

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie  
der Universitätsmedizin Rostock

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Stickstoffmonoxid beschleunigt die Regeneration  
und mindert den Organschaden der „reduced-size“-Leber  
durch verbesserte hepatoarterielle Blutversorgung



Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von:  
Daniel Cantré

Rostock, Mai 2014

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

Datum der Einreichung: 23.05.2014

Datum der öffentlichen Verteidigung: 18.11.2014

1. Gutachter:

Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Institut für Experimentelle Chirurgie und Zentrale Versuchstierhaltung

Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Herr Prof. Dr. med. Ernst Klar

Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie

Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Herr Prof. Dr. med. Hans K. Schackert

Abteilung Chirurgische Forschung

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Geschichte der Leberforschung.....	5
1.2 Leberchirurgie.....	7
1.3 Leberregeneration.....	9
1.4 Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen.....	13
2 Ziel der Studie.....	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Versuchstiere.....	17
3.2 Experimentelles Modell der 85% Hepatektomie.....	17
3.3 Experimentelles Protokoll.....	20
3.3.1 Studienabschnitt A: Hepatische Makro- und Mikrohämodynamik.....	21
3.3.1.1 Anästhesie und Präparation.....	21
3.3.1.2 Hämodynamik I.....	22
3.3.1.3 Hämodynamik II.....	25
3.3.2 Studienabschnitt B: Leberregeneration und Organintegrität.....	25
3.4 Untersuchungstechniken.....	28
3.4.1 Monitoring der Makro- und Mikrohämodynamik.....	28
3.4.1.1 Ultraschall-Laufzeitverfahren.....	28
3.4.1.2 Laser-Doppler-Verfahren.....	29
3.4.1.3 Messung des Sauerstoffpartialdrucks.....	29
3.4.1.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	29
3.4.1.4.1 Sinusoid- und Venolendurchmesser (d).....	32
3.4.1.4.2 Blutfließgeschwindigkeit (vRBC).....	32
3.4.1.4.3 Blutvolumenfluss (VQ).....	32
3.4.1.4.4 Scherstress ( $\tau$ ).....	33
3.4.2 Parameter des Leberschadens, der Organintegrität und der Leberregeneration.....	34
3.4.2.1 Serumanalytik.....	34
3.4.2.2 Immunhistochemie von BrdU.....	34
3.4.2.3 Proteinanalytik von PCNA.....	35
3.5 Statistik.....	37
4 Ergebnisse.....	38
4.1 Makrohämodynamik nach 85% Hepatektomie.....	38
4.2 Mikrohämodynamik nach 85% Hepatektomie.....	41
4.2.1 Perfusion des Leberparenchyms.....	41

4.2.2	Gewebeoxygenierung des Leberparenchyms.....	42
4.2.3	Mikrohämodynamik der Lebersinusoide.....	42
4.2.3.1	Sinusoidale Blutfließgeschwindigkeit.....	42
4.2.3.2	Sinusoidaler Gefäßdurchmesser.....	42
4.2.3.3	Sinusoidaler Blutvolumenfluss.....	43
4.2.3.4	Sinusoidaler Scherstress.....	44
4.2.4	Mikrohämodynamik der postsinusoidalen Venolen.....	44
4.2.4.1	Venoläre Blutfließgeschwindigkeit.....	44
4.2.4.2	Venolärer Gefäßdurchmesser.....	44
4.2.4.3	Venolärer Blutvolumenfluss.....	45
4.2.4.4	Venolärer Scherstress.....	46
4.3	Leberschaden und Organintegrität.....	47
4.3.1	Serumanalytische Parameter des Leberschadens und der Organintegrität.....	47
4.3.1.1	Transaminasen.....	47
4.3.1.2	Dehydrogenasen.....	48
4.3.1.3	Bilirubin.....	50
4.4	Leberregeneration.....	51
4.4.1	Nachweis der DNA-Synthese mittels BrdU.....	51
4.4.2	Expression von PCNA.....	52
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	53
5	Diskussion.....	55
5.1	Diskussion von Material und Methoden.....	55
5.1.1	Diskussion des Modells.....	55
5.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken.....	57
5.1.2.1	Chirurgische Präparation.....	57
5.1.2.2	Pharmakologische Behandlung.....	58
5.1.2.3	Anästhesie.....	59
5.1.2.4	Hämodynamische, laborchemische und immunhistochemische Parameter.....	62
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	67
5.2.1	Hepatische Makro- und Mikrohämodynamik.....	67
5.2.2	Leberschaden und Leberfunktion.....	75
5.2.3	Leberregeneration.....	78
5.3	Schlussfolgerungen und klinischer Ausblick.....	83
	Literaturverzeichnis.....	86
	Thesen zur Dissertation.....	97
	Lebenslauf.....	100
	Danksagung.....	103
	Eidesstattliche Erklärung.....	105

## Glossar

ABC	ATP-Binding Cassette
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BrdU	Bromodesoxyuridin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CCD	„charge coupled device“
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
d	Gefäßdurchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	„epidermal growth factor“
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET-1	Endothelin-1
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMN	Flavinmononukleotid
GLDH	Glutamatdehydrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
HABR	„hepatic arterial buffer response“
HGF	„hepatic growth factor“
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
Kon	Kontrollgruppe
L-NAME	N $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester
L-NNA	N $\omega$ -Nitro-L-Arginin
LDH	Lactatdehydrogenase
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure

---

MRP-2	„multi-drug-resistance-protein 2“
mtNOS	mitochondriale Stickstoffmonoxid-Synthase
N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid, Lachgas
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	„nuclear factor ' <i>kappa</i> -light-chain-enhancer' of activated <i>B</i> -cells“
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO-	Versuchsgruppe mit Hemmung der NO-Synthasen
NO+	Versuchsgruppe mit NO-Substitution
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS-1	siehe nNOS
NOS-2	siehe iNOS
NOS-3	siehe eNOS
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid-Anion
OATP 1	„organic anion transporting polypeptide 1“
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonukleinsäure
sGC	lösliche („soluble“) Guanylatcyclase
Sham	[engl. fingiert, vorgetäuscht] Versuchsgruppe ohne 85% Hepatektomie
SIN-1	3-Morpholino-Syndominin
TGF-α	„transforming growth factor – alpha“
TGF-β	„transforming growth factor – beta“
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor – alpha
TNFR1	Tumornekroserezeptor 1
v	Geschwindigkeit
VQ	Volumenfluss
V <sub>RBC</sub>	Geschwindigkeit der roten Blutkörperchen („red blood cells“)
η	Viskosität
T	Scherstress

## Zusammenfassung

Lebertransplantation oder Leberresektion sind häufig die letzten verbleibenden kurativen Therapieoptionen bei schwerwiegenden Lebererkrankungen. Aufgrund der knappen Ressourcen an Spenderorganen sind Split-Transplantate und Leber-Lebendspende als Optionen etabliert. Auch ausgedehnte Leberresektionen führen zu einer „reduced-size“-Leber. In dieser Situation profitiert die Leber von ihrer für ein hoch differenziertes Organ bemerkenswerten Fähigkeit zur Regeneration. Die Leberregeneration nach ausgedehnter Hepatektomie ist ein präzise regulierter Prozess. Angestoßen durch den akuten Massenverlust, einhergehend mit portaler Hyperperfusion und erhöhtem sinusoidalen Scherstress, initiieren mehrere teils redundante Messenger-Kaskaden den Regenerationsprozess, welcher in der Mitose adulter Hepatozyten gipfelt. Dabei wird durch Regeneration der nicht-parenchymatösen Zellen auch die hepatische Mikroanatomie vollständig wiederhergestellt und der Prozess präzise dann terminiert, wenn das für den Organismus ideale Verhältnis von Organ- zu Körpermasse erreicht ist. Der erhöhte sinusoidale Scherstress wird nicht nur als zentraler Trigger der Regenerationskaskaden angesehen. Er wird andererseits auch bei grenzwertig kleinen Restlebern oder Transplantaten für die Entwicklung eines Hyperperfusionsschadens verantwortlich gemacht, welcher zu einem akuten postoperativen Organversagen, dem sogenannten „small-for-size“-Syndrom führen kann. Weitere charakteristische Veränderungen der „reduced-size“-Leber können zum Organversagen beitragen, wie die durch intrinsische Regulationsmechanismen hervorgerufene hepatoarterielle Minderperfusion. Eine wichtige Rolle für die hämodynamischen Veränderungen nach Resektion spielen die vasoaktiven Mediatoren der Leber, wobei ein Ungleichgewicht zu Ungunsten des vasodilatativen Mediators Stickstoffmonoxid (NO) entstehen kann.

Zur Untersuchung des Einflusses von NO auf die Hämodynamik der „reduced-size“-Leber, sowie auf Leberschaden und Regeneration wurde in einem tierexperimentellen Modell der 85% Hepatektomie an der Wistar-Ratte durch pharmakologische Behandlung entweder eine NO-Substitution mittels Molsidomin oder eine Blockade der NO-Synthasen mittels L-NAME vorgenommen.

Durch Ultraschallflussmessungen an Pfortader und Leberarterie konnte in allen Gruppen nach Hepatektomie die portalvenöse Hyperperfusion nachgewiesen werden. Während in pharmakologisch unbehandelten oder NOS-inhibierten Tieren die hepatoarterielle Versorgung wie erwartet nach Resektion signifikant sank, blieb unter NO-Substitution die hepatoarterielle Minderperfusion aus. Die intravitalmikroskopische Quantifizierung der Mikrohämodynamik zeigte, dass der sinusoidale Scherstress sowohl als Regenerationstrigger als auch als potenzieller Verursacher eines Hyperperfusionsschadens unverändert erhalten blieb. Trotz unveränderter Wandscherraten war jedoch durch die NO-Substitution der Leberschaden bereits unmittelbar postoperativ und auch 24 h nach Hepatektomie signifikant reduziert, wie die laborchemische Bestimmung der Transaminasen und Dehydrogenasen im Serum belegt. Bei der immunhistochemischen Auswertung der mittels BrdU-Inkorporation nachgewiesenen DNA-Synthese zeigte sich eine Verdoppelung der BrdU-positiven Hepatozyten unter NO-Substitution im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

Somit konnte gezeigt werden, dass die NO-Substitution mittels Molsidomin die hepatoarterielle Perfusion der „reduced-size“-Leber und damit die Versorgung mit sauerstoffreichem Blut verbesserte. Dies führte zu einem deutlich abgemilderten Leberschaden und zu einer zweifachen Steigerung der hepatozytären Proliferation nach Leberresektion. Vor dem Hintergrund unveränderten sinusoidalen Scherstressess sollten die Ursachen des Hyperperfusionsschadens der „reduced-size“-Leber neu diskutiert werden, wobei der hepatoarteriellen Minderversorgung gegenüber der rein mechanischen Schädigung anscheinend eine größere als bisher angenommene Rolle zukommt. Die nicht invasive Prophylaxe und Therapie des „small-for-size“-Syndroms durch NO-Substitution mit Erhalt der hepatoarteriellen Sauerstoffversorgung der „reduced-size“-Leber bietet einen vielversprechenden Ansatz, die Sicherheit ausgedehnter Leberresektionen und Transplantationen kleiner Organteile zu verbessern.



## Summary

Liver transplantation or liver resection frequently represent the last curative option in the therapy of severe liver disease. Split-liver transplantation and living donor liver transplantation have been established to overcome the scarce resources on organs from deceased donors. Extended liver resection may also lead to organs of diminished size. The reduced-size liver profits from its remarkable capability to regenerate, a unique feature for highly differentiated tissues. The process of liver regeneration after liver resection is precisely regulated. Triggered by the acute loss of organ mass, accompanied by portal venous hyperperfusion and elevated sinusoidal shear stress, several redundant messenger cascades initiate the regeneration process, culminating in mitosis of adult hepatocytes. Furthermore, complete regrowth of the hepatic microarchitecture is achieved by proliferation and organization of non parenchymal cells. Liver regeneration is terminated precisely at the point when an ideal organ to body weight ratio is achieved. Elevated sinusoidal shear stress is not exclusively regarded a vital trigger of regeneration cascades. In residual livers or transplants of particular small size, elevated sinusoidal shear stress is also held responsible for the formation of hyperperfusion injury, leading to postoperative organ failure, labelled the „small-for-size“-syndrome. As a further characteristic property of the reduced-size liver, intrinsic vascular compensatory mechanisms cause diminished hepatic arterial perfusion, which may also contribute to organ failure. Vasoactive substances play an important role for changes in hemodynamics after liver resection, whereupon an imbalance in mediators may occur, which is detrimental for vasodilative nitric oxide (NO) levels.

For the evaluation of the influence of NO on the reduced-size liver's hemodynamics, organ damage and regeneration, an animal model of 85% hepatectomy using Wistar-rats was established. NO-levels were altered pharmacologically by either substitution of NO via Molsidomine or by blocking the NO-synthases via L-NAME.

Ultrasound flowmetry of portal veins and hepatic arteries confirmed portal hyperperfusion in all groups after liver resection. In both pharmacologically untreated and NOS-inhibited groups, hepatic arterial flow significantly decreased after liver resection, as expected. Substitution of NO on the

other hand counteracted the hepatoarterial hypoperfusion. Quantification of the liver's microhemodynamics, as achieved by intravital microscopy, showed that sinusoidal shear stress was not affected, implying it was unaltered both as a trigger of liver regeneration as well as a potential cause of hyperperfusion injury. Despite comparable wall shear rates, substitution of NO caused a reduction of liver damage both early after surgery as well as 24 h after hepatectomy, as shown by reduced plasma levels of transaminases and dehydrogenases. Immunohistochemical evaluation of BrdU-incorporation to depict DNA-synthesis showed a two-fold increase in hepatocyte proliferation under substitution of NO, compared to untreated controls.

Thus, the present study revealed that substitution of NO via Molsidomine enhanced hepatic arterial perfusion and therefore administration of oxygen-rich blood to the reduced-size liver, leading to attenuated liver damage and a remarkable two-fold increase in hepatocyte proliferation after liver resection. Sinusoidal shear stress, on the other hand, did not change significantly. Therefore, the causes of the reduced-size liver's hyperperfusion injury should be reconsidered, apparently focusing more on the contribution of hepatic arterial hypoperfusion than physical damage alone. Non invasive prophylaxis and therapy of the small-for-size syndrome through substitution of NO, preserving the reduced size liver's hepatic arterial oxygen supply, provides a promising approach to help making excessive liver resection or transplantation of small organ parts a safer choice in the future.

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte der Leberforschung

Die Geschichte der Leberforschung überspannt ausgehend von den ersten Überlieferungen mystischer und mythologischer Auseinandersetzung mit dem Organ bis zum heutigen wissenschaftlichen Verständnis Jahrtausende (Chen und Chen 1994; Reuben 2004). Die Entdeckung und systematische Erforschung der für ein hoch differenziertes Organ einzigartigen Regenerationsfähigkeit der Leber ist dagegen eine Leistung der Moderne (Power und Rasko 2008).

Der französische Chirurg und Medizinhistoriker Bonnichon teilt die Geschichte der Leberforschung in sieben Kapitel ein. Altertum und Mittelalter werden dabei in drei Kapiteln abgehandelt, während die Mehrzahl der Kapitel, der rasanten Entwicklung angemessen, in der Neuzeit angesiedelt sind. Hier wird deutlich, wie in vergleichsweise schneller Folge die Leber in der Renaissance „wiederentdeckt“, dann zunächst sporadisch reseziert wurde, wie zügig die Grundlagen der modernen Leberchirurgie erarbeitet und schließlich elektive Leberresektionen und als Höhepunkt Lebertransplantationen beherrschbar wurden (Bonnichon 2007).

Im antiken Griechenland gelang es in den Jahrhunderten um den Beginn unserer Zeitrechnung grundlegende leberanatomische Kenntnisse zu gewinnen, die für weitere eineinhalb Jahrtausende unangefochten bleiben sollten. Waren die anatomischen Kenntnisse der antiken Griechen bereits außerordentlich präzise, bewegten sie sich mit einer philosophisch abgeleiteten Physiologie noch weit von der Realität (McClusky et al. 1997). Erst der Geist der Renaissance und Aufklärung erhob die Medizin endgültig zur empirischen Wissenschaft, die es erlaubte, das althergebrachte medizinische Wissen in Frage zu stellen, den menschlichen Körper wieder zum Forschungsobjekt zu machen und so auch das Interesse an der Leber wieder zu entdecken. Meilensteine waren die anatomischen Studien Vesalius' (1514-1564) (Sherzoi 1999; Toledo-Pereyra 2008), die Begründung der wissenschaftlichen Chirurgie durch den deutschen Wundarzt Wilhelm Fabry (1560-1634) (Hoffmann 1960), dem auch eine der ersten erfolgreichen posttraumatischen Leberteilresektionen zugeschrieben wird (Hardy 1990) und die Entdeckung des

großen Blutkreislaufs durch William Harvey (1578-1657) (Töply 1910). Francis Glisson (1596-1677) begründete mit seinem Werk *Anatomica Hepatis* die Hepatologie (van Gulik 1990).

Zwar wurden bereits seit dem 17. Jahrhundert sporadisch posttraumatische Leberteilresektionen durch Militärärzte beschrieben, geplante abdominale Eingriffe konnten jedoch erst erfolgreich durchgeführt werden, nachdem Ether-Anästhesie und Antisepsis Ende des 19. Jahrhunderts entwickelt worden waren (Hardy 1990; Dionigi 2009; McClusky et al. 1997; Lehmann und Clavien 2010). Carl Langenbuch konnte neben anatomischen und tierexperimentellen Untersuchungen auch auf Erfahrungen im Deutsch-Französischen Krieg zurückblicken, als er im Jahr 1882 die erste elektive Cholezystektomie und im Jahr 1887 die erste elektive Leberteilresektion erfolgreich durchführte (Chauvin und O’Leary 1995; Fan und Chang 2002). Der nun folgende Weg zu Routineeingriffen in der Viszeralchirurgie war eng verknüpft mit den Leistungen der Industrialisierung. Nicht nur die erwähnte Ether-Anästhesie und Antisepsis, auch verbessertes Instrumentarium half, die Rahmenbedingungen erheblich zu verbessern. Durch anatomische, physiologische und chirurgische Forschung konnten das Wissen über die Leber vertieft und verbesserte chirurgische Verfahren entwickelt werden. Unzählige Innovationen wie das Pringle Verfahren zur temporären Blutungskontrolle, die Beschreibung der Segmentanatomie der Leber durch Couinaud und nicht zuletzt tierexperimentelle Forschungsarbeiten spielten hierbei eine wichtige Rolle (Pringle 1908; Couinaud 1954; Sutherland und Harris 2002). Tierexperimentelle Studien waren es auch, welche die nach heutiger Kenntnis zuerst von Cruveilhier und Andral in den 1830er Jahren postulierte These zur Leberregeneration bestätigen konnten (Power und Rasko 2008). Tillmanns, Gluck und Ponfick leisteten dabei Pionierarbeit (Hardy 1990). Schließlich etablierten Higgins und Anderson 1931 ein tierexperimentelles Standardmodell zur Erforschung der Leberregeneration, die Leberteilresektion an der Ratte (Higgins 1931).

Nach Bonnichon befinden wir uns heute im siebten Kapitel der Leberforschung, deren Höhepunkt die Lebertransplantation ist. Die aktuelle Entwicklung zeichnet sich außerdem durch zunehmend ausgedehntere Resektionen (Vauthey et al. 2005; Shimada et al. 2006; Mullin et al. 2005), die Transplantation immer kleinerer Organe und Organteile (Deshpande et al. 2002), die Leberlebendspende (Broelsch et al. 2008; Florman und Miller 2006), externe

Leberunterstützungsverfahren (Mitzner et al. 2009; Zhao et al. 2012; Banares et al. 2013) und die Nutzung molekulargenetischer Immuntherapien aus (Kemmer und Neff 2010; Varo Pérez und Castroagudín 2010). Gleichzeitig werden aktuell vielversprechende neue Verfahren entwickelt und Therapiemöglichkeiten erforscht, die in der Lage sein könnten, ein neues Kapitel der Leberforschung aufzuschlagen. Verfahren zur Unterstützung der Leberregeneration (Melo et al. 2005; Li et al. 2005; Cantré et al. 2008), Stammzelltherapien (Oertel und Shafritz 2008; Dalgetty et al. 2009; Flohr et al. 2009; Subba Rao et al. 2013), die Neogenese von Hepatozyten bzw. die Differenzierung hepatozytenähnlicher Zellen (Riquelme et al. 2009; Wu und Tao 2012; Lee et al. 2012) und Bioengineering von Neorganen (Fukumitsu et al. 2011) sind der Stoff für ein achtes Kapitel der Leberforschung, welches die Überschrift tragen könnte: „Die regenerierte Leber“.

## 1.2 Leberchirurgie

Die Leberchirurgie ist ein gewichtiges Gebiet der Viszeralchirurgie, denn sie bietet oftmals die einzig verbleibende therapeutische Option in der Behandlung schwerer primärer Lebererkrankungen. Auch bei sekundärer Beteiligung insbesondere durch viszerale Malignome ist die Leberchirurgie ein therapeutischer Grundpfeiler. Leberresektionen, genau genommen die vollständige Entfernung des tumortragenden Organanteils mit entsprechendem Sicherheitsabstand, gehören bei malignen Lebertumoren und Lebermetastasen zu den Grundbedingungen einer kurativen Therapie (Sasaki et al. 2013; Marin et al. 2013). Aber auch beim Tumor-Downstaging zum Beispiel vor Lebertransplantation kann die Resektion eine wichtige Rolle spielen (Belghiti et al. 2003). Darüber hinaus werden auch bei Komplikationen primär benigner Leberläsionen, wie beispielsweise der fokalen nodulären Hyperplasie, bei Zoonosen sowie bei schweren traumatischen Lazerationen teils ausgedehnte Resektionen durchgeführt (Buell et al. 2010; Craig 2003; Peitzman und Marsh 2012). Die Lebertransplantation ist die *ultima ratio* in der Behandlung sowohl einer heterogenen Gruppe schwerwiegender Lebererkrankungen, wenn ein dauerhafter Funktionsverlust droht oder bereits eingetreten ist, als auch ausgedehnter, nicht resezierbarer primärer Lebertumore (Lopez und Martin 2006; Shimada et al. 2006).

Sowohl die Leberresektion als auch die Lebertransplantation stellen die moderne Leberchirurgie vor große Herausforderungen. Bei der Leberresektion stellt sich die Frage nach der Grenze des Resektionsausmaßes. In der Tumorchirurgie primärer oder sekundärer Lebertumore ist dieses bestimmt durch Tumormasse und -dissemination (Lupinacci et al. 2007). Moderne chirurgische Techniken, wie zum Beispiel die Pfortaderembolisierung vor Hepatektomie (Yokoyama et al. 2007; Simoneau et al. 2012) oder die kombinierte Radiofrequenz- oder Kryoablation (Paschos und Bird 2008), konnten die Definition der Resektabilität erweitern und ermöglichen kurative Therapieansätze sogar für Patienten mit multiplen bilobären Tumoren (Vauthey et al. 2005; Shimada et al. 2006). Dabei gilt es nach wie vor als schwierig, die richtige Balance zu finden zwischen der sicheren Entfernung des Tumorgewebes mit entsprechendem Sicherheitsabstand und ausreichender residualer Organmasse (Mullin et al. 2005; Sasaki et al. 2013). In der Lebertransplantation stellt heute die Akquisition geeigneter Organe die größte Herausforderung dar, da Patienten auf Organwartelisten die Zahl verfügbarer Spenderorgane weit übersteigen (Ghobrial und Busuttil 2006). Um der großen Nachfrage nach Spenderorganen besser nachkommen zu können, wurde die Splitlebertransplantation entwickelt, bei der ein Spenderorgan auf zwei passende Empfänger aufgeteilt werden kann (Lopez und Martin 2006). Auch die Lebendspende wird angesichts der nach wie vor stagnierenden Spenderzahlen zunehmend propagiert (Fan 2006). Dabei besteht außer für den Empfänger auch für den Lebendspender ein geringes Risiko für ein postoperatives Leberversagen, das aber mit der Größe des gespendeten Leberanteils zu steigen scheint (Muzaale et al. 2012).

Alle genannten leberchirurgischen Verfahren können zu einer „reduced-size“-Leber führen, die ein deutlich reduziertes Verhältnis von Organmasse zur Körpermasse besitzt. Daher profitieren alle diese Verfahren von der einzigartigen Fähigkeit der Leber, verlorene Organmasse durch Regeneration zu ersetzen. Durch Regeneration können „reduced-size“-Restlebern oder -Transplantate das für den jeweiligen Patienten spezifische Organ- zu Körpermasseverhältnis und damit die bestmögliche Organfunktion wiederherstellen (Michalopoulos und DeFrances 1997; Fausto et al. 2006). Doch auch die Fähigkeit zur Leberregeneration besitzt Grenzen. Für Organe oder Transplantate, die ein bestimmtes kritisches Masseverhältnis unterschreiten, steigt das Risiko

eines Organverlusts durch akuten Leberschaden. Man spricht bei dieser gefürchteten Komplikation vom „small-for-size“-Syndrom, welches auftritt, wenn die „reduced-size“-Leber der starken Hyperperfusion, der Aufrechterhaltung einer minimalen Restfunktion und der gleichzeitig ablaufenden Regeneration nicht mehr gerecht werden kann (Dahm et al. 2005; Gonzalez et al. 2010).

### 1.3 Leberregeneration

Seit Cruveilhier und Andral Anfang des 19. Jahrhunderts die Leberregeneration postulierten und Higgins und Anderson ihr tierexperimentelles Modell vorstellten, wird die Leberregeneration systematisch erforscht (Higgins 1931). Über 5800 Originalarbeiten und Reviews liefert die Pubmed-Suche in einschlägigen Datenbanken unter dem Suchbegriff „liver regeneration“ allein für die letzten zwei Jahrzehnte. Doch trotz der aktuellen Möglichkeiten von breit verfügbaren experimentellen Modellen bis hin zu molekulargenetischen Analysemethoden wird der hoch komplexe Vorgang noch nicht vollständig verstanden (Carnovale und Ronco 2012).

Der biologische Regenerationsbegriff ist in seinen vielen Facetten unscharf definiert und lässt sich verallgemeinernd am ehesten als Prozess zur „Wiederherstellung oder Neubildung eines verlorenen oder verletzten Teils“ eines Organismus definieren (Carlson 2007). Im Sinne dieser Definition besitzt die Leber die für ein hochdifferenziertes parenchymatöses Organ bemerkenswerte Fähigkeit, einen Parenchymverlust durch Regeneration exakt auszugleichen (Diehl und Rai 1996b). Dabei wird jedoch nicht der fehlende Organteil in seiner ursprünglichen Makrostruktur wiederhergestellt, sondern die verlorene Organmasse in erster Linie durch kompensatorische Hyperplasie der Restleber ausgeglichen, wobei auch die hepatische Mikrostruktur einschließlich nicht-parenchymatöser Gewebe und die Funktion vollständig wiederhergestellt werden (Steer 1995). Welche Zellen und Zellkompartimente an der Regeneration im einzelnen beteiligt sind, ist Gegenstand zahlreicher aktueller Studien und wird teils kontrovers diskutiert (Fausto et al. 2012; Furuyama et al. 2011). Hierbei stellt sich insbesondere die Frage, inwieweit neben adulten Hepatozyten auch Stamm- und Progenitorzellen der Leber selbst,

benachbarter parenchymatöser Organe und auch Knochenmarkstammzellen einen Beitrag zur Leberregeneration leisten (Duncan et al. 2009). Erst kürzlich konnten Willenbring et al. ein Modell etablieren, das anhand der Expression eines fluoreszierenden Proteins durch adulte Hepatozyten die Herkunft regenerierter Hepatozyten nachvollziehen lässt. Tochterzellen der adulten Hepatozyten exprimieren hierbei ebenfalls das fluoreszierende Protein, wohingegen aus Progenitorzellen rekrutierte Hepatozyten dieses markierte Protein nicht besitzen. An der Maus konnte gezeigt werden, dass sowohl nach akutem toxischen Leberschaden als auch nach 2/3 Leberresektion etwa 99% der neuen Hepatozyten von residualen adulten Hepatozyten abstammten (Malato et al. 2011). Progenitorzellen scheinen somit eine untergeordnete Rolle für die Hepatozytenregeneration zu spielen, wenn ausreichend viele vitale adulte Hepatozyten zur Verfügung stehen. Diese Ergebnisse erhärten die These, dass der Ersatz der Leberparenchymzellen im Normalfall durch Zellteilung der differenzierten Hepatozyten selbst ohne nachweisbare Beteiligung von Stamm- oder Progenitorzellen stattfindet (Farber und Gerson 1984; Wagers et al. 2002). Es wird angenommen, dass Stamm- und Progenitorzellen, wie die hepatische Ovalzelle, eine Regenerationsreserve für ausgedehnte Parenchymverluste durch massive toxische Schädigung oder extreme „reduced-size“-Lebern darstellen, wenn die vitalen adulten Hepatozyten in der Zahl so massiv reduziert sind, dass sie der Aufrechterhaltung einer Restfunktion und der gleichzeitigen Regeneration nicht mehr gerecht werden können (Fausto et al. 2006; Dabeva und Shafritz 1993; Fujita et al. 2000; Lowes et al. 1999). Stammzellen des Knochenmarks spielen dagegen auch im Normalfall eine wichtige Rolle, jedoch hauptsächlich beim Ersatz nicht-parenchymatöser Leberanteile. Es gilt beispielsweise als erwiesen, dass Kupffer-Zellen und Sinusendothelzellen sich aus Knochenmarkstammzellen rekrutieren (Fujii et al. 2002). Hepatozyten und Ovalzellen können zwar ebenfalls aus Knochenmarkstammzellen differenziert werden, dies wird jedoch *in vivo* als Rarität angesehen (Fausto und Campbell 2003)

Adulte Hepatozyten haben eine Lebensspanne von 150 bis 450 Tagen (Malik et al. 2002). Der normale Zellumsatz einer gesunden, nicht regenerierenden Leber spiegelt sich daher wider in einer hepatozytären Mitoserate zwischen 1/20000 und 1/1000 (Steer 1995; Diehl und Rai 1996a). Für den einzelnen Hepatozyten konnte dabei gezeigt werden, dass ein mitotisches Potential von



bis zu 70 konsekutiven Zellteilungen besteht (Sandgren et al. 1991). Diese regenerative Reserve ist so groß, dass ein einzelner Hepatozyt theoretisch ausreichen würde, um die gesamte Leber eines Kleinnagers durch Zellteilung zu ersetzen (Fausto und Riehle 2005). Hepatozyten bilden die Hauptzellpopulation der Leber mit einem Masseanteil von ca. 80% und können nach einem entsprechenden Regenerationsreiz in den Zellzyklus eintreten. Nach 2/3 Hepatektomie reichen im Durchschnitt ein bis zwei Zellteilungen, theoretisch 1,66 Zellzyklen pro Hepatozyt aus, um die Lebermasse vollständig wiederherzustellen (Taub 2004; Michalopoulos und DeFrances 1997). Die Beteiligung sowohl der einzelnen Hepatozyten als auch verschiedener lobulärer Hepatozytensubpopulationen an der Regeneration ist dabei jedoch nicht homogen verteilt. Anhand von sequenziellen Injektionen unterschiedlich markierter Nukleotidanaloga gelang es Wu et al. an einem Rattenmodell der Leberteileresektion, die zeitliche Abfolge der Replikation in Bezug auf die lobuläre Lokalisation von Hepatozytenpopulationen sowie auch die tatsächlich erfolgten Zellteilungen einzelner Hepatozyten nachzuvollziehen. Es konnten drei Subpopulationen von Hepatozyten identifiziert werden, die von periportal nach zentrilobulär schrittweise jeweils synchronisiert replizierten. Etwa 15% der Zellen traten überhaupt nicht in den Zellzyklus ein und etwa 11% teilten sich mindestens dreimal. Da für eine Subpopulation ein und derselben lobulären Zone vergleichbare extrinsische Regenerationsreize angenommen werden können, ist die Entscheidung, ob der einzelne Hepatozyt tatsächlich die Transition von der  $G_0$  in die  $G_1$ -Phase vollzieht und wie oft der Zellzyklus durchlaufen wird, offenbar autonom auf Ebene der individuellen Zelle geregelt (Wu et al. 2011).

Der Prozess der Leberregeneration umfasst mindestens drei Signalpfade, die sich gegenseitig beeinflussen und darüber hinaus große Redundanz zeigen (Kandilis et al. 2010). Eine Zytokinkaskade vermittelt das Priming, also die Transition der Hepatozyten von der  $G_0$  in die  $G_1$ -Phase, entsprechend dem ersten Pfad. Die wichtigsten Zytokine sind Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-6 (IL-6). TNF wird dabei hauptsächlich von den Kupfferzellen sezerniert, während IL-6 auch von anderen Zellen der Leber produziert werden kann (Iwai et al. 2001; Nagata et al. 1994). Der von aktivierten Kupfferzellen freigesetzte TNF bindet an seinen Typ-1-Rezeptor (TNFR1), was eine Translokation in den Zellkern und die Aktivierung von „nuclear factor  $\kappa$ B“

(NF- $\kappa$ B) bewirkt. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der seinerseits die Expression von IL-6 induziert. IL-6 ist für die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren verantwortlich, die die Transition  $G_0/G_1$  steuern. Als zweiter Signalpfad steuern Wachstumsfaktoren dann die weitere Transition von der  $G_1$ - zur S-Phase. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren gehören dabei der „hepatocyte growth factor“ (HGF), der hauptsächlich von Ito-Zellen freigesetzt wird, der „transforming growth factor  $\alpha$ “ (TGF- $\alpha$ ), der als autokriner Faktor von Hepatozyten selbst produziert wird und der „epidermal growth factor“ (EGF), der hauptsächlich in Speicheldrüsen gebildet wird. (Mead und Fausto 1989). Drittens wird durch metabolische Steuerungsmechanismen das Wechselspiel zwischen Zellwachstum und Proliferation einerseits und der Leberfunktion andererseits reguliert. Schließlich muss die Proliferationsphase terminiert werden, wenn das regenerierte Organ die funktionellen Anforderungen des Organismus wieder voll erfüllt. Zahlreiche Proteine wirken als inhibierende Faktoren wie zum Beispiel TGF- $\beta$ , hauptsächlich von Ito-Zellen produziert, „plasminogen activator inhibitor“, „suppressor of cytokine signalling-3“ und p27 (Kandilis et al. 2010).

Nach wie vor wird nach einem spezifischen Ausgangspunkt, einem einzelnen auslösenden Regenerationsreiz oder „Trigger“ geforscht (Deng et al. 2009). Die aufgezeigten zum Teil redundanten Signaltransduktionswege und parallele intrazelluläre Messenger-Kaskaden legen jedoch nahe, dass auf molekularer Ebene ein einziger spezifischer „Trigger“ nicht existiert (Michalopoulos 2010). Es ist seit langem bekannt und heute allgemein anerkannt, dass nicht allein humorale Faktoren, sondern vielmehr hämodynamische Veränderungen für die Regulation der Leberregeneration eine essenzielle Rolle spielen (Alston und Thomson 1963). Die Hyperperfusion nach einem Parenchymverlust erscheint dabei als zweiseitiges Schwert. Insbesondere in Form ihrer an den Endothelien wirkenden mechanischen Kraft, dem sogenannten Scherstress, wird sie einerseits als wichtiger Regenerationsreiz angesehen, andererseits jedoch als Hauptursache für ein Organversagen verantwortlich gemacht (Schoen et al. 2001; Sato et al. 1997; Lo et al. 2003; Asakura et al. 2003). Es erscheint daher von großer Bedeutung die hepatische Hämodynamik und ihre Regulationsmechanismen zu beleuchten, um die Leberregeneration besser verstehen zu können. Einer der wichtigsten Mediatoren, der durch erhöhten Scherstress freigesetzt werden

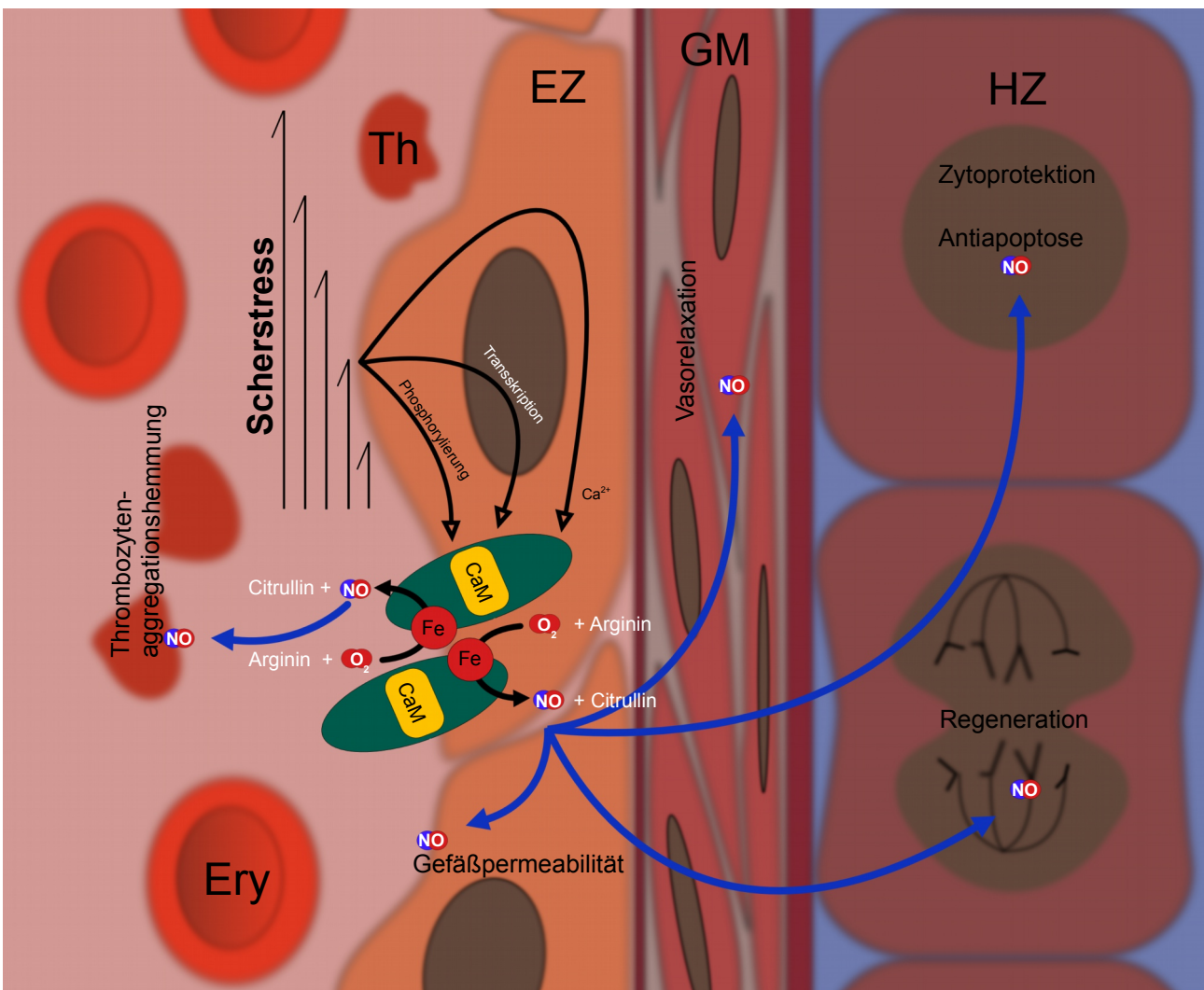
kann, ist Stickstoffmonoxid (NO) (Furchgott und Jothianandan 1991; Buga et al. 1991). Neben seiner vasoregulativen Funktion werden NO auch weitere die Leberregeneration beeinflussende Eigenschaften zugeschrieben, wie z. B. zytoprotektive oder antiapoptotische Wirkungen (Carnovale und Ronco 2012). Daher empfiehlt sich NO als besonders vielseitiger und vielversprechender Mediator der Leberregeneration einer eingehenden Betrachtung.

