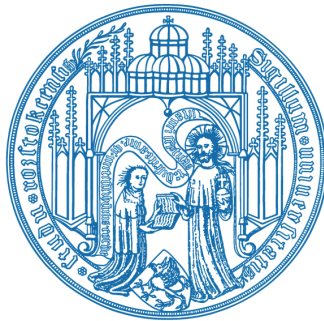


Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Modulation des NO- und CO-Stoffwechsels und dessen Bedeutung für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Harald Schütt, geb. 11.05.1981 in Bergen/Rügen

aus Hannover

Rostock, 2009

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0146-7

Datum der Verteidigung: 22.04.2009

Gutachter 1: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Institut für Experimentelle Chirurgie mit zentraler
Versuchstierhaltung
Universitätsklinikum Rostock

Gutachter 2: Herr Prof. Dr. med. Benedikt Pannen
Klinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Düsseldorf

Gutachter 3: Herr PD Dr. med. Matthias Glanemann
Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantations-
chirurgie
Charité Campus Virchow-Klinikum

Inhalt

Glossar	IV-V
Zusammenfassung	6
Summary	8
1 Einleitung	10
1.1 Leberresektion & Leberregeneration in der Geschichte	10
1.2 Physiologie der Leberregeneration	12
1.3 Häm-Oxygenase und CO	18
1.4 NO-Synthase und NO	22
1.5 Interaktionen von CO und NO	27
2 Ziel der Studie	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Versuchstiere	30
3.2 Experimentelles Modell	30
3.2.1 Mikrozirkulation der Leber – Anästhesie und chirurgische Präparation	30
3.2.2 Leberteilresektion – Anästhesie und chirurgische Präparation	31
3.3 Untersuchungstechniken	33
3.3.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	33
3.3.2 Mikrozirkulatorische Parameter	35
3.3.2.1 Gefäßdurchmesser	35
3.3.2.2 Blutzellgeschwindigkeit	36
3.3.2.3 Blutvolumenfluss	36
3.3.2.4 Scherstress	37
3.3.3 Serumanalytik	37
3.3.3.1 Bestimmung von Bilirubin und Transaminasen im Serum	37
3.3.3.3 Bestimmung der Endprodukte des NO-Stoffwechsels Nitrit/Nitrat	38
3.3.4 Immunhistochemie von HO-1, PCNA und BrdU	38
3.3.4.1 Immunhistochemische Aufarbeitung	39

3.3.4.2	<i>Immunhistochemische Auswertung</i>	40
3.3.5	Proteinanalytik von HO-1, NOS-2, PCNA und 3-NT	40
3.3.5.1	<i>Extraktion und Bestimmung von Proteinen aus Lebergewebe</i>	40
3.3.5.2	<i>Western Blot Analysen</i>	41
3.3.6	mRNA-Analytik	42
3.3.6.1	<i>Extraktion und Bestimmung von mRNA aus Lebergewebe</i>	42
3.3.6.2	<i>RT-PCR von c-fos</i>	43
3.3.7	Analyse der Guanylylzyklase-Aktivität	44
3.3.7.1	<i>Präparation des Lebergewebes</i>	44
3.3.7.2	<i>ELISA von cGMP</i>	45
3.4	<i>Experimentelles Protokoll</i>	45
3.4.1	Physiologische Regeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie	46
3.4.2	Modulation vasoaktiver Enzymsysteme	46
3.4.2.1	<i>Mikrozirkulation der Leber vor $\frac{2}{3}$-Hepatektomie</i>	47
3.4.2.2	<i>Leberregeneration nach $\frac{2}{3}$-Hepatektomie</i>	47
3.5	<i>Statistik</i>	49
4	Ergebnisse	51
4.1	<i>Physiologische Regeneration nach $\frac{2}{3}$-Hepatektomie</i>	51
4.1.1	Postoperativer Verlauf und Serumparameter	51
4.1.2	Expression der Häm-Oxygenase-1	52
4.1.3	Expression der NO-Synthase-2	52
4.1.4	Expression von PCNA	53
4.2	<i>Modulation vasoaktiver Enzymsysteme</i>	54
4.2.1	Induktion der Häm-Oxygenase-1	54
4.2.2	Inhibition der NO-Synthase	55
4.2.3	Substitution von NO	56
4.2.4	Auswirkungen auf die Guanylylzyklase-Aktivität	57
4.2.5	Mikrozirkulation der Leber vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie	58
4.2.5.1	<i>Gefäßdurchmesser</i>	58
4.2.5.2	<i>Blutzellgeschwindigkeit</i>	59
4.2.5.3	<i>Blutvolumenfluss</i>	60
4.2.5.4	<i>Scherstress</i>	61

4.2.6	Expression von c-fos vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie	62
4.2.7	Leberregeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie	63
4.2.7.1	Expression von PCNA	63
4.2.7.2	Inkorporation von BrdU.....	64
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65
5	Diskussion	68
5.1	Diskussion von Material und Methoden.....	68
5.1.1	Diskussion des Modells.....	68
5.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken.....	71
5.2	Diskussion der Ergebnisse	75
5.2.1	Expression der vasoaktiver Enzymsysteme nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie	76
5.2.2	Modulation der vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS	80
5.2.3	Einfluss des modulierten CO- und NO-Haushaltes auf die Mikrozirkulation der Leber vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie.....	82
5.2.4	Einfluss des modulierten CO- und NO-Haushaltes auf die Leberregeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie	87
5.3	Schlussfolgerung	92
5.4	Klinische Perspektiven.....	94
6	Literaturverzeichnis	96
7	Lebenslauf	107
8	Danksagung.....	110

Thesen zur Dissertation

Eidesstattliche Erklärung

Glossar

ADP	Adenosindiphosphat
ALR	<i>augmenter of liver regeneration</i>
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	<i>activator protein-1</i>
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
cAMP	3', 5' zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CCl ₄	Tetra-Chlor-Kohlenstoff
CDK	Zyclin-abhängige Kinasen
C/EBPβ	<i>CCAAT enhancer binding protein β</i>
cGMP	3', 5' zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
CoPP-IX	Cobalt Protoporphyrin-IX
CYP 450	Cytochrom P450
d	Durchmesser
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epithelial growth factor</i>
eNOS	endotheliale NOS
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FMN	Flavin-Mononukleotid
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor</i>
HBP23	<i>heme-binding protein 23</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HO	Häm-Oxygenase
HSP32	<i>heatshock protein 32</i>
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin

i.p.	intraperitoneal
iNOS	induzierbare NOS
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
L-NAME	N ^o -Nitro-L-Arginin Methylester
LPS	Lipopolysaccharid
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOL	Molsidomin
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NANC	nicht-adrenerge-nicht-cholinerge
NF κ B	<i>nuclear factor for kappa-chain on B-cells</i>
nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OSM	<i>oncostatin M</i>
PH	partielle Hepatektomie
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
sGC	lösliche Guanylylzyklase
SOCS-3	<i>suppressor of cytokine signalling-3</i>
STAT-3	<i>signaltransducer and activator of transcription-3</i>
TGF- α	<i>transforming growth factor-α</i>
TGF β -1	<i>transforming growth factor β-1</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VQ	Blutvolumenfluss
V _{RBC}	Blutzellgeschwindigkeit
η	Blutviskosität
τ	Scherstress

Zusammenfassung

Die Regeneration der Leber nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie ist ein präzise regulierter Prozess, dessen Verlauf durch das ausgewogene Zusammenspiel proliferationsstimulierender und proliferationshemmender Faktoren gesteuert wird. Es bedarf jedoch eines Startsignals, welches die Information über das fehlende Lebergewebe beinhaltet, sowie eines geeigneten Sensors, der diese Information in eine zelluläre Antwort umsetzt, bevor die komplexe Regenerationskaskade in Gang gesetzt werden kann. Da bei konstanter Durchblutung des portalvenösen Einzugsgebietes das verbleibende Lebergewebe nach partieller Hepatektomie entsprechend stärker perfundiert wird, kann diese Kommunikation durch die Interaktion von Blutvolumenfluss/Scherstress und Gefäßendothel bzw. glatten Gefäßmuskelzellen realisiert werden. Die vasoaktiven Enzymsysteme Häm-Oxygenase-1 (HO-1) und NO-Synthase (NOS) nehmen in diesem Zusammenhang eine zentrale Position in der Signaltransduktion mit ihren gasförmigen Mediatoren CO und NO ein. Diese fungieren jedoch nicht nur als simple Effektoren auf zellulärer Ebene, sondern sind ihrerseits auch in der Lage, die prä- und intrahepatische Perfusion zu regulieren und dadurch wiederum die Parameter Blutvolumenfluss und Scherstress zu beeinflussen.

Zur näheren Untersuchung des Einflusses von CO und NO auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wurde in einem tierexperimentellen Modell (C57BL/6J Mäuse) die Aktivität der CO-produzierenden HO-1 und der NO-produzierenden NOS pharmakologisch moduliert (CoPP-IX \rightarrow HO-1-Induktion; L-NAME \rightarrow NOS-Inhibition). Bereits im Vorfeld der Leberresektion war es dadurch möglich, die physiologische Balance zwischen CO und NO zugunsten von CO zu verschieben und die Leberdurchblutung zu intensivieren. Mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass innerhalb der hepatischen Mikrozirkulation bei induzierter HO-1 und gleichzeitiger NOS-Inhibition deutlich erhöhte Blutvolumenfluss- und Scherstresswerte herrschen. Dies allein führte, gemessen an der Expression des für die Leberregeneration zentralen *immediate early gene* c-fos (mRNA RT-PCR), noch zu keiner regenerativen Aktivität in der Leber. Nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie resultierte daraus jedoch eine akzelerierte hepatozytäre Proliferation, wie es die Analysen von PCNA-Expression und BrdU-Inkorporation (Immunhistochemie) gleichermaßen demonstrierten.

Die Notwendigkeit der gleichzeitigen NOS Blockade konnte durch den Einsatz des NO-Donors Molsidomin verdeutlicht werden. So führte die Substitution von NO bei Tieren mit CoPP-IX-induzierter HO-1-Expression bei gleichzeitig L-NAME-vermittelter NOS-Inhibition zum Abfall von Blutvolumenfluss und Scherstress sowie der Proliferationsmarker PCNA und BrdU auf das Niveau der mit den entsprechenden Trägersubstanzen behandelten Kontrolltiere.

Somit konnte gezeigt werden, dass die durch gleichzeitige HO-1-Induktion und NOS-Inhibition artifiziell gesteigerte mikrovaskuläre Perfusion der Leber zu einer beschleunigten hepatozytären Proliferation nach Leberteileresektion führt. Physiologischerweise vorhandene NO-Mengen sind hingegen in der Lage, den Einfluss einer erhöhten CO-Verfügbarkeit auf die Leberperfusion und Leberregeneration zu kompensieren. In zukünftigen Studien gilt es zu klären, inwieweit die hier gewonnenen Erkenntnisse zu den Interaktionen der vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS auf die klinisch relevanten Problemsituationen der ausgedehnten Leberresektion sowie der Transplantation von „small-for-size“-Transplantaten übertragen werden können.

Summary

Liver regeneration upon partial hepatectomy is a precisely regulated process, controlled by a well-balanced interaction of growth-stimulating and growth-inhibitory factors. To initiate the complex regeneration cascade, an appropriate signalling mechanism is required that translates the loss of liver mass into a cellular response. Since the steady blood flow of the portal-venous circulation leads to an increase of the perfusion of the remnant liver tissue, this particular signalling can be accomplished by the interaction of volumetric bloodflow/shear stress and endothelial cells or rather vascular smooth muscle cells. In this regard the vasoactive enzymesystems HO-1 and NOS with their gaseous mediators CO and NO constitute the major components in the signal transduction. Interestingly they do not only serve as cellular effectors but are also able to control the pre- and intrahepatic perfusion and are thereby in turn capable to affect volumetric blood flow and shear stress.

To investigate the impact of CO and NO on liver regeneration the activity of CO and NO producing enzymes HO-1 and NOS was pharmacologically modulated in an animal model of partial hepatectomy (CoPP-IX → HO-1 induction; L-NAME → NOS inhibition). By doing so, we were able to shift the balance between CO and NO in favor of CO in the run-up to liver resection and thereby boost liver perfusion. Intravital fluorescence microscopy demonstrated a marked increase of volumetric blood flow and shear stress in the hepatic microcirculation when NOS activity of HO-1 induced animals was concomitantly blocked. But solitary microcirculatory changes failed to induce proliferative activity as measured by mRNA RT-PCR of *c-fos*, one of the central immediate early genes in liver regeneration. However, upon partial hepatectomy analysis of PCNA expression as well as BrdU incorporation (immunohistochemistry) revealed a significant acceleration of hepatocytic proliferation.

The importance of an additional NOS blockade was confirmed by utilization of the NO donor molsidomine. When NO metabolism of HO-1 overexpressing animals with concomitant NOS blockade was again balanced by application of molsidomine, volumetric blood flow and shear stress as well as the proliferation marker PCNA and BrdU decreased to the level of vehicle-treated control animals.

Thus we could demonstrate that an artificially enhanced perfusion of the liver by means of a simultaneous HO-1 overexpression and NOS inhibition gives rise to an accelerated hepatocytic proliferation upon liver resection. On the other hand physiological NO levels are capable to counterbalance the impact of an augmented CO production on liver perfusion and liver regeneration. Now it has to be clarified how the obtained knowledge on the interactions of the vasoactive enzymesystems HO-1 and NOS can be transferred to clinically relevant situations like extended liver resection or small-for-size liver transplantation.

1 Einleitung

1.1 Leberresektion & Leberregeneration in der Geschichte

Wie kaum ein anderes Organ hat die Leber in den vergangenen Jahrtausenden für den Menschen eine zentrale Position im anfangs mystischen, später wissenschaftlichen Verständnis seines Selbst eingenommen. Im Babylonischen Reich, 2000-3000 v.Chr., galt die Leber noch als Sitz der Seele und anatomische Besonderheiten einer Schafsleber dienten während der rituellen Hepatoskopie (Abb. 1 A) zur Schicksalsbefragung [1]. In der griechischen Mythologie wurde der Leber zum ersten Mal die Eigenheit der umfangreichen Regenerationsfähigkeit zugeschrieben, welche die Forschung bis in die Gegenwart fasziniert. Hesiod beschrieb 700 v.Chr. die Bestrafung des Prometheus (Abb. 1 B), welcher als großer Wohltäter der Menschheit das Feuer aus dem Olymp mit einer List entwendete, um es auf die Erde zu bringen. In seinem Zorn ließ ihn Zeus, König der Götter, an einen Felsen im Kaukasischen Gebirge fesseln und entsandt jede Nacht einen Adler, der sich von der stetig regenerierenden Leber ernährte [2].

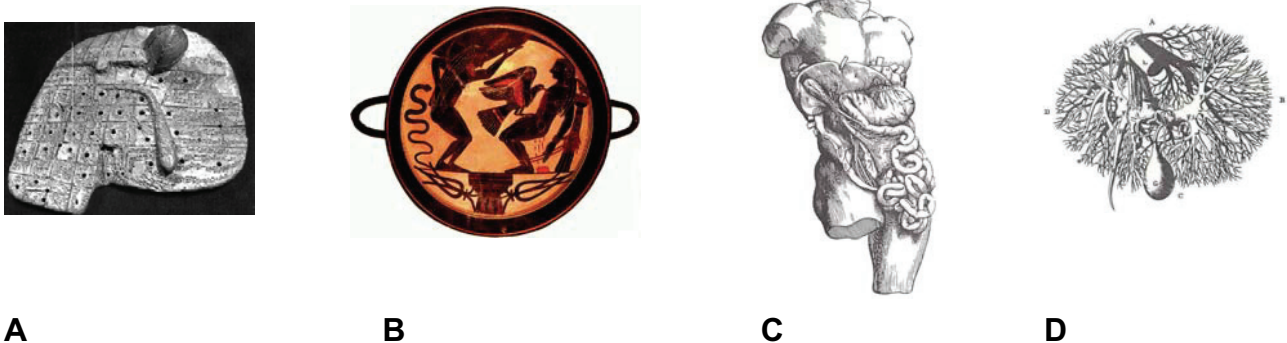


Abbildung 1: Babylonisches Tonmodell der Leber, 2000 v.Chr. (A); Prometheus mit dem Adler Ethon und Atlas, 530 v.Chr. (B); Viszerale Oberfläche der aufwärts flektierten Leberlappen in Vesalius Fabrica, 1543 (C); Intrahepatische Gefäßarchitektur in Francis Glisson's Anatomia Hepatis, 1654 (D).

Später rückte die Leber in das wissenschaftlich-forschende Interesse, wobei es anfangs vor allem die anatomischen Studien von Herophilus (334-280 v.Chr.) und Galen (130-200 n.Chr.) waren, welche das Wissen über die Leber vorantrieben [3, 4]. In der Renaissance wurde dieses Wissen mit ausgeprägt dogmatischem Charakter durch die Studien von Andreas Vesalius (Abb. 1 C) (1514-1564) und William Harvey (1578-1657)

kritisch überarbeitet [5, 6], worauf aufbauend die Arbeiten über Form und Funktion der Leber von Francis Glisson (1596-1677) *Anatomia Hepatis (Abb. 1 D)* und Albrecht von Haller (1708-1777) *Elementa Physiologiae Corporis Humani* den Beginn der wissenschaftlichen Hepatologie der Neuzeit markieren [3, 7]. Parallel dazu entwickelte sich die Leberchirurgie. Waren es zunächst nur kleinere Resektionen offener Lebertraumata, welche seit dem 17. Jahrhundert immer häufiger durchgeführt wurden, so ermöglichten die medizinischen Fortschritte des 19. Jahrhunderts die Durchführung der ersten erfolgreichen, elektiven Leberresektion durch Carl Langenbuch 1887 [8]. Hierzu trugen maßgeblich die neuen Techniken der Ether-Anästhesie (Crawford Long & William Morton), Asepsis (Ignaz Semmelweis & Joseph Lister) und Laparotomie (Lawson Tait & Willet) [9] sowie die Erkenntnisse über die außerordentliche regenerative Kapazität der Leber durch Tillmans, Gluck und Ponflick bei [10-12]. Die weitere Entwicklung der Leberchirurgie war bestimmt durch die Notwendigkeit einer optimalen Blutungsprävention, da unkontrollierte Blutungen sich als größtes Hindernis der operativen Eingriffe darstellten. Die Verfeinerung des Wissens über die segmentale Struktur der Leber und ihrer Vaskularisierung durch Hjortsjö, Healy und Couinaud [13-15] ebnete den Weg zur anatomisch korrekten Resektion, welche neben dem Gebrauch des adäquaten Instrumentariums der Schlüssel zur Senkung der post-operativen Mortalität war. Erst darauf aufbauend konnten elektive Resektionen bis an die Grenze der physiologischen Regenerationsfähigkeit und schließlich Transplantationen bis hin zur Split-Leber-Transplantation sowie Leberlebenspenden als Routineeingriffe verlässlich realisiert werden [16-18].

Die Regenerationsfähigkeit war bereits durch Tillmans Versuche zur Leberresektion an Kaninchen beschrieben worden [10] und einhergehend mit den Fortschritten im operativen Bereich weiteten sich auch die Bestrebungen aus, das Phänomen der Leberregeneration ausgiebig wissenschaftlich zu erschließen. Dabei waren es 1931 Higgins und Anderson [19], die das Modell der partiellen Hepatektomie in der Ratte etablierten und damit den Weg für die weitere Forschung in diesem Feld bereiteten. Die Erkenntnisse, welche aus diesem Wissenschaftszweig kommen sollten, erbrachten jedoch nicht nur Einblicke in die Physiologie der Leberregeneration, sondern trugen auch wesentlich zum Gesamtverständnis von elementaren Abläufen des Zellzyklus, seiner Kontrollmechanismen und der intrazellulären Signaltransduktion bei. Somit brachte Prometheus mit seiner unvergänglich regenerierenden Leber abermals das Feuer der Erleuchtung zurück zur Menschheit.

1.2 **Physiologie der Leberregeneration**

Der normale Hepatozyt ist eine hochdifferenzierte Zelle und als solche in der Lage, verschiedenste komplexe Stoffwechselaktivitäten des Organismus zu realisieren. Ohne schädigende Einwirkungen von außen befinden sich die meisten Zellen der Leber dementsprechend in der G₀-Phase des Zellzyklus und mitotische Zellteilungen lassen sich nur in einer von 1000 Zellen beobachten [20]. Daher könnte man davon ausgehen, dass dieses parenchymatöse Organ nur unzureichend auf schädigende Einflüsse reagieren kann. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Kommt es aufgrund von Chemikalien, viraler Infektionen oder chirurgischer Interventionen zu einem Verlust an funktionellem Lebergewebe, entfaltet dieses Organ ein erstaunliches regeneratives Potential, welches vergleichbar mit dem von hämatopoetischen Stammzellen ist. So konnten SANDGREN et al. in einem Modell der Hepatozyten-Serientransplantation zeigen, dass diese Zellen bis zu 70 Zellteilungen unterlaufen können, was einer über 10²⁰-fachen Expansion entspricht [21]. Die Leberregeneration stellt in sich ein komplexes Zusammenspiel von Hepatozyten und nicht-parenchymatösen Zellen dar, welches durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren präzise reguliert wird [22]. Dabei soll eingangs betont werden, dass es sich hierbei um keine Organregeneration im eigentlichen Sinne handelt, welche mit der Bildung eines Blastems aus undifferenzierten, pluripotenten Zellen beginnt, die die geschädigten Organteile ersetzen, wie zum Beispiel den abgetrennten Schwanz einer Echse [23]. Die Regeneration der Leber nach Resektion unterscheidet sich davon grundlegend. Es kommt zu keiner Ausbildung eines Blastems undifferenzierter Zellen, die den entfernten Leberlappen rekonstituieren. Vielmehr setzt ein kompensatorisches Wachstum der verbleibenden Leberlappen ein. Das Ausmaß der Regeneration unterliegt Steuerungsmechanismen, welche sich weniger in der absoluten Lebermasse, sondern mehr in der Wiederherstellung eines optimalen Verhältnisses zwischen Lebergewicht und Körpergewicht widerspiegeln. Dadurch wird eine Anpassung an die aktuellen metabolischen Bedürfnisse des Körpers gewährleistet [24]. Dies beinhaltet nicht nur das kompensatorische Wachstum nach dem Verlust von Lebergewebe, sondern ebenso die Reduktion der Lebermasse, wenn diese die körperlichen Bedürfnisse übersteigt. Dies ist beispielsweise nach Transplantation einer zu großen Leber der Fall, eines sogenannten *large-for-size-Transplantates*, oder medikamentös induzierter Leberhyperplasie [25].

Durch Entzug der wachstumsfördernden Stimulantien kommt es in dieser Situation zur vermehrten Apoptose von Hepatozyten, wodurch ein optimales Gleichgewicht zwischen Leber- und Körpergewicht wiederhergestellt wird [26].

Ein wichtiger Punkt bei der Betrachtung der Leberregeneration ist die Herkunft der Zellen, welche den Verlust an Leberparenchym ausgleichen, da diese in Abhängigkeit von der Art der Leberschädigung variieren [27]. Nach partieller Hepatektomie oder CCl₄-Intoxikation können die vorhandenen, differenzierten Hepatozyten den Zellverlust ohne nachweisliche Beteiligung von Stammzellen oder Progenitorzellen vollständig ausgleichen [28, 29]. Bei der Regeneration nicht-parenchymatöser Zellen der Leber, wie z.B. Endothelzellen, besteht jedoch Anhalt für einen Beitrag von Stammzellen des Knochenmarks [30]. Demgegenüber können in experimentellen Modellen nur Toxine wie z.B. Galactosamin oder Retrorsin einen derart schwerwiegenden Parenchymverlust erzeugen, der die Aktivierung intrahepatischer Progenitorzellen auslöst [31, 32]. Aber auch beim Menschen konnte die Beteiligung eines sogenannten Ovalzell-Kompartiments in Fällen von massiver Leberzellnekrose nachgewiesen werden [33-35]. Als Ovalzellen werden Leberepithelzellen in den Herring-Kanälen der Leber bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, sowohl in Hepatozyten, als auch in Cholangiozyten zu differenzieren [36]. Beide Zelllinien entstehen während der embryonalen Entwicklungsphase aus dem endodermalen Hepatoblasten, der als dritte Entität auch für die Entwicklung von Ovalzellen verantwortlich zu sein scheint [37]. Von dieser recht heterogenen Zellpopulation mit uneinheitlichem Reifungsgrad und unterschiedlichen Differenzierungsfähigkeiten wird angenommen, dass sie ein Reservekompartiment für die Regeneration von Hepatozyten für den Fall darstellt, dass die physiologische Replikation differenzierter Hepatozyten blockiert oder unzureichend für eine vollständige Regeneration ist [27].

Der charakteristische Ablauf der Leberregeneration beginnt bei der Maus mit dem Eintritt der Hepatozyten in die S-Phase des Zellzyklus 12 - 16 h nach PH, wobei 36 – 48 h nach PH das Maximum der DNA-Synthese normalerweise erreicht ist [38]. Der Übergang in die Mitose ist demgegenüber abhängig von zirkadianen Rhythmen, da der Eintritt in die M-Phase immer zur gleichen Tageszeit stattfindet [39]. Ausgehend von den periportalen Gebieten des klassischen Leberläppchens schreitet der Eintritt in die S-Phase weiter in die perizentralen Gebiete fort. Dabei konnte im Tiermodell festgestellt werden, dass in Abhängigkeit vom Alter zwischen 70% der Hepatozyten in älteren Tieren und über 90% der Hepatozyten in Jungtieren beteiligt sind [40, 41]. Die nicht-parenchymatösen Zellen

der Leber, die Gallengangsepithelzellen, fenestrierte Endothelzellen, Kupffer- und Ito-Zellen sind ebenfalls an der generalisierten Regenerationsreaktion beteiligt, treten jedoch mit einer Verzögerung von 24 h in den Zellzyklus ein und erreichen die maximale DNA-Synthese erst 48 h später als die Hepatozyten [42]. Durch die fortschreitende Replikation aller Zelltypen wird die normale Leberhistologie vollständig aufgelöst. Drei bis vier Tage nach PH ist die Mikroarchitektur durch Anhäufungen von je acht bis zehn Hepatozyten gekennzeichnet, die durch das Einsprossen von sinusoidalen Gefäßen und Ito-Zellausläufern organisiert werden [43]. Im weiteren Verlauf wandeln sich die zunächst gebildeten Kapillaren in echte Lebersinusoide mit fenestriertem Endothel um und auch die extrazelluläre Matrix nimmt mit zunehmendem Anteil von Fibronectin sowie Kollagen Typ I und IV die Leber-typische Zusammensetzung an. Am siebenten Tag ist die klassische Leberhistologie wiederhergestellt, wobei die zunächst vergrößerten Leberläppchen entsprechend den metabolischen Bedürfnissen in der Größe angepasst werden können, um letztendlich den normalen Leberaufbau wieder zu erreichen [44-46].

Der charakteristische Ablauf der Leberregeneration wird in die drei Phasen Initiation, Progression und Terminierung unterteilt [47]. Die Initiation umfasst die Vorbereitung der ruhenden Hepatozyten auf die anschließende Proliferation und ist charakterisiert durch den Übergang der Zellen vom G_0 - in den G_1 -Zustand des Zellzyklus [48]. Eingeleitet wird dieser Schritt durch die Zytokine Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6), deren Anstieg im Blut nach PH innerhalb der ersten 30 min nachweisbar ist [31]. Verantwortlich für die Freisetzung dieser Zytokine sind insbesondere die nicht-parenchymatösen Zellen der Leber, vor allem Kupffer-Zellen, sinusoidale Endothelzellen und hepatische Sternzellen [49]. In welchem Umfang diese beiden Zytokine alleine für die Initiation verantwortlich sind, kann noch nicht abschließend beantwortet werden, da kontroverse Daten zur Leberregeneration von genetisch veränderten Tieren mit Deletion des IL-6 bzw. TNF- α Rezeptors vorliegen [50-52]. Zudem konnten auch andere Zytokine, wie z.B. *stem cell factor* (SCF) und *oncostatin M* (OSM) identifiziert werden, die ebenfalls zu diesem frühen Zeitpunkt in die Regenerationskaskade involviert sind [53, 54]. Durch die Einwirkung der Zytokine werden über post-translationale Mechanismen die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor for kappa-chain on B-cells* (NF κ B), *signaltransducer and activator of transcription-3* (STAT-3), *activator protein-1* (AP-1) und *CCAAT enhancer binding protein β* (C/EBP β) aktiviert, welche nachfolgend die Expression der *immediate early genes* steuern [47]. Diese kodieren für eine Gruppe von über 70 funktionell inhomogenen Proteinen, deren Bedeutung für die Leberregeneration noch nicht

vollständig erschlossen werden konnte [55, 56]. Für einige von ihnen konnte jedoch bereits die funktionelle Relevanz geklärt werden. So sind die Produkte der Proto-Onkogene *c-fos*, *c-jun* und *c-myc* direkt an der Signaltransduktion beim G_0 - G_1 -Übergang der Hepatozyten beteiligt, während *c-met* für den zellulären Rezeptor des *hepatocyte growth factor* (HGF) kodiert [57-59]. Durch diese Prozesse werden die Hepatozyten insgesamt ansprechbar für die Wachstumsfaktoren, das sogenannte *Priming*, und können den G_0 -Arrest verlassen.

Die anschließende Phase der Progression im Zellzyklus wird allerdings nicht allein durch die Expression der *immediate early genes* erreicht. Erst durch die Wachstumsfaktoren HGF und *transforming growth factor- α* (TGF- α) kann dieser Schritt realisiert werden [22]. Daneben sind aber auch andere Mitogene wie *augmenter of liver regeneration* (ALR), *epithelial growth factor* (EGF) und *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) sowie eine Vielzahl von sogenannten Co-Mitogenen an der Progression beteiligt. Co-Mitogene, wie z.B. Insulin, Glukagon, Adrenalin, Noradrenalin, Thyroxin, Calcium und Vitamin D können nicht direkt die Proliferation der Hepatozyten stimulieren, sind aber in der Lage die Wirkung der oben genannten Mitogene zu verstärken [48]. Die Produktion all dieser Faktoren unterliegt wiederum komplexen Regulationsmechanismen, die an dieser Stelle nicht weiter erläutert werden können.

HGF, der potenteste Stimulator der hepatozytären Proliferation, wird vor allem in hepatischen Sternzellen, Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen produziert, was auf die wichtige Interaktion von parenchymatösen und nicht-parenchymatösen Zellen hindeutet [60]. Im Gegensatz zu der parakrinen Wirkung von HGF wird TGF- α von den Hepatozyten selbst synthetisiert und wirkt somit auto- bzw. juxtakrin [22]. Nach der erfolgreichen Transition in die G_1 -Phase wird die Progression im Zellzyklus unabhängig von Wachstumsfaktoren durch die Expression von Zyklinen und die Aktivierung von Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) sowie den entsprechenden CDK-Inhibitoren reguliert. So ist beispielsweise der Eintritt in die S-Phase abhängig von der Formation der Zyklin E-CDK2- und Zyklin A-CDK2-Komplexe. Die G_2 -M-Progression wiederum beruht auf der Assoziation von Zyklin B und CDK1, während der G_2 -M-Übergang durch ein Zellzyklus-abhängiges nukleäres Protein, die Zitrone-Kinase gesteuert wird [31, 61, 62]. Zudem wird angenommen, dass die Expression von Zellzyklusgenen wie den *delayed early genes* p53, p21 oder mdm nach PH an der Regulation der hepatozytären Proliferation beteiligt sind [24], auch wenn dies für p53 schon teilweise widerlegt werden konnte [63].

Um ein unkontrolliertes Wachstum der Leber zu verhindern, sind ebenfalls Inhibitoren der hepatozytären Proliferation in den Ablauf der Leberregeneration integriert, welche die Phase der Terminierung einleiten. Hierzu gehören vor allem *transforming growth factor β -1* (TGF β -1) und Activin A, die beide ihre intrazelluläre Wirkung über Smad-Proteine entfalten und so in der Lage sind, die Lebermasse über Apoptose-Induktion zu reduzieren [46, 48]. Zudem ist der *suppressor of cytokine signalling-3* (SOCS-3) als Zielgen von STAT-3 in der Lage, das aktivierte STAT-3 zu hemmen und damit die IL-6 Signaltransduktion zu inhibieren [64]. TGF β -1 wird von nicht-parenchymatösen Zellen synthetisiert und erreicht das Maximum seiner Expression ca. 72 h nach PH. Es ist jedoch nur in der Lage, die mitogene Wirkung von TGF- α zu unterdrücken [65]. Activin A hingegen wirkt, synthetisiert von proliferierenden Hepatozyten, als autokriner Inhibitor der hepatozytären DNA-Synthese und wird durch das Activin-bindende Protein Follistatin reguliert. Der hepatozytäre Activin-Rezeptor wird nach PH herunterreguliert und erreicht erst nach 72 h, vergleichbar mit TGF β -1, seine ursprüngliche Expression, wodurch die Ansprechbarkeit der Hepatozyten auf mitogene Stimuli gewährleistet wird [66]. Allerdings sind auch für diesen Abschnitt der Regeneration die genauen Abläufe noch nicht endgültig geklärt.

Die so beschriebenen Phasen von Initiation, Progression und Terminierung bilden das Grundgerüst der bisher bekannten Abläufe während der Leberregeneration. Allerdings deuten neuere Studien darauf hin, dass diese Prozesse nicht strikt getrennt voneinander ablaufen, sondern komplex miteinander verbunden sind [31]. So kann beispielsweise das für die Initiation verantwortliche Zytokin TNF- α über die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen die Freisetzung des in die Progression des Zellzyklus involvierten Wachstumsfaktors TGF- α und die Aktivierung des zugehörigen EGF-Rezeptors steuern [31, 67]. Von großer Bedeutung für die Forschung ist ebenso die Frage nach Mechanismen, die den initialen Trigger der Regenerationskaskade erzeugen und dafür Sorge tragen, dass das Ausmaß der Leberregeneration an die Bedürfnisse des Organismus angepasst wird. Interessante Kandidaten hierfür sind zum einen Moleküle wie das *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Dieses ist Bestandteil eines Komplexes, der Nährstoff- und Energiestatus von Zellen wahrnehmen und mit den Signalen von Wachstumsfaktoren verbinden kann. Dadurch wird eine bedarfsgerechte Regulation von Proteinsynthese und Zellwachstum ermöglicht [68, 69]. Dies könnte auch im Verlauf der Leberregeneration eine Rolle spielen, da nach PH die Versorgung der verbleibenden Hepatozyten mit Nährstoffen und Energielieferanten entsprechend ansteigt [31].

1.3 Häm-Oxygenase und CO

Bereits 1857 konnte von dem französischen Physiologen Claude Bernard [73] nachgewiesen werden, dass Kohlenmonoxid (CO) reversibel an Hämoglobin binden und dadurch eine Asphyxie auslösen kann. Zunächst war CO jedoch nur als luftverschmutzendes Agens und lautloser Killer bekannt, der vor allem bei unvollständiger Verbrennung fossiler Rohstoffe, wie Öl, Gas oder Kohle entsteht. Im Verlauf des nächsten Jahrhunderts konnte allerdings gezeigt werden, dass CO auch im Inneren des Körpers selbst gebildet wird und dass die treibende Kraft hierfür das Enzym Häm-Oxygenase (HO) ist [74-76]. Bisher wurden 3 verschiedene Isoenzymformen der HO identifiziert und in einer Vielzahl an Studien ließ sich die physiologische Beteiligung der endogenen CO-Produktion an der Aufrechterhaltung der körperlichen Homöostase für nahezu jedes Organsystem aufzeigen. Es besteht zwar weiterhin Skepsis bezüglich des Stellenwertes der körpereigenen CO-Synthese, allerdings liefern die aktuellen Fortschritte in der Wissenschaft ausreichende Belege dafür, dass CO zusammen mit Stickstoffmonoxid (NO) und Schwefelwasserstoff (H₂S) zu der neuen Klasse der physiologisch bedeutsamen Gasotransmitter gehört [77].

Auch wenn nicht-enzymatische Wege der Häm-Degradation bekannt sind [78], wird der Großteil des Häm-Katabolismus durch die HO realisiert, welche vor allem im retikuloendothelialen System von Milz und Leber synthetisiert wird [79]. Hier wird im Wesentlichen das Häm aus Hämoglobin zugrunde gegangener Erythrozyten abgebaut [80]. Die HO ist aber auch in vielen anderen Zelltypen vorhanden, in denen nicht-Protein-gebundenes Häm als prosthetische Gruppe in Häm-Proteine, wie Katalasen, Peroxidasen, Guanylylzyklase (GC), NO-Synthase (NOS) oder Cytochrome integriert ist [81]. Während ein erhöhtes intrazelluläres Stresslevel der dominierende Stimulator einer *de novo* Synthese der induzierbaren Isoenzymform HO-1 ist [82], werden HO-2 und HO-3 überwiegend konstitutiv exprimiert [83, 84]. HO-2 (36kD) und HO-3 (33kD) teilen vor allem eine 22 Aminosäuren große Domäne mit der HO-1, die als sogenannte HO-Signatur für die Häm-Bindung und Degradation verantwortlich sein soll [85]. Die Fähigkeit der HO-3 zur Häm-Degradation ist jedoch sehr beschränkt, so dass man ihr neben der Messung und Bindung von Häm keine weitere Rolle für dessen Katabolismus zuspricht [83, 86].

Unter physiologischen Bedingungen ist die HO-1 nur in der Milz stärker exprimiert als die HO-2, welche konstitutiv in Leber, Milz, Niere, Magen, Gehirn und Hoden vorhanden ist. Lokalisiert sind HO-1 und HO-2 vor allem im endoplasmatischen Retikulum [79, 87], wobei die HO-1 auch in Zytoplasma, Mitochondrien, Peroxisomen und in der nukleären Matrix von Leberzellen nachgewiesen werden konnte [88]. Prinzipiell trägt die HO-1 aufgrund ihres Molekulargewichtes von 32 kD und der Induzierbarkeit durch Hitzestress ebenfalls die Bezeichnung *heatshock protein 32* (HSP32) [89]. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass dieser Effekt genauso wie die Induktion durch Hypoxie oder Interferon- γ (IFN- γ) im Gegensatz zu vielen Tierversuchen nicht in humanen Zellen nachweisbar ist, sondern vielmehr in einer Repression der HO-1 Proteinexpression resultiert [90-93].

