich hinsichtlich der Zahl BrdU- und Ki-67-positiver Signale in den quantitativ auszuwertenden Färbungen. Die Präparate beider Interventionsgruppen zeigten in der Berliner-Blau-Färbung deutlich weniger in Makrophagen und interzellulär abgelagertes Eisen als Zeichen von Blutstauung und Nekrose als die Präparate der Kontrollgruppe. Unter den zu 70 Prozent leberteilresezierten Tieren war dieser Unterschied für die mit Terlipressin behandelten Tiere am dritten postoperativen Tag signifikant, für die splenektomierten Tiere bereits am ersten und am dritten Tag sowie an Tag 1 nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion. Diese Aussage betrifft nicht allein die akute Schädigung, deren eines Zeichen die Stauungsblutung ist, sondern hat auch prognostischen Wert, ist doch bekannt, daß es einen Zusammenhang zwischen Eisenbelastung,

Makrophagenaktivierung und fibrotischem Umbau mit konsekutiver Funktionseinschränkung der Leber gibt [72].

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erbrachte zu einem einzigen Zeitpunkt (Tag 3) in den Lebern der mit Terlipressin behandelten Tiere signifikant mehr durch BrdU nachweisbare Zellteilungen als bei den Kontrollgruppentieren, obwohl der Verlauf der Anzahl der BrdU-Signale über den Versuchszeitraum hinweg in allen Gruppen sehr ähnlich war. In genau diesem Verlauf unterschieden sich die Tiere der Terlipressingruppe dann aber in den Ki-67-Signalen: Hier war die Zahl der zählbaren Signale sowohl zu Beginn (Tag 1) und als auch am Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 7) signifikant höher als in der Kontrollgruppe und fiel von einem Gipfel, der höher war und früher auftrat als in den anderen beiden Gruppen, linear und stetig ab. Dagegen zeigte sich in den Lebern der Tiere aus den übrigen Gruppen die maximale Proliferationsbereitschaft, ausgedrückt durch die Zahl der Ki-67-Signale, erst zu einem späteren Zeitpunkt und auch nur in geringerem Ausmaß. Derart stetig wie bei den teilungsbereiten Zellen überhaupt verlief bei den mit Terlipressin behandelten Tieren auch der Abfall des Quotienten aus den Signalen der BrdU- und der Ki-67-Färbung, der den Anteil tatsächlich stattgefundener an den potentiell möglichen Zellteilungen darstellt. In der Zusammenschau bietet sich das Bild einer stark kontrolliert ablaufenden Gewebsregeneration bei den Tieren der Terlipressingruppe, ohne die Schwankungen der anderen beiden Gruppen. Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, daß keine Daten für die Zeit zwischen dem ersten und dem dritten postoperativen Tag existieren. Möglicherweise setzte in der Kontroll- und der Splenektomiegruppe ein ähnlich massiver zahlenmäßiger Anstieg der Ki-67-Signale genau in dem unbeobachteten Zeitraum ein, der sich bereits mehrfach, beispielsweise bei der Entwicklung der Überlebensziffern nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion, als kritisch für den weiteren Verlauf dargestellt hatte. Nimmt man das vorliegende Ergebnis unter dem genannten Vorbehalt an, zeigten die Lebern der mit Terlipressin behandelten Tiere anhand dieser beiden Proliferationsmarker eine völlig andere Dynamik der Regeneration als die Lebern der Kontroll- und der Splenektomiegruppe, die einander stark ähnelten. Charakterisieren läßt sie sich durch ein früheres Auftreten von proliferationsbereiten Zellen (Ki-67) als in den anderen Gruppen sowie, in der Mitte des Beobachtungszeitraum, durch signifikant mehr stattfindende Zellteilungen (BrdU, Tag 3) und außerdem durch einen linearen Abfall sowohl der Proliferationsfraktion der Hepatozyten (Ki-67) als auch des Anteils der Zellteilungen an dieser Proliferationsfraktion (Quotient aus BrdU und Ki-67). Die beiden anderen Gruppen dagegen zeigten die maximale Proliferationsbereitschaft nicht nur zu einem späteren Zeitpunkt,

sondern auch der Anteil tatsächlich stattgehabter Zellteilungen an der Proliferationsfraktion änderte sich über die drei Versuchsendpunkte hinweg mit einem frühen Abfall zwischen dem ersten und dritten sowie einem Wiederanstieg zwischen dem dritten und dem siebenten Tag. In einem Tiermodell mit Schweinen wurden ähnliche Unterschiede nach Provokation eines *Small-for-Size-Syndroms* beobachtet, jedoch anders interpretiert, indem der Verlauf eines Proliferationsmarkers zwischen den überlebenden und den vor Versuchsende gestorbenen Tieren verglichen wurde [28]. Dabei wurde die Thymidinkinase zur Quantifizierung der Leberregeneration verwendet. Den Beobachtungen zufolge stieg gerade die so gemessene Proliferationsstärkte bei den nicht-überlebenden Tieren sehr früh und sehr stark an. Im vorliegenden Versuch dagegen war das frühe und hohe Ansteigen der verwendeten Proliferationsmarker BrdU und Ki-67 in der Terlipressingruppe eher mit einer Reihe überwiegend positiv zu interpretierender Unterschiede assoziiert. Unterschiede hinsichtlich des Überlebens wie in dem erwähnten Versuch mit Schweinen gab es hier nicht, und auch eine direkte Vergleichbarkeit der verwendeten Proliferationsmarker gerade in Fragen ihres Verlaufs ist zu bezweifeln. Eine Diskussion darüber, wieso es diesen grundsätzlichen Unterschied in der Dynamik der Leberregeneration gab, ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich und würde weitere Versuche erfordern.

