

# **Die Rolle intestinaler Operationen auf die portale Hämodynamik und die Fibroseentwicklung in der experimentellen Leberzirrhose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Jonathan Meinke**

aus Duisburg

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Jonel Trebicka
2. Gutachterin: Prof. Dr. Bettina Kathrin Wabbels

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.02.2024

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

## **Für meine Familie**

Linda Meinke

Sabine Meinke-Henn

Wolfgang Meinke



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	6
<b>1.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	8
1.1	Einleitung	8
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	15
1.4	Diskussion	18
1.5	Zusammenfassung	22
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	23
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	28
	Abstract	28
	Introduction	29
	Materials and Methods	29
	Results	31
	Discussion	33
	References	38
	Supplementary Material	40
<b>3.</b>	<b>Danksagung</b>	43

## Abkürzungsverzeichnis

ACLF	akut-auf-chronisches Leberversagen (acute-on-chronic-liver failure)
AD	Akute Dekompensation
AIR	Luftinhalationsgruppe; hier: Versuchsgruppenbezeichnung
alpha-SMA	Alpha-Aktin-2 (alpha smooth muscle actin)
BDL	Gallengangsligatur (bile duct ligation)
CANONIC Studie	Studie der Europäischen Stiftung zur Erforschung des chronischen Leberversagens (European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure) zum akut-auf-chronischen Leberversagen
CCL2	Chemokin-Ligand-2 der CC-Familie
CCL4	Tetrachlormethan (auch: Tetrachlorkohlenstoff)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
CLIF-C	Konsortium der europäischen Stiftung zur Erforschung des chronischen Leberversagens (European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure)
EMR-1	epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
IL-6	Interleukin-6
IL-1 beta	Interleukin-1 beta
IM	Intestinale Manipulation (intestinal manipulation)
LAP	Medianlaparatomie; hier: Versuchsgruppenbezeichnung
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHT	Portale Hypertension
PPVL	Partielle Pfortaderligatur (partial portal vein ligation)
Sham	Schein-Operation; hier: Versuchsgruppenbezeichnung
TGF-beta	transformierender Wachstumsfaktor beta (tumor growth factor beta)
TIPS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
TLR-4	Toll-like receptor 4
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha (tumor necrosis factor-alpha)
18S-rRNA	18-Svedberg ribosomale Ribonukleinsäure

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Die Leberzirrhose stellt mit weltweit über 1,3 Millionen Todesfällen pro Jahr eine globale Gesundheitsbelastung dar und macht mit ca. 2,4 % aller globalen Todesfälle einen erheblichen Anteil an der weltweiten Sterblichkeit aus (GBD 2017 Cirrhosis Collaborators, 2020). Im Vergleich mit anderen chronischen Erkrankungen hospitalisierter Patienten konnte die Leberzirrhose auch in Deutschland als unabhängiger Risikofaktor mit 6-fach erhöhtem Risiko für die Krankenhaussterblichkeit identifiziert werden (Gu et al., 2021).

Der zugrundeliegende Pathomechanismus beginnt durch eine Schädigung der Leber, die den fibrotischen Umbau des Leberparenchyms mit pathologischer Akkumulation von Extrazellulärmatrix bedingt. Dieser Umbau findet im Rahmen einer Entzündungsreaktion statt, bei der sich die hepatischen Sternzellen zu Matrix-produzierenden Myofibroblasten differenzieren und Kupffer-Zellen aktiviert werden (Mederacke et al., 2013).

Infolge dieses Prozesses und durch eine Kontraktion der Myofibroblasten kommt es weiterhin zur Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes. Dieser wiederum führt zur Entstehung der portalen Hypertension (PHT) (Sauerbruch und Trebicka, 2014). Weiterhin ist die Aggravierung der PHT eng mit weiteren Dekompensationsereignissen assoziiert (Ferstl und Trebicka, 2021).

Während sich eine kompensierte Leberzirrhose klinisch unauffällig präsentieren kann (GBD 2017 Cirrhosis Collaborators, 2020), kommt es mit dem Auftreten einer akuten Dekompensation (AD) zu einer schwerwiegenden klinischen Symptomatik. Diese kann sich unter anderem in Form von Aszitesbildung, Ösophagusvarizenbutungen, Episoden einer hepatischen Enzephalopathie, bakteriellen Infektionen oder dem Hepatorenalen Syndrom präsentieren (EASL, 2018).

In diesem Stadium steigt neben der Frequenz von Krankenhausaufenthalten auch die Liegedauer der Patienten (Bajaj et al., 2015). Durch diesen Anstieg der Hospitalisierungsrate kommt es neben einer hohen ökonomischen Belastung für das Gesundheitssystem auch zum Verlust von Lebensqualität für die betroffenen Patienten (Ge und Runyon, 2016).



Neben den hohen Hospitalisierungsraten bei einer AD besitzt auch die Leberzirrhose als Komorbidität bei der Hospitalisierung einen hohen Stellenwert. Kürzlich konnte in deutschen Daten gezeigt werden, dass bei über 50 % der stationären Aufnahmen die Leberzirrhose als Nebendiagnose eine relevante Rolle spielt (Gu et al., 2021).

Neben der AD ist insbesondere das sogenannte akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF) als eigenständiges Syndrom eine seit ca. zehn Jahren bekannte und neu definierte Komplikation der Leberzirrhose. Es ist charakterisiert durch ein Multiorganversagen und eine hohe Kurzzeitmortalität (< 28 Tage) (Angeli et al., 2018; Moreau et al., 2013) und ist mit einem auslösenden Ereignis assoziiert wie beispielsweise einer bakteriellen Infektion, gastrointestinalen Blutungen oder akutem Alkoholismus (Moreau et al., 2013). Durch diese Kriterien unterscheidet es sich eindeutig von einer AD.

Jedoch sind 40-50 % der auslösenden Ereignisse eines ACLF nicht identifiziert. Zu den bisher nicht gut untersuchten Auslösern zählen insbesondere chirurgische Eingriffe, wengleich der operative Insult kürzlich als auslösendes Ereignis bei der Entwicklung von ACLF identifiziert wurde (Klein et al., 2020). Auch in einer weiteren Arbeit, an der ich beteiligt war, konnten elektive Eingriffe als auslösendes Ereignis für ein ACLF bei Patienten mit Leberzirrhose bestätigt werden (Chang et al., 2021).

Auch wenn der operative Insult im Kontext von ACLF erst in letzter Zeit verstärkt in den Fokus der Forschung gerät, ist die postoperative Dekompensation bei Patienten mit Leberzirrhose schon seit langer Zeit bekannt und stellt aufgrund der erhöhten Mortalität eine relevante klinische Herausforderung dar (Friedman, 2010).

Dabei ist die perioperative Mortalität nicht nur von der präoperativen Schwere der Leberschädigung abhängig. Auch das Vorliegen einer PHT bestimmt maßgeblich das postoperative Überleben (de Goede et al., 2012).

Neue Studien identifizierten den präoperativen portosystemischen Druckgradienten als prognostischen Faktor für die postoperative Mortalität (Reverter et al., 2019). Weiterhin zeigen aktuelle Daten, dass die präoperative Portaldrucksenkung durch eine TIPS-Anlage das Risiko für Dekompensationsereignisse senkt und folglich die 1-Jahres-Mortalität reduziert (Chang et al., 2022). Zusammenfassend ist dem Portaldruck eine Schlüsselrolle

bei der Entstehung der postoperativen Dekompensation bei Patienten mit Leberzirrhose zuzuschreiben.

Dennoch ist der zugrundeliegende Pathomechanismus der postoperativen Dekompensation noch weitestgehend unerforscht, sodass nicht nur die Prävalenz, sondern auch die 1-Jahres Mortalität bei Patienten mit Leberzirrhose nach wie vor hoch ist (Klein et al., 2020). Insgesamt mangelt es noch an einem einheitlichen Vorgehen bei Risikopatienten und therapeutischen Standards des perioperativen Managements. Somit bedarf der Einfluss eines operativen Insults auf die Entwicklung einer postoperativen Dekompensation weiterer Forschung. Außerdem fehlt es an reproduzierbaren Tiermodellen, um diesen Prozess von AD und ACLF im postoperativen Verlauf präklinisch zu erforschen.

Ziel unserer Studie war daher die Etablierung eines Tiermodells, welches den operativen Insult durch eine intestinale Operation bei Patienten mit Leberzirrhose möglichst adäquat nachahmen sollte. Dazu untersuchten wir bereits etablierte Modelle der Zirrhoseinduktion in Kombination mit dem ebenfalls etablierten Modell des operativen Insults. Da im klinischen Kontext der Grad der Leberfibrose und der Portaldruck die prognoseentscheidenden Parameter darstellen, wurden diese zur Validierung der verschiedenen Zirrhosemodelle herangezogen.

Die folgende Zusammenfassung auf Grundlage der von Chang/Meinke et al. im August 2021 veröffentlichten Originalpublikation „Extrahepatic Surgery in Cirrhosis Significantly Increases Portal Pressure in Preclinical Animal Models“ beschreibt die Entwicklung eines präklinischen Tiermodells zur Untersuchung des Einflusses einer extrahepatischen intestinalen Operation auf Portaldruck und Leberfibrose im Tiermodell.

## 1.2 Material und Methoden

### 1.2.1 Tierversuche und Induktion einer Leberzirrhose

Die Tierversuche wurden an insgesamt 166 männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Haltung erfolgte im Haus für Experimentelle Therapie, der zentralen Tierhaltung der Universität Bonn, in einzeln belüfteten Käfigsystemen mit zwölfstündigem Tag-/Nachtzyklus und einer Temperatur von

22 °C. Die Tiere hatten ad-libitum Zugang zu Wasser und Standard-Rattenfutter (Ssniff, Soest, Deutschland).

Alle Tierversuche wurden durch das in Nordrhein-Westfalen zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt (Aktenzeichen: 81-02-04.2018.A348) und wurden nach dessen Richtlinien durchgeführt. Alle operativen Eingriffe sowie die Portaldruckmessung und die Probengewinnung erfolgten in Allgemeinanästhesie mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (20 mg/kg Körpergewicht).

Im Rahmen des zweistufigen Modells (Fig. 1) wurde im ersten Schritt eine Leberzirrhose durch die im folgenden beschriebenen Zirrhosemodelle und deren jeweiligen Kontrollgruppen induziert. Nach vollständiger Ausbildung der Zirrhose wurde im zweiten Schritt ein standardisierter operativer Insult, zur Simulation einer extrahepatischen Operation, durchgeführt. Auch hier dienten unbehandelte Tiere als Kontrolle. Am zweiten und am siebten Tag nach diesem Insult erfolgte die Analyse der klinischen und laborchemischen Parameter.

Bei 35 Ratten wurde eine Gallengangsligatur (BDL) als cholestatisches Zirrhosemodell durchgeführt. Hierbei wurden nach einer Medianlaparotomie der Hauptgallengang der Ratte präpariert und freigelegt. Es wurden zwei Ligaturen gesetzt, der Gallengang dadurch verschlossen und anschließend im Bereich zwischen den Ligaturen durchtrennt. Dadurch wurde der Abfluss der in der Leber produzierten Galle behindert. Die Leberzirrhose entwickelte sich somit cholestatisch.

Eine toxische Leberzirrhose wurde durch die Inhalation von CCL<sub>4</sub> an 35 Ratten induziert und erfolgte zweimal wöchentlich über einen Gesamtzeitraum von 14 Wochen. Dabei wurde die Expositionsdauer jeweils um 30 Sekunden gesteigert, bis eine Gesamtdauer von fünf Minuten erreicht wurde (Woche 6). Die Tiere erhielten zusätzlich Phenobarbital über das Trinkwasser, welches als Cytochrom P450-Induktor den toxischen Effekt des Inhalats verstärkt, und somit als Fibroseakzelerator wirkt.

Als Kontrollgruppe erhielten 32 Ratten eine Partielle Pfortaderligatur (PPVL). Bei diesem Eingriff wird der Durchmesser der Pfortader auf eine definierte Größe von 22 Gauge verjüngt. Dafür wurde die Pfortader aufgesucht und mit dem Ligaturfaden angezügelt. Um

die Pfortader auf einen standardisierten Durchmesser zu verengen, wurde eine 22 Gauge Sonde verwendet. Die Sonde wurde an die Pfortader angelegt und anschließend zusammen mit der Pfortader ligiert. Nach erfolgter Lagekontrolle konnte die 22-Gauge Sonde entfernt werden. Die verbliebene Ligatur ließ nur den Maximaldurchmesser von 22 Gauge zu. Daraus resultierte eine Engstelle der Pfortader. Durch die partielle Ligatur wird eine portale Hypertension des Splanchnikusgebiets erzeugt. Damit stellt sie ein Modell für die nicht-zirrhotische portale Hypertension dar, bei der also eine portale Hypertension aber kein Leberschaden vorliegt.

Als weitere Kontrollen zur BDL-Gruppe erhielten 32 Ratten eine Scheinoperation (Sham), bei der nach einer Medianlaparatomie keine weiteren Eingriffe durchgeführt wurden. Hierdurch wurde eine Referenzgruppe erzeugt, die ebenfalls die Belastung des operativen Eingriffs mit Anästhesie, Medianlaparatomie und Hautnaht erhielt, bei der jedoch keine Zirrhose induziert wurde. Als Vergleichsgruppe zur CCL4-Gruppe diente eine Gruppe von 32 nativen Ratten, die weder einen operativen Eingriff noch eine Zirrhoseinduktion erhielten. Korrespondierend zu den Tieren der CCL4-Gruppe, inhalierten diese Ratten Raumluft (Gruppenbezeichnung: AIR) für den jeweils entsprechenden Zeitraum.

### 1.2.2 Operativer Insult am Tiermodell

Zur Simulation einer extrahepatischen Operation wurde das standardisierte Modell der intestinalen Manipulation (IM) verwendet, welches als etabliertes Tiermodell im Rahmen der Erforschung des postoperativen Ileus bereits langjährig etabliert ist (Chang et al., 2012).

Der Zeitpunkt des operativen Insults wurde in Abhängigkeit vom Zirrhosemodell nach Ausbildung der Leberzirrhose bzw. deren Kontrollgruppen induziert. Dies war bei der BDL- und Sham-Gruppe drei Wochen, bei der PPVL-Gruppe zwei Wochen nach Zirrhoseinduktion. Bei der CCL4-Gruppe sowie deren Kontrollgruppe (AIR) erfolgte die Exposition, wie bereits beschrieben, über einen Gesamtzeitraum von 14 Wochen. Der operative Insult wurde im Anschluss an die letzte CCL4-Inhalation durchgeführt.

Dabei erfolgte nach einer Medianlaparatomie die Eventration des Dünndarms und Blinddarms auf befeuchtete sterile Kompressen. Der gesamte eventrierte Intestinaltrakt wurde

daraufhin mit zwei sterilen Wattestäbchen standardisiert manipuliert (Moore et al., 2005). Anschließend wurden die entsprechenden Darmabschnitte in die Bauchhöhle zurückverlagert und die Bauchwand durch einen zweischichtigen Verschluss vernäht.

Bei der Kontrollgruppe zum operativen Insult erfolgte keine Darmoperation. Nach der Medianlaparatomie in Anästhesie (Gruppenbezeichnung: LAP) wurden keine weiteren Eingriffe durchgeführt und die Bauchwand durch einen zweischichtigen Verschluss vernäht.

### 1.2.3 Analysezeitpunkt und Messung der portalen Hämodynamik

Als Analysezeitpunkte für die Finalversuche wurde der zweite und siebte postoperative Tag ausgewählt um akute postoperative Reaktionen, wie inflammatorische oder laborchemische Veränderungen, von längerfristigen Auswirkungen, wie dem Progress der Leberfibrose abzugrenzen. Zudem konnten postoperative Auswirkungen, wie der Portaldruck, im longitudinalen Verlauf beobachtet werden. Die Analysezeitpunkte wurden weiterhin korrespondierend zu humanen Studiendaten ausgewählt, die unter anderem in der CANONIC-Studie angewandt wurden (Jalan et al., 2014).