Die möglichen Induktoren der HO-1 umfassen ein weites Feld von endogenen und exogenen Stimuli. Darunter befinden sich neben Häm und Häm-Derivaten als natürliche Substrate der HO, radioaktive und ultraviolette Strahlung, Metallverbindungen, Wachstumsfaktoren, Zytokine, oxidativer Stress, Scherstress, NO und exogen zugeführtes CO sowie viele andere zellschädigende Agenzien [94]. Die Induktion wird in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulus und Zelltyp über verschiedene Signalwege realisiert. Darunter befinden sich cAMP-abhängige Mechanismen [95, 96] sowie Signalwege, welche die Proteinkinase C (PKC), die Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase, Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) oder auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) einbeziehen [97, 98]. Die HO-2 kann zwar aufgrund einer entsprechenden Konsensus-Sequenz in ihrem Promotor durch Glukokortikoide induziert werden, relevanter ist für dieses Enzym jedoch die post-translationale Aktivierung [99]. So kann die Enzymaktivität kurzfristig durch Bindung des Ca²⁺-Calmodulin Komplexes [100], Phosphorylierung durch die PKC [101] oder Rezeptor-abhängige Glutamatwirkung [100] gesteigert werden.

Biologisch bedeutsame Inhibitoren sind für HO-1 und HO-2 kaum bekannt. Umso größer ist jedoch das Wissen um pharmakologische Inhibitoren der HO-Aktivität, vor allem Metalloporphyrinen [102], die viel zum Verständnis der physiologischen Bedeutung der HO beigetragen haben. Darüber hinaus sind an der Regulation der HO-Aktivität Häm-bindende Proteine, wie Hemopexin, *heme-binding protein 23* (HBP23) und Glutathion-S-Transferase beteiligt, da sie durch Bindung von freiem Häm dessen pro-oxidative Wirkung inhibieren und die katalytische Aktivität der HO reduzieren [103, 104].

Die HO bildet zusammen mit der Cytochrom P450 Reduktase und der Biliverdin Reduktase einen Komplex am endoplasmatischen Retikulum [79]. In Anwesenheit von

NADPH und O_2 wird der Porphyrinring des Häm aufgespalten (Abb. 3), CO, Fe^{2+} und Biliverdin werden in äquimolaren Mengen freigesetzt [105] sowie das Biliverdin daraufhin von der Biliverdin-Reduktase in Bilirubin umgewandelt [74]. Biliverdin und Bilirubin sind die stärksten, endogenen Antioxidantien und in der Lage, Peroxid-Radikale abzufangen und die Lipid-Peroxidation zu inhibieren [106, 107]. Zudem kann Biliverdin, aber nicht Bilirubin, die lösliche Guanylylzyklase (sGC) hemmen [108]. Fe^{2+} ist zwar oxidativ wirksam, induziert aber Ferritin, welches über 4000 Fe^{2+} Atome binden kann und damit für die sichere intrazelluläre Speicherung des freigesetzten Fe^{2+} sorgt [109]. Darüber hinaus steigert die HO-1 den zellulären Fe^{2+} -Efflux, weshalb davon ausgegangen wird, dass dieser Anteil der HO-1 Aktivität ebenfalls für zytoprotektive Effekte verantwortlich ist [110]. Nicht zuletzt weisen Tiere mit ausgeschaltetem HO-1 Gen genauso wie im Fall der humanen HO-1 Defizienz eine massive Eisenüberladung in Leber und Niere auf, was die entsprechenden Zellen um ein Vielfaches anfälliger für die Schädigung durch oxidativen Stress macht [111-113].

Die Effekte des freigesetzten CO konnten in vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen nachgewiesen werden. Verantwortlich sind hierfür vor allen Dingen die Fähigkeiten von CO, die cGMP-Synthese über eine sGC-Stimulation zu steigern, die p38 MAPK zu aktivieren, mit verschiedenen Ionenkanälen und Hämoproteinen zu interagieren sowie die sogenannte nicht-adrenerge-nicht-cholinerge (NANC) Neurotransmission zu realisieren [94]. Hierüber entfaltet CO seine anti-apoptotische, anti-inflammatorische, anti-aggregative und anti-proliferative Wirkung. Es reduziert die Schädigung von Herz, Lunge, Niere und Leber durch Toxine oder Ischämie-Reperfusion und verhindert die Abstoßung von Allo- und Xenotransplantaten. Darüber hinaus ist es in viele Prozesse des zentralen Nervensystems, wie die Hypothalamus-Hypophysen-Achse, zirkadiane Rhythmik, Riechen, Sehen, Hören, Nozizeption, Thermoregulation sowie Lernvorgänge involviert und kann ebenso das periphere autonome Nervensystem beeinflussen [94].

Eine weitere wichtige Eigenschaft von CO ist seine Fähigkeit, die vaskuläre Kontraktilität zu beeinflussen. Bereits 1984 konnte von McGrath und Smith eine Dilatation von Koronararterien der Ratte unter exogen zugeführtem CO nachgewiesen werden [114]. Dieser Endothel-unabhängige Effekt scheint nahezu ubiquitär vorzukommen und konnte für eine Reihe anderer Gefäße in verschiedenen Tiermodellen ebenfalls belegt werden [115]. Hierzu gehören unter anderem Koronararterie, Schwanzarterie, Lebervene und Aorta der Ratte, Karotis, Koronararterie und Femoralarterie des Hundes sowie

Koronararterien von Schwein und Meerschwein [94]. Verantwortlich für diese Effekte werden vor allem die Stimulation der cGMP-Synthese durch Aktivierung der sGC und die Interaktion mit Ionenkanälen gemacht [116]. CO entfaltete allerdings nicht bei allen untersuchten Gefäßen eine vasodilatative Wirkung und führte beispielsweise in den Arteriolen des Musculus gracilis der Ratte paradoxerweise zur Vasokonstriktion [117]. Ob diese Beobachtung durch abweichende Gefäßpräparationen und experimentelle Bedingungen verursacht sind oder hier tatsächlich Unterschiede der Gefäßmorphologie und Enzymverteilung zu tragen kommen, konnte bisher nicht geklärt werden.

Neben den bereits erwähnten protektiven Effekten nach Transplantationen, Toxineinwirkung oder Ischämie-Reperfusionstress [118] kommt der HO-medierten Produktion von CO eine wichtige Rolle für die Regulation der hepatischen Perfusion zu [119]. Unter physiologischen Bedingungen wird vor allem die HO-2 in Hepatozyten, Kupffer-, Endothel- und Itozellen exprimiert, während die HO-1 nur in Kupfferzellen nachgewiesen werden konnte [120]. Nach Einwirkung von endogenen Stimuli wie Insulin, Glukagon, Epinephrin und Angiotensin II oder exogenen Stressoren wird die HO-1 jedoch ubiquitär von Parenchym- wie Nicht-Parenchymzellen synthetisiert [96, 121]. Aufgrund der vasodilatativen Effekte von CO an Lebervene und Lebersinusoiden wird der HO-1 eine wichtige Rolle für die Kontrolle von Blutflussverteilung und sinusoidalem Tonus zugesprochen [122]. Im Gegensatz dazu hat CO im Ratten-Modell allerdings keinen Einfluss auf den Kontraktilitätszustand der Leberarterie. Hierfür scheint vielmehr das NOS/NO-System zuständig zu sein [123], welches im nachfolgenden Abschnitt näher betrachtet werden soll.

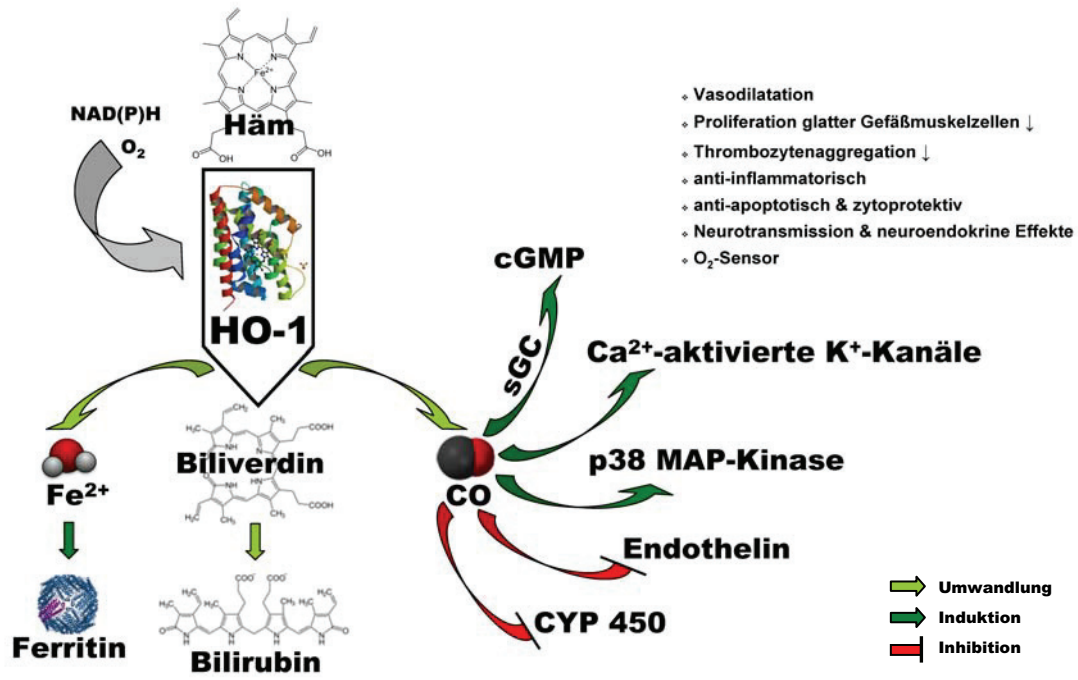


Abbildung 3: Die Häm-Oxygenase (HO-1) baut ihr Substrat Häm zu Biliverdin unter der Freisetzung von Fe²⁺ und CO ab. Die zellulären Effekte der HO-1-Aktivität werden durch die nachfolgende Induktion von Ferritin, die anti-oxidativ wirksamen Metabolite Biliverdin und Bilirubin sowie CO vermittelt. CO induziert dabei eine Vielzahl von Prozessen, wie z.B. die Aktivierung der p38 MAP-Kinase, Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle und der löslichen Guanylylzyklase (sGC) sowie die Inhibition von Endothelin und Cytochrom P450 (CYP 450).

1.4 NO-Synthase und NO

Die physiologische Bedeutung von NO wurde erst in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts erschlossen. Während bis 1986 nur 10 Artikel zur NO-Synthese von Säugetieren veröffentlicht wurden, waren die Identifizierung von NO als der bis dato nur hypothetisch existierende *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) 1987 und die erste Beschreibung der NO-Synthase (NOS) 1989 die Geburt eines vollständig neuen Forschungsgebietes [124, 125]. Bis 1992 beschäftigten sich schon 500 Artikel mit der Funktion von NO im Organismus, bis 2001 16.000 Artikel und jährlich kommen ca. 7.000 neue Veröffentlichungen hinzu [126]. Nicht zuletzt wurde die Erforschung von NO als körpereigener Mediator 1998 mit dem Nobelpreis für die führende Arbeitsgruppe um R. Furchgott, L. Ignarro und F. Murad gewürdigt [126].

Die bisher bekannten Isoenzymformen der NOS sind die nNOS bzw. NOS-1, das prädominante Isoenzym im Nervengewebe, die iNOS bzw. NOS-2, welche in einer großen Anzahl von Zell- und Gewebetypen induzierbar ist und zuletzt die eNOS bzw. NOS-3, das zuerst in Gefäßendothelzellen identifizierte Isoenzym. Alle 3 Isoenzymformen sind auf

verschiedenen Genen kodiert und unterscheiden sich in Regulation, katalytischer Aktivität und Sensibilität gegenüber Inhibitoren, weisen aber eine Homologie von über 50% untereinander auf [126]. Sie wurden zunächst nach ihrer konstitutiven (NOS-1 und NOS-3) bzw. induzierbaren (NOS-2) Expression sowie der Abhängigkeit (NOS-1 und NOS-3) bzw. Unabhängigkeit (NOS-2) von Ca^{2+} unterschieden [127]. Auch wenn die Nomenklatur weiterhin verwendet wird, entspricht die zugrunde liegende Unterteilung nicht mehr dem aktuellen Stand der Forschung. So konnte gezeigt werden, dass alle 3 Isoenzymformen in bestimmten Geweben sowohl konstitutiv exprimiert, als auch durch verschiedene Stimuli induziert werden können [128]. Die Abhängigkeit von Ca^{2+} trifft zumindest für NOS-1 und NOS-3 von Mensch und Nagetieren zu, nicht aber für viele andere Spezies. Außerdem stimmt die Unterscheidung nach dem Molekulargewicht (NOS-1 = 160 kD; NOS-2 und NOS-3 = 130 kD) nicht mit den neu gewonnenen Erkenntnissen über die alternativen splice-Varianten von NOS-1 und NOS-2 überein [126].

Alle Formen der NOS gleichen sich jedoch im prinzipiellen Aufbau. In ihrer aktiven Form bilden sie Homodimere bzw. Tetramere, da jedes NOS-Molekül noch zusätzlich ein Calmodulin-Molekül benötigt sowie als Co-Faktoren Tetrahydrobiopterin (BH_4), FAD, FMN und Häm. Die Elektronen von NADPH werden in Anwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin über FAD und FMN auf das Reaktionszentrum der NOS übertragen, interagieren mit dem Häm-Eisen und BH_4 , um dann die Reaktion von O_2 und L-Arginin zu L-Citrullin und NO zu katalysieren (Abb. 4) [129-131]. Dies stellt zumindest den breiten Konsensus über die „normale“ zelluläre Funktion der NOS dar, auch wenn weiter strittig ist, welchen Stellenwert NO^- als alternatives Reaktionsprodukt für die Physiologie und Pathophysiologie der NOS Aktivität hat [132, 133].

Die differentielle Regulation der NOS Isoenzymformen ist komplex und umfasst transkriptionelle, post-transkriptionelle, translationale und post-translationale Mechanismen [134]. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle nur kurz auf einige relevante Aspekte der Regulation von NOS-2 und NOS-3 eingegangen werden. Die NOS-2 kann Calmodulin schon bei minimalen Ca^{2+} -Konzentrationen binden und ist in ihrer Aktivität somit unabhängig von einer zusätzlichen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Vielmehr wird die Proteinexpression der NOS-2 durch eine Reihe von immunologischen und inflammatorischen Stimuli induziert und die NO-Synthese der betroffenen Zellen kann bis zu fünf Tage nach Stimulation erhöht sein. Zu den Stimuli gehören neben Interferon und der NF κ B-vermittelten LPS-Wirkung auch UV-Licht, Ozon, cAMP-Spiegel erhöhende Agenzien, Traumata und Mikroorganismen ohne LPS. Allerdings gibt es ebenso Anhalt für

eine konstitutive Expression der NOS-2 unter physiologischen Bedingungen. Außerdem kann IFN- γ die mRNA-Stabilität erhöhen, während TGF- β sowohl die mRNA-, als auch Protein-Degradation fördert und Kortikosteroide, IL-4 sowie IL-10 in der Lage sind, die Induktion der NOS-2 zu inhibieren [135].

Die NOS-3, wie auch die NOS-1, benötigen für die Bindung von Calmodulin deutlich höhere Ca^{2+} -Konzentrationen, so dass die kurzzeitige Aktivierung vor allem durch Substanzen ausgelöst wird, welche den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel erhöhen. In Abhängigkeit von der jeweiligen Zelle sind dies unter anderem Calcium-Ionophore, elektrische Reize, Aminosäuren, Acetylcholin, Bradykinin, ADP, LPS und Leukotriene. Allerdings sind durch Promotorstudien und *in vitro* Experimente ebenfalls Aktivatoren der NOS-3 Expression, wie z.B. Aktivator Protein-1 (AP-1), Akute Phase Proteine und Scherstress bekannt geworden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die NOS-3 mRNA post-transkriptional durch TNF- α destabilisiert wird, während die Enzymaktivität der NOS-3 durch post-translationale Phosphorylierung des Proteins gesteigert werden kann. Darüber hinaus wird die NOS Aktivität generell durch die Verfügbarkeit von L-Arginin, O_2 , BH_4 und die subzelluläre Lokalisation bestimmt, so dass insgesamt ein äußerst komplexes Regulationsschema resultiert, dessen natürliche Funktionsweise nur mittels *in vivo* Experimenten korrekt nachvollzogen werden kann [128, 136].

Die erste bekannte molekulare Zielstruktur von NO war die sGC. Durch Nitrosylierung der Häm-Gruppe stimuliert NO die cGMP-Synthese und entfaltet hauptsächlich hierüber seine vasodilatative Wirkung [137]. Durch Interaktion und Nitrosylierung mit anderen Häm-Proteinen kann NO zudem die Wirkung von Proteinen, wie z.B. der ADP-Ribosyltransferase oder der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase, inhibieren und dadurch eine zytotoxische Wirkung vermitteln. Wie von dem Plasminogen-Aktivator bekannt, kann aber durch S-Nitrosylierung die Aktivität von Proteinen interessanterweise auch gesteigert werden. Weitere zytotoxische Effekte von NO können zudem durch die Reaktion mit dem Superoxid-Anion und Bildung von Hydroxyl-Radikalen, den stärksten Oxidantien in biologischen Systemen, vermittelt werden [128].

Durch die Vielzahl an möglichen Proteininteraktionen und das nahezu ubiquitäre Vorkommen der sGC sind auch die physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der NOS äußerst vielfältig. NO mediiert die Wirkung exzitatorisch wirksamer Aminosäuren im zentralen Nervensystem und ist darüber möglicherweise in Lernvorgänge involviert [138, 139]. Daneben wird aber auch die Vermittlung der neurotoxischen Wirkung exzessiver Glutamat-Ausschüttung diskutiert [140]. Im peripheren autonomen

Nervensystem ist NO in die NANC-Neurotransmission eingebunden und kann darüber die Funktionen von Ösophagus, Magen und Darmtrakt beeinflussen [141].

Im Gefäßsystem ist NO via sGC/cGMP vor allem für die Reduktion des Gefäßtonus verantwortlich, wobei neben der NOS-3 auch die NOS-2 nach Induktion durch inflammatorische Stimuli beteiligt ist [142, 143]. Störungen der NO-Produktion und NO-Wirkung sind daher in die Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der essentiellen arteriellen und pulmonalen Hypertonie, oder auch in die gestörte Vasoregulation bei Diabetes mellitus und Atherosklerose involviert [144-147]. Neben der vasodilatativen Wirkung vermittelt NO im Gefäßsystem auch die Inhibition von Thrombozyten- und Leukozytenaggregation, der Endothelin-Synthese sowie der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [125, 148-151]. Die Mikrozirkulation der Niere kann ebenfalls durch NO moduliert werden, wobei es in die Kontrolle der Reninfreisetzung und des intravasalen Volumens integriert ist [152].

In der Lunge ist NO an der Regulation der Ventilations-Perfusionsverteilung beteiligt und vermittelt ebenso die Anpassung des Lungengefäßwiderstandes unter Hypoxie [153]. Die Funktion von NO im Immunsystem, freigesetzt durch Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten, ist in erster Linie durch seine zytostatische bis zytotoxische Wirkung gegenüber Mikroorganismen, Tumorzellen und Lymphozyten charakterisiert. Paradoxe Weise konnten in Abhängigkeit vom experimentellen Modell jedoch sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte von NO nachgewiesen werden [154].

Die beschriebene Diversität der NO-Wirkmechanismen findet sich in vielen anderen Systemen wieder und kennzeichnet auch die Effekte von NO in der Leber. So wird angenommen, dass die endotheliale NOS-3 eher an der Durchblutungsregulation und der Inhibierung von Thrombozyten- und Leukozytenaggregation innerhalb der Leberzirkulation beteiligt ist. Demgegenüber wird die NOS-2 vor allem im Verlauf von Endotoxinämie, hämorrhagischem Schock, Ischämie-Reperfusion, Infektionen, Tumorerkrankungen, aber auch der Leberregeneration induziert, woraufhin große Mengen an NO in nahezu allen Leberzellen, insbesondere in Kupffer-Zellen, produziert werden [155-158]. Nützliche, wie auch schädliche Einflüsse von NO sind abhängig von Menge, Dauer und Ort der NO-Synthese nachweisbar. In niedriger Konzentration verbessert es die Leberperfusion, neutralisiert toxische Sauerstoff-Radikale und kann anti-mikrobielle sowie anti-apoptische Effekte im Falle akuter Infektionen und anderer inflammatorischer Prozesse vermitteln. Demgegenüber werden anhaltend hohe NO-Konzentrationen während

chronischer Entzündungssituationen für kanzerogene und zytotoxische Effekte verantwortlich gemacht [159].

Für die Bedeutung der NO-Synthese im Rahmen der Leberregeneration konnte bisher gezeigt werden, dass unter der Einwirkung von erhöhtem Scherstress vermehrt NO durch NF κ B-vermittelte Induktion der NOS-2 produziert wird [160, 161]. Im Gegensatz zur NO-Synthese in Tiermodellen des septischen Schocks sind die resultierenden NO-Konzentrationen jedoch deutlich niedriger und die Expression der NOS-2 sowie der Verbrauch des produzierten NO lokal auf die Leber begrenzt [162-165]. NO entfaltet hier ein breites Wirkungsspektrum von der Modulation der Proteinsynthese und -funktion, Kontrolle der zellulären Ploidie und der mitochondrialen Atmung bis hin zu systemischen Effekten auf den Blutfluss [166-168]. Im Hinblick auf die vaskuläre Wirkung von NO wird angenommen, dass es nach partieller Hepatektomie an der vaskulären Readaption und Aufrechterhaltung des Blutflusses in den verbleibenden Leberlappen beteiligt ist und darüber hinaus auch zur Vaskularisierung des regenerierenden Gewebes beiträgt [165]. Die essentielle Bedeutung von NO für die Leberregeneration konnte durch eine Reihe an Experimenten mit genetisch veränderten Tieren belegt werden. Sowohl Tiere mit ausgeschaltetem NOS-2-Gen als auch Veränderungen, welche eine NOS-2-Induktion verhindern, beeinträchtigen den Regenerationsprozess erheblich [169-171].

Das freigesetzte NO ist überdies auch für protektive sowie anti-apoptische Effekte verantwortlich und kann die hepatozytäre Proliferation verzögern, wenn es beispielsweise vor einer Leberresektion verstärkt synthetisiert oder exogen zugeführt wird [172]. Widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Studien sind dabei meist durch Unterschiede im experimentellen Modell und der Art der NO-Modulation bedingt und erschweren valide Aussagen zur Bedeutung von NO in physiologischen wie pathophysiologischen Leberprozessen. Zudem existieren auch Überschneidungen mit dem zweiten bekannten Gasotransmitter CO, welche im nächsten Abschnitt dargelegt werden sollen.

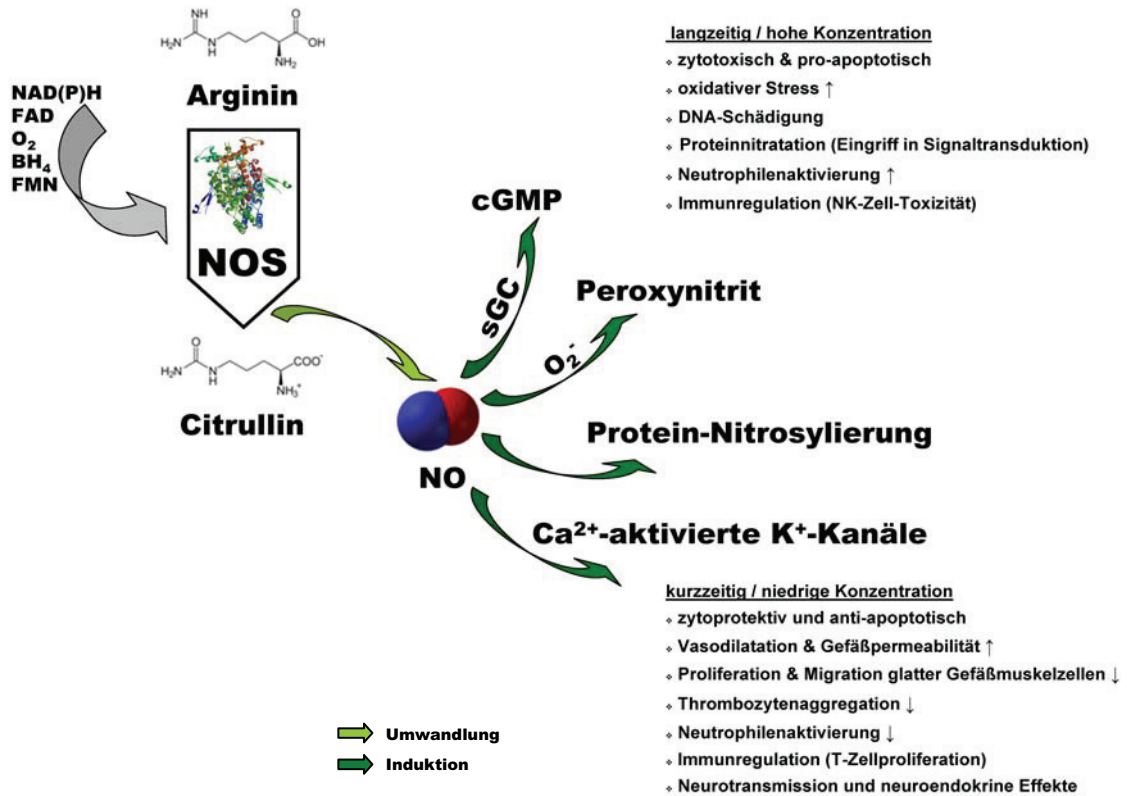


Abbildung 4: Die NO-Synthase wandelt ihr Substrat Arginin unter der Freisetzung von NO in Citrullin um. NO entfaltet daraufhin in Abhängigkeit von Zeitdauer und Konzentration über die Aktivierung Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle und der löslichen Guanylylzyklase (sGC), sowie der Protein-Nitrosylierung und Generierung von Peroxynitrit zahlreiche zelluläre Effekte.

1.5 Interaktionen von HO/CO und NOS/NO

Sowohl CO als auch NO binden an das Häm-Fe²⁺ von Hämoproteinen und teilen so eine Reihe von Signalwegen und Effektorfunktionen [94]. Andererseits sind ebenso funktionelle Unterschiede bekannt, die zu komplexen Interaktionsmechanismen zwischen diesen beiden Gasotransmittern führen. So ist CO in der Lage, die NOS-Aktivität zu inhibieren [173] und ebenso die Zytokin-induzierte NOS-2 Expression auf transkriptioneller Ebene zu reduzieren [174]. Allerdings gibt es in einigen experimentellen Modellen Anhalt dafür, dass CO eine Freisetzung von NO aus intrazellulären Depots [175-177] und in Abhängigkeit vom betroffenen Organ auch eine NOS-2 Induktion bewirken kann [178].

Auf der anderen Seite lösen NO und NO-Donore eine vermehrte HO-1-Expression und somit CO-Produktion in einer Vielzahl von Zellen aus. Diese Effekte werden vorzugsweise über die AP-1-vermittelte Induktion der HO-1-Expression [179, 180] sowie eine erhöhte Stabilität der HO-1 mRNA erzielt [181], während die cGMP-medierte Induktion von geringerer Bedeutung zu sein scheint [182, 183]. Dies ist physiologisch

2 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Bedeutung der vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS im Rahmen der Leberregeneration zu charakterisieren. Hierzu erfolgte eine sequentielle pharmakologische Modulation der HO-1 und der NOS. Daraufhin wurde zunächst das etablierte Modell der intravitalen Epifluoreszenzmikroskopie der Mausleber verwendet, um die mikrohämodynamischen Veränderungen direkt vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie studieren zu können. Im Anschluss daran wurde das standardisierte Modell der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie in der Maus zur Analyse der proliferativen Vorgänge genutzt.

In verschiedenen Studien konnte sowohl für die CO-, als auch die NO-Synthese eine essentielle Rolle für die physiologische Leberfunktion und Leberregeneration nachgewiesen werden [187, 188]. Es fehlen jedoch weiterhin Erkenntnisse zu möglichen Interaktionen zwischen den CO- und NO-produzierenden Systemen. Daher stellten wir uns für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

1. Inwieweit kommt es zu einer vermehrten Expression der induzierbaren Isoenzymformen von HO und NOS während der Leberregeneration?
2. Kann dieses Expressionsverhalten bzw. die damit verbundene Produktion der vasoaktiven Mediatoren CO und NO pharmakologisch beeinflusst werden?
3. Führt die Modulation von HO-1 und/oder NOS zu signifikanten Änderungen der mikrozirkulatorischen Parameter?
4. Wirken sich diese Veränderungen auf die für die Initiation der Leberregeneration relevanten Größen Blutvolumenfluss und Scherstress aus?
5. Lässt sich als Korrelat einer veränderten Mikrohämodynamik eine veränderte Aktivierung der sGC nachweisen?
6. Erzeugt die pharmakologische Erhöhung von Blutvolumenfluss und Scherstress unabhängig von der Leberresektion eine Induktion der charakteristischen *immediate early genes*?
7. Welchen Einfluss hat eine veränderte Mikrohämodynamik auf die Regeneration der Leber nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie?
8. Wie lässt sich das Zusammenspiel von HO und NOS im Verlauf der Leberregeneration charakterisieren?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an acht bis zehn Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen mit einem Körpergewicht (KG) von 20-25 g vorgenommen. Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland) und wurden in klimatisierten Räumen des Instituts für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Hr. Dr. rer. nat. H. Stein) in Gruppen von zwei bis drei Tieren pro Käfig bei 12 h Tag-/Nachtrhythmus und unter Bereitstellung von Standardfutter für Mäuse und Wasser ad libitum gehalten. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz §8 (1) genehmigt.

3.2 Experimentelles Modell

3.2.1 Mikrozirkulation der Leber – Anästhesie und Präparation

Um die Auswirkungen einer Modulation der vasoaktiven Systeme HO-1 und NOS auf die hepatische Mikrozirkulation analysieren zu können, erfolgte eine intravital-mikroskopische Untersuchung der entsprechend vorbehandelten Tiere (siehe 3.4.2.1). Nach Anästhesie mittels i.p. Applikation eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (90/25 mg/kg KG) und Rasur von Hals- und Bauchregion wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Heizplatte platziert. Die Körpertemperatur wurde auf einer Präparationsheizplatte, rückgekoppelt durch eine rektal eingeführte Temperaturmesssonde, während der gesamten Versuchsdauer bei 37°C konstant gehalten.

Zunächst wurde die Halsregion mittels eines medianen Hautschnittes eröffnet und dieser zu beiden Seiten um jeweils 5 mm in der Horizontalen erweitert. Nach stumpfer Dissektion des Unterhautgewebes erfolgte unter Zuhilfenahme eines Operationsstereomikroskops (Leica MZ6, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) die Darstellung der Halsgefäße und Kanülierung der *Vena jugularis externa* sowie der *Arteria carotis communis* mittels eines feinen Polyethylen-Katheters (PE 10, innerer Durchmesser: 0,28 mm). Der venöse Zugang diente im Folgenden der Applikation des

Fluoreszenzfarbstoffes Fluoreszein Isothiozyanat (FITC)-Dextran (5%, 0,1 ml/kg KG) zur Kontrastierung des Blutplasmas während der Intravitalmikroskopie. Über einen arteriellen Katheter konnte mittels Dreivegehahn und angeschlossenem Druckabnehmer der mittlere arterielle Blutdruck überwacht werden.

Nach medianer Laparotomie wurde die Bauchhöhle durch einen zusätzlichen Oberbauchquerschnitt mit Hilfe eines Thermokoagulators vollständig eröffnet und die so entstandenen Bauchdeckenlappen mit an Magnetständern befestigten Haken nach kranial aufgespannt. Mit erwärmter physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtete Kompressen dienten als Abdeckung für die freiliegenden Abdominalorgane, während die oberen Bauchdecken- und Leberlappen mittels Sauerstoff-impermeabler Klarsichtfolie vor Auskühlung und Austrocknung geschützt wurden. Der linke untere Leberlappen wurde daraufhin nach Durchtrennung der anhängenden Ligamente und Peritonealduplikaturen unter Zuhilfenahme feuchter Wattestäbchen mobilisiert und um dessen Längsachse rotiert. So konnte die Oberseite des Leberlappens auf dem anmodellierten Plastilinbett eines beweglichen Beobachtungsständers platziert und die ursprüngliche Unterseite nach ventral zum Mikroskop hin ausgerichtet werden. Für die anschließende Intravitalmikroskopie wurde das Tier mit der Heizplatte durch spezielle Positionierungsmagnete ca. 30° um dessen Querachse abwärts geneigt und der Leberlappen nach Superfusion mit physiologischer Kochsalzlösung und Abdeckung mit einem Deckgläschen parallel zur Fokusebene des Mikroskops positioniert (Abb. 6 A-C).

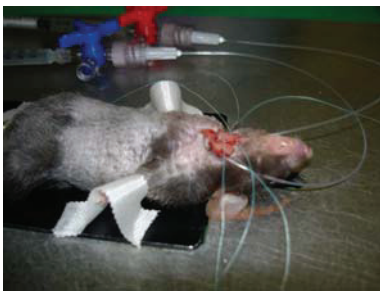
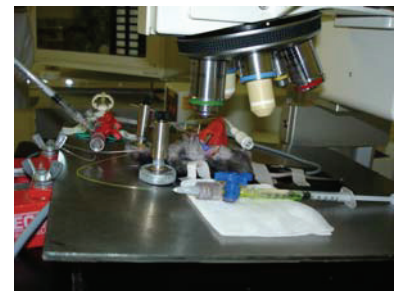
**A****B****C**

Abbildung 6 (A-C): Darstellung der Präparation in Vorbereitung auf die intravitalmikroskopische Untersuchung. Nach entsprechender Narkotisierung erfolgte die Katheterisierung der Halsgefäße (A) und Auslagerung des linken unteren Leberlappens (B). Anschließend wurde das Tier unter dem Mikroskop platziert und der zu untersuchende Leberlappen mittels des Ständers parallel in der Fokusebene ausgerichtet (C).

3.2.2 Leberteileresektion – Anästhesie und Präparation

Zur Analyse der Leberregeneration unter physiologischen Bedingungen sowie unter Modulation der vasoaktiven Systeme wurde das etablierte Modell der Leberteileresektion

verwendet, welches zuerst für Ratten [19] und später auch für Mäuse standardisiert werden konnte [189].

Die Anästhesie der Tiere wurde in einer Plexiglas-Box durch Zuführung eines Narkosegasgemisches aus Isofluran (1,5 vol%) und Lachgas (1,5 l/min) eingeleitet. Nach Eintreten einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte eine Umlagerung des Versuchstieres auf die Präparationsheizplatte und die Fortführung der Inhalationsnarkose unter einer speziell gefertigten Kunststoffmaske mit Absaugvorrichtung. Der Bauch wurde rasiert und mittels Povidoniod desinfiziert. Daraufhin konnte eine quere, ca. 1 cm lange Oberbauch-Laparotomie mittels Präparationsschere und Thermokoagulation der Bauchdeckengefäße durchgeführt werden. Durch Lagerung der unteren Brustwirbelsäule des Tieres auf einem geeigneten Kunststoffröhrchen wurde es in eine hyperlordosierende Haltung gebracht, sodass die Leber besser zur Darstellung kam. Die einzelnen Leberlappen waren nach Durchtrennung von anhängenden Ligamenten und Peritonealduplikaturen gut mobilisierbar (Abb. 7 A). Nach proximaler Ligatur des linken unteren Leberlappens sowie des linken oberen zusammen mit dem rechten oberen Leberlappen mit Vicryl® 4,0 wurden diese reseziert und gewogen (Abb. 7 B). Unter der Annahme, dass das Gesamtlebergewicht der Maus 5% des Körpergewichtes beträgt, konnte bestätigt werden, dass bei den Resektionen jeweils 65% – 70% der Leber entfernt wurden. Danach wurden das Abdomen mit erwärmter physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Bauchdecke sowie die Haut jeweils einzeln mit Prolene® 6,0 bzw. 5,0 in fortlaufender Nahttechnik verschlossen (Abb. 7 C). Ein subkutan auf dem Rücken appliziertes Depot physiologischer Kochsalzlösung diente zur Substitution eines während des Eingriffes erlittenen Flüssigkeitsverlustes. Im Anschluss daran wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt, in denen sie sich zunächst unter einer Rotlichtlampe von der Anästhesie und Operation erholen konnten.

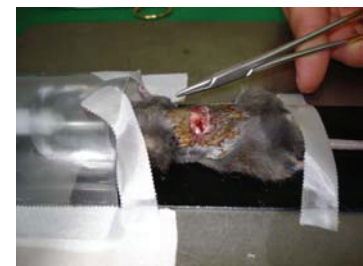
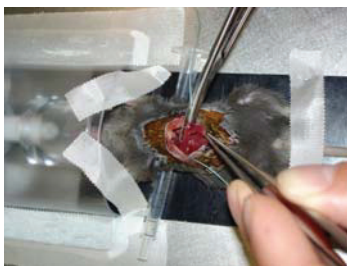
**A****B****C**

Abbildung 7 (A-C): Darstellung der partiellen Hepatektomie in der Maus. Unter Inhalationsnarkose wurden die entsprechenden Leberlappen mobilisiert, ligiert und nachfolgend reseziert (A). Danach erfolgte die Spülung des Abdomens (B) und Verschluss von Bauchdecke und Haut mittels fortlaufender Naht (C).

Nach der im jeweiligen Protokoll vorgesehenen Zeitdauer der Regeneration (*siehe 3.4.1 und 3.4.2.2*) erhielten alle Tiere eine Stunde vor Ende des Experimentes 50 mg/kg KG BrdU zur Bestimmung der BrdU-Inkorporation i.p. appliziert [190]. Zur Asservierung von Blut und Lebergewebe nach Ende des Versuches wurden die Tiere mittels eines i.p. applizierten Ketamin/Xylazin-Gemisches (90/25 mg/kg KG) anästhesiert. Es erfolgte zunächst mittels einer Glaskapillare die Punktion des retrobulbären Venenplexus zur Gewinnung von Blutproben für die spätere Serumanalytik. Danach wurde die Bauchhöhle durch eine mediane und quere Laparotomie vollständig eröffnet, das regenerierte Lebergewebe reseziert und das Tier mittels einer intrakardial verabreichten Überdosis Ketamin getötet. Das gewonnene Regenerat wurde gewogen, ein Teil zur histologischen Untersuchung in 4%-iger Formalinlösung fixiert und nach 3 d in Paraffinwachs eingebettet. Für die Proteinanalytik wurde ein weiteres Teil des Gewebes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu den entsprechenden Untersuchungen bei -80°C gelagert.

3.3 *Untersuchungstechniken*

3.3.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Als direkte Methode zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Verwendung fand dabei der hochmolekulare Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran (Molekulargewicht 150 kD), welcher das Blutplasma anfärbt.

Diese Technik nutzt die Eigenschaft fluoreszierender Stoffe, bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge Lichtquanten zu emittieren. Da ein Teil der eingestrahnten Lichtenergie in andere Energieformen, wie z.B. Wärme, umgewandelt wird, ist das emittierte Licht energieärmer und somit langwelliger. Aufgrund dieser Besonderheit ist es möglich, die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Epi-Illuminationstechnik als sogenannte Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie zu verwenden. Hierbei wird das Licht einer bestimmten Wellenlänge nach Passage des Anregungsfilters durch einen dichromatischen Teilerspiegel auf das Präparat gelenkt, während nur das vom Präparat emittierte, langwelligere Licht die Optik zum Okular passieren kann. Ein zusätzlicher Sperrfilter sorgt dafür, dass nur der für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifische Wellenbereich im Abbildungsstrahlengang erscheint (Abb. 8 A).

