

Medikamentöse Konditionierung der
Leberregeneration nach Pfortaderligatur im
cholestatischen Lebergewebe der Ratte

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Julia Hildegard Meiler

geboren am 04.10.1994 in Landshut

Gutachter:

1. Herr apl. Prof. Dr. Falk Rauchfuß, Jena
2. Herr PD Dr. Falko Schwarz, Jena
3. Herr PD Dr. René Fahrner, Thun

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Konditionierung von Lebergewebe im klinischen Alltag	3
2.1.1 Portalvenenembolisation und Pfortaderligatur	4
2.1.2 Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS)	6
2.2 Cholestase	6
2.2.1 Charakterisierung der Cholestase	6
2.2.2 Cholestase bei malignen Lebertumoren	7
2.3 Regeneration der Leber und Auswirkungen der Cholestase	8
2.3.1 Regeneration der Leber	8
2.3.2 Regeneration unter Cholestase	9
2.4 Hepatic Growth Factor	10
2.5 ICAM-1 und Theaflavin	11
3 Ziele der Arbeit	14
4 Methodik	15
4.1 Behördliche Genehmigung	15
4.2 Studienpopulation	15
4.3 Ablauf des Experiments	16
4.4 Untersuchungen	20
4.4.1 Lebergewicht und Körpergewicht	20
4.4.2 Laborchemische Untersuchungen	21
4.4.3 Histologie	21
4.5 Statistik	24
5 Ergebnisse	25
5.1 Tiere in Auswertung	25
5.2 Körpergewicht und Leberfeuchtgewicht	25
5.2.1 Körpergewicht	25
5.2.2 Leberfeuchtgewicht	27
5.3 Laborchemische Untersuchungen	31
5.3.1 Cholestaseparameter	31

5.3.2	Leberzellschädigung	34
5.3.3	Syntheseparameter	36
5.3.4	Kreatinin	38
5.4	Histologie	39
5.4.1	Anzahl der Gallengänge	39
5.4.2	Leukozyteninfiltration	42
5.4.3	Nekrose	49
5.4.4	Fibrose	52
6	Diskussion	55
6.1	Ablauf des Experiments	55
6.2	Methodendiskussion	56
6.3	Diskussion der Ergebnisse	59
6.3.1	Körpergewicht	59
6.3.2	Leberfeuchtgewicht	60
6.3.3	Laborchemische Untersuchungen	64
6.3.4	Histologie	67
6.4	Zusammenschau	73
7	Schlussfolgerung	74
8	Literaturverzeichnis	75
Anhang		83
	Tabellenverzeichnis	83
	Abbildungsverzeichnis	84
	Normwerte	85
	Ehrenwörtliche Erklärung	86
	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALPPS	Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Activator protein-1
Aqua dest.	Aqua destillata
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASDCL	Naphtol-AS-D-Chloracetat-Esterase
BDL	Gallengangsligatur
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EvG	Elastica-van-Gieson
FOI	Field of interest
FRLV	Funktionelles Restlebervolumen
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IL	Interleukin
INR	International normalized ratio
JNK	C-jun N-terminal kinase
KG	Körpergewicht
LFA-1	Lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen-1
L-LL	Ligierter Leberlappen
LPS	Lipopolysaccharide
LWBR	Liver weight to body weight ratio
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaNO₂	Natriumnitrit
NASDC	Naphthol-AS-D-Chloracetat
NF-κB	Nuclear factor κ B
NL-LL	Nicht ligierter Leberlappen
PAL	Pfortaderligatur
PHLF	Post hepatectomy liver failure
POD	Postoperative day
PTCD	Perkutane transhepatische Cholangiodrainage
PVE	Portalvenenembolisation

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosterol-System
rhHGF	Rekombinantes humanes HGF
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SFSS	Small for size syndrom
STAT-3	Signal transducers and activators of transcription-3
TACE	Transarteriale Chemoembolisation
TGF	Transforming growth factor
THEA	Theaflavin
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
UKJ	Universitätsklinikum Jena
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
V.	Vena
WWR	Wet weight ratio

Symbol	Einheit	Symbol	Einheit
cm	Zentimeter	μm	Mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	mg/dl	Milligramm/ Deziliter
g	Erdbeschleunigung	ml	Milliliter
G	Gauge	mm	Millimeter
g	Gramm	$10^6/\text{mm}^3$	$10^6/$ Kubikmillimeter
μg	Mikrogramm	$\mu\text{mol/l}$	Mikromol/ Liter
g/l	Gramm/ Liter	$\mu\text{mol}/(\text{ls})$	Mikromol/ Liter Sekunde
h	Stunde	s	Sekunde
Hz	Hertz	IU/l	International Units/ Liter
kDa	kilo Dalton	U/min	Umdrehungen/ Minute
μl	Mikroliter	V	Volt

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Einheiten.

1 Zusammenfassung

Bei Tumorerkrankungen des hepato-pankreatikobiliären Systems ist häufig auch das Auftreten einer Cholestase zu beobachten. Diese ist hauptsächlich bei extrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen (CCC) in Form einer obstruktiven Cholestase vorzufinden (Forner et al. 2019). Auch bei hepatozellulären Karzinomen (HCC) entsteht in 19 – 40 % der Fälle ein Gallenstau (Qin und Tang 2003).

Liegt eine Cholestase vor, führt diese zur Leberzellschädigung und zu einer eingeschränkten Regenerationskapazität der Leber (Yokoyama et al. 2007). Vor allem bei Major-Leberresektionen mit hohen Parenchymverlusten, beispielsweise in der Chirurgie von Klatskintumoren, ist dies zu bedenken (Capobianco et al. 2019). Darüber hinaus ist unter Cholestase die Wahrscheinlichkeit für ein postoperatives Leberversagen (PHLF, engl. Post hepatectomy liver failure) erhöht (Xiong 2013). Um eine postoperative Verbesserung der Leberregeneration oder überhaupt eine Resektabilität zu erreichen, wird heutzutage häufig die präoperative Okklusion des Pfortaderastes, der den tumortragenden Leberlappen versorgt, vorgenommen. Diese Unterbindung der portalvenösen Blutzufuhr erfolgt als Pfortaderligatur (PAL) oder Portalvenenembolisation (PVE). Hierdurch wird eine Hyperperfusion des verbleibenden Leberlappens mit konsekutiver Hypertrophie erzielt. Der ligierte Leberlappen atrophiert und wird wenige Wochen später reseziert (Heinrich und Lang 2015).

Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Theaflavin (THEA) haben anhand der aktuellen Daten einen positiven Einfluss auf die Regenerationsprozesse der cholestatischen Leber.

HGF wirkt als körpereigenes Wachstumshormon hepatotrop und steigert die Proliferation der Hepatozyten (Fujiwara et al. 1993). Außerdem ist eine positive Beeinflussung des Entzündungsgeschehens im Rahmen einer Cholestase beschrieben (Turk et al. 2016).

Theaflavin, ein in schwarzem Tee vorhandener sekundärer Pflanzenstoff, scheint die Leukozyteninfiltration im Leberparenchym zu hemmen, welche im Rahmen der Cholestase auftritt und zur Leberzellschädigung führt. Grund zu dieser Annahme bietet die Beobachtung, dass Theaflavin eine inhibitorische Wirkung auf das intrazelluläre Adhäsionsmolekül Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) besitzt (Song et al. 2011). ICAM-1 ist an der Leukozytenrekutierung in die cholestatische Leber beteiligt (Gujral et al. 2004).

Ob die regenerationsfördernde Wirkung von Theaflavin und HGF auf die cholestatische Leber auch in Kombination mit der bereits gängigen Methode Portalvenenokklusion auftritt, war Gegenstand dieser Studie.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein in einer vorangegangenen Studie erarbeitetes Rattenmodell angewandt (Dondorf et al. 2017). Hierbei erfolgt die Induktion einer chronischen Cholestase mittels einer Gallengangsligatur (BDL, engl. Bile duct ligation). Diese Ligatur verbleibt mindestens zwei Wochen, da erst ab diesem Zeitpunkt die auf der chronischen Cholestase beruhende Leberzellschädigung auftritt (Georgiev et al. 2008). Zusätzlich zur BDL erfolgte im zeitlichen Intervall von 26 Tagen eine Ligatur der Pfortader, wodurch die portalvenöse Versorgung von ca. 70 % des Lebergewebes der Ratte unterbunden wird.

Von den insgesamt 74 operierten männlichen Lewis-Ratten, die in vier Gruppen (Gruppe 1, 2, 3 und 4) unterteilt wurden, wurden 63 in die Auswertung aufgenommen. Gruppe 1 und 2 bildeten im Versuch die Kontrollgruppen. Hierbei wurde Gruppe 1 lediglich einer PAL und Gruppe 2 im Abstand von 26 Tagen zusätzlich einer Gallengangsligatur unterzogen. In den Interventionsgruppen 3 und 4 wurde sowohl der Gallengang als auch, in einem zweiten Eingriff, die Pfortader ligiert. Additiv wurde in Gruppe 3 rekombinantes humanes HGF (rhHGF) und in Gruppe 4 Theaflavin in den nicht ligierten Pfortaderast injiziert. Im Zuge dieser letzten Operation wurde von allen Tieren über die Vena cava inferior Blut gewonnen. Nach diesen Eingriffen folgte die Opferung der Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 120 h und 168 h). Die Leber wurde entnommen und Blutproben für weitere Analysen gesammelt.

Zur Beurteilung des Einflusses von HGF und Theaflavin auf die Leberregeneration wurde einerseits das Gesamtlebergewicht bzw. der Anteil des nicht ligierten Leberlappens (NL-LL) an diesem (Wet weight ratio (WWR)) ausgewertet sowie unterschiedliche histologische Analysen des Lebergewebes durchgeführt. Hierbei wurden die Gallengangsproliferation in den Portalfeldern, die Nekrosebildung, die Leukozyteninfiltration und die Kollagensynthese quantifiziert. Darüber hinaus wurden im Blut multiple Parameter (Albumin, Cholinesterase, Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alkalische Phosphatase (AP), direktes Bilirubin, Gesamtbilirubin und Kreatinin) bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen darauf schließen, dass es durch die portalvenöse Applikation von HGF zu einer verminderten Leukozyteninfiltration portal, periportal und in der Läppchenperipherie kommt. Unter Theaflavingabe zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier konnte insbesondere 48 h und 120 h nach der Pfortaderligatur eine Reduktion der Leukozytenmigration in den Hepatozytenverband sowie periportal beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen für einen abgemilderten Entzündungsprozess, der üblicherweise durch die Cholestase ausgelöst wird und mit einer Leberzellschädigung einhergeht. Eine verminderte Nekrosebildung konnte durch HGF zwischen 48 h und 120 h und durch Theaflavin ab 48 h beobachtet werden. Eine positive Beeinflussung der Fibrosebildung konnte hingegen in keiner der beiden Interventionsgruppen nachgewiesen werden.

Bei der Betrachtung der WWR-Entwicklung der beiden Interventionsgruppen wurde eine verstärkte Hypertrophie des NL-LL im Vergleich zu Gruppe 2 deutlich. Somit liefert diese Studie Hinweise, dass sowohl durch Theaflavin- als auch HGF-Gabe, eine verbesserte Regeneration der chronisch cholestatichen Leber erfolgt und das Entzündungsgeschehen abgemildert werden kann.

2 Einleitung

Die Leber, das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen, besitzt vielfältige Funktionen und ist an diversen physiologischen Abläufen beteiligt. Darunter fällt die Einbindung in den Stoffwechsel der Fette, Proteine und Kohlenhydrate. Aber auch die Synthese von Serumproteinen wie Gerinnungsfaktoren, Albumin, Bindungsproteinen für Hormone und Akut-Phase-Proteinen findet in der Leber statt. Darüber hinaus leistet die Leber mit der Biotransformation und der biliären Exkretion von neurotoxischen Metaboliten und Medikamenten einen wichtigen Beitrag zur Entgiftung des menschlichen Körpers (Taub 2004).

Eine Besonderheit der Leber ist die Fähigkeit zur Regeneration nach Schädigung des Lebergewebes, beispielsweise durch eine Teilresektion oder ein akutes Leberversagen. Im Jahr 1931 verifizierten Higgins und Anderson experimentell diesen Kompensationsprozess des verbleibenden Leberlappens nach einer Leberteilresektion bei Ratten (Taub 2004). Bereits ein bis zwei Wochen nach der Teilhepatektomie war die Leber durch die Proliferation des restlichen Lebergewebes wieder auf ihr ursprüngliches Volumen angewachsen (Kang et al. 2012). Zur Erforschung der Leberregeneration werden auch heutzutage noch Rattenmodelle eingesetzt (Turk et al. 2016, Abreu et al. 2020, Furrer et al. 2008, Dondorf et al. 2017). Dies ist unter anderem in den vergleichbaren Grundstrukturen der Leber von Ratte und Mensch begründet (Kogure et al. 1999).

2.1 Konditionierung von Lebergewebe im klinischen Alltag

Im Rahmen der Leberchirurgie, insbesondere bei Leberteilresektionen, stellt der oben beschriebene Kompensationsprozess eine wichtige Voraussetzung für den Therapieerfolg dar. Derartige Eingriffe sind bei hepatozellulären Karzinomen (HCC), cholangiozellulären Karzinomen (CCC) oder Tumormetastasen, beispielsweise des kolorektalen Karzinoms, indiziert, da in diesen Fällen die chirurgische Intervention die einzige kurative Therapie darstellt (Soll et al. 2013, Clavien et al. 2007).

Allerdings kann nicht bei allen Patienten eine Operation erfolgen. Einer der Gründe hierfür ist ein zu geringes Volumen des zukünftigen, *in situ* verbleibenden Lebergewebes, auch als funktionelles Restlebervolumen (FRLV) bezeichnet. Ist das FRLV nicht ausreichend, können die hepatischen Stoffwechsel- und Entgiftungsfunktionen postoperativ nicht aufrechterhalten werden (Shoup et al. 2003). Ein Leberversagen nach Leberteilresektion, das sogenannte Post hepatectomy liver failure (PHLF), zeichnet sich in der laborchemischen Untersuchung durch eine erhöhte International normalized ratio (INR) sowie eine Hyperbilirubinämie am fünften Tag *post operationem* aus (Capobianco et al. 2019). Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines PHLF ist abhängig vom Zustand und den Vorerkrankungen des Patienten und dessen Leber bzw. vom Umfang und den Komplikationen des chirurgischen Eingriffs (Ray et al. 2018). Die Häufigkeit eines PHLF wird mit 0,7 % – 35 % in der Literatur heterogen angegeben (Ray et al. 2018). Da die mit einer Teilresektion assoziierte Mortalität von 5 % größtenteils auf ein PHLF zurückzuführen ist, stellt dieses postoperative Leberversagen eine große Herausforderung der

Leberchirurgie dar (Ray et al. 2018).

Für ein zu geringes FRLV gibt es unterschiedliche Ursachen, beispielsweise die Lage und Größe des Tumors, wie im Falle eines Klatskintumors IIIa, bei welchem häufig eine erweiterte Leberresektion notwendig ist. Diese erfolgt zum Beispiel in Form einer Trisektorektomie rechts. Hierbei verbleiben nur die Lebersegmente II und III, also circa 25 % des ursprünglichen Lebervolumens, *in situ* (Rauchfuss et al. 2010). Weisen diese Segmente jedoch ein nicht ausreichendes Volumen auf, ist der kurative Eingriff nicht möglich. Auch eine Beeinträchtigung der Leberfunktion durch Zirrhose oder Cholestase führt zu einem verminderten FRLV (Heinrich und Lang 2015).

Ein zu geringes Restlebervolumen schränkt nicht nur die Operabilität ein, sondern kann auch postoperativ zu diversen Komplikationen führen. Unter anderem zum sogenannten Small for size syndrom (SFSS), wie es von Tucker und Heaton (Tucker und Heaton 2005) beschrieben wurde. Dabei reicht das verbliebene Lebervolumen nicht aus, um die Leberfunktion aufrechtzuerhalten. Dies hat eine verlängerte Cholestase, Koagulopathie sowie portale Hypertension bis hin zu Aszitesbildung zur Folge. Ursächlich ist ein Untergang von Hepatozyten aufgrund eines erhöhten portal-venösen und konsekutiv erhöhten sinusoidalen Drucks. Dies ist Folge des gleichbleibenden portal-venösen Blutflusses bei reduziertem Lebervolumen (Ray et al. 2018). Letztendlich kann die eingeschränkte Leberfunktion zu Sepsis oder gastro-intestinalen Blutungen führen (Tucker und Heaton 2005). Laborchemisch weisen erhöhte Werte des direkten Bilirubins und der Transaminasen sowie eine verlängerte Prothrombinzeit auf das Vorliegen eines SFSS hin. Als histologisches Korrelat liegen eine Cholestase, erkennbar durch Galleansammlungen, Regenerationszonen sowie Ischämiezeichen mit Nekrosen im Lebergewebe vor (Tucker und Heaton 2005). Somit kann ein SFSS ebenfalls ein PHLF verursachen.

Diese Aspekte zeigen auf, welche zentrale Bedeutung das Volumen des postoperativ *in situ* verbleibenden Lebergewebes hat. Letztlich sind zwei wichtige Parameter für eine erfolgversprechende Leberteilektomie zu nennen: einerseits das Verhältnis von FRLV zum standardisierten Lebervolumen und andererseits das Verhältnis von Restlebervolumen und Körpergewicht (Ray et al. 2018). Die Grenzwerte für das FRLV sind dabei abhängig vom Zustand der Leber. Eine adäquate postoperative Funktionsfähigkeit ist wahrscheinlich, wenn mindestens 25 % eines gesunden oder mehr als 40 % eines geschädigten, beispielsweise zirrhotischen, Lebergewebes *in situ* verbleiben (Shoup et al. 2003). Insgesamt gilt, dass bei einer FRLV von unter 30 % eine Portalvenenokklusion indiziert ist (Soll et al. 2013).

Um diese Volumina zu erreichen und eine kurative Therapie zu ermöglichen, sind bereits folgende unterschiedliche Methoden im klinischen Alltag etabliert.

2.1.1 Portalvenenembolisation und Pfortaderligatur

Bei einer Portalvenenembolisation (PVE) wird vor der Teilresektion der Leber über einen perkutanen Zugang ein Embolisat, beispielsweise Polyvinylalkohol oder Fibrinkleber, unter radiologischer Kontrolle in den Pfortaderast des später zu resezierenden, tumortragenden Leberlappens eingebracht (Loffroy et al. 2015). Der Zugang erfolgt hierbei ileokolisch bzw. perkutan ipsi-

oder kontralateral (Huisman et al. 2014). Zur Kontrolle der adäquaten Okklusion wird anschließend eine Portografie mit Darstellung des portalvenösen Systems durchgeführt (Szijártó und Fülöp 2015). Dieser Verschluss der Pfortader führt zur Hyperperfusion und folglich zur Hypertrophie durch Proliferation der Hepatozyten des verbleibenden, nicht embolisierten Lebergewebes. Gleichzeitig ist eine Atrophie des okkludierten Leberlappens zu beobachten (Clavien et al. 2007). Hierbei zeigt sich, dass der Grad der Hypertrophie des weiterhin perfundierten Leberlappens vom Ausmaß der Atrophie bzw. des Volumenverlustes des okkludierten Leberlappens abhängt (Bilodeau et al. 1999). Minorkomplikationen, die im Rahmen einer PVE in 20 – 25 % der Fälle auftreten, sind leichtes Fieber, abdominelle Schmerzen sowie Transaminasenerhöhungen. Zu Majorkomplikationen, wie beispielsweise einer Pfortaderthrombose der Gegenseite, Infektionen oder einem subkapsulären Leberhämatom, kommt es bei weniger als 2 % der Eingriffe. Todesfälle durch eine PVE wurden nicht beschrieben (Loffroy et al. 2015, Ebata et al. 2012). Wenn eine ausreichende Hypertrophie induziert werden konnte, was bei mindestens 70 % der Patienten zutrifft (Capobianco et al. 2019), erfolgt vier bis sechs Wochen nach der Pfortaderokklusion die Resektion des tumortragenden Leberlappens (Soll et al. 2013). Diese Methode wurde als Erstes durch Makuuchi et al. in den 1980er Jahren an Patienten mit perihilärem Karzinom, auch als Klatskin-Tumoren bezeichnet, durchgeführt (Clavien et al. 2007). CCC-Patienten, die in einer Studie präoperativ einer PVE unterzogen wurden, zeigten ein vierfach reduziertes Risiko für das Auftreten eines Leberversagens und eine 2,6-fach geringere 90-Tage-Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Olthof et al. 2020).

Eine andere Möglichkeit zur Portalvenenokklusion stellt die Pfortaderligatur (PAL) dar, bei welcher der Pfortaderast operativ mittels Ligatur verschlossen wird (Kang et al. 2014). Im klinischen Alltag wird die PVE jedoch bevorzugt eingesetzt, da es sich um ein weniger invasives Verfahren handelt. Die bei einer PAL notwendige Laparotomie führt durch das chirurgische Trauma außerdem zu einem erhöhten Risiko für Adhäsionsbildungen (Isfordink et al. 2017). Des Weiteren treten im Rahmen einer PAL vermehrt Links-Rechts-Shunts in Form von porto-portalen Kollateralen zwischen den nicht-okkludierten und okkludierten Leberlappen auf, wodurch die Regenerationsantwort reduziert wird (van Lienden et al. 2013).

In ihrer Metaanalyse stellen Isfordink et al. (Isfordink et al. 2017) fest, dass sich die beiden Verfahren hinsichtlich des Volumenzuwachses des verbleibenden Leberlappens (43,2 % bei PVE und 38,5 % bei PAL) und der postoperativen, leberspezifischen Morbidität (2,3 % bei PVE und 3,2, % bei PAL) nicht signifikant unterscheiden. Eine mangelnde Hypertrophie machte bei 4,3 % der PVE-Patienten eine anschließende Leberresektion unmöglich, nach einer PAL trat dies nicht auf (Isfordink et al. 2017). Bei 25 % der Patienten kann nach einer PVE aufgrund eines fortschreitenden Tumorwachstums keine Resektion erfolgen (Capobianco et al. 2019). Beide Methoden, die PAL und die PVE, werden auch in tierexperimentellen Untersuchungen zur Hypertrophieinduktion der Leber angewendet (Szijártó und Fülöp 2015).

2.1.2 Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS)

Ein weiteres Verfahren, welches klinisch zur Konditionierung des Lebergewebes vor erweiterten Leberresektionen angewendet wird, ist die Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS). Darunter versteht man die Ligatur des Pfortaderastes in Kombination mit einer Parenchymdissektion. Dies bedeutet, dass die tumortragenden Leberanteile von den gesunden getrennt werden. Hiermit soll die Bildung von Neovaskularisationen und ein interlobärer Blutfluss verhindert werden. Die venöse und arterielle Versorgung sowie der Galleabfluss des ligierten Leberlappens bleiben bestehen. Das Segment IV wird bei Bedarf ebenfalls devaskularisiert und vom restlichen Lebergewebe getrennt. Dies wirkt supportiv auf die Hypertrophie des verbleibenden Lebergewebes. Sechs bis zwölf Tage später erfolgt die Resektion des ligierten Leberanteils (Schnitzbauer et al. 2012).

Diese Technik ermöglicht eine Tumorresektabilität bei primär nicht oder nur marginal resezierbaren Patienten zu erreichen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist das verkürzte Zeitintervall zwischen dem ersten Eingriff der PAL mit Parenchymdissektion und der Teilresektion. Hierdurch kann die Wahrscheinlichkeit einer Tumorprogression vermindert werden. Außerdem konnte mit dieser Operationsmethode eine Volumenzunahme des verbleibenden Leberlappens von 74 % in neun Tagen erzielt werden. Dies ist eine deutliche Steigerung gegenüber der durch PAL und PVE induzierbaren Hypertrophie (Huang et al. 2019). Eine ALPPS ist auch dann noch möglich, wenn nach einer PVE keine ausreichende Hypertrophie erzielt werden konnte (Capobianco et al. 2019). Jedoch geht die ALPPS mit einer erhöhten Mortalität einher (Isfordink et al. 2017). Darüber hinaus ist diese Operationsmethode noch nicht weitläufig etabliert und die operative Morbidität liegt bei 16 – 64 % (Ray et al. 2018).

2.2 Cholestase

Eine weitere Herausforderung in der Therapie von malignen Lebertumoren ist das zeitgleiche Auftreten einer Cholestase. Diese führt zu einer additiven Leberschädigung und kann somit den Therapieerfolg beeinträchtigen und die Wahrscheinlichkeit eines postoperativen Leberversagens erhöhen. Im Folgenden soll näher auf die Entstehung und Einteilung der Cholestase eingegangen werden. Insbesondere wird das Vorliegen einer Cholestase im Rahmen von malignen Lebertumoren näher betrachtet.

2.2.1 Charakterisierung der Cholestase

Mit dem Begriff Cholestase, welcher sich aus den griechischen Wörtern *chole* (Galle) und *stasis* (Stillstand) ableitet, wird ein Gallenstau bezeichnet (Rodriguez-Garay 2003). Ursachen können unter anderem eine eingeschränkte Gallenbildung und -sekretion oder Gallenabfluss sein (Böcker 2012). Eine Einteilung der unterschiedlichen Cholestaseformen erfolgt zeitlich, in akut und chronisch, oder lokalisationsabhängig, in intra- und extrahepatisch. Ab einer Dauer von über sechs Monaten wird von einer chronischen Cholestase gesprochen, wie sie beispielsweise bei

der sklerosierenden Cholangitis auftritt (European Association for the Study of the Liver 2009). Die häufigsten Auslöser einer intrahepatischen Cholestase sind Medikamente, beispielsweise Bosentan oder Flucloxacillin, oder eine Schwangerschaft, aber auch Virushepatitiden, Tumorerkrankungen oder eine Leberzirrhose. Dementsprechend handelt es sich um Zustände, die zu einer gestörten hepatischen Funktion und damit zu einer eingeschränkten Gallenbildung führen (Rodriguez-Garay 2003). Eine extrahepatische Cholestase beruht auf der Obstruktion der ableitenden Gallenwege, beispielsweise durch einen den Gallengang verlegenden Gallenstein oder Gallengangstenosen und -atresien. Maligne Prozesse, wie das CCC oder Pankreastumoren, können durch Kompression oder Tumorerkrankungen ebenfalls zum Gallenstau führen (Herold 2012). Folgen einer Cholestase können Leberzellschädigungen mit konsekutiver Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose mit Leberversagen sein. Außerdem kann die cholestatische Leberschädigung die Entstehung eines HCC begünstigen (Rajapaksha et al. 2019).

Diese Folgeerkrankungen beruhen auf der beim Wundheilungsprozess gesteigerten Synthese der extrazellulären Matrix (EZM) durch die hepatischen Sternzellen und dem konsekutiven Ersatz des funktionellen Lebergewebes durch EZM. Die Aktivierung der Sternzellen, auch als Ito-Zellen bezeichnet, erfolgt durch die Schädigung von Hepatozyten (Taub 2004).

Laborchemische Parameter, die auf eine Cholestase hinweisen, sind eine Erhöhung des Bilirubins, der alkalischen Phosphatase (AP) und γ -Glutamyltransferase. Beim Bilirubin erfolgt eine Unterscheidung in das direkte bereits in der Leber konjugierte und das indirekte Bilirubin (Herold 2012).

2.2.2 Cholestase bei malignen Lebertumoren

Eine obstruktive Cholestase liegt bei extrahepatischen cholangiozellulären Tumoren häufig als eines der ersten Symptome vor, da der Tumor die Gallenwege verlegt und den Gallenabfluss behindert. Beim intrahepatischen CCC weisen hingegen lediglich 10 – 15 % der Patienten eine Obstruktion des Gallengangs auf (Forner et al. 2019). Bei 19 – 40 % der HCC-Patienten tritt aufgrund einer diffusen Tumorerkrankung, hilärer Invasion oder eines Leberversagens ein Gallenstau auf (Qin und Tang 2003).

Liegt eine Cholestase vor, hat dies prognostische Relevanz, da sie die Leberregeneration nach einer Majorresektion einschränkt sowie die Mortalität um 13 % und das Risiko eines PHLF um 17 % erhöht (Capobianco et al. 2019). Insbesondere Patienten mit einem perihilären CCC sind hiervon betroffen. Bei ihnen liegt die Wahrscheinlichkeit eines postoperativen Leberversagens bei 17 – 24 % (Olthof et al. 2020).

Ursache eines solchen PHLF können ein zu geringes FRLV oder auch eine beeinträchtigte Leberfunktion, ausgelöst durch die Cholestase, sein (Capobianco et al. 2019). Um diese unerwünschten Effekte einer Cholestase auf die Tumorthherapie zu verhindern, gibt es folgende Behandlungsmöglichkeiten. Eine präoperative biliäre Drainage der zukünftigen Restleber ist beispielsweise bei Vorliegen einer akuten Cholangitis, Cholestase, Malassimilation aufgrund einer Hyperbilirubinämie und vor einer geplanten PVE indiziert (Capobianco et al. 2019). Mögliche Verfahren für

eine Dekompression der Gallenwege sind eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) oder eine perkutane transhepatische Cholangiodrainage (PTCD) (Heinrich und Lang 2015). Beträgt die Bilirubinkonzentration nach erfolgter Drainage weniger als $50 \mu\text{mol/l}$ und liegt eine adäquate Volumenzunahme der Restleber vor, kann eine Leberteileresektion in Betracht gezogen werden (Clavien et al. 2007).

Für die Simulation einer chronischen Cholestase, wie sie im Rahmen von malignen Prozessen der Leber auftreten kann, wurde in dieser Arbeit ein Tiermodell von Dondorf et al. (Dondorf et al. 2017) angewendet. Hier gelang es bei Ratten eine chronische Cholestase zu induzieren, ohne dass eine Leberzirrhose auftrat.

2.3 Regeneration der Leber und Auswirkungen der Cholestase

Im Folgenden werden die grundlegenden Prozesse der Leberregeneration dargestellt. Die wissenschaftlichen Untersuchungen der Leberregeneration basieren meist auf dem Modell der Leberteileresektion. Dabei werden die Vorgänge der kompensatorischen Hypertrophie des verbleibenden Leberlappens studiert, die durch den Verlust des resezierten Leberlappens ausgelöst werden (Taub 2004).

2.3.1 Regeneration der Leber

Um den Regenerationsprozess der Leber anzustoßen, bedarf es eines Auslösers, da sich die ausgereiften Hepatozyten gewöhnlich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und somit kaum eine Zellteilung stattfindet (Taub 2004). Der kompensatorische Regenerationsprozess der Leber nach einer partiellen Hepatektomie ist dabei nicht von Stammzellen abhängig, sondern erfolgt durch die Proliferation der reifen, funktionsfähigen Zellen (Taub 2004). Potenzielle Trigger für eine Proliferation des Lebergewebes können Noxen, ein Teilverlust des Lebergewebes, beispielsweise in Form einer Hemihepatektomie, oder ein veränderter portalvenöser Fluss sein (Kandilis et al. 2010, Taub 2004). Dabei unterscheiden sich die Mechanismen der Regeneration in Abhängigkeit von der Art der Zellschädigung (Kandilis et al. 2010), jedoch sind die grundlegenden Mechanismen in der Leber nach einer partiellen Hepatektomie und einer PVE vergleichbar (Szijártó und Fülöp 2015). In beiden Fällen liegt ein erhöhter Blutfluss zum verbleibenden bzw. nicht ligierten Leberlappen vor. Daraus resultiert ein erhöhter portaler Druck (Yokoyama et al. 2007). Im Allgemeinen gilt die Leberregeneration nach einer Hemihepatektomie bei Ratten nach fünf bis sieben Tagen als abgeschlossen (Michalopoulos 2007).

Folgende verschiedene Thesen existieren über die Vorgänge, die der Hypertrophieinduktion durch einen veränderten Blutfluss zugrunde liegen. Aufgrund der sogenannten Hepatic arterial buffer response verdrei- bis vervierfacht sich der arterielle Blutfluss zum okkludierten Teil der Leber. Deshalb nimmt der gesamte Blutfluss, arteriell und portalvenös, in diesem Leberanteil nur um 45 – 50 % ab. Gleichzeitig steigert sich im nicht okkludierten Leberlappen der Blutfluss um fast 230 %, was großteils durch einen erhöhten portalen Blutfluss hervorgerufen wird (Szijártó und Fülöp 2015). Resultat dieser Vorgänge ist eine verminderte Sauerstoffver-

sorgung des nicht okkludierten Leberlappens, da das arterielle, oxygenierte Blut zu 90 % in den okkludierten Teil der Leber fließt. Diese Hypoxie wiederum kann Anpassungsvorgänge im regenerierenden Lebergewebe auslösen. Andererseits steht dem hypertrophierenden Lebergewebe eine größere Menge an Signalmolekülen zur Verfügung. Diese hepatotropen Faktoren wie Mitogene, Nährstoffe und Hormone befinden sich vor allem im portalvenösen Blut, welches nach der Portalvenenokklusion zu 100 % in den hypertrophierenden Leberlappen gelangt. Weiterhin nimmt durch den erhöhten sinusoidalen Blutfluss die Fenestration der Sinusoide zu, wodurch ein direkter Zugang der Signalmoleküle zu den Hepatozyten entsteht (Szijártó und Fülöp 2015). Durch den veränderten Blutfluss erhöht sich außerdem der portalvenöse Druck im nicht okkludierten Leberlappen. Dieser ruft eine Dehnung sowie Scherstress der vaskulären Endothelzellen hervor, was zu einer gesteigerten Interleukin (IL)-6-Ausschüttung dieser Zellen führt (Yokoyama et al. 2007). In Folge von hepatischem Stress kann eine erhöhte Konzentration von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und IL-6 in Endothel- und Kupfferzellen nachgewiesen werden (Yokoyama et al. 2007).

Auf molekularer Ebene spielen für die Initiierung der Leberregeneration die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α eine wichtige Rolle (Yokoyama et al. 2007, Taub 2004, Kandilis et al. 2010). Diese werden vor allem in den Kupfferzellen, den lebereigenen Makrophagen, gebildet und führen über verschiedene Signalwege (C-jun N-terminal kinase (JNK), Mitogen-activated protein kinase (MAPK), Extracellular signal-regulated kinase (ERK)) zur Aktivierung von diversen Transkriptionsfaktoren (Nuclear factor κ B (NF- κ B), Activator protein-1 (AP-1), Signal transducers and activators of transcription-3 (STAT-3)) und zur Expression von Immediate early genes in den Hepatozyten (Szijártó und Fülöp 2015). Dabei kann TNF- α die IL-6-Synthese der Kupfferzellen induzieren (Taub 2004). Durch diese Mechanismen werden die Hepatozyten für zahlreiche Wachstumsfaktoren und Mediatoren sensibilisiert. Zu diesen zählen unter anderem Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Transforming growth factor (TGF)- α (Yokoyama et al. 2007, Taub 2004). Dementsprechend bedingen die Zytokine den Übergang der Hepatozyten von der G0- in die G1-Phase des Zellzyklus. Die anschließende Transition in die S-Phase und somit die Proliferation der Hepatozyten ist von der Stimulation durch Wachstumsfaktoren abhängig (Kandilis et al. 2010).

Nach einer portalvenösen Okklusion treten ca. 70 – 95 % der Hepatozyten in den Zellzyklus ein (Szijártó und Fülöp 2015).

2.3.2 Regeneration unter Cholestase

Die Leberregeneration wird durch eine auftretende Cholestase eingeschränkt (Yamano et al. 2002, Capobianco et al. 2019). So ist nach einer PVE unter erhöhter Bilirubinkonzentration eine deutlich verminderte Hypertrophie des nicht okkludierten Leberlappens festzustellen. Gleiches zeigt sich nach einer Leberresektion unter Cholestase. Gründe hierfür sind ein verminderter portalvenöser Fluss und eine gehemmte Synthese von Mediatoren, die gewöhnlich den Regenerationsprozess fördern. Beispielsweise ist die HGF-Produktion reduziert. Es liegen ebenfalls

eine erhöhte Apoptoserate und ein gestörter enterohepatischer Kreislauf vor (Yokoyama et al. 2007). Weiterhin führen Gallensäuren, deren extrazelluläre Konzentration während einer obstruktiven Cholestase erhöht ist, über diverse Signalwege zu einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Genen in den Hepatozyten. Die Aktivierung dieser Gene, zu denen auch das Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)-Gen zählt, resultiert in einer erhöhten Synthese inflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise IL-10 oder IL-1 β (Allen et al. 2011). ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül für neutrophile Granulozyten und wird auf der Zellmembran unterschiedlicher Körperzellen exprimiert (Springer 1990). In Zusammenschau führen diese Vorgänge zur Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der Leber sowie zu deren Aktivierung, insbesondere von neutrophilen Granulozyten. Das Resultat ist eine hepatische Zellschädigung (Gujral et al. 2003, Allen et al. 2011). Der Prozess der Zellschädigung durch neutrophile Granulozyten kann in drei Schritte unterteilt werden. Zunächst fördern die in der Leber reaktiv gebildeten Zytokine die Akkumulation der Zellen im hepatischen Gefäßsystem. Durch die Leukodiapedese gelangen sie zu den Hepatozyten. Zuletzt adhärieren die Leukozyten an die Hepatozyten und entfalten ihre zytotoxische Wirkung in Form von oxidativem Stress (Jaeschke und Smith 1997). Auch eine Aktivierung der Kupfferzellen durch Gallensäuren und Bilirubin, und damit die Synthese proinflammatorischer Zytokine in diesen, ist während der Cholestase beschrieben (Gulubova 1998).