Die Finalversuche wurden in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Hierbei erfolgte die Erhebung klinischer Daten, wie dem Körpergewicht, das über den gesamten Versuchszeitraum regelmäßig erhoben wurde. Weiterhin erfolgte die Gewinnung von Blut und Lebergewebsproben.

Die Messung des Portaldrucks erfolgte mittels Kanülierung der Pfortader mit einem Polyethylenkatheter (B. Braun, Melsungen, Deutschland). Die Pfortader wurde mittels Medianlaparatomie und Eventration des Dünndarms freigelegt und anschließend am distalen Abschnitt der Pfortader punktiert. Der Polyethylenkatheter wurde anschließend nach proximal verschoben, sodass er im Portalvenenabschnitt kurz vor Eintritt in die Leber positioniert wurde. Der Portaldruck wurde dann durch eine Sonde als Druckkurve für 5 Minuten durch PowerLab 8/35 sowie deren Software LabChart (ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) aufgezeichnet. Aus der aufgezeichneten Druckkurve wurden mehrere Zeitabschnitte ausgewertet. Deren Mittelwert wurde zur statistischen Analyse herangezogen.

#### 1.2.4 Molekulare Untersuchungen auf der Leber-Darm-Achse

Im Leberparenchym erfolgte eine Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts. Dazu wurden Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in Salzsäure aufgeschlossen und für 16 h bei 110 °C inkubiert und anschließend in Methanol gelöst. Daraufhin wurde die Probe mittels Chloramin T oxidiert. Die Messung erfolgte photometrisch durch den Nachweis des nach Zugabe von Ehrlich-Reagenz entstandenen Kondensationsprodukts.

Die Quantifizierung hepatischer Inflammations- und Fibroseexpression erfolgte mittels Isolation von mRNA aus Lebergewebsproben (Trebicka et al., 2007). Diese wurden durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch eine Echtzeit-PCR (real-time PCR) quantifiziert. Die Darstellung der Expression erfolgte nach der Delta-Delta CT Methode als das x-Fache der jeweiligen Referenzgruppe. Als endogene Kontrolle wurde 18S rRNA verwendet (Sup. Tab. 1). Zur Quantifizierung der Fibroseexpression diente der Fibroblasten-aktivierende Sternzellmarker alpha-SMA sowie der unspezifische Bindegewebsmarkers Kollagen-1.

Zur Messung der systemischen zirkulierenden Endotoxinkonzentration wurden die im Rahmen der Finalversuche gewonnenen Blutproben auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 verdünnt. Daraufhin wurden die gewonnene Lösung zur Standardlösung (Limulus Amebocyte Lysate Kit Chromogenic Endotoxin Quantification Kit, Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Germany) hinzugegeben und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Endotoxinkonzentration erfolgte anschließend photometrisch.

Die histologische Auswertung des Leberparenchyms erfolgte an Paraffinschnitten nach Siriusrot-Färbung anhand des prozentualen Anteils der positiv gefärbten Fläche. Hämatoxylin-Eosin Anfärbungen dienten zum Vergleich als morphologisches Korrelat. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Digitalmikroskop (Nikon Digital Sight DS-Vi1; Chiyoda, Tokyo, Japan) erstellt und anhand automatisierter Auswertung durch die ImageJ Software (National Institute of Health, Bethesda, USA) wie bei Brol et al. vorbeschrieben ausgewertet (2019).

Die Bestimmung klinischer Laborparameter erfolgte über das Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn mit den

Laboratoriumssystemen Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) und deren Modulen 8000 ISE, c502 und c702.

### 1.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse und die Erstellung der Graphen erfolgte mit Prism V.5.0 (Graph-Pad, San Diego, USA). Gruppenvergleiche erfolgten mittels t-Test wobei p-Werte von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurden.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Postoperative Mortalität und Aszitesentwicklung

Die Gesamtmortalität aller 166 am Tierversuch beteiligten Ratten betrug 10 (6 %). Unterteilt nach Gruppen lag die Mortalität in der BDL-Gruppe bei 6 (17,1 %) und in der CCL4-Gruppe bei 4 (11,4 %). Ein signifikanter Unterschied zwischen IM- oder LAP-Gruppen konnte nicht festgestellt werden. In den nicht-zirrhatischen Kontrolltieren (PPVL, Sham, AIR) waren keine Tode zu verzeichnen, auch nicht nach dem operativen Insult (IM bzw. LAP).

Eine Aszitesbildung in der BDL-Gruppe wurde innerhalb der ersten sieben Tage nach IM bei drei Tieren (43 %) bzw. nach LAP bei einem Tier (13 %,  $p = 0,3$ ) beobachtet. Auch bei der CCL4-Gruppe wiesen nach IM drei Tiere (38 %) bzw. nach LAP ein Tier (14 %,  $p = 0,5$ ) eine Aszitesbildung auf. Keins der Tiere aus PPVL- sowie den Kontrollgruppen (Sham, AIR) entwickelte Aszites.

### 1.3.2 Gewichtsentwicklung

Die unterschiedlichen Zirrhosemodelle (BDL und CCL4) sowie die nicht zirrhatische PPVL-Gruppe wiesen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der

Tiere auf. Alle drei behandelten Gruppen waren zum Zeitpunkt der Portaldruckmessung signifikant leichter im Vergleich zu deren Kontrollgruppen (Sham, AIR) (Sup. Fig. 1).

Auch nach dem operativen Insult mittels IM entwickelten die Tiere eine geringere Gewichtszunahme: Zwischen den IM und LAP Gruppen zeigte sich insbesondere bei den zirrhatischen Tieren sieben Tage nach IM ein erheblicher Gewichtsunterschied (BDL: IM - 8,4 %  $\pm$  3,0 vs. LAP - 4,5 %  $\pm$  4,0,  $p = 0,03$ ; CCL4: IM - 10,7 %  $\pm$  2,2 vs. LAP - 1,2 %  $\pm$  0,3,  $p = 0,005$ ) (Tab. 1B, Tab. 1D). Bei PPVL waren zwischen IM und LAP Gruppen kein signifikanter Unterschied nach dem jeweiligen Eingriff zu verzeichnen (Tab. 1E-F).

### 1.3.3 Laborchemische Untersuchungen der Leberfunktion

In der BDL-Gruppe konnte zwei Tage nach IM ein vorübergehend signifikanter Anstieg vom Ammoniakspiegel im Vergleich zur LAP-Gruppe beobachtet werden, der zum Zeitpunkt nach sieben Tagen nicht mehr vorlag (Tab. 1B).

Sieben Tage nach IM zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Alkalischen Phosphatase (ALP) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie eine verminderte Albuminkonzentration im Vergleich zur Tieren, die eine LAP erhalten hatten (Tab. 1A).

Ratten der CCL4-Gruppe wiesen zwei Tage nach IM keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Laborparameter auf (Tab. 1C). Sieben Tage nach IM zeigte sich jedoch eine signifikante Steigerung der Transaminasen sowie eine erniedrigte Albuminkonzentration im Vergleich zur entsprechenden LAP-Gruppe (Tab 1D).

Bei der nicht-zirrhatischen PPVL-Gruppe zeigte sich zwei Tage nach IM ein signifikanter Anstieg der AST (Tab. 1E) im Vergleich zur Kontrollgruppe (LAP). Weitere signifikanten Unterschiede zeigten sich in dieser Gruppe auch nach sieben Tagen nicht (Tab. 1E, Tab. 1F). Auch in den Kontrollgruppen (Sham, AIR) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede nach IM im Vergleich zur LAP-Gruppe (Tab. 1A-E).



#### 1.3.4 Entwicklung der Leberfibrose nach IM

In den zirrhotischen Tiergruppen (BDL und CCL4) konnte zwei Tage nach IM kein signifikanter Unterschied des Fibrosegehalts dargestellt werden. Sieben Tage nach IM zeigte sich jedoch in der BDL-Gruppe eine signifikant höhere Hydroxyprolinkonzentration im Vergleich zur LAP-Gruppe (IM  $638,9 \pm 66,35 \mu\text{g/g}$  vs. LAP  $374 \pm 41,39 \mu\text{g/g}$ ;  $p = 0,0096$ ). Auch histologisch zeigte sich eine signifikant größere positiv angefärbte Fläche mittels Siriusrot (IM  $30,87 \pm 0,57 \%$  vs. LAP  $27,32 \pm 1,49 \%$ ,  $p = 0,0207$ ) im Vergleich zur LAP-Gruppe ohne Darmoperation (Fig. 2A, Fig. 2B). Weiterhin zeigten sich im Lebergewebe sieben Tage nach IM eine elevierte mRNA-Expression des Fibroblasten-aktivierenden Sternzellmarkers alpha-SMA sowie des unspezifischen Bindegewebsmarkers Kollagen-1 (Fig. 2C).

Bei der CCL4-Gruppe konnte sieben Tage nach IM bis auf eine leicht erhöhte mRNA-Expression von alpha-SMA, kein Unterschied im Fibrosegehalt mittels Siriusrotfärbung, Hydroxyprolinkonzentration oder der Kollagen-1 mRNA-Expression festgestellt werden.

In den nicht-zirrhotischen Gruppen zeigte sich kein Unterschied im Fibrosegehalt zwischen IM- und LAP-Gruppen.

#### 1.3.5 Portaldruck

Der Portaldruck der BDL-Gruppe zeigte sich nach IM sowohl am zweiten als auch am siebten postoperativen Tag signifikant erhöht im Vergleich zur LAP-Gruppe (Fig. 3). Auch bei der CCL4-Gruppe konnte dieser Effekt zu beiden Analysezeitpunkten nachgewiesen werden (Fig. 3). Bei der PPVL-Gruppe zeigte sich erwartungsgemäß eine PHT in allen Untergruppen, die auf die partielle Pfortaderligatur zurückzuführen ist. Signifikante Unterschiede zwischen LAP und IM sowie zwischen den jeweiligen Zeitpunkten konnten innerhalb der PPVL-Gruppe nicht nachgewiesen werden.

Die Kontrollgruppen (AIR, Sham) zeigten keine portale Hypertension. Auch nach IM kam es zu keinem signifikanten Anstieg im Vergleich zur jeweiligen LAP-Gruppe.

### 1.3.6 Intrahepatische Inflammationsmarker und Endotoxinzirkulation

Die Quantifizierung hepatischer Inflammationsexpression mittels Bestimmung von mRNA aus Lebergewebsproben zeigte am zweiten postoperativen Tag in den zirrhotischen Modellen (BDL, CCL4) zunächst keinen signifikanten Unterschied zwischen IM und LAP. In der BDL-Gruppe kam es sieben Tage nach IM jedoch zu einem signifikanten Anstieg intrahepatischer Inflammationsmarker (TGF-beta, IL-6, IL-1b, TNF-alpha, CCL2, EMR-1 und TLR-4) im Vergleich zur LAP-Kontrollgruppe (Fig. 4). In der CCL4-Gruppe zeigte sich sieben Tage nach IM ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Expression von Interleukin 6 (IL-6) im Leberparenchym im Vergleich zur LAP-Kontrolle.

In den Kontrollgruppen (PPVL, AIR, Sham) war zu beiden Analysezeitpunkten kein Unterschied der Leberinflammation zwischen IM und LAP nachzuweisen.

Die Endotoxinkonzentration, als Marker für die bakterielle Translokation, zeigte keinen Unterschied zwischen IM- und LAP-Gruppen (Sup. Fig. 4) sowie zwischen portaler und systemischer Blutproben. Jedoch konnten signifikant erhöhte Endotoxinkonzentrationen der zirrhotischen Gruppen (BDL, CCL4) im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe (Sham, Air) nachgewiesen werden (Sup. Fig. 4).

## 1.4 Diskussion

Die postoperative Dekompensation bei Patienten mit Leberzirrhose stellt nach wie vor eine Herausforderung für das klinische Vorgehen bei der Betreuung dieses Patientenkontingents und für die Forschung dar (Friedmann, 2010).

In Vorarbeiten, an denen ich beteiligt war, konnte gezeigt werden, dass sogar elektive Operationen bei Patienten mit Leberzirrhose ein Auslöser für ACLF sein können. Diese Daten suggerieren einen zurückhaltenden Einsatz von elektiven Eingriffen bei Patienten mit Leberschädigung. Nur ein CLIF-C AD Risikoscore von unter <50 bietet einen Spielraum für elektive Operationen (Chang et al., 2021).

Jedoch wird das Patientenkollektiv mit Leberzirrhose älter und die Anzahl der notwendigen Operationen steigt. Daher ist es wichtig, zugrundeliegende Pathomechanismen zu erforschen, um eine bessere Risikostratifizierung für diese Patienten zu gewährleisten. Auch die Etablierung von präklinischen Modellen zur Erforschung des zugrundeliegenden Pathomechanismus ist von immenser Wichtigkeit.

In unserer Arbeit konnte erstmalig ein reproduzierbares Tiermodell zur Erforschung der postoperativen Dekompensation sowie der Rolle der PHT und der systemischen Inflammation im Kontext der operativen Eingriffe bei Leberzirrhose entwickelt werden.

Die wichtigste Erkenntnis der Arbeit ist, dass ein signifikant erhöhter Portaldruck infolge eines operativen Insults mittels intestinaler Manipulation (IM) bei Ratten mit Leberzirrhose gezeigt werden konnte. Zu beiden Analysezeitpunkten am zweiten und am siebten Tag nach IM zeigten sich sowohl bei der toxischen Leberzirrhose (CCL4) als auch bei der cholestatisch induzierten Leberzirrhose (BDL) ein Anstieg des Portaldrucks. Diese Ergebnisse suggerieren, dass bei der Entstehung einer postoperativen Dekompensation der Portaldruck eine entscheidende Rolle spielt. Auch im klinischen Alltag entstehen Dekompensationsereignisse in der Mehrheit der Fälle auf dem Boden einer PHT (Ferstl und Trebicka, 2021). Außerdem ist die PHT eng mit der perioperativen Mortalität assoziiert (de Goede et al., 2012). Auch eine neuere Studie zeigte den Stellenwert des portosystemischen Druckgradienten als prognostischen Faktor für die postoperative Mortalität (Reverter et al., 2019). So beschreibt Reverter et al. (2019) eine bessere perioperative Prognose bei einem präoperativen Portaldruck unter 16 mmHg.

Eine 2022 erschienene Studie unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine präoperative TIPS-Anlage, das Risiko für ein ACLF und der Mortalität senkt (Chang et al., 2022). Diese Daten zeigen, dass der Senkung des Portaldrucks eine entscheidende therapeutische Rolle zufällt. Außerdem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der Portaldruck zur Beurteilung der Operationseignung einbezogen werden sollte.

Im Hinblick auf das durch uns entwickelte Tiermodell ist der signifikante Portaldruckanstieg als entscheidendes Herausstellungsmerkmal und Stärke dieses Tiermodells zu beurteilen, da dieses zur Erforschung von therapeutischen Angriffspunkten zur Senkung des

Portaldruckes genutzt werden kann und somit dazu beitragen kann, Hinweise für die Optimierung einer perioperativen Gesamtstrategie, auch übertragen auf den Menschen, zu entwickeln.

Dass der Portaldruck zwar bei den zirrhotischen Ratten (BDL, CCL4) ansteigt, nicht aber bei der PPVL-Gruppe, könnte darauf hinweisen, dass die Entstehung der PHT auch im Rahmen einer systemischen Inflammation stattfindet. Diese Hypothese wird durch die Messung signifikant erhöhter Inflammationsmarker nach IM gestützt. In klinischen Studien wurde bereits der Zusammenhang zwischen systemischer Inflammation und dem porto-systemischen Druckgradienten beschrieben (Praktiknjo et al., 2020). Auch das ACLF ist durch eine massive systemische Inflammation charakterisiert (Ferstl und Trebicka, 2021; Trebicka et al., 2019).