Methodenkritik. Zum Studium der Auswirkungen einer Leberteilresektion auf den Säugetierorganismus gibt es tierexperimentelle Arbeiten an Hunden, Schweinen, Ratten und Mäusen. Häufig werden Mäuse verwendet, da das Maus-Modell als physiologisch dem Menschen am nächsten gilt und mit einer großen Zahl von genetisch veränderten Stämmen mechanistische Studien gut durchführbar sind [19]. Gegen den Einsatz von Mäusen im hier beschriebenen Versuch sprachen chirurgisch-technische Gründe: da Mäuse im Gegensatz zu Ratten eine Gallenblase besitzen, wäre die 90-prozentige Leberteilresektion mit zusätzlichen Komplikationen behaftet gewesen.

Ratten sind neben Mäusen als Versuchstiere bei der Erforschung der Leberregeneration ein weithin akzeptiertes und häufig verwendetes Modelltier. Zu den Gründen zählen die gute Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Versuche zum einen durch die vielen verfügbaren, stabil rückgezüchteten Inzuchtstämme, für die es bereits ein großes Repertoire zum Beispiel an Antikörpern und etablierten molekularbiologischen Untersuchungen gibt, zum anderen wegen der Lobulierung ihrer Lebern, die nur geringfügigen Variationen unterworfen ist und deshalb standardisierte Resektionen ermöglicht. Außerdem verbleibt nach der zentralen Resektion eines solchen gut abgrenzbaren Leberlappens kaum nekrotisches Material im

Tier, wodurch die zu studierenden Regenerationsvorgänge vor allem vom Lebergewebe selbst abhängen, weniger von Nekrosen und Entzündungsherden. Durch diesen Vorteil einer lobulierten Leber sind sowohl das Ratten- als auch das Maus-Modell zu Studienobjekten für Regenerationsvorgänge auch in anderen Geweben *per se* geworden [65]. Auf Kogure geht die Erkenntnis zurück, daß die Lobi der Rattenleber trotz eines völlig unterschiedlichen makroskopischen Aspekts fast exakt den Couineaud-Segmenten der menschlichen Leber entsprechen [57]. Die Gewichtsanteile der einzelnen Lappen am Gesamtgewicht der Rattenleber sind bemerkenswert konstant [63]. Bereits seit den 1930er Jahren ist die Resektion von zwei Dritteln des Lebergewebes bei Ratten als Standardmodell zum Studium der Leberregeneration etabliert, heute gibt es für Ratten mit zwei unterschiedlich extensiven Leberteilresektionen (70 und 90 Prozent) sowohl ein Funktions- als auch ein Überlebensmodell, die beide als in ihren Ergebnissen zuverlässig reproduzierbar gelten [64]. Wistar-Ratten wurden gewählt, weil für diese Art bereits ein etabliertes Modell im Forschungslabor der Charité, Campus Virchow-Klinikum, existierte.

Eine mögliche, bislang in der Literatur wenig beachtete Komplikation der 90-prozentigen Leberteilresektion bei Ratten entsteht im zweiten Resektionsschritt: beim Abbinden der rechts-lateralen Leberlappen besteht die Gefahr, die Vena cava inferior dermaßen zu verengen, daß der venöse Abfluß aus dem Lobus caudatus nicht mehr ausreichend gewährleistet ist. Obwohl bei starker Einengung der Vena cava inferior der Lobus caudatus gut sichtbar blau anläuft, ist nicht auszuschließen, daß an dieser Stelle auch subklinische Stauungen entstehen, die sowohl den Pfortaderdruck als auch den Regenerationsprozeß beeinflussen.

Für die Splenektomie bei einer Ratte muß die Milz aus ihrer Loge dorsal des Magens mobilisiert und von dem bindegewebigen Netz, das sie mit dem Magen verbindet, getrennt werden. Auch bei einer hilusnahen Präparation der Milzgefäße ist nicht auszuschließen, daß es zu Verletzungen des Pankreas kommt, das sich als netzartiges Organ am gleichen Ort befindet, wodurch wiederum der Stoffwechsel während des beobachteten Regenerationsvorgangs in unkontrollierbarer Weise beeinflusst werden könnte. Möglicherweise bietet dies einen Erklärungsansatz für das unerwartet schlechte Abschneiden der Splenektomiegruppe, die sich entgegen den Literaturberichten zu den vorteilhaften Effekten einer Splenektomie auf die Leberregeneration bei unterschiedlichen Spezies in ihren Ergebnissen kaum von der Kontrollgruppe unterschied. So ist für Hunde beschrieben, daß nach 70-prozentiger Hepatektomie mit simultaner Pankreatektomie die Überlebensraten mit steigendem kumulativem Resektionsausmaß der beiden Organe sanken. Bereits nach alleiniger Pankreatektomie entwickelten die Tiere

Fettlebern und eine diabetische Stoffwechsellaage [51]. Da bei einer Splenektomie bei Ratten mehr oder minder starke Verletzungen des netzartigen Pankreas fast unumgänglich sind, könnte dies also zu dem unerwartet schlechten Abschneiden der Splenektomie– gegenüber den Terlipressingruppen beigetragen haben, und es ist an diesem Punkt zu hinterfragen, ob das Tiermodell Ratte für diesen Versuchsarm hinreichend geeignet war.

Die Implantation von osmotischen Mikropumpen zur kontinuierlichen Verabreichung von Medikamenten über Tage hinweg ist vielfach beschrieben und international üblich [35]. Terlipressin ist als Peptidhormon aufgrund seiner Molekularstruktur für diese Applikationsart geeignet [43].

