

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor der Klinik Prof. Dr. med. P. Michl

und der

Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Universitätsklinikum Leipzig

Prof. Dr. rer. nat. B. Christ

Einfluss von dl-Propranolol auf die Leberregeneration im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christoph Anders Toni Hillebrand

geboren am 18.12.1978 in Münster

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. B. Christ (Leipzig)
2. Prof. Dr. med. A Nüssler (Tübingen)
3. apl. Prof. Dr. med. A. Zipprich

08.01.2019

04.11.2019

Meiner Familie

Meinem Großvater

Referat

Das Leberversagen als Folge einer akuten oder chronischen Erkrankung führt unbehandelt zum Exitus letalis des Patienten. Als einzige kausal heilende Therapie kann derzeit lediglich eine Lebertransplantation angeboten werden. Eine Hepatozytentransplantation wurde bislang in Einzelfällen zum Bridging vor einer orthotopen Transplantation durchgeführt. Es wäre wünschenswert, in Zukunft durch eine Verbesserung dieses Verfahrens die Hepatozytentransplantation routinemäßig zum Bridging bis zur oder hierdurch ganz auf eine Organtransplantation verzichten zu können. Eine Möglichkeit, um eine bessere Integration der Hepatozytentransplantate zu erreichen, ist die Präkonditionierung der Empfängerleber. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von dl-Propranolol auf die Leberregeneration im Mausmodell untersucht, da bekannt war, dass die Inhibition des beta-adrenergen Rezeptors die Proliferation von Hepatozyten hemmt und somit die Integration von Spenderhepatozyten begünstigt werden könnte. Nach 2/3 Hepatektomie an weiblichen und männlichen C57BL/6- Mäusen wurde die Regeneration der Leber mit und ohne Anwendung nicht-selektiver beta-adrenerger Blockade durch dl-Propranolol beurteilt. Ausgewertet wurden das relative Lebergewicht, die Morphologie der Leber sowie die Histochemie bzw. Immunhistochemie im Zusammenhang mit der Analyse von Zellzyklusproteinen als Maß der Regeneration. An männlichen C57BL/6-Mäusen wurde zusätzlich untersucht, ob eine dl-Propranolol-Vorbehandlung die Regeneration der Leber dahingehend beeinflusst, daß dies einen Wachstumsvorteil für transplantierte Hepatozyten haben kann. Dazu erfolgten Untersuchungen bezüglich der Proliferation von Hepatozyten in Kultur unter Propranololgabe. Außerdem wurde untersucht, ob die Regeneration der Hepatozyten in vivo durch Propranololgabe verändert werden kann. Verglichen wurden die Ergebnisse mit jeweils einer Kontrollgruppe. In den Zellkulturexperimenten wurde die Proliferation von Hepatozyten in unterschiedlichen Szenarien mit und ohne Propranolol-Zugabe untersucht. Im Ergebnis konnte kein Unterschied der Proliferation anhand der Proliferationsraten und der Expression der Zellzyklusproteine registriert werden. Die mit Propranolol behandelten Zellen zeigten eine höhere Expression des Apoptosemarkers PARP. In den in vivo Versuchen konnte im Ergebnis festgestellt werden, dass das relative Lebergewicht in Bezug zum Körpergewicht 48 Stunden nach 2/3 Hepatektomie und dl-Propranolol-Gabe signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe. Nach 72 h war kein Gewichtsunterschied mehr nachweisbar. Unter dl-Propranolol zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate und eine deutlich geringere Leberverfettung. Die Transplantationsexperimente wurden aufgrund von erfolgreichen Vorversuchen nur an männlichen Mäusen durchgeführt. Zur Identifizierung und relativen Quantifizierung transplantierte Hepatozyten in der Empfängerleber wurden native Maus-Hepatozyten gewonnen und entweder mit „Cell-Trace“ angefärbt oder durch viralen Gentransfer mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markiert. Histologisch konnten die mit „Cell-Trace“ angefärbten Zellen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden, die GFP-exprimierenden Zellen wurden nach 2 Wochen in weiterführenden Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe mittels FACS-Analyse analysiert. Die Transplantation von Hepatozyten in mit dl-Propranolol behandelte Tiere erbrachte keine proliferativen Vorteile im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Repopularisierungsrate der Empfängerlebern durch die transplantierten Hepatozyten lag in beiden Gruppen bei 3-4%.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1 Einführung..... | 1 |
| 1.1. Die Leber | 1 |
| 1.1.1. Aufbau der Leber | 1 |
| 1.1.2. Funktion der Leber | 4 |
| 1.1.3. Lebererkrankungen und Transplantation | 5 |
| 1.1.4. Leberregeneration | 8 |
| 1.1.5. Fettstoffwechsel der Leber im Zusammenhang mit Leberregeneration..... | 9 |
| 1.1.6. Leberzelltransplantation | 10 |
| 1.1.7. dl-Propranolol..... | 11 |
| 2. Ziel der Arbeit..... | 14 |
| 3. Materialien und Methoden | 15 |
| 3.1. Materialien | 15 |
| 3.2. Chemikalien | 15 |
| 3.3. Geräte..... | 16 |
| 3.4. Methoden..... | 17 |
| 3.4.1. 2/3-Hepatektomie | 17 |
| 3.4.2. Definition des relativen Lebergewichtes | 17 |
| 3.4.3. Propranololbehandlung..... | 18 |
| 3.4.4. Zellisolation und Zellkultur | 18 |
| 3.4.5. Vitalitätsnachweis durch Trypanblau-Färbung..... | 23 |
| 3.4.6. Proteinisolierung und Proteinbestimmung..... | 24 |
| 3.4.7. Western Blotting..... | 27 |
| 3.4.8. Histochemie (HE-Färbung) | 30 |
| 3.4.9. Immunhistochemie | 31 |
| 3.4.10. Aussaat der Hepatozyten | 31 |
| 3.4.11. Trypsinisierung von kultivierten Hepatozyten..... | 32 |
| 3.4.12. Markierung der Hepatozyten durch Cell-Trace | 33 |
| 3.4.13. Virale Transfektion..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.14. Transplantation der Leberzellen | 34 |
| 3.4.15. Leberentnahme | 34 |
| 3.4.16. Nachweis der transplantierten Leberzellen..... | 35 |
| 3.4.17. Triacylglycerol-Nachweis..... | 35 |
| 3.4.18. Wirkung von Propranolol auf kultivierte Hepatozyten unter Zugabe von Fettsäuren | 35 |
| 3.4.19. Statistische Analyse | 36 |
| 4. Ergebnisse | 37 |
| 4.1. Effekt des Propranolols auf das relative Lebergewicht nach partieller Hepatektomie | 37 |
| 4.2. Einfluß des dl-Propranolols auf die Zellzyklusproteine in dem in vivo Versuch | 39 |
| 4.3. Die Zellzyklusproteine in der Zellkultur | 40 |
| 4.4. Einfluß des dl-Propranolol auf die Mitoserate..... | 42 |
| 4.5. Fettakkumulation im Lebergewebe nach partieller Hepatektomie mit- bzw. ohne Propranolol- Behandlung..... | 44 |
| 4.5. Hepatozytentransplantation nach Prä-konditionierung der Empfängerleber durch Propranolol | 47 |
| 5. Diskussion | 51 |
| 5.1. Mechanismen der Katecholaminwirkung auf die Leberregeneration | 51 |
| 5.2. Metabolische Wirkungen der Katecholamine im Zusammenhang mit der Leberregeneration..... | 53 |
| 5.3. Wirkung von Propranolol auf den hepatozytären Zellzyklus bei der Leberregeneration | 54 |
| 5.4. Die Hemmung der Leberregeneration durch Propranolol als Methode zur Präkonditionierung für die Hepatozytentransplantation | 55 |
| 5.5. Weitere Mechanismen der Propranololwirkung, die die Integration von Spenderhepatozyten in die Empfängerleber beeinflussen können..... | 56 |
| 5.6. Pharmakologische Aspekte zur Wirksamkeit des dl-Propranolol..... | 58 |
| 5.7. Klinische Translation..... | 59 |
| 6. Schlußfolgerung | 62 |
| 7. Zusammenfassung | 62 |
| 8. Literaturverzeichnis | 65 |
| 9. Thesen | 76 |
| Selbständigkeitserklärung..... | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Alb | Albumin |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-phenylindole |
| DMEM | Dulbecco`s Modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSO | Deutsche Stiftung Organtransplantation |
| ECL | Enhanced Chemical Luminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EGTA | Ethyleneglycoltetraacetic acid |
| FKS | Foetales Kälber-Serum |
| GFP | Green Flourescent Protein |
| g | Gramm |
| h | Stunde(n) |
| H ₂ O | Wasser (Dihydrogenoxid) |
| HCl | Salzsäure (Chlorwasserstoff) |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HGM | Hepatocyte Growth Medium |
| ICD-10 | International Classification of Disease Version 2010 |
| IGF | Insulin-like Growth Factor |

| | |
|-------------------|------------------------------------|
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IPP | Immunpräzipitationspuffer |
| Kg KG | Kilogramm Körpergewicht |
| KRP | Krebs-Ringer-Puffer |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| $\mu\text{mol/l}$ | mikromol/l |
| μl | Mikroliter (10^{-6} Liter) |
| μg | Mikrogramm (10^{-6} Gramm) |
| ml | Milliliter (10^{-3} Liter) |
| mA | Milliampere (10^{-3} Ampere) |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAHCO_3 | Natriumhydrogencarbonat |
| nM | nanomolar (10^{-9} Mol/l) |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PARP | Poly (ADP-Ribose) Polymerase |
| - CSSA | - Cleaved Site Specific Antibody |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCNA | Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| PCK | Phosphoenolpyruvat Carboxykinase |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SOP | Standard Operating Procedure |
| TAE | Triethanolamin-Puffer |

| | |
|-----------|---------------------------------|
| TEMED | Tetramethylethylenediamine |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TNF-Alpha | Tumor Necrosis Factor Alpha |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |

1 Einführung

1.1. Die Leber

1.1.1. Aufbau der Leber

Die murine Leber lässt sich grob in einen rechten und einen linken Leberanteil aufteilen. Der rechte wiederum wird in zwei und der linke in drei Leberlappen gegliedert. Die Leberlappen haben eine unterschiedliche Grösse, auf die linken Leberlappen entfallen etwa 2/3 der Organmasse.

Im Gegensatz hierzu ist die humane Leber funktionell-anatomisch in 4 Leberlappen (Lobus dexter et sinister, Lobus quadratus et caudatus), und diese wiederum in 8 Lebersegmente eingeteilt. Die 8 Segmente lassen sich weiter in Subsegmente einteilen. In der murinen- ebenso wie in der humanen Leber entspricht die funktionelle Aufteilung portalvenösen „Funktionseinheiten“ (Abb. 1).

Die kleinste Funktionseinheit der Leber bilden die meist hexagonalen „Leberläppchen“, die sich hauptsächlich aus den Hepatozyten zusammensetzen.

Die Morphologie der Leberläppchen lässt sich folgendermaßen einteilen: Die jeweils aneinandergrenzenden Leberläppchen bilden mit den sich darin befindlichen Gefässen die Periportalfelder. Innerhalb der Periportalfelder verlaufen jeweils eine Arteria interlobularis, eine Vena interlobularis (Ast der Pfortader) und ein Gallengang.

Die größte Zellpopulation der Leber bilden die Hepatozyten. Mit einem Gesamtvolumen von ca. 94% der Lebermasse und ca. 65% der Zellzahl erfüllen Sie den Hauptteil der inkretorischen- und exkretorischen Stoffwechsellistung der Leber [1]. Die Gesamtzellzahl der Hepatozyten wird mit $2,8 \times 10^{11}$ in einem gesunden menschlichen Organ angegeben [2].

Die Hepatozyten sind häufig polynukleär und können durch eine nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit die Regeneration des Organs im Bedarfsfall sichern [3].

Die Hepatozyten liegen mit ihrer basolateralen Membran zu den Kapillaren der Leber ausgerichtet, welche auch als Lebersinusoiden bezeichnet werden. Die apikalen Membranen benachbarter Hepatozyten bilden ein Gallenkanälchen. Innerhalb der Sinusoide befinden sich die Makrophagen der Leber: Die Kupffer'schen Sternzellen. Die Gallenkanälchen leisten mittels des „Gegenstromprinzips“ den Transport der Gallenflüssigkeit in Richtung größerer Gallengänge und letztendlich weiter in die Gallenblase.

Als Besonderheit der Sinusoide sei hier die fehlende Basallamina des Endothels erwähnt, dies ermöglicht z.B. den Kupffer'schen Sternzellen eine leichtere Migration in das Parenchym der Leber.

Die Sauerstoffversorgung der Leber erfolgt zu ca. 45% aus dem portalvenösen Stromgebiet und zu etwa 55% aus dem arteriellen Gefäßzufluß, vornehmlich aus der Art. Hepatica propria. Das nährstoffreiche Blut kommt sämtlich aus dem portalvenösen Bereich und somit über die venösen Gefäße aus dem Intestinaltrakt. Über die Portalvene findet ein Großteil der Blutzufuhr zur Leber statt. Bis zu $\frac{3}{4}$ des Blutflusses können über die Portalvene die Leber perfundieren. Die relativen Anteile des Blutflusses der Art. hepatica propria und der Vena portae schwanken insbesondere in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme [4]. In Abbildung 1 wird die Gefäßversorgung und die Aufteilung der Leber in die einzelnen Segmente graphisch dargestellt.

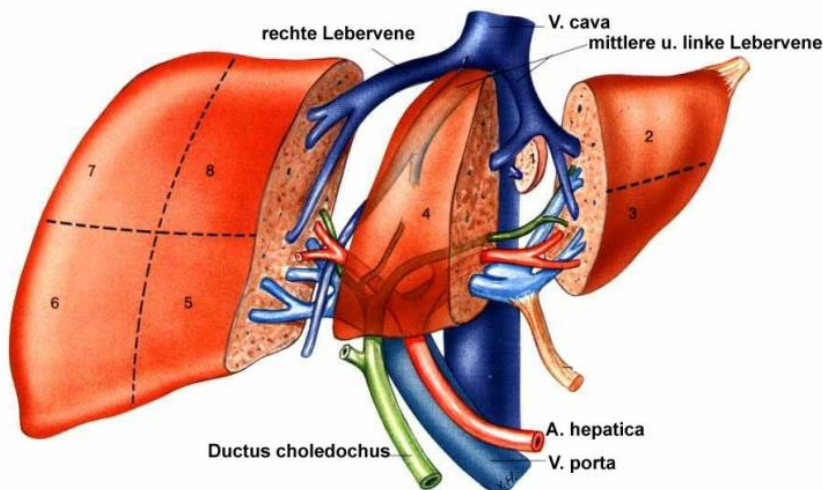


Abb. 1: Darstellung der Gefäßversorgung und Aufteilung der Leber in Segmente

Aufbau der Leber, Unterteilung in 2 Leberlappen und Unterteilung in 8 Lebersegmente (1-8). Portalvene, Art. Hepatica propria, Lebervenen und V. Cava inferior sowie Gallengänge.

(Quelle: <http://www.uniklinik-duesseldorf.de/img/ejbimage/herzbild.jpg?id=9420&typ=s>)

Der Blutfluss findet vom portalvenösen und arteriellen Stromgebiet zum zentralvenösen Gebiet hin statt. Innerhalb der Leber durchläuft das Blut mit seinen Nährstoffen und Stoffwechselprodukten ein Netz von Kapillaren. Die zuführenden Gefäße aus dem portalvenösen- und dem arteriellen Gebiet umgrenzen zusammen mit den kleinen Gallengängen die oben beschriebenen Funktionseinheiten der Leberläppchen. Das entlang des sinusoidalen Blutstromes entstehende Sauerstoffgefälle wird auch für die weiter unten beschriebenen zonalen Unterschiede von Stoffwechselvorgängen verantwortlich gemacht:

Der gerichtete Blutfluss innerhalb der Sinusoide transportiert das Blut der Pfortader zusammen mit dem Blut aus der Leberarterie durch die Sinusoide der Leberläppchen in Richtung der Läppchenzentren, wo es jeweils von einer Verzweigung der Vena centralis aufgenommen wird. Die einzelnen Zentralvenen vereinigen sich zu größeren Venen und schließlich zu den Lebervenen, die letztendlich in die untere Hohlvene münden.

Den Spaltraum zwischen den Endothelzellen der Lebersinusoiden und den Hepatozyten nennt man den „Disse’schen Raum“. Im Disse-Raum befindet sich Blutplasma, weiterhin die sog. Hepatischen Sternzellen (früher: Itozellen), die u.a. der Fettspeicherung dienen. Die Abbildung 2 zeigt den Feinbau der Leber mit schematischem Aufbau der Leberläppchen.

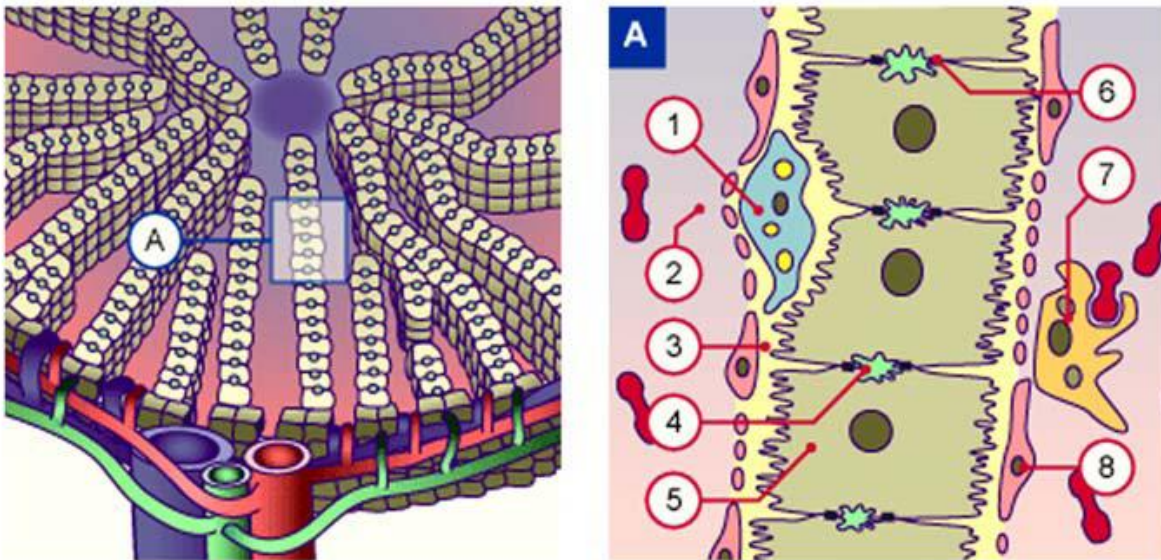


Abb. 2: Feinbau der Leber. Schematischer Aufbau der Leberläppchen. Über die Leberarterie und die Pfortader gelangt das Blut zu den Hepatozyten und wird über die Zentralvene wieder abgeführt. Die Gallenflüssigkeit fließt dem Blutstrom entgegen und wird über die Gallenkanälchen und den Gallengang in die Gallenblase geführt. Die Kupfferschen Sternzellen liegen in den Lebersinusoiden und stellen die Makrophagen der Leber dar (1 Hepatische Sternzellen (Itozellen), 2 Sinusoidaler Raum, 3 Disse’scher Raum, 4 Gallenkanälchen, 5 Hepatozyt, 6 Tight-Junction, 7 Kupffer’sche Sternzelle, 8 Sinusoidale Endothelzelle (Quelle: <http://www.embryology.ch/anglais/sdigestive/leber02.html>).

1.1.2. Funktion der Leber

Die Leber ist die größte Drüse und überhaupt das größte innere Organ des menschlichen Körpers. Mit einem Gesamtgewicht von ca. 1,5 kg, entsprechend 1,5 % bis 2,5 % des idealen Körpergewichtes, ist sie als zentrales Stoffwechselorgan des Körpers im rechten Oberbauch teilweise mit dem Zwerchfell verwachsen.

Das Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht verändert sich im Laufe des Lebens (Lebergewicht beim Neugeborenen ca. 1/25, beim Erwachsenen wie o.g.), da sich auch die Aufgaben des Organs zum Teil wandeln. Sowohl in der pränatalen als auch in der unmittelbar postnatalen Phase des Lebens nimmt die Leber u.a. an der Blutbildung teil, diese Eigenschaft verliert sie normalerweise im Laufe des weiteren Lebens.

Als zentrales Stoffwechselorgan übernimmt die Leber sowohl katabole als auch anabole Funktionen des Organismus. Hierzu gehören: Die Synthese von Plasmaproteinen (z.B. Albumin, Gerinnungsfaktoren) und die Bildung von Harnstoff aus dem im Intermediärstoffwechsel entstehenden Ammoniak. Weitere Aufgaben der Leber sind der Aufbau, die Speicherung und der Abbau von Glykogen, die Neusynthese von Glukose aus Laktat und glucogenen Aminosäuren. Sowohl die Synthese und der Abbau von Fettsäuren und von Phospholipiden, die Bildung und die Exkretion von Gallensäuren als auch die Produktion und der Abbau von essentiellen Hormonen stellen wesentliche Aufgaben der Leber dar [5].

Die Energiezufuhr des Körpers geschieht über die Nahrungsaufnahme. Neben der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten und Proteinen wird der Energiebedarf über die Aufnahme von Fetten gedeckt. Nach Aufspaltung durch die Darmmukosa werden aus den unterschiedlichen Bestandteilen der Fette Chylomikronen gebildet. Diese bestehen aus Phospholipiden, Triacylglyceriden, Cholesterin und Cholesterinestern. Nach Aufnahme in das Lymphsystem und durch den systemischen Transport im Blutkreislauf wird ein Teil der Chylomikronen bereits im Kapillarstromgebiet verstoffwechselt oder als Energiereserve in Adipozyten gespeichert. Nur ein kleiner Anteil der Chylomikronen, sog. Chylomikronen-Remnants, erreicht die Leber und durchläuft einen Umbauprozess. Aus den Anteilen von Triacylglyceriden, Phospholipiden, Cholesterin und Cholesterinestern werden Very low density lipoproteins (VLDL) gebildet und zur weiteren systemischen Energieversorgung in den Parenchymzellen (Hepatozyten) zu Low density Lipoproteins (LDL) umgebildet und in der Leber gespeichert. An der Cholesterinsynthese ist die Leber maßgeblich beteiligt. Hierbei sind insbesondere die LDL-Cholesterine und die HDL-Cholesterine (High density lipoprotein) und deren Verhältnis zueinander von Bedeutung. Die HDL dienen dem Transport von Cholesterinen aus der Peripherie in die Leber. Die LDL wiederum sind notwendig für den Cholesterintransport aus der Leber in die peripheren Zellen. Wie bereits weiter oben erwähnt, unterscheidet sich die Stoffwechsellistung der Hepatozyten in den periportalen und den perivenösen Zonen. In der periportalen Zone ist, durch den Blutfluß bedingt, die Sauerstoffkonzentration höher und somit finden hier die anabolen Stoffwechsellistungen statt

(Glukoneogenese, Ammoniakfixierung durch Harnstoffsynthese). Im zentralvenösen Stromgebiet hingegen sind eher die katabolen Leistungen wie z.B. Glykolyse, Ammoniakfixation durch die Glutaminsynthetase, etc. angesiedelt [6-8]. Ebenso findet die Verstoffwechslung von Medikamenten und weiteren organismusfremden Stoffen in dieser Zone statt [6].

Die Aufrechterhaltung der Bluthomöostase unterliegt somit in wesentlichen Teilen den Stoffwechselleistungen der Leber.

1.1.3. Lebererkrankungen und Transplantation

Chronische Lebererkrankungen werden durch die regenerative Fähigkeit der Leber über mehrere Jahre und unter Umständen sogar Jahrzehnte kompensiert [9].

Bei chronischen Lebererkrankungen tritt häufig zuerst der Ikterus in Erscheinung. Dies ist eine schmerzlose Kummulation von Abbaustoffen des Hämoglobins in der Haut mit primärer Erscheinung in den Skleren. An Symptomen treten eine zunehmende Abgeschlagenheit mit Leistungsintoleranz und gehäuften Phasen der Erschöpfung auf. Bei Fortschreiten der Leberdysfunktion werden weitere lebenswichtige metabolische Leistungen der Leber beeinträchtigt. Die verminderte Synthese der Gerinnungsfaktoren ist der Beginn des Gerinnungsversagens. Auch die verminderte Eliminierung von Ammoniak stellt bei fortschreitender Leberschädigung eine Komplikation dar, die aufgrund dessen neurotoxischer Wirkung mit schweren Bewusstseinsstörungen einhergehen kann, der sogenannten „Hepatischen Encephalopathie“. Die Hepatische Encephalopathie ist ein Kriterium für relevante Prognosescores (Child-Pugh-Score) zur Abschätzung des Schweregrades einer Leberzirrhose [10].

Die Unterscheidung des Leberversagens in ein „akutes“, „akut auf chronisches“ und in ein „chronisches“ Organversagen dient ebenso der Prognoseabschätzung. Hierbei hat das „akut auf chronische“-Leberversagen die schlechteste Prognose [11]. Insbesondere sei hier die Prognoseabschätzung über den Model for End Stage Liver Disease-Score (MELD-Score) erwähnt. Als aktuell bedeutendster Test berücksichtigt dieser anhand von Routinelaborparametern den Progress der Erkrankung und das Risiko innerhalb von 3 Monaten an der Erkrankung zu versterben [12]. Anhand verschiedener Scores (Kings College Kriterien bei akutem Leberversagen, Clichy-Kriterien bei akuter Virushepatitis) wird das Risiko bezüglich des Multiorganversagens berechnet. Bei einem Risiko von über 20% am Organversagen zu versterben, wird die Indikation zur Lebertransplantation erwogen [13, 14].

Die apparative Leberersatztherapie konnte bisher nur einen Zeitaufschub zur orthotopen Transplantation gewährleisten. Es stehen unterschiedliche maschinelle Verfahren zur Verfügung, z.B. Prometheus® oder MARS® (Molecular Adsorbent Recirculating System) [15-18]. Hierbei wird durch Bindung von Toxinen an Plasmaproteine (Albumin) die Aufgabe der Leber im Sinne einer „Dialyse“ simuliert.

