

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 200 - 300g verwendet (Firma Harlan-Winkelmann, Bochum, BRD). Dieser Stamm wurde auch bei eigenen Vorversuchen und in zahlreichen anderen experimentellen Studien zur Leberregeneration und in vielen Sepsismodellen benutzt. Somit ist ein Vergleich der Ergebnisse mit denen vieler anderer Arbeitsgruppen möglich. In einem Käfig wurden jeweils 4 bis 6 Ratten bei konstanter Raumtemperatur und einem zwölf Stunden Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Die Tiere hatten während des gesamten Versuchszeitraumes freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Rattenfutter. Nach einem Akklimatisierungsintervall von mindestens einer Woche wurden die Tiere in die entsprechenden Versuchsgruppen randomisiert und operiert. Die Tierversuche wurden dem Tierschutzgesetz entsprechend genehmigt (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin) und durchgeführt.

3.2 Operationstechnik

Alle Tiere wurden in tiefer Inhalationsnarkose mit Isofluran über eine mediane Laparotomie operiert. Die Eingriffe wurden unter sauberen, aber nicht sterilen Kautelen durchgeführt. Lediglich die Versuche mit mikrobiologischen Untersuchungen wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt. Nach Abschluß der jeweiligen operativen Maßnahmen (s.u.) wurde die Abdominalhöhle durch eine zweireihige fortlaufende Naht mit Vicryl 4/0 verschlossen. Alle Tiere erhielten als Schmerzmedikation eine subkutane Injektion von Novaminsulfon (Ratiopharm, Ulm, BRD) und Tramadol (Grünenthal, Aachen, BRD), sowie zusätzlich subkutan 5 ml isotone Kochsalzlösung, um eine Dehydratation zu vermeiden. Zur weiteren postoperativen Analgesie wurde dem Trinkwasser Novaminsulfon und Tramadol beigemischt.

3.2.1 Sham Operation

Bei der Sham operierten Kontrollgruppe wurde die Leber von ihrer ligamentären Aufhängung befreit und das Coecum mobilisiert und vorsichtig ausgelagert, jedoch nicht punktiert.

3.2.2 70% Leberresektion

Die Leberresektion erfolgte nach dem etablierten Modell von Minato et al. [5]. Dabei wurden der mediale und der links-laterale Leberlappen reseziert. Hierfür wurden die beiden Leberlappen von ihren ligamentären Aufhängungen mobilisiert und die vaskulären Pedikel mit einer 4/0 Vicryl Ligatur ligiert, ohne die zu- und abführenden Gefäße der verbleibenden Lappen einzuengen. Anschließend wurde das Lebergewebe der beiden resezierten Lappen distal der Ligaturen entfernt.

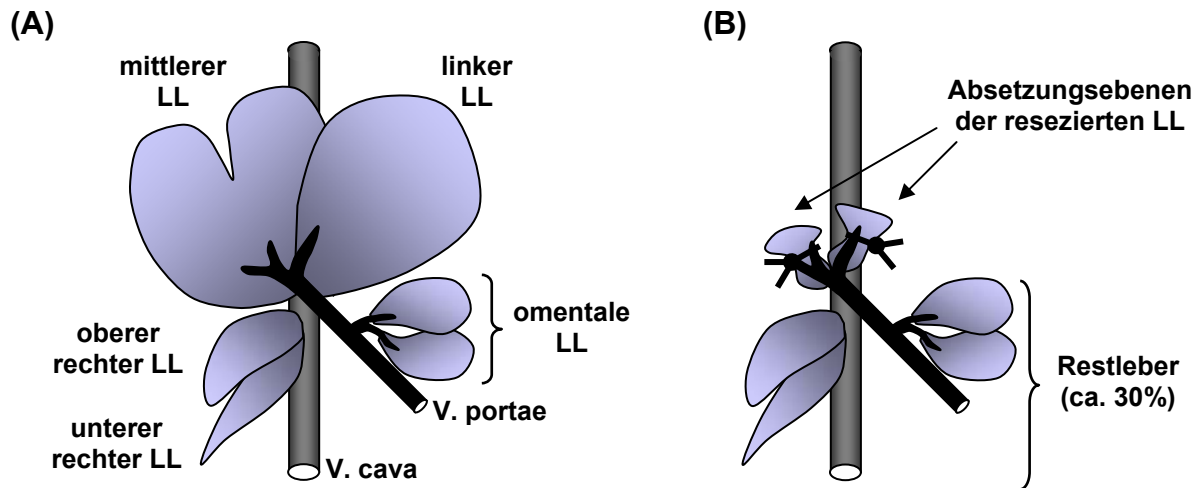


Abb. 4: Schematische Darstellung der Ratenleber **(A)** und des Leberrestes nach 70-prozentiger Leberresektion im Rattenmodell **(B)**; V.: Vena, LL: Leberlappen.

3.2.3 Kolonstenose

Für die Kolonstenose wurde das Kolon ascendens ausgelagert und das Meso in einem avaskulären Abschnitt auf einer Länge von 3 mm darmnah durchtrennt. Durch diese Lücke wurde ein standardisierter Silikonring mit einem Innendurchmesser von 3 mm durchgezogen und um das Darmlumen herum verschlossen. So resultierte eine subtotale Stenose des ascendierenden Kolon.

3.2.4 Coekale Ligatur und Punktion (CLP)

Die Coekale Ligatur und Punktion (CLP) ist ein seit langem etabliertes Kleintiermodell zur Induktion enterogener abdomineller Infektionen. Es kommt der klinischen Situation einer postoperativen Dünn- oder Dickdarmpfistel relativ nahe. Bei der CLP wurde das Coekum vorsichtig mobilisiert und der Blindsack distal der Mündung des terminalen Ileums unter Vermeidung einer Obstruktion der Darmkontinuität ligiert. Die Länge vom distalen Ende des Coecums bis zur Ligatur betrug jeweils 1 cm, um ein definiertes initiales Keimreservoir mit einem ungefähren Volumen von $0,5 \text{ cm}^3$ zu erhalten. Vor der Ligatur wurde Coekalinhalt in das distale Ende des Coekums gestrichen und dort vorhandene Luft dadurch evakuiert. Bei Verwendung eines größeren ligierten Coekumreservoirs ist eine hohe Mortalität bereits bei alleiniger CLP zu beobachten. Daher betrug der Durchmesser des ligierten Anteils ca. 1,0 cm, entsprechend etwa 20% des gesamten Coekumvolumens. Dadurch kommt es nur zu einer geringen Mortalität bei signifikanter septischer Reaktion mit entsprechender Zytokinfreisetzung sowie bakterieller Translokation ins Blut [77].