Dennoch bleibt wie bei jeder Arbeit im Tiermodell die Frage nach der Vergleichbarkeit mit der Situation beim Menschen nicht nur angesichts des doch beträchtlichen phylogenetischen Abstandes, sondern auch gerade weil beim Menschen inflammatorische Zustände und nekrotische Areale bei der Leberregeneration nach chronischem wie akutem Schaden eine prägende Rolle spielen [87]. Der mechanistische Charakter des Tierexperiments mit all seinen Einschränkungen, die er für mögliche Übertragungen in die klinische Situation mit sich bringt, ist also auch aus der vorliegenden Studie nicht wegzudenken.

Die Proliferationsrate der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie erreicht bei Ratten nach einem Zeitraum zwischen 24 Stunden und drei Tagen ihren Höhepunkt [90, 27]. Im Falle der Rekonvaleszenz ist bei Ratten nach einer beliebig extensiven Hepatektomie das ursprüngliche Leberteilvolumen innerhalb von sieben bis 14 Tagen wiederhergestellt, wobei die in der ersten Woche neugebildeten Zellen in der zweiten wiederum fast vollständig ersetzt werden [90]. Für das mit dieser Arbeit beschriebene Experiment sind als Versuchsendpunkte die Tage 1, 3 und 7 gewählt worden, die der Initialphase der Leberregeneration entsprechen. Jedoch legen die Berichte anderer Arbeitsgruppen wie auch die Überlebensraten der hier zu 90 Prozent leberteilresezierten Tiere die Vermutung nahe, daß die Schlüsselereignisse, die über Rekonvaleszenz oder Tod entscheiden und daher auch Ziel therapeutischer Maßnahmen in der klinischen Situation sein könnten, sehr früh nach einer extensiven Leberteilresektion stattfinden, wahrscheinlich im einstelligen Stunden–, wenn nicht sogar im Minutenbereich nach einer Operation [65]. Deshalb wären zusätzliche Versuchsendpunkte zwischen den Tagen 1 und 3 beziehungsweise vor dem Ablauf von 24 Stunden günstig für die Interpretation der Ergebnisse.

In der quantitativen Auswertung der angefertigten histologischen Präparate war die Rede ausschließlich von den Hepatozyten. Die so ausgezählten Signale in der BrdU- und Ki-67-Färbung dienten der unmittelbaren Vergleichbarkeit der stattfindenden Leberregeneration. Einschränkung muß allerdings angemerkt werden, daß die Leber nur zu 60 Prozent aus Hepatozyten besteht und andere Zellarten wie Kupffer-Zellen oder auch das Epithel der Gallengänge ihren entscheidenden Anteil an der Initiierung und Aufrechterhaltung der Leberregeneration haben [80]. In der vorliegenden Arbeit wurden nur die Signale der Hepatozyten ausgezählt, für mögliche Folgeexperimente sollte erwogen werden, die übrigen Zellarten des Lebergewebes stärker zu berücksichtigen.

Die Gruppenstärke der Tiere mit $n=8$ für das Funktions- beziehungsweise mit $n=10$ für das Überlebensmodell festzulegen, entspricht den üblichen Fallzahlen der Literaturberichte [62]. Trotzdem erreichten unter den zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren so wenige den festgelegten Versuchsendpunkt, daß nur am Tag 1 nach der Operation genügend Individuen vorhanden waren, um statistisch begründete Aussagen zu treffen. Während die vollständige und vollzählige Rekonvaleszenz der zu 70 Prozent leberteilresezierten Tiere mit den Berichten anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt, fällt doch bei den zu 90 Prozent hepatektomierten Ratten ein deutlich geringeres Überleben als in der Literatur beschrieben auf. Hier gilt teilweise erst eine 95-prozentige Leberteilresektion als letales Modell für Ratten, während von Überlebensraten von bis zu 86 Prozent nach einer Woche im Anschluß an eine 90-prozentige Leberteilresektion berichtet wird [33]. Dies steht in starkem Kontrast zu der hier gruppenübergreifend erreichten zehnpromtigen Überlebensrate. Eine Arbeitsgruppe berichtet außerdem, daß die Zahl der Todesfälle unter den von ihnen zu 90 Prozent leberteilresezierten Tieren nach zwei Tagen nicht mehr anstieg, was im hier beschriebenen Versuch — zwar auf niedrigem Niveau, jedoch gruppenübergreifend — durchaus der Fall war. Vergleicht man die Überlebenskurven in Verlauf und Ziffern, gleichen die Überlebensraten der Tiere des vorliegenden Experiments nach einer 90-prozentigen Leberteilresektion eher den von dieser Arbeitsgruppe beschriebenen Tieren nach einer 95-prozentigen Leberteilresektion [33]. Eine mögliche Ursache könnte ein abweichendes postoperatives Regime zur Vermeidung hypoglykämischer Episoden sein: So berichtet diese Arbeitsgruppe von wiederholten Glukoseinjektionen, die an den aktuellen Blutzuckerwert adaptiert waren, während die Tiere im hier beschriebenen Versuch standardmäßig nur eine einzige postoperative Glukoseinjektion und ab dann glukosehaltiges Trinkwasser erhielten. Die letztgenannte Vorgehensweise entspricht der anderer Arbeitsgruppen, die nach therapeutischen Maßnahmen zur grundsätzlichen Verbesserung der Situation

