



Invloed van levercirrose op de voedingstoestand van ratten.

Nathalie MICHELS

Verhandeling ingediend tot
het verkrijgen van de graad van
Master in de biomedische wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. Van Vlierberghe Hans
Vakgroep Inwendige Ziekten
Dienst Gastro-Enterologie en Hepatologie

Academiejaar 2008-2009

“De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.”

Nathalie Michels

Prof. Dr. Hans Van Vlierberghe

Voorwoord

Door dit onderzoek uit te voeren heb ik heel wat plezierige maar ook minder aangename kantjes van de wonderlijke ‘research’ wereld ontdekt. Ik heb geleerd hoe een project kan worden opgestart en hoe een ethische goedkeuring wordt aangevraagd. Uit de kleine probleempjes heb ik geleerd hoe belangrijk het is om vooraf het experiment goed te plannen, voldoende tijd te voorzien en voldoende staal af te nemen. Tevens heb ik ingezien hoe nuttig sommige cursussen uit de opleiding biomedische wetenschappen wel kunnen zijn bij het uitvoeren van wetenschappelijk werk. Uit de vele dagen geduldig werk, heb ik mij verder gerealiseerd hoeveel tijd er soms in een bepaalde analyse schuilt. Natuurlijk ben ik nu ook enkele technieken rijker. Maar de belangrijkste ondervinding is toch dat uit elk onderzoek opnieuw vragen rijzen en dat de wetenschap dus nooit stopt.

Bij het beëindigen van dit werk zou ik graag een paar mensen willen danken voor hun tijd en inzet. In de eerste plaats wil ik Prof. Dr. Van Vlierberghe bedanken om promotor van dit werk te zijn. Hij liet mij de nodige ruimte in tijd, financiën en ideeën. Veel dank aan Bram Blomme, Femke Heindryckx en Christophe Van Steenkiste als begeleiders. Zij hebben mij vol geduld ingewijd in de technieken zoals CBDL-inductie, microscopie en ELISA en stonden steeds paraat om hun visie te geven. Eline Vanheule wil ik bedanken om te helpen bij het opstellen van het ethische protocol en Kim Olievier voor de ondersteuning bij de ELISA techniek. In het bijzonder wil ik technicus Julien Dupont bedanken. Hij zorgde steeds voor de vrolijke noot in het labo en hielp bij de bloedafname. Speciale dank gaat ook uit naar Elke De Beleyr. Als mede-thesisstudent hebben we vele uren samengewerkt, elkaar te raad gestaan en gesteund. Tevens wil ik hier ook mijn vriend bedanken voor het luisterend oor wanneer ik ’s avonds nog maar eens de thesis en eventuele problemen aanhaalde. Als laatste bedank ik ook mijn ouders die mij de kans gaven deze opleiding te volgen en deze tot een goed einde te brengen.

Inhoudstafel

Samenvatting.....	1
1 Inleiding	2
1.1 Anatomie van de lever	2
1.2 Functies van de lever	4
1.3 Cirrose	6
1.4 Diermodel	9
1.5 Malnutritie en cirrose.....	10
1.6 Doelstelling.....	15
2 Materialen en methoden	17
2.1 Proefdieren.....	17
2.2 Metingen tijdens de inductietijd	18
2.3 Bloed- en weefselafname.....	18
2.4 Biochemische analyse bloed.....	19
2.4.1 ELISA.....	19
2.4.2 Bepalingen in het routinelabo	19
2.5 Biochemische analyse vetstalen	20
2.6 Lichtmicroscopisch onderzoek	21
2.6.1 Weefselcoupes.....	21
2.6.2 Protocol voor haematoxyline-eosine kleuring.....	21
2.6.3 Protocol voor Sirius Red kleuring.....	22
2.6.4 Histopathologie van de lever.....	22
2.6.5 Histologie van huid en visceraal peritoneum	23
2.7 Statistische analyse	23
3 Resultaten	24
3.1 Metingen tijdens de inductietijd en sacrificatie.....	24
3.2 Biochemische analyse bloed en weefsel.....	26
3.3 Lichtmicroscopisch onderzoek	27
3.3.1 Histopathologie van de lever.....	27
3.3.2 Histologie van huid en visceraal peritoneum	27
4 Bespreking.....	34
5 Algemene besluit omtrent het CBDL model.....	40
6 Korte vergelijking met het PPVL model.....	42
Referenties.....	44

Samenvatting

OBJECTIEVEN De stijgende prevalentiecijfers en de hoge mortaliteit van levercirrose dringen aan op verder onderzoek. Vooral de geassocieerde malnutritie leidt tot een slechte prognose. Deze studie zal het effect van cirrose op de voedingstoestand onderzoeken daar nog onvoldoende kennis omtrent malnutritie is vergaard.

METHODEN In dit onderzoek werd het common bile duct ligation (CBDL) ratmodel gebruikt. In dit model werd de hoofdgalweg afgebonden zodat cholestase en cholangitis ontstaan, leidend tot een secundaire biliaire cirrose. Vooreerst werd de aanwezigheid van cirrose onderzocht via biochemische parameters en macro- en microscopische studie van de lever. Daarna werd de voedingstoestand gecontroleerd door het gewicht op te volgen en door histologische analyse van het vet. Uiteindelijk werden de verschillende facetten van malnutritie nagegaan. Hierbij werd alvast de spontane voedsel- en drankopname opgevolgd. Vetmalabsorptie werd nagegaan aan de hand van de serumgehalten van vetoplosbare vitamines. Verder werden inflammatiestatus, insulineresistentie en serumconcentraties van koper en zink bepaald. Finaal werden serumwaarden van de hormonen adiponectine, ghreline en leptine gemeten en tevens de adiponectine- en leptinegehalten in vetweefsel.

RESULTATEN De biochemische parameters toonden aan dat in dit diermodel leverschade optrad; macroscopisch was de lever vergroot en leverhistologie gaf een F3 stadium aan. Er werden geen wijzigingen in lichaamsgewicht gezien maar vetcellen uit het visceraal peritoneum waren significant kleiner in de CBDL groep. Een verlaagde concentratie aan vitamine A, D en E en een stijging in TNF- α en koper werden vastgesteld bij de CBDL groep ($P < 0.05$). Geen significante verschillen werden gevonden in de voedsel- en drankopname, IL-6, zink en insulineresistentie. Bij de hormonen werd alleen een significante daling van het leptine in het serum teruggevonden bij de CBDL groep ($P < 0.05$).

CONCLUSIES In dit model werd geen insulineresistentie en gewijzigde voedselopname aangetoond. De malnutritie werd dan ook hoofdzakelijk bepaald door de vetmalabsorptie. De geobserveerde hormoonniveaus kunnen niet meteen aan de basis liggen van de malnutritie, maar kunnen soms wel een beschermingsfunctie vervullen. Zo kan de verlaagde leptineconcentraties een positief effect op de voedselopname uitoefenen en mede de ongewijzigde opname verklaren. Voor optimaal malnutritieonderzoek moet de cirrose-inductie in dit ratmodel echter langer dan 4 weken aangehouden worden aangezien bij de dieren maar een F3 stadium werd bevestigd.

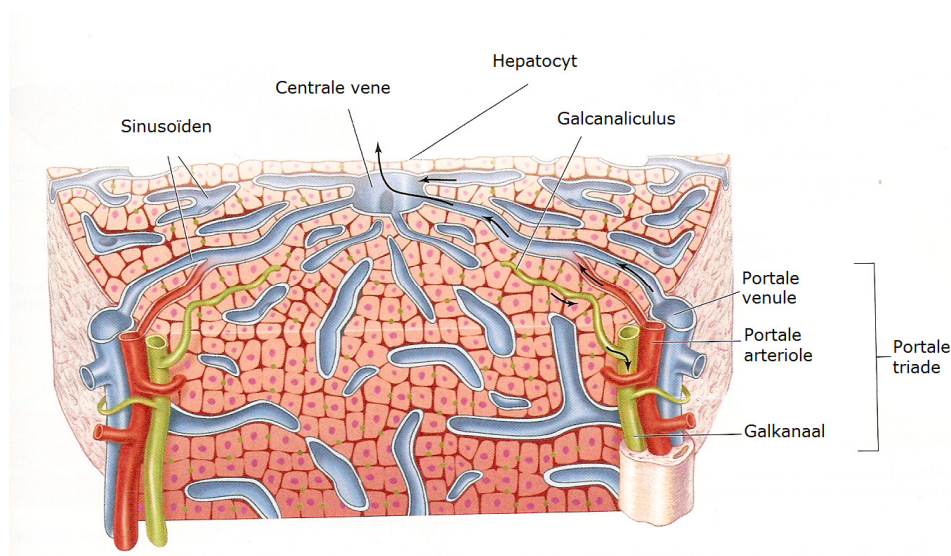
1 Inleiding

1.1 Anatomie van de lever

De lever is na de huid het grootste orgaan van het lichaam en bezit een heleboel belangrijke functies. Om deze functies te begrijpen, is kennis in de anatomie en fysiologie essentieel.

De lever is macroscopisch onder te verdelen in lobben. In de klassieke anatomie van de mens onderscheidt men een linker- en rechterkwab met daartussen de lobus quadratus en de lobus caudatus. In de moderne functionele indeling wordt de lever onderverdeeld in 8 Couinaud segmenten waarbij elk segment over een eigen vasculaire invoer, uitvoer en galafvoer beschikt.[1]

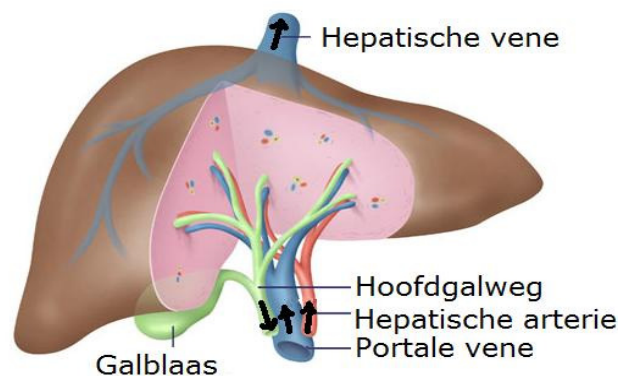
De kwabben zijn opgebouwd uit kleine eenheden met name de zeshoekige lobjes of lobules. Deze lobules bestaan uit levercellen (=hepatocyten) die radiaal gerangschikt zijn rondom een centrale vene. Aan bijna elke hoek van deze lobules bevindt zich de portale triade. Deze triade bestaat uit 3 belangrijke vaten: de portale arteriole als tak van de hepatische arterie, een portale venule als tak van de hepatische portale vene en een galkanaal.[1] (Figuur 1)



Figuur 1: Schematische voorstelling van een leverlobule [1].

