

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Unterprojekt 1: Enterogene bakterielle Infektionen

#### 4.1.1 Vergleich der verwendeten enterogenen Infektionsmodelle

Als erstes wurden im ersten Unterprojekt zwei kliniknahe Modelle der enterogenen Infektion (CLP und Kolonstenose) hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Leberregeneration bei simultaner Leberresektion evaluiert. Zunächst sollen daher die Ergebnisse des Vergleichs der beiden Modelle mit Darstellung der wichtigsten erhobenen Parameter aufgezeigt werden sowie die Entscheidungsfindung für die Verwendung des einen oder anderen Modells. Die detaillierten Ergebnisse des letztlich relevanten Modells sind im nächsten Abschnitt dargestellt.

##### 4.1.1.1 Überlebensraten

Zur Evaluation der technischen Parameter bei der CLP in Kombination mit einer 70% Leberresektion wurden zunächst Vorversuche in einer Gruppengröße von drei Tieren durchgeführt. Hier betrug die Letalität bei Leberresektion und simultaner CLP mit einer 16 G Kanüle innerhalb der ersten 24h 100%. Dagegen überlebten alle Tiere, bei denen lediglich eine 22 G Kanüle verwendet wurde. Für die vorliegende Fragestellung kam somit nur das weniger invasive Modell mit einer 22 G Punktion in Betracht. Das gute Gesamtüberleben bestätigte sich auch in der späteren Versuchsphase. Im Verlauf des Unterprojekts 1 wurde die 70% Leberresektion bei insgesamt 36 Tieren mit einer CLP (22 G Kanüle) kombiniert. Dabei starben nur drei Tiere (Abb. 6). Bei keinem der Tiere war bei der Obduktion ein chirurgisch-technisches Problem zu verzeichnen.

Bei 70% Leberresektion und simultaner Kolonstenose überlebten 100 % der Tiere bis zu 48h nach der Primäroperation. Allerdings war mit zunehmendem Nachbeobachtungszeitraum eine starke Dilatation des Kolons mit resultierender Dehydratation der Tiere zu beobachten. Somit wurde auf eine längere Versuchsdauer in dieser Gruppe verzichtet, zumal die größten Unterschiede in allen Gruppen während der ersten 48h zu verzeichnen waren. Sowohl nach alleiniger 70% Leberresektion als auch nach alleiniger CLP mit einer 22 G Kanüle überlebten 100 % der Tiere (Abb. 6).

##### 4.1.1.2 Vergleich der Funktions- und Regenerationsparameter

In den Gruppen mit Leberresektion und simultaner enterogener Infektion lagen die Regenerationsparameter 24 h postoperativ niedriger als bei alleiniger Leberresektion. Dies gilt sowohl für die Gruppe 5 (LR + KS) als auch für die Gruppe 4 (LR + CLP). So war das relative Lebergewicht 24h postoperativ bei alleiniger LR ( $1,78 \pm 0,04$  %) signifikant höher als nach simultaner LR + CLP ( $1,57 \pm 0,04$  %) bzw. LR + KS ( $1,57 \pm 0,05$  %). In den beiden Gruppen mit enterogener Infektion war das relative Lebergewicht jedoch gleich (LR+CLP vs. LR+KS,  $p=0,74$ ).

In den Zellzyklusfraktionen fanden sich die größten Unterschiede beim Mitoseindex. Bezogen auf 2000 Hepatozyten wurden nach alleiniger LR  $83 \pm 20$  Mitosen gezählt, dagegen bei LR + CLP nur  $11 \pm 6$  und nach LR + KS  $17 \pm 6$  Mitosen ( $p < 0,05$ ). Auch der Anteil der Zellen in der S-Phase (BrdU positiv) und die Gesamt-Wachstumsfraktion waren bei simultaner LR + CLP signifikant erniedrigt (Abb. 7, Abb. 8). Nach LR+KS waren die Anteile der BrdU- und Ki-67- positiven Zellen ebenfalls deutlich niedriger als nach alleiniger LR, eine statistische Signifikanz wurde jedoch knapp verfehlt (Abb. 7).

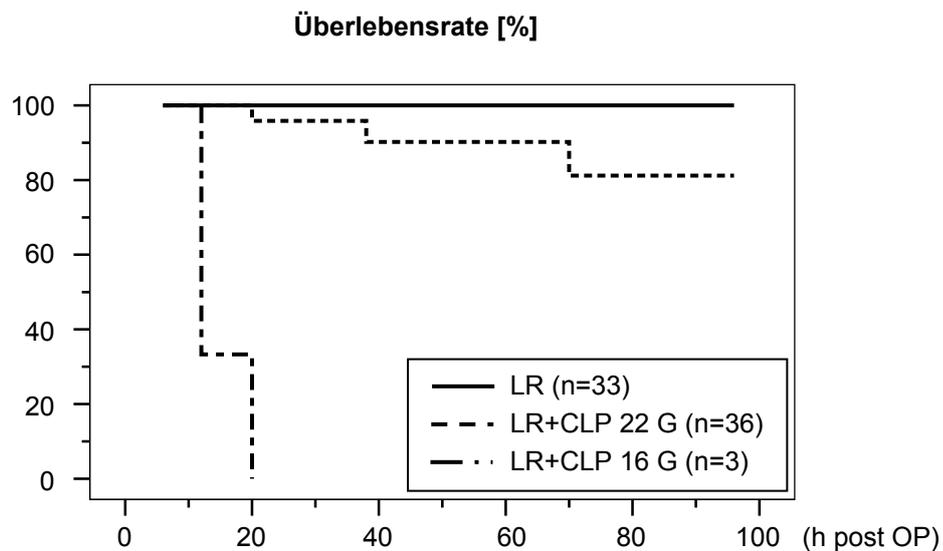


Abb. 6: Gesamtüberleben nach Leberresektion mit oder ohne simultane CLP und in Abhängigkeit vom Durchmesser der verwendeten Punktionskanüle (22 Gauge vs. 16 Gauge).

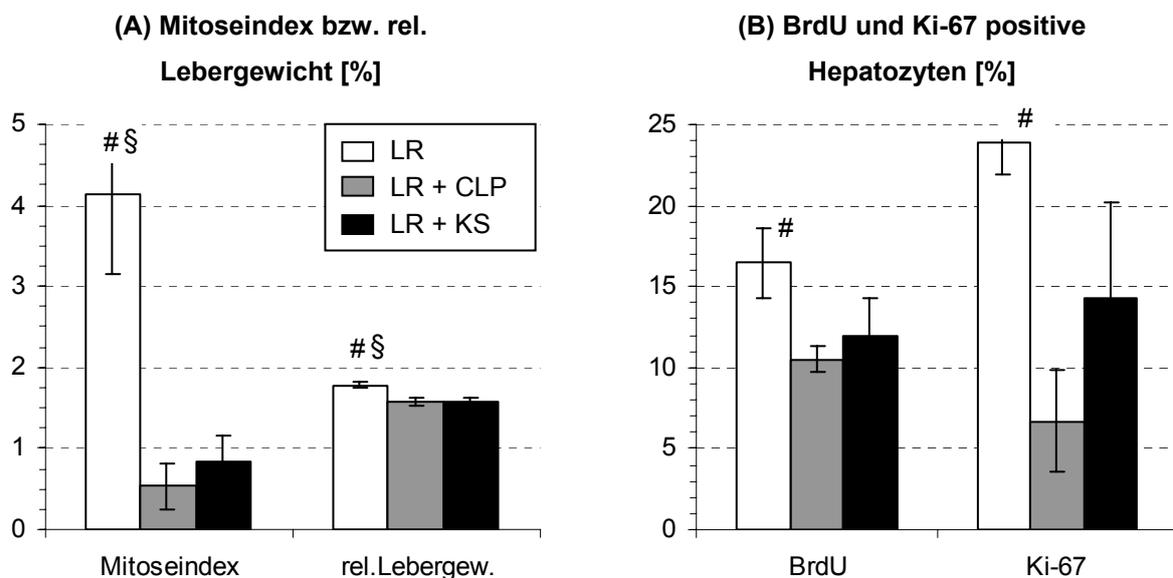


Abb. 7: Relatives Lebergewicht in Prozent **(A)** und verschiedene Wachstumsfraktionen in Prozent **(B)** bei alleiniger Leberresektion bzw. bei Leberresektion mit simultaner CLP oder simultaner Kolonstenose jeweils 24 h postoperativ (#:  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, §:  $p < 0,05$  vs. LR+KS, Mann-Whitney-U-Test)

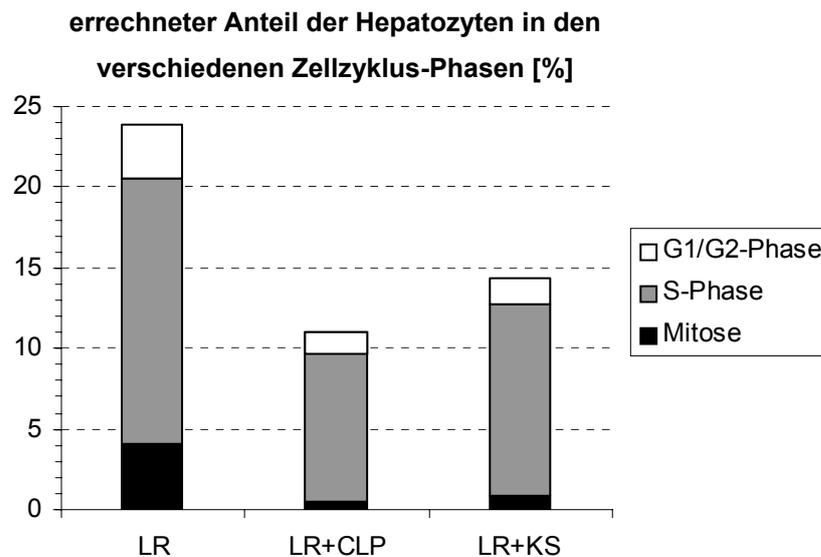


Abb. 8: Berechneter Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus (errechnet aus den Ergebnissen des Mitoseindex, BrdU-Labelings und der Ki-67 Immunhistologie) 24 h nach alleiniger Leberresektion bzw. simultaner CLP oder Kolonstenose (statistische Signifikanzen siehe Abb. 7).

Insgesamt war somit die Leberregeneration bei simultaner CLP stärker beeinträchtigt als bei simultaner Kolonstenose, allerdings fanden sich in den Regenerationsparametern Mitoseindex ( $p=0,35$ ), BrdU positive Hepatozyten ( $p=0,57$ ) und Ki-67 Wachstumsfraktion ( $p=0,20$ ) keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen (LR+CLP vs. LR+KS).

Ähnlich verhielten sich die Leberfunktionsparameter. So war das Gesamt - Bilirubin im Serum nach LR + CLP mit  $0,6 \pm 0,2$  mg/dl signifikant höher als nach alleiniger LR (Abb. 9) und deutlich, aber nicht signifikant höher als nach LR+KS ( $0,3 \pm 0,1$  m/dl,  $p=0,11$ ). Die Galleproduktion pro Gramm Lebergewebe war in den Gruppen mit LR und CLP ( $87 \pm 9$   $\mu$ l / g Leber / h) und der Gruppe mit LR und KS ( $84 \pm 1$   $\mu$ l / g Leber / h,  $p=0,40$ ) ähnlich. Als Syntheseparameter lag die Prothrombinzeit tendenziell nach LR und CLP niedriger ( $36 \pm 2$  %) als nach LR + KS ( $45 \pm 3$  %,  $p=0,06$ ). Insgesamt zeigte sich somit bei Vergleich der beiden Modelle CLP und KS bei simultaner LR ein deutlicher Trend zur schlechteren Leberfunktion nach LR+CLP bei allen Parametern, wenngleich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Einzelparametern zu verzeichnen waren.

Die Transaminasen-Aktivität (Abb. 9) als Parameter für einen septischen Leberschaden wies in der Gruppe mit LR + CLP höhere Werte als nach alleiniger LR auf. Verglichen mit einer simultanen Kolonstenose fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei den Aktivitäten der Leberenzyme ALT ( $p=0,22$ ) und GLDH ( $p=0,47$ ) im Serum.

Als Zeichen der entzündlichen Aktivität waren die IL-1 $\beta$ -Werte sowohl im Serum als auch im Lebergewebe nach simultaner LR+CLP signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen (Abb. 9). Dagegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den lokalen und systemischen TNF- $\alpha$  Werten. Die Leukozytenzahlen lagen nach LR + CLP mit  $2,7 \pm 0,5$  /nl deutlich niedriger als nach LR + KS mit  $7,2 \pm 0,7$  ( $p=0,04$ ). Als weitere Besonderheit stieg nach LR+KS der Hämoglobingehalt im

Sinne einer Hämokonzentration tendenziell an, dies korrelierte mit dem klinischen Befund einer beginnenden Exsikkose sowie mit tendenziell erniedrigten Blutdruckwerten, blieb jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 9,  $p=0,14$ ).

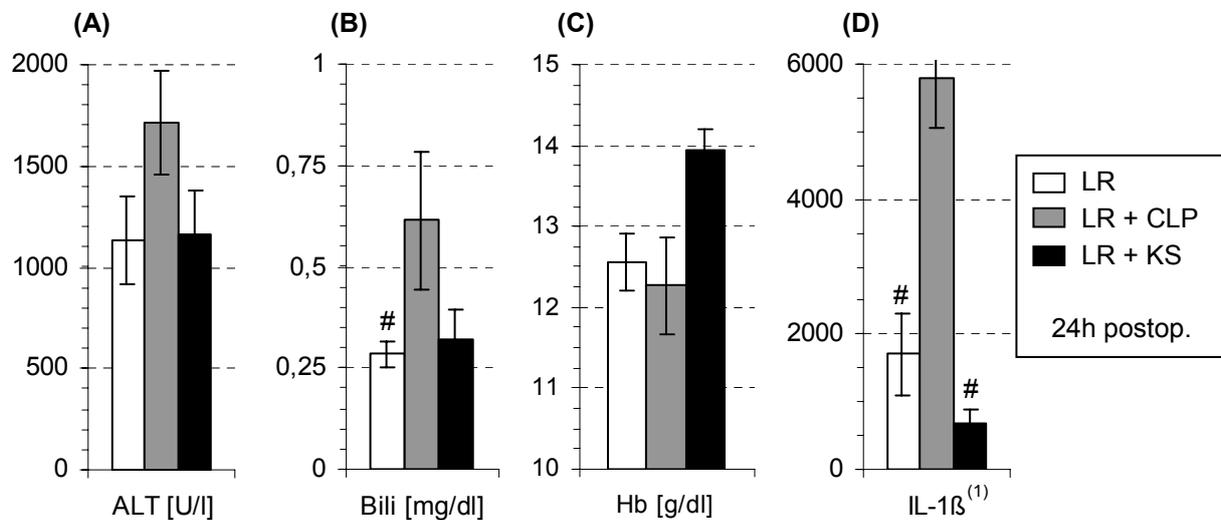


Abb. 9: Vergleich der ALT-Aktivität im Serum (A), Bilirubinkonzentration im Serum (B) Hämoglobinkonzentration (C) und der IL-1 $\beta$  Konzentration im Lebergewebe (D) 24h nach alleiniger Leberresektion bzw. bei simultaner CLP (LR+CLP) oder Kolonstenose (LR+KS), (Bili: Gesamt-Bilirubin, <sup>(1)</sup> pg / mg Protein im Lebergewebe; #  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, Mann-Whitney-U-Test)

Aufgrund der dargestellten Parameter erschien das Modell der Leberresektion mit simultaner CLP für die vorliegende Fragestellung als geeigneteres Modell verglichen mit einer simultanen Kolonstenose. Es fand sich nach LR+CLP eine tendenziell stärkere Kompromittierung der Leberfunktion und der Regeneration. Zusätzlich war bei gleichzeitiger CLP die Entzündungsreaktion (IL-1  $\beta$ ) erwartungsgemäß stärker ausgeprägt, dagegen fanden sich bei simultaner Kolonstenose andere potenziell interkurrente Faktoren wie Hämokonzentration / Dehydrierung, die für die vorliegende Fragestellung nicht erwünscht waren. Somit sind im folgenden nur die entsprechenden Gruppen mit LR + CLP sowie die jeweiligen Kontrollgruppen im Detail dargestellt, die Gruppen mit LR+KS werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mehr dargestellt.

#### 4.1.2 Körpergewicht und relatives Lebergewicht

Das Körpergewicht bei Primäroperation unterschied sich in allen Versuchsgruppen nicht signifikant (Tab. 5). Postoperativ war in allen Versuchsgruppen ein signifikanter Gewichtsverlust ab den 24h Gruppen zu verzeichnen. Der Gewichtsverlust war in allen Versuchsgruppen signifikant höher als in der Sham-Gruppe ( $p < 0,01$ ). Dagegen unterschieden sich die beiden Gruppen mit alleiniger Leberresektion und mit simultaner LR+CLP zu allen Untersuchungszeitpunkten von 6 bis 96 h weder im Körpergewicht noch im Gewichtsverlust (Tab. 5).

Tab. 5: Körpergewicht bei Primäroperation und relative Reduktion des Körpergewichts zwischen Primär- und Sekundäroperation (<sup>§</sup> bezogen auf das Körpergewicht bei Primäroperation, <sup>#</sup> p < 0,05 vs. alle anderen Gruppen, Mann-Whitney-U-Test, GL: Galleleck, KG: Körpergewicht)

	Gruppe	6 h	24 h	48 h	96 h
Körpergewicht (g)	Sham	--	265 ± 10	--	--
	LR	259 ± 12	267 ± 7	278 ± 8	265 ± 3
	CLP	--	266 ± 6	265 ± 4	269 ± 5
	LR + CLP	246 ± 13	267 ± 5	271 ± 10	271 ± 9
	LR + KS	--	268 ± 9	289 ± 11	--
	LR + GL	269 ± 3	268 ± 2	269 ± 14	268 ± 9
	rel. Reduktion des KG (%) <sup>§</sup>	Sham	--	4,3 ± 0,9 <sup>#</sup>	--
	LR	2,3 ± 1,7	9,4 ± 0,5	10,3 ± 1,6	8,4 ± 1,6
	CLP	--	7,1 ± 0,3	6,8 ± 1,7	4,9 ± 2,3
	LR + CLP	1,5 ± 1,4	8,5 ± 0,7	8,4 ± 2,0	11,2 ± 1,7
	LR + KS	--	6,1 ± 1,8	10,9 ± 1,8	--
	LR + GL	1,2 ± 1,0	7,8 ± 2,0	7,1 ± 2,6	6,7 ± 1,7

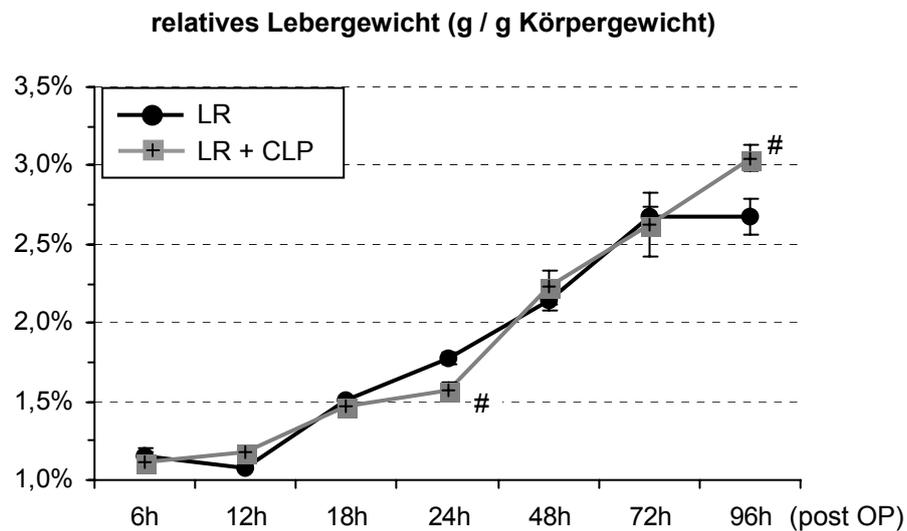


Abb. 10: Verlauf des relativen Lebergewichts in den ersten vier Tagen nach alleiniger Leberresektion und Leberresektion mit simultaner CLP bezogen auf das Körpergewicht bei Sekundäroperation (g pro g Körpergewicht, <sup>#</sup> p < 0,05 vs. LR, Mann-Whitney-U-Test).

Das Gewicht des Leberresektats bei der Primäroperation unterschied sich nicht signifikant in den Gruppen mit LR und LR+CLP. In den ersten 18h postoperativ gab es auch keine Unterschiede hinsichtlich des absoluten und relativen Gewichts der Restleber zwischen den beiden Gruppen. Nach 24 h war das relative Lebergewicht bei alleiniger LR mit  $1,78 \pm 0,04$  % des Körpergewichts signifikant höher als nach LR und simultaner CLP ( $1,57 \pm 0,04$  % des Körpergewichts). Allerdings waren 48 und 72h nach Primäroperation keine Unterschiede mehr zu verzeichnen, und 96h postoperativ war das relative Lebergewicht nach LR+CLP ( $3,05 \pm 0,09$  %) sogar höher als nach alleiniger LR ( $2,67 \pm 0,11$  %,  $p=0,04$ ).