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass Dekompensationsereignisse im Tiermodell nur bei zirrhotischer PHT stattfinden, nicht aber bei nicht-zirrhotischer PHT, wie beispielsweise beim Modell der PPVL als Modell der nicht-zirrhotischen portalen Hypertension (Garcia-Tsao et al., 1993). Diese Erkenntnisse konnten in unseren Daten zur PPVL-Gruppe bestätigt werden. Auch humane Forschungsergebnisse zeigen, dass Patienten mit nicht zirrhotischer PHT eine bessere perioperative Prognose haben (Elkrief et al., 2019).

Unsere Daten weisen in beiden zirrhotischen Modellen einen Anstieg der Endotoxinkonzentration auf, welcher allerdings nicht bei der PPVL-Gruppe vorliegt. Zur Erforschung des Einflusses einer bakteriellen Translokation nach dem operativen Insult durch IM bedarf es daher weiterer Forschung. Auch die je nach Tiermodell unterschiedlichen Inflammationsreaktionen nach IM sind auf Grundlage unseres Modells weiter zu untersuchen.

Demgegenüber ist bekannt, dass es durch die IM zu einer Barrierestörung der Darmwand mit Freisetzung von proinflammatorischen Extrazellulärmatrixfragmenten kommt, die eine lokale Inflammationsreaktion hervorrufen (Bortscher et al., 2012; Chang et al., 2012; Lehmann et al., 2019). Diese bewirkt im Gegensatz zur bakteriellen Translokation eine sterile

Inflammation. Auch dieser Mechanismus hat möglicherweise durch die IM einen proinflammatorischen Effekt auf die Leber. Dadurch wird die hepatische Dekompensation und konsekutiv der Progress der Fibrose begünstigt.

In unseren Daten zeigten sich in der BDL Gruppe ein stärkerer Progress der Leberfibrose sieben Tage nach IM im Vergleich zur LAP-Gruppe, was sich in einem signifikant höheren Hydroxyprolinegehalt im Leberparenchym sowie die Hochregulation von Typ I-Kollagen widerspiegelt. Da systemische oder portale Extrazellulärmatrixfragmente sowie Schübe bei der Kollagenfreisetzung bereits in klinischen Studien mit einem schlechteren Outcome assoziiert gezeigt wurden (Leeming et al., 2013, 2015; Lehmann et al., 2019), legt dies die Vermutung nahe, dass insbesondere im cholestatischen Zirrhosemodell ein solcher Effekt vorliegen könnte.

Das BDL-Modell scheint durch den postoperativen Fibroseprogress und den Anstieg der hepatischen Inflammationsexpression sieben Tage nach IM sowie den Anstieg der Transaminasen und Ammoniak am zweiten postoperativen Tag, die klinische Situation von postoperativen Patienten am besten widerzuspiegeln.

Insgesamt konnten durch das von uns etablierte Tiermodell entscheidende Erkenntnisse bei der Erforschung der postoperativen Dekompensation bei Leberzirrhose gewonnen werden, wenngleich es weiterer Studien zur Entschlüsselung des zugrundeliegenden Pathomechanismus bedarf. Insbesondere die Rolle der bakteriellen Translokation, sollte in künftigen Forschungsarbeiten beleuchtet werden. Weiterhin sollten sich nachfolgende Studien auch auf therapeutische Angriffspunkte konzentrieren. Aufgrund unserer ersten tierexperimentellen Daten scheinen insbesondere die Senkung des Portaldrucks sowie die Anwendung antiinflammatorischer oder antiinfektiver Therapeutika erfolgsversprechende Ansätze zu sein.

## 1.5 Zusammenfassung

Die Leberzirrhose ist eine Belastung der Gesundheitssysteme weltweit und macht einen erheblichen Anteil der weltweiten Sterblichkeit aus. Dabei ist der prognostische Verlauf grundlegend vom Auftreten einer akuten Dekompensation abhängig: Während sich eine kompensierte Leberzirrhose auch subklinisch präsentieren kann, geht die akute Dekompensation und insbesondere das sogenannte akut-auf-chronische Leberversagen mit einer schwerwiegenden klinischen Symptomatik einher, die häufig zur Hospitalisierung führt. Als Auslöser für eine akute Dekompensation bzw. eines akut-auf-chronischen Leberversagens wurde in der Vergangenheit auch ein vorangegangener operativer Insult identifiziert, wenngleich der zugrundeliegende Pathomechanismus noch weitestgehend unerforscht ist.

Zur präklinischen Erforschung dieses Pathomechanismus wurde ein zweistufiges Tiermodell an der Ratte etabliert. Im ersten Schritt wurde eine Leberzirrhose durch bereits bekannte Zirrhosemodelle a) cholestatisch, durch eine Gallengangsligatur (BDL-Gruppe) und b) toxisch, mittels Tetrachlormethan-Inhalation (CCL4-Gruppe) induziert. Neben der partiellen Pfortaderligatur (PPVL-Gruppe), als Modell der nicht zirrhatischen portalen Hypertension, dienten unbehandelte Gruppen (Sham- und AIR-Gruppe) als weitere Kontrollgruppen. Im zweiten Schritt wurde ein extrahepatischer operativer Insult mittels intestinaler Manipulation durchgeführt. Als Kontrollgruppe zur intestinalen Manipulation erhielt eine Gruppe nur eine Medianlaparatomie (LAP-Gruppe) ohne weiteren operativen Insult. Am zweiten und am siebten postoperativen Tag wurden im Rahmen der Analysezeitpunkte Blut und Lebergewebsproben gewonnen. Zudem erfolgte eine kathetergesteuerte Messung des Portaldrucks.

Bei der cholestatischen BDL-Gruppe zeigte sich zwei und sieben Tage nach intestinaler Manipulation eine signifikante Erhöhung des Portaldrucks im Vergleich zur Kontrollgruppe (LAP-Gruppe). Am zweiten postoperativen Tag konnte ein signifikanter Anstieg der Transaminasen und Ammoniak gemessen werden. Weiterhin konnte ein postoperativer Fibroseprogress und der Anstieg der hepatischen Inflammationsexpression am siebten postoperativen Tag nach intestinaler Manipulation nachgewiesen werden. Bei der toxi-

schen CCL4-Gruppe konnte ebenfalls ein erhöhter Portaldruck zu beiden Analysezeitpunkten dargestellt werden. Ein Fibroseprogress zeigte sich sieben Tage nach intestinaler Manipulation nicht, jedoch konnte ein Anstieg der Transaminasen sowie eine erhöhte Expression von alpha-SMA und Interleukin-6 gezeigt werden. Bei der partiellen Pfortaderligatur (PPVL-Gruppe) als nicht-zirrhotoser Kontrollgruppe zeigte sich erwartungsgemäß ein insgesamt erhöhter Portaldruck. Unterschiede zwischen intestinaler Manipulation und Kontrollgruppe (LAP-Gruppe) im Hinblick auf Portaldruck, Inflammation und hepatischer Fibrose zeigten sich nicht. Auch die weiteren Kontrollgruppen (Sham- und AIR-Gruppe) zeigten einen unauffälligen Verlauf nach intestinaler Manipulation.

Auf Grundlage unserer Daten scheint das cholestatische Zirrhosemodell mittels Gallengangsligatur (BDL-Gruppe) in Kombination mit der intestinalen Manipulation ein gutes präklinisches Modell zu sein den klinischen postoperativen Zustand von Patienten mit Leberzirrhose zu beschreiben. Insgesamt war die Etablierung eines präklinischen Modells zur Erforschung der postoperativen Dekompensation bei Leberzirrhose erfolgreich. Insbesondere der Anstieg des Portaldrucks ermöglicht die Erforschung von therapeutischen Angriffspunkten zur Portaldrucksenkung anhand dieses Modells.

## 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Angeli P, Bernardi M, Villanueva C, Francoz C, Mookerjee RP, Trebicka J, Krag A, Laleman W, Gines P. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2018; 69: 406-460

Bajaj JS, Reddy KR, Tandon P, Wong F, Kamath PS, Garcia-Tsao G, Maliakkal B, Biggins SW, Thuluvath PJ, Fallon MB, Subramanian RM, Vargas H, Thacker LR, O'Leary JG, North American Consortium for the Study of End-Stage Liver Disease. The 3-month readmission rate remains unacceptably high in a large North American cohort of patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2016; 64: 200-208

Bortscher S, Chang J, Vilz TO, Schäfer N, Sommer N, Wehner S, Kalff JC, Overhaus M. Hemin induction of HO-1 protects against LPS-induced septic ileus. *J Surg Res.* 2012; 178(2): 866-873

Brol MJ, Rösch F, Schierwagen R, Magdaleno F, Uschner FE, Manekeller S, Queck A, Schwarzkopf K, Odenthal M, Drebber U, Thiele M, Lingohr P, Plamper A, Kristiansen G, Lotersztajn S, Krag A, Klein S, Rheinwalt KP, Trebicka J. Combination of CCl<sub>4</sub> with alcoholic and metabolic injuries mimics human liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2019; 317(2): G182-G194

Chang J, Bamarni A, Böhling N, Zhou X, Klein LM, Meinke J, Duerr GD, Lingohr P, Wehner S, Brol MJ, Rockstroh JK, Kalff JC, Manekeller S, Meyer C, Spengler U, Jansen C, Arroyo V, Strassburg CP, Trebicka J, Praktiknjo M. Elective Surgery but not Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt Precipitates Acute-On-Chronic Liver Failure. *Hepatol Commun.* 2021; 5(7): 1265-1277

Chang J, Höfer P, Böhling N, Lingohr P, Manekeller S, Kalff JC, Dohmen J, Kaczmarek DJ, Jansen C, Meyer C, Strassburg CP, Trebicka J, Praktiknjo M. Preoperative TIPS prevents the development of postoperative acute-on-chronic liver failure in patients with high CLIF-C AD score. *JHEP Rep.* 2022; 4(3) 100442: 1-10

Chang J, Wehner S, Schäfer N, Sioutis, Bortscher S, Hirner A, Kalff JC, Bauer AJ, Overhaus M. Iatrogenic extracellular matrix disruption as a local trigger for postoperative ileus. *J Surg Res.* 2012; 178(2): 632-639

Elkrief L, Ferrusquia-Acosta J, Payancé A, Moga L, Tellez L, Praktiknjo M, Procopet B, Farcau O, Lédinghen VD, Yuldashev R, Tabchouri N, Barbier L, Dumortier J, Menahem B, Magaz M, Hernández-Gea V, Albillos A, Trebicka J, Spahr L, Gottardi AD, Plessier A, Valla D, Rubbia-Brandt L, Toso C, Bureau C, Garcia-Pagan JC, Rautou PE. Abdominal Surgery in Patients With Idiopathic Noncirrhotic Portal Hypertension: A Multicenter Retrospective Study. *Hepatology.* 2019; 70(3): 911-924

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* 2018; 69(2): 406-460



Ferstl P, Trebicka J. Acute Decompensation and Acute-on-Chronic Liver Failure. *Clin Liver Dis.* 2021; 25(2): 419-430

Friedman LS. Surgery in the patient with liver disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2010; 121: 192-204

Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology.* 1993; 17(6): 1081-1085

GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020; 5(3): 245-266

Ge PS, Runyon BA. Treatment of Patients with Cirrhosis. *N Engl J Med.* 2016; 375(8): 767-777

Gu W, Hortlik H, Erasmus HP, Schaaf L, Zeleke Y, Uschner FE, Ferstl P, Schulz M, Peiffer KH, Queck A, Sauerbruch T, Brol MJ, Rohde G, Sanchez C, Moreau R, Arroyo V, Zeuzem S, Welsch C, Trebicka J. Trends and the course of liver cirrhosis and its complications in Germany: Nationwide population-based study (2005 to 2018). *Lancet Reg Health Eur.* 2022; 12: 100240-100256

Jalan R, Saliba F, Pavesi M, Amoros A, Moreau R, Ginès P, Levesque E, Durand F, Angeli P, Caraceni P, Hopf C, Alessandria C, Rodriguez E, Solis-Muñoz P, Laleman W, Trebicka J, Zeuzem S, Gustot T, Mookerjee R, Elkrief L, Soriano G, Cordoba J, Morando F, Gerbes A, Agarwal B, Didier S, Bernardi M, Arroyo V, CANONIC study investigators of the EASL-CLIF Consortium. Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol.* 2014; 61(5): 1038-1047

Klein LM, Chang J, Gu W, Manekeller S, Jansen C, Lingohr P, Praktiknjo M, Kalff JC, Schulz M, Spengler U, Strassburg CP, Cárdenas A, Arroyo V, Trebicka J. The Development and Outcome of Acute-on-Chronic Liver Failure After Surgical Interventions. *Liver Transpl.* 2020; 26(2): 227-237

Leeming DJ, Karsdal MA, Byrjalsen I, Bendtsen F, Trebicka J, Nielsen MJ, Christiansen C, Møller S, Krag A. Novel serological neo-epitope markers of extracellular matrix proteins for the detection of portal hypertension. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013; 38(9): 1086-1096

Leeming DJ, Veidal SS, Karsdal MA, Nielsen MJ, Trebicka J, Busk T, Bendtsen F, Krag A, Møller S. Pro-C5, a marker of true type V collagen formation and fibrillation, correlates with portal hypertension in patients with alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol.* 2015; 50(5): 584-592.

Lehmann J, Praktiknjo M, Nielsen MJ, Schierwagen R, Meyer C, Thomas D, Violi F, Strassburg CP, Bendtsen F, Møller S, Krag A, Karsdal MA, Leeming DJ, Trebicka J. Collagen type IV remodelling gender-specifically predicts mortality in decompensated cirrhosis. *Liver Int.* 2019; 39(5): 885-893

Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP, Schwabe RF. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun.* 2013; 4:2823: 1-21

Moore BA, Overhaus M, Whitcomb J, Ifedigbo E, Choi AM, Otterbein LE, Bauer AJ. Brief inhalation of low-dose carbon monoxide protects rodents and swine from postoperative ileus. *Critical care medicine* 2005; 33: 1317-1326

Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V, CANONIC Study Investigators of the EASL–CLIF Consortium. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology.* 2013; 144(7): 1426-1437

Reverter E, Cirera I, Albillos A, Debernardi-Venon W, Abraldes JG, Llop E, Flores A, Martínez-Palli G, Blasi A, Martínez J, Turon F, García-Valdecasas JC, Berzigotti A, de Lacy AM, Fuster J, Hernández-Gea V, Bosch J, García-Pagán JC. The prognostic role of hepatic venous pressure gradient in cirrhotic patients undergoing elective extrahepatic surgery. *J Hepatol.* 2019; 71(5): 942-950

Trebicka J, Amoros A, Pitarch C, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Schierwagen R, Deulofeu C, Fernandez-Gomez J, Piano S, Caraceni P, Oettl K, Sola E, Laleman W, McNaughtan J, Mookerjee RP, Coenraad MJ, Welzel T, Steib C, Garcia R, Gustot T, Rodriguez Gandia MA, Bañares R, Albillos A, Zeuzem S, Vargas V, Saliba F, Nevens F, Alessandria C, de Gottardi A, Zoller H, Ginès P, Sauerbruch T, Gerbes A, Stauber RE, Bernardi M, Angeli P, Pavesi M, Moreau R, Clària J, Jalan R, Arroyo V. Addressing Profiles of Systemic Inflammation Across the Different Clinical Phenotypes of Acutely Decompensated Cirrhosis. *Front Immunol.* 2019;10:476: 128-139

Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology.* 2007; 46(1): 242- 253