Selbst bei maximaler medikamentöser Begleittherapie (Hemmung der Ammoniakspaltung im Intestinum, Senkung des portalvenösen Druckes, Substitution der Gerinnungsfaktoren, etc.) kann bei akutem Leberversagen nur die Organtransplantation eine kausale Heilung bringen.

Die häufigsten Erkrankungen, die in Deutschland zu der Notwendigkeit einer Lebertransplantation führen, sind chronisch toxischer Genese und somit potentiell vermeidbar. Hierbei spielt der Alkoholabusus mit der Folge alkoholischer Leberkrankheit eine führende Rolle. Nahezu 1/4 der Indikationen für eine Lebertransplantation sind hierdurch verursacht (siehe DSO Jahresbericht 2017). Eine Zusammenfassung der Indikationen für eine Lebertransplantation sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Indikationen für eine Lebertransplantation – Deutschland 2017

Aufschlüsselung der Indikationen für eine Lebertransplantation nach den zehn häufigsten ICD-10 (International Classification of disease)- Hauptdiagnosen bei Neuanmeldung (bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt 19 Hauptdiagnosen bei 1213 Fällen nach ICD-10; Quelle: DSO-Jahresbericht 2017, resp. Eurotransplant)

| Diagnose | Neuanmeldungen |
|--|----------------|
| Alkoholische Leberkrankheit | 288 |
| Fibrose und Zirrhose der Leber | 274 |
| Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge | 204 |
| Leberversagen andernorts nicht klassifiziert | 125 |
| Sonstige Krankheiten der Gallenwege | 125 |
| Angeborene Fehlbildungen der Gallenblase, der –gänge und der Leber | 96 |
| Störungen des Mineralstoffwechsels | 11 |
| Sonstige Krankheiten der Leber | 28 |
| Sonstige Stoffwechselstörungen | 25 |
| Sonstige Störungen der Leberfunktion | 9 |
| Summe | 1185 |

Die Zahl der in den letzten zehn Jahren erfolgten Neuanmeldungen und die Zahl der erfolgten Transplantationen divergieren seit Jahren. Ebenso sinkt mit regionalen Unterschieden die Bereitschaft der Bevölkerung, einer postmortalen Organspende zuzustimmen. So standen im Jahre 2017 1.367 Neuanmeldungen 823 erfolgten Transplantationen gegenüber. Diese Divergenz von 544 fehlenden Organen wird mit einer erhöhten Sterblichkeit und dem Aufbau einer „Warteliste“ erkaufte. (Vergl. DSO-Jahresbericht 2017).

Tabell 2 zeigt die Anzahl der in Deutschland zwischen 2008-2017 erfolgten Anmeldungen und durchgeführten Lebertransplantationen, aufgeteilt in postmortale- und Leberlebendspende, sowie die Gesamtzahl der erfolgten Transplantationen.

Tab. 2: Neuanmeldungen und Lebertransplantationen in Deutschland 2008-2017, Transplantationen

postmortal, Teilleberspende und Anzahl Leber-Gesamttransplantationen. (Quelle: DSO Jahresbericht 2017)

Neuanmeldungen zur Lebertransplantation nach Jahren (ohne Wiederholungsanmeldungen)

| 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| 1.644 | 1.842 | 1.834 | 1.781 | 1.688 | 1.305 | 1.336 | 1.308 | 1284 | 1367 |

Transplantationen nach postmortaler Spende

| 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| 1.067 | 1.120 | 1.192 | 1.116 | 1.017 | 884 | 879 | 846 | 826 | 823 |

Transplantationen nach Lebendspende

| 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 55 | 60 | 91 | 71 | 78 | 83 | 58 | 45 | 50 | 61 |

Leber-Transplantationen gesamt (inkl. Nichtaufgeführter Domino-Spende)

| 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| 1.122 | 1.180 | 1.283 | 1.199 | 1.097 | 970 | 941 | 894 | 888 | 884 |

1.1.4. Leberregeneration

Die Leber hat als einziges inneres Organ die Fähigkeit zur Regeneration [3]. Nach akuten toxischen Ereignissen ist es der Leber möglich, durch die hepatozytäre Proliferaton kompensatorisch zu hypertrophieren und somit die benötigte Stoffwechsellleistung wieder aufzunehmen und während der Regeneration aufrecht zu erhalten [19]. Diese Zeitspanne zur Bewältigung des schädigenden Ereignisses und die Zeitspanne bis zum vollständigen Erreichen der ursprünglichen Organmasse wird in der Literatur sehr variabel angegeben. Je nach Ausmaß der Schädigung sind Zeiträume von einigen Tagen bis zu mehreren Monaten beschrieben worden.

In Untersuchungen nach Teilleberspenden und –transplantationen sind Zeiträume bis zu 12 Monaten bis zur vollständigen Wiederherstellung der Organmasse beschrieben [112,113]. In weiteren Literaturquellen wird die Wiederherstellung der „Ursprungsgröße“ einer hepatektomierten Leber auch nach 12 Monaten noch nicht als vollständig angesehen. Die erforderlichen metabolischen Leistungen der hepatektomierten Lebern werden nach Angaben der Literatur sehr viel früher erreicht [119].

Anhand von Transplantationsexperimenten ließ sich beweisen, dass die Leber nur in ökonomisch sinnvoller Weise regeneriert. Bei einer Leber, die als zu „groß“ für den Empfänger galt, verkleinerte diese sich durch Apoptose bis auf „Idealgröße“. Umgekehrt erfolgte der Aufbau der Leber bei Organen, die zu „klein“ für den Empfänger waren. Allerdings erreicht die regenerierte Leber nur ein bestimmtes Ausmaß, das entsprechend der Körpergröße einen definierten Bedarf des Stoffwechsels garantiert [20].

Molekularbiologisch lassen sich die Prozesse der Leberregeneration in verschiedene Phasen aufteilen: Die erste Phase ist die von Cytokinen initiierte und hiervon abhängige Phase, die zweite ist die von Cytokinen unabhängige Phase der Leberzellerneuerung. In der ersten Phase kommt es durch den Verlust von Hepatozyten zu einem Missverhältnis zwischen benötigter Organfunktion und erhaltener Biomasse. Ausgelöst durch oxidativen Stress werden pro-inflammatorische Cytokine wie TNF-alpha und Interleukin-6 durch biliäre Epithelzellen und hämatopoetische Lymphozyten freigesetzt [21, 22], die in der Leber die sog. „Akut-Phase-Reaktion“ hervorrufen. Diese sorgt u.a. für eine Aktivierung der „immediate early genes“ [23]. Diese heterogene Gen-Familie, der zum Beispiel „IGF-1“, „PEPCK“ und „Beta-Actin“ angehören, hat unterschiedliche Wirkungen zur Initiation und Perpetuierung der Leberzellregeneration: sie vermittelt die Sekretion von Cytokinen und hält somit die „Akute-Phase-Reaktion“ in Gang. Die Cytokine TNF-Alpha und IL-6 gelten als „Primer“ für die Leberregeneration. Ihr unmittelbarer Anstieg nach einer relevanten Schädigung der Leber führt zur Stimulation der Proteinbiosynthese und ist essentiell für diesen Vorgang [24, 25]. Die G1-Phase des Zellzyklus wird durch den Anstieg der Wachstumsfaktoren TGF-beta und HGF getriggert [26]. Ohne diese Wachstumsfaktoren geht der Zellzyklus nicht in die G1-Phase über [19, 26]. Der Eintritt in die G1-Phase kann anhand des Anstiegs des Cyclin-D1 nachgewiesen werden [27]. Mit dem Fortschreiten des Zellzyklus wird die Leberregeneration unabhängig von der weiteren Stimulation durch die genannten

Cytokine [19, 28]. Dies ist die o.g. zweite Phase der Regeneration. Diese beiden Teilprozesse laufen parallel zueinander ab.

Durch die u.a. von TNF-alpha im Zusammenspiel mit den Wachstumsfaktoren HGF, TGF-beta und EGF initiierten Regenerationsprozesse kommt es zu einer Aktivierung von Tyrosinkinase, die wiederum im Zellkern zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und zur Stimulation der Genexpression führen. Dadurch wird die S-Phase des Zellzyklus, in der die zur Zellteilung notwendigen Proteine synthetisiert werden, eingeleitet und die Hepatozyten-Proliferation angeregt [27, 29]. Während der Leberregeneration wird die metabolische Homöostase aufrecht erhalten [30].

1.1.5 Fettstoffwechsel der Leber im Zusammenhang mit Leberregeneration

Die Leber ist wesentlich am Fettstoffwechsel des Körpers beteiligt. Wie bereits weiter oben beschrieben (siehe „Funktion der Leber“), stellt die Verstoffwechslung von Chylomikronen-Remnants, die Synthese von LDL-Cholesterinen und die Speicherung von Triacylglycerinen eine wichtige Ressource zur Umverteilung von Körperlipiden und eine Energiequelle für die Energieversorgung während der Leberregeneration dar. Die akute parenchymatöse Schädigung der Leber geht mit einer Steigerung der hepatischen Fettakkumulation einher [31, 32].

Die Steigerung der metabolischen Leistung der Leber in der Schädigungsphase wird durch eine Umverteilung der Durchblutung induziert. Der portale Blutfluss wird gesteigert und die arterielle Durchblutung vermindert [33].

Ob die hepatische Fettakkumulation zur Regeneration beiträgt, wird kontrovers diskutiert. An dieser Stelle sollen kurz die unterschiedlichen Sichtweisen dargestellt und erläutert werden:

Die Arbeitsgruppe um Newberry sieht keinen Zusammenhang zwischen hepatischer Regeneration und Fettakkumulation. Hierzu wurden verschiedene Versuche mit „Knock-out-Mäusen“ in Bezug auf den Lipidstoffwechsel durchgeführt. Unabhängig von der genetisch bedingten Stoffwechselstörung fand sich ein erhöhter Triglyceridgehalt während der Regeneration in der Leber. Allerdings war die Regeneration der Leber trotz der Ausschaltung von relevanten Fettstoffwechselgenen ungestört [35].

Die Ergebnisse von Stheyer et al. lassen den Schluß zu, das Hormone (Leptin, Glukokortikoide), welche eine Hemmung der hepatischen Fettakkumulation induzieren, die Regeneration negativ beeinflussen können [32].

Eine weitere Bestätigung, daß die Triglyceridanreicherung in der Leber entscheidend zur Regeneration beiträgt, liefert die Arbeitsgruppe um Fernandez. Durch Versuche mit „Knockout-Mäusen“ (Caveolin1 -/-) zeigte sich eine dramatische Erhöhung der Letalität und gleichzeitig eine nur schwache Leberregeneration. Dieser Effekt konnte durch die Zufuhr von Glukose und die damit verbundene Speicherung von Lipiden in der Leber umgekehrt werden [36].

Zu einem ähnlichen Schluß kommt auch die Gruppe um Farrell: Durch die hepatische Fettakkumulation nach einer akuten Schädigungsphase wird die Regeneration unmittelbar gefördert [37].

Somit sind je nach Design der Experimente einige Argumente für den Einfluß der hepatischen Fettakkumulation in Bezug auf die Leberregeneration als auch Argumente gegen diese These zu finden.

1.1.6. Leberzelltransplantation

Die Möglichkeit der isolierten Leberzelltransplantation wurde erstmalig Ende der 1970er Jahre erwähnt [38]. Durch die Transplantation von gesunden Spenderhepatozyten können fehlende oder eingeschränkte Funktionen der Leber ausgeglichen werden [39, 40]. Der Behandlungserfolg wird bestimmt durch die Qualität der transplantierten Leberzellen und durch die Repopularisierungsrate der Empfängerleber durch die Spenderhepatozyten. Um die Aufnahme der spezifischen Leberfunktionen zu gewährleisten, muss eine beträchtliche Anzahl an Hepatozyten transplantiert werden, dies erfolgte in humanen Experimenten in mehreren Sitzungen [41]. Bei akutem Leberversagen wurde die zu transplantierende Zellmasse auf ca. 10-15% der ursprünglichen Lebermasse geschätzt [42]. Diese Menge kann nicht in nur einer Sitzung infundiert werden, da portale Hypertension und die mögliche Okklusion der nachfolgenden portalvenösen Gefäße auftreten können [2, 43]. Die Leberzelltransplantation hat noch keinen Eingang in die Klinik als Routine-Therapie gefunden. Bisher gab es einzelne Therapieerfolge bei genetisch bedingten Lebererkrankungen wie z.B. Glykogenspeicherkrankheiten (GSD-type 1a) [44], Crigler-Najjar-Syndrom Typ 1 [45] oder schwere Formen der familiären Hypercholesterinämie, bei denen es durch eine Genterapie in Kombination mit Hepatozytentransplantation zu einer Teil-Heilung kam [39].

Bei akutem Leberversagen und notwendigem Organersatz wird die Leberzelltransplantation im Rahmen eines „Bridgings“ bis zur orthotopen Lebertransplantation durchgeführt [46, 47]. Durch die Zelltransplantation konnte in den meisten Fällen zumindest ein Rückgang der Bilirubin-Spiegel und eine Verbesserung der hepatischen Encephalopathie aufgrund der Reduktion des Ammoniak-Spiegels erreicht werden [48].

Damit sich möglichst viele transplantierte Zellen funktionell im Lebergewebe integrieren können, wurden verschiedene Wege der hepatischen „Präkonditionierung“ untersucht und teilweise erprobt [49, 50]. Die Präkonditionierung beinhaltet eine Schädigung und/oder Hemmung der Replikationsfähigkeit von Hepatozyten der Wirtsleber, um transplantierten Spenderzellen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen.

Am häufigsten wurden im Tiermodell die 2/3-Leberteilresektion in Kombination mit der Behandlung mit hepatotoxischen Stoffen (z.B. Retrorsin) verwendet. Ein weiteres Verfahren stellt die Röntgen-Bestrahlung der Leber oder des Bauchraumes dar. Hierbei finden bei einmaliger Bestrahlung

Röntgendosen von bis zu 50 Gray (Gy) Anwendung. Dies ist für den menschlichen Organismus eine letale Dosis [51, 52, 53] und somit nicht anwendbar.

Weitere Verfahren zur hepatischen Präkonditionierung, sind z.B. Ischämie-Reperusionsverfahren. Durch die Ligatur von portal-venösen oder arteriellen Gefäßen über eine variable Zeitspanne wird die Sauerstoffzufuhr erheblich reduziert. Durch die Hypoxie in der Leber kommt es zu einer Zellschädigung, die nachfolgend einen Wachstumsvorteil für transplantierte Zellen darstellt [54]. Teilweise werden die Verfahren auch kombiniert angewandt. Einen weiteren medikamentösen Ansatz, den Anteil an transplantierten Hepatozyten in der Empfängerleber zu steigern, stellt die Erhöhung der Durchlässigkeit der Endothelien dar. So konnte durch den Einsatz des Immunsuppressivums Cyclophosphamid der Anteil an ins Parenchym integrierten Zellen signifikant erhöht werden [55].

Eine Verbesserung der Integrationsrate durch die Gabe eines lokal und direkt wirkenden Vasodilatators (Nitroglycerin) konnte die Gruppe um Slehria zeigen. Die deutlich distalere Einnistung der transplantierten Hepatozyten blieb ohne relevanten Einfluss auf die portalvenösen Strömungsverhältnisse [56].

Die meisten der im Tierexperiment angewandten Methoden sind aus ethischer Sicht in humanen Studien und Therapien nicht anwendbar, da diese mit einer hohen Toxizität, Letalität oder aber Kanzerogenität einhergehen.

1.1.7. dl-Propranolol

Das dl-Propranolol ist ein nicht-selektiver Blocker der Beta-Rezeptoren (Beta-1 und Beta-2) des adrenergen Systems.

Nach oraler Applikation wird Propranololhydrochlorid zu mehr als 90 % aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die biologische Verfügbarkeit von oral verabreichtem Propranololhydrochlorid liegt bei 34 – 36 %. Propranololhydrochlorid unterliegt einem ausgeprägten „First-pass-Effekt“ [67]. Die absolute systemische Verfügbarkeit beträgt ca. 30 %. Somit wird oral verabreichtes Propranolol hauptsächlich von der Leber aufgenommen und hat dort die größte Wirkung. Maximale Plasmaspiegel werden nach ca. 1 – 2 Stunden erreicht. Die Plasmaproteinbindung von Propranololhydrochlorid beträgt ca. 90 % (hauptsächlich Albumin), das relative Verteilungsvolumen beträgt 3,6 l/kg. Einer der beim Abbau von Propranololhydrochlorid in der Leber entstehenden Metaboliten (4-Hydroxypropranolol) besitzt ebenfalls hemmende Wirkung auf den Beta-Rezeptor. Konzentration und Halbwertszeit sind jedoch gering. Propranololhydrochlorid und seine Metabolite werden zu über 90 % -davon weniger als 1 % der applizierten Dosis unverändert - renal eliminiert. Die Eliminationshalbwertszeit von Propranololhydrochlorid liegt bei normaler Nierenfunktion im Durchschnitt zwischen 3 und 4 Stunden. Die hepatische Metabolisierung erfolgt hauptsächlich über das CYP2D6-Cytochrom P450-System [68, 69]. Einen kleineren Eliminationsweg stellt das „Ionen-trapping“ und das „microsomal binding“ dar.

Hier ist allerdings eine dosisabhängige Sättigung des Eliminationsweges mit einer linearen Dosis zu Plasmakonzentration beschrieben worden [114].

Zur Therapie beim Menschen ist dl-Propranolol für folgende Indikationen zugelassen: dl-Propranolol wird u.a. bei infantilen Hämangiomen, zur Behandlung des essentiellen Tremors, bei Herzrhythmusstörungen, arterieller Hypertonie und zur Rezidivprophylaxe von Ösophagusvarizenblutungen eingesetzt [70-72]. Eine Senkung des portocavalen Druckgradienten ist beschrieben worden [73, 74]. Hierbei senkt der nicht-selektive Beta-Blocker den Druck der Umgehungskreisläufe allerdings stärker als den Druck in der Vena portae.

An Nebenwirkungen ist insbesondere die Depression des kardiovaskulären Systems zu nennen. Insbesondere Bradykardien und hypotensive Blutdruckwerte ließen sich nach Propranolol-Einnahme eruieren. Bei Propranolol-Überdosierung werden einzelne Fälle mit generalisierten Krampfanfällen und pulmonalen Ödemen hin bis zum Herzkreislaufstillstand berichtet [75].

Unter der Einnahme von Propranolol ließen sich deutliche Erhöhungen der LDL-Spiegel registrieren, ebenso stieg der Quotient von LDL/HDL deutlich an. Die Abnahme von HDL-Cholesterinen ist bei Hypertoniern unter Propranolol ebenfalls beschrieben worden. Das Verhältnis der Apolipoproteine B (Bestandteil von LDL) und A (Bestandteil von HDL, Enzymaktivator zur Cholesterinveresterung) zueinander wird durch Propranolol zu Gunsten des Apo B verändert [76], und kann somit die Pathogenese der Atherosklerose begünstigen. Daneben soll die Gabe von dl-Propranolol und somit die Hemmung des adrenergen Systems eine „Downregulation“ des Immunsystems zur Folge haben [77].

Nur wenige Studien beschäftigen sich mit der Leberregeneration unter Propranolol-Therapie.

In einer Arbeit von Thrower hatte die Gabe von Propranolol weder einen Effekt auf die DNA-Synthese noch auf die Ornithin-Decarboxylase (als Parameter der Proteinbiosyntheseleistung) [78]. Die Gruppe um Hong kam zu dem Ergebnis, daß die Gabe von Propranolol eine Hemmung der DNA-Replikation bei Ratten verursacht und somit die Organregeneration negativ beeinflusst [49]. In den Versuchen war jedoch lediglich das PCNA als Marker der DNA-Replikation signifikant verändert gewesen. Wood et al. konnten in einer Arbeit mit zirrhotischen Lebern die Elimination von Propranolol trotz erwartungsgemäß reduzierten hepatischen Stoffwechsels zeigen. Der Propranololmetabolismus war in mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Ratten untersucht worden [79]. Hier zeigte sich eine intakte aber verlängerte Eliminationszeit des applizierten Propranolols. Auch wenn die Arbeit einen anderen Ansatz verfolgte, kann die Elimination des Propranolols auch in geschädigten Lebern als gesichert gelten.

Die Arbeit von Reyes-Salcido von 2003 konnte bei hepatektomierten und mit Propranolol behandelten Tieren eine erhöhte Thymidin-Kinase-Aktivität feststellen. Dies wurde als Zeichen der Regeneration gewertet. Dieser Effekt war nur unmittelbar nach Hepatektomie und dann erneut 48 Stunden post-operationem zu beobachten. Zu dem für die Regeneration interessantem Zeitpunkt von 24 Stunden post-

operationem zeigte sich eine deutlich verminderte Aktivität der Thymidin-Kinase genauso wie eine reduzierte mitotische Aktivität, somit ebenfalls eine frühe Hemmung der Leberregeneration [80].

Die letale Dosis von enteral aufgenommenem dl-Propranolol wird in der Literatur als LD50 mit 289 mg/kgKG bei Nagern angegeben [93].

Die toxische Dosis von dl-Propranolol wird in der vorliegenden Literatur sehr uneinheitlich angegeben. Sie schwanken zwischen 120-400 mg/kg KG. Insbesondere die unterschiedliche Auslegung einer möglichen Toxizität (Hypotonie, Bradykardie, Somnolenz, Krampfanfälle) im kausalen Zusammenhang mit der Einnahme von Propranolol bereitet Schwierigkeiten bei der Beurteilung. Die verfügbare Literatur weist viele Fallberichte und nur wenige systematische Beurteilungen auf, insgesamt zeigt sich aber eine niedrige Letalität für Propranololintoxikationen (< 1%) [81].

2. Ziel der Arbeit

Die Zielstellung dieser Arbeit sollte die Analyse der Wirkung von dl-Propranolol auf die Leberregeneration sein, um dieses gegebenenfalls zur Prä-Konditionierung der Leber für die Hepatozytentransplantation einsetzen zu können.

Hierzu wurde der Einfluss von dl-Propranolol auf das relative Lebergewicht, die hepatische Fettakkumulation und die Expression von Zellzyklusproteinen zeit- und dosisabhängig gemessen und beurteilt.

Weiterhin wurden die Proliferationsrate und die Apoptose der murinen Hepatozyten unter dl-Propranolol-Behandlung in vivo und zur genaueren Differenzierung eines möglichen indirekten Einflusses von dl-Propranolol in vitro untersucht werden.

Schließlich wurde die Wirkung von dl-Propranolol auf einen möglichen Wachstumsvorteil für transplantierte Hepatozyten (Repopularisierung der Leber) nach 2/3 Hepatektomie untersucht.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Für die 2/3-Hepatektomie wurden folgende Materialien verwendet:

Anatomische Pinzetten und Scheren mittel, klein, gerade und gebogen – Conatex Didactic GmbH (Neunkirchen, Deutschland)

Nahtmaterial, Prolene 2,0, resorbierbar – Catgut GmbH (Markneukirchen, Deutschland)

Venenverweilkanüle Optiva 2 - Johnson&Johnson (Düsseldorf, Deutschland)

3.2. Chemikalien

Für die Behandlung der Mäuse, die Zellkulturversuche, die Markierung der Hepatozyten, das Western-Blotting und die Histochemie wurden folgende Chemikalien verwendet.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Roth, Sigma, Fluka, Serva und Merck erworben.

Flüssigmedien: DMEM-HG (4,5 g/l Glucose), DMEM-LG (1 g/l Glucose) mit und ohne Pyruvat, FKS und Trypan Blue (Gibco/Invitrogen, USA)

Pulvermedien: D-MEM ohne NaHCO₃ und Glucose, MCDB-201, PBS (Biochrom; Deutschland); MEM (Sigma, Deutschland)

Penicillin-Streptomycin und Trypsin/EDTA-Gemisch (ccPro, Deutschland)

Sämtliche Chemikalien und Reagenzien entsprachen dem Reinheitsgrad p.A. bzw. Zellkultur-getestet.

Cell-Trace (Invitrogen Molecular Probes, Cat.No. C34554, USA)

ECL (Enhanced Chemical Luminescence) -Reagenz (3,5 ml Detektionsreagenz 1 + 3,5 ml Detektionsreagenz 2, Kit von Amersham Biosciences Inc., USA)

Polybrene (Roth, Deutschland)

Avidin Block (Vector, SP-2001, USA), Biotin Block (Vector, SP-2001, USA)

Protein blocking agent (Thermo scientific, 407501, USA)

ABC (Vector, PK-6100, USA)

AEC-Substrate (Skytec, ACD-015, USA)

Permunt (Fisher Science, Deutschland)

BCA (Bicinchoninic Acid Solution), (Sigma, Deutschland)

Propranololhydrochlorid (dl-Propranolol, Schwarz Pharma, Deutschland)

Clin-Oleic 20 % (Baxter, Deutschland)

Antikörper für die Immunhistochemie

Rabbit anti-Ki67-Antikörper (1:50, Abcam, Ab833, USA)

Biotinylated-goat anti-rabbit-antibody (1:200, Vector BA-1000, USA)

Antikörper für das Western Blotting:

Cyclin D1 (1:1000), PCNA (1:1000), Vinculin (1:1000), CDK2 (1:1000, BD Bioscience, CA, USA)

PARP (1:1000) (anti-poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase CSSA-antibody) (Invitrogen Corp., CA, USA)

Sek. Antikörper: Ziege-Anti-Maus-Antikörper (1:2000),

3.3. Geräte

Geräte und Verbrauchsmaterialien die zur Standard Laborausrüstung gehören, werden nicht aufgeführt.