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem modifizierten Epifluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss vorgenommen (AxioTech vario, Zeiss, Jena, Deutschland). Für die Analyse der Leber wurde das Tier, wie in 3.2.1 beschrieben, unter dem Objektiv platziert, der linke untere Leberlappen ausgelagert und parallel zur Fokusebene positioniert. Bei dieser Studie kamen eine 100 W-Quecksilberlampe sowie ein Anregungsfilter mit 450 – 490 nm, ein dichromatischer Teilerspiegel mit 510 nm und ein Sperrfilter mit einer Wellenlänge > 520nm zum Einsatz. Durch die exakte Abstimmung der Filter auf das Fluorochrom FITC-Dextran konnte eine optimale Darstellungsqualität gewährleistet werden. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden unter Benutzung eines Wasser-Immersionsobjektives (x20/numerische Apertur 0,5, Achroplan, Zeiss) aufgenommen, mittels einer *charge-coupled device* (CCD)-Videokamera (FK 6990-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) auf den Bildschirm übertragen und auf Videoband gespeichert (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokyo, Japan). Datum und Uhrzeit der jeweiligen Aufnahmen wurden über einen in das Videosignal eingearbeiteten Videozeitgenerator (VTG 33, FOR-A-Company, Tokio, Japan) erfasst (Abb. 8 B).

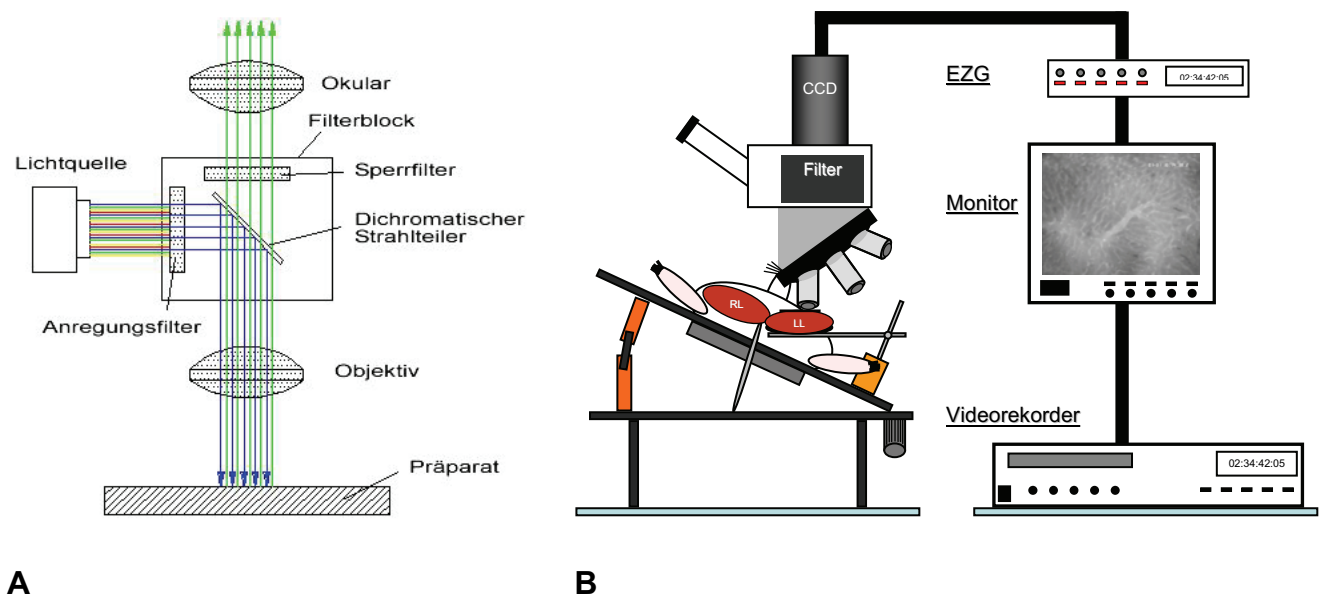


Abbildung 8 (A, B): Schematische Darstellung des Aufbaus eines Fluoreszenzmikroskopes (A) (<http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz/>) sowie der Versuchsanordnung zur Durchführung der Intravitalmikroskopie (B). Der linke Leberlappen (LL) wird auf einem in Plastilin befestigten Löffel ausgelagert, mit einem Deckglas abgedeckt und horizontal unter dem Objektiv positioniert. Das Mikroskopiebild wird von einer CCD-Kamera erfasst und nach Zwischenschaltung von Echtzeitgenerator (EZG) und Monitor von einem Videorekorder erfasst.

3.3.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Im Anschluss an die Mikroskopie konnten die aufgezeichneten Bilder offline mit Hilfe eines Computer-assoziierten Bildverarbeitungsprogramms (CapImage, Zeintl, Heidelberg, Deutschland) nach Kalibrierung mittels eines Mikrometer-Maßstabes ausgewertet werden. Dadurch ließ sich eine Minimierung der Untersuchungsdauer realisieren. Von jedem Tier wurden zehn Gesichtsfelder aufgenommen, in denen insgesamt 10-15 Sinusoide, 5-10 terminale arterioläre sowie portal venuläre Gefäße und 5-10 postsinusoidale Venolen hinsichtlich Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit untersucht wurden. Die davon abgeleiteten Größen Blutvolumenfluss und Scherstress konnten daraufhin mit den nachfolgend beschriebenen Formeln berechnet werden. Aus den einzelnen Werten der verschiedenen Parameter wurde für jedes einzelne Tier der arithmetische Mittelwert berechnet, welcher wiederum für die Mittelwertbestimmung der jeweiligen Versuchsgruppe genutzt wurde.

3.3.2.1 Gefäßdurchmesser (*d*)

Die Computer-gestützte Bestimmung des Durchmessers der beobachteten Gefäße erfolgte am Video-Standbild. An drei verschiedenen Stellen wurde der Abstand zweier Punkte der Gefäßwand senkrecht zur konstruierten Gefäßachse bestimmt und nachfolgend das arithmetische Mittel dieser Werte ermittelt. Durch die Verwendung des Plasma-Markers FITC-Dextran in Epi-Illuminationstechnik konnten die Gefäßgrenzen eindeutig bestimmt werden, da bei dieser Methode auch der Erythrozyten-freie Plasmasaum dargestellt wird (Abb. 9 A-C).

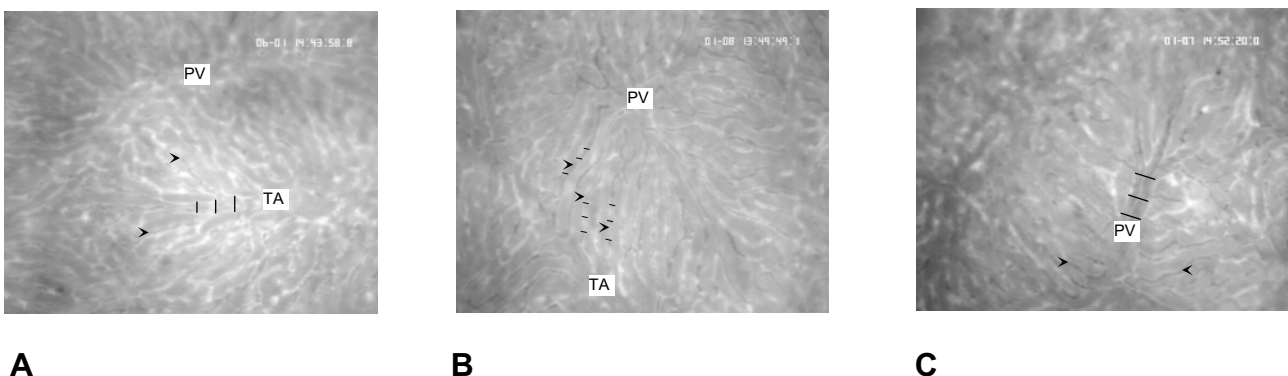
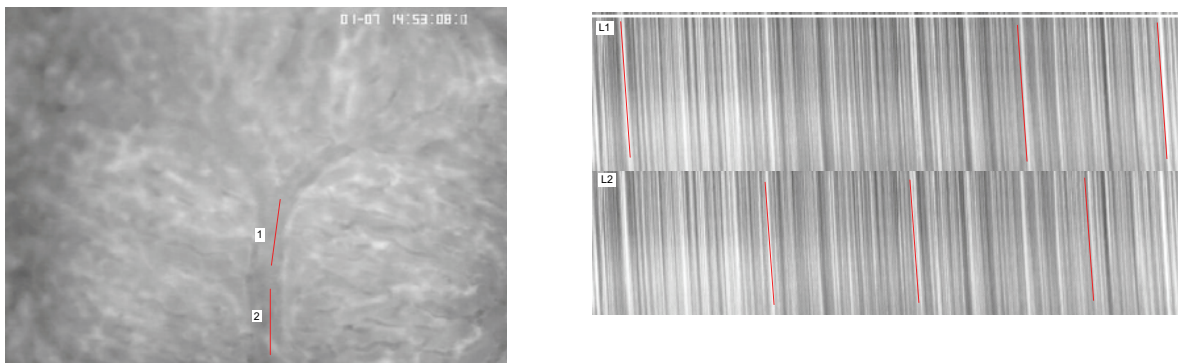


Abbildung 9 (A-C): Intravitalmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche mit einem 20x Wasser-Immersionsobjektiv (*x465-fache Vergrößerung*) nach Injektion von FITC-Dextran zur Kontrastverstärkung. Dargestellt sind terminal afferente Gefäße (TA), Sinusoide (Pfeilspitzen) und postsinusoidale Venolen (PV) an denen jeweils die Durchmesser (schwarze Striche) analysiert wurden.

3.3.2.2 Blutzellgeschwindigkeit (v_{RBC})

Im Anschluss an die Durchmesserbestimmung wurde in den untersuchten Gefäßen die Geschwindigkeit der Blutzellen mit Hilfe der Computer-gestützten Line-Shift-Diagramm-Methode bestimmt [191]. Dabei wird entlang der Flussrichtung des Gefäßes eine Messlinie zentral in dessen Lumen festgelegt und das Videoband für ca. 12 s in normaler Geschwindigkeit abgespielt, während für jedes Halbbild entlang dieser Messlinie ein Grauwertprofil im Bildspeicher erstellt wird. Aus den Grauwertprofilen erzeugt das Programm ein Line-Shift-Diagramm und reiht diese aneinander. Die entstehenden dunklen bzw. hellen Linien entsprechen fließenden Blutzellen bzw. den Plasmalücken dazwischen. Aus dem Anstieg dieser Linien wird danach vom Programm die Blutzellgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ berechnet (Abb. 10 A, B).



A

B

Abbildung 10 (A, B): Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postsinusoidalen Venole (A) in der Mausleber mit 2 definierten Messlinien (1, 2) zur Erfassung der Blutzellgeschwindigkeit. Nach Abspielen des Videobandes für etwa 12 s entsteht das Line-Shift-Diagramm (B) für jede der einzelnen Messlinien (L1, L2), anhand derer die Geschwindigkeit des Blutflusses ($\mu\text{m/s}$) aus der Steigung (rote Linien) der aneinandergereihten Grauwertprofile errechnet werden kann.

3.3.2.3 Blutvolumenfluss (VQ)

Unter Verwendung der mittels Computer-gestützter Videoauswertung gewonnenen Werte für Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit wurde der Blutvolumenfluss für jedes einzelne Gefäß anhand folgender Formel bestimmt:

$$\mathbf{VQ} = \mathbf{v}_{RBC} \times \pi \times \left(\frac{\mathbf{d}}{2}\right)^2$$

Diese Gleichung stellt eine Vereinfachung dar, da eine zylindrische Form des Gefäßes angenommen wird und so die berechneten Werte dem tatsächlichen Blutvolumenfluss nicht in jedem Fall entsprechen. Dennoch ist diese Methode eine valide Möglichkeit, um relative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen darzustellen [192].

3.3.2.4 Scherstress (τ)

Wie für den Blutvolumenfluss wurden auch zur Bestimmung des Scherstresses die jeweiligen Einzelwerte der Gefäße herangezogen und mittels folgender Formel berechnet [193]:

$$\tau = \frac{4 \times \eta \times VQ}{\pi \times r^3}$$

Dabei entspricht r dem Radius des Gefäßes und η der Blutviskosität, die für Mausblut nach Untersuchungen anderer Gruppen als $10 \text{ mPa} \times \text{s}$ angenommen werden konnte [194].

3.3.3 Serumanalytik

Das am Ende der Versuche durch retrobulbäre Punktion gewonnene Blut wurde in einem EDTA-beschichteten Röhrchen aufgefangen und zur Gewinnung von Blutplasma 10 min bei 4000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der so entstehende Überstand aus Plasma wurde mit einer Mikropipette vorsichtig entnommen und bis zur Durchführung der laborchemischen Untersuchungen bei -20°C gelagert.

3.3.3.1 Bestimmung von Bilirubin und Transaminasen im Serum

Um post-operative Komplikationen, wie z.B. einen post-hepatischen Ikterus nachweisen zu können, wurde das Serum auf erhöhte Bilirubin-Werte untersucht. Da die Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) bei akuter Leberschädigung vermehrt im Serum nachweisbar sind, dienten sie in dieser Studie als Marker einer gestörten hepatozellulären Integrität. In beiden Fällen erfolgten die Bestimmungen mittels spektrophotometrischer Standardmethoden an einem Serumanalysegerät (Hitachi 704, Roche Boehringer Mannheim Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

3.3.3.2 Bestimmung der Endprodukte des NO-Stoffwechsels Nitrit/Nitrat

NO kann im Organismus durch die neuronale, endotheliale und induzierbare NOS produziert werden und unterliegt nach seiner Interaktion mit biologischen Proteinen, wie z.B. der sGC, der Umwandlung in seine stabilen Endprodukte Nitrit und Nitrat [195]. Da das Verhältnis von Nitrit zu Nitrat variabel ist, reflektiert die Summe von beiden am deutlichsten die Gesamtheit der NO-Synthese.

Nach Ultrafiltration der Plasmaproben sowie Verteilung dieser auf einer 96 Well Mikrotiterplatte wurde zunächst Nitrat-Reduktase zugesetzt, welche die Umwandlung von Nitrat zu Nitrit bewirkt. Es folgte die schrittweise Zugabe von Griess Reagenz I und II, was die Bildung einer violetten Azoverbindung mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 540 \text{ nm}$ verursachte (Nitrit/Nitrat Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Die Extinktion wurde bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ durch spektrophotometrische Analyse in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt (ELISA-Reader Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim, Deutschland). Danach konnte mit Hilfe der zeitgleich erstellten Nitrat-Standardkurve sowie der daraus berechneten linearen Regressionsgeraden unter Verwendung folgender Formel die Konzentration von Nitrit und Nitrat im Plasma ermittelt werden:

$$(\text{Nitrat} + \text{Nitrit}) [\mu\text{mol/l}] = \frac{\text{Extinktion}_{540\text{nm}} - \text{Schnittpunkt}_{Y\text{-Achse}}}{\text{Anstieg}_{\text{Regressionsgerade}}}$$

3.3.4 Immunhistochemie von HO-1, PCNA und BrdU

Die Immunhistochemie ist eine spezielle histologische Technik, bei der nach Anfertigung eines Gewebeschnittes mit Hilfe eines Primär-Antikörpers spezifische Antigen-Strukturen detektiert werden können. An diesen Primär-Antikörper bindet der Sekundär-Antikörper, welcher mit einem Enzym gekoppelt ist, dass nach Zugabe eines geeigneten Substrates die Entstehung eines Chromogens bewirkt. Dadurch wird das jeweilige Antigen indirekt visualisiert und kann lichtmikroskopisch quantitativ analysiert werden.

Von besonderem Interesse waren bei den Untersuchungen die Expression der CO produzierenden HO-1 und deren verstärkte Induktion während der Regeneration oder Vorbehandlung mit CoPP-IX. Des Weiteren sollte das Ausmaß der Regeneration durch den Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA und der Inkorporation von BrdU quantifiziert werden.

3.3.4.1 Immunhistochemische Aufarbeitung

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten in Dünnschnitt-Technik, wobei das am Ende des Versuches entnommene Lebergewebe zunächst in 4%iger Formalinlösung für 3 d fixiert und danach in Paraffin eingebettet wurde. Es folgte die Anfertigung von 4 µm dünnen Gewebe-Schnitten, welche auf poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern aufgebracht und getrocknet wurden.

Daraufhin wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, zur Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle behandelt (DAKO Target Retrieval Solution, DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie unspezifischer Peroxidase-Aktivität mit entsprechenden Blocker-Lösungen überschichtet (DAKO Protein Block X0909, 3% bzw. DAKO Peroxidase Block). Nach Inkubation der Schnitte mit dem Primär-Antikörper für 18 h im Kühlschrank bei 4°C folgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (DAKO) sowie die Zugabe des entsprechenden Chromogens (DAKO), wie in Tabelle 1 dargestellt. Nach beendeter Farbentwicklung wurden die Schnitte mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und abschließend in Pertex eingedeckt.

	HO-1	PCNA	BrdU
Primär-Antikörper (Verdünnung)	rabbit polyclonal anti-HO-1 (1:2.000)	rabbit polyclonal anti-PCNA (1:50)	mouse monoclonal anti-BrdU (1:50)
Bezugsquelle	<i>Stressgen Biotech</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	<i>DAKO Cytomation</i>
Sekundär-Antikörper (Verdünnung)	goat anti-rabbit IgG (1:100)	goat anti-rabbit IgG (1:20)	goat anti-mouse IgG (1:100)
-Konjugation-	- Meerrettich Peroxidase -	- Alkalische Phosphatase -	- Meerrettich Peroxidase -
Substrat-Chromogen-System	3,3'-Diaminobenzidin	Fuchsin	3,3'-Diaminobenzidin

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper und Chromogene für die Immunhistochemie

3.3.4.1 *Immunhistochemische Auswertung*

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte verblindet mit einem Auflichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss) unter Verwendung eines 40er Objektivs (Achromplan, numerische Apertur 0,65), bei dem zunächst mit Hilfe eines Mikrometermaßstabes die Größe des Gesichtsfeldes bestimmt wurde. Danach wurden von jedem Schnitt jeweils 50 Gesichtsfelder ausgewertet und die Anzahl der positiv gefärbten Zellen bestimmt. Der arithmetische Mittelwert dieser 50 Gesichtsfelder wurde daraufhin nach Entblindung in die Berechnung des Mittelwertes der jeweiligen Versuchsgruppe einbezogen.

3.3.5 **Proteinanalytik von HO-1, NOS-2, PCNA und 3-NT**

Die Western Blot Analyse ist eine molekularbiologische Methode, bei der nach Aufarbeitung von organischem Gewebe in dem entstehenden Proteingemisch spezifische Proteine bzw. deren Antigen-Strukturen detektiert werden können. Dazu wird das Proteingemisch entsprechend dem Molekulargewicht seiner einzelnen Bestandteile elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Nach Inkubation dieser Membran mit einem Primär-Antikörper, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, kann der gebundene Primär-Antikörper mit Hilfe eines Sekundär-Antikörpers nachgewiesen werden. Letzterer ist mit einem Enzym gekoppelt, welches durch Reaktion mit einem geeigneten Substrat ein Luminogen mit detektierbarer Chemilumineszenz freisetzt.

3.3.5.1 *Extraktion und Bestimmung von Proteinen aus Lebergewebe*

Die bei -80°C gelagerten Proben wurden gewogen, mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert und das pulverisierte Gewebe anschließend in Lysis-Puffer aufgenommen (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN₃, 0,2 mM PMSF und Protease-Inhibitor Cocktail 1:100 vol/vol; Sigma-Aldrich). Danach wurden die Proben zweimal für 10 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand jeweils dekantiert.

Die Bestimmung des Proteingehaltes in dem gewonnenen Überstand wurde mittels des BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Bonn, Germany) vorgenommen. Das in dieser Lösung enthaltene Kupfer komplexiert mit Proteinen und erzeugt dadurch, je nach Proteinkonzentration, einen spezifischen Farbumschlag. Dieser konnte nach spektrophotometrischer Analyse in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA-Reader

Sunrise Remote, Tecan) durch Vergleich mit einem Proteinstandard quantifiziert werden. Die anschließende Einstellung der verschiedenen Proteinlösungen auf eine einheitliche Konzentration wurde durch die Verdünnung mit Aqua dest. erzielt.

3.3.5.2 *Western Blot Analysen*

Zur Vorbereitung der Proben auf die Gel-Elektrophorese wurden gleiche Mengen an Protein (siehe Tabelle 2) mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proteine diskontinuierlich auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 12%) bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA (Sammelgel) bzw. 40 mA (Trenngel) entsprechend ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Für die spätere Molekulargewichtsbestimmung wurde auf das Gel zusätzlich zu den Proben ein Proteinstandard aufgetragen.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel zunächst in Methanol und Aqua dest. äquilibriert, um dann die aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix mittels eines Semi-Dry-Blotters bei einer konstanten Stromstärke von 275 mA auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) zu transferieren. Durch die anschließende Inkubation der Membran für mindestens 12 h bei 4°C in einer 5%igen BSA-Lösung konnte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erzielt werden.

Zum Nachweis des jeweiligen Proteins aus dem untersuchten Lebergewebe wurden die Membranen zuerst mit dem entsprechenden Primär-Antikörper und nach mehrmaligem Waschen in TBST sowie TBS mit dem entsprechendem Sekundär-Antikörper für jeweils 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und abermals zur Entfernung überschüssiger Antikörper mehrmals in TBST sowie TBS gewaschen. Die genauen Angaben zu Spezifität und Verdünnung der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Die Detektion des an den Primär-Antikörper gekoppelten Sekundär-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL⁺-Systems (ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Dabei katalysiert die an den Sekundär-Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase die Reaktion von Peroxiden mit dem Substrat PS-3 Acridian, wodurch ein Luminogen mit einer bei 430 nm messbaren Chemilumineszenz entsteht. Für die Detektion wurden die Membranen 5 min im ECL⁺-Gemisch (1:50) inkubiert und danach zur Visualisierung der gesuchten Proteine auf einem Röntgenfilm (Kodak BioMax Light Film, Kodak-Industrie, Chalon-sur-Saone, Frankreich) positioniert. So konnte dieser, geschützt in einer Röntgenkassette, durch die Chemilumineszenz belichtet werden.

Zur Kontrolle der Proteinbeladung wurden alle Membranen nach diesem Vorgang mit einem β -Aktin-spezifischen Antikörper inkubiert, um die β -Aktin-Expression als internen Standard verwenden zu können. Die abschließende densitometrische Analyse erfolgte mit Hilfe der Software TotalLab (Nonlinear Dynamics, New Castle upon Tyne, UK), wobei die gemessenen Signalintensitäten für den Vergleich zwischen den Proben zum jeweiligen β -Aktin Signal ins Verhältnis gesetzt wurden.

	HO-1	NOS-2	PCNA	3-NT	β -Aktin
Proteinmenge [µg]	20	20	20	40	20/40
Primär-Antikörper (Verdünnung)	rabbit polyclonal anti-HO-1 (1:5.000)	rabbit polyclonal anti-NOS-2 (1:2.000)	rabbit polyclonal anti-PCNA (1:1.000)	mouse monoclonal anti-3-NT (1:2.000)	mouse monoclonal anti- β -actin (1:20.000)
Bezugsquelle	Stressgen Biotech	Calbiochem	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz Biotechnology	Sigma-Aldrich
Sekundär-Antikörper (Verdünnung)	goat anti-rabbit IgG (1:60.000)	goat anti-rabbit IgG (1:20.000)	goat anti-rabbit IgG (1:8.000)	rabbit anti-mouse IgG (1:5.000)	rabbit anti-mouse IgG (1:60.000)
Bezugsquelle	Cell Signalling Technology	Cell Signalling Technology	Cell Signalling Technology	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Western Blot Analyse

3.3.6 mRNA-Analytik

Die Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Kombination zweier molekularbiologischer Techniken, die dem Nachweis von mRNA aus Geweben dient und es so ermöglicht, die Expression eines spezifischen Gens zu analysieren, bevor durch die Mechanismen der Translation das entsprechende Protein daraus synthetisiert wurde. In einem ersten Schritt wird dazu mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, und nicht Gen-spezifischer Oligo-(dT)-Primer, welche komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA-Stränge sind, die aufbereitete mRNA in cDNA umgeschrieben. Danach kann mittels Gen-spezifischer Primer in der Polymerase-Kettenreaktion die gesuchte cDNA amplifiziert werden, da die natürlich vorkommenden Mengen zu gering für einen Nachweis sind. Abschließend wird die vervielfältigte cDNA elektrophoretisch in einem Agarosegel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und durch einen Farbstoff im UV-Licht sichtbar gemacht.

3.3.6.1 Extraktion und Bestimmung von mRNA aus Lebergewebe

Zur Isolation der mRNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Nach Homogenisation von jeweils 30 mg des gefrorenen Lebergewebes mit Hilfe eines Dismembrators und Zentrifugation des entstandenen Lysates wurde der verbleibende Überstand auf eine RNeasy Mini-Säule

aufgetragen und diese, verschlossen in einem Sammelröhrchen, in eine Zentrifuge gegeben. Es folgten mehrere Zentrifugationsschritte bei 10.000 U/min unter der Zugabe verschiedener Pufferlösungen auf die Mini-Säule und Verwerfen des entstehenden Durchflusses im Sammelröhrchen. Die zuletzt verbleibende getrocknete RNeasy Silicagel-Membran wurde nach Zugabe von RNase-freiem Wasser nochmals zentrifugiert, so dass die extrahierte RNA als Eluat gewonnen werden konnte. Vor der anschließenden RT-PCR wurde die RNA-Konzentration im Eluat UV-spektrophotometrisch bestimmt, um eine Verwendung gleicher RNA-Mengen für die Analyse garantieren zu können. Dazu wurde das Eluat jeweils mit Aqua dest. verdünnt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration der RNA errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{RNA}_{\text{Konzentration}} [\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \frac{\text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 40}{1.000}$$

3.3.6.2 RT-PCR von *c-fos*

Aus dem gewonnenen Eluat wurden jeweils 2 μg RNA genutzt, um unter der Verwendung von Oligo-(dT)-Primern (Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) und Superscript II RNaseH - Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) die komplementären cDNA-Stränge der mRNA zu gewinnen.

Danach konnten mit Hilfe von Gen-spezifischen Primern (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland), aufgeführt in Tabelle 3, und der Taq Polymerase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) in der PCR (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) die cDNA Fragmente von *c-fos* und GAPDH amplifiziert werden. Letzteres diente als interner Standard zur Angleichung der verwendeten cDNA-Menge. Die PCR Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt und mit Ethidium-Bromid gefärbt. Die gefärbten Banden konnten danach unter UV-Illumination sichtbar gemacht (Chemidoc XRS, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und mit der Software TotalLab densitometrisch ausgewertet werden. Die Ergebnisse wurden als Expression von *c-fos* im Verhältnis zur Expression von GAPDH wiedergegeben.

Gen	Primer	Zyklen
c-fos	forward: 5' – CTG ACT GCA CTT CCT GAC CA – 3' reverse: 5' – CTC CAT TCA GTC ACC CCA GT – 3'	35
GAPDH	forward: 5' – AAC GAC CCC TTC ATT GAC – 3' reverse: 5' – TCC ACG ACA TAC TCA GCA C – 3'	30

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primer für die RT-PCR

3.3.7 Analyse der Guanylylzyklase-Aktivität

Der „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein Verfahren aus der Gruppe der Immunoassays, mit deren Hilfe neben Proteinen auch niedermolekulare Substanzen, wie die Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden, nachgewiesen werden können. Die sGC wird durch NO oder CO aktiviert und synthetisiert daraufhin cGMP. Der quantitative Nachweis von cGMP mittels kompetitivem Immunoassay diente somit der Bestimmung der Guanylylzyklase Aktivität.

Hierbei wird ein an die Mikrotiterplatte gebundener Anti-cGMP-Antikörper verwendet, welcher sowohl mit dem zu bestimmenden cGMP der Probe als auch mit einem Enzym-markierten Kompetitor-Antigen hybridisieren kann. Nur das über das hybridisierte Kompetitor-Antigen gebundene Enzym kann dann die nachfolgende Reaktion mit einem Chromogen katalysieren und einen spektrophotometrisch messbaren Farbumschlag erzeugen. Somit kommt es durch die Konkurrenz von Probe und markiertem Kompetitor um den Anti-cGMP-Antikörper zu einer indirekten Proportionalität von gemessener Extinktion und cGMP-Konzentration in der untersuchten Probe [196, 197].

3.3.7.1 Präparation des Lebergewebes

Das bei -80°C gelagerte Lebergewebe wurde in Trichloressigsäure (6% w/v) homogenisiert und bei 2.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach in wassergesättigtem Diethylether gewaschen und die verbleibende wässrige Phase in einem beheizten Vakuumkonzentrator (Savant SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) lyophilisiert.

3.3.7.2 *ELISA von cGMP*

Zur Bestimmung der cGMP-Konzentration im gewonnenen Lyophilisat wurde das cGMP Enzyme Immuno Assay Biotrak System entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Amersham Bioscience Ltd., Amersham Place Little Chalfont Buckinghamshire, Großbritannien). Nach Resuspension der Proben in Puffer-Lösung erfolgte die Inkubation mit dem gebundenen cGMP-Antikörper auf einer Mikrotiterplatte bei 4°C für 16 h. Zur genauen Quantifizierung wurden im gleichen Ansatz auch Proben bekannter cGMP-Konzentrationen verwendet, mit deren Hilfe später die Standardkurve erstellt werden konnte. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurde das Peroxidase-konjugierte cGMP hinzugegeben, welches als Kompetitor-Antigen mit den verbleibenden Bindungsstellen der Anti-cGMP-Antikörper hybridisierte. Es folgten die Inkubation bei 4°C für 3 h und Waschung der Mikrotiterplatte mit entsprechender Pufferlösung. Nachdem der restliche Puffer entleert war, konnte das Enzym-Substrat hinzugegeben werden. Dieses wurde durch die cGMP-gebundene Peroxidase in ein Chromogen umgewandelt, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm durch Analyse in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA-Reader Sunrise Remote, Tecan) spektrophotometrisch bestimmt wurde. Über die Standardkurve der bekannten cGMP-Konzentrationen konnten abschließend die cGMP-Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

3.4 ***Experimentelles Protokoll***

Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluss der vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS auf die Leberregeneration zu klären. Dazu wurden drei verschiedene Versuchsansätze gewählt, die im Folgenden beschrieben werden und deren Zeitabläufe in Abbildung 11 schematisch dargestellt sind. Eine Randomisierung der Tiere war aufgrund ihrer Syngenität nicht notwendig. Die jeweilige Vorbehandlung wurde jedoch verblindet durchgeführt, so dass der Untersucher weder während des Eingriffes noch bei der anschließenden Auswertung der Versuchsdaten durch die Kenntnis über die jeweilige Vorbehandlung beeinflusst werden konnte.

3.4.1 Physiologische Regeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie

Um zunächst die Abläufe während der physiologischen Leberregeneration studieren zu können, wurden 24 Tiere ohne jegliche Vorbehandlung einer Leberteilektomie, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, unterzogen. Nach 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h und 96 h wurden die Tiere getötet und Proben zur molekularbiologischen und immunhistochemischen Analyse sowie zur Serum-Diagnostik gewonnen. Von besonderem Interesse war vor allem die Expression der induzierbaren Isoformen der vasoaktiven Enzyme HO-1 und NOS-2 sowie zur Veranschaulichung der Regenerationsaktivität der zelluläre Proliferationsmarker PCNA. Das zeitliche Protokoll hierzu ist in Abbildung 11 dargestellt.

3.4.2 Modulation vasoaktiver Enzymsysteme

Im nächsten Versuchsabschnitt wurde die Aktivität der HO-1 und der NOS einzeln oder gemeinsam moduliert. Dadurch sollten genauere Erkenntnisse darüber gewonnen werden, inwieweit sich die veränderte Produktion der vasoaktiven Mediatoren CO und NO auf die hepatische Mikrozirkulation und die Leberregeneration auswirkt.

Zur Induktion der HO-1 wurde Cobalt-Protoporphyrin-IX (CoPP-IX, 15 $\mu\text{mol/kg KG}$ i.p. [198]; Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland) gewählt, da hiermit innerhalb von 2 h eine gesteigerte Expression der HO-1 für mindestens 72 h erzielt werden kann [199].

Die Inhibition der NOS wurde über N^{ω} -Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME, 100 mg/kg KG i.p. [200]; Axxora Life Sciences, Grünberg, Deutschland) realisiert, welches durch seine strukturelle Ähnlichkeit mit der physiologischen NO-Vorstufe L-Arginin als kompetitiver Antagonist der NOS wirkt [201, 202].

Mit Hilfe dieser beiden pharmakologischen Substanzen (CoPP-IX und L-NAME) wurden die Tiere, wie in Tabelle 4 und Abbildung 11 dargestellt, in vier verschiedenen Versuchsgruppen (I-IV) untersucht. In den Versuchsgruppen I und III wurden sowohl PBS behandelte Kontrolltiere analysiert, als auch Tiere, deren CO-Produktion durch die CoPP-IX vermittelte HO-1-Induktion erhöht war. Die Versuchsgruppen II und IV beinhalteten die Untersuchung der mit PBS bzw. CoPP-IX behandelten Tiere mit zusätzlicher Blockade der NO-Synthese durch die Gabe von L-NAME.

Um den Effekt der NOS-Inhibition im Zusammenspiel mit einer HO-1-Induktion deutlich zu machen, wurde den Tieren in einer weiteren Versuchsgruppe (V) mit CoPP-IX- und gleichzeitiger L-NAME-Behandlung zur Substitution des fehlenden NO der NO-Donor

Molsidomin (MOL, 10 mg/kg KG i.p. [203]; Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland) verabreicht. Molsidomin, welches auch bei der Therapie der Angina pectoris Verwendung findet, wird in der Leber enzymatisch in seinen aktiven Metaboliten 3-Morpholinonyl-L-nitroimidin (SIN-1) umgewandelt, der nachfolgend nicht-enzymatisch NO freisetzt [204, 205].

3.4.2.1 *Mikrozirkulation der Leber vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie*

Bei der Initiation der Leberregeneration werden unter anderem hämodynamische Faktoren, insbesondere der nach der Resektion stark erhöhte Blutvolumenfluss und Scherstress, als bedeutsame Trigger diskutiert [160]. Aus diesem Grund war es in der vorliegenden Studie von Interesse, ob die Modulation der vasoaktiven Enzymsysteme diese Parameter bereits vor der Resektion positiv beeinflussen kann.

Dazu wurde den Tieren einzeln oder zusammen CoPP-IX, L-NAME sowie MOL i.p. verabreicht und 24 h später, wie in Abschnitt 3.2.1 und 3.3.2 beschrieben, die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation durchgeführt. Kontrolltieren wurden gleiche Volumina der jeweiligen Trägersubstanz appliziert und diese wurden ebenfalls nach 24 h untersucht. Nach Abschluss der Mikroskopie erfolgte zur späteren Analyse der c-fos Expression mittels RT-PCR die Asservierung der nicht-mikroskopierten Leberlappen. Dadurch sollte der Einfluss untersuchungsbedingter Manipulation auf die Ergebnisse möglichst gering gehalten werden. Die genauen Angaben zu Dosierungen, Benennung der Versuchsgruppen und Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Das zeitliche Protokoll der einzelnen Versuchsabschnitte ist in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

3.4.2.2 *Leberregeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie*

Neben den Auswirkungen einer Modulation vasoaktiver Enzymsysteme auf die Mikrozirkulation der Leber sollte in einem dritten Versuchsabschnitt geklärt werden, ob diese Modulation auch Einfluss auf die Leberregeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie hat und in welchem Zusammenhang diese Veränderungen mit den mikrohämodynamischen Parametern stehen.

Wie bereits in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben, wurden die Versuchstiere 24 h vor der Hepatektomie mit CoPP-IX, L-NAME, MOL bzw. der jeweiligen Trägersubstanz behandelt. Zudem erhielten die Tiere zum Zeitpunkt des Eingriffes die gleichen Dosen von L-NAME und MOL, da deren Wirkdauer im Gegensatz zu CoPP-IX stärker begrenzt ist. Der Eingriff erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 dargestellt. Nach 48 h wurden die Tiere getötet und Serum

sowie Gewebeproben des Regenerates asserviert. Neben der immunhistochemischen Quantifizierung der Regeneration (PCNA, BrdU) wurden auch die Auswirkungen der jeweiligen Vorbehandlung auf die Aktivität von HO-1 (HO-1 Immunhistochemie, HO-1 Western Blot) und NOS (Nitrit/Nitrat-Assay, 3-NT Western Blot) untersucht. Zusätzlich sollte über ein cGMP-ELISA geklärt werden, ob sich die Beeinflussung des CO- und NO-Haushalts auch in veränderten cGMP-Konzentrationen im Lebergewebe äußert. Die genauen Angaben zu Dosierungen, Benennung der Versuchsgruppen sowie Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen sind in Tabelle 4 aufgeführt, während Abbildung 11 einen Überblick über das zeitliche Protokoll der einzelnen Versuchsabschnitte gewährt.

Versuchsgruppen	Vorbehandlung (Dosis/kg KG i.p.) Trägersubstanz			Intervention	
	CoPP-IX (15 µmol) NaHCO ₃ /PBS	L-NAME (100 mg) NaHCO ₃ /PBS	MOL (10 mg) NaCl 0,9%	n (IVM)	n (PH)
Kontrolle (I)	–	–	–	6	7
Kontrolle/L-NAME (II)	–	+	–	6	7
CoPP-IX (III)	+	–	–	7	6
CoPP-IX/L-NAME (IV)	+	+	–	6	5
CoPP-IX/L-NAME/MOL (V)	+	+	+	5	6

Tabelle 4: Die Untersuchungen zur Modulation vasoaktiver Systeme wurden in zwei verschiedene Studienabschnitte unterteilt. Zum einen wurden die Tiere 24 h nach der entsprechenden Vorbehandlung zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM) unterzogen. Zum anderen erfolgte in einem zweiten Versuchsabschnitt 24 h nach der Vorbehandlung die partielle Hepatektomie (PH) und 48 h nach diesem Eingriff die Gewinnung von Blut- und Gewebeproben.