Anschließend wurde das Coekum einmal mit einer 22 Gauge Kanüle (Microlance, Becton Dickinson, Spanien) punktiert und etwas Darminhalt durch die Punktionsstelle gepreßt. In Vorversuchen wurden außerdem die technischen Parameter der CLP in Kombination mit einer 70% Leberresektion evaluiert, um das Modell für die vorliegende Fragestellung zu adaptieren. Hier wurden neben der kleinkalibrigen Punktionskanülen (22 Gauge) auch Punktionen mit 16 G Kanülen durchgeführt.

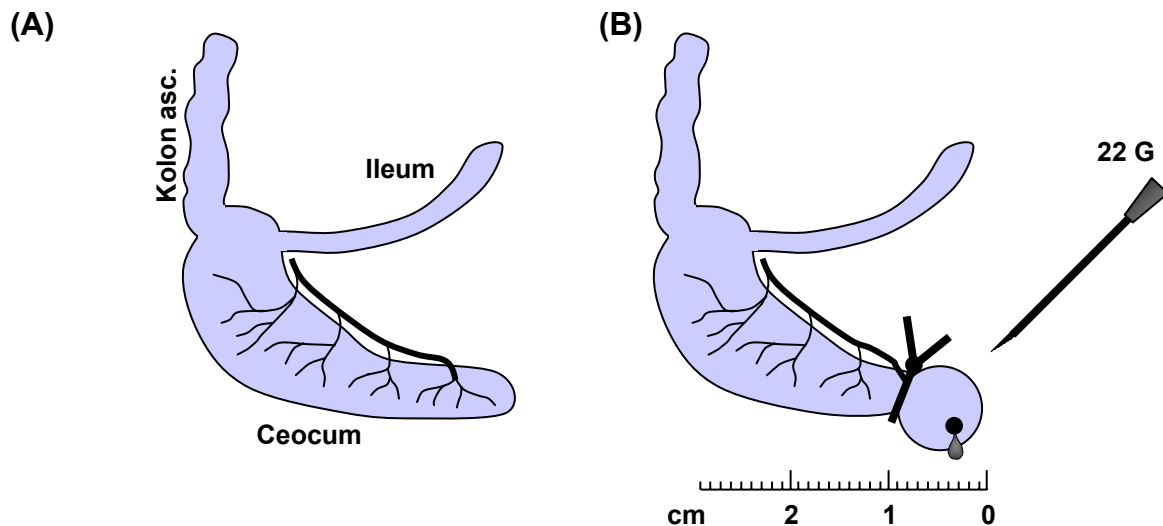


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Rattencoekums (A) und der Technik der Coekalen Ligatur und Punktion (CLP) (B).

3.2.5 Galleleck (GL)

Zur Induktion eines Gallecks wurde der Segmentgallengang des rechten Leberlappens etwas proximal der Einmündung in den Hauptgallengang durchtrennt. Der proximale Anteil wurde offen gelassen, der distale Anteil des Segmentgallenganges mit Prolene 8/0 übernäht, um eine spontane Fistelbildung bzw. innere Drainage zu vermeiden. Bei der Übernähung wurde strikt darauf geachtet, daß der Hauptgallengang hierbei nicht eingengt wurde.

3.2.6 Sekundäroperation

Die Zweitoperation erfolgte zu definierten Zeitpunkten nach der Primäroperation. Dreißig Minuten vor der Sekundäroperation erhielten die Ratten eine i.p. Injektion von 100 mg 5-Bromo-2'-deoxy-uridin (BrdU, Roche Diagnostics, Mannheim, BRD) pro kg Körpergewicht. Diese Substanz wird von allen in der S-Phase befindlichen Zellen in die DNA eingebaut und kann dann später immunhistochemisch nachgewiesen werden. Nach Relaparotomie wurde zunächst der Gallefluß bestimmt. Hierfür wurde der Gallengang mit einem Polyethylen Katheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm, Portex, Hythe, UK) sondiert und die Galle über einen Zeitraum von 10 Minuten gesammelt. Währenddessen wurde die Schwanzarterie über eine kleine Hautinzision mit einer 27 G Venenverweilkanüle direkt punktiert und der arterielle Mitteldruck gemessen. Anschließend erfolgte die Blutentnahme durch aortale Punktion. Die Leber bzw. Restleber wurde im Ganzen entnommen und das Lebergewicht gemessen. Gewebeproben aus Restleber, Lunge und Dünndarm wurden in Formalin fixiert, bzw. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3 ICG-Clearance

Die ICG Clearance ist ein Marker für die maximale hepatische Eliminationskapazität, d.h. für die (exkretorische) Funktionsreserve der Leber und damit ein sensitiverer Parameter der Leberfunktion als z.B. verschiedene Serumparameter. Durch Verwendung nicht invasiver Meßmethoden ohne Notwendigkeit von Blutentnahmen kann die ICG-Clearance wiederholt am selben Tier bestimmt werden und somit der Verlauf der Leberfunktion z.B. nach Leberresektion analysiert werden.

Zur Abschätzung der Funktionsreserve der Leber wurde bei den Tieren aus der 96 h Gruppe die ICG-Elimination wiederholt nicht-invasiv gemessen. ICG wird im Plasma an Albumin gebunden und ausschließlich hepatisch über einen energieabhängigen Membrantransport ausgeschieden, wobei es sich auch um einen Transportmechanismus für konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin handelt [78]. Die ICG-Clearance wurde mittels eines Meßgeräts zur ICG-Densitometrie (DDG-2001, Dye Densitogram Analyzer, Nihon Kohden, Japan), und einer Meßsonde (DDG Analyzer Finger Probe TL-301P, Nihon Kohden, Japan), die am rechten Hinterlauf plaziert wurde, bestimmt. Die Messungen erfolgten jeweils vor der Primäroperation, unmittelbar nach der Primäroperation und nach 6, 24, 48 und 96 Stunden. Zur ICG-Applikation wurde den Tieren eine 27 G Verweilkanüle (BD Venflon, Becton Dickinson, Schweden) in eine Schwanzvene eingebracht und fixiert. Die ICG-Stammlösung (ICG-Pulsion, Pulsion Medical Systems, München) wurde auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt und in einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht injiziert. Anschließend wurde die Verweilkanüle mit 1,3 ml isotoner Kochsalzlösung freigespült. Während der Messungen wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert, um ein Auskühlen zu vermeiden. Anschließend wurden die Kurve ausgedruckt, die Rohdaten auf einen Computer übertragen und gespeichert. Die spätere Feinauswertung mit Berechnung der Eliminationsrate (K) erfolgte off-line anhand einer mindestens 5 minütigen stabilen Messperiode.