Im Rahmen einer Cholestase ist außerdem eine vermehrte Fibrosebildung durch Zunahme der EZM festzustellen. Diese ist dann meist portal lokalisiert (Marques et al. 2012). An dieser gesteigerten Synthese von Bindegewebe sind nicht nur aktivierte Sternzellen beteiligt. Auch Myofibroblasten, die vorrangig in Portalfeldern lokalisiert sind und aus dem Knochenmark oder kleinen Portalgefäßen stammen, tragen vermutlich zur Kollagensynthese bei (Rajapaksha et al. 2019). Neben der Bildung von EZM, synthetisieren aktivierte Sternzellen während einer Cholestase außerdem TGF- β , welches die Proliferation der Hepatozyten hemmt. Gleichzeitig führt die Aktivierung der Sternzellen zur Reduktion ihrer HGF-Synthese (Makino et al. 2006). Eine Cholestase kann somit eine mögliche Einschränkung der Leberregeneration bedingen.

2.4 Hepatic Growth Factor

Bei HGF handelt es sich um ein körpereigenes Wachstumshormon, welches in den Sternzellen der Leber und von weiteren mesenchymalen Zellen, auch außerhalb der Leber, gebildet wird. Da es nicht in den Hepatozyten synthetisiert wird, wirkt es auf diese parakrin und endokrin. Das Vorläufermolekül ist preproHGF und wird extrazellulär durch Serinproteasen, HGF-Aktivator oder HGF-converting enzyme in seine aktive Form umgewandelt (Matsumoto und Nakamura 1996). HGF ist der Ligand des c-Met/HGF Rezeptor (Li et al. 2007). Dieser ist ein Tyrosinkinase-rezeptor und setzt durch Phosphorylierung eine Signalkaskade in Gang, an deren Ende die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren, unter anderem STAT-3, steht.

HGF besitzt multiple biologische Funktionen und ist das potenteste Mitogen der Hepatozyten (Matsumoto und Nakamura 1996). Es weist jedoch nicht nur gegenüber Hepatozyten einen tei-

lungsfördernden Effekt auf, sondern entfaltet auch in anderen Geweben seine Wirkung. Beispielsweise in renalen Epithelzellen oder vaskulären Endothelzellen, deren Zellmobilität gefördert wird. Bei neuronalen Zellen soll durch HGF der Eintritt des Zelltods verzögert werden. Hinweisend auf eine über die Leber hinaus reichende Relevanz ist die Tatsache, dass nach Nierentransplantationen oder -schädigung sowie einer Lungenschädigung erhöhte HGF-Spiegel im Blut messbar sind. Auch eine regulierende Wirkung von HGF auf die Hämatopoese und Chondrogenese wird beschrieben (Matsumoto und Nakamura 1996). An der Regulation der HGF-Expression sind verschiedene Faktoren beteiligt. Beispiele für diese die Synthese steigernden Substanzen sind IL-1, Epidermal growth factor (EGF), Basic und Acidic Fibroblast Growth Factor und Prostaglandine. Glucocorticoide und TGF- β 1 hingegen hemmen die Synthese (Matsumoto und Nakamura 1996).

Auch bei hepatischen Erkrankungen ist eine erhöhte HGF-Konzentration im Blut nachweisbar (Matsumoto und Nakamura 1996). So zeigt sich nach Leberschädigung, beispielsweise durch eine Hemihepatektomie, Ischämie oder α -Naphthyl-Isothiocyanat-Applikation bei Ratten oder Mäusen eine deutlich gesteigerte Expression der HGF-messenger RNA (mRNA) (Matsumoto und Nakamura 1996). Infolge einer Pfortaderligatur konnte ebenfalls eine erhöhte mRNA-Expression von HGF im nicht ligierten Leberlappen gemessen werden (Yokoyama et al. 2007). Hingegen kann eine verminderte HGF-Synthese in den Sternzellen festgestellt werden, nachdem diese durch eine Cholestase aktiviert wurden (Michalopoulos und Zarnegar 1992).

Die hepatotrope Wirkung von HGF konnte in diversen Studien nachgewiesen werden. Ishii et al. (Ishii et al. 1995) zeigten, dass durch die Applikation von HGF eine verbesserte Regeneration der teilresezierten Leber bewirkt werden kann und die Proteinkonzentration im Plasma, insbesondere von Albumin, ebenfalls positiv beeinflusst wird. Bei der Untersuchung der Auswirkung einer HGF-Applikation auf normales Rattenlebergewebe sowie nach einer 70 % Teilresektion konnte ein erhöhter hepatischer Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Gehalt registriert werden (Fujiwara et al. 1993).

Bei diversen Studien zur Wirkung von appliziertem HGF auf cholestatisches Lebergewebe konnten eine erhöhte DNA-Synthese und somit eine gesteigerte Proliferation der Hepatozyten, eine verminderte Hyperbilirubinämie (Yoshikawa et al. 1998), eine Modulation der Inflammation und des Apoptoseindex (Turk et al. 2016) sowie anti-fibrotische Effekte (Xia et al. 2006) beobachtet werden.

2.5 ICAM-1 und Theaflavin

ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das zur Immunglobulin-Superfamilie zählt. Zahlreiche Zelltypen wie Endothel- und Epithelzellen sowie Fibroblasten exprimieren es auf ihrer Zellmembran. ICAM-1 spielt als Regulator der T- und B-Zellantwort und der Zytotoxizität von Monozyten und Granulozyten sowie als Adhäsionsmolekül für Leukozyten eine wichtige Rolle (Springer 1990). Die Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen einer Inflammation erfolgt über die Interaktion der Adhäsionsmoleküle mit Liganden, z.B. dem Lymphozytenfunktionsassoziierten

Antigen-1 (LFA-1), welches sich auf der Zelloberfläche von Leukozyten befindet. Durch diese Bindung wird einerseits die Leukodiapedese durch das Endothel der Gefäße und andererseits die Bindung der Leukozyten an die ICAM-1 exprimierenden Zellen gesteuert (Springer 1990). An der Regulation der ICAM-1-Expression sind proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , das auch im Rahmen der Leberzellschädigung durch Kupfferzellen gebildet wird, oder IL-1 beteiligt (Jaeschke und Smith 1997). Die durch Zytokine induzierte Expression von ICAM-1 konnte *in vitro* und *in vivo* nach vier bis sechs Stunden beobachtet werden, das Maximum trat nach neun bis 24 h auf (Springer 1990).

Bislang konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 über diesen Mechanismus an den Prozessen bei Ischämie-Reperfusion- und post-Endotoxämie-Schädigungen der Leber und Lunge beteiligt ist. Bei der Untersuchung der Leukozytenmigration im, durch eine Hemihepatektomie geschädigten, Lebergewebe von ICAM-1-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen, wurde bei Mäusen mit fehlendem ICAM-1-Gen eine verminderte Leukozytenmigration in das verbleibende Lebergewebe beobachtet (Selzner et al. 2003).

Im Lebergewebe von Patienten, bei welchen eine extrahepatische Cholestase vorlag, zeigte sich eine erhöhte ICAM-1-Expression auf sinusoidalen Endothelzellen. Diese korrelierte mit dem Schweregrad der Cholestase. Ebenso konnte auf Kupfferzellen und teilweise auch bei Endothelzellen der Portalvenen, Arterien und Gallengangsepithelzellen sowie Hepatozyten ICAM-1 nachgewiesen werden. Kontrollproben von Lebern ohne Cholestase enthielten hingegen lediglich vereinzelt ICAM-1 auf portalen und sinusoidalen Endothelzellen (Gulubova 1998).

Bei der Analyse einer cholestatischen Leberschädigung, induziert durch eine Gallengangsligatur (BDL) bei Mäusen, fanden Gujral et al. (Gujral et al. 2004) heraus, dass die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in Sinusoiden und deren folgende Extravasation von ICAM-1 abhängig ist und zu einer Aggravation der cholestatischen Leberschädigung führt. Zur Zellschädigung kommt es durch oxidativen Stress, hervorgerufen durch die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) der neutrophilen Granulozyten. Diese bilden über die MPO reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. Reactive oxygen species) (Gujral et al. 2004). Auch bei gallengangsligierten Mäusen wurde eine Erhöhung der ICAM-1-Expression in der mRNA von Hepatozyten festgestellt (Allen et al. 2011). Rauchfuß (Rauchfuß 2012) identifizierte ICAM-1 als Schlüsseltranskript der Zellschädigung bei vorliegender Cholestase, wobei auch hier der Schädigungsprozess auf die verstärkte Leukozytenmigration und die daraus resultierende Inflammation zurückzuführen ist.

Eine erhöhte ICAM-1-Expression in der Hepatozytenmembran ist auch bei anderen Lebererkrankungen, die mit einem Parenchymschaden einhergehen, zu finden. Hierzu zählen beispielsweise die akute und chronisch aktive Hepatitis, Morbus Wilson und die primär sklerosierende Cholangitis. Kommt es nach einer Lebertransplantation zur Abstoßung des Spenderorgans, konnte ebenfalls eine erhöhte ICAM-1-Konzentration gemessen werden (Gulubova 1998).

Theaflavin ist als Polyphenol ein Bestandteil von schwarzem Tee und entsteht während dessen Fermentation durch oxidative Prozesse aus Catechinen (Weerawatanakorn et al. 2015). Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe und beispielsweise in Äpfeln, Zitrusfrüchten und vielen weiteren Pflanzen vorhanden (Li et al. 2018). Die Molekülstruktur von Polyphenolen weist mindestens einen aromatischen Ring auf, an den Hydroxylgruppen gebunden sind (Li et al. 2018). Anhand der unterschiedlichen weiteren funktionellen Gruppen können die Polyphenole in Untergruppen gegliedert werden. Darunter fallen auch Flavonoide, zu denen Theaflavin (THEA) zählt. Bisher bekannte Wirkungen von Polyphenolen sind die positive Beeinflussung des Lipidmetabolismus, des Entzündungsgeschehens und der Insulinresistenz sowie die Verringerung von oxidativem Stress (Li et al. 2018).

In einem Mäusemodell konnte gezeigt werden, dass Theaflavin über die Blockade des STAT-3-Signalwegs das Tumorwachstum und die Metastasierung beim HCC hemmt (Shao et al. 2016). Darüber hinaus kann THEA durch die Aktivierung der Caspase-Signalkaskade die Apoptose bei HCC-Zellen einleiten (Shao et al. 2016). Oral verabreichtes Theaflavin reduziert außerdem eine bei Ratten durch Dimethylnitrosamin induzierte hepatische Fibrose und Inflammation (Weerawatanakorn et al. 2015). Song et al. (Song et al. 2011) stimulierten bei ihrer *in vitro*-Studie isolierte intestinale Epithelzellen von Ratten mit Lipopolysacchariden (LPS) und machten sich somit deren biologische proinflammatorische Wirkung als Endotoxine von gramnegativen Bakterien zu Nutze. Diese LPS-Exposition hatte die Aktivierung von NF- κ B zur Folge. Da NF- κ B als Transkriptionsfaktor für die Regulation zahlreicher proinflammatorischer Gene und von ICAM-1 bzw. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) fungiert, erfolgt somit ein Eingriff in Entzündungsprozesse. Nach der Applikation von THEA und LPS wurde der Grad der Leukozytenadhäsion an den Zellen bestimmt. Hierbei wurde beobachtet, dass durch Theaflavin die Leukozytenadhäsion an den Epithelzellen vermindert wurde. Außerdem wurde eine verringerte Akkumulation von ICAM-1 und VCAM-1 mRNA in den mit THEA behandelten Zellen registriert. Als zugrunde liegender Mechanismus fungiert einerseits die Blockade der Aktivierung bzw. Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Andererseits wird die Aktivierung durch Phosphorylierung von JNK verhindert. JNK ist Teil eines MAPK-Signalwegs, der unter anderem durch oxidativen Stress aktiviert werden kann und in der Expression von Adhäsionsmolekülen mündet (Song et al. 2011). Ebenfalls konnte eine verminderte Inflammation nach zerebraler Ischämie bei Ratten durch THEA-Applikation erreicht werden. Dies ist auf die durch THEA verminderte ICAM-1-Expression und die folgende reduzierte Leukozyteninfiltration zurückzuführen (Cai et al. 2006). Eine weitere Eigenschaft von Theaflavin ist die antioxidative Wirkung, da *in vitro* Hepatozyten, die zuvor mit THEA behandelt und anschließend H_2O_2 ausgesetzt wurden, einen deutlich geringeren Zelluntergang und verminderte intrazelluläre ROS aufwiesen (Feng et al. 2002).

3 Ziele der Arbeit

Die aktuelle Studienlage zeigt, dass bereits etablierte Methoden zur Hypertrophieinduktion der Leber existieren (Capobianco et al. 2019, Baumgart et al. 2019). Da das Vorliegen einer Cholestase die Regeneration jedoch negativ beeinflusst (Yamano et al. 2002), ist die Untersuchung unterstützender Maßnahmen zur verbesserten Hypertrophie Ziel dieser Arbeit.

Die Auswirkung der Pfortaderligatur auf das Lebergewebe bei Ratten war mehrfach Gegenstand vorangegangener Studien (Furrer et al. 2008, Abreu et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit soll ebenfalls die Beeinflussung des Lebergewebes der Ratte durch eine PAL untersucht werden. Jedoch soll vor der PAL durch eine Ligatur des Gallengangs eine chronische Cholestase induziert werden. Insbesondere die Analyse des zeitlichen Verlaufs der provozierten Veränderungen soll in der vorliegenden Arbeit erfolgen.

Bei HGF handelt es sich um eine Substanz, die neben vielen Eigenschaften vor allem eine hepatotrope Wirkung aufweist (Ishii et al. 1995, Matsumoto und Nakamura 1996). Wie aus anderen Studien bekannt ist, führt die Gabe von HGF zu einer verstärkten Proliferation von Lebergewebe (Rauchfuß 2012, Mangieri et al. 2017). Ob dieser Effekt auch additiv zu PAL im chronisch cholestaten Lebergewebe gegeben ist bzw. die Cholestase die Wirkung von HGF verändert, ist Gegenstand dieser Studie. Auch die Beeinflussung der Cholestase durch HGF soll genauer betrachtet werden.

ICAM-1 hat große Bedeutung für die Rekrutierung von Leukozyten in das verbleibende Lebergewebe nach einer partiellen Hepatektomie bei Mäusen (Selzner et al. 2003). Eine Beteiligung an den Inflammationsprozessen im Rahmen der cholestaten Leberschädigung konnte ebenfalls registriert werden (Gujral et al. 2004). Dies ist auf den Einfluss der durch ICAM-1 in das cholestaten Lebergewebe rekrutierten Leukozyten und ihre zytotoxischen Eigenschaften zurückzuführen. Die durch die Leukozyten gebildeten ROS führen zum Zelluntergang (Gujral et al. 2003). Da Theaflavin die ICAM-1-Expression unterdrückt (Song et al. 2011), soll nun analysiert werden, ob durch die Applikation von THEA eine Hemmung der Leukozytenmigration in die cholestaten Leber erzielt werden kann. Hieraus würde eine verminderte Inflammation resultieren. Außerdem weist Theaflavin einen direkten, hemmenden Einfluss auf die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Leberepithelzellen von Ratten auf (Feng et al. 2002). Diese beschriebenen Eigenschaften von Theaflavin könnten in einer verminderten Leberschädigung und somit verbesserten Regeneration der chronisch cholestaten Leber münden. Insbesondere in Kombination mit der Pfortaderligatur, welche ebenfalls eine gesteigerte Regenerationsantwort zum Ziel hat, scheint die Anwendung von Theaflavin und HGF somit vielversprechend.

4 Methodik

4.1 Behördliche Genehmigung

Diese Studie wurde durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz unter der Registrierungsnummer 02-059/16 genehmigt. Es handelte sich um eine prospektive Studie auf Grundlage eines Rattenmodells.

4.2 Studienpopulation

Die acht bis neun Wochen alten Tiere, männliche Lewis Ratten, stammten von Charles River, Sulzfeld, Deutschland und besaßen ein Ausgangsgewicht von $259,97 \pm 10,61$ g (Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD)). Insgesamt wurden 74 Tiere operiert und 63 in die Auswertung aufgenommen.

Folgende vier Versuchsgruppen wurden durch zufällige Zuordnung gebildet:

Gruppe 1 (PAL-Gruppe): PAL (Anzahl (n)= 16)

Bei diesen Tieren wurde nach einer Laparotomie ausschließlich eine Pfortaderligatur durchgeführt.

Gruppe 2 (BDL-Gruppe): BDL+PAL (n= 16)

Hier erfolgte nach der Laparotomie eine Gallengangsligatur und 26 Tage später im Rahmen einer zweiten Laparotomie eine Pfortaderligatur.

Gruppe 3 (HGF-Gruppe): BDL+PAL+HGF (n= 15)

Auch hier wurde nach der Laparotomie eine Gallengangsligatur und beim folgenden Eingriff 26 Tage später eine Pfortaderligatur durchgeführt. Zusätzlich wurde bei der zweiten Operation HGF in den nicht ligierten Pfortaderast appliziert.

Gruppe 4 (THEA-Gruppe): BDL+PAL+THEA (n= 16)

Bei dieser Gruppe wurden ebenfalls bei der ersten Operation der Gallengang und bei der zweiten Laparotomie, ebenfalls nach 26 Tagen, ein Pfortaderast ligiert. Während des Eingriffs der Pfortaderligatur erfolgte darüber hinaus die Theaflavin-Injektion in den nicht ligierten Pfortaderast.

Gruppe 1 und Gruppe 2 fungierten als Kontrollgruppen, Gruppe 3 und 4 als Interventionsgruppen. Jede dieser Gruppen wurde in vier Untergruppen unterteilt, die sich im Nachbeobachtungszeitraum unterschieden. Dies bedeutet, dass die Tiere 24 h (1. Postoperative day (POD)), 48 h (2. POD), 120 h (5. POD) und 168 h (7. POD) nach der Pfortaderligatur geopfert wurden. Abbildung 1 zeigt eine grafische Übersicht des Ablaufs.

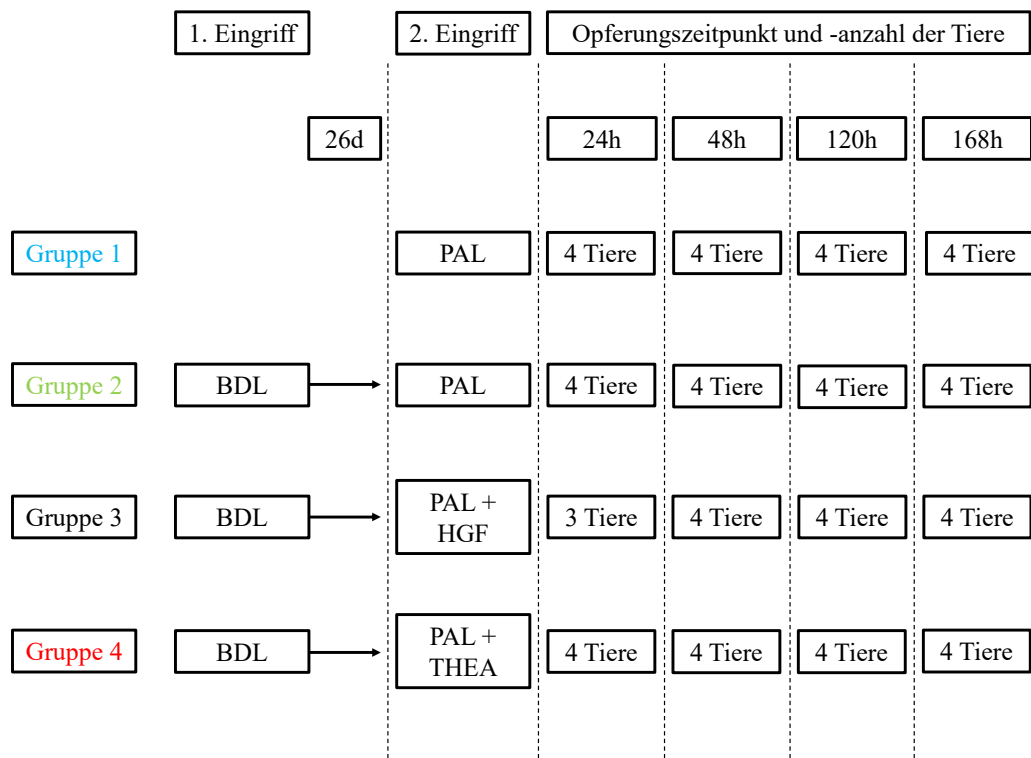


Abbildung 1: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs.

4.3 Ablauf des Experiments

Durchgeführt wurde die Studie am Institut für Experimentelle Transplantationschirurgie der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Jena (UKJ).

Tierhaltung Die Tiere wurden in Käfigen (Typ IV) zu dritt artgerecht in den Räumlichkeiten der Experimentellen Transplantationschirurgie gehalten und mit Wasser und Pelletstandardfutter (1324-10mm Pellets TPF, Altromin Spezialfutter, Lage, Deutschland) *ad libitum* versorgt. Die Raumtemperatur betrug 19 – 21 °C und die Luftfeuchtigkeit 30 – 70 %. Es lag ein Tag-Nachtzyklus von 12 h mit Lichtwechsel um 6 Uhr und 18 Uhr vor. Die Durchführung der Studie unterlag den Auflagen des deutschen Tierschutzgesetzes, welche stets befolgt wurden.

Bevor der erste Eingriff erfolgte, wurde für die Tiere eine Akklimatisationszeit von mindestens zwei Wochen im Tierstall sichergestellt. Ab Beginn der Studie wurden die Tiere täglich gewogen und ihr Allgemeinzustand geprüft.

Prozedur Bis auf die Tiere der Gruppe 1 wurden alle Tiere zweimal in Narkose laparotomiert. Dabei wurde bei allen Tieren, außer jenen der Gruppe 1, eine chronische Cholestase durch die Ligatur des Gallengangs nach dem Modell von Dondorf et al. (Dondorf et al. 2017) induziert. 26 Tage später erfolgte die Ligatur eines Pfortaderastes zur Unterbindung der portalvenösen Versorgung des medianen und linken Leberlappens (Rauchfuß 2012). Dies entspricht ca. 70 %

des gesamten Lebervolumens. Zusätzlich wurde bei den Gruppen 3 und 4 HGF bzw. Theaflavin über die nicht ligierte Portalvene in das restliche Lebergewebe appliziert. Weiterhin wurde beim zweiten Eingriff Blut durch eine Direktpunktion der Vena (V.) cava inferior gewonnen. Zum jeweiligen Zeitpunkt (24 h, 48 h, 120 h und 168 h nach der PAL) wurden die Tiere in Narkose mittels Exsanguination geopfert.

Operationsvorbereitung und Narkose Am Tag der Operation wurden die Tiere morgens in ihren Käfigen zur Eingewöhnung aus dem Tierstall in den Einleitungsraum des Labors gebracht und klinisch beurteilt. Die Narkose erfolgte in Form einer Allgemeinanästhesie. Für die Narkoseeinleitung (Vaporisator: Sigma Delta Vaporizer-Isoflurane; Flowmeter: CM2, UNO BV, Zevenaer, Niederlande) wurde ein Sauerstoff-Isofluran-Gemisch (Isofluran CP[®] 1 ml/ml, CP Pharma, Burgdorf, Deutschland) mit einem Isoflurananteil von 3 % und einer Sauerstoffzufuhr von 0,5 l/h in Kombination mit dem Analgetikum Butorphanol (Torbugesic Vet 10 mg/ml, Zoetis Deutschland, Berlin, Deutschland) verwendet. Dieses wurde den Tieren mit einer Dosierung von 0,05 mg/kg Körpergewicht (KG) subcutan in die Nackenfalte appliziert. Um die Inhalationsnarkose einzuleiten, wurden die Tiere in eine dafür vorgesehene Narkosebox gelegt. In dieser wurden die Tiere durch die Abdeckung mit einem Tuch von äußeren Reizen abgeschirmt. Vor jedem Eingriff wurden die bereits narkotisierten Tiere im Operationsgebiet am Abdomen mit einem Rasierer (Fovorita II GT104, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) enthaart und ihr Körpergewicht bestimmt (BLC-3000, Boeco, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die narkotisierten Tiere zum Operationstisch gebracht, wo die Narkose mit einem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch (Isofluran: 2,5 %; Sauerstoff: 0,5 l/h) aufrechterhalten wurde. Um die perioperative Auskühlung der Tiere zu verhindern, wurde der Operationstisch durch eine Wärmeplatte (Homeothermic Monitoring System, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March, Deutschland) beheizt. Mithilfe von Pflastern wurden die Tiere an den Extremitäten auf dem Operationstisch fixiert. Im Anschluss wurde unter Anwendung des Zwischenzehenreflexes und des Lidreflexes die Narkosetiefe getestet und kontrolliert. Bei Bedarf, also einer Reaktion des Tieres auf die gesetzten Reize, wurde die Narkose mittels vermehrter Isofluranzufuhr vertieft. Nach einigen Minuten erfolgte nochmals eine Testung der Reflexe, bevor mit dem Eingriff begonnen wurde. Das Abdomen wurde mit Povidon-Iod (Betaisodona[®] Lösung, Mundipharma Deutschland, Frankfurt am Main, Deutschland) desinfiziert und das Operationsgebiet mit Kompressen (Nobatop[®] 12, Nobamed, Wetter, Deutschland) steril abgedeckt.

Laparotomie Für die Eröffnung des Bauchraumes wurde eine Medianlaparotomie gewählt. Nach dem Hautschnitt und der atraumatischen Präparation des Unterhautgewebes mittels Scherenschlag wurde die Muskelschicht des Musculus rectus abdominis durch Scherenschnitt eröffnet. Wie auch beim Hautschnitt diente eine Bipolarpinzette (VIO[®] 50 C, Erbe, Tübingen, Deutschland) zur Blutstillung. Zur Fixation der Bauchdecke wurden zwei Fixationshaken verwendet. Nach einer Lavage mit ca. 3 ml Natriumchlorid (NaCl) (0,9 %, WDT, Garbsen, Deutschland) wurden die Darmschlingen mobilisiert und evertiert. Um die Austrocknung dieser zu vermei-

den, wurden die Darmschlingen in eine mit NaCl befeuchtete Minikompressse eingeschlagen. Die weiteren Schritte erfolgten unter dem Mikroskop (IC80 HD; M60, Leika, Wetzlar, Deutschland). Die Leber und die sie versorgenden Gefäße wurden sorgsam mit Wattetupfern (1,5 cm Nobamend, Wetter, Deutschland) aufgesucht und die Pfortader als Leitstruktur identifiziert, da bei der Ratte ventral von dieser der Hauptgallengang lokalisiert ist. Für einen besseren Zugang zu den Strukturen wurden mittels befeuchteter Kompressen und Wattetupfern die Leberlappen zur Seite verlagert.

Ligatur des Gallengangs und Vorlage der Fäden für die PAL Nach Identifikation des Hauptgallengangs wurde dieser in seinem Verlauf vorwiegend atraumatisch mit Pinzette und Wattetupfer von den umliegenden Strukturen sondiert. Anschließend wurde der Gallengang mithilfe einer gebogenen Pinzette unterminiert. Daraufhin wurde mit dieser, den Gallengang unterminierenden, Pinzette ein 6-0 Prolene® Faden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) gefasst, um den Ductus hepaticus gelegt und dieser ligiert. Mit der gleichen Methode wurde eine zweite Ligatur im Abstand von wenigen Millimetern zur ersten gesetzt. Kurze Zeit nach der Intervention zeigte sich bereits oberhalb der Ligatur ein leichter Stau von Gallenflüssigkeit.

Um den zweiten Eingriff, die Pfortaderligatur, zu erleichtern, wurde der Faden für die Ligatur des Pfortaderastes bei der ersten Operation vorgelegt. Hierfür wurde die Pfortader zunächst atraumatisch präpariert und anschließend mit einem 6-0-Prolene® Faden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) mithilfe der am Faden befindlichen Nadel umstochen. Die gekürzten Fadenenden wurden nach kranial unter das Diaphragma verlagert.

Abdomenverschluss und Beendigung des Eingriffs Nach der Kontrolle auf Bluttrockenheit wurden die eingebrachten Kompressen entfernt und nach der Entnahme der Fixationshaken nochmals eine Lavage mit ca. 3 ml 0,9% NaCl durchgeführt. Auf die Rückverlagerung der Darmschlingen in den Bauchraum folgte der zweireihige Bauchdeckenverschluss mittels Fasziennaht in Form einer fortlaufenden Naht mit einem 4-0 Vicryl® Faden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland), bei welcher die angrenzenden Muskelschichten eingeschlossen wurden. Nach der Kontrolle auf vollständigen Verschluss und Desinfektion mit Povidon-Iod (Betaisodona® Lösung, Mundipharma Deutschland, Frankfurt am Main, Deutschland) erfolgte die Hautnaht mit einem 3-0 Prolene® Faden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) ebenfalls in fortlaufender Naht. Auch hier wurde auf einen vollständigen Verschluss geachtet und nochmals desinfiziert. Die Narkosegaszufuhr wurde beendet und das Tier in Seitenlagerung mit einer Kompressse zum Schutz der Wunde in seinen Käfig gelegt. Für die Abschirmung von äußeren Reizen wurde dieser mit einem Tuch abgedeckt. Während der Aufwachphase stand das Tier unter Beobachtung. Innerhalb weniger Stunden tranken die Tiere wieder und begannen mit der Nahrungsaufnahme.

Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren insgesamt drei Tage lang vier Mal täglich Torbugesic Vet 10 mg/ml (0,05 mg/kg KG) subcutan in die Nackenfalte injiziert. Im Zeitraum zwischen den beiden Interventionen wurden die Tiere täglich gewogen und klinisch beurteilt.

Pfortaderligatur Die zweite Operation nach 26 Tagen lief bis zur Identifikation der Pfortader identisch mit dem ersten Eingriff ab. Die bereits vorhandene Narbe wurde dabei als Zugang gewählt. Da aufgrund der vorangegangenen Operation häufig Adhäsionen im Bereich des Oberbauchs vorhanden waren, wurden diese vor Aufsuchen der Lebergefäße stumpf mittels Watteputzer gelöst. War dies nicht möglich, erfolgte die Adhäsionolyse per Schere. Bei auftretenden Blutungen wurden diese mithilfe der Bipolarpinzette gestillt. Bei den Tieren wurde der bereits vorgelegte Faden aufgesucht und, falls notwendig, atraumatisch vom umliegenden Gewebe gelöst. Die Pfortader wurde ligiert. Da die Ligatur kranial der Abzweigung des kaudalen und rechten lateralen Leberlappens erfolgte, wie in Abbildung 2 dargestellt, wurde somit die portalvenöse Versorgung des medianen und linken Leberlappens unterbunden. Bereits kurz nach der Ligatur wurde ein Abblassen der ligierten Leberlappen deutlich.

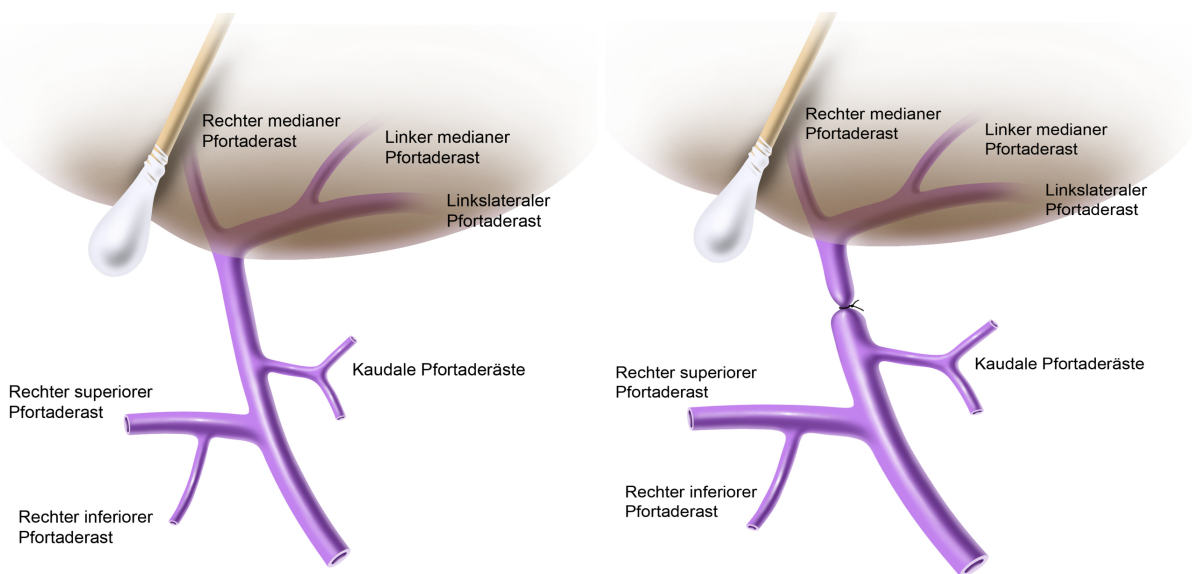


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Pfortadersystems der Ratte vor (links) und nach (rechts) der Pfortaderligatur. Durch die Ligatur kranial des Abgangs des kaudalen Pfortaderastes wurden circa 70% des Lebergewebes portalvenös ligiert. Die Übersicht wurde von Herrn Jens Geiling, Institut für Anatomie I der Friedrich-Schiller-Universität Jena, angefertigt.

Applikation von HGF und THEA Nach der PAL wurde den Tieren der Gruppe 3 HGF und jenen der Gruppe 4 Theaflavin injiziert. Die Applikation erfolgte jeweils in Form einer Injektionslösung in den nicht ligierten Pfortaderast. Somit erreichte die Lösung den Lobus caudatus und Lobus dexter lateralis. Die Dosierung von HGF betrug $200 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ ($63,37 \pm 3,78 \mu\text{g}$) (Rauchfuß 2012). Hergestellt wurde die HGF-Lösung mit rekombinanten humanen HGF (Preprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA) und 0,9% NaCl. Der Wirkstoff wurde zentrifugiert und 1 : 10 mit 0,9% NaCl verdünnt. Die Konzentration betrug somit 0,01 mg/0,1 ml. THEA wurde in einer Dosis von $10 \text{ mg}/\text{kg KG}$ ($3,15 \pm 0,12 \text{ mg}$) injiziert (Cai et al. 2006). Theaflavin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) lag zunächst in pulverisierter Form vor. Das Pulver wurde mit 0,9% NaCl verdünnt, sodass eine Konzentration 1 mg/ml resultierte und anschließend zentrifugiert (EBA-20, Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Beide Lösungen wurden bei 7°C

im Kühlschrank gelagert (profi line, Liebherr, Bulle, Schweiz).

Blutentnahme Für die Blutentnahme wurde die V. cava inferior aufgesucht und zentral der Einmündung der V. renalis mit einer 25 G Mikrokanüle (Sterican[®] Einmalkanüle, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) punktiert. Für laborchemische Zwecke wurden ca. 0,5 ml Blut entnommen und in eine Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Monovette (S-Monovette[®] (1,2 ml), SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) abgefüllt. Die Blutstillung erfolgte per Kompression mithilfe eines Wattetupfers. Das Vorgehen des Bauchdeckenverschlusses entsprach dem des ersten Eingriffs.

Opferung und Gewinnung der Proben Bei der Opferung der Tiere, die 24 h, 48 h, 120 h oder 168 h nach der PAL stattfand, wurden die gleichen präoperativen Maßnahmen wie bei den vorherigen Operationen ergriffen. Unter Vollnarkose erfolgte die Relaparotomie entlang der bestehenden Operationsnarbe. Im Anschluss wurde die Bauchhöhle exploriert und die V. cava inferior aufgesucht. Von dieser wurden ca. 8,0 ml Blut mittels Einmalkanüle (21 G Sterican[®], B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) und Spritze (Injekt[®] 10 ml, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) entnommen. Anschließend wurde das Blut sofort in folgende Monovetten umgefüllt: Serummonovette (1,2 ml), EDTA-Monovette (1,2 ml) und Gerinnungsmonovette (1,4 ml) (S-Monovette[®], SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland).

Die Opferung der Tiere erfolgte somit unter Vollnarkose durch Exsanguination. Für die Gewinnung der histologischen Proben wurde die Leber entnommen. Hierfür wurde diese stumpf von den umliegenden Strukturen gelöst und anschließend entnommen. Nach dem Wiegen der gesamten Leber wurden die nicht ligierten Leberlappen von den ligierten Anteilen mittels Skalpell und Schere getrennt. Folgende Proben wurden zur Analyse verwendet:

- Ribonukleinsäure (RNA)-Proben: Gewebe des Nicht ligierter Leberlappen (NL-LL) und Ligierter Leberlappen (L-LL)
- histologische Proben: Gewebe des NL-LL und L-LL, der Lunge, des Herzens und der Milz
- Blutproben: EDTA-Vollblut, Blutserum und -plasma

4.4 Untersuchungen

In den folgenden Abschnitten werden die durchgeführten Untersuchungen beschrieben.

4.4.1 Lebergewicht und Körpergewicht

Das Gesamtfeuchtgewicht der entnommenen Leber wurde in einer Petrischale mittels Präzisionswaage (PCB 100-3, Kern, Balingen, Deutschland) erfasst, ebenso wie das Feuchtgewicht des ligierten Anteils. Für die Auswertung wurde zum einen der Anteil des nicht ligierten Leberlappens

am Lebergesamtwicht (Wet weight ratio (WWR)) sowie am Körpergewicht berechnet. Darüber hinaus wurde der Anteil des Gesamtlebergewichts am Tiergewicht, die sog. Liver weight to body weight ratio (LWBR), zum Zeitpunkt der Opferung ermittelt. Durch das tägliche Wiegen der Tiere konnte der Gewichtsverlauf postoperativ nachvollzogen werden.