Cryotom: MEV Slee Cryostat – Slee Medical GmbH (Mainz, Deutschland)

HM 325 Microm – GMI Inc. (Ramsey, USA)

Nikon Eclipse E600 Fluoreszenz -Mikroskop – Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Nikon Eclipse E4200 Fluoreszenz-Mikroskop – Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Elektrophoreseapparatur (Mighty Small, Amersham Biosciences, USA)

Blot-Kammer (Mighty Small, Amersham Biosciences, USA)

PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore)

Filmkassette (Agfa International, Belgium)

High performance chemiluminescence film (Agfa International, Belgium)

Super Signal West Pico detection system (Pierce, USA)

LX-20 Analyzer (Beckmann-Coulter, Brea, California, USA)

3.4. Methoden

3.4.1. 2/3-Hepatektomie

Für die gesamte Versuchsreihe wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet. Der Tierversuch mit der Nummer K6IG3 wurde am 28.05.2003 durch das Regierungspräsidium Halle genehmigt. Die Tiere wurden unter Einhaltung der nationalen und regionalen Tierschutzbestimmungen im 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Nahrung in Gruppen von 4-6 Tieren je Käfig gehalten. Die Tiere waren zwischen 10-15 Wochen alt und wogen zwischen 25-30 g.

Die zu operierenden Tiere wurden spontan atmend mit einem Isofloran-Vernebler in eine tiefe Narkose versetzt und durch die kontinuierliche Gabe von 80% Sauerstoff vermischt mit ca. 1,5% Isofluran die Narkose aufrechterhalten. Nach Kontrolle der Analgesie erfolgte ein Hautschnitt mit einem 10er- Skalpell vom Xiphoid bis zum Bauchnabel. Danach wurde die Linea alba durchtrennt. Nach Freipräparieren der Leber und Darstellung der Vena portae, wurde die Leber von ligamentären Strukturen (Lig. teres hepatis, Lig. coronarium, Lig. triangulare sinistrum und Lig. falciforme) abgelöst. Im Anschluss erfolgt die Darstellung der Gallenblase, diese wird mit der Ligatur des linken seitlichen Leberlappens im Bereich der lobären Gefäßabgänge mit entfernt. Danach Lösung des linken medialen Leberlappens, anschließend die Ligatur und nachfolgend die Ligatur des rechten medialen Leberlappens. Diese Prozedur erfolgte modifiziert in Analogie zu Higgins und Anderson von 1931.

Nach Entfernung der genannten Leberanteile wurde auf eine konsequente Blutstillung geachtet und wenn notwendig, Kollagenschwämmchen zur Unterstützung der Blutgerinnung genutzt.

Im Anschluss erfolgte der schichtweise Wundverschluss mittels fortlaufender Naht zum Muskulaturverschluss und mittels Einzelknopfnahnt zum Hautverschluss. Bis zum Erwachen und Erreichen der Fluchtreaktion wurden die Tiere unter einer Infrarotlampe gewärmt. Um Tierbisse zu vermeiden, wurden die Tiere bis zur vollständigen Rekonvaleszenz im Einzelkäfig gehalten.

Die Methode konnte ohne Verluste der Tiere im Experiment durchgeführt werden.

3.4.2. Definition des relativen Lebergewichtes

Um ein Maß für das relative Lebergewicht zu erhalten, wurde das Gewicht von gesunden und unbehandelten Tieren dokumentiert und deren Lebern entnommen (n=10) und gewogen. Aus den erhaltenen Daten wurde ein auf das Körpergewicht bezogenes relatives Lebergewicht mit folgender Formel errechnet:

$$\text{relatives Lebergewicht in g} = \frac{\text{Lebergewicht in g}}{\text{Körpergewicht in g}}$$

Die erhobenen Daten dienten zum einen als Maß für die Abschätzung der Leberregeneration und zum anderen dienten die entnommenen Organe als Kontrolle in Bezug auf die Zellzyklusprotein-Analyse wie in Kapitel 3.4.6 ausgeführt.

3.4.3. Propranololbehandlung

Die Propranolol-Behandlung der Tiere erfolgte in zwei unterschiedlichen Dosierungen. In der einen Gruppe wurde eine Konzentration von 15 mg/kg KG zugrunde gelegt, hierbei wurde von einer Trinkmenge je Maus pro Tag von 3 ml Wasser ausgegangen. Somit erfolgte die Einwaage von 0,15 g/l Trinkwasser.

In einer weiteren Gruppe wurde eine höhere Propranolol-Dosierung gewählt. Es wurden 0,6 g/l Propranolol eingewogen. Auch hier wurde eine tägliche Trinkmenge von 3 ml/Maus/Tag kalkuliert und somit eine Konzentration vom 60mg/kg KG.

Als Kontrollgruppe diente eine identische Population von o.g. Mäusen, die jedoch Frischwasser ohne den Zusatz von Propranolol erhielten.

Die Propranolol-Behandlung erfolgte über 3 Tage vor und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Operation. Unmittelbar vor Beginn der Hepatektomie wurde die Behandlung ausgesetzt und die Tiere hatten wie in der Kontrollgruppe Zugang zu Frischwasser ohne Zusatz.

3.4.4. Zellisolation und Zellkultur

Für die Zellkulturversuche und die Transplantationsexperimente wurden Hepatozyten aus normalen Mauslebern, wie im Folgenden beschrieben, gewonnen.

Die Isolation der Hepatozyten erfolgte aus 10-15 Wochen alten, männlichen C57BL/6-Mäusen (25-30 g) in Anlehnung an die Methode von Seglen [82] und mit Modifikationen nach Kost [83]. Die Freilegung der Leber erfolgte wie bereits oben beschrieben (3.4.1). Allerdings wurde keine 2/3-Hepatektomie durchgeführt. Stattdessen erfolgte die Kanülierung der Portalvene mit einer 26G Venüle. Nach Ligatur und Fixierung derselben wurde eine Perfusion der Leber mittels Präperfusionspuffer (siehe unten) durchgeführt. Die Flussrate betrug 10 ml/min. Die Aufhellung der Leber wurde als erfolgreiche Perfusion gewertet, dann erfolgte die Durchtrennung der unteren Hohlvene, um den Abfluss der Perfusionslösung zu gewährleisten. Im Anschluss wurde mittels kontinuierlichen Flusses von 10 ml/min die Kollagenase-Perfusionslösung, bestehend aus Kollagenaseperfusionspuffer und Kollagenase, infundiert. Bei Erkennbarkeit der typischen Felderung auf der Leber nach ca. 2 min wurde die Perfusion beendet. Die Leber wurde unmittelbar aus dem Situs entfernt und in einem Glasgefäß mit eisgekühltem Waschpuffer (siehe unten) gelagert. Unter sterilen Bedingungen erfolgte die mechanische Separation der Hepatozyten nach Öffnung der Leberkapsel mittels einer sterilen Kanüle (G-22).

Die Zellsuspension wurde resuspendiert und in der Zentrifuge mit 600 U/min bei 4°C abzentrifugiert. Das sich am Boden des Reagenzgefäßes befindliche Zellpellet wurde mittels Waschpuffer resuspendiert und erneut 2-mal gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Vitalitätskontrolle wie unter 3.4.5 beschrieben.

Die Zellen wurden dann auf mit Kollagen beschichtete Platten mit einem Durchmesser von 10 cm gegeben. Zur Einsaat der Zellen wurde MEM (siehe unten) hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 3×10^6 je Platte eingesät. Nach 2-3 h erfolgte der Mediumwechsel zu HGM [84]. Die Zellen wurden dann für wenigstens 72h kultiviert [85].

Puffer zur Isolierung von Maushepatozyten

Tab. 3: Zusammensetzung von Krebs-Ringer-Puffer (1x KRP) ad 500 ml Aqua dest.

| Name | Einwaage | Finale Konz. | Hersteller |
|---------------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| NaCl | 3,5 g | 120 mM | Roth |
| KCl | 0,18 g | 4,8 mM | Merck |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,15 g | 1,2 mM | Sigma |
| KH ₂ PO ₄ | 0,08 g | 1,2 mM | Merck |
| NaHCO ₃ | 1,01 g | 24,4 mM | Merck |

Tab. 4: Zusammensetzung des Präperfusionspuffers (PPP= Ca₂ frei)

| Name | benötigte Menge | Finale Konz. | Hersteller |
|-------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 1x KRP | 50 ml | | |
| EGTA | 5 mg | 0,25 mM | Roth |

Das Gemisch wurde 30 Minuten mit Carbogen begast, der pH-Wert auf 7,35 eingestellt, und die Lösung im Anschluss steril filtriert. Vor der Verwendung musste der Puffer auf 37°C erwärmt werden.

Tab. 5: Kollagenase-Perfusionspuffer (CPP)

| Name | benötigte Menge | Finale Konz. | Hersteller |
|---------------------------------------|-----------------|--------------|------------|
| 1 x KRP | 50 ml | | |
| Hepes | 178,5 mg | 15 mM | Serva |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 29,5 mg | 4 mM | Merck |

Der Puffer wurde auch hier wiederum 30 Minuten mit Carbogen begast, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und die Lösung im Anschluss steril filtriert.

Tab. 6: Kollagenase im Kollagenase-Perfusionspuffer

| Name | benötigte Menge | Units | Hersteller |
|--------------------|-----------------|---------|------------|
| CPP | 50 ml | | |
| Kollagenase CLS II | 11,65 mg | 293U/mg | Biochrom |

Die Kollagenase wurde in 50 ml Puffer gelöst und steril filtriert, anschließend zum restlichen Puffer (Krebs-Ringer-Puffer, s.o.) gegeben und dies im 37°C warmen Wasser erwärmt. Bei der Berechnung der Kollagenase-Aktivität war die Chargenabhängigkeit der Aktivität zu beachten. Die Aktivität wurde dem beiliegenden Infoblatt entnommen und nach folgendem Beispiel berechnet:

$$\text{Kollagenaseaktivität (Maus): } 13.650 \text{ U}/200 \text{ ml: } \frac{293 \text{ U}}{1 \text{ mg}} = \frac{13650 \text{ U}}{x \text{ mg}} \rightarrow x = \frac{46,58 \text{ mg}}{200 \text{ ml CPP}}$$

Waschpuffer

Tab. 7: Zusammensetzung des Waschpuffers ad 1 Liter Aqua dest.

| Name | Einwaage | Final conc. | Hersteller |
|---------------------------------------|----------|-------------|--------------|
| Hepes | 4,77 g | 20 mM | Serva |
| NaCl | 7,00 g | 120 mM | Roth |
| KCl | 0,36 g | 4,8 mM | Merck |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,30 g | 1,2 mM | Sigma |
| KH ₂ PO ₄ | 0,16 g | 1,2 mM | Merck |
| BSA | 4,00 g | 0,4 % | Paesel+Lorei |

Der Puffer wurde 30 Minuten mit Carbogen begast, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und im Anschluss steril filtriert.

Einsaatmedium

Tab. 8: Einsaatmedium Minimal Essential Medium ad 1 l Aqua dest. Fertigmedium-Pulver:

| Produkt | Hersteller |
|--------------------------------|------------|
| Minimum Essential Medium Eagle | Sigma |

An Zusätzen wurden steriles NaHCO₃ hinzu gegeben (= MEM incomplete)

Insulin und Gentamycin wurden erst kurz vor der Verwendung hinzu gegeben (= MEM complete).

Tab. 9: Zusammensetzung von MEM complete

| Name | benötigte Menge | Final conc. | Hersteller |
|--------------------|-----------------|-------------|------------|
| NaHCO ₃ | 0,35 g | 0,004 M | Merck |
| Insulin | 10 ml | 500 ng/ml | Sigma |
| Gentamycin | 1 ml | 50 µg/ml | Biochrom |

Kultivierungsmedium

Tab. 10: Zusammensetzung des Hepatocyte Growth Medium (HGM) für Maushepatozyten

| Produkt | Hersteller |
|---|------------|
| D-MEM without Glucose (500 ml) mit L-Glutamin, ohne Glucose, ohne Natriumpyruvat | Gibco |
| D-MEM with 4,5 g/l Glucose (500 ml) mit L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose, ohne Natriumpyruvat | Gibco |

1 l HGM: 500 ml D-MEM ohne Glucose + 500 ml D-MEM mit Glucose wurden gemischt und anschließend mit den folgenden Zusätzen versehen und gemischt:

Tab. 11: Zusammensetzung von Zusatz 1

| Substanz | Einwaage | finale Konz. | Hersteller |
|-------------|----------|--------------|------------|
| Albumin | 2,00 g | 0,2 % | Sigma |
| Galaktose | 2,00 g | 11,1 mM | Serva |
| Ornithin | 0,10 g | 0,6 mM | Serva |
| Prolin | 30 mg | 0,26 mM | Serva |
| Hepes | 2,38 g | 9,98 mM | Serva |
| Nicotinamid | 0,305 g | 2,5 mM | Sigma |
| Glutamin | 0,146 g | 0,99 mM | Merck |

Tab. 12: Zusammensetzung von Zusatz 2

| Substanz | benötigte Menge | Konz. der Stocklösung | finale Konz. | Hersteller |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------------|--------------|------------|
| ZnCl ₂ | 200 µl | 2 mM | 54,4 µg/l | Sigma |
| CuSO ₄ x 5H ₂ O | 100 µl | 0,8 mM | 20 µg/l | Merck |
| ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 100 µl | 2,6 mM | 75 µg/l | Aldrich |
| MnSO ₄ | 10 µl | 14,8 mM | 25 µg /l | Merck |

Nach Zugabe der beiden Zusätze wurde das hergestellte Medium steril filtriert (= HGM incomplete).

Unmittelbar vor der Verwendung erfolgte die Zugabe von Penicillin/Streptomycin, Dexamethason und ITS (= HGM complete).

Tab. 13: Zusammensetzung von HGM complete

| Substanz | Benötigte Menge. | Konz. der Stocklösung | finale Konz. | Hersteller |
|-----------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| Pen/Strep | 10 ml | 1 % | 0,01% | cc pro |
| Dexamethason | 100 µl | 1 mM | 0,1 µM | Sigma |
| ITS | 1 ml | 0,1 % | 0,00 | Roche |

Kurz vor der Durchführung des Medienwechsels werden noch die Wachstumsfaktoren EGF und HGF zugesetzt.

Tab.14.: Zusammensetzung von HGM complete mit Wachstumsfaktoren

| Substanz | benötigte Menge | Konz. der Stocklösung | finale Konz. | Hersteller |
|-----------------|------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------|
| EGF | 1 ml | 20 µg/ml | 20 µg/l | PeptoTech |
| HGF | 1 ml | 40 µg/ml | 40 µg/l | Strathmann Biotec AG |

Der Medienwechsel der Zellkultur erfolgte alle 48 h. Die Zellkultur erfolgte im Zellkulturschrank bei 37 ° C und 5% CO₂-Konzentration.

3.4.5. Vitalitätsnachweis durch Trypanblau-Färbung

Die Anzahl an vitalen Zellen wurde durch die Trypanblau-Färbung bestimmt. Bei intakter Zellmembran kann der Farbstoff nicht in die Zelle eindringen. Die Zellzählung wurde mit Hilfe einer Zählkammer durchgeführt. Dies ist ein spezieller Glasobjektträger, der mit einem Gitternetz zur Quadrateinteilung und in der Folge zur Bestimmung der Zellzahl entwickelt wurde (nach Neubauer: 9 Großquadrate mit je 1mm² Fläche, eine weitere Unterteilung des mittleren Quadrates in 16 Gruppenquadrate und diese sind wiederum in 16 Kleinstquadrate unterteilt. Die Vertiefung betrug 0,1 mm).

100 µl Zellsuspension wurden mit 100 µl Trypanblau-Lösung vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neubauer-Zählkammer und das Deckgläschen wurden mit 70% Ethanol gereinigt, so dass die Glasflächen sauber, trocken und fettfrei waren. Das Deckgläschen wurde derart auf den Objektträger gedrückt, dass an beiden Auflagestegen Newtonsche Ringe zu sehen waren. 10 µl der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension (siehe unten) wurde mit einer Pipette zwischen Deckgläschen und Objektträger gebracht wodurch sich der Zwischenraum der Zählkammer mit

Flüssigkeit füllte. Die gefüllte Zählkammer wurde unter ein Mikroskop positioniert und die Zellzahl bei 100-facher Vergrößerung in 4 Großquadraten bestimmt. Die Zahl wurde durch 4 geteilt und mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu errechnen.

Die Gesamt-Zellzahl pro ml (Z_{gesamt}) ergab sich aus folgender Formel:

$$Z_{\text{gesamt}} = (\text{ausgezählte Zellen/ausgezählte Fläche}) * (\text{Kammertiefe (0,1 mm)}) * 10^4$$

Die Berechnung der Zellvitalität wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\% \text{ vitale Zellen} = \frac{\text{Anzahl ungefärbte Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzahl der Zellen}}$$

Eine Zellvitalität von über 85% war Voraussetzung zur weiteren Verwendung der Zellen.

3.4.6. Proteinisolierung und Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der BCA-Methode durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch Proteine in einwertige Kupferionen. Die Bicinchoninsäure reagiert im alkalischen Milieu mit den einwertigen Kupferionen zu einem violetten Farbkomplex. Die Färbung des Komplexes ist proportional zur Proteinkonzentration. In Tabelle 15 sind die Materialien zur Proteinisolierung/Proteinbestimmung aufgeführt.

Tab. 15: Materialien und Lösungen zur Proteinisolierung und Proteinbestimmung:

| Chemikalien | Hersteller |
|--|-------------------|
| Triton | SIGMA |
| NaCl | Roth |
| EDTA | Merck |
| EGTA | Roth |
| Aprotinin | Sigma |
| Antipain | Sigma |
| Leupeptin | Sigma |
| Pepstatin | Sigma |
| E 64 | Sigma |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma |
| Natriumorthovanadat | AppliChem |
| Protein Standard Bovine Serum Albumin | Sigma |
| Copper II Sulfate Solution 4% | Sigma |
| Bicinchoninic Acid Solution | Sigma |
| Tischzentrifuge | Heraeus |
| Mikroplattenreader | Biorad |

Zelluläre Proteine wurden in Immunpräzipitationslösung (IPP) angereichert.

Zusammensetzung der Immunpräzipitationslösung (2-fach konzentriert).

2 % Triton; 300 mM NaCl ; 20 mM EDTA; 2 mM EGTA; pH-Wert 7,4

Herstellung von 1-fach-IPP (für 100 ml):

50 ml 2 x IPP-Stocklösung + 50 ml H₂O

+ 500 µl Aprotinin + 500 µl Antipain + 500 µl Leupeptin

+ 500 µl Pepstain + 200 µl E 64(Proteaseinhibitor)

+ 1 ml PMSF Phenylmethansulfonylfluoride (17,42 mg in 1 ml Isopropanol)

+ 1 ml Natriumorthovanadat (18,3 mg in 1 ml H₂O)

Aufarbeitung der Gewebe-Proben: Das frische Lebergewebe wurde mit einem Stabmixer mechanisch zerkleinert und hiervon 50 mg zur weiteren Verarbeitung auf einer Feinwaage abgewogen, dann 1 ml IPP hinzugegeben und anschliessend gevortext. Das Homogenat wurde in der Zentrifuge bei 13.000U/min für 20 min. zentrifugiert, der Überstand abgenommen und im Verhältnis 1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt. Das Pellet wurde verworfen. Unmittelbar vor der Messung wurde die BCA-Reagenzlösung hergestellt. Es wurde 1 Teil Kupfer-II-Sulfat Lösung (4%) mit 49 Teilen BCA-Lösung gemischt. Die Messung erfolgte in einer 96er-Well-Platte bei 655 nm. Vorab wurde eine Standardreihe angefertigt und die Extinktion wie u.a. gemessen. Die Messung erfolgte im Doppelansatz. Es wurden jeweils 10 µl der verschiedenen Standardlösungen pipettiert und mit 200 µl des BCA-Reagenz vermischt. Die Vermessung der Proben erfolgte hierzu analog: 10 µl der zu vermessenden Probe wurden mit 200 µl BCA-Reagens gemischt. Dieser Ansatz wurde für 20 Min. bei 37°C inkubiert und im Anschluss bei 655 nm vermessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Microplate Reader Programms (Microplate Manager 5.2).

In Tabelle 16 ist die Standardreihe zur Proteinbestimmung exemplarisch dargestellt.

Tab. 16: Standardreihe zur Proteinbestimmung. Die Proteinkonzentration wurde nach Verdünnung des Standards wie angegeben photometrisch bestimmt und war zu den gemessenen Extinktionen proportional.

| BSA- Standard 1mg/ml in μ l | 0,9% NaCl in μ l | Conc. μ g/ μ l |
|------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0 | 100 | 0,0 |
| 10 | 90 | 0,1 |
| 20 | 80 | 0,2 |
| 40 | 60 | 0,4 |
| 60 | 40 | 0,6 |
| 80 | 20 | 0,8 |
| 100 | 0 | 1,0 |

3.4.7. Western Blotting

Das Western-Blotting dient der Identifizierung von spezifischen Proteinen nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe. Die Methode wurde nach Laemmli [86] durchgeführt.

SDS-Gelelektrophorese

Chemikalien zur Herstellung des SDS-Probenpuffers: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% 2-Mercaptoethanol; 10% Glycerol; 0,14 mM Bromphenolblau, Na-Salz.

Herstellung des Laufpuffers (10-fach): Tris 31,0 g; Glyzin 144,0 g; 10% SDS 100 ml; H₂O ad 1 l

In der Folge dann 1-fach: 100 ml 10-fach Laufpuffer mit 900 ml H₂O Als Zusätze werden im Anschluss hinzugefügt: 10% APS (Ammoniumpersulfat) 50 mg APS in 500 μ l H₂O;

Tab. 17: Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels für die Elektrophorese, Angaben in ml

| | Trenngel 12% | Sammelgel 9% |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| Polyacrylamid 30% | 12 | 3 |
| 1,5 M TRIS pH 8,8 | 7,5 | - |
| 0,5 M TRIS pH 6,8 | - | 2,5 |
| H ₂ O | 10,04 | 4,35 |

10 min. im Vakuum entgasen, danach Zugabe von in Tab. 18 genannten Reagenzien.

Tab. 18: Konzentrations- und Mengenangaben zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel.

| | | |
|---------|--------|--------|
| 10% SDS | 300 µl | 100 µl |
| TEMED | 15 µl | 5 µl |
| 10% APS | 150 µl | 50 µl |

Gelherstellung: Die Platten wurden mit 70%-igem Alkohol gesäubert und bei Raumluft getrocknet. Die Gelplatten- und Elektrophoreseapparaturen wurden zusammengebaut. Das 1%ige Agarosegel (Agarose mit 2%-igem TAE-Puffer) wurde in der Mikrowelle verflüssigt (ca. 2 min. bei 560 W), zum Verschluss der Unterseite der Apparatur ca. 2 mm hoch zwischen die Glasplatten gefüllt und zur Aushärtung erkalten lassen. Dann wurde das Trenngel eingefüllt und mit Ethanol luftblasenfrei überschichtet, um eine glatte Oberfläche herzustellen. Der Ethanol wurde nach der Polymerisation des Trenngels abgossen und dieses bis zum Rand mit Sammelgel überschichtet, in das ein Kamm mit 10 oder 15 Taschen eingesetzt wurde. Nach vollständiger Polymerisation wurde der „Kamm“ vorsichtig aus dem auspolymerisierten Sammelgel gezogen und die Apparatur mit 1-fach Laufpuffer (s.o) vollständig befüllt

Vorbereitung der Proben: Die Proteinbestimmung wurde wie o.g. durchgeführt. In jede Tasche wurden 50 µg Protein aufgetragen. Hierbei wurden die Proben aus den Zellkulturversuchen und den Tierversuchen verwendet. Jede der Proben wurde mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und gemischt. Proben und Marker (Rainbow-Marker, Amersham Biosciences) wurden für 5 min im Thermomixer bei 95°C bis zur Denaturierung erhitzt, gemischt und kurz bei 4°C und 10000 U/min. an zentrifugiert. Zur Auftrennung der Proteine- wurden die Proben vollständig in die Taschen gegeben, das Stromversorgungsgerät an die Elektrophoreseapparatur angeschlossen und die Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt (Stromfluß von der Anode zur Kathode). Bis zum Erreichen der Sammelgel/Trenngelgrenze des Bromphenolblaus wurde eine Stromstärke von 19 mA angelegt, danach

35 mA. Der Lauf wurde fortgesetzt, bis das Bromphenolblau ca. 1 cm vor dem Ende der Glasplatten angelangt war. Anhand des mitlaufenden Markers, welcher Proteine mit bekannter Größe enthielt, konnte die Größe der zu analysierenden Proteine in der Probe ermittelt werden.

Die Apparatur wurde nach Beendigung des Laufes auseinandergebaut, von dem vorliegenden Gel das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel in 1xTransferpuffer 2 x 10 min bei kontinuierlichem Schwenken auf dem Rüttler gewaschen.

Western Blot:

Transferpuffer: 50 mM Tris; 95 mM Glycin; 0,005% SDS

Blotto-Puffer 10-fach 200 mM Tris; 1,5 M NaCl; 1% Tween 20

1-fach 100 ml 10-fach Blotto + 900 ml H₂O

Blotto-Gebrauchslösung: 5% (5g Magermilchpulver in 100 ml 1-fach Blotto); 1% (100 ml 5% Blotto-Gebrauchslösung in 400 ml 1-fach Blotto).

Vorbereiten der PVDF-Membran: Die PVDF-Membran wurde auf die gewünschte Größe zugeschnitten, kurz in Methanol geschwenkt und somit aktiviert, hiernach in Aqua dest. gespült und anschließend für mindestens 2 min in Transferpuffer liegen gelassen. Das 3MM-Papier wurde auf Gelgröße zugeschnitten (pro Gel 2x) und ebenfalls in Transferpuffer gelegt.