De hepatocyten synthetiseren de gal die dan via galcanaliculi tussen de levercellen naar het galkanaal in de portale triade zal vloeien. Deze galkanalen komen dan samen in een linker- en rechter leverkanaal. Dit kanaal vloeit verder in de hoofdgalweg alwaar de gal tijdelijk wordt opgeslagen in een afsplitsing, de galblaas. Deze gal zal pas vrijgesteld worden indien voedingsvet het duodenum bereikt. [1]

De bloedvaten uit de portale triade vervoeren zowel arterieel als veneus bloed via capillairen (=leversinusoiden) naar de centrale vene. Het arteriële bloed voorziet zuurstof en het veneus bloed brengt nutriënten en toxines naar de hepatocyten. De centrale vene leidt uiteindelijk naar de hepatische vene die dan in de vena cava inferior uitvloeit. Het gedetoxificeerd en gedeoxygeneerd bloed komt zo naar het hart. Het hart pompt het bloed dan naar de longen, waar het na oxygenatie terug het hart bereikt. Dit zuurstofrijke bloed verlaat het hart dan via de aorta. Een tak van de abdominale aorta vormt de hepatische arterie die dan terug de portale triade zal vormen. Aan de andere kant zal veneus bloed uit de gastro-intestinale tractus de lever bereiken via de hepatische portale vene en zo ook in de portale triade uitmonden.[1] (Figuur 2)



Figuur 2: Gal- en bloedcirculatie in de lever. [<http://www.biotrin.com/cmsimages/liver2.jpg>]

Naast hepatocyten komen ook andere celtypes voor in de lever zoals de endotheelcellen, Kupffercellen, stellaatcellen en lymfocyten. De endotheelcellen verzorgen een continue aflijning van de sinusoiden. Het grote verschil met normale capillairen is het ontbreken van een basale membraam en de aanwezigheid van grote openingen of fenestrae. Deze fenestrae en de intercellulaire ruimtes zijn essentieel om het bloed te filtreren. Kupffercellen bevinden zich in het lumen van de sinusoiden en kunnen naar de ruimte van Disse (tussen het endotheel en de hepatocyt) migreren. Ze verzorgen als residente macrofaag vooral de fagocytose van oud, beschadigd of vreemd materiaal. Stellaatcellen of Ito-cellen liggen in de ruimte van Disse. Deze cellen zijn gekenmerkt door cytoplasmatische vetdruppels en vormen een opslagplaats voor vitamine A. Naast deze hoofdfuncties vervullen de endotheelcellen en Kupffercellen ook cytokineproductie, en zorgen de endotheelcellen en de stellaatcellen voor matrixvorming.[2]

Naast cellulaire componenten bestaat de lever ook uit een matrix. Deze bestaat uit de macromoleculen collageen, glycoproteïnen en proteoglycanen en zorgt voor een ondersteunende structuur. [2]

1.2 Functies van de lever

De lever is niet alleen een groot orgaan, maar ook een veelzijdig orgaan. De functies liggen onder andere in de galsecretie, het intermediair metabolisme, de afweer, de warmteproductie en de vasculaire functie.[2]

De lever produceert en secreteert gal. Gal is essentieel voor de eliminatie van cholesterol, afbraakproducten en toxines maar het helpt ook bij de vertering en absorptie van vetten. De belangrijkste componenten zijn bilirubine, galzouten, cholesterol, fosfolipiden en anorganische ionen.[2]

Bilirubine wordt gevormd door de lever maar ook in de milt en het beenmerg als een afbraakstof van oude rode bloedcellen. Vrij bilirubine is niet wateroplosbaar en wordt daarom meestal aan albumine gebonden in het bloed. Dit eiwitgebonden bilirubine kan niet door de lever of de nier worden geëxcreteerd. De lever conjugeert daarom een deel van dit vrije bilirubine aan glucuronzuur. Dit geconjugeerde bilirubine is wel wateroplosbaar en kan gesecreteerd worden in de gal waarbij het grotendeels via de faeces het lichaam verlaat.[2]

Galzouten worden door de hepatocyten gevormd als afbraakproduct van cholesterol. Na hun secretie in de darm, zullen ze zich organiseren in micellen met de hydrofiele zijden langs de buitenkant en de hydrofobe naar binnen. Hierdoor kunnen ze wateroplosbare bestanddelen zoals cholesterol, triglyceriden en vetoplosbare vitamines opnemen. Op deze manier kunnen ook deze bestanddelen getransporteerd worden naar het bloed. De galzouten worden tot 95% gereabsorbeerd uit de dunne darm om terug in de lever te worden gebruikt. Dit wordt de enterohepatische cyclus genoemd. De rest van de galzouten verlaat het lichaam met de faeces.[2]

De lever speelt een belangrijke rol in het intermediair metabolisme. Vooreerst is de lever verantwoordelijk voor de afbraak en synthese van eiwitten. Bij de synthese betreft het zowel hormonen, cytokines, groeifactoren, transporteiwitten als stollingsfactoren. In feite produceert het alle serumproteïnen met uitzondering van de immunoglobulines.[3] Het meest abundante serumproteïne is albumine. Albumine is vooreerst belangrijk bij de regulatie van de osmotische druk. Albumine werkt immers wateraanzuigend en kan dus het bloedvolume reguleren. Verder bindt het moleculen die minder wateroplosbaar zijn zoals hormonen, bilirubine, vrije vetzuren, oligo-elementen maar ook sommige farmaca. Hierbij worden de stoffen zowel gestabiliseerd als getransporteerd.[2]

De lever functioneert ook in het carbohydraatmetabolisme. Hierbij is het een soort van glucostaat: hij zorgt zowel voor glycogenese, glycogenolyse, gluconeogenese als glycolyse met als doel de stabilisatie van de suikerspiegel. Voedingsglucose wordt na absorptie doorheen de darmwand grotendeels naar de lever getransporteerd. Wanneer het glucosegehalte in het bloed hoog genoeg is, zal de lever het glucose opslaan als glycogeen. Ook in de spier wordt glycogeen opgeslagen, maar dit is enkel voor lokaal gebruik. Wanneer de suikerspiegel te laag is, dan zal het glycogeen terug vrijgesteld worden als glucose. Wanneer de glycogeenreserve opgebruikt is, start de lever met gluconeogenese. Hierbij kunnen lactaat, aminozuren (uit eiwitafbraak) en glycerol (uit vetafbraak) gebruikt worden als alternatieve bron om glucose te synthetiseren. Uiteraard verbruikt de lever zelf ook glucose. Bij deze glycolyse wordt de glucose omgezet in energie om de verschillende functies uit te voeren. Verschillende hormonen regelen dit carbohydraatmetabolisme. Voornamelijk insuline, glucagon en adrenaline oefenen hier antagonistische effecten op uit.[2]

Een ander domein van het metabolisme waarin de lever een rol speelt, is het vetmetabolisme. De lever produceert en kataboliseert lipoproteïnen, synthetiseert en elimineert het cholesterol en zorgt voor de opname en oxidatie van vrije vetzuren. Deze lipoproteïnen bestaan uit lipiden en proteïnen waarbij de verhouding afhankelijk is van het soort lipoproteïne. Een eerste lipoproteïne, het chylomicron, voert de triglyceriden uit de voeding naar de lever, de spier en het vet als energiebron. Het 'very low density' lipoproteïne brengt dan weer nieuw gesynthetiseerde triglyceriden uit de lever naar het vet. Het 'low density' en 'high density' proteïne transporteren cholesterol respectievelijk van en naar de lever. Cholesterol in de lever kan dan even opgeslagen worden, terug naar de andere lichaamscellen gebracht worden of via de gal geëxcreteerd worden.[2]

De lever is tevens belangrijk in het vitaminemetabolisme. Naast zijn rol bij de B vitaminen, is het vooral bij de vetoplosbare vitaminen (vitamine A, D, E en K) dat de lever zijn functie bewijst. Heel belangrijk hierbij zijn de galzouten voor absorptie en de chylomicronen voor transport naar de lever. Bij vitamine A en D zorgt de lever ook voor het transporteiwit, respectievelijk het retinol-bindend proteïne en het vitamine-D-bindend proteïne. Verder worden vetoplosbare vitaminen dikwijls opgeslagen in de lever. Vooral bij vitamine A is de enorme opslag in de Ito-cellen gekend. Bij vitamine D zorgt de lever ook voor activatie. Het vitamine D wordt als inactieve precursor gesynthetiseerd in de huid of opgenomen via de voeding. Deze precursor heeft een activatie nodig vooraleer het functioneel kan zijn. Dit gebeurt doordat de lever een 25-hydroxylatie uitvoert, waarna de nier een 1-hydroxylatie verzorgt. Zo wordt het actieve 1,25 hydroxyvitamine D bekomen.[2]

De lever speelt ook een centrale rol in de homeostase van sporenelementen. De meeste van deze sporenelementen zijn essentieel als componenten van enzymen of hormonen. De lever zorgt hierbij hoofdzakelijk voor de synthese van de transportproteïnen, voor de opslag en voor de excretie bij o.a. ijzer, koper, zink, selenium, mangaan, chroom en kobalt. Speciale aandacht zal hierbij gaan naar koper en zink. Bij koper is de lever voornamelijk verantwoordelijk voor de excretie van koper via de gal, met daarnaast ook een functie in de koperopslag en de synthese van de transportproteïnen ceruloplasmine en albumine. Bij zink vervult de lever naast excretie zijn rol voornamelijk door de transportproteïnen aan te maken: α_2 -macroglobuline, albumine en transferrine. De rol van deze twee metalen ligt vooral in de activatie van bepaalde enzymen. Zo is koper belangrijk voor de vorming van rode bloedcellen en bij de conversie van radicalen. Verder zijn bijna 200 enzymreacties afhankelijk van zink waarbij een groot deel te maken hebben met de leverfuncties: carbohydaat-, proteïne- en lipidemetabolisme, alcoholdegradatie, andere detoxificaties, het immuunsysteem, het vitamine A metabolisme en bloedvorming.[2]

1.3 Cirrose

Levercirrose ontstaat door chronische leverbeschadiging. De frequentste oorzaken zijn chronische virale hepatitis en steatohepatitis door alcohol of obesitas. Andere oorzaken zijn o.a. farmatotoxiciteiten, genetische aandoeningen, auto-immuunziekten en vasculaire afwijkingen. Deze beschadiging stimuleert dan het herstelmechanisme van de lever. Wanneer de beschadiging echter chronisch is, zal het herstel dit niet kunnen bijhouden. Het resultaat is fibrose door een accumulatie van bindweefsel. Door dit bindweefsel blijven er minder functionele hepatocyten over en wordt de geordende structuur verstoord. In een vergevorderd stadium wordt de lobulaire structuur helemaal geëlimineerd, ontstaat nodulevorming en is er leverdysfunctie. Dit eindresultaat is dan cirrose.[1]

Levercirrose wordt geschat op een prevalentie van 4-10% en een incidentie van ongeveer 240/miljoen inwoners/jaar. Verwacht wordt dat de incidentie in de toekomst zal blijven stijgen door het groeiend aantal risicopatiënten zoals de hepatitis-geïnfecteerde groep en personen met obesitas. Deze aandoening kan vooreerst symptomloos voorkomen maar kan uiteindelijk levensbedreigend worden door een verscheidenheid aan complicaties: portale hypertensie, ascites, gastro-intestinale bloedingen, spontane bacteriële peritonitis,

encefalopathie, hepatorenaal syndroom, endocriene abnormaliteiten en hepatocellulair carcinoom. Cirrose vormt dan ook een belangrijke doodsoorzaak in de westerse wereld.[4]

Deze complicaties zijn hoofdzakelijk het gevolg van de verstoorde leverstructuur en schade aan de hepatocyten zelf.

Vooreerst zal de bloedcirculatie verstoort zijn door een verhoogde weerstand. Dit veroorzaakt een verhoogde druk in de vena porta met portale hypertensie als gevolg. Het lichaam kan dan een poging ondernemen om de druk van het portaal systeem te verlagen en zo het portale bloed terug te krijgen in de systemische circulatie door middel van collaterale bloedvaten. De ruptuur van deze collateralen door verhoogde druk kan dan hevige bloedingen veroorzaken. De portale hypertensie zorgt daarnaast voor een verhoogde druk in de vaten van het abdomen. Hierdoor kan een vergroting van de milt (=splenomegalie) zich voordoen en kan de darmwand meer permeabel worden zodat albumineverlies en bacteriële invasie door de darmwand mogelijk is. Deze druk zorgt ook voor waterophoping in de buik (=ascites) en in de perifere lichaamsdelen (=oedeem). In de periferie is dit vooral te wijten aan wijzigingen in de osmotische druk door een verlaagd albumine. In het mesenterium lokt de verhoogde druk een lokale productie van vasodilatoren uit. De hieruit volgende mesenteriële vasodilatatie veroorzaakt enerzijds een activatie van neurohumorale systemen met een verhoogde water- en zoutretentie en anderzijds een verhoogde permeabiliteit met verhoogde vochtaccumulatie.[2]

Bij obstructieve cirrose ontstaat ook een blokkade van de galwegen. Het eerste probleem is dat hierdoor de gal niet voldoende in de darm kan afvloeien. Daar de galzouten essentieel zijn voor vetabsorptie treedt dan vetmalabsorptie op. Hierdoor zullen o.a. vetoplosbare vitamines niet of minder opgenomen worden met verlaagde serumgehalten tot gevolg. Aangezien de gal het lichaam niet meer verlaat via de faeces, zal de gal zich accumuleren in het bloed. De verhoogde concentratie van bilirubine in het bloed veroorzaakt dan een vergeling van de huid en het oogwit. Dit wordt geelzucht genoemd. Ook zal de overmatige gal dan door de nieren worden geklaard met een donkere urine tot gevolg. Bepaalde stoffen zoals bilirubine en koper die normaal via de gal worden geëlimineerd zullen zich beginnen opstapelen.[2]