3.4 Histologische Untersuchungen

3.4.1 HE-Färbung, Histomorphologie, Mitoseindex

Zur histomorphologischen Beurteilung wurden die formalinfixierten Gewebeproben in Paraffin eingebettet, 5 µm dicke Schnitte angefertigt und nach Fixation mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dazu wurden die Objektträger für 30 sek in einer Hämalaun-Lösung und danach für 5 sek in einer Eosin-Lösung inkubiert. Nach jedem Färbeschritt wurden die Objektträger vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen und abschließend die Objekte eingebettet. Bei Färbung entsteht Hämatin durch Oxidation des Hämatoxylins, welches mit Aluminiumionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Im Präparat erscheint der Zellkern blau, da negativ geladene Phosphatgruppen der Nukleinsäuren mit diesem Farbkomplex reagieren. Das Zytoplasma wird mit dem schwach sauren Eosin angefärbt und erscheint rosa.

Anhand dieser Übersichtsfärbung wurden die inflammatorischen Aktivität, das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung bzw. Nekrosen und der hepatozellulären Verfettung beurteilt. Zusätzlich wurde der Mitoseindex bei 400-facher Vergrößerung durch Auszählen der Mitosen in 20 HPF

ausgewertet und auf eine Gesamtzahl von insgesamt 2000 Hepatozyten bezogen. Die Auswertung erfolgte verblindet für die Gruppenzugehörigkeit des entsprechenden Versuchstiers. Alle histologischen Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité.

3.4.2 BrdU Immunhistologie

Bromodeoxyuridin (BrdU) wird von Zellen, die sich in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) befinden, anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und ist damit ein Marker für die Leberregeneration. Nach vorheriger *in vivo* BrdU Injektion 30 Minuten vor der Gewebeentnahme können somit alle S-Phase Zellen mit Hilfe eines monoklonalen BrdU Antikörpers nachgewiesen werden.

Die BrdU Inkorporation wurde an 5 µm dicken Paraffinschnitten immunhistologisch nachgewiesen. Hierfür wurden die Schnitte zunächst fixiert und durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Es folgte eine Mikrowellen-Erhitung (360 W, zwei mal 5 min) der Schnitte in 200 ml Citratpuffer (10 mM, pH 5.95), um im Zuge der Fixierung und Paraffineinbettung des Gewebes maskierte Epitope wieder zugänglich für Antikörper zu machen. Der immunhistologische Nachweis erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Nachweissystem entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (BrdU Labeling and Detection Kit II, Roche Diagnostics, Penzberg, BRD). Nach Spülen in TBS (PH 7.6) und anschließend PBS erfolgte die Inkubation mit dem Maus-anti-BrdU Antikörper für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde der Überstand durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Schnitte mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus AP) ebenfalls für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der filtrierte Substratpuffer (Color-substrate solution) für 18 min zugegeben. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Gegenfärbung mit 1:3 verdünntem Hämatoxylin für 45 Sekunden, Waschen in Leitungswasser und destilliertem Wasser und schließlich die Einbettung mit Kaisers Glyceringelatine.

Nach Fertigstellung der Färbung erscheinen die S-Phase Kerne braun, eine Anfärbung im Zytoplasma findet nicht statt. Ebenso kommt es zu keiner Anfärbung von Zellen, die sich in einer anderen Phase des Zellzyklus befinden. Anhand der Kernmorphologie bzw. der Lage der positiven Zellen kann zwischen Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen (Endothelzellen, Gallengangsepithelzellen, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen) unterschieden werden. Damit ist die BrdU Inkorporation ein Parameter für die Leberregeneration und definiert die S-Phase Fraktion. Alle Schnitte wurden vom selben Untersucher ausgewertet, der keine Informationen über die entsprechende Versuchsgruppe des Präparates hatte. Insgesamt wurden 20 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Anzahl der positiven Hepatozyten wurde dann auf 1000 ausgezählte Hepatozyten bezogen. Zusätzlich wurde die Anzahl an positiven Nicht-Parenchymzellen ausgewertet. Da eine Auswertung der Gesamtzahl der Nicht-Parenchymzellen pro HPF extrem aufwendig und gleichzeitig unzuverlässig erschien, wurden die BrdU positiven Nicht-Parenchymzellen als Anzahl der positiven Zellen pro Gesichtsfeld in insgesamt 20 Gesichtsfeldern ausgewertet.

3.4.3 Ki-67 Immunhistologie

Ki-67 ist ein Protein, das ubiquitär in allen proliferierenden Zellen vorkommt, wobei die genaue Funktion des Proteins nicht bekannt ist. Daher trägt es noch die ursprüngliche Bezeichnung nach seinem Entdeckungsort Kiel (Ki) und der Lokalisation auf der Mikrotiterplatte bei seiner Entdeckung (Nummer 67). Es wird zur Bestimmung der gesamten Wachstumsfraktion verwendet, da es in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase) positiv ist, und ist deshalb ebenfalls ein Regenerationsmarker. Somit kann die relative Anzahl der Zellen, die sich in der Proliferationsphase befinden, d.h. der Gesamt-Proliferationsindex, bestimmt werden (79). Andere Bestimmungsmethoden des Proliferationsindex, wie z.B. das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) sind weniger spezifisch, da sie nicht nur bei der DNA-Replikation, sondern auch bei der DNA-Reparatur positiv sind (80).