Protein-Transfer, Blotten: Das sogenannte „Sandwich“ wurde zusammengebaut. Dazu wurde das Schwämmchen zunächst in 1x Transferpuffer angefeuchtet und auf die Transferkassette gelegt. Das in Transferpuffer angefeuchtete 3MM Papier wurde darübergelegt, die PVDF-Membran hierauf gelegt, dann luftblasenfrei das Elektrophorese-Gel. Darauf kam dann erneut 3MM Papier und Schwämmchen. Die Kassette wurde in die Transferkammer eingesetzt, die Stromversorgung so angelegt, dass der Stromfluß von der Anode zur Kathode verlief und damit der Blot vom Gel auf die Membran erfolgte. Die Apparatur wurde mit Transferpuffer bis zur vorgegebenen Markierung aufgefüllt. Der Kammerdeckel wurde korrekt aufgelegt und die Gel-Apparatur bei 250 mA über Nacht bei 4° C über 12 h betrieben. Um den vollständigen Proteintransfer zu dokumentieren, wurde die Membran für ca. 1-2 min in Ponceau S-Rot gefärbt, mit 10%-iger Essigsäure entfärbt und zur Dokumentation eine Kopie der Membran angefertigt. Sodann wurde die Membran in Aqua dest. gespült.

Antikörper-Detektion: Die Membran wurde für 1 h in 5% Blotto-Gebrauchslösung inkubiert, hierbei erfolgte ein kontinuierliches Schwenken auf einem „Rüttler“. Der primäre Antikörper (Cyclin D1, Cyclin-Dependent-Kinase 2 (CDK-2), Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA), Vinculin (alle von BD Biosciences, San Jose, CA; Verdünnung jeweils 1:1000), Anti-poly-adenosine-diphosphate-ribose polymerase-cleavage site specific antigen (PARP-CSSA) (von InVitrogen Corp., Carlsbad, CA) wurde jeweils entsprechend der Herstellerangaben verwendet und in 8ml 5%-igem Blotto verdünnt. Die

Membran wurde 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert und anschließend 3x5 min in 1% Blotto gewaschen. Der mit „horse-radish-peroxidase“ gekoppelte sekundäre AK (Ziege-Anti-Maus-Antikörper) wurde in 10 ml 1%-igem Blotto entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Konzentration verdünnt (1:2000) und die Membran darin maximal 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Abschließend wurde die Membran 3x 10 min in 1x Blotto unter Schwenken gespült.

Die Farbentwicklung: Die Membran wurde max. 2 min in ECL (Enhanced Chemical Luminescence) - Reagenz (3,5 ml Detektionsreagenz 1 + 3,5 ml Detektionsreagenz 2) geschwenkt, luftblasenfrei in Klarsichtfolie verpackt und sofort lichtgeschützt in eine Filmkassette verbracht. In einer Dunkelkammer wurde je Membran eine Filmfolie (High performance chemiluminescence film) für ca. 2 min belichtet, und anschließend in Entwicklerlösung belassen, bis die Banden in gewünschter Intensität sichtbar waren. Danach wurde der Film kurz in Aqua dest. gespült und zum „Abstoppen“ in die Fixierlösung gegeben. Abschließend wurde der Film nochmals gründlich mit Wasser gespült und im Anschluss an der Raumluft getrocknet. Die Banden des Markers waren auf der PVDF-Membran sichtbar und konnten anhand der Größenbestimmung der auf dem Film sichtbaren Bande eindeutig zugeordnet werden.

3.4.8. Histochemie (HE-Färbung)

Die Histochemie dient der Feinstrukturdarstellung von fixierten Zellen und Geweben. Hier wurden die Lebern von unbehandelten und mit Propranolol behandelten Tieren mikroskopisch mittels HE-Färbung untersucht. Dazu erfolgte die Fixierung des Gewebes über 4 Tage in 4% Formaldehyd in PBS und anschließende Einbettung in Paraffin. Aus den fixierten Lebern wurden histologische Schnittpräparate mit einer Dicke von 7µm mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt und auf Objektträger gebracht. Zur anschließenden Färbung der Schnittpräparate war die Entparaffinierung des Gewebes in absteigender Alkoholreihe notwendig. Diese wurde wie folgt durchgeführt:

| | | | | | | | | |
|------------|------|---------|---------|------|---------|---------|------|-------|
| Xylol 1 | 100% | 10 min; | Xylol 2 | 100% | 10 min; | Ethanol | 100% | 5 min |
| Ethanol | 96% | 5 min ; | Ethanol | 70% | 5 min ; | Ethanol | 50% | 5 min |
| Aqua dest. | | 15 sec | | | | | | |

Im Anschluss wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Es erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun für 6 – 8 Minuten, im Anschluss hieran das Spülen der Objektträger in Aqua dest. gefolgt vom „Bläuen“ in Leitungswasser für 10 Minuten. Danach wurde für 10 Minuten in Eosin (0,1% in Aqua dest.) gefärbt. Zum Auswaschen der Färbung wurden die Präparate für 5 Min. mit Leitungswasser gespült. Die Dehydrierung erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe jeweils für 2 min bis zum 100%-igen Ethanol. Im Anschluss erfolgte die Reinigung mit Xylol für 3 – 5 min und das Einbetten mit Permount (Fisher Science) sowie die Lichtmikroskopie. Diese erfolgt in 100-facher Vergrößerung.

3.4.9. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wird zur Darstellung von Antigenen in Zellen und Geweben verwendet. Dies ist über eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion möglich. Um einen Überblick über die Mitoserate in den regenerierenden Lebern zu bekommen, wurde der Nachweis des Mitosemarkers „Ki-67“ gewählt. Das Lebergewebe wurde in 4% Formaldehyd in PBS fixiert und Schnitte mit 5-7µm Dicke angefertigt (Details siehe 3.4.8.)

Um endogene Peroxidasen zu hemmen, wurden die Schnitte mit H₂O₂ vorbehandelt, im Anschluss nacheinander mit Avidin-Block, Biotin-Block, Protein-Block-Lösung und zum Schluss mit Kaninchen-Anti-Ki-67-Antikörper (1:50) für 1 h inkubiert. Ein biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:200) wurde danach für 30 min hinzugefügt. Zum Abschluss wurden nacheinander die Reagenzien ABC-Vektor und AEC-Substrat zur Visualisierung der erfolgten Antikörperbindung nach Herstellerangaben hinzugefügt. Nach Gegenfärbung mit wässriger Hämalaun-Lösung wurden die Schnitte auf Objektträgern eingedeckelt. Fünf verschiedene Ausschnitte von je 3 Schnitten (mit Propranolol behandelte vs. unbehandelte) wurden im Lichtmikroskop mit 200-facher Vergrößerung fotografiert. Gefärbte und ungefärbte Zellkerne wurden gezählt und der prozentuale Anteil an gefärbten Kernen ermittelt. Die Mitoserate wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Mitoserate (\%)} = \frac{\text{gefärbte Zellkerne} \times 100}{\text{Gesamtzellkerne}}$$

3.4.10. Aussaat der Hepatozyten

Die Hepatozytensuspension wurde auf eine Konzentration von 1x10⁷ Zellen/ml Aussaatmedium eingestellt, indem das Pellet (1cm³ Pellet aus Hepatozyten entspricht 7 x 10⁷ Zellen) nach dem letzten Zentrifugationsschritt mit dem 6-fachen Volumen des Aussaatmediums aufgenommen wurde. Diese Suspension wurde erneut mit MEM (Zugabe des 3,3-fachen Volumens und damit Einstellung auf 3x10⁶ Zellen/ Kulturplatte) für die Aussaat auf die Kulturplatten verdünnt. Die Vitalitätsbestimmung erfolgt analog wie bereits vorab beschrieben. Diese wurde bei der Zelleinssat berücksichtigt (Bsp.: Bei einer angenommenen Vitalität von 50% erfolgte die Einsaat von 6 x 10⁶ Zellen/ Kulturplatte). Das Volumen wurde in der Folge auf 10 ml / Kulturplatte mit MEM aufgefüllt.

Das MEM wurde mit der Ausgangssuspension auf 37°C vorgewärmt. Auf die kollagenierten Kulturschalen (10 cm Durchmesser, Kulturfläche: 60,1 cm²) wurden 10 ml Aussaatsuspension gegeben. Die Zellen wurden in der Kulturschale gleichmäßig durch Schwenken verteilt und in den Brutschrank gestellt (5%CO₂, 37°C). Nach etwa 2 Stunden hatten sich die lebenden Zellen auf der Kollagen-Beschichtung abgesetzt. Nach dieser Zeit wurde ein Medienwechsel durchgeführt, wobei die nicht adhären Zellen entfernt wurden. Dabei wurde das Aussaatmedium durch Kulturmedium (HGM) ersetzt. Ein Medienwechsel wurde nach 48 h bei einer gesamten Kulturdauer von 72 h durchgeführt.

3.4.11. Trypsinisierung von kultivierten Hepatozyten

Um die in Kultur wachsenden Zellen für die Transplantation vorzubereiten, mussten diese von der Kulturschale nach u.g. Methode abgelöst werden.

Tabelle 19 zeigt die Materialien und Lösungen zur Trypsinisierung der Hepatozyten aus der Zellkultur.

Tab. 19: Materialien und Lösungen zur Trypsinisierung

| <i>Material</i> | <i>Verweis</i> | <i>Anmerkung</i> |
|------------------------------------|----------------------|------------------|
| HHMM (bzw. HGM) | Siehe Kapitel 3.4.4. | |
| Collagenbeschichtete Kulturschalen | Siehe Kapitel 3.4.4. | |
| Trypsin | | 0,5 fach |
| Kollagenase | Siehe Kapitel 3.4.4. | CLS II (Maus) |
| Megafuge 1.0 R | Heraeus Instruments | |

Trypsin/Kollagenase-Lösung

Die Menge der einzusetzenden Trypsin/Kollagenase-Lösung richtete sich nach der Größe der Kulturplatten. Zu 100 ml Trypsinlösung wurden 6825 U (CLS II) Kollagenase zugegeben und steril filtriert.

Die Menge der Kollagenase richtete sich nach der Enzymaktivität. Diese war chargenabhängig.

Tabelle 20 zeigt das Verhältnis Trypsin-/Kollagenase-Gemisch zur Größe der Zellkulturplatte.

Tab. 20: Verhältnis der Menge an Trypsin/Kollagenase pro Platte

| <i>Kulturgefäße (Durchmesser)</i> | <i>benötigte Menge an Trypsin/Kollagenase- Gemisch</i> |
|---------------------------------------|--|
| 6 cm Kulturschale | 2 ml |
| 10 cm Kulturschale | 4 ml |

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS bei Raumtemperatur gespült. Nun erfolgte die Zugabe der Trypsin/Kollagenaselösung wie oben angegeben und die Zellkulturplatte wurde anschließend bei 37°C für 6 min inkubiert. Die Reaktion wurde bei einer 10 cm² Platte mit 3,2 ml PBS-Lösung und 0,8ml FKS (37°C) abgestoppt. Danach wurden die Zellen mit einer serologischen Pipette vorsichtig resuspendiert und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde bei 600 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und 37°C warmes MEM dazugegeben. Diese Prozedur wurde wiederholt und der Überstand wiederum entfernt. Die Zellen wurden in MEM aufgenommen und unter dem Lichtmikroskop gezählt (siehe Kapitel 3.4.4.). Im Anschluss erfolgte der Vitalitätsnachweis mittels Trypanblau (siehe Kapitel 3.4.5.). Die Zellen wurden bis zur Transplantation in MEM aufbewahrt.

3.4.12. Markierung der Hepatozyten durch Cell-Trace

Um die transplantierten Spenderhepatozyten von den Wirtshepatozyten im Gewebeschnitt unterscheiden zu können, erfolgte die Färbung mittels “Cell-Trace”. Diese wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Nach der Trypsinisierung der Hepatozyten erfolgte die Zugabe je 10 cm-Durchmesser-Platte von 1ml MEM mit 25 µl Cell-Trace zur Hepatozytensuspension. Dies wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die erneute Zentrifugation der Suspension und 3-malige Waschung mit PBS. Danach erfolgte die Aufbewahrung bei 37°C bis zur Transplantation.

3.4.13. Virale Transfektion

Um die transplantierten Zellen im Lebergewebe von den Wirtshepatozyten auch langfristig (> 2 Wochen) unterscheiden zu können, wurde eine lentivirale Transduktion mit einem GFP-exprimierenden Vektor vorgenommen. Aufgrund der Expression des GFP konnten die transplantierten Zellen im Gewebe fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Die Transduktion der Leberzellen in Kultur erfolgte nach der Methode von Sgodda, M. et al [87]. Der lentivirale Expressionsvektor FUGW besitzt das Gen EGFP unter Kontrolle des Ubiquitin-C-Promotors und wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun (Kerckhoff Institut, Bad Nauheim) zur Verfügung gestellt.

Die Leberzellen für die Kultur wurden aus der Leber einer C57BL/6-Maus gewonnen und nach dem oben beschriebenen Verfahren isoliert. Nach Aussaat der Zellen auf die mit Kollagen beschichteten Platten in MEM erfolgte nach 2 Stunden der Medienwechsel von MEM zu HGM. Unmittelbar im Anschluss wurden ca. 40 Viruspartikel/Zelle unter Zugabe von Polybrene 3µg/ml hinzugefügt. Nach weiteren 48 h erfolgte die Ablösung der Zellen von der Platte mittels eines Gemisches aus Trypsin/Kollagenase (0.5 x- konzentriertes Trypsin/EDTA-Gemisch und 0.53 mg/ml Kollagenase). Diese Lösung wurde für 6 Minuten bei 37°C auf den Platten belassen. Nach Zufügen von 2x 4 ml PBS und 4 ml FKS wurden die Zellen resuspendiert und bei 600 U/min zentrifugiert. Danach wurde mit MEM gewaschen und die Vitalität mit der Trypanblau-Färbung (siehe Kapitel 3.4.5) bestimmt. Danach wurden die Zellen im erwärmten PBS bis zur Transplantation gelagert.

3.4.14. Transplantation der Leberzellen

Um für die transplantierten Zellen einen Proliferationsreiz zu schaffen, wurden die Mäuse einer 2/3 Hepatektomie unterzogen. Nach Verschluss der OP-Wunde wurde subcostal in der mittleren Axillarlinie auf der linken Seite der Maus mit einem ca. 1 cm langen Schnitt die Bauchhöhle eröffnet. Im Anschluss konnte die Milz mit einem Wattestäbchen vorsichtig mobilisiert werden. Nachdem in der Mitte der Milz eine lockere Ligatur mit einem Prolene 2.0 Faden gelegt wurde, wurden 3×10^5 Leberzellen mittels einer 1 ml-Spritze und einer 26 G (0,45x13 mm) Kanüle (Beckton Dickenson, Heidelberg) langsam in die Milz injiziert. Nach Beendigung der Injektion wurde die angeschlungene Ligatur festgezogen, die Spritze entfernt und erst die Bauchdecke, dann die Haut mittels Naht verschlossen. Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen unter einer Infrarotlampe gewärmt.

3.4.15. Leberentnahme

Die Leberentnahme erfolgte zu den definierten Versuchszeitpunkten von 2 h, 12h, 24h, 48h, 72h und 2 Wochen nach der 2/3-Hepatektomie und ebenfalls zu o.g. Zeitpunkten nach der Zelltransplantation. Die Operation und die Isofluran-Narkose wurden, wie bereits im Abschnitt „Hepatektomie“ (Kapitel 3.4.1.) beschrieben, durchgeführt. Nach Freilegung der Leber wurde das verbliebene Lebergewebe freipräpariert. Anschließend wurde aus der Vena cava inferior eine Blutprobe zur weiteren Diagnostik entnommen. Es folgte dann die vollständige Unterbindung der Blutzufuhr in das Organ durch Ligatur der Arteria hepatica und die Ligatur der Vena portae. Nun wurde die Leber vom umgebenden Gewebe befreit und nach Durchtrennung der Blutgefäße aus dem Situs entfernt. Es erfolgte die sofortige Kühlung des Gewebes auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung.

3.4.16. Nachweis der transplantierten Leberzellen

Die erfolgreiche Integration der transplantierten Zellen im Empfängergewebe wurde anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung mikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Empfängertiere 2 h, 12 h, 24 h und 48 Stunden nach Transplantation getötet, die Lebern entnommen und histologische Schnitte nach u.g. Methode angefertigt. Der Nachweis der transplantierten Zellen in der Empfängerleber erfolgte durch Vorbereitung des Gewebes wie im Folgenden beschrieben: Nach Kühlung der Leber auf Eis wurde sie in flüssigem Stickstoff (- 176 °C) schockgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 7µm für die Fluoreszenzmikroskopie mit dem Gefrierschnittkryotom angefertigt. Zur Fluoreszenz-Markierung der Zellkerne wurde je 1 ml destiliertem Wasser mit Zusatz von 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Konzentration von 2,3mg/ml) auf die Schnitte gegeben und für 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden im Fluoreszenzmikroskop mit 100-facher, beim Celltrace-Nachweis zusätzlich in 400-facher Vergrößerung photographiert (Rot- und Blaulichtfilter).

3.4.17. Triacylglycerol-Nachweis

Um die unterschiedliche Konzentration von Triglyceriden in den behandelten- und unbehandelten Lebern nachzuweisen, wurde der Triacylglycerol-Nachweis nach dem Protokoll von Carr et. al durchgeführt [88]. Es wurden 300 mg Lebergewebe in 10 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (im Verhältnis 2:1) in Lösung gebracht. Die anschließende Phasentrennung erfolgte unter Zugabe von 0,05 % Schwefelsäure. Die obere Phase wurde verworfen und die untere Phase weiter verwendet. Nach Zugabe von 1 ml Triton X-100 wurde gemischt und das Gemisch im Vakuum-Konzentrator bei 40°C eingedampft. Nach Spülung der Röhrchen mit 1 ml Chloroform wurde das Lipidgemisch in deionisiertem Wasser aufgenommen und für 30 Minuten in einem 40°C heißen Wasserbad unter langsamen Schwenken erhitzt. Die Triacylglycerol-Konzentration wurde mit einem LX-20-Analyser der Firma Beckmann-Coulter (USA) bestimmt. Dazu wurde gleichzeitig ein Standard mit bekannter Triglyceridkonzentration vermessen.

3.4.18. Wirkung von Propranolol auf kultivierte Hepatozyten unter Zugabe von Fettsäuren

Um die Regeneration von Hepatozyten in Kultur mit und ohne Propranolol-Zugabe zu untersuchen, wurden in einem Ansatz die Zellen von unbehandelten Tieren in HGM kultiviert. In einem zweiten Ansatz wurden Zellen unbehandelter Tiere in HGM plus 50 µmol/l Propranolol in HGM in Kultur gebracht. In einem dritten Ansatz wurden Zellen aus mit Propranolol behandelten Tieren (60mg/kgKG über 72 Stunden) isoliert und es erfolgte zusätzlich die Zugabe von 50 µmol/l Propranolol zum HGM in der anschließenden Kultur. Um eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit freien Fettsäuren zur Simulation einer „peripheren Lipolyse“ zu gewährleisten, wurden in allen drei Gruppen freie Fettsäuren ins Medium (Clinoleic 20%, Baxter Deutschland) hinzugegeben (auf 10 ml Medium 1 ml Clinoleic).

Das Medium wurde bei allen Versuchsgruppen 24-stündlich gewechselt. Nach 24 h, 48h und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und eine Proteinisolierung (siehe Kapitel 3.4.6.) zur semi-quantitativen Bestimmung von Vinculin, PCNA, CDK2, Cyclin D1, CSSA-PARP mittels Western-Blotting durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.7).

3.4.19. Statistische Analyse

Die hier aufgeführten Versuche wurden mindestens im Dreifach-Ansatz durchgeführt. Die statistischen Analysen wurden mit der frei verfügbaren Software „Statistica for Windows 5.0“ (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) ausgewertet. Nach Möglichkeit wurde der Students-t-Test zur Prüfung der Signifikanz der Daten angewendet. In den graphischen Darstellungen stellen die Varianzbalken den Standardfehler dar.

4. Ergebnisse

4.1. Effekt des Propranolols auf das relative Lebergewicht nach partieller Hepatektomie

In den durchgeführten Versuchen konnten dosisabhängige Effekte des Propranolols auf die Zunahme des relativen Lebergewichts nach 2/3-Hepatektomie nachgewiesen werden.

In der Versuchsgruppe der männlichen Tiere mit 60 mg/kgKG Propranolol war das Lebergewicht zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Teilhepatektomie signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (P-Wert < 0.01 bei 24h und 48 h nach Teilhepatektomie). In der Gruppe der männlichen Tiere mit 15 mg/kg KG Propranolol zeigte sich kein Effekt auf das Lebergewicht zu den oben genannten Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch 72 Stunden nach der Teilhepatektomie konnten keine signifikanten Unterschiede des relativen Lebergewichtes zwischen behandelten- (sowohl 15 mg/kgKG als auch 60 mg/kgKG) und unbehandelten Tieren ausgemacht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

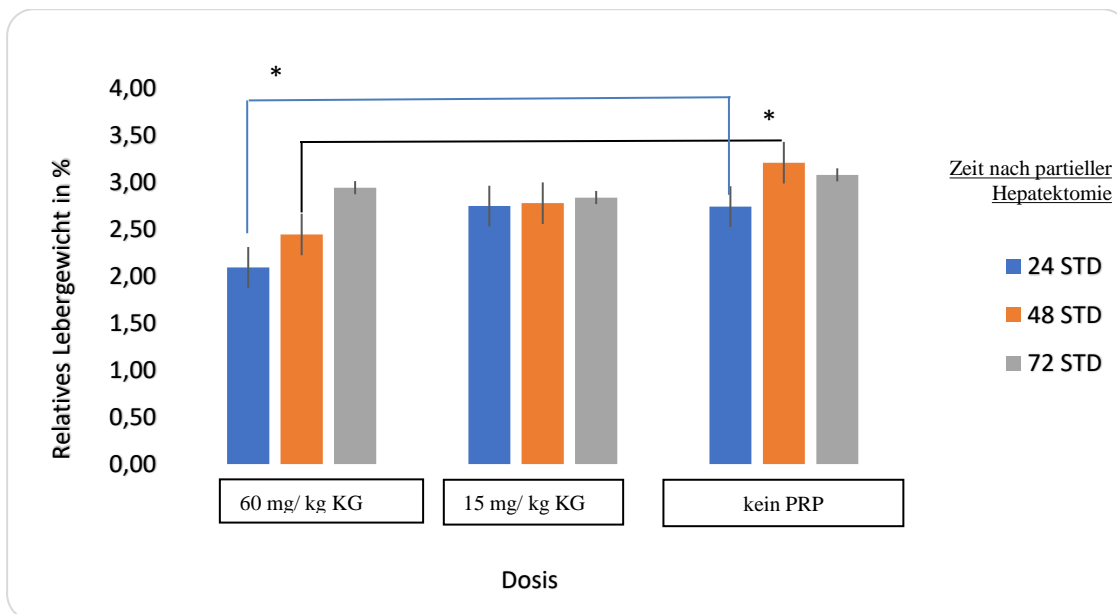


Abb.4: Relatives Lebergewicht nach Behandlung mit Propranolol

Männliche Tiere wurden mit Propranolol mit den angegebenen Dosen behandelt und die Lebern nach 24, 48 und 72 h zur Bestimmung des Lebergewichts entnommen. Dieses wurde zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt und so das relative Lebergewicht errechnet. Die Säulen stellen Mittelwerte±Standardfehler aus jeweils 9-11 Tieren dar. * Signifikant ($p \leq 0,01$) unterschiedlich vs. kein PRP. (PRP = Propranolol) [121].

Um einen geschlechtsunabhängigen Effekt des dl-Propranolols auf das relative Lebergewicht nach partieller Hepatektomie zeigen zu können, wurden die Versuche wie bereits in den Kapiteln 3.4.1 bis

3.4.7. beschrieben, ebenso an weiblichen Tieren durchgeführt. Bei den weiblichen Tieren waren die Effekte des Propranolols in Bezug auf das relative Lebergewicht bedeutend geringer ausgeprägt. Nur 24 Stunden nach der Teilhepatektomie ließ sich ein Unterschied im relativen Lebergewicht ausmachen, der jedoch nicht signifikant war ($P > 0.05$). Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach 2/3 Hepatektomie konnte kein Unterschied des relativen Lebergewichtes in den Gruppen mit der Propranolol-Behandlung (15 mg/kgKG und 60 mg/kgKG) und der Kontrollgruppe ausgemacht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

Weiterhin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren 72 Stunden nach Hepatektomie (grafisch nicht dargestellt), so dass diese Versuche nicht weiterverfolgt wurden.

Da sich bei weiblichen Tieren keine Unterschiede mit und ohne Propranololbehandlung feststellen ließen, wurden alle weiteren Versuche ausschließlich mit männlichen Mäusen fortgeführt.

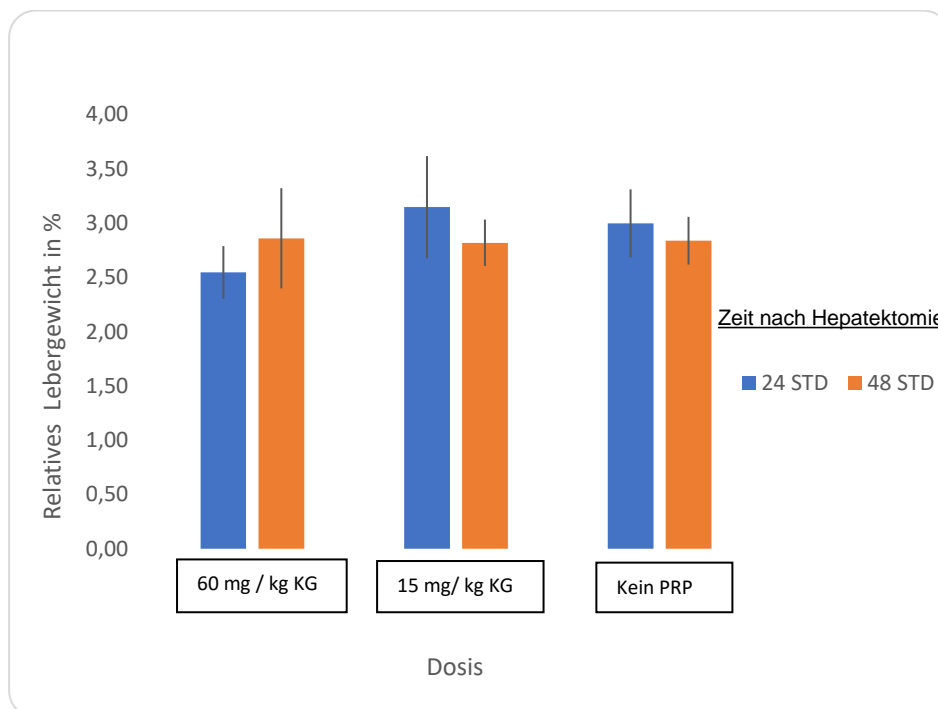


Abb. 5: Relatives Lebergewicht nach Behandlung mit Propranolol

Weibliche Tiere wurden mit Propranolol mit den angegebenen Dosen behandelt und die Lebern nach 24 und 48 h zur Bestimmung des Lebergewichts entnommen. Dieses wurde zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt und so das relative Lebergewicht errechnet. Die Säulen stellen Mittelwerte \pm Standardfehler aus jeweils 5-6 Tieren dar. (PRP = Propranolol) [121].