Naast verstoorde leverorganisatie is vooral de hepatocellulaire schade verantwoordelijk voor een verminderde werkefficiëntie van de lever. De belangrijke opslagfunctie en de biochemische functies van de lever kunnen hierdoor verstoord zijn. Deze schade zal zich laten blijken in het proteïne-, carbohydraat- en lipidemetabolisme. Zo zal een overgrote meerderheid van de cirrosepatiënten glucose-intolerantie hebben en 30% ontwikkelt hierbij

een klinische diabetes. Het precieze werkingsmechanisme is complex en nog niet volledig gekend. De oorzaak is de verminderde perifere insulinegevoelheid (spier- en vetweefsel) waardoor minder glucose in de cellen wordt opgenomen en hierdoor glucose-intolerantie ontstaat. Door het ontstaan van collateralen en de verminderde extractiefunctie van de lever zal er minder insulineklaring gebeuren en ontstaat hyperinsulinemie. Als dan nog eens de insulinesecretie van de pancreas aangetast wordt zoals bij alcoholische cirrose en er ook een hepatische insulineresistentie optreedt, zal een klinische diabetes met een verhoogd nuchter glucose zich manifesteren.[2, 5]

Leverschade veroorzaakt necrose en is dus typisch geassocieerd met infiltratie van inflammatoire cellen. Leverschade initieert ook de activatie van de stellaatcellen. Deze cellen veranderen dan van rustende vitamine A rijke cellen naar fibrogene en proliferatieve cellen die cytokineproductie en chemotaxis uitlokken. In de lever zelf zijn er van nature immuuncellen zoals de Kupffercellen die na stimulatie een lokale inflammatie initiëren. TNF- α is de vroege factor in de cascade en stimuleert dan vooral IL-1, IL-12, IL-6 en IFN- γ secretie. De interleukines kunnen via receptorbinding de transcriptie van acutefaseproteïnen initiëren. Deze proteïnen zijn nogal species-afhankelijk maar hebben als gemeenschappelijk doel de homeostase te herstellen. Bij deze acutefaseproteïnen bestaan er 2 groepen: de type 1 zoals het serum amyloïd A en type 2 waarbij o.a. het fibrinogeen en het α 1-antitrypsine horen. Het verschil bestaat hem erin dat IL-1-achtige interleukines zoals TNF- α vooral de type 1 induceren, terwijl IL-6-achtige interleukines zoals IL-6 zelf vooral de type 2 acutefaseproteïnen induceren. Toch is bij de type 1 proteïnen een synergistisch effect mogelijk door beide groepen van interleukines.[6, 7]

Naast necrose bestaan ook andere oorzaken van inflammatie bij cirrose. Bij biliaire cirrose ontstaat inflammatie door de cholestase. Overigens zorgt de verhoogde druk voor een verminderde darmbarrière en een mogelijke influx van bacteriën.[8]

Leverlijden kan met biochemische tests nagegaan worden. Daarbij kan zowel de synthesecapaciteit, excretiecapaciteit als de hepatocellulaire schade gecontroleerd worden.[8]

De biosynthesecapaciteit van de lever kan getest worden via albumine en protrombine. Deze eiwitten worden immers exclusief door de hepatocyten aangemaakt. Albumine is het meest abundante serumproteïne. In chronische leverziektes zal een verlaagde concentratie zichtbaar zijn door de ernstige leverschade met verminderde albuminesynthese als gevolg. Het serumgehalte van albumine wordt echter ook gereguleerd door andere factoren. Zo zal de

albuminesynthese gestimuleerd worden door bepaalde hormonen en geïnhibeerd worden bij proteïnemalnutritie en in de aanwezigheid van interleukines. Verder kan een vergroot distributievolume, zoals bij ascites, voor een artificieel verlaagde serumconcentratie zorgen. Het albumine zal zich immers over het volledige volume verspreiden waarbij het totale lichaamsalbumine dus niet gewijzigd wordt, maar wel een verlaagde concentratie in het serum aanwezig is.[4, 8]

Een tweede merker van de synthese-capaciteit is de protrombintijd, de tijd gemeten die nodig is vooraleer bloedstolling optreedt. Stolling is het effect van een serie van enzymatische reacties die tenminste 13 factoren vereisen. De lever is namelijk de belangrijkste syntheseplaats van een groot aantal van deze coagulatiefactoren. Bij leverlijden zullen dus minder coagulatiefactoren gesynthetiseerd worden met een verlenging van de protrombintijd tot gevolg. Sommige van deze factoren zijn afhankelijk van vitamine K.[4]

De excretiecapaciteit kan hoofdzakelijk bepaald worden via bilirubine. Na conjugatie door de lever zal het bilirubine uitgescheiden worden via de gal. Indien nu deze excretiecapaciteit beperkt is, dan zal het geconjugeerd bilirubine in het bloed terechtkomen en daar de concentratie doen stijgen. Andere merkers voor cholestase zijn het γ -glutamyltransferase, alkalisch fosfatase en de galzouten.[4, 8]

Om hepatocellulaire schade na te gaan worden transaminasegehalten gebruikt. Transaminasen katalyseren de reversibele transformatie van alfa-ketozuren in aminozuren en spelen zo een rol in de gluconeogenese. Om leverschade aan te tonen worden het alanine aminotransferase (ALT) en het aspartaat aminotransferase (AST) gemeten. Bij leverschade zullen deze enzymen meer vrijgelaten worden en dus een hogere concentratie in het serum bereiken. ALT is vooral in de lever te vinden, terwijl AST naast de lever ook aanwezig is in een groot aantal andere weefsels. De AST/ALT ratio is een diagnostisch hulpmiddel om de soort leverbeschadiging na te gaan. Zo is een ratio hoger dan 2 een suggestie voor alcoholisch leverlijden en zijn kleinere verhogingen in de ratio dikwijls zichtbaar bij cirrose.[4, 8]

1.4 Diermodel

In deze studie wordt gebruik gemaakt van het common bile duct ligation (CBDL) diermodel. Bij dit model wordt de hoofdgalgweg afgebonden zodat na enkele weken secundaire biliaire cirrose ontstaat. De hepatocellulaire schade bij dit model wordt veroorzaakt door cholestase en cholangitis.[9] Deze vorm van extrahepatisch galstuwning komt ook bij de mens voor. Oorzaken hiervan zijn te vinden in Tabel 1.

Door extrahepatische galstuwning zullen de galcanaliculi dilateren met een verlies van microvilli en veranderingen in intercellulaire juncties. Deze veranderingen verhogen dan de canaliculaire permeabiliteit met galevasie in lymfe en bloed. Dit heeft ook een invloed op de hepatocyten. Sommige substraten die in de gal worden gesecreteerd, zullen nu terug in het bloed terecht komen. Wanneer galwegobstructie lange tijd behouden blijft, dan leidt dit tot galwegproliferatie, fibrose en uiteindelijk secundaire biliaire cirrose met portale hypertensie.[8]

Als modeldier wordt voor ratten gekozen omdat muizen onvoldoende serum kunnen leveren voor de talrijke analyses. Tevens dienen de dieren allemaal van hetzelfde geslacht te zijn, daar het geslacht invloed kan hebben op de analysewaarden.

Tabel 1: Oorzaken van extrahepatische galwegobstructie[8]

Hoofdgalgweg: stenen, cyste

Pancreas: carcinoom, chronische ontsteking, cyste

Carcinoom van de hepatopancreatische ampulla

Galwegcarcinoom

Goedaardige of ischemische galwegvernauwing

Galwegatresie

Primaire scleroserende galwegontsteking

Aids cholangiopathie

Thrombose in de portale vene

Sommige maligniteiten van het lymfesysteem

Parasieten

1.5 Malnutritie en cirrose

Malnutritie is een veelvoorkomend probleem bij levercirrose. Zo lijden 50% van de alcoholische, 70% van de niet-alcoholische en alle biliaire obstructieve cirrosepatiënten aan malnutritie. Hierbij dient vermeld te worden dat de malnutritie inderdaad van de etiologie afhangt. Zo zal cholestatische cirrose vooral een calorie-malnutritie veroorzaken en een niet-cholestatische cirrose vooral een proteïne-malnutritie. Een vergevorderde malnutritie beperkt de optimale functionaliteit van het lichaam en kan zo resulteren in complicaties en een slechte prognose. Een vroege correctie van deze nutriëntdeficiëntie kan de levensverwachting en levenskwaliteit verhogen. Malnutritiemeting is dan ook aangewezen om at risk patiënten op te

sporen en eventueel over te gaan tot nutritionele ondersteuning. De beoordeling van de voedingsstatus is moeilijk aangezien cirrose verschillende malnutritiemerkers zoals albumine en de protrombintijd beïnvloedt. Een multivariate aanpak zoals bij een 'subjective global assessment' biedt hierbij de oplossing. Het is een combinatie van medische geschiedenis, lichamelijk onderzoek en basis antropometrie.[3, 4, 10]

Malnutritie is vooral een multifactorieel probleem. De belangrijkste etiologieën voor malnutritie zijn: verminderde vrijwillige voedselinname, malabsorptie, een verminderde leverfunctie met een veranderd nutriënt metabolisme en een hypermetabole status.[10]

De verminderde inname wordt enerzijds veroorzaakt door een veranderde smaakperceptie en eetlust en anderzijds een versnelde verzadiging. De eetlust gaat voornamelijk verloren door TNF- α stijging, terwijl een versnelde verzadiging te wijten is aan de verhoogde druk op de maag door ascites en een vertraagde gastro-intestinale transit.[3, 10]


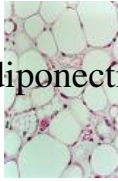

Indien dan toch voldoende voedsel wordt opgenomen, kunnen maldigestie en malabsorptie de opname verstoren. Deze kunnen veroorzaakt worden door de portale hypertensie, de cholestase, de bacteriële overgroei en een eventuele pancreatische deficiëntie. Resultaat is dat voornamelijk vet en vetoplosbare vitamines, samen met mineralen te weinig worden opgenomen. Deze deficiënties van bv zink kunnen dan bijdragen aan de malnutritie door een appetijtverlaging, een verminderde immunofunctie, verlaagde vitamine A gehalten en een veranderd en vertraagd proteïenmetabolisme met vertraagde groei en herstel tot gevolg. Enkele onderzoeken insinueren dat zink ook de link tussen levercirrose en diabetes zou kunnen leggen. Wetende dat zink een deel uitmaakt van het insulinemolecule, zou zinkdeficiëntie bij cirrose immers de werking van het insuline kunnen inperken.[10, 11]

Apart van de verminderde absorptie zal het lichaam ook over minder nutriënten kunnen beschikken door de verstoorde leverfunctie. De lever zal zijn synthese- en opslagfunctie minder vervullen en tevens is de enterohepatische cyclus aangetast. Dit alles zal voor een ander nutriëntmetabolisme zorgen. Doordat de glycogeenreserve van de lever verkleint, zal meer gluconeogenese plaatsvinden en dus een verhoogde proteïneafbraak. Minder beschikbaar eiwit wordt ook veroorzaakt door eiwitverlies via de bloedingen uit de collateralen en de verhoogde darmpermeabiliteit. Cirrose gaat dikwijls ook samen met verminderde insulinesensitiviteit en zo een veranderd nutriënt metabolisme, aangezien minder suikers maar meer vet en proteïnen als substraat zullen gebruikt worden.[10]

Naast een verminderde nutriëntbeschikbaarheid zorgt cirrose ook voor een verhoogd gebruik. Deze hypermetabole status kan ontstaan door o.a. de hyperdynamische circulatie, de circulerende cytokines en de peritonitis als gevolg van verminderde darmbarrièrefunctie.[10] Alles samen genomen staat het lichaam voor een grote uitdaging om voldoende energie te vinden voor zijn functies en zullen de reserves dus opgebruikt worden met een manifeste ondervoeding als gevolg.[3, 10, 12]

In de voedingsstatus spelen ook bepaalde hormonen een rol. Hun secretie kan beïnvloed worden door de voedingsstatus en op hun beurt reguleren ze o.a. de eetlust en het energie- en nutriëntgebruik. Tevens beïnvloeden ze andere orgaansystemen zoals de lever en kunnen ze ook een rol spelen in de immuniteit. (Tabel 2) Drie grote spelers hierbij zijn ghreline, leptine en adiponecine. Inzicht in hun werking en hun concentraties kan ons meer vertellen over de malnutritie bij cirrose.