nach einer extensiven Hepatektomie suchen [29]. Es war in der zweiten Arbeitshypothese des hier beschriebenen Experiments impliziert, daß Terlipressin und Splenektomie als therapeutische Maßnahmen mit einer verbesserten Regeneration der Leber auch die grundlegenden Stoffwechselfunktionen für den Organismus wie die Glukoneogenese früher wiederherstellen könnten und somit geeignete Maßnahmen seien, auch in der klinischen Situation das Outcome zu verbessern. Hinsichtlich des klinisch interessantesten Parameters, der Überlebensrate, konnte diese These im vorliegenden Versuch nicht belegt werden: Mit keiner der beiden Interventionen gelang es, die Überlebensraten im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant zu erhöhen. Adaptierte Glukosegaben als zusätzliche Intervention wie in der Literatur beschrieben [33] hätten diese Tatsache vermutlich verdecken können, waren aber gerade deswegen für die Fragestellung des hier beschriebenen Versuches unerwünscht. Allerdings eröffnet sich damit wegen der leichten Übertragbarkeit auf die klinische Situation ein möglicher Seitenarm für Folgeexperimente. Dennoch gibt es Berichte, daß nach einer Splenektomie die 90-prozentige Leberteilektomie auch ohne an den aktuellen Blutzuckerwert adaptierte Glukosegaben von etwa einem Viertel der Tiere langfristig überlebt wird [24]. Im genannten Versuch war die Fallzahl des letalen Modells der 90-prozentigen Leberteilektomie um die Hälfte höher als in der vorliegenden Arbeit. Möglicherweise können die im hier beschriebenen Experiment erzielten Überlebensraten auch auf eine zu geringe Fallzahl zurückgeführt werden.

Ausblick. In einem möglichen Anschlußexperiment zur Untersuchung therapeutischer Interventionen nach extensiver Leberteilektomien wären folgende Änderungen und Erweiterungen des Versuchsaufbaus in Betracht zu ziehen: mehr Versuchsendpunkte in den entscheidenden ersten drei postoperativen Tagen, eine höhere Fallzahl im letalen Modell sowie eventuell ein systematisches Anheben der Überlebensraten durch die zusätzliche Intervention standardisierter Glukoseinjektionen.

KAPITEL 5

Zusammenfassung

Eine Erweiterung des Lebervolumens, das mit einem geringen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko reseziert werden kann, würde die Zahl behandelbarer Lebertumoren ebenso erhöhen wie die Zahl der potentiell verfügbaren Spenderorgane für Lebertransplantationen. Bislang gibt es keine als Standard etablierte Therapieoption zur Verbesserung der Leberregeneration nach einer extensiven Leberteilektomie oder nach der Transplantation eines Organs von zu geringer Größe. Ein viel diskutierter Pathomechanismus, der die Prognose der Patienten entscheidend verschlechtert, ist die Small-for-Size-Situation, bei der eine für den Gesamtorganismus relativ zu kleine Leber einer zu hohen Druck- und Volumenbelastung ausgesetzt ist, unter der die sonst für die Leber so einzigartige Regeneration ausbleibt.

In dem mit der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experiment wurden zwei bereits klinisch verwendete Interventionen zur Behandlung von Komplikationen des Pfortaderhochdrucks — Terlipressingabe und Splenektomie — im Tiermodell auf ihre Fähigkeit hin untersucht, erstens den akut erhöhten portalvenösen Druck nach einer extensiven Leberteilektomie zu senken und zweitens die Regeneration der Leber zu begünstigen.

Entgegen der ersten Arbeitshypothese dieses Experiments gelang es zu keinem Zeitpunkt, weder mittels Splenektomie noch durch Terlipressingabe, den durch eine extensive Leberteilektomie akut erhöhten und an den postoperativen Tagen 1, 3 und 7 direkt in der Pfortader gemessenen portalvenösen Druck gegenüber den Werten einer Kontrollgruppe signifikant zu senken. Dies steht im Widerspruch zu verschiedenen Berichten der Forschungsliteratur. Als mögliche Ursachen dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit der Zeitpunkt der Messungen und eine postoperativ verminderte Ansprechbarkeit auf den Wirkstoff Terlipressin diskutiert.

Daß die Tiere der Splenektomiegruppe in ihren Ergebnissen zu großen Teilen der Kontrollgruppe ähnelten, entsprach ebenfalls nicht den Erwartungen. Möglicherweise war das verwendete Tiermodell aus anatomischen Gründen für diesen Versuchsarm nur bedingt geeignet.

Es gab jedoch mehrere Anzeichen dafür, daß zumindest die Intervention Terlipressingabe — entweder über einen niedrigeren Pfortaderdruck, der wegen des Versuchsaufbaus nicht erfaßt werden konnte, oder über einen anderen, bislang unbekanntem Mechanismus —

die Leberregeneration positiv beeinflusst. Zu diesen Anzeichen gehören die Parameter Regeneratgewicht, Milzgewicht, Dünndarmhyperämie, pathologische Eisenablagerungen sowie die Protein- und Harnstoffwerte im Serum. Die Behandlung mit Terlipressin war außerdem mit einer verminderten Synthese von Albumin sowie von Gerinnungsfaktoren assoziiert. Anhand der Proliferationsmarker Ki-67 und BrdU zeigte sich in den histologischen Präparaten eine von den anderen Gruppen verschiedene Regenerationsdynamik: Die Regeneration setzte zu einem früheren Zeitpunkt ein und verlief, soweit quantitativ erfaßbar, stetiger.

Durch keine der beiden therapeutischen Interventionen wurde der klinisch relevante Parameter Überleben verbessert. Allerdings zeigte sich in der Zusammenschau der biometrischen, laborchemischen und histologischen Untersuchungsergebnisse eine durch Terlipressingabe positiv beeinflussbare Dynamik der Leberregeneration, die es wert ist, durch Folgeexperimente genauer untersucht zu werden.