4.4.2 Laborchemische Untersuchungen

Das EDTA-Vollblut wurde mit dem Hämatologiegerät (Scil vet abc, scil animal care company, Viernheim, Deutschland) analysiert und ein Blutbild erstellt, wobei folgende Parameter untersucht wurden: Leukozyten, Erythrozyten, Hämatokrit, MCH, MCV, MCHC, Thrombozyten. Für die klinisch-chemische Blutanalyse wurde das Blut zehn Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (8EBA-20, Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland), um eine Trennung des Plasmas bzw. Serums von den Blutzellen zu erzielen. Anschließend wurde das Plasma bzw. Serum abpipettiert und nach einer kurzen Konservierung in Stickstoff bei -80°C (MDF-U74VC Biomedical freezer, VIP serie, Sanyo, Osaka, Japan) gelagert. Bei den am Institut für klinische Chemie des UKJ im Serum untersuchten Parametern handelte es sich um: Gesamtbilirubin, direktes Bilirubin, AP, Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Cholinesterase, Albumin und Kreatinin.

4.4.3 Histologie

Zur histologischen Untersuchung wurde jeweils Gewebe der ligierten und nicht ligierten Leberlappen entnommen. Dieses wurde in Histokassetten (Einbettkassette, Kartell Spa, Noviglio, Italien) in Formaldehyd (5 % gepuffert, Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) fixiert und bei 7°C gelagert. Danach wurden die Proben in Paraffin eingebettet und anschließend mit einem Rotationsmikrotom (HM 355S, MICROM International, Walldorf, Deutschland) $3 - 5 \mu\text{m}$ dünne Schnitte angefertigt.

Mit einem digitalen Scanner für histologische Bilder (Nano Zoomer 2.0-HT, Nano Zoomer Digital Pathology, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland) wurden die angefertigten histologischen Schnitte gescannt. Anschließend wurden diese digitalen Bilder mit Hilfe des Histologie Analyse Programms NDP.view2 (Nano Zoomer Digital Pathology, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee) untersucht und ausgewertet.

Für die Analyse der Nekrose- und Fibroseentwicklung wurde das histologische Analyseprogramm Histokat (Fraunhofer MEVIS, Bremen, Deutschland) verwendet. Dieses Programm kann durch einen zuvor adaptierten Algorithmus unterschiedliche Strukturen in einem histologischen Schnitt detektieren (Homeyer et al. 2013). Für die Etablierung des Algorithmus wurden in ca. zehn Schnitten manuell die zu analysierenden Strukturen markiert. Auf dieser Grundlage wurde der Anteil der relevanten Strukturen, in diesem Fall des Bindegewebes bzw. der Nekrose, am Gesamtschnitt berechnet.

HE-Färbung Die zunächst durchgeführte Hämatoxylin Eosin (HE)-Färbung diente als Übersichtsfärbung und zur Analyse der Gallengänge sowie zur Quantifizierung der Nekroseareale. Bei der HE-Färbung werden saure Strukturen, beispielsweise die Nukleinsäuren der DNA im Zellkern, durch die Bindung von Hämatoxylin dunkel und basische Zellbestandteile, wie das Zytoplasma, rötlich dargestellt. Die Färbung wurde per Hand in gängiger Form durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Um die Anzahl der Gallengänge zu quantifizieren, wurden zufällig fünf ähnlich große Portalfelder pro Schnitt ausgewählt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde bei einer 20-fachen Vergrößerung auf die jeweiligen Portalfelder ein Rechteck mit einer Größe von $0,1 \text{ mm}^2$ ($280 \times 357 \mu\text{m}$) projiziert. Somit wurde sichergestellt, dass die Portalfelder in ihrer Ausdehnung übereinstimmen. Anschließend wurden die Gallengänge pro Portalfeld gezählt, wobei als Kriterium für die Berücksichtigung ein Lumen sichtbar sein musste. Aus der Anzahl der Gallengänge pro Portalfeld wurde der Mittelwert und die Standardabweichung pro histologischen Schnitt berechnet. Auch zur Untersuchung der Nekroseentwicklung wurden die HE-gefärbten Schnitte verwendet und mithilfe von Histokat (Fraunhofer MEVIS, Bremen, Deutschland) der Anteil der Nekrose am Gesamtschnitt berechnet.

Reagenz	Hersteller
Xylol	Klinikumsapotheke, UKJ, Deutschland
Ethanol 100 %, 90 %, 70 %	Klinikumsapotheke, UKJ, Deutschland
Aqua destillata	Institut für experimentelle Transplantationschirurgie, UKJ, Deutschland
Hämatoxylin sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin Y Solution Alcoholic	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Eindeckmedium	Leica, Nussloch, Deutschland

Tabelle 2: Auflistung der für die HE-Färbung verwendeten Reagenzien.

EvG-Färbung Die Elastica-van-Gieson (EvG)-Färbung erfolgte per Hand und diente der Darstellung von Bindegewebe. Hier konnte die Fibroseentwicklung quantifiziert werden. Diese Färbung führt zu einer roten Darstellung von Kollagenfasern. Die Zellkerne werden dabei dunkel gefärbt, das Zytoplasma erscheint gelb.

Die Objektträger wurden bei 59°C vorbehandelt und die Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe und Xylol entparaffiniert. Abschließend wurden die Objektträger mit Leitungswasser und Aqua destillata (Aqua dest.) gespült. Als nächster Schritt wurde die Resorcinfuchsinlösung, welche elektrostatisch und über Grenzflächendispersion an Elastin und Fibrillin bindet, zugegeben und mit 96 % Alkohol bzw. Aqua dest. gespült. Durch die Verwendung von Hämalaun wurden nun die Zellkerne farblich dargestellt. Nach einer weiteren Spülung mit Leitungswasser und Aqua dest. folgte der letzte Färbeschritt mit Van-Gieson-Gemisch, welches Pikrofuchsin enthält und zur klassischen Rotfärbung der Kollagenfasern führt. Am Ende erfolgte mittels Aqua dest. und einer aufsteigender Alkoholreihe die Entwässerung.

Da für jedes Tier pro Leberlappen zwei histologische Schnitte angefertigt wurden, wurde der

Schnitt mit der besseren Färbe- und Aufnahmequalität für die Auswertung ausgewählt und mit dem Programm Histokat (Fraunhofer MEVIS, Bremen, Deutschland) analysiert. Auf diese Weise wurde der Anteil der rot gefärbten Kollagenfasern am Gesamtschnitt ermittelt.

Reagenz	Hersteller
Xylol (zweifach destilliert)	Institut für Pathologie, UKJ, Deutschland
Ethanol (100 %, 90 %, 70 %)	Institut für Pathologie, UKJ, Deutschland
Aqua dest.	Institut für experimentelle Transplantationschirurgie, UKJ, Deutschland
Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert 500 ml	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Van Gieson Farbstofflösung 500 ml	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
Eindeckmedium (LEICA CV Mount Zytologie)	Leica, Nussloch, Deutschland

Tabelle 3: Auflistung der für die EvG-Färbung verwendeten Reagenzien.

ASDCL-Färbung Um die Infiltration des Lebergewebes mit neutrophilen Granulozyten zu analysieren, kam die Naphtol-AS-D-Chloracetat-Esterase (ASDCL)-Färbung zum Einsatz. Im Rahmen dieser Färbemethode entsteht durch die enzymatische Hydrolyse von Naphthol-AS-D-Chloracetat (NASDC), ausgelöst durch die NASDC-Esterase, eine Naphtholverbindung. An diese bindet ein Diazoniumsalz, wodurch ein wasserunlöslicher Azofarbstoff entsteht und das Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten rot färbt.

Für die Herstellung der histologischen Schnitte wurden diese zur Entparaffinierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt und anschließend mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Um die Schnitte zu färben, mussten zwei Färbelösungen hergestellt und vermischt werden, wobei die eine aus jeweils einem Tropfen Pararosanilin und Natriumnitrit (NaNO_2) sowie 30 ml Michaelispuffer bestand. Die andere Lösung setzte sich aus 10 mg NASDC und 1,0 ml Dimethylformamid zusammen. Das Lösungsgemisch wurde in eine, die entparaffinierten Proben enthaltende, Küvette überführt und für 30 min ruhen gelassen. Danach wurden die Schnitte unter Leitungswasser und mit Aqua dest. gespült. Für die Kernfärbung wurde Hämatoxylin verwendet und die Schnitte in Leitungswasser für ca. 15 min gebläut. Abschließend wurden die Schnitte in Glyceringelatine eingebettet.

Auch bei der ASDCL-Färbung wurden für jedes Tier pro Leberlappen, ligiert und nicht ligiert, jeweils zwei histologische Schnitte angefertigt und für die Auswertung der Scan mit der besseren Qualität und der homogeneren Gewebestruktur ausgewählt. Zur Quantifizierung der Leukozyten wurden pro Schnitt fünf Portalfelder ausgewählt, die in ihrer Ausdehnung weitestgehend kongruierten. Anschließend wurde über die jeweiligen Portalfelder ein $0,1 \text{ mm}^2$ großes Rechteck projiziert, um einen standardisierten Bildausschnitt zu erhalten. Stellten sich Strukturen deutlich rot gefärbt und mit einem differenzierbaren Zellkern dar, wurden diese als Leukozyten gewertet. Rot gefärbte Zellen, die intravasal lokalisiert waren, wurden in der Analyse nicht berücksichtigt. Weiterhin erfolgte eine Differenzierung zwischen portaler und periportal Lokalisation der Zellen. Befanden sich die Zellen in dem, das Portalfeld umgebenden, Parenchym wurden sie als

Reagenz	Hersteller
Xylol	Institut für Pathologie, UKJ, Deutschland
Ethanol (100 %, 90 %, 70 %)	Institut für Pathologie, UKJ, Deutschland
Aqua dest.	Institut für experimentelle Transplantationschirurgie, UKJ, Deutschland
Michelis Puffer	Klinikumsapotheke, UKJ, Deutschland
Natriumnitrit NaNO ₂	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Pararosanilin	Merck, Darmstadt, Deutschland
NASDC	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium (Glyceringelatine)	Leica, Nussloch, Deutschland

Tabelle 4: Auflistung der für die ASDCL-Färbung verwendeten Reagenzien.

periportal eingestuft. Leukozyten, welche sich im Bindegewebe des Portalfeldes befanden, wurden zur portalen Fraktion gerechnet.

Der Grad der Infiltration des peripheren Lebergewebes, also des Hepatozytenverbands bzw. der Läppchenperipherie, wurde durch die zufällige Auswahl von zehn, ebenfalls 0,1 mm² großen, rechteckigen Regionen analysiert (Gujral et al. 2004). Diese werden im Folgenden als Field of interest (FOI) bezeichnet. Auch hier wurden rot gefärbte Zellen, welche sich innerhalb des umschriebenen Bereichs befanden und mit einem Zellkern assoziiert waren, gezählt.

Aus der Anzahl der Leukozyten, die in der jeweiligen Fraktion (portal, periportal und Läppchenperipherie) erfasst wurde, wurde pro Gruppe und Zeitpunkt der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

4.5 Statistik

Für die statistische Analyse der erhobenen Daten sowie deren Darstellung in Diagrammen wurde Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) verwendet. Die angegebenen Datenwerte werden als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) dargestellt.

5 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der erfolgten Untersuchungen dargestellt. Dabei werden die Gruppen wie folgt bezeichnet: Gruppe 1 (PAL), Gruppe 2 (BDL), Gruppe 3 (HGF) und Gruppe 4 (THEA).

5.1 Tiere in Auswertung

Von den ursprünglich 74 operierten Tieren verstarben drei während des Experiments. Dies war auf operationstechnische Fehler zurückzuführen, wie der Verursachung eines Pneumothorax, einer postoperativen Magenperforation sowie einer unstillbaren Blutung aus der V. cava. Bei acht Tieren traten Komplikationen auf. Diese manifestierten sich als eine Pankreatitis oder gallige Peritonitis. Somit wurden insgesamt 63 männliche Lewis-Ratten in die Auswertung aufgenommen. In Gruppe 1 (PAL), Gruppe 2 (BDL) und Gruppe 4 (THEA) wurden jeweils Daten von 16 Tieren und in Gruppe 3 (HGF) von 15 Tieren ausgewertet.

5.2 Körpergewicht und Leberfeuchtgewicht

Im Weiteren werden die Veränderungen des Körper- und Lebergewichts der Tiere beschrieben. Die Ratten wurden während des Experiments täglich gewogen. Das Körpergewicht der Tiere wurde nach der BDL und PAL separat betrachtet.

5.2.1 Körpergewicht

Als Ausgangsgewicht wurde das Gewicht der Tiere am Tag der ersten Operation (0. POD) festgesetzt. Der Mittelwert des Ausgangsgewichts der Lewis-Ratten betrug $260,11 \pm 6,13$ g.

Gewicht nach BDL Nach dem ersten operativen Eingriff, der Gallengangsligatur, reduzierte sich zunächst das Körpergewicht der Tiere. Das Minimum lag dabei zwischen dem 2. POD und 3. POD vor. Das Ausgangsgewicht wurde zwischen dem 8. POD und 9. POD erreicht. Ab diesem Zeitpunkt nahm das Körpergewicht der Tiere bei allen Gruppen kontinuierlich bis zur zweiten Operation zu. Die Mittelwerte der Tiergewichte und deren SD sind in Tabelle 5 zusammengefasst und der Gewichtsverlauf der Gruppen 2, 3 und 4 nach der BDL in Abbildung 3 dargestellt.

Zeit POD	BDL (2)			HGF (3)				THEA (4)			
	MW	± SD	%	MW	± SD	%	MW	± SD	MW	± SD	%
0	260,59	± 6,35		266,73	± 11,01		250,19	± 8,61			
2	229,81	± 7,06	-11,81	238,40	± 10,35	-10,62	222,31	± 6,40	-11,14		
4	237,06	± 10,93	-9,03	238,47	± 10,89	-10,60	224,31	± 7,96	-10,34		
6	252,69	± 12,58	-3,03	252,60	± 11,63	-5,30	235,88	± 9,82	-5,72		
8	265,00	± 11,97	1,69	263,93	± 11,57	-1,05	245,81	± 14,94	-1,75		
10	276,56	± 12,03	6,13	271,73	± 12,86	1,87	257,44	± 11,65	2,90		
12	288,44	± 14,20	10,69	281,53	± 14,17	5,55	265,75	± 11,89	6,22		
14	298,38	± 14,15	14,50	287,07	± 15,00	7,62	274,63	± 9,52	9,77		
16	306,06	± 12,45	17,45	294,00	± 14,80	10,22	280,56	± 9,33	12,14		
18	314,56	± 16,03	20,71	299,93	± 15,00	12,45	285,31	± 8,04	14,04		
20	323,25	± 17,33	24,05	306,07	± 15,98	14,75	288,13	± 11,87	15,16		
22	330,31	± 17,22	26,76	311,27	± 17,21	16,70	296,44	± 9,84	18,49		
24	332,81	± 16,46	27,72	315,20	± 18,13	18,17	303,81	± 10,94	21,43		
26	338,38	± 16,27	29,85	331,50	± 17,50	24,28	309,31	± 11,30	23,63		

Tabelle 5: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Tiergewichte im Verlauf des Beobachtungszeitraums nach BDL in Gramm sowie die relative Gewichtsveränderung Prozent. Für eine bessere Übersicht sind lediglich die Werte jedes zweiten postoperativen Tages (POD) aufgetragen.

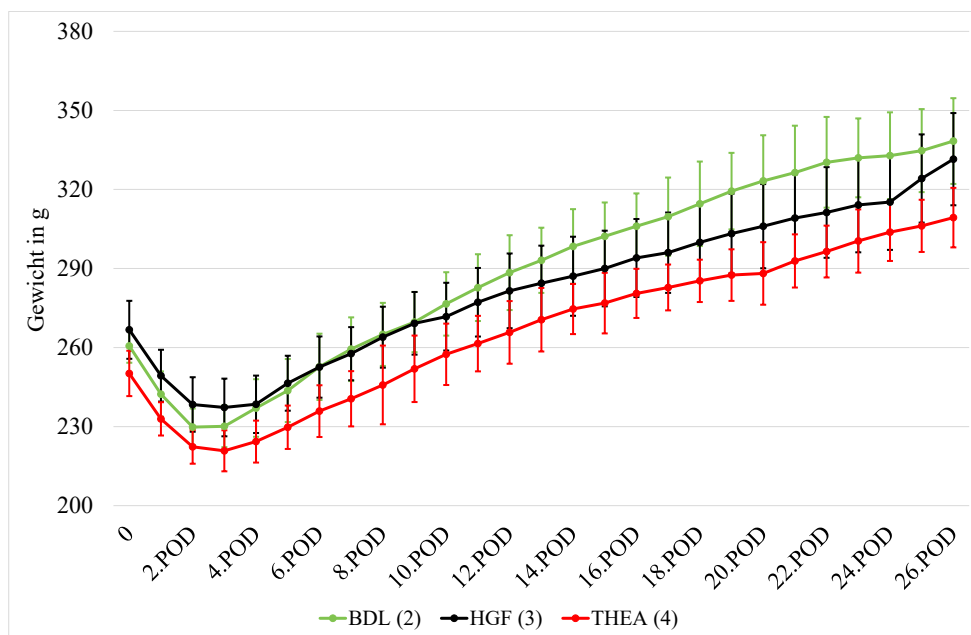


Abbildung 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Tiergewichte im Verlauf des Beobachtungszeitraums nach BDL in Gramm.

Gewicht nach PAL Die Pfortaderligatur wurde bei allen Tieren vorgenommen. Auch nach diesem Eingriff erfolgte zunächst ein Gewichtsverlust der Tiere von maximal $10,09 \pm 2,94\%$ in Gruppe 1 (3. POD), $9,05 \pm 1,14\%$ in Gruppe 2 (2. POD), $7,13 \pm 1,48\%$ (3. POD) in Gruppe 3 und $7,36 \pm 1,74\%$ in Gruppe 4 (2. POD). Der größte Gewichtsverlust war somit in Gruppe 1 zu beobachten. Im Anschluss zeigte sich ein gegenläufiger Trend mit einem Anstieg des

Körpergewichts, wobei nur die Tiere der Gruppe 1 am 7. POD ihr Ausgangsgewicht wieder erreichten. Tabelle 6 fasst die Mittelwerte der Tiergewichte und deren SD zusammen, Abbildung 4 skizziert die Gewichtsschwankungen der Tiere nach erfolgter PAL.

Zeit POD	PAL (1)				BDL (2)				HGF (3)				THEA (4)			
	MW	±	SD	%	MW	±	SD	MW	MW	±	SD	MW	MW	±	SD	MW
0	262,94	±	8,09		343,06	±	17,32		316,87	±	18,89		315,31	±	11,99	
1	242,50	±	7,32	-7,77	327,69	±	14,82	-4,48	297,80	±	18,63	-6,02	300,56	±	10,65	-4,68
2	231,58	±	9,81	-11,92	314,83	±	14,17	-8,23	291,50	±	17,04	-8,01	287,33	±	11,88	-8,87
3	231,00	±	9,73	-12,15	315,56	±	14,17	-8,02	290,38	±	18,67	-8,36	288,13	±	7,47	-8,62
4	239,75	±	10,01	-8,82	317,25	±	13,65	-7,52	291,75	±	17,68	-7,93	289,50	±	6,40	-8,19
5	249,88	±	10,43	-4,97	318,71	±	12,45	-7,10	296,88	±	15,60	-6,31	295,50	±	6,44	-6,28
6	262,00	±	9,19	-0,36	315,75	±	12,75	-7,96	304,25	±	15,88	-3,98	296,00	±	5,61	-6,12
7	269,25	±	8,67	2,40					306,25	±	15,45	-3,35	300,50	±	6,73	-4,70

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Tiergewichte im Verlauf des Beobachtungszeitraums nach PAL in Gramm sowie die relative Gewichtsveränderung in Prozent.

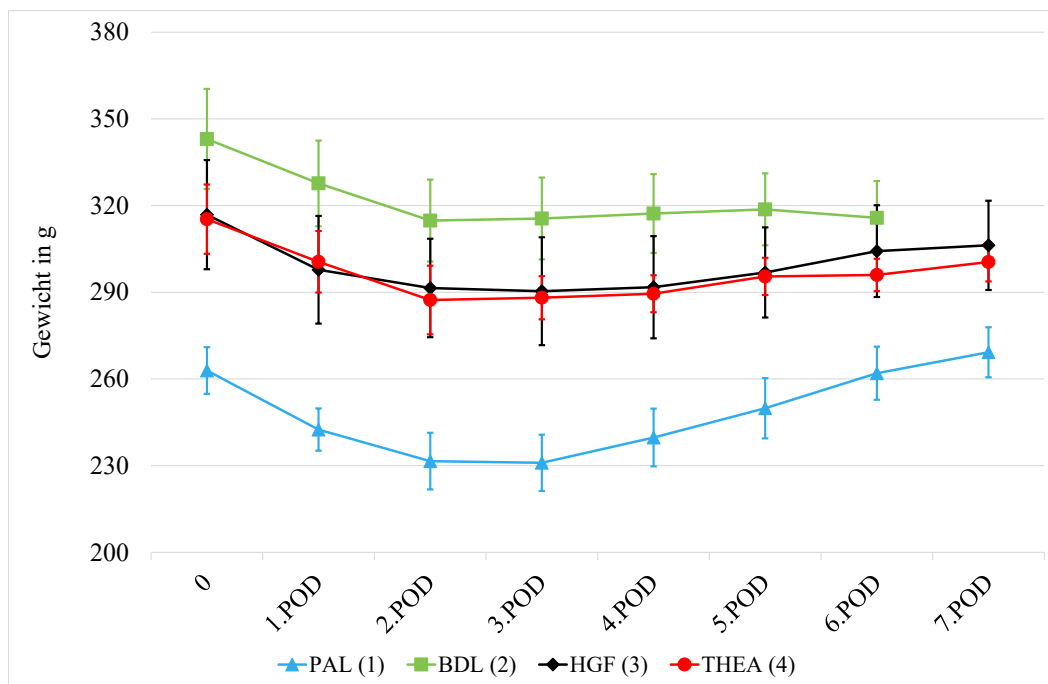


Abbildung 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Tiergewichte im Verlauf des Beobachtungszeitraums nach PAL in Gramm.

5.2.2 Leberfeuchtgewicht

Gesamtlebergewicht Nach der Entnahme der Leber bei der Opfierung der Tiere wurde das Leberfeuchtgewicht bestimmt. Anhand des Lebergewichts wurde unter anderem das Ausmaß der Hepatozytenproliferation quantifiziert. In allen Gruppen ließ sich dabei ein Anstieg des Gesamtleberfeuchtgewichts verzeichnen. In Gruppe 2 wurde das maximale Lebergewicht nach 48 h, in Gruppe 1 und Gruppe 4 nach 120 h und in Gruppe 3 nach 168 h erreicht (siehe Tabelle 7). Mit $13,96 \pm 0,50$ g (168 h) wies die HGF-Gruppe das höchste Lebergewicht auf. Der Verlauf des

Gesamtleberfeuchtgewichts der jeweiligen Gruppe in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Pfortaderligatur ist in Abbildung 5 dargestellt.

Zeit h	PAL (1)			BDL (2)			HGF (3)			THEA (4)		
	g			g			g			g		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	10,79	±	1,07	13,53	±	4,29	12,78	±	1,32	11,72	±	1,39
48	10,98	±	0,78	14,85	±	0,29	13,11	±	0,41	11,06	±	1,07
120	12,14	±	1,36	13,59	±	0,46	13,77	±	1,08	12,87	±	1,80
168	11,87	±	0,57	13,59	±	1,31	13,96	±	0,50	12,26	±	1,10

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtleberfeuchtgewichts im Verlauf des Beobachtungszeitraums in Gramm.

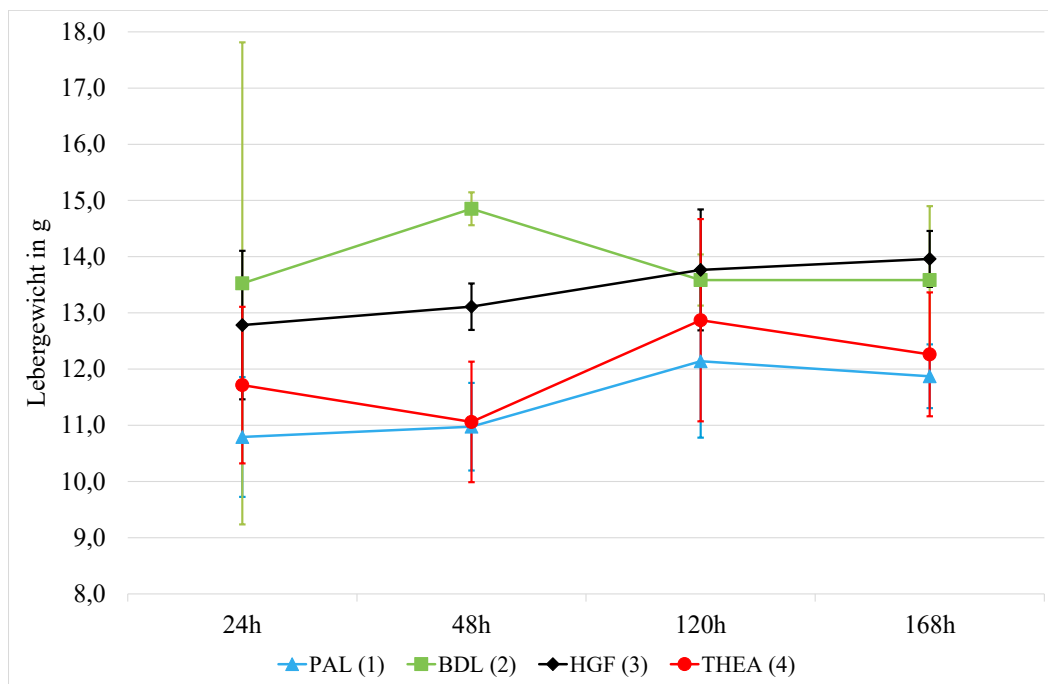


Abbildung 5: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtleberfeuchtgewichts im Verlauf des Beobachtungszeitraums in Gramm.

Liver weight to body weight ratio (LWBR) Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu erlangen, wurde das Lebergesamtwicht auf das jeweilige Körpergewicht der Tiere am Tag der Opferung bezogen und somit die sogenannte liver weight to body weight ratio (LWBR) berechnet. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 8 zusammengefasst und in Abbildung 6 der Verlauf grafisch skizziert.

Bei der Betrachtung des Lebergewichtanteils am Gesamtkörpergewicht zeigte sich die stärkste Zunahme in Gruppe 1 (PAL) nach 120 h um $4,93 \pm 0,72\%$. Die Gruppen 3 (HGF) und 4 (THEA) wiesen nach jeweils 120 h einen Leberanteil von $4,72 \pm 0,38\%$ bzw. $4,33 \pm 0,62\%$ auf. Der zeitliche Verlauf der LWBR dieser drei Gruppen war dabei ähnlich. Bis 120 h wuchs die

LWBR an, fiel jedoch im Anschluss wieder ab. In Gruppe 2 lag der geringste Anteilszuwachs mit $4,30 \pm 0,34\%$ nach 168 h vor, wobei in dieser Gruppe ein alternierender LWBR-Verlauf festzustellen war.

Zeit h	PAL (1) %			BDL (2) %			HGF (3) %			THEA (4) %		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	4,42	±	0,49	4,17	±	1,19	4,34	±	0,63	3,72	±	0,43
48	4,58	±	0,44	4,75	±	0,23	4,41	±	0,28	3,86	±	0,23
120	4,93	±	0,72	4,16	±	0,26	4,72	±	0,38	4,33	±	0,62
168	4,42	±	0,29	4,30	±	0,34	4,56	±	0,10	4,08	±	0,31

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen des Verhältnisses vom Gesamtleberfeuchtgewicht zum Körpergewicht (LWBR) im Verlauf des Beobachtungszeitraums in Prozent.

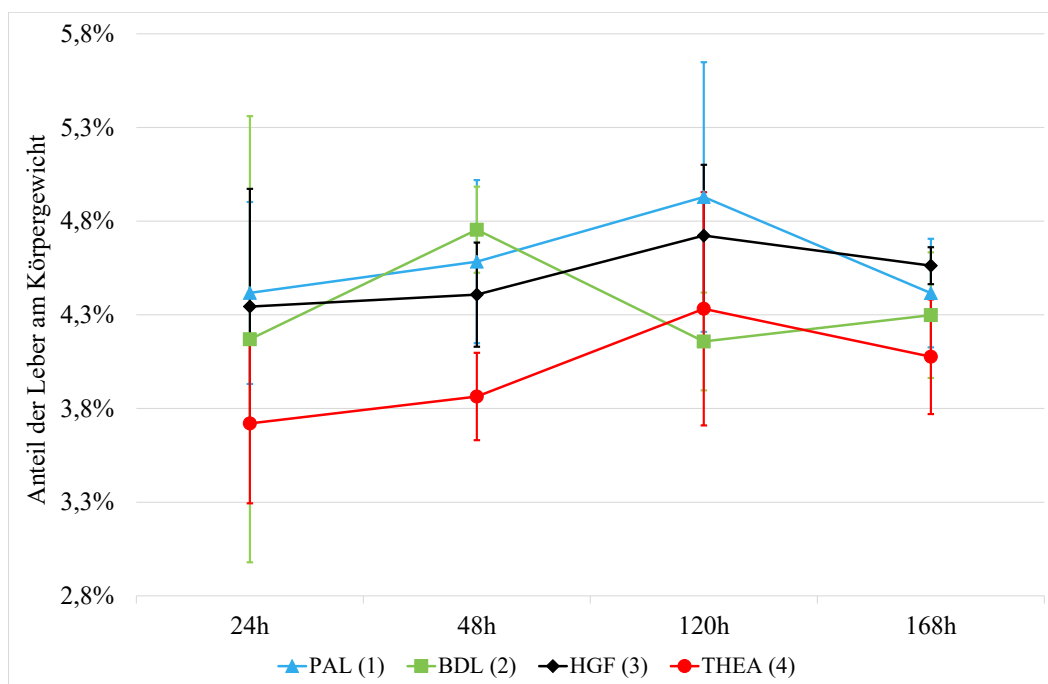


Abbildung 6: Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils des Gesamtleberfeuchtgewichts am Körpergewicht (KG), sogenannte LWBR, in Prozent.

Wet weight ratio (WWR) Die Berechnung des Anteils des nicht ligierten Leberlappens am Gesamtlebergewicht, auch als WWR bezeichnet, lässt Rückschlüsse auf das Hypertrophieausmaß des NL-LL zu. In den Gruppen 1, 3 und 4 wurde hierbei eine Zunahme im Verlauf des Beobachtungszeitraums registriert (siehe Abbildung 7 und Tabelle 9). In Gruppe 2 kam es hingegen zwischen 24 h und 48 h zu einem deutlichen Verlust. Zwar stieg die WWR nach 48 h wieder an, blieb jedoch merklich unter den Werten der anderen Gruppen. Die maximale WWR wurde durch Gruppe 4 mit $53,2 \pm 13,7\%$ nach 120 h erreicht. In Gruppe 2 betrug der größ-

te NL-LL-Anteil $48,6 \pm 7,3\%$ (48 h), in Gruppe 1 $45,1 \pm 9,4\%$ (168 h) und $42,1 \pm 6,7\%$ in Gruppe 3 (168 h).

Zeit h	PAL (1) %			BDL (2) %			HGF (3) %			THEA (4) %		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	29,70	±	1,53	48,65	±	7,28	28,88	±	4,25	43,51	±	2,52
48	35,94	±	4,24	23,12	±	1,76	30,24	±	1,72	43,14	±	6,10
120	42,17	±	10,00	28,22	±	0,85	39,17	±	4,29	53,20	±	13,75
168	45,08	±	9,44	27,31	±	3,47	42,08	±	6,68	49,34	±	10,29

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichtsverhältnisses des NL-LL und Gesamtleberfeuchtgewicht (WWR) im Verlauf des Beobachtungszeitraums in Prozent.

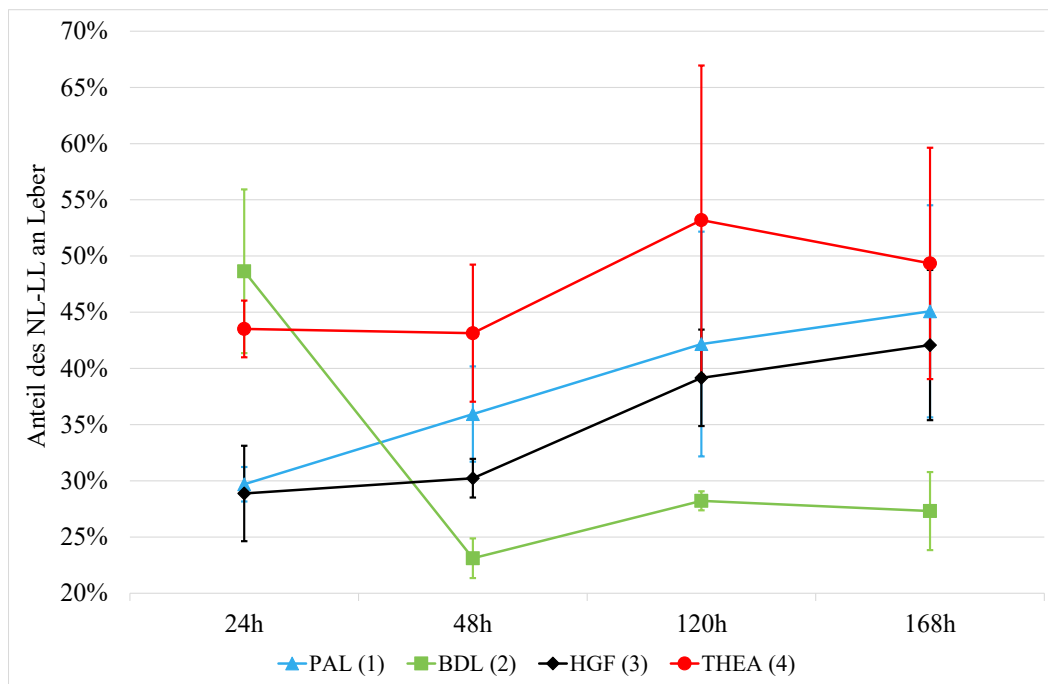


Abbildung 7: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichtsanteils des NL-LL am Gesamtleberfeuchtgewicht (WWR) im Verlauf des Beobachtungszeitraums in Prozent.

Ligierter Leberlappen Um die Auswirkung der PAL auf den ligierten Leberlappen darzustellen, wurde dessen Anteil am Gesamtlebergewicht berechnet. In Abbildung 8 ist der Verlauf des L-LL-Anteils am Lebergewicht skizziert, in Tabelle 10 die zugehörigen Werte zusammengefasst. In Gruppe 1 und 3 zeigte sich dabei eine über den Beobachtungszeitraum kontinuierliche Abnahme des Anteils des ligierten Leberlappens. Ein ähnlicher Trend war auch in Gruppe 4 erkennbar. Ab 120 h kam es abermals zu einem Anstieg, wobei der 24 h-Wert allerdings nicht wieder erreicht wurde. Einen abweichenden Verlauf wies Gruppe 2 auf. Bei dieser kam es zu einem Anstieg nach 24 h. Dieser hohe Anteil am Lebergewicht konnte bis 168 h postoperativ beobachtet werden.

Zeit h	PAL (1) %			BDL (2) %			HGF (3) %			THEA (4) %		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	70,3	±	1,5	51,4	±	7,3	71,1	±	4,2	56,5	±	2,5
48	64,1	±	4,2	76,9	±	1,8	69,8	±	1,7	56,9	±	6,1
120	57,8	±	10,0	71,8	±	0,8	60,8	±	4,3	46,8	±	13,7
168	54,9	±	9,4	72,7	±	3,5	57,9	±	6,7	50,7	±	10,3

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichtsverhältnisses vom ligierten Leberlappen zum Gesamtlebergewicht in Prozent im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

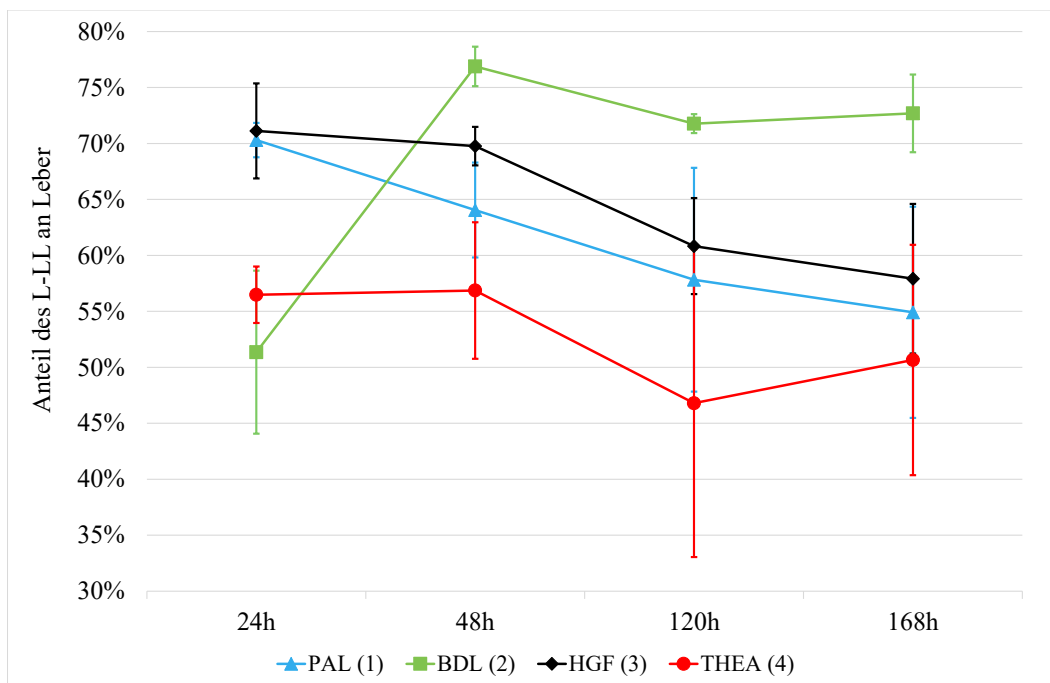


Abbildung 8: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichtsanteils des L-LL am Gesamtleberfeuchtgewicht im Verlauf des Beobachtungszeitraums in Prozent.