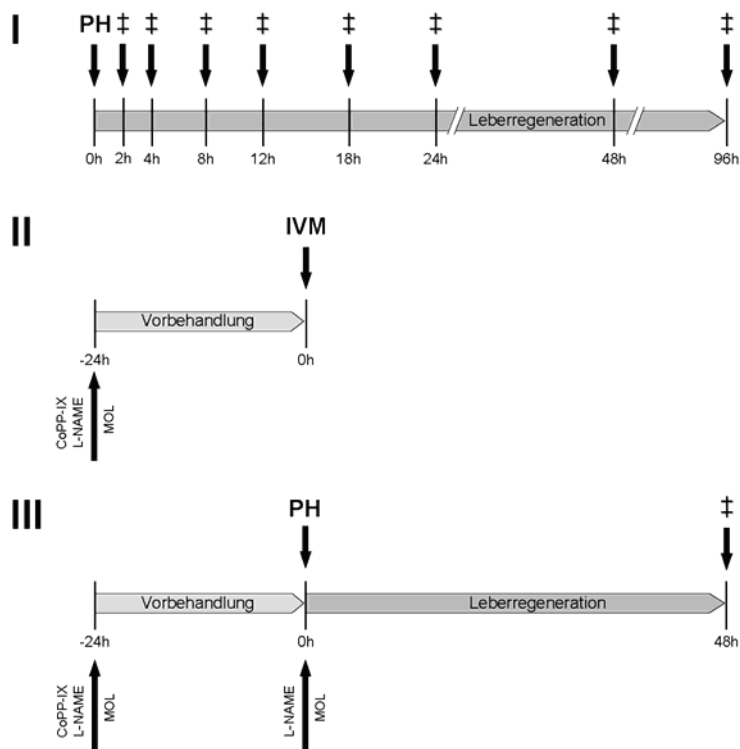


Abbildung 11: Die Untersuchungen wurden in drei verschiedene zeitliche Abschnitte eingeteilt. Im ersten Abschnitt (I) wurden nicht-vorbehandelte Tiere einer $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie (PH) unterzogen und an den indizierten Zeitpunkten zur Gewinnung von Blut- und Lebergewebsproben getötet (‡). Im zweiten Abschnitt (II) wurde nach der entsprechenden Vorbehandlung die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) zu dem Zeitpunkt vorgenommen, der dem Zeitpunkt der Resektion im dritten Abschnitt (III) entspricht. Im dritten Abschnitt wurden die Tiere nach der entsprechenden Vorbehandlung hepatektomiert und nach 48 h zur Gewinnung von Blut- und Lebergewebebeobungen getötet. Weitere Angaben zum Versuchsablauf siehe Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2 sowie Tabelle 4.

3.5 Statistik

Die während der Auswertung von intravitalmikroskopischen, molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen erhobenen Daten wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Microsoft Excel) gesammelt und die Einzeldaten als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ($MW \pm SEM$) der jeweiligen Versuchsgruppe zusammengefasst. Bei den intravitalmikroskopischen Analysen wurden pro Tier insgesamt 10-15 Sinusoide, 5-10 terminale arterioläre sowie portal venuläre Gefäße und 5-10 postsinusoidale Venolen erfasst und aus diesen Daten jeweils der Mittelwert berechnet, welcher dann in die Mittelwertberechnung der Versuchsgruppe einbezogen und ebenfalls in der nachfolgenden statistischen Analyse verwendet wurde.

Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software SigmaPlot (Jandel Corp., San Rafael, USA) in Säulendiagrammen unter Verwendung der absoluten Werte bzw. bei den molekularbiologischen Untersuchungen als relative Werte im Vergleich zum internen Standard graphisch dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SigmaStat Software (Jandel Corp.), wobei die Daten zunächst auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Gleichheit der Varianzen (Levene-Test) untersucht wurden. Waren diese Voraussetzungen erfüllt, konnten die Versuchsgruppen mittels Einfach-Varianzanalyse (ANOVA) verglichen werden, anderenfalls kam die Kruskal-Wallis Varianzanalyse zum Einsatz. Zur Adjustierung des P-Wertes wurde im nachfolgenden multiplen Paarvergleich der Holm-Sidak-Test eingesetzt. Sollten nur zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen werden, wurde der Student's t-Test bzw. bei nicht-normalverteilten Daten der Rangsummen-Test durchgeführt. Im Vergleich von multiplen wie auch von zwei einzelnen Versuchsgruppen wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ die Unterschiede zwischen den Ergebnissen als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Physiologische Regeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie

4.1.1 Postoperativer Verlauf und Serumparameter

Wie unter 3.4.1 beschrieben, wurden im ersten Versuchsabschnitt Tiere ohne Vorbehandlung einer $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie unterzogen, um die physiologische Regeneration und dabei vor allem die Expression der vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS-2 studieren zu können. Dieser Eingriff stellte keine vitale Bedrohung für die Versuchstiere dar. Es kam jedoch in ca. 20% der Resektionen zu postoperativen Komplikationen aufgrund einer Gallengangskompression und dadurch zum Bild eines post-hepatischen Ikterus. Neben dem klinisch deutlich morbiden Zustand der Tiere fielen 200- bis 300-fach erhöhte Bilirubin- und Transaminasenwerte (Abb. 12) sowie makroskopisch eindeutige Veränderungen des Lebergewebes im Sinne einer Verfestigung und Aufhellung auf. Da in diesen Fällen mit einer gestörten Regeneration zu rechnen war, wurden die Tiere mit derartigen Komplikationen von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Klinisch gesunde Tiere zeichneten sich hingegen schon in der frühen post-operativen Phase wie auch im weiteren Verlauf durch eine dem prä-operativen Zustand vergleichbare Vitalität ohne Anzeichen operativ bedingter Einschränkungen aus.

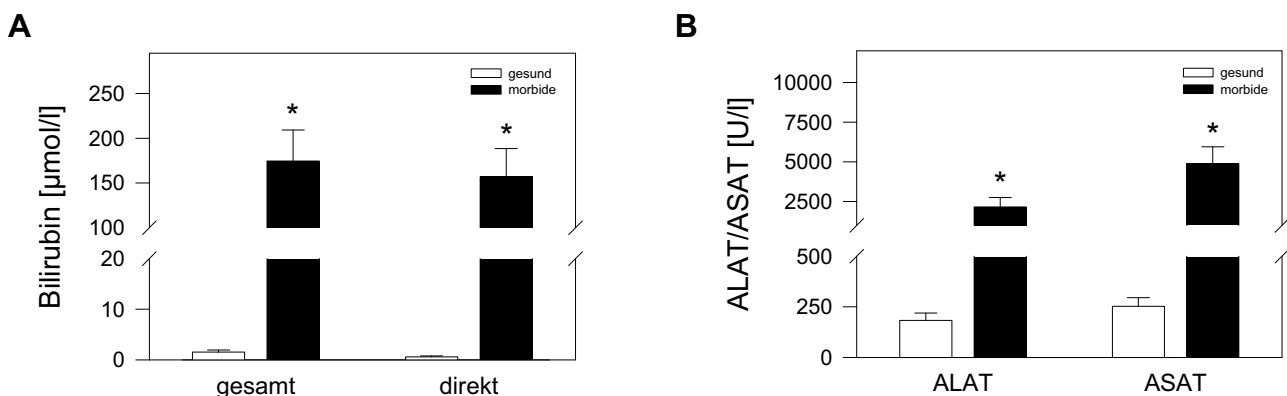


Abbildung 12: Gesamtes und direktes Bilirubin (A) sowie Serumkonzentrationen der Alanin- und Aspartat-Aminotransferase (ALAT/ASAT) (B) von Tieren 48 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie. Dabei wurden klinisch gesunde Tiere (\square ; $n = 22$) von klinisch morbiden Tieren (\blacksquare ; $n = 4$) unterschieden, zusätzlich sind in diese Auswertung die Tiere des Versuchsabschnitts 4.2.7 eingeschlossen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. Student's t -Test, * $p < 0,05$ vs. klinisch gesunde Tiere.

4.1.2 Expression der Häm-Oxygenase-1

Die Auswertung der Western Blot Analysen zeigte eine sukzessive Zunahme der HO-1 Proteinexpression nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie im untersuchten Lebergewebe. Bereits nach 4 h war die HO-1 Expression auf das 5-fache im Vergleich zur ruhenden Leber angestiegen, während 48 h nach Resektion die maximale Expression der HO-1 - ein 30-facher Anstieg gegenüber dem Zustand vor Resektion - erreicht wurde. 96 h nach dem Eingriff war bereits ein deutlicher Rückgang auf nur noch 3-fach erhöhte Werte zu beobachten (Abb. 13).

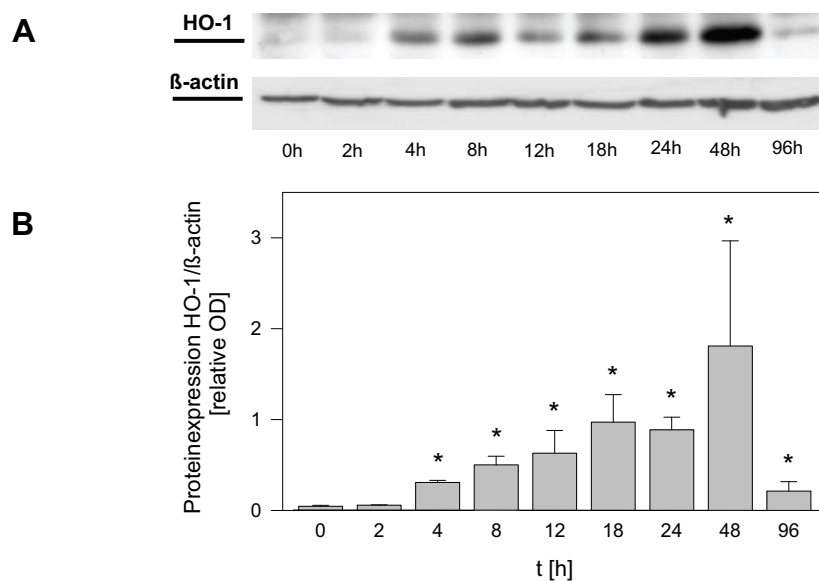


Abbildung 13: Repräsentativer Western Blot (A) und quantitative densitometrische Auswertung (B) der HO-1 Expression im Lebergewebe von Tieren ohne Vorbehandlung über einen Zeitraum von 96 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie ($n = 3$ pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. ANOVA, * $p < 0,05$ vs. 0 h.

4.1.3 Expression der NO-Synthase-2

Im Gegensatz zur gesteigerten Expression der induzierbaren Isoenzymform der Häm-Oxygenase HO-1 blieb die Expression der induzierbaren Isoenzymform der NO-Synthase NOS-2, nach der Resektion über den gesamten Zeitraum der Untersuchung auf dem Niveau von nicht regenerierendem Lebergewebe (Abb. 14).

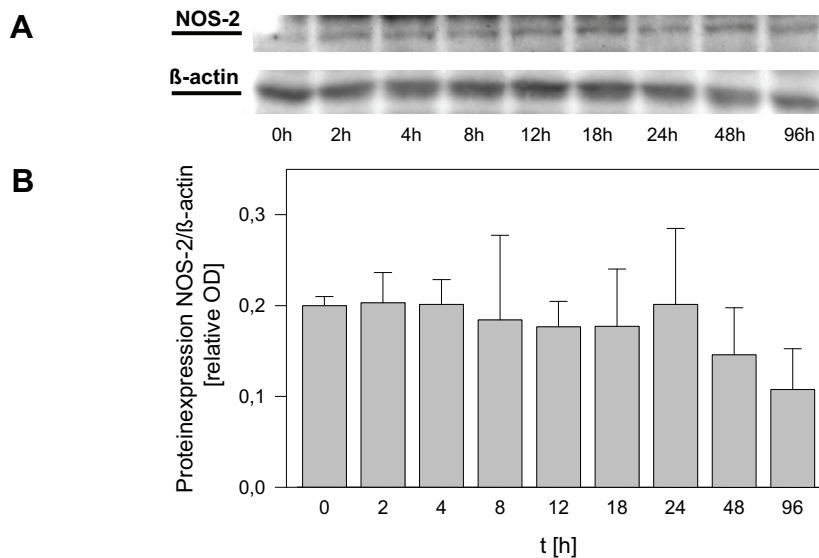


Abbildung 14: Repräsentativer Western Blot (A) und quantitative densitometrische Auswertung (B) der NOS-2 Expression im Lebergewebe von Tieren ohne Vorbehandlung über einen Zeitraum von 96 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie ($n = 3$ pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

4.1.4 Expression von PCNA

Die Expression des Proliferationsmarkers PCNA weist nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie anfangs eine ähnliche zeitliche Kinetik, wie die HO-1 Expression auf (siehe 4.1.2 Abb 13). Bereits in den ersten Stunden nach Resektion erhöht sich die PCNA Expression auf das Doppelte und erreicht danach 3-fach bis 5-fach erhöhte Werte gegenüber ruhendem Lebergewebe. Im Gegensatz zur HO-1 fällt die PCNA Expression jedoch nach 96 h nach Resektion nicht wieder ab, sondern bleibt weiterhin erhöht (Abb. 15).

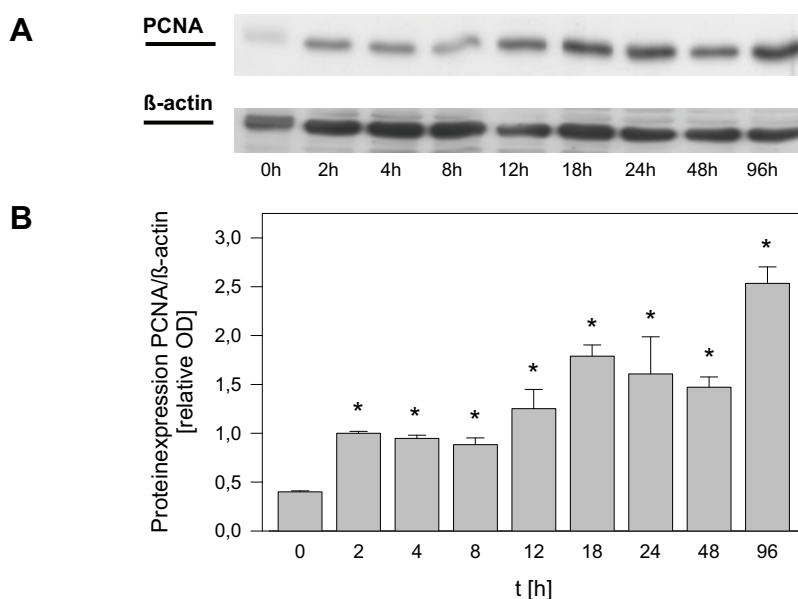


Abbildung 15: Repräsentativer Western Blot (A) und quantitative densitometrische Auswertung (B) der PCNA Expression im Lebergewebe von Tieren ohne Vorbehandlung über einen Zeitraum von 96 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie ($n = 3$ pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. ANOVA, * $p < 0,05$ vs. 0 h.

4.2 Modulation vasoaktiver Enzymsysteme

Nach dem Studium der Leberregeneration unter physiologischen Bedingungen sollte in den folgenden Versuchsabschnitten geklärt werden, welche Rolle hierbei die vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS spielen. Beide Systeme sind in der Lage, über ihre gasförmigen Mediatoren CO bzw. NO Einfluss auf die Gefäßweitenregulation zu nehmen und dadurch unter anderem die hepatische Mikrozirkulation zu beeinflussen. Die pharmakologische Modulation der Enzymaktivitäten wurde, wie in 3.4.2 beschrieben, durchgeführt.

4.2.1 Induktion der Häm-Oxygenase-1

Der unter 4.1.2 demonstrierte Anstieg der HO-1 Proteinexpression im Verlauf der Leberregeneration sowie der damit einhergehende erhöhte Häm-Abbau mit nachfolgender Freisetzung von vasoregulatorisch wirksamen CO wurde durch den Einsatz des HO-1 Induktors CoPP-IX weiter gesteigert.

Die HO-1 Western Blot Analysen bestätigen die verstärkte Induktion des Proteins. So zeigte deren quantitative Auswertung eine 13-fach höhere relative optische Dichte im regenerierenden Lebergewebe von CoPP-IX behandelten Tieren im Vergleich zu den mit Trägersubstanz behandelten Kontrolltieren 48 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie (Abb. 16).

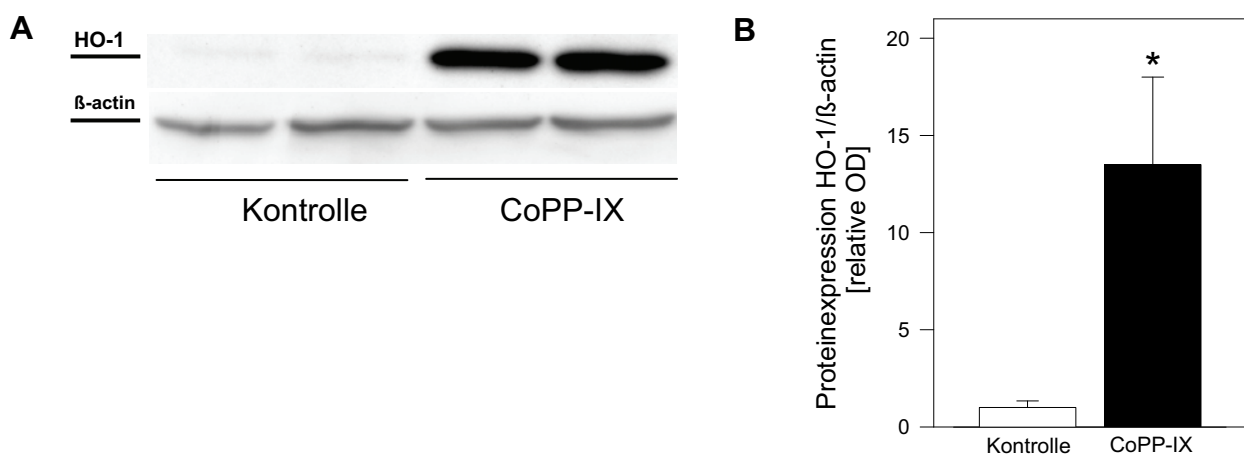


Abbildung 16: Repräsentative Western Blot Analysen (A) sowie quantitative densitometrische Auswertung (B) der HO-1 Proteinexpression. Die Tiere wurden 24 h vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie mit dem HO-1 Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz $\text{NaHCO}_3/\text{PBS}$ erhielten (□). Das Lebergewebe wurde 48 h nach der Resektion entnommen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. Student's t-Test, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Einhergehend der molekularbiologischen Analysen konnten auch die immunhistochemischen Untersuchungen eine gesteigerte HO-1 Expression belegen. Hier liegt die Anzahl an HO-1-positiven Zellen 48 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie bei den mit CoPP-IX behandelten Tieren ca. 2,5-fach höher als bei den entsprechenden Kontrolltieren (Abb. 17).

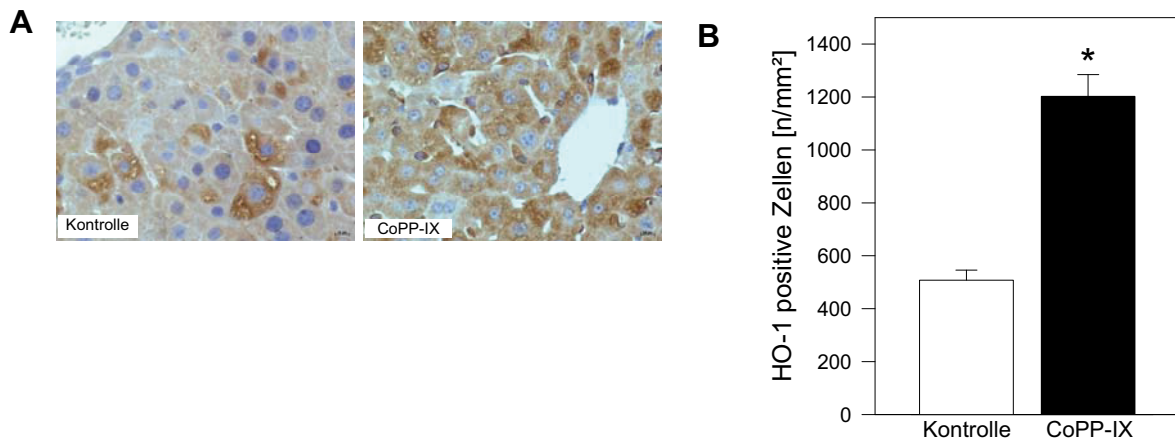


Abbildung 17: Repräsentative Präparate (A; zytoplasmatische Färbung mit dem Braun-Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin, 400fache Vergrößerung) sowie quantitative Auswertung (B) der HO-1 Immunhistochemie. Die Tiere wurden 24 h vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie mit dem HO-1 Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO₃/PBS erhielten (□). Das Lebergewebe wurde 48 h nach der Resektion entnommen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. Student's t-Test, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.2.2 Inhibition der NO-Synthase

Die Reduktion des vasoregulatorisch wirksamen NO im Blutkreislauf der Versuchstiere, welches sowohl von der induzierbaren NOS-2 als auch von der konstitutiv exprimierten NOS-1 produziert wird, wurde durch den Einsatz des unspezifischen NOS-Inhibitors L-NAME (siehe 3.4.2) ermöglicht.

Mittels des Nitrit/Nitrat-Assays, welcher die typischen Abbauprodukte von NO im Serum nachweist (siehe 3.3.3.2), konnte ein 30%iger Rückgang der NO-Synthese bei L-NAME behandelten Tieren festgestellt werden, welcher jedoch kein statistisch signifikantes Niveau ($p = 0,067$) erreichte (Abb. 18).

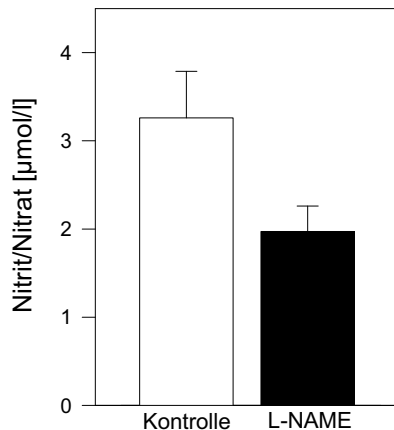


Abbildung 18: Spektrophotometrische Auswertung des Nitrit/Nitrat-Assays, die mit Hilfe einer parallel erstellten Nitrat-Standardkurve quantifiziert werden konnte. Die Tiere wurden 24 h vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie sowie im direkten Anschluss daran mit L-NAME behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz $\text{NaHCO}_3/\text{PBS}$ erhielten (□). Das Serum wurde 48 h nach der Resektion gewonnen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

4.2.3 Substitution von NO

Um eindeutig demonstrieren zu können, dass die biologischen Effekte der L-NAME Applikation auf eine reduzierte NO-Produktion zurückzuführen sind, wurde zum Zweck der NO-Resubstitution eine weitere Gruppe von Tieren mit dem NO-Donor MOL behandelt (siehe 3.4.2).

Zum Beleg des mit Hilfe von MOL wiederhergestellten NO-Haushaltes diente der molekularbiologische Nachweis von nitrosylierten Tyrosinresten (3-NT) in Proteinen des regenerierenden Lebergewebes. Hierbei ist 48 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie eine deutliche Abnahme der relativen optischen Dichte von 3-NT auf ca. 25-30% bei Tieren mit inhibierter NOS im Vergleich zu Tieren mit unbeeinflusster NO-Synthese zu erkennen (Abb. 19). Ebenso wird die Wiederherstellung des NO-Haushaltes durch die Applikation von MOL deutlich. Die relative optische Dichte von 3-NT im Lebergewebe dieser Tiere befindet sich wieder auf dem Niveau von Tieren ohne L-NAME Behandlung (Abb. 19). Die statistische Testung aller Versuchsgruppen mittels Varianzanalyse weist jedoch keine signifikanten Unterschiede auf. Stellt man allerdings die Versuchsgruppen mit L-NAME Behandlung einzeln den Gruppen mit intaktem NO-Haushalt im einfachen Paarvergleich gegenüber, so erreichen diese einzelnen Testungen ein signifikantes Niveau.

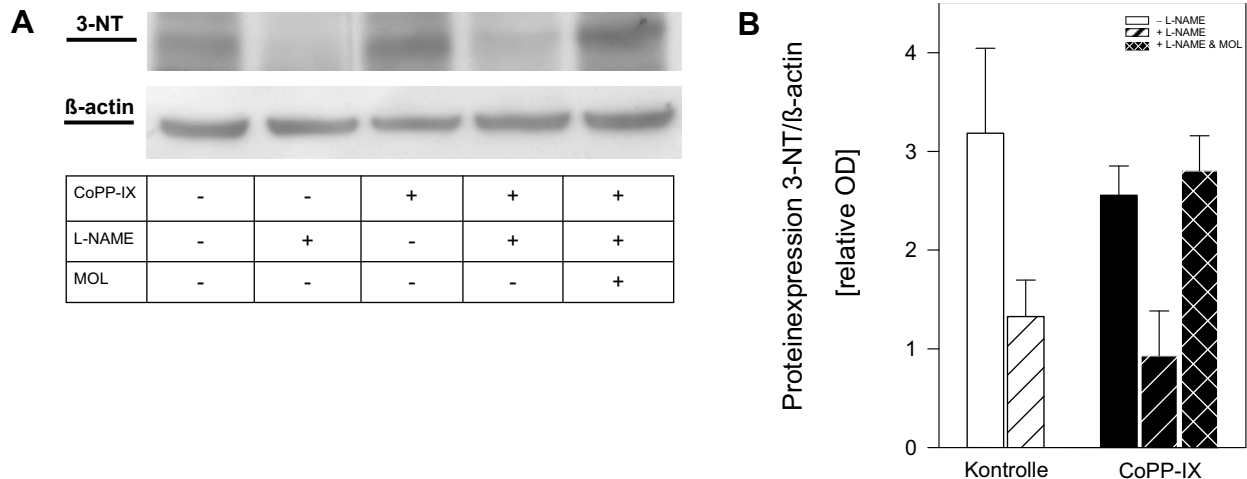


Abbildung 19: Repräsentative Western Blot Analysen (A) sowie quantitative densitometrische Auswertung (B) der Formation von 3-NT Addukten. Die Tiere wurden 24 h vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO_3 /PBS erhielten (□). L-NAME wurde den Tieren zur NOS-Inhibition 24 h vor Hepatektomie wie auch direkt im Anschluss an den Eingriff verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Das Lebergewebe wurde 48 h nach der Resektion entnommen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

4.2.4 Auswirkungen auf die Guanylylzyklase-Aktivität

Ein zentraler Punkt der vorliegenden Studie war die Untersuchung der vasoaktiven Funktionen der Enzymsysteme HO-1 und NOS, welche über die von ihnen synthetisierten gasförmigen Mediatoren CO und NO realisiert werden. NO, aber auch CO sind in der Lage, die Guanylylzyklase zu aktivieren, welche wiederum über das von ihr produzierte cGMP eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen und somit eine Vasodilatation auslöst.

Da durch die Modulation der beiden Enzymsysteme die Produktion der Gase CO und NO beeinflusst wurde, sollte analysiert werden, ob sich dies auch auf die Aktivität der Guanylylzyklase und damit auf den cGMP-Gehalt der regenerierenden Leber 48 h nach Resektion auswirkt.

Die Auswertung des cGMP-ELISA zeigte jedoch bei allen Versuchsgruppen Werte zwischen 22-25 fmol cGMP/mg Lebergewebe ohne statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 20). Die Beeinflussung des CO- und NO-Haushalts wirkte sich somit nicht auf den cGMP-Gehalt der regenerierten Leber aus.

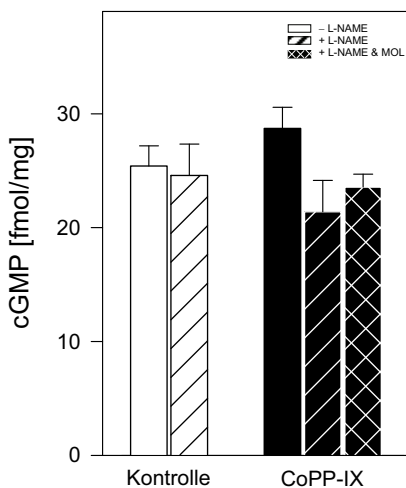


Abbildung 20: Spektrophotometrische Auswertung des cGMP-ELISA, die mit Hilfe einer parallel erstellten cGMP-Standardkurve quantifiziert werden konnte. Die Tiere wurden 24 h vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO₃/PBS erhielten (□). L-NAME wurde den Tieren zur NOS-Inhibition 24 h vor Hepatektomie wie auch direkt im Anschluss an den Eingriff verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Das Lebergewebe wurde 48 h nach der Resektion entnommen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

4.2.5 Mikrozirkulation der Leber vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie

Durch die intravenöse Gabe des hochmolekularen Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran, der sich im Gefäßsystem anreichert, konnte die hepatische Mikrohämodynamik mit Hilfe der hochauflösenden intravitalen Fluoreszenzmikroskopie eingehend untersucht werden. Neben der Frage, ob sich unter der Modulation der vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS Veränderungen der Gefäßdurchmesser beobachten lassen, war es von Interesse, ob aus der Vorbehandlung Veränderungen der für die Leberregeneration bedeutsamen Parameter Blutvolumenfluss und Scherstress resultieren. Beurteilt wurden drei verschiedene Gefäßabschnitte: terminal afferente Gefäße der Leber, d.h. terminale arterioläre sowie portal venuläre Gefäße, Sinusoide und postsinusoidale Venolen (siehe 3.3.2).

4.2.5.1 Gefäßdurchmesser

24 h nach der Vorbehandlung konnte weder bei Tieren mit CoPP-IX induzierter HO-1 Überexpression noch bei Tieren, deren NO-Produktion durch L-NAME inhibiert war, eine Veränderung der Gefäßdurchmesser beobachtet werden. Allerdings führte die gleichzeitige HO-1 und L-NAME Gabe zu einer tendenziellen, jedoch nicht statistisch signifikanten Gefäßerweiterung in allen drei Gefäßabschnitten (Abb. 21).

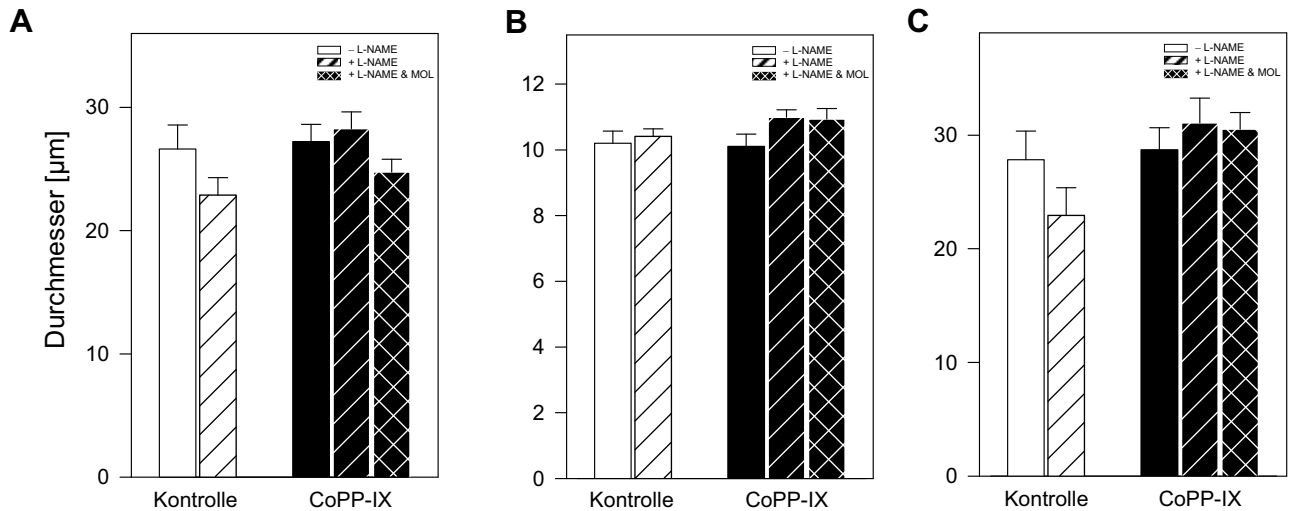


Abbildung 21: Gefäßdurchmesser der terminal afferenten Gefäße (A), Sinusoide (B) und postsinusoidalen Venolen (C) der Leber, welche mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert wurden. Die Tiere wurden 24 h vor der Mikroskopie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO₃/PBS erhielten (□). Zur NOS-Inhibition wurde den Tieren L-NAME 24 h vor Mikroskopie verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

4.2.5.2 Blutzellgeschwindigkeit

Bei den Messungen der Blutzellgeschwindigkeit zeigten sich 24 h nach Vorbehandlung weder bei HO-1-überexprimierenden noch bei NOS-inhibierten Tieren Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 22). Hervorzuheben ist jedoch wiederum, dass unter dem Zusammenwirken von HO-1-Induktion und NOS-Inhibition ein klarer Trend zu höheren Blutzellgeschwindigkeiten erkennbar war (Abb 16 A/C). Interessanterweise ließ sich nach zusätzlicher Gabe des NO-Donors MOL eine Reduktion der Blutzellgeschwindigkeit auf das Niveau der Versuchsgruppen mit alleiniger CoPP-IX bzw. L-NAME Behandlung beobachten (Abb. 22).

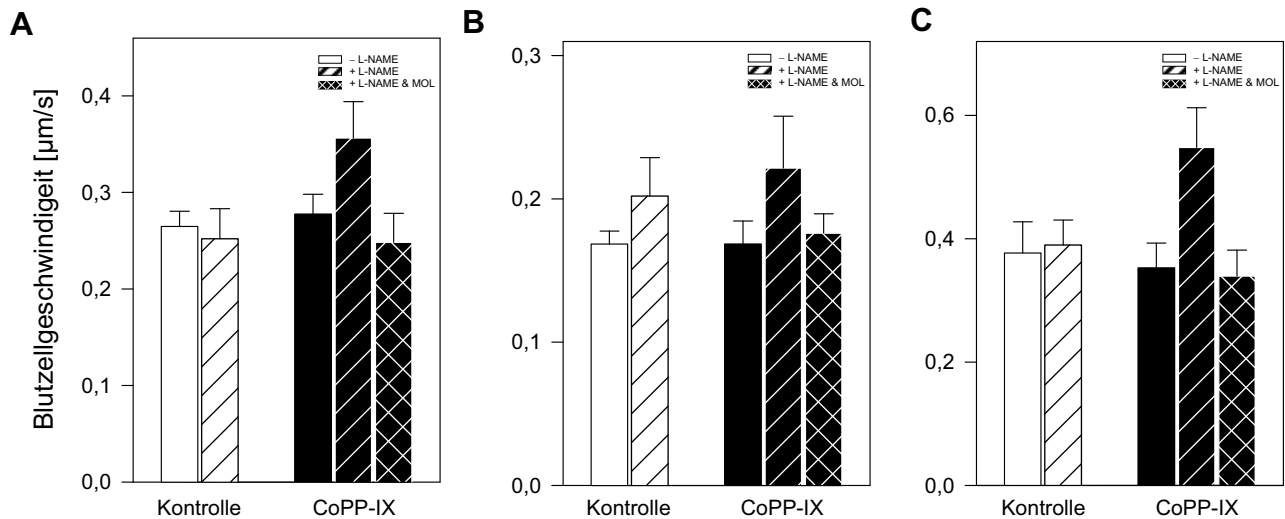


Abbildung 22: Blutzellgeschwindigkeiten in den terminal afferenten Gefäßen (A), Sinusoiden (B) und postsinusoidalen Venolen (C) der Leber, welche mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert wurden. Die Tiere wurden 24 h vor der Mikroskopie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO₃/PBS erhielten (□). Zur NOS-Inhibition wurde den Tieren L-NAME 24 h vor der Mikroskopie verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

4.2.5.3 Blutvolumenfluss

Wie bereits erläutert, ist die relative Zunahme des Blutvolumens, welches durch die drastisch reduzierte Lebermasse nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie strömt, ein zentraler Faktor bei der Initiierung der Leberregeneration. Ob sich dieses durch eine Modulation der Verfügbarkeit der vasoaktiven Mediatoren CO und NO schon im Vorfeld der Resektion beeinflussen lässt, sollte durch Bestimmung des Blutvolumenflusses geklärt werden. Zu dessen Berechnung mittels der in 3.3.2.3 dargestellten Formel wurden mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeiten verschiedener Gefäßsegmente bestimmt.

Die Werte des Blutvolumenflusses bei den HO-1-überexprimierenden Tieren mit intakter NO-Synthese unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrolltiere. Hingegen führte die Zunahme von Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit bei HO-1-überexprimierenden Tieren mit inhibierter NO-Synthese zu einer klaren Steigerung des Blutvolumenflusses gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe. Diese Veränderungen stellten sich in den terminal afferenten Gefäßen sowie den postsinusoidalen Venolen auch als statistisch signifikant dar. Die zusätzliche Gabe des NO-Donors MOL bewirkte wiederum eine Reduktion des Blutvolumenflusses auf Werte, welche vergleichbar mit denen von Tieren mit intakter NO-Synthese waren (Abb. 23).

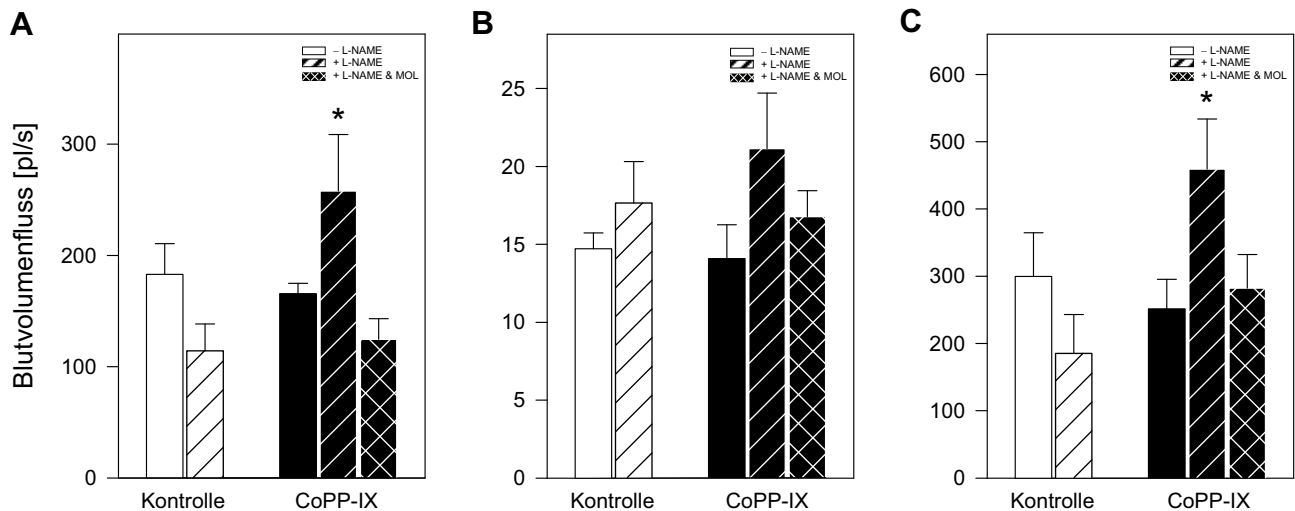


Abbildung 23: Blutvolumenfluss in den terminal afferenten Gefäßen (A), Sinusoiden (B) und postsinusoidalen Venolen (C) der Leber, welcher mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert wurde. Die Tiere wurden 24 h vor der Mikroskopie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO₃/PBS erhielten (□). Zur NOS-Inhibition wurde den Tieren L-NAME 24 h vor der Mikroskopie verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. ANOVA, **p* < 0,05 vs. Kontrolle/+L-NAME.