Literaturverzeichnis

- [1] K. Akimaru, M. Onda, T. Tajiri, et al. Hypersplenism induced by hepatectomy. *Hepatogastroenterology*, 48(40):1170–1175, 2001.
- [2] T. A. Aloia, B. N. Fahy, C. P. Fischer, et al. Predicting poor outcome following hepatectomy: analysis of 2313 hepatectomies in the nsqip database. *HPB (Oxford)*, 11(6):510–515, Sep 2009.
- [3] H. Ando, M. Nagino, T. Arai, H. Nishio, and Y. Nimura. Changes in splenic volume during liver regeneration. *World J Surg*, 28(10):977–981, Oct 2004.
- [4] G. Anegawa, H. Kawanaka, H. Uehara, et al. Effect of laparoscopic splenectomy on portal hypertensive gastropathy in cirrhotic patients with portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol*, 24(9):1554–1558, Sep 2009.
- [5] K. M. Bambha and S. W. Biggins. Inequities of the model for end-stage liver disease: an examination of current components and future additions. *Curr Opin Organ Transplant*, 13(3):227–233, Jun 2008.
- [6] F. Bendtsen, A. Krag, and S. Møller. Treatment of acute variceal bleeding. *Dig Liver Dis*, 40(5):328–336, May 2008.
- [7] J. N. Benoit, W. A. Womack, R. J. Korthuis, W. H. Wilborn, and D. N. Granger. Chronic portal hypertension: effects on gastrointestinal blood flow distribution. *Am J Physiol*, 250(4 Pt 1):G535–G539, Apr 1986.
- [8] J. L. Braithwaite and D. J. Adams. The venous drainage of the rat spleen. *J Anat*, 91(3):352–357, Jul 1957.
- [9] S. Breitenstein, C. Apestegui, H. Petrowsky, and P. A. Clavien. State of the art in liver resection and living donor liver transplantation: a worldwide survey of 100 liver centers. *World J Surg*, 33(4):797–803, Apr 2009.
- [10] R. P. Burt, C. R. Chapple, and I. Marshall. Evidence for a functional alpha 1a- (alpha 1c-) adrenoceptor mediating contraction of the rat epididymal vas deferens and an alpha 1b-adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen. *Br J Pharmacol*, 115(3):467–475, Jun 1995.
- [11] L. D. Carlis, C. V. Sansalone, G. F. Rondinara, et al. Splenic artery steal syndrome after orthotopic liver transplantation: diagnosis and treatment. *Transplant Proc*, 25(4):2594–2596, Aug 1993.
- [12] F. C. Chang, Y. T. Huang, H. C. Lin, et al. Beneficial effects of combined terlipressin and tetramethylpyrazine administration on portal hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 77(8):618–624, Aug 1999.
- [13] C.-T. Chen, C.-J. Chu, F.-Y. Lee, et al. Splanchnic hyposensitivity to glypressin in a hemorrhage-transfused common bile duct-ligated rat model of portal hypertension: role of nitric oxide and bradykinin. *Hepatogastroenterology*, 56(94-95):1261–1267, 2009.
- [14] T.-Y. Chen, C.-L. Chen, T.-L. Huang, et al. Remnant liver regeneration and spleen volume changes after living liver donation: influence of the middle hepatic vein. *Clin Transplant*, 20(6):725–731, 2006.
- [15] T.-Y. Chen, C.-L. Chen, T.-L. Huang, et al. Spleen volume and platelet count changes among donors after living donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology*, 55(85):1211–1215, 2008.

- [16] Y.-F. Cheng, T.-L. Huang, T.-Y. Chen, et al. Liver graft regeneration in right lobe adult living donor liver transplantation. *Am J Transplant*, 9(6):1382–1388, Jun 2009.
- [17] C. Chiarla, I. Giovannini, F. Giuliani, et al. Plasma bilirubin correlations in non-obstructive cholestasis after partial hepatectomy. *Clin Chem Lab Med*, 46(11):1598–1601, 2008.
- [18] C. J. Chu, S. L. Wu, F. Y. Lee, et al. Splanchnic hyposensitivity to glypressin in a haemorrhage/transfused rat model of portal hypertension: role of nitric oxide and bradykinin. *Clin Sci (Lond)*, 99(6):475–482, Dec 2000.
- [19] F. Dahm, P. Georgiev, and P.-A. Clavien. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant*, 5(11):2605–2610, Nov 2005.
- [20] T. de Baere, J. M. Robinson, F. Deschamps, et al. Preoperative portal vein embolization tailored to prepare the liver for complex resections: initial experience. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 33(5):976–982, Oct 2010.
- [21] W. de Graaf, K. P. van Lienden, T. M. van Gulik, and R. J. Bennink. (99m)tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy with spect for the assessment of hepatic function and liver functional volume before partial hepatectomy. *J Nucl Med*, 51(2):229–236, Feb 2010.
- [22] K. D. Döhler and M. Meyer. Vasopressin analogues in the treatment of hepatorenal syndrome and gastrointestinal haemorrhage. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 22(2):335–350, Jun 2008.
- [23] DSO. Daten zur neu anmeldung und lebertransplantation für 2009. <http://www.dso.de/>, 2009.
- [24] C. Eipel, K. Abshagen, J. Ritter, et al. Splenectomy improves survival by increasing arterial blood supply in a rat model of reduced-size liver. *Transpl Int*, Mar 2010.
- [25] F. Fabrizi, V. Dixit, P. Messa, and P. Martin. Terlipressin for hepatorenal syndrome: A meta-analysis of randomized trials. *Int J Artif Organs*, 32(3):133–140, Mar 2009.
- [26] S. T. Fan, C. M. Lo, C. L. Liu, B. H. Yong, J. K. Chan, and I. O. Ng. Safety of donors in live donor liver transplantation using right lobe grafts. *Arch Surg*, 135(3):336–340, Mar 2000.
- [27] N. Fausto. Liver regeneration. *J Hepatol*, 32(1 Suppl):19–31, 2000.
- [28] C. Fondevila, A. J. Hessheimer, P. Taurá, et al. Portal hyperperfusion: mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transpl*, 16(3):364–374, Mar 2010.
- [29] T. Fukuchi, H. Hirose, A. Onitsuka, et al. Effects of portal-systemic shunt following 90 per cent partial hepatectomy in rats. *J Surg Res*, 89(2):126–131, Apr 2000.
- [30] I. Geissler, P. Lamesch, H. Witzigmann, U. Jost, J. Hauss, and J. Fangmann. Splenohepatic arterial steal syndrome in liver transplantation: clinical features and management. *Transpl Int*, 15(2-3):139–141, Mar 2002.
- [31] I. Giovannini, C. Chiarla, F. Giuliani, M. Vellone, F. Ardito, and G. Nuzzo. The relationship between albumin, other plasma proteins and variables, and age in the acute phase response after liver resection in man. *Amino Acids*, 31(4):463–469, Nov 2006.
- [32] S. Gruttadauria, L. Mandala, R. Miraglia, et al. Successful treatment of small-for-size syndrome in adult-to-adult living-related liver transplantation: single center series. *Clin Transplant*, 21(6):761–766, 2007.
- [33] Y. He, J. Zhou, K.-F. Dou, and Y. Chen. A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2(3):423–425, Aug 2003.
- [34] H. A. Heindorff. The hepatic catabolic stress response. hormonal regulation of urea synthesis after surgery. *Dan Med Bull*, 40(2):224–234, Apr 1993.