Tabel 2: Invloed van leptine, adiponecine en ghreline op energieverbruik, appetijt, inflammatie en fibrosevorming en het effect van malnutritie op de concentratie van deze hormonen.[13, 14]

	 Leptine	 Adiponecine	 Ghreline
Energieverbruik	+	+	-
Appetijt	-	=	+
Inflammatie	+	-	-
Fibrosevorming	+	-	-
Respons op malnutritie	↓	↑	↑

+ (stimulatie), - (bescherming, reductie), = (geen invloed), ↑ (verhoogde concentratie), ↓ (verlaagde concentratie)

Adiponecine wordt gesecreteerd tijdens de differentiatie van de vetcellen en onder invloed van insuline. Adiponecine zorgt voornamelijk voor een katabolisch gebeuren: door zijn invloed op de lever en skeletspieren zullen vet- en glucoseproductie worden verlaagd, terwijl vetoxidatie wordt verhoogd. Het gevolg is een lage concentratie van glucose en vrije vetzuren in het bloed. Het verzorgt dus een verhoogde insulinegevoeligheid. Bij insulineresistentie worden verlaagde waarden gezien, bij gewichtsverlies verhoogde waarden. Verder werkt het anti-inflammatoir door TNF- α suppressie.[13, 14]

Ghreline wordt vooral geproduceerd door de epitheelcellen in de maagfundus. Kleine productiehoeveelheden zijn ook te vinden in de placenta, nieren, hypothalamus en hypofyse.

Ghreline, het zogenaamde hongerhormoon, wordt vrijgesteld wanneer de maag leeg is. Zijn signalen naar de hypothalamus verhogen de appetijt zodat de maag terug gevuld wordt. Tevens zal het energieverbruik beperkt worden door o.a. de vetoxidatie te minimaliseren. Bij een negatieve energiebalans worden verhoogde concentratie opgemerkt, bij insulineresistentie worden verlaagde concentraties gezien. Ghreline vervult verder een rol in de immuunrespons door downregulatie van anti-inflammatoire cytokines.[13, 14]

Leptine wordt voornamelijk geproduceerd door gedifferentieerde vetcellen. Onderzoek wees echter ook uit dat minieme producties plaatsvinden in de maagfundus, de lever, de placenta en skeletspieren. Leptine voert zijn acties uit door informatie over de energieopslag in vet door te geven aan de hypothalamus. De secretie is immers rechtevenredig met de vetreserve. Bij een verhoogde vetreserve zal leptine dan voornamelijk de voedselinname beperken en deels het energieverbruik verhogen. Leptine onderhoudt de normale vetreserve van het lichaam. Leptine doet dit niet alleen via centrale anorectische mechanismen maar kan ook de lever, pancreas en skeletspieren beïnvloeden. Algemeen zal synthese of opname van vetten verhinderd worden en zal oxidatie gestimuleerd worden. Naast zijn metabole functie zal het ook een endocrien effect hebben. Zo zorgt leptine voor een stijging in insuline en TNF- α . [13, 14]

Belangrijk is ook te vermelden dat hyperinsulinemie als eventuele complicatie de eetlust en het energieverbruik kan beïnvloeden. Insuline wordt gesecreteerd door de β -cellen van de pancreas wanneer de suikerspiegel hoog is. Naast glucoseopname zal ook de opstapeling hiervan in de vorm van glycogeen gestimuleerd worden en zal de vetoxidatie gestopt worden. Het kan als een verzadigende factor aanzien worden. Onrechtstreeks zal het de appetijt verlagen door een verhoogde vetdepositie met een verhoogd leptine tot gevolg. Insuline kan ook rechtstreeks anorexigene werken op de hypothalamus.[1]

Onderzoek naar de hormonen adiponectine, ghreline en leptine in levercirrose werd voornamelijk de laatste jaren opgezet. Heel wat resultaten zijn gekomen maar toch is er dikwijls geen eenduidigheid. Bij onderzoek in patiënten wordt soms wel een onderscheid gemaakt tussen de verschillende ziektestadia maar zelden wordt een onderscheid gemaakt in de verschillende etiologieën van levercirrose. Onderzoeken die geen onderscheid maken in cirrose-etologie, bekomen een verhoging in alle drie de hormonen. Enkele onderzoeken hebben reeds een onderscheid in de verschillende etiologieën gemaakt en deze tonen soms wel frappante verschillen.[15, 16] Dit onderscheid kan onderzocht worden bij patiënten, maar het is makkelijker in diermodellen. Een groot onderscheid wordt hierbij gemaakt tussen de

alcoholische en niet-alcoholische cirrose. Bij de niet-alcoholische cirrose is het belangrijk biliaire cirrose als een aparte categorie te beschouwen. Verschillende etiologieën zorgen immers voor verschillen in de mechanismen om tot cirrose te komen en kunnen andere complicaties veroorzaken.

Adiponectine werd bij cirrose algemeen als verhoogd waargenomen.[17, 18] In biliaire cirrose werden echter zowel bij patiënten als bij diermodellen nog hogere waarden bereikt. Deze studies toonden aan dat adiponectine via de gal het lichaam verlaat en dat bij cholestase dus automatisch verhoogde waarden aanwezig zijn.[19] Adiponectinemeting in vet bij het CBDL model om een verhoogde synthese te verduidelijken, werd nog niet uitgevoerd. Tevens werd serumadiponectine nog niet nagegaan in andere diermodellen van cirrose of portale hypertensie. Studies toonden aan dat adiponectine als hepatoprotectief en antifibrinogeen kan aanzien worden. Het onderdrukt namelijk de proliferatie van de stellaatcellen en de expressie van fibrogene genen. Verder is ook zijn antagonistisch effect op TNF- α aangetoond. Een adiponectineverhoging in cirrose kan dus aanzien worden als een anti-inflammatoire respons.[20]

In cirrose vond men geen of een lichte stijging van het nuchtere ghreline.[21-23] Nuchter ghreline zou als merker voor malnutritie kunnen gebruikt worden, aangezien het gecorreleerd werd met antropomorfe parameters en voedselinname. Hierbij dient vermeld te worden dat zeker de factor inflammatie kan zorgen voor ghreline verhoging.[21, 22] Een stijgend ghreline zou kunnen wijzen op een beschermende reactie van het lichaam tegen malnutritie, echter dergelijke minieme verhogingen hebben geen fysiologisch effect. Hierbij werd geen verschil gezien tussen de verschillende etiologieën van cirrose.[23] Verder werd ook door opvolging van de ghrelineconcentratie postprandiaal aangetoond dat de ghrelinestijging bij cirrose veel trager was. Dit kan dan leiden tot een verminderde eetlust en dus een mindere energie-inname bij cirrose.[24] Rechtstreeks onderzoek van ghreline in cirrotische diermodellen werd nog niet gepubliceerd. Uit onderzoek bleek wel dat supplementatie van ghreline in cirrotische diermodellen voor een afname van de leverschade zorgt. Hierbij toonde men aan dat ghreline antifibrotische eigenschappen heeft doordat het zowel anti-inflammatoir als anti-oxiderend werkt.[25]

Leptine werd bij patiënten algemeen als verhoogd opgemerkt. Er bestaat heel wat discrepantie over de correlatie met de ernst van de cirrose. Algemeen wordt wel aangenomen dat in een vergevorderd stadium een afname kan waargenomen worden hoofdzakelijk door de verlaagde vetmassa.[14, 16, 24] In klinische studies zag men stevast een leptineverhoging

zeker bij alcoholische cirrose[20], terwijl er bij biliare cirrosepatiënten echter een daling was in leptinegehalten[16]. Diermodelstudies bevestigen deze trend daar leptine ook gestegen was in het alcoholische model, terwijl bij het model voor biliare cirrose geen significante verhoging of zelfs een verlaging werd gezien.[15, 26] Diermodellen toonden verder aan dat leptine profibrinogeen is en zelfs essentieel is om fibrose te ontwikkelen. Leptine activeert immers de Kupffercellen, stellaatcellen en sinusendothelcellen. Deze activatie leidt tot verhoogde fagocytreactie, radicalen- en cytokinesecretie. Verder verhindert leptine de afbraak van gevormd collageen.[20]

1.6 Doelstelling

Deze studie was een onderdeel van een overkoepelend project omtrent cirrose en malnutritie. Dit project werd uitgevoerd in dieren aangezien hier de verschillende oorzaken elegant kunnen opgesplitst worden. Verder leveren dieren het voordeel van weefselprelevatie. In dit project werden dan ook de drie meest gebruikte diermodellen voor cirrose onderzocht.

Een eerste model is het CBDL model waarbij door ligatie van de hoofdgalweg, secundaire biliare cirrose en portale hypertensie ontstaan. Een tweede model is het PPVL (partial portal vein ligation) model als model voor geïsoleerde portale hypertensie door partiële portale vene ligatie. Een laatste model is het CCL4 (carbon tetrachloride) model met kenmerken van alcoholisch cirrose door chronische koolstof tetrachloride toediening.[9] Voor een uitvoerige bespreking van het PPVL model kan verwezen worden naar de thesis van Elke De Beleyr. Het CCL4 model werd door beide studenten bestudeerd. De gegevens hiervan zullen gebruikt worden voor een wetenschappelijke publicatie.

Dit project is het eerste waarbij het fenomeen malnutritie in de drie modellen tegelijk onderzocht werd. Zeker het onderzoek op de hormonen adiponectine, ghreline en leptine in de drie modellen tegelijk is uniek. Hierbij werd niet alleen de serumconcentratie van deze drie hormonen nagegaan, ook het adiponectine- en leptinegehalte in hun primaire syntheseplaats, het vet, werden gemeten. Het fenomeen malnutritie is immers niet geheel identiek bij de verschillende varianten van levercirrose. Zo zullen licht verschillende mechanismen spelen bij alcoholgeïnduceerde cirrose dan bij biliare cirrose. Tevens kan zo de invloed van portale hypertensie apart op de voedingstoestand aangeduid worden. Deze visies kunnen dan gebruikt worden om een meer gerichte benadering van malnutritie te bekomen. Verder is er nog onvoldoende inzicht in de complexe interacties van hormonen op de voedingstoestand.

Het doel van deze studie was dus om de voedingsstatus van het CBDL model te vergelijken met een controle model. Hierbij diende de efficiëntie van het model voor cirrose-inductie en de aanwezigheid van een mogelijke malnutritie te worden geverifieerd. Verder werden de verschillende oorzaken van malnutritie onderzocht: voedsel- en drankopname, (vet)malabsorptie, leverfunctie, insulineresistentie en metabole status. Tevens werd beslist de concentraties van het adiponecine, ghreline en leptine na te gaan.

2 Materialen en methoden

2.1 Proefdieren

Het experiment werd uitgevoerd in mannelijke Wistar ratten van 8 weken aangekocht bij Iffa Credo (Brussel, België). De ratten werden onder constante temperatuur en vochtigheid gehouden in een 12 uur gecontroleerde donker/licht cyclus. De ratten zatten in aparte kooien en werden ad libidum gevoederd met standaardvoer in pelletvorm en konden ad libidum kraantjeswater drinken via zuigflessen. De protocols werden goedgekeurd door de Ethische commissie voor proefdieren aan de faculteit Geneeskunde en gezondheidswetenschappen, Universiteit Gent, België.

In dit experiment werd gebruik gemaakt van de CBDL inductie als model voor secundaire biliaire cirrose.