## 1.4 Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen

Die Bedeutung von NO in erster Linie als vasoregulativer Mediator und seine Freisetzung durch spezifische Synthasen wurden in den 1980er Jahren entdeckt (Moncada et al. 1988, 1991). Diese Erkenntnisse revolutionierten innerhalb kurzer Zeit die Erforschung und Therapie insbesondere kardiovaskulärer Erkrankungen und erwiesen sich als so bahnbrechend, dass Furchgott, Ignarro und Murad 1998 gemeinsam der Medizin-Nobelpreis „für ihre Erkenntnisse über Stickstoffmonoxid als ein Signalmolekül im kardiovaskulären System“ verliehen wurde (Alderton et al. 2001). NO wird heute nicht nur in seiner Funktion als vasoregulativer Mediator in einer Vielzahl von Geweben und Organen untersucht. Insbesondere in der Erforschung der Leberregeneration offenbaren sich weitere Eigenschaften des Moleküls, das auch an der Regulation der Regeneration sowie am Erhalt der Zellintegrität durch Beeinflussung der Apoptose beteiligt ist (Carnovale und Ronco 2012).

Seit den 1990er Jahren sind drei Hauptformen der NO-Synthasen (NOS) bekannt, die nach verschiedenen zellulären Lokalisationen und spezifischen Eigenschaften unterschieden werden (Knowles und Moncada 1994). Die NOS-1 ist die im Nervengewebe vorherrschende Isoform des Enzyms und wird auch als nNOS (n für „neural“) bezeichnet. Sie gilt als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und findet sich hauptsächlich im Zytosol. Die NOS-2 wird in vielen unterschiedlichen Geweben, insbesondere nach zellschädigenden Reizen, exprimiert und daher auch iNOS (i für „inducible“) genannt. Sie kann Calmodulin schon bei sehr geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen binden und gilt daher als  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Auch sie ist hauptsächlich zytosolisch zu finden (Weinberg 1998). Die NOS-3 wird hauptsächlich von Gefäßendothelzellen exprimiert und auch als eNOS (e für „endothelial“)

bezeichnet. Sie bindet Calmodulin wie die nNOS abhängig von der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und gilt daher ebenfalls als  $Ca^{2+}$ -abhängig. Anders als ihre Verwandten ist die eNOS in ihrer aktiven Form hauptsächlich als Membranprotein zu finden (Govers und Rabelink 2001). Neuere Untersuchungen konnten außerdem eine spezielle mitochondriale NOS (mtNOS) nachweisen, die am ehesten einer Splicevariante der nNOS zu entsprechen scheint und eine wichtige Steuerungsfunktion für den Energiemetabolismus besitzt (Carreras und Poderoso 2007).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der endothelialen NO-Synthese (eNOS) in einer hepatischen Arteriole. Scherstress aktiviert die eNOS unter anderem über erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, vermehrte Transkription und Phosphorylierung. Nach Bindung des  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-Komplexes (CaM) und Dimerisierung, sowie mit Hilfe der Co-Faktoren NADPH, FAD, FMN und  $BH_4$  setzt die eNOS ihre Substrate  $O_2$  und L-Arginin an ihrer eisenhaltigen Oxygenasedomäne (Fe) zu NO und L-Citrullin um. Das freigesetzte NO beeinflusst die Hämodynamik durch Thrombozytenaggregationshemmung, erhöhte Gefäßpermeabilität und Relaxation arterieller Gefäße. Es kann außerdem zytoschutzive und antiapoptotische Wirkung auf parenchymatöse Zellen entfalten und an der Regulation der Leberregeneration mitwirken. Ery: Erythrozyten; Th: Thrombozyten, EZ: Endothelzelle; GM: glatte Gefäßmuskulatur; HZ: Hepatozyt. Die Abbildung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit der mannigfaltigen durch NO vermittelten Wirkungen.

Die Isoenzymformen werden zwar auf unterschiedlichen Genen kodiert, weisen jedoch eine gewisse Strukturhomologie auf und gleichen sich insbesondere in ihrem funktionellen Aufbau (Marletta 1994). Als homodimere Molekülverbindungen katalysieren sie die Reaktion von  $O_2$  und L-Arginin zu NO und L-Citrullin. Dafür benötigen alle Isoformen neben einem  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-Komplex die Co-Faktoren Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ), NADPH, FAD, FMN und Häm (Nathan und Xie 1994). Eine der wichtigsten Wirkungen des freigesetzten NO ist die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclyase (sGC) durch Nitrosylierung, wodurch cGMP-vermittelt eine Vasorelaxation erfolgt (Arnold et al. 1977; Friebe und Koesling 2003). Eine Vielzahl anderer nitrosylierbarer Zielmoleküle und die ubiquitär vorhandene sGC ermöglichen weitere, in Abhängigkeit von der Konzentration teils gegensätzliche Wirkungen auf Gefäße und Parenchym (Abbildung 1).

Die Bedeutung von NO für die Leberregeneration wird tierexperimentell hauptsächlich am Modell der 2/3 Leberresektion am Kleinnager untersucht (Schoen et al. 2001). Dieses Resektionsausmaß führt beim Kleinnager zu einer prompt einsetzenden und geradezu ideal zu beobachtenden Regeneration bei für Ratten und Mäuse in der Regel unkompliziert tolerablem Organ- zu Körpermasseverhältnis mit einer zu vernachlässigenden Mortalität. Damit können wichtige Erkenntnisse zur Bedeutung von NO für die Leberregeneration unter standardisierten Bedingungen gewonnen werden (Hortelano et al. 2007). Diese gelten jedoch für ein verhältnismäßig umschriebenes Resektionsausmaß. Dagegen gibt es nur wenige Daten zur Bedeutung von NO während der Regeneration von „reduced-size“-Lebern mit einem grenzwertigen Organ- zu Körpermasseverhältnis und konsekutiv erhöhter Morbidität und Mortalität. Spezifische Kenntnisse der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge dieser „reduced-size“-Lebern sind jedoch essentiell, um den Organverlust durch ein „small-for-size“-Syndrom verhindern zu können und in Zukunft ausgedehnte Leberresektionen und Transplantationen kleiner Organe zu einer sichereren therapeutischen Option zu machen, möglicherweise mit Hilfe externer Unterstützungsverfahren der Leberregeneration (Ikegami et al. 2008; Gruttadauria et al. 2010; Tucker und Heaton 2005).

## 2 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe eines Leberresektionsmodells an der Wistar-Ratte den Einfluss von NO auf Perfusion, Regeneration, Parenchymschaden und Organfunktion der „reduced-size“-Leber zu untersuchen. Das Standardmodell der 2/3 Leberresektion wurde dabei zu einer ausgedehnteren 85% Hepatektomie abgewandelt, um einen relevanten Organschaden bei möglichst geringer Letalität zu erzeugen. Die NO-Freisetzung wurde pharmakologisch moduliert. Multi-modal wurden Parameter der Makro- und Mikrohämodynamik, der Leberregeneration, des Zellschadens und der Organfunktion erfasst.

Die wesentlichen bearbeiteten Fragestellungen waren:

1. Eignet sich das Modell der 85% Hepatektomie an der Wistarratte zur Untersuchung der „reduced-size“-Leber, wird also ein signifikanter Leberschaden verursacht?
2. Beeinträchtigt die 85% Hepatektomie an der Wistarratte die Leberhämodynamik, bzw. lassen sich eine portale Hyperperfusion und vaskuläre Regulationsmechanismen der „reduced-size“-Leber nachweisen?
3. Welchen Effekt zeigt die pharmakologische Modulation der NO-Freisetzung durch NO-Substitution bzw. Blockade der NO-Synthasen auf die portale Hyperperfusion und die hepatoarterielle Versorgung?
4. Spiegeln sich diese Effekte in der hepatischen Mikrozirkulation wider?
5. Lässt sich der hypothetische Hyperperfusionsschaden der „reduced-size“-Leber durch Änderung des sinusoidalen Scherstress beeinflussen?
6. Stellt die 85% Hepatektomie an der Wistarratte einen potenten Regenerationsreiz dar?
7. Welchen Einfluss besitzt die Modulation der NO-Freisetzung einerseits und die Veränderung der Leberhämodynamik andererseits auf den Leberschaden, die Leberfunktion und die Leberregeneration der „reduced-size“-Leber?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten (230-350 g Körpergewicht) durchgeführt. Alle Tiere entstammten einer Zucht (Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland). Sie wurden in klimatisierten Räumen des Instituts für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung der Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Hr. Dr. rer. nat. H. Stein) in Käfigen mit ein bis zwei Individuen bei 12 h Tag-/Nachtrhythmus mit Standardfutter für Ratten und Trinkwasser *ad libitum* gehalten. Die Versuche waren nach dem Tierschutzgesetz §8 (1) genehmigt.

### 3.2 Experimentelles Modell der 85% Hepatektomie

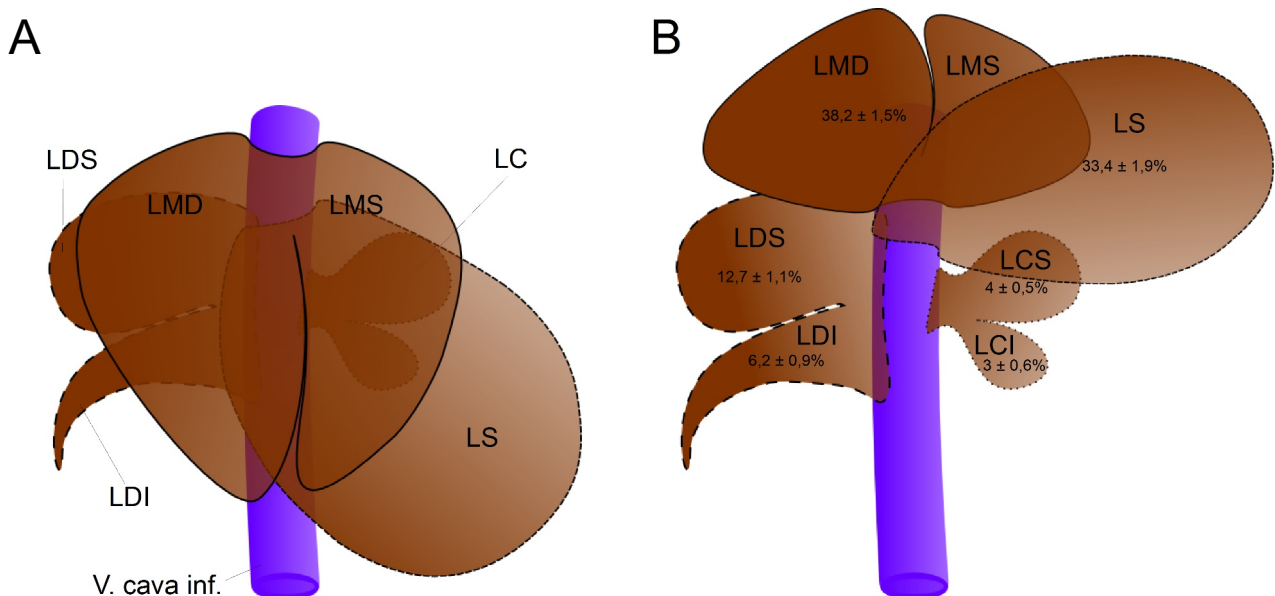
Zur Untersuchung der Wirkung von NO auf die frühen physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge der „reduced-size“-Leber und der folgenden Leberregeneration diente ein Modell der Leberteileresektion an der Ratte (Higgins 1931). Im Vergleich zum Standardmodell der 2/3 Leberresektion wurde dabei das Resektionsausmaß ausgedehnt, um in Anlehnung an Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen den größtmöglichen postoperativen Organschaden ohne gesteigerte Letalität zu erreichen (Dahmen et al. 2008; Debbaut et al. 2012), entsprechend einer 85% Hepatektomie. Um den unterschiedlichen Zeitpunkten der frühen postoperativen Ereignisse und ihrer unmittelbaren Auswirkungen nach 85% Hepatektomie gerecht zu werden, wurde das Experiment in zwei Studienabschnitte gegliedert.

Im Studienabschnitt A erfolgte die Untersuchung der hepatischen Makro- und Mikrohämodynamik direkt im Anschluss an die Hepatektomie. Voraussetzung dazu waren eine gut steuerbare intravenöse Anästhesie, Blutdruckmonitoring, repetitive Blutentnahmen, und ein großflächiger operativer Zugang zum oberen Abdomen.

Im Studienabschnitt B wurden Leberregeneration und Organintegrität 24 h nach Hepatektomie untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist in der Ratte die maximale DNA-Syntheserate erreicht

(Kountouras et al. 2001). Um die interventionsbezogene Letalität möglichst gering zu halten, war hier ein kurzer und wenig invasiver operativer Eingriff unter Inhalationsnarkose mit kleinerem, leicht zu verschließendem Zugang zum Abdomen notwendig. Die eigentliche Leberteilresektion wurde in beiden Versuchsabschnitten identisch vorgenommen.

Die besondere Makroanatomie der Rattenleber mit vier Hauptlappen, von denen drei zusätzlich jeweils zweigeteilt sind, erlaubt in geradezu idealer Weise eine stufenweise Resektion definierten Ausmaßes durch Auswahl derjenigen Lappen, die sich zu dem gewünschten Resektionsumfang addieren lassen (Abbildung 2).

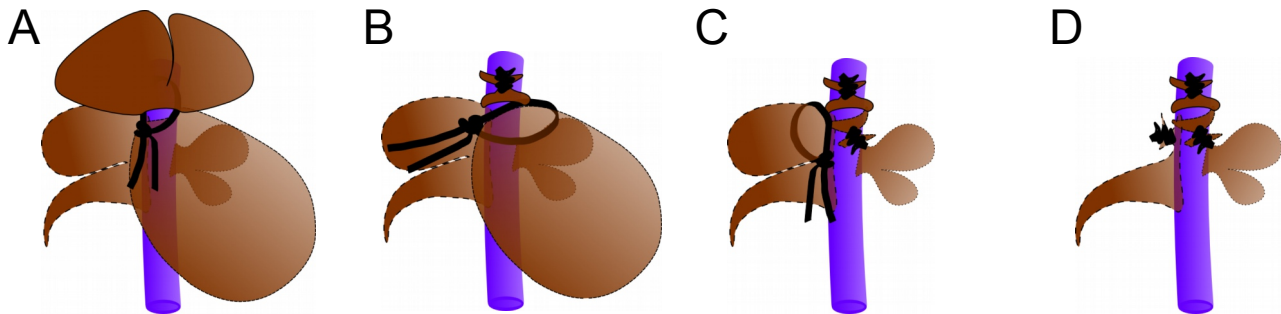


**Abbildung 2:** Makroanatomie der Rattenleber nach Madrahimov et al. (A) dem normalen Situs entsprechend und (B) nach Mobilisierung von Lobus medianus und Lobus sinister. Abkürzungen der lateinischen Lappenbezeichnungen: Lobus medianus dexter (LMD), Lobus medianus sinister (LMS), Lobus sinister (LS), Lobus dexter superior (LDS), Lobus dexter inferior (LDI), Lobus caudatus superior (LCS) und Lobus caudatus inferior (LCI). Angegeben sind in (B) näherungsweise prozentuale Gewichtsanteile der einzelnen Leberlappen männlicher Wistar-Ratten nach Madrahimov et al.. Die Differenz zu 100% entspricht dem paracavalen Parenchymanteil (nicht abgebildet).

Die prozentualen Gewichtsanteile der in dieser Studie zur Resektion vorgesehenen Lobus medianus, Lobus sinister und Lobus dexter superior ergeben dabei mit den verbleibenden avitalen Resektionsstümpfen die 85% Hepatektomie (Madrahimov et al. 2006; Shimizu et al. 2000). Die Leberresektion wurde nach einem etablierten Verfahren schrittweise durchgeführt (Higgins 1931; Dahmen et al. 2008). Der Lobus medianus, der Lobus sinister und der Lobus dexter superior wurden sukzessive mit 4/0-Vicryl-Fäden ligiert und reseziert (Abbildung 3). Die Ligatur erfolgte



möglichst hilusnah, wobei der Lobus dexter superior etwas hilusferner ligiert werden musste, um die Perfusion des benachbarten Leberlappens zu erhalten.



**Abbildung 3:** Stufenweise 85% Hepatektomie der Rattenleber (A bis D). Schrittweise Ligatur des Lobus medianus (A), des Lobus sinister (B) sowie des Lobus dexter superior (C). Es verbleiben Lobus dexter inferior und Lobus caudatus superior und inferior sowie der paracavale Parenchymanteil (nicht abgebildet).

### 3.3 Experimentelles Protokoll

Unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte einhergehend mit unterschiedlichen Operations- und Untersuchungstechniken machten – wie beschrieben – eine Unterteilung in die Studienabschnitte A, Hepatische Makro- und Mikrohämodynamik sowie B, Leberregeneration und Organintegrität nötig. Studienabschnitt A, in dem die Wirkung von NO auf die hepatische Hämodynamik kurz nach 85% Hepatektomie erfasst wurde, war aufgrund verschiedener invasiver apparativer Techniken wiederum zweigeteilt in die Unterabschnitte Hämodynamik I und Hämodynamik II.

Zur besseren Übersicht findet sich am Ende dieses Abschnitts eine schematische grafische Übersicht über die einzelnen Versuchsabschnitte, die im Folgenden näher erläutert werden (Abbildung 5).

In allen Versuchsabschnitten wurden vier Versuchsgruppen untersucht:

1. **NO+**: In dieser Gruppe erfolgte 24 h vor und während der 85% Hepatektomie die Substitution von NO mittels Molsidomin (10 mg/kg KG (i.p.)).
2. **NO-**: In dieser Gruppe wurden vor und während der 85% Hepatektomie die NO-Synthasen mittels L-NAME (L-N $\omega$ -Nitroarginin Methyl Ester; 100 mg/kg KG (i.p.)) gehemmt.
3. **Sham**: Tiere dieser Gruppe erhielten weder eine pharmakologische Vorbehandlung noch eine Leberresektion. Anstelle pharmakologischer Substanzen erhielten sie identische Mengen physiologischer Kochsalzlösung als i.p. Injektion. Die Eingriffe wurden analog zu den anderen Gruppen vorgenommen. Statt der Hepatektomie erfolgte jedoch lediglich eine Manipulation der entsprechenden Leberlappen.
4. **Kon**: Tiere dieser Gruppe wurden der 85% Hepatektomie unterzogen, erhielten jedoch statt pharmakologischer Beeinflussung identische Volumina physiologischer Kochsalzlösung als i.p. Injektion.

### **3.3.1 Studienabschnitt A: Hepatische Makro- und Mikrohämodynamik**

Um die Wirkung von NO auf die hepatische Makro- und Mikrohämodynamik der „reduced-size“-Leber früh nach Hepatektomie zu erfassen, wurden insgesamt 36 Tiere in den Unterabschnitten Hämodynamik I bzw. Hämodynamik II untersucht.

#### **3.3.1.1 Anästhesie und Präparation**

Im ersten Studienabschnitt wurden an entsprechend vorbehandelten Tieren im Unterabschnitt Hämodynamik I leberarterieller und portalvenöser Fluss gemessen, die Perfusion des Leberparenchyms bestimmt, der intrahepatische Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) ermittelt und im Unterabschnitt Hämodynamik II die intrahepatische Mikrozirkulation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (IVM) untersucht.

Nach primärer intraperitonealer (i.p.) Anästhesie mit Pentobarbital (55 mg/kg KG) und Rasur von Hals und Bauch wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert, die durch eine rektale Temperatursonde gesteuert wurde. Die Körpertemperatur der Tiere konnte dadurch während der gesamten Versuchsdauer konstant bei 37 °C gehalten werden.

Nach Hautantiseptik mit Povidoniodlösung, medianer Inzision der Halshaut und stumpfer Separation von Bindegewebe und Halsmuskulatur wurden die Trachea, die rechte V. jugularis interna und die rechte A. carotis communis unter Schonung begleitender Gefäße und Nerven dargestellt. Zur Sicherung der Atemwege wurde ein Polyethylen-Katheter (Innendurchmesser 2 mm) als Trachealkanüle platziert. Die Gefäße wurden mit Polyethylen-Kathetern (Innendurchmesser 0,28 bis 1,0 mm) kanüliert. Der arterielle Katheter diente der repetitiven Blutentnahme zur Blutgasanalyse und dem kontinuierlichen Blutdruckmonitoring zur Narkosesteuerung. Per Pentobarbitalinfusionen im Bolus über den venösen Katheter wurde der arterielle Mitteldruck konstant zwischen 100 und 110 mmHg eingestellt. Der venöse Katheter diente außerdem der Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran, 5%, 0,1 ml/100g KG) zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM).

Nach erneuter Hautantiseptik mit Povidoniodlösung und medianer Laparotomie wurden die

Bauchdecken per zusätzlichem Oberbauchquerschnitt beidseits unter Blutungskontrolle mittels Elektrokauter bis auf den Rippenbogen geteilt. Die proximalen Bauchdeckenlappen wurden mit zwei Haken seitlich aufgespannt, um einen großflächigen Zugang zum Oberbauch herzustellen. Unterbauch und offen liegende Abdominalorgane wurden bis auf Höhe der Leber mit in körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung getränkten Kompressen abgedeckt. Die Leberbänder und Peritonealduplikaturen wurden durchtrennt und die einzelnen Leberlappen unter größtmöglicher Schonung der Organoberflächen mit feuchten Wattetupfern mobilisiert.

Für die Messungen der Blutflüsse in A. hepatica communis und V. portae im Unterabschnitt Hämodynamik I wurden diese Gefäße unter einem Operationsstereomikroskop (Leica MZ6, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) präpariert. Die Darstellung der A. hepatica propria erfolgte direkt nach ihrem Abgang aus der A. hepatica communis. Die Pfortader wurde kurz vor ihrer ersten Aufzweigung freigelegt.

Für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen im Unterabschnitt Hämodynamik II wurde der Lobus caudatus auf ein zur Organunterseite passend modelliertes Plastilinbett ausgelagert und parallel zur Fokusebene des Intravitalmikroskops positioniert.

Nach einer ersten Messphase bzw. den intravitalmikroskopischen Aufnahmen der intakten Leber erfolgte nun die eigentliche 85% Hepatektomie wie beschrieben und im Anschluss daran die definitive Messphase.

### **3.3.1.2 Hämodynamik I**

Im Unterabschnitt Hämodynamik I wurden in  $n = 5$  Tieren je Versuchsgruppe mittels Ultraschall-Laufzeitverfahren die Blutflüsse in der Pfortader und in der Leberarterie gemessen, die hepatische Perfusion durch ein Laser-Doppler-Verfahren bestimmt und der intrahepatische Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) ermittelt. Zum Ausschluss einer anästhesiebedingten respiratorischen Insuffizienz mit systemischer Hypoxie wurde außerdem jeweils nach der Messung des  $pO_2$  eine arterielle Blutgasanalyse vorgenommen. Die Messungen erfolgten in dieser Reihenfolge sukzessive jeweils vor und nach 85% Hepatektomie bzw. der Sham-Manipulation (Abbildung 4, Abbildung 5 A).

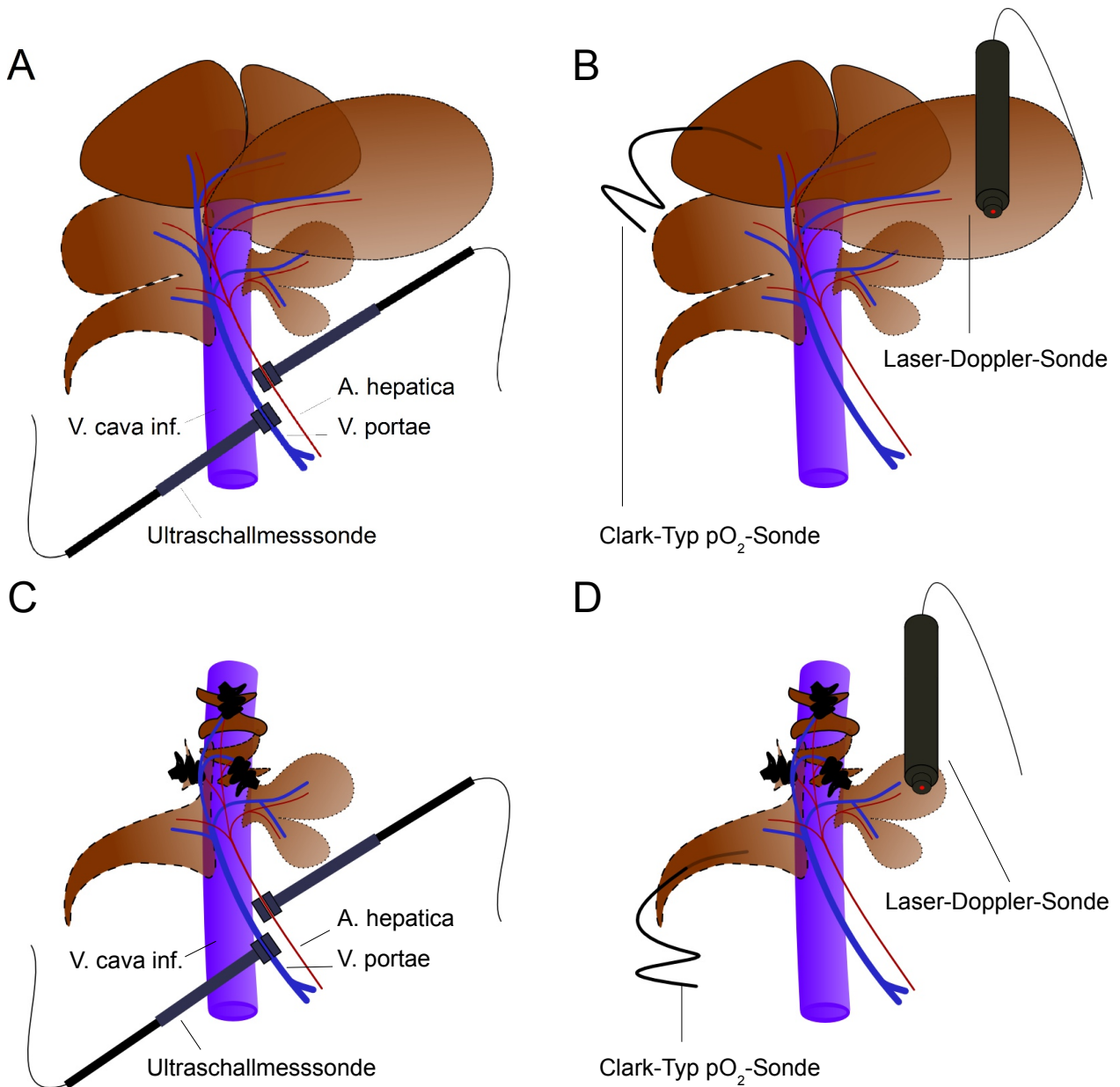
Für den Messdurchlauf vor Hepatektomie wurden nach Anästhesie und Präparation zunächst die großen Leberlappen nach kranial unter das Zwerchfell verlagert, um Zugang zum Ligamentum hepatoduodenale, zum Lobus dexter inferior und zum Lobus caudatus inferior zu erhalten, wo die Messungen jeweils vorgenommen wurden. Zur Messung der Blutfließgeschwindigkeiten in V. portae und A. hepatica propria wurden die Messsonden vorsichtig um die freipräparierten Gefäße platziert, ohne diese zu komprimieren (Abbildung 4 A). Nach dieser Manipulation konnten sich die Gefäße in einer kurzen Ruhephase erholen. Nach mindestens einer Minute ohne messbare spontane Flussänderungen wurden die basalen Blutfließgeschwindigkeiten vor Hepatektomie für 1 min aufgezeichnet.

Nach Entfernen der Ultraschallsonden wurde der Laser-Doppler-Messkopf mit einem Mikromanipulator in Position gebracht und vorsichtig auf die Oberfläche des Lobus caudatus aufgesetzt (Abbildung 4 B). Der Mittelwert aus drei Messungen an unterschiedlichen Stellen der Leberlappenoberfläche wurde notiert.

Der Sauerstoffpartialdruck wurde mit einem Licox-System (Licox Systems; GMS, Kiel-Mielkendorf, Deutschland) im Leberparenchym gemessen. Vor Hepatektomie diente hierzu der Lobus medianus, nach Hepatektomie der Lobus dexter inferior. Dazu wurde der die Clark-Sonde umgebende Polyethylenkatheter ( $\varnothing$  0,5 mm) lateral in den jeweiligen Leberlappen eingestochen und subkapsulär in Richtung Hilus vorgeschoben, bis das Sondenende intraparenchymal lag (Abbildung 4 B). Intraparenchymale Messungen haben sich als genauer erwiesen und sind einer Messung an der Leberoberfläche vorzuziehen (Pestel et al. 2006). Durch den kleinen Durchmesser der Sonde wurden die Leberlappen dabei kaum geschädigt. Die Temperaturmesssonde zur Temperaturkompensation wurde extraparenchymal zwischen Leberlappen und dorsaler Abdominalwand platziert. Zur Blutgasanalyse wurde Blut aus dem arteriellen Katheter in ein heparinisiertes Kapillarröhrchen entnommen und sofort maschinell analysiert (Siemens Rapidlab 348, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland).

Nach 85% Hepatektomie folgte der zweite Messdurchlauf. Die Messungen erfolgten in derselben Reihenfolge (Abbildung 4 C und D). Nachdem sich nach der Manipulation durch die Resektion und die erneute Platzierung der Ultraschallmesssonden ein neues Gleichgewicht der

Blutfließgeschwindigkeiten in V. portae und A. hepatica propria eingestellt hatte, erfolgte die Aufzeichnung der Flusswerte für 30 min. Die Messungen der hepatischen Perfusion mittels Laser-Doppler-Verfahren, des Sauerstoffpartialdruckes mit dem Licox-System und die Blutgasanalyse erfolgten, wie oben beschrieben. Nach Abschluss der Messungen erfolgte transdiaphragmal eine intrakardiale Blutentnahme und Tötung der Tiere mit einer intrakardialen Überdosis Pentobarbital.



**Abbildung 4:** (A bis D) Platzierung der Ultraschallmesssonden zur Messung des portalvenösen und hepatoarteriellen Blutflusses, der Clark-Typ pO<sub>2</sub>-Kathetersonde zur Sauerstoffpartialdruckmessung sowie der Laser-Doppler-Sonde zur Bestimmung der Gewebepерfusion jeweils in der unresezierten Sham-Gruppe (A und B) bzw. nach 85% Hepatektomie (C und D). Ultraschallmesssonden und Laser-Doppler-Sonde wurden per Mikromanipulator (nicht abgebildet) fixiert und justiert. Die Clark-Typ pO<sub>2</sub>-Kathetersonde wurde intraparenchymal platziert.

### 3.3.1.3 Hämodynamik II

Im Unterabschnitt Hämodynamik II wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in  $n = 4$  Tieren je Gruppe die erythrozytäre Blutfließgeschwindigkeit und die Durchmesser der Lebersinusoide und postsinusoidalen Venolen gemessen, sowie Blutvolumenfluss und Scherstress errechnet (Abbildung 5 B und Abbildung 6).

Zwanzig Minuten nach Anästhesie und Präparation bzw. zehn Minuten nach Hepatektomie bzw. Sham-Operation wurden die Tiere, fixiert auf ihren Heizplatten, unter dem Intravitalmikroskop platziert und die Oberfläche des auf einem angepassten Plastilinbett ausgelagerten Lobus caudatus inferior parallel zur Fokusebene positioniert. Nach intravenöser Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran (5%, 0,1 ml/100 g KG) wurden Sinusoide und postsinusoidale Venolen in jeweils zehn Gesichtsfeldern aufgezeichnet. Nach Ende der Untersuchung wurden die Tiere durch eine Pentobarbitalüberdosis getötet.

### 3.3.2 Studienabschnitt B: Leberregeneration und Organintegrität

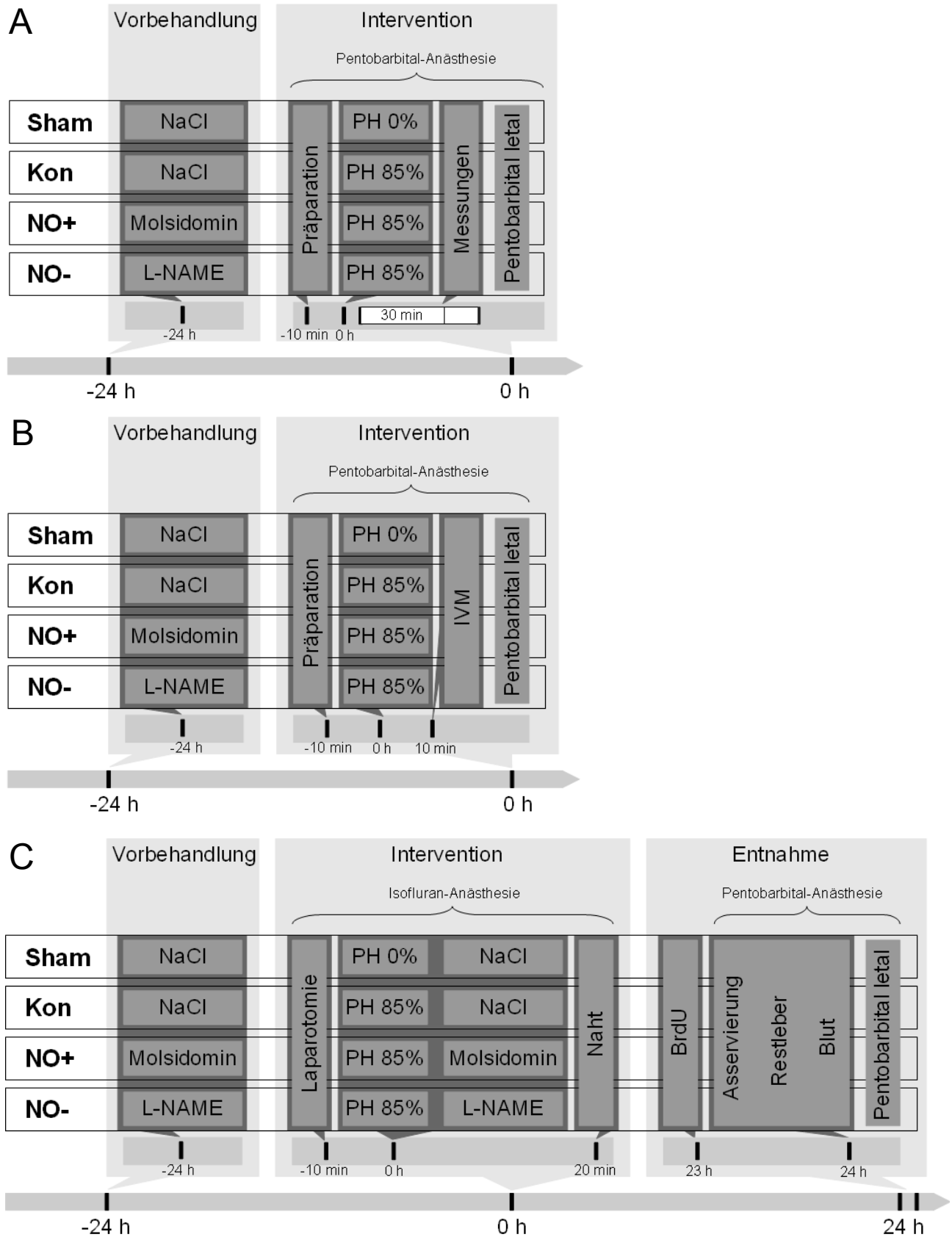
Um im Studienabschnitt B die Wirkung von NO auf die Regeneration und Organintegrität der „reduced-size“-Leber nach 85% Hepatektomie zu untersuchen, wurden insgesamt 40 Tiere untersucht, jeweils 10 pro Versuchsgruppe (Abbildung 5 C).