Paraffinschnitte mit einer Dicke von 4 μm wurden fixiert und entparaffiniert. Zur Demaskierung der Epitope erfolgte eine 12 minütige Behandlung im Dampfkochtopf in Citratpuffer. Nach Abkühlen wurde die endogene Peroxidase mit einem Peroxidase Blocking Reagens inhibiert (Dako, Hamburg, BRD). Anschließend wurde der Maus-anti-Ratte Ki-67 Primärantikörper (MIB-5, Dako, Hamburg, BRD) in einer Verdünnung von 1:25 für 30 min bei RT inkubiert. Nach Auswaschen des Überstandes erfolgte eine 10 minütige Inkubation mit einem biotinylierten anti-Maus Sekundärantikörper und nach erneutem Waschen eine 10 minütige Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Streptavidin bindet nahezu irreversibel an Biotin, und ein Streptavidin Peroxidase-Konjugat oxidiert letztlich ein Chromogen, das in der oxidierten Form durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Hierzu folgte die Entwicklung mit DAB und Chromogen (Dako, Hamburg, BRD) für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Gegenfärbung wurde unverdünntes Härris Hämatoxylin verwendet (25 sec.) und die Präparate in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

Positive Zellen weisen eine rötlich-braune Färbung im Bereich des Zellkerns auf, wobei in Abhängigkeit von der entsprechenden Phase des Zellzyklus ein charakteristisches Färbemuster zu beobachten ist [81, Abb. 5]. Während der G_0 -Phase läßt sich keine Ki-67 Expression nachweisen. Die G_1 -Phase ist durch Anfärbung der Nukleoli und zusätzlich multipler kleiner Punkte im Nukleoplasma gekennzeichnet, wobei die Anzahl der Spots im Nukleoplasma mit dem Fortschritt der G_1 -Phase abnimmt. In der S-Phase färben sich dann ausschließlich die Nukleoli an. Während der G_2 -Phase kommt es zu einer diffusen Färbung des Nukleus, unter Umständen mit fokal starker Anfärbung, allerdings scheint die Expression in der G_2 -Phase speziesabhängig unterschiedlich zu sein. Auch die verschiedenen Phasen der Mitose sind aufgrund ihres Färbemusters gut zu differenzieren. Generell kommt es zu einer Anfärbung der kondensierenden bzw. kondensierten Chromosomen, je nach Mitosephase. In der Prophase wird das Ki-67 Antigen von den Nukleoli zu den kondensierenden Chromosomen umverteilt und ist dort als feines Netzwerk sichtbar. In der Metaphase findet sich eine typische Einrahmung der Chromosomen, nach Zusammenbruch der Kernmembran teilweise auch ein Nachweis diffus im Zytoplasma. Dies ist die einzige Phase, wo auch eine Anfärbung außerhalb des Zellkerns zu finden sein kann. In der Anaphase bleibt das Ki-67 Antigen mit dem kondensierten Chromatin assoziiert und ist dann in der Telophase wieder in kleinen nukleären Strukturen lokalisiert [81].

Die Ki-67 positiven Hepatozyten wurden bei 400-facher Vergrößerung in 20 Gesichtsfeldern ausgezählt und auf 2000 ausgezählte Hepatozyten bezogen, wobei der Proliferationsindex als Prozent der Ki-67 positiven Zellen angegeben wurde. Die Auswertung erfolgte verblindet für die Gruppenzugehörigkeit des entsprechenden Versuchstiers.

3.4.4 In situ Apoptose Detektion

Die Beurteilung der Apoptose erfolgte mittels TUNEL Färbung. Diese ist geeignet, um einerseits apoptotische Vorgänge nachzuweisen und andererseits diese durch Auszählen der apoptotischen Zellen zu quantifizieren [82]. Sie ist allerdings nicht spezifisch für die Apoptose, da auch bestimmte Phasen des nekrotischen Zelltodes mit einer Positivität in der TUNEL Färbung einhergehen können [83]. Während der Apoptose degradieren spezifische Kalzium-abhängige Endonukleasen genomische DNA, aus der doppelsträngige DNA-Reste resultieren. Die Identifikation apoptotischer Zellen erfolgt mittels Detektion der DNA-Fragmente durch eine Kombination enzymologischer und immunhistochemischer Techniken mittels TUNEL (TdT terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) mit einem kommerziell erhältlichen Testkit (TdT in situ Apoptose Detection Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA). Das Protokoll des Herstellers wurde gering modifiziert angewendet.

Kryostatschnitte der Leber mit einer Dicke von 5 µm wurden zunächst mit Formaldehyd 10 min fixiert. Um die DNA-Fragmente den färbenden Enzymen zugänglich zu machen, erfolgt die Permeabilisation mit Proteinase K-Verdauung. Bei jeder Färbung wurde eine positiv-Kontrolle für 20 min mit TACS-Nuclease bei 37°C inkubiert und dann in PBS gewaschen. Nach Zugabe der Quenching-Solution und des TdT Labeling Puffers für jeweils 5 min. wurde eine Stunde lang mit dem Labeling Reaction Mix bei 37°C inkubiert. Die jeweils mitgeführte Negativkontrolle wurden stattdessen mit PBS inkubiert. Nach 5 minütiger Inkubation mit dem TdT Stop Puffer wurden die biotinierten Nukleotide mit Streptavidin-Peroxidase Konjugaten identifiziert. Anschließend wurden die Präparate mit Methylgrün 2 1/2 min. gegengefärbt. Die TUNEL positiven Zellen erscheinen braun. Es wurden insgesamt 20 Gesichtsfelder bei 400 facher Vergrößerung ausgezählt und die Anzahl der TUNEL positiven Zellen pro Gesichtsfeld angegeben.