Alvorens de cirrose-inductie werd uitgevoerd, werden alle ratten gewogen. De chirurgische procedure werd uitgevoerd in steriele condities. De lichaamstemperatuur van de ratten werd behouden door het gebruik van warmtekussens. Onder isofluraan inhalatie anesthesie (Forene[®], Abbott NV, Brussel, België) werd een middellijn abdominale insnijding gemaakt. De hoofdgalgweg (common bile duct) werd geïsoleerd en afgesnoerd op 2 plaatsen met een afbindingsdraad van niet-resorbeerbare 7-0 zijde. De eerste afsnoering vond plaats onder de junctie van de hepatische ductus en de tweede boven de ingang van de pancreatische ductus. Ter preventie van biloomformatie, werd er vooraleer de bovenste ductus af te binden, 150 µg formaline 10% ingespoten in de galwegen. Zo werd een volledige stase van de gal bekomen. De hoofdgalgweg werd dan tussen de 2 afsnoeringen doorgesneden. Het abdomen werd vervolgens gesloten met hechting van abdominale spieren en huid. Na 4 weken werden de experimenten op deze dieren uitgevoerd.

Als controle werden sham ratten gecreëerd door de abdominale holte te openen en de hoofdgalgweg te isoleren zonder enige afsnoering aan te brengen. Daarna werd het abdomen opnieuw gesloten met hechting van abdominale spieren en huid. Na 4 weken werden de experimenten op deze dieren uitgevoerd.

Uit de ervaringen in het labo, bleek dat tenminste 8 ratten nodig waren in elke groep om statistische significantie te bekomen. Rekening houdend met eventuele mortaliteit en mislukte inducties werden 12 ratten in de CBDL groep opgestart en 10 ratten in de sham groep.

2.2 Metingen tijdens de inductietijd

De dieren werden elke dag geobserveerd en eventueel overlijden werd gerapporteerd. Metingen werden uitgevoerd op de dag van de inductie, daarna tweemaal per week op vaste dagen gedurende 4 weken en ook op de avond voor de sacrificatie. Steeds werd dezelfde elektronische weegschaal gebruikt. Het gewicht van de dieren werd genoteerd tot op 1 g nauwkeurig en telkens ook omgezet als percentage van het begingewicht. Verder werd het voedsel gewogen tot op 0,01 g nauwkeurig en wekelijks werd de aanvulling gewogen om zo de geconsumeerde portie te berekenen. Het water werd gekwantificeerd met behulp van een maatcilinder tot op 5 ml nauwkeurig en werd ook wekelijks aangevuld. De avond voor de sacrificatie werd na de meting het voedsel weggenomen, maar bleef water ter beschikking. Tevens werd geprobeerd om met een elektrische caliper de huidploidikte ter hoogte van de rug na te gaan. Hierbij werd op 4 cm van de staartbasis tot op 0.01 mm nauwkeurig gemeten.

2.3 Bloed- en weefselafname

Na 4 weken werden de dieren terug verdoofd met isofluraan. De rechter halsregio werd geschoren en ontsmet. Een incisie werd gemaakt en de rechter arteria carotis werd afgezonderd voor ongeveer 3 cm. Het meest craniale gedeelte werd afgebonden en een carotisklem werd gezet op het meest caudale deel. Tussen deze beide afbindingen werd een sonde in de carotis in de richting van het hart gebracht waarbij ter hoogte van de tip de carotis werd afgebonden. Hierna werd de carotisklem losgemaakt en bloed afgenomen. Een deel van het bloed diende om een voorgemaakt protrombinebuisje met citraat verder op te vullen tot aan de maatstreep. Dit werd dan afgecentrifugeerd op 2250 rotaties per minuut gedurende 10 minuten. De rest van het bloed werd opgevangen in ebjes en gecentrifugeerd gedurende 10 minuten op 2000 rotaties per minuut waarna het serum werd afgenomen. De stalen werden dan op -20°C bewaard voor testen op AST, ALT, albumine, bilirubine, protrombinetijd, TNF- α , IL-6, vitamine A, vitamine D, vitamine E, koper, zink, glucose, insuline, ghreline, leptine en adiponectine.

De nekregio en de abdominale regio werden geschoren en ontsmet om dan een stukje huid te preleveren. Deze huidstalen werden op formol bewaard voor histologisch onderzoek. Verder werd een abdominale incisie gemaakt. Eventueel ascitesvocht werd opgezogen voor kwantificatie. De lever en milt werden gewogen tot op 0,01 gram nauwkeurig en gewicht werd genoteerd als percentage van het totaal lichaamsgewicht bij sacrificatie. Een deel van het abdominaal vet werd verwijderd en na behandeling met vloeibare stikstof bewaard bij -80°C voor eiwitanalyse. Uit elk van de 3 leverlobben (linker, rechter en middelste) werd een

staal van ± 1 cm verwijderd en in formol gebracht voor histologisch onderzoek. Als laatste werd ook een deel van het visceraal peritoneum ter hoogte van de blinde darm gepreleveerd en in formol gebracht voor histologisch onderzoek.

2.4 Biochemische analyse bloed

2.4.1 ELISA

De ELISA-techniek of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay werd gebruikt om de concentratie van bepaalde eiwitten in een oplossing te bepalen. Hierbij werden steeds de instructies van de verkoper gevolgd. Zowel competitieve als niet-competitieve ELISA's werden gebruikt. Het werkingsmechanisme kende hierbij kleine variaties. Algemeen werd een vooropgestelde hoeveelheid van het staal in de welletjes van een 96 microtiterplaat gebracht waarop reeds een antilichaam tegen het welbepaalde eiwit gecoat was. Het doel was een antilichaam-antigen binding te bekomen die na toevoeging van reagentia in verschillende stappen een kleuromslag teweegbracht. De intensiteit van deze kleur werd gemeten met een absorbantiemeter (Wallac 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland). De concentratie kon dan berekend worden aan de hand van de absorbantie en een ijklijn. Deze ijklijn werd bekomen door ook een standaardreeks mee te nemen in het protocol. Naargelang de detectierange van de kit waren eventuele verdunning van het staal nodig vooraleer de analyse gebeurde. Deze verdunning werden dikwijls aangeraden in de instructies en werden ook telkens eerst uitgetest. Resultaten werden dan ook altijd gecorrigeerd voor deze verdunning.

ELISA werd uitgevoerd op serum voor ghreline (Ghrelin EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals, Californië, USA), adiponectine (Adiponectin ELISA kit, Phoenix Pharmaceuticals, Californië, USA), leptine (Quantikine leptin immunoassay, R&Dsystems, Verenigd Koninkrijk), IL-6 (Quantikine Rat IL-6, R&Dsystems, Verenigd Koninkrijk), TNF- α (Quantikine Rat TNF- α and TNFSF1A, R&Dsystems, Verenigd Koninkrijk), insuline (Rat insuline ELISA kit, Crystal Chem Inc, Illinois, USA) en albumine (Rat albumine ELISA kit, Biovendor, Duitsland).

2.4.2 Bepalingen in het routinelabo

Metingen voor AST, ALT, bilirubine, glucose, vitamine A, vitamine D, vitamine E, zink en koper werden uitgevoerd in het klinisch labo van het Universitair Ziekenhuis Gent. Steeds werd hiervoor serum gebruikt, alleen bij de protrombinetijd was citraat-plasma vereist. Protrombinetijd werd verkregen via mechanische coagulometrische bepaling. AST en ALT

ondergingen een spectrofotometrische bepaling. Direct bilirubine onderging reactie met diazonium en werd fotometrisch gemeten. Glucose werd bepaald met een hexokinasmethode, gevolgd door fotospectrometrische bepaling. Vitamine A en E ondergingen een vloeistof-vloeistof extractie gevolgd door hoge druk vloeistofchromatografie en UV-detectie. 25-hydroxy vitamine D bepaling gebeurde via een radio-immunoassay. Zink en koper werden tenslotte gemeten via inductieve gekoppelde plasma massaspectrometrie. Uit de verkregen nuchtere glucose- en insulineconcentratie werd de insulineresistentie nagegaan via HOMA (homeostasis model assessment). De formule voor HOMA berekening is als volgt: “(glucose x insuline) / normalisatiefactor” waarbij de normalisatiefactor de “glucose x insuline” voorstelt van een niet-insulineresistente populatie.[27] In deze studie werd dus de gemiddelde ‘glucose x insuline’ van de sham groep als normalisatiefactor genomen.

2.5 Biochemische analyse vetstalen

Vooreerst werd een RIPA-buffer aangemaakt. Deze lysebuffer bevat proteïne inhibitoren en fosfatase inhibitoren om de vetstalen te lyseren:

- 25 mM Tris; pH 8,2 0.1515g (VWR International, Leuven, België)
- 50 mM NaCl 0.1461 g (VWR International, Leuven, België)
- 0.5 % NP40 250 µl (FlukaChemieGmbH, Buchs, Zwitserland)
- 0.5 % deoxycholaat 250 µl (Sigma, St-Louis, MO, VS)
- 0.1 % SDS 250 µl (Bio-rad Laboratories S.A.-N.V., Nazareth Eke, België)
- Mini EDTA-free tablet 1000 µl (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Duitsland)
- β-glycerofosfaat 2.75g (Sigma, St-Louis, MO, VS)
- DTT 50 µl (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Duisland)
- Standard fosfatase inhibitor cocktail 1000 µl (Sigma, St-Louis, MO, VS)

Het lyseren gebeurde door 20 mg weefselstaal met 150 µl RIPA te soniceren. Na 20 minuten werden de lysaten aan 4°C gedurende 10 minuten aan het maximum toerental gecentrifugeerd. Het supernatans werd afgepipeteerd en op -80°C bewaard.

Via een colorimetrische analyse werd de eiwitconcentratie gemeten. Hiervoor werd van elk lysaat 5 µl gepipeteerd in een microtiterplaat. Bij elk lysaat werd eerst 25 µl reagens A' en dan 200 µl reagens B toegevoegd (Bio-Rad DC Protein assay, Bio-Rad Laboratories, Nazareth-Eke, België). In de eerste stap reageerde het eiwit met het koper in reagens A'. In de tweede stap werd het reagens B gereduceerd door het koper-eiwit complex wat leidde tot een blauwe kleuromslag. Dit werd voor elk staal in duplo gedaan en ook werd een blanco (=

RIPA-buffer) in duplo meegenomen. De microtiterplaat werd vervolgens in een microtiterplaatlezer (Wallac 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland) gebracht om de absorptie bij 750 nm te bepalen. De gemiddelde absorptie van de duplo's werd berekend en gecorrigeerd voor de blanco-waarde. De concentratie eiwit (mg/ml lysaat) werd dan bekomen door de formule $Y=aX+b$ (waarbij Y = gecorrigeerde absorptie, X =concentratie eiwit, $a=0.028$ en $b=0.1062$)

Op het overig lysaat werd dan leptine en adiponectine gehalte nagegaan via bovenvermelde ELISA. De ELISA resultaten in ng/ml serum werden dan gecorrigeerd voor de proteïnebepaling zodat de resultaten werden genoteerd in ng/mg proteïne.

2.6 Lichtmicroscopisch onderzoek

2.6.1 Weefselcoupes

Stalen werden na 24 uur fixatie in formol (Klinipath, Geel, België) overgebracht naar een 4% fosfaat gebufferde zoutoplossing (Klinipath, Geel, België). Na onderdompeling in een stijgend ethanolbad van telkens 1 uur in respectievelijk 30, 50, 70, 96, 99 en opnieuw 99% ethanol (Klinipath, Geel, België) en een 2 uren durende spoeling in Ultraclear (Klinipath, Geel, België) werden de weefsels in paraffine gebed. Van de huid- en levermonsters werden 5µm weefselsecties onder een hoek van 6° gesneden met een Leica RM 2145 sliding microtoom (Leica Microsystems, Nussloch, Duitsland) voor histologie. Van het visceraal peritoneum werden 2 µm weefselsecties onder een hoek van 6° gesneden. De weefselcoupes werden dan eerst in een warmwaterbad tussen 40 en 50 °C gelegd om een goede strekking te bekomen. Nadien werden ze op een gecoat draagglasje gebracht en overnacht in de oven geplaatst op 37°C.