## 2. Veröffentlichung



ORIGINAL RESEARCH  
published: 20 August 2021  
doi: 10.3389/fphys.2021.720898

# Extrahepatic Surgery in Cirrhosis Significantly Increases Portal Pressure in Preclinical Animal Models



Johannes Chang<sup>1†</sup>, Jonathan Meinke<sup>1†</sup>, Moritz Geck<sup>1</sup>, Marc Hebest<sup>1</sup>, Nina Böhling<sup>1</sup>, Ramona Dolscheid-Pommerich<sup>2</sup>, Birgit Stoffel-Wagner<sup>2</sup>, Glen Kristiansen<sup>3</sup>, Marcus Overhaus<sup>4</sup>, Leon O. Peyman<sup>1</sup>, Sabine Klein<sup>5</sup>, Frank E. Uschner<sup>5</sup>, Maximilian J. Brol<sup>5</sup>, Tim O. Vilz<sup>6</sup>, Philipp Lingohr<sup>6</sup>, Jörg C. Kalff<sup>6</sup>, Christian Jansen<sup>1</sup>, Christian P. Strassburg<sup>1</sup>, Sven Wehner<sup>6‡</sup>, Jonel Trebicka<sup>5,7‡</sup> and Michael Praktiknjo<sup>1\*‡</sup>

## OPEN ACCESS

Edited by:  
Pavel Strnad,

University Hospital RWTH  
Aachen, Germany

Reviewed by:  
Oriol Juanola,

University of Italian  
Switzerland, Switzerland  
Savio George Barreto,  
Flinders Medical Centre, Australia

\*Correspondence:  
Michael Praktiknjo  
michael.praktiknjo@ukbonn.de

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share first  
authorship

<sup>‡</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share last  
authorship

Specialty section:  
This article was submitted to  
Gastrointestinal Sciences,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

Received: 05 June 2021

Accepted: 27 July 2021

Published: 20 August 2021

Citation:

Chang J, Meinke J, Geck M,  
Hebest M, Böhling N,  
Dolscheid-Pommerich R,  
Stoffel-Wagner B, Kristiansen G,  
Overhaus M, Peyman LO, Klein S,  
Uschner FE, Brol MJ, Vilz TO,  
Lingohr P, Kalff JC, Jansen C,  
Strassburg CP, Wehner S, Trebicka J  
and Praktiknjo M (2021) Extrahepatic  
Surgery in Cirrhosis Significantly  
Increases Portal Pressure in Preclinical  
Animal Models.  
*Front. Physiol.* 12:720898.  
doi: 10.3389/fphys.2021.720898

<sup>1</sup> Department of Internal Medicine 1, Center for Cirrhosis and Portal Hypertension Bonn (CCB), University Hospital Bonn, Bonn, Germany, <sup>2</sup> Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany, <sup>3</sup> Institute of Pathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany, <sup>4</sup> Department of Visceral Surgery, Malteser Hospital Sankt Hildegardis, Cologne, Germany, <sup>5</sup> Translational Hepatology, Department of Internal Medicine 1, University of Frankfurt, Frankfurt, Germany, <sup>6</sup> Department of Surgery, University of Bonn, Bonn, Germany, <sup>7</sup> European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure, Barcelona, Spain

**Background:** Liver cirrhosis is a relevant comorbidity with increasing prevalence. Postoperative decompensation and development of complications in patients with cirrhosis remains a frequent clinical problem. Surgery has been discussed as a precipitating event for decompensation and complications of cirrhosis, but the underlying pathomechanisms are still obscure. The aim of this study was to analyze the role of abdominal extrahepatic surgery in cirrhosis on portal pressure and fibrosis in a preclinical model.

**Methods:** Compensated liver cirrhosis was induced using tetrachlormethane (CCL4) inhalation and bile duct ligation (BDL) models in rats, non-cirrhotic portal hypertension by partial portal vein ligation (PPVL). Intestinal manipulation (IM) as a model of extrahepatic abdominal surgery was performed. 2 and 7 days after IM, portal pressure was measured *in-vivo*. Hydroxyproline measurements, Sirius Red staining and qPCR measurements of the liver were performed for evaluation of fibrosis development and hepatic inflammation. Laboratory parameters of liver function in serum were analyzed.

**Results:** Portal pressure was significantly elevated 2 and 7 days after IM in both models of cirrhosis. In the non-cirrhotic model the trend was the same, while not statistically significant. In both cirrhotic models, IM shows strong effects of decompensation, with significant weight loss, elevation of liver enzymes and hypoalbuminemia. 7 days after IM in the BDL group, Sirius red staining and hydroxyproline levels showed significant progression of fibrosis and significantly elevated mRNA levels of hepatic inflammation compared to the respective control group. A progression of fibrosis was not observed in the CCL4 model.

**Conclusion:** In animal models of cirrhosis with continuous liver injury (BDL), IM increases portal pressure, and development of fibrosis. Perioperative portal pressure and hence inflammation processes may be therapeutic targets to prevent post-operative decompensation in cirrhosis.

**Keywords:** surgery, acute decompensation, cirrhosis, ACLF, portal pressure, HVPG, intestinal manipulation

## INTRODUCTION

Liver cirrhosis is the common end-stage of chronic liver diseases. Acute decompensation (AD) such as variceal bleeding, refractory ascites, hepatorenal syndrome, or hepatic encephalopathy can develop and define advanced stages (Angeli et al., 2018). AD may also precipitate acute-on-chronic liver failure (ACLF), a distinct syndrome recently characterized in the CANONIC- and PREDICT-study (Moreau et al., 2013; Gustot et al., 2015; Trebicka et al., 2019, 2020a,b). ACLF is defined by the development of multiorgan failure resulting in high short-term mortality.

Postoperative decompensation of cirrhosis is a well-known but still unsolved problem in surgery. Even though there has been substantial progress in the fields of hepatology and surgery in managing patients with cirrhosis, surgery-associated AD and mortality remains high and correlates with severity of liver disease (Friedman, 2010; de Goede et al., 2012). Recently, the role of surgery as a precipitating event for ACLF development has been characterized, resulting in high rates of ACLF development even after electively performed surgical procedures (Klein et al., 2020; Chang et al., 2021). Therefore, in many hospitals, with the presence of cirrhosis especially in advanced stages is considered a contraindication for all kinds of surgery.

Clinically significant portal hypertension has been associated with increased numbers of episodes of acute decompensation after hepatic surgery (Bruix et al., 1996). In a recent prospective study, hepatic venous pressure gradient (HVPG) has also been described as a predictor for mortality after extrahepatic surgery, indicating that optimization of portal hypertension might be the key to improve postoperative outcome (Reverter et al., 2019). However, data about underlying mechanisms of post-operative decompensation and characterization of portal pressure in the pre- and post-operative period are at best scarce and thus need to be studied more to shed light on the pathophysiology involved in the post-operative development of AD and ACLF.

In this context, preclinical models to characterize proinflammatory downstream signaling and portal hemodynamics that help to understand the pathophysiology of post-operative decompensation of cirrhosis are needed. This study aimed to establish a preclinical model of extrahepatic abdominal surgery in animal models of portal hypertension and to study consecutive changes of portal pressure and liver fibrosis.

**Abbreviations:** 18s rRNA, Eukaryotic 18S ribosomal ribonucleic acid; ACLF, acute-on-chronic liver failure; AD, acute decompensation; ALB, albumin; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BDL, bile-duct ligation; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; CCL4, tetrachlormethane; cDNA, complementary desoxyribonucleic acid; CTP, Child-Turcotte-Pugh; EMR-1, EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 1; HE, hematoxylin and eosin; HVPG, hepatic venous pressure gradient; i.p., intraperitoneal; ICU, intensive care unit; IL-6, interleukin 6; IL1b, interleukin 1 beta; IM, intestinal manipulation; LAP, median laparotomy; mRNA, messenger ribonucleic acid; PE, Polyethylen; qPCR, real-time polymerase chain reaction; TGF-beta, transforming growth factor beta 1; TIPS, transjugular portosystemic shunt; TLR-4, toll-like receptor 4; TNF-alpha, tumor necrosis factor alpha; TP, total protein.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Experiments

Specific pathogen-free male Sprague Dawley rats were used for this study. Animals were acquired from Charles-River (Sulzfeld, Germany) and maintained in the animal facility at the University Clinic of Bonn, Department for Experimental Therapy in individually ventilated cages with a 12:12-h day-night cycle at 22 °C. Water and chow were provided *ad libitum*. Animal studies were performed in accordance with the German Animal Welfare Act and standard operation procedures of the Laboratory of Liver Fibrosis and Portal Hypertension and the animal care facility. Studies were approved by the Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV, Reference: 81-02-04.2018.A348). Animals were sufficiently handled before all operations and received sufficient pain medication after all operations. When reaching human endpoint the experiment was stopped and animals were euthanized.

### Establishing a Preclinical Model of Extrahepatic Abdominal Surgery in Cirrhosis and Non-cirrhotic Portal Hypertension

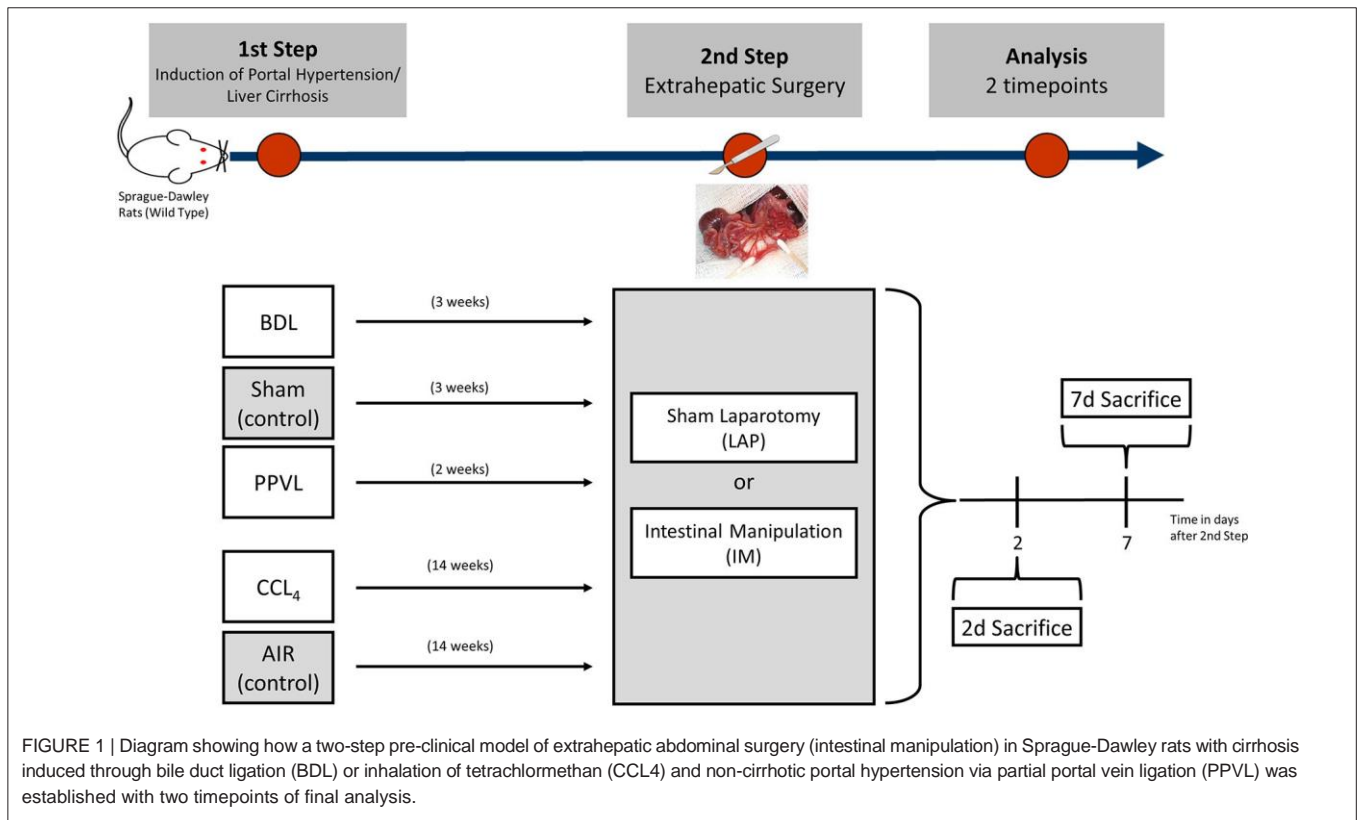
A two-step animal model of extrahepatic abdominal surgery was established. Cirrhosis was induced via bile duct ligation (BDL) and CCL4-intoxication via inhalation, non-cirrhotic portal hypertension via partial portal vein ligation (PPVL) as previously described (Uschner et al., 2015; Klein et al., 2017). 3 weeks after BDL or PPVL and 14 weeks after CCL4-intoxication (stage of compensated cirrhosis) intestinal manipulation (IM) was performed as previously described (Bortscher et al., 2012; Chang et al., 2012). 2 and 7 days after IM *in-vivo* portal pressure measurement was performed according to established protocol. Animals were then sacrificed and harvested. The experimental design is shown in **Figure 1**.

### Bile Duct Ligation (BDL)

BDL was performed as previously described in a sterile environment (Uschner et al., 2015; Klein et al., 2017). In short, the common bile duct was ligated twice and dissected between the two ligatures to induce cholestatic cirrhosis. Sham animals received a median laparotomy (group name: Sham). All BDL procedures were performed by the same individual.

### CCL4-Inhalation

Inhalation with CCL4 (abcr, Karlsruhe, Germany) was started at the age of 4 weeks (80–100 g body weight) and performed as previously described (Klein et al., 2017; Brol et al., 2019). Inhalation was done twice a week in growing intervals of 30 s. Reaching 5 min, animals inhaled CCL4 until week 14 (stage of compensated cirrhosis). All animals received phenobarbital (0.33 g/l) via drinking water for induction of cytochrome P-450 metabolic activity starting from 1 week before CCL4 inhalation until animal sacrifice. Inhalation was stopped 3 days before IM as a model of toxic cirrhosis with removal of the injuring agent. Age-matched animals without CCL4 inhalation served as controls (group name: AIR).



### Partial Portal Vein Ligation (PPVL)

To induce non-cirrhotic portal hypertension via PPVL, the portal vein was ligated around a 22 G needle. After ligation, the 22 G needle was removed immediately, resulting in a smaller diameter of the portal vein with consecutive development of non-cirrhotic portal hypertension. The same sham group used for the BDL group served as controls (group name: Sham). All PPVL procedures were performed by the same individual.

### Intestinal Manipulation (Model of Extrahepatic Abdominal Surgery)

Intestinal manipulation (IM) was performed as previously described (Chang et al., 2012). IM was chosen as an established standardized model associated with postsurgical local inflammation and breakup of extracellular matrix in the gut wall (Chang et al., 2012). After median laparotomy, cecum and small bowel were placed on moist gauze outside the abdominal cavity. Then the entire small bowel and colon were manipulated between two sterile cotton swabs twice in a standardized fashion. The intestine was kept moist with saline at all times. After IM the intestine was placed back into the abdominal cavity, the abdomen was then closed with two layers of sutures. Age-matched animals only receiving a median laparotomy without IM served as sham controls (group name: LAP). All IM procedures were performed by the same individual.

### Portal Pressure Measurement and Animal Sacrifice

Before sacrifice animals were put into anaesthesia with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (dose: ketamin 100 mg/kg/body weight (bw)/xylazin: 20 mg/kg/bw). After median laparotomy, for *in-vivo* portal pressure measurements the portal vein was dissected and punctured with a polyethylen catheter (B. Braun, Melsungen, Germany). The catheter was fixated with a vascular clamp. Portal pressure was then recorded over a time of 5 min under echocardiogram monitoring using PowerLab 8/35 and LabChart Software (ADInstruments, Dunedin, New Zealand). The used value of portal pressure and heart frequency of one biological replicate for further analysis, was determined as mean of three randomly chosen values in the recorded phase after calibrated recording. After portal pressure measurement and acquiring blood samples from the caval vein, the animal was sacrificed by dissecting the inferior caval vein. Liver samples were snap frozen in liquid nitrogen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , fixated in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin or in Tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Staufen, Germany).