5.3 Laborchemische Untersuchungen

Für die Untersuchung der Leberfunktion, der Cholestaseparameter und der Inflammation wurde den Tieren bei der PAL und nochmals bei der Opferung Blut aus der V. cava inferior entnommen und anschließend laborchemisch untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

5.3.1 Cholestaseparameter

Um das Vorliegen und den Grad der Cholestase zu untersuchen, wurde die Konzentration des Gesamtbilirubins und direkten Bilirubins sowie der alkalischen Phosphatase (AP) im Blutserum bestimmt. Bei der ersten Blutentnahme vor der PAL zeigte sich bei den gallengangligierten Tieren gegenüber der Gruppe 1 erhöhte Werte, sowohl beim Gesamtbilirubin als auch beim

direkten Bilirubin. Im Vergleich zu den Werten vor der PAL wurde bei fast allen Gruppen ein postoperativer Anstieg der Cholestaseparameter festgestellt, wobei die Maxima zwischen 24 h und 48 h erreicht wurden. Lediglich die Gesamtbilirubinwerte von Gruppe 2 stiegen nach der PAL nicht an. Im Allgemeinen lässt sich ein Abwärtstrend der Bilirubinwerte in allen Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 168 h feststellen. Zwischenzeitlich zeigten sich dabei leichte Schwankungen. Unter THEA-Gabe zeichneten sich geringere Gesamtbilirubinwerte als in den anderen Gruppen ab. Tabelle 11 und 12 zeigen die gemessenen Bilirubinwerte. In Abbildung 9 bzw. 10 wird deren zeitliche Entwicklung grafisch skizziert.

Zeit h	PAL (1) $\mu\text{mol/l}$		BDL (2) $\mu\text{mol/l}$		HGF (3) $\mu\text{mol/l}$		THEA (4) $\mu\text{mol/l}$	
	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
vor PAL	1,88	\pm 1,58	2,15	\pm 1,25	3,33	\pm 2,09	1,08	\pm 0,49
24	3,00	\pm 1,00	1,75	\pm 0,43	3,67	\pm 1,70	2,00	\pm 0,00
48	3,00	\pm 1,22	2,00	\pm 0,71	1,75	\pm 0,83	1,25	\pm 0,43
120	1,75	\pm 0,43	2,00	\pm 0,00	2,00	\pm 0,71	1,25	\pm 0,43
168	1,75	\pm 0,43	1,67	\pm 0,47	2,00	\pm 0,00	1,25	\pm 0,43

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtbilirubins in $\mu\text{mol/l}$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

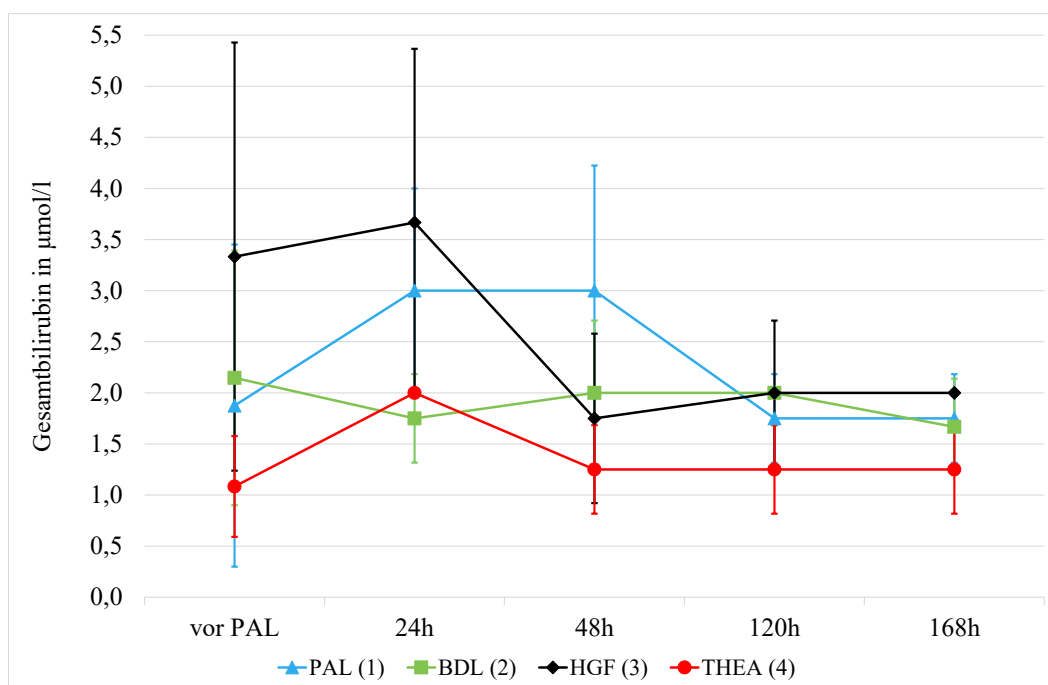


Abbildung 9: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtbilirubins in $\mu\text{mol/l}$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

Zeit h	PAL (1) $\mu\text{mol/l}$		BDL (2) $\mu\text{mol/l}$		HGF (3) $\mu\text{mol/l}$		THEA (4) $\mu\text{mol/l}$	
	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
vor PAL	0,96	\pm 0,41	1,71	\pm 1,08	1,57	\pm 0,66	1,02	\pm 0,25
24	1,73	\pm 0,79	1,38	\pm 0,22	2,50	\pm 0,94	1,70	\pm 0,14
48	1,58	\pm 0,77	1,55	\pm 0,59	1,43	\pm 0,29	1,10	\pm 0,12
120	0,70	\pm 0,29	1,00	\pm 0,25	1,20	\pm 0,24	1,13	\pm 0,08
168	0,60	\pm 0,28	0,78	\pm 0,16	1,08	\pm 0,18	0,88	\pm 0,13

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen des direkten Bilirubins in $\mu\text{mol/l}$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

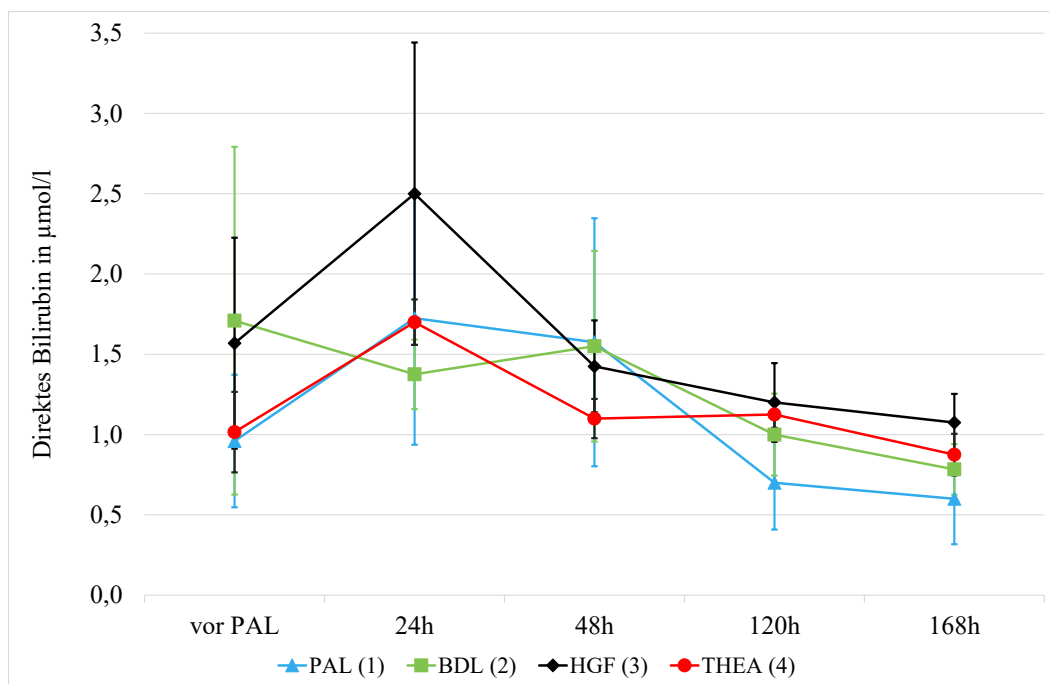


Abbildung 10: Mittelwerte und Standardabweichungen des direkten Bilirubins in $\mu\text{mol/l}$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

AP Betrachtet man den Verlauf der alkalischen Phosphatase vor der Pfortaderligatur, wird in der Gruppe 1 ein gegenüber den anderen Gruppen erhöhter Wert deutlich.

Nach erfolgter Pfortaderligatur zeigte sich in allen Gruppen ein stetiger Anstieg der AP, nur in Gruppe 3 kam es nach 168 h zu einem leichten Rückgang.

Die beschriebenen Daten sind in Tabelle 13 dargestellt, der zeitliche Verlauf in Abbildung 11.

Zeit h	PAL (1) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$			BDL (2) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$			HGF (3) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$			THEA (4) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$		
	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
vor PAL	6,71	\pm	0,29	3,77	\pm	0,49	4,84	\pm	0,60	4,52	\pm	0,40
24	4,06	\pm	0,33	2,35	\pm	1,02	2,17	\pm	0,25	1,98	\pm	0,16
48	4,36	\pm	0,43	2,62	\pm	0,41	2,30	\pm	0,37	2,38	\pm	0,43
120	4,60	\pm	0,53	3,33	\pm	0,43	4,07	\pm	0,70	3,38	\pm	0,19
168	5,06	\pm	0,26	3,71	\pm	0,41	3,80	\pm	0,17	3,64	\pm	0,54

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der alkalischen Phosphatase in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

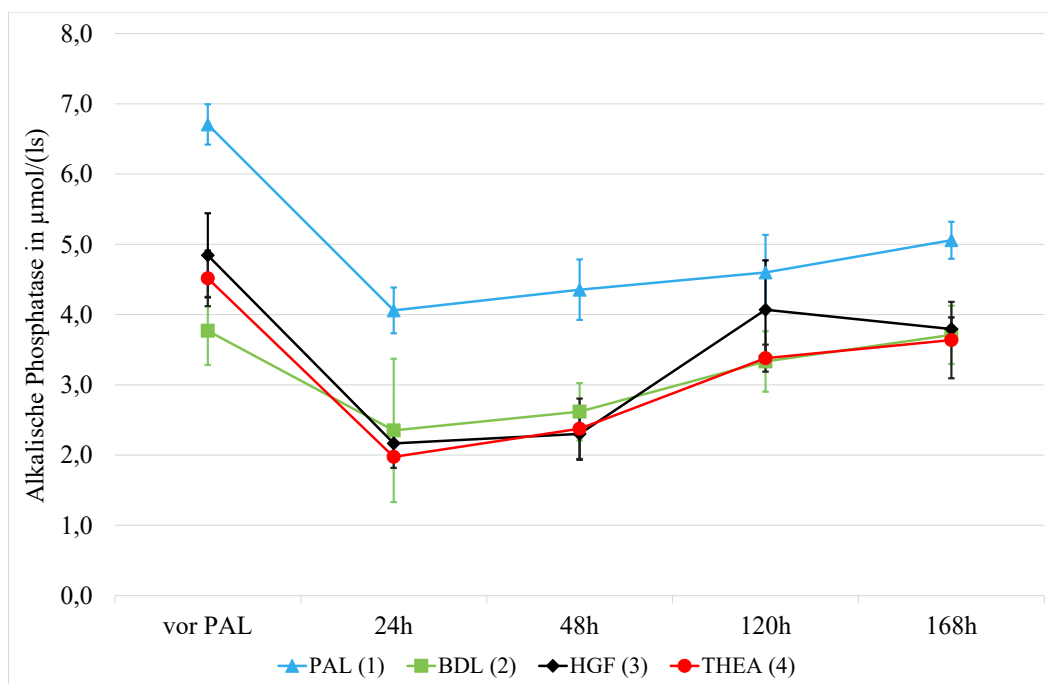


Abbildung 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der alkalischen Phosphatase in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

5.3.2 Leberzellschädigung

Die Aktivität der ALAT und ASAT wurden zur Untersuchung der Leberzellschädigung bestimmt. Diese Enzyme sind in den Leberzellen lokalisiert und werden bei Schädigung dieser freigesetzt. ALAT gilt dabei als leberspezifisch, da es in den Hepatozyten in deutlich erhöhter Konzentration vorliegt. Die Aktivität der ASAT und ALAT wird in Tabelle 14 und 15 zusammengefasst und ihr zeitlicher Verlauf in Abbildung 12 und 13 aufgezeigt.

ALAT Vor der Pfortaderligatur unterschied sich die Aktivität der ALAT der Gruppe 1 kaum von jener der anderen Gruppen, bei denen eine chronische Cholestase vorlag. Infolge des zweiten Eingriffs, der Pfortaderligatur, stellte sich in allen Gruppen zunächst eine deutliche Zunahme der

ALAT-Aktivität ein. Diese Erhöhung um das 25-Fache in Gruppe 1, das 2,43-Fache in Gruppe 2 und das 1,36-Fache in Gruppe 3 trat bereits nach 24 h auf. In Gruppe 4 erhöhte sich die ALAT nach 48 h um maximal das 2,17-Fache.

Zeit h	PAL (1) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$			BDL (2) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$			HGF (3) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$			THEA (4) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$		
	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
vor PAL	2,11	\pm	1,08	2,17	\pm	1,32	2,82	\pm	1,18	1,59	\pm	0,75
24	53,67	\pm	10,88	5,28	\pm	5,59	3,83	\pm	0,98	2,51	\pm	0,65
48	8,69	\pm	5,53	0,71	\pm	0,22	0,79	\pm	0,33	3,45	\pm	2,92
120	0,87	\pm	0,14	0,58	\pm	0,37	0,54	\pm	0,26	0,70	\pm	0,31
168	0,96	\pm	0,62	0,75	\pm	0,29	0,55	\pm	0,13	1,05	\pm	0,55

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Alanin-Aminotransferase (ALAT) in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

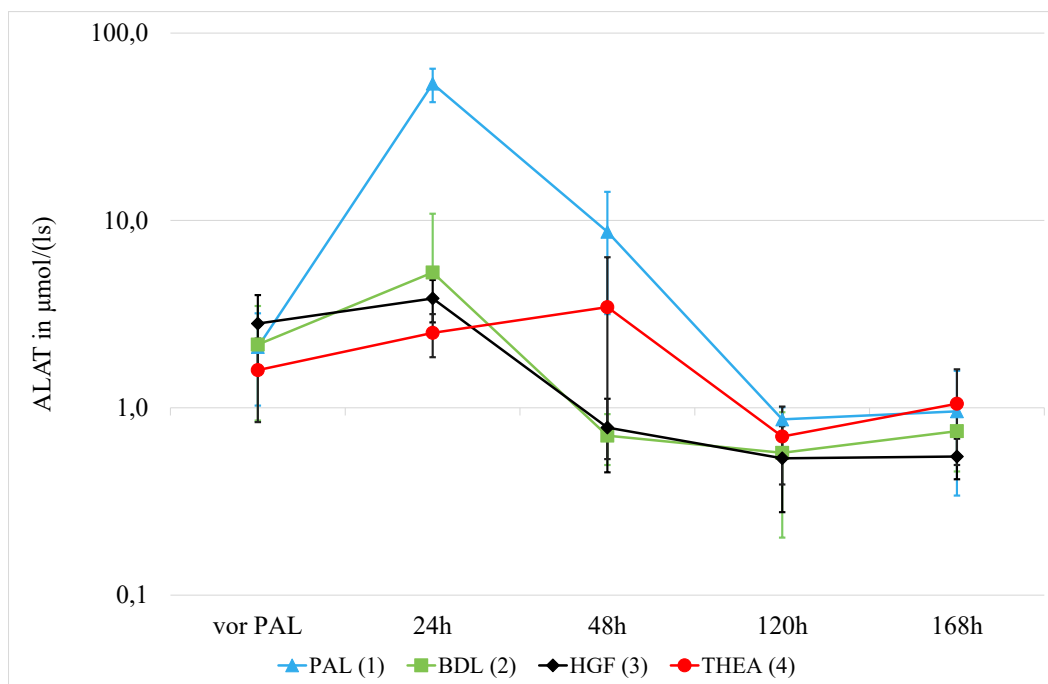


Abbildung 12: Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der ALAT in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

ASAT Eine sehr ähnliche Dynamik zeigte sich bei der ASAT, wobei in Gruppe 1 ein geringerer Anstieg um lediglich das 14,85-Fache nach 24 h auffiel.

Zeit h	PAL (1) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$	BDL (2) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$	HGF (3) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$	THEA (4) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$
	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD
vor PAL	4,69 \pm 2,78	3,11 \pm 1,41	5,76 \pm 2,09	3,49 \pm 1,38
24	69,62 \pm 44,58	6,94 \pm 5,28	8,08 \pm 0,25	5,43 \pm 1,02
48	10,31 \pm 5,09	1,85 \pm 0,27	1,94 \pm 0,50	4,58 \pm 2,98
120	1,50 \pm 0,14	1,40 \pm 0,47	1,32 \pm 0,54	1,50 \pm 0,38
168	2,44 \pm 1,96	1,74 \pm 0,42	1,43 \pm 0,18	2,27 \pm 1,51

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

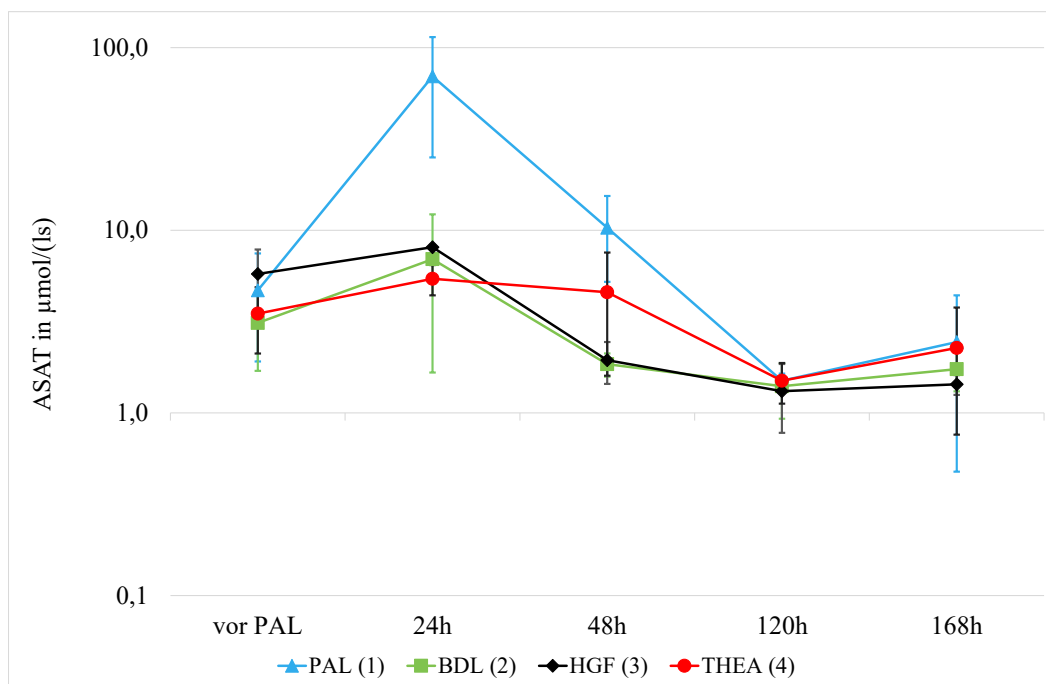


Abbildung 13: Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der ASAT in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

5.3.3 Syntheseparameter

Zur weiteren Beurteilung der Leberfunktion wurden die Syntheseparameter Cholinesterase und Albumin, deren Werte in Tabelle 16 und 17 zusammengefasst sind, bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Parameter ist in Abbildung 14 und 15 skizziert.

Cholinesterase Nach einem leichten Rückgang am 2. POD nach der PAL kam es im Anschluss zu einem Anstieg der Cholinesteraseaktivität in den Gruppen 2, 3 und 4. Der Ausgangswert wurde nach 120 h wieder erreicht. Der Verlauf in Gruppe 1 hob sich von den restlichen Gruppen durch einen von Beginn an steten Anstieg ab 24 h *post operationem* ab.

Zeit h	PAL (1) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$		BDL (2) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$		HGF (3) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$		THEA (4) $\mu\text{mol}/(\text{ls})$	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
24	4,17	1,44	3,50	0,50	4,00	1,00	4,25	0,43
48	4,25	0,43	3,00	0,00	3,50	0,50	3,50	0,50
120	4,50	0,50	3,00	0,00	4,50	0,50	4,50	0,50
168	4,75	0,43	4,00	0,89	4,50	0,50	5,00	0,71

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Cholinesterase in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

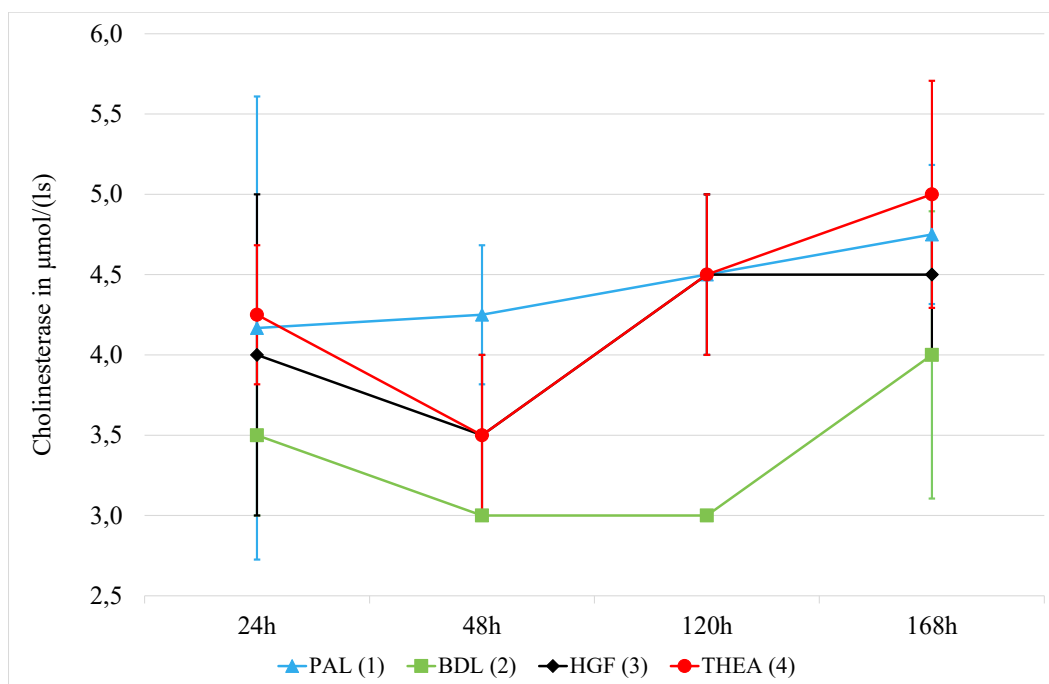


Abbildung 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Cholinesterase in $\mu\text{mol}/(\text{ls})$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

Albumin Im Verlauf zeigte sich ein maximaler Anstieg des Albumins um 8% in Gruppe 1, ca. 20% in Gruppe 3 und 4 sowie 30% in Gruppe 2 bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Bei allen Gruppen, außer Gruppe 2, war zwischen 24 h und 48 h postoperativ eine Stagnation oder ein leichter Rückgang zu verzeichnen. Dieser wurde zum Zeitpunkt 120 h jedoch wieder kompensiert. In Gruppe 2 stieg die Albuminkonzentration nach der PAL kontinuierlich an.

Zeit h	PAL (1) g/l			BDL (2) g/l			HGF (3) g/l			THEA (4) g/l		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	9,50	±	0,50	7,17	±	1,67	7,50	±	0,50	8,50	±	0,87
48	9,25	±	0,43	7,50	±	0,50	7,50	±	0,50	8,25	±	0,43
120	10,25	±	0,43	8,50	±	1,12	8,50	±	0,87	9,25	±	0,43
168	10,25	±	0,83	9,33	±	0,75	9,00	±	0,71	10,25	±	0,83

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardabweichungen des Albumins in g/l im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

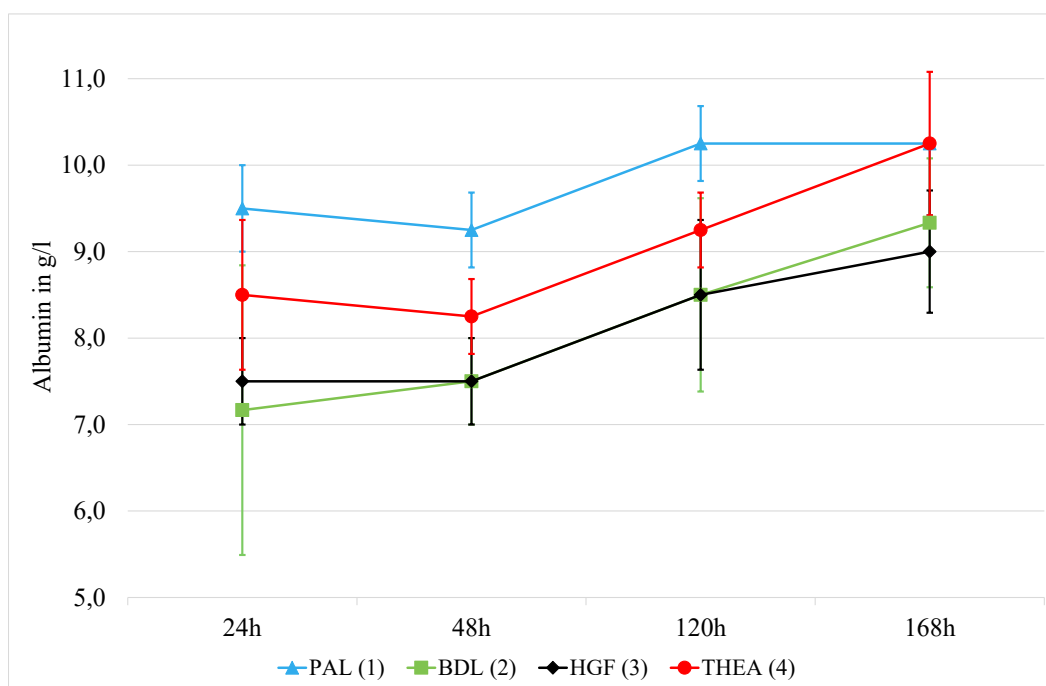


Abbildung 15: Mittelwerte und Standardabweichungen des Albumins in g/l im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

5.3.4 Kreatinin

Da Kreatinin, das beim Abbau von Kreatin entsteht, als harnpflichtige Substanz über die Nieren ausgeschieden wird, kann durch dessen Konzentrationsmessung im Blutserum die Nierenfunktion quantifiziert werden. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 18 aufgeführt und in Abbildung 16 der zeitliche Verlauf der Kreatininkonzentration dargestellt.

Es zeigte sich in keiner der Gruppen ein Anstieg über die Normwerte hinweg (Normwerte Kreatinin: 35,36 – 61,88 $\mu\text{mol/l}$, Umrechnung von mg/dl in $\mu\text{mol/l}$; Normwerte siehe Anhang). Zwischen 48 h und 120 h wurde eine Abnahme der Kreatininkonzentration in allen Gruppen deutlich, im Anschluss erfolgte ein Anstieg. Gruppe 1 wies insgesamt die niedrigsten Kreatininwerte auf. Dementsprechend ist nicht von einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion durch Theaflavin oder HGF bzw. durch die PAL oder Cholestase auszugehen.

Zeit h	PAL (1) $\mu\text{mol/l}$			BDL (2) $\mu\text{mol/l}$			HGF (3) $\mu\text{mol/l}$			THEA (4) $\mu\text{mol/l}$		
	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
24	33,00	\pm	2,45	34,75	\pm	1,79	32,00	\pm	2,16	34,00	\pm	1,87
48	33,50	\pm	2,06	34,75	\pm	0,83	37,00	\pm	0,71	34,50	\pm	1,50
120	29,50	\pm	1,66	34,50	\pm	2,96	36,00	\pm	2,92	31,25	\pm	0,43
168	30,00	\pm	3,00	35,50	\pm	1,71	37,75	\pm	1,48	35,00	\pm	5,61

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen von Kreatinin in $\mu\text{mol/l}$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

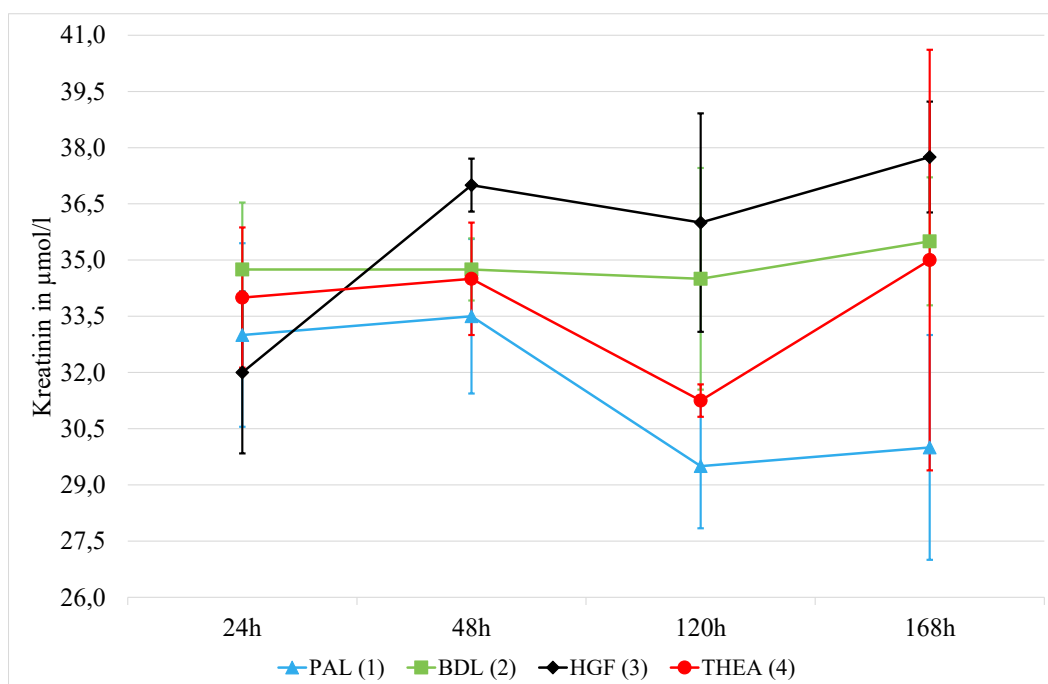


Abbildung 16: Mittelwerte und Standardabweichungen des Kreatinins in $\mu\text{mol/l}$ im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

5.4 Histologie

Histologisch wurde zum einen die Anzahl der Gallengänge pro Portalfeld im HE-Schnitt ermittelt. Außerdem erfolgte mithilfe der HE-Färbung die Analyse der Nekroseentwicklung. Anhand der ASDCL-Färbung wurde die Infiltration des Lebergewebes durch Leukozyten quantifiziert. Die EvG-Färbung diente der Darstellung von Bindegewebe.

5.4.1 Anzahl der Gallengänge

Nicht ligierter Leberlappen (NL-LL) Im Folgenden wird der nicht ligierte Leberlappen betrachtet. Tabelle 19 fasst die Entwicklung der Anzahl der Gallengänge pro Portalfeld des NL-LL zusammen. Der zugehörige grafische Verlauf ist in Abbildung 17 dargestellt. Die maximale An-

zahl an Gallengängen pro Portalfeld wurde bei den Gruppen 1, 2 und 3 nach 48 h erreicht. Bei der THEA-Gruppe zeigten sich nach 120 h die meisten Gallengänge. Gruppe 1 wies, trotz fehlender Cholestase, eine ähnliche Dynamik wie Gruppe 2 auf. Bei beiden kam es nach einem Anstieg bis 48 h postoperativ zu einem anschließenden Rückgang der Gallengänge.

Vergleicht man die beiden Interventionsgruppen 3 und 4, so zeigte sich eine verminderte Gallengangsproliferation bei der THEA-Gruppe, da in dieser Gruppe nach 24 h stets geringere Werte als bei der HGF-Gruppe vorlagen. Unter HGF-Applikation wurden hingegen ab 24 h jederzeit die höchsten Werte unter allen Gruppen beobachtet.

Letztendlich lagen die Werte für die Gallengänge pro Portalfeld bei den Interventionsgruppen 3 und 4, mit Ausnahme des 48 h-Wertes der THEA-Gruppe, stets über Gruppe 2.

Abbildung 18 bietet einen Überblick über die HE-Schnitte des nicht ligierten Leberlappens.

Zeit h	PAL (1)			BDL (2)			HGF (3)			THEA (4)		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	1,70	±	0,30	6,90	±	3,17	6,67	±	0,47	7,60	±	0,71
48	2,70	±	0,30	8,30	±	1,36	10,20	±	3,69	6,80	±	2,70
120	2,55	±	0,46	4,95	±	1,60	8,30	±	1,65	7,90	±	2,41
168	1,65	±	0,46	4,85	±	1,37	8,55	±	3,36	6,25	±	1,90

Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Gallengänge pro Portalfeld des NL-LL.

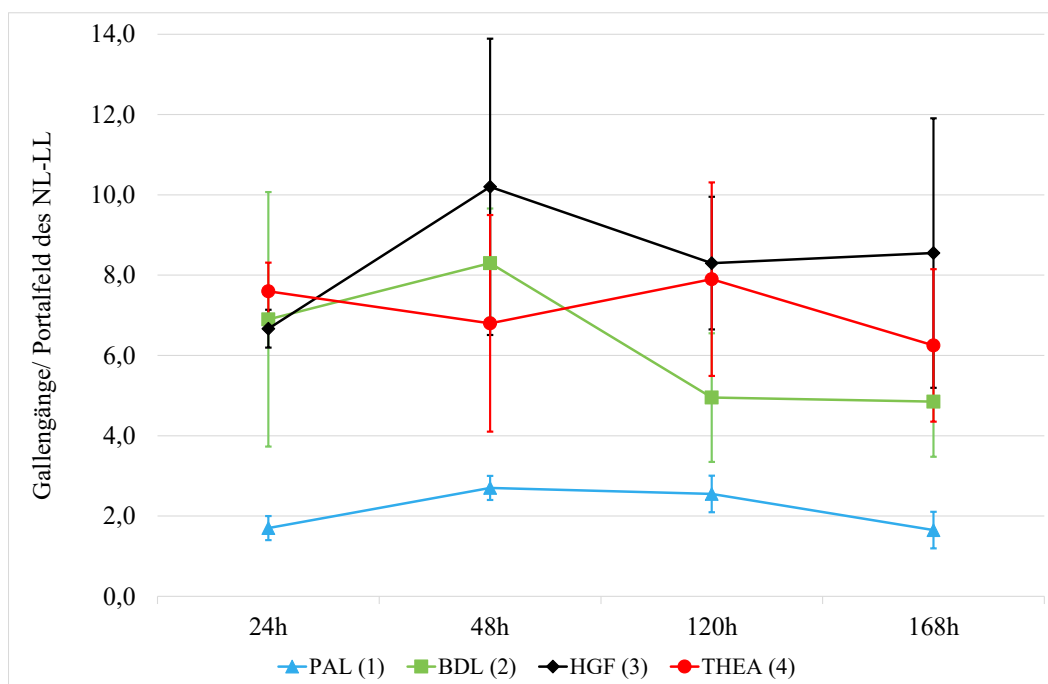
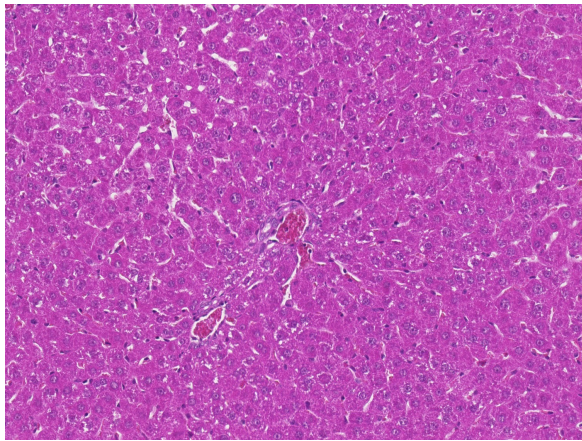
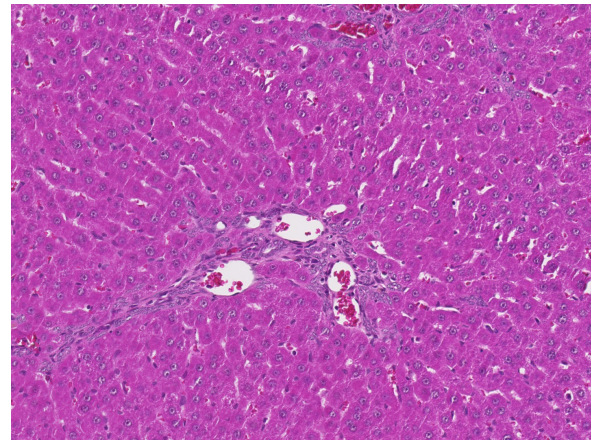


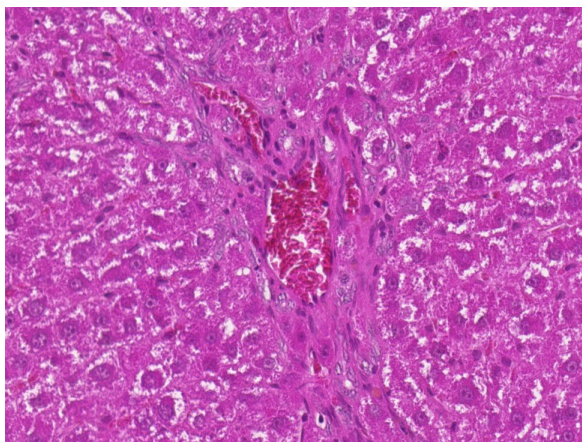
Abbildung 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Gallengänge pro Portalfeld des NL-LL.