Auch nach alleiniger CLP ohne LR war ein Zuwachs des relativen Lebergewichts von  $3,78 \pm 0,12$  % nach 24 h auf  $4,02 \pm 0,12$  % nach 96 h zu beobachten. Somit war das relative Lebergewicht 24 h nach alleiniger CLP etwas höher ( $p=0,10$ ) und 96 h nach alleiniger CLP signifikant höher als 24 h nach Sham Operation  $3,36 \pm 0,22$  % ( $p=0,04$ ).

### 4.1.3 Hämodynamik

Als makrohämodynamische Parameter wurden der arterielle Mitteldruck und die Herzfrequenz bestimmt. Es fanden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten keine signifikanten hämodynamischen Unterschiede zwischen den Gruppe mit alleiniger LR und simultaner LR und CLP.

Nach 12 und 18h fiel der arterielle Mitteldruck sowohl nach LR als auch nach LR+CLP leicht ab, nach 24 h normalisierte sich der Blutdruck sowohl nach LR ( $94 \pm 4$  mm Hg) als auch nach LR+CLP ( $90 \pm 3$  mm Hg) wieder. Im weiteren Verlauf bis 96h kam es nicht mehr zu relevanten Veränderungen in den beiden Gruppen. Insgesamt ergaben sich auch im Vergleich zur Sham operierten Gruppe ( $89 \pm 9$  mm Hg) keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppe mit alleiniger CLP wies nach 24 h einen etwas höheren arteriellen Mitteldruck ( $102 \pm 7$  mm Hg) auf als nach LR bzw. LR+CLP ( $p>0,05$ ). Auch in dieser Gruppe kam es nach 48 h wieder zu einer Normalisierung des arteriellen Mitteldruckes ( $93 \pm 4$  mm Hg).

### 4.1.4 Leberzellschaden

#### 4.1.4.1 Leberenzyme

In allen Gruppen mit einer Leberresektion kam es zu einem signifikanten Anstieg insbesondere der ALT, aber auch der GLDH-Aktivität bereits 6h postoperativ (Abb. 11). Der Anstieg war 24 h postoperativ in der Gruppe mit simultaner LR+CLP etwas ausgeprägter als in der Gruppe mit alleiniger LR, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Nach 96 h hatten sich die Leberenzyme in allen Gruppen wieder nahezu normalisiert. Bei alleiniger CLP waren die ALT-Werte mit  $84 \pm 11$  U/l nach 24h nicht signifikant höher als in der Sham-Gruppe ( $67 \pm 4$  U/l,  $p=0,26$ ), die GLDH-Aktivität im Serum war dagegen nach CLP signifikant höher ( $56 \pm 12$  U/l) als in der Sham-Gruppe ( $9 \pm 1$  U/l,  $p=0,01$ ).

#### 4.1.4.2 Histomorphologie

Histomorphologisch bestanden 6 h postoperativ keine Unterschiede zwischen den leberresezierten Tieren mit oder ohne simultane CLP. In beiden Gruppen fanden sich keine relevante entzündliche Aktivität und auch keine Leberzellnekrosen. Vor allem periportal war eine beginnende feintropfige Verfettung zu verzeichnen. Nach 24 h war diese Verfettung stärker ausgeprägt und reichte bei den meisten Präparaten bis nach mittzonal (Abb. 12). Die Verfettung war nach 48 h deutlich weniger ausgeprägt, aber etwas grobtropfiger, und nach 96 h nicht mehr nachweisbar. Ansonsten fanden sich in beiden Gruppen keine signifikanten pathologischen Veränderungen. Lediglich bei einem Tier nach Leberresektion und simultaner CLP waren einige kleine Nekroseareale zu beobachten, zusätzlich in diesem und in zwei weiteren Tieren der 24 h Gruppe eosinophile zytoplasmatische Einschlusskörperchen. Zu diesem und auch zu keinem späteren Zeitpunkt fand sich eine relevante entzündliche Infiltration (Abb. 12). Histomorphologisch bestanden ansonsten auch zu den späteren Zeitpunkten mit Ausnahme einer unterschiedlichen mitotischen Aktivität (siehe 4.1.6.1) keine Unterschiede.

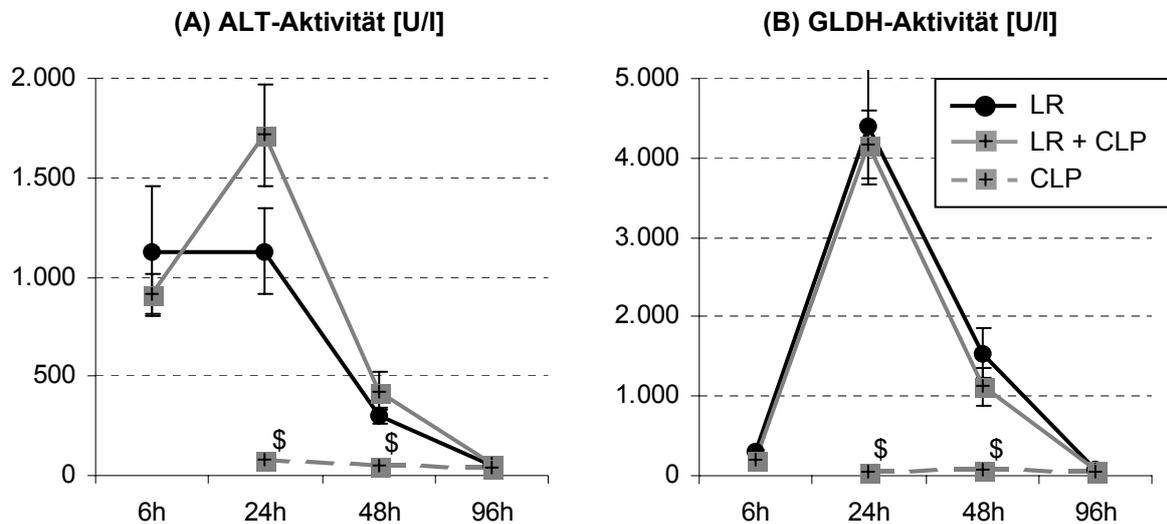


Abb. 11: ALT- **(A)** und GLDH-Enzymaktivität **(B)** im Verlauf nach alleiniger Leberresektion, alleiniger CLP und Leberresektion mit simultaner CLP. (§  $p < 0,05$  vs LR mit oder ohne CLP; die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit LR waren nicht statistisch signifikant, Mann Whitney-U-Test).

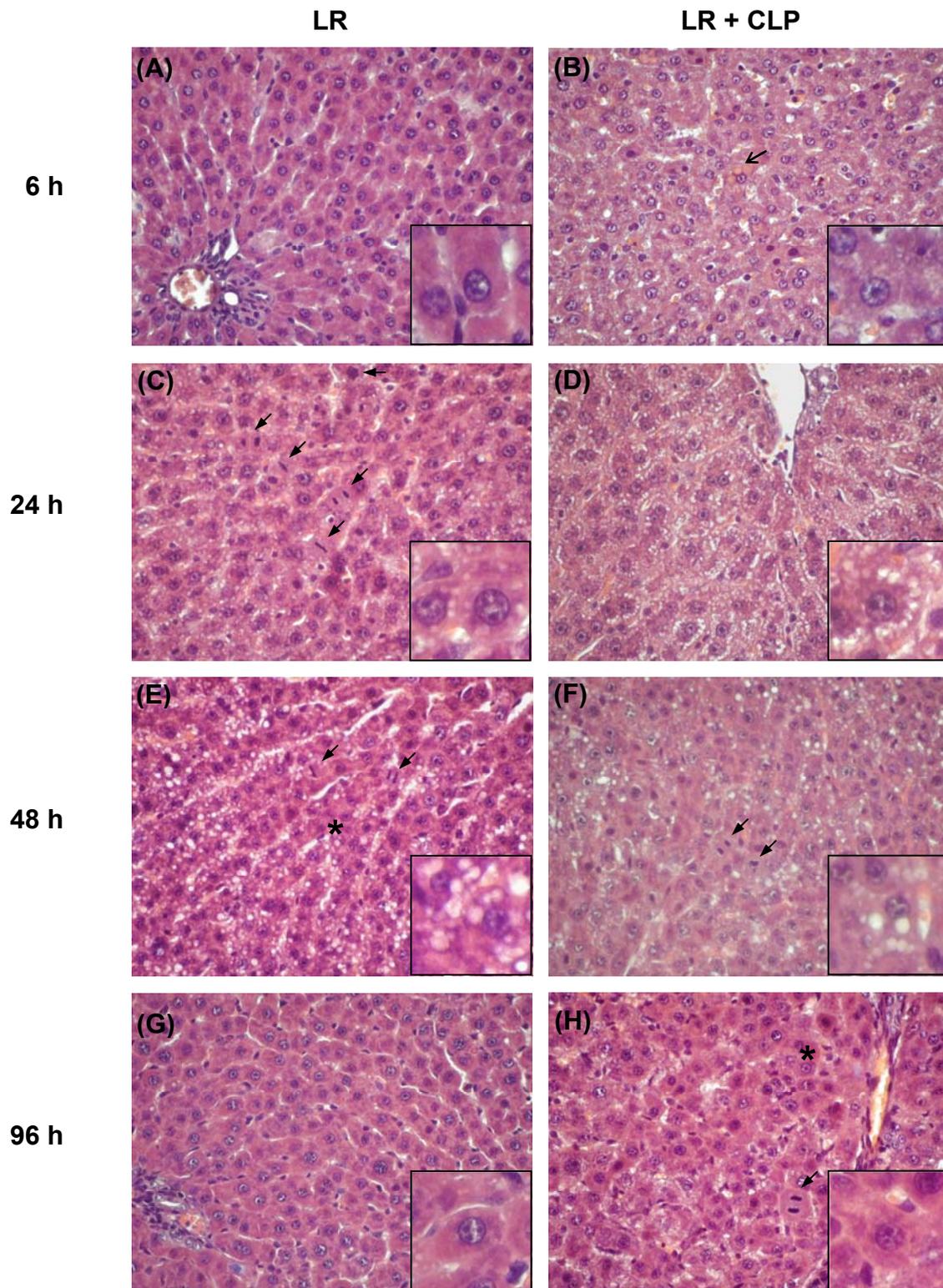


Abb. 12: HE-Färbung (alle x 400): (A) Normale Leberarchitektur 6 h nach LR (B) Beginnende Verfettung und vereinzelt Einschlusskörperchen (←) 6 h nach LR+CLP (C) periportale feintropfige Parenchymverfettung und hohe Anzahl an Mitosen (←) 24 h nach LR (D) keine Mitosen und starke periportale Parenchymverfettung 24 h nach LR+CLP (E) grobtropfige Parenchymverfettung und Rückgang der Mitoserate 48 h nach LR sowie multiple Hepatozytencluster (\*) vor der sinusoidalen Reorganisation (F) maximale Mitoserate in der LR+CLP Gruppe nach 48 h (G) keine Verfettung mehr und weitgehende sinusoidale Reorganisation 96 h nach LR (H) zahlreiche Hepatozyten-Cluster (\*) und andauernde mitotische Aktivität 96 h nach LR+CLP bei nicht abgeschlossener azinärer Reorganisation.

## 4.1.5 Leberfunktionsparameter

### 4.1.5.1 Galleproduktion

Als Parameter für die sekretorische Funktion der Leber wurde die Galleproduktion gemessen. Der Gesamt-Gallefluß bezogen auf das Körpergewicht 24h nach Sham Operation war mit  $2,7 \pm 0,3 \mu\text{l/g KG/h}$  doppelt so hoch wie nach LR ( $1,3 \pm 0,3 \mu\text{l/g KG/h}$ ,  $p < 0,05$ ) und nach LR + CLP ( $1,3 \pm 0,2 \mu\text{l/g KG/h}$ ,  $p = 0,03$ ). Keine signifikanten Unterschiede waren zwischen Sham Operation und alleiniger CLP ( $2,4 \pm 0,1 \mu\text{l/g KG/h}$ ,  $p = 0,40$ ) zu beobachten. Betrachtet man jedoch den Gallefluß pro Gramm Lebergewebe, so lagen die Werte in der Sham Gruppe ( $79 \pm 10 \mu\text{l/g Leber/h}$ ) und in der Gruppe mit alleiniger CLP ( $66 \pm 3 \mu\text{l/g Leber/h}$ ) im ähnlichen Bereich wie bei LR ( $76 \pm 13 \mu\text{l/g Leber/h}$ ,  $p =$ ) und LR+CLP ( $86 \pm 12 \mu\text{l/g Leber/h}$ ) (Abb. 13).

Bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Galleproduktion pro Gramm Lebergewebe (Abb. 13) war 6 h postoperativ in beiden Gruppen mit Leberresektion (LR und LR+CLP) die Galleproduktion höher als 24 h postoperativ. Während nach alleiniger LR der Gallefluß bereits 48 h postoperativ signifikant auf  $128 \pm 8 \mu\text{l/g Leber/h}$  anstieg, blieb er 48 h nach LR + CLP annähernd konstant ( $91 \pm 12 \mu\text{l/g Leber/h}$ ). Erst in der 96h Gruppe war die Galleproduktion nach LR+CLP wieder gleich hoch wie nach alleiniger LR, aber deutlich höher als 24h nach Sham Operation oder 96 h nach CLP. Ähnliches war beim Gallefluß bezogen auf das Körpergewicht zu beobachten, hier hatte sich in der Gruppe mit alleiniger LR trotz reduziertem Gewicht der Restleber nach 48 h die Gesamt-Galleproduktion wieder normalisiert. Dies wurde durch eine erhöhte Galleproduktion pro Gramm Leber erreicht, nach alleiniger LR bereits 48 h postoperativ und nach LR+CLP erst 96 h postoperativ (Abb. 13).

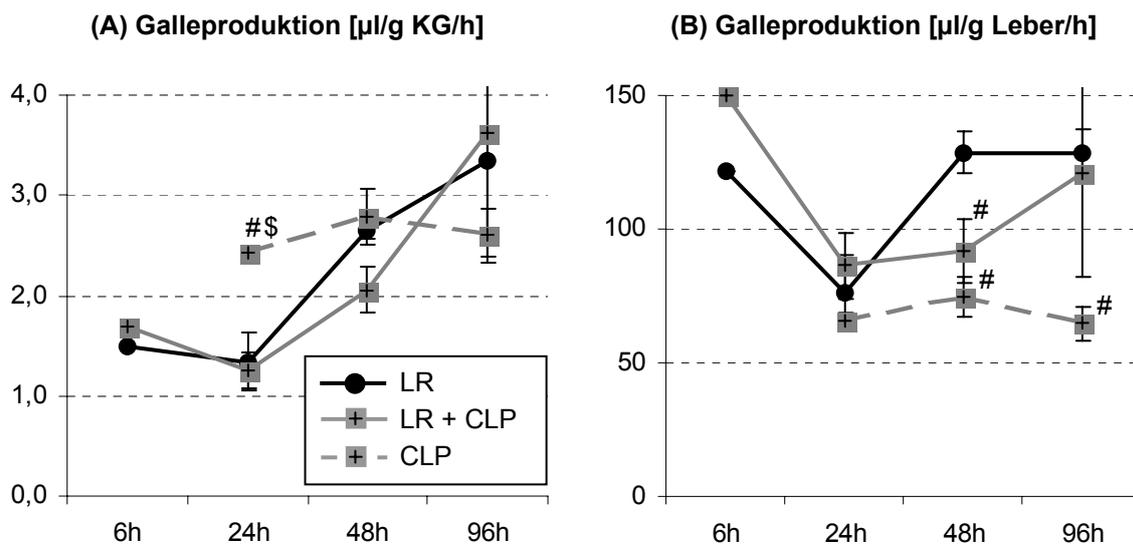


Abb. 13: Relative Galleproduktion bezogen auf des jeweilige Körpergewicht **(A)** bzw. Gewicht der (Rest-) Leber **(B)** (KG: Körpergewicht, #  $p < 0,05$  vs. LR; \$  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, Mann Whitney-U-Test).

#### 4.1.5.2 Bilirubin, Albumin, Prothrombinzeit nach Quick

Als Laborparameter für die exkretorische und synthetische Funktion der Leber während des Regenerationsprozesses wurden das Gesamt-Bilirubin im Serum, Albumin im Serum und die Prothrombinzeit nach Quick gemessen. Bei den Sham operierten Tieren betrug der mittlere Bilirubinwert im Serum 24 h postoperativ  $0,11 \pm 0,02$  mg/dl. Nach alleiniger CLP fanden sich keine signifikanten Unterschiede zur Sham Operation, der 24 h Wert lag hier bei  $0,10 \pm 0,02$  mg/dl, und er veränderte sich bis 96 h postoperativ nicht signifikant.

Dagegen stieg das Bilirubin nach LR bereits 6 h postoperativ leicht an ( $0,24 \pm 0,02$  mg/dl). Das Maximum nach alleiniger LR fand sich nach 24 h ( $0,28 \pm 0,03$  mg/dl), anschließend fiel der mittlere Bilirubinwert kontinuierlich wieder ab (Abb. 14). Nach simultaner LR + CLP war das Bilirubin bereits 6h postoperativ tendenziell höher als nach alleiniger LR ( $0,34 \pm 0,07$  mg/dl,  $p=0,22$ ). Die 24 h und 48 h Werte waren dann hochsignifikant höher verglichen mit alleiniger LR ( $p<0,01$ ). Nach 96 h fanden sich wieder vergleichbare Werte.

Die Albumin-Konzentration als Syntheseparameter betrug 24 h nach Sham Operation  $3,3 \pm 0,1$  g/dl. Nach CLP lag der 24 h Wert bei  $3,0 \pm 0,1$  g/dl, der 96 h Wert bei  $2,8 \pm 0,1$  g/dl. In der 6 h Gruppe waren die Albumin Werte sowohl nach LR ( $3,9 \pm 0,1$  g/dl) als auch nach LR + CLP ( $3,8 \pm 0,1$  g/dl) leicht erhöht. Während sich nach alleiniger LR bis 96 h ( $3,1 \pm 0,1$  g/dl) postoperativ dann annähernde Normalwerte fanden, fiel das Albumin nach LR+CLP kontinuierlich und signifikant auf  $2,3 \pm 0,1$  g/dl nach 96 h ab (Abb. 14). Die Prothrombinzeit nach Quick lag 24 h nach Sham Operation bei  $60 \pm 4$  %. Nach alleiniger CLP wichen die Quick-Werte davon nicht signifikant ab:  $65 \pm 2$  % nach 24h,  $56 \pm 2$  % nach 48 h und  $57 \pm 3$  % nach 96 h.

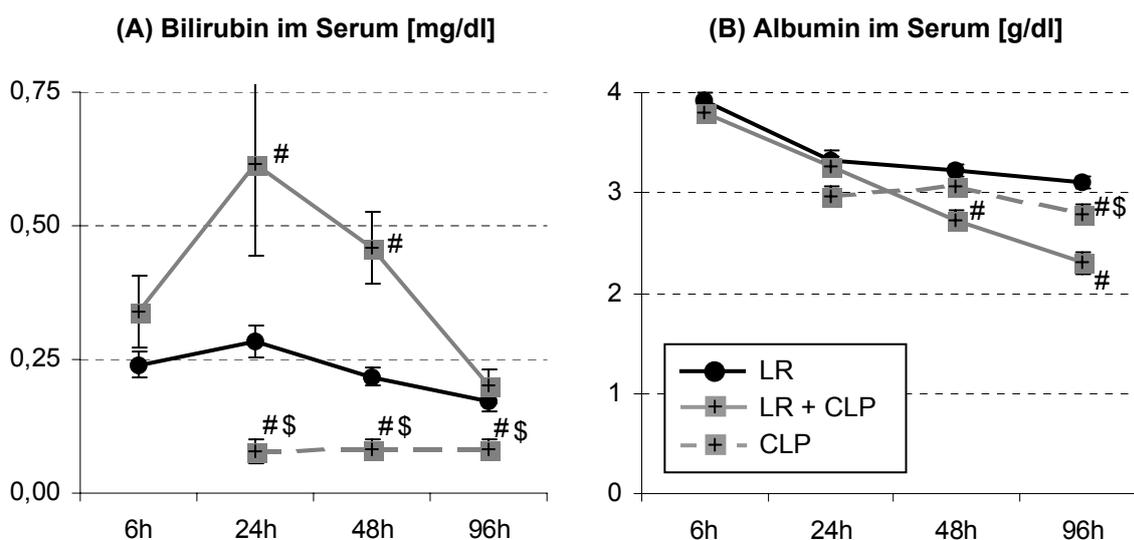


Abb. 14: Serumkonzentrationen von Bilirubin [mg/dl] und Albumin [g/dl] in den Versuchsgruppen (<sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. LR; <sup>§</sup>  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, Mann Whitney-U-Test).