### Measurement of Hydroxyproline Content in Liver Samples

Hydroxyproline content measurement was performed as described previously (Brol et al., 2019). Snap-frozen liver samples were weighed and dissolved in 12 N hydrochloric acid at  $110^{\circ}\text{C}$ , then homogenized and incubated for another 16 h

at 110 °C. After filtering, samples were dissolved in methanol and oxidized in a chloramine T buffer. Finally, Ehrlich's reagent was added, the photometric product was measured at 558 nm wave length.

## Parameters of Hepatic Inflammation and Circulating Endotoxin Levels

Hepatic inflammation was assessed by mRNA gene expression. RNA isolation was done using the ReliaPrep RNA Miniprep Systems (Promega, Madison, WI). For cDNA synthesis ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) was used. For every sample, two DNase digestion steps were done for genomic DNA to be disposed. Quantitative PCR (qPCR) was carried out using TaqMan gene expression assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's protocol. qPCR amplification was performed on the 7300 Real-Time PCR Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). qPCR analyses were done using duplicates. Gene expression was calculated with the Delta-Delta CT method. 18s rRNA was used as housekeeping gene. Levels of gene expression are shown as *x*-fold compared to the respective control group. A list of gene expression assays is shown in **Supplementary Table 1**.

Circulating endotoxin levels were measured using the Pierce Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Germany) according to the manufacturer's protocol. In short, all samples were diluted and adjusted to a pH between 6 and 8. After pipetting standards and samples on a 96-well plate and incubating at 37 °C for 4 h, activation in the modified LAL was stopped. Endotoxin concentration was then photometrically measured at 405 nm wavelength. Levels of endotoxin are expressed as EU/ml. Only endotoxin-free plastic ware or sterile glass ware was used for the experiment.

## Histological Staining and Quantification

Sirius red and Hematoxylin and eosin (HE) stainings were performed on paraffin slides (2–3 μm) of the liver as previously described (Trebicka et al., 2011; Schierwagen et al., 2015; Brol et al., 2019). Stainings were captured with a Nikon Digital Sight DS-Vi1 microscope (Chiyoda, Tokyo, Japan) and quantified via ImageJ software (V.1.51q; National Institutes of Health, Bethesda, USA) using macros for automatized quantification and color detection. Individual samples were controlled for correct analysis, if color analysis was not executed properly, threshold was adjusted manually. Images were taken in 10-fold magnification and a minimum of 10 representative fields per biological replicate were taken into analysis.

## Analysis of Laboratory Parameters of Liver Function

Electrolytes (sodium, potassium) and parameters of liver function (alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), total protein, and ammonia) were analyzed in serum using the Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), modules 8000 ISE, c502, and c702 according to the manufacturer's protocol.

## Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Prism V.5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Data are expressed as means ± SEM. For comparisons between two groups, student's *t*-test was used. *P*-values ≤ 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Establishing a Preclinical Model of Extrahepatic Intestinal Surgery in Different Animal Models of Cirrhotic or Non-cirrhotic Portal Hypertension

Only animals that recovered completely from the first operation (BDL, PPVL, Sham) were included in the final analysis. Animals were then randomized into a group that underwent intestinal manipulation (IM) or median laparotomy (LAP). Animals presenting with ascites as a clinical sign of AD prior to IM or LAP were excluded from the experiment.

Due to the more aggressive nature of cirrhosis and expected higher postoperative mortality rate in BDL, a preliminary study had to be performed to determine the optimal time for IM after induction of cirrhosis. This preliminary study was approved within the applied project. When IM was performed 28 days after BDL, postoperative mortality was high, as expected (30%, data not shown). Therefore, the time point of 21 days (3 weeks) after BDL with a mortality of 10% after IM was established for the experiment.

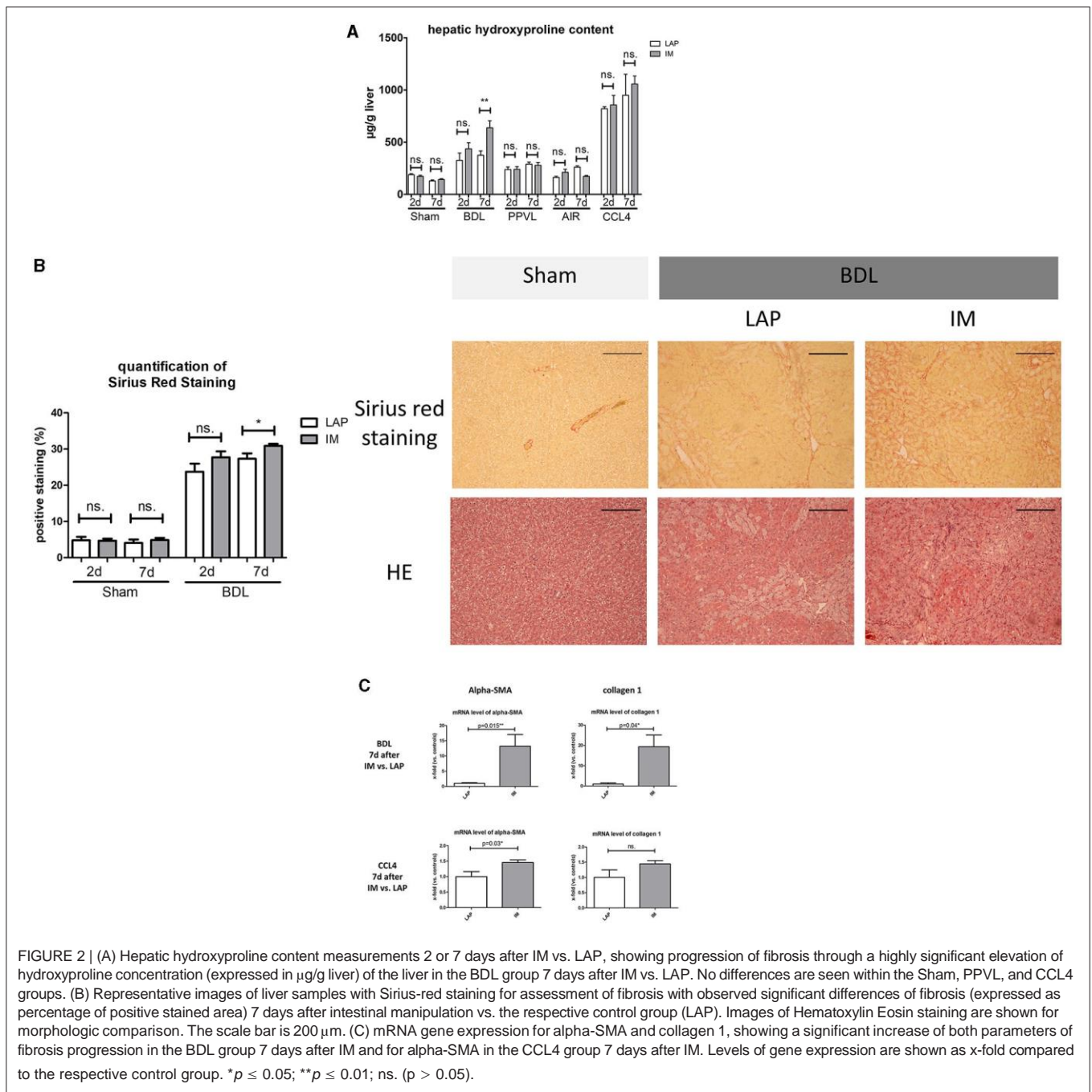
### Postoperative Mortality and Development of Ascites After Intestinal Manipulation

Combined postoperative mortality for BDL, PPVL, and CCL4 groups after IM for both timepoints (2 and 7 days after IM) was 10, 0, and 6%, respectively. Due to a low number of animal deaths without significant distribution concerning time after IM or operation type (IM/LAP), survival analysis was not performed. No deaths were recorded in all control groups (Sham (controls for BDL and PPVL), AIR (controls for CCL4) (**Figure 1**) after IM or LAP. In the BDL group that underwent IM and were sacrificed 7 days after IM, 3 (43%) developed ascites, vs. 1 (13%) animal in the control group (*p* = 0.3). The rate of development of ascites in the CCL4 group was similar 7 days after IM (IM 3 (38%) vs. LAP 1 (14%), *p* = 0.5). No animals in BDL and CCL4 groups developed ascites 2 days after IM, also none of the animals belonging to the PPVL groups developed ascites.

### Weight Development

Significant weight differences were observed in all models of cirrhosis or non-cirrhotic portal hypertension at time of IM, compared to the respective control groups (Sham, Air), with a significantly lower body weight in the PPVL, BDL, and CCL4 groups at the time of IM vs. LAP (**Supplementary Figure 1**).

Moreover, significant weight loss was observed in some groups after IM vs. LAP. In the BDL model, 7 days after IM animals lost significantly more weight compared to LAP, but not at 2 days (**Table 1B**). The same effect was observed in the CCL4 groups



(Table 1D). In the control and PPVL groups, weight loss before and after IM, was not statistically significant (Tables 1B,D,F).

### Laboratory Parameters of Liver Function at the Time of Sacrifice

Among laboratory parameters representing liver function in the Sham and AIR groups, no significant changes could be observed between IM and LAP groups (Table 1A).

In the BDL groups, Alkaline phosphatase (ALP) and Aspartate aminotransferase (AST) were significantly elevated 7 days after

IM vs. LAP (Table 1A). Albumin levels were significantly lower, 2 and 7 days after IM vs. LAP (Table 1A). Interestingly, ammonia serum levels were elevated 2 days after IM vs. LAP (Table 1B).

In the CCL4 group, AST and ALT were significantly elevated 7 days after IM vs. LAP (Table 1D), while albumin levels were significantly lower (Table 1D). No significant differences in laboratory parameters were observed 2 days after IM vs. LAP.

In the PPVL group 2 days after IM, AST was significantly elevated vs. LAP (Table 1E). No other significant differences were observed 2 and 7 days after IM vs. LAP.



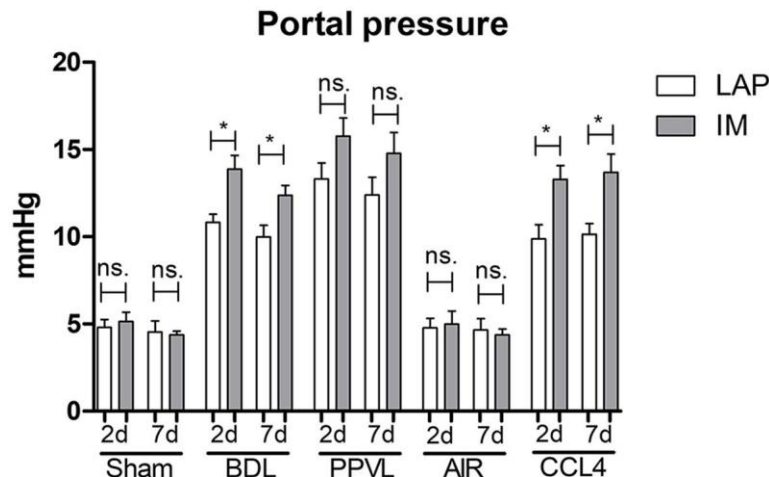


FIGURE 3 | *In-vivo* portal pressure development 2 or 7 days after IM vs. LAP in the different animal models (BDL and PPVL vs. Sham and CCL4 vs. AIR), showing significantly elevated portal pressure after IM in all BDL and CCL4 groups. \* $p \leq 0.05$ ; ns. ( $p > 0.05$ ).

## Development of Hepatic Fibrosis After Intestinal Manipulation

Hydroxyproline measurement showed significant increase of hydroxyproline levels and significantly larger Sirius-Red stained areas in the BDL group 7 days after IM vs. LAP (Figures 2A,B). In the BDL group 7 days after IM, mRNA expression of alpha-SMA (a marker of profibrogenic hepatic stellate cells) and collagen 1 were significantly upregulated compared to LAP (13- and 19- fold,  $p = 0.02$  and  $p = 0.04$ , respectively) (Figure 2C). In the other cirrhotic and non-cirrhotic groups (PPVL, Sham, Air, CCL4), no significant differences in fibrosis development between animals receiving IM vs. LAP could be observed, except a slight, but significant upregulation of alpha-SMA gene expression in the CCL4 group 7 days after IM compared to LAP (Figures 2A,C; Supplementary Figure 2).

## Portal Pressure After Intestinal Manipulation

In the cirrhotic groups (BDL and CCL4) portal pressure was significantly elevated 2 and 7 days after IM compared to LAP (BDL 2 d: IM  $13.9 \pm 0.8$  mmHg vs. LAP  $10.8 \pm 0.5$  mmHg,  $p = 0.01^*$ ; BDL 7 d: IM  $12.4 \pm 0.6$  mmHg vs. LAP  $10.0 \pm 0.7$  mmHg,  $p = 0.02$ ; CCL4 2 d: IM  $13.3 \pm 0.8$  mmHg vs. LAP  $10.7 \pm 0.3$  mmHg,  $p = 0.03$ ; CCL4 7 d: IM  $13.7 \pm 1.1$  mmHg vs. LAP  $10.2 \pm 0.6$  mmHg,  $p = 0.02$ ) (Figure 3; Tables 1A–D). The control groups (Sham, AIR) did not show any significant increase of portal pressure after IM or LAP (Figure 3; Tables 1A–D). While there was a trend of higher portal pressure after IM in the PPVL group, results were not significantly different compared to LAP (Figure 3; Tables 1E,F).

## Parameters of Hepatic Inflammation and Circulatory Level of Endotoxins

Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1b), tumor necrosis factor alpha

(TNF-alpha), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 1 (EMR-1), toll-like receptor 4 (TLR-4) were measured in liver samples via mRNA gene expression as parameters of hepatic inflammation. These inflammatory parameters were elevated in the BDL group 7 days after IM but not 2 days after IM vs. LAP, especially IL-6 (25-fold), TNF-alpha (14-fold) and CCL2 (8-fold) ( $p = 0.05$ ,  $p = 0.006$ ,  $p = 0.02$ , respectively) (Figure 4). In the CCL4 model IL-6 gene expression was significantly upregulated after IM vs. LAP among the measured inflammatory parameters (Supplementary Figure 3).

Endotoxin levels were measured in the different models 2 and 7 days after IM/LAP as a marker of bacterial translocation as possible trigger for upregulation of hepatic inflammation. No significant differences could be detected 2 and 7 days after IM/LAP between operation type (IM vs. LAP) or blood compartment (portal vein vs. caval vein). However, in both cirrhosis models circulatory level of endotoxins was significantly higher than in the non-cirrhotic groups (Supplementary Figure 4).

## DISCUSSION

This study is the first to characterize portal pressure after abdominal extrahepatic surgery in preclinical models of cirrhosis with ongoing hepatic injury (BDL) and discontinued hepatic injury (CCL4) prior to surgery. It shows that an abdominal extrahepatic surgical procedure significantly increases portal pressure, rendering our model suitable for studying pathomechanisms of post-operative acute decompensation (AD).