4.2. Einfluß des dl-Propranolols auf die Zellzyklusproteine in dem in vivo Versuch

Die Expression von Zellzyklusproteinen zeigt die Aktivität der zellulären Proliferation an. Um Hinweise auf den Einfluss von Propranolol auf die hepatozytäre Proliferation zu erhalten, wurde die Expression der mit der G1-Phase des Zellzyklus assoziierten Proteine Cyclin D1, CDK 2 und PCNA analysiert. Hierzu wurden die Tiere mit Propranolol-Behandlung (initial 15 mg/kg KG und 60 mg/kg KG) mit den Kontrollgruppen (kein Propranolol, keine Hepatektomie; Propranololgabe, keine Hepatektomie) verglichen. Vinculin diente hierbei als G1-Phase unabhängiger Marker. Die Analyse der Zellzyklusproteine wurde im Doppelansatz mit jeweils unterschiedlichen Tieren durchgeführt.

Die Behandlung der Tiere mit 15 mg/kg KG Propranolol ergab keinerlei Unterschiede zu den Kontrolltieren ohne Hepatektomie oder ohne Propranololbehandlung (nicht gezeigt).

Auch die Behandlung mit 60 mg/kg KG Propranolol zeigte zur Kontrollgruppe ohne Propranolol keinen Unterschied zum Zeitpunkt vor der Hepatektomie. Erwartungsgemäß waren die mit der G1-Phase assoziierten Zellzyklusproteine kaum nachweisbar

Nach der 2/3 Hepatektomie zeigte sich zu den angeführten Zeitpunkten folgendes Bild: In der Gruppe der mit 60 mg/kg KG Propranolol behandelten Tiere waren die mit der G1-Phase assoziierten Proteine Cyclin D1, CDK 2 und PCNA bereits nach 24 h erhöht. Dies ging mit einem nachweisbaren Anstieg des CSSA-PARP als Marker für die Apoptose-Induktion einher. In den unbehandelten Tieren konnten zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Hepatektomie keine der analysierten G1-Phase-Proteine nachgewiesen werden. Auch der Apoptose-Marker CSSA-PARP war nicht darstellbar.

Nach 48 Stunden war in Lebern der Tiere mit 60 mg/kg KG Propranolol-Behandlung die Proteine Cyclin D1 und CDK-2 nachweisbar. PCNA hingegen war jedoch kaum nachweisbar. CSSA-PARP war 48 Stunden nach der Hepatektomie nicht mehr nachweisbar. In den Lebern der Kontrollgruppe zeigte sich nach 48 Stunden der stärkste Anstieg der G1-Phase-Proteine Cyclin D1, CDK 2 und PCNA. Der o.g. Apoptose-Marker war weiterhin nicht nachweisbar. In Lebern mit Propranolol behandelte Tiere ließ sich nach 72 Stunden eine in Bezug zur Kontrollgruppe deutlich schwächere Bande der Proteine PCNA und Cyclin D1 nachweisen. CDK-2 war in ähnlicher Weise ausgeprägt nachweisbar wie in der Kontrollgruppe. In den Lebern der Kontrollgruppe ließ sich 72 Stunden nach partieller Hepatektomie eine deutliche Bande als Nachweis für die hochregulierte Proteinbiosynthese von CDK-2, Cyclin D1 und PCNA zeigen (Abbildung 7).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass die Propranololbehandlung zur verfrühten und transienten Induktion der mit der G1-Phase des Zellzyklus assoziierten Proteine führte. Die Abnahme schien mit einer erhöhten Apoptose zu korrelieren. In unbehandelten Tieren wurden die Proteine später induziert und blieben über den Beobachtungszeitraum erhöht. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit der Annahme, dass Propranolol die Progression durch den Zellzyklus hemmte.

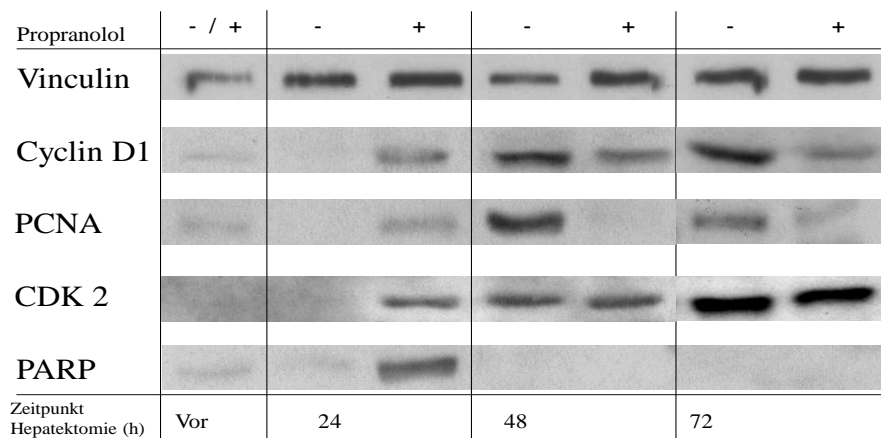


Abb. 7: Nachweis von Zellzyklusproteinen (Cyclin D1, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), CDK2 (cyclin-Dependent-Kinase 2)) und des Apoptosemarkers CSSA-PARP (cleavage-site-specific-antibody- Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) im Lebergewebe mittels Western-Blotting. Vinculin diente als Housekeeping-Gen. Die Tiere wurden für die angegebenen Zeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) nach Hepatektomie mit Propranolol behandelt (+) oder ohne Propranolol (-) gelassen. Als Ausgangswert wurden Tiere mit und ohne Propranolol für 72 Stunden vor der Hepatektomie behandelt (gleiches Ergebnis, daher nur einmal dargestellt). Im Western-Blot wurden 50 µg an cytosolischem Protein eingesetzt. Repräsentative Darstellung von Ergebnissen aus 2 unabhängigen Versuchen [120].

4.3. Die Zellzyklusproteine in der Zellkultur

Um zu zeigen, ob Propranolol direkt oder indirekt auf die Regulation des Zellzyklus wirkte, wurde die Expression der Zellzyklusproteine in Hepatozyten in der Zellkultur untersucht. Die Bedingungen der Zellkultur sind im Kapitel 3.4.18. aufgeführt. Die Versuche wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Expression der mit der G1-Phase assoziierten Proteine des Zellzyklus, Cyclin-D1, CDK-2 und PCNA im Western Blot dargestellt. Als Marker für die Induktion der Apoptose diente CSSA-PARP, Vinculin diente zur Ladungskontrolle.

Die Analyse der genannten Zellzyklusproteine ergab folgendes Bild:

Nach 24 Stunden war in der Kontrollgruppe (keine Vorbehandlung der Tiere mit Propranolol, anschließende Zellkultur ohne Propranolol (-/-)) im Vergleich zu den beiden Ansätzen mit Propranolol (keine Vorbehandlung der Tiere mit Propranolol und anschließende Zellkultur mit Propranolol (-/+)) und

Vorbehandlung der Tiere mit Propranolol, anschließende Zellkultur mit Propranolol (+/+) kein Unterschied in der Menge der o.g. Zellzyklusproteine darstellbar.

In der Gruppe ohne Propranolol-Vorbehandlung und Zellkultur mit Propranolol (-/+) zeigte sich nach 24 Stunden ein Anstieg des CSSA-PARP im Vergleich zur Kontrollgruppe (-/-). In der Gruppe mit Propranolol-Vorbehandlung und Zellkultur mit Propranolol (+/+) konnte nach 24 Stunden ebenfalls ein Anstieg des Apoptosemarkers (CSSA-PARP) dokumentiert werden.

48 Stunden nach Hepatektomie zeigte sich in allen drei Versuchsansätzen ein nahezu identischer Anstieg der Zellzyklusproteine. Der Apoptosemarker war in der Kontrollgruppe (-/-), der Gruppe (-/+) und der kontinuierlich mit Propranolol-behandelten Gruppe(+/+) nach 48 Stunden etwas schwächer, aber insgesamt weiterhin deutlich nachweisbar.

Nach 72 Stunden waren die Zellzyklusproteine in allen drei Gruppen deutlich nachweisbar. Der Marker für die Apoptose war ebenfalls auf gleichem Niveau in den drei Gruppen nachweisbar (Abbildung 8).

Man kann zusammenfassen, dass die Zugabe von Propranolol zum Zellkulturmedium keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Zellzyklusproteine Cyclin-D1, CDK-2 und PCNA hatte. Die Vorbehandlung der Tiere jedoch schien deren Expression geringfügig negativ zu beeinflussen. Daraus kann man schließen, dass andere Mechanismen als die direkte Regulation des Zellzyklus für die Verminderung der Proliferation der Hepatozyten durch Propranolol verantwortlich sein mussten.

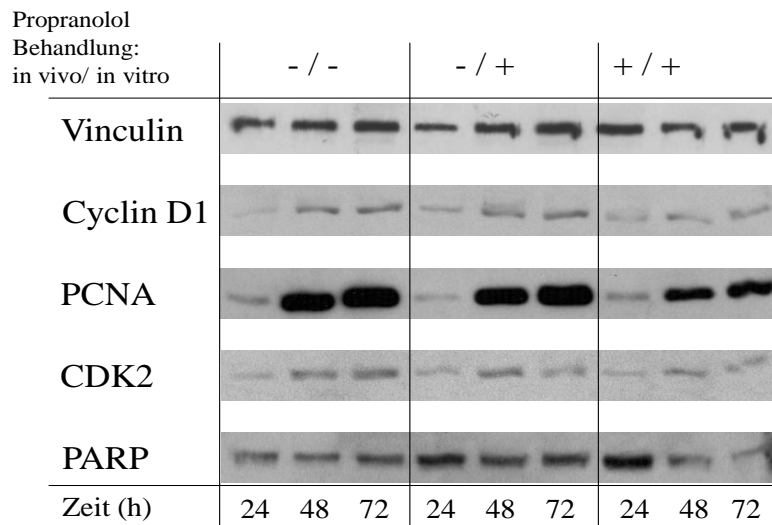


Abb. 8: Nachweis der Proteine Vinculin (Housekeeping), Cyclin D1, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), CDK2 (cyclin-dependent-kinase 2), und als Apoptosemarker CSSA-PARP (cleavage-site-specific-antibody-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) in kultivierten Hepatozyten mittels Western-Blotting. Hepatozyten wurden aus Lebern von Tieren ohne vorherige Propranolol-Behandlung isoliert und in der Zellkultur weiter ohne Propranolol (-/-) kultiviert. In einem weiteren Ansatz wurden Hepatozyten aus Tieren ohne vorherige Propranolol-Behandlung isoliert und in der Zellkultur mit Zugabe von 50 µmol/l Propranolol (-/+) kultiviert. In einem dritten Ansatz wurden Hepatozyten aus Tieren, die zuvor für 72 Stunden mit Propranolol behandelt wurden, isoliert und in der Zellkultur mit Zugabe von o.g. Propranolol-Konzentration (+/+) kultiviert. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) kultiviert und Western Blots mit 50 µg cytosolischem Protein durchgeführt. Darstellung von repräsentativen Ergebnissen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen [120].

4.4. Einfluß des dl-Propranolol auf die Mitoserate

Die Verminderung der Zunahme des Leber- zum Körpergewichtsverhältnisses nach Propranololgabe könnte auf die Verminderung der Proliferationsrate in den Lebern behandelter Tiere hinweisen. Dieser Nachweis sollte durch die Bestimmung der Mitoserate mittels des Ki-67-Nachweises erfolgen, der als spezifischer Test für den Nachweis von mitotisch aktiven Zellen dient. Hierbei erfolgte die Ki-67-Färbung der Proben wie in Kapitel 3.4.9. beschrieben.

In Abbildung 6 sind die zeitabhängige Zunahme der prozentualen Anzahl mitotisch aktiver Zellen und die zeitabhängige Zunahme der Ki 67-positiven Zellkerne jeweils in Lebern von mit Propranolol-behandelten Tieren und ohne Propranolol-Behandlung dargestellt.

Ki-67-Nachweis

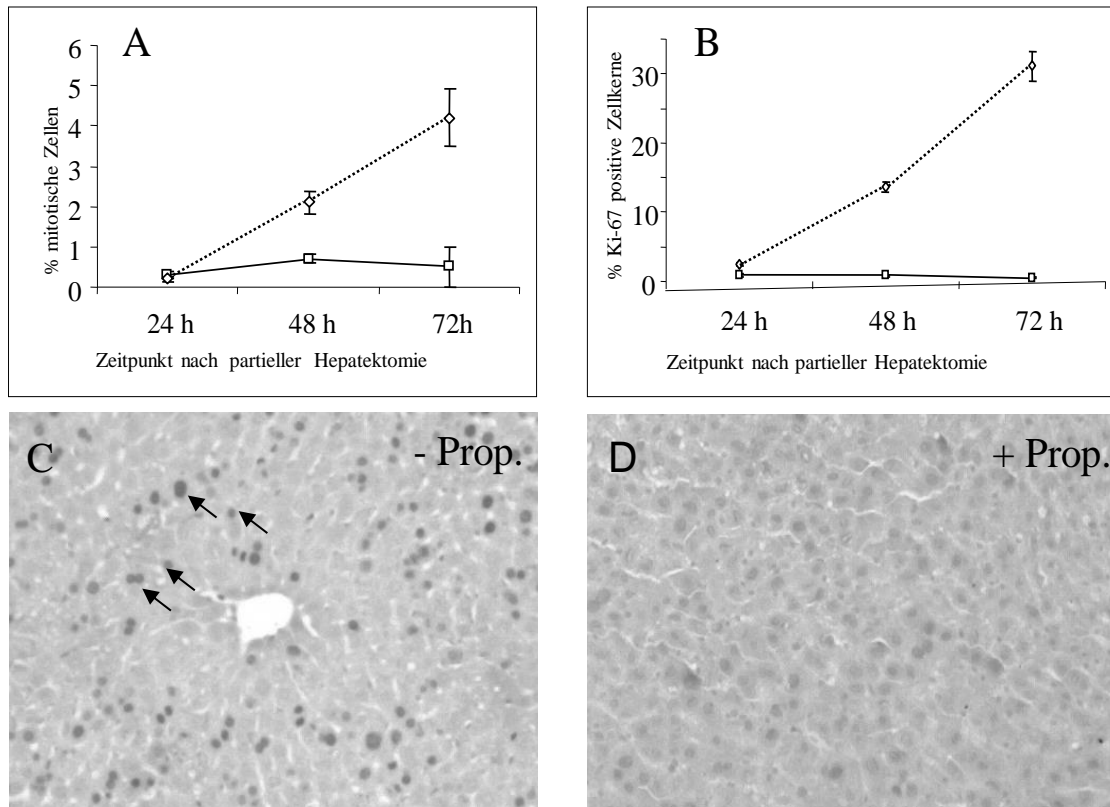


Abb.6: Zeitabhängige Zunahme der prozentualen Anzahl mitotisch aktiver Zellen (A) und zeitabhängige Zunahme der Ki 67-positiven Zellkerne (B) jeweils in Lebern von mit Propranolol-behandelten Tieren (durchgezogene Linien) und ohne Propranolol-Behandlung (unterbrochene Linien). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

C und D zeigen repräsentative Bilder der immunhistologischen Darstellung Ki 67-positiver Zellkerne (Pfeile) in Lebern 72 h nach partieller Hepatektomie aus Tieren ohne (C) und mit (D) Propranololbehandlung. Für die quantitative Bestimmung wie in (A) und (B) gezeigt, wurden jeweils 4 Bildausschnitte pro Zeitpunkt und Tier (n=3) ausgewertet [120].

Die Anzahl der mitotisch aktiven Zellen stieg in den Lebern zeitabhängig nach der partiellen Hepatektomie linear an. 24 Stunden nach partieller Hepatektomie betrug der Anteil mitotischer Zellen in den beiden Gruppen ca. 0,5%. Während in der Gruppe der unbehandelten Tiere der Anteil an mitotisch aktiven Zellen nach 48 und 72 h von ca. 2% auf ca. 4% anstieg, blieb in der Gruppe der mit

Propranolol behandelten Tiere der Anteil mitotisch aktiver Hepatozyten zu beiden Zeitpunkten unter 1% (Abbildung 6A). Dieser Verlauf spiegelte sich auch im immunhistochemischen Nachweis von Ki 67 wieder. Ausgehend von ca. 2,5% Ki 67-positiver Zellkerne zum Zeitpunkt 24 h nach partieller Hepatektomie stieg die Anzahl nach 48 und 72 h in unbehandelten Tieren auf 12 bzw. 30%, während in mit Propranolol behandelten Tieren kein Anstieg festzustellen war.

Die Daten zeigten also, dass Propranolol die Proliferation der Hepatozyten in der regenerierenden Leber nach partieller Hepatektomie hemmte. Somit war die Verminderung der Zunahme des Leber- zum Körpergewichtsverhältnisses zumindest teilweise durch Propranolol, wie in Abbildung 4 gezeigt, auf die Hemmung der Proliferation zurückzuführen.

4.5. Fettakkumulation im Lebergewebe nach partieller Hepatektomie mit- bzw. ohne Propranolol-Behandlung

Die transiente Einlagerung von Triglyceriden in Hepatozyten ist ein wesentliches histologisches Merkmal der Leber nach partieller Hepatektomie und kann zur Beurteilung der funktionellen Kapazität der regenerierenden Leber herangezogen werden. Daher wurde die hepatische Verfettung von mit Propranolol behandelten und nicht behandelten Tieren in Schnittpräparaten nach HE-Färbung mikroskopisch untersucht.

In der HE-Färbung zeigten sich folgende Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren: Unmittelbar vor partieller Hepatektomie waren keinerlei Unterschiede in der mikroskopischen Morphologie der Leberschnitte in Bezug auf die Fettvakuolierung zu erkennen. 24 Stunden nach partieller Hepatektomie zeigte sich in den Lebern der unbehandelten Tiere eine deutliche Fettvakuolierung, die sich als großvakuolär beschreiben ließ. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in der mit Propranolol behandelten Gruppe das Bild einer mikrovakuolären Verfettung der Leber. Im Vergleich der beiden Gruppen miteinander war der mikroskopische Eindruck, daß die Fettakkumulation in den Leberschnitten der unbehandelten Tiere deutlicher ausgeprägt war.

48 Stunden nach der partiellen Hepatektomie nahm die Fettvakuolierung in den beiden Gruppen wieder ab (Abbildung 9).

72 Stunden nach partieller Hepatektomie war der Grad der Fettakkumulation in beiden Gruppen weiter deutlich rückläufig. Auch war kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen erkennbar (Abbildung 10).

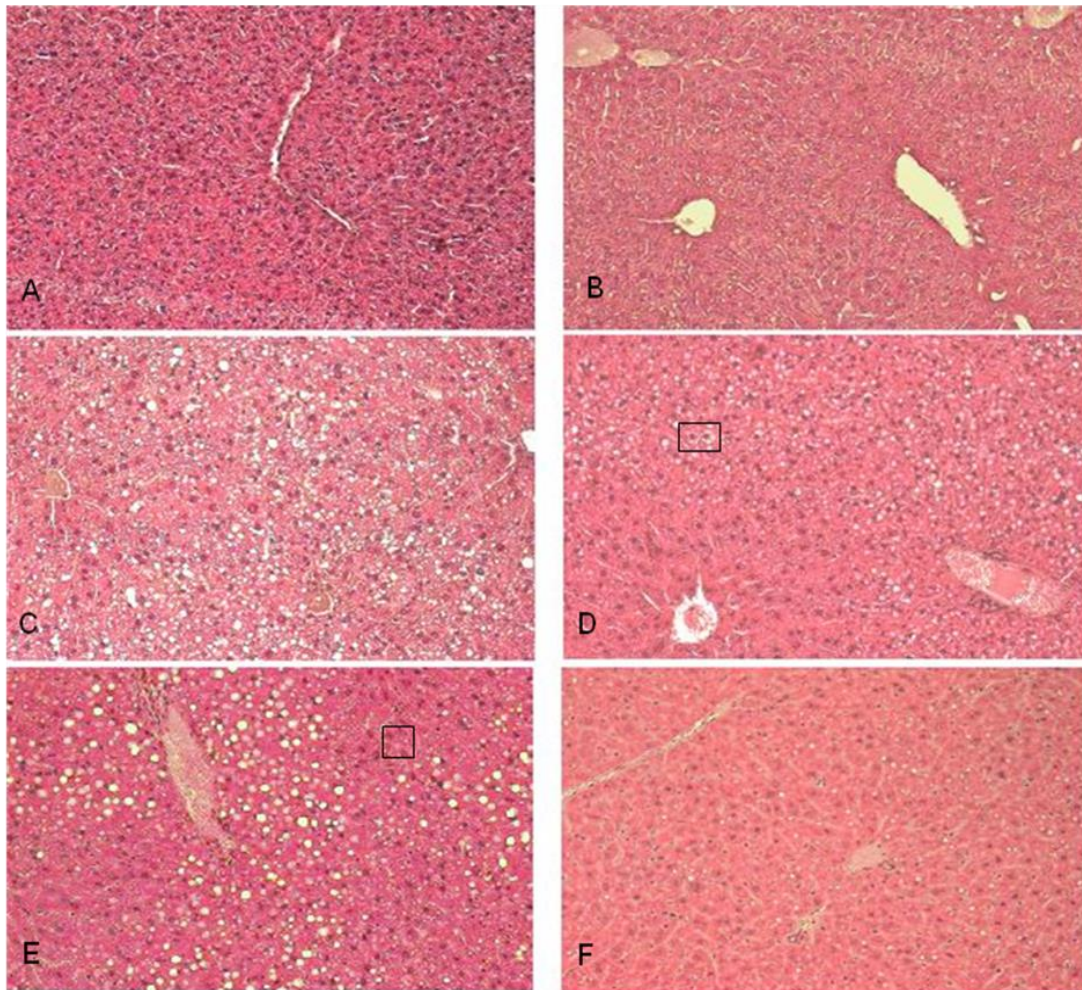


Abb. 9: Zeitabhängige Veränderungen der hepatischen Fettvakuolierung nach partieller Hepatektomie. HE-Färbung von Mausleberschnitten von unbehandelten Tieren (A, C, E) und von mit Propranolol (60 mg/kgKG) behandelten Tieren (B, D, F). Die Schnitte wurden aus Lebern vor (A, B), bzw. 24 h (C, D) und 48 h (E, F) nach partieller Hepatektomie angefertigt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Die markierten Areale in D und E zeigen apoptotische Zellschrumpfungen (D) und mitotische Zellkerne (E). Abbildungen jeweils in 200-facher Vergrößerung [120].

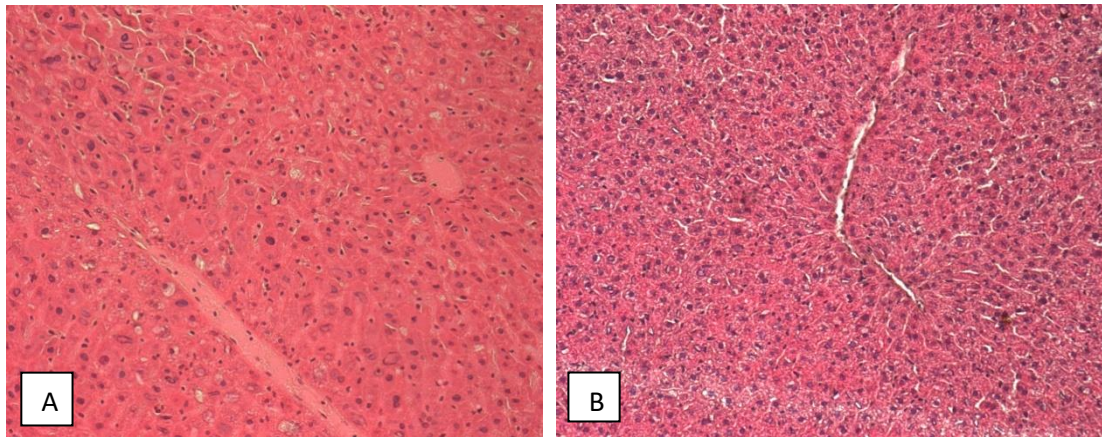


Abb. 10: HE-Färbung von Mausleberschnitten aus unbehandelten Tieren (A) und von mit Propranolol (60 mg/kgKG) behandelten Tieren (B). Die Schnitte wurden aus Lebern 72 h nach partieller Hepatektomie angefertigt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Abbildung in 200-facher Vergrößerung.

Zur Bestätigung der histologischen Befunde wurden die Triglyceride biochemisch im Lebergewebe von Tieren 24 h nach partieller Hepatektomie bestimmt. Die Messung der Triglycerid-Konzentration erfolgte wie in Kapitel 3.4.17 beschrieben. Hierbei zeigte sich in der unbehandelten Gruppe von Mäusen vor partieller Hepatektomie eine Triglycerid-Konzentration von $5,2 \pm 0,8$ nmol/g Lebergewicht, gegenüber den mit Propranolol behandelten Tieren (s. 3.4.3) vor partieller Hepatektomie von $4,9 \pm 1,3$ nmol/g Lebergewicht.