Die Prothrombinzeit fiel 24 h nach LR auf  $39 \pm 2$  % ab und war damit signifikant niedriger als nach CLP oder Sham Operation. Ab der 48 h Gruppe stieg der Quick dann wieder auf  $53 \pm 1$  % an. Nach LR + CLP fiel die Prothrombinzeit in der 24 h Gruppe ebenfalls signifikant auf  $36 \pm 2$  % ab verglichen mit der Sham Gruppe und der CLP Gruppe ( $p=0,03$ ). Nach 48 h lag der Quick Wert noch tendenziell niedriger als nach alleiniger LR ( $45 \pm 4$  %,  $p= 0,10$ ), in den 96 h Gruppen waren dann keine Unterschiede mehr zu verzeichnen.

#### 4.1.5.3 ICG-Clearance

Zur Messung der Funktionsreserve der Leber wurde die maximale ICG - Elimination pro Zeiteinheit gemessen. Die Absolutwerte der ICG-Messung zeigten präoperativ keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Nach Sham-Operation kam es zu keinen signifikanten Veränderungen der ICG-Clearance bis 24 h postoperativ. So lag die Eliminationsrate präoperativ bei  $59 \pm 5$  %, unmittelbar postoperativ bei  $50 \pm 10$  % und nach 24 h bei  $52 \pm 8$  % (Abb. 15). Spätere Messungen wurden in dieser Gruppe nicht durchgeführt. Nach alleiniger CLP kam es zu einer signifikanten Reduktion der ICG-Clearance 24 h postoperativ, an sämtlichen anderen Meßzeitpunkten fanden sich keine Unterschiede verglichen mit dem Ausgangswert.

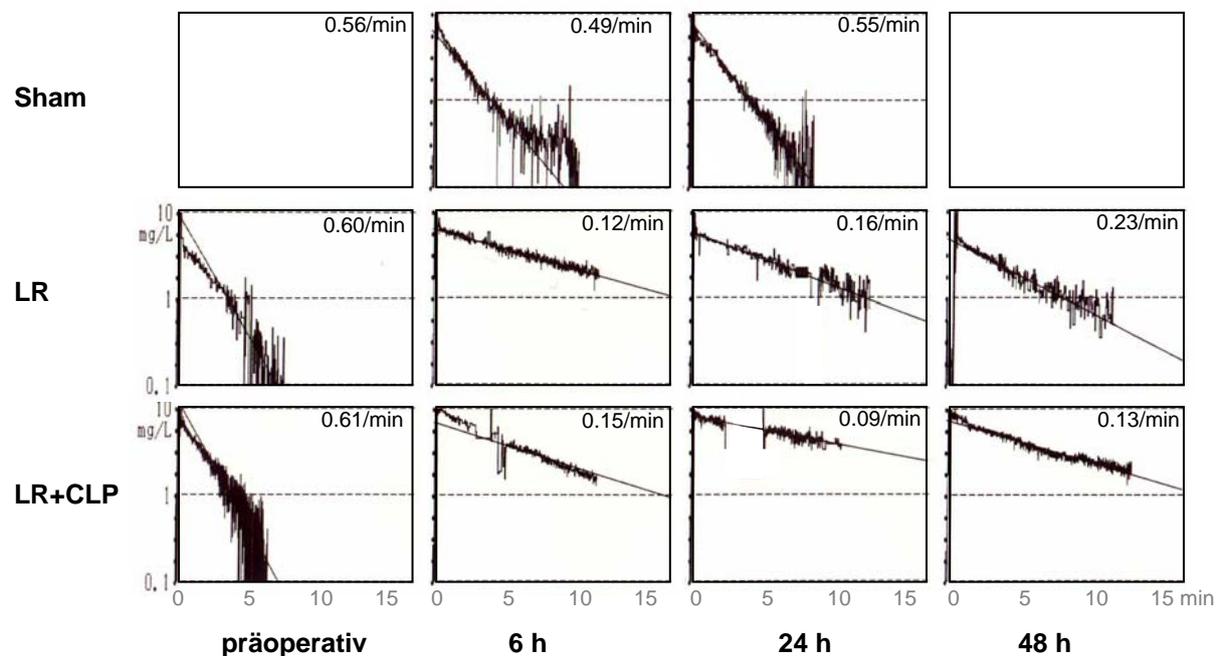


Abb. 15: Exemplarische Originalkurven der ICG-Clearance Messung von drei Einzeltieren aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen (sequentielle Messungen jeweils am selben Tier).

Tab. 6: Relativwerte der ICG-Clearance bezogen auf den präoperativen Ausgangswert (=100%) des jeweiligen Tieres (<sup>#</sup> p<0,05 vs. LR, Mann Whitney-U-Test ; <sup>§</sup> p<0,05 vs. postop. Wert der entsprechenden Gruppe, Wilcoxon-Test, <sup>&</sup>die Unterschiede zwischen Sham-OP und alleiniger CLP waren nicht signifikant)

		postop.	6 h	24 h	48 h	96 h
<b>Sham</b>	<b>[%]</b>	86,3 ± 17,9 <sup>#</sup>	93,5 ± 15,8 <sup>#</sup>	81,7 ± 6,8 <sup>#</sup>	--	--
<b>LR</b>	<b>[%]</b>	29,2 ± 4,2	24,2 ± 5,2	34,3 ± 12,3	52,1 ± 8,5 <sup>§</sup>	61,3 ± 8,6 <sup>§</sup>
<b>CLP <sup>&amp;</sup></b>	<b>[%]</b>	94,5 ± 10,8 <sup>#</sup>	101,3 ± 19,8 <sup>#</sup>	62,5 ± 20,1 <sup>§#</sup>	93,1 ± 12,4 <sup>#</sup>	94,7 ± 3,0 <sup>#</sup>
<b>LR + CLP</b>	<b>[%]</b>	31,4 ± 8,9	21,8 ± 2,8	18,4 ± 2,4 <sup>#</sup>	28,3 ± 6,0	57,6 ± 18,5

Bezogen auf den präoperativen Wert (=100 %) sank die ICG-Clearance unmittelbar nach Resektion auf 29 ± 4 % nach LR und auf 31 ± 8% nach LR + CLP (Tab. 6). Dies entspricht der Reduktion des Lebergewichtes um ca. 70 % in beiden Gruppen.

Sechs Stunden nach Leberresektion mit oder ohne CLP kam es zu einem weiteren Abfall der ICG-Clearance bei allen Tieren, dies erreichte aber keine statistische Signifikanz. Nach alleiniger LR stieg die ICG-Clearance bereits nach 24h wieder leicht an, eine signifikante Erhöhung war dann nach 48 h zu beobachten (p=0,04 vgl. mit den postop. Werten, Abb. 15, Abb. 16). Dagegen kam es 24 h nach simultaner LR + CLP zu einer weiteren leichten Reduktion der ICG Clearance (9 ± 1 %), und erst nach 48 h waren annähernd wieder die unmittelbar postoperativen Werte erreicht (14 ± 2%). Die deutlichsten Unterschiede bei der ICG-Elimination zwischen den Gruppen mit alleiniger LR und LR+CLP waren bei den 48 h Tieren zu verzeichnen (p=0,02). Nach 96 h war die ICG-Clearance in beiden Gruppen wieder annähernd gleich (Abb. 15,Abb. 16).

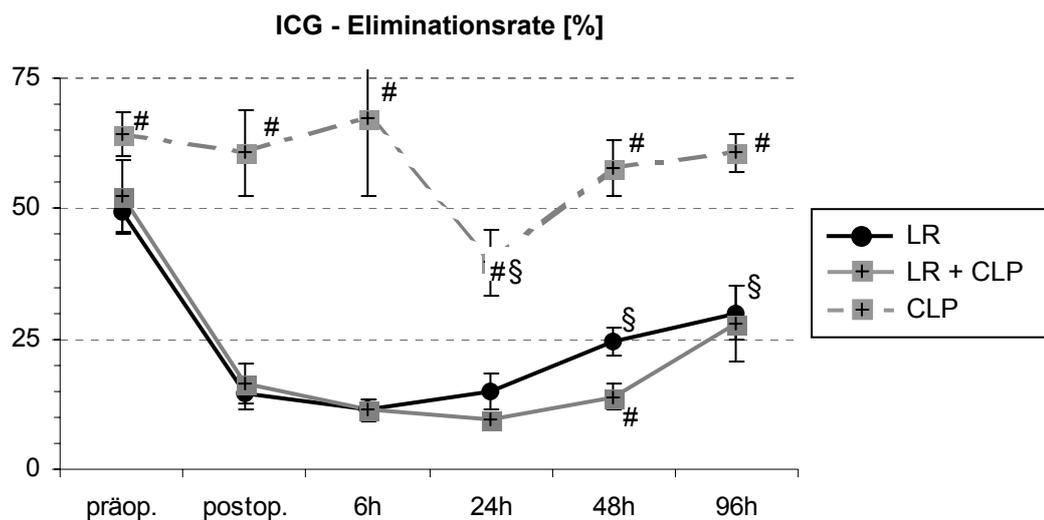


Abb. 16: Postoperative Veränderungen der ICG-Eliminationsrate (K; Absolutwerte) in den 96 h Gruppen (<sup>#</sup> p<0,05 vs. LR, Mann Whitney-U-Test ; <sup>§</sup> p<0,05 vs. postop. Wert der entsprechenden Gruppe, Wilcoxon-Test)

#### 4.1.6 Regenerationsparameter

Zur Quantifizierung der Regenerationskinetik wurden neben der gesamten Wachstumsfraktion, d.h. allen im Zellzyklus außerhalb der G<sub>0</sub>-Phase befindlichen Zellen, auch die S-Phase Fraktion und die Mitosefraktion der Hepatozyten bestimmt. Zusätzlich wurde beim BrdU-Labeling die Kinetik der Regeneration der Nicht-Parenchymzellen ausgewertet.

##### 4.1.6.1 M-Phase: Mitoseindex

In der Sham operierten Gruppe waren nach 24 h keine Mitosen zu beobachten. Nach alleiniger CLP sah man ebenfalls keine mitotische Aktivität in den 24 h und 96 h Untersuchungszeitpunkten (0 Mitosen / 2000 Hepatozyten). Vereinzelt Mitosen waren dagegen 48 h nach alleiniger CLP zu finden ( $0,4 \pm 0,2$  Mitosen / 2000 Hepatozyten).

Nach alleiniger Leberresektion wurde die maximale mitotische Aktivität in der 24 h Gruppe beobachtet (Abb. 12), hier befanden sich 4,2% der Hepatozyten in der M-Phase ( $83 \pm 20$  Mitosen / 2000 Hepatozyten). In der 24 h Gruppe waren dabei die Mitosen vor allem periportal und mittzonal lokalisiert, zu den späteren Untersuchungszeitpunkten dann auch perizentral. Nach 48 h fiel die Mitoserate wieder deutlich ab (Abb. 17).

Eine Leberresektion mit simultaner CLP führte zu einer deutlichen Veränderung der Regenerationskinetik. Es wurde zum einen der Eintritt in die M-Phase verzögert und zum anderen auch die maximale mitotische Aktivität vermindert. So befanden sich nach 24 h lediglich 0,5 % der Hepatozyten in der M-Phase. Der relative Anteil der Zellen in der M-Phase stieg nach 48 h in dieser Gruppe auf 1,6% an und lag zu diesem Zeitpunkt auf ähnlichem Niveau wie nach alleiniger LR (Abb. 17). In den 96 h Gruppen war die mitotische Aktivität in beiden Gruppen nur noch gering, aber nach simultaner LR und CLP (7 Mitosen / 2000 Hepatozyten) noch etwas höher als nach LR ( $5 \pm 1$  Mitosen / 2000 Hepatozyten), dies war jedoch nicht signifikant ( $p=0,16$ ).

Bei den beiden leberresezierten Gruppen korrelierte die Mitoserate 24 h postoperativ hochsignifikant mit dem erreichten relativen Lebergewicht (Abb. 18). Somit hatten Tiere mit einem hohen Mitoseindex auch schon ein deutlich höheres Lebergewicht erreicht als solche mit einer niedrigen Mitoserate oder solche, bei denen der Zellzyklus noch nicht die Mitose erreicht hatte. Somit kann das Lebergewicht 24 h postoperativ als valider Parameter für den Fortschritt des Regenerationsprozesses angesehen werden. Dagegen fand sich nach 48 h keine Korrelation der beiden Parameter für die beiden Gruppen zusammen, dafür aber für die beiden Untergruppen. Während in der Gruppe mit alleiniger LR mit zunehmendem relativen Lebergewicht die Mitoserate abfiel, war nach LR+CLP eine inverse Korrelation zu verzeichnen. Hier korrelierte eine hohe Mitoserate mit einem hohen erreichten relativen Lebergewicht (Abb. 18). Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten war keine Korrelation zwischen relativem Lebergewicht und Mitoseindex mehr zu beobachten.

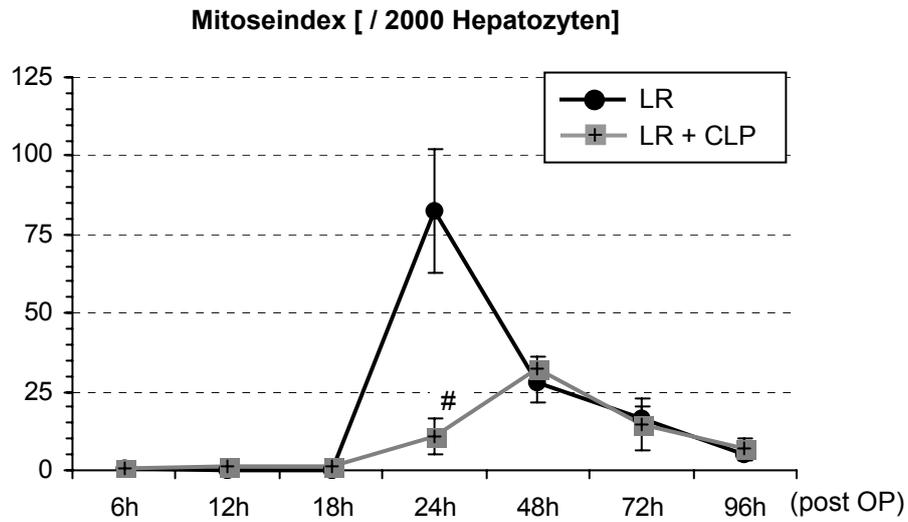


Abb. 17: Mitoseindex (Anzahl der Zellen in der M-Phase pro 2000 Hepatozyten) im entsprechenden Zeitintervall nach Leberresektion mit oder ohne simultane CLP (#  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test)

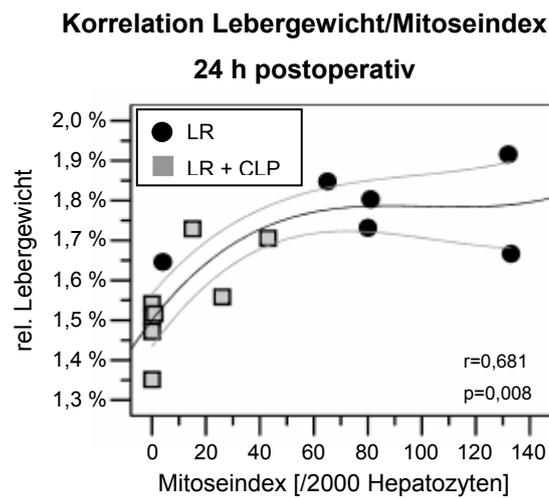


Abb. 18: Korrelation des Mitoseindex mit dem relativen Lebergewicht nach 24 h ( $r=0,681$ ), 48 h postoperativ bestand keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern mehr.

#### 4.1.6.2 S-Phase: BrdU-Labeling

Nur vereinzelt waren BrdU positive Hepatozyten nach Sham Operation zu beobachten (im Mittel 0,02% der Hepatozyten), ebenso nach alleiniger CLP zu allen Untersuchungszeitpunkten (im Mittel zwischen 0,08 und 0,12 % der Hepatozyten).

Beim Vergleich der alleinigen LR mit simultaner LR+CLP fielen auch in der S-Phase ähnliche Veränderungen der Regenerationskinetik auf wie in der M-Phase. Auch hier war insgesamt eine deutliche Verzögerung des Eintritts in die S-Phase zu beobachten (Abb. 19). Während nach 6 h und 12 h in beiden Gruppen nur vereinzelt BrdU positive Zellen gefunden wurden, befanden sich 18 h nach LR 2,3% der Hepatozyten in der S-Phase, dagegen nur 0,5 % nach LR+CLP. Signifikant mehr Parenchymzellen in der S-Phase fanden sich dann 24 h nach LR ( $16 \pm 2$  %) verglichen mit der LR+CLP Gruppe ( $10 \pm 1$  %,  $p=0,02$ ), auch hier war vor allem eine periportale und mittzonale Verteilung der BrdU-positiven Zellen zu beobachten. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in der S-Phase Fraktion nicht so deutlich ausgeprägt wie beim Mitoseindex. So war die Mitoserate 24 h nach alleiniger LR 700% höher, die S-Phase Fraktion dagegen nur 50% höher als nach simultaner LR+CLP. Dies weist auch auf eine Verlangsamung der Zellzyklus-Progression hin. Weiterhin waren aufgrund der deutlichen Verzögerung des gesamten Regenerationsprozesses in der LR+CLP Gruppe auch in den späteren Untersuchungszeitpunkten bis 96 h noch signifikant mehr BrdU positive Zellen zu beobachten als nach LR (Abb. 19, Abb. 21).

Die Regenerationskinetik der Nicht-Parenchymzellen war ebenfalls etwas verzögert, allerdings nicht so deutlich wie die der Hepatozyten. Beim Vergleich von LR und LR+CLP (Abb. 20) unterschieden sich die Gruppen nach 24 h nicht signifikant. In beiden Gruppen war nur eine geringe Anzahl von Nicht-Parenchymzellen BrdU positiv (LR:  $4 \pm 3$  / HPF, LR+CLP:  $2 \pm 1$  / HPF). Nach 48 h befanden sich sowohl in der LR Gruppe ( $21 \pm 4$ ), aber auch in der LR+CLP Gruppe ( $10 \pm 1$ ) deutlich mehr Nicht-Parenchymzellen (Kupffer-Zellen, Endothelzellen, Gallengangsepithelzellen) in der S-Phase (Abb. 21). Der statistische Vergleich ergab signifikant höhere Werte in der Gruppe mit alleiniger LR. Nach 72 h und 96 h lagen die Werte in beiden Gruppen dann im ähnlichen Bereich.

Nach Sham Operation waren nur vereinzelt ( $0,4 \pm 0,1$  / HPF) BrdU positive Nicht-Parenchymzellen zu verzeichnen. Dagegen waren 24 h nach alleiniger CLP  $1,7 \pm 0,3$  BrdU positive Nicht-Parenchymzellen pro HPF, nach 48 h  $6,6 \pm 2,0$  / HPF und nach 96 h  $2,8 \pm 0,4$  / HPF zu beobachten.