Postoperative AD in patients with cirrhosis is a long existing clinical problem which to date limits surgical procedures in cirrhosis. Moreover, AD can precipitate ACLF, resulting in multiorgan-failure and high short-term mortality (Moreau et al., 2013; Trebicka et al., 2020a). In previous studies, our group

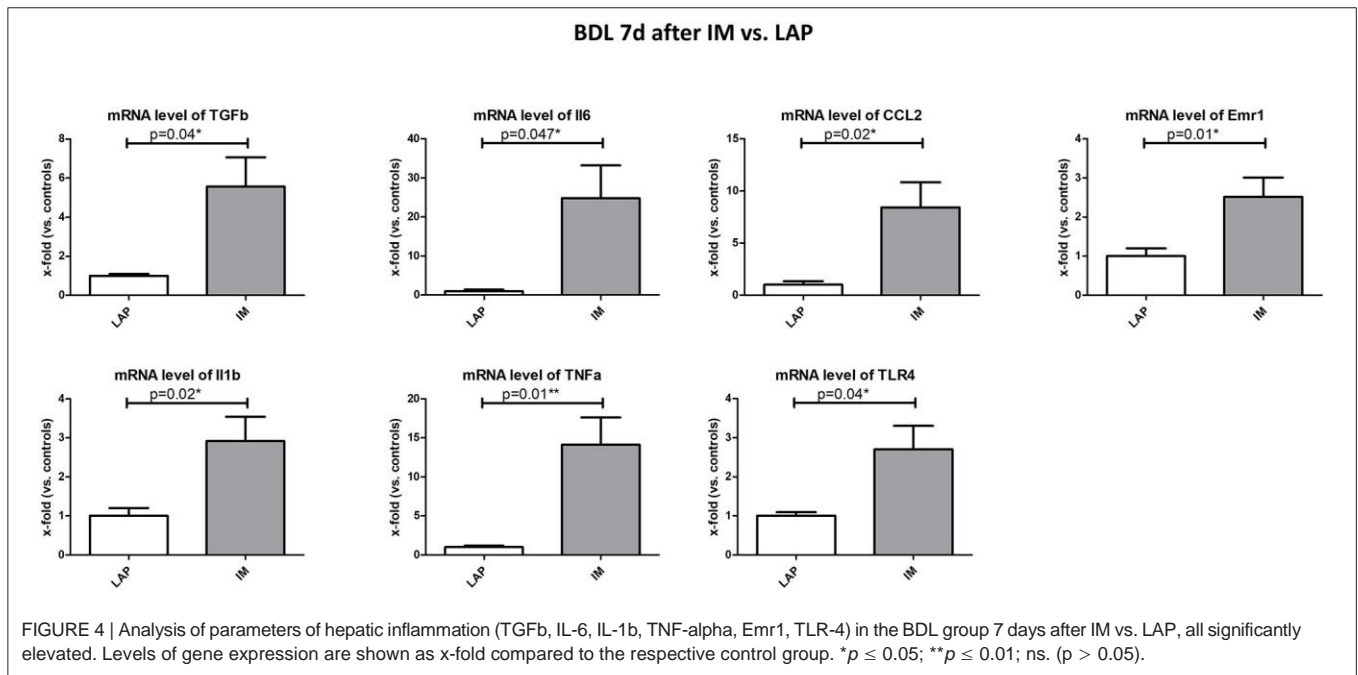


TABLE 1A | General characteristics and clinical data of rats undergoing Sham/BDL at sacrifice 2 days after IM/LAP.

Parameter		Sham + LAP <i>n</i> = 8	Sham + IM <i>n</i> = 8	<i>p</i>	BDL + LAP <i>n</i> = 7	BDL + IM <i>n</i> = 7	<i>p</i>
Weight data	Liver weight [g]	15 ± 0.6	14.4 ± 0.8	0.41	13.7 ± 0.8	13.3 ± 0.8	0.7
	Body weight at sacrifice [g]	394.6 ± 8.5	393.2 ± 17.9	0.94	330.9 ± 18.2 <sup>#</sup>	329 ± 15.3 <sup>#</sup>	0.94
	Weight development surgery - sacrifice [%]	-0.25 ± 1.3	-2.7 ± 3.2	0.52	-5.3 ± 2.2 <sup>§</sup>	-5.4 ± 0.9 <sup>§</sup>	0.94
Baseline laboratory	Sodium [mmol/l]	134.8 ± 2.6	137.0 ± 1.2	0.41	137.4 ± 1.2	139 ± 1.1	0.39
	ALP [U/L]	148.2 ± 21.3	141.3 ± 10.4	0.76	131.3 ± 8.3 <sup>§</sup>	151.8 ± 29.3 <sup>§</sup>	0.48
	AST [U/L]	88.8 ± 15.7	81.3 ± 6.3	0.63	96 ± 4.7 <sup>§</sup>	110.8 ± 17.3 <sup>§</sup>	0.39
	ALT [U/L]	47.3 ± 4	38.7 ± 3.4	0.15	47.3 ± 3.5 <sup>§</sup>	47.3 ± 3.5 <sup>§</sup>	0.47
	ALB [g/L]	30.4 ± 0.5	31.7 ± 1.3	0.41	30.6 ± 0.5 <sup>§</sup>	27.3 ± 0.9 <sup>#</sup>	0.009**
	TP [g/L]	50.3 ± 0.6	51.9 ± 1.8	0.49	50 ± 0.6 <sup>§</sup>	47.3 ± 1.3 <sup>§</sup>	0.07
	Urea [mg/dl]	38.0 ± 2.4	44.3 ± 6.0	0.41	37.8 ± 2.5 <sup>§</sup>	42.0 ± 4.9 <sup>§</sup>	0.44
	Ammonia [μmol/L]	121.3 ± 6.4	106.7 ± 8.1	0.2	101.6 ± 18.5 <sup>§</sup>	191.5 ± 17.6 <sup>#</sup>	0.007**
Hemodynamics	Portal Pressure [mmHg]	4.8 ± 0.5	5.1 ± 0.5	0.64	10.8 ± 0.5 <sup>###</sup>	13.9 ± 0.8 <sup>####</sup>	0.011*
	Heart frequency [bpm]	195 ± 12.8	200 ± 12.8	0.77	202.2 ± 22.0	208.9 ± 13.9	0.82

Sham vs. BDL: <sup>#</sup> $p \leq 0.05$ ; <sup>###</sup> $p \leq 0.01$ ; <sup>####</sup> $p \leq 0.001$ ; <sup>§</sup>ns. ( $p > 0.05$ ). BDL + LAP vs. BDL + IM: \* $p \leq 0.05$ .

showed that about 25% of patients with cirrhosis develop post-operative ACLF, including emergency surgery (Klein et al., 2020). Similar rates of post-operative ACLF are demonstrated even in elective surgical procedures, thus establishing surgical procedures as a precipitant of ACLF (Chang et al., 2021). In clinical practice, Child-Turcotte-Pugh-Score is commonly used for pre-operative risk stratification. Higher Child-Turcotte-Pugh-Score at the time of surgery is associated with higher mortality (Friedman, 2010). However, more biomarkers and clinical parameters are needed for better risk stratification for patients with liver cirrhosis in need of a surgical procedure.

Portal pressure seems to play an important role in post-operative outcome of patients with cirrhosis. In a recent prospective study, it was shown that preoperative HVPG below 16 mmHg before a surgical procedure is associated with a better postoperative outcome (Reverter et al., 2019). In a series of smaller studies it was shown that preoperative decompression of portal pressure via transjugular portosystemic shunt (TIPS) improves post-operative outcome, thus the concept of preoperative TIPS has been discussed as well (García-Pagán et al., 2020). However, no studies investigated the evolution of portal pressure after surgery, limiting the investigation

TABLE 1B | General characteristics and clinical data of rats undergoing Sham/BDL at sacrifice 7 days after IM/LAP.

Parameter		Sham + LAP n = 8	Sham + IM n = 8	p	BDL + LAP n = 8	BDL + IM n = 7	p
Weight data	Liver weight [g]	17.2 ± 0.4	15.9 ± 0.8	0.17	12.8 ± 1.3	15.3 ± 1.4	0.24
	Body weight at sacrifice [g]	408.5 ± 7.3	396.3 ± 12.6	0.42	345.0 ± 34.4 <sup>§</sup>	312.6 ± 16.6 <sup>###</sup>	0.42
	Weight development surgery - sacrifice [%]	-1.1 ± 1	-1.4 ± 1.8	0.9	4.5 ± 4 <sup>§</sup>	-8.4 ± 3 <sup>§</sup>	0.03*
Baseline laboratory	Sodium [mmol/l]	135.9 ± 1.1	137.4 ± 0.6	0.31	141.4 ± 1.4	141.8 ± 0.5	0.83
	ALP [U/L]	160.0 ± 7.1	147.8 ± 11.6	0.36	154 ± 19.7 <sup>§</sup>	340.8 ± 57.4 <sup>#</sup>	0.01*
	AST [U/L]	76.3 ± 6.4	81.5 ± 4	0.48	116.2 ± 22.7 <sup>§</sup>	288.3 ± 80.4 <sup>#</sup>	0.05*
	ALT [U/L]	49.4 ± 3.5	45.2 ± 1.6	0.36	50.2 ± 11.7 <sup>§</sup>	69.8 ± 13.7 <sup>§</sup>	0.31
	ALB [g/L]	32.6 ± 0.6	32.7 ± 0.9	0.92	32.7 ± 1.6 <sup>§</sup>	22.3 ± 2.1 <sup>###</sup>	0.002**
	TP [g/L]	52.1 ± 0.6	50.3 ± 1.4	0.22	50.5 ± 1.7 <sup>§</sup>	42.5 ± 2.7 <sup>###</sup>	0.01*
	Urea [mg/dl]	36.7 ± 3.6	31.3 ± 1.8	0.25	29.5 ± 2.4 <sup>§</sup>	44.1 ± 5.7 <sup>§</sup>	0.07
	Ammonia [μmol/L]	92.2 ± 14.4	80.3 ± 19.11	0.63	100 ± 12.9 <sup>§</sup>	223.6 ± 65 <sup>§</sup>	0.07
Hemodynamics	Portal Pressure [mmHg]	4.5 ± 0.6	4.4 ± 0.2	0.82	10.0 ± 0.7 <sup>###</sup>	12.4 ± 0.6 <sup>###</sup>	0.02*
	Heart frequency [bpm]	205.8 ± 16.7	196.6 ± 14.2	0.73	199.1 ± 20.34	197.2 ± 15.37	0.94

Sham vs. BDL: #p ≤ 0.05; ###p ≤ 0.01; ####p ≤ 0.001; §ns. (p > 0.05). BDL + LAP vs. BDL + IM: \*p ≤ 0.05.

TABLE 1C | General characteristics and clinical data of rats receiving AIR/CCL4 at sacrifice 2 days after IM/LAP.

Parameter		Air + LAP n = 8	Air + IM n = 8	p	CCL4 + LAP n = 7	CCL4 + IM n = 8	p
Weight data	Liver weight [g]	19.6 ± 0.6	18.9 ± 0.7	0.45	19.2 ± 0.7	17.6 ± 0.6	0.1
	Body weight at sacrifice [g]	546.5 ± 11.7	546.8 ± 11.4	0.99	438.4 ± 15.12 <sup>####</sup>	422.8 ± 22.58 <sup>###</sup>	0.57
	Weight development surgery - sacrifice [%]	-3.8 ± 0.6	-6.1 ± 1.0	0.1	-1.6 ± 2.0 <sup>§</sup>	-7.1 ± 1.3 <sup>§</sup>	0.07
Baseline laboratory	Sodium [mmol/l]	139.4 ± 0.2	138.2 ± 1.9	0.6	142.2 ± 0.3	142.5 ± 1.0	0.8
	ALP [U/L]	95.7 ± 10.7	79.6 ± 7.2	0.3	177.4 ± 20 <sup>#</sup>	150 ± 27.4 <sup>#</sup>	0.4
	AST [U/L]	94.8 ± 10.9	102.4 ± 7.0	0.6	338.3 ± 29.2 <sup>####</sup>	405 ± 77.7 <sup>#</sup>	0.5
	ALT [U/L]	42.8 ± 1.2	36.6 ± 3.5	0.13	132.4 ± 16.7 <sup>####</sup>	131.2 ± 22.7 <sup>###</sup>	0.96
	ALB [g/L]	33.5 ± 0.9	35.0 ± 1.2	0.4	33.3 ± 0.9 <sup>§</sup>	32.5 ± 0.8 <sup>§</sup>	0.6
	TP [g/L]	51.4 ± 1.8	53.4 ± 2.0	0.5	49.5 ± 1.3 <sup>§</sup>	50.2 ± 1.4 <sup>§</sup>	0.7
	Urea [mg/dl]	36.4 ± 1.2	39.9 ± 2.0	0.2	25.2 ± 2.6 <sup>##</sup>	29.6 ± 3.3 <sup>#</sup>	0.3
	Ammonia [μmol/L]	73.8 ± 5.3	106.8 ± 26	0.24	107.6 ± 17.9 <sup>##</sup>	85.8 ± 6.0 <sup>###</sup>	0.3
Hemodynamics	Portal Pressure [mmHg]	4.8 ± 0.6	5.0 ± 0.7	0.81	10.7 ± 0.3 <sup>###</sup>	13.3 ± 0.8 <sup>###</sup>	0.03*
	Heart frequency [bpm]	205.9 ± 11.03	201.0 ± 14.6	0.8	203.7 ± 15.0	197.5 ± 34.8	0.86

AIR vs. CCL4: #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001; ####p ≤ 0.0001; §ns. (p > 0.05). BDL + LAP vs. BDL + IM: \*p ≤ 0.05.

of pathophysiological pathways driving post-operative hepatic decompensation. Prospective clinical studies to characterize post-operative measurements of portal pressure in patients with cirrhosis are ethically difficult to perform, given that patients are mostly under postoperative care in the intensive care unit and in danger of AD or ACLF development. Therefore, animal models are needed to explore the mechanisms of postoperative AD or ACLF, and to study the evolution of portal pressure after surgery and its association with potential underlying inflammatory processes.

In our study, we show in two different animal models of cirrhosis (BDL and CCL4), that portal pressure is significantly elevated 2 and 7 days after IM vs. LAP (median laparotomy). Accordingly, in both models, 7 days after IM, there were more

clinical events of decompensation such as the development of ascites or significant weight loss. The BDL model seems to mimic the clinical situation after surgery in patients more accurately, showing progression of fibrosis and significant elevation of parameters of hepatic inflammation 7 days after IM and elevation of liver enzymes and ammonia acutely within 2 days after IM. In the BDL model, IM was performed in an earlier stage of fibrosis (3 weeks after BDL), leading to progression of fibrosis and earlier decompensation events after IM vs. LAP. In the CCL4 group however, no significant changes of the fibrosis parameters could be observed after IM compared to LAP. A possible reason might be that IM was performed at more advanced stages of cirrhosis. However, a regression of fibrosis after withdrawal of the injuring agent has been described in the CCL4 model (Nevzorova

TABLE 1D | General characteristics and clinical data of rats receiving AIR/CCL4 at sacrifice 7 days after IM/LAP.

Parameter		Air + LAP n = 8	Air + IM n = 8	p	CCL4 + LAP n = 8	CCL4 + IM n = 7	p
Weight data	Liver weight [g]	18.1 ± 0.9	18.8 ± 0.6	0.7	17.7 ± 1.1	16.2 ± 0.9	0.3
	Body weight at sacrifice [g]	540.7 ± 14.8	553.0 ± 14.1	0.6	465.6 ± 4.1 <sup>###</sup>	404.6 ± 9.7 <sup>###</sup>	<0.001 <sup>***</sup>
	Weight development surgery - sacrifice [%]	-4.0 ± 0.5	-3.9 ± 0.7	0.9	-1.2 ± 0.3 <sup>§</sup>	-10.7 ± 2.2 <sup>§</sup>	0.005 <sup>**</sup>
Baseline laboratory	Sodium [mmol/l]	138.8 ± 0.3	139.8 ± 0.6	0.2	141.6 ± 0.8	141.5 ± 1.3	1
	ALP [U/L]	79.2 ± 11.6	77.4 ± 2.8	0.9	146 ± 23 <sup>#</sup>	194.1 ± 22.6 <sup>##</sup>	0.17
	AST [U/L]	75.8 ± 5.7	103. ± 12.1	0.08	171.0 ± 29.0 <sup>#</sup>	306.7 ± 30.7 <sup>###</sup>	0.02 <sup>*</sup>
	ALT [U/L]	38.0 ± 2.1	43.8 ± 3.7	0.21	77.4 ± 5.4 <sup>###</sup>	118.7 ± 6.0 <sup>###</sup>	<0.001 <sup>***</sup>
	ALB [g/L]	34.2 ± 1.0	33.2 ± 0.6	0.4	34.6 ± 1.2 <sup>§</sup>	28.0 ± 1.0 <sup>##</sup>	0.0017 <sup>***</sup>
	TP [g/L]	47.7 ± 1.4	48.0 ± 1.5	0.9	49.1 ± 1.1 <sup>§</sup>	45.4 ± 1.3 <sup>§</sup>	0.1
	Urea [mg/dl]	31.9 ± 0.9	40.3 ± 3.3	0.02 <sup>*</sup>	25.8 ± 2.1 <sup>#</sup>	30.7 ± 1.9 <sup>#</sup>	0.1
	Ammonia [μmol/L]	100.2 ± 18.7	109.4 ± 38.4	0.8	86.8 ± 18.3 <sup>#</sup>	111.75 ± 27 <sup>§</sup>	0.5
Hemodynamics	Portal Pressure [mmHg]	4.7 ± 0.7	4.4 ± 0.3	0.71	10.2 ± 0.6 <sup>###</sup>	13.7 ± 1.1 <sup>###</sup>	0.02 <sup>*</sup>
	Heart frequency [bpm]	210.2 ± 27.94	194.0 ± 0.5	0.59	190.8 ± 8.3	191.2 ± 8.6	0.43

AIR vs. CCL4: <sup>#</sup>p ≤ 0.05; <sup>##</sup>p ≤ 0.01; <sup>###</sup>p ≤ 0.001; <sup>§</sup>ns. (p > 0.05). CCL4 + LAP vs. CCL4 + IM: <sup>\*</sup>p ≤ 0.05; <sup>\*\*</sup>p ≤ 0.01; <sup>\*\*\*</sup>p ≤ 0.001.