2.6.2 Protocol voor haematoxyline-eosine kleuring

Coupes werden gedeparaffineerd door onderdompeling gedurende 10 minuten in Ultraclear, 10 minuten 99% ethanol, 10 minuten 96% ethanol, 5 minuten 70% ethanol en 5 minuten 50% ethanol. Na dit dalende ethanolbad werden de stalen 5 minuten gespoeld met gedistilleerd water. Daarna werden deze 30 seconden in Mayer's haematoxyline oplossing (Klinipath, Geel, België) ondergedompeld. Verder gebeurde een spoeling gedurende 5 minuten onder stromend water en 5 minuten in gedistilleerd water. Hierna werden de coupes gedurende 5 minuten ondergedompeld in 1% eosine-oplossing (Klinipath, Geel, België) en opnieuw gespoeld. De coupes ondergingen dan weer hetzelfde ethanolbad maar in omgekeerde

volgorde. Na 10 minuten Ultraclear en 5 minuten Mounting Clear (Klinipath, Geel, België) behandeling, werden enkele druppeltjes Neutral Mounting Medium (D.P.X, Klinipath, Geel, België) op het draagglasje gepipetteerd zodat een dekglasje kon gemonteerd worden.

2.6.3 Protocol voor Sirius Red kleuring

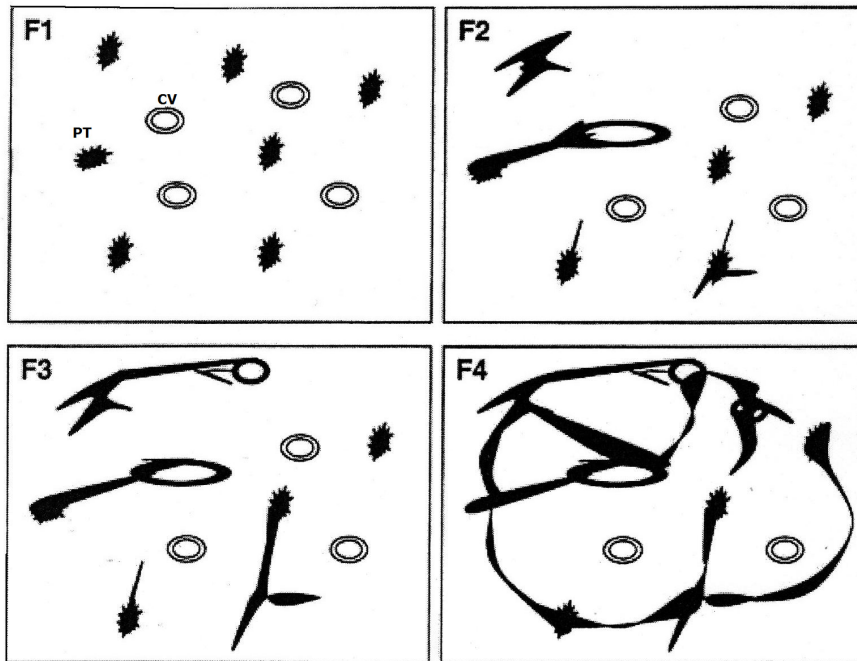
Coupes werden gedeparaffineerd door onderdompeling gedurende 10 minuten in Ultraclear, 10 minuten 99% ethanol, 10 minuten 96% ethanol, 5 minuten 70% ethanol en 5 minuten 50% ethanol. Na dit dalende ethanolbad werden de stalen 5 minuten gespoeld met gedestilleerd water. Daarna werden deze 30 minuten in een 0.1% Sirius Red oplossing (Klinipath, Geel, België) ondergedompeld. Hierna gebeurde een spoeling gedurende 5 minuten onder stromend water en 5 minuten in gedistilleerd water. Na 10 minuten Ultraclear en 5 minuten Mounting Clear behandeling, werden enkele druppeltjes Neutral Mounting Medium op het draagglasje gepipetteerd zodat een dekglasje kon gemonteerd worden

2.6.4 Histopathologie van de lever

De leversecties werden gekleurd met Mayer's haematoxyline-eosine (H&E) en Sirius Red.

De Sirius Red kleuring kleurde het collageen rood en het cytoplasma geel-rozig. Zo werd informatie verkregen over de verhoogde hoeveelheid collageen depositie en kon het fibrose/cirroze stadium geëvalueerd worden. Met behulp van een lichtmicroscop (Olympus BX41, Aartselaar, België) werden de coupes gescoord volgens de semi-kwantitatieve Metavir score. De Metavir fibrose stadia van de portale tractus worden als volgt gescoord: F0, geen fibrose; F1, fibrotische veranderingen beperkt tot de portale velden (portale fibrose); F2, portale fibrose met vorming van enkele septa; F3, vorming van fibreuze septa van portaal veld naar portaal veld (septale fibrose); F4, cirrose. (Figuur 3)

De H&E kleuring werd uitgevoerd om de algemene morfologie te evalueren. Haematoxyline kleurde als basische kleurstof vooral de negatief geladen of zure componenten. Eosine kleurde als zure kleurstof eerder de positief geladen of basische componenten.



Figuur 3: Stagering van het fibrose/cirrose stadium met de Metavir score. CV: centrale vene, PT: portale tractus. [Bedossa P., Hépatites chroniques virales. La biopsie hépatique en pathologie non tumorale du foie. Groupe Metavir. Paris, France: Elsevier, 2000, p 31]

2.6.5 Histologie van huid en visceraal peritoneum

Coupees van huid en visceraal peritoneum werden gekleurd met H&E. De coupes werden dan geblindeerd en met behulp van een lichtmicroscop werden vetcellen bekeken. Op een vergroting 40X werd een foto genomen. Via software (Cell D life science documentation software, Olympus, Aartselaar, België) werd het contrast versterkt en werd de omtrek van de vetcellen gemeten in μm . Per staal werden ad random 3 regio's gevisualiseerd waarbij telkens 10 vetcellen werden gemeten.

2.7 Statistische analyse

De data werden beschreven als de gemiddelde \pm standaarddeviatie. Afrondingen werden gebruikt bij meer dan 3 cijfers na de komma. De distributie van de data werd gecontroleerd via boxplots. De data waren niet-normaal verdeeld. In SPSS (Statistical package for the social sciences) werd daarom de Mann-Whitney rank sum test uitgevoerd om statistisch significant verschil tussen de sham en CBDL groep te bepalen. Hierbij werden *P*-waarden gelijk aan of lager dan 0.05 beschouwd als statistisch significant.

3 Resultaten

3.1 Metingen tijdens de inductietijd en sacrificatie

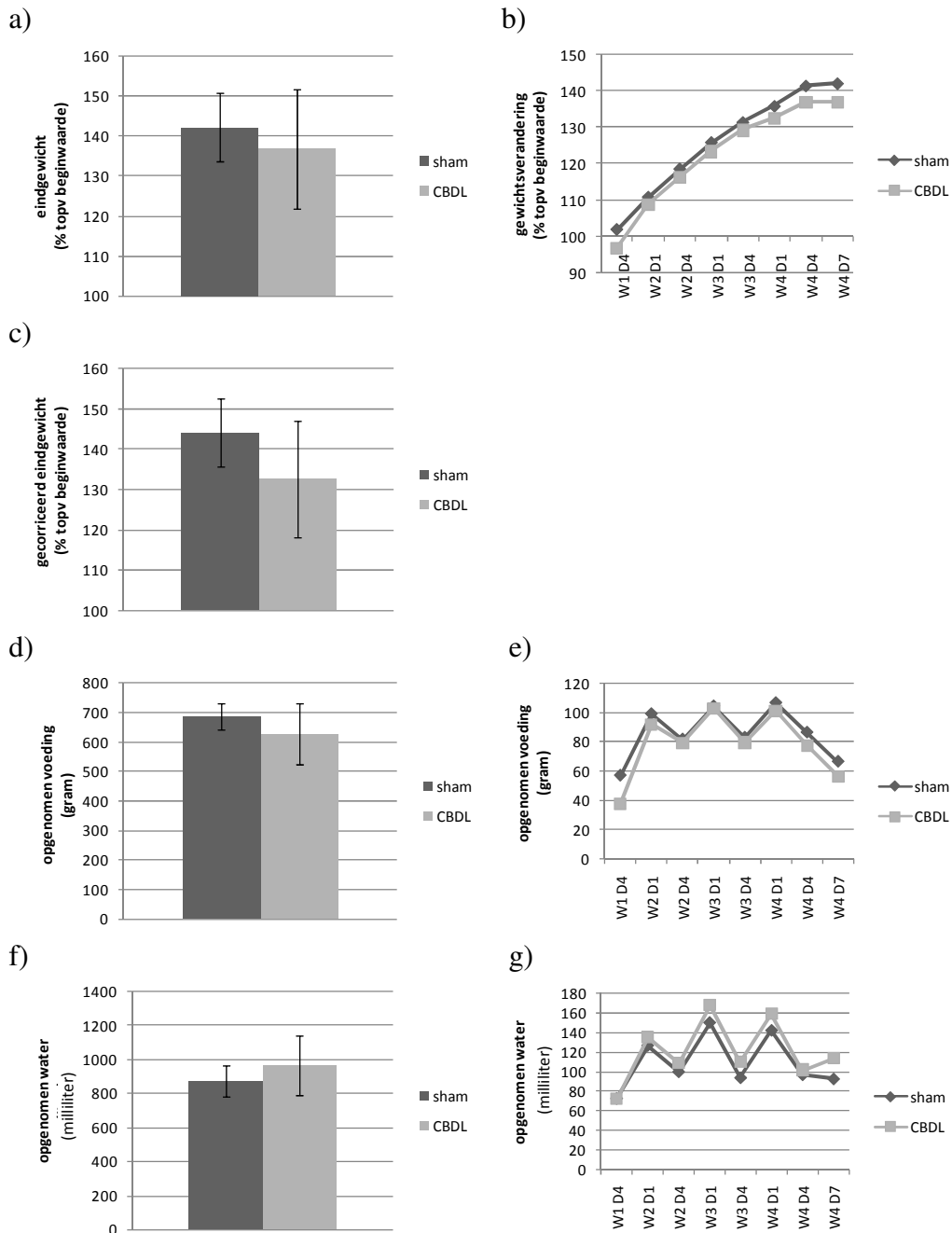
Bij de inductie lieten 3 ratten het leven door moeilijkheden bij de verdoving. Hierdoor werden 11 CBDL ratten en 8 controleratten bekomen. In de CBDL groep was er 1 sterfgeval op de 6^e dag na inductie. In de sham groep waren er geen sterfgevallen.

Bij sacrificatie werd opgemerkt dat één van de CBDL ratten niet goed geïnduceerd werd. Dit besluit werd genomen op basis van heptosplenair gewicht. Uit de biochemische analyse bleek ook geen invloed van cirrose op AST, ALT en bilirubine. Ook bij de microscopische analyse kon geen leverschade worden opgemerkt. Dit dier werd dan ook niet meegenomen in de berekeningen. In totaal werden dus de gegevens van 8 controleratten en 9 CBDL ratten in rekening gebracht.

Over de inductieperiode werd het gewicht van de dieren gevolgd. Al de dieren namen in gewicht toe over deze periode. Er werd geen significant verschil tussen sham en CBDL gevonden in eindgewicht. Wel werd bij de eerste meting een significant mindere gewichtstijging gezien in CBDL. Zie fig. 4a-b. De huidplooiemeting werd na de eerste dag stopgezet, daar de resultaten niet reproduceerbaar bleken.

Over de inductieperiode werd ook totaal opgenomen voeding en water opgevolgd. Hierbij werd geen significant verschil gevonden. Wel werd bij de eerste meting een significant mindere voedselopname in CBDL opgemerkt. Zie fig. 4d-g.