24 Stunden nach partieller Hepatektomie wurde in der unbehandelten Gruppe eine Triglycerid-Konzentration von $9,9 \pm 1,3$ nmol/g Lebergewicht gegenüber der behandelten Gruppe mit $6,2 \pm 1,4$ nmol/g Lebergewicht bestimmt. Dieser Unterschied war signifikant (vier Tiere je Gruppe, $p < 0,05$) (Tabelle 21).

Somit wurden die histologischen Daten bestätigt, die zeigten, dass Propranololbehandlung nach partieller Hepatektomie den Triglyceridgehalt in der Leber verringerte.

Tab. 21: Hepatischer Triglyceridgehalt in nmol/g Lebergewicht (*/* = $p < 0,05$; *signifikant niedriger als ohne Propranolol / * signifikant höher als vor Hepatektomie)

| | vor Hepatektomie | 24 h nach Hepatektomie |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Gruppe ohne Propranolol | $5,2 \pm 0,8$ nmol/g | $9,9 \pm 1,3$ nmol/g* |
| Gruppe mit Propranolol | $4,9 \pm 1,3$ nmol/g | $6,2 \pm 1,4$ nmol/g* |

4.5. Hepatozytentransplantation nach Prä-konditionierung der Empfängerleber durch Propranolol

Die durchgeführten biochemischen und histologischen Analysen zeigten bisher, dass die Behandlung der Tiere mit Propranolol zu einer Verzögerung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie führte. Diese stand offenbar in Verbindung mit einer verminderten Lipidakkumulation nach Hepatektomie. Es wurde vermutet, dass diese Situation einen Wachstumsvorteil für transplantierte Hepatozyten darstellen könnte und zur Verbesserung der Repopularisierung der Wirtsleber durch die Zelltransplantate führen könnte.

Zur Detektion der transplantierten Zellen im Wirtsleberparenchym wurden die Zellen zuvor mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Celltrace) markiert. 24 und 48 Stunden nach der Zelltransplantation wurden den Versuchstieren die Lebern entnommen und Kryoschnitte für die Fluoreszenzmikroskopie angefertigt.

Die transplantierten Zellen konnten nach 24 h in den portalvenösen Gefäßen anhand der Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Propranolol behandelten Tieren gegenüber den nicht behandelten Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 11).

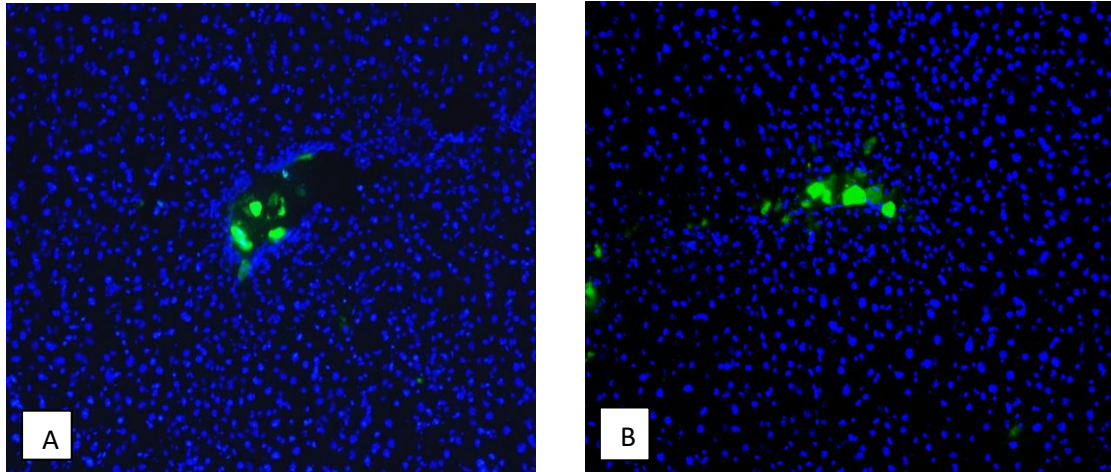


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Detektion von transplantierten Hepatozyten in der Wirtsleber 24 h nach Hepatozytentransplantation. Die Zelltransplantate sind anhand der Fluoreszenzmarkierung (grün) deutlich in portalvenösen Gefäßbereichen sichtbar. (blau (DAPI): Zellkerne der Hepatozyten); 200-fache Vergrößerung. A: unbehandelte Kontrollgruppe, B: Vorbehandlung der Empfängertiere mit 60 mg/kg KG dl-Propranolol

Auch nach 48 Stunden waren die transplantierten Zellen noch mikroskopisch detektierbar. Die transplantierten Zellen waren auch teilweise außerhalb der portalvenösen Gefäße im Leberparenchym nachweisbar. Die absolute Zahl der nachweisbaren Zellen war offensichtlich geringer als nach 24 Stunden. Wenn auch die Integration der Zellen in das Lebergewebe zu diesem Zeitpunkt in den beiden Gruppen mikroskopisch nicht eindeutig nachweisbar war, so zeigte sich doch, dass die transplantierten Zellen ins Parenchym übergetreten waren, was die Voraussetzung für die Integration darstellt. Die Zahl der nachweisbaren transplantierten Hepatozyten unterschied sich in den beiden Gruppen nicht (Abbildung 12).

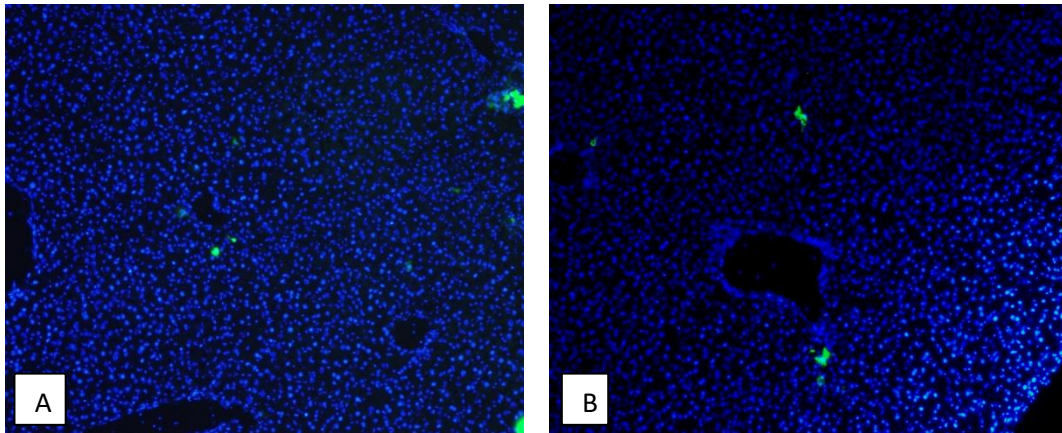


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopische Detektion von transplantierten Hepatozyten in der Wirtsleber 48 h nach Hepatozytentransplantation. Die Zelltransplantate sind anhand der Fluoreszenzmarkierung (grün) deutlich sichtbar. (blau (DAPI): Zellkerne der Hepatozyten), grün: transplantierte Hepatozyten); 100-fache Vergrößerung). A: unbehandelte Kontrollgruppe, B: Vorbehandlung der Empfängertiere mit 60 mg/kg KG dl-Propranolol

4.6. Zellintegration

Aufgrund der limitierten Stabilität der Markierung mit Celltrace waren 72 h nach Hepatozytentransplantation mikroskopisch kaum noch markierte Zellen auszumachen. Da die Zellen nach der Transplantation jedoch zunächst aus den portavenösen Gefäßen ins Parenchym übertreten müssen (48 h), bevor sie sich in das Parenchym integrieren und dort teilen können, ist die Markierung mit Celltrace ungeeignet, um Integration und Repopularisierung über längere Zeiträume beobachten zu können.

Ausserhalb dieser Arbeit erfolgte anhand der o.g. Zellversuche die lentivirale Markierung der Hepatozyten mit einem GFP-exprimierenden Vektor zum langfristigen Nachweis der transplantierten Hepatozyten. Diese Methode wurde im Rahmen einer Publikation außerhalb dieser Arbeit verwendet und soll nur kurz der Vollständigkeit halber erläutert werden.

Durch die Transfektion der Hepatozyten mit Lenti-Viren, die GFP unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors stabil exprimieren, ließ sich die Markierung der Zellen bedeutend länger erhalten. Diese konnten mittels Fluoreszenz-Analyse ausgewertet werden (FACS-Analyse).

Abbildung 13 zeigt die Expression von GFP lentiviral infizierten Hepatozyten in der Zellkultur.

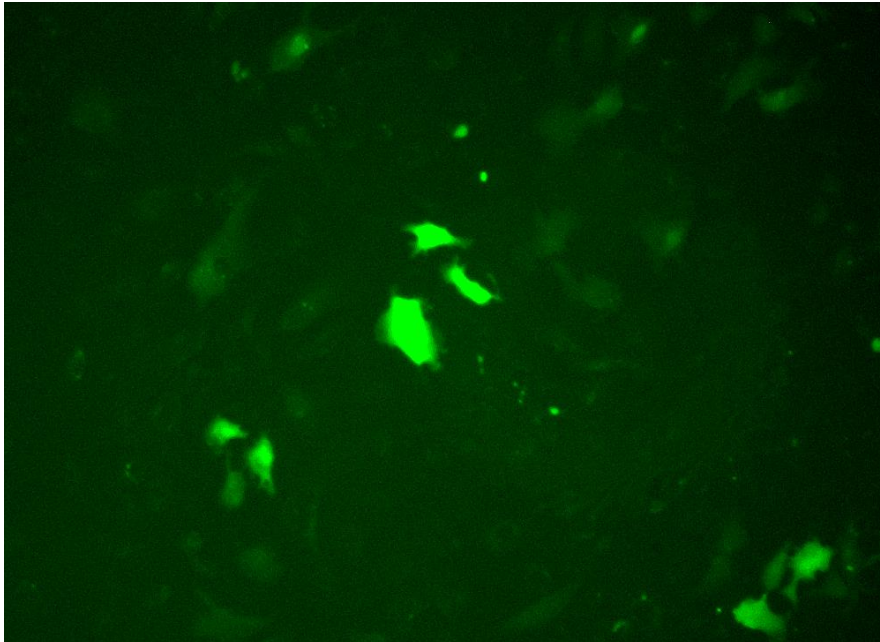


Abb. 13: Lentiviral infizierte und GFP-exprimierende (grün) murine Hepatozyten in der Zellkultur.

(Vergrößerung 1:400)

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass dl-Propranolol die Leberregeneration nach Teilhepatektomie verzögerte. Mechanistisch schien dafür die Hemmung der Triglycerideinlagerung verantwortlich zu sein. Triglyceride dienen wahrscheinlich als Energiereservoir für die Leberregeneration. Dies wurde bestätigt, da durch Propranolol die Proliferationsrate der Hepatozyten nach Leberteileresektion zumindest vorübergehend gehemmt wurde. Es wurde angenommen, dass diese Hemmung für transplantierte Hepatozyten einen Wachstumsvorteil darstellte, der zur besseren Integration und Proliferation der transplantierten Hepatozyten im Wirtsparenchym führen könnte. Diese Annahme bestätigte sich im Tierversuch nicht.

5.1. Mechanismen der Katecholaminwirkung auf die Leberregeneration

Der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Leberregeneration wurde schon mehrfach beschrieben. Hierbei scheinen die unterschiedlichen Rezeptoren eine divergierende Wirkung zu haben. Den Alpha-Rezeptoren wird unter physiologischen Bedingungen (ohne partielle Hepatektomie) ein stimulierender Effekt auf die Leberregeneration zugeschrieben [57, 58]. Ebenso scheint die Leberdurchblutung unter physiologischen Bedingungen eher durch Alpha-adrenerge Beeinflussung gesteuert zu werden [59]. In männlichen und weiblichen aber ovariektomierten Mäusen führte die Blockade der Alpha-Rezeptoren zu einer Inhibition der Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie [57, 58, 60]. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in einem zeitabhängigen Einfluß der unterschiedlichen Rezeptoren auf die Regeneration der Leber. Insbesondere scheint sich die Rezeptordichte (Alpha- und Beta-Rezeptoren) im Lebergewebe nach einer akuten Schädigung zeitabhängig zu verändern [61]. Im Laufe der Organregeneration scheint initial der Alpha-Rezeptor vorzuherrschen, später ein relatives Beta-Rezeptor-Übergewicht vorzuliegen [62, 63].

Bei Untersuchungen zur Rolle der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin bei der Leberregeneration zeigte sich eine prolongierte Adrenalin-Erhöhung nach partieller Hepatektomie für ca. 24 Stunden. Dies ist der Zeitraum, in dem vermehrt Mitosen auftreten [65], so dass die hohen Adrenalin Spiegel somit einen Einfluß auf die Zellproliferation haben könnten.

Die Endstrecke des autonomen Nervensystems in der Leber variiert bei verschiedenen Spezies erheblich. Bei Ratten und Hamstern reicht dieses bis in die interlobuläre Region (Gefäße, Gallengänge), wohingegen es sich bei Menschen, Hunden und Meerschweinchen auch intraparenchymal (sympathisches Nervensystem) findet [66]. Durch die weitreichend intraparenchymal liegenden sympathischen Nervenfasern ist eine direkte sympathische Regulation der Funktion von Hepatozyten und sinusoidalen Zellen beim Menschen naheliegend, so dass eine angenommene pharmakologische Wirkung von dl-Propranolol auf die Hepatozytenfunktion beim Menschen wahrscheinlich sein könnte. Eine Beeinflussung der sympathisch innervierten Lebersinusoide durch adrenerge Stimulation ist bereits vorbeschrieben. In der Gruppe um Ueno konnte gezeigt werden, daß die Sternzellen der Lebersinusoide

die Kontraktilität der Gefäße vermittelten, die durch Adrenalin erhöht wurde. Obwohl die Rolle der Beta-Rezeptoren bei der Leberregeneration bisher nicht so ausführlich untersucht worden ist [61, 64], kann man vermuten, dass eine Blockade der Adrenozeptoren durch dl-Propranolol möglicherweise eine relative Weitstellung der Lebersinusoiden bedingt und eine Transmigration von transplantierten Zellen über die sinusoidalen Endothelzellen ins Parenchym begünstigt [117].

Die Zunahme des Lebergewichtes nach partieller Hepatektomie gilt als Surrogat für die Regeneration des Organs [97]. In der vorliegenden Arbeit verzögerte Propranolol den Anstieg des Lebergewichts bis 48 Stunden nach Hepatektomie. Dies weist somit auf einen regenerationshemmenden Effekt von Propranolol hin. 72 Stunden nach partieller Hepatektomie glich sich das Lebergewicht in den beiden Gruppen bereits wieder an. Die Verzögerung war zumindest teilweise auf die Hemmung der Proliferation zurückzuführen. Dieses Ergebnis könnte allerdings nicht ausschließlich sein, da auch andere Mechanismen zu einer Gewichtszunahme der Leber nach Hepatektomie führen können. So wurde bereits von der Gruppe um Nagy eine Zellhypertrophie im periportalen Bereich als ein möglicher Kompensationsmechanismus des Zellverlustes nach Hepatektomie beschrieben [98]. Die Zellschwellung unterliegt komplexen Regelmechanismen, die sich abhängig von der Homöostase der Organfunktion zeigen. Ein erhöhter adrenerger Stimulus durch z.B. Phenylephrin (direktes Sympathomimetikum) in Kombination mit Insulin führt zu einer Zellschwellung. Das Volumen von Hepatozyten wird aber durch vielfältige Mechanismen reguliert. So führt u.a. oxidativer Streß mit einer Veränderung der zellulären Laktat-Aufnahme zu einer Aktivierung von Ionenkanälen. In der Folge kommt es zu einer Zellschwellung. Auch die gesteigerte Synthese von Glykogen bewirkt eine relevante Volumenänderung von Hepatozyten [99].

Auch weitere Autoren sehen die Zellteilung als nicht essentiell für die Zunahme des Lebergewichtes an [100, 101], da trotz Behandlung mit Mitoseinhibitoren eine Zunahme des Lebergewichtes ohne relevante Proliferation der Hepatozyten erfolgte. Mechanismen wie oben beschrieben könnten dies erklären. Im Einklang damit erscheint es möglich, daß die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Hinweise auf einen niedrigen Proliferationsindex, eine erhöhte Apoptoserate (PARP-CSSA,) die damit verbundene Zellschrumpfung, ebenso wie die verminderte hepatische Fettakkumulation in der Gruppe der mit Propranolol behandelten Tiere einen maßgeblichen Einfluß auf das relative Lebergewicht hatten.

5.2. Metabolische Wirkungen der Katecholamine im Zusammenhang mit der Leberregeneration

Die akute Schädigung der Leber geht mit einer Steigerung der hepatischen Fettakkumulation einher [31]. Es wird vermutet, dass die Triglyceride in den Parenchymzellen der Leber zur Energiegewinnung während der Leberregeneration benötigt werden [32]. Dies wird allerdings sehr kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Newberry konnte keinen Zusammenhang zwischen hepatischer Regeneration und Fettakkumulation dokumentieren. Die Versuche waren mit genetisch veränderten Mäusen (Knock-out-Mäuse für intrahepatische und extrahepatische Verwertungsstörungen von Fettsäuren) durchgeführt worden. Unabhängig von der „Knock-out“-Spezifität zeigte sich ein hepatozytärer Anstieg der Triglyceridkonzentration in der Proliferationsphase. Die Rate der Zellteilung unterschied sich jedoch nicht wesentlich [35].

Die Gruppe um Barrow konnte in einer Studie mit Kindern nach schweren Verbrennungen zeigen, daß sich die hepatische Steatose mit Gabe eines nicht-selektiven Beta-Blockers hemmen ließ. Die Ursache der hepatischen Fettakkumulation war das Verbrennungstrauma und die hiermit verbundene periphere Lipolyse mit erhöhtem Fettsäureangebot. Die Behandlung mit Propranolol führte bei Kindern mit schwersten Verbrennungen zu einer geringeren Hepatomegalie bei konsekutiver Verfettung als bei den Kindern ohne die Gabe von Propranolol [104]. Propranolol kann somit die streßinduzierte Lipolyse und die ansonsten folgende Hepatomegalie bei Kindern mit traumatisch bedingter Hepatosteatoe verhindern. Somit kann die verminderte Lipolyse in den Adipozyten bei Hemmung des adrenergen Systems Ursache für die Verminderung der hepatischen Triglyceridakkumulation sein. So steht der Leber weniger Energie in Form von Lipiden zur Verfügung. Dies könnte die geringere Proliferationsrate der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie erklären [32].

Weitere Belege für die Relevanz der hepatischen Fettspeicherung im Zusammenhang mit der Leberregeneration liefert die Arbeit der Gruppe um Gebhardt [105]. Die Zonierung der Leber in bestimmte metabolische Funktionseinheiten ist gekennzeichnet durch die unterschiedliche Nutzung von Energiequellen. Die zentroazinären Zellen nutzen hauptsächlich Lipide als Energiequelle [37, 106]. Diese Zellgruppe ist nach Ansicht von Gebhardt auch diejenige, welche initial an der Regeneration des Organs mitwirkt [105]. Somit kann man also aus den in vivo Daten der vorliegenden Arbeit vermuten, dass aufgrund des vermindert zur Verfügung stehenden Energieträgers in Form von Fetten die Organregeneration nach Hepatektomie und Blockade des adrenergen Systems nur sehr verzögert stattfinden kann. Diese Annahme steht im Einklang mit physiologischen Veränderungen des hepatischen Blutflusses nach partieller Hepatektomie, die durch eine Erhöhung des portalen Blutflusses [33] und bei verminderter arterieller Durchblutung zu einem Anfluten von Mediatoren führen. Durch Cytokine wie IL-6, TNF-Alpha, TGF-beta und auch durch die direkte Beeinflussung des adrenergen Systems folgt eine erhöhte Lipolyse aus den Adipozyten [34] mit konsekutiver hepatischer Triglycerideinlagerung.

Daraus ergibt sich, dass die Hemmung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie durch die nicht selektive Blockade des adrenergen Systems indirekter Natur ist. Dies wurde in vitro an isolierten Hepatozyten mit der kontinuierlichen Gabe von freien Fettsäuren belegt. Hierbei zeigte sich nur ein marginaler Unterschied zwischen propranololnaiven und mit Propranolol behandelten Zellen in der Expression von Zellzyklusproteinen, die als Marker für die Proliferation galten. Lediglich in Hepatozyten, deren Spendertiere zuvor mit Propranolol behandelt worden waren, war eine leicht verminderte Expression der Zellzyklusproteine und gleichzeitig eine leichte Erhöhung des Apoptosemarkers PARP zu verzeichnen. Somit hatte die Hemmung des dl-Propranolols auf die Zellproliferation keinen direkten Einfluss auf die Hepatozyten sondern war eher indirekter Natur. Diese bestand also nach den erhobenen Daten wahrscheinlich in der verminderten peripheren Lipolyse und der damit verminderten Bereitstellung von Triglyceriden als Energiereservoir für die Hepatozytenproliferation nach partieller Hepatektomie.

5.3. Wirkung von Propranolol auf den hepatozytären Zellzyklus bei der Leberregeneration

Nach 2/3-Hepatektomie kommt es zu einem maximalen Proliferationsreiz für die Hepatozyten. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Expression von Proteinen des Zellzyklus gezeigt werden, daß dl-Propranolol inhibitorisch auf den Zellzyklus wirkte. Dies ging mit der Hemmung der mitotischen Aktivität der Hepatozyten einher, wie durch die verminderte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 gezeigt wurde.

Bei Mäusen beträgt die Zeitspanne bis zur nachweisbaren Zellproliferation in etwa 36 Stunden nach partieller Hepatektomie. Die Ursache für die relativ verzögerte DNA-Synthese liegt in der prolongierten G1-Phase bei Mäusen [19]. In den hier durchgeführten Untersuchungen stellten wir bei den mit Propranolol behandelten Tieren eine nach 24 Stunden nachweisbare Erhöhung der Zellzyklusproteine Cyclin-D1, CDK-2 und PCNA fest. Im Gegensatz hierzu stand die Beobachtung der unbehandelten Tiere: Die Zellzyklusproteine waren erwartungsgemäß nach 24 Stunden niedrig und stiegen in ihrer Konzentration nach 48 und 72 Stunden an. In der Gruppe der mit Propranolol behandelten Tiere zeigte sich nach 24 Stunden ebenso ein Anstieg des Apoptosemarkers PARP. Die hohen Spiegel von Cyclin-D1, CDK-2 und PCNA in den mit Propranolol behandelten Tiere 24 Stunden nach partieller Hepatektomie zeigten den Eintritt in die G1-Phase an. Bei gleichzeitig erhöhten PARP-Spiegeln lässt sich vermuten, daß die Mitose die späte G1- bzw. die frühe S-Phase erreicht hatte, aber wahrscheinlich aufgrund der oben genannten metabolischen Komplikationen nicht vollenden konnte [32]. Die Folge ist ein Zellzyklus-Arrest in der späten G1 oder in der frühen S-Phase. Dieser Arrest könnte zur Apoptose führen, wie sich in den dargestellten Versuchen anhand des hohen CSSA-PARP ablesen ließ und zu diesem Zeitpunkt ein Maximum erreicht hatte. Somit trug die Behandlung mit Propranolol sowohl zur Hemmung der mitotischen Aktivität als auch zur Zunahme der Apoptose der Hepatozyten in den mit Propranolol behandelten Mäusen bei, was zum Teil die verminderte Organregeneration erklären könnte.

Die inhibitorische Wirkung von beta-Sympathomimetika auf die Apoptose ist von André et. al. beschrieben worden [107]. Die Experimente waren mit transgenen F28-Mäusen (Überexpression von beta-2-Rezeptoren und erhöhte basale Adenylat-Cyclase-Aktivität) im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen mit normal niedrigen beta-2-Adrenozeptoren durchgeführt worden. Die transgenen Mäuse waren gegenüber der Induktion der Apoptose durch Jo2 - resistent. Die Gabe von Clenbuterol führte bei den „Normalen“ Mäusen zu einer Reduktion der Jo2-induzierten Apoptose und ebenfalls zu einer Reduktion der Letalität. Propranolol konnte diesen protektiven Effekt wieder aufheben. Eine Blockade von beta-2-Rezeptoren in der Leber führte somit zu einer erhöhten Apoptoserate durch Modulation der Fas-regulierten hepatozytären Apoptose.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse wie folgt interpretieren: Durch die Gabe von dl-Propranolol wurde die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie temporär gehemmt. Dies ging mit einem Zellzyklusarrest und verminderter Mitose bei gleichzeitiger Erhöhung der Apoptose der Hepatozyten einher. Wahrscheinlich aufgrund der Hemmung der Lipolyse im Fettgewebe durch dl-Propranolol war eine verminderte hepatische Fettakkumulation zu beobachten, die vermutlich aufgrund fehlender Energiereservoirs für die Leberregeneration zum Zellzyklusarrest führte. Ein direkter Effekt von Propranolol auf Hepatozyten war in vitro nicht nachweisbar.

5.4. Die Hemmung der Leberregeneration durch Propranolol als Methode zur Präkonditionierung für die Hepatozytentransplantation

Die effiziente Repopularisierung einer Wirtsleber durch transplantierte Hepatozyten hängt wesentlich von 2 Faktoren ab; (1) ein mitotischer Reiz für die Leberregeneration und (2) ein Wachstumsvorteil der Spender- gegenüber den Wirtshepatozyten. Nach den hier gezeigten Ergebnissen in der Maus könnte also die Hemmung der Proliferation ortsständiger Hepatozyten durch Propranolol zur Präkonditionierung der Lebern dienen, um syngen transplantierten Hepatozyten einen Wachstumsvorteil zu verschaffen.

Die Verfahren der hepatischen Präkonditionierung wurden bereits in der Einführung ausführlich beschrieben. Sämtliche Verfahren können in Teilen auch kombiniert angewandt werden und dienen der Schädigung der Wirtsleber um transplantierten Hepatozyten einen Wachstumsvorteil gegenüber den ortsständigen Hepatozyten zu verschaffen.