Nach entsprechender pharmakologischer Vorbehandlung wurden diese Tiere der 85% Hepatektomie, bzw. Sham-Operation zugeführt. Die Narkose wurde in einer Plexiglasbox durch ein Narkosegasgemisch aus Isofluran (1,8 vol %), Lachgas (0,8 l/min) und Sauerstoff (1,6 l/min) eingeleitet. Nach vollständiger muskulärer Relaxation wurden die Tiere, wie oben beschrieben, auf einer Heizplatte fixiert. Die Inhalationsnarkose wurde über eine Kunststoffmaske aufrecht erhalten. Eine integrierte Absaugvorrichtung der Maske und suffiziente Raumbelüftung dienten dem Schutz des Laborpersonals vor eventuell austretendem Narkosegas (Green 1981). Der Bauch wurde rasiert und mit Povidoniodlösung desinfiziert. Nach medianer Laparotomie wurden die Bauchdecken beidseits mit Haken aufgespannt. Ein Kunststoffröhrchen unter der Brustwirbelsäule ermöglichte die bessere Exposition der Oberbauchorgane. Nun wurden die

Leberlappen aus ihren Bändern und Peritonealduplikaturen befreit und mit befeuchteten Wattetupfern mobilisiert. Es folgte die 85% Hepatektomie. Die resezierten Leberlappen wurden gewogen und asserviert. Es folgte die Spülung des Abdomens mit warmer physiologischer Kochsalzlösung. Ein Flüssigkeitsdepot von 2 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes belassen. Bauchdecke und Haut wurden nun einzeln mit 5/0 Prolene-Nähten in fortlaufender Naht verschlossen und mit Povidoniodlösung desinfiziert. Im Anschluss konnten sich die Tiere unter einer Rotlichtlampe von Operation und Narkose erholen und blieben unter Beobachtung bis sie normales Aktivitäts- und Fressverhalten zeigten. Das resezierte Lebergewebe wurde gewogen und in drei Fraktionen asserviert. Zur histologischen Untersuchung wurden Gewebeproben sowohl in 4% Formalinlösung fixiert und nach drei Tagen in Paraffin eingebettet als auch in einem Histoacrylbett in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Proteinanalytik wurden zusätzlich Gewebeproben in flüssigkeitsdichten Tubes ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Vierundzwanzig Stunden nach Hepatektomie, auf dem Höhepunkt der resektionsinduzierten hepatischen DNA-Synthese (Kountouras et al. 2001), erfolgte die Entnahme von Blut und Restlebergewebe in tiefer i.p. Pentobarbitalnarkose. Dazu wurde die Abdomennaht wieder eröffnet und die Laparotomie erweitert. Nach transdiaphragmaler intrakardialer Blutentnahme in jeweils ein EDTA- und ein Citrat-Röhrchen wurde ebenfalls intrakardial eine letale Dosis Pentobarbital injiziert. Im Anschluss daran wurde die Restleber entnommen und asserviert. Zum immunhistochemischen Nachweis der DNA-Synthese des regenerierenden Gewebes erhielten die Tiere bereits eine Stunde vor Entnahme eine i.p.-Injektion mit dem Thymidin-Analogon 5-Bromodesoxyuridin (BrdU, 50 mg/kg KG). Das Restlebergewebe wurde *en bloc* entfernt und gewogen. Nach der Entfernung der nekrotischen Resektionsstümpfe wurde nochmals gewogen. Lebergewebeproben wurden erneut wie oben beschrieben in drei Fraktionen asserviert. Das gewonnene Blut wurde zentrifugiert (10 min, 3000 U/min), der Plasmaüberstand abpipettiert und bei -20 °C in Eppendorf-Tubes eingefroren.





**Abbildung 5:** (A bis C) Schematische Zusammenfassungen des experimentellen Protokolls. (A) Studienabschnitt A, Hämodynamik I: Ultraschallflussmessungen der A. hepatica und V. Portae, Messung von Gewebeoxygenierung und -perfusion. (B) Studienabschnitt A, Hämodynamik II: intravitalmikroskopische Erfassung von Gefäßdurchmessern und Blutfließgeschwindigkeit, Errechnung von Blutvolumenfluss und Scherstress. (C) Studienabschnitt B: laborchemische, immunhistochemische und proteinanalytische Quantifizierung von Leberschaden und Regeneration. NaCl: Natriumchlorid, L-NAME: L-Nw-Nitroarginin Methyl Ester, PH: partielle Hepatektomie, IVM: Intravitalmikroskopie, BrdU: 5-Bromodesoxyuridin.

## **3.4 Untersuchungstechniken**

### **3.4.1 Monitoring der Makro- und Mikrohämodynamik**

#### **3.4.1.1 Ultraschall-Laufzeitverfahren**

Die Messung des hepatischen Blutzufusses in Vena portae und Arteria hepatica propria erfolgte mit einem Ultraschall-Laufzeitverfahren. Gefäßumschließende Ultraschallsonden mit kleinen Durchmessern erlauben unter Nutzung des Doppler-Effekts die Messung der Blutfließgeschwindigkeiten auch in sehr kleinlumigen Gefäßen. Die Messungen wurden mit einem Ultraschall-Flussmessgerät durchgeführt (T402 Animal Research Flowmeter; Transonic Systems, Ithaca, New York, USA). Den Herstellerempfehlungen folgend wurden zwei unterschiedliche jeweils dem Durchmesser der Arteria hepatica propria (Nanoprobe MA0.5PSB) und der Vena portae (Probe MC2PSB) angepasste Messsonden genutzt. Die Sondenköpfe wurden direkt um die Gefäße platziert (Abbildung 4 A und C). Gleichmäßiger und schallneutraler Kontakt zwischen Sonde und Gefäß wurde mit Sonographiegel hergestellt, welches mittels einer stumpfen Kanüle vorsichtig in die Sondenöffnungen appliziert wurde.

Messwerte wurden erst aufgezeichnet, nachdem sich die durch direkte Manipulation an den Gefäßen verursachten Perfusionsänderungen beispielsweise in Form von Vasospasmen zurück bildeten. Das Erreichen des als von äußeren Einflüssen unbeeinflusst angesehenen Perfusionsgleichgewichts wurde anhand der geräteinternen Digitalanzeige überwacht. Das Flussmessgerät stellt die Daten zur externen Weiterverarbeitung nur an analogen Datenausgängen zur Verfügung. Die automatisierte digitale Erfassung der Messwerte nach Erreichen des Perfusionsgleichgewichts erfolgte daher über einen Analog-Digitalwandler (LabJack U12, LabJack, Lakewood, Colorado, USA) per Computersoftware (DAQFactory Express, Azeotech, Ashland, Oregon, USA). Die per Software geschriebenen Rohdaten wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (MS Excel, Microsoft Corp., Redmont, Washington, USA) importiert, aufbereitet und statistisch ausgewertet.

### 3.4.1.2 Laser-Doppler-Verfahren

Die intrahepatische Perfusion wurde durch ein Laser-Doppler-Verfahren bestimmt. Dieses Verfahren erfasst die durch die Bewegung roter Blutkörperchen verursachten Spektralverschiebungen des mit einer Wellenlänge von 632,8 nm emittierten Lichts eines 2 mW Helium-Neon-Lasers. Das an der Organoberfläche reflektierte Spektrum wird von Photodetektoren in elektrische Spannung eines entsprechenden Frequenzbereichs umgewandelt, welche linear abhängig ist vom Produkt aus Geschwindigkeit und Konzentration der roten Blutkörperchen im Untersuchungsfeld (Almond und Wheatley 1992). Die Messsonde des Laser-Flowmeters (Peri Flux PF3; Perimed, Stockholm, Schweden) wurde dabei mittels eines Mikromanipulators vorsichtig auf die Organoberfläche aufgesetzt, vor Hepatektomie auf den Lobus sinister und nach Hepatektomie auf den Lobus caudatus (Abbildung 4 B und D). Die Perfusion wurde je Messdurchgang an jeweils drei unterschiedlichen Stellen der Organoberfläche bestimmt und das arithmetische Mittel notiert.

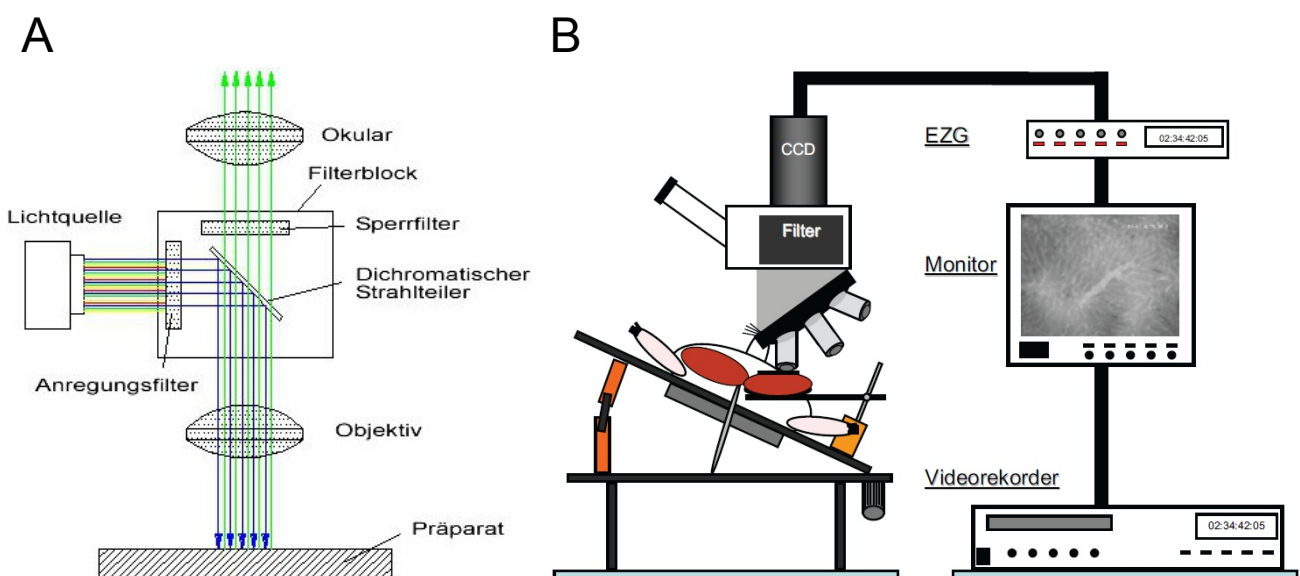
### 3.4.1.3 Messung des Sauerstoffpartialdrucks

Die Gewebeoxygenierung der Leber wurde mit  $pO_2$ -Sonden in Form von flexiblen Polyethylenmikrokathetern gemessen (Clark-Typ, 0,5 mm Durchmesser, Länge 200 mm, Licox Systems; GMS, Kiel-Mielkendorf, Deutschland). Die  $pO_2$ -Sonde wurde dabei intraparenchymal platziert (Abbildung 4 B und D) (Pestel et al. 2006). Die Temperatursonde wurde retrohepatisch intraperitoneal platziert.

### 3.4.1.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist ein Verfahren, mit dem Parenchymstatus und Mikrozirkulation der vitalen Leber am lebenden Versuchstier visualisiert, aufgezeichnet und quantifiziert werden können (Grafflin 1953). Dabei kommen intravenös applizierte Fluoreszenzfarbstoffe zur Anwendung, die sich je nach ihren chemischen Eigenschaften in unterschiedliche Kompartimente verteilen. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge im Vergleich energieärmere Lichtquanten mit größerer Wellenlänge

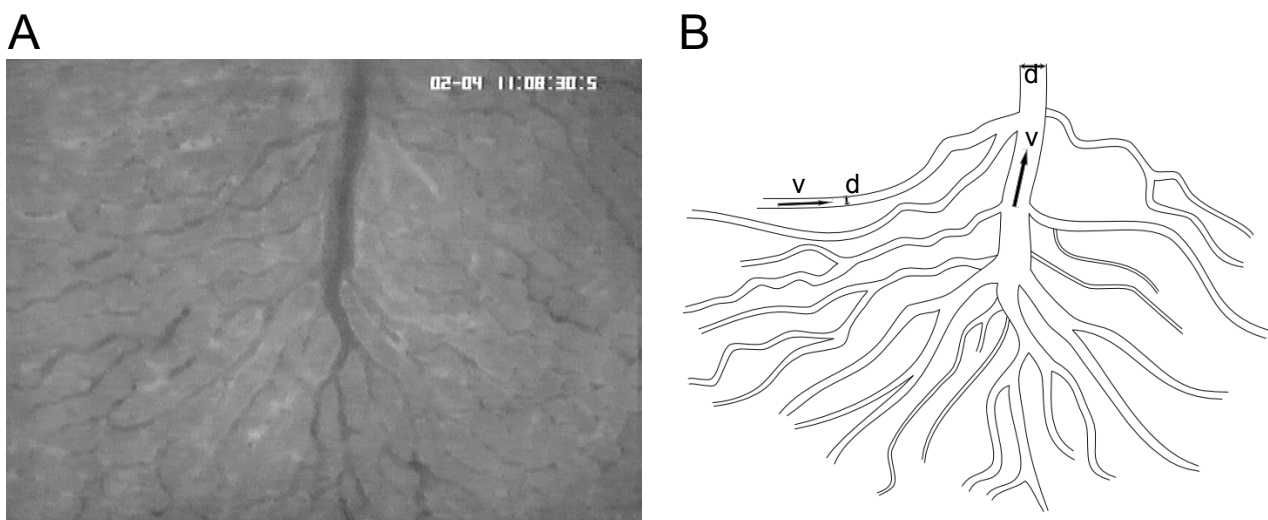
und können somit ihre Kompartimente kontrastieren. Diese Epi-Illuminationstechnik ermöglicht die intravitale Auflichtfluoreszenzmikroskopie. Licht einer bestimmten Wellenlänge wird nach Passage eines Anregungsfilters durch einen dichromatischen Teilungsfilter auf die zu untersuchende Gewebeoberfläche gelenkt. Das vom Fluoreszenzfarbstoff im Gewebe emittierte langwelligere Licht wird nur zum Okular hin durchgelassen. Zusätzlich sorgt ein Sperrfilter dafür, dass im Abbildungsstrahlengang nur der spezifische Wellenlängenbereich des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Durchlass findet (Abbildung 6 A).



**Abbildung 6:** (A und B) Schematische Darstellung der intravitale Mikroskopie. (A) Funktionsprinzip der Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie (<http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz/>). (B) Versuchsanordnung: Der Lobus caudatus wird auf einen Löffel mit Plastilinbettung ausgelagert, mit einem Deckglas abgedeckt und horizontal unter dem Objektiv positioniert. Das Mikroskopiebild wird von einer CCD-Kamera erfasst und nach Einschleifen von Echtzeitgenerator (EZG) und Monitor auf Videoband aufgezeichnet (Schuett H. Modulation des NO- und CO-Stoffwechsels und dessen Bedeutung für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. Rostock, Univ., Med. Fak., Diss., 2009).

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem modifizierten Epifluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss vorgenommen (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland). Für die Analyse der Leber wurde das Tier nach Anästhesie und Präparation unter dem Objektiv platziert, der Lobus caudatus ausgelagert und parallel zur Fokusebene positioniert (Abbildung 6 B). Als Fluoreszenzfarbstoff kam FITC-Dextran zur Anwendung, das aufgrund seiner Molekülgröße (Molekulargewicht 150 kD) nicht in den extravasalen Raum diffundieren kann und somit ausschließlich die Gefäße kontrastiert. Als Lichtquelle diente eine 100 W Quecksilberlampe, gefiltert wurde mit einem Anregungsfilter (Wellenlängen 450 - 490 nm), einem dichromatischen

Teilerspiegel (Wellenlänge 510 nm) und einem Sperrfilter (Wellenlängen > 520 nm). Durch die exakte Abstimmung der Filter auf den Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran konnte eine optimale Darstellungsqualität gewährleistet werden. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden unter Benutzung von Wasser-Immersionsobjektiven (x20 / numerische Apertur 0.5, Achroplan, Zeiss; x40 / numerische Apertur 0.8, Achroplan, Zeiss) aufgenommen, mittels einer „charge-coupled device“ (CCD)-Videokamera (FK 6990-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) auf einen Bildschirm übertragen und auf Videoband gespeichert (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokio, Japan). Über einen in das Videosignal eingeschleiften Videozeitgenerator (VTG 33, FOR-A-Company, Tokio, Japan) wurden eine zahlenkodierte Versuchsgruppenbezeichnung und die Untersuchungszeit erfasst. Von jedem Tier wurden jeweils 10 Gesichtsfelder mit Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen aufgezeichnet.



**Abbildung 7:** (A) Exemplanische intravitalmikroskopische Aufnahme von Lebersinusoiden mit drainierender postsinusoidaler Venole. (B) Korrespondierende schematische Darstellung von Lebersinusoiden und drainierender postsinusoidaler Venole. Mittels computergestützter quantitativer Videoanalyse wurden sinusoidale und venoläre Gefäßdurchmesser ( $d$ , schwarze Doppelpfeile) und Blutflussgeschwindigkeit ( $v$ , lange schwarze Pfeile) bestimmt. Aus diesen quantitativ ermittelten Werten konnten unter der Annahme eines zylindrischen Gefäßlumens mit dem Querschnittsradius  $r=d/2$ , eines laminaren Blutflusses und eines newtonschen Fluids jeweils Blutvolumenfluss ( $VQ=v \cdot \pi \cdot r^2$ ) und Scherstress ( $\tau=(4 \cdot \eta \cdot VQ)/(\pi \cdot r^3)$ ) für die einzelnen Gefäßabschnitte bestimmt werden.

Die Auswertung der auf Videoband gespeicherten intravitalmikroskopischen Bilder erfolgte im folgenden offline durch quantitative Videoanalyse mit einem computerunterstützten Bildverarbeitungsprogramm (CapImage, Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Für jedes verwendete Objektiv wurde mittels Mikrometer-Maßstab eine Kalibrierung vorgenommen. Je Tier wurden jeweils 10 midzonale Sinusoide und 10 postsinusoidale Venolen hinsichtlich Gefäßdurchmesser ( $d$ )

und Blutzellgeschwindigkeit ( $v$ ) durch Mehrfachmessungen ausgewertet (Abbildung 7). Aus den Messdaten wurden Blutvolumenfluss und Scherstress berechnet. Alle Daten wurden für jedes Individuum arithmetisch gemittelt. Diese Mittelwerte gingen schließlich in die Berechnung der Gruppenmittelwerte ein.

#### **3.4.1.4.1 Sinusoid- und Venolendurchmesser ( $d$ )**

Die Messung der Sinusoid- und Venolendurchmesser ( $d$ ) erfolgte am Standbild. Gefäßachse und Gefäßgrenzen konnten durch die Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran, der das gesamte Plasma kontrastiert, exakt ermittelt werden. Durch eine automatisierte Mehrfachmessung senkrecht zur bestimmten Gefäßachse wurde der Mittelwert des Durchmessers aus jeweils 50 Einzelmessungen ermittelt.

#### **3.4.1.4.2 Blutfließgeschwindigkeit ( $v_{RBC}$ )**

Im Anschluss an die Durchmesserbestimmung wurde in den untersuchten Gefäßen die Geschwindigkeit der Blutzellen mit Hilfe der Computer-gestützten Line-Shift-Diagramm Methode bestimmt (Klyscz et al. 1997). Dabei wird entlang der Flussrichtung des Gefäßes eine Messlinie zentral im 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 kann danach vom Programm die Blutzellgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  berechnet werden.

#### **3.4.1.4.3 Blutvolumenfluss ( $VQ$ )**

Unter Verwendung der mittels computergestützter Videoauswertung gewonnenen Werte für Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit wurde der Blutvolumenfluss für jedes einzelne Gefäß anhand folgender Formel berechnet:

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

Diese Gleichung stellt eine Vereinfachung dar, die unter der Annahme einer zylindrischen Form des Gefäßes bzw. eines kreisrunden Gefäßquerschnitts und eines newtonschen Fluids mit laminarer Strömung den tatsächlichen Verhältnissen in einem vitalen, perfundierten Gefäßbett nur näherungsweise entsprechen kann. Da die genannten Vereinfachungen jedoch für alle untersuchten Individuen bzw. Gefäße Anwendung finden, können relative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen trotzdem valide dargestellt werden (Aroesty und Gross 1972, 1972).

#### 3.4.1.4.4 Scherstress ( $\tau$ )

Wie für den Blutvolumenfluss, wurden auch zur Bestimmung des Scherstress die jeweiligen Einzelwerte der Gefäßdurchmesser und Blutfließgeschwindigkeiten herangezogen und mittels folgender Formel berechnet (Hori et al. 1998):

$$\tau = \frac{4 \times \eta \times VQ}{\pi \times r^3} \quad \text{bzw.} \quad \tau = 4 \times \eta \times \frac{v_{RBC}}{r}$$

Dabei entspricht  $r$  dem Radius des Gefäßes. Der Scherstress verhält sich unter der Annahme der oben genannten Vereinfachungen folglich proportional zur Blutfließgeschwindigkeit und umgekehrt proportional zum Gefäßradius. Für die Konstante der Blutviskosität  $\eta$  wurde entsprechend den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen für Kleinnagerblut ein Wert von 7 festgelegt (Vogel et al. 2003; Windberger et al. 2003)

## **3.4.2 Parameter des Leberschadens, der Organintegrität und der Leberregeneration**

### **3.4.2.1 Serumanalytik**

Um den hepatozellulären Schaden zu erfassen, wurden die Transaminasen, Glutamat- und Lactatdehydrogenasen sowie der Bilirubinspiegel jeweils eine Stunde bzw. 24 h nach Resektion bestimmt. Dies geschah spektrophotometrisch mit Hilfe kommerziell verfügbarer Kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die untersuchten Plasmaproben wurden durch Blutentnahmen jeweils am Ende des Experiments im Studienabschnitt A (Hämodynamik I) bzw. Studienabschnitt B gewonnen.

### **3.4.2.2 Immunhistochemie von BrdU**

Zum immunhistochemischen Nachweis der DNA-Synthese 24 h nach 85% Leberteileresektion erfolgte im Studienabschnitt B eine Stunde vor Organentnahme die intraperitoneale Applikation des Thymidin-Analogons 5-Bromodesoxyuridin (BrdU, 50 mg/kg KG). BrdU wird in der S-Phase des Zellzyklus von der DNA-Polymerase anstelle Thymidin mit Adenin gepaart und kann immunhistochemisch nachgewiesen werden. Es eignet sich insbesondere deshalb gut zum Nachweis der DNA-Synthese, da Thymidin und seine Analoga anders als die restlichen Basen nahezu exklusiv in der DNA vorkommen und in der RNA größtenteils durch Uracil ersetzt sind (Eidinoff et al. 1959; Russev und Tsanev 1973). Das entnommene BrdU-markierte Lebergewebe wurde für zwei bis drei Tage in 4% phosphatgepufferter Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte für die histologische Analyse gefertigt. Für den immunhistochemischen Nachweis der BrdU-Inkorporation wurden die Schnitte auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger gegeben und zur Antigendemarkierung mit Mikrowellen behandelt. Als primärer Antikörper kam monoklonales Maus-Anti-BrdU (1:50; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz, das für 18 h bei 4 °C inkubiert wurde. Nach Equilibrierung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Ziegen Anti-Maus-IgG (1:100; Dako Cytomation) für 30 min inkubiert. Als Chromogen kam



3,3'-Diaminobenzidin zum Einsatz. Die Schnitte wurden dann mit Hämalaun gegengefärbt und mittels Lichtmikroskopie untersucht (Axioskop 40; Zeiss Göttingen, Deutschland). BrdU-positive Hepatozytenzellkerne wurden in 30 aufeinanderfolgenden High-Power-Feldern (x40 Objektiv, numerische Apertur 0,65) ausgezählt (Zellen/mm<sup>2</sup>).

### 3.4.2.3 Proteinanalytik von PCNA

Mittels Westernblot des „proliferating-cell-nuclear-antigen“ (PCNA) konnte das Ausmaß des Regenerationsreizes auf Proteinebene ermittelt werden. Die in Studienabschnitt B gewonnenen und bei -80 °C gelagerten Gewebeproben 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% NaN<sub>3</sub>, 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, 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.

Zur Vorbereitung der Proben auf die Gel-Elektrophorese wurden 20 µg Protein 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.

aquilibriert, 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% BSA-Lösung konnte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erzielt werden.

Zum Nachweis von PCNA wurden die Membranen zuerst mit polyklonalem Hasen-Anti-PCNA (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA) als primärem Antikörper und nach mehrmaligem Waschen in TBST sowie TBS mit Ziegen Anti-Hasen IgG (1:8000; Cell Signalling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) als Sekundär-Antikörper für jeweils 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und abermals zur Entfernung überschüssiger Antikörper mehrmals in TBST sowie TBS gewaschen.

Die Detektion des an den Primär-Antikörper gekoppelten Sekundär-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL+TM-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  $\beta$ -Aktin-spezifischem monoklonalem Maus-Anti- $\beta$ -Aktin (1:20000; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) als Primärantikörper und Hasen Anti-Maus IgG (1:60000; Sigma-Aldrich) als Sekundärantikörper inkubiert, um die  $\beta$ -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  $\beta$ -Aktin Signal ins Verhältnis gesetzt wurden.

### 3.5 Statistik

Alle erhobenen Daten wurden mithilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (MS Excel, Microsoft Corp., Redmont, Washington, USA) erfasst. Lagen mehrere Einzeldaten pro Individuum vor, wurden Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts ( $MW \pm SEM$ ) für jedes Individuum berechnet. Darauf erfolgte die Berechnung von Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts für jede Versuchsgruppe.

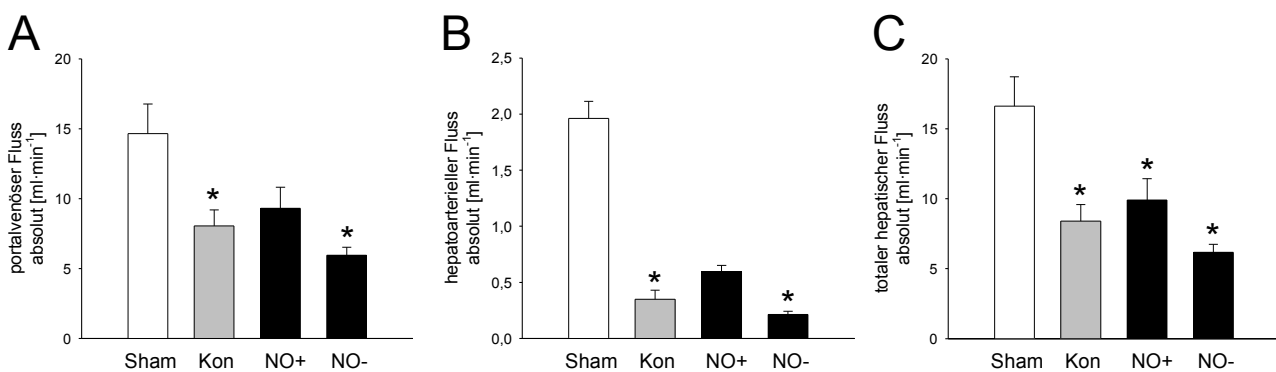
Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware SigmaStat (Jandel Corp., San Rafael, Kalifornien, USA). Zuerst wurde die Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Gleichheit der Varianzen (Levene-Test) geprüft. Normalverteilte und varianzgleiche Daten wurden mittels Einfach-Varianzanalyse (ANOVA) verglichen, gefolgt von einem post-hoc multiplen Paarvergleich (Holm-Sidak). Waren die Kriterien für einen parametrischen Test nicht erfüllt, erfolgte die Analyse mittels Rangsummentest (Kruskal-Wallis ANOVA on ranks), gefolgt von einem Paarvergleich (Dunn's Test).

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurden die Unterschiede als statistisch signifikant erachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Makrohämodynamik nach 85% Hepatektomie

Zur Erfassung der hepatischen Makrohämodynamik wurden die Blutflüsse der Leberarterie und der Pfortader mittels Ultraschalllaufzeitverfahren bestimmt. Nach 85% Hepatektomie sind Leberparenchym und verbleibender Gesamtquerschnitt des hepatischen Gefäßbetts in gleichem Maße reduziert, so dass das Restorgan nicht mehr im selben Umfang portalvenöses und hepatoarterielles Blut entgegennehmen kann. Dies ist gleichbedeutend mit einem gesteigerten hepatischen Gefäßwiderstand. Nach Hepatektomie sanken daher die gemessenen absoluten Blutflüsse in allen Gruppen im Vergleich zu der unresezierten Sham-Gruppe (Abbildung 7). Der absolute portalvenöse Zufluss ging in resezierten Kontrolltieren und in NOS-inhibierten Tieren im Vergleich zum basalen Fluss unresezierter Tiere signifikant um ca. 45%, respektive 60% zurück. Der portalvenöse Flussabfall der NO-substituierten Gruppe fiel mit etwa 36% geringer aus und erwies sich als nicht signifikant (Abbildung 7 A). Besonders deutlich zeigte sich die Reduktion des absoluten arteriellen Zuflusses. Nach Resektion gingen die Flüsse sowohl in der Kontrollgruppe als auch in NOS-inhibierten Tieren signifikant um 82% bzw. 89% zurück. In der NO-substituierten Gruppe fiel der hepatoarterielle Flussverlust wiederum am geringsten aus und unterschied sich trotz deutlichem Rückgang um 70% nicht statistisch signifikant von Werten nicht hepatektomierter Tiere (Abbildung 7 B).



**Abbildung 7:** Quantitative Analyse von (A) portalvenösem Fluss und (B) hepatoarteriellem Fluss mittels Ultraschalllaufzeitverfahren sowie (C) Berechnung des totalen hepatischen Zuflusses als Summen aus (A) und (B). Untersucht wurden Tiere jeweils 30 min nach 85 % Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert±SEM. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \* p < 0,05 vs. Sham.

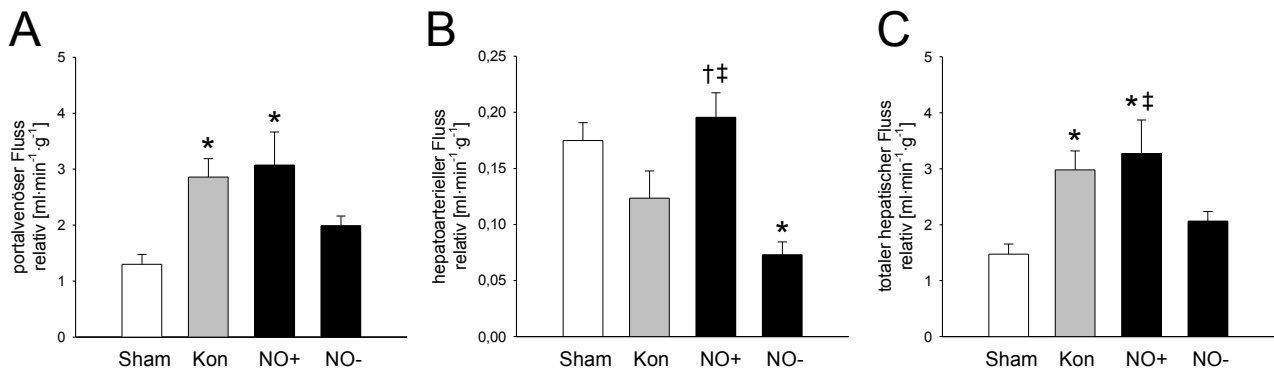
Die Summe des portalvenösen und hepatoarteriellen Flusses ist der totale hepatische Zufluss. Er stellt sich weitgehend analog zu den portalvenösen Verhältnissen dar. Grund hierfür ist der relativ geringe prozentuale Anteil der hepatoarteriellen Versorgung an der Gesamtperfusion zwischen 12,7% in unresezierten Tieren und minimal ca. 3,6% in resezierten und NO-inhibierten Tieren (Tabelle 1). Der Summenfluss sank nach Resektion in allen Gruppen auf 40% bis 60% ab, wobei sich hierbei auch für die NO-substituierte Gruppe eine statistische Signifikanz ergab (Abbildung 7 C).

	Sham	Kon	NO+	NO-
Perfusionsanteil Pfortader	87,29% ± 2,12	95,73% ± 0,81*	93,60% ± 0,95*	96,41% ± 0,52*
Perfusionsanteil Leberarterie	12,70% ± 2,12	4,27% ± 0,81*	6,41% ± 0,95*	3,56% ± 0,52*

**Tabelle 1:** Prozentuale Anteile der Perfusionsanteile von Pfortader und Leberarterie an der hepatischen Gesamtperfusion. Berechnet anhand der absoluten quantitativen Daten der portalvenösen und hepatoarteriellen Flussmessung mittels Ultraschalllaufzeitverfahren. Untersucht wurden Tiere jeweils 30 min nach 85 % Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert±SEM. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \* p < 0,001 vs. Sham.

Um die Flussänderungen in Bezug zur residualen Lebermasse bestimmen zu können, wurden im Folgenden die Flüsse relativ zur Lebermasse dargestellt (Abbildung 8). Im Verhältnis zur Lebermasse stieg der portalvenöse Zufluss nach Resektion in der Kontrollgruppe und in der NO-substituierten Gruppe auf etwa das Doppelte. Dagegen war der relative portalvenöse Zufluss in der NOS-inhibierten Gruppe nicht signifikant erhöht (Abbildung 8 A). Der relative hepatoarterielle Zufluss sank nach alleiniger Resektion leicht. NO-Blockade führte zu einer weiteren, signifikanten Abnahme des relativen hepatoarteriellen Zuflusses auf etwa die Hälfte im Vergleich zu basalen Werten. Der Verlust an hepatoarteriellem Fluss konnte durch NO-Substitution vollständig aufgehoben werden. Tiere dieser Gruppe zeigten arterielle Flusswerte, die sich von Werten nicht resezierter Sham-Tiere nicht signifikant unterschieden und sogar tendenziell darüber lagen (Abbildung 8 B). Im Vergleich zu den anderen beiden resezierten Gruppen erwies sich dies als statistisch signifikante Verbesserung der hepatoarteriellen Versorgung. Der resultierende totale hepatische Zufluss war in der Kontrollgruppe und der molsidominbehandelten Gruppe signifikant erhöht. NO-Substitution führte interessanterweise insbesondere auch gegenüber der NO-Blockade

zu einer signifikant verstärkten Perfusion im Verhältnis zur Lebermasse (Abbildung 8 C).



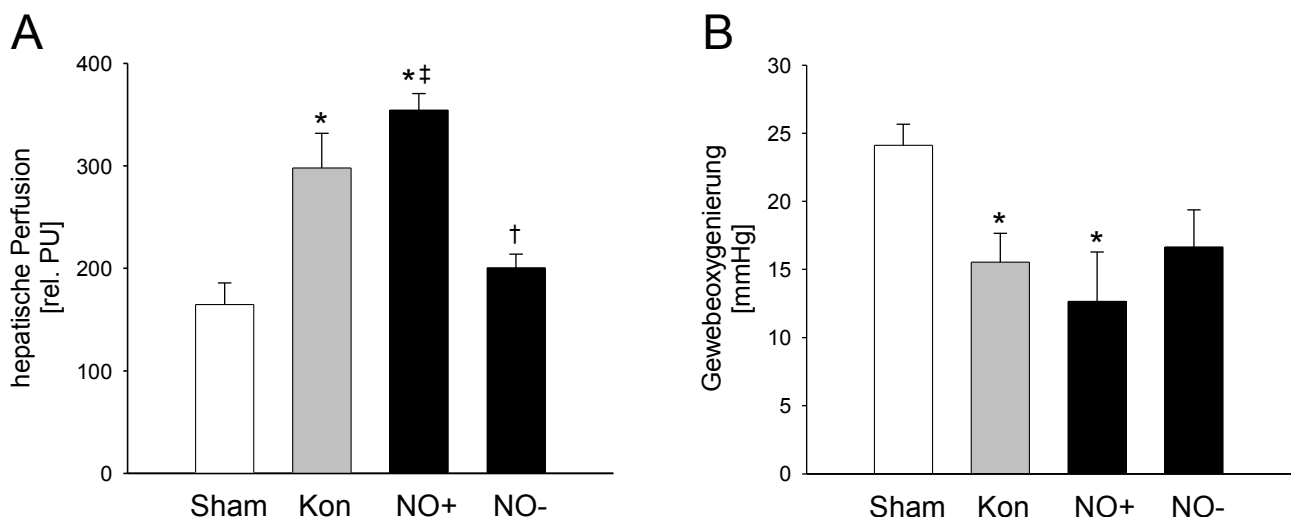
**Abbildung 8:** Quantitative Analyse von (A) relativem portalvenösem Fluss und (B) relativem hepatoarteriellem Fluss mittels Ultraschalllaufzeitverfahren sowie (C) Berechnung des relativen hepatischen Zuflusses als Summen aus (A) und (B), jeweils bezogen auf die Lebermasse. Untersucht wurden Tiere jeweils 30 min nach 85 % Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit  $N^G$ -nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \*  $p < 0,05$  vs. Sham,  $^\dagger$   $p < 0,05$  vs. Kon,  $^\ddagger$   $p < 0,05$  vs. NO-.