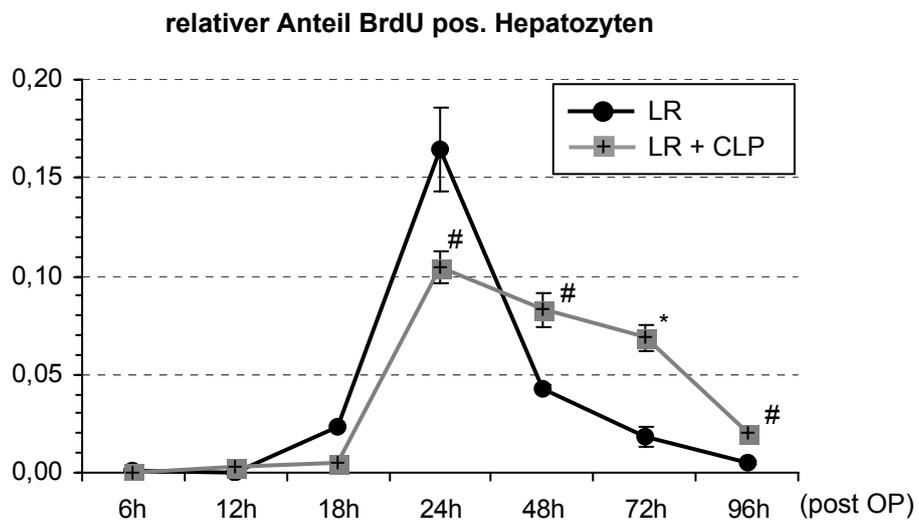


Abb. 19: Relative Anzahl der BrdU positiven Hepatozyten (S-Phase) im entsprechenden Zeitintervall nach Leberresektion mit oder ohne simultane CLP (#  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test, \* in der 72h Gruppe wurde aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Auswertung vorgenommen)

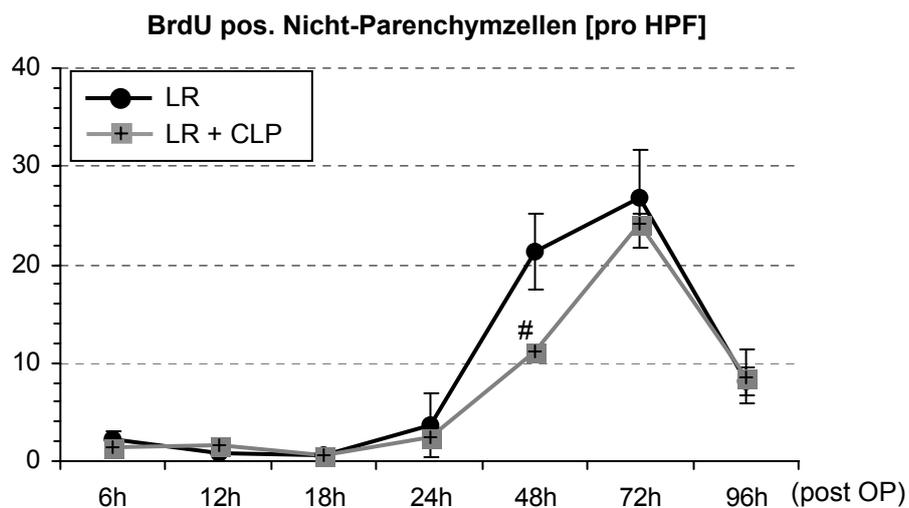


Abb. 20: Anzahl der BrdU positiven (S-Phase) Nicht-Parenchymzellen pro HPF im entsprechenden Zeitintervall nach Leberresektion mit oder ohne simultane CLP

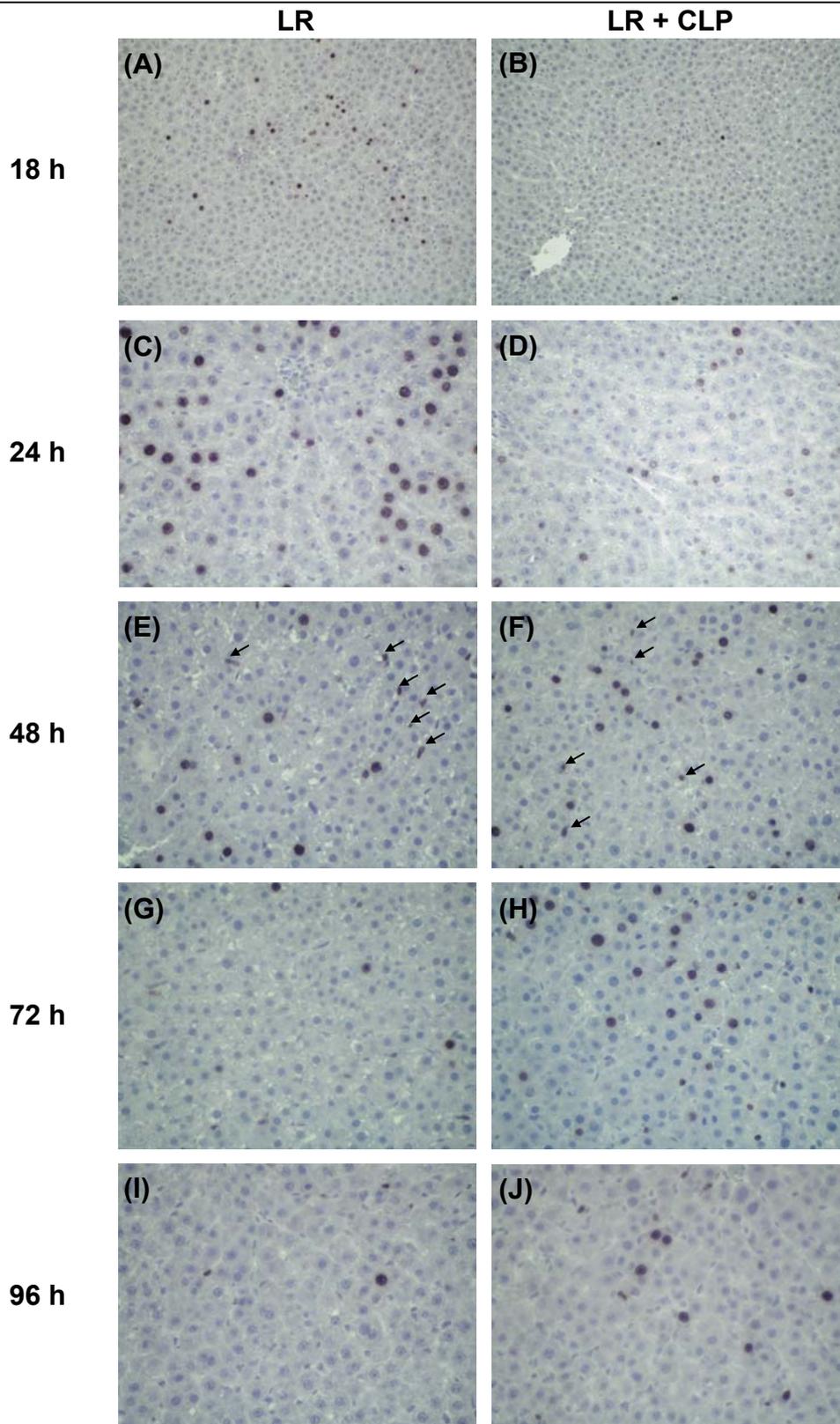


Abb. 21: **BrdU-Labeling** (Vergrößerung A,B: x 200, C bis J: x 400): **(A)** beginnende S-Phase Aktivität der Hepatozyten 18 h nach LR **(B)** fast keine S-Phase Zellen 18 h nach LR+CLP **(C)** sehr hohe S-Phase Fraktion der Hepatozyten 24 h nach LR **(D)** deutlich weniger BrdU positive Hepatozyten 24 h nach LR+CLP **(E)** starker Rückgang der hepatozytären S-Phase Fraktion 48 h nach LR, dagegen maximale Aktivität der Nicht-Parenchymzellen (NPC, ←) **(F)** maximale S-Phase Aktivität der Hepatozyten und der NPC (←) in der LR+CLP Gruppe nach 48 h **(G)** 72 h nach LR nur noch wenige Zellen in der S-Phase **(H)** viele BrdU positive Hepatozyten und NPC 72 h nach LR+CLP **(I)** fast keine S-Phase Zellen 96 h nach LR **(J)** persistierende Regenerationsaktivität 96 h nach LR+CLP.

#### 4.1.6.3 Gesamt-Wachstumsfraktion

Auch die Auswertung der Gesamt-Wachstumsfraktion, definiert als Ki-67 positive Zellen, zeigte eine deutlich verzögerte Regeneration nach simultaner LR+CLP (Abb. 22, Abb. 23). So lagen die Werte der Wachstumsfraktion 24 h nach alleiniger LR signifikant höher als nach LR+CLP (0,005). Besonders auffallend war ein hoher Peak der Ki-67 positiven Wachstumsfraktion 48 h postoperativ nach LR+CLP. Hier waren signifikant mehr Hepatozyten Ki-67 positiv als nach alleiniger Leberresektion (Abb. 22). Zu diesem Zeitpunkt war nach LR+CLP jeder zweite, in periportalen Arealen teilweise sogar jeder Hepatozyt Ki-67 positiv (Abb. 23). Vom Verteilungsmuster des Ki-67 Antigens her und unter Einbeziehung der BrdU-Färbungen befand sich der Hauptteil der positiven Zellen in der  $G_{1/2}$ -Phase, dagegen nur eine sehr kleine Fraktion in der Mitose. Auch nach 72 h und 96 h war die Ki-67 Wachstumsfraktion nach LR+CLP deutlich erhöht, wobei ebenfalls hauptsächlich Zellen in der  $G_{1/2}$ -Phase zu beobachten waren.

Nach Sham Operation waren nur vereinzelt Ki-67 positive Zellen zu sehen ( $0,2 \pm 0,2$  %). Auch nach alleiniger CLP waren zu allen Untersuchungszeitpunkten nur ganz vereinzelt Ki-67 positive Zellen zu finden. Eine Auswertung der Nicht-Parenchymzellen erfolgte bei den Ki-67 Färbungen nicht, da diese bereits bei den BrdU-Präparaten quantifiziert wurden und dort die Nicht-Parenchymzellen eindeutiger quantifiziert werden konnten.

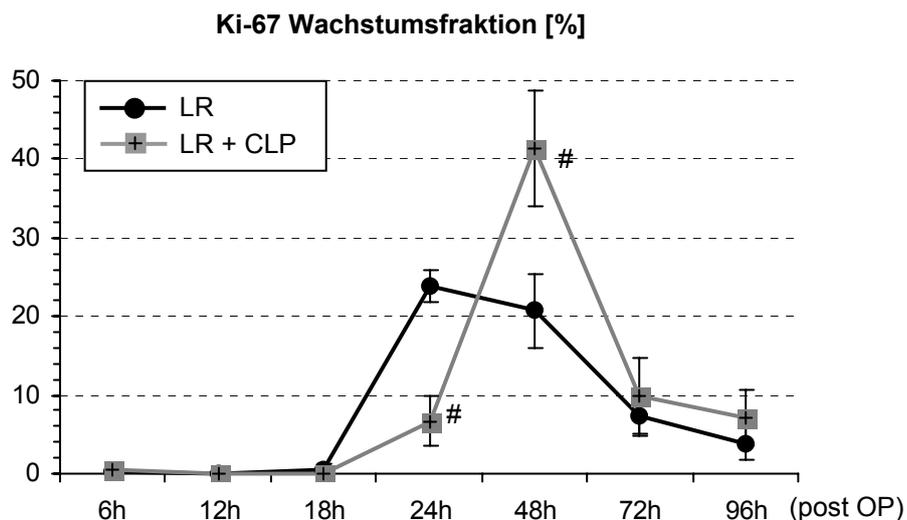


Abb. 22: Wachstumsfraktion (Ki-67 positive Zellen) bei Leberresektion mit und ohne simultane CLP (#  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test)

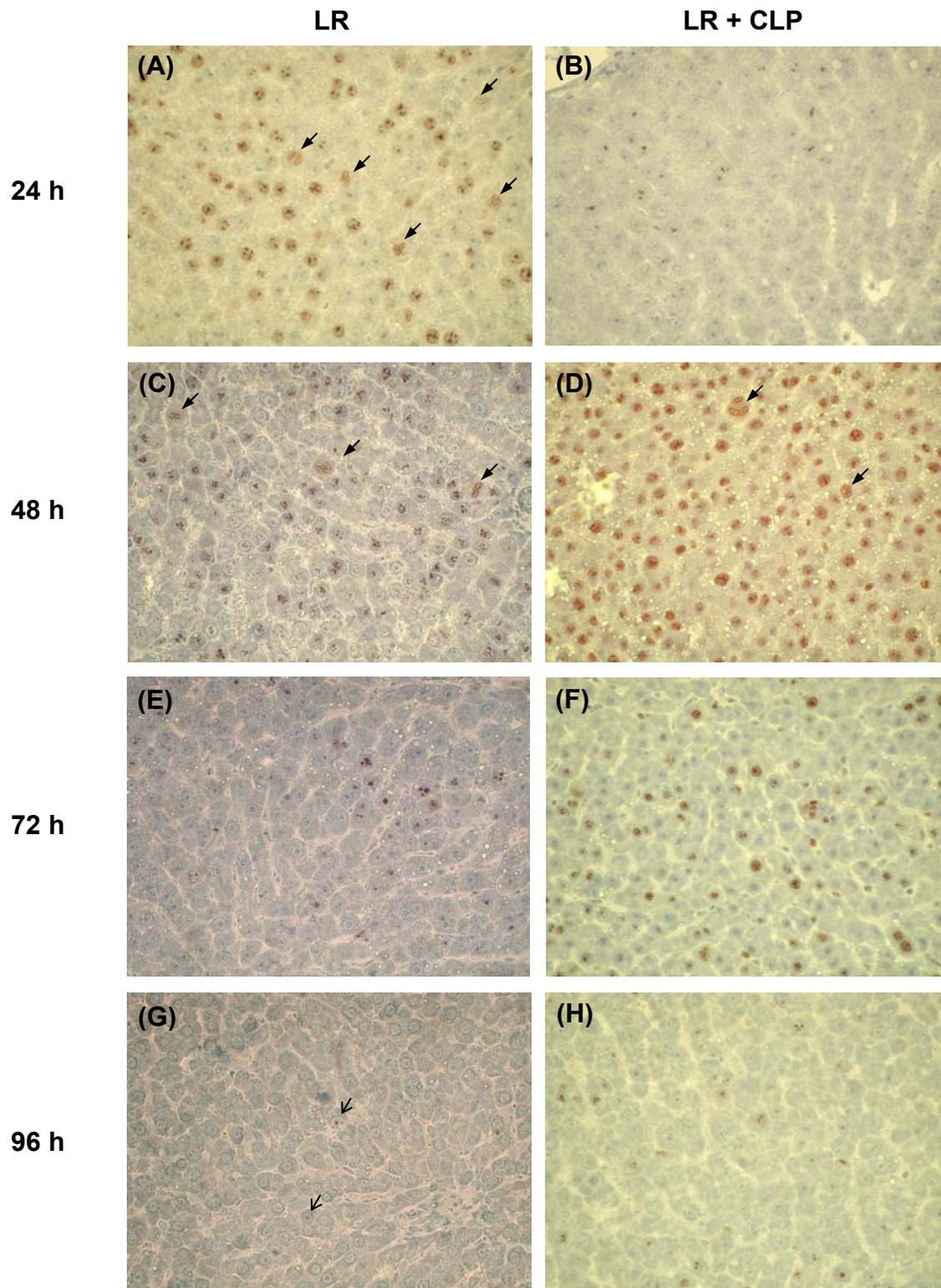


Abb. 23: **Ki-67 Immunhistologie** (alle x 400): **(A)** maximale Wachstumsfraktion in der LR-Gruppe 24 h nach Leberresektion mit relativ hohem Anteil an Zellen in der Mitosephase ( $\blackleftarrow$ ), S-Phase und  $G_{1/2}$ -Phase **(B)** niedrige Wachstumsfraktion 24 h nach LR+CLP, vor allem S-Phase Zellen zu beobachten **(C)** Rückgang der Wachstumsfraktion 48 h nach LR **(D)** extrem hohe Gesamt-Wachstumsfraktion 48 h nach LR+CLP mit hohem Anteil an Zellen in der  $G_{1/2}$ -Phase, allerdings mit sehr niedrigem Anteil an mitotischen Zellen ( $\blackleftarrow$ ) **(E)** weiterer Rückgang der Ki-67 positiven Zellen 72 h nach Leberresektion **(F)** relativ hohe Wachstumsfraktion mit fast ausschließlich  $G_{1/2}$  und S-Phase Zellen 72 h nach LR+CLP **(G)** nur noch vereinzelt Ki-67 positive Hepatozyten ( $\blackleftarrow$ ) 96 h nach LR **(H)** weiterhin relativ hohe Regenerationsaktivität 96 h nach LR+CLP.

## 4.1.7 Zytokine

### 4.1.7.1 *TNF- $\alpha$*

TNF- $\alpha$  wurde als zentrales pro-inflammatorisches Zytokin sowohl während der akuten Phase Reaktion bei Infektionen als auch bei der Leberregeneration bestimmt. Bereits ab dem Untersuchungszeitpunkt 6 h postoperativ und bis 96 h anhaltend war die TNF- $\alpha$  mRNA Expression nach LR+CLP in der semiquantitativen Auswertung deutlich höher als nach alleiniger LR (Tab. 7). Auch die quantitativen Messungen im Serum mittels ELISA ergaben deutlich höhere TNF- $\alpha$  Werte nach LR+CLP an den 6 h ( $7 \pm 3$  pg/ml), 24 h ( $6 \pm 3$  pg/ml) und 48 h ( $3 \pm 1$  pg/ml) Zeitpunkten. Nach alleiniger LR wurden im Serum - allerdings mit einem relativ unsensitiven ELISA - keine relevanten TNF- $\alpha$  Konzentrationen zu den Messzeitpunkten 6 h bis 48 h nachgewiesen.

### 4.1.7.2 *IL-6*

IL-6 stellt ein frühes pro-inflammatorisches Zytokin dar, das bei akuten inflammatorischen Reaktionen sehr früh freigesetzt wird und auch im Verlauf nach Leberresektion eine wichtige Rolle spielt. Bei der IL-6 mRNA Expression waren besonders große Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu beobachten. Hier war die Expression 6 h nach LR+CLP bereits sehr hoch, dagegen nach alleiniger LR zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden. Hier fand sich erst 24 h postoperativ eine Expression, die allerdings auch zu diesem Zeitpunkt noch deutlich geringer als nach LR+CLP war (Tab. 7).

### 4.1.7.3 *TGF- $\beta$*

TGF- $\beta$  ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das zur Limitierung entzündlicher Reaktionen beiträgt, aber auch einen wichtigen negativen Wachstumsfaktor für Hepatozyten darstellt. Die stärkste TGF- $\beta$  Expression war in den 96 h Gruppen nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt bestanden keine Unterschiede zwischen den leberresezierten Tieren mit und ohne CLP. Dagegen war nach 24 h und nach 48 h die TGF- $\beta$  Expression in der Gruppe nach LR+CLP deutlich höher als nach alleiniger LR (Tab. 7).

### 4.1.7.4 *ICAM-1*

ICAM-1 als Adhäsionsmolekül wird durch viele pro-inflammatorische Zytokine induziert und ist ein Marker für die Adhäsion und Akkumulation von Leukozyten. Sowohl in der Gruppe mit alleiniger Leberresektion als auch in der Gruppe mit simultaner LR+CLP fand sich bereits nach 6 h eine erhöhte Expression von ICAM-1 in der Leber. Diese zeigte in der semiquantitativen Auswertung keine relevanten Unterschiede (Tab. 7) zwischen den beiden Versuchsgruppen.

### 4.1.7.5 *Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )*

Interleukin-1 $\beta$  als pro-inflammatorisches Zytokin ist ein bekannter Inhibitor der Leberregeneration, der während bakterieller Infektionen freigesetzt wird. Die IL-1 $\beta$  Konzentration wurde sowohl systemisch als auch lokal gemessen, da insbesondere die Konzentration in der Leber für die vorliegende Fragestellung relevant erschien.

Verglichen mit alleiniger Leberresektion waren bereits nach 6h deutlich höhere lokale ( $p=0,008$ ) und systemische (0,04) Interleukin-1 $\beta$  Werte nach LR+CLP (Abb. 24) zu messen. In der 24 h Gruppe

fanden sich nach LR+CLP ebenfalls signifikant höhere Interleukin-1 $\beta$  Konzentrationen sowohl im Serum ( $p=0,02$ ) als auch im Lebergewebe ( $p=0,01$ ) als nach alleiniger LR. Auch nach 48 h waren nach kombinierter LR+CLP noch erhöhte lokale und systemische IL-1 $\beta$  Konzentrationen nachweisbar. In der Kontrollgruppe mit Sham Operation waren die IL-1 $\beta$  Werte im Serum mit  $30 \pm 5$  pg/ml gleich hoch wie 24 h nach LR ( $28 \pm 5$  pg/ml). Die lokale IL-1 $\beta$  Konzentration im Lebergewebe war nach Sham Operation ( $813 \pm 38$  pg/mg Protein) etwas, aber nicht signifikant niedriger als nach LR ( $1707 \pm 611$  pg/mg Protein,  $p=0,15$ ).

Es zeigte sich eine hochsignifikante inverse Korrelation zwischen dem Mitoseindex und der IL-1 $\beta$  Konzentration im Lebergewebe (Abb. 25). Dies traf für beide leberresezierte Gruppen zu. So war bei Tieren mit hoher lokaler IL-1 $\beta$  Konzentration eine niedrige Mitoserate nach 24 h zu verzeichnen, bei denen mit niedriger Konzentration dagegen eine sehr hohe ( $r=0,929$ ,  $p=0,001$ ). In geringerem Maße traf dies auch für die Gesamt-Wachstumsfraktion (Ki-67) zu, allerdings war die Korrelation hier nicht so ausgeprägt.

Bei der IL-1 $\beta$  Freisetzung fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit alleiniger CLP und LR+CLP. Nach CLP lag die lokale IL-1 $\beta$  Konzentration im Lebergewebe bei  $5347 \pm 1007$  pg/mg Protein, und unterschied sich nicht von den Werten nach LR+CLP ( $5787 \pm 730$  pg/mg Protein). Die Werte in beiden Gruppen waren aber signifikant höher als im gleichen Intervall nach Sham Operation ( $p=0,02$ ) oder alleiniger LR ( $p=0,03$ ).