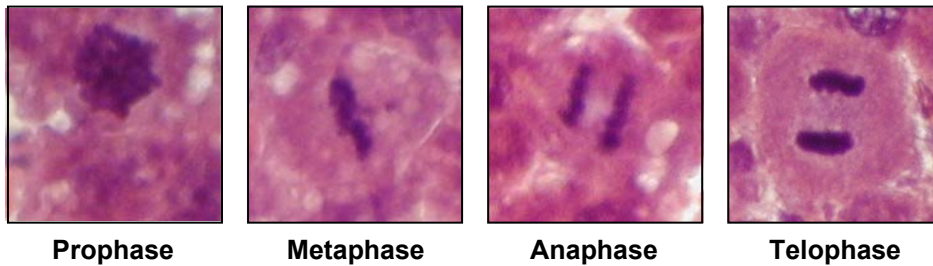
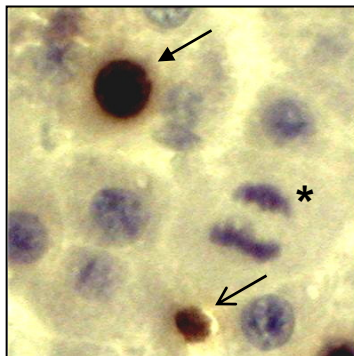
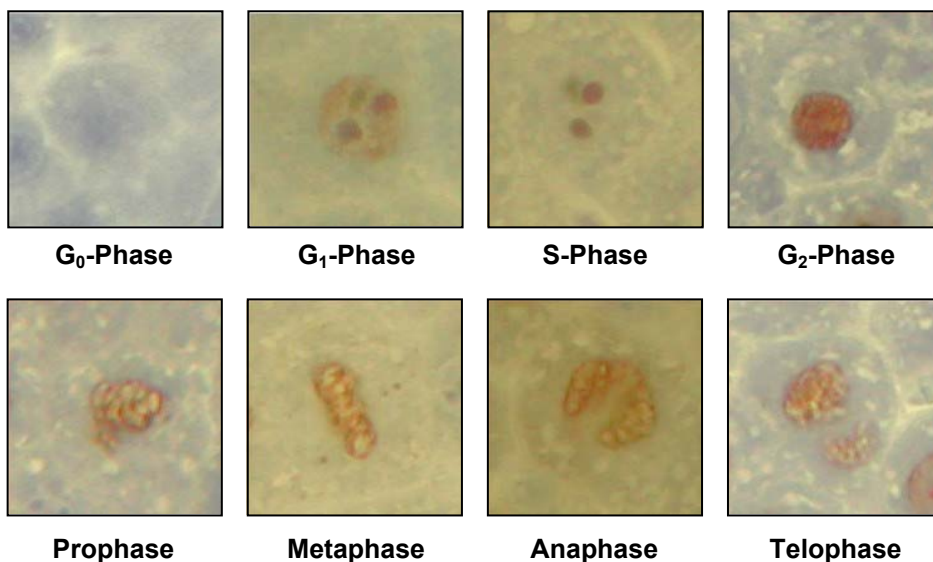
(A) HE-Färbung:**(B) BrdU-Labeling:****(C) Ki-67-Antigen:**

Abb. 5: **Regenerationsparameter:** **(A)** Anfärbung der verschiedenen Mitosephasen der Hepatozyten mittels Hämatoxylin und Eosin. **(B)** BrdU-Labeling: Anfärbung der Zellkerne von Hepatozyten (◄—) und Nicht-Parenchymzellen (←) in der S-Phase; während der Mitose (*) sind die Zellen negativ **(C)** Ki-67 Immunhistologie: das Färbungsmuster ist von der Phase des Zellzyklus abhängig: keine Anfärbung in der G₀-Phase, während der G₁-Phase Färbung der Nukleoli und multipler kleiner Punkte im Nukleoplasma, in der S-Phase ausschließlich der Nukleoli, in der G₂-Phase diffuse Färbung des Zellkerns und während der Mitose Anfärbung der kondensierenden/kondensierten Chromosomen je nach Mitosephase.

3.5 Zytokinbestimmungen

3.5.1 PCR

Die Technik der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht den Nachweis auch sehr geringer Mengen mRNA in einer Gewebeprobe. Dazu wird aus dem zu untersuchenden Gewebe die GesamtrNA isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkriptase zu cDNA umgeschrieben [84].

Hierzu wurden kryokonservierte Gewebeproben in einem kommerziell erhältlichen RNA Extraktionsgemisch aufgenommen und homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat mit Na-Acetat, Phenol und Chloroform- Isoamylalkohol versetzt und die mRNA ausgefällt. Im nächsten Schritt, der eigentlichen Polymerase Kettenreaktion, wurden dann die gewünschten Abschnitte der cDNA selektiv durch spezifische Primer unter spezifischen Versuchsbedingungen mit Hilfe einer DNA-Polymerase amplifiziert. Dies geschieht durch zyklische Wiederholung der drei Einzelschritte Denaturierung (DNA-Doppelstränge zerfallen bei 95°C in zwei komplementäre Einzelstränge), Ankopplung (spezifische Oligonukleotide, Primer genannt, lagern sich an die komplementäre cDNA an) und Elongation (Verlängerung des Primer/cDNA-Hybrids vom 3'-Ende her durch eine DNA-Polymerase.) Durch Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) können die Einzelschritte automatisiert in einem Thermocycler wiederholt werden. Die Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wird anhand publizierter Sequenzen des Zielgens ausgewählt. Die PCR wurde in Reaktionsansätzen von 20µl durchgeführt. Darin enthalten war 2µl PCR Puffer, 0,6 µl MgCl (25mM), 0,5 µl dNTP (jeweils 25mM) 0,5 µl des Primer I (sense), 0,5 µl des Primer II (antisense) und 13,6 µl steriles Wasser. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden auf Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden nach Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Geldokumentationssystem 5000 mit Diana Software, Firma Raytest). Als molekularer Massenstandard wurden 100 bp-DNA-Größenmarker verwendet. Mit der gleichzeitigen Analyse eines sog. „house-keeping“ Gens als interner Standard (β -Actin), wurde der Einsatz gleichmäßiger DNA Mengen in den untersuchten Proben kontrolliert. In der Etablierungsphase des Modells wurden zunächst zentrale Zytokine der Leberregeneration und/oder akute Phase Reaktion orientierend untersucht. Hierzu wurde die Expression der Zielgene semiquantitativ als nicht exprimiert (-), schwach (+), mittelgradig (++) und stark (+++) klassifiziert. In den durchgeführten Experimenten wurde diese Technik der RNA-Quantifizierung gewählt, da eine absolute Konzentrationsangabe der mRNA eines Zielgenes keine zusätzlichen Informationen erbracht hätte.

Die Sequenzen der verwendeten Primer für die untersuchten Zielgene waren wie folgt:

β -ACTIN diente als interner Standard zur Kontrolle für den Einsatz gleichmäßiger DNA Mengen in den untersuchten Proben.

Antisense 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA `3

Sense 5' CGG AAC CGC TCA TTG CC `3

TNF- α wurde als zentrales pro-inflammatorisches Zytokin während der akuten Phase Reaktion sowohl bei Infektionen als auch während der Leberregeneration nachgewiesen.

Antisense 5' GGA TGA ACA CGC CAG TCG CC `3

Sense 5' CGA GTG ACA AGC CCG TAG CC 3'

IL-6 stellt ein pro-inflammatorisches Zytokin dar, das während akuter inflammatorischer Reaktionen schnell induziert wird. Seine Freisetzung wird sowohl durch TNF- α als auch durch IL-1 β stimuliert. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Sepsis, und wurde in einigen Studien auch als prognostischer Parameter nachgewiesen: bei hohen Plasmakonzentrationen fand sich eine erhöhte Mortalität bei abdominaler Sepsis [85]. Gleichzeitig kommt IL-6 aber auch eine zentrale Rolle bei der Leberregeneration zu.