Zur Beurteilung der Verbesserung der Integration transplantierte Hepatozyten in die Lebern von mit Propranolol behandelten Mäusen wurden die Zelltransplantate zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und 1 und 2 Tage nach der Transplantation mikroskopisch detektiert. Es zeigte sich, dass nach Behandlung mit Propranolol keine Zunahme der in das Leberparenchym integrierten Hepatozyten im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte. Somit könnte man vermuten, dass die Prä-Konditionierung der Empfängerleber mit Propranolol keinen Wachstumsvorteil für die Zelltransplantate darstellte. Allerdings muss man berücksichtigen, dass aufgrund der zeitlich begrenzten

Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoff der Beobachtungszeitraum wahrscheinlich nicht ausreichte, um eine effiziente Repopularisierung der Empfängerleber zu erreichen. Weiterhin sind quantitative Analysen, wie z.B. Durchflusscytometrie erforderlich, die allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit waren.

Eine weitere Ursache für die fehlende effizientere Besiedelung nach Propranololgabe könnte in der nicht ausreichenden Anzahl an transplantierten Zellen (ca. 3×10^5) liegen. Geht man von einer Gesamtzellzahl der erwachsenen menschlichen Leber (1,5 kg) von etwa $2,8 \times 10^{11}$ [2] und von einer zu transplantierenden Zellzahl 10-15% der Hepatozyten, um einen relevanten Effekt auf die Wiederherstellung von Stoffwechseldefekten zu erreichen, erscheint die hier verwendete Zellzahl bei einem Lebergewicht der Maus von 1,5 g verhältnismäßig klein. Aufgrund von zu erwartenden Komplikationen wie Gefäßokklusionen und Volumenexpansion in der Empfängerleber konnten jedoch keine größeren Zellzahlen verwendet werden. Hier finden sich derzeit keine Daten in der Literatur zu einer konkreten Zellzahl, welche eine erhöhte Chance zur erfolgreichen Zellintegration in die bestehende Leberstruktur ermöglichen könnte.

5.5. Weitere Mechanismen der Propranololwirkung, die die Integration von Spenderhepatozyten in die Empfängerleber beeinflussen können

In Versuchen anderer Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass etwa 16-20 Stunden nach Zelltransplantation keine Hepatozyten mehr in den Portalgefäßen oder Sinusoiden beobachtet wurden, die initiale Phase der portalvenösen Druckerhöhung war nach kurzer Zeit wieder im Normbereich. Die Zellen, welche nicht die Sinusoide erreichten, wurden phagozytiert [109]. Die Hepatozyten, welche die Lebersinusoide erreicht hatten, konnten sich erfolgreich in das Lebergewebe integrieren. In den eigenen dargelegten Ergebnissen konnten bereits mikroskopisch in das Leberparenchym integrierte transplantierte Hepatozyten detektiert werden. Dies zeigt an, dass das Verfahren zur Hepatozytentransplantation grundsätzlich erfolgreich war.

Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Transplantation von Hepatozyten und die Integration in das Lebergewebe ist die Vasodilatation im Bereich der Lebersinusoide. Es wird angenommen, daß die Sternzellen der Lebersinusoide die Kontraktilität der Gefäße vermitteln, und so unter führender adrenerger Innervation die sinusoidale Mikrozirkulation regeln [110]. Der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf den intrahepatischen Gefäßtonus wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. In der Gruppe um Akiyoshi konnte bei verschiedenen Spezies (Ratte, Meerschwein, Goldhamster, Hund und Mensch) eine differenzierte Darstellung der sympathischen und parasympathischen Beeinflussung der Gefäße in der Leber untersucht werden. [66]. In diesem Zusammenhang zeigte sich, daß bei den untersuchten Nagetieren die sympathische Innervation bis in den periportalen Bereich hineinreicht. Das Parenchym steht nicht direkt unter sympathischen- oder parasympathischen Einflüssen.

Im Zusammenhang mit der Dilatation der Lebersinusoiden wurden bereits unterschiedliche Substanzen getestet [55]. In Voruntersuchungen von Slehria erbrachte die Beta-Rezeptor-Blockade des Sympathikus wie in den hier durchgeführten Versuchen keinen Vorteil der Zellmigration von transplantierten Zellen [56]. Die Präkonditionierung mit Nitroglycerin oder einem reinen Alpha-Blocker (Phentolamin) hingegen führte zu einer Einnistung der transplantierten Zellen in die distalen Lebersinusoiden. Diese Versuche wurden allerdings in Dipeptidyl-Transferase-IV (DPP IV) defizienten F-344 Ratten ohne Hepatektomie durchgeführt, sind also nicht direkt mit den hier durchgeführten Transplantationsexperimenten zu vergleichen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur erfolgreichen Integration der transplantierten Hepatozyten sind die immunologischen Abwehrreaktionen, die im allogenen Transplantationsmodell von Bedeutung sind. Es kann vermutet werden, dass allogene transplantierte Hepatozyten durch frühe Immunreaktionen eliminiert werden. Dies ist u.a. die rasche T-Zell vermittelte Immunantwort der NK-Zellen. Bereits kurze Zeit nach der Zelltransplantation kommt es zu einer Immunreaktion (s.u.). Daneben werden CD4+ und CD 8+ T-Zellen aktiviert und spielen bei der weiteren Immunreaktion eine entscheidende Rolle. Zusätzlich scheinen interzelluläre Proteine eine Abstoßungsreaktion der transplantierten Hepatozyten zu vermitteln [95].

In der Literatur ist der zeitliche Ablauf der Phagozytose und Elimination von allogenen transplantierten Hepatozyten nach Transplantation beschrieben worden [95]. Ohne Immunsuppression wurden die Zellen im Zeitraum bis zu 10 Tage eliminiert. Die initiale Phase von Granulozyten-, NK- und T-Zell vermittelter Abwehrreaktion und hierdurch bedingtem Zelltod der transplantierten Hepatozyten konnte bis zu 70 % der transplantierten Zellzahl ausmachen. Zusätzlich war eine akute Komplementreaktion mit Zell-Lyse für dieses Ausmaß des Zellverlustes mit verantwortlich [109] und somit dem „angeborenen“ Immunsystem zuzuschreiben.

Es gibt Daten, dass durch die Gabe von Propranolol die adrenerg aktivierte Immunreaktion abgeschwächt werden kann. Insbesondere die frühe T-Zell vermittelte Immunantwort durch „natural killer cells“ kann durch die Gabe eines nicht selektiven Beta-Blockers reduziert werden. Die genannten T-Lymphozyten haben auf ihrer Zelloberfläche in der akuten Phase nach einer partiellen Hepatektomie eine hohe Anzahl von beta-Rezeptoren exprimiert. Durch die Blockade mit Propranolol kann die Zytotoxizität deutlich reduziert werden [77].

Da das Propranolol lediglich vor der Hepatektomie und der nachfolgenden Zelltransplantation gegeben wurde, könnte die immunmodulierende Wirkung postoperativ rasch verloren gegangen sein. Trotz der vorbeschriebenen Reduktion der Zytotoxizität durch die Gabe von Propranolol liess sich in durchgeführten Versuchen keine höhere Anzahl von transplantierten Hepatozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. In der vorliegenden Arbeit können diese Mechanismen der adaptiven

Immunantwort somit eine mögliche Ursache für die rasche Elimination der transplantierten Hepatozyten darstellen.

Auch sind geschlechtsspezifische Unterschiede der Propranololwirkung zu beachten. In den Vorversuchen sollte ein möglicher Unterschied in Bezug auf das Geschlecht der Mäuse und deren Behandlung mit Propranolol herausgefiltert werden. Hierbei zeigte sich in der Dosierung von 15 mg/kgKG keine Beeinflussung des Lebergewichtes, in der höheren Dosierung von 60 mg/kgKG zeigte sich nur nach 24 Stunden ein Einfluss auf das relative Lebergewicht. Die in dieser Arbeit analysierten Zellzyklusproteine waren bei Weibchen zu keiner Zeit beeinflusst. Hierbei ist die unterschiedliche Hormonwirksamkeit und -präferenz der weiblichen gegenüber den männlichen Tieren zu beachten [90]. So wurden beispielsweise unterschiedliche metabolische Einflüsse auf die notwendigen Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch die Geschlechtshormone ausgemacht [90]. In einer weiteren Untersuchung wurden die Östrogene als protektive Hormone in Bezug auf den Leberzellschaden gesehen [102]. Vermutet wurde sogar eine deutlich Steigerung der hepatischen Regeneration durch Östrogene [103]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind kongruent zu Befunden der Arbeitsgruppen um Francavilla und Tsukamoto. In diesen Arbeitsgruppen wurde die unterschiedliche Triggerung der Hepatozytenregeneration an weiblichen und männlichen Ratten dokumentiert. In der Gruppe um Francavilla [90] konnte eine verminderte EGF-Antwort im Zusammenhang mit dem Fehlen von Östrogenrezeptoren beobachtet werden (in vitro). Die Arbeitsgruppe um Tsukamoto [57] konnte eine geschlechtsspezifische Differenz zwischen der Alpha- und Betarezeptoren-Hemmung bei der Leberregeneration feststellen. In weiblichen Ratten blieb die Betarezeptorenhemmung ohne Einfluß auf die Regeneration der Leber. Da Propranolol in der vorliegenden Arbeit nur in Männchen wirkte, ist von geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Wirkungsweisen auszugehen.

5.6. Pharmakologische Aspekte zur Wirksamkeit des dl-Propranolol

Die intestinale Resorption, die Proteinbindung und die hepatische, weniger die renale Elimination, stellten wichtige Faktoren zur Dosisfindung des Propranolols in den hier durchgeführten Versuchen dar. Die hepatische Metabolisierung erfolgt durch das Cytochrom P-450-System in der Leber (CYP2D6). Ein weiterer Teil der Elimination erfolgt über das „Ionen-trapping“ und das „microsomal binding“. Diese Eliminationswege unterliegen allerdings einer linearen Dosis-Plasmakonzentrations-Kurve und werden schon durch niedrige Propranololdosen aufgesättigt [114,115]. Bei einem inflammatorischen Reiz (z.B. Hepatektomie) ist sowohl die metabolische Kapazität als auch das „Ionen-trapping“ in Bezug auf die Elimination des Propranolols durch die Leber beeinträchtigt.

Propranolol wird bis zu 95% der applizierten Dosis in einem ausgeprägten hepatischen „first-pass“-Effekt aufgenommen und verstoffwechselt [67]. Folglich ist aufgrund des Verlustes an Hepatozyten nach partieller Hepatektomie die langsamere Elimination des im Kreislauf zirkulierenden Propranolols verlangsamt. In einem anderen Modell wurde die Elimination des Propranolols im Zusammenhang mit

einer systemischen Inflammation beobachtet. Auch hier zeigte sich eine deutlich langsamere Elimination des Propranolols [116]. Aufgrund der hier verwendeten Dosierung und der beschriebenen Kinetik gehen wir von einer verzögerten aber konstanten Elimination des Medikamentes in der Maus nach partieller Hepatektomie aus. Dies wird durch Daten aus der Literatur gestützt [114].

Die hier gewählte, im Vergleich zum Menschen sehr hohe Dosierung von 60mg/kg KG Propranolol ist den unterschiedlichen Metabolisierungsraten bei Nagern und Nichtnagern zuzuschreiben [91, 92]. Die Plasmaclearance ist speziesabhängig und beim Menschen eher gering ausgeprägt. Die beim Menschen bisher gängigen therapeutischen Dosierungen von dl-Propranolol sind mit tgl. max. 320 mg angegeben. Wie in den hier geschilderten Versuchen verwendete auch die Gruppe um Hong ähnlich hohe Dosierungen des Propranolols [89], die nach partieller Hepatektomie zu einer PCNA-Suppression in der regenerierenden Leber führten.

Bei der oralen Aufnahme des Medikamentes kann es zu Differenzen des wirksamen Medikamentes im Stoffwechsel der Tiere kommen. Die intestinale Aufnahme des Propranolols beträgt etwa 90% des oral applizierten Wirkstoffes [67]. Wir gingen von einer konstanten Flüssigkeitsaufnahme durch das Trinken von 3 ml je Maus und Tag aus und somit auch von einer relativ konstanten Wirkstoffkonzentration. Diese Annahme wird durch Daten der Literatur bestätigt [94].

Da sich keine dokumentierten toxischen Nebenwirkungen in den gewählten Versuchen zeigte, und die hier maximal eingesetzte Dosierung von 60mg/kg KG deutlich unterhalb des toxisch-letalen Bereiches für Mäuse lag (LD-50 für die orale Aufnahme von Propranolol bei Nagern um 289mg/kg KG [93]), konnte die Propranolol-Gabe als gut steuerbar und ohne relevante Nebenwirkungen bewertet werden.

Die durchgeführten Versuche zeigten eine dosisabhängige Hemmung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie durch Propranolol. Dieser Effekt war für die enterale Propranolol-Applikation bisher nicht bekannt und hätte prinzipiell zur hepatischen Präkonditionierung für die Hepatozytentransplantation dienen können.

5.7. Klinische Translation

Die in der Einführung beschriebene Problematik mit Zunahme der akut-auf-chronischen Leberschäden mit der Notwendigkeit eines Organersatzes führte bei fehlenden Spenderlebern zur intensiven Suche nach Alternativen wie z.B. die Transplantation isolierter Hepatozyten. Die Möglichkeit der isolierten Leberzelltransplantation wurde erstmalig Ende der 1970er Jahre beschrieben [38]. Durch die Transplantation von gesunden Spenderhepatozyten können fehlende oder eingeschränkte Funktionen der Leber ausgeglichen werden [39, 40]. Der Behandlungserfolg wird bestimmt durch die Qualität der transplantierten Leberzellen und durch die Repopularisierungsrate der Spenderhepatozyten in der Empfängerleber. Um die Aufnahme der spezifischen Leberfunktionen zu gewährleisten, muss eine beträchtliche Anzahl an Hepatozyten transplantiert werden. Dies erfolgte in humanen Studien in

mehreren Sitzungen [41]. Bei akutem Leberversagen wurde die zu transplantierende Zellmasse auf ca. 10-15% der ursprünglichen Lebermasse geschätzt [42]. Diese Menge kann nicht in nur einer Sitzung infundiert werden, da portale Hypertension und die mögliche Okklusion der nachfolgenden portalvenösen Gefäße auftreten können [2, 43].

Bei akutem Leberversagen und notwendigem Organersatz wird die Leberzelltransplantation, wie bereits weiter oben beschrieben, im Rahmen eines „Bridgings“ bis zur orthotopen Lebertransplantation durchgeführt.

Auch die in Tiermodellen verwendeten Methoden zur Prä-konditionierung der Empfängerleber wie unter 5.4. beschrieben sind größtenteils klinisch wegen relevanter Nebenwirkungen nicht umsetzbar. Auch die hier beschriebene Methode zur Prä-konditionierung durch die Gabe von dl-Propranolol bedarf der weiteren Optimierung, um ggf. den Weg in die Klinik nehmen zu können. Insbesondere müsste die Verbesserung der Repopularisierung quantitativ nachgewiesen werden.

Insgesamt kann die Hepatozytentransplantation als eine in wenigen Zentren verfügbare Methode und hier als Therapieoption für spezielle Krankheitsbilder gelten. Die aktuelle Literatur zeigt bis zum aktuellen Zeitpunkt immer wieder kleinere Studien und individuelle humane „Heilversuche“ mit Hepatozytentransplantationen. Diese werden bisher weltweit im Rahmen von kleineren Studien durchgeführt. Häufig wurden diese als ultima ratio vor drohendem Exitus letalis oder aber als Bridging bis zur orthotopen Lebertransplantation durchgeführt. In seltenen Fällen konnte die Hepatozytentransplantation auch eine Heilung von genetisch determinierten Stoffwechselerkrankungen der Leber bringen [39, 45].

In der aktuellen Literatur wird immer wieder über kleinere Studien an Menschen berichtet, welche ohne die überbrückende Maßnahme der Leberzelltransplantation eine nur sehr eingeschränkte Lebenserwartung hatten [118]. Hier können durchaus auch Heilungserfolge berichtet werden.

Die Tatsache, daß dieses Verfahren noch keinen Eingang in die klinische Routine gefunden hat, basiert zum einen auf der unzureichenden Erfahrung am Menschen und der teilweise unzureichenden Qualität von Spenderzellen.

Ein möglicher Ansatzpunkt um eine erfolgreiche Transplantation von Hepatozyten zu ermöglichen stellt die Optimierung der Konservierungsbedingungen für die zu transplantierenden Hepatozyten dar. Die bisher gängige Kryokonservierung kann nur an wenigen Zentren erfolgreich durchgeführt werden. Hier könnte ein Ansatz zur Optimierung der Verfügbarkeit der Aufbau von regionalen Strukturen sein, um die rasche Verarbeitung von möglichen Spenderhepatozyten zu ermöglichen.

Ein anderer Ansatzpunkt zur Optimierung der Hepatozytentransplantation ist die bereits ausführlich diskutierte „Präkonditionierung“. Um eine erfolgreichere Repopularisierung der Empfängerlebern mit transplantierten Hepatozyten zu ermöglichen, wird es weiterer Forschungsansätze für eine erfolgreiche

Zellintegration in das Wirtsorgan bedürfen, um auch akut und vital bedrohlich Erkrankten ohne rasche Aussicht auf eine orthotope Lebertransplantation diese vielversprechende Methode zukommen zu lassen.

6. Schlußfolgerung

Zusammenfassend lässt sich eine dosisabhängige und temporäre Hemmung der Leberregeneration durch dl-Propranolol als Folge der verminderten Mitoserate und Proliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie feststellen. Zusätzlich ist eine erhöhte Apoptoserate in den regenerierenden Lebern der mit Propranolol behandelten Mäuse zu verzeichnen. Diese Prozesse haben indirekte Ursachen:

Die Hemmung der Zellproliferation ist durch eine verminderte hepatische Fettakkumulation als Folge einer verminderten Lipolyse im Fettgewebe unter Propranolol zu erklären. Ebenso kann angenommen werden, dass der verminderte adrenerge Stimulus die Organregeneration negativ beeinflusst.

Die Proliferation ist nicht alleine verantwortlich für die Leberregeneration, denn trotz der prolongierten Hemmung der Mitose erreicht die Leber der mit Propranolol behandelten Tiere bereits 72 Stunden nach Teilhepatektomie eine Masse, welche der der Lebern von unbehandelten Tieren entspricht.

Die durch dl-Propranolol verursachte Verzögerung der Leberregeneration verschafft transplantierten Hepatozyten keinen Wachstumsvorteil in der Maus. Trotz möglicher Optimierung und aufgrund fehlender quantitativer Analysen wird die Methode der beta-adrenergen Blockade zur Verbesserung der Effizienz der Hepatozytentransplantation klinisch derzeit nicht umsetzbar sein.

7. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung des dl-Propranolols auf die Leberregeneration nach 2/3-Hepatektomie. In vivo wurde eine 2/3-Hepatektomie bei männlichen C57/Bl 6-Mäusen mit und ohne Vorbehandlung durch dl-Propranolol durchgeführt. Es wurde das relative Lebergewicht, die Morphologie der Leber und die Histochemie bzw. Immunhistochemie im Zusammenhang mit der Analyse von Zellzyklusproteinen erhoben.

Es zeigte sich ein dosisabhängiger und temporärer Einfluß des dl-Propranolols auf die hepatozytäre Proliferation. Durch die Gabe von dl-Propranolol war ein vermindertes Lebergewicht zumindest bis 48 Stunden post-partieller Hepatektomie nachweisbar. Die lichtmikroskopische Analyse ergab eine verminderte hepatische Fettakkumulation in den Hepatozyten der Propranolol-behandelten Tiere. Dieses Ergebnis war nach 24 und 48 Stunden am ausgeprägtesten. Nach 72 Stunden war dieser Effekt bereits regredient.

Die Zellzyklusproteine (Cyclin-D1, CDK-2, PCNA) waren in der mit Propranolol behandelten Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach 24 Stunden erhöht. Dies wurde allerdings durch die gleichzeitige Vermehrung des Apoptosemarkers CSSA-PARP relativiert.

48 Stunden nach partieller Hepatektomie waren die o.g. Zellzyklusproteine in der unbehandelten Gruppe deutlich vermehrt nachweisbar. Im Gegensatz hierzu stand die mit Propranolol behandelte Gruppe: Hier

waren die Zellzyklusproteine schwächer nachweisbar, auch das CSSA-PARP war unterhalb der Nachweisgrenze. Dieser Effekt war in vivo bis 72 Stunden nach partieller Hepatektomie nachweisbar.

Zusätzlich erfolgte der Nachweis des Mitosemarkers Ki-67. Der Ki-67-Nachweis bestätigte die Hemmung der Mitose bei den Propranololbehandelten Tieren. Bis 3 Tage nach Teilhepatektomie war unter Einfluß des Propranolols kein nachweisbarer Anstieg der Mitoserate zu verzeichnen.

Die mikroskopische Beurteilung der Mitoserate in den regenerierenden Lebern der unbehandelten Tiere bestätigte eine regelrechte Proliferation der Hepatozyten mit einem Ki-67 positiven Zellanteil von bis zu 30% der ortsständigen Hepatozyten.

Die Lichtmikroskopie zeigte in den HE-Färbungen eine verminderte hepatische Fettakkumulation in den Hepatozyten der Propranolol-behandelten Tiere. Die hepatische Fettakkumulation zeigte sich deutlich 24 Stunden nach partieller Hepatektomie und konnte über weitere 24 Stunden verfolgt werden. Nach 72 Stunden war die Fettvakuolierung in den untersuchten Lebern deutlich rückläufig.

Die Lebern der unbehandelten Tiere zeigten eine deutlich stärkere Fettvakuolierung im zeitlichen Verlauf. Auch in diesen Geweben war nach 72 Stunden eine deutliche Regredienz der Fettvakuolen zu verzeichnen.

Um den proliferationshemmenden Effekt des dl-Propranolols weiter eingrenzen zu können, erfolgten in vitro-Versuche. Diese dienten der Frage, ob sich ein direkter oder indirekter Einfluß des Propranolols in Bezug auf die periphere Lipolyse ausmachen ließ. Die Hepatozyten erhielten in vitro eine kontinuierliche Zufuhr von freien Fettsäuren, zusätzlich zur Gabe von 50 µmol/l Propranolol in verschiedenen Versuchsansätzen. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß die Wirkung des Propranolols über die Einflußnahme auf die periphere Lipolyse erfolgt. In Bezug auf die Zellzyklusproteine und die Apoptoserate zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der Verum- oder Kontrollgruppe.

Die Bestimmung des Triacylglycerolgehaltes in der Leber von behandelten und unbehandelten Tieren ergab eine signifikant höhere Konzentration von Triglyceriden in den Beta-Blocker naiven Lebern.

Auch hieraus konnte auf die indirekte Hemmung der peripheren Lipolyse bedingt durch die nichtselektive Hemmung der Beta-Rezeptoren gefolgert werden.

In einem Zelltransplantationsexperiment sollte die Hemmung der Zellteilung von „Wirts“-Hepatozyten durch Propranolol zu einem Wachstumsvorteil für transplantierte Hepatozyten führen. Dies konnte in den oben gewählten Versuchen allerdings nicht demonstriert werden. In den mikroskopischen Untersuchungen der Leberschnitte bis zu 72 Stunden nach Transplantation, als auch in der FACS-Analyse 2 Wochen nach Transplantation (Arbeit in derselben Arbeitsgruppe, außerhalb dieser

Dissertation) konnte in der Empfängerleber der Propranolol-behandelten Tieren keine erhöhte Repopulationsrate mit transplantierten Zellen gesehen werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Bauer, M., M. Paxian, and A. Kortgen, [*Acute liver failure. Current aspects of diagnosis and therapy*]. *Anaesthesist*, 2004. **53**(6): p. 511-30.
2. Selden, C. and H. Hodgson, *Cellular therapies for liver replacement*. *Transpl Immunol*, 2004. **12**(3-4): p. 273-88.
3. Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., Grompe, M., *Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(5): p. 1273-80.
4. Lauth, W.W. and C.V. Greenway, *Conceptual review of the hepatic vascular bed*. *Hepatology*, 1987. **7**(5): p. 952-63.
5. Jungermann, K. and N. Katz, *Functional specialization of different hepatocyte populations*. *Physiol Rev*, 1989. **69**(3): p. 708-64.
6. Jungermann, K. and T. Kietzmann, *Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver*. *Hepatology*, 2000. **31**(2): p. 255-60.
7. Jungermann, K., *Zonation of metabolism and gene expression in liver*. *Histochem Cell Biol*, 1995. **103**(2): p. 81-91.
8. Jungermann, K. and T. Kietzmann, *Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver*. *Annu Rev Nutr*, 1996. **16**: p. 179-203.
9. Fausto, N. and J.S. Campbell, *The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation*. *Mech Dev*, 2003. **120**(1): p. 117-30.
10. Hilgard, P. and G. Gerken, [*Hepatic encephalopathy*]. *Med Klin (Munich)*, 2004. **99**(10): p. 591-602.
11. Rifai, K., Bahr, M.J., Schneider, A., Ott, M., Manns, M.P., [*New devices in liver replacement therapy*]. *Med Klin (Munich)*, 2003. **98**(12): p. 750-3.
12. Kamath, P.S., Wiesner, R.H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T.M., Kosberg, C.L., D'Amico, G., Dickson, E.R., Kim, W.R., *A model to predict survival in patients with end-stage liver disease*. *Hepatology*, 2001. **33**(2): p. 464-70.
13. Bernuau, J., *Selection for emergency liver transplantation*. *J Hepatol*, 1993. **19**(3): p. 486-7.
14. O'Grady, J.G., Alexander, G.J., Hayllar, K.M., Williams, R., *Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(2): p. 439-45.