Macroscopische evaluatie van de lever gaf een ietwat hardere en een meer hobbelige lever bij de CBDL groep. Bij de sacrificatie hadden de CBDL ratten duidelijk een vergrote lever, maar ook een vergrote milt. Voor de milt werden relatieve waarden van 0.181 ± 0.028 % voor de shamgroep en 0.460 ± 0.121 % voor de CBDL groep verkregen ($P < 0.001$). Voor de lever werden relatieve waarden van 2.607 ± 0.118 % voor de shamgroep en 6.500 ± 0.790 % voor de CBDL groep bekomen ($P < 0.001$). Aangezien milt en lever enorm toenamen, werd verwacht dat deze een grote invloed op het gewicht hadden. Om die reden werd het lichaamsgewicht gecorrigeerd voor heptosplenair gewicht. Hierbij werd het eindgewicht weer uitgedrukt als percentage van het begingewicht. Bij het eindgewicht werd echter het heptosplenair gewicht bij iedere rat afzonderlijk afgetrokken en bij het begingewicht werd telkens het gemiddelde heptosplenair gewicht van de shamgroep afgetrokken. Dit laatste werd gedaan daar het heptosplenair gewicht op dag 1 onbekend bleef. Er was nog steeds geen significant verschil, maar er was wel een duidelijke trend naar een mindere gewichtsstijging bij CBDL. Zie fig. 4c.



Figuur 4: Metingen tijdens de inductietijd

a) Gewichtsverandering over inductietijd. Sham ($142.283 \% \pm 8.469$) vs CBDL ($136.842 \% \pm 15.027$) $P=0.441$. b) Tijdsverloop gewicht. Op de x-as zijn de metingpunten weergegeven in week (w) en dag (d) over de inductietijd. Alleen op W1D4 significant verschil: Sham ($101.939 \% \pm 2.176$) vs CBDL ($96.939 \% \pm 4.355$) $P=0.012$ c) Gewichtsverandering over inductietijd gecorrigeerd voor heptosplenair gewicht. Sham ($144.040 \% \pm 8.796$) vs CBDL ($132.686 \% \pm 14.473$) $P=0.102$ d) Opgenomen voeding tijdens de inductietijd. Sham ($685.851 \text{ g} \pm 44.009$) vs CBDL ($627.530 \text{ g} \pm 104.538$) $P=0.149$ e) Tijdsverloop opgenomen voeding. Op de x-as zijn de metingpunten weergegeven in week (w) en dag (d) over de inductietijd. Alleen op W1 D4 significant verschil: Sham ($56.844 \text{ g} \pm 6.313$) vs CBDL ($37.861 \text{ g} \pm 11.034$) $P=0.001$ f) Opgenomen water tijdens de inductietijd. Sham ($875.630 \text{ ml} \pm 90.017$) vs CBDL ($968.890 \text{ ml} \pm 174.94$) $P=0.123$ g) Tijdsverloop opgenomen water. Op de x-as zijn de metingpunten weergegeven in week (w) en dag (d) over de inductietijd. Geen significante verschillen.

Een andere opmerking bij de sacrificatie was de gele kleur van het serum door gestegen bilirubineconcentratie bij de CBDL groep.

3.2 Biochemische analyse bloed en weefsel

In tabel 3 zijn de resultaten van de biochemische analyse op het bloed en weefsel weergegeven. Bij CBDL was er een duidelijke stijging in AST, ALT, bilirubine, koper en TNF- α . Verder was er bij CBDL ook een duidelijke daling in vitamines A, D en E, albumine en serum leptine. Bij het vetlysaat werd tevens een dalende trend in leptine opgemerkt. IL-6 kende een hogere gemiddelde in de CBDL groep, dat echter gemaskeerd werd door een grote standaarddeviatie. Bij adiponectine, ghreline, zink, glucose en insuline werden geen verschillen gevonden tussen de groepen. Wanneer de HOMA-index werd bepaald uit de glucose- en insulinewaarden, werd ook geen significant verschil gevonden in insulineresistentie (1.138 ± 0.82 bij CBDL vs standaard 1).

De stalen volbloed voor protrombinetijd werden te lang bewaard vooraleer analyse uit te voeren. Deze waarden werden dan ook niet weergegeven.

Tabel 3: Resultaten biochemische analyse bloed en weefsel

	Sham (n=8)	CBDL (n=9)	P-waarde
AST (U/l)	44.8 \pm 6.670	328.93 \pm 144.56	<0.001***
ALT (U/l)	28.088 \pm 8.426	103.578 \pm 30.67	<0.001***
Bilirubine (mg/dl)	0.05 \pm 0.023	9.052 \pm 1.41	<0.001***
Albumine (g/l)	38.579 \pm 0.562	29.111 \pm 1.395	0.002**
Vitamine A (μ g/dl)	36.723 \pm 4.970	25.843 \pm 9.416	0.001**
Vitamine D (ng/ml)	23.47 \pm 4.24	4.64 \pm 1.25	0.001**
Vitamine E (μ g/dl)	0.506 \pm 0.130	0.227 \pm 0.041	0.001**
Zink (μ g/dl)	111.45 \pm 8.538	107.81 \pm 15.037	0.596
Koper (μ g/dl)	111.7 \pm 13.9	522.2 \pm 94.2	0.001**
Glucose (g/l)	1.554 \pm 0.397	1.341 \pm 0.356	0.193
Insuline (ng/ml)	569 \pm 406.350	775.167 \pm 466.589	0.361
IL-6 (pg/ml)	3.766 \pm 5.462	20.74 \pm 25.979	0.542
TNF- α (pg/ml)	0.269 \pm 0.415	7.429 \pm 3.117	0.002**
Leptine serum (ng/ml)	338.239 \pm 109.301	195.280 \pm 116.265	0.045*
Leptine vet(ng/mg)	182.202 \pm 146.435	99.259 \pm 46.714	0.105
Adiponectine serum (ng/ml)	2917.367 \pm 1570.381	2775.655 \pm 1418.484	0.754
Adiponectine vet (ng/mg)	134.774 \pm 73.132	234.916 \pm 113.456	0.251
Ghreline serum (ng/ml)	2,337 \pm 0,967	2,967 \pm 1,334	0.294

AST (aspartaat aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), IL-6 (interleukine 6), TNF- α (tumor necrosis factor alfa), CBDL (common bile duct ligation), *($P < 0.05$ CBDL vs sham), **($P < 0.01$), ***($P < 0.001$)

3.3 Lichtmicroscopisch onderzoek

3.3.1 Histopathologie van de lever

De leverlobben werden via de Sirius Red kleuring op fibrose/cirrose geëvalueerd. De indeling gebeurde met de Metavir score (zie materialen en methoden). De meeste van de CBDL ratten werden als F3 gescoord aangezien duidelijk collageenbanden te zien waren, maar deze niet steeds het volledige portaal veld rondgingen zodat niet steeds nodules gevormd werden. De controleratten werden allemaal als F0 gescoord. Bij de CBDL ratten werd verder ook galwegproliferatie gezien. Zie fig. 5-7.

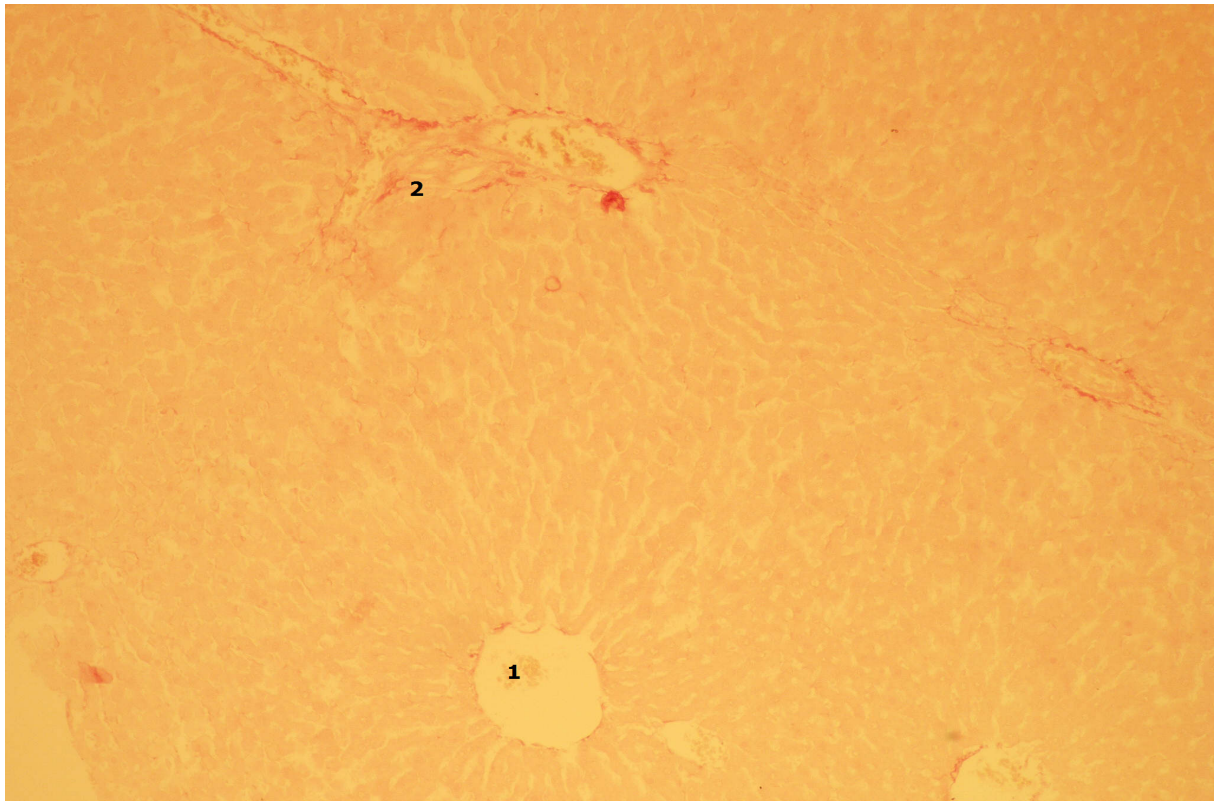
H&E kleuring liet toe de algemene morfologie te evalueren. Zo waren bij de sham ratten de normale structuren van het leverweefsel te zien. Radiaal gerangschikte hepatocyten waren zichtbaar rond de centrale vene zonder afwijkende cellen of aflijningen. Verder waren duidelijk de portale triaden met venule, arteriool en galkanaaltje te onderscheiden. Zie fig. 8.

Bij de CBDL ratten waren histopathologische afwijkingen zichtbaar. Net zoals op de Sirius Red kleuring, was ook hier de fibrosevorming opmerkelijk. Verder werd ook galwegproliferatie opgemerkt in het portale kanaal en was er cholestase zichtbaar. Zie fig. 9.

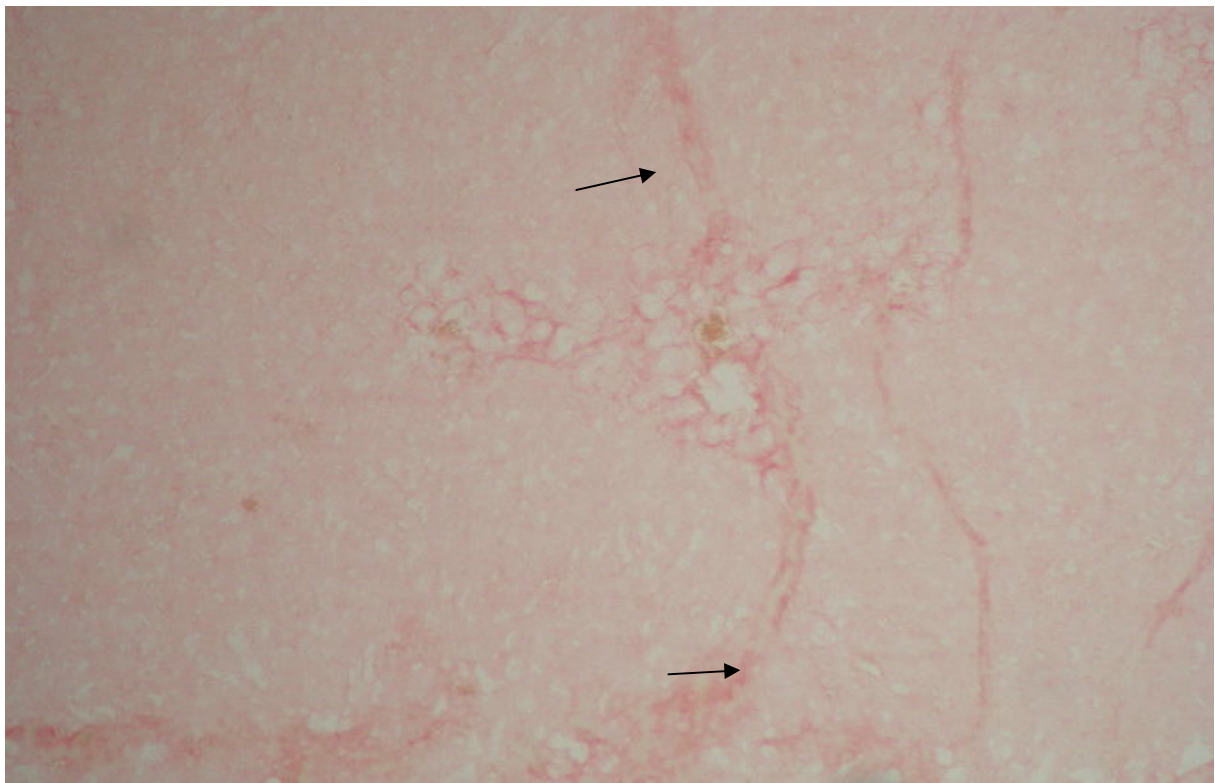
3.3.2 Histologie van huid en visceraal peritoneum

Op de H&E kleuring van de huidcoupes werden maar fracties van de vetlaag gevonden. Verdere metingen hierop werden dan ook niet uitgevoerd.