Antisense 5' GGT AGA AAC GGA ACT CCA GAA GAC `3

Sense 5' GGA ACG AAA GTC AAC TCC ATC TGC `3

TGF- β ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das im Rahmen des compensatory anti-inflammatory response syndromes (CARS) während septischer Reaktionen gebildet wird. Bei der Leberregeneration stellt es neben IL-1 β den wichtigsten negativen Wachstumsfaktor der Hepatozyten dar.

Antisense 5' CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC `3

Sense 5' CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC `3

ICAM-1 als Adhäsionsmolekül wird durch viele pro-inflammatorische Zytokine bei der Endothelzellaktivierung induziert und ist ein Marker für die Adhäsion und Akkumulation von Leukozyten während entzündlicher Zustände. Es existieren jedoch auch Hinweise für eine Beteiligung bei der Leberregeneration [13].

Antisense 5' ACT GCC TGG CGG CTC AGT `3

Sense 5' ATG GCT TCA ACC CGT GCC 3'

3.5.2 ELISA

Die Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α wurden mittels kommerziell erhältlicher Sandwich ELISA-Kits (Quantikine® Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA) quantifiziert. Dabei wird jeweils eine 96-well-Mikrotiterplatte verwendet, die mit einem Antikörper gegen das nachzuweisende Zytokin beschichtet ist. Nach Zugabe der Serumprobe werden die entsprechenden Antigene gebunden. Anschließend werden sämtliche anderen Probenbestandteile ausgewaschen und ein an ein Enzym gekoppelter zweiter Antikörper zugegeben, der an die fixierten Zielantigene bindet. Das gesuchte Antigen befindet sich nun zwischen zwei Antikörpern („Sandwich“). Nach Auswaschen der nicht gebundenen sekundären Antikörper wird das Substrat zugegeben. Die Farbreaktion ist in ihrer Intensität proportional zur Menge des zu messenden Antigens. Damit ist mit Hilfe eines Photometers die quantitative Zytokinbestimmung möglich.

3.5.2.1 IL-1 β im Serum

Interleukin-1 β ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das die Bildung nahezu aller anderen pro-inflammatorischen Zytokine induziert, insbesondere TNF- α und IL-6, aber auch Cyclooxygenase-2 (COX-2), die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) und anderen Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Es führt zu einer Inhibition der Leberregeneration, weist aber keine direkte Zytotoxizität auf, wie z.B. TNF- α .

Nach Auftauen der Serumproben auf Raumtemperatur wurden diese entsprechend der Anleitung der Kits mit dem jeweiligen Diluent verdünnt. Anschließend erfolgte die Beschickung der Mikrotiterplatten mit den Standardverdünnungen und den Proben. Diese wurden bei Raumtemperatur 2 Stunden auf einem horizontalen Shaker inkubiert. Hierauf erfolgte der erste Waschschrift und als nächstes wurde der Sekundärantikörper zugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Nach abermaligem Waschen wurde das Substrat dazugegeben und 30 Minuten inkubiert. Anschließend Zugabe von 100 μ l Stop Solution und Bestimmung der optischen Dichte der einzelnen Wells bei $\lambda = 450$ nm und $\lambda = 620$ nm als Referenz im Photometer. Nach Ermittlung einer Standardkurve aus den Werten der Standardverdünnungsreihe erfolgte die Errechnung der Zytokinkonzentration in den Einzelproben.

3.5.2.2 IL-1 β im Lebergewebe

Bei IL-1 β als wichtigstem endogenem Inhibitor der Leberregeneration ist vor allem die lokale Konzentration in der Leber für die Inhibition der Regeneration entscheidend. Daher wurde zusätzlich zur Serumkonzentration auch die Konzentration im Lebergewebe selbst gemessen. Nach entsprechender Validierung des verwendeten ELISA für Leberhomogenisat erfolgte die Messung der Einzelproben. Die Werte wurden jeweils pro Gramm Gesamtprotein (BCA) angegeben. Zur Messung der IL-1 β Konzentration im Lebergewebe erfolgte zunächst eine Protein Isolierung aus den Leberproben. Hierzu wurde Protease-Inhibitor Puffer auf Eis mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride, 100mM) versetzt und ca. 100 mg gefrorenes Lebergewebe dazugegeben. Anschließend wurde das Gewebe homogenisiert (Ultra-Turrax, IKA, Staufen, BRD) und es folgten drei Zyklen mit jeweils vorsichtigem Auftauen in 4°C kaltem Wasser und erneutem Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff. Nach 60 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand gewonnen und für die weiteren Messungen entsprechend der Serumproben verwendet.

3.6 Myeloperoxidase Messungen

Zur Quantifizierung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten im Leber- und Lungengewebe wurde die Myeloperoxidase (MPO) Konzentration in der Rattenleber gemessen. MPO wird aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt und kann somit als Parameter der neutrophilen Infiltration und Aktivierung fungieren [86].

Zur Bestimmung des MPO-Gehaltes in Leber und Lunge wurden jeweils ca. 100 mg kryokonserviertes Gewebe in 0,05 molarem Kaliumdihydrogenphosphat (KDHP) Puffer und 0,5%igem (w/v) Hexacyltrimethylammoniumbromid (HTAB) mit Hilfe eines Ultraturrax dismembriert. Die Proben

wurden anschließend auf Eis gelagert. Das Detergens HTAB setzt aus den primären Granula der neutrophilen Granulozyten MPO frei. Nach Zentrifugation der Proben mit 2000 g bei 4°C wurde jeweils 1 ml des Überstandes für 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 15000 g für 2 Minuten wurden 25 µl der abgekühlten Probe in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zu den Proben wurden 25 µl eines Tetramethylbenzidin-Dimethyl-Sulfoximin-(DMSO) Gemisches (0,1% w/v) und 200 µl eines H₂O₂/KDHP Gemisches (1:18000) in die Mikrotiterplatte gegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 37°C wurden 50 µl einer 2 M H₂SO₄-Lösung dazugegeben, um die kinetische Reaktion zu unterbrechen. Die Messung der Extinktion erfolgte im Fluostar Photometer bei 450 nm. Die Berechnung der MPO-Konzentrationen erfolgte über eine Standardkurve, die anhand von MPO-Standards (Sigma, Hamburg, BRD) erstellt wurde.