## 4.2 Mikrohämodynamik nach 85% Hepatektomie

Die hepatische Mikrohämodynamik wurde im Studienabschnitt A in den beiden Unterabschnitten Hämodynamik I und II erhoben. Im Unterabschnitt I wurden neben der Makrohämodynamik auch die mikrozirkulatorischen Parameter der hepatischen Parenchymperfusion mittels Laser-Doppler-Verfahren und die Gewebeoxygenierung bestimmt. Der Unterabschnitt II war mit der intravitalmikroskopischen Untersuchung der intrahepatischen Blutgefäße allein der quantitativen Erfassung der Mikrohämodynamik gewidmet.

### 4.2.1 Perfusion des Leberparenchyms

Die hepatische Gewebepfusion wurde durch Laser-Doppler-Flussmessung nichtinvasiv an der Leberoberfläche bestimmt. Sie zeigte sich nach 85% Hepatektomie in der Kontrollgruppe und der NO-substituierten Gruppe signifikant erhöht, während sie in der NOS-blockierten Gruppe im Vergleich zu nicht resezierten Tieren nicht signifikant stieg. Dabei zeigte sich die Gewebepfusion unter NO-Substitution auch gegenüber der NOS-Blockade signifikant erhöht (Abbildung 9 A). Die Laser-Doppler-Flussmessung spiegelte damit erwartungsgemäß die Ergebnisse der Ultraschallflussmessungen wider (Abbildung 8 C).



**Abbildung 9:** Quantitative Analyse von (A) hepatischer Gewebepfusion und (B) hepatischer Gewebeoxygenierung mittels Laser-Doppler-Verfahren nicht invasiv an der Organoberfläche bzw. mittels Clark-Typ  $pO_2$ -Messsonden invasiv intraparenchymal. Untersucht wurden Tiere jeweils 30 min nach 85% Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit  $N^G$ -nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, †  $p < 0,05$  vs. NO-, ‡  $p < 0,05$  vs. Kon.

## 4.2.2 Gewebeoxygenierung des Leberparenchyms

Die hepatische Gewebeoxygenierung als Resultat aus vaskulärem Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Gewebes wurde mit Licox-Sauerstoffpartialdruckmesssonden intraparenchymal ermittelt. Sie zeigte sich in allen Gruppen etwa gleich stark vermindert auf Werte um 15 mmHg (Abbildung 9 B). Statistisch signifikant war der Abfall im Vergleich zu basalen Werten jedoch nur in der Kontrollgruppe und der NO-substituierten Gruppe. Unter NO-Substitution wurden tendenziell die niedrigsten Sauerstoffpartialdrücke gemessen.

## 4.2.3 Mikrohämodynamik der Lebersinusoide

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Lebersinusoide nach Kontrastierung des intravasalen Lumen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran erlaubte die Messung von Gefäßdurchmesser und Blutfließgeschwindigkeit einzelner Sinusoide. Aus diesen beiden Messwerten wurden Blutvolumenfluss und Scherstress errechnet.

### 4.2.3.1 Sinusoidale Blutfließgeschwindigkeit

Die sinusoidale Blutfließgeschwindigkeit (Abbildung 10 A), ermittelt anhand der Geschwindigkeit roter Blutkörperchen, stieg im Vergleich zur unresezierten Sham-Gruppe in der Kontrollgruppe nach Resektion auf etwa das Dreifache. NO-Substitution führte zu einer weiteren Zunahme der sinusoidalen Blutfließgeschwindigkeit. Durch NOS-Blockade fiel die Blutfließgeschwindigkeit im Vergleich zur NO-Substitution deutlich niedriger aus.

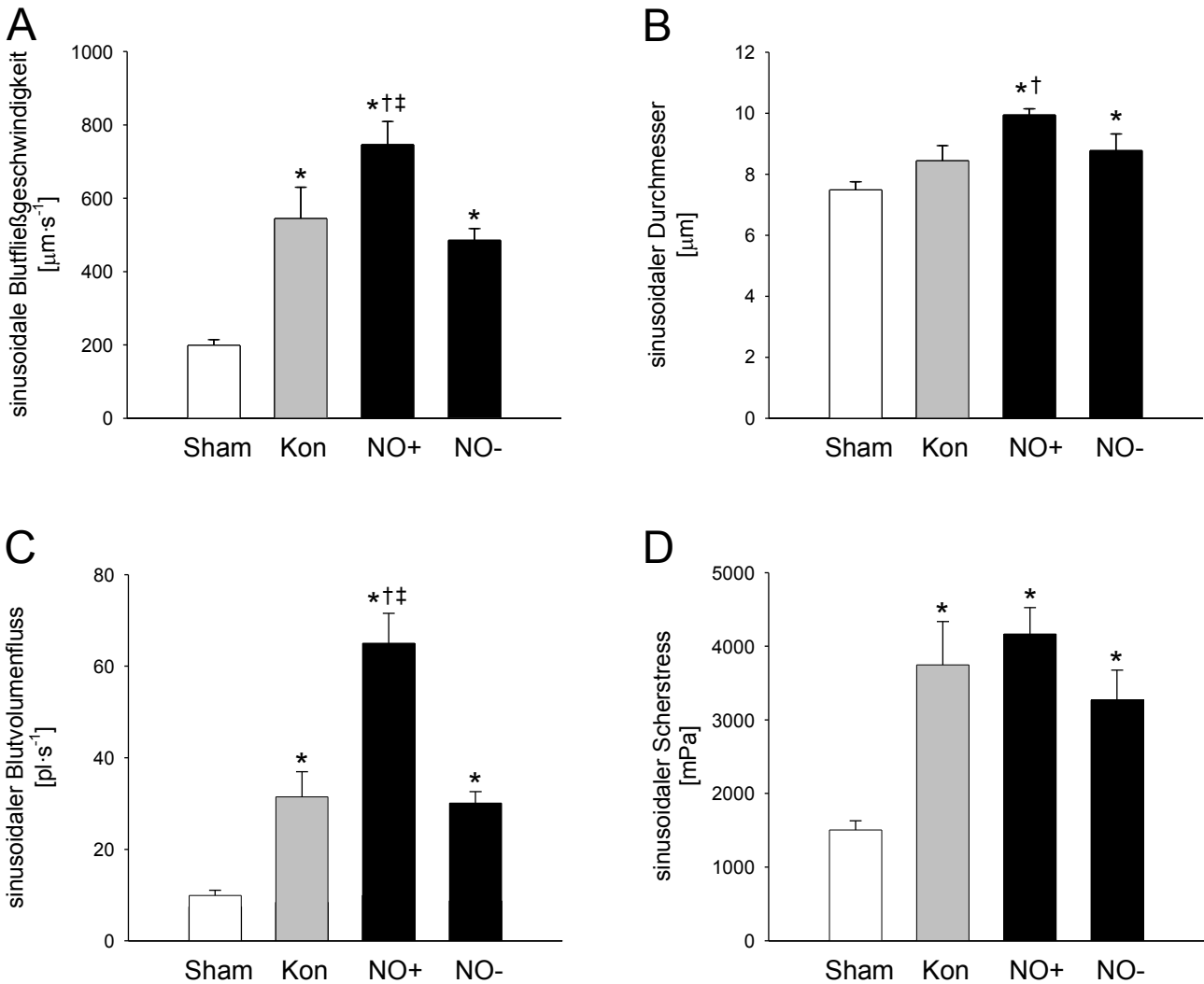
### 4.2.3.2 Sinusoidaler Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser der Lebersinusoide (Abbildung 10 B) stiegen nach Resektion in der Kontrollgruppe nicht signifikant um 13%, nach NO-Substitution signifikant um 18% und nach NOS-Blockade um 14%. Diese tendenziellen Änderungen sind für Gefäße dieser Größenordnung möglicherweise relevant. Die pharmakologisch behandelten Gruppen unterschieden sich untereinander nicht signifikant.



### 4.2.3.3 Sinusoidaler Blutvolumenfluss

Nach 85% Hepatektomie stieg das pro Zeiteinheit durch die Sinusoide fließende Blutvolumen in allen Gruppen signifikant (Abbildung 10 C). Resektion allein führte zu einer Verdreifachung des Blutvolumenflusses. Zusätzliche NO-Substitution konnte diesen auf mehr als das Sechsfache steigern. Unter NOS-Blockade wurden Werte erreicht, die der Kontrollgruppe entsprachen.



**Abbildung 10:** Quantitative Analyse von (A) sinusoidaler Blutfließgeschwindigkeit und (B) Sinusoiddurchmessern mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie. Berechnung von (C) sinusoidalem Blutvolumenfluss und (D) sinusoidalem Scherstress. Untersucht wurden Tiere jeweils 30 min nach 85% Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit  $N^G$ -nitro-L-argininmethylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienen als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, †  $p < 0,05$  vs. Kon, ‡  $p < 0,05$  vs. NO-.

#### **4.2.3.4 Sinusoidaler Scherstress**

Der sinusoidale Scherstress verhält sich proportional zur Blutfließgeschwindigkeit und umgekehrt proportional zum Gefäßradius. Interessanter Weise zeigte er sich in allen hepatektomierten Versuchsgruppen gegenüber nicht resezierten Tieren statistisch signifikant deutlich erhöht. Zwischen den resezierten Gruppen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell erreichten Tiere der NO-substituierten Gruppe die höchsten Scherstresswerte (Abbildung 10 D).

### **4.2.4 Mikrohämodynamik der postsinusoidalen Venolen**

Analog zu den Lebersinusoiden erfolgte die Untersuchung der postsinusoidalen Venolen mit Messung von Gefäßdurchmesser und Blutfließgeschwindigkeit, sowie die Errechnung von Blutvolumenfluss und Scherstress.

#### **4.2.4.1 Venoläre Blutfließgeschwindigkeit**

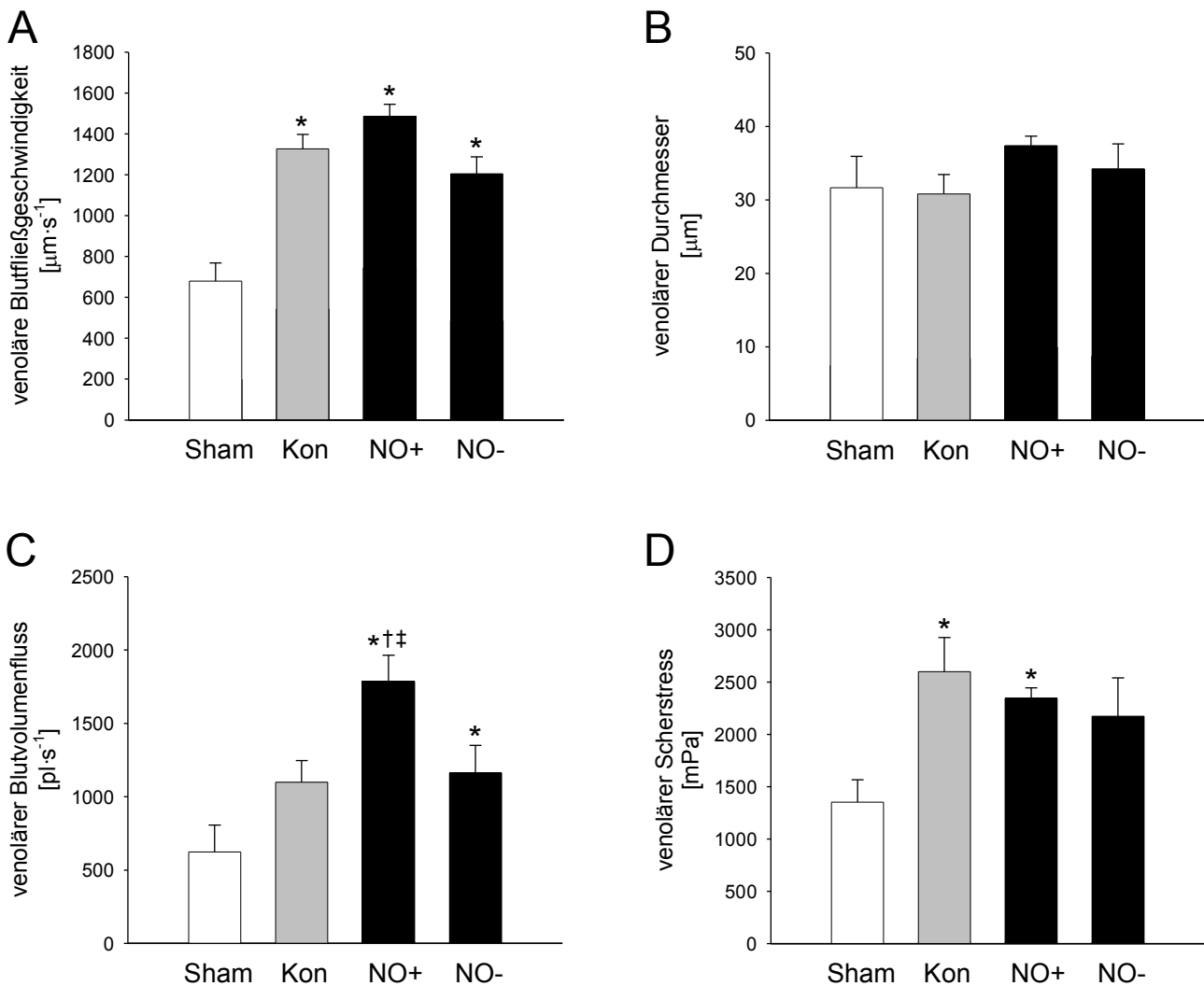
Die Blutfließgeschwindigkeit in den postsinusoidalen Venolen stieg nach Resektion in allen Gruppen deutlich an (Abbildung 11 A). Ohne dass sich die resezierten Gruppen untereinander signifikant unterschieden; zeigte die NO-substituierte Gruppe tendenziell die höchsten Blutfließgeschwindigkeiten mit einem Anstieg auf das Doppelte im Vergleich zu unresezierten Sham-Tieren.

#### **4.2.4.2 Venolärer Gefäßdurchmesser**

Resektion allein konnte die Gefäßdurchmesser der postsinusoidalen Venolen nicht beeinflussen. Sowohl NO-Substitution als auch NOS-Blockade führten zu einer dezenten Steigerung des Gefäßradius, jedoch ohne statistisch signifikante Änderung im Vergleich zur unresezierten Sham-Gruppe (Abbildung 11 B).

#### 4.2.4.3 Venolärer Blutvolumenfluss

Das pro Zeiteinheit durch die postsinusoidalen Venolen fließende Blutvolumen stieg nach alleiniger Resektion auf etwa das Doppelte an. Durch NO-Substitution konnte der Blutvolumenfluss auf mehr als das Dreifache gesteigert werden. NOS-Blockade führte gegenüber der alleinigen Hepatektomie nicht zu einer signifikanten Volumenflusszunahme. NO-substituierte Tiere lagen damit statistisch signifikant 1/3 über Kontroll- und NOS-inhibierten Tieren (Abbildung 11 C).



**Abbildung 11:** Quantitative Analyse von (A) Blutfließgeschwindigkeit und (B) Durchmessern der postsinusoidalen Venolen mittels Intravitaler Fluoreszenzmikroskopie. Berechnung von (C) venolärem Blutvolumenfluss und (D) venolärem Scherstress. Untersucht wurden Tiere jeweils 30 min nach 85% Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, †  $p < 0,05$  vs. Kon, ‡  $p < 0,05$  vs. NO-.

#### **4.2.4.4 Venolärer Scherstress**

Der Scherstress in den postsinusoidalen Venolen stieg nach Resektion deutlich an und zeigte sich in Kontrolltieren am stärksten ausgeprägt. Sowohl in NO-substituierten als auch in NOS-inhibierten Tieren fiel der Anstieg etwas geringer aus. Die beiden pharmakologisch behandelten Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich. Jedoch erwies sich der Scherstress in der NO-substituierten Gruppe gegenüber unresezierten Tieren statistisch signifikant erhöht, wohingegen sich für den Scherstress unter NOS-Blockade trotz eines Anstiegs um mehr als 50% keine statistische Signifikanz ergab (Abbildung 11 D).

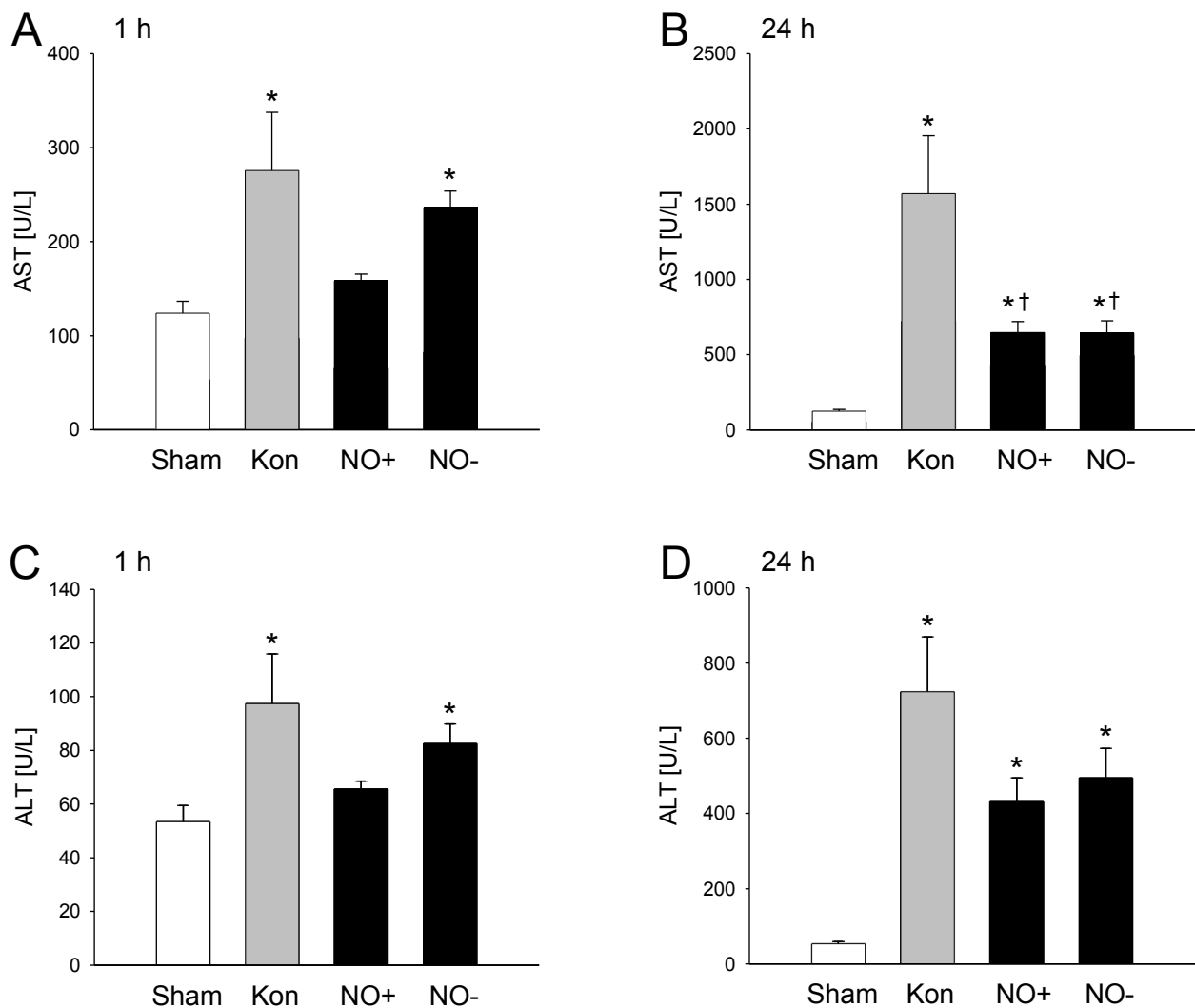
### **4.3 Leberschaden und Organintegrität**

Zur Evaluation der Auswirkung der 85% Hepatektomie auf die Organintegrität und Syntheseleistung der Restleber wurden serumanalytisch die Transaminasen, Glutamat- und Lactatdehydrogenasen sowie der Bilirubinspiegel jeweils 1 h und 24 h nach Resektion bestimmt.

#### **4.3.1 Serumanalytische Parameter des Leberschadens und der Organintegrität**

##### **4.3.1.1 Transaminasen**

Transaminasen und insbesondere der gleichzeitige Anstieg der Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase sind empfindliche Parameter zur Evaluation einer Schädigung des Leberparenchyms. Die 85% Hepatektomie führte in pharmakologisch unbehandelten Kontrolltieren bereits 1 h nach Leberresektion zu einem signifikanten Leberschaden, was der starke Anstieg der Serumspiegel von Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) im Vergleich zur unresezierten Sham-Gruppe belegt (Abbildung 12). Substitution von NO konnte 1 h nach Leberresektion einen signifikanten Anstieg der Transaminasen verhindern. Im Gegensatz dazu stiegen die Transaminasen in der NO-inhibierten Gruppe ebenfalls signifikant zur unresezierten Sham-Gruppe an, jedoch tendenziell weniger stark als unter Resektion allein (Abbildung 12 A und C). Vierundzwanzig Stunden nach Resektion stiegen die Transaminasen in allen hepatektomierten Gruppen weiter an (Abbildung 12 B und D). Sowohl Substitution als auch Inhibition von NO resultierte dabei im Vergleich zu resezierten aber pharmakologisch unbehandelten Kontrolltieren in einem verminderten Leberschaden, was sich in niedrigeren AST- und ALT- Serumspiegeln niederschlug. Die AST zeigte sich dabei in beiden pharmakologisch behandelten Gruppen 24 h nach 85% Hepatektomie zwar zur Sham-Gruppe etwa 5-fach erhöht, zur resezierten, unbehandelten Kontrollgruppe jedoch statistisch signifikant mehr als halbiert.



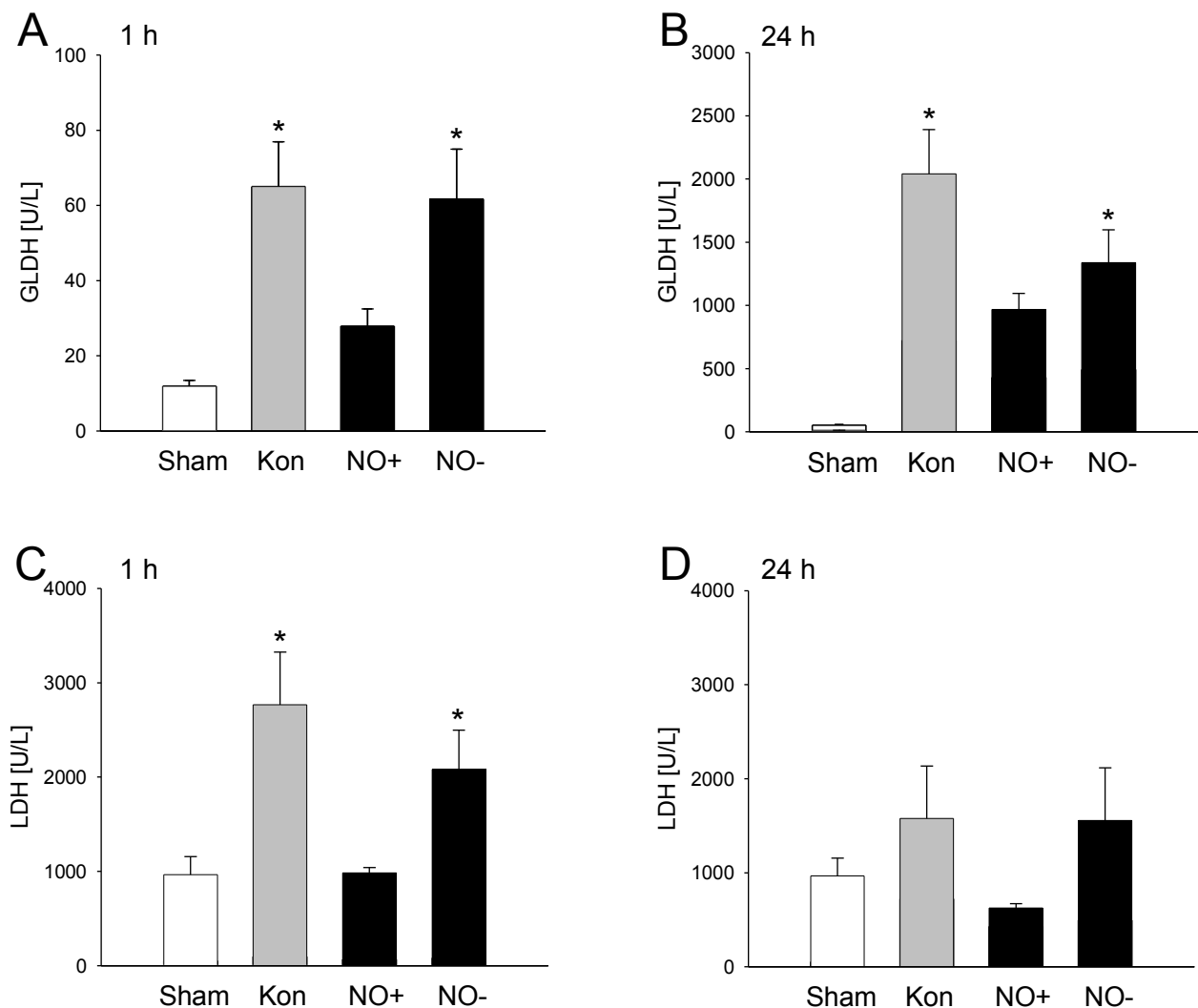
**Abbildung 12:** Quantitative Analyse von (A und B) Aspartat-Aminotransferase sowie (C und D) Alanin-Aminotransferase im Serum. Untersucht wurden Tiere 1 h bzw. 24 h nach 85% Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>6</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert±SEM. Rangsummen-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, †  $p < 0,05$  vs. Kon.

#### 4.3.1.2 Dehydrogenasen

Die mitochondriale Glutamatdehydrogenase (GLDH) ist ein Serumparameter für Zellnekrosen. In der pharmakologisch unbehandelten Kontrollgruppe stiegen die GLDH-Plasmaspiegel bereits eine Stunde nach Leberresektion signifikant an und zeigten sich 24 h später 200-fach erhöht. NO-Substitution konnte den GLDH-Anstieg schon eine Stunde nach Resektion mehr als halbieren, wobei sich kein statistisch signifikanter Anstieg zu unresezierten Tieren ergab. Dieser Effekt war auch nach 24 h in einem vergleichbaren Verhältnis nachzuweisen. Die NOS-Blockade führte 1 h nach Resektion zu keiner wesentlichen Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. 24 h nach

Resektion zeigte sich jedoch der GLDH-Anstieg um etwa 1/3 abgemildert (Abbildung 13 A und B).

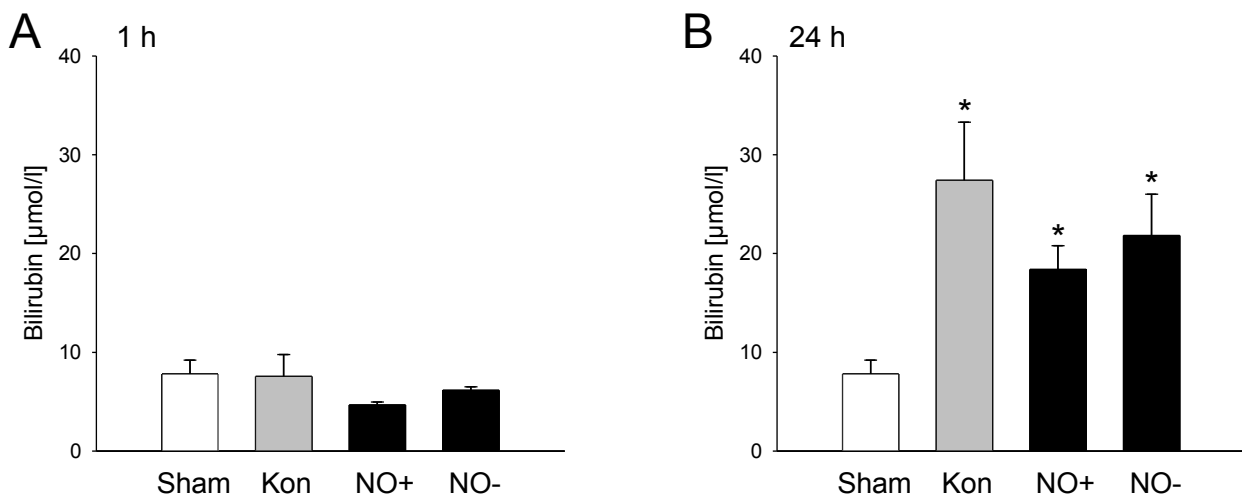
Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein weniger spezifischer laborchemischer Parameter für Zelluntergang. In der Kontrollgruppe und der NO-substituierten Gruppe zeigten sich die LDH-Plasmaspiegel eine Stunde nach Leberresektion gegenüber unresezierten Tieren signifikant erhöht. Vierundzwanzig Stunden nach Resektion waren in diesen beiden Gruppen die Plasmaspiegel zwar noch tendenziell erhöht, jedoch bereits wieder soweit gefallen, dass sich keine statistische Signifikanz ergab. NO-Substitution konnte den LDH-Anstieg 1 h nach Resektion vollständig unterbinden und 24 h später waren gar Werte zu messen, die unter denen der unresezierten Sham-Gruppe lagen (Abbildung 13 C und D).



**Abbildung 13:** Quantitative Analyse von (A und B) Glutamat-Dehydrogenase sowie (C und D) Lactatdehydrogenase im Serum. Untersucht wurden Tiere jeweils 1 h bzw. 24 h nach 85% Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>3</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert±SEM. Rangsummen-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \* p < 0,05 vs. Sham, † p < 0,05 vs. Kon.

### 4.3.1.3 Bilirubin

Die Serumkonzentration von Bilirubin zeigte sich eine Stunde nach Leberresektion in allen Gruppen unverändert. Vierundzwanzig Stunden nach Resektion konnten in allen hepatektomierten Versuchsgruppen signifikant erhöhte Bilirubinkonzentrationen gemessen werden. Dabei führe die NO-Substitution tendenziell zu den niedrigsten Werten, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den etwas höheren Werten der unbehandelten Kontrollgruppe und der NOS- blockierten Gruppe. Kontrolltiere zeigten nach Resektion etwa dreifach erhöhte Bilirubinspiegel. Unter NO-Substitution stieg der Bilirubinspiegel um 25% weniger an (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Quantitative Analyse von Bilirubin im Serum. Untersucht wurden Tiere jeweils 1 h (A) bzw. 24 h (B) nach 85% Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert±SEM. Rangsummen-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \* p < 0,05 vs. Sham.

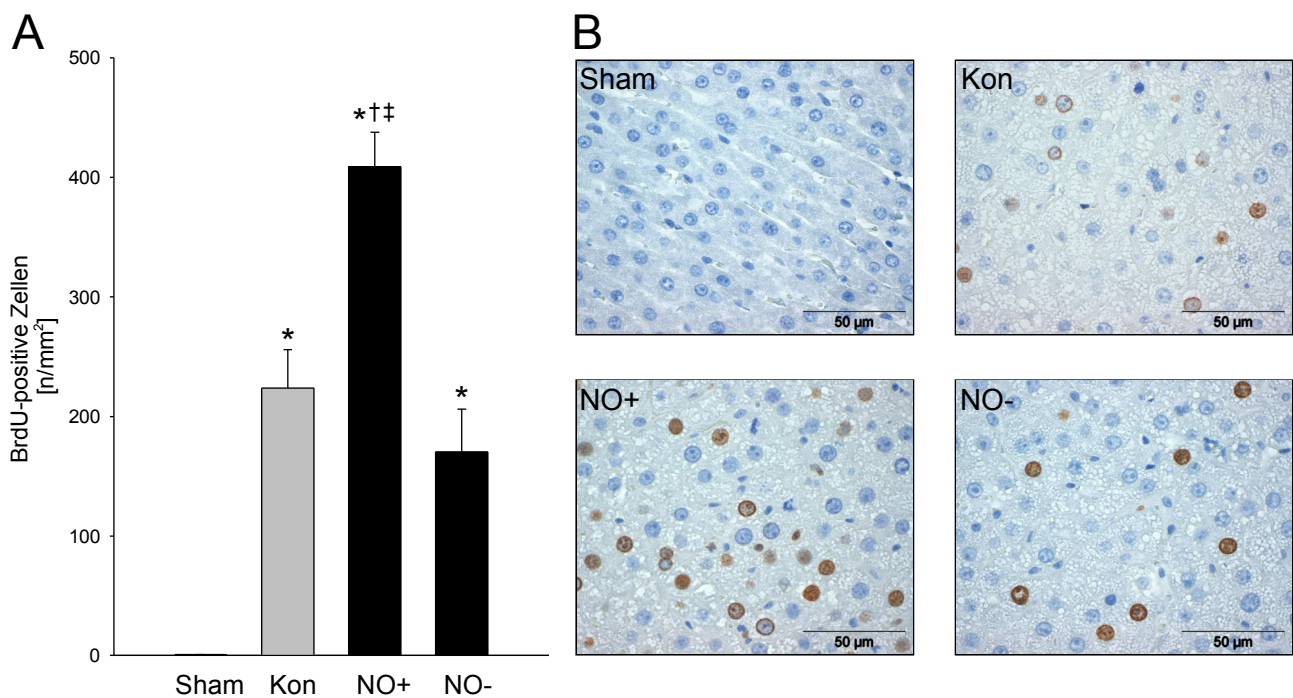


## 4.4 Leberregeneration

Die Wirkung von NO auf die Leberregeneration wurde 24 h nach Resektion mittels immunhistochemischem Nachweis der DNA-Synthese mit 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) und zusätzlich durch die Expression des „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) evaluiert.

### 4.4.1 Nachweis der DNA-Synthese mittels BrdU

Leberresektion induziert Leberregeneration, was der Anstieg der BrdU-positiven Hepatozyten von nahezu Null auf über 200 pro Quadratmillimeter nach 85% Hepatektomie zeigt. Substitution von NO konnte die Anzahl der proliferierenden Hepatozyten auf über 400 pro Quadratmillimeter verdoppeln. NOS-Blockade senkte dagegen die Anzahl auf unter 200 pro Quadratmillimeter (Abbildung 15 A).



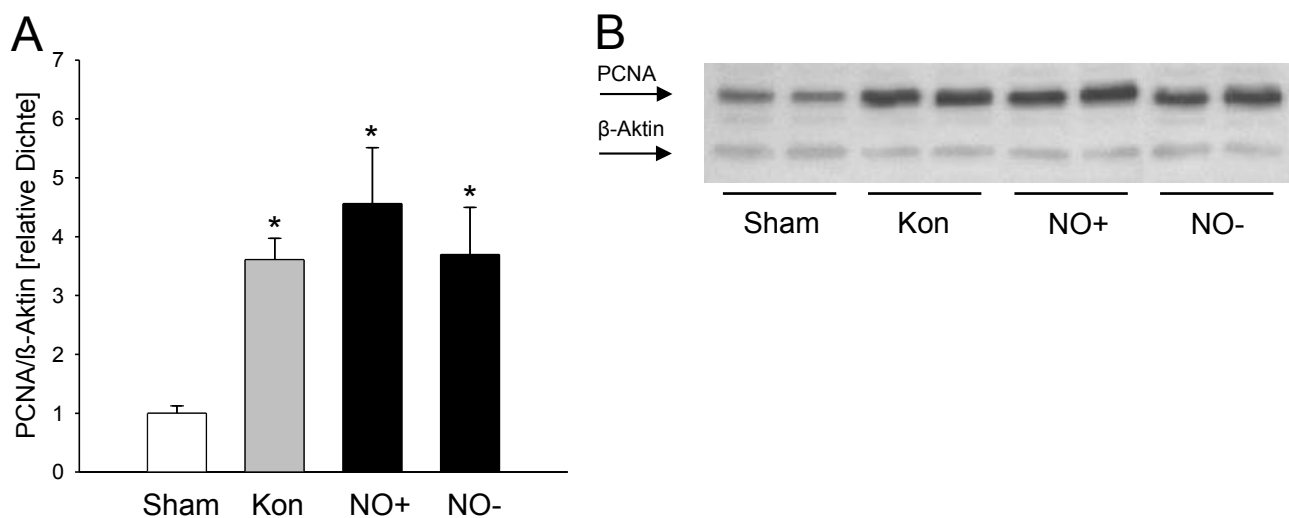
**Abbildung 15:** (A) Quantitative Analyse BrdU-positiver Hepatozyten durch mikroskopische Auszählung histologischer Leberschnittpräparate. (B) Repräsentative histologische Leberschnitte mit immunhistochemischer Darstellung der Zellkerne BrdU-positiver Hepatozyten. Untersucht wurden Tiere 24 h nach 85% Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>ε</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienen als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert±SEM. Rangsummen-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, †  $p < 0,05$  vs. Kon, ‡  $p < 0,05$  vs. NO-.