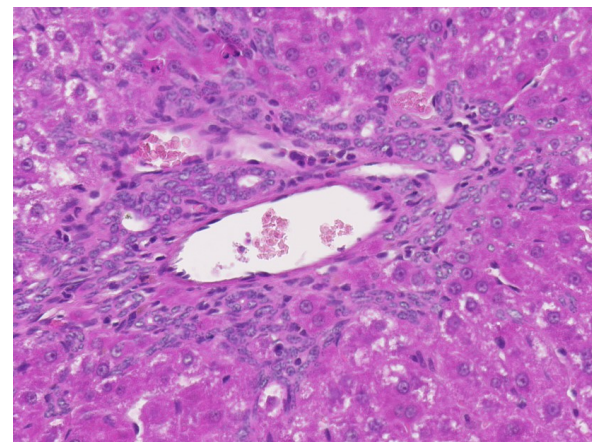
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 18: HE-Schnitte des NL-LL in 20-facher Vergrößerung, jeweils 120 h postoperativ. Dargestellt sind Portalfelder mit umgebendem Leberparenchym. (a) Gruppe 1, (b) Gruppe 2, (c) Gruppe 3, (d) Gruppe 4.

Ligierter Leberlappen (L-LL) Im ligierten Leberlappen konnten folgende Veränderungen der Gallengänge beobachtet werden. Ebenso wie beim NL-LL zeigte sich die geringste Anzahl an Gallengängen bei der nicht cholestatischen Gruppe 1. In Gruppe 2 stellte sich die Anzahl der Gallengänge ab 48 h rückläufig dar. Unter HGF-Applikation zeigte sich in Gruppe 3 bis 120 h *post operationem* eine Abnahme der Gallengänge, im Anschluss kam es zu einer Zunahme, welche jedoch nicht den 24 h-Wert erreichte. In Gruppe 4 zeichnete sich ein alternierender Verlauf ab. Auf eine kurzzeitige Abnahme bis 48 h folgte ein Anstieg nach 120 h. Anschließend fiel die Anzahl der Gallengänge unter den 168 h-Wert der HGF-Gruppe ab (siehe Tabelle 20 und Abbildung 19).

Zeit h	PAL (1)		BDL (2)		HGF (3)		THEA (4)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
24	2,00	± 0,58	7,75	± 2,98	12,00	± 2,08	8,30	± 2,10
48	2,60	± 0,61	8,05	± 2,31	9,90	± 2,41	6,40	± 1,13
120	2,80	± 0,20	6,60	± 1,14	8,25	± 1,42	12,00	± 2,66
168	2,75	± 0,61	6,30	± 1,97	9,10	± 3,55	8,05	± 1,32

Tabelle 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Gallengänge pro Portalfeld des L-LL.

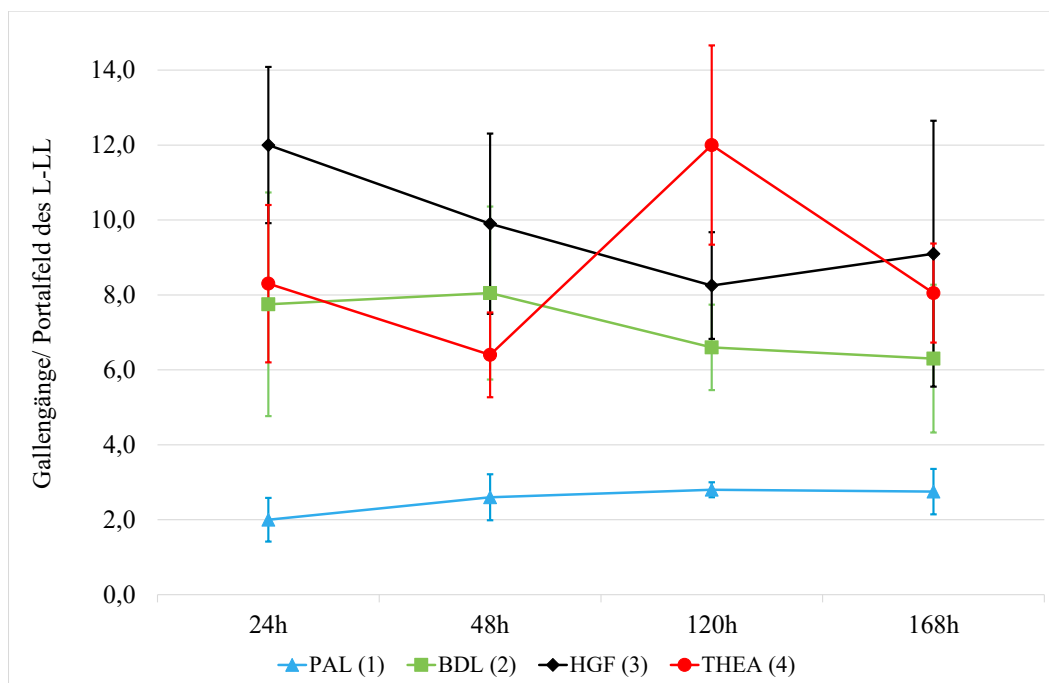


Abbildung 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Gallengänge pro Portalfeld des L-LL.

Vergleich ligierter und nicht ligierter Leberlappen Bei der Gegenüberstellung der Gallengangsanzahl des ligierten und nicht ligierten Leberlappens zeigten sich Unterschiede. Zu fast allen Beobachtungszeitpunkten wies der nicht ligierte Leberanteil eine geringere Gallengangsanzahl als der ligierte auf. Allerdings war 48 h postoperativ im NL-LL in allen Gruppen eine Gallengangsanzahl vorzufinden, die jene des ligierten Lappens überstieg.

5.4.2 Leukozyteninfiltration

Um die Anzahl der in die Leber eingewanderten Leukozyten zu quantifizieren, erfolgte eine Markierung dieser Entzündungszellen mithilfe der ASDCL-Färbung. Zunächst wurden die Leukozyten in den Portalfeldern gezählt, wobei diese in portal und periportal unterteilt wurden. Des Weiteren wurde die Läppchenperipherie auf eine vorliegende Leukozyteninfiltration untersucht. Der ligierte und nicht ligierte Leberlappen wurde getrennt voneinander betrachtet. Zunächst wird

auf den NL-LL eingegangen. Abbildung 20 zeigt beispielhaft Portalfelder des nicht ligierten Leberlappens.

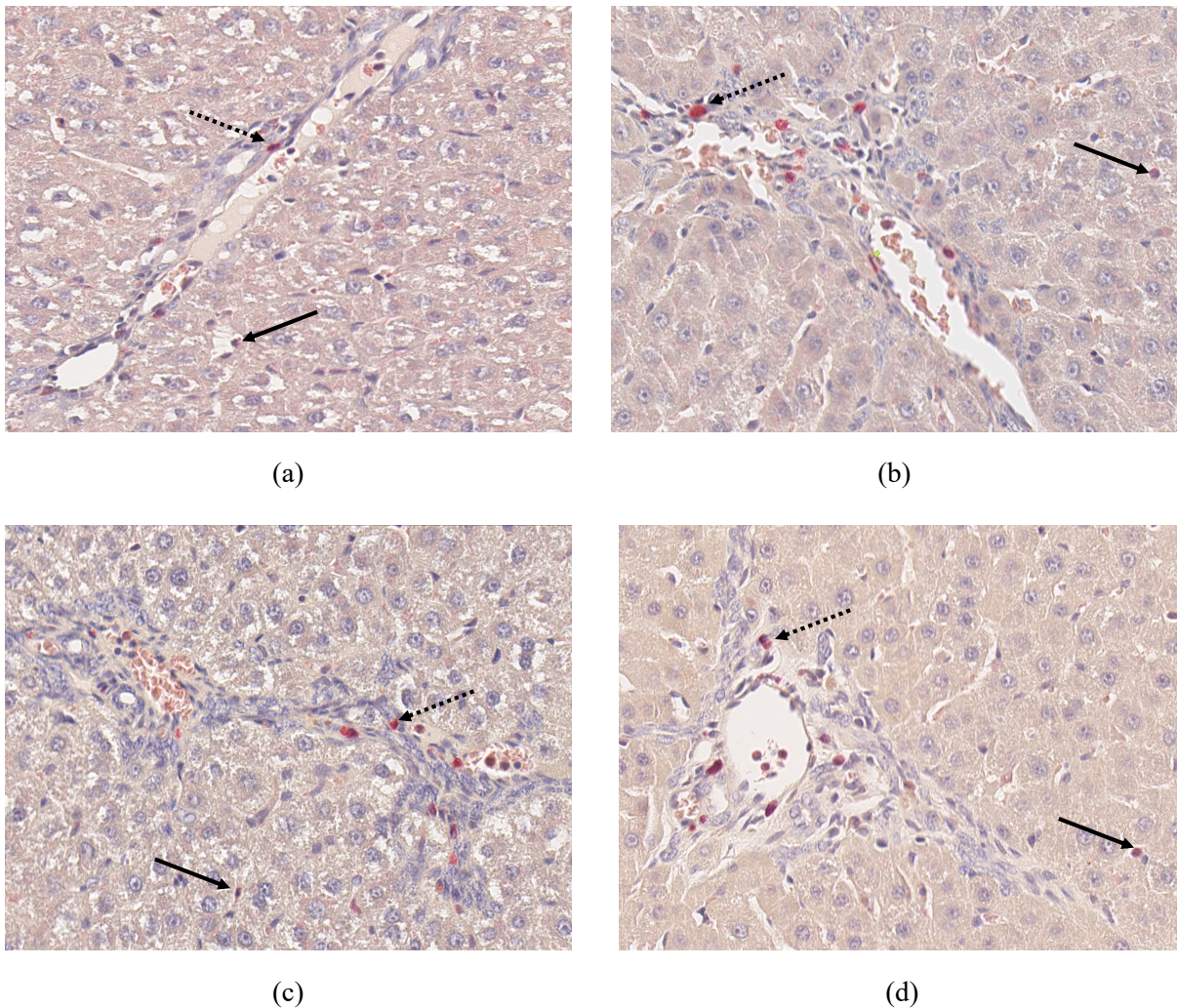


Abbildung 20: ASDCL-Schnitte in 40-facher Vergrößerung jeweils 120 h postoperativ. Dargestellt sind Portalfelder mit umgebendem Leberparenchym des NL-LL. Durch die ASDCL-Färbung wurden die Leukozyten rot markiert (portale Leukozyten: gestrichelter Pfeil; periportale Leukozyten: durchgezogener Pfeil). (a) Gruppe 1, (b) Gruppe 2, (c) Gruppe 3, (d) Gruppe 4.

NL-LL (portal) Bei der Betrachtung der portalen Areale des NL-LL wurde in Gruppe 1 zu jedem Beobachtungszeitpunkt die geringsten Leukozyteninfiltration beobachtet, wie in Abbildung 21 deutlich wird. Die Gruppen 2 und 3 wiesen einen ähnlichen, alternierenden Verlauf auf, wobei in beiden Gruppen das Maximum nach 48 h erreicht wurde. Eine diesem Verlauf entgegengesetzte Dynamik stellte sich in Gruppe 4 dar. Unter THEA-Gabe wurde das Maximum der Leukozyteninvasion nach 120 h erreicht, wobei diese Gruppe mit $10,45 \pm 1,06$ Leukozyten pro Portalfeld ein geringeres Maximum als Gruppe 3 unter HGF-Applikation ($12,15 \pm 0,92$) aufwies. Auch bei Kontrollgruppe 2 lag eine höhere Leukozytenanzahl vor ($12,80 \pm 1,98$). Jedoch sank die Leukozytenzahl der Gruppe 2 nach 48 h unter jene der beiden Interventionsgruppen. Tabelle 21 zeigt die Anzahl der portal lokalisierten Leukozyten des NL-LL.

Zeit h	PAL (1)		BDL (2)		HGF (3)		THEA (4)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
24	3,65	± 0,88	7,40	± 0,51	6,07	± 0,50	8,85	± 1,02
48	5,35	± 0,98	12,80	± 1,98	12,70	± 1,20	7,15	± 1,39
120	4,30	± 0,61	6,80	± 1,81	8,05	± 1,11	10,45	± 1,06
168	4,45	± 0,89	7,90	± 2,67	12,15	± 0,92	10,00	± 1,77

Tabelle 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der portalen Leukozyten des NL-LL.

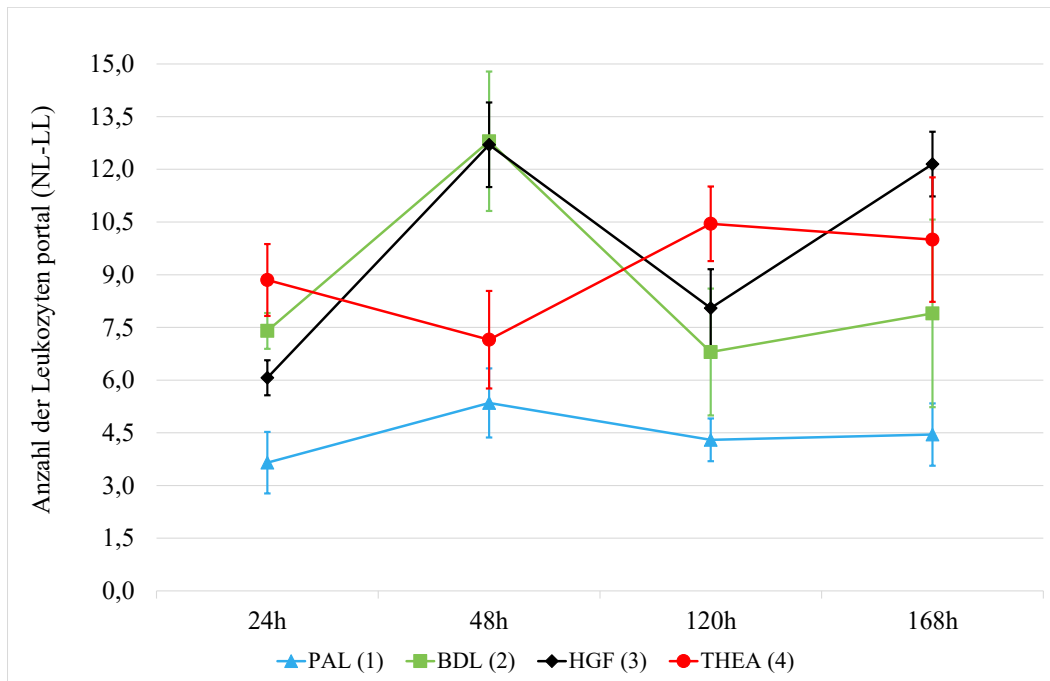


Abbildung 21: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der portalen Leukozyten NL-LL.

NL-LL (periportal) In der Analyse der periportalen Zone wurde deutlich, dass es in den Gruppen 1 und 2 mit fortschreitender Beobachtungszeit zu einer Zunahme der periportalen Leukozytenansammlung kam. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Gruppe 4 eine nahezu kontinuierliche Abnahme der Leukozyten. Nach 168 h unterschritt die Leukozytenanzahl sogar den Wert von Gruppe 1. In der HGF-Gruppe, deren Dynamik sich nach 48 h ähnlich jener der THEA-Gruppe verhielt, konnte ebenfalls ein Rückgang der Leukozytenansammlung vermerkt werden. Der Verlauf der periportalen Leukozyten ist in Abbildung 22 dargestellt, die zugehörigen Daten in Tabelle 22.

Zeit h	PAL (1)			BDL (2)			HGF (3)			THEA (4)		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	0,60	±	0,49	1,40	±	0,32	2,20	±	1,41	2,25	±	0,86
48	0,60	±	0,28	1,10	±	0,44	0,40	±	0,20	1,25	±	0,57
120	0,65	±	0,43	1,50	±	0,57	0,90	±	0,54	0,95	±	0,57
168	1,15	±	1,06	2,10	±	0,10	0,60	±	0,14	0,70	±	0,36

Tabelle 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der periportal Leukozyten des NL-LL.

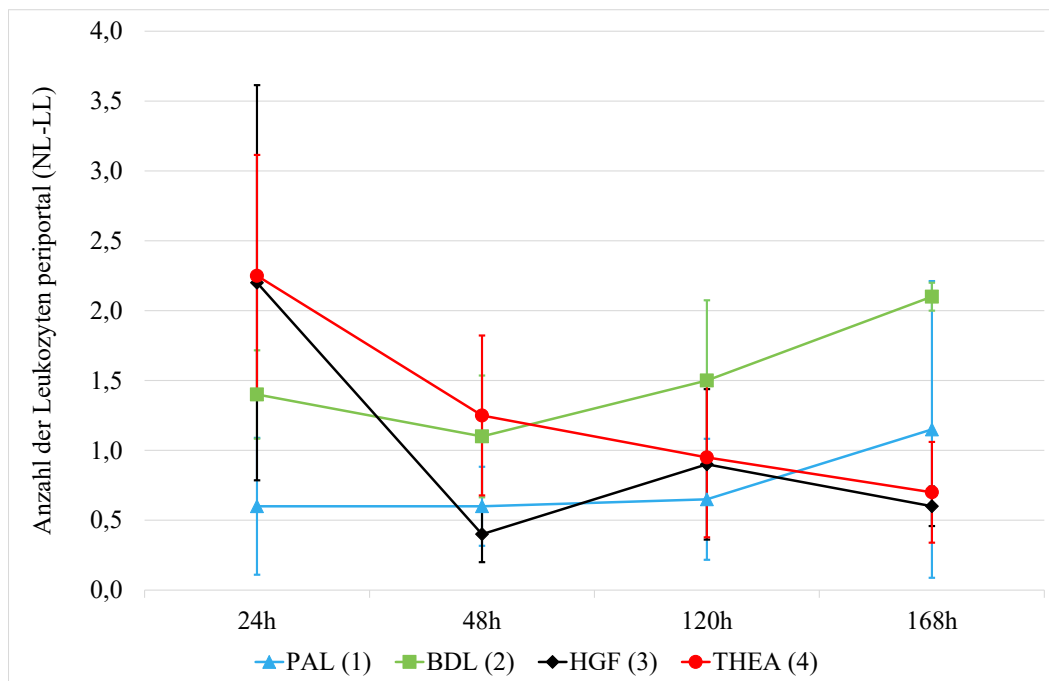


Abbildung 22: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der periportal Leukozyten im NL-LL.

NL-LL (Läppchenperipherie) Für die Analyse der Infiltration der Läppchenperipherie wurden die zufällig ausgewählten FOI auf deren beinhaltete Leukozyten untersucht. Dabei wurde eine abnehmende Leukozyteninvasion über den Beobachtungszeitraum in Gruppe 4 beobachtet. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der Leukozyten im Parenchym in Gruppe 2 postoperativ an. Gruppe 2 wies meist die höchste Anzahl an Leukozyten in der Läppchenperipherie auf. Außer nach 24 h, hier wurde das Maximum durch Gruppe 4 erreicht. Unter HGF-Applikation kam es nach einem Minimum nach 48 h zu einem wiederholten Anstieg, dieser erreichte jedoch nicht das Ausgangsniveau des 24 h-Wertes. In Gruppe 1 konnte nach einem leichten Rückgang ab 48 h eine Zunahme der Leukozyteninfiltration bis zum Beobachtungsende registriert werden. Ab 120 h wies Gruppe 1 eine höhere Leukozyteninfiltration als die Interventionsgruppen auf. Der zeitliche Verlauf der Leukozyteninvasion der Läppchenperipherie aller Gruppen ist in Abbildung 23 dargestellt, die Werte sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Zeit h	PAL (1)		BDL (2)		HGF (3)		THEA (4)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
24	0,85	± 0,18	1,58	± 0,37	2,47	± 0,82	3,25	± 0,95
48	0,45	± 0,23	1,85	± 0,36	0,88	± 0,46	1,48	± 0,56
120	1,80	± 0,21	2,20	± 0,43	1,75	± 0,86	1,50	± 0,31
168	1,55	± 0,86	2,15	± 0,21	1,50	± 0,21	1,33	± 0,56

Tabelle 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Leukozyten aller FOI in der Lappenperipherie des NL-LL.

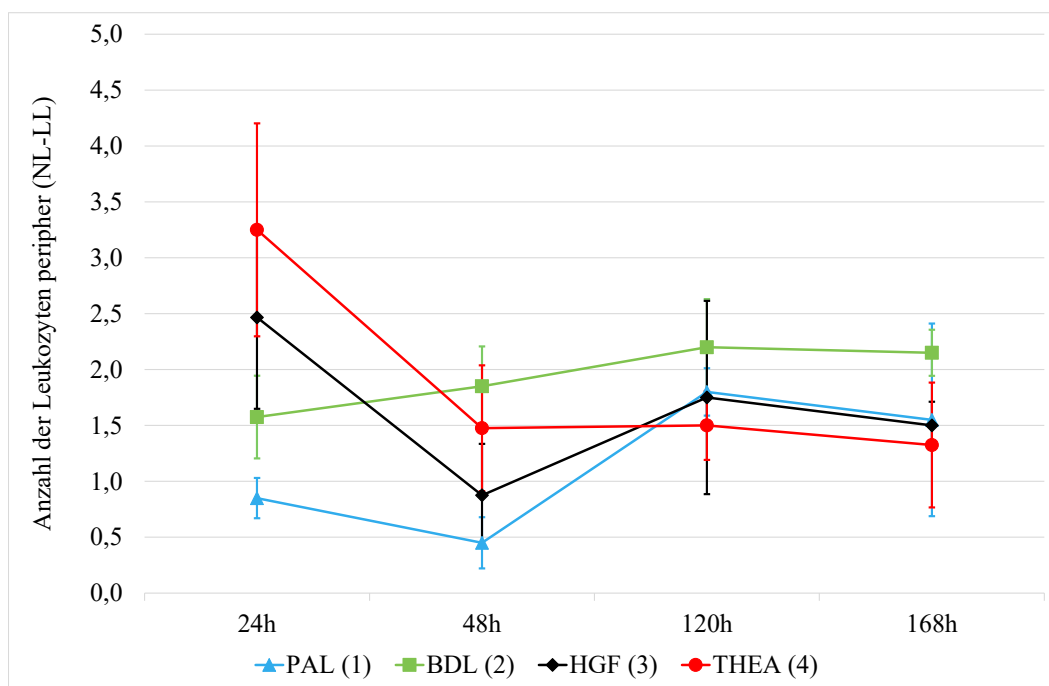


Abbildung 23: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der peripher lokalisierten Leukozyten in den FOI des NL-LL.

Im Folgenden wird der Grad der Leukozyteninfiltration des ligierten Leberlappens beschrieben.

L-LL (portal) Bei Erfassung des Invasionsgrades der Leukozyten im portalen Bereich im ligierten Leberlappen zeigten sich, gleich dem Ergebnis des NL-LL, in Gruppe 1 zu allen Zeitpunkten die geringsten Werte. Diese lagen deutlich unter jenen der cholestatischen Gruppen. Bis 120 h postoperativ wies Gruppe 1 einen mäßigen Anstieg und anschließend einen Rückgang der portalen Leukozyteninfiltration auf, wobei der 24 h-Wert nicht unterschritten wurde. Ein ähnlicher Verlauf, jedoch mit einem jeweils höheren Invasionsgrad, lag in Gruppe 2 vor. Unter der Applikation von Theaflavin war ein Anstieg bis 120 h zu verzeichnen. Diese Gruppe wies in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraums den höchsten Invasionsgrad auf, der das 3,28-Fache von Gruppe 1 betrug. Der Verlauf der Leukozyteninfiltration ist in Abbildung 24 dargestellt, in Tabelle 24 die zugehörigen Werte.

Zeit h	PAL (1)		BDL (2)		HGF (3)		THEA (4)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
24	3,00	± 2,20	7,95	± 1,80	9,87	± 1,11	8,85	± 1,80
48	5,00	± 0,71	11,30	± 3,12	12,30	± 2,53	10,10	± 2,80
120	4,90	± 1,73	8,85	± 0,97	9,85	± 1,65	13,60	± 1,36
168	3,75	± 0,50	6,95	± 2,34	12,35	± 0,86	13,20	± 1,59

Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der portalen Leukozyten des L-LL.

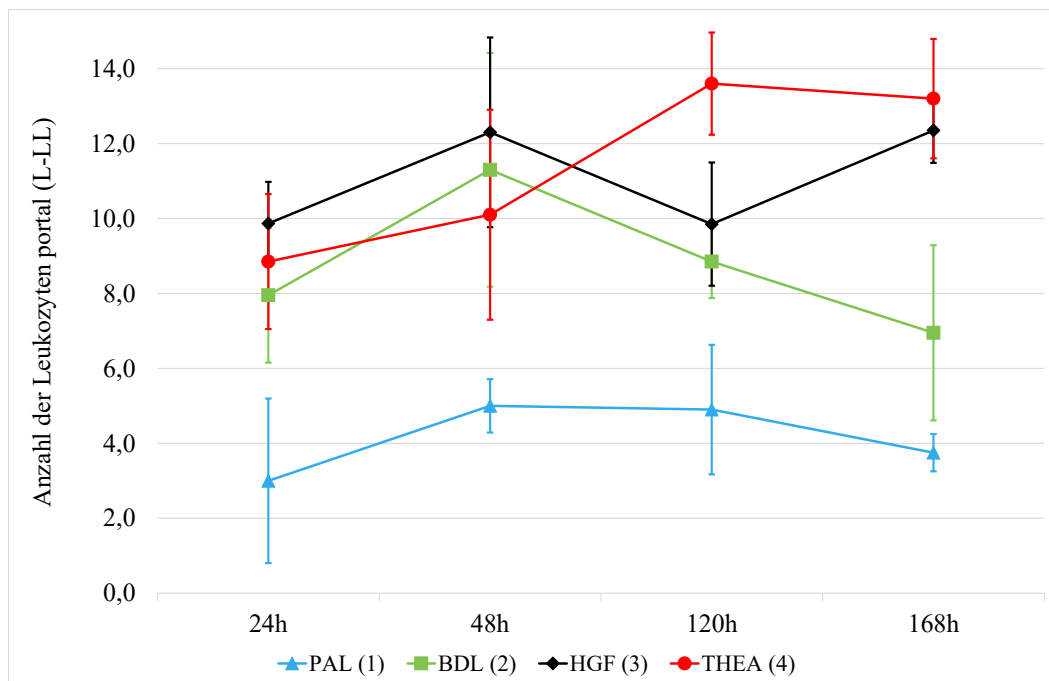


Abbildung 24: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der portalen Leukozyten im L-LL.

L-LL (periportal) Periportal stellte sich jedoch ein anderes Bild als im portalen Bereich dar. Insbesondere konnte in Gruppe 4 nach einem Maximum nach 48 h eine anschließende deutliche Abnahme der Leukozyteninfiltration festgestellt werden, wobei der 168 h-Wert unter jenen der Gruppen 2 und 3 lag. Bei diesen zeigte sich ein der Gruppe 4 entgegengesetzter Verlauf mit einer Abnahme der periportalen Leukozytenzahl bis 48 h und anschließender Zunahme. Gruppe 1 wies einen schwankenden Verlauf auf, jedoch lag in dieser Gruppe zu jederzeit die geringste Leukozyteninfiltration vor. Der zeitliche Verlauf der beschriebenen Veränderungen ist in Abbildung 25 repräsentiert und die zugehörigen Werte in Tabelle 25 wiedergegeben.

Zeit h	PAL (1)			BDL (2)			HGF (3)			THEA (4)		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	0,60	±	0,43	1,00	±	0,37	1,07	±	0,34	0,67	±	0,19
48	0,47	±	0,25	0,90	±	0,73	0,55	±	0,36	1,40	±	0,81
120	0,75	±	0,46	0,90	±	0,82	0,75	±	0,26	1,10	±	0,57
168	0,55	±	0,17	1,90	±	0,78	1,27	±	0,96	0,75	±	0,48

Tabelle 25: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der periportal Leukozyten des L-LL.

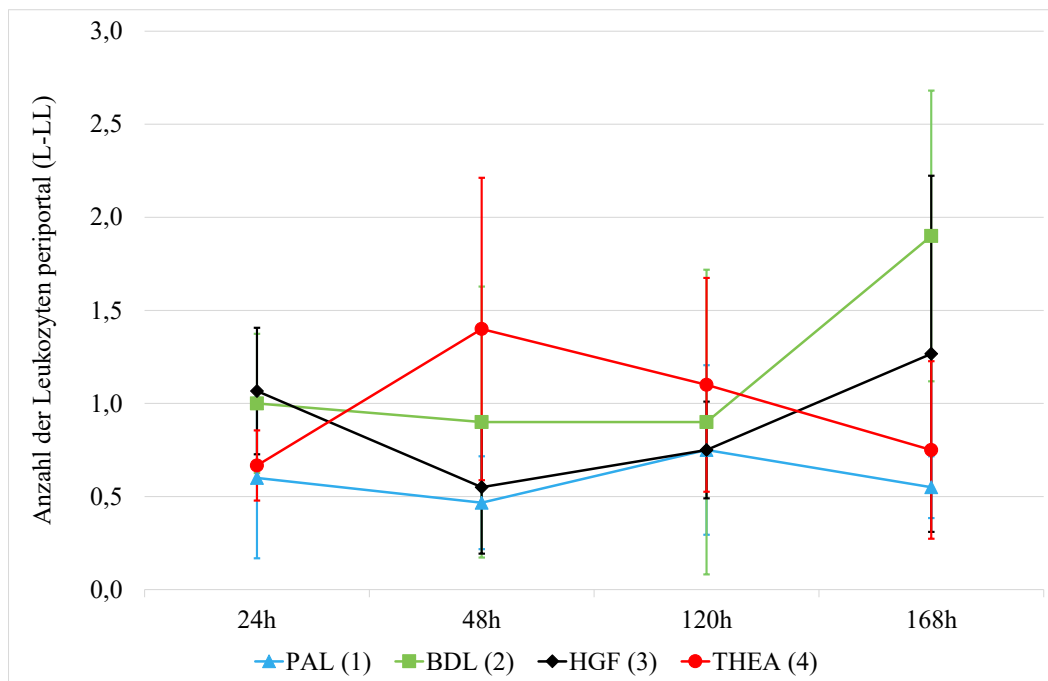


Abbildung 25: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der periportal Leukozyten im L-LL.

L-LL (Läppchenperipherie) Die Leukozyteninfiltration der Läppchenperipherie des ligierten Leberlappens stellte sich wie folgt dar. Die THEA-Gruppe zeigte während des gesamten Beobachtungszeitraums eine Abnahme der Leukozytenansammlung in den FOI. Im Vergleich zu den anderen Gruppen, bei denen auch eine Cholestase vorlag, wies Gruppe 4 zu jedem Zeitpunkt die wenigsten Leukozyten in der Peripherie auf. In den anderen beiden cholestatischen Gruppen 2 und 3 zeigte sich eine bis 120 h (Gruppe 2) bzw. 48 h (Gruppe 3) abnehmende Leukozytenansammlung. Nachfolgend schloss sich eine leichte Zunahme an, die jedoch in beiden Gruppen unter dem 24 h-Wert verblieb. Wurde lediglich eine PAL durchgeführt, lag meist die geringsten Leukozytenansammlung vor. Allerdings wies Gruppe 1 120 h *post operationem* die zweithöchste Leukozyteninfiltration aller Gruppen auf. Einen Überblick über die einzelnen Verläufe bietet Abbildung 26, die jeweiligen Werte sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Zeit h	PAL (1)			BDL (2)			HGF (3)			THEA (4)		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	0,73	±	0,57	2,68	±	1,66	2,10	±	0,80	1,88	±	0,36
48	0,80	±	0,22	2,03	±	0,89	1,75	±	0,67	1,38	±	0,79
120	2,50	±	0,94	1,88	±	0,47	1,78	±	0,91	1,68	±	0,54
168	0,90	±	0,19	2,13	±	0,62	2,00	±	0,43	1,40	±	0,32

Tabelle 26: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der peripheren Leukozyten in den FOI des L-LL.

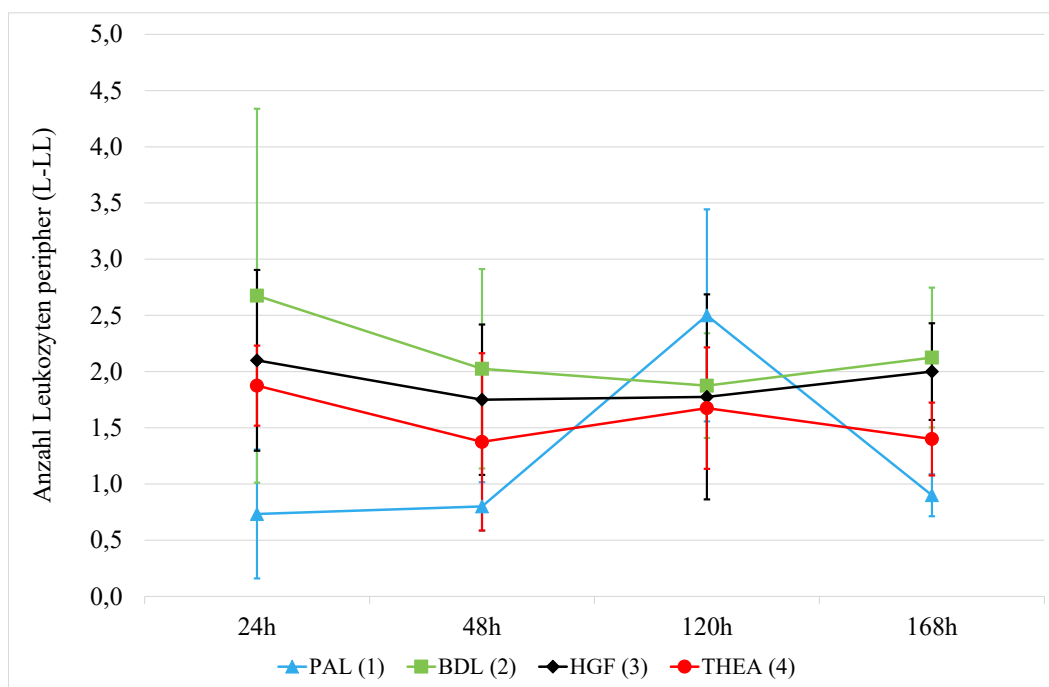


Abbildung 26: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der peripheren Leukozyten in den FOI des L-LL.

5.4.3 Nekrose

Für die Untersuchung, ob es durch die Pfortaderligatur bzw. durch eine Cholestase zum Untergang von Hepatozyten kommt, wurde der Nekroseanteil in den histologischen HE-Schnitten mit dem Analyseprogramm Histokat ermittelt. Abbildung 27 illustriert den Analyseprozess.

NL-LL Bei der Analyse der Schnitte zeigte sich, dass im NL-LL stets ein geringerer Nekroseanteil als im L-LL vorlag, wie in Tabelle 27 und 28 deutlich wird. Auffällig war auch eine gegenüber der PAL-Gruppe verstärkte Nekrose der Gruppe 2 ab 48h. Unter THEA sank der Nekroseanteil ab 120h unter die Werte der Gruppe 2. Auch in der HGF-Gruppe war zu diesem Zeitpunkt der Nekrosegrad am geringsten. Hier lagen die Werte ebenfalls unter jenen der Gruppe 2, jedoch kam es im Anschluss zu einem Anstieg (siehe Abbildung 28).

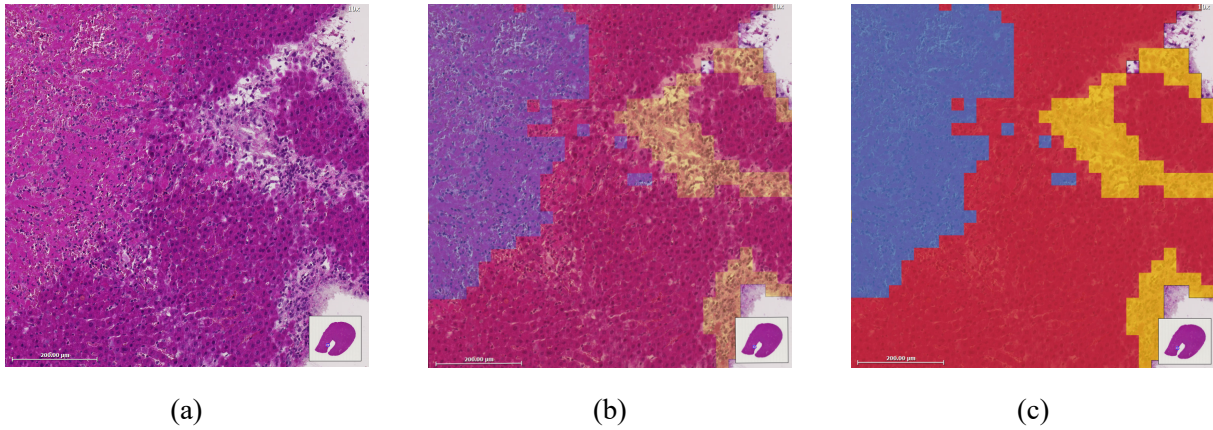


Abbildung 27: HE-Schnitte des L-LL in 10-facher Vergrößerung (24 h; Gruppe 1). Bild (a) zeigt den Originalschnitt. Die Schnitte in Bild (b) und (c) wurden mit dem Analyseprogramm Histokat bearbeitet, wobei der Kontrast stufenweise erhöht wurde. Die Nekroseareale sind gelb und blau, das vitale Lebergewebe rot markiert.