3.7 Mikrobiologische Untersuchungen

Zur Quantifizierung der bakteriellen Konzentration an verschiedenen postoperativen Zeitpunkten wurden relevante Organe entnommen und definierte Gewebeproben kultiviert. Die Tiere, bei denen mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt wurden, wurden unter sterilen Kautelen operiert (n=3 pro Gruppe). Im entsprechenden zeitlichen Abstand zur Primäroperation erfolgte die Relaparotomie. Vorher wurde die Haut mit Ethanol gereinigt. Über die mit sterilen Instrumenten wiedereröffnete mediane Laparotomie wurde nach Eingehen in das Peritoneum zunächst eine Peritoneallavage mit 10 ml steriler isotoner Kochsalzlösung zur Keimzahlbestimmung durchgeführt. Danach wurde 1 ml Blut aus der Aorta entnommen, anschließend die drei Kompartimente der mesenterialen Lymphknoten und jeweils der untere omentale Lappen der (Rest-) Leber, die Milz, das Coekum und ein Dünndarmsegment.

Die Blutkulturen wurden unmittelbar nach Entnahme in kommerziell erhältliche pädiatrische Blutkulturflaschen (BactAlert, BioMerieux, Lyon, Frankreich) gefüllt und bei 37°C für maximal sechs Tage inkubiert. Bei fehlendem bakteriellen Wachstum wurden sie dann als steril definiert. Die mesenterialen Lymphknoten (MLK), Lebergewebe und Milz wurden in jeweils 1000 µl steriler Sojabouillon homogenisiert; 100 µl davon wurden jeweils auf Blutagar (für grampositive und gramnegative Bakterien) und auf McConkey Agar (für gramnegative Bakterien) ausgestrichen. Coekum und Dünndarm wurden in jeweils 10 ml Sojabouillon homogenisiert. Danach wurden wegen der hohen Bakteriendichte serielle Verdünnungen durchgeführt und 10 µl der 10³, 10⁴ und 10⁵ verdünnten Lösung auf Blut-, und McConkey- Platten aufgebracht. Alle Agarplatten wurden für 48 Stunden inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurde das bakterielle Wachstum beurteilt und die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt. Die Konzentration lebender Bakterien wurde jeweils pro Gramm Organgewicht berechnet. Kultivierung und Differenzierung der Bakterien wurden durch einen Untersucher verblindet für die Versuchsgruppen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie der Charité durchgeführt.

3.8 Blut- und Serumparameter

Unmittelbar nach der Blutentnahme bei der Sekundäroperation wurden die Konzentrationen von Albumin und Bilirubin sowie der Enzyme ALT und GLDH im Serum gemessen. Durch die Messung der Aktivität zweier Enzyme, die in verschiedenen Kompartimenten vorkommen (ALT im Zytosol und GLDH in den Mitochondrien), kann die Analyse dieser Parameter über die Schwere der zellulären Schädigung Auskunft geben. Die Analyse der Parameter Albumin und Bilirubin läßt Rückschlüsse auf die Synthese- und Entgiftungsfunktion der Leber zu [87]. Hierzu wurden die in Serumröhrchen aufgenommenen Blutproben in einer vorgekühlten Zentrifuge mit 3000 G für 10 min zentrifugiert. Die Bestimmung der Prothrombinzeit nach Quick und das maschinelle Blutbild mit Messung der Leukozyten-, Thrombozyten- und Erythrozytenzahlen wurden ebenfalls unmittelbar nach der Sekundäroperation vorgenommen. Sämtliche Untersuchungen wurden in der Abteilung Klinische Chemie der Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum mit handelsüblichen automatisierten Reaktionskits (Roche Elecsys System) durchgeführt. Das restliche Blut wurde nach Ende der Primäroperation zentrifugiert und das gewonnene Serum/Plasma bis zur späteren Analyse bei -80°C gelagert.

3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA)

Die Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Gewebeproben, als Bezugsgröße unter anderem für die MPO-Aktivität und die IL-1 β Konzentration, wurde durch photometrischen Nachweis nach Lowry [88] bestimmt. Dazu wurden die Gewebeproben zunächst homogenisiert, mit Wasser und Aceton gewaschen und danach mit Natronlauge, Bicinchoninic-Acid-Lösung und 4%-iger Kupfersulfatlösung versetzt. Danach wurde die Lichtabsorption bei 562 nm photometrisch gemessen, diese ist proportional zum Proteingehalt der Probe. Mit Hilfe einer Standardkurve wurde dann die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

3.10 Unterprojekte und Versuchsgruppen

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde das Gesamtprojekt thematisch in drei Unterprojekte aufgeteilt, wobei die Ergebnisse der vorgeschalteten Projekte jeweils die Versuchsparameter der nachgeschalteten Projekte beeinflussten. Somit konnten die Tiere nicht innerhalb des Gesamtprojektes randomisiert werden, sondern lediglich innerhalb der verschiedenen Unterprojekte. Hierbei erfolgte zunächst eine Randomisierung innerhalb der Vorversuche, anschließend innerhalb der Unterprojekte 1 und 2 gemeinsam und schließlich innerhalb des Unterprojekts 3. Dazwischen wurden die vorangegangenen Unterprojekte jeweils ausgewertet, um das geeignete Modell bzw. die Meß- und Interventionszeitpunkte der Folgeprojekte festzulegen.

3.10.1 Unterprojekt 1: Leberresektion und enterogene Infektionen

Da bisher keine systematischen Untersuchungen zum Einfluß von (enterogenen) Infektionen auf die Leberregeneration nach Resektion vorliegen, sollte im ersten Unterprojekt zunächst ein Rattenmodell etabliert werden, anhand dessen der Einfluß bakterieller Infektionen auf die Leberregeneration nach

Resektion charakterisiert werden kann. Hierfür wurde das etablierte Rattenmodell der Leberresektion mit einem der etablierten Modelle der bakteriellen Translokation bzw. Infektion kombiniert. Es wurden zwei Modelle der bakteriellen Entzündung ausgewählt, die als Einzelmodelle in der Ratte gut etabliert sind, jedoch in Kombination mit einer Leberresektion bisher nicht systematisch untersucht wurden. Zur Induktion einer bakteriellen Infektion während der Leberregeneration wurde zum einen das Modell der Coekalligatur und Punktion (CLP) als Modell für eine enterogene polymikrobielle Sepsis [89] und zum anderen eine definierte Kolonstenose (KS) als Modell für eine polymikrobielle bakterielle Translokation [90] ausgewählt. Die Modelle kommen der klinischen Situation einer großen Leberresektion mit den häufigsten infektiösen Komplikationen (postoperativer Subileus mit bakterieller Translokation und postoperativer intraabdominaler Abszeß mit oder ohne Darmfistel) sehr nahe.