- [35] R. Henriksson, A. Widmark, A. Bergh, and J. E. Damber. Interleukin-2-induced growth inhibition of prostatic adenocarcinoma (dunning r3327) in rats. *Urol Res*, 20(3):189–191, 1992.
- [36] H.-C. Huang, Y.-C. Chen, S.-S. Wang, et al. Nitric oxide synthase expression in the splanchnic hyposensitivity to glypressin of a hemorrhage-transfused rat model with portal hypertension. *J Chin Med Assoc*, 67(6):268–274, Jun 2004.
- [37] H. C. Huang, C. J. Chu, F. Y. Lee, et al. Chronic inhibition of nitric oxide ameliorates splanchnic hyposensitivity to glypressin in a hemorrhage-transfused rat model of portal hypertension. *Scand J Gastroenterol*, 35(12):1308–1313, Dec 2000.
- [38] Y. T. Huang, L. C. Lin, J. W. Chern, H. C. Lin, and C. Y. Hong. Portal hypotensive effects of combined terlipressin and dl-028, a synthetic alpha 1 adrenoceptor antagonist administration on anesthetized portal hypertensive rats. *Liver*, 19(2):129–134, Apr 1999.
- [39] Y. T. Huang, J. F. Tsai, H. C. Lin, C. F. Chen, and C. Y. Hong. Hemodynamic effects of acute tetrandrine and terlipressin administration on portal hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 75(10-11):1220–1225, 1997.
- [40] A. Humar, J. Beissel, S. Crotteau, M. Cohen, J. Lake, and W. D. Payne. Delayed splenic artery occlusion for treatment of established small-for-size syndrome after partial liver transplantation. *Liver Transpl*, 15(2):163–168, Feb 2009.
- [41] S. Ibrahim, C.-L. Chen, C.-C. Wang, et al. Liver regeneration and splenic enlargement in donors after living-donor liver transplantation. *World J Surg*, 29(12):1658–1666, Dec 2005.
- [42] S. Imura, M. Shimada, T. Utsunomiya, et al. Impact of splenectomy in patients with liver cirrhosis: Results from 18 patients in a single center experience. *Hepatol Res*, 40(9):894–900, Sep 2010.
- [43] T. Indrambarya, J. H. Boyd, Y. Wang, M. McConechy, and K. R. Walley. Low-dose vasopressin infusion results in increased mortality and cardiac dysfunction following ischemia-reperfusion injury in mice. *Crit Care*, 13(3):R98, 2009.
- [44] K. Ito, H. Ozasa, and S. Horikawa. Effects of prior splenectomy on remnant liver after partial hepatectomy with pringle maneuver in rats. *Liver Int*, 25(2):438–444, Apr 2005.
- [45] S.-M. Jiang, G.-W. Zhou, R. Zhang, et al. Role of splanchnic hemodynamics in liver regeneration after living donor liver transplantation. *Liver Transpl*, 15(9):1043–1049, Sep 2009.
- [46] K. Jungermann and T. Kietzmann. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*, 16:179–203, 1996.
- [47] P. S. Kamath, R. H. Wiesner, M. Malinchoc, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*, 33(2):464–470, Feb 2001.
- [48] T. Kamiyama, K. Nakanishi, H. Yokoo, et al. Perioperative management of hepatic resection toward zero mortality and morbidity: analysis of 793 consecutive cases in a single institution. *J Am Coll Surg*, 211(4):443–449, Oct 2010.
- [49] T. G. Kampmeier, S. Rehberg, M. Westphal, and M. Lange. Vasopressin in sepsis and septic shock. *Minerva Anesthesiol*, 76(10):844–850, Oct 2010.
- [50] S. Kanzler, A. Teufel, and P. R. Galle. [liver function test to predict hepatic failure after liver resection—expensive and without clinical relevance?]. *Zentralbl Chir*, 132(4):267–273, Aug 2007.