Zeit h	PAL (1) %		BDL (2) %		HGF (3) %		THEA (4) %	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
24	0,16	± 0,12	0,10	± 0,03	0,15	± 0,14	0,48	± 0,22
48	0,09	± 0,03	0,19	± 0,07	0,19	± 0,34	0,40	± 0,12
120	0,19	± 0,23	0,22	± 0,09	0,06	± 0,03	0,09	± 0,04
168	0,13	± 0,13	0,33	± 0,15	0,45	± 0,53	0,15	± 0,05

Tabelle 27: Mittelwerte und Standardabweichungen des Nekroseanteils im NL-LL in Prozent.

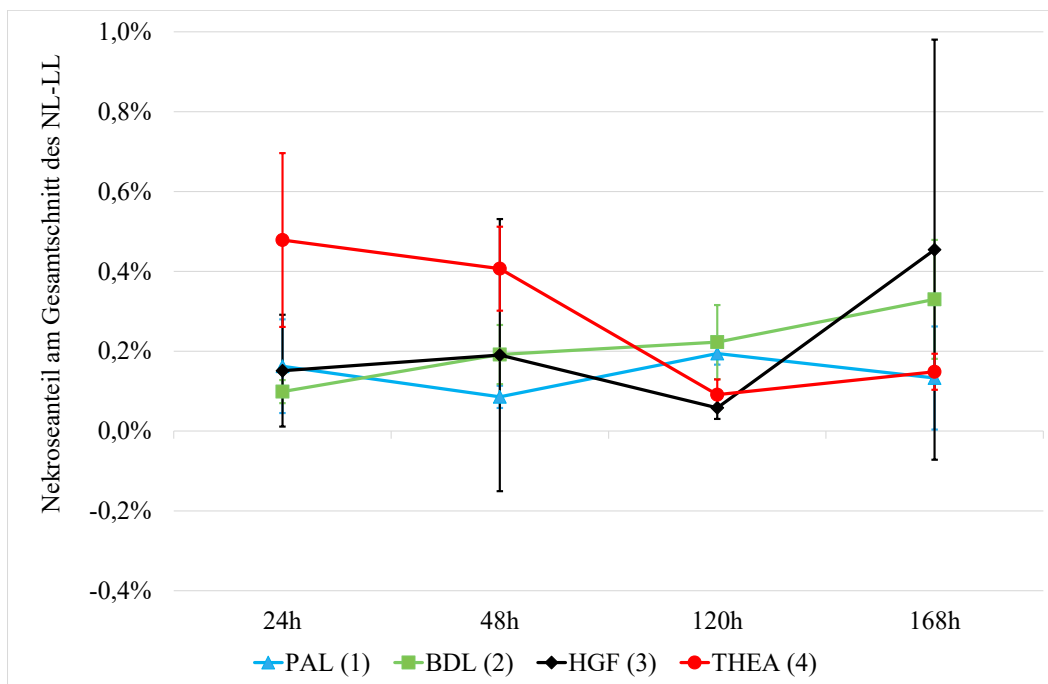


Abbildung 28: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen des Nekroseanteils im NL-LL in Prozent.

L-LL Bezüglich des L-LL ist vor allem der Nekroseverlauf der Gruppe 1 hervorzuheben. Hier war bis 120 h postoperativ eine massive Nekrose zu beobachten, die deutlich über jener der anderen Gruppen lag. In Gruppe 3 und 4 konnte nach 120 h der geringste Nekroseanteil registriert werden (siehe Abbildung 29).

Zeit h	PAL (1) %			BDL (2) %			HGF (3) %			THEA (4) %		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	58,41	±	34,35	0,57	±	0,71	0,82	±	0,73	0,58	±	0,07
48	43,45	±	22,70	1,90	±	0,51	0,67	±	0,69	1,00	±	1,32
120	41,05	±	38,50	3,72	±	2,17	0,31	±	0,16	0,12	±	0,02
168	0,31	±	0,32	0,52	±	0,28	0,58	±	0,04	0,16	±	0,09

Tabelle 28: Mittelwerte und Standardabweichungen des Nekroseanteils im L-LL in Prozent.

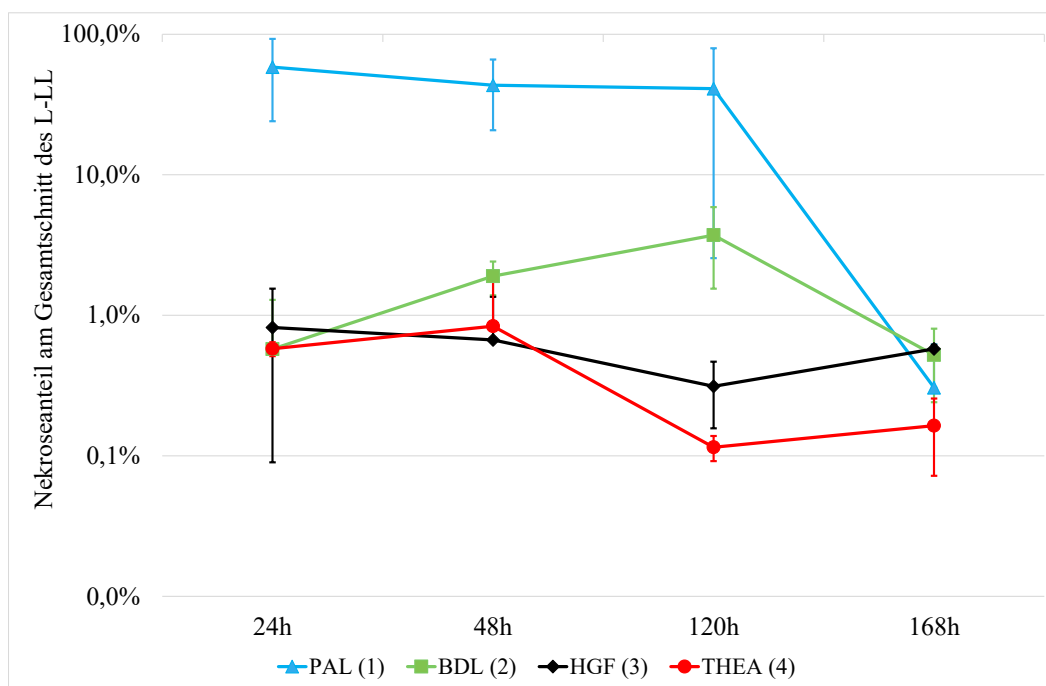


Abbildung 29: Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des Nekroseanteils im L-LL in Prozent im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

5.4.4 Fibrose

Um zu beurteilen, wie sich eine Cholestase bzw. PAL auf die Bindegewebssynthese in der Leber auswirkt, wurde eine EvG-Färbung des Lebergewebes vorgenommen und der Anteil des Bindegewebes am Gesamtschnitt berechnet. Darüber hinaus wurde mithilfe der EvG-Färbung der Einfluss von HGF und THEA auf die Fibroseentwicklung untersucht. Der ligierte und nicht ligierte Leberlappen wurden dabei getrennt voneinander beurteilt. Abbildung 30 zeigt beispielhaft den Ablauf der Analyse, die mit dem Programm Histokat erfolgte.

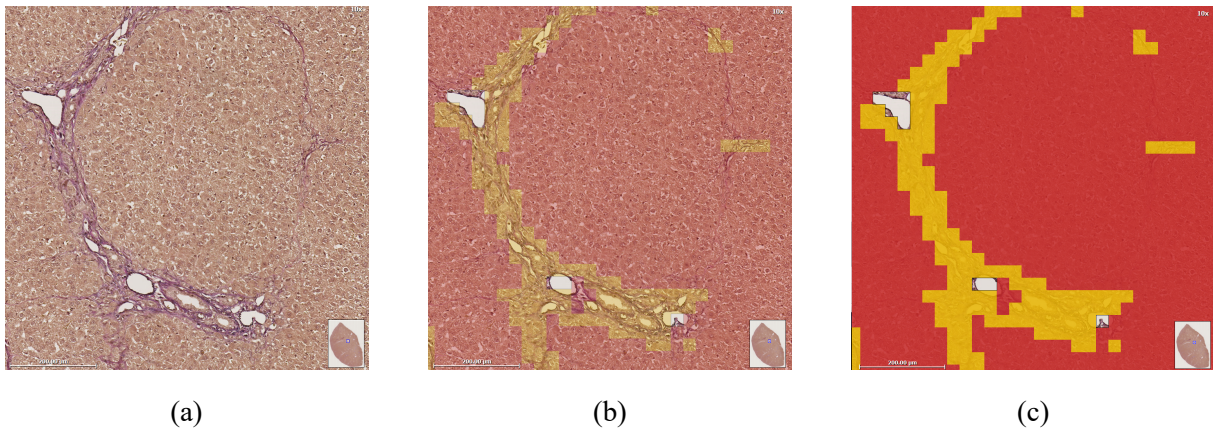


Abbildung 30: EvG-Schnitte des L-LL in 10-facher Vergrößerung (168 h; Gruppe 3). Bild (a) zeigt den Originalschnitt. Die Schnitte in Bild (b) und (c) wurden mit dem Analyseprogramm Histokat bearbeitet, wobei der Kontrast stufenweise erhöht wurde. Die Bindegewebsanteile sind gelb und das normale Leberparenchym rot markiert.

NL-LL Bei allen Gruppen zeigte sich zu jedem Beobachtungszeitpunkt im nicht ligierten Leberlappen ein, im Vergleich zum ligierten Leberlappen, verminderter Bindegewebsanteil, wie die Gegenüberstellung der beiden Diagramme 32 und 31 deutlich widerspiegelt. Der Manifestationsort der Fibrose war dabei überwiegend portal lokalisiert. Darüber hinaus bildete sich in den gallengangligierten Lebern vermehrt Bindegewebe, wie der höhere Fibroseanteil in den Gruppen 2, 3 und 4 gegenüber der PAL-Gruppe zeigte. In der PAL-Gruppe wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt der geringste Fibroseanteil gemessen, wobei bis 120 h ein Anstieg der Bindegewebssynthese im NL-LL erfolgte (siehe Tabelle 29). Beim Vergleich der Cholestasegruppen wurde deutlich, dass die Interventionsgruppen 3 und 4 meist eine stärkere Fibroseentwicklung aufwiesen als Gruppe 2. In jeder dieser drei Gruppen kam es nach einer Abnahme bis 48 h bzw. 120 h *post operationem* zu einem nochmaligen Anstieg der Fibrosebildung im NL-LL.

Zeit h	PAL (1)			BDL (2)			HGF (3)			THEA (4)		
	%			%			%			%		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
24	0,39	±	0,20	2,96	±	1,18	8,53	±	3,21	4,53	±	2,59
48	0,45	±	0,10	2,39	±	0,65	5,33	±	2,08	3,75	±	2,75
120	0,75	±	0,55	1,98	±	1,46	1,88	±	0,19	3,75	±	1,33
168	0,54	±	0,26	2,62	±	0,43	2,91	±	1,56	4,46	±	1,34

Tabelle 29: Mittelwerte und Standardabweichungen des Fibroseanteils am Gesamtschnitt im NL-LL in Prozent.

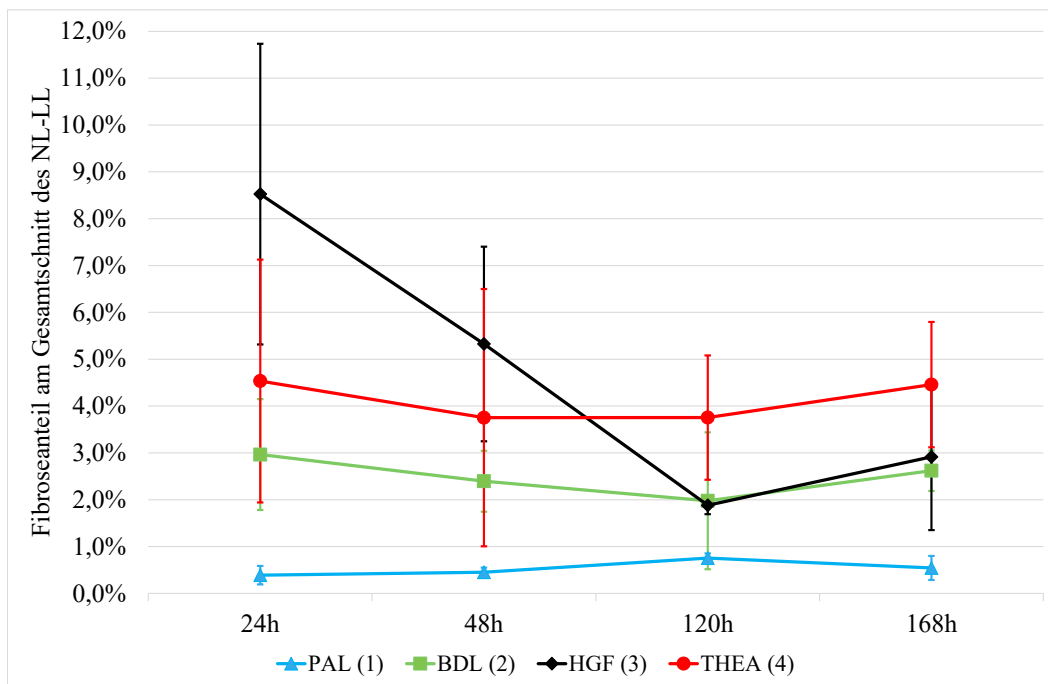


Abbildung 31: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen des Fibroseanteils im NL-LL in Prozent.

L-LL Im ligierten Leberlappen wurde der maximale Fibroseanteil bei den Gruppen 1, 2 und 4 nach 120 h erreicht. Im Gegensatz dazu zeigte die HGF-Gruppe bereits nach 24 h die größte Fibroseentwicklung und im Anschluss eine Abnahme. Eine Übersicht über den Fibroseanteil des ligierten Leberlappens zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt bietet Tabelle 30. In Abbildung 32 ist der zeitliche Verlauf grafisch skizziert.

Zeit h	PAL (1) %		BDL (2) %		HGF (3) %		THEA (4) %	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
24	1,50	± 0,71	7,09	± 2,98	11,98	± 0,10	4,76	± 2,90
48	2,06	± 1,12	8,14	± 3,89	5,68	± 1,77	4,87	± 1,44
120	6,85	± 6,38	8,03	± 5,75	5,94	± 3,89	12,23	± 4,37
168	1,83	± 1,61	1,93	± 0,99	6,83	± 4,34	8,77	± 1,11

Tabelle 30: Mittelwerte und Standardabweichungen des Fibroseanteils am Gesamtschnitt im L-LL in Prozent.

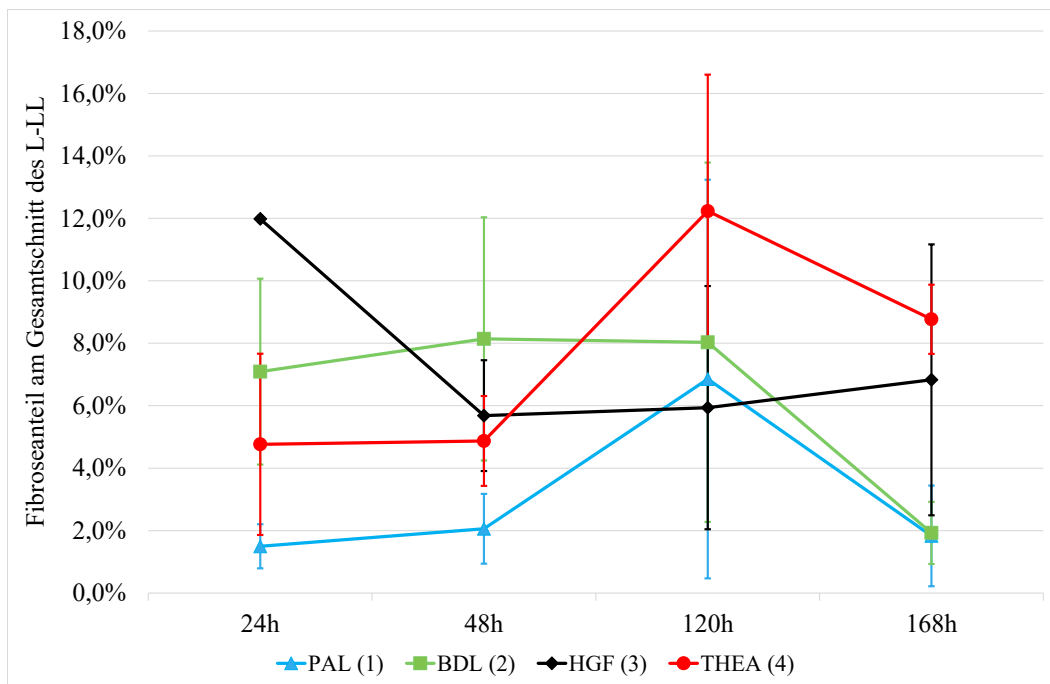


Abbildung 32: Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen des Fibroseanteils im L-LL in Prozent.

6 Diskussion

Die Applikation von Theaflavin bzw. HGF additiv zur Ligatur der Pfortader verspricht eine verbesserte Regeneration der cholestatischen Leber, da die Inflammation hierdurch gehemmt werden könnte und durch HGF die Proliferation der Hepatozyten gesteigert wird (Rauchfuß 2012, Song et al. 2011). Um diese These zu verifizieren, wurden die Daten von 63 Ratten, die einer PAL sowie einer vorhergehenden BDL unterzogen wurden, analysiert. Durch die Eingriffe wurde bei drei Gruppen eine chronische Cholestase induziert. Den beiden Interventionsgruppen wurde Theaflavin und HGF portalvenös verabreicht.

6.1 Ablauf des Experiments

Während der Durchführung des Experiments kam es zu Unregelmäßigkeiten bei der Tierverteilung. Aufgrund des Verlustes eines Tieres durch einen operationstechnischen Fehler und anschließenden Lieferengpässen bei der Tierbestellung konnten in Gruppe 3 für die Daten des 1. POD lediglich drei anstelle von vier Tieren in die Auswertung aufgenommen werden.

In Gruppe 2 mussten außerdem die Tiere, die am 7. POD geopfert werden sollten, aufgrund äußerer Gegebenheiten 24 h früher, also nach 144 h, geopfert werden. Für eine bessere Übersichtlichkeit werden die so generierten Daten im Folgenden dennoch mit 168 h bezeichnet. Da es sich bei Gruppe 2 jedoch nur um eine Kontrollgruppe handelt, stellt dies nur eine geringe Limitation der vorliegenden Arbeit dar. Die primäre Untersuchung der HGF bzw. THEA-Wirkung auf cholestatisches Lebergewebe wurde hierdurch nicht beeinflusst. Auch lässt sich mit den vorhandenen Daten dennoch eine Aussage über den Trend der Leberregeneration treffen, da die Leberregeneration nach fünf bis sieben Tagen nach einer Hemihepatektomie bei Ratten als abgeschlossen gilt (Michalopoulos 2007). Mit 144 h liegen die Daten somit im Zeitintervall der Leberregeneration.

Ursprünglich war bei der Planung des Experiments die Untersuchung von zwei weiteren Gruppen vorgesehen. Hier war zusätzlich zur Pfortaderligatur die Applikation von HGF geplant. Jedoch stellte diese Gruppe keine zwingende Kontrollgruppe dar, weil hierbei lediglich die Wirkung von HGF auf normales, nicht-cholestatisches Lebergewebe untersucht worden wäre. Eine weitere Gruppe sollte mit Perindopril, einem Angiotensin converting enzyme (ACE)-Hemmer, behandelt werden. Jedoch stellte sich in der weiteren Vorbereitung heraus, dass die Applikation von Perindopril schwierig durchzuführen ist, da der Wirkstoff von den Tieren über 21 Tage nach der BDL oral über eine Schlundsonde hätte appliziert werden müssen. Eine Alternative wäre die Applikation mit dem Trinkwasser gewesen, was eine Einzelkäfigunterbringung zur Messung der täglichen Trinkmenge des Einzeltieres mit sich gebracht hätte. Sowohl die tägliche Schlundsondierung als auch die Einzelunterbringung hätte in einer zu starken Gesamtbelastung für die Tiere, welche bereits zweimalig laparotomiert wurden, kulminiert, so dass sich gegen diese Art der Medikation, zu Gunsten des Tierwohls, entschieden wurde.

6.2 Methodendiskussion

Die Verwendung von Nagetiermodellen für Untersuchungen der Leber ist in der Forschung ein etabliertes Verfahren. Von Vorteil zeigen sich Mäuse und Ratten, da die artgerechte Haltung der Tiere sowie die Durchführung von Interventionen mit einem geringeren Aufwand als bei größeren Tieren wie Schweinen oder Schafen verbunden ist. Darüber hinaus sind die Grundstrukturen der Leber von Ratte und Mensch vergleichbar (Kogure et al. 1999).

Auch im Rahmen von Experimenten, bei denen die Effekte von Gallengangsligaturen (Johnstone und Lee 1976, Turk et al. 2016) und Pfortaderligaturen (Abreu et al. 2020, Furrer et al. 2008, Yamano et al. 2002) untersucht wurden, wurden Rattenmodelle häufig genutzt. Der Beobachtungszeitraum von sieben Tagen wurde gewählt, da die Leberregeneration bei Ratten innerhalb von fünf bis sieben Tagen als abgeschlossen gilt (Michalopoulos 2007).

HGF Die potente Wirkung von HGF auf die Proliferation des Lebergewebes ist seit den 1980er-Jahren bekannt (Matsumoto und Nakamura 1996). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die supportive HGF-Gabe bei der Pfortaderligatur tierexperimentell untersucht (Ueno et al. 1996, Rauchfuß 2012). Mangieri et al. (Mangieri et al. 2017) konnten beispielsweise mittels perioperativer HGF-Gabe ein erhöhtes Lebervolumen sowie eine schnellere Rekonstitution der Leberfunktion nach einer PAL erzielen.

Gallengangsligierte Mäuse, welchen HGF appliziert wurde, wiesen neben einer verminderten Leukozyteninvasion im Leberparenchym eine verminderte ICAM-1-Expression auf. Daraus resultierte eine geringere Nekrose (Li et al. 2007). Auch die Verwendung von HGF zur Hypertrophieinduktion sowie zur Therapie einer cholestatischen Leber bei Ratten oder Mäusen war bereits Gegenstand anderer Studien. Jedoch erfolgte diese HGF-Applikation hier meist bei einer akuten Cholestase. So wurde HGF zwei Tage nach der Cholestaseinduktion bei Yoshikawa et al. (Yoshikawa et al. 1998) injiziert. In einer anderen Arbeit wurde nach der Gallengangsligatur bei Mäusen rekombinantes humanes HGF (rhHGF) appliziert und die Tiere zwei bis sechs Tage später geopfert (Li et al. 2007). Kaido et al. (Kaido et al. 1999) lösten die Ligatur des Gallengangs drei Tage nach deren Durchführung wieder und verabreichten den Tieren über eine intraperitoneale Pumpe rhHGF. Die HGF-Applikation in chronisch cholestatisches Lebergewebe in Kombination mit einer Pfortaderligatur wurde jedoch bisher noch nicht durchgeführt. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit rhHGF über die Portalvene in die seit 26 Tagen cholestatische Leber injiziert. Diese Form des HGF wurde gewählt, da rekombinantes HGF die hepatozelluläre DNA-Synthese stärker stimuliert als humanes HGF (Fujiwara et al. 1993). Möglicherweise ist die Bolusgabe von HGF als problematisch zu betrachten, da HGF eine kurze Halbwertszeit in Bezug auf die Beobachtungsdauer von 168 h hat. Grund zu dieser Annahme besteht, da in vorangegangenen Arbeiten beispielsweise bereits fünf Minuten nach intravenöser Injektion von HGF in die V. jugularis von Ratten über 60% des exogen zugeführten HGF in der Leber nachgewiesen werden konnten (Ishii et al. 1995). In einer weiteren Arbeit konnte festgestellt werden, dass Hepatozyten 40% von *in vitro* an sie gebundenem HGF

bereits nach 30 Minuten internalisierten. Ferner waren 100 bis 120 Minuten nach dessen Aufnahme durch die Hepatozyten intrazellulär nur noch 50% des HGF nachweisbar (Naka et al. 1993). Dementsprechend wäre mit einer kontinuierlichen Applikation, beispielsweise mittels intraperitonealer (Kaido et al. 1999) oder intravenöser (Ishii et al. 1995) Pumpe eine konstante HGF-Wirkung über den gesamten Beobachtungszeitraum zu erreichen.

Jedoch muss auch angemerkt werden, dass die Applikation von HGF aufgrund seines fördernden Einflusses auf die Angiogenese, Zellwachstum und -motilität das Wachstum sowie die Invasion und Metastasierung des vorhandenen Lebertumors bewirken könnte (Matsumoto und Nakamura 1996). Eine Beteiligung von HGF/c-MET an pathologischen Mechanismen der Karzinogenese ist bisher beispielsweise bei Ovarial-, Magen- oder Lungenkarzinomen sowie Gliomen beobachtet werden (Faiella et al. 2022).

Theaflavin Aufgrund der Ergebnisse unterschiedlicher Studien verspricht Theaflavin durch seine Wirkung auf ICAM-1 einen positiven Einfluss auf die Hemmung der Inflammation im Leberparenchym während einer Cholestase (Song et al. 2011, Cai et al. 2006, Gosslau et al. 2011). Auch eine verminderten Fibrosebildung unter Theaflavingabe wurde beobachtet (Weerawatanakorn et al. 2015).

Die portalvenöse Applikation wurde bis *dato* nicht durchgeführt. In bisherigen Studien erfolgte eine orale (Weerawatanakorn et al. 2015), intraperitoneale (Shao et al. 2016) oder topische (Gosslau et al. 2011) Anwendung von Theaflavin bei Nagern. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine Komplikationen unter der portalvenöse Theaflavingabe. Es kam weder zu einer Zirrhosebildung oder Peritonitis, noch zu Wundheilungsstörungen. Im Vergleich mit Gruppe 2 wiesen sowohl die laborchemischen Parameter als auch die Tiergewichte keine Auffälligkeiten auf. Dementsprechend scheint die portalvenöse Theaflavingabe bei Ratten gut verträglich.

Zunächst erschien die Zusammensetzung der hergestellten THEA-Suspension kritisch, da sich das Theaflavin, welches in Pulverform vorlag, trotz vortexen, Inkubation und Zentrifugation nicht vollständig in NaCl lösen ließ. Somit wurden makroskopisch sichtbare Partikel in die Portalvene appliziert. Jedoch zeigten sich weder histologisch noch klinisch Auffälligkeiten, die auf Komplikation wie Gefäßverschlüsse oder Fremdkörperreaktionen hinwiesen.

Wurde Theaflavinextrakt beim Menschen oral verabreicht, konnte dessen Biotransformation durch das Mikrobiom im Gastrointestinaltrakt festgestellt werden. Die entstandenen Metabolite wiesen anti-inflammatorische und -oxidative Eigenschaften auf, ebenso wie protektive Effekte gegenüber der Arterioskleroseentstehung. Darüber hinaus wurde eine Apoptoseinduktion bei Colonkarzinomzellen beobachtet (Pereira-Caro et al. 2017). Die fördernde Wirkung der oralen Theaflavingabe auf cholestatisches Lebergewebe könnte somit Gegenstand weiterer Forschung sein.

PAL Wie eingangs erwähnt, wird im klinischen Alltag bevorzugt eine Embolisation der Pfortader (PVE) zur Hypertrophieinduktion durchgeführt. Im Gegensatz dazu kommt im tierexperimentellen Bereich meist eine Pfortaderligatur (PAL) zum Einsatz, da eine Embolisation aufgrund des geringen Gefäßdurchmessers bei Nagern schwer durchzuführen ist (Szijártó und Fülöp 2015). Außerdem ist bei der PAL eine gute Reproduzierbarkeit und Standardisierung des Eingriffs realisierbar, weil bei der Ratte jeder Leberlappen eine eigene Blutversorgung besitzt und somit eine Separation und Ligatur des entsprechenden Pfortaderastes gut möglich ist (Szijártó und Fülöp 2015). Die Entstehung porto-portaler Shunts wie beim Menschen ist daher praktisch ausgeschlossen. Bezüglich des Okklusionsgrades der Pfortaderligatur bei Ratten konnte herausgefunden werden, dass eine vollständige Okklusion im Vergleich zur partiellen Ligatur zur stärkeren Hypertrophie des nicht ligierten Leberlappens führt (Bilodeau et al. 1999).

Vergleicht man die PAL und PVE hinsichtlich ihrer Effektivität der Hypertrophieinduktion, lässt sich in der Literatur kein eindeutiger Konsens finden. Zum einen wurde bei der Gegenüberstellung der PAL und PVE bei Ratten deutlich, dass durch die PAL eine frühere und umfangreichere Hypertrophie induziert werden konnte (Szijártó und Fülöp 2015). Furrer et al. (Furrer et al. 2008) führten dies auf eine massive Inflammation mit Makrophagenakkumulation in Portalfeldern des okkludierten Lappens zurück, die auf einer Fremdkörperreaktion auf das Embolisat beruhte. Durch die vermehrte Ansammlung der Makrophagen im embolisierten Leberlappen mangelte es im nicht embolisierten Leberlappen, in welchem sie normalerweise als Trigger der Leberregeneration wirken, an diesen. In einer anderen Studie zeigten sich hingegen keine Unterschiede bezüglich der DNA-Synthese und Proliferation nach PVE oder PAL in der Rattenleber, allerdings wurde nach der PAL ein größeres Volumen des hypertrophierenden Leberlappens gemessen (Huisman et al. 2014).

Cholestaseinduktion Die in der Literatur aufgeführten Studien über Auswirkungen einer Cholestase bei Nagern beruhen in erster Linie auf der Induktion einer akuten Cholestase, da diese meist nur wenige Tage bestand, bevor die Tiere geopfert wurden (Mizuno et al. 1996, Gujral et al. 2004). Möglichkeiten zur Auslösung einer akuten intrahepatischen Cholestase sind die Endotoxin-, Östrogen- oder Medikamenten-Applikation. Mittels einer Gallengangsligatur kann hingegen eine extrahepatische Cholestase induziert werden (Rodriguez-Garay 2003).

Für eine sinnvolle Evaluation der Hepatozytenproliferation unter dem Einfluss einer chronischen Cholestase sollte diese für mindestens 14 Tage bestehen (Georgiev et al. 2008). Dondorf et al. (Dondorf et al. 2017) etablierten in ihrer Arbeit ein Modell zur Induktion einer chronischen Cholestase bei Ratten, ohne eine Zirrhosebildung zu provozieren. Dieses Modell kam in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung, da insbesondere die Prozesse im Rahmen einer chronischen Cholestase in dieser Arbeit von Bedeutung sind. Tritt eine Cholestase beim Menschen im Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung der Leber auf, handelt es sich hierbei bekanntermaßen um eine chronische und keine akute Cholestase (Dondorf et al. 2017). Tumorwachstum und -infiltration sind schleichende Prozesse und beeinträchtigen dementsprechend die Funktion des Lebergewebes nicht akut. Auch die Kompression oder Destruktion der abführenden Gallen-

wege erfolgt über Wochen. Somit kann nur durch die Induktion einer chronischen Cholestase ein Vergleichsmodell geschaffen werden, welches die Abläufe im menschlichen Körper unter einer tumorinduzierten Cholestase widerspiegelt.

Klinische Praxis Zwar kann durch die Portalvenenokklusion vielen Patienten mit Lebertumoren eine kurative Therapie ermöglicht werden, bezüglich der Anwendung der PVE im klinischen Alltag musste jedoch festgestellt werden, dass es zu einem Tumorprogress kolorektaler Metastasen in der Leber nach erfolgter Portalvenenembolisation kommen kann (Kokudo et al. 2001, Hoekstra et al. 2012). Als Therapieoption für diese Situation besteht die two-stage Hepatektomie. Hierbei erfolgt zunächst die Entfernung der sichtbaren Metastasen mit anschließender PAL oder PVE. Vier Wochen später folgt die Hemihepatektomie der betroffenen Leberhälfte (Clavien et al. 2007). Eine weitere Möglichkeit der Prävention dieses Tumorprogresses unter PVE ist die transarterielle Chemoembolisation (TACE), also die Embolisation der tumorversorgenden Arterie, die zu einer Tumornekrose führt (Ray et al. 2018).

Bei 30% der Patienten ist aufgrund dieses Tumorprogresses oder eines mangelnden Hypertrophieausmaßes keine Leberteileresektion möglich (Soll et al. 2013). Der zur Pfortaderligatur oder -embolisation additive Einsatz von HGF oder Theaflavin als hypertrophie-fördernde Substanzen könnte eine zusätzliche Option darstellen, den Zeitraum zwischen Pfortaderokklusion und Leberteileresektion zu verkürzen und somit die Wahrscheinlichkeit des Tumorprogresses zu reduzieren. Auch könnte die Verabreichung dieser Substanzen einer vermehrten Anzahl von Patienten künftig eine Leberteileresektion ermöglichen, wenn diese zuvor aufgrund eines mangelnden Hypertrophieausmaßes als inoperabel galten.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und in Beziehung zu den bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen gesetzt.

6.3.1 Körpergewicht

Die Ausgangsgewichte der Tiere wiesen nur eine geringe Streuung von $260,11 \pm 6,13$ g auf. Bei der Analyse des Körpergewichts stand vor allem dessen Dynamik im Vordergrund, da anhand dieser der Gesundheitszustand der Tiere und ihre Beeinträchtigung durch die operativen Eingriffe beurteilt wurde.

Gewicht nach BDL Nach erfolgter BDL verringerte sich das Körpergewicht der Tiere bis zum 2. und 3. POD. Anschließend kam es zu einem Anstieg des Körpergewichts, bis der zweite Eingriff durchgeführt wurde. Grund für den postoperativen Gewichtsverlust ist die Schwächung der Tiere durch die Operation. Diese führt zu einer verminderten Nahrungsaufnahme sowie geringerer Aktivität der Tiere. Eine ähnliche Dynamik zeigt sich auch in einer anderen Studie, bei der Mäuse einer BDL unterzogen wurden (Georgiev et al. 2008). Auch gallengangsligierte Ratten

wiesen postoperativ zunächst einen Gewichtsverlust auf, wobei diese nach vier Tagen wieder ihr Ausgangsgewicht erreichten (Schweizer et al. 1995). In einer weiteren Studie mit gleichem Aufbau erzielten die Tiere ab dem 15. POD das präoperative Körpergewicht (Dondorf et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wiesen die Tiere am 8. POD bzw. 9. POD wieder ihr initiales Gewicht auf. Möglicherweise ist der schnellere Gewichtszuwachs der Tiere in der vorliegenden Arbeit auf ihr geringeres Ausgangsgewicht zurückzuführen.

Gewicht nach PAL Der Verlauf des Körpergewichts zeigte auch nach der PAL einen Rückgang bis zum 2. POD bzw. 3. POD. Abreu et al. (Abreu et al. 2020) registrierten eine Gewichtsveränderung von ca. $-10,8\%$ sieben Tage nach erfolgter Pfortaderligatur bei Ratten. In der vorliegenden Arbeit war hingegen am 7. POD ein geringerer Gewichtsverlust zu verzeichnen (siehe Tabelle 6). Die erneute Gewichtszunahme innerhalb von drei Tagen liefert Hinweise auf eine angemessene Erholung der Tiere und eine ausreichende postoperative Schmerztherapie.

6.3.2 Leberfeuchtgewicht

Die Bestimmung des Lebergewichts stellt eine Möglichkeit dar, eine Aussage über das Ausmaß der Hypertrophie bzw. der Atrophie der Leber zu treffen. Diese Analysemethode ist bereits in diversen weiteren Studien etabliert (Schweizer et al. 1995, Abreu et al. 2020, Kountouras et al. 1984).

Gesamtlebergewicht Liegt eine alleinige Cholestase der Leber vor, konnte in vorangegangenen experimentellen Studien festgestellt werden, dass es zehn bzw. 21 Tage nach der Ligatur des Gallengangs bei Ratten zu einer Zunahme des Lebergewichts kommt (Kountouras et al. 1984, Dondorf et al. 2017). Ebendiese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit erzielt. Alle Gruppen, bei denen eine Cholestase vorlag, wiesen deutlich erhöhte Lebergewichte gegenüber Gruppe 1 auf. Als Ursache für die Gewichtszunahme der Leber nach einer BDL bei Mäusen ist die Gallengangsproliferation beschrieben (Geerts et al. 2008). Diese konnte auch in den histologischen Schnitten der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 17 und 19). Folglich unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diese Beobachtung. Nach einer PVE beim Menschen kommt es nicht zu signifikanten Veränderungen des Gesamtlebergewichts, da sich aufgrund des Hypertrophie-Atrophiekomplexes der Volumenzuwachs des nicht okkludierten Lappens und der Volumenverlust des okkludierten Leberlappens ausgleichen (Hayashi et al. 2009). Auch nach der Ligatur der Pfortader bei Ratten konnte dieser Effekt beobachtet werden (Schweizer et al. 1995).

Die Gewichtsentwicklung der Leber nach Okklusion der Pfortader stellt sich in der vorliegenden Arbeit wie folgt dar. Es konnte ein Anstieg des Lebergesamtwichts in allen Gruppen, außer in Gruppe 2, beobachtet werden. Bei dieser Gruppe veränderte sich das Lebergewicht nach der PAL kaum (siehe Abbildung 5).