TABLE 1E | General characteristics and clinical data of rats undergoing Sham/PPVL at sacrifice 2 days after IMLAP.

Parameter		Sham + LAP n = 8	Sham + IM n = 8	p	PPVL + LAP n = 8	PPVL + IM n = 8	p
Weight data	Liver weight [g]	15 ± 0.6	14.4 ± 0.8	0.41	14.1 ± 0.7	15.4 ± 1.0	0.34
	Body weight at sacrifice [g]	394.6 ± 8.5	393.2 ± 17.9	0.94	388.1 ± 11.1 <sup>§</sup>	385.7 ± 9.1 <sup>§</sup>	0.87
	Weight development surgery - sacrifice [%]	-0.25 ± 1.3	-2.7 ± 3.2	0.52	0.8 ± 1.0 <sup>§</sup>	-1.8 ± 0.5 <sup>§</sup>	0.16
Baseline laboratory	Sodium [mmol/l]	134.8 ± 2.6	137.0 ± 1.2	0.41	140.1 ± 1.0	139.9 ± 0.6	0.85
	ALP [U/L]	148.2 ± 21.3	141.3 ± 10.4	0.76	132.1 ± 8.3 <sup>§</sup>	135.5 ± 5.6 <sup>§</sup>	0.73
	AST [U/L]	88.8 ± 15.7	81.3 ± 6.3	0.63	82.0 ± 6.0 <sup>§</sup>	123 ± 16.6 <sup>§</sup>	0.04 <sup>*</sup>
	ALT [U/L]	47.3 ± 4	38.7 ± 3.4	0.15	57.4 ± 3.1 <sup>§</sup>	60.2 ± 4.0 <sup>§</sup>	0.6
	ALB [g/L]	30.4 ± 0.5	31.7 ± 1.3	0.41	31.7 ± 0.8 <sup>§</sup>	31.6 ± 0.6 <sup>§</sup>	0.96
	TP [g/L]	50.3 ± 0.6	51.9 ± 1.8	0.49	48.6 ± 0.9 <sup>§</sup>	48.8 ± 1.0 <sup>§</sup>	0.85
	Urea [mg/dl]	38.0 ± 2.4	44.3 ± 6.0	0.41	41 ± 2.4 <sup>§</sup>	36.3 ± 1.4 <sup>§</sup>	0.1
	Ammonia [μmol/L]	121.3 ± 6.4	106.7 ± 8.1	0.2	138.8 ± 15.1 <sup>§</sup>	136.2 ± 13.8 <sup>§</sup>	0.91
Hemodynamics	Portal Pressure [mmHg]	4.8 ± 0.5	5.1 ± 0.5	0.64	13.3 ± 0.9 <sup>###</sup>	15.8 ± 1.0 <sup>###</sup>	0.11
	Heart frequency [bpm]	195 ± 12.8	200 ± 12.8	0.77	211.1 ± 12.2	207.3 ± 14.6	0.84

Sham vs. PPVL: <sup>#</sup>p ≤ 0.05; <sup>##</sup>p ≤ 0.01; <sup>###</sup>p ≤ 0.001; <sup>§</sup>ns. (p > 0.05). CCL4 + LAP vs. CCL4 + IM: <sup>\*</sup>p ≤ 0.05.

et al., 2020). In our model CCL4 inhalation was stopped 3 days before IM, which might be masking progression of fibrosis in this model by IM. However, the perioperative discontinuation of the hepatotoxic agents such as alcohol reflects clinical reality. Still, in our CCL4 model IM leads to significantly elevated portal pressure, elevated levels of liver enzymes and alpha-SMA and IL-6 gene expression after IM compared to LAP as relevant surrogate parameters for hepatic inflammation and decompensation.

An elevated portal pressure after surgery may be the expression of increased systemic inflammation. Our data shows significantly upregulated parameters of inflammation after IM, suggesting an association between inflammation and the development of elevated portal pressure after surgery. A close association of HVPG and systemic inflammation has been shown

recently (Praktiknjo et al., 2020). A hyperinflammatory state is also a key element of ACLF (Trebecka et al., 2019).

Inflammatory pathways driven by bacterial translocation and mechanisms of sterile inflammation may play a role in postoperative portal pressure elevation. In a recent retrospective study, bowel-related surgery was associated with a poor outcome in patients with cirrhosis, especially in those presenting with ascites and thrombocytopenia (Wetterkamp et al., 2020). Our study supports the role of bacterial translocation, indicated by the significant increase of hepatic TLR-4 expression in the BDL model 7 d after IM and significantly higher levels of endotoxin in the cirrhosis models. However, our data do not show differences of endotoxin levels between IM and LAP groups at 2 and 7 days. It has been shown that major abdominal surgery is associated

TABLE 1F | General characteristics and clinical data of rats undergoing Sham/PPVL at sacrifice 7 days after IM/LAP.

Parameter		Sham + LAP n = 8	Sham + IM n = 8	<i>p</i>	PPVL + LAP n = 8	PPVL + IM n = 8	<i>p</i>
Weight data	Liver weight [g]	17.2 ± 0.4	15.9 ± 0.8	0.17	14.2 ± 0.3	13.9 ± 0.4	0.58
	Body weight at sacrifice [g]	408.5 ± 7.3	396.3 ± 12.6	0.42	378.6 ± 8.5 <sup>§</sup>	369.3 ± 7.7 <sup>§</sup>	0.42
	Weight development surgery - sacrifice [%]	-1.1 ± 1	-1.4 ± 1.8	0.9	-0.3 ± 1.71 <sup>§</sup>	-2.2 ± 1.5 <sup>§</sup>	0.41
Baseline laboratory	Sodium [mmol/l]	135.9 ± 1.1	137.4 ± 0.6	0.31	139.0 ± 1.1 <sup>§</sup>	140.7 ± 0.5 <sup>§</sup>	0.2
	ALP [U/L]	160.0 ± 7.1	147.8 ± 11.6	0.36	127.3 ± 7.8 <sup>#</sup>	139.7 ± 11.4 <sup>§</sup>	0.42
	AST [U/L]	76.3 ± 6.4	81.5 ± 4	0.48	71.9 ± 4.8 <sup>§</sup>	79.5 ± 7.3 <sup>§</sup>	0.42
	ALT [U/L]	49.4 ± 3.5	45.2 ± 1.6	0.36	48.7 ± 1.4 <sup>§</sup>	40.7 ± 2.7 <sup>#</sup>	0.11
	ALB [g/L]	32.6 ± 0.6	32.7 ± 0.9	0.92	31.7 ± 0.6 <sup>§</sup>	30.0 ± 1.0 <sup>§</sup>	0.17
	TP [g/L]	52.1 ± 0.6	50.3 ± 1.4	0.22	50.2 ± 0.7 <sup>#</sup>	46.6 ± 2.2 <sup>§</sup>	0.15
	Urea [mg/dl]	36.7 ± 3.6	31.3 ± 1.8	0.25	37.8 ± 2.1 <sup>§</sup>	34.2 ± 2.1 <sup>§</sup>	0.23
Hemodynamics	Ammonia [μmol/L]	92.2 ± 14.4	80.3 ± 19.11	0.63	89.5 ± 16 <sup>§</sup>	151.7 ± 46.3 <sup>#</sup>	0.18
	Portal Pressure [mmHg]	4.5 ± 0.6	4.4 ± 0.2	0.82	12.4 ± 1.0 <sup>####</sup>	14.8 ± 1.2 <sup>####</sup>	0.16
	Heart frequency [bpm]	205.8 ± 16.7	196.6 ± 14.2	0.73	222.2 ± 16.9	200.9 ± 2.9	0.1

Sham vs. PPVL: #*p* ≤ 0.05; ####*p* ≤ 0.001; §*ns*. (*p* > 0.05).

ALB, albumin; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BDL, bile-duct ligation; bpm, beats per minutes; CCL4, tetrachlormethane; IM, intestinal manipulation; LAP, median laparotomy; *ns*, no significance; PPVL, partial portal vein ligation; TP, total protein.

with transient endotoxemia that peak between 1 and 24 h after surgery (Buttenschoen et al., 2001, 2009). Endotoxin levels might be significantly higher immediately after IM and then quickly decrease after increase of systemic and inflammation markers and upregulation of hepatic inflammation. This hypothesis needs to be further investigated in the future.

It has also been shown that IM leads to a disruption of the gut wall with the release of sterile proinflammatory agents, e.g., extracellular matrix components that lead to local and systemic inflammation (Bortscher et al., 2012; Chang et al., 2012; Nielsen et al., 2015; Lehmann et al., 2019). Our data show significant upregulation of collagen type 1 and elevated hepatic hydroxyproline levels in the BDL model 7 days after IM as expression of fibrosis progression and clinical events of decompensation. A boost of collagens and fragments or neopeptides of extracellular matrix systemically and in the portal vein have been shown to be significantly associated with outcome in patients with advanced stages of cirrhosis (Leeming et al., 2013, 2015; Nielsen et al., 2015; Praktijnjo et al., 2018a; Lehmann et al., 2019). Our data indicate that extrahepatic bowel surgery, especially in the model of continuous liver injury, may have the same effect, but needs to be confirmed in further studies using this model. We believe that our model is well-suited to study different pathways of inflammation and thus to investigate pathomechanisms of postoperative hepatic decompensation.

Interestingly in the PPVL groups, portal pressure was not significantly elevated after IM but showed the same trend as the cirrhotic groups. No deaths or signs of decompensation after IM in this model were recorded, at best, only transient changes were seen in the expression of liver enzymes. IM in this important non-cirrhotic control group was performed relatively early after PPVL. Patients with portal hypertension without cirrhosis, e.g., with vascular disorders of the liver have

better postsurgical prognosis, if they are treated early before the presence of liver decompensation (Elkrief et al., 2019). Our data show distinct post-surgical differences of inflammatory pathways between cirrhosis and non-cirrhotic portal hypertension, which can be further evaluated using this model.

Sarcopenia seems to play a role in these animal models of cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension. Our data show significant weight differences during the time of development of cirrhosis or non-cirrhotic portal hypertension. Weight loss seems to be more significant after IM in models of cirrhosis than in sham and PPVL animals. While weight loss in cirrhosis is a well-known fact, molecular mechanisms are still not fully understood, since obtaining muscle biopsies in patients might be ethically difficult. In recent studies it has been shown that muscle mass in patients with cirrhosis is associated with outcome and ACLF (Praktijnjo et al., 2018b, 2019). Pathophysiological investigation of the role of sarcopenia in the development of AD and ACLF especially after surgery in this model should be performed in the future, but is beyond the scope of this study.

There are several limitations to the study. Different surgical models, especially IM, might be dependent on the animal surgeon. However, to remove bias, all surgical procedures were performed by the same and trained individual for each surgery type (BDL, Sham, IM, LAP). Surgical procedures were performed in a block design, and animals were randomized into the different groups. Clear-cut criteria of AD in animals are missing, but our data includes relevant surrogate parameters of systemic inflammation and important laboratory parameters as well as clinical features of decompensation. Whether progression of fibrosis and inflammation can be seen more clearly in the CCL4 model without the removal of the hepatotoxic agent CCL4 remains to be investigated. Finally, the role and relevance of bacterial translocation and integrity of intestinal barrier need

to be assessed in more detail in further experiments including groups treated with antibiotics.

In conclusion, this study showed significantly elevated portal pressure and systemic inflammation in preclinical models of cirrhosis after IM. It also shows progression of fibrosis especially in models of continuous liver injury. These models may be useful to investigate pathophysiological mechanisms of post-operative decompensation. Lowering the risk of postoperative portal pressure elevation may be a therapeutic target.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this article are not readily available because restrictions according to GDPR and LANUV (local animal authority) apply. Requests to access the datasets should be directed to Dr. Michael Praktiknjo, michael.praktiknjo@ukbonn.de.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (81-02-04.2018.A348).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JC, JM, MG, and MH: acquisition of data, analysis, interpretation of data, drafting of the manuscript, and statistical analysis. NB, RD-P, BS-W, and GK: acquisition of data, analysis, and interpretation of data and critical revision of the manuscript regarding important intellectual content. MO, LP, SK, FU, MB, TV, PL, and JK: interpretation of data and critical revision of the manuscript regarding important intellectual content. CJ and CS: administrative, technical and material support, and critical revision of the manuscript regarding important intellectual

## REFERENCES

- Angeli, P., Bernardi, M., Villanueva, C., Francoz, C., Mookerjee, R. P., Trebicka, J., et al. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J. Hepatol.* 69, 406–460. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.024
- Bortscher, S., Chang, J., Vilz, T. O., Schäfer, N., Sommer, N., Wehner, S., et al. (2012). Hemin induction of HO-1 protects against LPS-induced septic ileus. *J. Surg. Res.* 178, 866–873. doi: 10.1016/j.jss.2012.07.064
- Brol, M. J., Rösch, F., Schierwagen, R., Magdaleno, F., Uschner, F. E., Manekeller, S., et al. (2019). Combination of CCl<sub>4</sub> with alcoholic and metabolic injuries mimics human liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 317, G182–G194. doi: 10.1152/ajpgi.00361.2018
- Bruix, J., Castells, A., Bosch, J., Feu, F., Fuster, J., Garcia-Pagan, J., et al. (1996). Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 111, 1018–1022. doi: 10.1016/S0016-5085(96)70070-7
- Buttenschoen, K., Buttenschoen, D. C., Berger, D., Vasilescu, C., Schafheutle, S., Goeltenboth, B., et al. (2001). Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. *Am. J. Surg.* 181, 36–43. doi: 10.1016/S0002-9610(00)00534-1
- Buttenschoen, K., Schneider, M. E., Utz, K., Kornmann, M., Beger, H. G., and Carli Buttenschoen, D. (2009). Effect of major abdominal surgery on endotoxin release and expression of Toll-like receptors 2/4. *Langenbecks. Arch. Surg.* 394, 293–302. doi: 10.1007/s00423-008-0357-8
- Chang, J., Bamarni, A., Böbling, N., Zhou, X., Klein, L.-M., Meinke, J., et al. (2021). Elective surgery but not transjugular intrahepatic portosystemic shunt precipitates acute-on-chronic liver failure. *Hepatol. Commun.* 5, 1265–1277. doi: 10.1002/hep4.1712
- Chang, J., Wehner, S., Schäfer, N., Sioutis, M., Bortscher, S., Hirner, A., et al. (2012). Iatrogenic extracellular matrix disruption as a local trigger for postoperative ileus. *J. Surg. Res.* 178, 632–639. doi: 10.1016/j.jss.2012.05.044
- de Goede, B., Klitsie, P. J., Lange, J. F., Metselaar, H. J., and Kazemier, G. (2012). Morbidity and mortality related to non-hepatic surgery in patients with liver cirrhosis; a systematic review. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 26, 47–59. doi: 10.1016/j.bpg.2012.01.010
- Elkrief, L., Ferrusquia-Acosta, J., Payancé, A., Moga, L., Tellez, L., Praktiknjo, M., et al. (2019). Abdominal surgery in patients with idiopathic noncirrhotic portal hypertension: a multicenter retrospective study. *Hepatology* 70, 911–924. doi: 10.1002/hep.30628
- Friedman, L. S. (2010). Surgery in the patient with liver disease. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 121, 192–204; discussion 205.