An den repräsentativen histologischen Schnitten (Abbildung 15 B) sind die unterschiedlichen Regenerationskapazitäten nachzuvollziehen. Immunhistochemisch gegengefärbt imponieren BrdU-

positive Hepatozytenzellkerne braun. Zu erkennen ist außerdem der Einfluss der 85% Hepatektomie auf das histologische Gewebebild, welches jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher quantifiziert wurde. Histologische Schnitte der unresezierten und unbehandelten Sham-Gruppe zeigten ein homogenes Zellbild und eine intakte Läppchenstruktur, die Sinusoidalräume waren gut erkennbar. Nach 85% Hepatektomie kam es in allen resezierten Gruppen zu ausgeprägter Vakuolisierung der Hepatozyten, die Läppchenstruktur war schwieriger zu differenzieren und die Sinusoidalräume kaum zu erkennen.

#### 4.4.2 Expression von PCNA

Auf Proteinebene wurde der Regenerationsreiz durch die 85% Hepatektomie anhand der Expression des „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) untersucht. Die Densitometrie des PCNA ergab in allen resezierten Versuchsgruppen erhöhte Expressionsraten nach 85% Hepatektomie (Abbildung 16 A). In der Kontrollgruppe und der NOS-inhibierten Gruppe stieg die PCNA-Expression auf das 3,5-Fache. NO-Substitution konnte die PCNA-Expression auf das 4,5-Fache steigern. Ein repräsentativer Westernblot verdeutlicht die höhere Dichte der entsprechenden PCNA-Banden der resezierten Gruppen gegenüber der unresezierten Sham-Gruppe (Abbildung 16 B).



**Abbildung 16:** (A) Quantitative Analyse der Expression des „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA). (B) Repräsentativer Westernblot von PCNA. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Untersucht wurden Tiere 24 h nach 85 % Hepatektomie und NO-Substitution mit Molsidomin (Gruppe NO+), NOS-Inhibition mit N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin-methylester (Gruppe NO-) oder Gabe äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe Kon). Tiere ohne Hepatektomie dienten als Sham-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert±SEM. Rangsummen-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich, \* p < 0,05 vs. Sham.

## 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden tierexperimentellen *in vivo* Studie wurde die Wirkung von NO auf die hepatische Makro- und Mikrozirkulation, sowie auf Leberschaden, Leberfunktion und Leberregeneration der „reduced-size“-Leber nach ausgedehnter 85% Hepatektomie multimodal untersucht. Stickstoffmonoxid wurde dazu entweder substituiert oder durch Blockade der NO-Synthasen reduziert. Folgende Ergebnisse konnten dabei erhoben werden:

1. Die 85% Hepatektomie verursachte einen signifikanten akuten Leberschaden, der bereits 1 h nach Resektion nachweisbar und nach 24 h deutlicher ausgeprägt war. NO-Substitution konnte die frühe Schädigung abmildern. Vierundzwanzig Stunden nach Hepatektomie können die NO-Substitution und in geringerem Maße auch die NOS-Blockade den Leberschaden reduzieren.
2. Die 85% Hepatektomie verursachte eine portale Hyperperfusion, einhergehend mit hepatoarterieller Hypoperfusion. NO-Substitution konnte die arterielle Minderversorgung ausgleichen. Durch NOS-Blockade verstärkte sich der arterielle Perfusionsverlust.
3. Der gesamthepatische Zufluss, welcher vom portalvenösen Volumenanteil dominiert wird, verdoppelte sich bezogen auf die Restlebermasse nach 85% Hepatektomie. NO-Substitution führte nicht zu einer signifikanten Änderung. Unter NOS-Blockade blieb dagegen nach Resektion ein signifikanter Anstieg gegenüber unresezierten Tieren aus.
4. Diese makrohämodynamischen Veränderungen spiegelten sich in der hepatischen Mikrohämodynamik wider. So stieg als Beleg für die intrahepatische Hyperperfusion nach 85% Hepatektomie der Blutvolumenfluss ohne pharmakologische Behandlung und unter NOS-Blockade um etwa das Dreifache, unter NO-Substitution sogar um etwa das Sechsfache.
5. Trotz dieser erheblichen Unterschiede in dem pro Zeiteinheit die Sinusoide durchfließenden Blutvolumen änderte sich der sinusoidale Scherstress wider Erwarten nicht signifikant.
6. Unabhängig von der unterschiedlichen arteriellen Versorgung mit sauerstoffreichem Blut fiel die Gewebeoxygenierung in allen resezierten Gruppen nach 85% Hepatektomie auf einen

O<sub>2</sub>-Partialdruck um 15 mmHg ab.

7. Die 85% Hepatektomie erwies sich erwartungsgemäß als starker Regenerationsreiz, was das vermehrt exprimierte PCNA sowie die nachgewiesene DNA-Synthese nach Resektion belegt. NO-Substitution verdoppelte die Anzahl regenerierender Hepatozyten. NOS-Blockade erbrachte dagegen keine regenerativen Vorteile.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 5.1.1 Diskussion des Modells

Zur Untersuchung der Leberregeneration stehen neben dem beschriebenen *in-vivo*-Modell auch unterschiedliche *in vitro*- und *ex vivo*-Modelle zur Verfügung. *In vitro*-Modelle bieten Vorteile bei der isolierten Betrachtung bestimmter Zellpopulationen, insbesondere wenn es um die Untersuchung von Stammzellen und ihrer Beteiligung an den regenerativen Vorgängen geht (He et al. 2013). Während einigen Nachteilen der Zellkultur, wie der relativ kurzen Lebensdauer und der Dedifferenzierungstendenz, mittels modernem „Bioengineering“ entgegengewirkt werden kann (Giri et al. 2013), sind naturgemäß weder das komplexe Zusammenspiel aller natürlicherweise an der Regeneration beteiligter Zellen, noch systemische Auswirkungen auf den Gesamtorganismus in einem *in vitro*-Setting zu simulieren. *Ex vivo*-Modelle erlauben dagegen auch die Untersuchung intrahepatischer Perfusionsparameter (Alzaraa et al. 2013; Ferrigno et al. 2013). Die Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion, welche die Integrität von Transplantatlebern entscheidend beeinflussen, können unter anderem an *ex vivo*-Lebern untersucht werden (Minor et al. 2013). Darüber hinaus werden komplexe *ex vivo*-Multiorganmodelle entwickelt, die der Leber als Zielorgan ein physiologischeres Milieu bereitstellen sollen (Chung et al. 2012). Bei einem zum *in vivo*-Modell vergleichbaren Bedarf an Versuchsindividuen erfordern diese *ex vivo*-Settings allerdings einen ungleich höheren präparativen und technischen Aufwand und sind außerdem für mittlere oder längerfristig angelegte Beobachtungszeiträume ungeeignet, da Perfusionszeiten von 24 h oder mehr noch nicht erreicht werden können (Dutkowski et al. 2006; Chung et al. 2013). *In vivo*-Modelle der autologen oder allogenen Lebertransplantation sind etabliert, gehen jedoch neben dem im Vergleich zur Leberresektion höheren operativen Aufwand insbesondere in Modellen zur Simulation postmortaler allogener Organspenden auch mit einem erhöhten Ressourcenverbrauch einher (Huang et al. 2011; Schlegel et al. 2013). Transplantationsmodelle bleiben daher zumeist der Untersuchung transplantationsexklusiver Fragestellungen vorbehalten,

insbesondere des akuten Ischämie-Reperfusionsschadens und immunbedingter chronischer Organschädigung, die jedoch nicht Gegenstand dieser Studie sind (Urakami et al. 2007; Shimizu et al. 2013, 2013). Diesem Umstand mag es auch geschuldet sein, dass Transplantationsmodelle in einer Standardpublikation zu Tiermodellen der Leberregeneration keine Erwähnung finden (Palmes und Spiegel 2004), obwohl diese in der entsprechenden Arbeitsgruppe durchaus etabliert sind (Palmes et al. 2002). Zur Untersuchung regenerativer Vorgänge bei chronischem Leberschaden oder akutem toxischem Leberversagen stehen schließlich eine Reihe von *in vivo*-Modellen mit entweder vorbestehender oder pharmakologisch-toxisch induzierter Leberschädigung zur Verfügung (Palmes und Spiegel 2004), die jedoch wiederum die akuten hämodynamischen Veränderungen in einem chirurgisch Größenreduzierten Organ nicht abbilden können.

Mit der partiellen Hepatektomie an der Ratte steht ein seit gut 80 Jahren etabliertes *in vivo*-Verfahren zur Verfügung, das in Bezug auf allgemeine Versuchs-kriterien, insbesondere Reproduzierbarkeit, Spezifität und Durchführbarkeit, entscheidende Vorteile bietet (Higgins 1931; Abral-des et al. 2006). Dieses Modell ist bei überschaubarem chirurgischem Aufwand in hohem Maße standardisierbar und am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock etabliert (Palmes und Spiegel 2004; Glanemann et al. 2005; Eipel et al. 2010a). Die große Mehrzahl der tierexperimentellen Arbeiten zur Leberregeneration an Kleinnagern nutzt das ausführlich beschriebene Standardmodell der 70% Hepatektomie an der Ratte. Erst in den letzten Jahren wird deutlich, dass dieses Modell die Pathophysiologie der grenzwertigen „reduced-size“-Leber möglicherweise nicht exakt genug abbilden kann, vor allem da dramatische Veränderungen in der Leberhämodynamik erst bei höherem Resektionsausmaß beobachtet werden (Dahmen et al. 2007). Vor diesem Hintergrund wird zur Untersuchung des „small-for-size“-Syndroms eine Volumenreduktion des Restorgans von mehr als 70% als notwendig erachtet (Debbaut et al. 2012). Die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge der Leberregeneration bei ausgedehnter „reduced-size“- bzw. „small-for-size“- Leber, das heißt bei über 70% ausgedehnten Resektionsausmaßen, und insbesondere die Bedeutung von NO für die Regeneration in dieser Situation sind bisher noch wenig untersucht.

## 5.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

### 5.1.2.1 Chirurgische Präparation

Die spezielle Lappenanatomie der Rattenleber lässt stufenweise verschiedene Resektionsausmaße bis zu 97% zu, die große Mehrzahl an Publikationen befasst sich jedoch mit dem Standardmodell der 2/3-Resektion bzw. 70% Hepatektomie (Martins et al. 2008). Die subtotale Hepatektomie an der Ratte mittels der standardmäßig angewandten Lappenligatur wurde in der Vergangenheit als letales Modell angesehen (Weinbren und Woodward 1964; Panis et al. 1997). Mittlerweile lässt sich durch ein gefäßorientiertes, mikrochirurgisch aufwendiges Resektionsverfahren auch bei 90% Hepatektomie eine Ein-Wochen-Überlebensrate von 100% erreichen (Madrahimov et al. 2006). Möglicherweise ist der damit verbundene höhere operative Aufwand mitverantwortlich für die Tatsache, dass Regenerationsmodelle mit ausgedehnter „reduced-size“ Leber noch nicht flächendeckend etabliert und somit Ergebnisse für diese in der Leber- und Transplantationschirurgie problematischen Grenzfälle rar sind.

Um die Wirkung von NO sowohl auf die Leberhämodynamik als auch auf Organintegrität und Regeneration der „reduced-size“ Leber *in vivo* untersuchen zu können, musste das in der vorliegenden Arbeit gewählte Modell zwei spezielle Bedingungen erfüllen. Die angewandte Operationstechnik sollte einerseits zu standardisiert geringer Lebermasse führen mit reproduzierbar messbarer deutlicher Leberschädigung. Zweitens sollte das Modell subletal sein, um die Evaluation der Regeneration nach 24 h uneingeschränkt zu ermöglichen. Zu Gunsten der methodischen Vereinfachung, einhergehend mit einer relevanten Zeitersparnis bei insgesamt bereits aufwendiger Präparation insbesondere im Versuchssetting zur Untersuchung der Leberhämodynamik wurde die etablierte Ligaturtechnik angewandt. Dabei wird die Blutversorgung jedes einzelnen Leberlappens oder Lappenteils hilusnah durch eine einzelne Ligatur unterbunden und der entsprechende Lappen reseziert. Gegenüber mikrochirurgischen, gefäßorientierten Methoden mit Ligatur jeweils einzelner Gefäße besteht dabei ein etwas höheres Risiko der Schädigung nicht resezierter Lappenteile (Madrahimov et al. 2006). Durch entsprechend exakte Platzierung der Ligaturen konnte dieses Risiko minimiert werden, unerwünschte

Minderperfusionen oder Nekrosen der nicht resezierten Lappen traten makroskopisch auch nach 24 h nicht auf. Das Resektionsausmaß wurde darüber hinaus im Ausgleich gegenüber der beschriebenen und von manchen Arbeitsgruppen favorisierten subletalen Maximalvariante von 90% etwas reduziert (Debbaut et al. 2012). In Abwandlung der von Martins et al. beschriebenen Resektionsstufen (Martins et al. 2008) und in Anlehnung an das Resektionsausmaß anderer Arbeitsgruppen (Shimizu et al. 2000) konnten mit der 85% Hepatektomie an der Wistar-Ratte beide speziellen Kriterien erfüllt und ein Modell zur Untersuchung der „reduced-size“ Leber und des „small-for-size“- Syndroms etabliert werden (Cantré et al. 2008; Eipel et al. 2010a).

### 5.1.2.2 Pharmakologische Behandlung

Die pharmakologische NO-Substitution erfolgte durch intraperitoneale Injektion des NO-Donors Molsidomin. Molsidomin ist ein in der klinischen Anwendung etabliertes Medikament zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit (Reden 1990). Es wird in der Leber durch enzymatische Hydrolyse und Decarboxylierung zum aktiven Metaboliten SIN-1 umgewandelt, welcher spontan NO freisetzt (Feelisch et al. 1989; Schror et al. 1989). Der aktive Metabolit besitzt eine Eliminationshalbwertszeit von nur ca. 1 - 2 h. Die Molsidominwirkung hält jedoch länger an, was zum Teil auf die verzögerte Metabolisierung und die nicht enzymatische NO-Freisetzung zurückgeführt wird (Rosenkranz et al. 1996). Durch die nötige enzymatische Umwandlung von Molsidomin zum aktiven Metaboliten SIN-1 in der Leber ist die Pharmakokinetik von der Leberfunktion abhängig (Rosenkranz et al. 1996). In der akuten „small-for-size“-Situation kann daher durch die Leberfunktionseinschränkung mit verminderter Effizienz der NO-Substitution gerechnet werden. Die erste Gabe von Molsidomin erfolgte aus diesem Grund bereits 24 h vor der Leberresektion. Mit Linsidomin steht theoretisch auch der aktive Metabolit SIN-1 als Pharmakon zur Verfügung, der jedoch neben einer geringeren Halbwertszeit auch den Nachteil hat, dass er intravenös appliziert werden muss (Delonca et al. 1997). Andere alternativ verfügbare NO-Donoren bieten Nachteile, wie extrem kurze Halbwertszeiten, beispielsweise im Fall von Nitroglycerin, oder werden an pharmakologische Substanzen gekoppelt verabreicht, welche selbst für dieses Versuchssetting unerwünschte Nebenwirkungen besitzen, wie zum Beispiel NO-Aspirin



(Yamamoto und Bing 2000).

Die pharmakologische Behandlung zur NOS-Blockade erfolgte mit L-N $\omega$ -Nitroarginin Methyl Ester (L-NAME), einem wasserlöslichen Prodrug zu dem synthetischen, kompetitiven NOS-Antagonisten L-N $\omega$ -Nitroarginin (L-NNA). L-NAME selbst ist ein schwacher Antagonist mit einer Halbwertszeit von maximal 30 min, der durch ubiquitäre Esterasen zum hoch wirksamen L-NNA hydrolysiert wird (Pfeiffer et al. 1996; Griffith und Kilbourn 1996). L-NNA ist ein unspezifischer NOS-Inhibitor mit einer Halbwertszeit von 20 h (Tabrizi-Fard und Fung 1996), zeigt jedoch ein unterschiedliches nonkovalentes Bindungsverhalten zu den verschiedenen NOS-Isoenzymen. Während die iNOS sofort, jedoch schnell reversibel geblockt wird, ist die Bindung an eNOS und nNOS zeitabhängig und nur langsam reversibel (Moore et al. 1996). Neben den beschriebenen Substanzen stehen eine Vielzahl alternativer natürlicher und synthetischer NOS-Inhibitoren zur Verfügung (Vitecek et al. 2012). L-NAME wurde gewählt, da es zusammen mit L-NNA zu den etablierten, am häufigsten in humanen und tierexperimentellen Studien angewendeten NOS-Inhibitoren zählt (Vitecek et al. 2012) und die Pharmakokinetik ausgiebig an der Ratte untersucht wurde (Tabrizi-Fard und Fung 1996). Über den Einfluss des unterschiedlichen Bindungsverhaltens zu den einzelnen NOS-Isoenzymen kann gegenwärtig nur spekuliert werden. Einerseits wird die iNOS je nach Betrachtungsweise entweder als wichtiger NO-Produzent während der Leberregeneration betrachtet (Carnovale und Ronco 2012) oder für die Produktion von schädlichen Sauerstoffradikalen verantwortlich gemacht (Jiang et al. 2009). Es gibt andererseits Hinweise, dass die iNOS an der durch Scherstress hervorgerufenen Freisetzung von NO in seiner vermuteten Rolle als Regenerationstrigger gar nicht beteiligt ist (Schoen und Lautt 2001). Somit könnte der Effekt der im Vergleich zur eNOS schnell reversiblen Blockade der iNOS durch L-NAME/L-NNA für die Regeneration der „reduced-size“-Leber gering sein.

### 5.1.2.3 Anästhesie

Auf eine suffiziente Anästhesie während der chirurgischen Intervention kann selbstverständlich auch in tierexperimentellen Studien nicht verzichtet werden (Gargiulo et al. 2012). Die gewählten Verfahren und Anästhetika wurden den unterschiedlichen Erfordernissen der

einzelnen Versuchsabschnitte angepasst.

Der Studienabschnitt A zur Untersuchung der Hämodynamik erforderte nur eine einzeitige Intervention bei jedoch hohem präparativen Aufwand und vergleichsweise langer Anästhesiezeit. Es war hier dem Versuchsaufbau nach möglich und notwendig, die Halsgefäße der Tiere zu katheterisieren, wodurch sowohl die Verabreichung eines intravenösen Anästhetikums als auch die Steuerung desselben über ein invasives Monitoring möglich wurde. Zur Narkoseeinleitung und zur Überbrückung der Zeit bis zur Katheterisierung der Halsgefäße wurde Pentobarbital intraperitoneal injiziert. Im weiteren Verlauf erfolgte die Gabe als Bolus über die intravenös platzierten Katheter. Pentobarbital ist ein kurz wirksames Barbiturat, das einem First-Pass-Metabolismus in der Leber unterliegt, während die Metaboliten hauptsächlich renal eliminiert werden (Ossenberg et al. 1975). Trotz der vorwiegend hepatischen Verstoffwechslung wird Pentobarbital in der klinischen Anwendung gerade bei akutem Leberversagen als Reserveanästhetikum angesehen (Stravitz et al. 2007). Unter anderem wird dabei von einer zusätzlichen intestinalen Verstoffwechslung ausgegangen (Knodell et al. 1980). Auch in der akuten „small-for-size“- Situation nach Hepatektomie, einhergehend mit akutem Leberschaden, war daher eine ausreichende anästhetische Wirkung von Pentobarbital ohne relevante Hepatotoxizität zu erwarten. Wie die meisten Barbiturate besitzt Pentobarbital ein erhebliches Abhängigkeitspotenzial. Bei der Ratte treten physische Entzugssymptome jedoch erst nach einer zehntägigen kontinuierlichen Einnahme auf (Suzuki 1990). Ältere Arbeiten geben Hinweise, dass Pentobarbital einerseits die DNA- und RNA-Synthese hemmen (Baserga und Weiss 1967; Rovera und Baserga 1970) sowie andererseits die Serumkonzentrationen von hypothalamischem Somatostatin und hypophysärem Wachstumshormon steigern kann (Saito et al. 1979). Eine neuere Studie von Hamaya et al. untersuchte die Wirkung mehrerer Anästhetika inklusive Pentobarbital und Isofluran auf die mRNA-Expression der „immediate early genes“ c-fos und c-jun in verschiedenen Geweben, darunter auch in der Rattenleber. Zu den stufenweisen Untersuchungszeitpunkten von 5 bis 120 Minuten nach Narkosebeginn konnte dabei für Pentobarbital kein signifikanter Einfluss auf die mRNA-Expression in der Leber nachgewiesen werden, anders als in Hirn, Herz und Nieren. Die Isoflurannarkose führte dagegen zu erhöhter mRNA-Expression beider genannter „immediate early genes“ in der

Leber, jedoch frühestens 30 Minuten nach Narkosebeginn (Hamaya et al. 2000). Zusammengefasst scheint Pentobarbital tendenziell ein größeres Potenzial zu besitzen, die Regenerationsprozesse zu beeinflussen und folglich für die Präparation von Tieren, die der Untersuchung von Regenerationsparametern dienen, weniger geeignet zu sein.

Die Präparation und Hepatektomie dieser Tiere im entsprechenden Studienabschnitt B erfolgte daher unter einer relativ kurzzeitigen Inhalationsnarkose mittels eines Gemischs aus Isofluran, Lachgas ( $N_2O$ ) und Sauerstoff. Mit Narkosezeiten bis maximal 30 Minuten wurde dem beschriebenen Einfluss auf die hepatische mRNA-Expression von c-fos und c-jun durch Isofluran begegnet. Jedoch kann eine geringe Beeinflussung der Regenerationskaskade während der Hepatektomie und unmittelbar postoperativ letztlich nicht ausgeschlossen werden. Pentobarbital kam im Studienabschnitt B, in welchem unter anderem die DNA-Synthese untersucht wurde, ausschließlich zur Anwendung, um den Versuch nach 24 h durch eine letale Dosis zu beenden. Innerhalb des kurzen Zeitraums zwischen Anästhesie und Probenentnahme war dabei ein Einfluss auf die erfassten Regenerationsparameter nicht zu erwarten. Die Beendigung des Versuchs durch eine letale Pentobarbitaldosis erfolgte analog im Studienabschnitt A, wie in der Veterinärmedizin üblich (Caffrey et al. 2011).

Isofluran ist auch ohne invasives Monitoring gegenüber anderen volatilen und intravenösen Anästhetika gut steuerbar und unterliegt einer nur geringen Biotransformation ohne nennenswerte Hepatotoxizität (Eger 1984; Ludders 1992). Wie die meisten Anästhetika beeinflussen sowohl Isofluran und Lachgas als auch Pentobarbital das kardiovaskuläre System und damit auch die systemische, splanchnische und hepatische Hämodynamik (Redfors et al. 2013). Die stärkste Senkung der Leberperfusion kann durch Inhalation höherer Dosen von Lachgas erreicht werden, verursacht durch einen systemisch, splanchnisch und hepatoarteriell erhöhten arteriellen Gefäßwiderstand (Thomson et al. 1982). Dieser Effekt kann jedoch durch Dosisanpassung insbesondere in Kombination mit anderen volatilen Anästhetika deutlich reduziert werden (Goldfarb et al. 1990). In Verbindung mit Isofluran, welches allein verabreicht den systemischen und splanchnischen Fluss gering senkt (Bencze et al. 2013), kann Lachgas den arteriellen Mitteldruck und die Herzfrequenz stabilisieren (Constantinides et al. 2011). Bei nur einmaliger

Isofluran-/Lachgas-Anästhesie mit relativ kurzer Narkosezeit im Studienabschnitt B war daher ein für die Initiation der Leberregeneration während der Hepatektomie relevanter Einfluss auf die hepatische Hämodynamik unwahrscheinlich. Zudem wurden auch Tiere ohne Hepatektomie einer Sham-Operation mit identischer Narkose unterzogen, um eventuell auftretende minimale Effekte zu egalisieren.

Pentobarbital kann die Herzfunktion beeinflussen und zeigte in älteren Studien eine Reduktion des Herzminutenvolumens, jedoch keine Reduktion der splanchnischen Perfusion (Lee et al. 1985). Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass ein vermindertes Schlagvolumen unter Pentobarbitalnarkose in üblicher Dosierung durch die positiv chronotrope Wirkung ausgeglichen werden kann (Redfors et al. 2013). Gegenüber anderen Anästhetika inklusive Isofluran zeigt Pentobarbital daher einen geringeren Einfluss auf die systemische Hämodynamik (Bencze et al. 2013) und bietet sich zur Untersuchung hämodynamischer Parameter, wie im Studienabschnitt A der vorliegenden Studie an. Um den Einfluss weiter zu minimieren wurde während der Untersuchung der arterielle Mitteldruck aller Tiere zwischen 100 und 110 mmHg eingestellt.

#### **5.1.2.4 Hämodynamische, laborchemische und immunhistochemische Parameter**

Die hepatische Makro- und Mikrohäodynamik ist mit den erfassten hämodynamischen Parametern umfassend abgedeckt. Vom portalvenösen und hepatoarteriellen Zufluss per Ultraschalllaufzeitverfahren, über die intrahepatische Perfusion mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowie die hepatische Gewebepfusion mittels Laser-Doppler-Flussmessung bis zur Gewebeoxygenierung mit Clark-Typ-pO<sub>2</sub>-Sonden konnten alle relevanten Parameter erfasst werden. Von besonderer Bedeutung für die bearbeitete Fragestellung war die Berechnung des sinusoidalen Scherstress. Diese Berechnung erfolgte wie beschrieben aus den intravitalmikroskopisch erfassten mikrohäodynamischen Parametern näherungsweise unter vereinfachender Annahme zylindrischer Gefäßquerschnitte und laminarer Strömung einer Newton'schen Flüssigkeit (Aroesty und Gross 1972, 1972; Hori et al. 1998). Es ist anzunehmen, dass sich diese Vereinfachungen grundlegender physikalischer Parameter durch Anwendung auf alle Versuchsgruppen egalisieren und die Daten damit vergleichbar bleiben.

Ungleich komplexer ist der Fall für die Gesamtblutviskosität gelagert, welche für die angewendete Formel ebenfalls relevant ist. Diese hängt nicht nur vom Hämatokrit einerseits und der Plasnaviskosität andererseits ab, sondern ändert sich auch mit der Wandscherrate (Nwose und Richards 2011). Damit ist sie auch eben jenen hämodynamischen Einflussgrößen unterworfen, welche zur Berechnung des Scherstress quantitativ bestimmt und die durch die 85% Hepatektomie sowie die pharmakologische Beeinflussung des NO-Haushalts beeinflusst wurden, nämlich Blutfließgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser. Klinisch und experimentell ist die apparative Messung der Gesamtblutviskosität beispielsweise durch Kapillarviskosimeter möglich (Kim et al. 2013). Dies gilt jedoch nur bei hohen Wandscherraten während der Messung (Lowe 1987). Der Einfluss mikrohämodynamischer Veränderungen des Gefäßbetts auf die Viskosität kann ebensowenig durch diese Methode abgebildet werden, wie er in verschiedenen Formeln zur näherungsweisen Bestimmung der Viskosität aus dem Verhältnis von Hämatokrit zum Gesamtserumprotein Eingang findet (Nwose 2010). Experimentelle Vergleichsdaten oder gar spezifische mathematische Modelle zur Berechnung der Blutviskosität in den Lebersinusoiden sind in der Literatur nicht verfügbar. Darüber hinaus besitzen auch die Erythrozytenaggregation und andere Zell-Zell-Interaktionen Einfluss auf die Blutviskosität (Nwose 2010). Es ist vorstellbar, dass in engen Kapillarräumen die korpuskulären Blutbestandteile gegenüber dem Plasma in höherem Maße die Viskosität beeinflussen, als es für größere Gefäße angenommen wird. Dabei würden auch Zell-Zell-Interaktion, wie die genannte Erythrozyten- aber auch die Thrombozytenaggregation und Zell-Gefäßwand-Interaktion, überproportional an Bedeutung gewinnen. Da NO sowohl die Thrombozytenaggregation als auch die Gefäßwandadhäsion von Thrombozyten und Leukozyten hemmt (Lei et al. 2013), ist ein mittelbarer Einfluss der vorgenommenen pharmakologischen Behandlung auf die Blutviskosität vorstellbar. Zusammenfassend ist die exakte in den Lebersinusoiden vorliegende Blutviskosität gegenwärtig nicht bestimmbar. Box et al. untersuchten 2005 den Einfluss aller drei Parameter Blutfluss, Gefäßdiameter und Viskosität auf den Wandscherstress in einem Computermodell der Carotisbifurcation. In ihren Simulationen zeigte unter diesen drei Parametern die Blutviskosität den geringsten Einfluss auf den Scherstress (Box et al. 2005). Vor diesem Hintergrund galt das Hauptaugenmerk der Quantifizierung der

mikrohämodynamischen Parameter. Um aufwändige und möglicherweise nur eingeschränkt auf den Untersuchungsfokus übertragbare Messungen zu vermeiden, wurde die Viskosität nach Angaben aus der Literatur zu Kleinnagerblut vereinfachend für alle Versuchsgruppen als konstant angenommen (Vogel et al. 2003; Windberger et al. 2003). Eine alternative nicht invasive Messmethode zur Verifizierung der berechneten Scherstresswerte wäre wünschenswert. *In vivo*-Messungen des Scherstress sind prinzipiell mittels Phasenkontrast-Magnetresonanztomographie möglich (Pantos et al. 2007). Die technischen Limitationen der Magnetresonanztomographie erlauben zwar Messungen beispielsweise an der Aorta eines Kleinnagers (Bjorck et al. 2012), nach gegenwärtigem Stand der Technik jedoch wie die beschriebenen Messmethoden und mathematischen Modelle ebenfalls nicht in Kapillargebieten.

Bei den laborchemischen Parametern galt das Hauptaugenmerk dem Nachweis des akuten Leberschadens des „small-for-size“ Organs, weshalb Transaminasen und Dehydrogenasen bestimmt wurden. Die Serumkonzentrationen dieser Enzyme sind klinisch etablierte Messgrößen zum Nachweis eines akuten oder chronischen Leberschadens (Schmidt und Schmidt 1967; Dufour et al. 2000a). Díaz-Juárez et al. sind dagegen aufgrund ihrer *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen nach Hepatektomie an der Ratte der Ansicht, die Freisetzung dieser Leberenzyme erfolge im Zuge der Leberregeneration nicht durch Zell- und Mitochondrienschädigung, sondern sei in erster Linie abhängig von der Organperfusion (Diaz-Juarez et al. 2006). Dieser Arbeitsgruppe war gelungen, insbesondere in *ex vivo* perfundierten Lebern eine von Apoptose- und Nekroserate unabhängige, sondern flussabhängige Freisetzung der Enzyme zu beobachten. Diese mit dem Fluss variable Transaminasenfreisetzung zeigte sich zudem reversibel und erschien damit nicht mit einem Hyperperfusionsschaden erklärbar. Tatsächlich werden sowohl die Bedeutung von Apoptose und Nekrose für die Leberregeneration, als auch die Korrelation derselben mit dem Anstieg der Leberenzyme kontrovers diskutiert (Panis et al. 1997; Oikawa und Novikoff 1995). Als unstrittig muss jedoch angesehen werden, dass im Rahmen der Leberregeneration nach ausgedehnter Hepatektomie Zellapoptosen und -nekrosen in relevantem Umfang auftreten können (Yoshida et al. 2007), wobei die Höhe des Transaminasenanstiegs nicht gut mit dem Ausmaß des Zellschadens korreliert (Dufour et al. 2000b). Eine vorwiegend flussabhängige und vom

Zellschaden unabhängige Freisetzung der Leberenzyme, wie von Díaz-Juárez et al. postuliert, käme jedoch einer Revolution der Serumdiagnostik von Leberwerten nahe. Dies würde bedeuten, dass diese Serumparameter zumindest im Rahmen der Leberregeneration nach Hepatektomie, welche bekanntermaßen mit erheblichen Veränderungen der Perfusion einhergeht, nicht für die Evaluation des Leberschadens geeignet wären. Vielmehr könnte man die Enzymfreisetzung unter dieser Voraussetzung hypothetisch als indirekten Perfusionsparameter betrachten. Dieser Annahme widersprechen die vorgelegten Daten. Während die Leberenzyme im Serum mit der 85% Hepatektomie unbehandelter Kontrolltiere signifikant anstiegen, führte die stärkste gemessene Parenchymperfusion unter NO-Substitution entgegen der Annahme nach Díaz-Juárez et al. nicht zu einem weiteren Anstieg der Serumwerte sondern zu einem deutlichen Abfall gegenüber der Kontrolle. Damit ist eine vorwiegend unmittelbar perfusionsabhängige Freisetzung der zytosolischen und mitochondrialen Enzyme in diesem Versuchsetting unwahrscheinlich und die Transaminasen und Dehydrogenasen konnten als Standardparameter für den Leberschaden herangezogen werden.

Eine Einschätzung der Leberfunktion nach ausgedehnter Hepatektomie erfolgte über den Serumbilirubinspiegel. Eine neuere Untersuchung impliziert jedoch, dass dieser Parameter im Rahmen der Leberregeneration nur eingeschränkt aussagekräftig sein kann. Ausgerechnet die für die Leberregeneration essenziellen Signalpfade beeinflussen offenbar auch die Transportsysteme für Bilirubin, wobei eine Umkehr des Transports konjugierten Bilirubins von den Gallenwegen in die Sinusoide stattfindet (Kimura et al. 2012). Daher wäre gerade bei verbesserter Regeneration auch ein steigender Serumbilirubinspiegel denkbar. Ergänzend wäre die Bestimmung weiterer Serumparameter der Synthese- und Entgiftungsleistung sinnvoll gewesen, wie beispielsweise Albumin und Ammoniak. Auch das biliäre System wäre durch die Quantifizierung des Galleflusses weiter evaluierbar gewesen. Die nötige Katheterisierung des Ductus choledochus hätte jedoch einen erhöhten präparativen Aufwand mit längerer Versuchsdauer bedingt, sowie insbesondere eine zusätzliche Manipulation des Lig. hepatoduodenale mit möglicher Beeinflussung der hepatischen Gefäße (Chen et al. 2013; Ferrigno et al. 2013). Im Hinblick auf die Erfassung hämodynamischer Parameter war dies unerwünscht.

Die Evaluation der Regeneration erfolgte sowohl durch den immunhistochemischen Nachweis der BrdU-Inkorporation während der hepatozytären DNA-Synthese (Russev und Tsanev 1973), als auch durch die Proteinanalyse von PCNA mittels Westernblot. Gegenüber der Bestimmung der Mitoserate, welche ihr Maximum in Rattenhepatozyten zwischen 36 h und 48 h nach Hepatektomie erreicht (Bybee et al. 1990; Lai et al. 2005), besitzt der Nachweis der DNA-Synthese mit Maximum nach 24 h (Kountouras et al. 2001) den Vorteil, dass sowohl die 85% Hepatektomie als auch die Messungen und Probenentnahmen zu identischen Umgebungsbedingungen im 12 h Tages-Nacht-Rhythmus der Versuchstiere erfolgen konnte. Einflüsse des zirkadianen Rhythmus konnten so minimiert werden (Schibler 2003). Neben BrdU stehen weitere alternative Thymidinanaloga zur Verfügung, welche wie BrdU während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut werden und zumeist über Antikörperreaktionen nach enzymatischem oder chemischem Aufspalten der untersuchten DNA nachgewiesen werden (Eidinoff et al. 1959; Wu et al. 2011). Für Untersuchungen, in welchen die Intaktheit der untersuchten DNA essenziell ist, stellt das Thymidinanalogon EdU (5-Ethynyldeoxyuridin) eine Alternative dar, da die Nachweisreaktion ohne Aufspaltung der Doppelhelix auskommt (Buck et al. 2008). Da die Integrität der DNA in der vorliegenden Untersuchung nicht von Belang war, verließen wir uns auf den seit Jahrzehnten als Standardverfahren beschriebenen sowie in unserer Arbeitsgruppe etablierten immunhistochemischen Nachweis der BrdU-Inkorporation (Eidinoff et al. 1959; Buck et al. 2008; Bravo et al. 2013). Auch zum durchgeführten PCNA-Westernblot gibt es Alternativen. Möglich wäre auch die Bestimmung anderer „immediate early genes“ bzw. Transkriptionsfaktoren, Zytokine und weiterer Kofaktoren der Regenerationskaskade gewesen, wie z. B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF- $\kappa$ B) (Brenner 1998; Kirillova et al. 1999; Chen und Xu 2012). Zum Nachweis des Regenerationsreizes in Ergänzung zur DNA-Synthese konzentrierten wir uns jedoch auf PCNA als gut etablierten Marker (Assy et al. 1998; Maga und Hubscher 2003; Liu et al. 2010).



## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Hepatische Makro- und Mikrohämodynamik

Zu den charakteristischen Vorgängen in der „reduced size“-Leber nach Transplantation oder Resektion gehören Veränderungen der hepatischen Makro- und Mikrohämodynamik (Hanna et al. 1988; Li et al. 2010). Unter Normalbedingungen beträgt der portalvenöse und hepatoarterielle Gesamtzufluss einer intakten, gesunden Leber etwa 25% des Herzzeitvolumens (Lautt und Greenway 1987). Der Anteil des portalvenösen Blutvolumens überwiegt dabei mit 65-90% den hepatoarteriellen Volumenanteil von 10-35%, wobei beide Fraktionen jeweils 50% zur Sauerstoffversorgung der Leber beitragen (Quiroga et al. 2001; Nakai et al. 2002; Eipel et al. 2010b). Das über die Pfortader zugeführte Blutvolumen ist nahezu ausschließlich abhängig vom venösen Abfluss der vorgeschalteten Organe und damit indirekt vom arteriellen Widerstand insbesondere des Darms (Lautt 2007). Dagegen können die hepatoarterielle, die prä- und postsinusoidale und auch die sinusoidale Durchblutung durch die Leber selbst reguliert werden. Ein komplexes System einer ganzen Reihe vasoaktiver Substanzen wirkt dabei auf die glatten Gefäßmuskulzellen der Leberarterie sowie der prä- und postsinusoidalen Gefäße und auf die kontraktile Ito-Zellen der Lebersinusoiden, aber auch auf die Kupffer- und Sinusendothelzellen (Rockey 2001; Lautt 2007). Die wichtigsten vasoaktiven Substanzen in der Leber sind neben Stickstoffmonoxid (NO) auch Endothelin-1 (ET-1), Kohlenmonoxid (CO) sowie Adenosin und Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) (Siebert et al. 2008).

Ein zentraler intrinsischer Regulationsmechanismus ist unter physiologischen Bedingungen die sogenannte „hepatic arterial buffer response“ (HABR) (Lautt 1985). Sie beschreibt die Fähigkeit der Leber, passive Veränderungen der portalvenösen Perfusion durch eine aktive Anpassung der hepatoarteriellen Durchblutung auszugleichen, mit dem Ziel die hepatische Gesamtpfusion konstant zu halten. Ursächlich wird hauptsächlich die sogenannte „adenosine washout“-Hypothese diskutiert. Hierbei wird angenommen, dass Adenosin kontinuierlich und unabhängig vom Sauerstoffangebot und -verbrauch in den Mall-Raum der terminalen Pfortaderäste und der hepatischen Arteriolen freigesetzt wird, wo es eine vasodilative Wirkung entfaltet. Bei steigendem

portalvenösen Zufluss wird Adenosin zunehmend aus dem Mall-Raum abtransportiert, also „ausgewaschen“. Durch die sinkende Adenosinkonzentration wird die hepatoarterielle Perfusion gedrosselt. Andersherum lässt ein verminderter portalvenöser Fluss die Adenosinkonzentration im Mall-Raum ansteigen, was eine hepatoarterielle Vasodilatation mit Steigerung der arteriellen Durchblutung bedingt. Von der Leberarterie ausgehende Flussänderungen können dagegen nicht aktiv durch die Pfortader kompensiert werden (Eipel et al. 2010b). Nach Resektion besitzt die „reduced size“-Leber ein vermindertes Organvolumen mit reduziertem gesamtheptatischem Gefäßquerschnitt und konsekutiv erhöhtem Gesamtwiderstand. Ohne weitere chirurgische Maßnahmen findet keine relevante Drosselung des splanchnischen Blutflusses statt. Da der portalvenöse Zufluss durch die Leber nicht reguliert werden kann, resultiert eine portale Hyperperfusion (Troisi et al. 2003). Es kann vermutet werden, dass die HABR durch eine Minderung der hepatoarteriellen Perfusion die hepatische Gesamtperfusion bis zu einem gewissen Resektionsausmaß konstant halten kann, möglicherweise sogar durch eine Absenkung des hepatoarteriellen Volumenanteils unter den in Literatur angegebenen Minimalwert von 10%. Die genaue Kapazität, nach deren Ausschöpfung eine manifeste Hyperperfusion des Leberparenchyms mit steigendem Scherstress insbesondere in den Sinusoiden entsteht, ist jedoch nicht bekannt (Lautt et al. 1990). Auch ist nicht ausreichend untersucht, in welchem Umfang die durch die HABR verursachte hepatoarterielle Minderperfusion, die sich in „reduced size“-Lebern beobachten lässt (Smyrniotis et al. 2002; Ho et al. 2013), zur Ausbildung eines „small-for-size“-Syndroms beitragen kann.

In der vorliegenden Studie lagen die einzelnen Volumenanteile unbehandelter, unresezierter Tiere der Sham-Gruppe an der hepatischen Gesamtperfusion im Einklang mit den Angaben in der Literatur (Quiroga et al. 2001; Nakai et al. 2002), das heißt im Mittel bei rund 87,3% portalvenös und 12,7% hepatoarteriell. Die 85% Hepatektomie pharmakologisch unbehandelter Tiere verursachte erwartungsgemäß eine deutliche portale Hyperperfusion mit Verdopplung des die Restlebermasse pro Zeiteinheit durchströmenden portalvenösen Blutvolumens. Gleichzeitig verschoben sich die Volumenteile auf im Mittel rund 95,7% portalvenöse und nur noch 4,3% hepatoarterielle Blutversorgung. Sowohl die relative portalvenöse Flusszunahme, als auch der

relative hepatoarterielle Perfusionsverlust stimmen mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen nach schrittweiser Resektion bis 90% gut überein (Debbaut et al. 2012). Da diese hämodynamischen Veränderungen unmittelbar nach der Hepatektomie auftraten, muss es als unwahrscheinlich angesehen werden, dass die hepatoarterielle Vasokonstriktion durch einen akuten NO-Mangel ausgelöst wurde. Erst etwa 2 h nach ausgedehnter Leberresektion kann eine verminderte Expression der eNOS nachgewiesen werden (Palmes et al. 2005). Es ist nicht anzunehmen, dass die konsekutiv eingeschränkte NO-Freisetzung bereits früher relevante vasoaktive Wirksamkeit entfaltet. Die beobachtete portale Hyperperfusion einhergehend mit einer sofortigen Drittelung des hepatoarteriellen Perfusionsanteils kann dagegen sehr gut durch das Adenosin-„washout“ und damit der „hepatic arterial buffer response“ (HABR) erklärt werden (Lautt 1985; Eipel et al. 2010b). Im weiteren kurzfristigen Verlauf nach ausgedehnter Hepatektomie muss dem durch verminderte NOS-Expression verursachten NO-Mangel, welcher darüber hinaus noch mit einer Überexpression des vasokonstriktiven ET-1 vergesellschaftet ist, jedoch Bedeutung für die hepatische Zirkulation beigemessen werden (Palmes et al. 2005).

Bei Betrachtung der mittels Ultraschall-Laufzeitverfahren erhobenen absoluten Flussmesswerte ist sowohl portalvenös als auch hepatoarteriell ein Flussabfall in allen hepatektomierten Gruppen gegenüber nicht resezierten Tieren auffällig. Dieser Flussabfall ist hämodynamisches Korrelat für den erhöhten Widerstand des nach 85% Hepatektomie entsprechend im Querschnitt reduzierten hepatischen Gefäßbetts und einer damit einhergehenden transienten portalen Hypertension, welche ebenfalls zu den typischen und komplikationsträchtigen hämodynamischen Veränderungen der „reduced-size“-Leber gehört und zum „small-for-size“-Syndrom beitragen kann (Raut et al. 2013; Li et al. 2010; Man et al. 2003). Der Pfortaderdruck wurde in der vorliegenden Studie nicht gemessen. Daten anderer Arbeitsgruppen zu ausgedehnter Leberresektion von 70 - 90% konnten jedoch bei zu den vorliegenden Ergebnissen vergleichbaren Flussparametern einen Anstieg des Pfortaderdrucks um 30 - 40% zeigen (Morsiani et al. 1998; Dahmen et al. 2007). Zusätzlich zu den intrahepatischen Veränderungen können durch die akute portale Hypertension auch systemisch ungünstige Veränderungen hervorgerufen werden. Durch verminderten venösen Rückfluss zum Herzen kann beispielsweise das Herzzeitvolumen sinken

(Moriura et al. 1990). Das sich bei anhaltender portaler Hypertension entwickelnde Darmwandödem ist außerdem ein Risikofaktor für Bakteriämien und Peritonitis, insbesondere bei gleichzeitigem Vorliegen einer Leberzirrhose (Hashimoto und Ohyanagi 2002). NO-substituierte Tiere zeigten im Vergleich zu den anderen resezierten Gruppen den geringsten Flussabfall, welcher sich bei getrennter Betrachtung von Pfortader und Leberarterie trotz des deutlichen Unterschieds nicht signifikant von den Werten unresezierter Tiere unterschied. Dies lässt auf einen verminderten Druck im Pfortadersystem schließen und somit auf eine tendenziell günstige Wirkung der NO-Substitution auf die akute portale Hypertension. Ob hierdurch auch die systemische Hämodynamik positiv beeinflusst und Sekundärkomplikationen abmildert oder gar vermieden werden, kann nicht beurteilt werden, entsprechende Daten wurden im Rahmen dieser Studie nicht erhoben.

Die Substitution von Stickstoffmonoxid erfolgte mittels Molsidomin, welches NO unabhängig von Expression und Aktivität der NO-Synthasen freisetzt (Feelisch et al. 1989; Schror et al. 1989). Man kann daher annehmen, dass das Molekül den unterschiedlichen Effektoren in allen intakten Organabschnitten der „reduced-size“-Leber zur Verfügung stand. Diese Eigenschaft versprach den Vorteil, dass der potente Vasodilatator sowohl die durch die HBR verursachte Vasokonstriktion unmittelbar nach Resektion antagonisieren, als auch der aggravierend wirkenden verminderten NO-Produktion entgegenwirken konnte. Erwartungsgemäß zeigte die NO-Substitution auf den relativen portalvenösen Fluss keinen signifikanten Einfluss. Dies ist mit der auch unter physiologischen Bedingungen nur geringen vasoregulativen Wirkung von NO auf das Pfortadersystem zu erklären. Periphere Pfortaderäste und insbesondere die Sinusoide fungieren durchaus als Widerstandsgefäße auch für das Pfortadersystem. Ihr Tonus wird unter anderem guanylatcyclasenabhängig reguliert und ist damit prinzipiell durch NO beeinflussbar. Hauptmediator ist jedoch das hier intrinsisch wirksame, durch Hämoxxygenasen freigesetzte CO (Pannen 2002), welches in dieser Studie nicht näher untersucht wurde. Dagegen erfolgt die hepatoarterielle Vasodilatation neben Adenosin vorwiegend durch NO, während eine intrinsische CO-abhängige Vasoregulation der Leberarterie nicht nachweisbar ist (Pannen und Bauer 1998). Im Einklang damit konnte der relative hepatoarterielle Fluss durch NO-Substitution gegenüber der

Kontrollgruppe sogar über die Werte nicht resezierter Sham-Tiere hinaus gesteigert werden. Auch zeigte sich der hepatoarterielle Volumenanteil am totalen hepatischen Zufluss mit rund 6,4% in NO-substituierten Tieren nur mehr halbiert anstatt gedrittelt. Dies kann eine substanziiell bessere Sauerstoffversorgung der „reduced-size“-Leber bedeuten, deren positive Effekte auf Organintegrität und Leberregeneration aus Versuchen mit chirurgischer Arterialisierung der Pfortader oder hyperbarer Sauerstoffbeatmung bekannt sind (Nardo et al. 2005; Kurir et al. 2004).

Der unter NOS-Blockade im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe geringere Anstieg des relativen portalvenösen Flusses nach 85% Hepatektomie entspricht einer geringeren portalen Hyperperfusion mit reduzierter Hypertension. Im Gegensatz zu der hepatoarteriellen Flussänderung kann dafür jedoch nicht in erster Linie die intrahepatische Wirkung der verminderten NO-Freisetzung verantwortlich gemacht werden. Man könnte annehmen, dass sich unter aggraviertem NO-Mangel das Verhältnis der Vasoregulatoren zugunsten der Vasokonstriktoren verschiebt und es zu einem zumindest gering erhöhten Tonus der portalen Widerstandsgefäße kommen könnte, was die bestehende Hypertension noch verstärken würde. Diese Wirkung wird offenbar zumindest teilweise durch den perisinusoidal vorherrschenden Vasodilatator CO ausgeglichen, dessen Freisetzung nicht zusätzlich gehemmt wurde (Pannen 2002). Tatsächlich zeigten die vorliegenden intravitalmikroskopischen Messungen sinusoidaler und postsinusoidal-venolärer Gefäßdurchmesser unter NOS-Inhibition gar eine dezente Steigerung, jedoch keine signifikante Änderung gegenüber pharmakologisch unbehandelten, leberresezierten Kontrolltieren. Hauptsächlich muss daher eine extrahepatische Wirkung des systemisch wirksamen kompetitiven NOS-Antagonisten L-NAME in Betracht gezogen werden (Pfeiffer et al. 1996; Griffith und Kilbourn 1996). Es ist davon auszugehen, dass der portalvenöse Zufluss bei niedrigen NO-Spiegeln durch Vasokonstriktion der mesenterialen Widerstandsgefäße gesenkt wird. Der Einfluss von L-NAME auf die mesenteriale Perfusion wurde zwar in der vorliegenden Studie nicht direkt erfasst, die systemisch und mesenterial vasokonstriktive Wirkung ist in der Literatur jedoch ausführlich beschrieben. So wird dieser NOS-Inhibitor unter anderem gezielt zur Steigerung des mesenterialen Gefäßwiderstands in hämodynamischen Untersuchungen bei chronischer portaler Hypertension eingesetzt (Pilette et al. 1996). Pathophysiologisch zeichnet sich

dabei ein auffälliger Gegensatz zwischen Veränderungen der intrahepatischen Vasoregulation einerseits und der mesenterialen Hämodynamik andererseits ab. In beiden Gefäßabschnitten wird ein Missverhältnis zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Mediatoren beobachtet. Intrahepatisch führt ein Ungleichgewicht der vasoaktiven Substanzen zugunsten der Vasokonstriktoren mit gleichzeitig verminderter Freisetzung und Wirkung vasodilatativer Mediatoren zu einem pathologisch erhöhten Tonus der perisinusoidalen portalen Widerstandsgefäße (Cichoz-Lach et al. 2008). Dagegen zeigt das mesenteriale Gefäßbett eine dauerhaft erhöhte Freisetzung vasodilatativer Substanzen inklusive NO mit vermindertem Ansprechen auf endogene Vasokonstriktoren (Colle et al. 2008). Diese gegensätzlichen, sich jedoch in der Wirkung auf den Druck im Pfortadersystem addierenden hämodynamischen Veränderungen könnten dafür sorgen, dass die durch NOS-Blockade potenziell protektive Absenkung der akuten portalen Hyperperfusion und Hypertension intrahepatisch nicht in vollem Umfang zum Tragen kommen kann. Im Sinne der HABR könnte erwartet werden, dass die abgemilderte portale Hyperperfusion über ein reduziertes Adenosin-“washout“ das bestehende intrahepatische Missverhältnis der vasoregulativen Mediatoren zugunsten der Vasodilatoren etwas verbessern (Eipel et al. 2010b) und den durch NOS-Blockade zusätzlich verschärften NO-Mangel zumindest teilweise ausgleichen kann. Die intravitalmikroskopisch erhobenen Daten zu Blutfließgeschwindigkeit und Durchmesser der Sinusoide sowie der resultierende Blutvolumenfluss nach L-NAME-Gabe zeigten jedoch keine Änderung im Vergleich zur pharmakologisch unbehandelten Kontrollgruppe. Der unveränderte sinusoidale Blutvolumenfluss ist gleichzusetzen mit konstantem Adenosin-“washout“, weshalb die HABR-bedingte hepatoarterielle Vasokonstriktion ebenfalls unverändert als aktiv angenommen werden kann. Durch die NOS-Blockade mittels L-NAME und die damit einhergehende verminderte NO-Freisetzung konnte daher der relative hepatoarterielle Fluss über den HABR-bedingten Abfall hinaus reduziert werden. Dies kam auch in einem hepatoarteriellen Volumenanteil von nur noch etwa 3,6% an der Gesamtdurchblutung der Leber zum Ausdruck.

Obwohl offenbar nicht alle makrohämodynamischen Veränderungen unmittelbar auf die Mikrozirkulation übertragen werden können, korrelierte der gemessene, auf die Organmasse bezogene summierte Leberzufluss gut mit der im selben Versuchsabschnitt durch Laser-Doppler-

Flussmessung ermittelten Parenchymperfusion an der Leberoberfläche. Dies spricht für ein den prähepatischen Messungen entsprechendes Volumenverhältnis zwischen portalvenöser und hepatoarterieller Blutversorgung auch im Parenchym. Um so auffälliger ist, dass trotz der unter NO-Substitution signifikant verbesserten und unter NOS-Blockade deutlich reduzierten hepatoarteriellen Versorgung im Vergleich zur resezierten, unbehandelten Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied der Leberparenchymoxygenierung gemessen werden konnte. Der Sauerstoffpartialdruck sank nach Resektion in allen Gruppen von etwa 24 mmHg auf Werte um 15 mmHg, wobei in der Gruppe mit der schlechtesten hepatoarteriellen Versorgung unter NOS-Blockade die tendenziell höchsten Werte erreicht wurden. Es muss beachtet werden, dass der parenchymale Sauerstoffpartialdruck das Ergebnis des Verhältnisses zwischen O<sub>2</sub>-Angebot und O<sub>2</sub>-Verbrauch darstellt. Er kann daher insbesondere bei hohem Sauerstoffbedarf nicht notwendigerweise als Indikator für eine verbesserte Sauerstoffzufuhr herangezogen werden, sondern lässt nur indirekte Schlüsse auf den Sauerstoffverbrauch zu. Im Einklang damit konnten Yoshioka et al. durch prä- und posthepatische Blutgasanalysen am ersten Tag nach partieller Hepatektomie an der Ratte zeigen, dass auf ein verbessertes portalvenöses Sauerstoffangebot ein gleichförmiger Anstieg sowohl der hepatischen Sauerstoffaufnahme als auch des Sauerstoffverbrauchs folgt (Yoshioka et al. 1998). Wird der erhöhte Energie- und Sauerstoffbedarf einer regenerierenden Leber also durch Substitution nicht übersättigt, kann das Mehrangebot verbraucht werden, während das Verhältnis konstant bleibt (Shimizu et al. 2000).

Die beobachtete Korrelation zwischen dem relativen gesamthepatischen Zufluss und der Parenchymperfusion an der Leberoberfläche ließ sich auch durch intravitalmikroskopische Messungen der sinusoidalen und venolären Perfusionsparameter bestätigen, die ein analoges mikrohämodynamisches Bild der Veränderungen nach 85% Hepatektomie zeigten. Hieraus konnte der sinusoidale, respektive venoläre Scherstress als wichtiger mikrohämodynamischer Parameter berechnet werden (Aroesty und Gross 1972, 1972; Hori et al. 1998). Der in allen Gruppen nach 85% Hepatektomie im Vergleich zur unresezierten Sham-Gruppe mehr als verdoppelte sinusoidale Scherstress belegt im Einklang mit der Literatur die These, dass hepatische Hyperperfusion erhöhten sinusoidalen Scherstress verursacht (Glanemann et al. 2005; Demetris et al. 2006).

Erhöhter sinusoidaler Scherstress wird als Ursache des Parenchymschadens einer „reduced-size“-Leber diskutiert und als pathophysiologischer Risikofaktor für die Entwicklung eines „small-for-size“-Syndroms angesehen (Pan und Yan 2006; Goldstein et al. 2003; Dahm et al. 2005). Diese Annahme wird scheinbar durch Untersuchungen untermauert, in welchen durch chirurgische Reduktion des hepatischen Blutzufusses das postoperative Ergebnis nach ausgedehnter Hepatektomie verbessert werden konnte (Troisi et al. 2005; Lo et al. 2003). Andererseits gilt der sinusoidale Scherstress als Reiz für die frühen Regenerationsvorgänge nach Leberresektion oder Transplantation von „reduced-size“-Lebern und wird von vielen Autoren als essenziell betrachtet (Schoen et al. 2001; Schuett et al. 2007; Nobuoka et al. 2006). Es gibt neuerdings auch Hinweise dafür, dass sich die beschriebene chirurgische Reduktion des hepatischen Zuflusses, beispielsweise durch Splenektomie, zwar günstig auf Leberschaden und Leberfunktion auswirkt, jedoch andererseits durch reduzierten Scherstress für die Leberregeneration nachteilig wirken könnte (Eipel et al. 2010a). Letztlich ist die genaue Bedeutung des Scherstress für die Initiierung der Leberregeneration bis heute nicht restlich geklärt. Alston und Thomson konnten bereits 1963 in einem Modell der kreuzweisen Perfusion zweier Rattenlebern *in vivo et situ* zeigen, dass jeweils nur dasjenige Organ regenerierte, welches einer Teilresektion unterzogen wurde, obwohl die humoralen Faktoren beiden Organen in gleicher Weise zur Verfügung standen. Sie schrieben daher den hämodynamischen Veränderungen eine übergeordnete Rolle zu (Alston und Thomson 1963). Wie bereits mehrfach verdeutlicht, wird die abgeleitete These der hämodynamischen Regulation der Leberregeneration heute allgemein anerkannt. Mortensen et al. warfen im Jahr 2010 jedoch Zweifel daran auf, nachdem sie feststellten, dass in Schweinelebern mit durch aorto-linksportalem Shunt einseitig hyperperfundiertem Pfortadersystem gerade jene Segmente hypertrophierten, die nicht der Hyperperfusion und gesteigertem Scherstress ausgesetzt waren (Mortensen et al. 2010). Überraschenderweise spielten Änderungen des sinusoidalen Scherstress durch pharmakologische Beeinflussung der NO-Freisetzung nach Hepatektomie in der vorliegenden Studie eine offenbar untergeordnete Rolle. NO-Substitution konnte zwar die sinusoidale Blutfließgeschwindigkeit, den sinusoidalen Durchmesser und Blutvolumenfluss signifikant steigern. Wider Erwarten konnte der Scherstress im Vergleich zu pharmakologisch



unbehandelten, leberresezierten Kontrollen jedoch nicht signifikant geändert werden. Insbesondere wurde der Scherstress durch die vasodilative NO-Wirkung nicht verringert. Effekte der NO-Substitution bei 85% Hepatektomie können daher den vorliegenden Daten nach nicht auf einen reduzierten sinusoidalen Scherstress zurückgeführt werden. Der unter NOS-Blockade deutlich reduzierte makrohämodynamische Leberzufluss wirkte sich auf das perisinusoidale Gefäßbett offenbar nur gering aus, das zeigen die sinusoidale Blutfließgeschwindigkeit und der Volumenfluss, die allenfalls dezent sanken. Wie beschrieben erhöhte der NO-Mangel interessanterweise nicht den sinusoidalen Gefäßtonus, im Gegenteil vergrößerten sich die Sinusoiddurchmesser geringfügig. Aufgrund dieser gegensätzlichen Tendenzen ergab sich auch ein etwas geringer ausgeprägter, jedoch ebenfalls nicht signifikant veränderter sinusoidaler Scherstress. Sämtliche beschriebenen mikrozirkulatorischen Veränderungen unter NOS-Blockade unterschieden sich nicht signifikant zur Kontrolle. Es kann daher anhand der vorliegenden Daten nur spekuliert werden, ob Effekte von L-NAME dem tendenziell reduzierten Scherstress zugeschrieben werden können, wie die bereits angeführten Untersuchungen zur chirurgischen Reduktion des hepatischen Zuflusses implizieren (Di Domenico et al. 2011; Troisi et al. 2005; Lo et al. 2003).

### **5.2.2 Leberschaden und Leberfunktion**

Wie erwartet verursachte die 85% Hepatektomie einen deutlichen Leberschaden, was die signifikante Freisetzung sowohl der zytosolischen als auch der mitochondrialen Transaminasen ins Serum nach Resektion pharmakologisch unbehandelter Kontrolltiere belegt. Die gemessenen Serumwerte lagen dabei in vergleichbaren Dimensionen zu anderen tierexperimentellen Studien zum akuten Leberschaden (Teixeira et al. 2010; Detry et al. 2013). Erhöhte Leberenzyme ließen sich bereits eine Stunde nach Resektion nachweisen und stiegen 24 h nach Hepatektomie weiter an. Die NO-Substitution mittels Molsidomin konnte den frühen Anstieg sowohl der Transaminasen als auch der Dehydrogenasen bereits 1 h nach Hepatektomie verhindern oder zumindest deutlich reduzieren. Dieser Effekt war auch 24 h nach Resektion noch nachweisbar und impliziert eine

anhaltend reduzierte hepatozelluläre Schädigung. Wie bereits beschrieben, wurde der Scherstress durch die NO-Substitution nicht gesenkt. Es soll daher an dieser Stelle betont werden, dass diese günstige Wirkung nicht auf einen abgemilderten mechanischen Hyperperfusionsschaden zurückgeführt werden kann. Die erhobenen Daten widersprechen damit zumindest teilweise der These, der sinusoidale Scherstress sei Hauptursache des Parenchymschadens der „reduced-size“ Leber (Pan und Yan 2006; Goldstein et al. 2003; Dahm et al. 2005). Im Gegenteil wurde die hepatoarterielle Perfusion durch NO-Substitution sogar signifikant gesteigert und folglich die Sauerstoffversorgung des Leberparenchyms verbessert. Damit konnte nicht nur eine bessere Energieversorgung der Hepatozyten erreicht werden (Shimizu et al. 2000). Verbesserte Sauerstoffversorgung zeigt auf „reduced-size“-Lebern sowohl nach Transplantation als auch nach ausgedehnter Resektion auch eine anti-apoptotische und anti-nekrotische Wirkung, was in Versuchen mit hyperbarer Sauerstoffbeatmung belegt werden konnte (Tran et al. 2012; Ijichi et al. 2006). Nicht nur der vermehrt verfügbare Sauerstoff, sondern auch das substituierte NO selbst kann unter bestimmten Voraussetzungen zytoprotektive Wirkung entfalten und damit theoretisch die Leberfunktion verbessern (Carnovale und Ronco 2012). Der günstige Einfluss der NO-Substitution auf den Leberschaden ist durch den Erhalt der Zellintegrität sowie eine bessere Sauerstoff- und Energieversorgung der Hepatozyten erklärbar. Zu erwarten wäre darüber hinaus auch eine bessere Leberfunktion. Diese kann jedoch zumindest anhand der ermittelten Bilirubinwerte nicht belegt werden, da die Serumspiegel 24 h nach Resektion und Molsidomingabe nicht signifikant gegenüber der Kontrolle abgesunken waren. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in der Konfiguration des hepatozytären Bilirubintransportsystems. Kimura et al. beleuchteten 2012 die Ursache der Bilirubinämie im „small-for-size“-Syndrom in einem Modell der 90% Hepatektomie an der Ratte. Sie untersuchten dabei die Expression verschiedener „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transporter mittels DNA-Microarray und real-time-PCR. Unter den verschiedenen ABC-Transportern beobachteten sie 24 h nach Resektion eine verminderte Expression sowohl des „multi-drug-resistance-protein 2“ (MRP 2), welches für den Transport des konjugierten Bilirubins in die Gallenwege verantwortlich ist, als auch des „organic anion transporting polypeptide 1“ (OATP 1), welches die Aufnahme unkonjugierten Bilirubins aus dem Serum übernimmt.

Gleichzeitig waren MRP 1 und MRP 3 vermehrt exprimiert, welche beide Bilirubin zurück in die Sinusoide transportieren. Die MRP 2-Expression, so postulieren Kimura et al., wird durch IL-6 vermindert (Kimura et al. 2012). Die Umkehr des Bilirubintransports ins Serum und damit die Hyperbilirubinämie werden folglich zumindest teilweise von einem für die Leberregeneration essenziellen Zytokin (Kandilis et al. 2010) verursacht. Da Bilirubin zusätzlich in geringerem Umfang aus dem Serum aufgenommen wird, stellt diese Modulation des ABC-Transportsystems möglicherweise einen Schutzmechanismus für die „reduced-size“-Leber dar, die sich dadurch vorrangig mit der Regeneration befassen kann. Transient hohe Bilirubinspiegel stellen daher möglicherweise eine notwendige Begleiterscheinung der frühen regenerativen Vorgänge dar. Entsprechend geht in die klinische Definition des „small-for-size“-Syndroms auch eine prolongierte Hyperbilirubinämie über einen weiteren Zeitraum im Verlauf der ersten postoperativen Woche ein (Dahm et al. 2005). Veränderungen des Bilirubinserumspiegels sind vor diesem Hintergrund zumindest in den ersten 24 h des Regenerationsvorgangs mit Vorsicht zu bewerten.

Unklar bleibt, weshalb auch unter NOS-Blockade bei gleichzeitig aggraviertem NO- und O<sub>2</sub>-Mangel der anhand der Transaminasen ermittelte Leberschaden 24 h nach Resektion, zumindest was die AST angeht, signifikant abgeschwächt war. Zwar war neben der hepatoarteriellen Versorgung auch die portale Hyperperfusion weniger stark ausgeprägt, jedoch änderte sich die mechanische Belastung des Sinusendothels nicht. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die Blockade der iNOS, die auch zytotoxische Funktionen besitzt (Jiang et al. 2009). Andererseits kann die eNOS bei Substratmangel von der NO-Produktion entkoppelt werden und bildet dann vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, für welche zumindest chronische Schäden am Gefäßbett nachgewiesen werden können (Forstermann 2006). Insgesamt stehen die Veränderungen nach NOS-Blockade deutlich hinter den Vorteilen der NO-Substitution zurück. Diese Tendenz ist noch ausgeprägter bei der Betrachtung der Leberregeneration nachweisbar.

### 5.2.3 Leberregeneration

Die charakteristischen Vorgänge der Leberregeneration nach Hepatektomie können in ihrem Verlauf je nach dem gewünschten Untersuchungszeitpunkt auf unterschiedlichen Ebenen erfasst werden. Unmittelbar nach der Leberresektion als Auslöser lässt sich die Initiierung der Regenerationskaskaden auf genetischer und molekularer Ebene bereits nachweisen (Chen und Xu 2012; Liu et al. 2010). Die Expression des Regenerationsmarkers PCNA (Assy und Minuk 1997; Jia 2011) änderte sich nach Hepatektomie sowie zusätzlicher pharmakologischer Beeinflussung des NO-Haushalts auffallend analog zum Scherstress, dem mechanischen Korrelat des Regenerationsreizes (Schoen et al. 2001; Schuett et al. 2007; Nobuoka et al. 2006). In allen hepatektomierten Gruppen konnte nach 24 h ein ähnlich starker Regenerationsreiz nachgewiesen werden. Unter NO-Substitution zeigte sich die PCNA-Expression nur tendenziell erhöht, jedoch nicht signifikant verändert. Es konnte in der Vergangenheit bereits nachgewiesen werden, dass die unmittelbar einsetzende Expression von Genen, welche die Leberregeneration initiieren und steuern, auch bei ausgedehnter Leberresektion erhalten ist, sogar bei letalen Resektionsausmaßen, wenn durch ein sich entwickelndes Leberversagen die Regeneration nicht vollendet werden kann (Panis et al. 1998). Dabei korreliert jedoch offenbar das Resektionsausmaß nicht in jedem Fall mit dem Umfang der Genexpression, so dass ein mit ausgedehnterer Resektion steigender Regenerationsreiz auf Gen- bzw. Transkriptions- und Proteinebene nicht belegt werden kann. So konnten beispielsweise Ijichi et al. in einem Modell der 70% Hepatektomie an der Ratte zwar den Leberschaden durch hyperbare Sauerstoffbehandlung mindern, jedoch zeigte sich die hepatozytäre PCNA-Konzentration zu resezierten Kontrolltieren 24 h nach Resektion analog zu den vorliegenden Daten weitgehend unverändert (Ijichi et al. 2006). Es kann daher nur spekuliert werden, ob sich in der tendenziell erhöhten PCNA-Expression unter NO-Substitution der allenfalls dezent erhöhte mechanische Regenerationsreiz auf Transkriptionsebene widerspiegelt oder ob sich möglicherweise zusätzlich eine Wirkung von NO als direktem Regenerationstrigger andeutet (Wang und Lautt 1998). Das Auftreten von „immediate early genes“, Transkriptionsfaktoren und Cyclinen bedingt nicht notwendigerweise auch das tatsächliche Eintreten der Hepatozyten in den

Zellzyklus. Beispielsweise können ein akutes Leberversagen nach zu ausgedehnter Leberresektion (Panis et al. 1998), aber auch Autoregulationsmechanismen des einzelnen Hepatozyten (Wu et al. 2011) die Transition von der  $G_0$  in die  $G_1$ -Phase verhindern. Auch bereits in den Zellzyklus eingetretene Zellen können durch einen  $G_1$ - oder S-Phasen-Arrest an der Mitose gehindert werden. Beispielsweise hemmt der „transforming growth factor  $\beta 1$ “ (TGF- $\beta 1$ ) die Progression von der  $G_1$ - in die S-Phase und wirkt dadurch zytostatisch. Ein Gegenspieler ist  $H_2O_2$ , welches die TGF- $\beta 1$ -Wirkung antagonisieren kann (Choi et al. 2013). Durch PCNA, welches bereits in der  $G_1$ -Phase exprimiert wird (Woods et al. 1991), kann daher nicht notwendiger Weise ein erfolgreicher Progress durch den Zellzyklus nachgewiesen werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass eine Zelle zwar in die Interphase eintritt und bereits PCNA exprimiert, jedoch an der Progression in die S-Phase gehindert wird und die Mitose-Phase niemals erreicht. Es schien geboten, durch BrdU-Inkorporation die DNA-Synthese zusätzlich nachzuweisen, welche in der Rattenleber 24 h nach Hepatektomie ihr Maximum erreicht (Kountouras et al. 2001). Obwohl sich die Stärke des Regenerationsreizes unter den leberresezierten Gruppen nicht signifikant unterschied, führte die NO-Substitution nach 24 h zu einer Verdoppelung der DNA-Synthese mit etwa 400 BrdU-positiven Hepatozyten je Quadratmillimeter gegenüber einer Anzahl von etwas über 200 je Quadratmillimeter in der Kontrollgruppe. Der Ausgleich des mit ausgedehnter Leberresektion einhergehenden NO-Mangels (Palmes et al. 2005) führte damit zu einem enormen Anstieg in der Ausschöpfung der regenerativen Reserve. Erneut soll darauf hingewiesen werden, dass dies nicht auf eine Änderung des Scherstress als mechanischer Regenerationsreiz zurückgeführt werden kann, da sich dieser unter NO-Substitution nicht signifikant änderte.

Vielmehr sind andere sich ergänzende Faktoren ursächlich zu diskutieren. Zentrale Bedeutung wird der substanzuell gesteigerten hepatoarteriellen Blutversorgung der resezierten Leber unter NO-Substitution beigemessen. Es ist bekannt, dass die „reduced-size“- Leber einen erheblichen, vom Resektionsausmaß abhängigen Energie- und Sauerstoffbedarf besitzt, um der Regeneration und den metabolischen Anforderungen gleichzeitig gerecht werden zu können (Shimizu et al. 1999; Shimizu et al. 2000). Die durch NO-Substitution verbesserte Sauerstoffversorgung des Leberparenchyms kann die Energieversorgung sowohl der

regenerierenden und der für die Erhaltung der Leberfunktion wichtigen in der G<sub>0</sub>-Phase verbleibenden Hepatozyten, als auch die Energieversorgung der nicht parenchymalen hepatischen Zellpopulationen verbessern. Essenzieller Bestandteil der intrazellulären Energieversorgung regenerierender Lebern ist die gesteigerte mitochondriale ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung von Adenosinnukleosiden (Yamaoka et al. 1974; Ozawa et al. 1974). Neben dem reinen ATP-Angebot kann der Energiestatus einer Zelle durch die sogenannte Energieladung („energy charge“) ausgedrückt werden, die das Verhältnis phosphorylierter, energiereicher Adenosinformen zur Gesamtkonzentration der Adenosinnukleoside darstellt (Atkinson 1968; Kamiyama et al. 1976). Kamiyama et al. konnten an einem 70%-Hepatektomiemodell am Hasen zeigen, dass 24 h nach Leberresektion die ATP-Produktion auf 170% des Ausgangswerts angestiegen war, während gleichzeitig die Energieladung sank. Sie schlussfolgerten einen entsprechend erhöhten Energieverbrauch der regenerierenden Leber, welcher das Energieangebot übersteigt (Kamiyama et al. 1976). Shimizu et al. führten an einem Modell der 85% Hepatektomie an der Ratte Untersuchungen zur Sauerstoff- und Energieversorgung nach partieller chirurgischer Pfortaderarterialisierung durch. Durch die Überleitung arteriellen, sauerstoffreichen Blutes in die Pfortader wurde gegenüber nur resezierten sowie arteriell ligierten Tieren eine verbesserte portalvenöse Sauerstoffsättigung erreicht. Gleichzeitig konnte eine erhöhte parenchymale ATP-Konzentration gemessen werden, wobei sich jedoch die Energieladung nicht verbesserte. Shimizu et al. konstatieren neben dem erhöhten Energiebedarf auch einen gesteigerten Sauerstoffbedarf der regenerierenden Leber nach ausgedehnter Resektion und konnten einen Zusammenhang zwischen Sauerstoff- und Energieangebot nachweisen (Shimizu et al. 2000). Eine normal große Rattenleber kann völlig ohne hepatoarterielle Versorgung auskommen, auch wenn sie als Transplantat dient, wobei die Pfortader sowohl das Leberparenchym als auch die Gallenwege ausreichend mit Sauerstoff versorgen kann (Goncalves et al. 1989). Unter normalen Umständen steht daher jederzeit ausreichend Sauerstoff zur Verfügung, was sich in einer ausgeglichenen Energieladung ausdrückt. Auch in venösem Blut ist der Sauerstoffpartialdruck üblicherweise hoch genug, um theoretisch eine ausreichende Sättigung der mitochondrialen Atmungskette mit Sauerstoff zu gewährleisten. Nur bei ausgeprägtem Sauerstoffmangel ist die mitochondriale ATP-

Synthese teilweise durch das Sauerstoffangebot limitiert (Brown 1992). Es kann angenommen werden, dass die 85% Hepatektomie durch die verminderte hepatoarterielle Sauerstoffversorgung bei gleichzeitig gesteigertem Sauerstoffbedarf eine jener Situationen darstellt, in welcher die Energiebereitstellung sauerstoffabhängig erfolgt. Die Beobachtung, dass die Gewebeoxygenierung unter NO-Substitution trotz verbesserter hepatoarterieller Versorgung der Leber mit sauerstoffreichem Blut nicht ansteigt, unterstützt diese These. Der durch die verbesserte arterielle Versorgung zusätzlich verfügbare Sauerstoff kann durch gesteigerte ATP-Synthese verbraucht werden, wodurch der erhöhte Energiebedarf der regenerierenden Hepatozyten zumindest teilweise gedeckt werden kann. Analog zur Energieladung bei anhaltend hohem Energiebedarf kann dabei der im Parenchym resultierende Sauerstoffpartialdruck, wie beobachtet, gleichbleibend niedrig bleiben.