Allerdings zeigte sich, dass das Gesamtlebergewicht der mit HGF und THEA behandelten Gruppen geringer als das der Gruppe 2 war. Auf eine verminderte Gallengangsbildung ist dies nicht

zurückzuführen (siehe Abbildung 17). Da keine Daten über das Lebergewicht vor der PAL vorhanden sind, kann in der vorliegenden Arbeit jedoch nur die zeitliche Entwicklung des Lebergewichts nach einer PAL beurteilt werden und keine Aussage im Vergleich zum Ausgangslebergewicht getroffen werden. Außerdem ist der direkte Vergleich des absoluten Lebergewichts zwischen den Gruppen nur eingeschränkt möglich, da die individuellen Unterschiede der Gewichte der Rattenlebern nicht berücksichtigt werden. Die LWBR bzw. die WWR sind deshalb für den direkten Vergleich besser geeignet.

LWBR Eine weitere Möglichkeit des Vergleichs von Gewichtsveränderungen der Leber ist die Ermittlung der LWBR. Hierbei wird das Lebergewicht auf das Gesamtkörpergewicht bezogen. Bei Betrachtung der LWBR wiesen bei Mueller et al. (Mueller et al. 2003) Rattenlebern mit ligierter Pfortader 24 h *post operationem* einen Anteil von knapp unter 4 % auf. Einen Tag später wurde mit 4 % das Maximum erreicht. In der vorliegenden Studie wurde bei der PAL-Gruppe mit $4,93 \pm 0,72\%$ das Maximum ebenfalls am 2. POD gemessen. In einer weiteren Arbeit, bei der 2/3 der Rattenleber pfortaderligiert wurden, wurde nach einem kurzen Anstieg bis 30 h postoperativ über 28 Tage hinweg eine Abnahme der LWBR registriert. In der gleichen Arbeit wurde die PAL ebenfalls mit einer BDL kombiniert. Bei diesen Tieren zeigte sich eine verminderte LWBR im Vergleich zu den lediglich pfortaderligierten Ratten (Schweizer et al. 1995). Steiner und Martinez (Steiner und Martinez 1961) beobachteten eine Abnahme der LWBR nach der PAL bei Ratten, die bis zehn Tage *post operationem* zwischen 3,2 – 3,8 % lag. Bei simultaner Cholestase wurde eine verminderte LWBR registriert. Auch nach erfolgter Teilhepatektomie unter Cholestase war der Gewichtszuwachs der Leber deutlich geringer als bei Kontrolllebern ohne Cholestase (Yokoyama et al. 2007).

Die in den genannten Studien beobachtete eingeschränkte LWBR-Entwicklung unter Cholestase zeigte sich ebenfalls in der vorliegenden Arbeit. Die LWBR der cholestatischen Gruppen lag stets unter jener der PAL-Gruppe, den 48 h-Wert der Gruppe 2 ausgenommen. Auch diese Daten unterstützen die bisherigen Erkenntnisse, dass die Leberregeneration unter Cholestase eingeschränkt ist (Yamano et al. 2002). Durch die Applikation von HGF wurde eine Steigerung der LWBR gegenüber Gruppe 2 erreicht. Das liefert Hinweise für die verbesserte Leberregeneration durch HGF. Theaflavin zeigte hingegen keinen fördernden Einfluss auf die LWBR (siehe Abbildung 6).

WWR Für die Beurteilung des Hypertrophie-Ausmaßes des NL-LL eignet sich die WWR, die den Anteil des nicht ligierten Leberlappens am Gesamtlebergewicht ausdrückt.

Im Allgemeinen kann durch die Ligatur der Pfortader eine Steigerung der WWR induziert werden, wie die folgenden Studien verdeutlichen. So konnte sieben Tage nach einer PAL bei Ratten ein Verhältnis des NL-LL zur Gesamtleber von 77,6 % beobachtet werden (Abreu et al. 2020). Ähnliche Ergebnisse finden sich in einer weiteren Arbeit. Sieben Tage nach dem gleichen Eingriff zeigte sich hier eine WWR von $81 \pm 1\%$ (Mizuno et al. 1996). In einer anderen Studie stellte sich eine Steigerung des Gewichtsverhältnisses des NL-LL zur Gesamtleber auf $59,7 \pm 4,4\%$

nach der PAL bei Ratten ein (Kaido et al. 1999). Bei der PAL-Gruppe der vorliegenden Studie wurde eine maximale WWR von $45,08 \pm 9,44\%$ nach sieben Tagen dokumentiert.

Die hypertrophie-fördernde Wirkung von HGF im Zusammenhang mit einer Pfortaderligatur bei Ratten wurde bereits mehrfach untersucht. Wurde pfortaderligierten Ratten über vier Tage HGF mittels einer intraperitonealen Pumpe verabreicht, zeichnete sich bei diesen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant gesteigerte WWR ab (Mangieri et al. 2017). Bei einem weiteren Experiment wurde eine reversible Cholestase über drei Tage induziert. Gleichzeitig zu dieser erfolgte eine PAL und bei einem Teil der Tiere eine kontinuierliche intraperitoneale HGF-Applikation. Bei diesen Tieren zeigte sich in der HGF-Gruppe eine WWR von $44,6 \pm 1,8\%$ am 2. POD und $59,2 \pm 3,5\%$ am 4. POD. Die PAL-Gruppe der gleichen Studie wies zu diesen Zeitpunkten Werte von lediglich $39,9 \pm 1,9\%$ bzw. $48,9 \pm 2,8\%$ auf. Somit konnte hier eine Steigerung der NL-LL-Hypertrophie durch die HGF-Gabe erreicht werden. Die DNA-Synthese war in diesen Tieren gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls deutlich gesteigert (Kaido et al. 1999). Eine gleichgerichtete Beeinflussung des NL-LL-Anteils am Gesamtlebergewicht wurde bei der Kombination von HGF mit einer Pfortaderligatur bei Ratten ersichtlich (Rauchfuß 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit fiel unter der Gabe von HGF eine Steigerung der WWR gegenüber der Gruppe 2 auf (siehe Abbildung 7). Diese Daten sind hinweisend dafür, dass HGF auch im chronisch cholestatischen Lebergewebe die Leberregeneration positiv beeinflusst und unterstützt die Ergebnisse vorangegangener Studien.

Die verminderte Hypertrophie unter Cholestase, die Kaido et al. (Kaido et al. 1999) beim Vergleich der WWR-Werte der cholestatischen Gruppe und der nicht-cholestatischen Gruppe beobachteten, zeigte sich auch in einer weiteren Studie. Wurde hierbei fünf Tage vor der PAL bei Ratten eine Cholestase durch eine BDL induziert, sank die WWR um 15% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mizuno et al. 1996). In beiden Fällen war somit die Hypertrophieinduktion unter einer akuten Cholestase deutlich eingeschränkt, wie auch Yokoyama et al. (Yokoyama et al. 2007) konstatierten.

Im klinischen Alltag liegt jedoch meist eine chronische Cholestase im Rahmen von Tumorerkrankungen vor. Ursachen für eine solche Tumor-induzierte Cholestase sind unter anderem Tumorthromben, eine Tumordinfiltration oder -kompression der Gallengänge oder eine Hämobilie (Qin und Tang 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine chronische Cholestase induziert, um dem klinischen Bild dieser tumorbedingten Cholestase am nächsten zu kommen. In der chronisch cholestatisch geschädigten Leber konnte eine ähnliche Entwicklung der WWR registriert werden wie im Rahmen einer akuten Cholestase. Gruppe 2 wies demnach gegenüber der PAL-Gruppe ab dem 2. POD deutlich reduzierte WWR-Werte auf (siehe Abbildung 7).

Doch finden sich in der Literatur auch gegenteilige Beobachtungen. Bei einer simultanen 90 %-Pfortader- und Gallengangsligatur lag die WWR der cholestatischen Leber stets über jener der Kontrollgruppe, die lediglich einer PAL unterzogen wurde (Ren et al. 2015). Allerdings wurde in dieser Arbeit eine akute Cholestase simultan und in einem deutlich größeren Leberanteil als in den Vergleichsarbeiten induziert.

Die größte WWR konnte in der vorliegenden Arbeit 120 h nach Theaflavingabe erreicht werden

und betrug $53,2 \pm 13,75\%$. Unabhängig vom Messzeitpunkt wurde bei dieser Gruppe 4 stets der größte Anteil des NL-LL am Gesamtlebergewicht registriert, was Hinweis auf eine ausgeprägte Proliferation der Hepatozyten sein könnte.

Beim Vergleich der WWR zeigt sich, dass die applizierten Substanzen tatsächlich eine erheblich verbesserte Regeneration der cholestatischen Leber bewirken können. Diese war in Gruppe 2 nahezu dauerhaft am geringsten (siehe Abbildung 7).

Eine Zunahme der WWR könnte auch auf eine gesteigerte Fibrosebildung und Gallengangsproliferation zurückzuführen sein, da diese Veränderungen typischerweise im Rahmen einer biliären Obstruktion auftreten (Schweizer et al. 1995). Ein paralleler Verlauf dieser morphometrischen Veränderungen und der WWR-Entwicklung war jedoch nur in Gruppe 2 hinsichtlich der Gallengangsproliferation zu beobachten (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 17).

Ligierter Leberlappen Die Okklusion der portalvenösen Versorgung eines Leberlappens hat dessen Atrophie zur Folge. Da simultan eine Hypertrophie des nicht ligierten Leberlappens auftritt, wird von einem Hypertrophie-Atrophiekomplex gesprochen (Schweizer et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei allen Gruppen, außer in Gruppe 2, ein Rückgang des Anteils des ligierten Leberlappens am Gesamtlebergewicht nach der Pfortaderligatur beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Erkenntnissen aus anderen Arbeiten überein. Mueller et al. (Mueller et al. 2003) verzeichneten eine kontinuierliche Abnahme des L-LL-Anteils über den Beobachtungszeitraum von 192 h nach erfolgter Pfortaderligatur bei Ratten.

In einer weiteren Arbeit wurden Ratten ebenfalls einer PAL, teilweise in Kombination mit einer BDL, unterzogen. Bei beiden Gruppen wurde eine Abnahme des Anteils des ligierten Leberlappens an der Gesamtleber deutlich. Ursächlich für den Gewichtsverlust des L-LL scheint die abnehmende Hepatozytenfraktion mit gleichzeitiger Zunahme der Fibrose und Gallengänge zu sein (Schweizer et al. 1995). Diese gesteigerte Fibrosebildung wurde auch in der vorliegenden Arbeit bis 120 h postoperativ in den Gruppen 1, 2 und 4 registriert (siehe Abbildung 32).

Hinsichtlich der Entwicklung des L-LL-Anteils am Gesamtlebergewicht unter Cholestase finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Ratten, bei welchen die Pfortader und teilweise simultan der Gallengang ligiert wurde, zeigten ein erhöhtes Gewicht des ligierten Lappens der cholestatischen Lebern gegenüber der Kontrollgruppe (Weinbren und Ghorpade 1962). Eine andere Arbeit, bei der Ratten einer PAL mit gleichzeitiger BDL unterzogen und über sieben Tage beobachtet wurden, ergab gegenteilige Ergebnisse. Hier wurde eine Zunahme des prozentualen Anteils des nicht ligierten Leberlappens und eine Abnahme des ligierten Leberlappens nachgewiesen (Ren et al. 2015). Ähnliche Resultate der simultanen Gallengangs- und Pfortaderligatur finden sich in einer weiteren Arbeit (Steiner und Martinez 1961).

Der erhöhte Anteil des ligierten Leberlappens der Gruppe 2 in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur PAL-Gruppe könnte auf eine Schwellung durch die vorliegende Cholestase zurückzuführen sein. Um die Prozesse im ligierten, cholestatischen Leberlappen genauer nachvollziehen zu können, bedarf es jedoch weiterer Studien.

6.3.3 Laborchemische Untersuchungen

Cholestaseparameter Bei Betrachtung der Cholestaseparameter (Gesamtbilirubin und direktes Bilirubin, AP) war festzustellen, dass die Tiere unter THEA-Applikation meist die geringsten Gesamtbilirubinwerte aufwiesen, die sogar unter jenen von Gruppe 1 lagen. Aus vorausgehenden Studien ist bekannt, dass es durch eine BDL zunächst zur Erhöhung der Cholestaseparameter kommt, da der Galleabfluss behindert ist (Yamano et al. 2002, Georgiev et al. 2008, Dondorf et al. 2017). Yamano et al. (Yamano et al. 2002) unterzogen Ratten einer BDL. Sieben Tage später erfolgte bei einem Teil der Tiere eine zusätzliche PAL. Bei weiteren, bisher unbehandelten Tieren wurde zu diesem Zeitpunkt nur die Pfortader ligiert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet und in gewissen zeitlichen Abständen geopfert. Bei der PAL-Gruppe dieser Studie wurde eine Bilirubinkonzentration registriert, die über die gesamte Beobachtungszeit hinweg unter 0,2 mg/dl ($= 3,4 \mu\text{mol/l}$) lag. Auch in der vorliegenden Arbeit stieg weder die Gesamtbilirubin- noch die direkte Bilirubinkonzentration bei der PAL-Gruppe über $3 \mu\text{mol/l}$. Die Tiere, bei denen eine BDL erfolgte, zeigten bei Yamano et al. (Yamano et al. 2002) eine Bilirubinkonzentration von 5,7 mg/dl ($= 96,9 \mu\text{mol/l}$) nach sieben Tagen unter Cholestase. Im weiteren Verlauf der 21 Tage stieg diese bis auf 7 mg/dl ($= 119 \mu\text{mol/l}$) an, wobei sich die Werte der BDL und PAL+BDL Gruppen nicht signifikant unterschieden. Auch Georgiev et al. (Georgiev et al. 2008), die am murinen Modell die Veränderungsprozesse der cholestatischen Leber untersuchten, stellten eine steigende Konzentration des direkten und indirekten Bilirubins bis zum 7. POD nach der BDL fest. Diese hohen Werte konnten bis 45 Tage nach der Ligatur gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Arbeit ein Rückgang der Bilirubinkonzentration 14 Tage nach Ligatur und zusätzlicher Durchtrennung des Gallengangs bei Ratten deutlich (Kountouras et al. 1984).

Da im hier beschriebenen Experiment die erste Messung der Bilirubinkonzentration am 26. Tag nach der BDL erfolgte, kann keine Aussage über die Dynamik der Cholestaseparameter vor diesem Zeitpunkt getroffen werden. Allerdings kann anhand der Normwerte für das Gesamtbilirubin (Normwerte Gesamtbilirubin: 3,42 – 10,26 $\mu\text{mol/l}$, Umrechnung von mg/dl in $\mu\text{mol/l}$; Normwerte siehe Anhang) konstatiert werden, dass im Zeitraum ab der PAL keine Hyperbilirubinämie vorlag (siehe Tabelle 11). Eine mögliche Erklärung für die niedrige Bilirubinkonzentration mehrere Tage nach einer BDL liefern Wright und Braithwaite (Wright und Braithwaite 1964). Sie gehen von einer wiederhergestellten biliären Drainage durch die Bildung von Kollateralen und somit einem Bypass der Ligatur aus. Diese neuen Gallengänge bildeten sich zwischen dem 7. und 12. POD aus.

Ein weiterer Cholestaseparameter ist die AP (Herold 2012). Diesbezüglich wurde in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass die Aktivität der AP jederzeit im normwertigen Bereich lag (Normwerte AP: 4,12 – 8,92 $\mu\text{mol/(ls)}$, Umrechnung von IU/l in $\mu\text{mol/(ls)}$; Normwerte siehe Anhang). In den cholestatischen Gruppen wurde stets eine geringere Aktivität der AP als in Gruppe 1 registriert. Grund hierfür könnte das leicht differierende Alter der Tiere sein. Die erste Blutprobe wurde bei den cholestatischen Gruppen 26 Tage nach der BDL und somit über drei

Wochen später als bei Gruppe 1 entnommen.

Auffällig war außerdem, dass die Aktivität der AP nach Durchführung der PAL in allen Gruppen zunächst reduziert war und über den Beobachtungszeitraum wieder anstieg, ohne den Ausgangswert vor der PAL zu erreichen. In anderen Studien wurde ein gegenteiliger Verlauf beobachtet. Hier kam es direkt nach der PAL zum Anstieg der AP. Am 7. POD wurde das Ausgangsniveau wieder erreicht (Bülbüloğlu et al. 2005, Takeuchi et al. 1996). Ob und in welcher Form die vorliegende chronische Cholestase Grund für diesen abweichenden Verlauf ist, könnte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Georgiev et al. (Georgiev et al. 2008) registrierten bei gallengangsligierten Mäusen zunächst einen deutlichen Anstieg der AP und führten dies auf die akute Leberschädigung zurück. Nach einem kurzen Abfall am 7. POD konnte über 45 Tage hinweg ein stetiger Anstieg über den präoperativen Wert hinaus gemessen werden. Da in der vorliegenden Arbeit Messwerte vor der BDL fehlen, kann nur eine Aussage über die Aktivität der AP 26 Tage nach der BDL und nicht über die Dynamik während dieses Zeitraums getroffen werden. Im Vergleich mit den Normwerten wurde in den cholestatischen Gruppen zu diesem Zeitpunkt keine Erhöhung der AP in der vorliegenden Arbeit deutlich.

Die unter HGF-Applikation verminderte Hyperbilirubinämie, die in einer vorausgegangenen Studie beobachtet wurde (Yoshikawa et al. 1998), zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass keine Hyperbilirubinämie auftrat. Zum anderen erfolgte in der genannten Arbeit bereits 96 Stunden nach der Cholestaseinduktion mittels α -Naphthyl-Isothiocyant die Opferung der Tiere (Yoshikawa et al. 1998). Dementsprechend könnte die hemmende Wirkung von HGF auf eine Hyperbilirubinämie vor allem im akuten cholestatischen Zustand von Nutzen sein. Theaflavin beeinflusste den Gesamtbilirubinverlauf dagegen positiv und könnte somit die Folgen einer chronischen Cholestase abmildern. Insbesondere am 2. POD wurde auch die direkte Bilirubinkonzentration durch THEA gegenüber Gruppe 2 reduziert.

Der Anstieg des Bilirubins nach der PAL bei allen Gruppen, außer in Gruppe 2, spiegelt die Dynamik der Cholestaseparameter von Patienten wider, bei denen eine PVE erfolgte. Bei diesen konnten drei Tage nach der PVE signifikant erhöhte Werte des Bilirubins beobachtet werden (Hayashi et al. 2009).

Leberzellschädigung Einen Hinweis auf eine vorliegende Leberzellschädigung liefern die Parameter ALAT und ASAT. Diese wurden sowohl vor als auch nach erfolgter PAL gemessen. Auffällig waren hier die 24 h-Werte der Gruppe 1. Beide Enzyme waren massiv um das 25-Fache (ALAT) bzw. das 15-Fache (ASAT) gegenüber dem präoperativen Wert erhöht (siehe Abbildungen 12 und 13). Diese hohen Werte weisen auf eine starke Leberzellschädigung hin, welche sich in der histologischen Untersuchung bestätigte. Im Lebergewebe des ligierten Leberlappens lag eine ausgeprägte Nekrose vor (siehe Abbildung 29). Dieses Ergebnis ist konform mit der bisherigen Studienlage. Bekanntlich wird 24 bis 48 Stunden nach erfolgter Pfortaderligatur das Maximum der zentrilobulären Nekrose erreicht, was mit dem Transaminasenanstieg im Blut

korreliert (Szijártó und Fülöp 2015). Die zentrilobuläre Lokalisation der Nekrose ist dabei auf die erhöhte Sensitivität der dortigen Hepatozyten gegenüber ischämischen Zuständen zurückzuführen (Bilodeau et al. 1999). Eine ähnliche Dynamik der ASAT-Aktivität war bei Mizuno et al. (Mizuno et al. 1996) zu finden. 24 h nach der Ligatur der Pfortader bei Ratten kam es hier zu einem Anstieg der ASAT auf über 3500 U/l und anschließend zu einer Abnahme, sodass am 5. POD keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe mehr registriert werden konnten. Die Tiere, bei denen fünf Tage zuvor eine Gallengangsligatur erfolgte, wiesen nach der PAL ebenfalls einen Anstieg der ASAT auf, jedoch deutlich geringer als die PAL-Gruppe. Dieser Verlauf konnte auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Nach Durchführung der PAL kam es 24 h *post operationem* bei den Gruppen 2, 3 und 4, bei denen eine Cholestase vorlag, lediglich zu einem Anstieg um durchschnittlich das 1,79-Fache (ALAT) bzw. 1,73-Fache (ASAT). Zwar finden sich in anderen Arbeiten (Bilodeau et al. 1999, Furrer et al. 2008) die Maxima der Transaminasenaktivität nach der Pfortaderligatur bei Ratten ebenfalls zwischen 24 h und 48 h *post operationem*, jedoch sind die Werte deutlich geringer als in der vorliegenden Arbeit. Bei Betrachtung der Transaminasenaktivität nach der PVE beim Menschen im Rahmen der CCC-Therapie wurde ebenfalls ein Anstieg auf maximal das Dreifache beobachtet. Nach sieben Tagen wurden die Ausgangswerte wieder erreicht (Ebata et al. 2012). Bezüglich der Beeinflussung der Transaminasen durch Theaflavin gibt es keine Vergleichsstudien. Allerdings wurde bei der Gegenüberstellung von ICAM-1-defizienten Mäusen mit Wildtyp-Mäusen drei Tage nach der BDL eine um 65 % reduzierte ALAT-Aktivität beobachtet (Gujral et al. 2004). Da THEA die Expression von ICAM-1 reduziert (Cai et al. 2006) und somit die Leukozyteninvasion vermindert wird, könnte Theaflavin über diesen Mechanismus die Transaminasenaktivität senken. Dieser Effekt einer verminderten Transaminasenaktivität konnte in der vorliegenden Arbeit bis 24 h nach der Pfortaderligatur beobachtet werden. Eine geringere Beeinflussung im Vergleich zu den beschriebenen Ergebnissen (Gujral et al. 2004) könnte auf die hier bestehende, chronische Cholestase zurückzuführen sein.

Syntheseparameter Die Bestimmung der Syntheseparameter diente der Analyse der Leberfunktion. Hierfür wurden die Albuminkonzentration und die Cholinesteraseaktivität im Blut der Tiere bestimmt. Betrachtet man die Werte der Cholinesterase, so zeigte sich in Gruppe 2 eine verminderte Aktivität. Im Vergleich dazu waren die Werte der Gruppe 1, bei welcher keine Cholestase vorlag, deutlich höher (siehe Abbildung 15). Auch bei der Messung der Albuminkonzentration ließ sich dies feststellen, was auf eine eingeschränkte Leberfunktion unter Cholestase schließen lassen kann. Allgemein zeigte sich bei allen Gruppen nach einem leichten Rückgang 48 h nach der PAL eine Steigerung der Syntheseleistung der Leber.

Die unter Cholestase eingeschränkte hepatische Syntheseleistung konnte auch von Dondorf et al. (Dondorf et al. 2017) anhand eines verminderten Albuminspiegels nach der BDL bei Ratten registriert werden. Erst nach über 28 Tagen *post operationem* wurde der Albuminwert der Kontrollgruppe erreicht.

In einer anderen Studie wurde die mRNA-Konzentration von Albumin nach einer PAL bei Rat-

ten gemessen. Diese war kurz nach dem Eingriff reduziert. Nach 24 h waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Interventions- und Kontrollgruppe mehr feststellbar (Mueller et al. 2003). Bei Betrachtung der Leberfunktion nach erfolgter PAL bei Ratten und einer additiven intraperitonealen HGF-Gabe wurde eine schnellere Wiederherstellung der Leberfunktion deutlich. Die Indocyaningrün-Elimination, mit welcher die Leberfunktion beurteilt wurde, erreichte bei der Interventionsgruppe nach 2,83 Tage und bei der Kontrollgruppe nach 6,13 Tage die Normwerte (Mangieri et al. 2017).

Die Applikation von Theaflavin schien eine positive Auswirkung auf die Syntheseleistung der Leber zu haben, da sowohl die Albuminspiegel als auch die Cholinesteraseaktivität im Vergleich zu Gruppe 2 deutlich verbesserte Werte aufzeigten (siehe Abbildungen 14 und 15). Eine positive Beeinflussung der Syntheseleistung der cholestatischen Leber konnte auch bei der HGF-Gruppe bei der Cholinesteraseaktivität beobachtet werden.

6.3.4 Histologie

Gallengänge Es ist bekannt, dass es unter einer chronisch obstruktiven Cholestase zur Proliferation der Cholangiozyten der Gallengänge kommt. Auch hepatische Progenitorzellen oder Ovalzellen, welche eine Transformation zu Cholangiozyten durchlaufen, sind an der Bildung neuer Gallengänge beteiligt (Rajapaksha et al. 2019). Eine solche Zunahme der Gallengänge in Portalfeldern nach einer BDL beobachteten auch andere Arbeitsgruppen (Dondorf et al. 2017, Rodriguez-Garay 2003, Kountouras et al. 1984). Die Gallengangsproliferation nach einer BDL bei Mäusen wurde beispielsweise mithilfe eines Zytokeratin-Antikörpers, der Gallengangsepithelzellen markierte, deutlich. Die Anzahl der Gallengänge in den Portalfeldern stieg ab dem 2. POD und hielt bis zum 14. POD an. Durch die Verwendung eines Ki67-Antikörpers konnten auch die proliferierenden Gallengangsepithelzellen direkt dargestellt werden. Die vermehrte Teilung der Zellen erfolgte vor allem zwei bis drei Tage nach der BDL in den großen Gallengängen und hielt in geringerem Ausmaß bis 45 Tage postoperativ an (Georgiev et al. 2008). Yamano et al. (Yamano et al. 2002) konnten eine Zunahme an Gallengängen in den Portalfeldern nach einer BDL in Kombination mit einer PAL erkennen, jedoch erfolgte die Ligatur der Pfortader hier bereits sieben Tage nach jener des Gallengangs.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine gesteigerte Anzahl an Gallengängen nach der Cholestaseinduktion ebenfalls deutlich. Im Vergleich zu den anderen Gruppen wies die PAL-Gruppe stets die geringste Anzahl auf (vgl. Abbildungen 17 und 19). Dennoch ist auch bei dieser Gruppe eine leichte Zunahme der Gallengänge bis 120 h zu beobachten. Dies ist konform mit Ergebnissen aus einer vorangegangenen Untersuchung, bei welcher ebenfalls eine PAL bei Ratten durchgeführt wurde (Schweizer et al. 1995).

Beim Vergleich der ligierten und nicht ligierten Leberlappen fiel außerdem eine erhöhte Gallengangsanzahl in den von der portalvenösen Blutzufuhr abgetrennten Leberlappen auf. Gleiches wurde in einer Studie von Weinbren und Ghorpade (Weinbren und Ghorpade 1962) beobachtet, bei der Ratten entweder nur einer PAL oder zusätzlich einer BDL unterzogen wurden.

Die intraperitoneale Applikation von HGF nach reversibler BDL resultierte in einer gehemmten Gallengangsbildung (Kaido et al. 1999). Diese hemmende Wirkung von HGF auf die Bildung neuer Gallengänge konnte in der durchgeführten Studie nicht bestätigt werden. Die Anzahl der Gallengänge in Gruppe 3 lag über jener der BDL-Gruppe sowohl im ligierten als auch im nicht ligierten Leberlappen. Ursächlich für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die abweichende Dauer der Cholestase in den beiden Studien sein. Möglicherweise entfaltet HGF insbesondere in der akuten Phase der Cholestase seine antiproliferative Wirkung auf die Gallengangsepithelzellen. Darüber hinaus erfolgte in der Vergleichsarbeit die HGF-Gabe kontinuierlich über zwei oder vier Tage mit einer Laufrate von $1\mu\text{g/h}$. Dementsprechend war die Dosis der 96 h-Gruppe deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit.

Unter Theaflavingabe stellte sich ein ähnliches Bild dar. Nur 48 h postoperativ konnte in dieser Gruppe eine geringere Gallengangsanzahl als in Gruppe 2 beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen folglich nicht für eine Hemmung der Gallengangsproliferation durch Theaflavin oder HGF. Dies korreliert weitestgehend mit dem Verlauf des direkten Bilirubins, welcher durch die Wirkstoffgabe nicht wesentlich beeinflusst wurde. Allerdings wiesen die Bilirubinwerte nicht auf eine Hyperbilirubinämie hin.

Leukozyteninfiltration Die Akkumulation von Leukozyten in der Leber kann bei verschiedenen Arten der Leberzellschädigung beobachtet werden. Ist diese beispielsweise durch Endotoxine induziert, akkumulieren die inflammatorischen Zellen in erster Linie in den Sinusoiden (Jaeschke und Smith 1997). Unter Cholestase ist eine Leukozyteninvasion ebenfalls typisch und geht mit der Extravasation dieser Zellen in das Lebergewebe einher, was in verschiedenen Studien an gallengangsligierten Mäusen gezeigt werden konnte (Allen et al. 2011, Gujral et al. 2003). So lag eine 40-fache Steigerung der Anzahl der Leukozyten im Leberparenchym drei Tage nach der Gallengangsligatur gegenüber der Kontrollgruppe vor (Gujral et al. 2003). Vergleicht man in der vorliegenden Untersuchung die cholestatische Gruppe 2 und die nicht cholestatische Gruppe 1, wird ein maximaler Anstieg der Leukozyten auf das Vierfache zwei Tage nach der PAL in der Läppchenperipherie im nicht ligierten Leberlappen deutlich. Dementsprechend war auch hier eine vermehrte Leukozytenakkumulation unter Cholestase erkennbar. Allerdings erreichte diese nicht das Ausmaß wie bei Gujral et al. (Gujral et al. 2003). Der verminderte Invasionsgrad ist vermutlich auf die Dauer der Cholestase zurückzuführen, da diese in der Vergleichsarbeit lediglich drei Tage bestand. Diese abnehmende Leukozyteninvasion mit Voranschreiten der Zeit der Cholestase konnten auch in einer anderen Arbeit beobachtet werden. Bei dieser lag eine chronische Cholestase bei Ratten vor. Hierbei konnte 14 Tage nach der BDL ein Rückgang der portalen Leukozyteninfiltration festgestellt werden (Dondorf et al. 2017). Somit ist vor allem in der akuten Phase der Cholestase von einer Zunahme der Leukozyten in der Leber auszugehen, was als akute Inflammation nach Cholestaseinduktion angesehen werden kann. Die portale Infiltration erfolgt in erster Linie über die portalen Venolen (Gulubova 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dies deutlich, da ein erhöhter Infiltrationsgrad der Portalfelder gegenüber der Läppchenperipherie in allen Gruppen sichtbar war (siehe Abbildung 21 und 23).

ICAM-1 spielt als Adhäsionsmolekül bei der Leukozytenrekrutierung in die geschädigte Leber eine zentrale Rolle (Selzner et al. 2003). Beim Vergleich von Wildtyp- und ICAM-1-defizienten Mäusen drei Tage nach BDL akkumulierten Leukozyten bei den Wildtyp-Mäusen vor allem in den Sinusoiden und portalen Venolen, gefolgt von einer Extravasation in das Parenchym bzw. die Portalfelder (Gujral et al. 2004). Im Gegensatz dazu wiesen die ICAM-1-defizienten Tiere eine um 65 % geringere Akkumulation neutrophiler Granulozyten auf, wobei hiervon nur 15 % in das Leberparenchym übertraten. Somit wurde die Extravasation neutrophiler Granulozyten bei ICAM-1-defizienten Mäusen um 90 % reduziert (Gujral et al. 2004). Vergleicht man die Kontrollgruppe mit den gallengangligierten Tieren, wurde eine 145-fach erhöhte Neutrophilen-Akkumulation in den Portalfeldern nach BDL deutlich, wobei hiervon nur 12 % intravasal lokalisiert waren. Bei ICAM-1-defizienten Mäusen konnte die Akkumulation um 77–80 % reduziert werden (Gujral et al. 2004). Eine ähnliche Entwicklung zeichnete sich in der vorliegenden Arbeit unter Theaflavin-Gabe ab. Bei dieser Interventionsgruppe akkumulierten nach Applikation ab 48 h weniger Leukozyten in der Lappchenperipherie und ab 120 h periportal weniger Entzündungszellen als in Gruppe 2.

Eine verminderte periduktale Leukozyteninfiltration wurde ebenfalls in cholestatischen Lebern von Ratten unter intraperitonealer HGF-Gabe beobachtet (Kaido et al. 1999). Auch nach einer chemisch induzierten Cholestase konnte durch HGF-Applikation ein abgemilderter Inflamationsprozess beobachtet werden (Yoshikawa et al. 1998). Hier wurde insbesondere eine reduzierte periportale Infiltration durch Entzündungszellen sowie ein Rückgang der Ödembildung erzielt. Diese Ergebnisse sind konform mit den erfolgten Analysen. Unter HGF-Gabe wurde eine verminderte periportale und periphere Invasion von Leukozyten bereits nach 48 h deutlich (siehe Abbildungen 22 und 23).

Schlussendlich weisen diese Beobachtungen daraufhin, dass sowohl HGF als auch Theaflavin das Entzündungsgeschehen im Rahmen einer Cholestase hemmt und somit dessen negativen Einfluss auf die Leberregeneration minimiert.

Nekrose Bei einer Cholestase kann es durch die Detergenswirkung der Gallensäuren zur akuten Leberzellschädigung kommen und somit eine Nekrose entstehen (Böcker 2012). Ein weiterer Auslöser der cholestatischen Zellschädigung sind die eingewanderten Leukozyten, welche zytotoxische ROS bilden, die das Leberparenchym angreifen (Gujral et al. 2003). Der Untergang von Hepatozyten konnte bereits drei Tage nach der BDL in Mäusen beobachtet werden (Gujral et al. 2003). Bestand eine obstruktive Cholestase bei Ratten über längere Zeit, stieg der Nekroseanteil in den ersten zwei Wochen postoperativ an (Dondorf et al. 2017). Da der Nekroseanteil des nicht ligierten Leberlappens in der Gruppe 2 über jenem der PAL-Gruppe lag, konnte somit in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine verstärkte Nekrosebildung unter Cholestase beobachtet werden (siehe Abbildung 28).

Doch nicht nur die Cholestase führt zum Verlust der Hepatozyten, auch durch eine Pfortaderligatur tritt eine vermehrte Nekrosebildung und Apoptose im ligierten Leberlappen auf (Mueller et al. 2003). Dies zeigte sich bevorzugt perizentral nach der PAL bei Ratten und korrelierte mit

den Blutwerten der ALAT (Bilodeau et al. 1999). Auch Steiner und Martinez (Steiner und Martinez 1961) kamen zu diesem Ergebnis, nachdem sie bei Ratten die Pfortader ligierten. Das größte Nekroseausmaß verzeichneten sie zwei Tage nach dem Eingriff, ebenfalls bevorzugt in Bereich der Zentralvenen. Gleiches stellte sich in der vorliegenden Arbeit heraus. Im ligierten Leberlappen der Gruppe 1 wurde eine massive Nekroseentwicklung bis 120 h postoperativ sichtbar (siehe Abbildung 29). Auch die ALAT- und ASAT-Werte waren zu diesen Zeitpunkten deutlich erhöht und spiegelten somit diesen Zelluntergang wider (siehe Abbildungen 12 und 13). Die unter Cholestase deutlich verminderte Nekrose könnte dabei ein Hinweis auf eine eingeschränkte Reaktionsfähigkeit des Lebergewebes auf den veränderten portalvenösen Fluss sein.

Die zytoprotektiven Eigenschaften von HGF wurden bereits in vorangegangenen Studien beschrieben. So konnte bei Ratten durch die Implantation von HGF-synthetisierenden Fibroblasten in die Milz eine durch Tetrachlormethan hervorgerufene Leberzellschädigung klar abgeschwächt werden. Diese Intervention resultierte in einer stark reduzierten Nekrose in der Leber sowie erniedrigten ALAT- und ASAT-Werte im arteriellen Blut (Kaido et al. 1997). Bei der Behandlung mit rhHGF zusätzlich zur BDL zeigte sich bei Mäusen zwei und sechs Tage postoperativ ein um 33% verminderter Nekrose-Score (Li et al. 2007). Darüber hinaus konnte eine anti-apoptotische Wirkung durch einen HGF-Genstransfer in zirrhotische Rattenlebern beobachtet werden. Die Zirrhose wurde dabei durch eine drei- bis fünf-wöchige Dimethylnitrosaminapplikation induziert. Nach einer Latenz von 72 h nach dem Genstransfer erfolgte eine partielle Hepatektomie und im Anschluss eine weitere Dimethylnitrosamingabe. Neben der Hochregulation der Expression des anti-apoptotischen Leberproteins Bcl-x1 wurde eine verbesserte Überlebensrate bei der Interventionsgruppe erfasst (Nishino et al. 2008). Eine positive Beeinflussung der Nekroseentwicklung durch HGF zeigte sich in der vorliegenden Arbeit zwischen 48 und 120 h. In diesem Zeitraum fiel der Nekroseanteil im nicht ligierten Leberlappen in Gruppe 3 unter den von Gruppe 2.

Auch Theaflavin beeinflusste die Nekroseentwicklung im NL-LL. Nach 48 h kam es zur Reduktion der Nekrose im Vergleich zu Gruppe 2 (siehe Abbildung 28). Diese Beobachtung unterstützt die bisherigen Erkenntnisse über Theaflavin, dessen zytoprotektiver Effekt mehrfach beschrieben wurde. Bislang fehlen direkt vergleichbare Studien zur Wirkung von Theaflavin auf die Nekrosebildung im Rahmen einer Cholestase. Jedoch konnte bisher festgestellt werden, dass unter Theaflavin die zytotoxische Wirkung von intrazellulären ROS, induziert durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), abgemildert werden kann (Feng et al. 2002). Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, beispielsweise aus H_2O_2 , durch Leukozyten kann im Entzündungsprozess zu Gewebenekrosen führen (Böcker 2012). Außerdem hemmte Theaflavin die LPS-induzierte NF- κ B-DNA-Bindung und demnach die Aktivierung proinflammatorischer Gene, insbesondere von ICAM-1, in intestinalen Rattenepithelzellen (Song et al. 2011). Dieses intrazelluläre Adhäsionsmolekül ist wiederum an der Leukozytenrekrutierung in die cholestatisch geschädigte Leber beteiligt (Selzner et al. 2003). Auch bei der durch Tetradecanoylphorbol-acetat induzierten Inflammation in Caco-2 humanen Colonkarzinomzellen wurde die Expression von NF- κ B und ICAM-1 durch Theaflavin herab reguliert (Gosslau et al. 2011). Beide Gene sind auch unter

Cholestase vermehrt exprimiert (Song et al. 2011). Zusammenfassend stellt Theaflavin somit eine zytoprotektive Wirkung auf cholestatisch geschädigte Hepatozyten in Aussicht.