4.2.5.4 Scherstress

Ergänzend zum Blutvolumenfluss beschreibt die Größe Scherstress die Kräfte, welche durch einen gegebenen Blutvolumenfluss auf die Wände eines Gefäßes mit definiertem Durchmesser wirken. Da diese Größe nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie rapide zunimmt, wird ihr ebenfalls eine Rolle bei den ersten Schritten der einsetzenden Leberregeneration zugesprochen. Für die Berechnung des Scherstresses wird neben dem Blutvolumenfluss auch der Radius, wie in 3.3.2.4 dargestellt, berücksichtigt. In diesem Fall geht der Radius jedoch mit der dritten Potenz in den Nenner ein, was bedeutet, dass bei einem vergleichbaren Blutvolumenfluss Gefäße mit kleineren Durchmessern einem größeren Scherstress exponiert sind.

Aus diesem Grund ist 24 h nach Vorbehandlung bei HO-1-überexprimierenden Tieren mit inhibierter NO-Synthese der mittlere Scherstress zwar erhöht, die Unterschiede zu den anderen Versuchsgruppen jedoch nicht mehr statistisch signifikant. Trotzdem bleibt das charakteristische Verteilungsmuster der Mittelwertunterschiede vor allem im Vergleich zu den Werten von HO-1-überexprimierenden Tieren mit intakter NO-Synthese bestehen (Abb. 24).

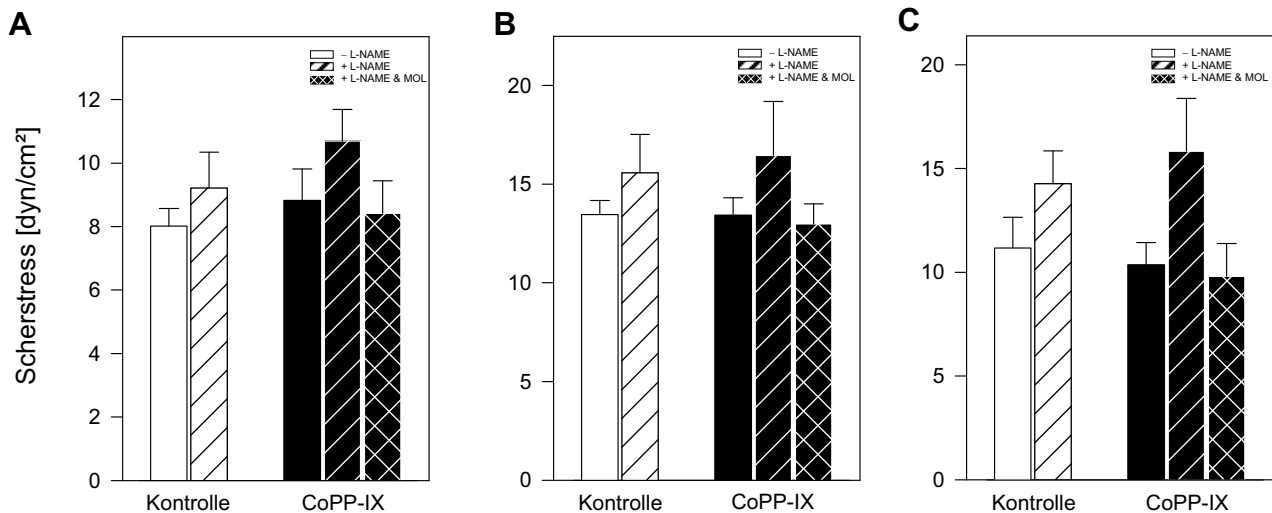


Abbildung 24: Scherstress in den terminal afferenten Gefäßen (A), Sinusoiden (B) und postsinusoidalen Venolen (C) der Leber, welcher mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert wurde. Die Tiere wurden 24 h vor der Mikroskopie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO₃/PBS erhielten (□). Zur NOS-Inhibition wurde den Tieren L-NAME 24 h vor der Mikroskopie verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

4.2.6 Expression von c-fos vor 2/3-Hepatektomie

Einer der ersten Prozesse, die unmittelbar nach der Resektion auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden können, ist die Induktion der *immediate early genes*, welche die nachfolgende Proliferation der Hepatozyten steuern. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, ob Veränderungen der hepatischen Mikrohämodynamik die Expression von c-fos, einem zentralen *immediate early gene* im Verlauf der Leberregeneration, beeinflussen können. Insbesondere war die Frage von Interesse, ob Steigerungen von Blutvolumenfluss und Scherstress, welche in dieser Form auch nach der Leberresektion beobachtet werden, eine erhöhte c-fos Expression im Vorfeld der Resektion vermitteln können.

Aus diesem Grund wurde eine semiquantitative RT-PCR von c-fos im Anschluss an die intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. So konnte eine mögliche transskriptionelle Aktivierung von c-fos nach Modulation der vasoaktiven Systeme HO-1 und NOS analysiert werden. Allerdings bestätigte sich nicht die Vermutung, dass der erhöhte Scherstress der gleichzeitig HO-1-überexprimierenden und NOS-inhibierten Tiere zu einer gesteigerten c-fos-Transkription führt. Der c-fos mRNA-Gehalt im Lebergewebe dieser Tiere unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrolltiere, oder dem der HO-1-überexprimierenden Tiere ohne L-NAME-Behandlung. Auffällig war lediglich, dass

die NOS-inhibierten, HO-1-induzierten Tiere, welche zur NO-Substitution MOL erhielten, einen signifikant niedrigeren c-fos-mRNA Gehalt im untersuchten Lebergewebe aufwiesen (Abb. 25).

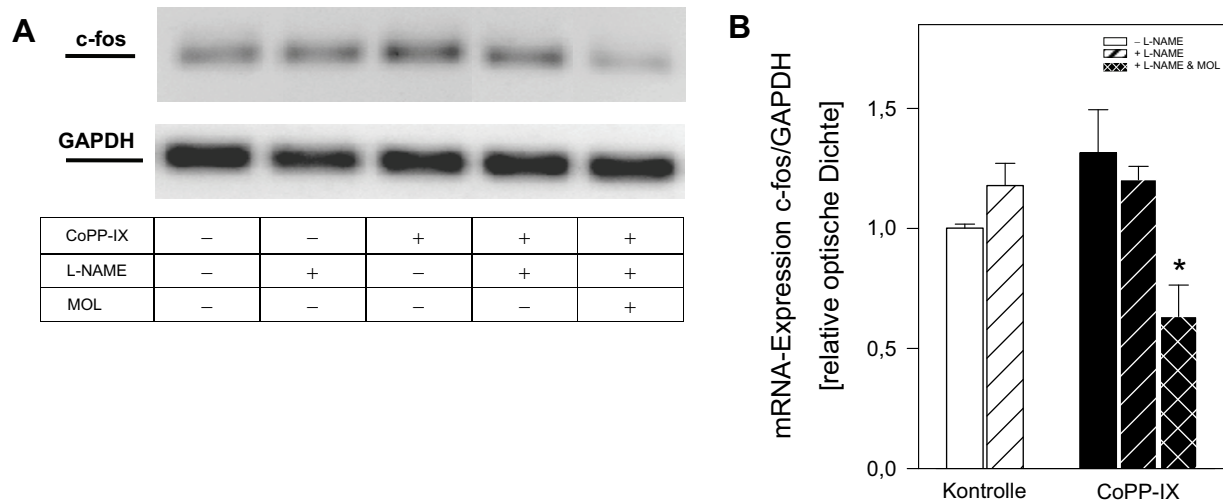


Abbildung 25: RT-PCR (A) sowie quantitative densitometrische Auswertung (B) der c-fos mRNA-Expression. Die Tiere wurden 24 h vor der Untersuchung mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz NaHCO₃/PBS erhielten (□). Zur NOS-Inhibition wurde den Tieren L-NAME 24 h vor Untersuchung verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Das Lebergewebe wurde direkt im Anschluss an die intravitale Fluoreszenzmikroskopie entnommen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. ANOVA, **p* < 0,05 vs. Kontrolle/–L-NAME.

4.2.7 Leberregeneration nach 2/3-Hepatektomie

Mittels der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass eine Beeinflussung der Verfügbarkeit vasoaktiver Mediatoren im Sinne einer Steigerung der CO-Produktion bei gleichzeitiger Reduktion der NO-Synthese zur Erhöhung von Blutvolumenfluss und Scherstress führt. Im folgenden Versuchsabschnitt war nun zu klären, ob sich diese Veränderungen auch auf das Ausmaß der Proliferation nach 2/3-Hepatektomie auswirken.

4.2.7.1 Expression von PCNA

Da PCNA als Cofaktor der DNA-Polymerase- δ in den Zellzyklus eingebunden ist, spiegelt seine Expression das Ausmaß der zellulären Proliferation verlässlich wieder.

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Präparate des Regenerates 48 h nach Resektion demonstrierte eine signifikant erhöhte Anzahl an PCNA-positiv gefärbten Hepatozyten in gleichzeitig HO-1-induzierten und NOS-inhibierten Tieren gegenüber HO-1-induzierten Tieren mit intakter NO-Synthese sowie gegenüber

den Kontrolltieren (Abb. 26). Nach NO-Resubstitution wurde deutlich, dass die erhöhte PCNA-Expression aus der Kombination von erhöhter CO- und verminderter NO-Verfügbarkeit resultierte. So zeigte sich in den Tieren mit gleichzeitiger HO-1-Induktion und NOS-Inhibition, welche zusätzlich MOL zur NO-Substitution erhielten, eine Reduktion der Anzahl PCNA-positiv gefärbter Hepatozyten sogar unter die Werte von Kontrolltieren (Abb. 26).

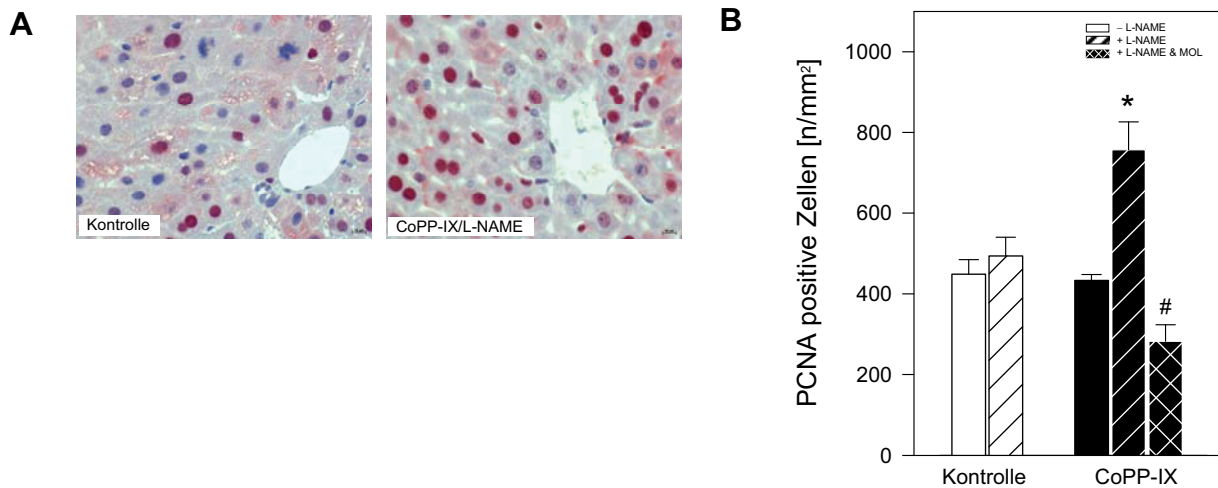


Abbildung 26: Repräsentative Präparate (A; nukleäre Färbung mit dem Rot-Chromogen Fuchsin, 400-fache Vergrößerung) sowie quantitative Auswertung (B) der PCNA-Immunhistochemie. Die Tiere wurden 24 h vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz $\text{NaHCO}_3/\text{PBS}$ erhielten (□). L-NAME wurde den Tieren zur NOS Inhibition 24 h vor Hepatektomie wie auch direkt im Anschluss an den Eingriff verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Das Lebergewebe wurde 48 h nach der Resektion entnommen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. ANOVA, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle/–L-NAME, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle/+L-NAME.

4.2.7.2 Inkorporation von BrdU

Um die Ergebnisse der PCNA-Immunhistochemie zu überprüfen, wurde die Inkorporation des Thymidin-Analogons BrdU studiert. Dieses wurde den Versuchstieren eine Stunde vor Entnahme des Regenerates appliziert (siehe 3.2.2), so dass der Einbau von BrdU in die DNA der zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Hepatozyten stattfinden konnte.

Die quantitative Auswertung der BrdU-Immunhistochemie bestätigte die Resultate der PCNA-Immunhistochemie. Tiere mit gleichzeitiger HO-1-Induktion und NOS-Inhibition wiesen eine signifikant höhere Anzahl an BrdU-inkorporierenden Hepatozyten gegenüber Kontrolltieren sowie HO-1-überexprimierenden Tieren ohne NOS-Inhibition auf. Unter der zusätzlichen Gabe von Molsidomin ließ sich wiederum ein Rückgang der BrdU-positiven

Hepatozyten in Tieren mit gleichzeitiger CoPP-IX- und L-NAME-Behandlung beobachten (Abb. 27).

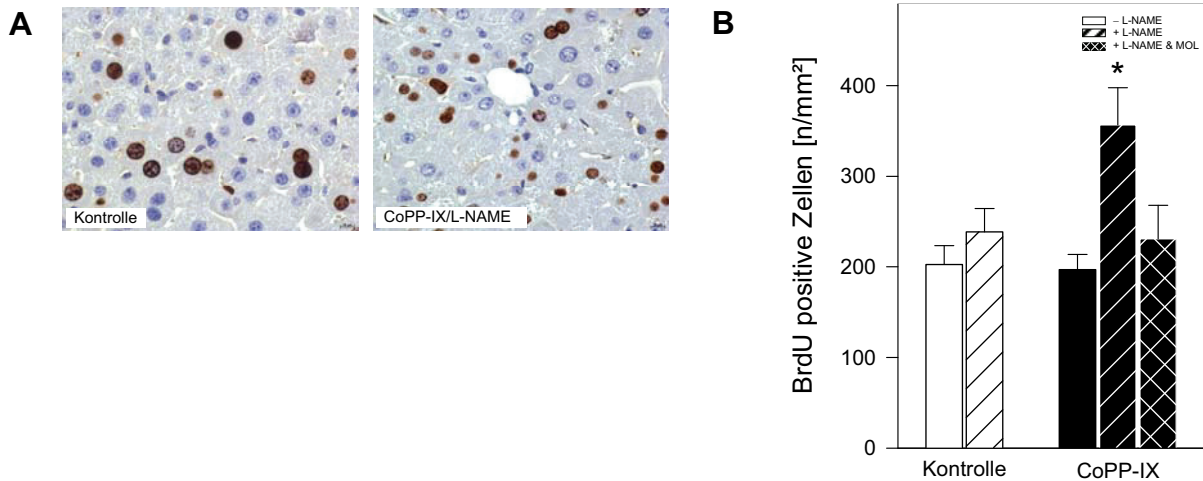


Abbildung 27: Repräsentative Präparate (A; nukleäre Färbung mit dem Braun-Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin, 400-fache Vergrößerung) sowie quantitative Auswertung (B) der HO-1-Immunhistochemie. Die Tiere wurden 24 h vor der $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie mit dem HO-1-Induktor CoPP-IX behandelt (■), während Kontrolltiere nur die Trägersubstanz $\text{NaHCO}_3/\text{PBS}$ erhielten (□). L-NAME wurde den Tieren zur NOS-Inhibition 24 h vor Hepatektomie wie auch direkt im Anschluss an den Eingriff verabreicht (gestreifte Balken). Um die biologischen Effekte von gleichzeitiger HO-1-Induktion (CoPP-IX) und NOS-Inhibition (L-NAME) eindeutig auf die reduzierte NO-Produktion zurückführen zu können, erhielten die Tiere zusätzlich den NO-Donor MOL (karierte Balken). Das Lebergewebe wurde 48 h nach der Resektion entnommen und nachfolgend untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. ANOVA, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle/-L-NAME.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen *in vivo* Studie wurde mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die hepatische Mikrohämodynamik in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der vasoaktiven Mediatoren CO und NO untersucht. Inwieweit sich die Modulation der CO- und NO-produzierenden Enzymsysteme und die damit verbundenen Veränderungen der hepatischen Mikrozirkulation auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie auswirken, wurde in einem weiteren Versuchsabschnitt analysiert. Dabei konnten folgende Erkenntnisse über das komplexe Zusammenspiel von HO-1 und NOS erarbeitet werden:

1. Nach partieller Hepatektomie nahm die Expression der HO-1 als induzierbare Isoenzymform der HO sukzessive bis zum Erreichen ihres Maximums, 48 h nach Resektion, zu und gelangte 96 h nach Resektion wieder in den Ausgangszustand zurück. Hingegen änderte sich das Expressionsverhalten der

NOS-2 als induzierbare Isoenzymform der NOS nicht, sondern blieb auf dem Niveau nicht-regenerierenden Lebergewebes.

2. Durch die Behandlung mit CoPP-IX ließ sich die physiologische HO-1-Induktion im Verlauf der Leberregeneration weiter steigern. Auf der anderen Seite war es mittels L-NAME-Gabe möglich, die NO-Synthese zu reduzieren, wobei die Applikation von MOL das dadurch entstandene NO-Defizit wieder ausgleichen konnte.
3. Durch die Induktion der HO-1 oder Inhibition der NOS alleine ließen sich Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit nicht beeinflussen. Kombinierte man hingegen beide Behandlungen und verstärkte somit den Einfluss von CO, während die NO-Verfügbarkeit reduziert wurde, nahmen Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit zu. Dies bewirkte einen konsekutiven Anstieg von Blutvolumenfluss und Scherstress.
4. Die Untersuchung des cGMP-Gehaltes der Leber 48 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen auf, so dass die mikrohämodynamischen Veränderungen nicht durch eine modulierte Guanylylzyklase-Aktivierung verursacht sein konnten.
5. Alleine die Steigerungen von Blutvolumenfluss und Scherstress im Vorfeld der Hepatektomie induzierten keine vermehrte Expression des *immediate early gene c-fos*.
6. Interessanterweise führte eine HO-1-Induktion in Verbindung mit einer NOS-Inhibition neben dem Anstieg von Blutvolumenfluss und Scherstress 48 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie ebenso zu einer gesteigerten Proliferation der Hepatozyten.
7. Der Einfluss von gleichzeitiger HO-1-Induktion und NOS-Inhibition auf sowohl die hepatische Mikrozirkulation vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie als auch die hepatozytäre Proliferation nach Resektion ließ sich durch Substitution von NO mittels Molsidomin wieder aufheben. Bei der Expression von c-fos sowie von PCNA wiesen die zusätzlich mit MOL behandelten Tiere sogar signifikant niedrigere Werte als Kontrolltiere auf.

8. Sowohl unter alleiniger NOS-Inhibition als auch unter alleiniger HO-1-Induktion regenerierte die Leber nach partieller Hepatektomie wie unter physiologischen Bedingungen. Nur durch die Kombination eines verstärkten CO-Einflusses bei gleichzeitig geringerer NO-Verfügbarkeit ließ sich die Regeneration darüber hinaus weiter steigern. Es konnte somit geschlossen werden, dass die unbeeinflusste NO-Synthese den stärkeren Einfluss von CO nach pharmakologisch induzierter Überexpression der HO-1 auf die Leberregeneration kompensiert. Dadurch wurde ein physiologisches Ausmaß der Regeneration gewährleistet.

5 Diskussion

5.1 *Diskussion von Material und Methode*

5.1.1 Diskussion der Modelle

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss der vasoaktiven Systeme HO-1 und NOS auf die Leberregeneration analysiert sowie in Sonderheit der Einfluss dieser Enzymsysteme auf die hepatische Mikrozirkulation evaluiert.

Zum Studium der Leberregeneration stehen verschiedene Modelle zur Verfügung, wobei jedoch beachtet werden muss, dass ein Modell problembezogen ausgewählt sein sollte, um der zugrunde liegenden Fragestellung gerecht werden zu können [206].

Im Rahmen von *in vitro* Studien an hepatischen Zellkulturen werden häufig Untersuchungen zu Biotransformation und anderen metabolischen Vorgängen durchgeführt [207]. Es kann jedoch auch die Wirksamkeit bestimmter Wachstumsfaktoren [208] und deren Einfluss auf den Zellzyklus analysiert werden [209]. Einer der Nachteile der Zellkultur liegt in der Tendenz der Zellen zur Dedifferenzierung, bedingt durch Isolationsprozesse, den damit verbundenen Ischämie-Reperfusionstress und die spezifische *in vitro* Umgebung, welche die Aussagekraft der gewonnenen Erkenntnisse für *in vivo* Bedingungen reduziert [210].

Dahingegen erlauben *ex vivo* Untersuchungen an isoliert perfundierten Lebern zum einen Aussagen über die Reaktion der hepatischen Mikrozirkulation auf bestimmte vasoaktive Mediatoren [211], zum anderen können neben dem Regenerationsprozess [212] auch die Produktion lebereigener Wachstumsfaktoren [213] sowie Veränderungen des Metabolismus während der Regeneration [214] studiert werden.

Nachteil dieser Ansätze ist in beiden Fällen die isolierte Betrachtung der einzelnen Zellart bzw. des einzelnen Organs, was nicht die Berücksichtigung komplexer Interaktionen der verschiedenen Zellpopulationen bzw. verschiedener Organsysteme erlaubt. Die Leberregeneration wird vor allem infolge eines Verlustes an funktionsfähigem Lebergewebe durch Resektion [215] oder toxische Schädigung [216] ausgelöst. Bei gleichzeitig konstanter Durchblutung der restlichen Organe im Einzugsgebiet der Pfortader kommt es aufgrund des reduzierten Gesamt-Gefäßquerschnittes in der Restleber zu

drastischen Anstiegen von Leberdurchblutung und Pfortaderdruck [217]. Somit steht der Regenerationsprozess in engem Zusammenhang mit Veränderungen von Mikro- und Makrohämodynamik [218, 219]. Um diese vielfältigen Faktoren berücksichtigen zu können, wurde diese Studie im *in vivo* Modell der partiellen Hepatektomie durchgeführt.

Nachdem HIGGINS und ANDERSON 1931 [19] erstmals ein standardisiertes Modell der partiellen Hepatektomie in der Ratte beschrieben hatten, konnte zuletzt von GREENE und PUDER 2002 [189] ein ebenso sicheres peri- und intraoperatives Vorgehen für die partielle Hepatektomie in der Maus etabliert werden. Die Vorteile der Maus gegenüber der Ratte liegen in ihrer günstigeren Anschaffung und Haltung. Des Weiteren besteht eine breitere Verfügbarkeit von Antikörpern für molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen und von transgenen Tieren, so dass insgesamt ein größeres Spektrum für potentielle Analysen und Versuchsanordnungen zur Verfügung steht [220].

Demgegenüber ist die Leberresektion in der Ratte aufgrund ihrer Größe und der fehlenden Gallenblase technisch einfacher durchführbar, wobei dieser Vorteil durch ein geschultes und standardisiertes Vorgehen bei der Maus kompensiert werden kann [189]. Die Notwendigkeit für ein solch standardisiertes Vorgehen ist gegeben, da nur durch die Resektion der prozentual gleichen Gewebemenge und der gleichen Leberlappen vergleichbare Regenerationsbedingungen gewährleistet werden können. So kommt es zum einen bei größeren Abweichungen von der angestrebten 68%igen Resektion zu signifikant geringerer Proliferationsaktivität. Zum anderen variiert auch das Ausmaß der Regeneration in Abhängigkeit von den verbleibenden Leberlappen [221].

Die chirurgische Präparation macht eine Narkose des Tieres unumgänglich, wobei im Rahmen der Leberresektion ein Isofluran/N₂O Gemisch verwendet wurde. Isofluran hat neben seiner einfacheren Steuerung gegenüber anderen volatilen und intravenös verabreichten Anästhetika den Vorteil, dass es einer äußerst geringen Biotransformation unterliegt und so weder durch die Grundsubstanz noch durch seine Metabolite eine hepatotoxische Wirkung bedingt ist [222, 223]. Ähnlich dem älteren Inhalationsanästhetikum Halothan [224] soll es zwar in Einzelfällen bei wiederholter Isofluran Verwendung ebenfalls zu Transaminasen-Anstiegen [225] und Leberversagen gekommen sein [226]. Dieses konnte jedoch in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden, zumal die Tiere nur einmalig mittels Isofluran anästhesiert wurden. Ein weiterer Vorteil von Isofluran liegt in seiner im Vergleich zu Halothan und Enfluran geringeren kardiodepressiven Wirkung [227] sowie dem nur sehr geringen Einfluss auf die hepatische

Makro- und Mikrozirkulation [228, 229]. Das zusätzlich verwendete N₂O, welches allein verwendet und in höheren Konzentrationen den Leberblutfluss beeinträchtigen kann [230], weist diesen Effekt in Kombination mit Isofluran nur noch marginal auf [231]. Auf eine postoperative analgetische Therapie wurde aufgrund der bekannten Verstoffwechslung und Induktion von leberspezifischen Enzymen durch die gängigen Präparate verzichtet [232], zumal das Verhalten der Tiere nach der Resektion nicht auf schmerzbedingte Einschränkungen schließen ließ.

Die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation erfolgte mit Hilfe der Intravitalmikroskopie, wobei in der Vergangenheit diverse Akut-Modelle zur quantitativen Analyse der mikrohämodynamischen Bedingungen in verschiedenen Organen etabliert wurden. So kann mittels Epi-Illumination und *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie unter anderem die Mikrozirkulation von Gehirn [233], Herz [234], Lunge [235], Pankreas [236], Pankreas-Inseln [237], Magen [238], Darm [239], Mesenterium [240, 241], Milz [242] und Niere [243], sowie von Knochen [244], Haut [245-247] und Skelettmuskel [248, 249] quantitativ beurteilt werden.

Allerdings macht dieses Modell zur Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation ein invasives Vorgehen mit Anästhesie, Laparotomie und Auslagerung der Leber erforderlich. Im Gegensatz zur Leberresektion handelte es sich hierbei um Finalversuche, für die eine kurzfristige Steuerbarkeit und ein schnelles Erwachen der Tiere nach der Narkose, wie es die Verwendung von Isofluran ermöglicht, nicht notwendig waren. Deshalb wurde zur Anästhesie der Tiere für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen ein Ketamin-Xylazin-Gemisch verwendet, welches in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war [218, 250, 251] und die für die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation hämodynamische Stabilität gewährleistete. Ketamin alleine erzeugt einen Bewusstseinszustand der dissoziativen Anästhesie, welcher sich durch Analgesie und Bewusstseinsverlust bei gleichzeitig erhaltenen Schutzreflexen und erhöhtem Sympathikotonus auszeichnet. Daher wirkt sich die Ketamin-Gabe nicht auf die intestinale Mikrozirkulation [252] oder den Leberblutfluss aus [253]. Xylazin ist ein α_2 -Adrenozeptor-Agonist, der sedativ-hypnotisch, analgetisch und muskelrelaxierend wirkt [254]. Somit ist es für die Kombination mit Ketamin geeignet, auch wenn eine atem- und kreislaufdepressorische Wirkung [255] sowie ein verringertes Ansprechen auf vasoaktive Mediatoren wie Noradrenalin und Bradykinin in Kauf genommen werden müssen [256]. Zu beachten ist jedoch, dass alle Versuchsgruppen dem gleichen Narkoseprotokoll unterlagen und deshalb Vergleiche der

hepatischen Mikrohämodynamik zwischen den Gruppen bei gleichem Ausmaß der eventuellen Kreislaufdepression möglich waren. Kurzfristige Erhöhungen der Transaminasen-Aktivitäten und Apoptoseraten nicht-parenchymatöser Leberzellen unter Ketamin-Xylazin [257] spielten hingegen keine Rolle, da diese Parameter für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen nicht relevant sind.

Neben dem Anästhesieverfahren liegen auch für die zur Intravitalmikroskopie unumgänglichen Schritte der Laparotomie und Leberauslagerung Hinweise in der Literatur vor, dass aus der damit verbundenen Traumatisierung des Gewebes eine Störung der Leberperfusion resultieren kann [258, 259]. Allerdings ließen sich bei Messungen der Leberdurchblutung in Ratten mittels radioaktiv markierten Mikrosphären keine signifikanten Unterschiede zwischen laparotomierten und nicht-laparotomierten Tieren nachweisen [260]. Nur nach Laparotomie und Auslagerung des linken Leberlappens können mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie mikrohämodynamische Parameter wie Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit in Sinusoiden sowie den zugehörigen afferenten und efferenten Gefäßen der Leber quantitativ bestimmt werden [261, 262].

Inwieweit Anästhesie und Präparation die Leberperfusion beeinflussen, lässt sich nicht abschließend beurteilen, da vergleichende Messungen mikrohämodynamischer Parameter an nicht-narkotisierten, nicht-laparotomierten Tieren derzeit nicht möglich sind. Zumindest ließen sich nach entsprechend vorsichtiger und standardisierter Auslagerung des Leberlappens weder makroskopische Hinweise auf eine Torquierung der versorgenden Gefäße finden, noch kam es zu intravitalmikroskopisch erfassbaren Perfusionsausfällen.

5.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Im Rahmen der vorliegenden Studie zur Bedeutung der vasoaktiven Systeme HO-1 und NOS im Verlauf der Leberregeneration wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen durchgeführt. Neben der Untersuchung von physiologischer und modulierter Aktivität der vasoaktiven Enzymsysteme wurde auch deren Einfluss auf die hepatische Regeneration und Mikrohämodynamik analysiert.

Die Aktivitäten von HO-1 und NOS-2 wurden in diesem *in vivo* Experiment nur indirekt bestimmt, auch wenn es spezialisierten Forschungsgruppen bereits gelungen ist, die von diesen Enzymen synthetisierten Gase CO und NO intravitalmikroskopisch nachzuweisen [263]. Für die HO-1-Aktivitätsbestimmung wurde die Quantifizierung der Proteinexpression mittels Western Blot Analysen und Immunhistochemie gewählt, da *in*

vitro Untersuchungen anhand des Nachweises aus Häm synthetisierten Bilirubins demonstrieren konnten, dass die HO-1-Aktivität mit dem Ausmaß der Proteinexpression korreliert [264].

Zur Beurteilung der NO-Synthese mussten zum einen verschiedene Isoenzymformen berücksichtigt werden. Zum anderen sah der Versuchsaufbau vor, die Modulation der NOS-Aktivität im Gegensatz zur HO-1-Aktivität nicht über die Proteinexpression zu realisieren. Stattdessen kam ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthese zum Einsatz, dessen Effekt in einer weiteren Versuchsgruppe durch NO-Substitution wieder aufgehoben wurde. Aus diesem Grund erwies es sich als sinnvoll, die NOS-Aktivität nicht über die Proteinexpression zu quantifizieren, sondern sie durch den indirekten Nachweis des synthetisierten NO zu bestimmen. Da NO sehr rasch metabolisiert und in die stabilen Abbauprodukte Nitrit und Nitrat umgewandelt wird [265], konnte deren verminderte Konzentration im Serum als Beleg einer erfolgreichen Inhibition der NO-Synthese genutzt werden [266, 267]. Neben anderen Methoden, wie der Gaschromatographie-Massenspektrometrie oder der High-Performance Flüssigchromatographie, stellt dabei die spektrophotometrische Bestimmung von Nitrit unter Verwendung der Griess-Reaktion eine etablierte und aufgrund identischer diätetischer Bedingungen für die Versuchstiere [268] verlässliche Möglichkeit zur Bestimmung der NO-Abbauprodukte Nitrit und Nitrat dar [269, 270].

Als eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung von synthetisiertem NO wurde die Bestimmung von nitrosylierten Tyrosinresten in Proteinen des regenerierten Lebergewebes herangezogen. Diese entstehen durch die Reaktion von Tyrosinresten mit Peroxynitrit, welches wiederum durch die Reaktion von NO mit einem Superoxid-Anion gebildet wird [271]. Mittels dieser Methode können Veränderungen des NO-Haushaltes sowohl durch NOS-Inhibitoren [272] als auch durch NO-Donore [203] nachgewiesen werden.

Um die Guanylylzyklase Aktivität bestimmen zu können, welche prinzipiell durch CO und NO modifiziert werden kann [273, 274], erfolgte die Untersuchung des regenerierten Lebergewebes hinsichtlich des darin enthaltenen cGMP. Dieses wird durch die Guanylylzyklase aus Guanosin-Triphosphat synthetisiert und vermittelt unter anderem die vasoregulative Wirkung von CO und NO [275]. Andere Untersuchungen bestätigten bereits, dass sich Modulationen der HO-1- und NOS-Aktivität auf den hepatischen cGMP-Gehalt auswirken und diese Veränderungen per ELISA-Technik erfasst werden können [276, 277].

Zur Beurteilung der Leberregeneration wurden die Expression von PCNA und die Inkorporation von BrdU herangezogen. Beide bieten gegenüber anderen Parametern, wie z.B. dem Lebergewicht oder leberspezifischen Enzym-Konzentrationen den Vorteil, nicht durch intrinsische oder extrinsische Faktoren, welche nicht im Zusammenhang mit den Regenerationsvorgängen stehen, beeinflusst zu werden [278]. Auch der lichtmikroskopischen Quantifizierung mitotischer Figuren sind die immunhistochemischen Analysen von PCNA und BrdU überlegen. Entgegen dem Nachweis der Mitose werden sie als Parameter der Synthese-Phase in ihrer Aussagekraft nicht durch eine kurze Dauer im Zellzyklus und eine eingeschränkte objektive Auswertbarkeit reduziert. PCNA ist als Cofaktor der DNA-Polymerase- δ ein wesentlicher Bestandteil der Synthese-Phase [279], auch wenn er ebenso in Prozesse wie z.B. der DNA-Reparatur oder DNA-Methylierung involviert ist [280]. Die Analyse der BrdU-Inkorporation stellt aufgrund des Einbaus von BrdU als Thymidin-Analogon in die DNA einen Referenzparameter zur Untersuchung der DNA-Syntheseaktivität dar [190], weshalb sie sich ideal zur Bestätigung der Resultate der PCNA-Expression eignet.

Als *immediate early gene* ist c-fos im Vergleich zu PCNA und BrdU ein wesentlich früherer Marker der beginnenden Leberregeneration. Zudem bietet der mRNA-Nachweis mittels RT-PCR gegenüber der Proteinanalyse den Vorteil, diesen Vorgang bereits auf transkriptioneller Ebene nachvollziehen zu können [281]. Somit war die Möglichkeit gegeben, hämodynamisch bedingte Veränderungen der c-fos-Expression vor der Leberresektion nachzuweisen und so ein frühzeitiges Priming der Leberregeneration zu erfassen.

Um die Auswirkungen einer Modulation von vasoaktiven Systemen auf die hepatische Mikrozirkulation evaluieren zu können, wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Sie stellt eine etablierte Untersuchungstechnik dar, welche bereits in einer Vielzahl von Tiermodellen, wie z.B. Mäusen [282], Ratten [261] und Kaninchen [283] sowie in einigen Großtieren, wie Hunden und Affen [284], angewendet werden konnte. Gegenüber anderen indirekten Methoden wie der Mikrosphären-Technik [285], der Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs [286], der Xenon-Clearance-Technik [287], der photochemischen Plethysmographie [288], der Thermographie [289] oder der Laser-Doppler-Flussmessung [290] bietet die intravitale Fluoreszenzmikroskopie den Vorteil der direkten Visualisierung hepatischer Gefäßstrukturen. Somit können die Durchblutung von Arteriolen, Sinusoiden und Venolen der Leber *in vivo* analysiert und dynamische Veränderungen direkt beobachtet werden [261].

Die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation ist sowohl in Epi- als auch in Trans-Illumination möglich. Auch wenn die grundlegenden Erkenntnisse über die hepatische Angioarchitektur auf Untersuchungen in Trans-Illuminationstechnik zurückgehen [291] birgt diese Variante den Nachteil, auf eine sehr dünne, trans-illuminierbare Gewebedicke angewiesen zu sein. Dadurch wird selbst bei Kleintieren mit geringer Leberkapseldicke die untersuchbare Leberoberfläche auf den äußersten Rand eingeschränkt. Allerdings ist dieser während der Untersuchung in größerem Umfang durch Austrocknung und mechanische Manipulationen gefährdet, weshalb bezweifelt werden muss, dass hier physiologische Flussbedingungen herrschen. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung bestätigt, dass bei Analyse mittels Trans-Illumination die Perfusion der Sinusoide deutlich eingeschränkt ist [292], wohingegen bei der Untersuchung in Epi-Illuminationstechnik eine sinusoidale Perfusionsrate > 98% angegeben wird [261].

Durch die intravenöse Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen kann nicht nur ein großer Teil der Leberoberfläche mit seiner Angioarchitektur visualisiert, sondern auch die selektive Betrachtung verschiedener Parameter der hepatischen Mikrohämodynamik realisiert werden. In der vorliegenden Studie wurde FITC-Dextran zur Kontrastierung des Gefäßsystems benutzt [293]. Durch die Kombination der Intravitalmikroskopie in Epi-Illuminationstechnik mit einem *offline* Bildverarbeitungsprogramm konnten diese Aufnahmen im Anschluss hinsichtlich Gefäßdurchmesser [294] und Blutzellgeschwindigkeit [295] quantitativ analysiert werden. Als Einschränkung muss jedoch in Kauf genommen werden, dass vor allem bei Kleintieren wie der Maus die Auswertung dieser Aufnahmen durch Bewegungen der Leber aufgrund von Herzaktionen und atmungsbedingter Zwerchfellverschiebungen erschwert ist.

Neben der Bestimmung von Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit erfolgte auf deren Grundlage auch die Berechnung von Blutvolumenfluss und Scherstress in Anlehnung an KOO et LIANG [296] bzw. HORI et al. [193]. Da das Ausmaß des Scherstresses neben dem Blutvolumenfluss, welcher auf eine definierte Gefäßoberfläche einwirkt, auch von der Viskosität der durchströmenden Flüssigkeit abhängig ist, wurde dieser Faktor ebenfalls in die Berechnung mit einbezogen [194]. Die Viskosität wurde dabei für alle Tiere als konstant angenommen, auch wenn sie theoretisch bei höheren Wandscherraten (Wandscherrate $\gamma = 8 \text{ VQ} / d$) abnimmt [297]. Da diese Veränderungen im Bereich der hier gemessenen Wandscherraten allerdings keine statistische Signifikanz aufweisen, erschien es gerechtfertigt, diese Veränderungen bei der Berechnung des Scherstress unberücksichtigt zu lassen.