Um die Bedeutung der verbesserten Sauerstoff- und Energieversorgung nicht überzubewerten, muss der Vollständigkeit halber an dieser Stelle auf weitere, komplexere NO-Wirkungen hingewiesen werden, die ebenfalls die Regeneration beeinflussen können. NO ist über eine mitochondriale NOS (mtNOS), welche an Komplexen der Atmungskette verankert ist, nicht nur unmittelbar an der Regulation der Energiebereitstellung beteiligt. Der Mediator reguliert hierüber - selbst konzentrationsabhängig - auch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies wie Hyperoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) und insbesondere Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Dessen zytosolische Konzentration aktiviert in engen Konzentrationsgrenzen unter anderem den Transkriptionsfaktor p53 (Carreras und Poderoso 2007). Über diesen und vermutlich weitere Transkriptionsfaktoren ist NO an der Regulation des Verhältnisses zweier Proteine beteiligt, von denen eines (Bax) proapoptotisch wirkt. Bax führt letztlich zu erhöhter Caspaseaktivität und DNA-Fragmentierung. Der Gegenspieler (Bcl-xL) kann dagegen anti-apoptotische Mechanismen in Gang setzen. Das Verhältnis beider Moleküle entscheidet dabei über Erhalt der Zellintegrität oder Einleitung der Apoptose (Klemm et al. 2008). Die NO-Wirkung ist hierbei dosisabhängig. Unterhalb eines bestimmten Grenzwertes der NO-Konzentration überwiegt die anti-apoptotische Wirkung. Wird der Grenzwert überschritten, überwiegt die pro-apoptotische Wirkung. Zusätzlich besteht bei sehr hohen intrazellulären NO-Konzentrationen die Gefahr einer Akkumulation reaktiver

Sauerstoffspezies, was wiederum Zellnekrosen zur Folge haben kann (Carnovale und Ronco 2012).  $H_2O_2$  ist darüber hinaus wirksamer Gegenspieler des zytostatischen TGF- $\beta$ 1 (Choi et al. 2013). Bei verbessertem NO-Haushalt, welcher wie beschrieben konzentrationsabhängig die  $H_2O_2$ -Freisetzung reguliert (Carreras und Poderoso 2007), kann möglicherweise auch einem unter NO- und hypothetischem  $H_2O_2$ -Mangel verstärkten Zellzyklus-Arrest entgegengewirkt werden. Da die beschriebenen Wirkungen sämtlich konzentrationsabhängig sind, im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch weder die Konzentration von NO im Serum oder im hepatozytären Zytosol, noch reaktive Sauerstoffspezies oder die genannten pro- und anti-apoptotischen Transkriptionsfaktoren und zytoregulativen Proteine bestimmt wurden, kann über eine die Regeneration direkt unterstützende Wirkung der hier vorgenommenen NO-Substitution letztlich nur spekuliert werden. Die Dosierung des NO-Donors Molsidomin erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie nach Angaben in der Literatur und Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe in Konzentrationen, in welchen pro-apoptotische Effekte nicht zu erwarten waren. Hepatozytäre Apoptosen und Nekrosen wurden in der vorliegenden Studie zwar ebenfalls nicht explizit untersucht. Entsprechende Zellbildveränderungen waren jedoch in den aufgearbeiteten histologischen Präparaten unter NO-Substitution zumindest augenscheinlich nicht auffällig vermehrt nachweisbar. Daher ist eine pro-apoptotisch wirkende NO-Konzentration unter der gewählten NO-Substitution mittels Molsidomin unwahrscheinlich, so dass zusätzlich zum verbesserten Sauerstoff- und Energieangebot eher eine die Regeneration unterstützende Wirkung in Betracht gezogen werden muss.

Die Bedeutung der verbesserten hepatischen Sauerstoffversorgung sowohl für Leberschaden und Leberfunktion, als auch für die Leberregeneration wird durch Untersuchungen mit hyperbarer Sauerstoffversorgung untermauert. Ijichi et al. konnten bereits 2006 einen positiven Effekt auf den Leberschaden nachweisen. Sie verneinten jedoch eine Verbesserung der Regeneration, da sich die von ihnen zur Evaluation der Regeneration bestimmte PCNA-Expression zwischen Gruppen mit und ohne hyperbarer Sauerstoffbehandlung nicht unterschied (Ijichi et al. 2006). Dieser Schluss erscheint voreilig, da keine über die Transkriptionsebene hinausgehenden Regenerationsparameter bestimmt wurden. Im gleichen Jahr konnten Tolentino et al. anhand eines



ähnlichen Modells gleichsam ergänzend zeigen, dass die Methode sehr wohl die Leberregeneration befördert. Sowohl das Trockengewicht der residualen Leber als auch die residuale DNA-Masse waren 24 h nach Hepatektomie und hyperbarer Sauerstoffbehandlung signifikant gegenüber hepatektomierten Kontrolltieren angestiegen (Tolentino et al. 2006). Weitere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse reproduzieren und legen eine Implementierung der hyperbaren Sauerstoffbehandlung zur Unterstützung der Leberregeneration im Rahmen klinischer Studien beispielsweise in Transplantationszentren nahe (Tran et al. 2012).

### **5.3 Schlussfolgerungen und klinischer Ausblick**

Die vorliegende tierexperimentelle Untersuchung belegt einen klaren Vorteil der NO-Substitution für Hämodynamik, Leberschaden und Regeneration der „reduced-size“-Leber nach ausgedehnter 85% Hepatektomie. Wider Erwarten können die positiven Effekte der NO-Substitution nicht auf die Reduktion eines postulierten vorwiegend mechanischen Hyperperfusionsschadens zurückgeführt werden. Die intrinsischen vaskulären Regulationsmechanismen (HABR) der Leber lassen sich auch bei ausgedehnter 85% Hepatektomie nachvollziehen. Ohne pharmakologische Vorbehandlung führt die starke portalvenöse Hyperperfusion nach Leberresektion zu einer hepatoarteriellen Minderperfusion. Der wichtigste nachweisbare hämodynamische Effekt der NO Substitution ist die Wirkung auf die Leberarterien. Der hepatoarterielle Perfusionsverlust kann vollständig ausgeglichen werden. Hierdurch zeigt sich die Perfusion der Leber sogar noch gesteigert, wobei jedoch die als potenziell schädigend betrachteten mechanischen Kräfte in den Sinusoiden weder erhöht noch gesenkt werden können. Die ausgeglichene Versorgung mit sauerstoffreichem arteriellem Blut kann die Energieversorgung verbessern. Es ist anzunehmen, dass der „reduced-size“-Leber in dieser Situation daher mehr Energiereserven zur Verfügung stehen, um gleichzeitig eine schnellere Regeneration zu bewerkstelligen und ihre Funktion aufrechtzuerhalten. Dies spiegelt sich auch in einem geringeren Leberschaden wider.

Die hepatoarterielle Minderversorgung kann nicht nur als Nebeneffekt im Rahmen des

Hyperperfusionssyndroms der „reduced-size“-Leber betrachtet werden. Vielmehr sollte ihr im Rahmen der Schädigung nach ausgedehnter Leberresektion oder Transplantation von „reduced-size“-Lebern eine größere Rolle zugeschrieben werden als bisher angenommen. Dies ist insbesondere auch eine wichtige Erkenntnis für die Entwicklung von Therapien zur Prophylaxe und Behandlung eines drohenden „small-for-size“-Syndroms bei grenzwertig kleinen Organen. Hier können gegenüber Verfahren zur Reduktion der portalvenösen Hyperperfusion auch Strategien zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung in den Mittelpunkt rücken.

Die Übertragung tierexperimentell gewonnener Erkenntnisse zur Unterstützung der Regeneration und Funktion von „reduced-size“-Lebern durch verbesserte Sauerstoffversorgung auf klinische Studien wird propagiert. Beispielsweise zeigen Tran et al. auf, dass tierexperimentell entwickelte Protokolle der hyperbaren Sauerstoffbehandlung der „reduced-size“-Leber im Rahmen der postoperativen Intensivtherapie nach humaner Lebertransplantation mit überschaubarem Aufwand zu erproben wären (Tran et al. 2012). Suehiro et al. untersuchten bereits ein Protokoll der hyperbaren Sauerstoffbehandlung in einer kleinen Kohorte von 14 Patienten, allerdings Leber-Lebend Spendern, mit vielversprechendem Ergebnis (Suehiro et al. 2008). Randomisierte, kontrollierte Studien existieren bisher nicht und die Literatur liefert bislang auch keine Daten zur hyperbaren Sauerstoffbehandlung von Organempfängern oder nach ausgedehnter Leberresektion am Menschen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Methode der pharmakologischen NO-Substitution mit konsekutiv verbesserter arterieller Sauerstoffversorgung, verbesserter Regeneration und vermindertem Leberschaden der „reduced-size“-Leber kann einen Ansatz für klinische Studien mit einem vergleichbar geringen Aufwand bieten. Molsidomin bietet sich dabei als klinisch etabliertes Pharmakon an (Reden 1990). Auch ist eine Kombination der nicht invasiven Unterstützungsverfahren denkbar mit paralleler Administration eines NO-Donors und hyperbarer Sauerstofftherapie. Der überschaubare Zeitraum, in welchem die wesentlichen Regenerationsvorgänge der „reduced-size“-Leber physiologischerweise abgeschlossen werden, deckt sich mit der vulnerablen Phase für die Manifestation eines „small-for-size“-Syndroms und liegt im klinischen Umfeld innerhalb der Dauer des postoperativen stationären Aufenthalts nach

ausgedehnter Leberresektion oder -transplantation. Nach dieser Zeit ist idealer Weise sowohl ein Großteil der energieaufwändigen DNA-Synthese abgeschlossen als auch die Leberfunktion soweit wieder hergestellt, dass auch ein kleines Organ in Abwesenheit anderer Komplikationen selbständig funktionieren kann. Nicht invasive Unterstützungsverfahren, wie die Beschleunigung der Regeneration und die Zytoprotektion durch NO-Substitution, könnten in Zukunft invasive apparative oder chirurgisch aufwändige und definitive Optionen wie externe Leberunterstützungsverfahren (Nardo et al. 2006a), Pfortaderarterialisierung (Nardo et al. 2006b) oder Splenektomie (Arakawa et al. 2009), welche diese vulnerable Phase nur überbrücken sollen, unterstützen oder gar vollständig ersetzen.

## Literaturverzeichnis

- 1 Abrales, Juan-G; Pasarín, Marcos; García-Pagán, Juan-Carlos (2006): Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 12 (41), S. 6577–6584.
- 2 Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357 (Pt 3), S. 593–615.
- 3 Almond, N. E.; Wheatley, A. M. (1992): Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry. *Am J Physiol* 262 (2 Pt 1), S. G203-9.
- 4 Alston, W. C.; Thomson, R. Y. (1963): Humoral and local factors in liver regeneration. *Cancer Res* 23, S. 901–905.
- 5 Alzaraa, Ahmed; Al-Leswas, Dhya; Chung, Wen Yuan; Gravante, Gianpiero; Bruno, Morgan; West, Kevin et al. (2013): Contrast-enhanced ultrasound detects perfusion defects in an ex vivo porcine liver model: a useful tool for the study of hepatic reperfusion. *J Artif Organs*.
- 6 Arakawa, Yusuke; Shimada, Mitsuo; Uchiyama, Hideaki; Ikegami, Toru; Yoshizumi, Tomoharu; Imura, Satoru et al. (2009): Beneficial effects of splenectomy on massive hepatectomy model in rats. *Hepatol Res* 39 (4), S. 391–397.
- 7 Arnold, W. P.; Mittal, C. K.; Katsuki, S.; Murad, F. (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (8), S. 3203–3207.
- 8 Aroesty, J.; Gross, J. F. (1972): The mathematics of pulsatile flow in small vessels. I. Casson theory. *Microvasc Res* 4 (1), S. 1–12.
- 9 Asakura, Takeshi; Ohkohchi, Nobuhiro; Orii, Takashi; Koyamada, Nozomi; Tsukamoto, Shigeki; Sato, Masahide et al. (2003): Portal vein pressure is the key for successful liver transplantation of an extremely small graft in the pig model. *Transpl Int* 16 (6), S. 376–382.
- 10 Assy, N.; Gong, Y.; Zhang, M.; Pettigrew, N. M.; Pashniak, D.; Minuk, G. Y. (1998): Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* 131 (3), S. 251–256.
- 11 Assy, N.; Minuk, G. Y. (1997): Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 26 (4), S. 945–952.
- 12 Atkinson, D. E. (1968): The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7 (11), S. 4030–4034.
- 13 Banares, Rafael; Catalina, Maria-Vega; Vaquero, Javier (2013): Liver support systems: will they ever reach prime time? *Curr Gastroenterol Rep* 15 (3), S. 312.
- 14 Baserga, R.; Weiss, L. (1967): Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis by pentobarbital. *Biochim Biophys Acta* 145 (2), S. 361–367.
- 15 Belghiti, Jacques; Cortes, Alexandre; Abdalla, Eddie K.; Regimbeau, Jean-Marc; Prakash, Kurumboor; Durand, Francois et al. (2003): Resection prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 238 (6), S. 885-92; discussion 892-3.
- 16 Bencze, M.; Behuliak, M.; Zicha, J. (2013): The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*.
- 17 Bjorck, Hanna M.; Renner, Johan; Maleki, Shohreh; Nilsson, Siv F. E.; Kihlberg, Johan; Folkersen, Lasse et al. (2012): Characterization of shear-sensitive genes in the normal rat aorta identifies Hand2 as a major flow-responsive transcription factor. *PLoS One* 7 (12), S. e52227.
- 18 Bonnichon, Philippe (2007): The liver and surgeons. *Hist Sci Med* 41 (1), S. 95–104.
- 19 Box, Frieke M. A.; van der Geest, Rob J.; Rutten, Marcel C. M.; Reiber, Johan H. C. (2005): The influence of flow, vessel diameter, and non-newtonian blood viscosity on the wall shear stress in a carotid bifurcation model for unsteady flow. *Invest Radiol* 40 (5), S. 277–294.
- 20 Bravo, Daniel; Martin, Gaetan; David, Maude M.; Cailleau, Guillaume; Verrecchia, Eric; Junier, Pilar (2013): Identification of active oxalotrophic bacteria by Bromodeoxyuridine DNA-labeling in a microcosm soil experiments. *FEMS Microbiol Lett*.
- 21 Brenner, D. A. (1998): Signal transduction during liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 13, S. S93-5.
- 22 Broelsch, C. E.; Malago, M.; Frilling, A.; Nadalin, S.; Malamutmann, E.; Klein, C.; Gerken, G. (2008): Leberlebenspende. *Der Chirurg* 2 (79), S. 135–143.
- 23 Brown, G. C. (1992): Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* 284 (Pt 1), S. 1–13.

- 24 Buck, Suzanne B.; Bradford, Jolene; Gee, Kyle R.; Agnew, Brian J.; Clarke, Scott T.; Salic, Adrian (2008): Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* 44 (7), S. 927–929.
- 25 Buell, Joseph F.; Tranchart, Hadrien; Cannon, Robert; Dagher, Ibrahim (2010): Management of benign hepatic tumors. *Surg Clin North Am* 90 (4), S. 719–735.
- 26 Buga, G. M.; Gold, M. E.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J. (1991): Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17 (2), S. 187–193.
- 27 Bybee, A.; Styles, J. A.; Beck, S. L.; Blackburn, D. (1990): Mitosis and histopathology in rat liver during methylclofenapate-induced hyperplasia. *Cancer Lett* 52 (2), S. 95–100.
- 28 Caffrey, Niamh; Mounchili, Aboubakar; McConkey, Sandra; Cockram, Michael S. (2011): Survey of euthanasia practices in animal shelters in Canada. *Can Vet J* 52 (1), S. 55–61.
- 29 Cantré, D.; Schuett, H.; Hildebrandt, A.; Dold, S.; Menger, M. D.; Vollmar, B.; Eipel, C. (2008): Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *Br J Surg* 95 (6), S. 785–792.
- 30 Carlson, B. M. (2007): Principles of Regenerative Biology. Hg. v. B. M. Carlson: Elsevier.
- 31 Carnovale, Cristina E.; Ronco, Maria T. (2012): Role of nitric oxide in liver regeneration. *Ann Hepatol* 11 (5), S. 636–647.
- 32 Carreras, Maria Cecilia; Poderoso, Juan Jose (2007): Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 292 (5), S. C1569-80.
- 33 Chauvin, K. L.; O'Leary, J. P. (1995): Carl Langenbuch and the first cholecystectomy. *Am Surg* 61 (8), S. 746–747.
- 34 Chen, Chiung-Yu; Kao, Chi-Ya; Lin, Po-Ju; Shiesh, Shu-Chu (2013): Carbon monoxide may enhance bile secretion by increasing glutathione excretion and Mrp2 expression in rats. *J Chin Med Assoc* 76 (5), S. 258–264.
- 35 Chen, T. S.; Chen, P. S. (1994): The myth of Prometheus and the liver. *J R Soc Med* 87 (12), S. 754–755.
- 36 Chen, Xiaoguang; Xu, Cunshuan (2012): High-throughput analysis of tumor necrosis factor signaling pathways in eight cell types during rat hepatic regeneration. *Inflammation* 35 (4), S. 1538–1548.
- 37 Choi, Jiyeon; Park, Seong Ji; Jo, Eun Ji; Lee, Hui-Young; Hong, Suntaek; Kim, Seong-Jin; Kim, Byung-Chul (2013): Hydrogen peroxide inhibits transforming growth factor-beta1-induced cell cycle arrest by promoting Smad3 linker phosphorylation through activation of Akt-ERK1/2-linked signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 435 (4), S. 634–639.
- 38 Chung, Wen Yuan; Gravante, Gianpiero; Al-Leswas, Dhya; Alzarrah, Ahmed; Sorge, Roberto; Ong, Seok Ling et al. (2012): The autologous normothermic ex vivo perfused porcine liver-kidney model: improving the circuit's biochemical and acid-base environment. *Am J Surg* 204 (4), S. 518–526.
- 39 Chung, Wen Yuan; Gravante, Gianpiero; Al-Leswas, Dhya; Arshad, Ali; Sorge, Roberto; Watson, Chris C. et al. (2013): The development of a multiorgan ex vivo perfused model: results with the porcine liver-kidney circuit over 24 hours. *Artif Organs* 37 (5), S. 457–466.
- 40 Cichoż-Lach, H.; Celinski, K.; Slomka, M.; Kasztelan-Szczerbinska, B. (2008): Pathophysiology of portal hypertension. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 2, S. 231–238.
- 41 Colle, Isabelle; Geerts, Anja M.; van Steenkiste, Christophe; van Vlierberghe, Hans (2008): Hemodynamic changes in splanchnic blood vessels in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)* 291 (6), S. 699–713.
- 42 Constantinides, Christakis; Mean, Richard; Janssen, Ben J. (2011): Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. *ILAR J* 52, S. e21-31.
- 43 Couinaud, C. (1954): Lobes et segments hépatiques: notes sur l'architecture anatomique et chirurgicale de foie. *Presse Med* 62 (33), S. 709–712.
- 44 Craig, Philip (2003): Echinococcus multilocularis. *Curr Opin Infect Dis* 16 (5), S. 437–444.
- 45 Dabeva, M. D.; Shafritz, D. A. (1993): Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 143 (6), S. 1606–1620.
- 46 Dahmen, U.; Hall, C. A.; Madrahimov, N.; Milekhin, V.; Dirsch, O. (2007): Regulation of hepatic microcirculation in stepwise liver resection. *Acta Gastroenterol Belg* 70 (4), S. 345–351.
- 47 Dahmen, Uta; Madrahimov, Nodir; Madrahimova, Fotima; Ji, Yuan; Schenk, Andrea; Dirsch, Olaf (2008): Small-for-size syndrome in the rat: does size or technique matter? *J Surg Res* 149 (1), S. 15–26.
- 48 Dahm, Felix; Georgiev, Panco; Clavien, Pierre-Alain (2005): Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* 5 (11), S. 2605–2610.
- 49 Dalgetty, D. M.; Medine, C. N.; Iredale, J. P.; Hay, D. C. (2009): Progress and future challenges in stem cell-derived liver technologies. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 297 (2), S. G241.

- 50 Debbaut, Charlotte; Wilde, David de; Casteleyn, Christophe; Cornillie, Pieter; van Loo, Denis; van Hoorebeke, Luc et al. (2012): Modeling the impact of partial hepatectomy on the hepatic hemodynamics using a rat model. *IEEE Trans Biomed Eng* 59 (12), S. 3293–3303.
- 51 Delonca, J.; Giraud, T.; Beauflis, P.; Dupuis, B.; Haiat, R.; Thery, C. (1997): Comparative efficacy of the intravenous administration of linsidomine, a direct nitric oxide donor, and isosorbide dinitrate in severe unstable angina. A French multicentre study. French Group of Investigators. *Eur Heart J* 18 (8), S. 1300–1306.
- 52 Demetris, Anthony J.; Kelly, Dymna M.; Eghtesad, Bijan; Fontes, Paulo; Wallis Marsh, J.; Tom, Kusum et al. (2006): Pathophysiologic observations and histopathologic recognition of the portal hyperperfusion or small-for-size syndrome. *Am J Surg Pathol* 30 (8), S. 986–993.
- 53 Deng, X. Y.; Li, W. R.; Sun, Y. W.; Wei, H. D.; Jiang, Y.; He, F. C. (2009): Exploring rat plasmatic proteomes: what triggered the liver regeneration? *Protein Pept Lett* 16 (6), S. 698–705.
- 54 Deshpande, R. R.; Heaton, N. D.; Rela, M. (2002): Surgical anatomy of segmental liver transplantation. *Br J Surg* 89 (9), S. 1078–1088.
- 55 Detry, Olivier; Gaspar, Yves; Cheramy-Bien, Jean-Paul; Drion, Pierre; Meurisse, Michel; Defraigne, Jean-Olivier (2013): A modified surgical model of fulminant hepatic failure in the rat. *J Surg Res* 181 (1), S. 85–90.
- 56 Di Domenico, Stefano; Santori, Gregorio; Traverso, Nicola; Balbis, Emanuela; Furfaro, Annalisa; Grillo, Federica et al. (2011): Early effects of portal flow modulation after extended liver resection in rat. *Dig Liver Dis* 43 (10), S. 814–822.
- 57 Diaz-Juarez, Julieta; Rivera-Valerdi, Lorena; Bernal-Cerrillo, Delia E.; Hernandez-Munoz, Rolando (2006): Predominance of released mitochondrial enzymes by partial hepatectomy-induced rat regenerating liver is controlled by hemodynamic changes and not related to mitochondrial damage. *Scand J Gastroenterol* 41 (2), S. 223–233.
- 58 Diehl, A. M.; Rai, R. (1996a): Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol* 11 (5), S. 466–470.
- 59 Diehl, A. M.; Rai, R. M. (1996b): Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J* 10 (2), S. 215–227.
- 60 Dionigi, R. (2009): Recent Advances in Liver Surgery. Hg. v. Renzo Dionigi: Landes Bioscience.
- 61 Dufour, D. R.; Lott, J. A.; Nolte, F. S.; Gretch, D. R.; Koff, R. S.; Seeff, L. B. (2000a): Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 46 (12), S. 2027–2049.
- 62 Dufour, D. R.; Lott, J. A.; Nolte, F. S.; Gretch, D. R.; Koff, R. S.; Seeff, L. B. (2000b): Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem* 46 (12), S. 2050–2068.
- 63 Duncan, Andrew W.; Dorrell, Craig; Grompe, Markus (2009): Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 137 (2), S. 466–481.
- 64 Dutkowski, P.; Graf, R.; Clavien, P. A. (2006): Rescue of the cold preserved rat liver by hypothermic oxygenated machine perfusion. *Am J Transplant* 6 (5 Pt 1), S. 903–912.
- 65 Eger, E. I. 2nd (1984): The pharmacology of isoflurane. *Br J Anaesth* 56 Suppl 1, S. 71S–99S.
- 66 Eidinoff, M. L.; Cheong, L.; Rich, M. A. (1959): Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science* 129 (3362), S. 1550–1551.
- 67 Eipel, Christian; Abshagen, Kerstin; Ritter, Jessica; Cantre, Daniel; Menger, Michael D.; Vollmar, Brigitte (2010a): Splenectomy improves survival by increasing arterial blood supply in a rat model of reduced-size liver. *Transpl Int* 23 (10), S. 998–1007.
- 68 Eipel, Christian; Abshagen, Kerstin; Vollmar, Brigitte (2010b): Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited. *World J Gastroenterol* 16 (48), S. 6046–6057.
- 69 Fan, Ming-Hui; Chang, Alfred E. (2002): Resection of liver tumors: technical aspects. *Surg Oncol* 10 (4), S. 139–152.
- 70 Fan, Sheung Tat (2006): Live donor liver transplantation in adults. *Transplantation* 82 (6), S. 723–732.
- 71 Farber, J. L.; Gerson, R. J. (1984): Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. *Pharmacol Rev* 36 (2 Suppl), S. 71S–75S.
- 72 Fausto, Nelson; Campbell, Jean S. (2003): The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120 (1), S. 117–130.
- 73 Fausto, Nelson; Campbell, Jean S.; Riehle, Kimberly J. (2006): Liver regeneration. *Hepatology* 43 (2 Suppl 1), S. S45–53.
- 74 Fausto, Nelson; Campbell, Jean S.; Riehle, Kimberly J. (2012): Liver regeneration. *J Hepatol* 57 (3), S. 692–694.
- 75 Fausto, Nelson; Riehle, Kimberly J. (2005): Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12 (3), S. 181–189.

- 76 Feelisch, M.; Ostrowski, J.; Noack, E. (1989): On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 Suppl 11, S. S13-22.
- 77 Ferrigno, Andrea; Richelmi, Plinio; Vairetti, Mariapia (2013): Troubleshooting and improving the mouse and rat isolated perfused liver preparation. *J Pharmacol Toxicol Methods* 67 (2), S. 107–114.
- 78 Flohr, Tanya R.; Bonatti, Hugo, JR; Brayman, Kenneth L.; Pruet, Timothy L. (2009): The use of stem cells in liver disease. *Current Opinion in Organ Transplantation* 14 (1), S. 64–71.
- 79 Florman, Sander; Miller, Charles M. (2006): Live donor liver transplantation. *Liver Transpl* 12 (4), S. 499–510.
- 80 Forstermann, Ulrich (2006): Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem* 387 (12), S. 1521–1533.
- 81 Friebe, Andreas; Koesling, Doris (2003): Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 93 (2), S. 96–105.
- 82 Fujii, Hideaki; Hirose, Tetsuro; Oe, Shoshiro; Yasuchika, Kentaro; Azuma, Hisaya; Fujikawa, Takahisa et al. (2002): Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 36 (5), S. 653–659.
- 83 Fujita, M.; Furukawa, H.; Hattori, M.; Todo, S.; Ishida, Y.; Nagashima, K. (2000): Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Mod Pathol* 13 (2), S. 152–157.
- 84 Fukumitsu, K.; Yagi, H.; Soto-Gutierrez, A. (2011): Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver. *Transplant Proc* 43 (6), S. 2137–2138.
- 85 Furchgott, R. F.; Jothianandan, D. (1991): Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28 (1-3), S. 52–61.
- 86 Furuyama, Kenichiro; Kawaguchi, Yoshiya; Akiyama, Haruhiko; Horiguchi, Masashi; Kodama, Sota; Kuhara, Takeshi et al. (2011): Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 43 (1), S. 34–41.
- 87 Gargiulo, Sara; Greco, Adelaide; Gramanzini, Matteo; Esposito, Silvia; Affuso, Andrea; Brunetti, Arturo; Vesce, Giancarlo (2012): Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J* 53 (1), S. E55-69.
- 88 Ghobrial, Rafik Mark; Busuttill, Ronald W. (2006): Challenges of adult living-donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 13 (2), S. 139–145.
- 89 Giri, Shibashish; Braumann, Ulf-Dietrich; Giri, Priya; Acikgoz, Ali; Scheibe, Patrick; Nieber, Karen; Bader, Augustinus (2013): Nanostructured self-assembling peptides as a defined extracellular matrix for long-term functional maintenance of primary hepatocytes in a bioartificial liver modular device. *Int J Nanomedicine* 8, S. 1525–1539.
- 90 Glanemann, M.; Eipel, C.; Nussler, A. K.; Vollmar, B.; Neuhaus, P. (2005): Hyperperfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res* 37 (6), S. 335–341.
- 91 Goldfarb, G.; Debaene, B.; Ang, E. T.; Roulot, D.; Jolis, P.; Lebec, D. (1990): Hepatic blood flow in humans during isoflurane-N<sub>2</sub>O and halothane-N<sub>2</sub>O anesthesia. *Anesth Analg* 71 (4), S. 349–353.
- 92 Goldstein, Michael J.; Salame, Ephrem; Kapur, Sandip; Kinkhabwala, Milan; LaPointe-Rudow, Diane; Harren N P, Patricia et al. (2003): Analysis of failure in living donor liver transplantation: differential outcomes in children and adults. *World J Surg* 27 (3), S. 356–364.
- 93 Goncalves, R. H.; Castro-e-Silva Junior, O.; Franco, C. F.; Souza, M. E.; Picinato, M. A.; Mazzetto, S. A.; Ceneviva, R. (1989): Effect of hepatic artery ligation on liver metabolism in rats. *Braz J Med Biol Res* 22 (6), S. 799–802.
- 94 Gonzalez, Hector Daniel; Liu, Zi Wei; Cashman, Sophia; Fusai, Giuseppe K. (2010): Small for size syndrome following living donor and split liver transplantation. *World J Gastrointest Surg* 2 (12), S. 389–394.
- 95 Govers, R.; Rabelink, T. J. (2001): Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 (2), S. F193-206.
- 96 Grafflin, A. L. (1953): In vivo studies of hepatic structure and function in the salamander. *Anat Rec* 115 (1), S. 53–61.
- 97 Green, C. J. (1981): Anaesthetic gases and health risks to laboratory personnel: a review. *Lab Anim* 15 (4), S. 397–403.
- 98 Griffith, O. W.; Kilbourn, R. G. (1996): Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol* 268, S. 375–392.
- 99 Gross, J. F.; Aroesty, J. (1972): Mathematical models of capillary flow: a critical review. *Biorheology* 9 (4), S. 225–264.
- 100 Gruttadauria, Salvatore; Pagano, Duilio; Luca, Angelo; Gridelli, Bruno (2010): Small-for-size syndrome in adult-to-adult living-related liver transplantation. *World J Gastroenterol* 16 (40), S. 5011–5015.
- 101 Hamaya, Y.; Takeda, T.; Dohi, S.; Nakashima, S.; Nozawa, Y. (2000): The effects of pentobarbital, isoflurane, and propofol on immediate-early gene expression in the vital organs of the rat. *Anesth Analg* 90 (5), S. 1177–1183.

- 102 Hanna, S. S.; Pagliarello, G.; Ing, A. (1988): Liver blood flow after major hepatic resection. *Can J Surg* 31 (5), S. 363–367.
- 103 Hardy, K. J. (1990): Liver surgery: the past 2000 years. *Aust N Z J Surg* 60 (10), S. 811–817.
- 104 Hashimoto, Naoki; Ohyanagi, Harumasa (2002): Effect of acute portal hypertension on gut mucosa. *Hepatogastroenterology* 49 (48), S. 1567–1570.
- 105 He, Yun; Zhou, Jian-Wu; Xu, Lei; Gong, Meng-Jia; He, Tong-Chuan; Bi, Yang (2013): Comparison of proliferation and differentiation potential between mouse primary hepatocytes and embryonic hepatic progenitor cells in vitro. *Int J Mol Med*.
- 106 Higgins, G. M. (1931): Experimental pathology of the liver: 1. Restoration of liver of white rat following surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* 12, S. 186–202.
- 107 Hoffmann, K. F. (1960): [Wilhelm Fabry von Hilden, called Fabricius Hildanus (1560-1634), the founder of clinical surgery.]. *Med Monatsschr* 14, S. 391–394.
- 108 Ho, Harvey; Sorrell, Keagan; Bartlett, Adam; Hunter, Peter (2013): Modeling the hepatic arterial buffer response in the liver. *Med Eng Phys* 35 (8), S. 1053–1058.
- 109 Hori, N.; Wiest, R.; Groszmann, R. J. (1998): Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 28 (6), S. 1467–1473.
- 110 Hortelano, Sonsoles; Zeini, Miriam; Casado, Marta; Martín-Sanz, Paloma; Boscá, Lisardo (2007): Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins. *Front Biosci* 12, S. 13–21.
- 111 Huang, H.; Deng, M.; Jin, H.; Liu, A.; Dirsch, O.; Dahmen, U. (2011): A novel end-to-side anastomosis technique for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation to accommodate size mismatches between vessels. *Eur Surg Res* 47 (2), S. 53–62.
- 112 Ijichi, Hideki; Taketomi, Akinobu; Yoshizumi, Tomoharu; Uchiyama, Hideaki; Yonemura, Yusuke; Soejima, Yuji et al. (2006): Hyperbaric oxygen induces vascular endothelial growth factor and reduces liver injury in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol* 45 (1), S. 28–34.
- 113 Ikegami, Toru; Shimada, Mitsuo; Imura, Satoru; Arakawa, Yusuke; Nii, Akira; Morine, Yuji; Kanemura, Hirofumi (2008): Current concept of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Surg Today* 38 (11), S. 971–982.
- 114 Ishii, E.; Shimizu, A.; Kuwahara, N.; Kanzaki, G.; Higo, S.; Kajimoto, Y. et al. (2013): Hepatic Artery Reconstruction Prevents Ischemic Graft Injury, Inhibits Graft Rejection, and Mediates Long-term Graft Acceptance in Rat Liver Transplantation. *Transplant Proc* 45 (5), S. 1748–1753.
- 115 Iwai, M.; Cui, T. X.; Kitamura, H.; Saito, M.; Shimazu, T. (2001): Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine* 13 (1), S. 60–64.
- 116 Jia, Changku (2011): Advances in the regulation of liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 5 (1), S. 105–121.
- 117 Jiang, Wei-Wei; Kong, Lian-Bao; Li, Guo-Qiang; Wang, Xue-Hao (2009): Expression of iNOS in early injury in a rat model of small-for-size liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8 (2), S. 146–151.
- 118 Kamiyama, Y.; Ozawa, K.; Honjo, I. (1976): Changes in mitochondrial phosphorylative activity and adenylate energy charge of regenerating rabbit liver. *J Biochem* 80 (4), S. 875–881.
- 119 Kandilis, Apostolos N.; Koskinas, John; Tiniakos, Dina G.; Nikiteas, Nikolaos; Perrea, Despina N. (2010): Liver Regeneration: Focus on Cell Types and Topographic Differences. *Eur Surg Res* 44 (1), S. 1–12.
- 120 Kemmer, N.; Neff, G. (2010): Recipient-based approach to tailoring immunosuppression in liver transplantation. *Transplant Proc* 42 (5), S. 1731–1737.
- 121 Kim, Hanah; Cho, Young I.; Lee, Dong-Hwan; Park, Chul-Min; Moon, Hee-Won; Hur, Mina et al. (2013): Analytical performance evaluation of the scanning capillary tube viscometer for measurement of whole blood viscosity. *Clin Biochem* 46 (1-2), S. 139–142.
- 122 Kimura, Norihisa; Hakamada, Kenichi; Ikenaga, Shojiro-Kazunori; Umehara, Yutaka; Toyoki, Yoshikazu; Sasaki, Mutsuo (2012): Gene expression of ATP-binding cassette transporters during liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *Int J Mol Med* 30 (1), S. 28–34.
- 123 Kirilova, I.; Chaisson, M.; Fausto, N. (1999): Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ* 10 (12), S. 819–828.
- 124 Klemm, Katja; Eipel, Christian; Cantré, Daniel; Abshagen, Kerstin; Menger, Michael D.; Vollmar, Brigitte (2008): Multiple doses of erythropoietin impair liver regeneration by increasing TNF-alpha, the Bax to Bcl-xL ratio and apoptotic cell death. *PLoS ONE* 3 (12), S. e3924.
- 125 Klyszcz, T.; Jünger, M.; Jung, F.; Zeintl, H. (1997): [Cap image-a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 42 (6), S. 168–175.