Durch sequentielle Messung spezifischer Parameter sollte zunächst untersucht werden, welches Modell der bakteriellen Infektion in Kombination mit einer Leberresektion die besseren Voraussetzungen hinsichtlich Mortalität sowie Verlauf und Stabilität der gemessenen Parameter hat. Zusätzlich sollte die Regenerationsantwort auf die verschiedenen Infektionen charakterisiert und die geeignetsten Zeitpunkte für die Beurteilung der Wirksamkeit einer späteren therapeutischen Intervention herausgefiltert werden.

Im ersten Schritt wurden Vorversuche mit jeweils drei Tieren in der 24 h und 48 h Gruppe mit alleiniger Leberresektion, Leberresektion und simultaner CLP sowie Leberresektion und simultaner Kolonstenose durchgeführt und ausgewertet. Dabei wurden bei der CLP zwei verschiedene Punktionsgrößen bei jeweils drei Tieren verwendet (16 Gauge vs. 22 Gauge). Nachdem die Zwischenauswertung eine Praktikabilität der entsprechenden Modelle ergeben hatte, wurden die geplanten Versuchsgruppen und -zeitpunkte (Tab. 2) in randomisierter Form zahlenmäßig aufgestockt. Lediglich auf die ursprünglich geplante 96h Gruppe nach Leberresektion und Kolonstenose wurde verzichtet, da sich in den Vorversuchen bereits die CLP als geeigneteres Modell herauskristallisierte. Bei der Sham Operation wurde eine 24h Gruppe zu Vergleichszwecken als ausreichend erachtet, da später keine relevanten Veränderungen mehr zu erwarten waren. Außerdem sind vor allem die Unterschiede bezogen auf die alleinige Leberresektion, und nicht die Unterschiede zur Sham Operation bzw. alleinigen CLP entscheidend. Daher wurden auch bei alleiniger CLP keine Messung nach 6h durchgeführt, ebenfalls um die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten.

Nach einer Zwischenauswertung der Unterprojekte 1 und 2 wurden drei zusätzliche Untersuchungszeitpunkte zur genaueren Charakterisierung des Regenerationsprozesses als nötig erachtet (Tab. 3), um die optimalen Meß- und Interventionszeitpunkte zu definieren. Da von Seiten der Leberregeneration relativ homogene Ergebnisse zu erwarten waren, wurden jeweils nur drei Tiere pro Versuchsgruppe eingeplant. Nach der Zwischenauswertung war bereits das Modell mit simultaner Leberregeneration und CLP als besser geeignet (s.u.) ausgewählt worden, daher wurde auf weitere Versuchsgruppen mit Kolonstenose und Leberresektion verzichtet.

Tab. 2: Übersicht der Versuchsgruppen in den Unterprojekten 1 und 2 ([#] nach Abschluß der Vorversuchsphase wurde entschieden, keine „Langzeitversuche“ mit Kolonstenose durchzuführen, s.u.)

Gr.	OP	6 h	24 h	48 h	96 h
1	Sham-Operation	--	n=6	--	--
2	70% Leberresektion (LR 70)	n=6	n=6	n=6	n=6 (ICG)
3	CLP	--	n=6	n=6	n=6 (ICG)
4	LR 70 + CLP, simultan	n=6	n=6	n=6	n=6 (ICG)
5	LR 70 + Kolonstenose (KS), simultan	--	n=6	n=6	-- [#]
6	LR 70 + Galleleck (GL), simultan	n=6	n=6	n=6	n=6 (ICG)

Tab. 3: Zusätzliche Versuchsgruppen nach Auswertung der Unterprojekte 1 und 2 zur genaueren Charakterisierung des Regenerationsprozesses nach Leberresektion mit und ohne simultane CLP.

Gr.	OP	12 h	18 h	72 h
2	LR 70	n=3	n=3	n=3
4	LR 70 + CLP, simultan	n=3	n=3	n=3

3.10.2 Unterprojekt 2: Leberresektion und Galleleck

Zusätzlich sollten in einem Modell der abakteriellen Entzündung (gallige Peritonitis) Gemeinsamkeiten und Unterschiede bakterieller und abakterieller Entzündungen bezüglich ihrer Wirkung auf die Leberregeneration herausgearbeitet werden. Als abakterieller Stimulus diente ein segmentales Galleleck (GL, Übersicht siehe auch 3.2.5). Dies kommt der klinischen Situation einer großen Leberresektion mit postoperativem Galleleck ebenfalls sehr nahe.

3.10.3 Unterprojekt 3: Präkonditionierung

Im dritten Unterprojekt wurden die Auswirkung einer vorbestehenden Infektion oder unspezifischen Streßreaktion auf eine nachfolgende Leberresektion untersucht. Hierzu wurde eine CLP durchgeführt und 24 h später eine 70 prozentige Leberresektion (Gruppe **pr-CLP**: Präkonditionierung CLP), da Ergebnisse der Studien zur LPS-Applikation vor Leberresektion eine gewisse Präkonditionierung durch die Entzündungsreaktion vermuten lassen [31,32]. In einer weiteren Gruppe wurde 24 h vor kombinierter Leberresektion mit CLP eine Sham Operation durchgeführt (Gruppe **pr-Sham**: Präkonditionierung Sham-OP), um eine eventuelle infektionsspezifische Präkonditionierung in der Gruppe pr-CLP von der unspezifischen Streß-Präkonditionierung in der Gruppe pr-Sham abgrenzen zu können (Tab. 4).

Tab. 4: Sequentielle Operationen zur Untersuchung der Präkonditionierung durch eine vorbestehende Infektion (Gruppe 7) beziehungsweise Sham-Operation (Gruppe 8).

Gr.	OP	24 h	48 h
7	CLP und 24 h später LR 70 (pr-CLP)	n=6	n=6
8	Sham-Operation und 24 h später LR 70 (pr-Sham)	n=6	n=6

3.11 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. In den Gruppen mit einer Fallzahl von n=3 wurde keine statistische Auswertung vorgenommen, hier erfolgte lediglich die deskriptive Darstellung der Ergebnisse. Bei den anderen Gruppen wurden Vergleiche innerhalb einer Gruppe mit dem Wilcoxon-Test und Vergleiche zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde jeweils als statistisch signifikant gewertet. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) berechnet.