Als indirekte Parameter zur Bestimmung des Leberschadens nach Leberresektion erfolgte die Untersuchung des Blutplasmas auf leberspezifische Aminotransferasen und Bilirubin. Dabei kann die Erhöhung der Transaminasen als Korrelat einer hepatischen Zellschädigung verschiedener Genese gewertet werden [298]. Die differenzierte Bestimmung von der präferentiell mitochondrialen Aspartat-Aminotransferase und der zytoplasmatischen Alanin-Aminotransferase erlaubt es die Schwere der Leberschädigung abzuschätzen. Eine mitochondriale Freisetzung von Transaminasen erfolgt erst bei hepatozytärer Nekrose, während die zytoplasmatischen Transaminasen auch bei beginnender Zell-Hypoxie ins Serum abgegeben werden, ohne dass es zum Zelluntergang kommen muss [299]. Ähnlich ist es auch bei der Bestimmung von Bilirubin durch Differenzierung von konjugiertem und unkonjugiertem Bilirubin möglich, die Lokalisation der Schädigung besser einzuschätzen [300]. So spricht eine Erhöhung des unkonjugierten Bilirubins eher für eine prä-hepatische, die Erhöhung des konjugierten Bilirubins eher für eine post-hepatische Genese des Ikterus [301].

5.2 *Diskussion der Ergebnisse*

Im Verlauf des letzten Jahrhunderts war die Leber mit ihrer einzigartigen Regenerationsfähigkeit Mittelpunkt einer Vielzahl von Studien, wobei meist die Vorgänge nach Leberresektion untersucht wurden. Vor allem seit dem letzten Jahrzehnt war es durch die Fortschritte in der Molekularbiologie möglich, die zugehörigen Prozesse der drei Hauptphasen der Leberregeneration – Initiation, Proliferation und Terminierung – besser zu verstehen. Es konnte jedoch bisher nicht exakt geklärt werden, welche Veränderungen das Signal zum Start der Regeneration geben.

Bei der Klärung dieser Frage rückten die hämodynamischen Veränderungen nach Leberresektion in den Mittelpunkt, da die Zunahme des Verhältnisses von Blutfluss zu Lebergewebe ein charakteristisches, unmittelbares Ereignis zu Beginn der Regeneration darstellt. Diese Hypothese kann heute als weitestgehend belegt angenommen werden. So wurde zum einen der rasche Anstieg des portal-venösen Druckes, welcher als Korrelat des steigenden Scherstress herangezogen werden kann, als initiales Ereignis des Regenerationsprozesses beschrieben [72, 302]. Zum anderen war es möglich, ein hämodynamisches Modell der Leberregeneration zu etablieren [303]. In diesem wird durch selektive Unterbindung des portal-venösen Zuflusses eines Teiles der Leber ein

kompensatorischer Anstieg des portal-venösen Flusses in den verbleibenden Leberlappen, vergleichbar mit dem Zustand nach partieller Hepatektomie, erzielt [304]. Der starke Anstieg des Leberblutflusses kann dabei nicht durch den reduzierten arteriellen Zufluss kompensiert werden und so resultiert ein erhöhter Scherstress [305]. Die daraus resultierende Proliferation des hyperperfundierten Lebergewebes entspricht dabei sowohl in ihrem Ausmaß als auch in den molekularbiologischen Vorgängen der Regeneration nach partieller Hepatektomie [306, 307].

Relevant für die darauffolgenden Studien waren somit Proteine, deren Expression durch Scherstress beeinflussbar ist, weshalb vor allem die NOS-2 aber auch die NOS-3 im Zusammenhang mit der Leberregeneration untersucht wurden [188, 308]. Daneben ließen sich jedoch auch eindeutige Hinweise dafür finden, dass die HO-1, ein Enzymsystem, welches viele Gemeinsamkeiten mit der NOS aufweist, ebenso durch ansteigenden Scherstress induzierbar ist [309, 310].

Sowohl NOS als auch HO-1 sind dabei in der Lage, über ihre gasförmigen Mediatoren NO bzw. CO vasoregulatorisch zu wirken, können aber auch komplexere Vorgänge, wie z.B. die Apoptose beeinflussen [169, 311]. Inwieweit diese beiden Enzymsysteme im Verlauf der Leberregeneration miteinander interagieren, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

5.2.1 Expression vasoaktiver Enzymsysteme nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie

Die Leberteilresektion führte bereits nach 4 h zum 5-fachen Anstieg der HO-1-Proteinexpression, welche nach 48 h ihr Maximum mit einer 30-fach erhöhten Expression gegenüber nicht regenerierendem Lebergewebe erreichte. Eine ähnliche Dynamik konnte auch in den Versuchen von LYOUMI et al. [312] beobachtet werden. In dieser Studie lag die maximale HO-1-Expression zwar bei 6 h, allerdings muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass nicht die Protein-, sondern die mRNA-Expression untersucht wurde. Zudem handelte es sich bei den Versuchstieren nicht um Mäuse, sondern um Ratten, deren Regeneration zu Beginn einen schnelleren Verlauf aufweist [24].

Bei der Identifikation der zugrunde liegenden Mechanismen, welche die HO-1-Induktion verursachen, müssen zunächst artifizielle Störungen beachtet werden. Durch den Verzicht auf Analgetika oder Anästhetika, wie z.B. Phenobarbital, wurde eine Inhibition der HO-1, vermittelt durch Cytochrom P450-Induktion, verhindert [313, 314]. Die angewendete Isofluran-Narkose ist theoretisch auch in der Lage, die HO-1 zu induzieren

[315]. Dies wird allerdings erst nach deutlich längeren Expositionszeiten von über 5 h beobachtet [316].

Wie bereits erwähnt, stellt der direkt nach Leberteilresektion drastisch erhöhte Scherstress einen möglichen Initiator der Regeneration dar. Deshalb ist zu klären, auf welche Weise dieses mechanische Signal in eine zelluläre Reaktion umgesetzt werden kann und inwieweit die HO-1 mit ihrer Vielzahl an Regulationsmöglichkeiten [317] damit in Verbindung steht. Zum einen konnte von WAGNER et al. [309] nachgewiesen werden, dass Scherstress zu einer verstärkten HO-1-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen sowie die gesteigerte CO-Synthese zur Aktivierung der Guanylylzyklase führt. Zum anderen ist bekannt, dass die Einwirkung von Scherstress auf Endothelzellen eine Stabilisierung des Proteins *NF-E2-related factor 2* bedingt [318]. Dieses Protein kann wiederum durch Bindung an die entsprechenden Motive im Promotor des HO-1-kodierenden Gens, das *antioxidant response element* (ARE) sowie das *stress response element* (StRE), die Protein-Synthese von HO-1 in den Endothelzellen erhöhen [310, 319]. Somit stehen sowohl für glatte Gefäßmuskelzellen als auch für Endothelzellen Mechanismen der scherstress-bedingten HO-1-Induktion zur Verfügung. Der Prozess dieser sogenannten Mechanotransduktion läuft nach heutigen Vorstellungen über die Öffnung von K⁺-Kanälen und einen durch die resultierende Hyperpolarisation der Zelle hervorgerufenen Ca²⁺-Einstrom ab [320, 321]. Danach kann dieses Signal unter anderem durch Ca²⁺-abhängige Kinasen die Expression und Aktivität verschiedener Proteine modifizieren.

Eine andere Hypothese wurde von FAUSTO [24] aufgestellt, der die stärkere Belastung der nach Resektion verbleibenden Leber durch unvermindert anfallende Stoffwechselprodukte im Einzugsgebiet der Pfortader als Initiator der Leberregeneration postulierte. Diese Stoffwechselprodukte und deren Metabolite führen zu einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffabkömmlinge und erhöhen den oxidativen Stress der betroffenen Zellen. Dieser oxidative Stress ist wiederum in der Lage, zentrale Proteine der Leberregeneration, wie NFκB oder AP-1, über das entsprechende ARE in der Promotorregion ihres kodierenden Gens zu induzieren [322]. Es sollte dabei erwähnt werden, dass die HO-1 sowohl direkt durch oxidativen Stress über das eigene ARE [323] als auch indirekt durch NFκB und AP-1 [324, 325] induziert werden kann. Allerdings ist diese Hypothese umstritten, da die NFκB-Aktivierung im Rahmen der Leberregeneration unabhängig vom Vorhandensein des NADPH-Oxidasesystems, einer zellulären Hauptquelle reaktiver Sauerstoffabkömmlinge, ist [326] und somit andere Aktivatoren in

Betracht gezogen werden müssen. Interessanterweise kann auch NF κ B durch ansteigenden Scherstress induziert werden, da dieser Integrin-abhängig zur Aktivierung der I κ B-Kinase führt, so dass I κ B vermehrt degradiert und NF κ B in den Zellkern transloziert wird [327].

Es lässt sich zusammenfassen, dass die HO-1 nach Leberresektion durch oxidativen Stress, aber auch durch Scherstress induzierbar ist und dies in beiden Fällen sowohl direkt als auch indirekt über den Zwischenschritt der NF κ B-Aktivierung geschehen kann. Scherstress kann eine HO-1-Induktion zunächst nur in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen erzeugen. Danach könnte sich dieses Signal jedoch durch parakrine Mechanismen z.B. über die erhöhte CO-Produktion mit nachfolgender Aktivierung der Guanylylzyklase auf die umliegenden Leberparenchymzellen ausbreiten, da die HO-1-Expression ebenfalls durch cGMP induzierbar ist [328]. Unterstützung erhält diese Hypothese durch die Beobachtung, dass in der regenerierenden Leber nach Induktion von Cytochrom P450 nicht nur die HO-1-Expression reduziert ist, sondern auch die cGMP-Konzentration des regenerierenden Lebergewebes vermindert ist. Die HO-1-Inhibition ließe sich damit hier zum einen durch die geringere Häm-Verfügbarkeit aber auch durch die fehlende Selbstverstärkung über den Guanylylzyklase-cGMP-Weg erklären [312].

In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte nachgewiesen werden, dass nach Leberresektion vermehrt NO produziert wird [162, 329]. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie analog zur HO-1 die Expression der NOS-2 als induzierbare Isoenzymform der NOS im Verlauf der Leberregeneration untersucht. Im Gegensatz zur HO-1 konnte jedoch keine verstärkte Expression der NOS-2 in der Western Blot Analyse beobachtet werden. Die NOS-2 Proteinlevel blieben nach der Leberresektion auf dem Niveau nicht regenerierenden Lebergewebes.

Die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen dazu sind sehr kontrovers und bedürfen einer sorgfältigen Interpretation. Als kleinster gemeinsamer Nenner lässt sich festhalten, dass NO nach der Leberregeneration freigesetzt wird. Über den zugrunde liegenden Mechanismus, die genaue Quelle und Funktion des NO existieren jedoch verschiedene Vorstellungen. Als Quelle kommt neben der NOS-2 auch die endotheliale Isoenzymform NOS-3 in Frage. Von dieser nimmt man an, dass sie die größere Bedeutung bei der Reaktion auf Veränderungen der Hämodynamik hat [330], wie sie auch in der Leber nach partieller Hepatektomie beobachtet werden können.

Die NOS-3 reagiert über verschiedene Wege auf erhöhten Scherstress. Auch wenn sie im Gegensatz zur NOS-2 prinzipiell als konstitutiv exprimiert gilt, konnte eine bis zu 8-fach gesteigerte Expression der NOS-3-mRNA bei zunehmendem Scherstress beobachtet werden. Dies wird Ca^{2+} -abhängig durch K^+ -Kanalöffnung reguliert [331, 332]. Für die erhöhten NOS-3-mRNA-Spiegel sind transkriptionale wie posttranskriptionale Mechanismen verantwortlich, die neben dem Scherstress auch durch andere Faktoren, wie Zellwachstum oder HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, gesteuert werden können [333]. Daneben kann die NO-Produktion der NOS-3 ihrer Klassifikation als Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiges Enzym zufolge ebenfalls durch verschiedene Agonisten, die zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen, gesteigert werden [330]. Interessanterweise ist zwar auch bei erhöhtem Scherstress ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nachweisbar [334], der biphasische, bis zu 13-fache Anstieg der NO-Produktion nach Steigerung des Scherstress ist allerdings Ca^{2+} - und Calmodulin-unabhängig und wird vor allem durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase vermittelt [335-337].

Im Gegensatz zur NOS-3 wird die NO-Produktion der NOS-2 weniger durch posttranslationale Aktivierung des Proteins, sondern - ihrer Klassifikation als induzierbare Isoenzymform der NOS folgend - durch eine Erhöhung der Proteinexpression gesteigert [338]. In neueren Studien konnte neben verschiedenen Zytokinen und dem Bakterienwandbestandteil Lipopolysaccharid ebenfalls der Faktor Scherstress als potentieller Induktor der NOS-2 im Gefäßendothel identifiziert werden [339]. Als Vermittler dieser scherstress-bedingten Induktion spielt wiederum $\text{NF}\kappa\text{B}$ eine zentrale Rolle, dessen Bedeutung bereits für die NOS-2-Induktion in der regenerierenden Leber belegt werden konnte [161].

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die gesteigerte NO-Produktion nach partieller Hepatektomie zum einen durch transkriptionale sowie post-translationale Aktivierung der NOS-3 erklärbar ist. Zum anderen kann sie ihren Ursprung auch in der Zytokin- oder Scherstress-bedingten Induktion der NOS-2 haben. Welche Bedeutung CO und NO für die hepatische Mikrohämodynamik oder Leberregeneration haben, lässt sich allerdings aus deren Aktivierbarkeit nicht ablesen und soll daher gesondert unter 5.2.3 und 5.2.4 diskutiert werden.

5.2.2 Modulation der vasoaktiven Systeme HO-1 und NOS

Die Zielstellung der Experimente lag in der Charakterisierung der komplexen Interaktionen der vasoaktiven Gase CO und NO, synthetisiert durch HO-1 bzw. NOS, im Kontext der hepatischen Mikrozirkulation und Leberregeneration. Eine Untersuchung aller möglichen Konstellationen von reduzierter und gesteigerter CO- bzw. NO- Verfügbarkeit einschließlich der jeweiligen Versuchsgruppen zur Bestätigung der Ergebnisse mittels Substitution des vermindert produzierten Gases hätte allerdings den Rahmen dieses Projektes weit überschritten. Zur Bedeutung von NO im Verlauf der Leberregeneration liegt eine Reihe von Studien vor. Diese berücksichtigen jedoch nicht den Einfluss der CO-produzierenden HO-1, obwohl deren zentrale Rolle sowohl für die hepatische Mikrozirkulation [119] als auch für protektive Effekte in verschiedenen Leberschädigungsmodellen [118] belegt werden konnte. Daher konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die Auswirkungen einer gesteigerten CO-Synthese bei physiologischer oder reduzierter NO-Verfügbarkeit.

Die Induktion der HO-1 mittels CoPP-IX hatte vorrangig zum Ziel, die CO-Produktion zu steigern. Die erhöhte HO-1-Expression konnte bei Untersuchungen 48 h nach Hepatektomie sowohl mittels Western Blot Analysen des regenerierenden Lebergewebes, als auch durch immunhistochemischen Nachweis HO-1-positiver Zellen belegt werden. Gegenüber Versuchstieren ohne CoPP-IX-Behandlung stellte sich eine 13-fach höhere Proteinexpression bei 2,5-fach erhöhter Anzahl an HO-1-exprimierenden Zellen dar. Dieser beobachtete Effekt von CoPP-IX geht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen einher, die ebenfalls über eine anhaltende HO-1-Induktion von mehr als zehn Tagen nach einmaliger Gabe von CoPP-IX berichtet hatten [198, 199]. In der Vergangenheit kamen anorganische Zinn- und Cobalt-Verbindungen zur HO-1-Induktion zum Einsatz [340]. Später wurde ein erstaunlicher Effekt der gleichen Metalle in organischen Verbindungen bzw. als Chelat in Porphyrinen gebunden entdeckt [341]. Während anorganisch gebundenes Zinn die HO-1 induziert, ist es als Chelat gebunden ein wirkungsvoller Inhibitor der HO-1-Aktivität. Paradoxe Weise erzeugt Cobalt als Chelat gebunden eine vielfach höhere Steigerung der HO-1-Expression und damit einhergehend auch der HO-1-Aktivität [341, 342]. Dieser Effekt von CoPP-IX erreicht 24 – 48 h nach Verabreichung seine maximale Wirkung, hält danach jedoch unvermindert ca. drei bis fünf

Wochen an [341]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass über den gesamten Zeitraum des Versuches eine vielfach erhöhte CO-Verfügbarkeit gewährleistet war.

Da, wie eingehend geschildert, nicht eindeutig bekannt ist, ob NOS-2 und/oder NOS-3 an der NO-Produktion in der regenerierenden Leber beteiligt sind, wurde zur Verminderung der NO-Synthese der unselektive Inhibitor L-NAME eingesetzt. Der zur Überprüfung einer erfolgreichen NOS-Inhibition durchgeführte Nitrit/Nitrat-Assay konnte einen ca. 30%igen Rückgang der NO-Produktion nach L-NAME-Behandlung sichern. Der Mittelwertunterschied verfehlte allerdings mit $p = 0.067$ knapp ein statistisch signifikantes Niveau. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich der Zeitpunkt der Probengewinnung, da andere Arbeitsgruppen mit kürzeren Versuchsdauern einen deutlichen, statistisch signifikanten Rückgang der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Plasma L-NAME-behandelter Versuchstiere demonstrieren konnten [267, 343, 344]. Das L-Arginin Substratanalogon L-NAME, welches selbst eine Halbwertszeit von ca. 20 min aufweist, wird nach Aufnahme in den Blutkreislauf mit einer Verzögerung von ca. 30 min in seine aktive Form NG-Nitro-L-Arginin umgewandelt, welches eine Halbwertszeit von ca. 23 h besitzt [345]. NG-Nitro-L-Arginin vermittelt die reduzierte NO-Verfügbarkeit danach sowohl durch direkte Inhibition der NOS, als auch durch kompetitive Inhibition des Arginin-Transportes über die hepatozytäre Plasmamembran [346]. In einer Untersuchung zur hämodynamischen Aktivität von L-NAME durch CONNER et al. [347] mit einer 30-fach niedrigeren L-NAME Dosis konnten 3-6 h andauernde Verringerungen von Darm- und Leberdurchblutung erzielt werden. Daher ist davon auszugehen, dass im vorliegenden Versuchsaufbau eine hämodynamische Wirksamkeit von L-NAME zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie ebenso gegeben war, wie eine wirkungsvolle NOS-Blockade nach Leberresektion. Dies sollte durch die wiederholte Applikation von L-NAME direkt nach dem Eingriff sichergestellt sein, auch wenn 48 h nach der letzten Gabe des NOS-Inhibitors ein signifikanter Nachweis der Wirksamkeit auf metabolischer Ebene ausbleibt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Nitrit/Nitrat-Assays zeigte auch die 3-NT Western Blot Analyse bei Tieren mit L-NAME-Behandlung eine deutliche Reduktion nitrosylierter Tyrosinreste im regenerierenden Lebergewebe. Wiederum verfehlte der Vergleich aller Versuchsgruppen ein statistisch signifikantes Niveau, was wie im Falle des Nitrit/Nitrat-Assays wahrscheinlich auf das längere Interall nach der letzten L-NAME-Applikation zurückgeführt werden kann. Anderen Arbeitsgruppen war es bei kürzeren Versuchszeiträumen gelungen, eine signifikante Reduktion nitrosylierter Tyrosinreste nach

Gabe von L-NAME nachzuweisen [348]. Die Gabe des NO-Donors Molsidomin führte bei Tieren mit L-NAME-Behandlung zum Anstieg der nitrosylierten Proteine im Lebergewebe auf das Niveau der Versuchstiere ohne L-NAME-Applikation. Diese Ergebnisse lassen, wie bereits von SADRI et al. [349] und GUARINO et al. [350] beschrieben, den Schluss zu, dass die durch L-NAME induzierte NOS-Inhibition mit konsekutiv reduzierter NO-Verfügbarkeit durch die zusätzliche Gabe von Molsidomin kompensiert werden kann.

5.2.3 Einfluss des modulierten CO- und NO-Haushaltes auf die Mikrozirkulation der Leber vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie

Den hämodynamischen Veränderungen nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie wird eine entscheidene Rolle in der Steuerung der Leberregeneration zugesprochen [72, 302], weshalb mittels der vorliegenden Studie erstmals geklärt werden sollte, ob durch die gezielte Beeinflussung vasoaktiver Systeme im Vorfeld der Resektion die Leberdurchblutung soweit moduliert werden kann, dass sich dies auch auf die nachfolgende Regeneration auswirkt.

In der Vergangenheit belegte eine Vielzahl von Studien, dass kein uniformes Interaktionsmuster zwischen CO-produzierender HO und NO-produzierender NOS besteht, sondern dieses vielmehr abhängig vom jeweiligen Organ bzw. Gefäßabschnitt ist. So beobachteten ISHIKAWA et al. [351] in Untersuchungen der zerebralen Mikrozirkulation bei unbeeinflusster NO-Synthese eine vasokonstriktive Wirkung von CO sowie eine signifikante Zunahme der Gefäßdurchmesser nach HO-Inhibition. In den afferenten Arteriolen der Niere ließen sich hingegen bei physiologischer NOS-Aktivität keine Veränderungen der Gefäßdurchmesser nach HO-Inhibition feststellen, dafür aber eine Vasodilatation nach CO Applikation [352]. Im Folgenden soll nun zunächst diskutiert werden, welche Möglichkeiten zur Regulation und Interaktion der CO-produzierenden HO-1 und der NO-freisetzenden NOS prinzipiell zur Verfügung stehen, um danach die gewonnen Erkenntnisse zur Modulation der hepatischen Mikrozirkulation besser verstehen zu können.

Es ist bekannt, dass sowohl CO als auch NO in der Lage sind, die Guanylylzyklase zu aktivieren und dadurch die Synthese des vasodilatativ wirksamen cGMP auszulösen [275]. Auch wenn die Wirksamkeit von CO in Bezug auf die Guanylylzyklase umstritten ist, konnten MORITA et al. [353] in einer *in vitro* Studie demonstrieren, dass die durch

Hypoxie ausgelöste Vasodilatation durch die cGMP-Produktion glatter Gefäßmuskelzellen mediiert wird, welche nicht von der NO-, sondern der HO-1-gesteuerten CO-Synthese abhängig ist. Ebenso wurde unter septischen Bedingungen eine HO-1-bedingte gesteigerte cGMP-Synthese in der Gefäßwand mit nachfolgender Relaxation der Gefäßmuskelzellen nachgewiesen [276]. Demgegenüber stehen die Erkenntnisse von IMAI et al. [184], welche in transgenen Mäusen mit HO-1-Überexpression in glatten Gefäßmuskelzellen einen Anstieg des Blutdruckes beschrieben, welcher nicht durch NO-Donore sondern nur durch einen HO-1-Inhibitor gesenkt werden konnte. Einhergehend mit den *in vitro* Versuchen von INGI et al. [354] wurde auf eine Desensitivierung der Guanylylzyklase gegenüber NO durch hohe, lokale CO-Konzentrationen mit nachfolgend reduzierter cGMP-Synthese und konsekutiv erhöhtem Vasotonus geschlossen. Die resultierende cGMP-Konzentration ist somit abhängig vom biologischen Gewebe sowie der jeweiligen pathophysiologischen Situation.

Im Falle der Leberregeneration war zwar kein signifikanter Anstieg der cGMP-Konzentration im regenerierenden Lebergewebe zu ermitteln [312] und auch die Modulation der HO-1 und NOS in der vorliegenden Studie konnte die cGMP-Synthese nach Hepatektomie nicht wesentlich beeinflussen. Trotzdem kann eine Regulierung des Leberblutflusses durch eine intrahepatische cGMP-Synthese nicht vollständig ausgeschlossen werden. KOIDE et al. verwiesen in diesem Fall darauf, dass der cGMP-Gehalt der Leber während der Regeneration wohl unverändert bleibt, sich aber die intrazelluläre Verteilung von cGMP deutlich ändert und es regional zu einem 2- bis 3fachen Aktivitätsanstieg der Guanylylzyklase kommen kann [355]. Somit scheint cGMP doch eine bedeutende Rolle im Verlauf der Leberregeneration zuzukommen. Es bleibt jedoch weiterhin ungeklärt, welchen Beitrag diese intrazelluläre Umverteilung der Guanylylzyklaseaktivität zur Steuerung der Leberperfusion leistet.

Eine weitere Möglichkeit zur Steuerung der Gefäßweite durch CO und NO stellt die Beeinflussung von Calcium-aktivierten K^+ -Kanälen dar, deren Aktivierung zur Hyperpolarisation von glatten Gefäßmuskelzellen mit nachfolgender Vasodilatation führt [356, 357]. Dabei unterscheiden sich jedoch sowohl Mechanismen als auch Ausmaß der Aktivierbarkeit der Ionenkanäle durch CO bzw. NO, da die Moleküle an verschiedene Untereinheiten des Kanalproteins andocken [358]. Somit wird auch die Beobachtung von WANG et WU [185] erklärbar, dass in diesem Fall NO ab einer kritischen Konzentration die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle verhindert. Eine praktische Konsequenz dieser Interaktion konnte für die Leberdurchblutung bisher nicht belegt werden, auch wenn

die Bedeutung der CO-medierte Vasodilatation über eine K^+ -Kanal-Aktivierung bereits für mesenteriale Gefäße *in vitro* demonstriert wurde [359].

Daneben wird für CO auch die Möglichkeit diskutiert, dass eine zusätzliche vasorelaxierende Wirkung auf der Inhibition von Cytochrom P450 beruhen könnte [360]. Hierdurch würden vermindert vasokonstriktive Metabolite des Arachidonsäure-Stoffwechsels freigesetzt werden, deren Wirkungen auf das Gefäßsystem von ROMAN 2002 [361] beschrieben wurde. Die Effizienz dieses Mechanismus konnte allerdings nur für den Ductus arteriosus gesichert werden, während er in anderen Gefäßen gegenüber der cGMP-Synthese und Aktivierung von K^+ -Kanälen nur einen geringen Stellenwert zu haben scheint [115]. Demgegenüber steht die differenzierte Betrachtung von Endothelin-1, welches ebenfalls von Cytochrom P450 synthetisiert wird. Unabhängig von einer möglichen Cytochrom P450-Inhibition waren sowohl CO als auch NO fähig, die Freisetzung des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 zu vermindern [362]. Dies beschränkte sich jedoch nicht nur auf den Ductus arteriosus, da STANFORD et al. [363] ebenso nachweisen konnten, dass durch CO-Applikation die Endothelin-1-Freisetzung in den glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie reduziert wird. Diese Erkenntnis ist von besonderer Bedeutung für die Analyse der modulierten hepatischen Mikrozirkulation, da Endothelin-1 eine zentrale Rolle in der Regulation aller Gefäßabschnitte der Leber zugeschrieben wird [364]. Zudem ließ sich neben der Freisetzung von endogenem Endothelin-1 auch die vasokonstriktive Wirkung von exogen zugeführtem Endothelin-1 auf Lebersinusoide durch CO reduzieren [365].

Die Perfusion der Leber ist einer heterogenen Steuerung durch CO und NO unterworfen. Während der Gefäßtonus der Leberarterie vor allem durch NO aufrechterhalten wird, unterliegt der Tonus der venösen Gefäße sowie der Lebersinusoide der Kontrolle von CO [119, 123]. Einen vereinigenden Erklärungsansatz bei der Interpretation dieser diffizilen Wirkungsmechanismen von CO und NO versucht WANG zu geben [115]. Er weist darauf hin, dass vor allem die Verfügbarkeit von Produktions- und Rezeptorsystemen entscheidend ist. Wenn in einem bestimmten Gefäßabschnitt deutlich mehr CO-produzierende HO exprimiert wird und nur wenig NO-produzierende NOS, so kann eine Inhibition der NO-Synthese nur einen geringen Einfluss auf den Gefäßtonus haben und vice versa. Ist die Vasotonuskontrolle von der Endothelinsynthese abhängig, hat CO über die Inhibition des Endothelin-1-produzierenden CYP450-Systems sowie über die reduzierte ET-1-Rezeptorempfindlichkeit die Möglichkeit, vasodilatativ zu wirken. Genauso verhält es sich möglicherweise mit der Guanylylzyklase und den Ca^{2+} -

abhängigen K⁺-Kanälen. Überwiegt die cGMP-vermittelte Vasodilatation gegenüber der Öffnung von K⁺-Kanälen, so kann, wie IMAI [184] demonstriert hat, durch die Überproduktion von CO mit nachfolgender Desensitivierung der Guanylylzyklase für NO auch eine Blutdruckerhöhung im Körperkreislauf resultieren. Umgekehrt kann die CO-produzierende HO eine größere Bedeutung erhalten, wenn - wie im Fall der portalvenösen Vasotonuskontrolle - dieses Gleichgewicht zugunsten der K⁺-Kanäle verlagert wird.

Hierbei handelt es sich jedoch um vereinfachte Modellvorstellungen, da die Interaktionen *in vivo* um ein Vielfaches komplexer sind. So müssten auch die synthetisierenden Enzyme betrachtet werden, die sich ebenfalls gegenseitig beeinflussen können. Denn während die NOS über AP-1 und cGMP die HO-1 induzieren kann, ist die HO-1 ihrerseits in der Lage, die Produktion von NO zu vermindern [96, 182, 186]. Neben der Konkurrenz um NADPH als Elektronendonator benötigt die NOS auch Häm als prosthetische Gruppe, welche bei erhöhter HO-Aktivität schneller degradiert wird [366, 367]. Des Weiteren ist CO in der Lage, sowohl die NOS-Aktivität direkt zu reduzieren als auch die Expression der NOS-2 zu inhibieren [366, 368]. Diese Betrachtung ist allerdings in der vorliegenden Studie von untergeordneter Bedeutung, da in den einzelnen Versuchsgruppen die gegenseitigen Beeinflussungen durch Gabe von L-NAME bzw. CoPP-IX überdeckt wurden.

Bei der Analyse der aktuell erhobenen Daten konnte festgestellt werden, dass in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LI et al. [369], welche die hepatische Makrohämodynamik eingehend studiert haben, eine alleinige NOS-Inhibition zu keiner Veränderung der portalvenösen Hämodynamik führt. Auch in einem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber verursachte die NOS-Inhibition keine Veränderung des hepatischen Gefäßwiderstandes [119], weshalb NO zumindest in der physiologischen Makro- und Mikrohämodynamik der Leber eine geringere Rolle zu spielen scheint. Allerdings bewirkte in der vorliegenden Studie die durch HO-1-Induktion gesteigerte Verfügbarkeit von CO im Gegensatz zu den Beobachtungen von SUEMATSU et al. [119] und WAKABAYASHI et al. [365] in der isoliert perfundierten Rattenleber keine weitere Verminderung des hepatischen Gefäßwiderstandes. Neben den unterschiedlichen Versuchstierspezies müssen auch die verwendeten *ex vivo* Modelle kritisch betrachtet werden. Hierbei wird die Leber durch Albumin- und Hämoglobin-freie Lösungen perfundiert und dies in der Regel allein durch die kanülierte Portalvene. Dadurch werden Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation erschwert, da somit Interaktionen von CO und NO

mit verschiedenen Hämoproteinen entfallen. Außerdem hat die duale Perfusion der Leber durch Portalvene und Leberarterie, welche über prä-sinusoidale intrahepatische Shunts verbunden sind, einen großen Stellenwert bei der Aufrechterhaltung physiologischer Flussverhältnisse [370].

Signifikant gesteigerte Blutvolumenflüsse sind in der vorliegenden Studie interessanterweise nur bei HO-1-überexprimierenden Tieren mit gleichzeitig blockierter NO-Synthese nachweisbar. Dabei beruht diese Steigerung nach genauerer Analyse der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter sowohl auf der erhöhten Blutzellgeschwindigkeit als auch auf dem tendenziell größeren Durchmesser der untersuchten Gefäße. Ebenfalls liegen die Scherstresswerte in diesen Tieren deutlich, wenn auch nicht signifikant, über den Werten der Tiere ohne die gleichzeitige Modulation von HO-1 und NOS. Ursache für die geringeren Unterschiede im Vergleich zu den Blutvolumenflusswerten ist die stärkere Berücksichtigung des Durchmessers bei der Berechnung des Scherstress. Dieser spiegelt die Einwirkung der Kraft des Blutstromes auf die Oberfläche der Gefäßwand wider, welche bei höheren Durchmessern entsprechend vergrößert ist und den Scherstress dadurch verringert. Da die Tiere mit gleichzeitiger HO-1-Induktion und NOS-Inhibition tendenziell höhere Gefäßdurchmesser aufweisen, wird die Auswirkung des stark erhöhten Blutvolumenflusses auf den Scherstress teilweise kompensiert.

Die gesteigerte CO-Produktion nach alleiniger HO-1-Induktion erwies sich als ineffektiv, die hepatische Mikrohämodynamik zu modulieren. Erst durch die zusätzlich reduzierte NO-Verfügbarkeit war eine effektive Modulation mikrozirkulatorischer Parameter möglich. Dies legt den Schluss nahe, dass physiologisch vorkommende NO-Mengen die Wirkung einer erhöhten CO-Verfügbarkeit aufheben können. Diese Hypothese konnte in den weiterführenden Versuchen bestätigt werden, da die pharmakologische NO-Substitution mittels Molsidomin den Effekt der durch L-NAME vermittelten NOS-Inhibition sowohl auf den NO-Haushalt als auch auf die Mikrozirkulation der Leber aufheben konnte.

Diese komplexe Interaktion der beiden gasförmigen Transmitter CO und NO ist für das *in vivo* Modell der Lebermikrozirkulation noch nicht beschrieben worden, da bisher die beiden Systeme meist einzeln betrachtet wurden. Somit liegen auch keine konkreten Erkenntnisse darüber vor, warum der Blutvolumenfluss bei HO-1-überexprimierenden Tieren mit zusätzlicher NOS-Blockade gegenüber den anderen Versuchsgruppen ansteigt. Verbindet man die Kenntnisse über mögliche vasoregulative Mechanismen von CO und NO mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppen, die diese Systeme im Zusammenhang mit

der hepatischen Makro- und Mikrohämodynamik einzeln untersucht haben [119, 123, 369] so lassen sich unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten folgende Hypothesen daraus ableiten:

- da der portalvenöse Blutzufuss aus dem Splanchnikusgebiet den überwiegenden Anteil der Leberperfusion ausmacht, rekrutiert sich der erhöhte Blutvolumenfluss in der Leber nach HO-1-Induktion aus einem gesteigerten Blutvolumenfluss im Splanchnikusgebiet,
- die NOS-Blockade führt zum Anstieg des arteriellen Blutdrucks, weswegen auch der Perfusionsdruck im Splanchnikusgebiet steigt,
- die Absenkung des Gefäßtonus im portalvenösen Einzugsbereich durch eine höhere CO-Verfügbarkeit nach HO-1-Induktion führt dort zu einem höheren Blutvolumenfluss bei gleichzeitiger NOS-Blockade,
- die Beobachtung, dass die alleinige HO-1-Induktion nicht zu einem höheren Blutvolumenstrom im Vergleich zur Kontrollgruppe führte, weist auf die blockierende Wirkung der physiologischen NO-Synthese bei CO-vermittelter Modulation des Gefäßtonus im Splanchnikusgebiet hin,
- eine effektivere vasorelaxierende Wirkung von CO bei gleichzeitig reduzierter NO-Verfügbarkeit ist die Folge einer in den entsprechenden Gefäßabschnitten überwiegenden Kontrolle des Vasotonus durch Systeme, auf die CO einen größeren Einfluss hat als NO,
- neben der Reduktion CYP450-abhängiger Vasokonstriktoren kommen dafür vor allem Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle in Frage, deren durch CO erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit bei NO-Einwirkung wieder reduziert wird.

5.2.4 Einfluss des modulierten CO- und NO-Haushaltes auf die Leberregeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie

Bei der Untersuchung des Einflusses von CO und NO auf die hepatische Mikrozirkulation konnte eindeutig demonstriert werden, dass eine Verschiebung der physiologischen Balance zugunsten von CO bei gleichzeitiger NOS-Blockade zu einem signifikant höheren Blutvolumenfluss und erhöhtem Scherstress in den Gefäßen der Leber führt. Da hämodynamische Faktoren einen maßgeblichen Einfluss auf die

Leberregeneration haben, wurde in der vorliegenden Studie die Proliferation des nach partieller Hepatektomie verbleibenden Lebergewebes unter diesem Gesichtspunkt analysiert.

Übereinstimmend zeigten die immunhistochemischen Analysen der PCNA-Expression und der BrdU-Inkorporation eine signifikant akzelerierte Proliferation in den Versuchstieren mit kombinierter CoPP-IX- und L-NAME-Behandlung. Die gleiche Intervention hatte auch eine deutliche Steigerung der Leberdurchblutung im Vorfeld der Leberresektion bewirkt (siehe 5.2.3). Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, dass in der Maus aufgrund der geringen Größe der nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie verbleibenden Leberlappen eine direkt an die Resektion anschließende Intravitalmikroskopie technisch nicht durchführbar ist. Allerdings bestätigen die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe von einer vergleichbaren Studie an Ratten die Annahme, dass die Auswirkungen von HO-1- und NOS-Modulation, welche in dieser Untersuchung vor der Hepatektomie demonstriert wurden, auch nach der Hepatektomie bestehen bleiben [371]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die unter kombinierter HO-1-Induktion und NOS-Blockade deutlich erhöhten Blutvolumenflusswerte vor $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie auch in der frühen Regenerationsphase zu einem zusätzlich akzeleriertem Scherstress führen.

Damit einhergehend stellen sich die Ergebnisse der pharmakologischen NO-Substitution dar, welche verbunden mit dem Rückgang von Blutvolumenfluss und Scherstress auch eine Reduktion der zellulären Proliferationsparameter auf Kontrollniveau aufweisen. Wie bereits 1997 von SATO et al. [302] nachgewiesen wurde, repräsentiert der erhöhte Blutvolumenfluss in Verbindung mit dem verstärkten Scherstress nach partieller Hepatektomie einen wesentlichen Trigger für die anschließende Proliferation der Hepatozyten. Bei Versuchstieren mit artifiziell vermindertem Leberblutfluss durch einen porto-cavalen Shunt war die Regeneration nach dem Eingriff hingegen deutlich reduziert.

So lässt sich folgern, dass die in der vorliegenden Studie erzielte Modulation der hepatischen Mikrozirkulation durch kombinierte CoPP-IX- und L-NAME-Behandlung mit dem Ergebnis eines gesteigerten Blutvolumenflusses zu einer Akzeleration der hepatozytären Proliferation führt. Physiologische NO-Mengen sind allerdings ausreichend, die Wirkung einer durch HO-1-Induktion erhöhten CO-Verfügbarkeit aufzuheben [372]. Diese Form der experimentellen Beeinflussung der Leberregeneration stellt ein Novum dar, da bisher nur die Verabreichung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren als erfolgsversprechende Ansätze galten, die Leberregeneration *in vivo* zu steigern [373, 374]. Allein chirurgische Modelle, welche die Flussbedingungen nach Hepatektomie durch

selektive Ligation mehrerer Portalvenenäste imitierten, konnten einen direkten Beweis für eine fluss-bedingte, gesteigerte Proliferation erbringen [304].