Fibrose Liegt eine Cholestase über längere Zeit vor, ist eine Zunahme von Bindegewebe im Lebergewebe zu beobachten (Allen et al. 2011). Diese vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix (EZM) ist eine hepatische Reaktion auf eine Zellschädigung und tritt nach Entzündungsprozessen oder als Teil von Reparationsmechanismen auf (Böcker 2012). Dabei erfolgt die EZM-Synthese durch unterschiedliche Zellen (Xia et al. 2006). Einerseits bilden durch die Cholestase aktivierte Sternzellen in den Portalfeldern vermehrt extrazelluläre Matrix. Zum anderen tragen portale Myofibroblasten zur Bindegewebssynthese bei (Rajapaksha et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde eine vermehrte EZM-Synthese in den cholestatischen Lebern gegenüber der Gruppe 1 deutlich (siehe Abbildungen 31 und 32).

Diese Entwicklung zeigte sich auch in anderen Studien. Georgiev et al. (Georgiev et al. 2008) registrierten 14 Tage nach der BDL ein Maximum des Fibroseanteils im Lebergewebe bei Mäusen, wohingegen die Kontrollgruppe keine Fibroseentwicklung aufwies. In einer anderen Arbeit, bei der ebenfalls durch eine BDL eine Cholestase induziert wurde, kam es zu einem Anstieg des Bindegewebsanteils der Rattenleber. Nach 28 Tagen traten die für eine Leberzirrhose typischen Anzeichen, wie beispielsweise der noduläre, fibröse Umbau des Leberparenchyms, auf (Kountouras et al. 1984). Solche zirrhotischen Prozesse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Es traten lediglich vereinzelt portale Bindegewebssepten auf, deren Bildung bereits zuvor beobachtet wurde (Böcker 2012).

Die vermehrte Bindegewebssynthese in den ligierten Leberlappen im Vergleich zu den nicht ligierten, die in allen Gruppen erkennbar war, konnte auch durch Shrestha et al. (Shrestha et al. 2014) nachgewiesen werden. Ratten, bei denen eine PAL eine Woche nach der Gallengangsembolisation durchgeführt wurde, wiesen eine deutlich erhöhte Kollagen I Expression sowie eine gesteigerte Fibroserate im ligierten Leberlappen auf.

Unter HGF-Plasmid-Applikation zeigte sich eine abgemilderte Bildung von Kollagen in gallengangligierten und somit cholestatischen Mäuselebern (Xia et al. 2006). Dieser positive Einfluss der HGF-Applikation konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Die HGF-Gruppe wies, bis auf eine Ausnahme, stets einen höheren Fibroseanteil als Gruppe 2 auf (siehe Abbildungen 31 und 32). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten zum einen darauf zurückgeführt werden, dass in der vorliegenden Arbeit rhHGF und kein Plasmid injiziert wurde. Außerdem erfolgte eine einmalige Gabe, in der Vergleichsarbeit jedoch eine wiederholte HGF-Plasmid-Injektion. Auch die Verwendung von Mäusen kann Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. In der Literatur finden sich allerdings auch andere Ergebnisse. Zwar zeigte sich eine verminderte Fibrosebildung nach postoperativer, intraperitonealer HGF-Gabe bei gallengangligierten Ratten, allerdings war die Bindegewebssynthese gegenüber der Kontrollgruppe nur wenig reduziert (Turk et al. 2016). Auch in zirrhotischen Rattenlebern konnte ein HGF-Genstransfer die Fibrosebildung nicht merklich beeinflussen (Nishino et al. 2008).

In Gruppe 4, die mit THEA behandelt wurde, zeigte sich keine verminderte Bindegewebssyn-

these im Vergleich zu Gruppe 2. Interessanterweise wies Gruppe 4 sogar den höchsten Fibroseanteil im nicht ligierten Leberlappen unter allen Gruppen auf. Somit konnte die bei Weerawatanakorn et al. (Weerawatanakorn et al. 2015) beobachtete verminderte Fibrosebildung unter oraler Theaflavingabe nicht nachgewiesen werden. Ob gegebenenfalls die orale Applikation in der Vergleichsarbeit hierbei eine Rolle spielt, könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

6.4 Zusammenschau

Letztendlich konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen ein förderlicher Einfluss von Theaflavin und HGF auf die Leberregeneration festgestellt werden. Diese verbesserten Konditionen äußerten sich in verschiedenen Aspekten. Zum einen konnte die Inflammation unter der chronischen Cholestase gehemmt werden, was die geringere Leukozyteninvasion in die Leber beweist. Bei den Tieren, welche HGF erhielten, zeigte sich eine deutlich verminderte periportale sowie Läppchen-periphere Leukozyteninfiltration ab 48 h nach der PAL. Dies bestätigt die Ergebnisse von anderen Studien (Kaido et al. 1999, Yoshikawa et al. 1998). Da durch Theaflavin die Expression von ICAM-1 vermindert wird und somit die Leukozytenrekrutierung gehemmt wird (Song et al. 2011, Cai et al. 2006), konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch Theaflavin eine reduzierte Leukozyteninvasion periportal (ab 120 h) sowie in der Läppchenperipherie (ab 48 h) erzielt werden (siehe Abbildung 22 und 23). Da eine Inflammation die Regeneration der Leber hemmt (Gujral et al. 2003), kann in der vorliegenden Arbeit von einer verbesserten Regeneration der chronisch cholestatichen Leber durch Theaflavin und HGF ausgegangen werden. Weitere Hinweise für eine supportive Wirkung dieser Substanzen lieferte auch die Entwicklung der Lebergewichte. Der Anteil des nicht ligierten Leberlappens am Gesamtlebergewicht (WWR) lag unter HGF- und THEA-Applikation über jenem der cholestatichen Kontrollgruppe. Auch Kaido et al. (Kaido et al. 1999) registrierten am Modell einer reversiblen Cholestase mit PAL eine Steigerung der WWR unter HGF-Applikation. Die relevanten Veränderungen im Regenerationsprozess traten in der vorliegenden Arbeit ab 48 h auf. Bezüglich der direkten Beeinflussung der Leberregeneration durch Theaflavin gibt es bisher keine Studien, die zum Vergleich herangezogen werden können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind somit die ersten Hinweise auf die proliferationsfördernde Wirkung von Theaflavin auf die Leber.

Eine positive Beeinflussung der Nekrosebildung konnte durch Theaflavin nach 120 h beobachtet werden. Grund hierfür ist am ehesten die verminderte zytotoxische Wirkung der Leukozyten über oxidativen Stress (Feng et al. 2002). Ein ähnliches Bild der verringerten Nekrose zeigte sich auch unter HGF-Gabe zwischen 48 h und 120 h. Dass HGF eine zytoprotektive Wirkung aufweist, wurde auch in vorangegangenen Studien beschrieben (Kaido et al. 1997, Li et al. 2007). Eine verminderte Fibrosebildung konnte in den Interventionsgruppen hingegen nicht nachgewiesen werden.

7 Schlussfolgerung

Die portalvenöse Applikation von HGF simultan zur Ligatur der Pfortader führt zu einer verstärkten Hypertrophie im cholestatischen Lebergewebe der Ratte. Dies konnte durch eine Steigerung des Anteils des nicht ligierten Leberlappens am Gesamtleberfeuchtgewicht (WWR) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 2) verifiziert werden. Darüber hinaus wird durch HGF die Leukozyteninfiltration portal, periportal und in der Läppchenperipherie vermindert. Daraus resultiert eine Verringerung der Inflamationsprozesse, welche üblicherweise im Rahmen der Cholestase auftreten und zur Leberzellschädigung sowie Beeinträchtigung der Regeneration führen.

Ähnliche Ergebnisse liefert die Theaflavingabe. Die WWR stellt sich unter Einfluss von Theaflavin erheblich gesteigert dar. Bei Betrachtung der Veränderung der Leukozytenmigration in die Leber zeigt sich 48 h, bzw. 120 h nach der Applikation eine deutlich verminderte Leukozyteninfiltration im Hepatozytenverband sowie periportal.

In diversen Studien konnte außerdem eine antikanzerogene Wirkung von Theaflavin festgestellt werden (Shao et al. 2016, Gosslau et al. 2011, Feng et al. 2002). Dies wäre im Hinblick auf die Anwendung von Theaflavin bei der Therapie von Lebertumoren ein praktischer Zusatznutzen. Schlussendlich könnten beide Substanzen zu einer gesteigerten Regeneration der cholestatischen Leber beitragen und somit die Operabilität von Lebertumoren bei zuvor als inoperable geltenden Patienten ermöglichen bzw. deren Outcome positiv beeinflussen. Ein weiteres Potential dieser Therapieoption ist die Verkürzung des Zeitintervalls zwischen Pfortaderokklusion und Leber- teilresektion mit folglich vermindertem Risiko eines Tumorprogresses in diesem Zeitraum.

Um eine fundierte Aussage über die Effektivität der hier untersuchten Methoden im Rahmen der Therapie von Lebertumoren treffen zu können, bedarf es weiterführender Forschung. Hierbei muss der Einfluss der Substanzen auf das Leberwachstum bei vorliegenden Tumoren untersucht werden, ebenso die Wirkung von HGF und Theaflavin auf das Tumorgewebe. Zusätzlich muss eine geeignete Herstellung der Injektionslösung entwickelt werden. Bisher ist Theaflavin nur als Pulver auf dem Markt verfügbar. Dieses löst sich allerdings nicht vollständig in NaCl, weshalb sich Partikel bilden. Diese könnten zu portalvenösen Obstruktionen im nicht okkludierten Leberlappen führen.

Eingriffe in das Renin-Angiotensin-Aldosterol-System (RAAS) bzw. das "alternative" RAAS versprechen ebenfalls einen positiven Einfluss auf eine cholestatisch hervorgerufene Leberfibrose. Dies begründet sich in der erhöhten Konzentration von ACE und des Angiotensin II type 1 receptor, die im Rahmen einer solchen Fibrose vorliegen (Rajapaksha et al. 2019). Mittels einer Hemmung des RAAS durch ACE-Hemmer oder Angiotensinrezeptor-Blocker könnte somit die Fibrosebildung vermindert werden (Rajapaksha et al. 2019). Ursprünglich waren Untersuchungen diesbezüglich in der Forschungsgruppe geplant. Diese waren bisher jedoch aufgrund der schwierig zu kontrollierenden Dosierung der genannten Substanzen nicht möglich. Die Nutzung von ACE-Hemmern sowie eine Kombination unterschiedlicher Substanzen zur Hypertrophieinduktion wäre somit ein weiterer Forschungsansatz.

8 Literaturverzeichnis

Abreu TBd, Ribeiro AdA, Provenzano LPC, Ribeiro Filho J, Schanaider A. 2020. Assessment of remnant liver function and volume after selective ligation of portal vein and hepatic artery in a rat model. *Acta cirurgica brasileira*, 34(11):e201901103–e201901103.

Allen K, Jaeschke H, Copple BL. 2011. Bile Acids Induce Inflammatory Genes in Hepatocytes: A Novel Mechanism of Inflammation during Obstructive Cholestasis. *The American Journal of Pathology*, 178(1):175–186.

Baumgart J, Jungmann F, Bartsch F, Kloth M, Mittler J, Heinrich S, Lang H. 2019. Two-Stage Hepatectomy and ALPPS for Advanced Bilateral Liver Metastases: a Tailored Approach Balancing Risk and Outcome. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 23(12):2391–2400.

Bilodeau M, Aubry MC, Houle R, Burnes PN, Éthier C. 1999. Evaluation of hepatocyte injury following partial ligation of the left portal vein. *Journal of Hepatology*, 30(1):29–37.

Böcker W. 2012. *Pathologie*. München: Urban & Fischer in Elsevier.

Bülbüloğlu E, Şahin M, Kantarçeken B, Çıralık H, Çetinkaya A, İnanç F, Ezberci F. 2005. Different durations of portal vein ligation in rats. *European Journal of General Medicine*, 2(2):47 – 55.

Cai F, Li CR, Wu JL, Chen JG, Liu C, Min Q, Yu W, Ouyang CH, Chen JH. 2006. Theaflavin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-inflammatory effect and modulation of STAT-1. *Mediators of inflammation*, 2006(5):30490–30490.

Capobianco I, Strohäker J, Della Penna A, Nadalin S, Königsrainer A. 2019. Präkonditionierung der Leber. *Der Chirurg*, 90(7):542–547.

Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. 2007. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *The New England journal of medicine*, 356(15):1545–1559.

Dondorf F, Fahrner R, Ardelt M, Patsenker E, Stickel F, Dahmen U, Settmacher U, Rauchfuss F. 2017. Induction of chronic cholestasis without liver cirrhosis - Creation of an animal model. *World J Gastroenterol*, 23(23):4191–4199.

Ebata T, Yokoyama Y, Igami T, Sugawara G, Takahashi Y, Nagino M. 2012. Portal Vein Embolization before Extended Hepatectomy for Biliary Cancer: Current Technique and Review of 494 Consecutive Embolizations. *Digestive Surgery*, 29(1):23–29.

European Association for the Study of the Liver. 2009. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *Journal of Hepatology*, 51(2):237–267.

- Faiella A, Riccardi F, Carteni G, Chiurazzi M, Onofrio L. 2022. The Emerging Role of c-Met in Carcinogenesis and Clinical Implications as a Possible Therapeutic Target. *Journal of Oncology*, 2022:1–12.
- Feng Q, Torii Y, Uchida K, Nakamura Y, Hara Y, Osawa T. 2002. Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P450 1A1 in cell cultures. *J Agric Food Chem*, 50(1):213–20.
- Forner A, Vidili G, Rengo M, Bujanda L, Ponz-Sarvisé M, Lamarca A. 2019. Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Liver International*, 39(S1):98–107.
- Fujiwara K, Nagoshi S, Ohno A, Hirata K, Ohta Y, Mochida S, Tomiya T, Higashio K, Kurokawa K. 1993. Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 18(6):1443–1449.
- Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, Jochum W, El-Badry AM, Graf R, Clavien PA. 2008. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology*, 47(5):1615–1623.
- Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. 2008. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *International Journal of Experimental Pathology*, 89(4):251–263.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. 2008. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg*, 95(5):646–56.
- Gossiau A, En Jao DL, Huang MT, Ho CT, Evans D, Rawson NE, Chen KY. 2011. Effects of the black tea polyphenol theaflavin-2 on apoptotic and inflammatory pathways in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res*, 55(2):198–208.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. 2003. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology*, 38(2):355–363.
- Gujral JS, Liu J, Farhood A, Hinson JA, Jaeschke H. 2004. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(3):G499–G507.
- Gulubova MV. 1998. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Acta histochemica*, 100(1):59–74.
- Hayashi H, Beppu T, Sugita H, Horino K, Komori H, Masuda T, Okabe H, Takamori H, Baba H. 2009. Increase in the Serum Bile Acid Level Predicts the Effective Hypertrophy of the Nonembolized Hepatic Lobe After Right Portal Vein Embolization. *World Journal of Surgery*, 33(9):1933–1940.

- Heinrich S, Lang H. 2015. [Primary liver tumors. Preoperative conditioning of the liver and perioperative management in extended liver resection]. *Chirurg*, 86(2):125–31.
- Herold G. 2012. *Innere Medizin 2012 eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Selbstverl.
- Hoekstra LT, van Lienden KP, Doets A, Busch OR, Gouma DJ, van Gulik TM. 2012. Tumor progression after preoperative portal vein embolization. *Ann Surg*, 256(5):812–7; discussion 817–8.
- Homeyer A, Schenk A, Arlt J, Dahmen U, Dirsch O, Hahn HK. 2013. Practical quantification of necrosis in histological whole-slide images. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 37(4):313–322.
- Huang HC, Bian J, Bai Y, Lu X, Xu YY, Sang XT, Zhao HT. 2019. Complete or partial split in associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 25(39):6016–6024.
- Huisman F, van Lienden KP, Damude S, Hoekstra LT, van Gulik TM. 2014. A review of animal models for portal vein embolization. *Journal of Surgical Research*, 191(1):179–188.
- Isfordink CJ, Samim M, Braat MNGJA, Almalki AM, Hagendoorn J, Borel Rinkes IHM, Molenaar IQ. 2017. Portal vein ligation versus portal vein embolization for induction of hypertrophy of the future liver remnant: A systematic review and meta-analysis. *Surgical Oncology*, 26(3):257–267.
- Ishii T, Sato M, Sudo K, Suzuki M, Nakai H, Hishida T, Niwa T, Umezu K, Yuasa S. 1995. Hepatocyte Growth Factor Stimulates Liver Regeneration and Elevates Blood Protein Level in Normal and Partially Hepatectomized Rats. *The Journal of Biochemistry*, 117(5):1105–1112.
- Jaeschke H, Smith CW. 1997. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(6):647–653.
- Johnstone JM, Lee EG. 1976. A quantitative assessment of the structural changes the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *Br J Exp Pathol*, 57(1):85–94.
- Kaido T, Yamaoka S, Seto Si, Funaki N, Kasamatsu T, Tanaka J, Nakamura T, Imamura M. 1997. Continuous hepatocyte growth factor supply prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *FEBS Letters*, 411(2-3):378–382.
- Kaido T, Yoshikawa A, Seto S, Yamaoka S, Sato M, Ishii T, Inoue K, Imamura M. 1999. Hepatocyte growth factor supply accelerates compensatory hypertrophy caused by portal branch ligation in normal and jaundiced rats. *J Surg Res*, 85(1):115–9.

- Kandilis AN, Koskinas J, Tiniakos DG, Nikiteas N, Perrea DN. 2010. Liver regeneration: focus on cell types and topographic differences. *Eur Surg Res*, 44(1):1–12.
- Kang LI, Mars WM, Michalopoulos GK. 2012. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells*, 1(4):1261–92.
- Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan XG, Yan Z, Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar TR, Zeh r H J, Lotze MT, Tang D. 2014. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med*, 40:1–116.
- Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. 1999. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 6(2):171–175.
- Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, Ohta K, Yamaguchi T, Matsubara T, Takahashi T, Nakajima T, Muto T, Ikari T, Yanagisawa A, Kato Y. 2001. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology*, 34(2):267–72.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. 1984. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology*, 65(3):305–311.
- Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. 2018. The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2018:8394818.
- Li Z, Mizuno S, Nakamura T. 2007. Antinecrotic and antiapoptotic effects of hepatocyte growth factor on cholestatic hepatitis in a mouse model of bile-obstructive diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(2):G639–46.
- van Lienden KP, Hoekstra LT, Bennink RJ, van Gulik TM. 2013. Intrahepatic Left to Right Portoportal Venous Collateral Vascular Formation in Patients Undergoing Right Portal Vein Ligation. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 36(6):1572–1579.
- Loffroy R, Favelier S, Chevallier O, Estivalet L, Genson PY, Pottecher P, Gehin S, Krausé D, Cercueil JP. 2015. Preoperative portal vein embolization in liver cancer: indications, techniques and outcomes. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 5(5):730–739.
- Makino H, Shimizu H, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Ohtsuka M, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Sawada S, Miyazaki M. 2006. Changes in growth factor and cytokine expression in biliary obstructed rat liver and their relationship with delayed liver regeneration after partial hepatectomy. *World journal of gastroenterology*, 12(13):2053–2059.
- Mangieri CW, McCartt JC, Strode MA, Lowry JE, Balakrishna PM. 2017. Perioperative hepatocyte growth factor (HGF) infusions improve hepatic regeneration following portal branch ligation (PBL) in rodents. *Surgical Endoscopy*, 31(7):2789–2797.

- Marques TG, Chaib E, Fonseca JHd, Lourenço ACR, Silva FD, Ribeiro Jr MAF, Galvão FHF, D'Albuquerque LAC. 2012. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cirurgica Brasileira*, 27:589–594.
- Matsumoto K, Nakamura T. 1996. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem*, 119(4):591–600.
- Michalopoulos GK. 2007. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 213(2):286–300.
- Michalopoulos GK, Zarnegar R. 1992. Hepatocyte growth factor. *Hepatology*, 15(1):149–155.
- Mizuno Si, Nimura Y, Suzuki H, Yoshida S. 1996. Portal Vein Branch Occlusion Induces Cell Proliferation of Cholestatic Rat Liver. *Journal of Surgical Research*, 60(1):249–257.
- Mueller L, Grotelueschen R, Meyer J, Vashist YK, Abdulgawad A, Wilms C, Hillert C, Rogiers X, Broering DC. 2003. Sustained function in atrophying liver tissue after portal branch ligation in the rat. *J Surg Res*, 114(2):146–55.
- Naka D, Shimomura T, Yoshiyama Y, Sato M, Sato M, Ishii T, Hara H. 1993. Internalization and degradation of hepatocyte growth factor in hepatocytes with down-regulation of the receptor/c-*Met*. *FEBS Letters*, 329(1-2):147–152.
- Nishino M, Iimuro Y, Ueki T, Hirano T, Fujimoto J. 2008. Hepatocyte growth factor improves survival after partial hepatectomy in cirrhotic rats suppressing apoptosis of hepatocytes. *Surgery*, 144(3):374–384.
- Olthof PB, Aldrighetti L, Alikhanov R, Cescon M, Groot Koerkamp B, Jarnagin WR, Nadalin S, Pratschke J, Schmelze M, Sparrelid E, Lang H, Guglielmi A, van Gulik TM, Andreou A, Bartsch F, Benzing C, Buettner S, Capobianco I, de Reuver P, de Savornin Lohman E, Dejong CHC, Efanov M, Erdmann JJ, Franken LC, Frascaroli G, Giglio MC, Gomez-Gavara C, Heid F, Ijzermans JNM, Jansson H, Ligthart MAP, Maithel SK, Malago M, Malik HZ, Muiesan P, Olde Damink SWM, Pando E, Quinn LM, Ratti F, Roberts KJ, Rolinger J, Ruzzenente A, Schadde E, Serenari M, Sultana A, Troisi R, van Laarhoven S, van Vugt JLA, the Perihilar Cholangiocarcinoma Collaboration G. 2020. Portal Vein Embolization is Associated with Reduced Liver Failure and Mortality in High-Risk Resections for Perihilar Cholangiocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*.
- Pereira-Caro G, Moreno-Rojas JM, Brindani N, Del Rio D, Lean MEJ, Hara Y, Crozier A. 2017. Bioavailability of Black Tea Theaflavins: Absorption, Metabolism, and Colonic Catabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(26):5365–5374.
- Qin LX, Tang ZY. 2003. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World journal of gastroenterology*, 9(3):385–391.

- Rajapaksha IG, Angus PW, Herath CB. 2019. Current therapies and novel approaches for biliary diseases. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 10(1):1–10.
- Rauchfuss F, Scheuerlein H, Götz M, Dittmar Y, Voigt R, Heise M, Settmacher U. 2010. Hepatozelluläres Karzinom und Cholangiokarzinom. *Der Chirurg*, 81(10):941–954.
- Rauchfuß F. 2012. Molekulare Mechanismen der Leberregeneration nach Pfortaderembolisation und deren therapeutische Beeinflussung zur Konditionierung erweiterter Leberresektionen [Habilitation]. Jena: Friedrich- Schiller-Universität.
- Ray S, Mehta NN, Golhar A, Nundy S. 2018. Post hepatectomy liver failure – A comprehensive review of current concepts and controversies. *Annals of Medicine and Surgery*, 34:4–10.
- Ren W, Chen G, Wang X, Zhang A, Li C, Lv W, Pan K, Dong Jh. 2015. Simultaneous bile duct and portal vein ligation induces faster atrophy/hypertrophy complex than portal vein ligation: role of bile acids. *Scientific Reports*, 5(1):8455.
- Rodriguez-Garay EA. 2003. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol*, 2(4):150–8.
- Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, Fichtner-Feigl S, Lorf T, Goralczyk A, Hörbelt R, Kroemer A, Loss M, Rümmele P, Scherer MN, Padberg W, Königsrainer A, Lang H, Obed A, Schlitt HJ. 2012. Right Portal Vein Ligation Combined With In Situ Splitting Induces Rapid Left Lateral Liver Lobe Hypertrophy Enabling 2-Stage Extended Right Hepatic Resection in Small-for-Size Settings. *Annals of Surgery*, 255(3):405–414.
- Schweizer W, Duda P, Tanner S, Balsiger D, Hörlin F, Blumgart LH, Zimmermann A. 1995. Experimental atrophy/hypertrophy complex (AHC) of the liver: portal vein, but not bile duct obstruction, is the main driving force for the development of AHC in the rat. *Journal of Hepatology*, 23(1):71–78.
- Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, van Rooijen N, Clavien P. 2003. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF- α /IL-6 in mice. *Gastroenterology*, 124(3):692–700.
- Shao J, Meng Q, Li Y. 2016. Theaflavins suppress tumor growth and metastasis via the blockage of the STAT3 pathway in hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther*, 9:4265–75.
- Shoup M, Gonen M, D’Angelica M, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Schwartz LH, Tuorto S, Blumgart LH, Fong Y. 2003. Volumetric Analysis Predicts Hepatic Dysfunction in Patients Undergoing Major Liver Resection. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 7(3):325–330.
- Shrestha A, Zhou Y, Mao H, Li FY, Ma WJ, Cheng NS, Xu RH, Zhang YQ, Jiang T, Feng H, Li W, Han Q. 2014. Sequential embolization of the branches of the bile duct and portal vein to the targeted hepatic lobe in rats. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 13(1):55–59.

- Soll C, Schadde E, Petrowsky H, Clavien PA. 2013. Primäre und sekundäre Lebertumore: Techniken der Leberresektion. In: Swiss Medical Forum, Bd 13. EMH Media.
- Song YA, Park YL, Yoon SH, Kim KY, Cho SB, Lee WS, Chung IJ, Joo YE. 2011. Black tea polyphenol theaflavin suppresses LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression via blockage of NF- κ B and JNK activation in intestinal epithelial cells. *Inflammation Research*, 60(5):493–500.
- Springer TA. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283):425–434.
- Steiner PE, Martinez JB. 1961. Effects on the Rat Liver of Bile Duct, Portal Vein and Hepatic Artery Ligations. *Am J Pathol*, 39(3):257–89.
- Szijártó A, Fülöp A. 2015. Triggered Liver Regeneration: From Experimental Model to Clinical Implications. *European Surgical Research*, 54(3-4):148–161.
- Takeuchi E, Nimura Y, Ichi Mizuno S, Nagino M, Shoji-Kawaguchi M, Izuta S, Yoshida S. 1996. Ligation of Portal Vein Branch Induces DNA Polymerases α , δ , and ϵ in Nonligated Lobes. *Journal of Surgical Research*, 65(1):15–24.
- Taub R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10):836–47.
- Tucker ON, Heaton N. 2005. The ‘small for size’ liver syndrome. *Current Opinion in Critical Care*, 11(2):150–155.
- Turk O, Badak B, Ates E, Dundar E, Sutken E. 2016. The role of growth factors on hepatic damage in rats with obstructive jaundice. *Springerplus*, 5(1):1274.
- Ueno S, Aikou T, Tanabe G, Kobayashi Y, Hamanoue M, Mitsue S, Kawaida K, Nakamura T. 1996. Exogenous hepatocyte growth factor markedly stimulates liver regeneration following portal branch ligation in dogs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 38(3):233–237.
- Weerawatanakorn M, Lee YL, Tsai CY, Lai CS, Wan X, Ho CT, Li S, Pan MH. 2015. Protective effect of theaflavin-enriched black tea extracts against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Food Funct*, 6(6):1832–40.
- Weinbren K, Ghorpade KV. 1962. The Enhancement of Ductal Proliferation by Deprivation of the Portal Blood Supply in the Rat Liver. *Cancer Research*, 22(7 Part 1):881.
- Wright JE, Braithwaite JL. 1964. The Effects of Ligation of the Common Bile Duct in the Rat. *J Anat*, 98:227–33.
- Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. 2006. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol*, 168(5):1500–12.

Xiong JJ. 2013. Preoperative biliary drainage in patients with hilar cholangiocarcinoma undergoing major hepatectomy. *World Journal of Gastroenterology*, 19(46):8731.

Yamano T, Hirai R, Hato S, Uemura T, Shimizu N. 2002. Delayed liver regeneration with negative regulation of hepatocyte growth factor and positive regulation of transforming growth factor- β 1 mRNA after portal branch ligation in biliary obstructed rats. *Surgery*, 131(2):163–171.

Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. 2007. Mechanism of impaired hepatic regeneration in cholestatic liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 14(2):159–66.

Yoshikawa A, Kaido T, Seto Si, Yamaoka S, Sato M, Ishii T, Imamura M. 1998. Hepatocyte Growth Factor Promotes Liver Regeneration with Prompt Improvement of Hyperbilirubinemia in Hepatectomized Cholestatic Rats. *Journal of Surgical Research*, 78(1):54–59.

Anhang

Tabellenverzeichnis

1	Einheiten	V
2	Reagenzien HE-Färbung	22
3	Reagenzien EvG-Färbung	23
4	Reagenzien ASDCL-Färbung	24
5	Gewichtsverlauf nach BDL	26
6	Gewichtsverlauf nach PAL	27
7	Gesamtleberfeuchtgewicht	28
8	LWBR	29
9	Verhältnis NL-LL zu Gesamtlebergewicht (WWR)	30
10	Verhältnis L-LL zu Gesamtlebergewicht	31
11	Gesamtbilirubin	32
12	Direktes Bilirubin	33
13	Alkalische Phosphatase	34
14	ALAT	35
15	ASAT	36
16	Cholinesterase	37
17	Albumin	38
18	Kreatinin	39
19	Gallengänge Portalfeld (NL-LL)	40
20	Gallengänge Portalfeld (L-LL)	42
21	Leukozyten portal (NL-LL)	44
22	Leukozyten periportal (NL-LL)	45
23	Leukozyten peripher (NL-LL)	46
24	Leukozyten portal (L-LL)	47
25	Leukozyten periportal (L-LL)	48
26	Leukozyten peripher (L-LL)	49
27	Nekrose (NL-LL)	50
28	Nekrose (L-LL)	51
29	Fibroseanteil (NL-LL)	53
30	Fibroseanteil (L-LL)	54

Abbildungsverzeichnis

1	Schematischer Ablauf des Experiments	16
2	PAL-Schema	19
3	Gewichtsverlauf nach BDL	26
4	Gewichtsverlauf nach PAL	27
5	Gesamtleberfeuchtgewicht	28
6	LWBR	29
7	Verhältnis NL-LL zu Gesamtlebergewicht (WWR)	30
8	Verhältnis L-LL zu Gesamtlebergewicht	31
9	Gesamtbilirubin	32
10	Direktes Bilirubin	33
11	Alkalische Phosphatase	34
12	ALAT	35
13	ASAT	36
14	Cholinesterase	37
15	Albumin	38
16	Kreatinin	39
17	Gallengänge Portalfeld (NL-LL)	40
18	Portalfelder HE	41
19	Gallengänge Portalfeld (L-LL)	42
20	Portalfelder ASDCL	43
21	Leukozyten portal (NL-LL)	44
22	Leukozyten periportal (NL-LL)	45
23	Leukozyten peripher (NL-LL)	46
24	Leukozyten portal (L-LL)	47
25	Leukozyten periportal (L-LL)	48
26	Leukozyten peripher (L-LL)	49
27	HE-Analyse	50
28	Nekrose (NL-LL)	50
29	Nekrose (L-LL)	51
30	EvG-Analyse	52
31	Fibroseanteil (NL-LL)	53
32	Fibroseanteil (L-LL)	54

Normwerte

Die folgende Tabelle der Normwerte wurde von der Website des Unternehmens Charles River am 8. Juli 2022 abgerufen.

Lewis Rat Hematology

North American Colonies*
January 2008 - December 2011

LEW/CrI		WBC	NEUT	LYMPH	MONO	EOS	BASO	NEUT	LYMPH	MONO	EOS
		(K/ μ L)	(K/ μ L)	(K/ μ L)	(K/ μ L)	(K/ μ L)	(K/ μ L)	(%)	(%)	(%)	(%)
Male (♂)	Mean	7.46	2.75	4.27	0.39	0.03	0.01	36.39	57.78	5.26	0.45
95% interval	Low	3.56	1.09	1.94	0.13	0.00	0.00	24.90	46.88	2.38	0.05
	High	11.64	4.71	6.19	0.83	0.11	0.04	48.96	69.07	9.29	1.63
	N	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
Female (♀)	Mean	7.03	2.17	4.35	0.40	0.08	0.02	30.49	62.34	5.71	1.15
95% interval	Low	2.98	0.71	2.03	0.11	0.01	0.00	20.82	51.85	2.88	0.10
	High	11.24	4.08	6.60	0.76	0.33	0.11	40.16	73.13	8.98	3.72
	N	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214

LEW/CrI		BASO	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	PLT	MPV
		(%)	(M/ μ L)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	(%)	(K/ μ L)	(fL)
Male (♂)	Mean	0.12	8.48	16.2	50.1	59.2	19.2	32.5	16.5	1068	8.4
95% interval	Low	0.00	7.02	13.3	42.6	55.6	16.3	28.4	15.4	664	7.2
	High	0.58	10.05	18.9	58.7	63.3	21.5	35.4	17.7	1627	9.7
	N	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
Female (♀)	Mean	0.30	8.27	16.0	50.9	61.8	19.4	31.4	15.1	1066	8.1
95% interval	Low	0.00	6.61	12.5	42.0	58.2	17.0	28.0	13.8	677	6.9
	High	1.55	9.99	18.8	61.4	64.7	21.4	34.2	16.2	1663	9.2
	N	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214

*Samples were collected from animals housed in Charles River's standard production setting.
Age: 8-10 Weeks.

Lewis Rat Biochemistry

North American Colonies*
January 2008 - December 2011

LEW/CrI		CHOL	TRG	ALT	AST	ALK	TBIL	GLU	PHOS
		(mg/dL)	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Male (♂)	Mean	95	277	114	205	370	0.3	308	12.4
95% interval	Low	71	114	46	68	247	0.2	172	10.3
	High	121	487	551	710	535	0.6	463	15.0
	N	230	230	230	229	230	230	230	230
Female (♀)	Mean	101	141	87	246	219	0.3	281	10.9
95% interval	Low	74	75	35	81	112	0.1	144	8.9
	High	131	261	293	879	346	0.7	432	13.5
	N	223	223	223	222	223	223	223	223

LEW/CrI		TPR	CAL	BUN	CRE	ALB	NA	K	CL
		(g/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(g/dL)	(meq/L)	(meq/L)	(meq/L)
Male (♂)	Mean	6.6	12.0	13	0.5	3.5	144.9	8.75	101.3
95% interval	Low	5.7	9.7	6	0.4	3.1	136.0	6.78	96.3
	High	8.2	14.4	24	0.7	4.3	163.5	11.14	113.7
	N	230	230	230	230	230	228	228	228
Female (♀)	Mean	6.9	11.1	12	0.5	3.9	144.0	8.33	101.5
95% interval	Low	5.9	9.0	5	0.3	3.4	135.4	6.53	97.0
	High	8.0	13.6	21	0.7	4.7	158.6	10.88	110.4
	N	223	223	223	223	223	212	212	211

*Samples were collected from animals housed in Charles River's standard production setting.
Age: 8-10 Weeks.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr apl.-Prof. Dr. med. Falk Rauchfuß, M. Sc., Herr Dr. med. Felix Dondorf, Frau Prof. Dr. med. Uta Dahmen,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Paderborn, den 23. März 2023

Unterschrift der Verfasserin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen Dank entgegenbringen.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, apl.-Prof. Dr. med. Falk Rauchfuß, M. Sc. als Versuchsleiter dieses Projekts sowie für die freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Umsetzung der Forschungsarbeit. Auch dafür, dass er sich die Zeit nimmt als Gutachter meine Dissertation zu lesen und bewerten, möchte ich mich bedanken.

Einen großen Dank möchte ich ebenfalls meinem Betreuer Dr. med. Felix Dondorf aussprechen, insbesondere für die große Unterstützung bei der Laborarbeit sowie für die gute wissenschaftliche und persönliche Betreuung während der Anfertigung meiner Dissertation.

Für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, Arbeitsmaterialien und für die fachliche Beratung möchte ich Frau Prof. Dr. med. Uta Dahmen, Leiterin des Instituts für Experimentelle Transplantationschirurgie der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Jena danken.

Dank gilt auch den Mitarbeiter*innen des Instituts für Experimentelle Transplantationschirurgie, die während der Durchführung der Untersuchungen im Labor stets für eine kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten. Insbesondere möchte ich mich hier bei Isabel Jank und Dr. rer. nat. Janine Arlt bedanken, die mir bei Fragen immer zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Lukas, der mir, wie so oft in meinem Studium und bei meiner Arbeit, jederzeit mit seiner Geduld, seiner Zuversicht und seinen Ratschlägen zur Seite stand und mich immer unterstützt.

Bei Dr. med. Nora Ziegler möchte ich mich für ihre mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bedanken.

Schlussendlich gilt ein großer Dank meiner Familie sowie meinen Freund*innen. Meinen Eltern und meinem Bruder Stefan danke ich insbesondere dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich haben, immer an mich geglaubt haben und mir meinen Weg bis hierhin ermöglicht haben.