Tab. 7: Vergleich der Expression der mRNA Transskripte von TNF-  $\alpha$ , IL-6, TGF-  $\beta$  und ICAM-1 im Lebergewebe nach LR und nach LR+CLP. In jeder Gruppe wurden pro Zeitpunkt 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

		6 h	24 h	48 h	96 h
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	LR	+ / + / +	- / + / +	- / - / +	- / - / -
	LR + CLP	+ / + / ++	+ / +++ / ++	++ / ++ / ++	- / + / +
<b>IL-6</b>	LR	- / - / -	+ / + / +	- / - / -	- / - / -
	LR + CLP	++ / +++ / +++	+++ / +++ / +++	- / - / -	- / - / -
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	LR	- / - / -	- / + / +	- / - / +	++ / +++ / +++
	LR + CLP	- / - / -	+ / + / ++	+ / ++ / ++	+++ / +++ / +++
<b>ICAM-1</b>	LR	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++	- / + / +	++ / ++ / ++
	LR + CLP	++ / ++ / ++	++ / ++ / +++	++ / ++ / +++	+ / ++ / ++

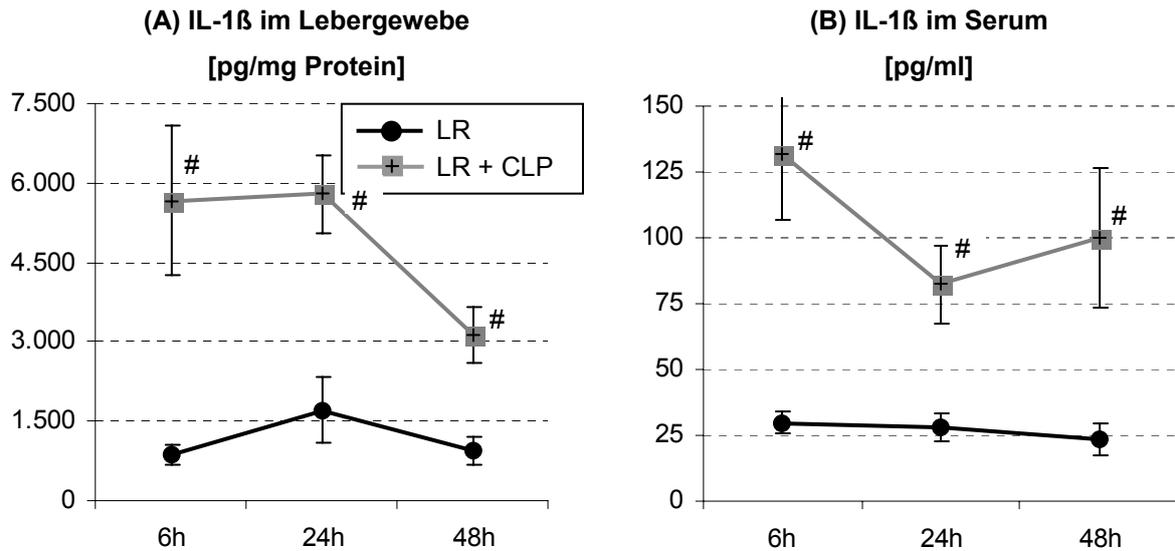


Abb. 24: Konzentration von IL-1 $\beta$  lokal im Lebergewebe (A) und systemisch im Serum (B) (#  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test)

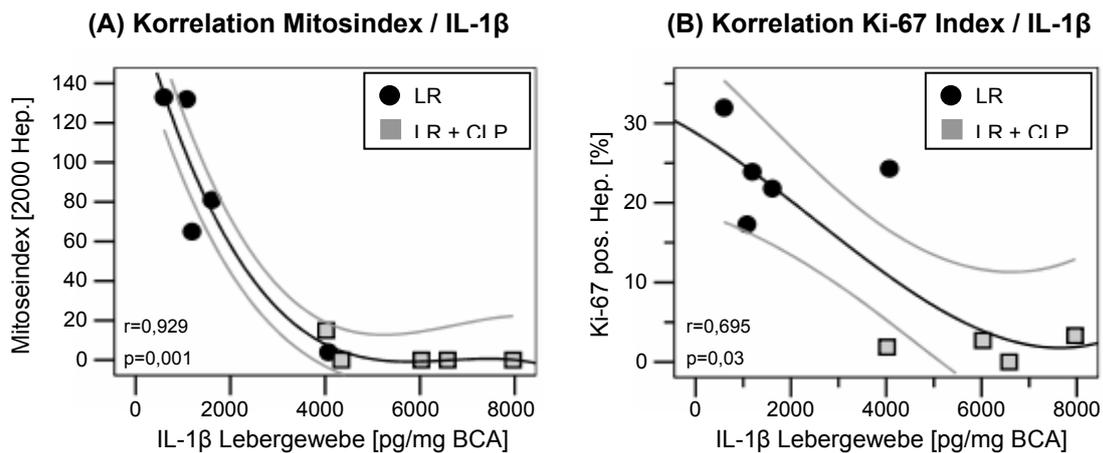


Abb. 25: Korrelation der lokalen IL-1 $\beta$  Konzentration im Lebergewebe mit dem Mitoseindex (A) und der Ki-67 Wachstumsfraktion (B) 24 h nach alleiniger LR und nach simultaner LR+CLP (Hep.: Hepatozyten).

#### 4.1.8 Mikrobiologische Untersuchungen

In allen 6 h Gruppen fanden sich enterogene Bakterien, allerdings in einer relativ geringen Konzentration, in den mesenterialen Lymphknoten, der Leber und der Milz, hingegen nicht in der Lunge. Die Bakterienkonzentration in der Leber war bereits 6 h nach LR + CLP höher als nach LR alleine (Abb. 26). Insgesamt stieg die bakterielle Konzentration in den späteren Versuchsgruppen deutlich an. So lag zum Beispiel die Bakterienkonzentration 72 h nach LR + CLP im Mittel 20 mal höher als in der 6 h Gruppe. Vergleichbare Unterschiede fanden sich auch in den anderen Organen.

Nach alleiniger LR waren die 72 h Werte ebenfalls deutlich (etwa 30 mal) höher als die 6 h Werte. Im Vergleich zwischen den beiden Gruppen war auch nach 48 und 72 h die Bakterienkonzentration in allen gemessenen Organen in der LR+CLP Gruppe deutlich höher als in der LR Gruppe (Abb. 26). Bei den isolierten Bakterien handelte es sich hauptsächlich um gram-negative Stäbchen und Enterokokken, eine weitere Differenzierung erfolgte nicht, da dies nicht relevant für die Fragestellung erschien. In der 96 h Gruppe wurden keine mikrobiologischen Untersuchungen mehr durchgeführt. Eine statistische Auswertung wurde bei den mikrobiologischen Untersuchungen aufgrund der kleinen Gruppen (n=3) als nicht sinnvoll erachtet.

#### 4.1.9 Leukozytenakkumulation

##### 4.1.9.1 Blutbild

Die Leukozytenzahlen im peripheren Blut wiesen zwischen den Gruppen LR, CLP und LR+CLP keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 27). Nach Leberresektion veränderte sich im 96 stündigen Verlauf die Hämoglobinkonzentration nicht. Dagegen fiel das Hämoglobin in der Gruppe 96 h nach LR + CLP signifikant ab ( $p=0,03$ ) verglichen mit der Gruppe nach LR.

Auch nach alleiniger CLP waren die 96 h Werte tendenziell erniedrigt, allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede verglichen mit LR allein ( $p=0,35$ ) und LR+CLP ( $p=0,29$ ). Verglichen mit alleiniger LR war ein signifikanter Abfall der Thrombozyten 48 h ( $p=0,03$ ) und insbesondere 96 h ( $p=0,01$ ) nach LR +CLP zu beobachten. Hingegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit alleiniger LR und alleiniger CLP (Abb. 27).

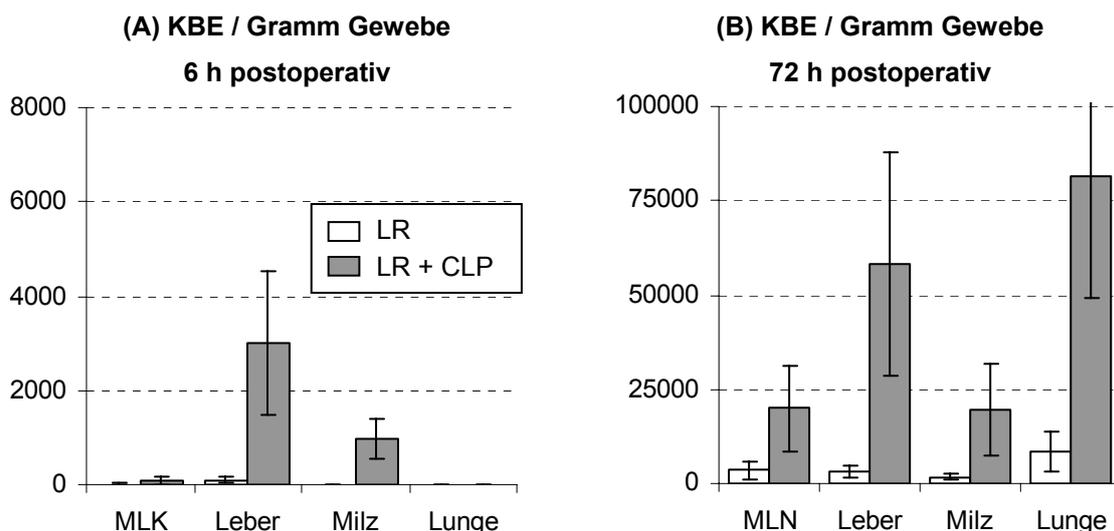


Abb. 26: Exemplarische Darstellung der Bakterienkonzentrationen 6 h (A) und 72 h (B) nach Leberresektion mit und ohne simultane CLP (MLK: mesenteriale Lymphknoten, KBE: Kolonie bildende Einheiten)

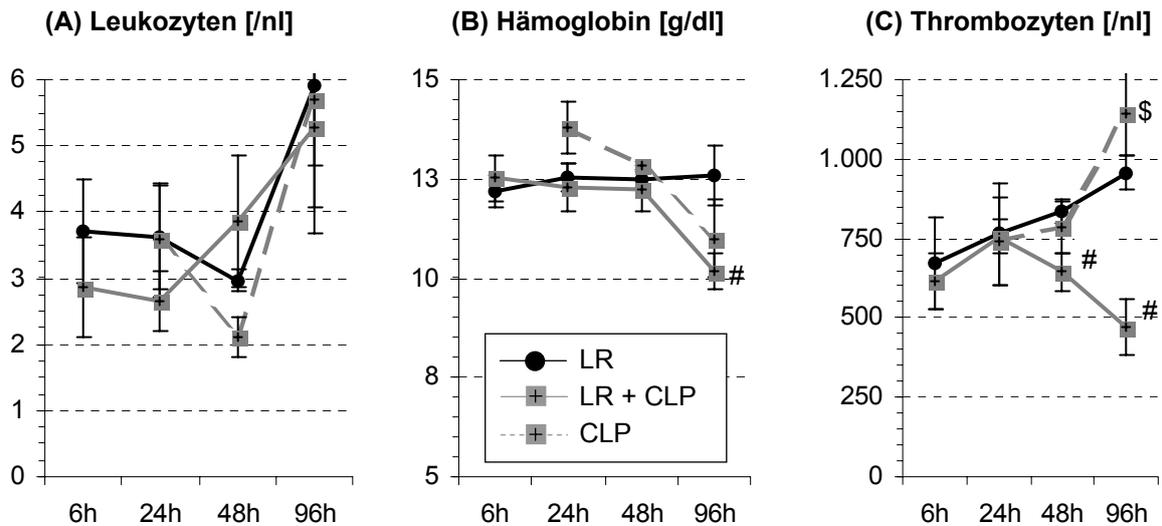


Abb. 27: Leukozytenzahlen (A), Hämoglobinkonzentration (B) und Thrombozytenzahlen (C) im peripheren Blut (#  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test, \$  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, Mann Whitney-U-Test)

#### 4.1.9.2 Myeloperoxidase Aktivität in der Leber

Als quantitativer Parameter für die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe wurde die MPO-Aktivität bestimmt. Nach 6 h fand sich in der Gruppe mit simultaner LR+CLP eine deutlich höhere Myeloperoxidase (MPO) -Aktivität im Lebergewebe ( $925 \pm 82$  mU/mg Protein) als nach alleiniger LR ( $758 \pm 68$  mU/mg Protein), allerdings erreichte der Unterschied keine statistische Signifikanz ( $p=0,15$ , Abb. 28).

Die einzigen signifikanten Unterschiede fanden sich 24 h postoperativ. Hier war die MPO Aktivität nach LR + CLP signifikant niedriger als nach 6 h in der gleichen Gruppe. Auch im Vergleich mit alleiniger CLP ( $893 \pm 64$  mU/mg Protein) waren die 24 h Werte signifikant erniedrigt ( $p=0,004$ ). Dagegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit LR+CLP und alleiniger LR. Nach 48 h war die MPO-Aktivität nach alleiniger LR wieder deutlich, aber nicht signifikant höher als nach LR+CLP ( $p=0,12$ ). Nach Sham Operation lag die MPO Aktivität im Lebergewebe bei  $780 \pm 50$  mU/mg Protein und unterschied sich nicht signifikant von den anderen Gruppen.

#### 4.1.9.3 Myeloperoxidase Aktivität in der Lunge

Insgesamt waren die MPO-Werte im Lungengewebe um ein Vielfaches höher als im Lebergewebe. Es bestanden aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Wie auch im Lebergewebe lag die MPO Aktivität im Lungengewebe 6 h postoperativ nach LR+CLP tendenziell höher als nach LR. Auch in der Lunge war verglichen mit den 6 h Werten nach 24 h ein tendenziell niedrigerer Wert in beiden Gruppen zu beobachten. Nach alleiniger LR gab es keine signifikanten Veränderungen der MPO-Aktivität bis 96 h postoperativ.

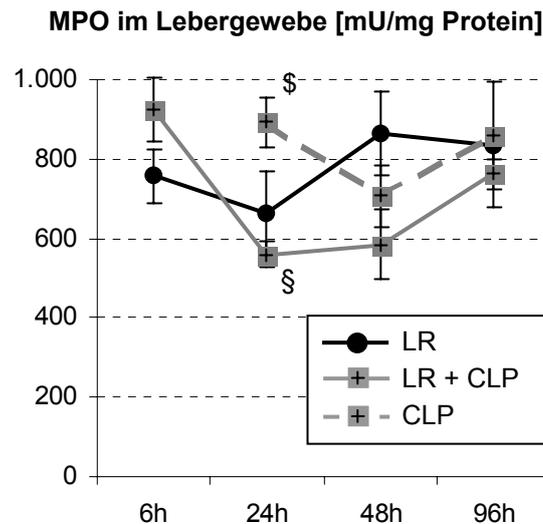


Abb. 28: Myeloperoxidase Aktivität im Lebergewebe als Marker für die Akkumulation von Granulozyten ( \$  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, Mann Whitney-U-Test; die Unterschiede zwischen Gruppen LR vs. LR+CLP waren nicht statistisch signifikant; §  $p < 0,05$  vs. 6 h postop. Wert der entsprechenden Gruppe, Wilcoxon-Test)

#### 4.1.10 Apoptose

In keiner der untersuchten Gruppen war zu einem Untersuchungszeitpunkt eine relevante Anzahl TUNEL positiver Zellen zu beobachten. In allen Gruppen sah man vereinzelt TUNEL positive Zellen, die orientierende Auszählung ergab zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede der TUNEL positiven Zellen pro Gesichtsfeld. Lediglich in der LR+CLP Gruppe fand sich 6h postoperativ eine tendenziell höhere Anzahl TUNEL positiver Zellen, dies war aber nicht statistisch signifikant verglichen mit alleiniger Leberresektion.

#### 4.1.11 Zusammenfassung: Ergebnisse Unterprojekt 1

Im ersten Unterprojekt konnte gezeigt werden, daß die Kombination von coekaler Ligatur und Panktion (CLP) mit einer 70 prozentigen Leberresektion ein geeignetes **Modell** zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Leberresektion und enterogenen Infektionen darstellt. Bei hoher Reproduzierbarkeit der einzelnen Funktions- und Regenerationsparameter zeigte sich eine signifikante Inhibition der Leberregeneration durch eine simultane infektiöse Noxe. Insgesamt erwies sich in diesem kombinierten Modell die CLP für die vorliegende Fragestellung der definierten Kolonstenose als überlegen, da hier die Regeneration stärker inhibiert wurde und weitere Parameter wie Dehydratation und Elektrolytstörungen, die nach Kolonstenose beobachtet wurden, nicht auftraten.

Die größten Unterschiede bezüglich der Inflammation waren in den 6 h Gruppen zu verzeichnen. Die **Regenerationsparameter** dagegen unterschieden sich 24 h postoperativ am deutlichsten. Während

nach alleiniger LR zu diesem Zeitpunkt die maximale Regenerationsaktivität gefunden wurde, war nach simultaner LR+CLP die Gesamt-Wachstumsfraktion signifikant erniedrigt und auch die Zellzyklus-Progression verzögert, insbesondere die Progression zur Mitose. Somit lag die maximale Mitoserate in der LR+CLP Gruppe deutlich niedriger und war auch später nachzuweisen als nach alleiniger LR. Dagegen fand sich in der kombinierten Gruppe 48 h postoperativ ein sehr hoher Anteil an Ki-67 positiven Hepatozyten, viele davon in der G1-Phase. Aufgrund der sonst relativ niedrigen Wachstumsfraktion bleibt unklar, ob diese Zellen später alle den kompletten Zellzyklus durchlaufen oder wieder in die G0 Phase übertreten. Die **Leberfunktion** war in der LR+CLP Gruppe nach 48 h am stärksten kompromittiert. Alle gemessenen leberspezifischen Exkretions- und Syntheseparameter (Galleproduktion, ICG-Clearance, Bilirubin, Prothrombinzeit) waren nach 48 h deutlich schlechter als nach alleiniger LR. Auch wenn nicht jeder gemessene Einzelparameter statistische Signifikanz erreichte, war der Gesamttrend eindeutig. Die Funktionseinschränkung nach 48 h in der LR+CLP Gruppe korrelierte mit einem Anstieg der regenerativen Aktivität zu diesem Untersuchungszeitpunkt. Zur Evaluierung therapeutischer Interventionen in diesem Modell erscheint daher zur Untersuchung der entzündlichen Aktivität das 6 h Intervall, zur Untersuchung der regenerativen Aktivität das 24 h Intervall und zur Untersuchung der Leberfunktion das 48 h Intervall am besten geeignet. Die 96 h Gruppe unterschieden sich dagegen nur noch geringfügig: während die Funktionsparameter nahezu gleich waren, war in den Gruppen mit LR+CLP nach 72 und 96 h noch eine persistierende erhöhte regenerative Aktivität nachzuweisen.

## 4.2 Unterprojekt 2: Galleleck

### 4.2.1 Allgemeine Parameter

Die Gruppe mit Leberresektion und simultanem Galleleck unterschied sich im Körpergewicht nicht signifikant von den anderen Versuchsgruppen, weder beim präoperativen Ausgangsgewicht, noch bei den absoluten oder relativen Gewichtsveränderungen zwischen Primär- und Sekundäroperation (Tab. 5). Auch die makrohämodynamischen Parameter, insbesondere der arterielle Mitteldruck ( $92 \pm 4$  mm Hg 24 h postoperativ), wiesen keine signifikanten Unterschiede verglichen mit den anderen Versuchsgruppen und zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten auf.

### 4.2.2 Regenerationsparameter

Insgesamt wurde der Regenerationsprozeß durch ein Galleleck signifikant verzögert. Verglichen mit alleiniger LR war nach LR mit Galleleck das relative Lebergewicht 24 h postoperativ signifikant niedriger ( $p=0,02$ ), zu den späteren Zeitpunkten bestanden dagegen keine signifikanten Unterschiede mehr (Abb. 29). Die Kinetik der Mitoserate (Abb. 29) war ähnlich verzögert wie nach LR+CLP. Auch nach simultanem Galleleck lag der Mitoseindex 24 h postoperativ um ein Vielfaches niedriger als nach alleiniger LR ( $p=0,001$ ). Die vorher beobachtete Korrelation zwischen relativem Lebergewicht und Mitoseindex bestätigte sich auch unter Einschluß der Gruppe mit LR und Galleleck 24 h postoperativ. Somit kann auch unter Berücksichtigung dieser Gruppe das Lebergewicht 24 h postoperativ als valider Parameter für den Fortschritt des Regenerationsprozesses angesehen werden. In der S-Phase Fraktion (Abb. 30) und beim Ki-67 Proliferationsindex (Abb. 30) war 24 h nach LR mit Galleleck eine ähnliche, aber nicht ganz so starke Verzögerung des Regenerationsprozesses wie nach LR+CLP zu beobachten. Wie auch nach LR+CLP war nach LR mit Galleleck ein hoher Peak der Ki-67 Wachstumsfraktion 48 h postoperativ nachzuweisen. Auch hier befand sich ein Großteil der Hepatozyten in der  $G_{1/2}$ -Phase, während im Verhältnis sehr wenige Zellen im Mitosestadium zu finden waren. Auffallend war eine stark erhöhte proliferatorische Aktivität von Nicht-Parenchymzellen 96 h postoperativ (Abb. 30). Verglichen mit den anderen Gruppen, lag hier vor allem auch ein erhöhter Anteil von BrdU positiven Gallengangsepithelien vor.