15. Ambrosino, G., Varotto, S., Stefano Basso, S.M., Galavotri, D., Cecchetto, A., Carrar, P., Naso, A., De Silvestro, G., Plebani, M., Giron, G., Abatangelo, G., Donato, D., Cestrone, A., Marelli, L., Trombetta, M., Lorenzelli, V., Picardi, A., Colantoni, A., Van Thiel, D., Ricordi, C., D'Amico, F.D., *Development of a new bioartificial liver using a porcine autologous biomatrix as hepatocyte support*. *Asaio J*, 2002. **48**(6): p. 592-7.
16. Boudjema, K., Bechellier, P., Wolf, P., Tempe, J.D., Jaeck, D., *Auxiliary liver transplantation and bioartificial bridging procedures in treatment of acute liver failure*. *World J Surg*, 2002. **26**(2): p. 264-74.
17. Santoro, A., Macini, E., Ferramosca, E., Faenza, S., *Liver support systems*. *Contrib Nephrol*, 2007. **156**: p. 396-404.
18. Rifai, K., Ernst, T., Kretschmer, U., Bahr, M.J., Schneider, A., Hafer, C., Haller, H., Manns, M.P., Fliser, D., *Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure*. *J Hepatol*, 2003. **39**(6): p. 984-90.
19. Fausto, N., *Liver regeneration*. *J Hepatol*, 2000. **32**(1 Suppl): p. 19-31.
20. Kam, I., Lynch, S., Svanas, G., Todo, S., Polimeno, L., Francavilla, A., Penkrot, R.J., Takaya, S., Ericzon, B.G., Starzl, T.E., *Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants*. *Hepatology*, 1987. **7**(2): p. 362-6.
21. Demetris, A.J., Lunz, J.G. 3rd., Specht, S., Nozaki, I., *Biliary wound healing, ductular reactions, and IL-6/gp130 signaling in the development of liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(22): p. 3512-22.
22. Shinozuka, H., Ohmura, T., Katyal, S.L., Zedda, A.I., Leda-Columbano, G.M., Columbano, A., *Possible roles of nonparenchymal cells in hepatocyte proliferation induced by lead nitrate and by tumor necrosis factor alpha*. *Hepatology*, 1996. **23**(6): p. 1572-7.
23. Haber, B.A., Mohn, K.L., Diamond, R.H., Taub, R., *Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1319-26.
24. Selzner, M. and P.A. Clavien, *Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway*. *Hepatology*, 2000. **31**(1): p. 35-42.
25. Selzner, M., C.A. Camargo, and P.A. Clavien, *Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6*. *Hepatology*, 1999. **30**(2): p. 469-75.
26. Fausto, N., A.D. Laird, and E.M. Webber, *Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration*. *Faseb J*, 1995. **9**(15): p. 1527-36.

27. Albrecht, J.H. and L.K. Hansen, *Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(6): p. 397-404.
28. Matsumoto, K. and T. Nakamura, *Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions*. Crit Rev Oncog, 1992. **3**(1-2): p. 27-54.
29. Taub, R., L.E. Greenbaum, and Y. Peng, *Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(2): p. 117-27.
30. Michalopoulos, G.K. and M. DeFrances, *Liver regeneration*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005. **93**: p. 101-34.
31. Barrow, R.E., Hawkins, H.K., Aarsland, A., Cox, R., Rosnblatt, J., Barrow, L.N., Jeschke, M.G., Herndon, D.N., *Identification of factors contributing to hepatomegaly in severely burned children*. Shock, 2005. **24**(6): p. 523-8.
32. Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L.J., Hruz, P.W., Rudnick, D.A., *Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1322-32.
33. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas*. Am J Pathol. **176**(1): p. 2-13.
34. Brasaemle, D.L., *Cell biology. A metabolic push to proliferate*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1581-2.
35. Newberry, E.P., Kennedy, S.M., Xie, Y., Luo, J., Stanley, S.E., Semenkovich, C.F., Crooke, R.M., Graham, M.J., Davidson N.O., *Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models*. Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1097-105.
36. Fernandez, M.A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Noxn, S.J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., Tebar, F., Enrich, C., Parton, R.G., Pol, A., *Caveolin-1 is essential for liver regeneration*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1628-32.
37. Farrell, G.C., *Probing Prometheus: fat fueling the fire?* Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1252-5.
38. Mito, M., Ebata, M., Kusano, M., Onishi, T., Hiratsuka, M, Saito, T., *Studies on ectopic liver utilizing hepatocyte transplantation into the rat spleen*. Transplant Proc, 1979. **11**(1): p. 585-91.

39. Grossman, M., Rader, D.J., Muller, D.W., Kolansky, D.M., Kozarsky, K., Clark, B.J. 3rd, Stein, E.A., Lupien, P.J., Brewer, H.B., Jr., Raper, S.E., *A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia*. Nat Med, 1995. **1**(11): p. 1148-54.
40. Runge, D., Fleig, W.E., Michalopoulos, G.K., Strom, S.C., Runge, D.M., [*Hepatocyte transplantation. Possibilities for use and examples of practical clinical application*]. Dtsch Med Wochenschr, 2000. **125**(13): p. 397-400.
41. Strom, S.C., J.R. Chowdhury, and I.J. Fox, *Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(1): p. 39-48.
42. Asonuma, K., Gilbert, J.C., Stein, J.E., Takeda, T., Vacanti, J.P., *Quantitation of transplanted hepatic mass necessary to cure the Gunn rat model of hyperbilirubinemia*. J Pediatr Surg, 1992. **27**(3): p. 298-301.
43. Fitzpatrick, E., R.R. Mitry, and A. Dhawan, *Human hepatocyte transplantation: state of the art*. J Intern Med, 2009. **266**(4): p. 339-57.
44. Muraca, M., Gerunda, G., Neri, D., Vilei, M.T., Granato, A., Feltracco, P., Meroni, M., Giron, G., Burlina, A.B., *Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type Ia*. Lancet, 2002. **359**(9303): p. 317-8.
45. Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V., Strom, S.C., *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation*. N Engl J Med, 1998. **338**(20): p. 1422-6.
46. Bilir, B.M., Guinette, D., Karrer, F., Kumpe, D.A., Krysl, J., Stephens, J., McGavran, L., Ostrowska, A., Durham, J., *Hepatocyte transplantation in acute liver failure*. Liver Transpl, 2000. **6**(1): p. 32-40.
47. Strom, S.C., Fisher, R.A., Thompson, M.T., Sanyal, A.J., Cole, P.E., Ham, J.M., Posner, M.P., *Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure*. Transplantation, 1997. **63**(4): p. 559-69.
48. Fisher, R.A. and S.C. Strom, *Human hepatocyte transplantation: worldwide results*. Transplantation, 2006. **82**(4): p. 441-9.
49. Guha, C., Deb, N.J., Sappal, B.S., Ghosh, S.S., Roy-Chowdhury, N., Roy-Chowdhury, J., *Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver*. Artif Organs, 2001. **25**(7): p. 522-8.

50. Guha, C., Parashar, B., Deb, N.J., Garg, M., Gorla, G.R., Singh, A., Roy-Chowdhury, N., Vikram, B., Roy-Chowdhury, J., *Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection*. Hepatology, 2002. **36**(2): p. 354-62.
51. Laconi, E., Oren, R., Mukhopadhyay, D.K., Hurston, E., Laconi, S., Pani, P., Dabeva, M.D., Shafritz, D.A., *Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine*. Am J Pathol, 1998. **153**(1): p. 319-29.
52. Guha, C., Sharma, A., Gupta, S., Alfeiri, A., Gorla, G.R., Gagandeep, S., Sokhi, R., Roy-Chowdhury, N., Tanaka, K.E., Vikram, B., Roy-Chowdhury, J. , *Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation*. Cancer Res, 1999. **59**(23): p. 5871-4.
53. Malhi, H., Gorla, G.R., Irani, A.N., Annamanemi, P., Gupta, S., *Cell transplantation after oxidative hepatic preconditioning with radiation and ischemia-reperfusion leads to extensive liver repopulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13114-9.
54. Frederiks, W.M., James, J., Bosch, K.S., Schroder, M.J., Schuyt, H.C., *A model for provoking ischemic necrosis in rat liver parenchyma and its quantitative analysis*. Exp Pathol, 1982. **22**(4): p. 245-52.
55. Malhi, H., Annamanemi, P., Slehria, S., Joseph, B., Bhargava, K.K., Palestro, C.J., Novikoff, P.M., Gupta, S., *Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver*. Hepatology, 2002. **36**(1): p. 112-21.
56. Slehria, S., Rajvanshi, P., Ito, Y., Sokhi, R.P., Bhargava, K.K., Palestro, C.C., McCuskey, R.S., Gupta, S., *Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver*. Hepatology, 2002. **35**(6): p. 1320-8.
57. Tsukamoto, I. and S. Kojo, *The sex difference in the regulation of liver regeneration after partial hepatectomy in the rat*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1033**(3): p. 287-90.
58. Nakata, R., Tsukamoto, I., Nanme, M., Makino, S., Miyoshi, M., Kojo, S., *Alpha-adrenergic regulation of the activity of thymidylate synthetase and thymidine kinase during liver regeneration after partial hepatectomy*. Eur J Pharmacol, 1985. **114**(3): p. 355-60.
59. Gardemann, A., G.P. Puschel, and K. Jungermann, *Nervous control of liver metabolism and hemodynamics*. Eur J Biochem, 1992. **207**(2): p. 399-411.
60. Tsukamoto, I., Wakabayashi, M., Takeyoshi, K., Nomura, S., *Control of thymidine kinase during liver regeneration after partial hepatectomy*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1290**(3): p. 267-72.

61. Huerta-Bahena, J., R. Villalobos-Molina, and J.A. Garcia-Sainz, *Roles of alpha 1- and beta-adrenergic receptors in adrenergic responsiveness of liver cells formed after partial hepatectomy*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **763**(2): p. 112-9.
62. Reyes-Salcido, V. and R. Villalobos-Molina, *Patterns of adrenoceptor change during liver regeneration of the Wistar Kyoto rat: a binding study*. *Arch Med Res*, 1999. **30**(2): p. 89-92.
63. Borle, A.B. and R.K. Studer, *Effect of adrenalectomy on Ca²⁺ signaling in rat hepatocytes*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(32): p. 19495-501.
64. Vunder, P.A., V.P. Vunder, and T.A. Andronova, *[Effect of adrenoceptor blockaders on the mitotic activity of regenerating liver]*. *Biull Eksp Biol Med*, 1976. **82**(11): p. 1373-4.
65. Knopp, J., Jezova, D., Rusnak, M., Jaroscakova, I., Farkas, R., Kvetnansky, R., *Changes in plasma catecholamine and corticosterone levels and gene expression of key enzymes of catecholamine biosynthesis in partially hepatectomized rats*. *Endocr Regul*, 1999. **33**(4): p. 145-53.
66. Akiyoshi, H., T. Gonda, and T. Terada, *A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers*. *Liver*, 1998. **18**(5): p. 352-9.
67. Du Souich, P., H. Maurice, and L. Heroux, *Contribution of the small intestine to the first-pass uptake and systemic clearance of propranolol in rabbits*. *Drug Metab Dispos*, 1995. **23**(2): p. 279-84.
68. Hung, D.Y., Siebert, G.A., Chang, P., Anissimov, Y.G., Roberts, M.S., *Disposition kinetics of propranolol isomers in the perfused rat liver*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **311**(2): p. 822-9.
69. Siebert, G.A., Hung, D.Y., Chang, P., Roberts, M.S., *Ion-trapping, microsomal binding, and unbound drug distribution in the hepatic retention of basic drugs*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **308**(1): p. 228-35.
70. Sarin, S.K., Lamba, G.S., Kunar, M., Misra, A., Murthy, N.S., *Comparison of endoscopic ligation and propranolol for the primary prevention of variceal bleeding*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(13): p. 988-93.
71. Shahi, H.M. and S.K. Sarin, *Prevention of first variceal bleed: an appraisal of current therapies*. *Am J Gastroenterol*, 1998. **93**(12): p. 2348-58.
72. Poynard, T., Lebrech, D., Hillon, P., Syegh, R., Bernuau, J., Neveau, S., Chaput, J.C., Klepping, C., Rueff, B., Benhamou, J.P., *Propranolol for prevention of recurrent gastrointestinal bleeding*

- in patients with cirrhosis: a prospective study of factors associated with rebleeding.* Hepatology, 1987. **7**(3): p. 447-51.
73. Bosch, J. and J.C. Garcia-Pagan, *Prevention of variceal rebleeding.* Lancet, 2003. **361**(9361): p. 952-4.
74. Patch, D., Sabin, C.A., Goulis, J., Gerunda, G., Greenslade, L., Merkel, C., Burroughs, A.K., *A randomized, controlled trial of medical therapy versus endoscopic ligation for the prevention of variceal rebleeding in patients with cirrhosis.* Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1013-9.
75. Tynan, R.F., M.M. Fisher, and L.S. Ibels, *Self-poisoning with propranolol.* Med J Aust, 1981. **1**(2): p. 82-3.
76. Sasaki, J., Kajiyama, G., Kusukawa, R., Mori, H., Koga, S., Takagi, R., Tanaka, N., Ogawa, N., Arakawa, K., *Effect of bevantolol and propranolol on serum lipids in patients with essential hypertension.* Int J Clin Pharmacol Ther, 1994. **32**(12): p. 660-4.
77. Minagawa, M., Oya, H., Yamamoto, S., Shimizu, T., Bannai, M., Kawamura, H., Hatakeyama, K., Abo, T., *Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation.* Hepatology, 2000. **31**(4): p. 907-15.
78. Thrower, S. and M.G. Ord, *Hormonal control of liver regeneration.* Biochem J, 1974. **144**(2): p. 361-9.
79. Wood, A.J., Villeneuve, J.P., Branch, R.A., Rogers, L.W., Shand, D.G., *Intact hepatocyte theory of impaired drug metabolism in experimental cirrhosis in the rat.* Gastroenterology, 1979. **76**(6): p. 1358-62.
80. Reyes-Salcido, V. and R. Villalobos-Molina, *Evidence that dl-propranolol increases thymidine kinase activity, cell mitosis, and beta-adrenoceptors during rat liver regeneration.* Arch Med Res, 2003. **34**(4): p. 273-5.
81. Elkharrat, D., C. Bismuth, and J.M. Davy, *[Beta adrenergic receptor blockade : a self-limited phenomenon explaining the benignancy of acute poisoning with beta adrenergic inhibitors. Report of a series of 40 patients seen at the Fernand-Widal Toxicology Center, with a 0% mortality rate (author's transl)].* Sem Hop, 1982. **58**(17): p. 1073-6.
82. Seglen, P.O., *Preparation of isolated rat liver cells.* Methods Cell Biol, 1976. **13**: p. 29-83.
83. Kost, D.P. and G.K. Michalopoulos, *Effect of epidermal growth factor on the expression of protooncogenes c-myc and c-Ha-ras in short-term primary hepatocyte culture.* J Cell Physiol, 1990. **144**(1): p. 122-7.

84. Runge, D., Runge, D.M., Jager, D., Lubecki, K.A., Beer Stolz, D., Karathanasis, S., Kietzmann, T., Strom, S.C., Fleig, W.E., Michalopoulos, G.K., *Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(1): p. 46-53.
85. Block, G.D., Locker, J, Bowen, W.C., Petersen, B.E., Katyal, S., Strom, S.C., Riley, T., Howard, T.A., Michalopoulos, G.K., *Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium*. *J Cell Biol*, 1996. **132**(6): p. 1133-49.
86. Gallagher, S.R., *One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins*. *Curr Protoc Immunol*, 2006. **Chapter 8**: p. Unit 8 4.
87. Sgodda, M., Aurich, I., Kleist, S., Aurich, H., Konig, S., Dollinger, M.M., Fleig, W.E., Christ, B., *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(13): p. 2875-86.
88. Carr, T.P., C.J. Andresen, and L.L. Rudel, *Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts*. *Clin Biochem*, 1993. **26**(1): p. 39-42.
89. Hong, J.H., Hwang, E.S., Lee, C.H., Lee, Y.H., Lee, S.K., *dl-propranolol negatively regulates the transcription of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-gene and thereby suppresses DNA synthesis in regenerating rat liver*. *Biochem Mol Biol Int*, 1997. **42**(1): p. 103-12.
90. Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Sciascia, C., Coetzee, M., Pellici, R., Todo, S., Kam, I., Starzl, T.E., *Different response to epidermal growth factor of hepatocytes in cultures isolated from male or female rat liver. Inhibitor effect of estrogen on binding and mitogenic effect of epidermal growth factor*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(3): p. 597-605.
91. Baughman, T.M., C.L. Talarico, and J.R. Soglia, *Evaluation of the metabolism of propranolol by linear ion trap technology in mouse, rat, dog, monkey, and human cryopreserved hepatocytes*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009. **23**(14): p. 2146-50.
92. Weidler, D.J., Jallad, N.S., Garg, D.C., Wagner, J.G., *Pharmacokinetics of propranolol in the cat and comparisons with humans and three other species*. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1979. **26**(1): p. 105-14.
93. Franke, A., Frickel, F.F., Gries, J, Lehmann, H.D., Lenke, D., Ohnsorge, U., *[New beta-sympatholytic agents. Synthesis and pharmacological activity of isomeric benzthiazole and benzoxazole derivates (author's transl)]*. *Arzneimittelforschung*, 1980. **30**(11): p. 1831-8.
94. Meneton, P., Ichikawa, I., Inagami, T., Schnermann, J., *Renal physiology of the mouse*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **278**(3): p. F339-51.

95. Han, B., Lu, Y., Meng, B., Qu, B., *Cellular loss after allogenic hepatocyte transplantation*. Transplantation, 2009. **87**(1): p. 1-5.
96. Shen, K., Zheng, S.S., Park, O., Wang, H., Sun, Z., Gao, B., *Activation of innate immunity (NK/IFN-gamma) in rat allogeneic liver transplantation: contribution to liver injury and suppression of hepatocyte proliferation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(4): p. G1070-7.
97. Tada, Y., Kithara, T., Yoshioka, T., Nakamura, T., Ichikawa, N., Nakashima, M., Nshida, K., Nakamura, J., Sasaki, H., *Partial hepatectomy enhances polyethylenimine-mediated plasmid DNA delivery*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(8): p. 1712-6.
98. Nagy, P., Teramoto, T., Factor, V.M., Sanchez, A., Schnur, J., Paku, S., Thorgeirsson, S.S., *Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat*. Hepatology, 2001. **33**(2): p. 339-45.
99. Haussinger, D., *The role of cellular hydration in the regulation of cell function*. Biochem J, 1996. **313** (Pt 3): p. 697-710.
100. Bennett, L.M., P.J. Farnham, and N.R. Drinkwater, *Strain-dependent differences in DNA synthesis and gene expression in the regenerating livers of CB57BL/6J and C3H/HeJ mice*. Mol Carcinog, 1995. **14**(1): p. 46-52.
101. Greenbaum, L.E., Li, W., Cressmann, D.E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V., Taub, R., *CCAAT enhancer- binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy*. J Clin Invest, 1998. **102**(5): p. 996-1007.
102. Harada, H., Pavlick, K.P., Hines, I.N., Hoffman, J.M., Bharwani, S., Gray, L., Wolf, R.E., Grisham, M.B., *Selected contribution: Effects of gender on reduced-size liver ischemia and reperfusion injury*. J Appl Physiol, 2001. **91**(6): p. 2816-22.
103. Fisher, B., Gunduz, N., Saffer, E.A., Zheng, S., *Relation of estrogen and its receptor to rat liver growth and regeneration*. Cancer Res, 1984. **44**(6): p. 2410-5.
104. Barrow, R.E., Wolfe, R.R., Dasu, M.R., Barrow, L.N., Herndon, D.N., *The use of beta-adrenergic blockade in preventing trauma-induced hepatomegaly*. Ann Surg, 2006. **243**(1): p. 115-20.
105. Gebhardt, R., *Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function*. Pharmacol Ther, 1992. **53**(3): p. 275-354.
106. Mitchell, C. and H. Gilgenkrantz, *Had Prometheus known, would he have preferred to be obese?* J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(12): p. 2053-4.

107. Andre, C., Couton, D., Gaston, J., Erraji, L., Renia, L., Varlet, P., Briand, P., Guillet, J.G., *beta2-adrenergic receptor-selective agonist clenbuterol prevents Fas-induced liver apoptosis and death in mice*. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 1): p. G647-54.
108. Arab, J.P., Pizzaro, M., Solis, N., Sun, H., Thevanather, S., Arrese, M., *Mild hypothermia does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice*. Liver Int, 2009. **29**(3): p. 344-8.
109. Gupta, S., Rajvanshi, P., Sokhi, R., Slehria, S., Yam, A., Kerr, A., Novikoff, P.M., *Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 509-19.
110. Ueno, T., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Rosenbaum, J., *Innervation of the sinusoidal wall: regulation of the sinusoidal diameter*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 868-73.
111. Ohtake, M., *The role of the abdominal sympathetic nervous system in regulating portal venous flow and its functional distribution*. Surg Today, 1992. **22**(2): p. 128-36.
112. Pomfret, Pomposelli, J. J.; Gordon, F. D.; *Liver regeneration and surgical outcome in donors of right-lobe liver grafts*, Transplantation, 2003, 76 (1): p. 5-10.
113. Olthoff, K. M.; Emond, J. C.; Shearon, T. H.; *Liver regeneration after living donor transplantation: adult-to-adult living donor liver transplantation cohort study*. Liver Transplantation, 79 (1): p- 79-88.
114. Siebert, G. A.; Hung, D. Y.; Chang, P.; Roberts, M. S.; *Ion-trapping, microsomal binding, and unbound drug distribution in the hepatic retention of basic drugs*. Journal of Pharmacologic and Experimental Therapy, 2004, 308 (1): p. 228-235
115. Hung, D. Y., Siebert, G. A., Chang, P., Anissimov, Y. G., Roberts, M. S., *Disposition kinetics of propranolol isomers in the perfused rat liver*, Journal of Pharmacologic and Experimental Therapy, 2004, 311 (2): p. 822-829
116. Hung, D. Y., Siebert, G. A., Chang, P., Whitehouse, P.W., *Hepatic pharmacokinetics of propranolol in rats with adjuvant-induced systemic inflammation*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006 (2): p. G 343-351

117. Ueno, T., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Rosenbaum, J., *Innervation of the sinusoidal wall: regulation of the sinusoidal diameter*, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004, 280 (1): p. 868-873
118. Wang, F., Zhou, L., Ma, X., Ma, W.; *Monitoring of intrasplenic Hepatocyte transplantation for acute-on-chronic Liver-failure: a prospective Five-year-Follow-up Study*, *Transplantation proceedings*, 2014, 46 (1): p. 192-198.
119. Duclos, J., Bhangui, P., Salloum, C., Andreani, P., Saliba, F., Ichai, P., Elmaleh, A., Castaing, D., Azoulay, D., *Ad Integrum Functional and Volumetric Recovery in Right Lobe Living Donors: Is It Really Complete 1 Year After Donor Hepatectomy*; *American Journ. of Transplantation*, 2016, 16 (1): p. 143-156 .
120. Walldorf, J. , Hillebrand. C., Aurich. H., Stock, P., Hempel, M., Ebensing, S., Fleig, W.E., Seufferlein, T., Dollinger, M.M., Christ, B.; “Propranolol impairs liver regeneration after partial hepatectomy in C57BL/6-mice by transient attenuation of hepatic lipid accumulation and increase of apoptosis.” *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 45 (2010) 468-476
121. Walldorf, J., Hillebrand, C., Aurich H, Stock P, Hempel M, Christ, B., “ Unselektive Betarezeptorblockade nach partieller Hepatektomie bei C57BL/6-Mäusen: Einfluss auf die hepatische Fettakkumulation und Leberregeneration“. *Zeitung für Gastroenterologie* 46 (2008)
- P2_44

9. Thesen

1. Die enterale Gabe von Propranolol hat in vivo einen temporären und dosisabhängigen hemmenden Einfluß auf die Leberregeneration nach 2/3-Hepatektomie in der Maus.
2. Propranolol vermindert in vivo die Stress-induzierte und akute hepatische Fettakkumulation nach 2/3-Hepatektomie, wahrscheinlich durch Hemmung der peripheren Lipolyse.
3. Propranolol hemmt in einer Dosis von 60 mg/kg KG die Proliferation der Hepatozyten nach 2/3-Hepatektomie durch die Hemmung der Mitose.
4. Die Behandlung mit Propranolol induziert nach Hepatektomie eine erhöhte Apoptoserate der Hepatozyten.
6. Der Einfluss des Propranolols in einer Dosis von 60 mg/kg KG reicht nicht aus, um eine Leberregeneration nach 2/3-Hepatektomie gänzlich zu verhindern.
7. Die temporäre enterale Gabe von Propranolol in einer Dosis von 60 mg/kg KG schafft keinen Wachstumsvorteil für intraportal syngen transplantierte Hepatozyten.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Die aus anderen Quellen wörtlich oder inhaltlich übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht worden.

Ich versichere, daß für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Dissertation keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde. Es sind von mir weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen, geleistet worden.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde im In- oder Ausland vorgelegt worden.

Remscheid, den 15. November 2018

Christoph Hillebrand

Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Christ, der mich zum Einen in der ersten Phase der Dissertation und auch im Bereich der experimentellen Arbeit zu jeder Zeit unterstützt hat, und zum anderen auch nach Jahren des Stillstandes erneut motivieren konnte, diese Arbeit zum Abschluß zu bringen.

Ganz herzlichen Dank an meinen “klinischen” Betreuer Jens Walldorf. Für die vielen Korrekturen und die Hinweise auf das wesentliche einer Dissertation ebenso wie für die Kollegialität trotz des langen Stillstandes. Dank Deiner Hilfe ist die Arbeit fertig geworden!

Aus der ersten Phase der Arbeit gebührt Hendryk und Ines Aurich sowie Malte Sgodda mein großer Dank! Für die tolle Zeit in der klinischen Grundlagenforschung und die lehrreichen Stunden mit und bei Euch ein von Herzen kommendes Dankeschön!

Dankeschön auch an Madlen Hempel und Sabine Ebensing für die wertvolle Unterstützung während der Laborarbeiten.

Und nicht zuletzt meiner wunderbaren Ehefrau Dr. Ina D. Hillebrand danke ich für Ihre immerwährende Unterstützung in den schwierigsten Phasen der Bewältigung und der erneuten Aufnahme der Dissertationsarbeit!