content. SW, JT, and MP: study concept and design, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript regarding important intellectual content, final approval of the version to be published, administrative, technical and material support, and study supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

JC was funded by grants from the Else-Kroener Fresenius Foundation (2014\_Kolleg.05) and BONFOR research program of the University of Bonn (grant ID 2019-2-08). JT was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB TRR57 to P18, CRC 1382 A09), European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (Galaxy, No. 668031; MICROB-PREDICT, No. 825694; DECISION, No. 847949), Societal Challenges – Health, Demographic Change and Wellbeing (No. 731875), and Cellex Foundation (PREDICT). MP was funded by the Ernst-und-Berta Grimmke Foundation (No. 5/19) and BONFOR research program of the University of Bonn (grant ID 2020-2A-07 and 2021-2A-07). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jennifer Söhne, Franziska Füllmann, Christiane Esch, and Christine Peigney for their excellent technical assistance.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.720898/full#supplementary-material>

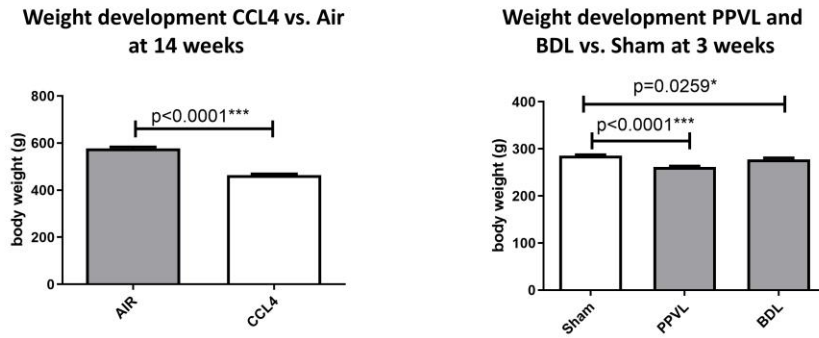
- García-Pagán, J. C., Saffo, S., Mandorfer, M., and Garcia-Tsao, G. (2020). Where does TIPS fit in the management of patients with cirrhosis? *JHEP Rep.* 2:100122. doi: 10.1016/j.jhepr.2020.100122
- Gustot, T., Fernandez, J., Garcia, E., Morando, F., Caraceni, P., Alessandria, C., et al. (2015). Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology*. *Baltim. Md* 62, 243–252. doi: 10.1002/hep.27849
- Klein, L. M., Chang, J., Gu, W., Manekeller, S., Jansen, C., Lingohr, P., et al. (2020). The development and outcome of acute-on-chronic liver failure after surgical interventions. *Liver Transplant.* 26, 227–237. doi: 10.1002/lt.25675
- Klein, S., Rick, J., Lehmann, J., Schierwagen, R., Schierwagen, I. G., Verbeke, L., et al. (2017). Janus-kinase-2 relates directly to portal hypertension and to complications in rodent and human cirrhosis. *Gut* 66, 145–155. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309600
- Leeming, D. J., Karsdal, M. A., Byrjalsen, I., Bendtsen, F., Trebicka, J., Nielsen, M. J., et al. (2013). Novel serological neo-epitope markers of extracellular matrix proteins for the detection of portal hypertension. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 38, 1086–1096. doi: 10.1111/apt.12484
- Leeming, D. J., Veidal, S. S., Karsdal, M. A., Nielsen, M. J., Trebicka, J., Busk, T., et al. (2015). Pro-C5, a marker of true type V collagen formation and fibrillation, correlates with portal hypertension in patients with alcoholic cirrhosis. *Scand. J. Gastroenterol.* 50, 584–592. doi: 10.3109/00365521.2014.996590
- Lehmann, J., Praktiknjo, M., Nielsen, M. J., Schierwagen, R., Meyer, C., Thomas, D., et al. (2019). Collagen type IV remodelling gender-specifically predicts mortality in decompensated cirrhosis. *Liver Int.* 39, 885–893. doi: 10.1111/liv.14070
- Moreau, R., Jalan, R., Gines, P., Pavesi, M., Angeli, P., Cordoba, J., et al. (2013). Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 144, 1426–1437. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.042
- Nevzorova, Y. A., Boyer-Diaz, Z., Cubero, F. J., and Gracia-Sancho, J. (2020). Animal models for liver disease – a practical approach for translational research. *J. Hepatol.* 73, 423–440. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.011
- Nielsen, M. J., Lehmann, J., Leeming, D. J., Schierwagen, R., Klein, S., Jansen, C., et al. (2015). Circulating elastin fragments are not affected by hepatic, renal and hemodynamic changes, but reflect survival in cirrhosis with TIPS. *Dig. Dis. Sci.* 60, 3456–3464. doi: 10.1007/s10620-015-3783-9
- Praktiknjo, M., Book, M., Luetkens, J., Pohlmann, A., Meyer, C., Thomas, D., et al. (2018b). Fat-free muscle mass in magnetic resonance imaging predicts acute-on-chronic liver failure and survival in decompensated cirrhosis. *Hepatology*. *Baltim. Md* 67, 1014–1026. doi: 10.1002/hep.29602
- Praktiknjo, M., Clees, C., Pigliacelli, A., Fischer, S., Jansen, C., Lehmann, J., et al. (2019). Sarcopenia is associated with development of acute-on-chronic liver failure in decompensated liver cirrhosis receiving transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 10:e00025. doi: 10.14309/ctg.0000000000000025
- Praktiknjo, M., Lehmann, J., Nielsen, M. J., Schierwagen, R., Uschner, F. E., Meyer, C., et al. (2018a). Acute decompensation boosts hepatic collagen type III deposition and deteriorates experimental and human cirrhosis. *Hepatology*. *Commun.* 2, 211–222. doi: 10.1002/hep.4.1135
- Praktiknjo, M., Monteiro, S., Grandt, J., Kimer, N., Madsen, J. L., Werge, M. P., et al. (2020). Cardiodynamic state is associated with systemic inflammation and fatal acute-on-chronic liver failure. *Liver Int.* 40, 1457–1466. doi: 10.1111/liv.14433
- Reverter, E., Cirera, I., Albillos, A., Debernardi-Venon, W., Abraldes, J. G., Llop, E., et al. (2019). The prognostic role of hepatic venous pressure gradient in cirrhotic patients undergoing elective extrahepatic surgery. *J. Hepatol.* 71, 942–950. doi: 10.1016/j.jhep.2019.07.007
- Schierwagen, R., Maybüchen, L., Zimmer, S., Hittatiya, K., Bäck, C., Klein, S., et al. (2015). Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci. Rep.* 5:12931. doi: 10.1038/srep12931
- Trebicka, J., Amorós, A., Pitarch, C., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Schierwagen, R., et al. (2019). Addressing profiles of systemic inflammation across the different clinical phenotypes of acutely decompensated cirrhosis. *Front. Immunol.* 10:476. doi: 10.3389/fimmu.2019.00476
- Trebicka, J., Fernandez, J., Papp, M., Caraceni, P., Laleman, W., Gambino, C., et al. (2020a). PREDICT identifies precipitating events associated with the clinical course of acutely decompensated cirrhosis. *J. Hepatol.* 74, 1097–1108. doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.019
- Trebicka, J., Fernandez, J., Papp, M., Caraceni, P., Laleman, W., Gambino, C., et al. (2020b). The PREDICT study uncovers three clinical courses of acutely decompensated cirrhosis that have distinct pathophysiology. *J. Hepatol.* 73, 842–854. doi: 10.1016/j.jhep.2020.06.013
- Trebicka, J., Racz, I., Siegmund, S. V., Cara, E., Granzow, M., Schierwagen, R., et al. (2011). Role of cannabinoid receptors in alcoholic hepatic injury: steatosis and fibrogenesis are increased in CB2 receptor-deficient mice and decreased in CB1 receptor knockouts. *Liver Int.* 31, 860–870. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02496.x
- Uschner, F. E., Ranabhat, G., Choi, S. S., Granzow, M., Klein, S., Schierwagen, R., et al. (2015). Statins activate the canonical hedgehog signaling and aggravate non-cirrhotic portal hypertension, but inhibit the non-canonical hedgehog signaling and cirrhotic portal hypertension. *Sci. Rep.* 5:14573. doi: 10.1038/srep14573
- Wetterkamp, M., van Beekum, C. J., Willis, M. A., Glowka, T. R., Manekeller, S., Fimmers, R., et al. (2020). Risk factors for postoperative morbidity and mortality after small bowel surgery in patients with cirrhotic liver disease – a retrospective analysis of 76 cases in a tertiary center. *Biology* 9:349. doi: 10.3390/biology9110349

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

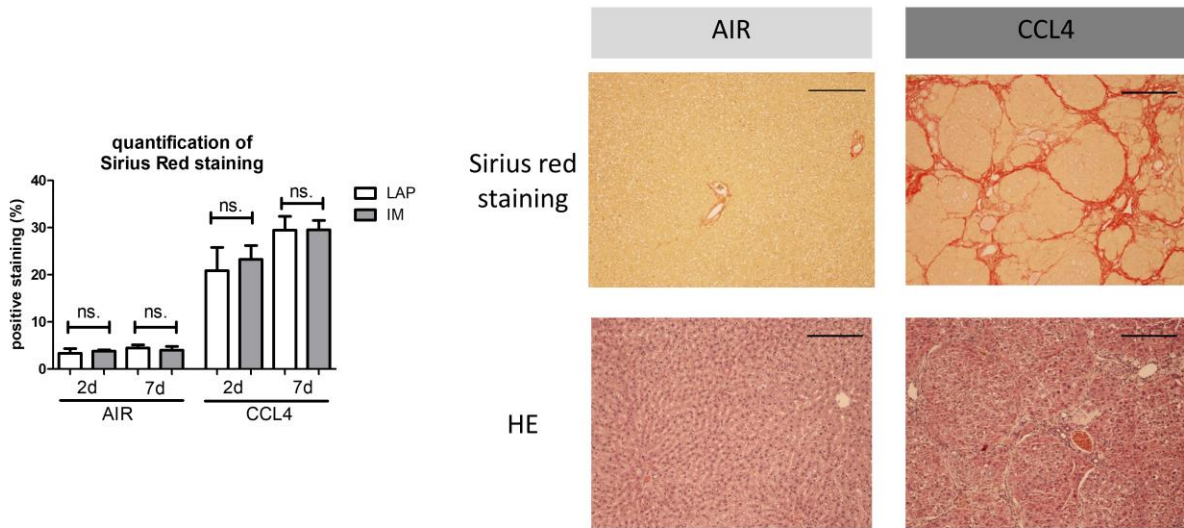
**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Chang, Meinke, Geck, Hebest, Böhring, Dolscheid-Pommerich, Stoffel-Wagner, Kristiansen, Overhaus, Peyman, Klein, Uschner, Brol, Vilz, Lingohr, Kalff, Jansen, Strassburg, Wehner, Trebicka and Praktiknjo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

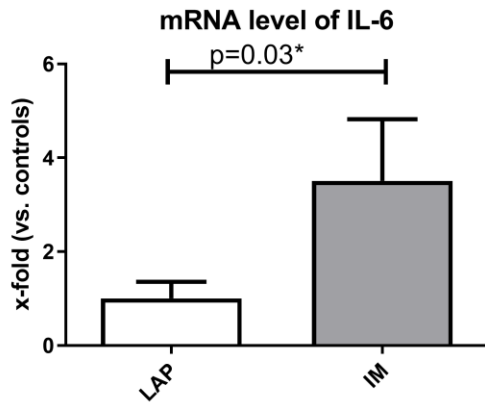
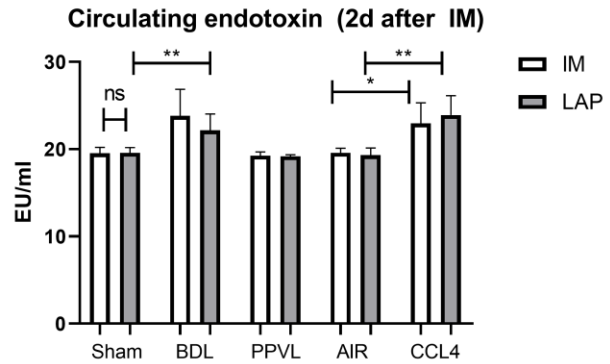
**Supplementary FIGURE 1**



**Supplementary FIGURE 2**





**Supplementary FIGURE 3****Supplementary FIGURE 4****Supplementary Figure 1:**

Weight development between BDL or PPVL vs. Sham and CCL4 vs. AIR groups until the time of intestinal manipulation.

**Supplementary Figure 2:**

Representative images of liver samples with Sirius-red staining for assessment of fibrosis, expressed as percentage of positive stained area, with no differences within CCL4 and AIR groups. Images of Hematoxylin Eosin staining is shown for morphologic comparison. The scale bar is 200  $\mu$ m.

**Supplementary Figure 3:**

Analysis of hepatic IL-6 gene expression in the CCL4 group 7 days after IM vs. LAP. Levels of gene expression are shown as x-fold compared to the respective control group.

**Supplementary Figure 4:**

Endotoxin levels (representatively for 2 days after IM) measured in serum samples. Endotoxin levels in the cirrhosis groups are significantly higher than in the non-cirrhotic groups. Levels of endotoxin are shown as EU/ml.

**SUPPLEMENTARY TABLE 1.** Taqman assays of nucleotide sequences of the rat (Applied Biosystems, Germany)

Assay ID	Gene symbol	Gene Name	Reference Sequence	Amplicon Length
Hs99999901_s1	18s-rRNA	Eukaryotic 18S rRNA	X03205.1	187
Rn01759928_g1	Acta2	Alpha-Smooth Muscle Actin	NM_031004.2	65
Rn00580555_m1	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_031530.1	95
Rn01463848_m1	Col1a1	collagen, type I, alpha 1	NM_053304.1	115
Rn01527631_m1	Emr1	EGF-like module containing, mucin-like hormone receptor-like 1	NM_001007557.1	100
Rn00580432_m1	Il1b	interleukin 1 beta	NM_031512.2	74
Rn01410330_m1	Il6	interleukin 6	NM_012589.2	121
Rn00572010_m1	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	NM_021578.2	65
Rn00569848_m1	Tlr4	toll-like receptor 4	NM_019178.1	127
Rn99999017_m1	Tnf	tumor necrosis factor	NP_036807.1	108

### 3. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Jonel Trebicka, für die Überlassung des Dissertationsthemas danken und die Expertise, die er in das gesamte Projekt eingebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Johannes Chang, der mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingearbeitet hat und mich mit seiner Freude für Forschung für das wissenschaftliche Arbeiten begeistern konnte.

Mein Dank gilt zudem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Leberfibrose und Portale Hämodynamik, die mir jederzeit zur Seite gestanden haben und mich bei der Umsetzung des Projektes unterstützt haben, namentlich Herrn PD Dr. Michael Praktiknjo, Moritz Geck, Marc Hebest und Jennifer Söhne.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken: meinen Eltern, Wolfgang Meinke und Sabine Meinke-Henn und meiner Schwester Linda Meinke. Auf meine Familie konnte ich mich immer verlassen. Ohne ihren Rückhalt und ihren Zuspruch wären Studium und Promotion nicht möglich gewesen.