### 4.2.3 Leberzellschaden

Die ALT und GLDH Aktivitäten 24 h postoperativ waren in der Gruppe mit Galleleck signifikant niedriger als nach LR (Abb. 31). Nach 48 h war dagegen die ALT Aktivität gleich hoch, nach 96 h sogar signifikant höher ( $79 \pm 10$  U/l) als nach alleiniger LR ( $49 \pm 2$  U/l,  $p=0,01$ ). Dagegen war die GLDH Aktivität 96 h postoperativ ( $46 \pm 7$  U/l) - wie auch zu allen anderen Untersuchungszeitpunkten - niedriger als nach LR alleine ( $71 \pm 7$  U/l,  $p=0,03$ ).

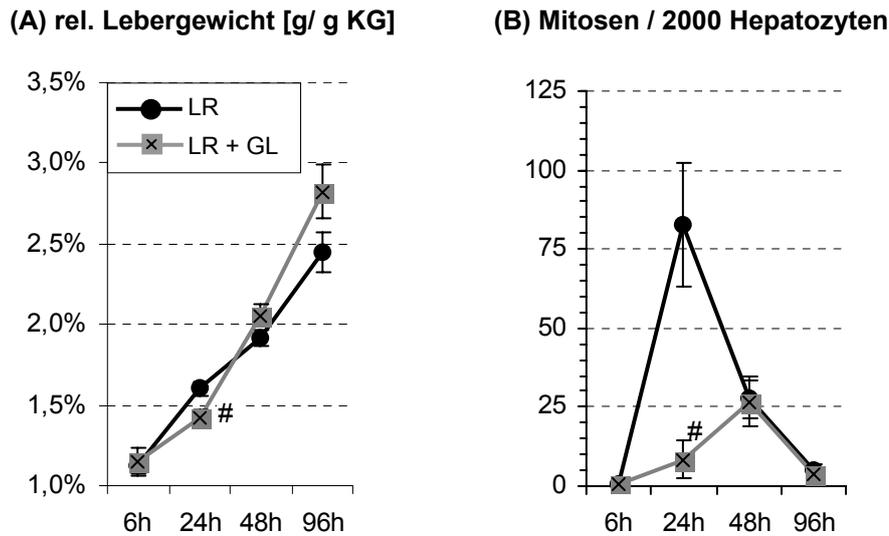


Abb. 29: Veränderungen des relativen Lebergewichts **(A)** und der Mitoserate **(B)** nach Leberresektion mit und ohne simultanem Galleleck, (#  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test).

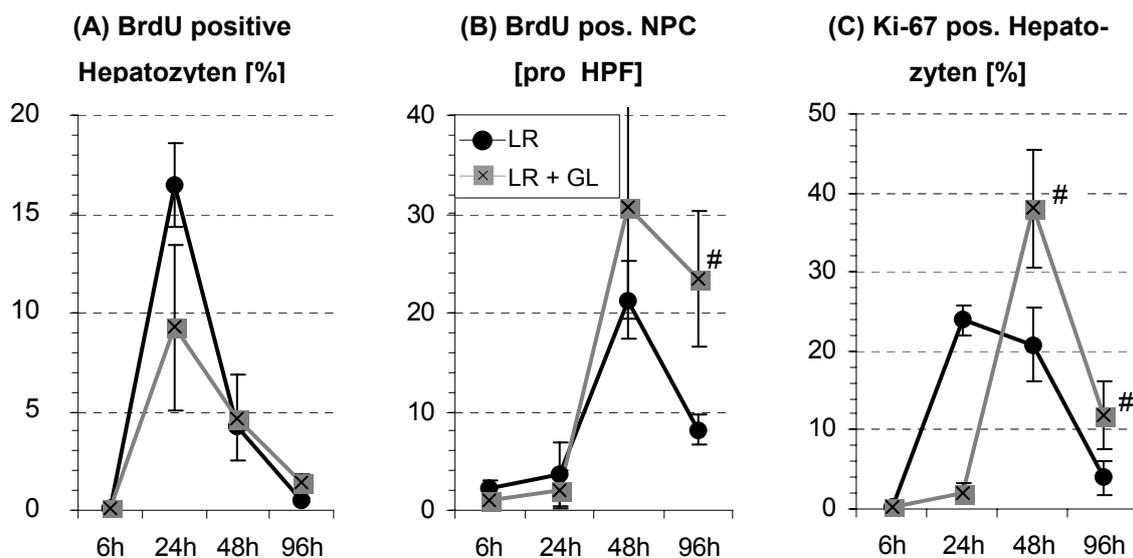


Abb. 30: Relativer Anteil BrdU positiver Hepatozyten **(A)**, BrdU positiver Nicht Parenchymzellen pro Gesichtsfeld **(B)** und Ki-67 Wachstumsfraktion **(C)** nach Leberresektion mit und ohne simultanem Galleleck (NPC: Nicht-Parenchymzellen, #  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test).

Histomorphologisch fanden sich zum keinem Untersuchungszeitpunkt Leberzellnekrosen (Abb. 32). Auch eine relevante entzündliche Aktivität lag nicht vor. In der 6 h Gruppe waren bei zwei Tieren eosinophile zytoplasmatische Einschlusskörperchen zu verzeichnen, diese waren zu keinem späteren Untersuchungszeitpunkt mehr nachweisbar. Die feintropfige Verfettung begann wie in der LR Gruppe nach 6 h, hatte ihr Maximum nach 24 h und war nach 96 h nicht mehr nachzuweisen. Als einziger

Unterschied war ab 48 h postoperativ eine Aktivierung und Proliferation der Gallengänge nachweisbar, die dann 96 h postoperativ am stärksten ausgeprägt war. Hier fanden sich auch deutlich mehr Mitosen in den Gallengangsepithelien als nach alleiniger Leberresektion zum gleichen Zeitpunkt. Zusätzlich war nur in der Gruppe mit Galleleck eine beginnende pericholangioläre Fibrose 96 h postoperativ zu beobachten (Abb. 32).

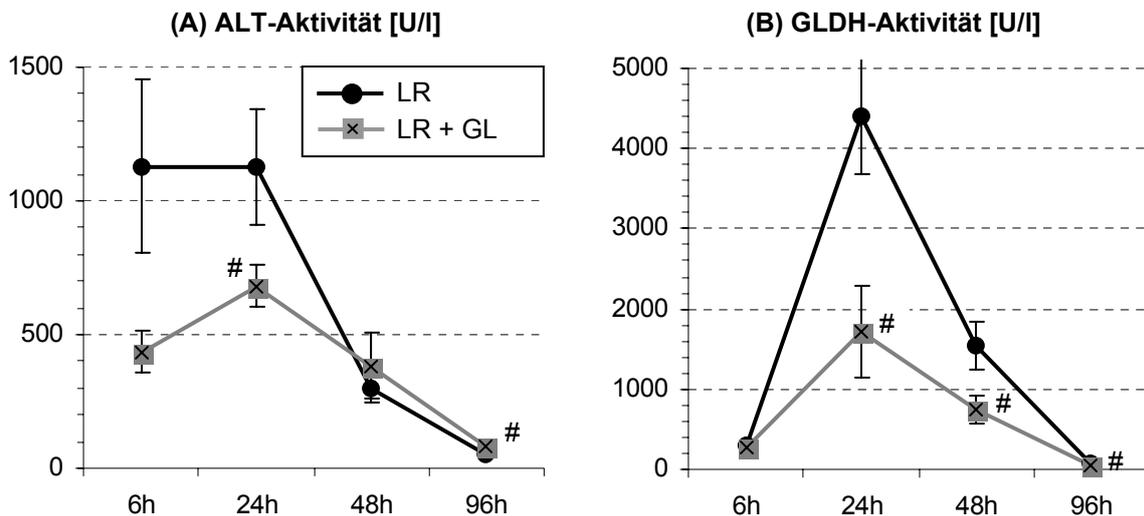


Abb. 31: Enzymaktivität von **(A)** zytosolischen (ALT) und **(B)** mitochondrialen (GLDH) Leberenzymen im Serum nach Leberresektion mit und ohne Galleleck (#  $p < 0,05$  vs. LR, Mann Whitney-U-Test).

#### 4.2.4 Leberfunktion

Nach Leberresektion mit simultanem Galleleck war die Exkretionsfunktion der Leber signifikant eingeschränkt.

So war die Galleproduktion 6 h postoperativ signifikant geringer als nach LR ohne Galleleck (Abb. 33). Dieser frühe Unterschied resultierte daher, daß es aufgrund des Gallecks zu einem gewissen Galleverlust kam, der bei der Messung des Gallefflusses über den Hauptgallengang nicht mitgesammelt wurde. Während sich nach 24 h und 96 h eine vergleichbare Galleproduktion fand, lag der 48 h Wert bei Galleleck wieder etwas niedriger. Das Gesamt - Bilirubin war bereits 6 h postoperativ signifikant erhöht ( $p = 0,02$ ) und blieb verglichen mit alleiniger LR bis 96 h erhöht. Allerdings fand sich in der Gruppe mit Galleleck eine relativ hohe Varianz bei den Einzeltieren (Abb. 33).

Auch die Synthesefunktion war im Vergleich mit einer Leberresektion ohne Galleleck eingeschränkt. Die Prothrombinzeit war 48 h postoperativ signifikant erniedrigt, dieser Unterschied war 96 h postoperativ dann nicht mehr vorhanden (Abb. 33). Bei den Albumin-Werten fanden sich signifikante Unterschiede im frühen, nicht aber im späten postoperativen Verlauf.

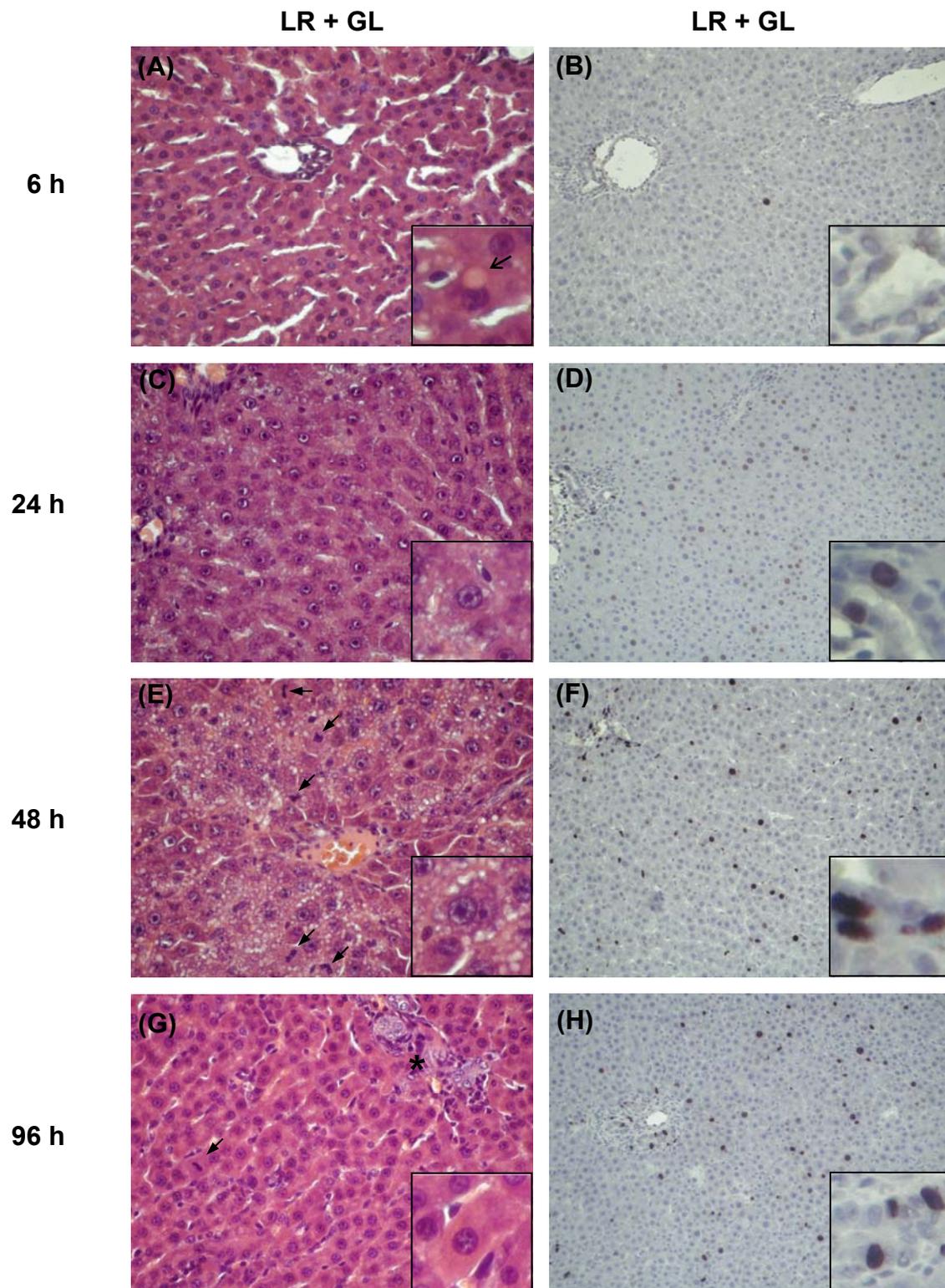


Abb. 32: **HE-Färbung und BrdU-Labeling nach LR+GL:** (A) geringe Leberzellverfettung und vereinzelt eosinophile Einschlusskörperchen (←) nach 6 h (B) vereinzelt BrdU positive Zellen nach 6 h (C) feintropfige periportale Parenchymverfettung und geringe Mitoserate nach 24 h (D) hohe Rate an BrdU positiven Hepatozyten aber auch Gallengangsepithelien (Bildausschnitt) nach 24 h (E) grobtropfige Parenchymverfettung und Anstieg der Mitoserate (←) nach 48 h (F) BrdU positive Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen nach 48 h (G) keine Verfettung mehr und weitgehende sinusoidale Reorganisation nach 96 h, allerdings cholangioläre Proliferationen und einzelne Mitosen (←) (H) relativ hohe S-Phase Aktivität in Hepatozyten, NPC und vor allem in Gallengangsepithelien nach 96 h.

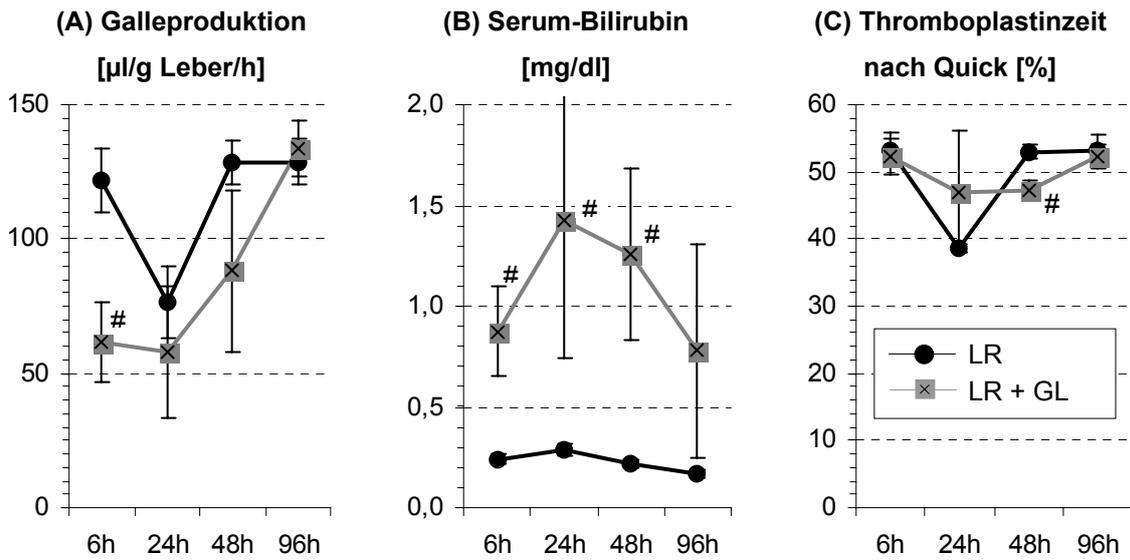


Abb. 33: Galleproduktion pro Gramm Lebergewebe (A), systemische Bilirubinwerte (B) und Prothrombinzeit nach Quick (C) im zeitlichen Verlauf nach Leberresektion mit und ohne Galleleck (# p<0,05 vs. LR, Mann Whitney-U-Test).

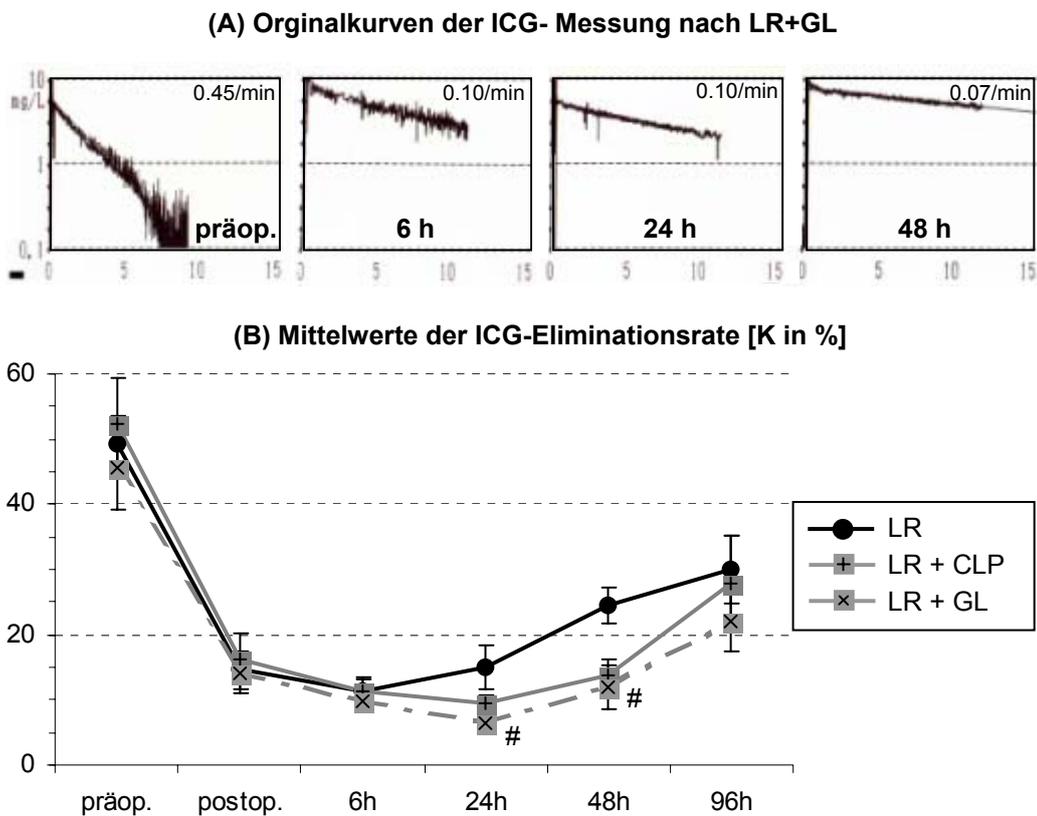


Abb. 34: Exemplarische Originalkurven (A) der ICG-Messung bei einem Tier mit Leberresektion und simultanem Galleleck und Mittelwerte (B) der ICG Eliminationsrate (K) nach Leberresektion allein, Leberresektion mit Galleleck (GL) und Leberresektion mit simultaner CLP (# p<0,05 vs. LR, Mann Whitney-U-Test).

So war die Albumin Konzentration im Serum 6 h postoperativ mit  $3,6 \pm 0,1$  g/dl signifikant niedriger als nach alleiniger Leberresektion ( $3,9 \pm 0,1$  g/dl,  $p=0,03$ ). Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten unterschieden sich die beiden Gruppen mit und ohne Galleleck nicht mehr signifikant.

Die Funktionsreserve der Leber, evaluiert durch Messung der maximalen ICG-Elimination, war ebenfalls nach Leberresektion mit simultanem Galleleck signifikant reduziert (Abb. 34). Bereits 24 h postoperativ war die ICG-Clearance deutlich reduziert ( $p=0,02$ ). Wie auch in der Gruppe mit LR+CLP, waren die deutlichsten Unterschiede 48 h postoperativ zu finden ( $p=0,01$ ), während nach 96 h nur noch minimale Unterschiede vorlagen ( $p=0,17$ ).

#### **4.2.5 Leukozytenakkumulation, Zytokine, Mikrobiologie**

Bei den peripheren Leukozytenzahlen wiesen die leberresezierten Tiere mit und ohne Galleleck keine signifikanten Unterschiede auf, ebenso bei den Thrombozytenzahlen und bei den Hämoglobinwerten. Die MPO-Aktivität im Lebergewebe als Parameter für die Infiltration von Granulozyten lag 6 h nach LR + GL bei  $1050 \pm 173$  mU/mg Protein und damit etwas höher ( $p=0,18$ ) als nach alleiniger LR ( $758 \pm 68$  mU/mg Protein) und im gleichen Bereich wie nach LR+CLP ( $925 \pm 82$  mU/mg Protein). Auch 24 h postoperativ waren die MPO-Werte bei Galleleck noch etwas höher als nach alleiniger LR, zu den späteren Untersuchungszeitpunkten kam es dann zu einem weiteren Abfall, und es bestanden keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen (Abb. 35).