- [51] Y. Kawarada, M. Sanda, K. Kawamura, M. Suzuki, I. Nakase, and R. Mizumoto. Simultaneous extensive resection of the liver and the pancreas in dogs. *Gastroenterol Jpn*, 26(6):747–756, Dec 1991.
- [52] R. E. Kirsch, E. A. Lloyd, L. O. Frith, B. Gordon, and S. J. Saunders. Stimulation of albumin synthesis by amino acids following partial hepatectomy in the rat. *Am J Clin Nutr*, 28(12):1412–1415, Dec 1975.
- [53] T. H. Kiser, R. Maclaren, and D. N. Fish. Treatment of hepatorenal syndrome. *Pharmacotherapy*, 29(10):1196–1211, Oct 2009.
- [54] T. Kiuchi, M. Kasahara, K. Uryuhara, et al. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation*, 67(2):321–327, Jan 1999.
- [55] T. Kiuchi, S. Uemoto, H. Egawa, et al. Living donor liver transplantation in kyoto, 2001. *Clin Transpl*, pages 195–201, 2001.
- [56] D. E. Kleiner, E. M. Brunt, M. V. Natta, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6):1313–1321, Jun 2005.
- [57] K. Kogure, M. Ishizaki, M. Nemoto, H. Kuwano, and M. Makuuchi. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 6(2):171–175, 1999.
- [58] H. Kokai, Y. Sato, S. Yamamoto, et al. Successful super-small-for-size graft liver transplantation by decompression of portal hypertension via splenectomy and construction of a mesocaval shunt: a case report. *Transplant Proc*, 40(8):2825–2827, Oct 2008.
- [59] A. Krag, T. Borup, S. Møller, and F. Bendtsen. Efficacy and safety of terlipressin in cirrhotic patients with variceal bleeding or hepatorenal syndrome. *Adv Ther*, 25(11):1105–1140, Nov 2008.
- [60] L. Krieg, A. Alonso, H. Winter, and M. Volm. Albumin messenger rna after partial hepatectomy and sham operation. *Biochim Biophys Acta*, 610(2):311–317, Dec 1980.
- [61] S. Kubo, I. Matsui-Yuasa, S. Otani, S. Morisawa, H. Kinoshita, and K. Sakai. Effect of splenectomy on liver regeneration and polyamine metabolism after partial hepatectomy. *J Surg Res*, 41(4):401–409, Oct 1986.
- [62] J. Li, L. Liang, T. Ma, et al. Sinusoidal microcirculatory changes after small-for-size liver transplantation in rats. *Transpl Int*, 23(9):924–933, Sep 2010.
- [63] P. N. A. Martins and P. Neuhaus. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int*, 27(3):384–392, Apr 2007.
- [64] P. N. A. Martins, T. P. Theruvath, and P. Neuhaus. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*, 28(1):3–11, Jan 2008.
- [65] G. K. Michalopoulos. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*, 176(1):2–13, Jan 2010.
- [66] M. T. Mogl, N. C. Nüssler, S. J. Presser, et al. Evolving experience with prevention and treatment of splenic artery syndrome after orthotopic liver transplantation. *Transpl Int*, 23(8):831–841, Aug 2010.
- [67] R. Moreau, E. Barrière, K. A. Tazi, et al. Terlipressin inhibits in vivo aortic inos expression induced by lipopolysaccharide in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology*, 36(5):1070–1078, Nov 2002.
- [68] A. Morelli, C. Ertmer, P. Pietropaoli, and M. Westphal. Terlipressin: a promising vasoactive agent in hemodynamic support of septic shock. *Expert Opin Pharmacother*, 10(15):2569–2575, Oct 2009.
- [69] G. Morris-Stiff, D. Gomez, and R. Prasad. Quantitative assessment of hepatic function and its relevance to the liver surgeon. *J Gastrointest Surg*, 13(2):374–385, Feb 2009.

- [70] E. Morsiani, A. Aleotti, and D. Ricci. Haemodynamic and ultrastructural observations on the rat liver after two-thirds partial hepatectomy. *J Anat*, 192 (Pt 4):507–515, May 1998.
- [71] J. G. O’Grady. Acute liver failure. *Postgrad Med J*, 81(953):148–154, Mar 2005.
- [72] M.-A. Philippe, R.-G. Ruddell, and G.-A. Ramm. Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol*, 13(35):4746–4754, Sep 2007.
- [73] B. Pålsson, M. Hallén, A. M. Forsberg, and A. Alwmark. Partial splenic embolization: long-term outcome. *Langenbecks Arch Surg*, 387(11-12):421–426, Feb 2003.
- [74] M. W. Russo, D. LaPointe-Rudow, A. Teixeira, et al. Interpretation of liver chemistries in adult donors after living donor liver transplantation. *J Clin Gastroenterol*, 38(9):810–814, Oct 2004.
- [75] F. H. Saner, A. Canbay, G. Gerken, and C. E. Broelsch. Pharmacology, clinical efficacy and safety of terlipressin in esophageal varices bleeding, septic shock and hepatorenal syndrome. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 1(2):207–217, Dec 2007.
- [76] Y. Sato, S. Yamamoto, H. Oya, et al. Splenectomy for reduction of excessive portal hypertension after adult living-related donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology*, 49(48):1652–1655, 2002.
- [77] P. D. Schneider. Preoperative assessment of liver function. *Surg Clin North Am*, 84(2):355–373, Apr 2004.
- [78] R. Schumann, I. Bonney, L. M. McDevitt, J. T. Cooper, and M. S. Cepeda. Extent of right hepatectomy determines postoperative donor albumin and bilirubin changes: new insights. *Liver Int*, 28(1):95–98, Jan 2008.
- [79] H. J. Smeets, J. Kievit, H. I. Harinck, M. Frölich, and J. Hermans. Differential effects of counterregulatory stress hormones on serum albumin concentrations and protein catabolism in healthy volunteers. *Nutrition*, 11(5):423–427, 1995.
- [80] M. R. Tarlá, F. S. Ramalho, L. N. Z. Ramalho, et al. A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir Bras*, 21 Suppl 1:58–62, 2006.
- [81] A. G. Testro and P. W. Angus. Targeting circulatory dysfunction in cirrhosis: terlipressin and the hepatorenal syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*, 24(11):1707–1709, Nov 2009.
- [82] R. Troisi, G. Cammu, G. Militerno, et al. Modulation of portal graft inflow: a necessity in adult living-donor liver transplantation? *Ann Surg*, 237(3):429–436, Mar 2003.
- [83] O. N. Tucker and N. Heaton. The ‘small for size’ liver syndrome. *Curr Opin Crit Care*, 11(2):150–155, Apr 2005.
- [84] M.-J. Tuñón, M. Alvarez, J.-M. Culebras, and J. González-Gallego. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol*, 15(25):3086–3098, Jul 2009.
- [85] Y. Umeda, T. Yagi, H. Sadamori, et al. Effects of prophylactic splenic artery modulation on portal overperfusion and liver regeneration in small-for-size graft. *Transplantation*, 86(5):673–680, Sep 2008.
- [86] D. Valla, P. Geoffroy, C. Girod, and D. Lebecq. Circulatory actions of vasopressin in anaesthetized rats with portal hypertension subjected to haemorrhage. *J Hepatol*, 2(3):328–339, 1986.
- [87] C. S. Viebahn and G. C. T. Yeoh. What fires prometheus? the link between inflammation and regeneration following chronic liver injury. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(5):855–873, 2008.