- 126 Knodell, R. G.; Spector, M. H.; Brooks, D. A.; Keller, F. X.; Kyner, W. T. (1980): Alterations in pentobarbital pharmacokinetics in response to parenteral and enteral alimentation in the rat. *Gastroenterology* 79 (6), S. 1211–1216.
- 127 Knowles, R. G.; Moncada, S. (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2), S. 249–258.
- 128 Kountouras, J.; Boura, P.; Lygidakis, N. J. (2001): Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 48 (38), S. 556–562.
- 129 Kurir, T. T.; Markotić, A.; Katalinić, V.; Bozanić, D.; Cikes, V.; Zemunik, T. et al. (2004): Effect of hyperbaric oxygenation on the regeneration of the liver after partial hepatectomy in rats. *Braz J Med Biol Res* 37 (8), S. 1231–1237.
- 130 Lai, Hong-Shiee; Chen, Yun; Lin, Wen-Hsi; Chen, Chiung-Nien; Wu, Hsiu-Chuan; Chang, Chee-Jen et al. (2005): Quantitative gene expression analysis by cDNA microarray during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Surg Today* 35 (5), S. 396–403.
- 131 Lauth, W. W. (1985): Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol* 249 (5 Pt 1), S. G549–56.
- 132 Lauth, W. W.; Greenway, C. V. (1987): Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology* 7 (5), S. 952–963.
- 133 Lauth, W. W.; Legare, D. J.; Ezzat, W. R. (1990): Quantitation of the hepatic arterial buffer response to graded changes in portal blood flow. *Gastroenterology* 98 (4), S. 1024–1028.
- 134 Lauth, W. Wayne (2007): Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: Vascular compliance, hepatic arterial buffer response, hepatorenal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatol Res* 37 (11), S. 891–903.
- 135 Lee, Hyun-Jung; Jung, Jieun; Cho, Kyung Jin; Lee, Chang Kyou; Hwang, Seong-Gyu; Kim, Gi Jin (2012): Comparison of in vitro hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes. *Differentiation* 84 (3), S. 223–231.
- 136 Lee, S. S.; Girod, C.; Valla, D.; Geoffroy, P.; Lebrec, D. (1985): Effects of pentobarbital sodium anesthesia on splanchnic hemodynamics of normal and portal-hypertensive rats. *Am J Physiol* 249 (4 Pt 1), S. G528–32.
- 137 Lehmann, Kuno; Clavien, Pierre-Alain (2010): History of hepatic surgery. *Surg Clin North Am* 90 (4), S. 655–664.
- 138 Lei, Jing; Vodovotz, Yoram; Tzeng, Edith; Billiar, Timothy R. (2013): Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide* 35, S. 175–185.
- 139 Li, Junjian; Liang, Liang; Ma, Tao; Yu, Xiazhen; Chen, Wei; Xu, Guodong; Liang, Tingbo (2010): Sinusoidal microcirculatory changes after small-for-size liver transplantation in rats. *Transpl Int* 23 (9), S. 924–933.
- 140 Li, Qing; Liu, Dian-Wu; Zhang, Li-Mei; Zhu, Bing; He, Yu-Tong; Xiao, Yong-Hong (2005): Effects of augmentation of liver regeneration recombinant plasmid on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 11 (16), S. 2438–2443.
- 141 Liu, Wei-Hua; Zhao, Yue-Shui; Gao, Shun-Yu; Li, Shu-De; Cao, Jun; Zhang, Ke-Qin; Zou, Cheng-Gang (2010): Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Am J Pathol* 177 (5), S. 2357–2365.
- 142 Lo, Chung-Mau; Liu, Chi-Leung; Fan, Sheung-Tat (2003): Portal hyperperfusion injury as the cause of primary nonfunction in a small-for-size liver graft-successful treatment with splenic artery ligation. *Liver Transpl* 9 (6), S. 626–628.
- 143 Lopez, Patricia M.; Martin, Paul (2006): Update on liver transplantation: indications, organ allocation, and long-term care. *Mt Sinai J Med* 73 (8), S. 1056–1066.
- 144 Lowe, G. D. (1987): Blood rheology in vitro and in vivo. *Baillieres Clin Haematol* 1 (3), S. 597–636.
- 145 Lowes, K. N.; Brennan, B. A.; Yeoh, G. C.; Olynyk, J. K. (1999): Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 154 (2), S. 537–541.
- 146 Ludders, J. W. (1992): Advantages and guidelines for using isoflurane. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 22 (2), S. 328–331.
- 147 Lupinacci, Renato; Penna, Christophe; Nordlinger, Bernard (2007): Hepatectomy for resectable colorectal cancer metastases-indicators of prognosis, definition of resectability, techniques and outcomes. *Surg Oncol Clin N Am* 16 (3), S. 493–506, vii–viii.
- 148 Madrahimov, Nodir; Dirsch, Olaf; Broelsch, Christoph; Dahmen, Uta (2006): Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg* 244 (1), S. 89–98.
- 149 Maga, Giovanni; Hubscher, Ulrich (2003): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116 (Pt 15), S. 3051–3060.
- 150 Malato, Yann; Naqvi, Syed; Schurmann, Nina; Ng, Raymond; Wang, Bruce; Zape, Joan et al. (2011): Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 121 (12), S. 4850–4860.

- 151 Malik, Raza; Selden, Clare; Hodgson, Humphrey (2002): The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 13 (6), S. 425–431.
- 152 Man, Kwan; Fan, Sheung-Tat; Lo, Chung-Mau; Liu, Chi-Leung; Fung, Peter Chin-Wan; Liang, Ting-Bo et al. (2003): 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* 237 (2), S. 256–264.
- 153 Marin, Caridad; Robles, Ricardo; Lopez Conesa, Asuncion; Torres, Juan; Flores, Domingo Perez; Parrilla, Pascual (2013): Outcome of strict patient selection for surgical treatment of hepatic and pulmonary metastases from colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 56 (1), S. 43–50.
- 154 Marletta, M. A. (1994): Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78 (6), S. 927–930.
- 155 Martins, Paulo N. A.; Theruvath, Tom P.; Neuhaus, Peter (2008): Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 28 (1), S. 3–11.
- 156 McClusky, D. A. 3rd; Skandalakis, L. J.; Colborn, G. L.; Skandalakis, J. E. (1997): Hepatic surgery and hepatic surgical anatomy: historical partners in progress. *World J Surg* 21 (3), S. 330–342.
- 157 Mead, J. E.; Fausto, N. (1989): Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (5), S. 1558–1562.
- 158 Melo, Gustavo B.; Silva, Renata L.; Melo, Valdinaldo A.; Lima, Sônia O.; Antonioli, Angelo R.; Castro-E-silva, Tiago et al. (2005): Enhancement of liver regeneration by the association of Hyptis pectinata with laser therapy. *Dig Dis Sci* 50 (5), S. 949–954.
- 159 Michalopoulos, G. K.; DeFrances, M. C. (1997): Liver regeneration. *Science* 276 (5309), S. 60–66.
- 160 Michalopoulos, George K. (2010): Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 176 (1), S. 2–13.
- 161 Minor, T.; Efferz, P.; Fox, M.; Wohlschlaeger, J.; Luer, B. (2013): Controlled oxygenated rewarming of cold stored liver grafts by thermally graduated machine perfusion prior to reperfusion. *Am J Transplant* 13 (6), S. 1450–1460.
- 162 Mitzner, Steffen R.; Stange, Jan; Klammt, Sebastian; Koball, Sebastian; Hickstein, Heiko; Reisinger, Emil C. (2009): Albumin dialysis MARS: knowledge from 10 years of clinical investigation. *ASAIO J* 55 (5), S. 498–502.
- 163 Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. (1988): The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12 (4), S. 365–372.
- 164 Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 (2), S. 109–142.
- 165 Moore, W. M.; Webber, R. K.; Fok, K. F.; Jerome, G. M.; Kornmeier, C. M.; Tjoeng, F. S.; Currie, M. G. (1996): Inhibitors of human nitric oxide synthase isoforms with the carbamidine moiety as a common structural element. *Bioorg Med Chem* 4 (9), S. 1559–1564.
- 166 Moriura, S.; Nimura, Y.; Kato, M.; Sato, T.; Shionoya, S. (1990): Effects of acute portal hypertension by portal venous stenosis on systemic hemodynamics in dogs. *Eur Surg Res* 22 (2), S. 113–119.
- 167 Morsiani, E.; Aleotti, A.; Ricci, D. (1998): Haemodynamic and ultrastructural observations on the rat liver after two-thirds partial hepatectomy. *J Anat* 192 (Pt 4), S. 507–515.
- 168 Mortensen, Kim E.; Conley, Lene N.; Nygaard, Ingviid; Sorenesen, Peter; Mortensen, Elin; Bendixen, Christian; Revhaug, Arthur (2010): Increased sinusoidal flow is not the primary stimulus to liver regeneration. *Comp Hepatol* 9, S. 2.
- 169 Mullin, Emma J.; Metcalfe, Matthew S.; Maddern, Guy J. (2005): How much liver resection is too much? *Am J Surg* 190 (1), S. 87–97.
- 170 Muzaale, Abimereki D.; Dagher, Nabil N.; Montgomery, Robert A.; Taranto, Sarah E.; McBride, Maureen A.; Segev, Dorry L. (2012): Estimates of early death, acute liver failure, and long-term mortality among live liver donors. *Gastroenterology* 142 (2), S. 273–280.
- 171 Nagata, Y.; Tanaka, N.; Orita, K. (1994): Endotoxin-induced liver injury after extended hepatectomy and the role of Kupffer cells in the rat. *Surg Today* 24 (5), S. 441–448.
- 172 Nakai, A.; Sekiya, I.; Oya, A.; Koshino, T.; Araki, T. (2002): Assessment of the hepatic arterial and portal venous blood flows during pregnancy with Doppler ultrasonography. *Arch Gynecol Obstet* 266 (1), S. 25–29.
- 173 Nardo, B.; Caraceni, P.; Montalti, R.; Puviani, L.; Bertelli, R.; Beltempo, P. et al. (2005): Portal vein arterialization: a new surgical option against acute liver failure? *Transplant Proc* 37 (6), S. 2544–2546.
- 174 Nardo, B.; Montalti, R.; Puviani, L.; Pacilè, V.; Beltempo, P.; Bertelli, R. et al. (2006a): An experimental pilot study on controlled portal vein arterialization with an extracorporeal device in the swine model of partial liver resection and ischemia. *Int J Artif Organs* 29 (9), S. 912–918.

- 175 Nardo, B.; Puviani, L.; Caraceni, P.; Montalti, R.; Pacilè, V.; Bertelli, R. et al. (2006b): Technical aspects of portal vein arterialization for acute liver failure: from rat lab to man. *Transplant Proc* 38 (4), S. 1195–1197.
- 176 Nathan, C.; Xie, Q. W. (1994): Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78 (6), S. 915–918.
- 177 Nobuoka, T.; Mizuguchi, T.; Oshima, H.; Shibata, T.; Kimura, Y.; Mitaka, T. et al. (2006): Portal blood flow regulates volume recovery of the rat liver after partial hepatectomy: molecular evaluation. *Eur Surg Res* 38 (6), S. 522–532.
- 178 Nwose, Ezekiel Uba (2010): Cardiovascular risk assessment and support techniques: Whole blood viscosity assessment issues I: Extrapolation chart and reference values. *N Am J Med Sci* 2 (4), S. 165–169.
- 179 Nwose, Ezekiel Uba; Richards, Ross Stuart (2011): Whole blood viscosity issue VIII: Comparison of extrapolation method with diagnostic digital viscometer. *N Am J Med Sci* 3 (7), S. 333–335.
- 180 Oertel, Michael; Shafritz, David A. (2008): Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 1782 (2), S. 61–74.
- 181 Oikawa, I.; Novikoff, P. M. (1995): Catalase-negative peroxisomes: transient appearance in rat hepatocytes during liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Pathol* 146 (3), S. 673–687.
- 182 Ossenberg, F. W.; Peignoux, M.; Bourdieu, D.; Benhamou, J. P. (1975): Pentobarbital pharmacokinetics in the normal and in the hepatectomized rat. *J Pharmacol Exp Ther* 194 (1), S. 111–116.
- 183 Ozawa, K.; Takeda, H.; Yamaoka, Y.; Nambu, H.; Kamiyama, Y. (1974): Adenine nucleotide metabolism in regenerative, atrophic, and necrotizing processes of the liver. *Gastroenterology* 67 (6), S. 1225–1230.
- 184 Palmes, D.; Dietl, K. H.; Drews, G.; Hölzen, J. P.; Herbst, H.; Spiegel, H. U. (2002): Auxiliary partial orthotopic liver transplantation: treatment of acute liver failure in a new rat model. *Langenbecks Arch Surg* 386 (7), S. 534–541.
- 185 Palmes, Daniel; Minin, Evgeny; Budny, Tymoteusz; Uhlmann, Dirk; Armann, Barbara; Stratmann, Udo et al. (2005): The endothelin/nitric oxide balance determines small-for-size liver injury after reduced-size rat liver transplantation. *Virchows Arch* 447 (4), S. 731–741.
- 186 Palmes, Daniel; Spiegel, Hans-Ullrich (2004): Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 25 (9), S. 1601–1611.
- 187 Pan, Guang-Dong; Yan, Lu-Nan (2006): Problems in adult living donor liver transplantation using the right hepatic lobe. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5 (3), S. 345–349.
- 188 Panis, Y.; Lomri, N.; Emond, J. C. (1998): Early gene expression associated with regeneration is intact after massive hepatectomy in rats. *J Surg Res* 79 (2), S. 103–108.
- 189 Panis, Y.; McMullan, D. M.; Emond, J. C. (1997): Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 121 (2), S. 142–149.
- 190 Pannen, B. H.; Bauer, M. (1998): Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci* 62 (22), S. 2025–2033.
- 191 Pannen, Benedikt H. J. (2002): New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion. *Anesth Analg* 94 (6), S. 1448–1457.
- 192 Pantos, Ioannis; Patatoukas, Georgios; Efstathopoulos, Efstathios P.; Katritsis, Demosthenes (2007): In vivo wall shear stress measurements using phase-contrast MRI. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 5 (5), S. 927–938.
- 193 Paschos, K. A.; Bird, N. (2008): Current diagnostic and therapeutic approaches for colorectal cancer liver metastasis. *Hippokratia* 12 (3), S. 132–138.
- 194 Peitzman, Andrew B.; Marsh, J. Wallis (2012): Advanced operative techniques in the management of complex liver injury. *J Trauma Acute Care Surg* 73 (3), S. 765–770.
- 195 Pestel, G. J.; Hillebrand, L. B.; Leibundgut, D.; Fukui, K.; Kurz, A. (2006): A Comparison of Two Measurement Sites To Assess Liver Tissue Oxygenation. *Anesthesiology* 105, S. A245.
- 196 Pfeiffer, S.; Leopold, E.; Schmidt, K.; Brunner, F.; Mayer, B. (1996): Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol* 118 (6), S. 1433–1440.
- 197 Pilette, C.; Moreau, R.; Sogni, P.; Kirstetter, P.; Cailmail, S.; Pussard, E.; Lebrec, D. (1996): Haemodynamic and hormonal responses to long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats with portal hypertension. *Eur J Pharmacol* 312 (1), S. 63–68.
- 198 Power, Carl; Rasko, John E. J. (2008): Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. *Ann Intern Med* 149 (6), S. 421–426.
- 199 Pringle, J. H. (1908): V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg* 48 (4), S. 541–549.
- 200 Quiroga, S.; Sebastia, C.; Pallisa, E.; Castella, E.; Perez-Lafuente, M.; Alvarez-Castells, A. (2001): Improved diagnosis of hepatic perfusion disorders: value of hepatic arterial phase imaging during helical CT. *Radiographics* 21 (1), S. 65-81; questionnaire 288-94.

- 201 Raut, Vikram; Alikhanov, Ruslan; Belghiti, Jacques; Uemoto, Shinji (2013): Review of the surgical approach to prevent small-for-size syndrome in recipients after left lobe adult LDLT. *Surg Today*.
- 202 Reden, J. (1990): Molsidomine. *Blood Vessels* 27 (2-5), S. 282–294.
- 203 Redfors, Bjorn; Shao, Yangzhen; Omerovic, Elmir (2013): Influence of anesthetic agent, depth of anesthesia and body temperature on cardiovascular functional parameters in the rat. *Lab Anim*.
- 204 Reuben, Adrian (2004): Prometheus and Pandora-together again. *Hepatology* 39 (5), S. 1460–1463.
- 205 Riquelme, Paloma; Wundt, Judith; Hutchinson, James A.; Brulport, Marc; Jun, Yu; Sotnikova, Anna et al. (2009): A refined characterisation of the NeoHepatocyte phenotype necessitates a reappraisal of the transdifferentiation hypothesis. *Differentiation* 77 (3), S. 263–276.
- 206 Rockey, D. C. (2001): Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 21 (3), S. 337–349.
- 207 Rosenkranz, B.; Winkelmann, B. R.; Parnham, M. J. (1996): Clinical pharmacokinetics of molsidomine. *Clin Pharmacokinet* 30 (5), S. 372–384.
- 208 Rovera, G.; Baserga, R. (1970): Inhibition of RNA synthesis in mammalian cells by pentobarbital sodium. *Proc Soc Exp Biol Med* 135 (2), S. 529–532.
- 209 Russev, G. C.; Tsanev, R. G. (1973): Continuous labeling of mammalian DNA in vivo. *Anal Biochem* 54 (1), S. 115–119.
- 210 Saito, H.; Ogawa, T.; Ishimaru, K.; Oshima, I.; Saito, S. (1979): Effect of pentobarbital and urethane on the release of hypothalamic somatostatin and pituitary growth hormone. *Horm Metab Res* 11 (10), S. 550–554.
- 211 Sandgren, E. P.; Palmiter, R. D.; Heckel, J. L.; Daugherty, C. C.; Brinster, R. L.; Degen, J. L. (1991): Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66 (2), S. 245–256.
- 212 Sasaki, Kazunari; Matsuda, Masamichi; Ohkura, Yu; Kawamura, Yusuke; Hashimoto, Masaji; Ikeda, Kenji et al. (2013): Minimum resection margin should be based on tumor size in hepatectomy for hepatocellular carcinoma in hepatoviral infection patients. *Hepatol Res*.
- 213 Sato, Y.; Koyama, S.; Tsukada, K.; Hatakeyama, K. (1997): Acute portal hypertension reflecting shear stress as a trigger of liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Today* 27 (6), S. 518–526.
- 214 Schibler, Ueli (2003): Circadian rhythms. Liver regeneration clocks on. *Science* 302 (5643), S. 234–235.
- 215 Schlegel, Andrea; Graf, Rolf; Clavien, Pierre-Alain; Dutkowski, Philipp (2013): Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects from biliary injury in a rodent model of DCD liver transplantation. *J Hepatol*.
- 216 Schmidt, E.; Schmidt, F. W. (1967): Release of enzymes from the liver. *Nature* 213 (5081), S. 1125–1126.
- 217 Schoen, J. M.; Lutt, W. W. (2001): iNOS is not involved in shear stress-induced nitric oxide release, which triggers the liver regeneration cascade. *Proc West Pharmacol Soc* 44, S. 181–182.
- 218 Schoen, J. M.; Wang, H. H.; Minuk, G. Y.; Lutt, W. W. (2001): Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 5 (5), S. 453–464.
- 219 Schror, K.; Forster, S.; Woditsch, I.; Schroder, H. (1989): Generation of NO from molsidomine (SIN-1) in vitro and its relationship to changes in coronary vessel tone. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 Suppl 11, S. S29-34.
- 220 Schuett, Harald; Eipel, Christian; Maletzki, Claudia; Menger, Michael D.; Vollmar, Brigitte (2007): NO counterbalances HO-1 overexpression-induced acceleration of hepatocyte proliferation in mice. *Lab Invest* 87 (6), S. 602–612.
- 221 Sherzoi, H. (1999): Andreas Vesalius (1514-1567). *J Invest Surg* 12 (3), S. 131–132.
- 222 Shimada, Hiroshi; Tanaka, Kuniya; Matsuo, Kenichi; Togo, Shinji (2006): Treatment for multiple bilobar liver metastases of colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 391 (2), S. 130–142.
- 223 Shimizu, A.; Ishii, E.; Kuwahara, N.; Arai, T.; Kanzaki, G.; Higo, S. et al. (2013): Chronic antibody-mediated responses may mediate chronic rejection in rat orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 45 (5), S. 1743–1747.
- 224 Shimizu, H.; Miyazaki, M.; Yoshioka, S.; Ito, H.; Nakagawa, K.; Ambiru, S. et al. (1999): Changes in hepatic venous oxygen saturation related to the extent of regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Surg* 178 (5), S. 428–431.
- 225 Shimizu, Y.; Miyazaki, M.; Shimizu, H.; Ito, H.; Nakagawa, K.; Ambiru, S. et al. (2000): Beneficial effects of arterialization of the portal vein on extended hepatectomy. *Br J Surg* 87 (6), S. 784–789.
- 226 Siebert, Nikolai; Cantré, Daniel; Eipel, Christian; Vollmar, Brigitte (2008): H2S contributes to the hepatic arterial buffer response and mediates vasorelaxation of the hepatic artery via activation of K(ATP) channels. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295 (6), S. G1266-73.
- 227 Simoneau, Eve; Aljiffry, Murad; Salman, Ayat; Abualhassan, Nasser; Cabrera, Tatiana; Valenti, David et al. (2012): Portal vein embolization stimulates tumour growth in patients with colorectal cancer liver metastases. *HPB (Oxford)* 14 (7), S. 461–468.

- 228 Smyrniotis, Vassilios; Kostopanagiotou, Georgia; Kondi, Agathi; Gamaletsos, Evangelos; Theodoraki, Kassiani; Kehagias, Dimitrios et al. (2002): Hemodynamic interaction between portal vein and hepatic artery flow in small-for-size split liver transplantation. *Transpl Int* 15 (7), S. 355–360.
- 229 Steer, C. J. (1995): Liver regeneration. *FASEB J* 9 (14), S. 1396–1400.
- 230 Stravitz, R. Todd; Kramer, Andreas H.; Davern, Timothy; Shaikh, A. Obaid S.; Caldwell, Stephen H.; Mehta, Ravindra L. et al. (2007): Intensive care of patients with acute liver failure: recommendations of the U.S. Acute Liver Failure Study Group. *Crit Care Med* 35 (11), S. 2498–2508.
- 231 Subba Rao, Mekala; Sasikala, Mitnala; Nageshwar Reddy, D. (2013): Thinking outside the liver: Induced pluripotent stem cells for hepatic applications. *World J Gastroenterol* 19 (22), S. 3385–3396.
- 232 Suehiro, Taketoshi; Shimura, Tatsuo; Okamura, Kaori; Okada, Toshiyuki; Okada, Koji; Hashimoto, Shinji et al. (2008): The effect of hyperbaric oxygen treatment on postoperative morbidity of left lobe donor in living donor adult liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 55 (84), S. 1014–1019.
- 233 Sutherland, Francis; Harris, Julie (2002): Claude Couinaud: a passion for the liver. *Arch Surg* 137 (11), S. 1305–1310.
- 234 Suzuki, T. (1990): Pharmacological studies on drug dependence in rodents: dependence on opioids and CNS depressants. *Jpn J Pharmacol* 52 (1), S. 1–10.
- 235 Tabrizi-Fard, M. A.; Fung, H. L. (1996): Pharmacokinetics and steady-state tissue distribution of L- and D-isomers of nitroarginine in rats. *Drug Metab Dispos* 24 (11), S. 1241–1246.
- 236 Taub, Rebecca (2004): Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (10), S. 836–847.
- 237 Teixeira, Antonio Roberto Franchi; Machado, Marcel Cerqueira Cesar; Kubrusly, Marcia Saldanha; Molan, Nilza Trindade; Bellodi-Privato, Marta; Leite, Katia Regina; D'Albuquerque, Luiz Augusto Carneiro (2010): A new experimental model for acute hepatic failure in rats. *Acta Cir Bras* 25 (3), S. 269–274.
- 238 Thomson, I. A.; Hughes, R. L.; Fitch, W.; Campbell, D. (1982): Effects of nitrous oxide on liver haemodynamics and oxygen consumption in the greyhound. *Anaesthesia* 37 (5), S. 548–553.
- 239 Toledo-Pereyra, Luis H. (2008): De Humani Corporis Fabrica surgical revolution. *J Invest Surg* 21 (5), S. 232–236.
- 240 Tolentino, E. C.; Castro e Silva, O.; Zucoloto, S.; Souza, M. E. J.; Gomes, M. C. J.; Sankarankutty, A. K. et al. (2006): Effect of hyperbaric oxygen on liver regeneration in a rat model. *Transplant Proc* 38 (6), S. 1947–1952.
- 241 Töply (1910): Die Bewegung des Herzens und des Blutes 1628: Zentralantiquariat der Dt. Demokratischen Republik.
- 242 Tran, Nhut Quang; Malcontenti-Wilson, Caterina; Hammoud, Soukena; Millar, Ian; Christophi, Chris; Muralidharan, Vijayaragavan (2012): Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of ischaemia, preservation and reperfusion injury in a rat model of liver transplantation. *HPB (Oxford)* 14 (2), S. 103–114.
- 243 Troisi, Roberto; Praet, Marleen; Hemptinne, Bernard de (2003): Small-for-size syndrome: what is the problem? *Liver Transpl* 9 (9), S. S1.
- 244 Troisi, Roberto; Ricciardi, Salvatore; Smeets, Peter; Petrovic, Mirko; van Maele, Georges; Colle, Isabelle et al. (2005): Effects of hemi-portocaval shunts for inflow modulation on the outcome of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 5 (6), S. 1397–1404.
- 245 Tucker, O. N.; Heaton, N. (2005): The 'small for size' liver syndrome. *Curr Opin Crit Care* 11 (2), S. 150–155.
- 246 Urakami, Hidejiro; Abe, Yuta; Grisham, Matthew B. (2007): Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in partial liver transplantation: lessons learned from reduced-size liver ischaemia and reperfusion injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34 (9), S. 912–919.
- 247 van Gulik, T. M. (1990): From the archives of hepato-biliary and pancreatic disease—Francis Glisson's Anatomy of the Liver and Biliary Tract. *Hepatogastroenterology* 37 (5), S. 530–531.
- 248 Varo Pérez, E.; Castroagudín, J. F. (2010): The future of liver transplantation. *Transplant Proc* 42 (2), S. 613–616.
- 249 Vauthey, Jean-Nicolas; Zorzi, Daria; Pawlik, Timothy M. (2005): Making unresectable hepatic colorectal metastases resectable—does it work? *Semin Oncol* 32 (6 Suppl 9), S. S118–22.
- 250 Vitecek, Jan; Lojek, Antonin; Valacchi, Giuseppe; Kubala, Lukas (2012): Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators Inflamm* 2012, S. 318087.
- 251 Vogel, Johannes; Kiessling, Isabel; Heinicke, Katja; Stallmach, Thomas; Ossent, Pete; Vogel, Olga et al. (2003): Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood* 102 (6), S. 2278–2284.
- 252 Wagers, Amy J.; Sherwood, Richard I.; Christensen, Julie L.; Weissman, Irving L. (2002): Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297 (5590), S. 2256–2259.
- 253 Wang, H. H.; Lutt, W. W. (1998): Evidence of nitric oxide, a flow-dependent factor, being a trigger of liver regeneration in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 76 (12), S. 1072–1079.

- 254 Weinberg, J. B. (1998): Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med* 4 (9), S. 557–591.
- 255 Weinbren, K.; Woodward, E. (1964): Delayed incorporation of  $^{32}\text{P}$  from orthophosphate into deoxyribonucleic acid of rat liver after subtotal hepatectomy. *Br J Exp Pathol* 45, S. 442–449.
- 256 Windberger, U.; Bartholovitsch, A.; Plasenzotti, R.; Korak, K. J.; Heinze, G. (2003): Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp Physiol* 88 (3), S. 431–440.
- 257 Woods, A. L.; Hall, P. A.; Shepherd, N. A.; Hanby, A. M.; Waseem, N. H.; Lane, D. P.; Levison, D. A. (1991): The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 19 (1), S. 21–27.
- 258 Wu, Xu-Bo; Tao, Ran (2012): Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 11 (4), S. 360–371.
- 259 Wu, Yizhou; Guo, Fuzheng; Liu, Jin; Xiao, Xueyuan; Huang, Lingyun; He, Dacheng (2011): Triple labeling with three thymidine analogs reveals a well-orchestrated regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatol Res* 41 (12), S. 1230–1239.
- 260 Yamamoto, T.; Bing, R. J. (2000): Nitric oxide donors. *Proc Soc Exp Biol Med* 225 (3), S. 200–206.
- 261 Yamaoka, Y.; Ohsawa, T.; Takasan, H.; Ozawa, K. (1974): Energy requirement in regenerative and atrophic processes of the liver in man and other mammals. *Surg Gynecol Obstet* 139 (2), S. 234–240.
- 262 Yokoyama, Y.; Nagino, M.; Nimura, Y. (2007): Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg* 31 (2), S. 367–374.
- 263 Yoshida, Naomasa; Iwata, Hisashi; Yamada, Takuya; Sekino, Takafumi; Matsuo, Hiroshi; Shirahashi, Koyo et al. (2007): Improvement of the survival rate after rat massive hepatectomy due to the reduction of apoptosis by caspase inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol* 22 (11), S. 2015–2021.
- 264 Yoshioka, S.; Miyazaki, M.; Shimizu, H.; Ito, H.; Nakagawa, K.; Ambiru, S. et al. (1998): Hepatic venous hemoglobin oxygen saturation predicts regenerative status of remnant liver after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 27 (5), S. 1349–1353.
- 265 Zhao, Li-Fu; Pan, Xiao-Ping; Li, Lan-Juan (2012): Key challenges to the development of extracorporeal bioartificial liver support systems. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 11 (3), S. 243–249.

## Thesen zur Dissertation

1. Ausgedehnte Leberresektion und Transplantation von Split-Lebern oder Organsegmenten nach Lebendspende führen zu einem reduzierten Verhältnis von Organ- zu Körpermasse, resultierend in einer „reduced-size“-Leber.
2. Charakteristisches Merkmal der „reduced-size“-Leber ist die portale Hyperperfusion, da das größenreduzierte Organ das über die Pfortader angebotene Blut unverändert entgegennehmen muss. Sie besitzt keine aktiven Regulationsmechanismen, um den portalvenösen Fluss zu drosseln.
3. Zur Kompensation physiologischer Perfusionsschwankungen im Pfortadersystem besitzt die Leber einen intrinsischen Regulationsmechanismus, die sogenannte „hepatic arterial buffer response“ (HABR). Passive Veränderungen der Pfortaderperfusion in physiologischem Umfang können durch dieses System durch aktive Beeinflussung des hepatoarteriellen Gefäßtonus ausgeglichen werden.
4. Die HABR ist auch in „reduced-size“-Lebern aktiv und verursacht bei passiver portaler Hyperperfusion eine ausgeprägte hepatoarterielle Minderperfusion. Darüber hinaus entwickelt die „reduced-size“-Leber ein Ungleichgewicht ihrer vasoaktiven Mediatoren, unter anderem kann ein Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) auftreten.
5. Die „reduced-size“-Leber profitiert von der für ein hoch differenziertes Organ bemerkenswerten Eigenschaft durch Regeneration den Massenverlust exakt auszugleichen, wobei auch die hepatische Mikroarchitektur und die Funktion vollständig wiederhergestellt werden können. Als wichtiger Auslöser und Steuerungsfaktor für die Leberregeneration gilt der sinusoidale Scherstress.
6. Die „reduced-size“-Leber trägt jedoch auch das Risiko der Entwicklung eines „small-for-size“-Syndroms, charakterisiert durch Organversagen oder Organverlust in der ersten postoperativen Woche in Abwesenheit anderer beispielsweise autoimmunologischer Ursachen. Als Hauptursache wird ein mechanischer Hyperperfusionsschaden durch die portalvenöse Hyperperfusion angesehen, welcher sich ebenfalls in stark erhöhtem sinusoidalem Scherstress manifestiert.

7. Inwieweit neben mechanischer Schädigung auch die hepatoarterielle Minderperfusion und der NO-Mangel zum „small-for-size“-Syndrom beitragen, wurde bisher nicht ausreichend untersucht. Die vorliegende Studie sollte daher in einem tierexperimentellen Ansatz klären, inwieweit die pharmakologische Beeinflussung des NO-Haushalts Einfluss auf die Hämodynamik, den Leberschaden und die Regeneration der „reduced-size“-Leber besitzt.
8. Durch den NO-Donor Molsidomin konnte der gasförmige Mediator NO substituiert werden, während durch L-NAME (N $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester) eine Blockade der NO-Synthasen erzielt wurde.
9. Durch NO-Substitution mittels Molsidomin konnte der arterielle Perfusionsverlust nach 85% Hepatektomie verhindert werden mit dem Ergebnis einer substanziell verbesserten Sauerstoffversorgung der „reduced-size“-Leber.
10. Wider Erwarten konnte der sinusoidale Scherstress nicht beeinflusst werden. Er blieb somit in seiner Doppelrolle als Regenerationstrigger einerseits und als schädigendes mechanisches Element andererseits unverändert erhalten. Positive Effekte der NO-Substitution können daher nicht auf eine reduzierte mechanische Komponente des Hyperperfusionsschadens zurückgeführt werden.
11. Die NO-Substitution mittels Molsidomin führte sowohl bereits unmittelbar postoperativ, als auch 24 h nach Resektion zu einem deutlich reduzierten Organschaden. Dies kam in signifikant niedrigeren Serumspiegeln der Transaminasen und Dehydrogenasen zum Ausdruck.
12. Die NO-Substitution mittels Molsidomin erhöhte die Regeneration nach 85% Hepatektomie um das doppelte im Vergleich zu pharmakologisch unbehandelten Kontrollen. Dies zeigte die Verdoppelung der hepatozytären DNA-Synthese 24 h nach Resektion, die durch immunhistochemischen Nachweis der Inkorporation des Thymidin-Analogon BrdU (5-Bromodesoxyuridin) nachgewiesen wurde.
13. Es lässt sich somit schließen, dass die NO-Substitution nicht durch Beeinflussung des sinusoidalen Scherstress, sondern vielmehr in der Hauptsache durch die Verbesserung der sauerstoffreichen hepatoarteriellen Blutversorgung den Organschaden der „reduced-size“-Leber reduzieren und gleichzeitig die Regeneration deutlich erhöhen kann.



14. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der hepatoarteriellen Minderperfusion für die Entwicklung eines „small-for-size“-Syndroms eine größere als bisher angenommene Rolle gegenüber dem mechanischen Hyperperfusionsschaden zukommt und das Verhältnis zwischen beiden neu bewertet werden sollte. Dies ist insbesondere für die Entwicklung von Strategien zur Prophylaxe und Therapie des „small-for-size“-Syndroms wichtig. Nicht invasive pharmakologische Verfahren, wie die NO-Substitution zur passageren Kontrolle der Hämodynamik der „reduced-size“-Leber, zur Abmilderung ihres Organschadens und zur Unterstützung der Regeneration können einen wichtigen Beitrag leisten, ausgedehnte Leberresektionen und Transplantationen kleiner Organe oder Organsegmente sicherer zu machen. Invasive Lösungen zur dauerhaften Senkung der portalen Hyperperfusion können unterstützt und möglicherweise sogar ersetzt werden.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich über Jahre hinweg beim Verfertigen der vorliegenden Arbeit begleitet und durch ihre Unterstützung zum erfolgreichen Abschluss beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Vollmar, der Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung an der Universitätsmedizin Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchführen zu dürfen. Durch ihre außerordentliche fachliche Expertise gepaart mit beeindruckendem wissenschaftlichem Enthusiasmus begeisterte sie mich vorbildhaft für das wissenschaftliche Arbeiten. Ihre kontinuierliche und umfassende Begleitung von der Vermittlung grundlegender wissenschaftlicher Arbeitsmethoden über die kritische, jederzeit fruchtbare Diskussion der experimentellen Ergebnisse bis zur Unterstützung von Kongressbeiträgen und Publikationen haben maßgeblich zum Abschluss der vorliegenden Dissertation beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinische und Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes danke ich für sein Interesse an meiner Dissertation.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Eipel danke ich für die Einarbeitung in das experimentelle Modell, die Konkretisierung des Dissertationsthemas und eine hervorragende Betreuung während der tierexperimentellen Versuche, bei Publikationen und Kongressbeiträgen. Durch seine Expertise und seine Geduld war er unverzichtbarer Ansprechpartner, vor allem während meines Forschungsjahrs am Institut für Experimentelle Chirurgie.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch allen Mitarbeitern des Instituts für die sehr herzliche Aufnahme in eine fruchtbare wissenschaftliche Gemeinschaft und die kollegiale und gutgelaunte Unterstützung. Namentlich ergeht mein Dank hierbei besonders an Frau Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Franz und Maren Nerowski für die essenzielle und exzellente technische

Assistenz. Kathrin Sievert, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer danke ich sehr für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere. Auch bei Frau Dr. rer. nat. Kerstin Abshagen, Herrn Dr. Hartmut Stein und Frau Anja Gellert möchte ich mich für die geleistete Unterstützung bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre liebevolle Begleitung den Weg an die Universität ermöglichten und die mich während des gesamten Studiums und insbesondere auch während des Forschungsjahres am Institut vertrauensvoll unterstützten. Zuletzt Danke ich meiner Frau und meinen zwei Söhnen dafür, dass sie mir unzählige Stunden den Rücken freihielten, um mich ungestört der Fertigstellung der Dissertation widmen zu können.