Im Lungengewebe lagen die MPO Werte um ein Vielfaches höher als in der Leber, es waren aber auch in der Lunge keine signifikanten Unterschiede an allen Meßzeitpunkten zwischen den Gruppen nach Leberresektion mit und ohne Galleleck zu verzeichnen. So lag die MPO-Aktivität beispielsweise 6 h postoperativ nach LR und Galleleck bei  $243919 \pm 61812$  mU/mg Protein und unterschied sich nicht von den Werten nach alleiniger LR ( $231157 \pm 23118$  mU/mg Protein,  $p=0,23$ ). An den späteren Meßzeitpunkten lagen die Werte in beiden Gruppen ebenfalls im gleichen Bereich.

Nach simultanem Galleleck waren die Bakterienkonzentrationen in der Leber, aber auch in den anderen Organen 6 h postoperativ nur unwesentlich höher als nach alleiniger LR, aber deutlich niedriger als nach LR+CLP (siehe 4.1.8). Nach 48 h war die Bakterienkonzentration sogar etwas niedriger als nach alleiniger LR (Abb. 36).

Nach Leberresektion mit Induktion eines Gallecks waren die lokalen und systemischen IL-1 $\beta$  Konzentrationen zu allen Meßzeitpunkten gleich hoch wie nach Leberresektion ohne Galleleck (Abb. 35). Entsprechend fand sich auch keine Korrelation zwischen der IL-1 $\beta$  Konzentration und dem Mitoseindex oder dem Ki-67 Proliferationsindex, wie sie nach nach LR+CLP zu beobachten war.

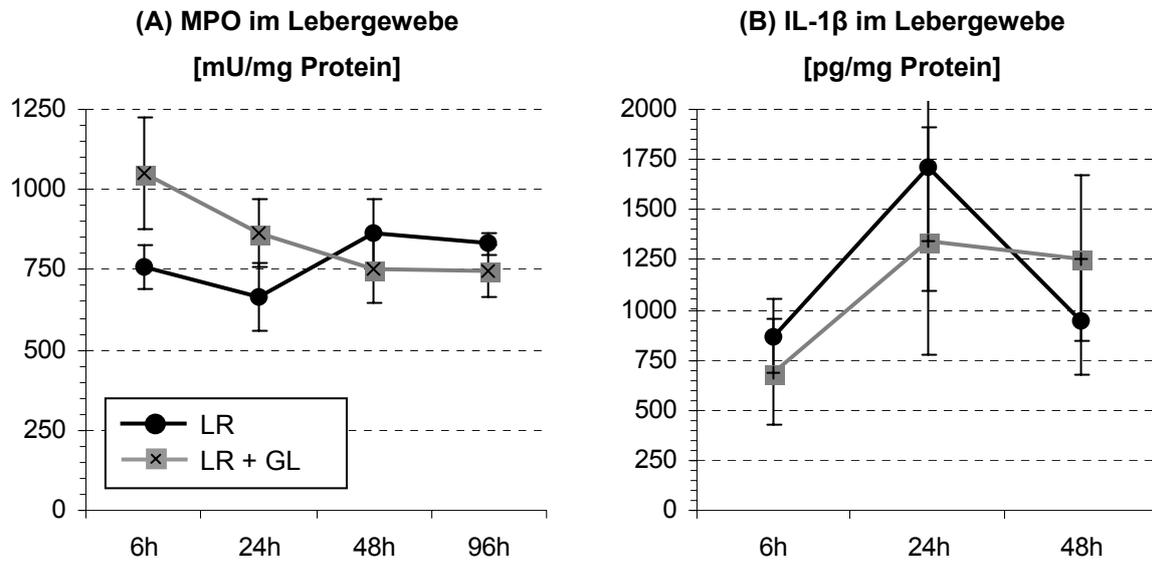


Abb. 35: Myeloperoxidase (MPO) Aktivität im Lebergewebe **(A)** und lokale IL-1 $\beta$  Konzentration in der Leber **(B)** nach Leberresektion mit und ohne simultanem Galleleck (die Unterschiede waren jeweils nicht statistisch signifikant).

Besonders auffallend war nach LR mit Galleleck eine sehr starke TNF- $\alpha$  Expression bereits 6 h postoperativ. Diese war deutlich höher als nach LR+CLP und auch zu den 24 h, 48 h und 96 h Untersuchungszeitpunkten noch deutlich erhöht (Tab. 8). Dagegen unterschieden sich die peripheren TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Serum nach 24 h ( $6 \pm 2$  pg/ml) und 48 h ( $3 \pm 1$  pg/ml) nicht signifikant von denen nach LR+CLP.

Die TGF- $\beta$  mRNA-Expression nach 48 h war in der Gruppe mit Galleleck etwas erhöht (Tab. 8), zu den anderen Zeitpunkten aber ähnlich hoch wie in den beiden anderen Gruppen. Wie nach LR+CLP fand sich auch in der Gruppe mit LR und Galleleck bereits 6 h postoperativ eine sehr hohe IL-6 Expression. Nach 24 h und 48 h lag die IL-6 Expression deutlich höher als nach alleiniger LR. In den 96 h Gruppen fand sich in keiner der Versuchsgruppen noch eine IL-6 Expression (Tab. 8).

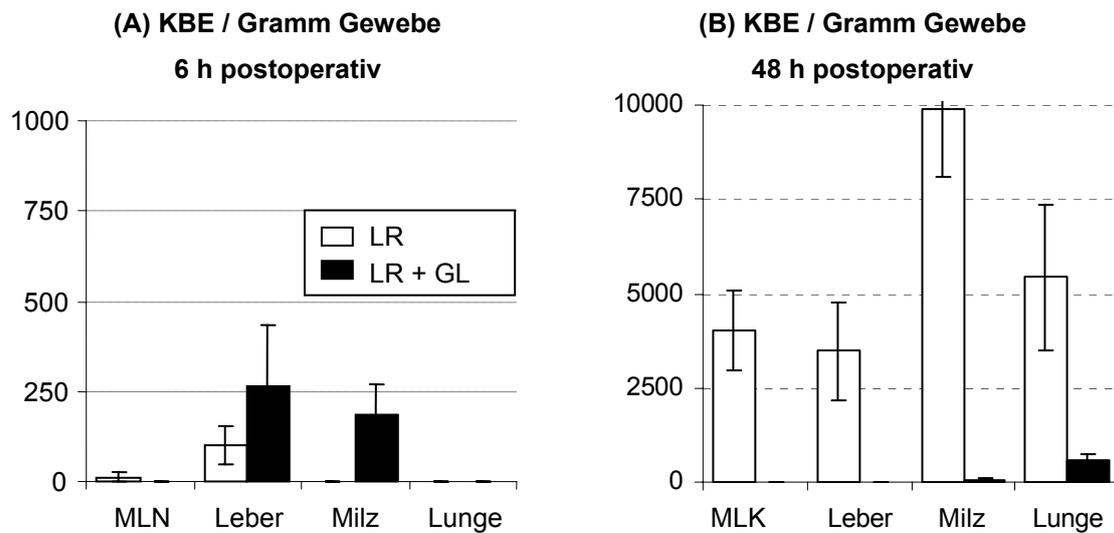


Abb. 36: Gesamt- Bakterienkonzentrationen in den 6 h **(A)** und 48 h **(B)** Gruppen nach Leberresektion mit und ohne simultanem Galleleck (MLK: mesenteriale Lymphknoten, KBE: Kolonie bildende Einheiten)

Tab. 8: Expression der mRNA Transskripte von TNF-  $\alpha$ , IL-6 und TGF-  $\beta$  im Lebergewebe nach LR, LR+CLP und LR +Galleleck. In jeder Gruppe wurden drei Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

		6 h	24 h	48 h	96 h
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	LR	+ / + / +	- / + / +	- / - / +	- / - / -
	LR + CLP	+ / + / ++	+ / +++ / ++	++ / ++ / ++	- / + / +
	LR + GL	++ / +++ / +++	- / + / ++	++ / ++ / ++	++ / ++ / +++
<b>IL-6</b>	LR	- / - / -	+ / + / +	- / - / -	- / - / -
	LR + CLP	++ / +++ / +++	+++ / +++ / +++	- / - / -	- / - / -
	LR + GL	++ / +++ / +++	++ / ++ / ++	- / + / +	- / - / -
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	LR	- / - / -	- / + / +	- / - / +	++ / +++ / +++
	LR + CLP	- / - / -	+ / + / ++	+ / ++ / ++	+++ / +++ / +++
	LR + GL	- / - / -	- / + / +	+ / ++ / ++	+++ / +++ / +++

#### 4.2.6 Zusammenfassung Unterprojekt 2:

Eine postoperative Galleleckage führte im vorliegenden Modell zu einer TNF- $\alpha$  vermittelten inflammatorischen Reaktion und zu einer signifikanten Störung der Leberregeneration. Eine zusätzliche signifikante bakterielle Komponente, im Sinne einer bakteriellen Superinfektion nach Galleleck, konnte durch die mikrobiologische Aufarbeitung ausgeschlossen werden. Eine erhöhte Freisetzung von IL-1 $\beta$ , als inhibitorisches Protein der Leberresektion, wurde ebenfalls nicht beobachtet. Insgesamt war eine ähnliche Verzögerung der Regenerationskinetik zu beobachten wie bei enterogenen Infektionen (CLP bzw. Kolonstenose). Wie auch bei der LR+CLP, war bei Leberresektion mit Galleleck die Gesamt-Wachstumsfraktion erniedrigt und die Zellzyklus-Progression verzögert, auch hier besonders die Progression zur Mitose. In Analogie zur Gruppe mit LR+CLP fand sich bei simultanem Galleleck 48 h postoperativ ein sehr hoher Peak von Ki-67 positiven Hepatozyten. Ebenso war die verzögerte Regeneration nach Leberresektion mit simultanem Galleleck von einer signifikanten Einschränkung der Leberfunktion begleitet. Diese war 48 h postoperativ am stärksten ausgeprägt und korrelierte auch hier mit einem Anstieg der regeneratorischen Aktivität zu diesem Untersuchungszeitpunkt.

### 4.3 Unterprojekt 3: Präkonditionierung

Zur genaueren Analyse der Wechselwirkungen zwischen Infektionen und Leberregeneration wurde in einer Gruppe eine CLP 24 h vor Leberresektion durchgeführt (Gruppe Präkonditionierung mit CLP: **pr-CLP**), in einer weiteren eine Sham Operation 24 h vor kombinierter LR+CLP (Gruppe Präkonditionierung mit Sham-OP: **pr-Sham**). Dadurch sollte eine unspezifische Präkonditionierung durch eine Laparotomie vom Einfluß des infektiösen bzw. inflammatorischen Stimulus abgegrenzt werden.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind im folgenden vornehmlich die 24 h Gruppen graphisch dargestellt, da hier die meisten relevanten Veränderungen zu sehen waren. Soweit sich in den 48 h Gruppen wichtige Befunde ergaben, sind diese dann entweder im Text angegeben oder in den Abbildungen gesondert gekennzeichnet. Zum Vergleich sind jeweils die Gruppen mit Sham-Operation, alleiniger Leberresektion, LR+CLP und alleiniger CLP dargestellt, wobei statistische Signifikanzen nur bei den Gruppen mit einer Leberresektion gekennzeichnet sind. Bei den Gruppen mit alleiniger Sham Operation oder alleiniger CLP wurde zur Verbesserung der Übersichtlichkeit keine Kennzeichnung von statistischen Signifikanzen vorgenommen, zumal die Unterschiede in der Regel offensichtlich waren.

#### 4.3.1 Allgemeine Parameter

In beiden präkonditionierten Versuchsgruppen pr-CLP und pr-Sham lag die postoperative Überlebensrate bei 100 % und damit tendenziell höher als nach simultaner LR und CLP ohne Präkonditionierung. Die Gruppen in diesem Unterprojekt unterschieden sich im Ausgangskörpergewicht nicht signifikant von den anderen Versuchsgruppen und zeigten auch keine unterschiedlichen postoperativen Gewichtsveränderungen. Die makrohämodynamischen Parameter, insbesondere der arterielle Mitteldruck, wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der Gruppe mit simultaner LR + CLP ohne Voroperation auf (24 h postoperativ:  $92 \pm 2$  mm Hg nach pr-CLP und  $95 \pm 2$  mm Hg nach pr-Sham).

#### 4.3.2 Regenerationsparameter

Das relative Lebergewicht war in der pr-CLP Gruppe mit  $1,95 \pm 0,05$  % 24 h nach Leberresektion signifikant höher als nach alleiniger LR, nach simultaner LR+CLP und auch als in der pr-Sham Gruppe (Abb. 37). Parallel dazu waren auch alle gemessenen Regenerationsparameter in der pr-CLP Gruppe signifikant höher als nach simultaner LR+CLP. Dies gilt für den Mitoseindex (Abb. 37), den Anteil BrdU positiver Parenchymzellen (Abb. 38) und für die Ki-67 positive Gesamt-Wachstumsfraktion. So waren 24 h nach Leberresektion in der pr-CLP Gruppe  $26 \pm 3$  % der Hepatozyten Ki-67 positiv und damit signifikant mehr als nach simultaner LR+CLP. Dagegen war der Anteil Ki-67 und BrdU positiver Zellen zwischen der pr-CLP und der LR-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich der Mitoseindex war 24 h nach alleiniger LR signifikant höher als in der pr-CLP Gruppe. Beim Vergleich der beiden Gruppen mit Präkonditionierung unterschieden sich zwei Regenerationsparameter deutlich: zum einen

war die Mitoserate in der pr-Sham Gruppe deutlich niedriger (Abb. 37) und zum anderen die Proliferationsrate von Nicht Parenchymzellen in der pr-CLP Gruppe signifikant erhöht (Abb. 38). Auch im Vergleich mit alleiniger Leberresektion und simultaner LR+CLP fanden sich nach pr-CLP signifikant mehr BrdU positive Nicht-Parenchymzellen.

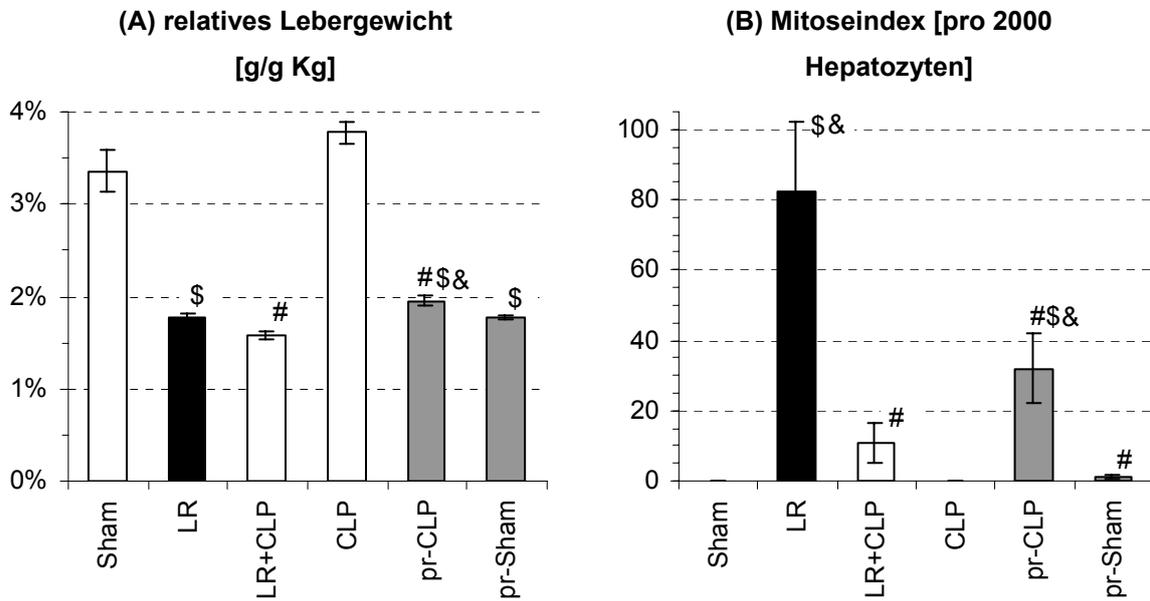


Abb. 37: Relatives Lebergewicht **(A)** und Mitoseindex **(B)** 24 h postoperativ, bzw. in den sequentiellen Gruppen 24 h nach Leberresektion (#  $p < 0,05$  vs. LR, \$  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, &  $p < 0,05$  vs. pr-Sham, Mann Whitney-U-Test, Hepat.: Hepatozyten)

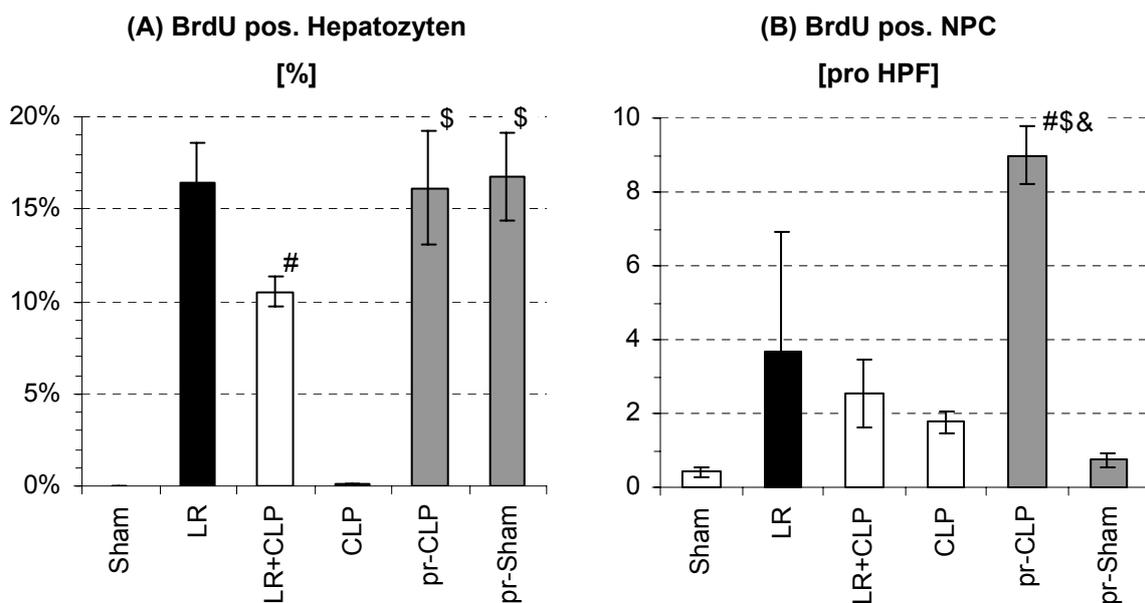


Abb. 38: **(A)** Parenchym- und **(B)** Nicht-Parenchymzellen (NPC) in der S-Phase (BrdU positiv) 24 h nach der Primäroperation bzw. in den sequentiellen Gruppen 24 h nach Leberresektion (#  $p < 0,05$  vs. LR, \$  $p < 0,05$  vs LR+CLP, &  $p < 0,05$  vs. pr-Sham, Mann Whitney-U-Test)

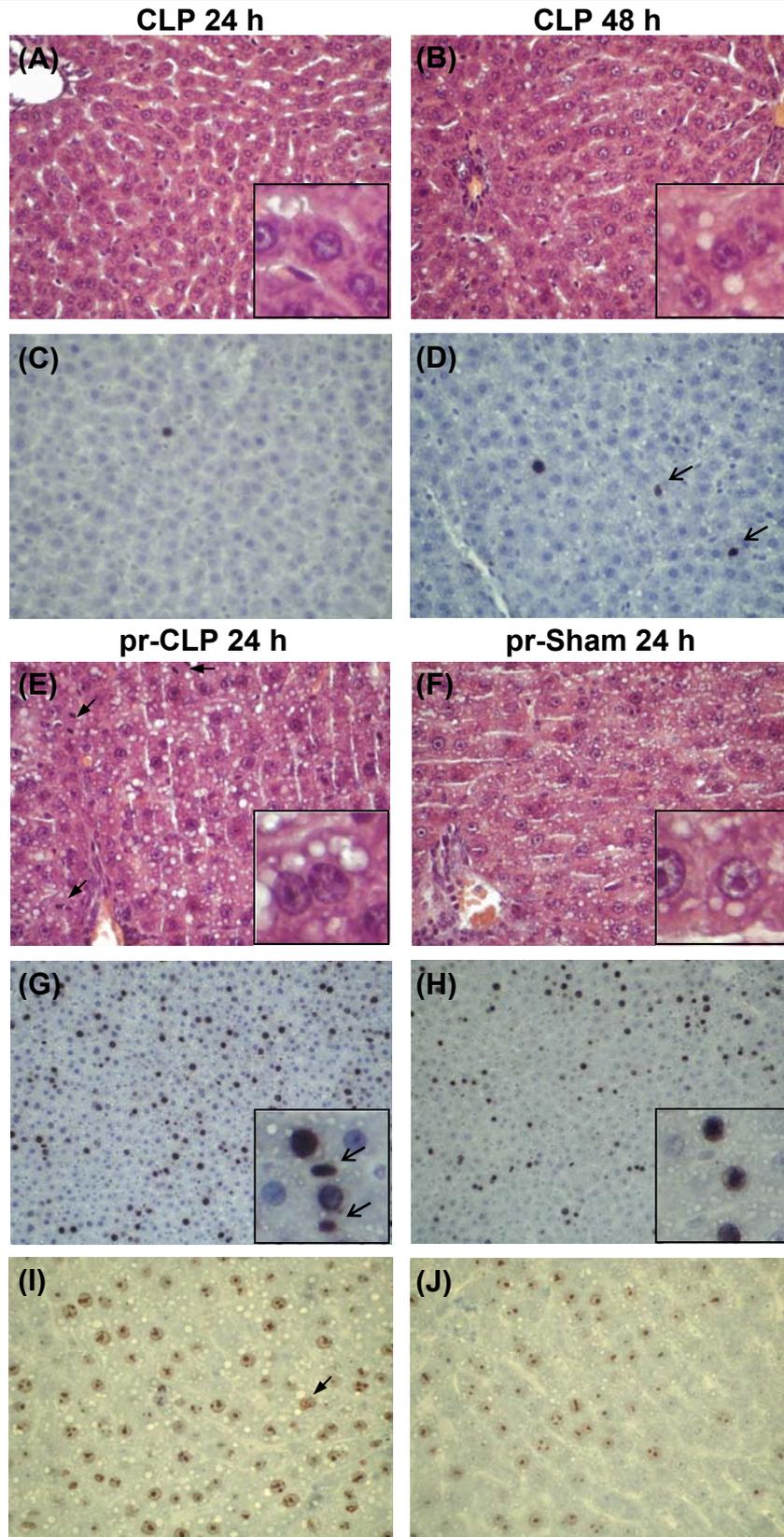


Abb. 39: **Alleinige CLP und präkonditionierte Gruppen:** (A) normale Histomorphologie 24 h nach CLP (B) einzelne BrdU positive Hepatozyten 24 h nach CLP (C) geringe Leberverfettung 48 h nach CLP (D) wenige BrdU positive Hepatozyten und NPC (←)48 h nach CLP (E) grobtropfige Verfettung und moderate Mitoserate (←) 24 h nach pr-CLP (F) Leberzellverfettung 24 h nach pr-Sham, keine Mitoseaktivität (G) hoher Anteil an BrdU positiven Hepatozyten und NPC (←) 24 h nach pr-CLP (H) viele BrdU positive Hepatozyten 24 h nach pr-Sham bei relativ wenigen positiven NPC (I) hohe Wachstumsfraktion 24 h nach pr-CLP (J) Wachstumsfraktion 24 h nach pr-Sham.