Allerdings sollten direkt auf zellulärer Ebene auftretende Effekte der Gase CO und NO in der Leber nicht vollständig vernachlässigt werden. Für CO wie für NO sind vor allem anti-apoptotische Wirkungen nach Leberschädigung durch Endotoxine, Zytokine oder Ischämie/Reperfusion beschrieben worden [198, 375, 376]. Dass dies auch für die Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie von Bedeutung ist, wurde 1998 von RAI et al. demonstriert, die eine reduzierte Proliferation der Hepatozyten bei gleichzeitig erhöhter Apoptoserate in NOS-2-defizienten Mäusen beschrieben [169].

Hintergrund der hepatozytären Apoptose scheint in diesem Fall das Einwirken des Zytokins TNF- α zu sein. Dieses wird zwar für die Regeneration der Leber benötigt, physiologischerweise kann dessen pro-apoptotische Wirkung jedoch durch die NO-medierte Inaktivierung von Effektor-Caspasen kompensiert werden [169, 377]. Ebenso konnten ZEINI et al. [378] nachweisen, dass die zusätzliche Cyclooxygenase-2-Hemmung bei NOS-2-defizienten Mäusen mit einer hohen Letalität nach Leberteileresektion verbunden ist. Die Ursache dafür, dass in der vorliegenden Studie unter L-NAME-vermittelter NOS-Inhibition keine derartig deletären Auswirkungen auf die Leberregeneration auftraten, liegt in der inkompletten Blockade der Enzymfunktion. Anders als beim vollständigen Gen-Knockout in NOS-2 defizienten Mäusen kommt es hierbei nur zu einer Reduktion der NOS-Aktivität, die sich im 30%igen Rückgang der NO-Metabolite im Nitrit/Nitrat-Assay und in der 3-NT Western Blot Analyse widerspiegelt. Darüber hinaus weisen aber ZEINI et al. [172] auch darauf hin, dass die anti-apoptotische Wirkung von NO mit einer Proliferationsverzögerung verbunden ist. Darauf hatten bereits die Versuche von OBOLENSKAYA et al. [329] hingedeutet, da in regenerierenden Hepatozyten die Aktivität von DNA-Synthese und NO-Produktion invers miteinander korrelierten.

Für die Beteiligung von NO an der Leberregeneration gibt es somit ausreichende Belege [308, 379] und auch die Vorstellung, dass NO aufgrund des nach Hepatektomie erhöhten Scherstress vermehrt produziert wird, ist weitestgehend gesichert [380]. Strittig ist aber weiterhin, welche Isoenzymform den größeren Anteil an der Triggerung der initialen Schritte der Regenerationskaskade hat. 2001 konnten SCHOEN et LAUTT nachweisen, dass die Behandlung mit dem spezifischen NOS-2-Inhibitor Aminoguanidin zu keinem Rückgang der c-fos-mRNA-Expression nach partieller Hepatektomie führt.

Deswegen spricht diese Arbeitsgruppe eher der endothelialen Isoenzymform NOS-3 die Vermittlerrolle zwischen Scherstress und Regenerationsinduktion zu [188]. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Studie erhobenen Daten beschreibt diese Arbeitsgruppe auch eine deutliche Regenerationsverzögerung unter L-NAME-vermittelter NOS-Blockade sowie eine verstärkte hepatozytäre Proliferation nach zusätzlicher Behandlung mit einem NO-Donor [160]. Einschränkend muss bei der Interpretation dieser Ergebnisse im Vergleich zur vorliegenden Studie jedoch angeführt werden, dass sich die Beurteilung der Regeneration bei der Arbeitsgruppe von SCHOEN und LAUTT nur auf die ersten, frühen Ereignisse nach Hepatektomie beschränkt, welche mittels *c-fos*-mRNA-RT-PCR oder *proliferative factor assay* analysiert wurden. Während für *c-fos* als *immediate early gene* das Gewebe 15 min nach dem Eingriff entnommen wird, ist für die Analyse proliferationsstimulierender Mediatoren im *proliferative factor assay* die Blutentnahme vier Stunden nach Resektion notwendig [188, 380]. Somit bezieht sich die Aussage dieser Studien mehr auf das Ausmaß der initialen Triggerung der Leberregeneration. Die Beurteilung des Regenerationsverlaufes wird größtenteils vernachlässigt und es findet sich lediglich in wenigen dieser Arbeiten der Hinweis auf Gewichtsunterschiede der Leberregenerate nach mehreren Tagen. Gegenüber der Analyse von PCNA und BrdU stellt dies jedoch einen äußerst unzuverlässigen Parameter der Regeneration dar [278].

So lässt sich folgern, dass diese Ergebnisse nicht zwingend im Widerspruch zu den aktuell erhobenen Daten stehen, da bisher keine eindeutigen Hinweise für einen direkten Zusammenhang zwischen *c-fos* Expression 15 min und beispielsweise PCNA-Expression 48 h nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie vorliegen. Die *c-fos*-RT-PCR, welche 24 h nach Vorbehandlung und entsprechender Modulation der hepatischen Mikrozirkulation durchgeführt wurde, zeigte einen signifikant geringeren *c-fos*-mRNA-Gehalt bei den Tieren mit zusätzlicher NO-Substitution mittels Molsidomin. Dieser ging zwar auch mit einer signifikant reduzierten PCNA-Expression einher, allerdings spiegelte sich dies nicht in entsprechenden Veränderungen der BrdU-Inkorporation wider. Somit bedarf es weiterer Untersuchungen, um eindeutig zu klären, inwieweit die frühzeitig messbaren Ereignisse nach Leberresektion mit dem Verlauf der Regeneration korrelieren.

Für die HO-1 und CO sind im Gegensatz zu NOS-2 und NO bisher keine Studien zum Effekt eines vollständigen Gen-Knockouts auf die Leberregeneration durchgeführt worden. Dies liegt vor allem daran, dass entsprechende HO-1-defiziente Versuchstiere von Geburt an unter Wachstumsstörungen, Anämie, Hepatosplenomegalie, Eisenüberladung und einer gesteigerten Vulnerabilität gegenüber äusseren Stressoren

leiden [113]. Dadurch wären die Ergebnisse nach Leberresektion durch eine hohe Letalität geprägt und hätten nur wenig Aussagekraft über die Rolle der HO-1 während der Regeneration. Insofern scheinen eher Modelle der selektiven pharmakologischen HO-1-Inhibition ohne Auswirkungen auf die Guanylylzyklase- und NOS-Aktivität [381, 382] oder die Nutzung der RNA-Interferenz-Technik zum temporären HO-1-Knockdown [383] erfolversprechend, um diese Fragestellung bearbeiten zu können.

Auf der anderen Seite konnten GLANEMANN et al. [384] aufschlussreiche Ergebnisse zum Einfluss der HO-1-Überexpression bei Untersuchungen der Regeneration ischämisch geschädigter Lebern gewinnen. Hier führte die durch CoPP-IX vermittelte HO-1-Induktion neben einer schnelleren post-operativen Erholung vor allem zu einer initial gesteigerten Proliferation des verbleibenden Lebergewebes. Die zugrunde liegende pathophysiologische Situation unterscheidet sich jedoch von den Bedingungen einer regulären $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie. Allerdings weisen die erhobenen Daten auf einen wichtigen Punkt im Verlauf der Leberregeneration hin, den auch RAI et al. [169] für die Rolle der NOS-2 deutlich gemacht haben: die Einwirkung von Zytokinen, wie TNF- α mit partiell proapoptotischer Wirkung zu Beginn der Regenerationskaskade, welche im Rahmen des Ischämie/Reperusionsmodells von GLANEMANN et al. [384] zusätzlich verstärkt wurde [385, 386], macht für eine optimale Regeneration eine Kompensation durch anti-apoptotische Systeme notwendig.

Interessanterweise ist es neben dem bereits bekannten NO auch CO, synthetisiert durch die HO-1, welches die TNF- α -induzierte Apoptose in der Leber wie auch in anderen Geweben [387-389] über den p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Weg inhibieren kann [375]. Neben dieser anti-apoptotischen Wirkung des HO-1/CO-Systems liegen jedoch keine Erkenntnisse zu einem direkten proliferationsstimulierenden Effekt von CO auf zellulärer Ebene vor. Im Fokus der Forschung stehen eher die anti-proliferativen Eigenschaften von CO vermittelt durch p38 MAPK und Caveolin-1 [390], die vor allem für die glatten Gefäßmuskelzellen nach Gefäßläsionen von Bedeutung sind [391]. In welchem Umfang eine Aktivierung der p38 MAPK während der Leberregeneration zu Wachstumsstimulation oder Wachstumsverzögerung beitragen kann, wird derzeit jedoch kontrovers diskutiert [392, 393].

Neben den zum Teil noch unklaren direkten Auswirkungen der Modulation des CO- und NO-Haushaltes auf hepatozytärer Ebene bleibt festzuhalten, dass diese schlussendlich zu einer akzelerierten Regeneration des verbleibenden Lebergewebes führt, ohne dass es zu klinischen Einschränkungen der Versuchstiere kam. MINUK [394]

hat in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass Steigerungen der hepatozytären Proliferation kritisch zu betrachten seien, da nach Hepatektomie die Prozesse der Regeneration und die metabolischen Funktionen parallel ablaufen müssen. Da beide auf eine ausreichende Energieversorgung angewiesen sind, steigt unter anderem bei ausgedehnten Resektionen die Gefahr, dass die Proliferation nur eingeschränkt abläuft und es zum metabolischen Leberversagen kommt [394]. Aus diesem Grund ist die Verfügbarkeit der energiereichen Nukleotid-Triphosphate, vor allem von Adenosin-Triphosphat, von herausragender Bedeutung. Neben allen unklaren Punkten der Einflussnahme einer HO-1-Überexpression auf die Leberregeneration sollte in diesem Zusammenhang hervorgehoben werden, dass die HO-1-vermittelte CO-Produktion nachweislich die Adenosin-Triphosphat-Synthese in Hepatozyten stimulieren kann [395]. Dadurch wird mit Hilfe des erhöhten hepatozellulären Energiehaushaltes auch die Möglichkeit gegeben, eine gesteigerte Regeneration der Leber zu realisieren.

5.3 Schlussfolgerung

Die Regeneration der Leber nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie ist ein präzise regulierter Prozess, dessen Verlauf durch das ausgewogene Zusammenspiel proliferationsstimulierender und proliferationshemmender Faktoren gesteuert wird. Es bedarf jedoch eines Startsignals, welches die Information über das fehlende Lebergewebe beinhaltet, sowie eines geeigneten Sensors, der diese Information in eine zelluläre Antwort umsetzt, bevor die komplexe Regenerationskaskade in Gang gesetzt werden kann. Da bei konstanter Durchblutung des portalvenösen Einzugsbietes das verbleibende Lebergewebe nach partieller Hepatektomie entsprechend stärker perfundiert wird, kann diese Kommunikation durch die Interaktion von Blutvolumenfluss/Scherstress auf der einen und Gefäßendothel bzw. glatten Gefäßmuskelzellen auf der anderen Seite realisiert werden. Die vasoaktiven Systeme HO-1 und NOS nehmen in diesem Zusammenhang eine zentrale Position in der Signaltransduktion mit ihren gasförmigen Mediatoren CO und NO ein. Diese fungieren jedoch nicht nur als simple Effektoren auf zellulärer Ebene, sondern sind ihrerseits auch in der Lage, die prä- und intrahepatische Perfusion zu regulieren und dadurch wiederum die Parameter Blutvolumenfluss und Scherstress zu beeinflussen.

Basierend auf diesen Regulationsmöglichkeiten ist es bereits vor der Leberresektion möglich, durch Verschiebung der physiologischen Balance zwischen CO und NO zugunsten von CO, die Leberdurchblutung zu intensivieren, was mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte. Dies allein führt, gemessen an der c-fos-Expression, noch zu keiner proliferativen Aktivität in der Leber. Nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie resultiert daraus jedoch eine akzelerierte hepatozytäre Proliferation, wie es die Analysen der PCNA-Expression und BrdU-Inkorporation gleichermaßen demonstrieren. Hierzu ist eine zusätzliche NOS-Blockade notwendig, da die vorhandenen NO-Mengen physiologischerweise den Einfluss einer erhöhten CO-Verfügbarkeit auf Leberperfusion und Leberregeneration aufheben können. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass eine Reduktion der NO-Verfügbarkeit durch die unselektive Inhibition aller NOS-Isoenzymformen mittels L-NAME realisiert wurde. Dies führte jedoch nicht zu einer vollständigen Depletion des NO-Haushaltes, welche sich vorangehenden Studien zufolge deletär auf die Leberregeneration auswirkt.

Die Untersuchungen führen somit zu der zentralen Erkenntnis, dass die durch gleichzeitige HO-1-Induktion und NOS-Inhibition artifiziell gesteigerte mikrovaskuläre Perfusion der Leber zu einer beschleunigten hepatozytären Proliferation nach Leberteilresektion führt. Allerdings reichen die Daten der vorliegenden Studie nicht aus, um die zugrunde liegenden Mechanismen auf vaskulärer und zellulärer Ebene zweifelsfrei zu identifizieren. Da der die Leber durchfließende Blutvolumenstrom hauptsächlich aus dem venösen Blutzufuss der mesenterialen Organe resultiert, ist bei gleichem oder gar durch NOS-Blockade gesteigertem arteriellem Perfusionsdruck eine Absenkung des Gefäßwiderstandes im portalvenösen Einzugsgebiet die naheliegende Ursache eines zunehmenden Blutvolumenstroms. Die Interaktion der beiden Gase an Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen stellt dabei möglicherweise das Korrelat der physiologisch auftretenden, NO-vermittelten Blockierung einer verstärkten CO Wirkung dar. Hier hat NO die Möglichkeit, eine maximale Aktivierung durch CO zu begrenzen und kann somit theoretisch eine übermäßige venöse Dilatation im Splanchnikusgebiet verhindern. Für das Gesamtverständnis der akzelerierten Proliferation ist in diesem Kontext vor allem die Erkenntnis von Bedeutung, dass der proliferationsstimulierende Effekt einer gesteigerten Leberperfusion erst durch die ausreichende Energiebereitstellung nach HO-1-Induktion ohne Einschränkungen realisiert werden kann.

5.4. *Klinische Perspektiven*

Wie zu Beginn der Diskussion bereits angemerkt wurde, sollte das Design einer Studie problembezogen gewählt werden, um die entsprechende Fragestellung suffizient bearbeiten zu können [206]. So war es mithilfe der vorliegenden Studie möglich, Informationen darüber zu erhalten, inwieweit sich Modulationen des CO- und NO-Haushaltes auf die hepatische Mikrozirkulation und die Leberregeneration auswirken. Dabei konnte geschlussfolgert werden, dass die alleinige Reduktion der NO- bzw. Steigerung der CO-Verfügbarkeit keinen signifikanten Einfluss auf diese Vorgänge hat, wohingegen die Kombination beider Interventionen zu einer Akzeleration der hepatozytären Proliferation als Folge erhöhter Blutvolumenfluss- und Scherstresswerte führt.

Diese Ergebnisse ermöglichen somit ein besseres Verständnis der komplexen Interaktionen von CO und NO während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie, wodurch sich Möglichkeiten einer klinischen Verwendung der Daten ergeben. Es sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass das verwendete Modell herausragende Einblicke in die Vorgänge der physiologischen Regeneration der gesunden Leber gewähren kann. Im klinischen Alltag überwiegen jedoch die Fälle der Leberregeneration nach akuter oder chronischer Einwirkung von toxischen, viralen oder immunologischen Schädigungsmechanismen [396]. Dies erschwert die Anwendung der Erkenntnisse aus dem Modell der partiellen Hepatektomie, da nach akuter Einwirkung derartiger Noxen die Schädigung über das gesamte Lebergewebe mitsamt der nicht-parenchymalen Zellen sowie der extrazellulären Matrix verteilt ist. Im Falle einer chronischen Exposition mit konsekutiver Leberzirrhose wird zudem noch die hepatische Gefäßarchitektur alteriert, was eine physiologisch ablaufende Leberregeneration zusätzlich behindert [397].

Auch wenn die Erkenntnisse über mögliche CO-NO-Interaktionen beim Verständnis der pathologischen Regeneration mit möglicherweise gestörtem CO- oder NO-Haushalt hilfreich sein können, sind sie doch relevanter für die physiologische Leberregeneration. Diese findet im klinischen Alltag meist nach Tumor-bedingter Leberteileresektion oder Transplantation eines *small-for-size*-Lebertransplantates statt. Dort stößt die moderne Medizin, trotz des verbesserten *Outcome* der Patienten nach Leberresektion im letzten Jahrzehnt [398], vor allem bei immer ausgedehnteren Resektionen an ihre Grenzen [399]. Aus diesem Grund besteht weiterhin der Bedarf, die Mechanismen zu verstehen, die es

ermöglichen, das regenerative Potenzial der Leber vollständig auszunutzen [31]. Ebenso ist es bei der Transplantation einer Leber-Lebend-Spende von Bedeutung, auch kleinere Transplantate verwenden zu können, ohne dass die nachfolgende Leberregeneration durch die Entwicklung eines *small-for-size*-Syndroms beeinträchtigt wird [400]. Hierbei gibt es eindeutige Hinweise dafür, dass in beiden Fällen Störungen der hepatischen Mikrozirkulation und damit verbunden auch die vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS eine zentrale Rolle spielen [401, 402]. Deswegen gilt es, die Imbalancen dieser Enzymsysteme und der Mikrozirkulation präzise zu analysieren, um mit den gewonnenen Erkenntnissen über mögliche Interaktionen ein optimales Ergebnis der Leberregeneration bei gleichzeitig minimalem Risiko eines post-operativen Leberversagens zu erreichen.

Der Schritt zur klinischen Erprobung erfordert nach erfolgreichen Experimenten im Großtiermodell jedoch noch die Klärung der Frage, ob die Modulation der vasoaktiven Systeme mittels CoPP-IX und L-NAME beim Menschen ebenfalls durchgeführt werden kann. Die HO-1-induzierende Wirkung von CoPP-IX ist zwar für humane Leberzellen bereits *in vitro* nachgewiesen worden [403, 404]. Allerdings ist es notwendig, diese Protoporphyrin-Verbindung vor einem humanen *in vivo* Einsatz noch hinsichtlich einer eventuellen Photosensitivierung [405] und anderen systemischen Nebenwirkungen zu analysieren. Eine vielversprechende Alternative für die Zukunft stellen auch CO-freisetzende Verbindungen dar, welche eine organspezifische Beeinflussung des CO-Haushaltes zulassen und dadurch geringere unerwünschte Wirkungen aufweisen [406]. Daneben sind aber auch die Nutzung der simplen CO-Inhalation [407] und in weiterer Zukunft möglicherweise der Einsatz des vektorbasierten Gentransfers mit organspezifischen Promotoren in der Diskussion [408-410]. Ebenso konnte L-NAME in humanen *ex vivo* Modellen [411] und als Inhalations-Aerosol in einem *in vivo* Modell [412] erfolgreich eingesetzt werden. Da aber aufgrund des unspezifischen Wirkmechanismus von L-NAME mit unerwünschten systemischen Nebenwirkungen zu rechnen ist, sollten auch hier möglichst selektive Substanzen verwendet werden, deren Wirkung sich, ähnlich dem spezifischen NO-Donor NCX-1000 [413], auf die Leber beschränkt.

Somit stehen durchaus Ansätze zur Modulation des CO- und NO-Haushaltes zur Verfügung, die neben anderen adjuvanten Therapien nach Leberresektionen und -transplantationen eine Verbesserung der hepatozytären Proliferation durch gezielte Beeinflussung der Leberdurchblutung [372] sowie des Energiehaushaltes der Leber [395] ermöglichen. Diese müssen nun im Weiteren kritisch überprüft werden [181].

6 Literaturverzeichnis

1. Jastrow M. The liver in antiquity and the beginning of anatomy. *Trans Stud Coll Physicians Phila* 1907;29:117.
2. Hesiod. In: *Theogony*. Übersetzer: Lattimore R. University of Michigan Press, Ann Arbor 1959;154.
3. Chen TS, Chen PS. Understanding the Liver: A History. *Greenwood Press*, Westport 1984;293.
4. Galen C. On Anatomical Procedures. Übersetzer: Singer C. *Oxford University Press*, London 1956;289.
5. Saunders JB, O'Mallery CD. In: *The Illustrations from the Work of Andreas Vesalius of Brussels*. Classics of Medicine, New York 1993;165.
6. Harvey W. An Anatomical Study of the Motion of the Heart and the Blood in Animals. In: *Medicine and Western Civilization*. (Marcus S, Kiceluk SA, Rothman DJ). Rutgers University Press, New Brunswick 1996;68-75.
7. Haller A. Of the Liver, Gall-Bladder and Bile. In: *Dr. Albert Haller's physiology : being a course of lectures upon the visceral anatomy and vital oeconomy of human bodies : including the latest and most considerable discoveries and improvements*. Innys & Richardson, London 1754;181-204.
8. Langenbuch C. Ein Fall von Resection eines linksseitigen Schnurlappens der Leber. Heilung. *Berl Klin Wochenschr* 1888;25:37.
9. McClusky DA, 3rd, Skandalakis LJ, Colborn GL, Skandalakis JE. Hepatic surgery and hepatic surgical anatomy: historical partners in progress. *World J Surg* 1997;21:330-342.
10. Tillmanns H. Experimentelle und anatomische Untersuchungen über Wunden der Leber und Niere: Ein Beitrag zur Lehre von der antiseptischen Wundheilung. *Arch Path Anat* 1879;78:437.
11. Gluck T. Ueber die Bedeutung physiologisch chirurgischer Experimente an der Leber. *Arch Klin Chir* 1883;29:139.
12. Ponflick E. Experimentelle Beiträge zur Pathologie der Leber. *Arch Pathol Anat Physiol* 1889;118:209.
13. Hjortsjo CH. The topography of the intrahepatic duct systems. *Acta Anat (Basel)* 1951;11:599-615.
14. Healey JE, Jr., Schroy PC, Sorensen RJ. The intrahepatic distribution of the hepatic artery in man. *J Int Coll Surg* 1953;20:133-148.
15. Couinaud C. [Intrahepatic distribution of hepatic artery.]. *Acta Anat (Basel)* 1954;22:49-81.
16. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:659-676.
17. Ryckman FC, Flake AW, Fisher RA, Tchervenkov JI, Pedersen SH, Balistreri WF. Segmental orthotopic hepatic transplantation as a means to improve patient survival and diminish waiting-list mortality. *J Pediatr Surg* 1991;26:422-427; discussion 427-428.
18. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet* 1989;2:497.
19. Higgins G, Anderson R. Experimental Pathology of the liver. *Arch Pathol* 1931;12:186-201.
20. Diehl AM, Rai R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:466-470.
21. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991;66:245-256.
22. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995;9:1527-1536.
23. Tanaka EM. Regeneration: if they can do it, why can't we? *Cell* 2003;113:559-562.
24. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
25. Kam I, Lynch S, Svanas G, Todo S, Polimeno L, Francavilla A, Penkrot RJ, Takaya S, Ericzon BG, Starzl TE, et al. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology* 1987;7:362-366.
26. Schutle-Hermann R, Bursch W. Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In: *Liver regeneration and carcinogenesis : molecular and cellular mechanisms*. (Jirtle RL). Academic Press, San Diego ; London 1995;141-178.
27. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-1487.
28. Farber JL, Gerson RJ. Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. *Pharmacol Rev* 1984;36:71S-75S.
29. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297:2256-2259.
30. Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002;36:653-659.
31. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45-53.
32. Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 1993;143:1606-1620.
33. Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, Theise ND. Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol* 2003;39:357-364.
34. Fujita M, Furukawa H, Hattori M, Todo S, Ishida Y, Nagashima K. Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Mod Pathol* 2000;13:152-157.
35. Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999;154:537-541.
36. Fausto N, Lemire JM, Shiojiri N. Oval cells in liver carcinogenesis: cell lineages in hepatic development and the identification of facultative stem cells in normal liver. In: *The Role of Cell Types in Hepatocarcinogenesis*. (Sirica AE). CRC Press, Boca Raton 1992;89-108.
37. Shiojiri N. The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1984;79:25-39.
38. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
39. Schibler U. Circadian rhythms. Liver regeneration clocks on. *Science* 2003;302:234-235.
40. Rabes HM, Wirsching R, Tuzcek HV, Iseler G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet* 1976;9:517-532.
41. Stocker E, Heine WD. Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr Pathol* 1971;144:400-408.
42. Widmann JJ, Fahimi HD. Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. A light and electron microscopic cytochemical study. *Am J Pathol* 1975;80:349-366.
43. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995;9:1401-1410.
44. Ogawa K, Medline A, Farber E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Br J Cancer* 1979;40:782-790.

45. Iashina IN. [Formation of hepatic lobules in the regenerating liver]. *Biull Eksp Biol Med* 1970;70:95-98.
46. Zimmermann A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit* 2002;8:RA53-63.
47. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:556-562.
48. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89:1089-1095.
49. Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19 Suppl 4:iv6-10.
50. Hayashi H, Nagaki M, Imose M, Osawa Y, Kimura K, Takai S, Imao M, Naiki T, Kato T, Moriwaki H. Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor- α -deficient mice. *Liver Int* 2005;25:162-170.
51. Fujita J, Marino MW, Wada H, Jungbluth AA, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Daly JM. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 2001;129:48-54.
52. Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, Manns MP, Muller W, Trautwein C. Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* 2003;278:11281-11288.
53. Ren X, Hogaboam C, Carpenter A, Colletti L. Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *J Clin Invest* 2003;112:1407-1418.
54. Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 2004;39:635-644.
55. Haber BA, Mohn KL, Diamond RH, Taub R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J Clin Invest* 1993;91:1319-1326.
56. Taub R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *Faseb J* 1996;10:413-427.
57. Columbano A, Shinozuka H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *Faseb J* 1996;10:1118-1128.
58. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4477-4482.
59. Fausto N, Webber EM. Control of liver growth. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993;3:117-135.
60. Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995;129:1177-1180.
61. Menjo M, Ikeda K, Nakanishi M. Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13 Suppl:S100-105.
62. Albrecht JH, Hoffman JS, Kren BT, Steer CJ. Cyclin and cyclin-dependent kinase 1 mRNA expression in models of regenerating liver and human liver diseases. *Am J Physiol* 1993;265:G857-864.
63. Eipel C, Schuett H, Glawe C, Bordel R, Menger MD, Vollmar B. Pifithrin- α induced p53 inhibition does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2005;43:829-835.
64. Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, Argast GM, Heinrich PC, Fausto N. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest* 2001;107:1285-1292.
65. Francavilla A, Azzarone A, Carrieri G, Scotti-Foglieni C, Zeng QH, Cillo U, Porter K, Starzl TE. Effect on the canine Eck fistula liver of intraportal TGF- β alone or with hepatic growth factors. *Hepatology* 1992;16:1267-1270.
66. Rodgarkia-Dara C, Vejda S, Erlach N, Losert A, Bursch W, Berger W, Schulte-Hermann R, Grusch M. The activin axis in liver biology and disease. *Mutat Res* 2006;613:123-137.
67. Lee DC, Sunnarborg SW, Hinkle CL, Myers TJ, Stevenson MY, Russell WE, Castner BJ, Gerhart MJ, Paxton RJ, Black RA, Chang A, Jackson LF. TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:22-38.
68. Avruch J, Lin Y, Long X, Murthy S, Ortiz-Vega S. Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:67-72.
69. Kim DH, Sabatini DM. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;279:259-270.
70. Mead JE, Braun L, Martin DA, Fausto N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. *Cancer Res* 1990;50:7023-7030.
71. McGowan J, Atryzek V, Fausto N. Effects of protein-deprivation on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. *Biochem J* 1979;180:25-35.
72. Niiya T, Murakami M, Aoki T, Murai N, Shimizu Y, Kusano M. Immediate increase of portal pressure, reflecting sinusoidal shear stress, induced liver regeneration after partial hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999;6:275-280.
73. Bernard C, Tripier AEP. Lecons sur les effets des substances toxiques et medicamenteuses. *J B Bailliere*, Paris 1857;488.
74. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:748-755.
75. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969;244:6388-6394.
76. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 1970;75:410-421.
77. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 2002;16:1792-1798.
78. Karuzina, II, Zgoda VG, Kuznetsova GP, Samenkova NF, Archakov AI. Heme and apoprotein modification of cytochrome P450 2B4 during its oxidative inactivation in monooxygenase reconstituted system. *Free Radic Biol Med* 1999;26:620-632.
79. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *Faseb J* 1988;2:2557-2568.
80. Abraham NG, Lin JH, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S. The physiological significance of heme oxygenase. *Int J Biochem* 1988;20:543-558.
81. Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 1999;318:241-256.
82. Tyrrell R. Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1. *Free Radic Res* 1999;31:335-340.
83. McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;247:725-732.
84. McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 1997;272:12568-12574.
85. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-554.
86. Hon T, Hach A, Lee HC, Cheng T, Zhang L. Functional analysis of heme regulatory elements of the transcriptional activator Hap1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:584-591.
87. Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 2003;55:551-571.

88. Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Tan M, Iwahara S, Ramadori G, Fahimi HD. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1621-1631.
89. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:99-103.
90. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F425-441.
91. Okinaga S, Takahashi K, Takeda K, Yoshizawa M, Fujita H, Sasaki H, Shibahara S. Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood* 1996;87:5074-5084.
92. Sato M, Ishizawa S, Yoshida T, Shibahara S. Interaction of upstream stimulatory factor with the human heme oxygenase gene promoter. *Eur J Biochem* 1990;188:231-237.
93. Shibahara S, Kitamuro T, Takahashi K. Heme degradation and human disease: diversity is the soul of life. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:593-602.
94. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005;57:585-630.
95. Durante W, Christodoulides N, Cheng K, Peyton KJ, Sunahara RK, Schafer AI. cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1997;273:H317-323.
96. Immenschuh S, Hinke V, Ohlmann A, Gifhorn-Katz S, Katz N, Jungermann K, Kietzmann T. Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 1998;334 (Pt 1):141-146.
97. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol* 1999;276:H1493-1501.
98. Chen K, Maines MD. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000;46:609-617.
99. Liu N, Wang X, McCoubrey WK, Maines MD. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. *Gene* 2000;241:175-183.
100. Boehning D, Sedaghat L, Sedlak TW, Snyder SH. Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. *J Biol Chem* 2004;279:30927-30930.
101. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2445-2450.
102. Vreman HJ, Ekstrand BC, Stevenson DK. Selection of metalloporphyrin heme oxygenase inhibitors based on potency and photoreactivity. *Pediatr Res* 1993;33:195-200.
103. Iwahara S, Satoh H, Song DX, Webb J, Burlingame AL, Nagae Y, Muller-Eberhard U. Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry* 1995;34:13398-13406.
104. Muller-Eberhard U. Hemopexin. *Methods Enzymol* 1988;163:536-565.
105. Ortiz de Montellano PR, Nishida C, Rodriguez-Crespo I, Gerber N. Nitric oxide synthase structure and electron transfer. *Drug Metab Dispos* 1998;26:1185-1189.
106. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16093-16098.
107. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235:1043-1046.
108. Koglin M, Behrends S. Biliverdin IX is an endogenous inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Pharmacol* 2002;64:109-116.
109. Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:688-692.
110. Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1999;1:152-157.
111. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10925-10930.
112. Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10919-10924.
113. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999;103:129-135.
114. McGrath JJ, Smith DL. Response of rat coronary circulation to carbon monoxide and nitrogen hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984;177:132-136.
115. Wang R. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:1-15.
116. Wang R, Wang Z, Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 1997;121:927-934.
117. Johnson FK, Johnson RA. Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R536-541.
118. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 2003;24:449-455.
119. Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995;96:2431-2437.
120. Bauer I, Rensing H, Florax A, Ulrich C, Pistorius G, Redl H, Bauer M. Expression pattern and regulation of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 in human liver cells. *Shock* 2003;20:116-122.
121. Bakken AF, Thaler MM, Schmid R. Metabolic regulation of hepatic heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity. *J Clin Invest* 1972;51:530-536.
122. Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1333-1337.
123. Pannen BH, Bauer M. Differential regulation of hepatic arterial and portal venous resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci* 1998;62:2025-2033.
124. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 1992;6:3051-3064.
125. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
126. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.

127. Yuan T, Vogel HJ, Sutherland C, Walsh MP. Characterization of the Ca²⁺-dependent and -independent interactions between calmodulin and its binding domain of inducible nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1998;431:210-214.
128. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:13725-13728.
129. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298 (Pt 2):249-258.
130. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994;78:927-930.
131. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
132. Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M. No .NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14492-14497.
133. Xia Y, Zweier JL. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12705-12710.
134. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995;34:71-90.
135. Weinberg JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med* 1998;4:557-591.
136. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F193-206.
137. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 2003;93:96-105.
138. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11285-11289.
139. Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 1991;254:1503-1506.
140. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6368-6371.
141. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14:60-67.
142. Kilbourn RG, Belloni P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:772-776.
143. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3375-3378.
144. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87:432-438.
145. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323:22-27.
146. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991;338:1546-1550.
147. Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC, Wallwork J. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991;324:1539-1547.
148. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:535-560.
149. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-4655.
150. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990;85:587-590.
151. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1990;189:347-353.
152. Raji L, Baylis C. Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 1995;48:20-32.
153. Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 1997;10:699-707.
154. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2:907-916.
155. Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994;267:G416-422.
156. Muriel P. Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *J Appl Toxicol* 2000;20:189-195.
157. Aono K, Isobe KH, Kiuchi K, Fan ZH, Ito M, Takeuchi A, Miyachi M, Nakashima I, Nimura Y. In vitro and in vivo expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines. *J Cell Biochem* 1997;65:349-358.
158. Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, Billiar TR. Role of nitric oxide in liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:519-526.
159. Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:275-295.
160. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 2001;5:453-464.
161. Diaz-Guerra MJ, Velasco M, Martin-Sanz P, Bosca L. Nuclear factor kappaB is required for the transcriptional control of type II NO synthase in regenerating liver. *Biochem J* 1997;326 (Pt 3):791-797.
162. Obolenskaya M, Vanin AF, Mordvintcev PI, Mulsch A, Decker K. Epr evidence of nitric oxide production by the regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:571-576.
163. Fry DE. Sepsis syndrome. *Am Surg* 2000;66:126-132.
164. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:437-455.
165. Martin-Sanz P, Hortelano S, Callejas NA, Goren N, Casado M, Zeini M, Bosca L. Nitric oxide in liver inflammation and regeneration. *Metab Brain Dis* 2002;17:325-334.
166. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999;30:1-5.
167. Debonera F, Aldeguer X, Shen X, Gelman AE, Gao F, Que X, Greenbaum LE, Furth EE, Taub R, Olthoff KM. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. *J Surg Res* 2001;96:289-295.
168. Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Diaz-Guerra MJ, Bosca L. Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995;21:776-786.
169. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, Liew FY, Zaragoza C, Lowenstein C, Diehl AM. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13829-13834.
170. Yamada T, Murase N, Maeda T, Ye Q, Sakamoto T, Terakura M, Starzl TE, Todo S. Protective effect of TNF-alpha and IL-1 beta inhibitor FR167653 on ischemia-reperfusion injury in rat small intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1998;30:2638.
171. Taylor BS, Shao L, Gambotto A, Ganster RW, Geller DA. Inhibition of cytokine-induced nitric oxide synthase expression by gene transfer of adenoviral I kappa B alpha. *Surgery* 1999;126:142-147.

172. Zeini M, Hortelano S, Traves PG, Gomez-Valades AG, Pujol A, Perales JC, Bartrons R, Bosca L. Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of hepatocyte proliferation. *Faseb J* 2005;19:995-997.
173. Ding Y, McCoubrey WK, Jr., Maines MD. Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular 'sink' for NO? *Eur J Biochem* 1999;264:854-861.
174. Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Boyle P, Jaffe R, Upperman J, Zamora R, Ford HR. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G607-613.
175. Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol* 1999;277:F882-889.
176. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *Faseb J* 2000;14:1889-1900.
177. Cao L, Eldred WD. Inhibitors of nitric oxide synthase block carbon monoxide-induced increases in cGMP in retina. *Brain Res* 2003;988:78-83.
178. Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, Wagner O, Usheva A, Liu F, Ifedigbo E, Zamora R, Choi AM, Otterbein LE. Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *Faseb J* 2004;18:854-856.
179. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1997;80:557-564.
180. Hartsfield CL, Alam J, Cook JL, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997;273:L980-988.
181. Bouton C, Demple B. Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide. *J Biol Chem* 2000;275:32688-32693.
182. Motterlini R, Hidalgo A, Sammut I, Shah KA, Mohammed S, Srail K, Green CJ. A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:167-172.
183. Liang M, Croatt AJ, Nath KA. Mechanisms underlying induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F728-735.
184. Imai T, Morita T, Shindo T, Nagai R, Yazaki Y, Kurihara H, Suematsu M, Katayama S. Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ Res* 2001;89:55-62.
185. Wang R, Wu L. Interaction of selective amino acid residues of K(ca) channels with carbon monoxide. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:474-480.
186. Zuckerbraun BS, Billiar TR, Otterbein SL, Kim PK, Liu F, Choi AM, Bach FH, Otterbein LE. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J Exp Med* 2003;198:1707-1716.
187. Suematsu M, Ishimura Y. The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology* 2000;31:3-6.
188. Schoen JM, Lault WW. iNOS is not involved in shear stress-induced nitric oxide release, which triggers the liver regeneration cascade. *Proc West Pharmacol Soc* 2001;44:181-182.
189. Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2003;16:99-102.
190. Furnus CC, Inda AM, Andriani LB, Garcia MN, Garcia AL, Badran AF, Errecalde AL. Chronobiology of the proliferative events related to angiogenesis in mice liver regeneration after partial hepatectomy. *Cell Biol Int* 2003;27:383-386.
191. Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H. Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 1997;42:168-175.
192. Gross JF, Aroesty J. Mathematical models of capillary flow: a critical review. *Biorheology* 1972;9:225-264.
193. Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998;28:1467-1473.
194. Windberger U, Bartholovitsch A, Plasenzotti R, Korak KJ, Heinze G. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp Physiol* 2003;88:431-440.
195. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 2001;89:224-236.
196. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:871-874.
197. Goldsby RA, Kindt T, Osborne B, Kuby J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: *Immunology*. WH Freeman, Houndmills (New York) 2003;5:148-150.
198. Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003;38:909-918.
199. Kappas A, Drummond GS. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J Clin Invest* 1986;77:335-339.
200. Rahman TM, Hodgson HJ. The effects of early and late administration of inhibitors of inducible nitric oxide synthase in a thioacetamide-induced model of acute hepatic failure in the rat. *J Hepatol* 2003;38:583-590.
201. Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, Adams J, Griffith OW, Levi R, Lodato RF. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3629-3632.
202. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991;338:1557-1558.
203. Osna NA, Haorah J, Krutik VM, Donohue TM, Jr. Peroxynitrite alters the catalytic activity of rodent liver proteasome in vitro and in vivo. *Hepatology* 2004;40:574-582.
204. Feelisch M, Ostrowski J, Noack E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;14 Suppl 11:S13-22.
205. Yamamoto T, Bing RJ. Nitric oxide donors. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;225:200-206.
206. Wortha H, Adams J. Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. In: *Einführung in die Medizinische Biometrie*. (Ed. Adams J). Gustav Fischer, Jena 1992;18-19.
207. Castell JV, Jover R, Martinez-Jimenez CP, Gomez-Lechon MJ. Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006;2:183-212.
208. Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S. Insights on augments of liver regeneration cloning and function. *World J Gastroenterol* 2006;12:4951-4958.
209. Loyer P, Ilyin G, Cariou S, Glaise D, Corlu A, Guguen-Guillouzo C. Progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes. *Prog Cell Cycle Res* 1996;2:37-47.

210. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, Snykers S, Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* 2006;7:629-660.
211. Clemens MG, Zhang JX. Regulation of sinusoidal perfusion: in vivo methodology and control by endothelins. *Semin Liver Dis* 1999;19:383-396.
212. Grandjean C, Garcia H. Studies on liver regeneration. Deoxyribonucleic acid synthesis in the isolated perfused liver after in vitro and in vivo partial hepatectomy. *Lab Invest* 1975;32:552-554.
213. Iwai M, Cui TX, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine* 2001;13:60-64.
214. Gartner U, Stockert RJ, Levine WG, Wolkoff AW. Effect of nafenopin on the uptake of bilirubin and sulfobromophthalein by isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 1982;83:1163-1169.
215. Becker FF. Restoration of Liver Mass Following Partial Hepatectomy: "Surgical Hepartrophy". I. Influence of Blood Flow. *Am J Pathol* 1963;43:497-510.
216. Kinoshita T, Tashiro K, Nakamura T. Marked increase of HGF mRNA in non-parenchymal liver cells of rats treated with hepatotoxins. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:1229-1234.
217. Rice GC, Leiberman DP, Mathie RT, Ryan CJ, Harper AM, Blumgart LH. Liver tissue blood flow measured by 85Kr clearance in the anaesthetized rat before and after partial hepatectomy. *Br J Exp Pathol* 1977;58:243-250.
218. Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res* 2006;134:354-362.
219. Menyhart J, Simon L. Circulatory events accompanying liver regeneration following partial hepatectomy. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1966;30:169-174.
220. Fausto N. Lessons from genetically engineered animal models. V. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future. *Am J Physiol* 1999;277:G917-921.
221. Inderbitzin D, Studer P, Sidler D, Beldi G, Djonov V, Keogh A, Candinas D. Regenerative capacity of individual liver lobes in the microsurgical mouse model. *Microsurgery* 2006;26:465-469.
222. Njoku D, Laster MJ, Gong DH, Eger EI, 2nd, Reed GF, Martin JL. Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. *Anesth Analg* 1997;84:173-178.
223. Eger EI, 2nd. The pharmacology of isoflurane. *Br J Anaesth* 1984;56 Suppl 1:71S-99S.
224. Ray DC, Drummond GB. Halothane hepatitis. *Br J Anaesth* 1991;67:84-99.
225. Sinha A, Clatch RJ, Stuck G, Blumenthal SA, Patel SA. Isoflurane hepatotoxicity: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2406-2409.
226. Gelven PL, Cina SJ, Lee JD, Nichols CA. Massive hepatic necrosis and death following repeated isoflurane exposure: case report and review of the literature. *Am J Forensic Med Pathol* 1996;17:61-64.
227. Tarnow J, Eberlein HJ, Oser G, Patschke D, Schneider E, Schweichel E, Wilde J. [Influence of modern inhalation anaesthetics on haemodynamics, myocardial contractility, left ventricular volumes and myocardial oxygen supply (author's transl)]. *Anaesthesist* 1977;26:220-230.
228. Grundmann U, Zissis A, Bauer C, Bauer M. In vivo effects of halothane, enflurane, and isoflurane on hepatic sinusoidal microcirculation. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41:760-765.
229. Matsumoto N, Koizumi M, Sugai M. Hepatolobectomy-induced depression of hepatic circulation and metabolism in the dog is counteracted by isoflurane, but not by halothane. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999;43:850-854.
230. Thomson IA, Hughes RL, Fitch W, Campbell D. Effects of nitrous oxide on liver haemodynamics and oxygen consumption in the greyhound. *Anaesthesia* 1982;37:548-553.
231. Goldfarb G, Debaene B, Ang ET, Roulot D, Jolis P, Lebrec D. Hepatic blood flow in humans during isoflurane-N2O and halothane-N2O anesthesia. *Anesth Analg* 1990;71:349-353.
232. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc* 2008;3:1167-1170.
233. Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhaupl KM. Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res* 1989;504:159-160.
234. Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K. Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg* 1995;80:249-255.
235. Kuhnle GE, Leipfinger FH, Goetz AE. Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol* 1993;74:1462-1471.
236. Vollmar B, Preissler G, Menger MD. Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas. *Am J Physiol* 1994;267:H1936-1940.
237. Vajkoczy P, Vollmar B, Wolf B, Menger MD. Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans. *J Mol Med* 1999;77:111-114.
238. Koo A. In vivo characterization of histamine H1- and H2-receptors in the rat stomach microcirculation. *Br J Pharmacol* 1983;78:181-189.
239. Bohlen HG, Gore RW. Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc Res* 1976;11:103-110.
240. Zweifach BW. Direct observation of the mesenteric circulation in experimental animals. *Anat Rec* 1954;120:277-291.
241. Zweifach BW. The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc Res* 1973;5:363-367.
242. McCuskey RS, McCuskey PA. In vivo microscopy of the spleen. *Bibl Anat* 1977;121-125.
243. Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Esslinger HU, von Hagens G, Komitowski D, Dallenbach FD. Intraglomerular microcirculation: measurements of single glomerular loop flow in rats. *Kidney Int* 1981;20:230-239.
244. Winet H. A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res* 1989;37:105-114.
245. Rucker M, Schafer T, Stamm A, Saueressig K, Vollmar B, Spitzer WJ, Menger MD. New model for in vivo quantification of microvascular embolization, thrombus formation, and recanalization in composite flaps. *J Surg Res* 2002;108:129-137.
246. Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Uhl E, Galla TJ, Menger MD, Messmer K. The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:948-959.
247. Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Galla TJ, Menger MD, Gross W, Messmer K. Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model. *Plast Reconstr Surg* 1989;84:303-313.
248. Menger MD, Barker JH, Messmer K. Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:1104-1114.
249. Menger MD, Feifel G, Messmer K. Distribution pattern of capillary and venular red blood cell velocity following ischemia-reperfusion in striated muscle. *Adv Exp Med Biol* 1992;317:765-769.

250. Eipel C, Kidess E, Abshagen K, Leminh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2007;151:406-413.
251. Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin- α in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 2007;170:1954-1963.
252. Lehmann C, Feyerherd F, Feyerherd T, Fogliata M, Grundling M, Usichenko TI, Meissner K, Wendt M, Pavlovic D. Ketamine does not affect intestinal microcirculation in pentobarbital-anaesthetized rats during experimental endotoxaemia. *Lab Anim* 2007;41:55-62.
253. Thomson IA, Fitch W, Campbell D, Watson R. Effects of ketamine on liver blood flow and hepatic oxygen consumption. Studies in the anaesthetised greyhound. *Acta Anaesthesiol Scand* 1988;32:10-14.
254. Schmidt-Oechtering GU, Becker K. [Old and new α 2-adrenoceptor agonists. 1. Xylazine and medetomidine]. *Tierarztl Prax* 1992;20:447-458.
255. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blumel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med (Berl)* 1984;184:159-169.
256. Rodrigues SF, de Oliveira MA, Martins JO, Sannomiya P, de Cassia Tostes R, Nigro D, Carvalho MH, Fortes ZB. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci* 2006;79:1630-1637.
257. Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG, Scheff SW. Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbital, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comp Med* 2002;52:63-67.
258. Gelman SI. Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. *Arch Surg* 1976;111:881-883.
259. Gelman S, Dillard E, Bradley EL, Jr. Hepatic circulation during surgical stress and anesthesia with halothane, isoflurane, or fentanyl. *Anesth Analg* 1987;66:936-943.
260. Kerner T. Durchblutung und Gewebeoxygenierung von Leber und Pankreas während Hypotension durch volatile Anästhetika. *Dissertationsschrift*, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1993.
261. Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991;23:158-169.
262. Drugas GT, Chun KE, Miescher EA, Clemens MG. Maturational differences in hepatic microhemodynamics in rats. *J Surg Res* 1993;54:246-253.
263. Suematsu M, Suganuma K, Kashiwagi S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:485-492.
264. Ye J, Laychock SG. A protective role for heme oxygenase expression in pancreatic islets exposed to interleukin-1 β . *Endocrinology* 1998;139:4155-4163.
265. Veszelovsky E, Holford NH, Thomsen LL, Knowles RG, Baguley BC. Plasma nitrate clearance in mice: modeling of the systemic production of nitrate following the induction of nitric oxide synthesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36:155-159.
266. Eum HA, Yeom DH, Lee SM. Role of nitric oxide in the inhibition of liver cytochrome P450 during sepsis. *Nitric Oxide* 2006;15:423-431.
267. Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *Faseb J* 2005;19:1155-1157.
268. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 2005;39:797-815.
269. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:577-581.
270. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892-896.
271. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett* 1995;363:235-238.
272. Strunk V, Hahnenkamp K, Schneuing M, Fischer LG, Rich GF. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth Analg* 2001;92:681-687.
273. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:3203-3207.
274. Kharitonov VG, Sharma VS, Pilz RB, Magde D, Koesling D. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2568-2571.
275. Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991;28:52-61.
276. Downard PJ, Wilson MA, Spain DA, Matheson PJ, Siow Y, Garrison RN. Heme oxygenase-dependent carbon monoxide production is a hepatic adaptive response to sepsis. *J Surg Res* 1997;71:7-12.
277. Moal F, Veal N, Vuillemin E, Barriere E, Wang J, Fizanne L, Oberti F, Douay O, Gallois Y, Bonnefont-Rousselot D, Roussetlet MC, Cales P. Hemodynamic and antifibrotic effects of a selective liver nitric oxide donor V-PYRRO/NO in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:6639-6645.
278. Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 1997;26:945-952.
279. Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* 1998;131:251-256.
280. Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 2003;116:3051-3060.
281. Pisto S, Morello D. Liver regeneration 7. Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. *Faseb J* 1996;10:819-828.
282. Rappaport AM. Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat* 1977;116-120.
283. McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat* 1966;119:455-477.
284. Bloch EH. The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination. *Angiology* 1955;6:340-349.
285. Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K. Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med (Berl)* 1991;191:47-63.
286. Conzen PF, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W. Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1988;69:643-651.
287. Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ. A study of the pharmacologic control of blood flow to acute skin flaps using xenon washout. Part I. *Plast Reconstr Surg* 1983;71:387-398.
288. Webster MH, Patterson J. The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 1976;29:182-185.

289. Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G. Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp* 1986;5:73-83.
290. Chavez-Cartaya RE, Ramirez P, Jamieson NV. Haemoglobin saturation in the rat liver after ischaemia and reperfusion: study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 1995;27:82-92.
291. Irwin JW, Macdonald J, 3rd. Microscopic observations of the intrahepatic circulation of living guinea pigs. *Anat Rec* 1953;117:1-15.
292. Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS. Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology* 1991;13:751-757.
293. Varghese HJ, MacKenzie LT, Groom AC, Ellis CG, Chambers AF, MacDonald IC. Mapping of the functional microcirculation in vital organs using contrast-enhanced in vivo video microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H185-193.
294. Intaglietta M, Tompkins WR. Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc Res* 1973;5:309-312.
295. Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR. Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res* 1975;10:165-179.
296. Koo A, Liang IY. Microvascular filling pattern in rat liver sinusoids during vagal stimulation. *J Physiol* 1979;295:191-199.
297. Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, Vogel O, Aulmann M, Frietsch T, Schmid-Schonbein H, Kuschinsky W, Gassmann M. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood* 2003;102:2278-2284.
298. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Cmaj* 2005;172:367-379.
299. Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y. Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. *Hepatology* 1986;6:701-707.
300. McKnight JT, Jones JE. Jaundice. *Am Fam Physician* 1992;45:1139-1148.
301. Roche SP, Kobos R. Jaundice in the adult patient. *Am Fam Physician* 2004;69:299-304.
302. Sato Y, Koyama S, Tsukada K, Hatakeyama K. Acute portal hypertension reflecting shear stress as a trigger of liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Today* 1997;27:518-526.
303. Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol* 2006;45:35-42.
304. Veteläinen R, Dinant S, van Vliet A, van Gulik TM. Portal vein ligation is as effective as sequential portal vein and hepatic artery ligation in inducing contralateral liver hypertrophy in a rat model. *J Vasc Interv Radiol* 2006;17:1181-1188.
305. Rocheleau B, Ethier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M. Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. *Am J Physiol* 1999;277:G1000-1007.
306. Peng Y, Du K, Ramirez S, Diamond RH, Taub R. Mitogenic up-regulation of the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase gene by Egr-1. Egr-1 activation is an early event in liver regeneration. *J Biol Chem* 1999;274:4513-4520.
307. Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, Rogiers X. The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* 2002;37:606-612.
308. Hortelano S, Zeini M, Casado M, Martin-Sanz P, Bosca L. Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins. *Front Biosci* 2007;12:13-21.
309. Wagner CT, Durante W, Christodoulides N, Hellums JD, Schafer AI. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997;100:589-596.
310. Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman MA, Medford RM, Jaiswal AK, Kunsch C. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem* 2003;278:703-711.
311. Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. Antiapoptotic action of carbon monoxide on cultured vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:572-575.
312. Lyoumi S, Puy H, Tamion F, Scotte M, Daveau M, Nordmann Y, Lebreton JP, Deybach JC. Nitric oxide synthase inhibition and the induction of cytochrome P-450 affect heme oxygenase-1 messenger RNA expression after partial hepatectomy and acute inflammation in rats. *Crit Care Med* 1998;26:1683-1689.
313. Solangi K, Sacerdoti D, Goodman AI, Schwartzman ML, Abraham NG, Levere RD. Differential effects of partial hepatectomy on hepatic and renal heme and cytochrome P450 metabolism. *Am J Med Sci* 1988;296:387-391.
314. Yoshida T, Arakaki M, Kumakawa J, Kuroiwa Y. An induction of heme oxygenase and its possible relation to the decrease of cytochrome P-450 content during liver regeneration. *J Pharmacobiodyn* 1984;7:112-119.
315. Hoetzel A, Leitz D, Schmidt R, Tritschler E, Bauer I, Loop T, Humar M, Geiger KK, Pannen BH. Mechanism of hepatic heme oxygenase-1 induction by isoflurane. *Anesthesiology* 2006;104:101-109.
316. Schmidt R, Hoetzel A, Baechle T, Loop T, Humar M, Bauer M, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BH. Isoflurane pretreatment lowers portal venous resistance by increasing hepatic heme oxygenase activity in the rat liver in vivo. *J Hepatol* 2004;41:706-713.
317. Elbirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111:438-447.
318. Warabi E, Takabe W, Minami T, Inoue K, Itoh K, Yamamoto M, Ishii T, Kodama T, Noguchi N. Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2007;42:260-269.
319. Alam J, Cook JL. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr Pharm Des* 2003;9:2499-2511.
320. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988;331:168-170.
321. Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest* 1995;95:1363-1369.
322. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo J* 1993;12:2005-2015.
323. Chang EF, Wong RJ, Vreman HJ, Igarashi T, Galo E, Sharp FR, Stevenson DK, Noble-Haesslein LJ. Heme oxygenase-2 protects against lipid peroxidation-mediated cell loss and impaired motor recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci* 2003;23:3689-3696.
324. Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5987-5991.

325. Lee PJ, Camhi SL, Chin BY, Alam J, Choi AM. AP-1 and STAT mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L175-182.
326. Ueno S, Campbell J, Fausto N. Reactive oxygen species derived from NADPH oxidase system is not essential for liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res* 2006;136:260-265.
327. Bhullar IS, Li YS, Miao H, Zandi E, Kim M, Shyy JY, Chien S. Fluid shear stress activation of I κ B kinase is integrin-dependent. *J Biol Chem* 1998;273:30544-30549.
328. Polte T, Abate A, Dennery PA, Schroder H. Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1209-1215.
329. Obolenskaya M, Schulze-Specking A, Plaumann B, Frenzer K, Freudenberg N, Decker K. Nitric oxide production by cells isolated from regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:1305-1311.
330. Forstermann U, Pollock JS, Tracey WR, Nakane M. Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. *Methods Enzymol* 1994;233:258-264.
331. Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol* 1997;171:205-211.
332. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995;269:C1371-1378.
333. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C803-816.
334. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996;79:984-991.
335. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res* 1998;82:686-695.
336. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 1999;43:532-541.
337. Jin ZG, Wong C, Wu J, Berk BC. Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:12305-12309.
338. Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995;352:351-364.
339. Ozawa N, Shichiri M, Iwashina M, Fukai N, Yoshimoto T, Hirata Y. Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. *Hypertens Res* 2004;27:93-99.
340. Maines MD, Kappas A. Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:4293-4297.
341. Kappas A, Drummond GS. Synthetic metalloporphyrins: a class of compounds of pharmacological interest. *Bioessays* 1985;3:256-259.
342. Smith A, Alam J, Escriba PV, Morgan WT. Regulation of heme oxygenase and metallothionein gene expression by the heme analogs, cobalt-, and tin-protoporphyrin. *J Biol Chem* 1993;268:7365-7371.
343. Zhang GL, Wang YH, Teng HL, Lin ZB. Effects of aminoguanidine on nitric oxide production induced by inflammatory cytokines and endotoxin in cultured rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:331-334.
344. Um SH, Kwon YD, Kim CD, Lee HS, Jeon YT, Chun HJ, Lee SW, Choi JH, Ryu HS, Hyun JH. The role of nitric oxide in experimental cerulein induced pancreatitis. *J Korean Med Sci* 2003;18:520-526.
345. Avontuur JA, Buijk SL, Bruining HA. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54:627-631.
346. Inoue Y, Bode BP, Beck DJ, Li AP, Bland KI, Souba WW. Arginine transport in human liver. Characterization and effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Ann Surg* 1993;218:350-362; discussion 362-353.
347. Conner EM, Aiko S, Fernandez M, Battarbee HD, Gray L, Grisham MB. Duration of the hemodynamic effects of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in vivo. *Nitric Oxide* 2000;4:85-93.
348. Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:1139-1146.
349. Sadri P, Lauth WW. Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *Am J Physiol* 1999;277:G101-108.
350. Guarino MP, Correia NC, Lauth WW, Macedo MP. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G527-532.
351. Ishikawa M, Kajimura M, Adachi T, Maruyama K, Makino N, Goda N, Yamaguchi T, Sekizuka E, Suematsu M. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against NO-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation. *Circ Res* 2005;97:e104-114.
352. Botros FT, Navar LG. Interaction between endogenously produced carbon monoxide and nitric oxide in regulation of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2772-2778.
353. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1475-1479.
354. Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 1996;16:835-842.
355. Koide Y, Earp HS, Ong SH, Steiner AL. Alterations in the intracellular distribution of cGMP and guanylate cyclase activity during rat liver regeneration. *J Biol Chem* 1978;253:4439-4445.
356. Gutterman DD, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:671-678.
357. Koehler RC, Traystman RJ. Cerebrovascular effects of carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:279-290.
358. Wu L, Cao K, Lu Y, Wang R. Different mechanisms underlying the stimulation of K(Ca) channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J Clin Invest* 2002;110:691-700.
359. Naik JS, Walker BR. Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H220-228.
360. Coceani F, Kelsey L, Seidlitz E. Carbon monoxide-induced relaxation of the ductus arteriosus in the lamb: evidence against the prime role of guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 1996;118:1689-1696.
361. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 2002;82:131-185.
362. Coceani F, Kelsey L. Endothelin-1 release from the lamb ductus arteriosus: are carbon monoxide and nitric oxide regulatory agents? *Life Sci* 2000;66:2613-2623.
363. Stanford SJ, Walters MJ, Mitchell JA. Carbon monoxide inhibits endothelin-1 release by human pulmonary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2004;486:349-352.
364. Oda M, Yokomori H, Han JY. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003;29:167-182.

365. Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, Kyokane T, Goda N, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Suematsu M, Ishimura Y. Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1999;277:G1088-1096.
366. White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992;31:6627-6631.
367. Noguchi M, Yoshida T, Kikuchi G. A stoichiometric study of heme degradation catalyzed by the reconstituted heme oxygenase system with special consideration of the production of hydrogen peroxide during the reaction. *J Biochem* 1983;93:1027-1036.
368. Yang NC, Lu LH, Kao YH, Chau LY. Heme oxygenase-1 attenuates interleukin-1beta-induced nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci* 2004;11:799-809.
369. Li X, Benjamin IS, Alexander B. The role of nitric oxide in systemic and hepatic haemodynamics in the rat in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368:142-149.
370. Alexander B, Cottam H, Naftalin R. Hepatic arterial perfusion regulates portal venous flow between hepatic sinusoids and intrahepatic shunts in the normal rat liver in vitro. *Pflugers Arch* 2001;443:257-264.
371. Cantre D, Schuett H, Hildebrandt A, Dold S, Menger MD, Vollmar B, Eipel C. Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *Br J Surg* 2008;95:785-792.
372. Schuett H, Eipel C, Maletzki C, Menger MD, Vollmar B. NO counterbalances HO-1 overexpression-induced acceleration of hepatocyte proliferation in mice. *Lab Invest* 2007;87:602-612.
373. Kiso S, Kawata S, Tamura S, Inui Y, Yoshida Y, Sawai Y, Umeki S, Ito N, Yamada A, Miyagawa J, Higashiyama S, Iwawaki T, Saito M, Taniguchi N, Matsuzawa Y, Kohno K. Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 2003;124:701-707.
374. Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* 2003;38:326-334.
375. Amersi F, Shen XD, Anselmo D, Melinek J, Iyer S, Southard DJ, Katori M, Volk HD, Busuttill RW, Buelow R, Kupiec-Weglinski JW. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002;35:815-823.
376. Mojena M, Hortelano S, Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Garcia-Barchino MJ, Saez GT, Bosca L. Protection by nitric oxide against liver inflammatory injury in animals carrying a nitric oxide synthase-2 transgene. *Faseb J* 2001;15:583-585.
377. Bohlinger I, Leist M, Barsig J, Uhlig S, Tiegs G, Wendel A. Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* 1995;22:1829-1837.
378. Zeini M, Hortelano S, Traves PG, Martin-Sanz P, Bosca L. Simultaneous abrogation of NOS-2 and COX-2 activities is lethal in partially hepatectomised mice. *J Hepatol* 2004;40:926-933.
379. Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Mato JM, Avila MA. NO sensitizes rat hepatocytes to proliferation by modifying S-adenosylmethionine levels. *Gastroenterology* 2002;122:1355-1363.
380. Wang HH, Lutt WW. Evidence of nitric oxide, a flow-dependent factor, being a trigger of liver regeneration in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:1072-1079.
381. Serfass L, Burstyn JN. Effect of heme oxygenase inhibitors on soluble guanylyl cyclase activity. *Arch Biochem Biophys* 1998;359:8-16.
382. Appleton SD, Chretien ML, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Brien JF, Nakatsu K, Maurice DH, Marks GS. Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metab Dispos* 1999;27:1214-1219.
383. Xia ZW, Li CE, Jin YX, Shi Y, Xu LQ, Zhong WW, Li YZ, Yu SC, Zhang ZL. Reduction of bilirubin by targeting human heme oxygenase-1 through siRNA. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:495-502.
384. Glanemann M, Schirmeier A, Lippert S, Langrehr JM, Neuhaus P, Nussler AK. Cobalt-protoporphyrin induced heme oxygenase overexpression and its impact on liver regeneration. *Transplant Proc* 2005;37:3223-3225.
385. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122:202-210.
386. Ben-Ari Z, Hochhauser E, Burstein I, Papo O, Kaganovsky E, Krasnov T, Vamichkim A, Vidne BA. Role of anti-tumor necrosis factor-alpha in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment. *Transplantation* 2002;73:1875-1880.
387. Kaizu T, Nakao A, Tsung A, Toyokawa H, Sahai R, Geller DA, Murase N. Carbon monoxide inhalation ameliorates cold ischemia/reperfusion injury after rat liver transplantation. *Surgery* 2005;138:229-235.
388. Petrace I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L312-319.
389. Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:17950-17961.
390. Kim HP, Wang X, Nakao A, Kim SI, Murase N, Choi ME, Ryter SW, Choi AM. Caveolin-1 expression by means of p38beta mitogen-activated protein kinase mediates the antiproliferative effect of carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11319-11324.
391. Durante W. Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease. *J Cell Physiol* 2003;195:373-382.
392. Liao Y, Shikapwashya ON, Shteyer E, Dieckgraefe BK, Hruz PW, Rudnick DA. Delayed hepatocellular mitotic progression and impaired liver regeneration in early growth response-1-deficient mice. *J Biol Chem* 2004;279:43107-43116.
393. Hsu MK, Qiao L, Ho V, Zhang BH, Zhang H, Teoh N, Dent P, Farrell GC. Ethanol reduces p38 kinase activation and cyclin D1 protein expression after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2006;44:375-382.
394. Minuk GY. Hepatic regeneration: If it ain't broke, don't fix it. *Can J Gastroenterol* 2003;17:418-424.
395. Tsui TY, Siu YT, Schlitt HJ, Fan ST. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide stimulates adenosine triphosphate generation in human hepatocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336:898-902.
396. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004;25:1601-1611.
397. Hoffman AL, Rosen HR, Ljubimova JU, Sher L, Podesta LG, Demetriou AA, Makowka L. Hepatic regeneration: current concepts and clinical implications. *Semin Liver Dis* 1994;14:190-210.
398. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, Corvera C, Weber S, Blumgart LH. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002;236:397-406; discussion 406-397.
399. Mullin EJ, Metcalfe MS, Maddern GJ. How much liver resection is too much? *Am J Surg* 2005;190:87-97.
400. Lo CM, Fan ST, Liu CL, Chan JK, Lam BK, Lau GK, Wei WI, Wong J. Minimum graft size for successful living donor liver transplantation. *Transplantation* 1999;68:1112-1116.

401. Baek Y, Nakano H, Kumada K, Nagasaki H, Kigawa G, Sasaki J, Kaneda M, Hatakeyama T, Kitamura N, Sanada Y, Midorikawa T, Yamaguchi M. Administration of prostaglandin E1 reduces post-operative hepatocellular damage and restores hepatic integrity in patients undergoing hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1836-1841.
402. Man K, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Fung PC, Liang TB, Lee TK, Tsui SH, Ng IO, Zhang ZW, Wong J. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. *Ann Surg* 2003;237:256-264.
403. Tuzuner E, Liu L, Shimada M, Yilmaz E, Glanemann M, Settmacher U, Langrehr JM, Jonas S, Neuhaus P, Nussler AK. Heme oxygenase-1 protects human hepatocytes in vitro against warm and cold hypoxia. *J Hepatol* 2004;41:764-772.
404. Shan Y, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Identification of key elements that are responsible for heme-mediated induction of the avian heme oxygenase-1 gene. *Biochim Biophys Acta* 2004;1679:87-94.
405. Vreman HJ, Cipkala DA, Stevenson DK. Characterization of porphyrin heme oxygenase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:278-285.
406. Motterlini R, Mann BE, Johnson TR, Clark JE, Foresti R, Green CJ. Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Curr Pharm Des* 2003;9:2525-2539.
407. Fujimoto H, Ohno M, Ayabe S, Kobayashi H, Ishizaka N, Kimura H, Yoshida K, Nagai R. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt-eNOS pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1848-1853.
408. Yang L, Quan S, Abraham NG. Retrovirus-mediated HO gene transfer into endothelial cells protects against oxidant-induced injury. *Am J Physiol* 1999;277:L127-133.
409. Deramautd BM, Braunstein S, Remy P, Abraham NG. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 1998;68:121-127.
410. Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem* 1999;72:1187-1203.
411. Taberner A, Schneider F, Potenza MA, Randriamboavonjy V, Chasserot S, Wolf P, Mitolo-Chieppa D, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immuno-localization and influence on vascular tone. *Intensive Care Med* 2003;29:262-270.
412. Brussino L, Bucca C, Morello M, Scappaticci E, Mauro M, Rolla G. Effect on dyspnoea and hypoxaemia of inhaled N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in hepatopulmonary syndrome. *Lancet* 2003;362:43-44.
413. Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8897-8902.

7 Lebenslauf

Person

Name: Harald Schütt
Geburtsdatum: 11.05.1981
Geburtsort: Bergen/Rügen
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder
Anschrift: Ludwig-Sievers-Ring 44 / 30659 Hannover

Schulische Ausbildung

1987 – 1991 Grundschule Rostock
1991 – 1999 Christophorus-Gymnasium Rostock
1999 Allg. Hochschulreife, Note: 1,0
9/1999 – 7/2000 Zivildienst am Universitätsklinikum Rostock, Chirurgische Intensivstation

Hochschulausbildung

2000 – 2006 Studium der Medizin, Universität Rostock
2002 Ärztliche Vorprüfung, Note: gut
2003 1. Teil Ärztliche Prüfung, Note: gut
2005 2. Teil Ärztliche Prüfung, Note: gut
2006 3. Teil Ärztliche Prüfung, Note: sehr gut

Praktisches Jahr

10 – 11/2005 Universitätsklinikum Rostock – Traumatologie
12/2005 – 01/2006 Universitätsklinikum Rostock – Viszeralchirurgie
02 – 05/2006 Südstadtklinikum Rostock – Kardiologie
06-09/2006 Universitätsklinikum Rostock – Psychosomatik

Wissenschaftliche Tätigkeiten

- ab 09/2003** Promotion am Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. B. Vollmar)
- ab 05/2007** Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Kardiologie und Angiologie (Direktor: Prof. Dr. med. H. Drexler), Arbeitsgruppe „Pathophysiologie der Atherosklerose und vaskuläres Remodeling (Leiter: Prof. Dr. med. B. Schieffer), Medizinische Hochschule Hannover
- ab 10/2007** PhD-Student im MD/PhD-Programm „Molecular Medicine“ an der Hannover Biomedical Research School, Medizinische Hochschule Hannover

Preise und Stipendien

- 1999** Auszeichnung als jahrgangsbester Schüler des Abiturjahrgangs 1999 / Preis des Bundesverbands der Chemischen Industrie für besondere Leistungen im Fach Chemie
- 2006** Auszeichnung als jahrgangsbester Medizinstudent des Abschlussjahrgangs 2006
- 2007** Einladung zum *57th Meeting of Nobel Laureates at Lindau, 19th Forum dedicated to Physiology or Medicine*
- 2007 – 2009** Stipendium der Hannover Biomedical Research School

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

1. Eipel C; **Schuett H**; Glawe C; Bordel R; Menger M. D; Vollmar B: Pifithrin-alpha induced p53 inhibition does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2005;43:829-835,
2. Eipel C, Eisold M, **Schuett H**, Vollmar B: Inhibition of heme oxygenase-1 protects against tissue injury in carbon tetrachloride exposed livers. *J Surg Res* 2007;139:113-120.
3. **Schuett H**; Eipel C; Maletzki C; Menger M. D; Vollmar B: NO counterbalances HO-1 overexpression-induced acceleration of hepatocyte proliferation in mice. *Lab Invest* 2007;87:602-12.
4. Cantré D, **Schuett H**, Hildebrandt A, Dold S, Menger MD, Vollmar B, Eipel C. Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *Br J Surg* 2008;95:785-92.
5. **Schuett H**, Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B. Atherosklerose als chronischer Entzündungsprozess – Neue Paradigmen für die Entstehung einer Volkskrankheit. *Lebendige Wissenschaft (Kardiologie)* Mai 2008;128-138.

Kongressbeiträge und publizierte Abstracts

1. **Schuett H**, Eipel C, Bordel R, Menger MD, Vollmar B. Bedeutung von p53 für die Leberregeneration nach Resektion. 121. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum Berlin 2004. *Chir Forum* 2004;33:311-312.
2. **Schuett H**, Eipel C, Bordel R, Vollmar B. Pifithrin- α induced p53 inhibition does not affect liver regeneration after partial hepatectomy. 8. Chirurgische Forschungstage Mannheim 2004. *Langenbecks Arch Surg* 2004;389:422.
3. **Schuett H**, Eipel C, Vollmar B. Bedeutung der Hämoxygenase-1 und der NO-Synthase bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum München 2005. *Chir Forum* 2005;34:247-248.

Hannover, den 19.12.2008

8 Danksagung

Ein besonderes Bedürfnis ist es mir an dieser Stelle all denjenigen zu danken, die mich auf diesem langen Weg begleitet und zum erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, die mir dieses Thema überlassen und damit die Türen zu meiner weiteren wissenschaftlichen Laufbahn aufgestoßen hat. Mit ihrer kontinuierlichen, uneingeschränkten und stets unkomplizierten Unterstützung sowie den großartigen Möglichkeiten in ihrem Institut war sie ein Garant für die erfolgreiche Durchführung meiner Doktorarbeit. Darüber hinaus haben ihre inspirierende Art und die Fähigkeit wissenschaftliche Begeisterung zu wecken, entscheidend zu meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung auf dem Gebiet der Forschung beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinische und Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes möchte ich für die konstruktive Begleitung meiner Doktorarbeit vor Ort, wie auch aus der Ferne danken.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Eipel danke ich für die schnelle Einarbeitung in das Modell, die Vermittlung der Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens sowie die hervorragende Betreuung im gesamten Verlauf der Doktorarbeit. Durch sein naturwissenschaftliches Wesen hat er es mir ermöglicht, die vielfältigen Aspekte der Forschung besser begreifen zu können und war mir zudem eine unverzichtbare menschliche Stütze auf unserem gemeinsamen Weg.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Maletzki danke ich für ihre großartige und unkomplizierte Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten. Zusammen mit ihr möchte ich auch Herrn Dr. med. Heiko Sorg für den gegenseitigen psychologischen Beistand während unserer Projekte danken – all die Stunden, die wir während der Arbeiten neben- und miteinander verbracht haben werden mir fest in Erinnerung bleiben.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes bedanken, ohne deren Einsatz und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank geht vor allem an Maren Nerowski, Dorothea Frenz, Berit Blendow, Doris Butzlaff und Anja Gellert für die unermüdliche und stets freundliche Hilfe. Kathrin Sievert, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer danke ich sehr für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern danken, in deren Synthese aus Liebe, Menschlichkeit und wissenschaftlichem Geist ich mich zu dem entwickeln konnte, was mich heute ausmacht. Ihr Glaube an mich und meinen Weg hat mir stets die notwendige Ruhe und Kraft geben können – Danke für alles!

Thesen zur Dissertation

1. Die Regeneration der Leber nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie ist ein präzise regulierter Prozess, dessen Verlauf durch das ausgewogene Zusammenspiel proliferationsstimulierender und proliferationshemmender Faktoren gesteuert wird.
2. Zur Initiation des komplexen Regenerationsprozesses bedarf es eines entsprechenden Startsignals und eines geeigneten Sensors, welche die Informationen über das fehlende Lebergewebe in eine zelluläre Antwort umsetzen.
3. Aufgrund des konstanten Blutzustroms aus dem portalvenösen Einzugsgebiet wird die verbleibende Leber stärker perfundiert und intrahepatischer Blutvolumenfluss sowie Scherstress steigen konsekutiv an. Durch die Interaktion dieser hämodynamischen Veränderungen mit Zellen der Gefäßwand können nachgeschaltete Signalwege aktiviert werden.
4. Die vasoaktiven Enzymsysteme Häm-Oxygenase-1 (HO-1) und NO-Synthase (NOS) nehmen mit ihren gasförmigen Mediatoren CO und NO eine zentrale Position in dieser Signaltransduktion ein und sind ihrerseits wiederum in der Lage, die hepatische Mikrozirkulation zu beeinflussen.
5. Bisher waren Interaktionen dieser beiden Enzymsysteme hinsichtlich ihrer Effekte im Verlauf der Leberregeneration noch nicht untersucht worden. Daher sollte die vorliegende Studie in einem tierexperimentellen Ansatz klären, welche Auswirkungen die Modulation der HO-1 und NOS auf die Leberregeneration nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie hat.
6. Durch die Verwendung von Cobalt-Protoporphyrin-IX (CoPP-IX) war es möglich, HO-1-Expression und CO-Produktion zu steigern, während durch N^ω-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME) NOS-Aktivität und NO-Produktion gehemmt werden konnten. Der NO-Donor Molsidomin diente zur Substitution des fehlenden NO und damit zur Verifizierung L-NAME-Effekte.
7. Die Verschiebung der physiologischen Balance zwischen CO und NO zugunsten von CO durch die kombinierte Gabe von CoPP-IX und L-NAME führte zu deutlich erhöhten Blutvolumenfluss- und Scherstresswerten im Vorfeld der Leberresektion.
8. Eine vorzeitige Aktivierung der Leberregeneration im Sinne eines *Priming* der Hepatozyten konnte unter dieser Behandlung, gemessen an der mRNA-Expression

- des *immediate early genes* c-fos, nicht beobachtet werden. Nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie zeigten die Analysen von PCNA-Expression und BrdU-Inkorporation jedoch übereinstimmend eine signifikant akzelerierte hepatozytäre Proliferation unter HO-1-Induktion bei gleichzeitiger NOS-Inhibition.
9. Die Substitution von NO mittels Molsidomin führte bei Tieren mit kombinierter HO-1-Induktion und NOS-Inhibition zu einer Reversion der erhöhten hämodynamischen Parameter sowie zu einem Rückgang der Proliferationsmarker PCNA und BrdU auf das Niveau der entsprechenden Kontrolltiere.
 10. Es lässt sich somit schließen, dass durch die Verstärkung der CO-Effekte bei gleichzeitiger Reduktion der NO-Produktion eine gesteigerte mikrovaskuläre Perfusion der Leber mit konsekutiv akzelerierter hepatozytäre Proliferation nach $\frac{2}{3}$ -Hepatektomie induziert wird. Die physiologischerweise vorhandenen NO-Konzentrationen sind jedoch in der Lage, den Einfluss einer gesteigerten CO-Verfügbarkeit auf Leberperfusion und Leberregeneration zu kompensieren.
 11. Diese Beobachtungen legen nahe, dass bei der Suche nach Optionen zur Förderung der Leberregeneration in den klinisch relevanten Problemsituationen der ausgedehnten Leberresektion sowie der Transplantation von „small-for-size“-Transplantaten auch die Interaktionen der vasoaktiven Enzymsysteme HO-1 und NOS in Betracht gezogen werden sollten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Hannover, 19. Dezember 2008

Harald Schütt