- [88] J. Walter, M. Burdelski, and D. C. Bröring. Chances and risks in living donor liver transplantation. *Dtsch Arztebl Int*, 105(6):101–107, Feb 2008.
- [89] R.-Y. Xu, B. Liu, and N. Lin. Therapeutic effects of endoscopic variceal ligation combined with partial splenic embolization for portal hypertension. *World J Gastroenterol*, 10(7):1072–1074, Apr 2004.
- [90] G. Zajicek, N. Arber, and D. Schwartz-Arad. Streaming liver. viii: Cell production rates following partial hepatectomy. *Liver*, 11(6):347–351, Dec 1991.

Der Lebenslauf

ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf

ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationsliste

Medizin

- Denecke C, Ge X, Jurisch A, Kleffel S, Kim IK, Padera RF, Weiland A, Fiorina P, Pratschke J, Tullius SG. Influence of Donor Age on the Balance of Regulatory and Effector Mechanisms in Cardiac Allograft Recipients. *Manuscript submitted.*
- Denecke C, Bedi DS, Ge X, Kim IK, Jurisch A, Weiland A, Habicht A, Li XC, Tullius SG. Prolonged graft survival in older recipient mice is determined by impaired effector T-cell but intact regulatory T-cell responses. PLoS One. 2010 Feb 16;5(2):e9232.

Geschichtswissenschaften

- Artikel "Gallus Anonymus" in der Enzyklopädie des Europäischen Ostens (EEO), 2002: <http://eeo.uni-klu.ac.at/>
- Artikel "Heinrich von Lettland" ebd., 2002.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Anne Weiland, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

"Modulation von Pfortaderdruck und Leberregeneration durch Terlipressin und Splenektomie im Tiermodell (Wistar-Ratte)"

selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 20.10.2010

Anne Weiland

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Michael Heise, meinem Doktorvater, und dem wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit, Herrn Dr. med. Christoph Heidenhain, für die Überlassung des Themas und ihre umsichtige Betreuung der Dissertation.

Diese Arbeit wäre nicht entstanden ohne die oft spontane Hilfsbereitschaft vor allem von Mitarbeitern der Charité. An dieser Stelle möchte ich Frau Anke Jurisch danken, die mich aufmerksam und gründlich in die Laborarbeit eingewiesen und praktisch dabei unterstützt hat, darüber hinaus für meine Fragen oft bis spät in den Abend hinein zur Verfügung stand. Frau Anja Schirmeier gilt mein Dank für ihre profunde Einweisung in die immunhistochemischen Färbetechniken. Frau Dr. med. Birgit Rudolph und Herrn PD Dr. med. Wilko Weichert vom Institut für Pathologie danke ich für ihre Bereitschaft, mich hinsichtlich der Auswertung der Präparate zu beraten. Der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. Eckard Hamelmann danke ich dafür, daß sie mich ihr Mikroskop zum Fotografieren meiner Präparate nutzen ließ.

Herr Martin Czuchra hat sich viel Zeit genommen, mich in LaTeX einzuweisen und das Layout dieser Arbeit zu verbessern, wofür ich ihm vielmals danken möchte.

Frau Dr. Lena Ulm danke ich für die energische abschließende Korrektur und noch viel mehr für ihre Ermunterungen als Freundin zu Zeiten, in denen ein Abschluß dieser Arbeit unerreichbar fern schien.

Frau Theresa Weiland danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, mir zu jeder möglichen Tages- und Nachtzeit die gewünschte Literatur zukommen zu lassen, zu der ich selbst keinen Zugang hatte.

Meinen Eltern Elke und Stefan Weiland danke ich von Herzen für ihre jahrzehntelange tatkräftige Unterstützung meiner Ideen, zuletzt meines Studiums und meines Promotionsvorhabens, für ihr bedingungsloses Vertrauen und ihre Liebe.

An letzter, aber nicht an geringster Stelle danke ich meinem Mann, Dr. Moritz Höft, und unserem Sohn Julius ebenso wie meinen Schwestern Katharina und Theresa Weiland und meinen Freunden für all ihre Aufmunterungen und Zerstreuungsversuche, die diese Arbeit in ihrer Entstehung ebenso benötigt hat wie die Zeiten der Konzentration.