### 4.3.3 Leberfunktion und Leberzellschaden

Die Galleproduktion in den präkonditionierten Gruppen war zwar tendenziell höher verglichen mit einer alleinigen Leberresektion oder mit simultaner Leberresektion und CLP, dies war aber statistisch nicht signifikant (Abb. 40). Dagegen war das Gesamt-Bilirubin im Serum nach pr-CLP signifikant höher als nach LR und nach gleichzeitiger LR+CLP (Abb. 41). Keine signifikant höheren Werte als nach simultaner Leberresektion und CLP fanden sich in der Sham präkonditionierten Gruppe (pr-Sham).

Hinsichtlich der Syntheseparameter waren sowohl nach pr-CLP als auch nach pr-Sham signifikant reduzierte Albuminwerte im Serum zu verzeichnen (Abb. 42), dagegen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Prothrombinzeit (Abb. 41).

Der hepatozelluläre Schaden, gemessen an der Freisetzung von Leberenzymen, war in den präkonditionierten Gruppen ähnlich ausgeprägt wie nach alleiniger Leberresektion. Verglichen mit der LR Gruppe fanden sich keine signifikant verschiedenen ALT-Werte, allerdings lag die ALT-Aktivität nach beiden Arten von Präkonditionierung deutlich niedriger als nach simultaner LR+CLP, statistische Signifikanz wurde aber nur in der pr-Sham Gruppe erreicht (Abb. 42). Vergleiche der GLDH-Aktivität zwischen den verschiedenen Gruppen mit Leberresektion zeigten ähnliche statistische Ergebnisse wie bei ALT. So lag z.B. 24 h nach Leberresektion die GLDH-Aktivität in der pr-CLP bei  $2941 \pm 804$  U/l und in der pr-Sham Gruppe bei  $1905 \pm 245$  U/l, verglichen mit LR+CLP waren die Unterschiede ebenfalls nur in der pr-Sham Gruppe statistisch signifikant.

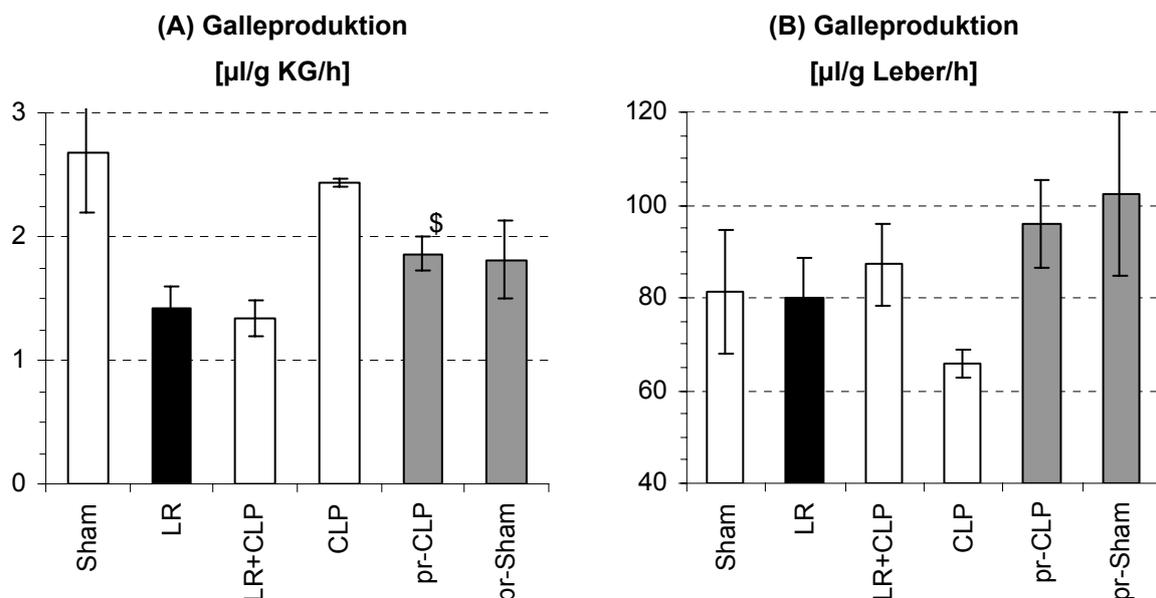


Abb. 40: Gallefluß pro Gramm Körpergewicht **(A)** bzw. Gramm Lebergewicht **(B)** 24 h nach der Primäroperation bzw. in den sequentiellen Gruppen 24 h nach Leberresektion (#  $p < 0,05$  vs. LR, \$  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, &  $p < 0,05$  vs. pr-Sham, Mann Whitney-U-Test)

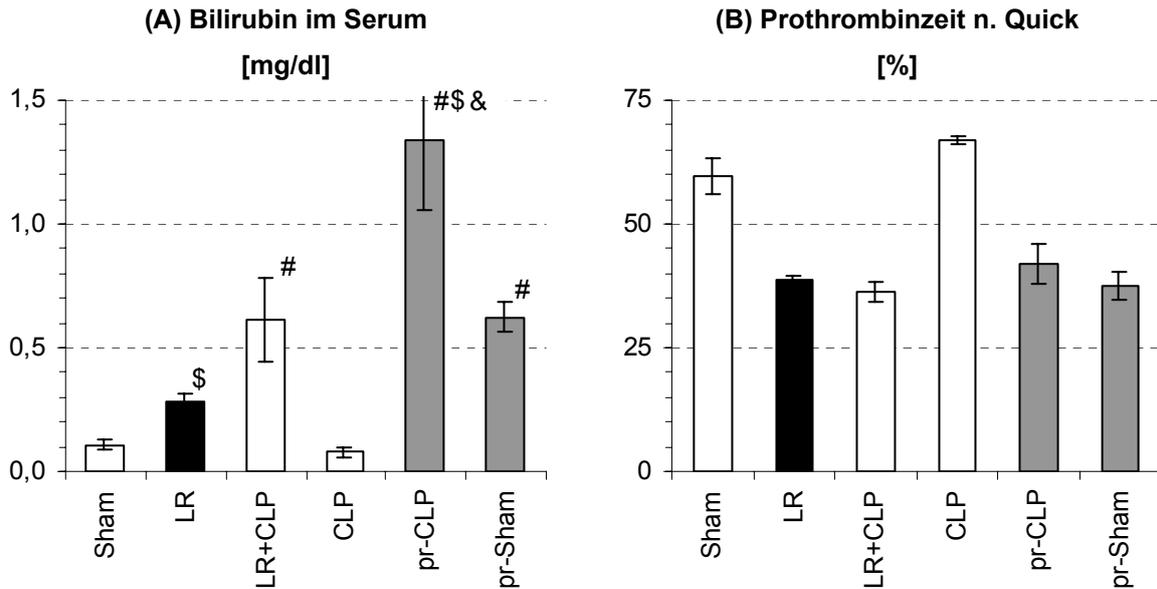


Abb. 41: Bilirubin im Serum **(A)** und Prothrombinzeit nach Quick **(B)** 24 h nach der Primäroperation bzw. in den sequentiellen Gruppen 24 h nach Leberresektion (#  $p < 0,05$  vs. LR, \$  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, &  $p < 0,05$  vs. pr-Sham, Mann Whitney-U-Test, bei TPZ keine signifikanten Unterschiede bei Gruppen mit LR)

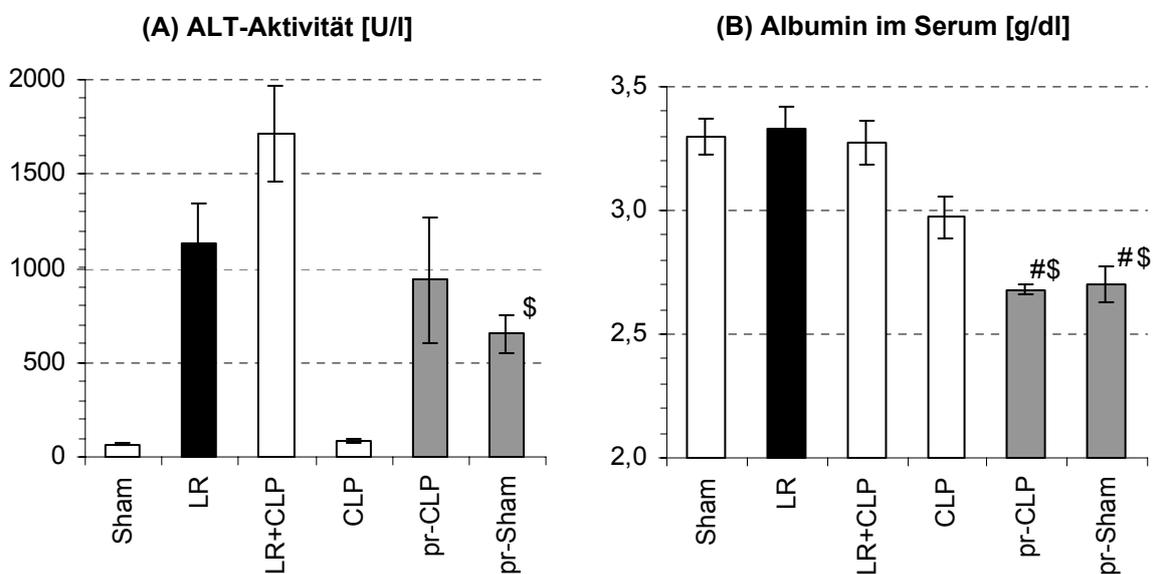


Abb. 42: ALT Aktivität **(A)** und Albumin im Serum **(B)** 24 h nach der Primäroperation bzw. in den sequentiellen Gruppen 24 h nach Leberresektion (#  $p < 0,05$  vs. LR, \$  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, &  $p < 0,05$  vs. pr-Sham, Mann Whitney-U-Test)

Histomorphologisch bestanden, abgesehen von der Mitoserate, keine relevanten Unterschiede zwischen den präkonditionierten Gruppen und der LR+CLP Gruppe ohne Präkonditionierung. In der pr-CLP Gruppe fanden sich lediglich bei einem Tier einige kleine Nekroseareale. Eosinophile Einschlusskörper wurden nicht gefunden.

#### 4.3.4 Blutbild, Zytokine, Myeloperoxidase-Aktivität

Im peripheren Blut wurden bei CLP-Präkonditionierung (pr-CLP) signifikant höhere Leukozytenzahlen gemessen als nach simultaner LR+CLP oder Sham-Präkonditionierung, nicht aber als nach alleiniger Leberresektion (Abb. 43). Außerdem war die Hämoglobin-Konzentration etwas erniedrigt verglichen mit alleiniger LR, sonst wurden keine signifikanten Veränderungen im Blutbild 24 h nach Leberresektion in den verschiedenen Gruppen beobachtet.

Trotz der erhöhten peripheren Leukozytenzahlen in der pr-CLP Gruppe war die MPO-Aktivität im Lebergewebe 24 h nach Leberresektion signifikant niedriger als nach simultaner LR+CLP (Abb. 44). Sie lag auch niedriger als nach alleiniger LR, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Dagegen fanden sich keine Unterschiede zwischen LR+CLP und der pr-Sham Gruppe. Die lokalen IL-1 $\beta$  Konzentrationen im Lebergewebe lagen in beiden präkonditionierten Gruppen auf gleich hohem Niveau wie bei simultaner LR+CLP ohne Präkonditionierung (Abb. 44).

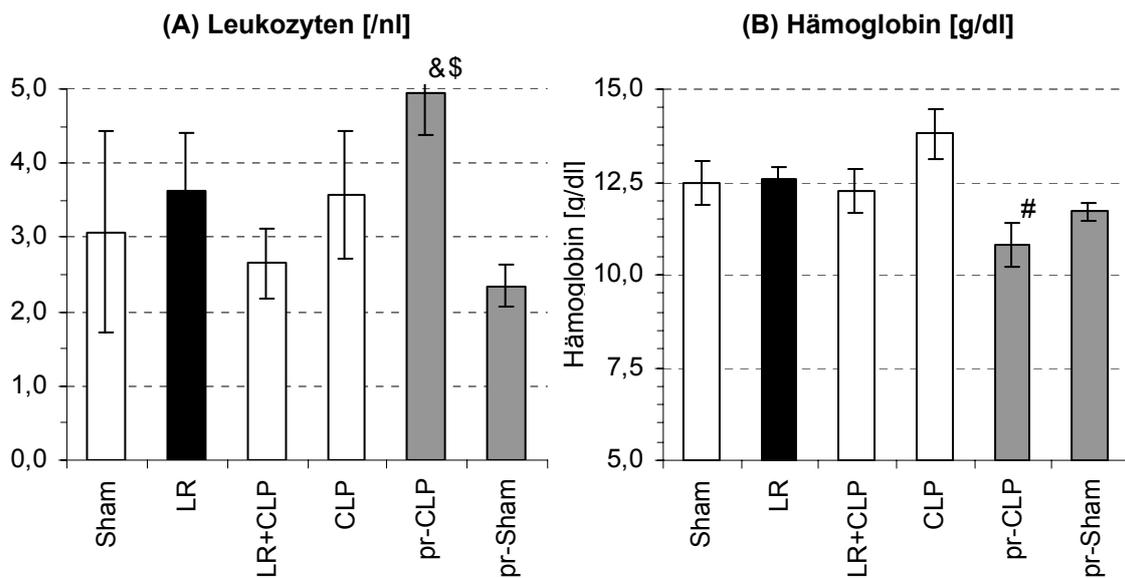


Abb. 43: Periphere Leukozytenzahlen (A) und Hämoglobinkonzentration (B) 24 h nach der Primäroperation bzw. in den präkonditionierten Gruppen 24 h nach Leberresektion (# p < 0,05 vs. LR, \$ p < 0,05 vs. LR+CLP, & p < 0,05 vs. pr-Sham, Mann Whitney-U-Test)

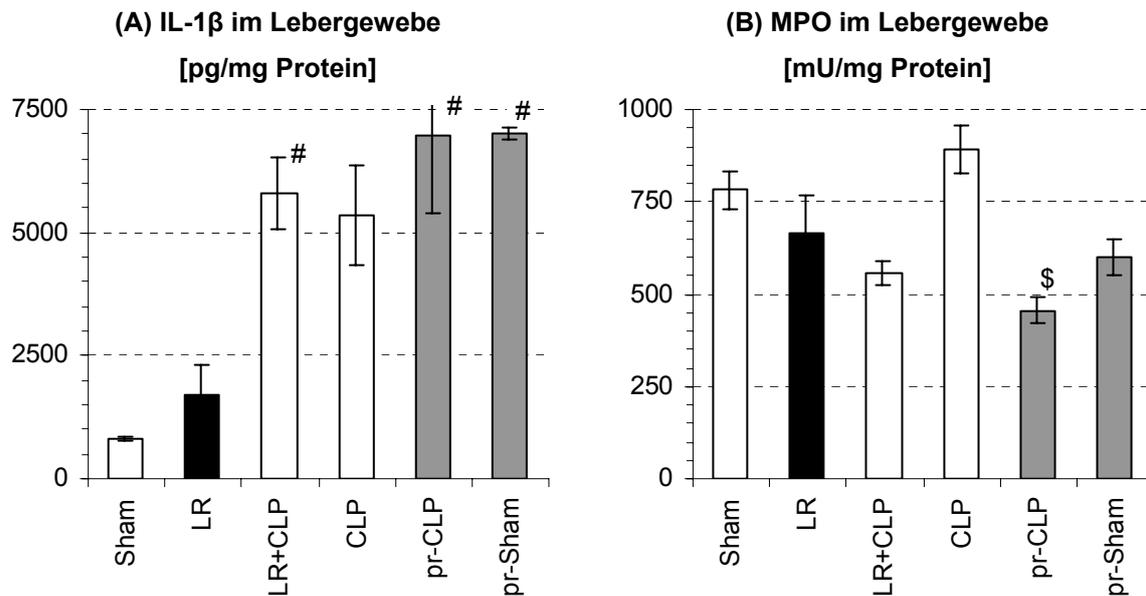


Abb. 44: IL-1 $\beta$  Konzentration im Lebergewebe **(A)** und MPO im Lebergewebe **(B)** 24 h nach der Primäroperation bzw. in den präkonditionierten Gruppen 24 h nach Leberresektion (<sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. LR, <sup>\$</sup>  $p < 0,05$  vs. LR+CLP, &  $p < 0,05$  vs. pr-Sham, Mann Whitney-U-Test)

#### 4.3.5 Zusammenfassung Unterprojekt 3

In diesem Unterprojekt konnte gezeigt werden, daß die Störung der Leberregeneration bei gleichzeitigen Infektionen grundsätzlich durch eine Präkonditionierung vermindert werden kann. Insgesamt konnte durch beide Formen der Präkonditionierung (vorherige Sham Operation oder vorherige CLP) die Leberregeneration verbessert werden. Damit einher ging auch eine tendenziell niedrigere Mortalität, da in beiden präkonditionierten Gruppen keine Tiere verstarben.

Die Präkonditionierung durch eine vorhergehende CLP war dabei effektiver (höhere Mitoserate) als durch eine Sham Operation. Allerdings zog die beschleunigte Regeneration eine Verschlechterung der Leberfunktion nach sich. Sowohl Exkretions-, als auch Synthesestörung waren nach pr-CLP stärker ausgeprägt als nach pr-Sham. Bei der Sham Präkonditionierung war außerdem eine etwas geringere hepatozelluläre Schädigung nachzuweisen, sowohl was die Freisetzung von Leberenzymen betraf, als auch histomorphologisch. Dagegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der inflammatorischen Zytokinantwort, insbesondere auch nicht in den lokalen IL-1 $\beta$  Konzentrationen, zwischen präkonditionierten Gruppen und der LR+CLP Gruppe ohne Präkonditionierung. Die MPO Aktivität als Parameter für die Leukozytenakkumulation war jedoch in der pr-CLP Gruppe etwas niedriger als möglicher Hinweis für eine abgeschwächte entzündliche Antwort in der Frühphase nach Leberresektion.