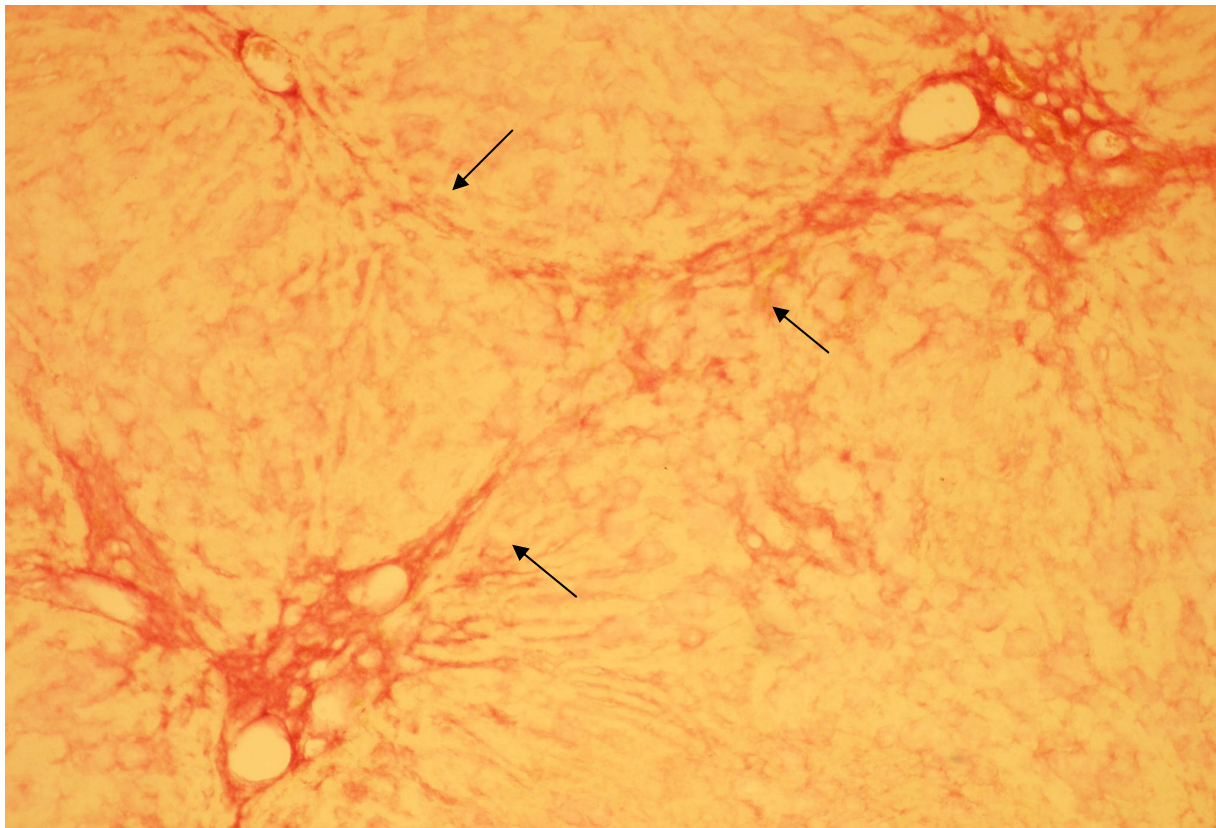
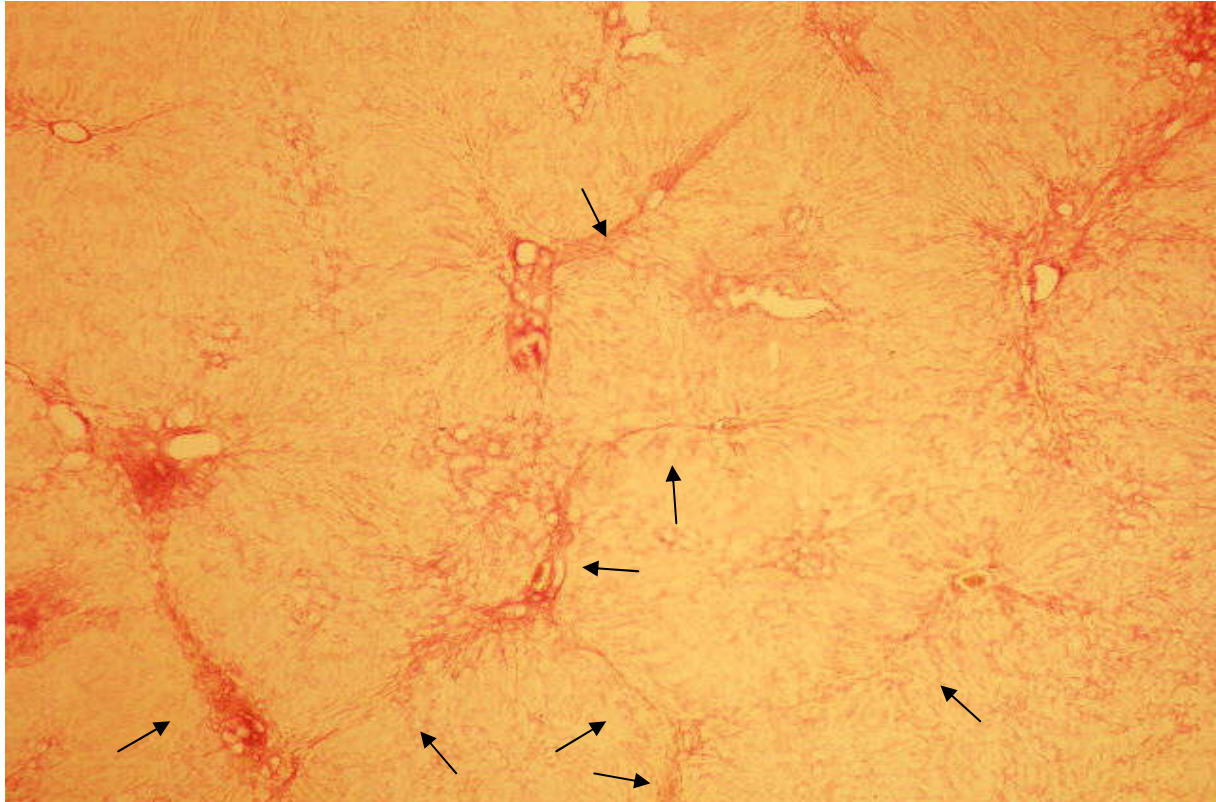
Op de H&E kleuring van het mesenterium was duidelijk vet te zien. Naast vet werd ook soms bindweefsel en bloedvaten gevonden. De omtrek van de vetcellen bij de controleratten gaf $198.520 \pm 74.049 \mu\text{m}$, terwijl deze bij de CBDL groep $140.373 \pm 36.079 \mu\text{m}$ was. De vetcellen bij de CBDL groep waren dus significant kleiner met $P < 0.001$. Zie fig. 10-11.



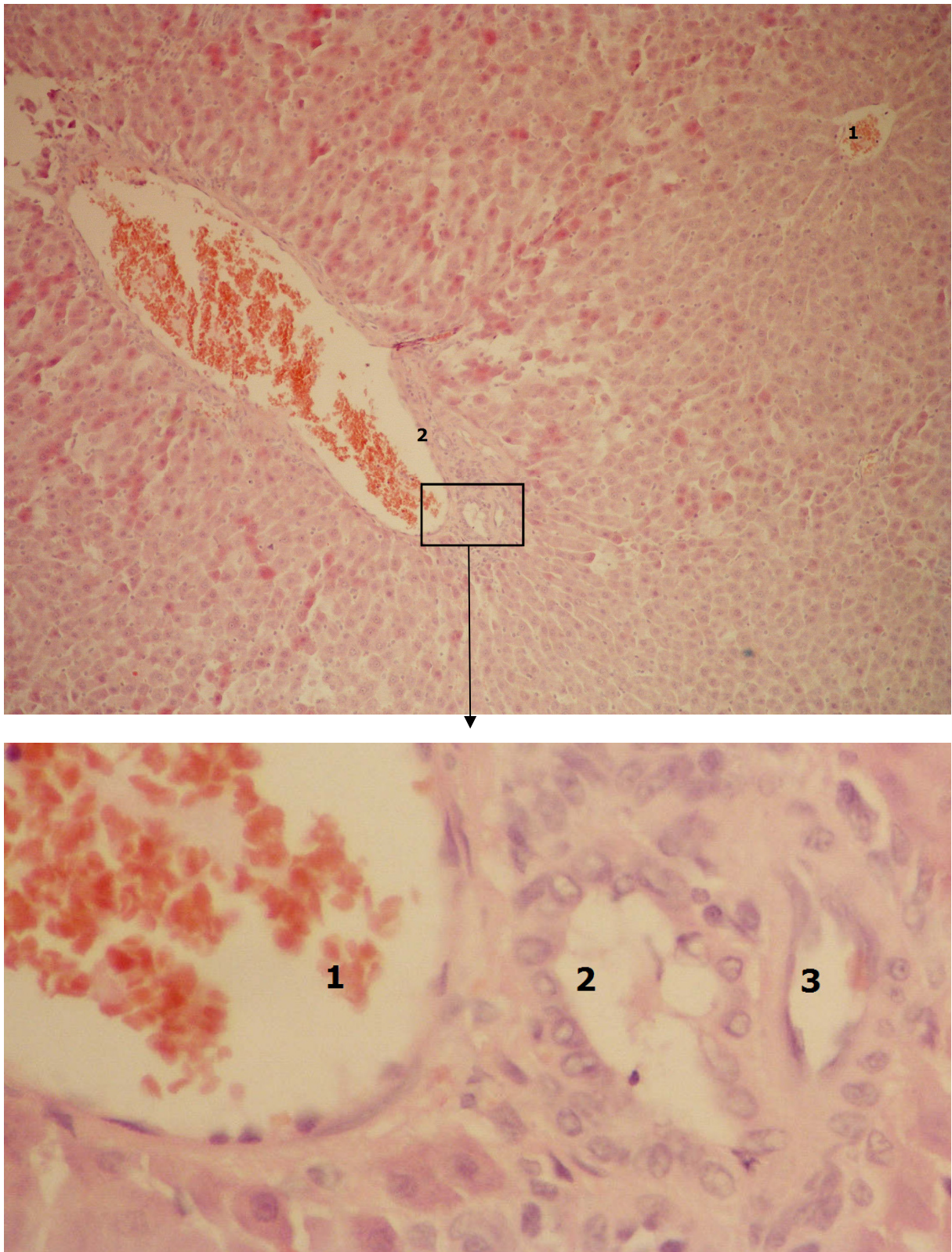
Figuur 5: LM 10X. Sirius red kleuring van de lever bij de sham groep. Alleen het collageen van de vaatwand kleurde rood aangezien er geen collageenbanden gevormd werden. 1:centrale vene, 2: portale triade.



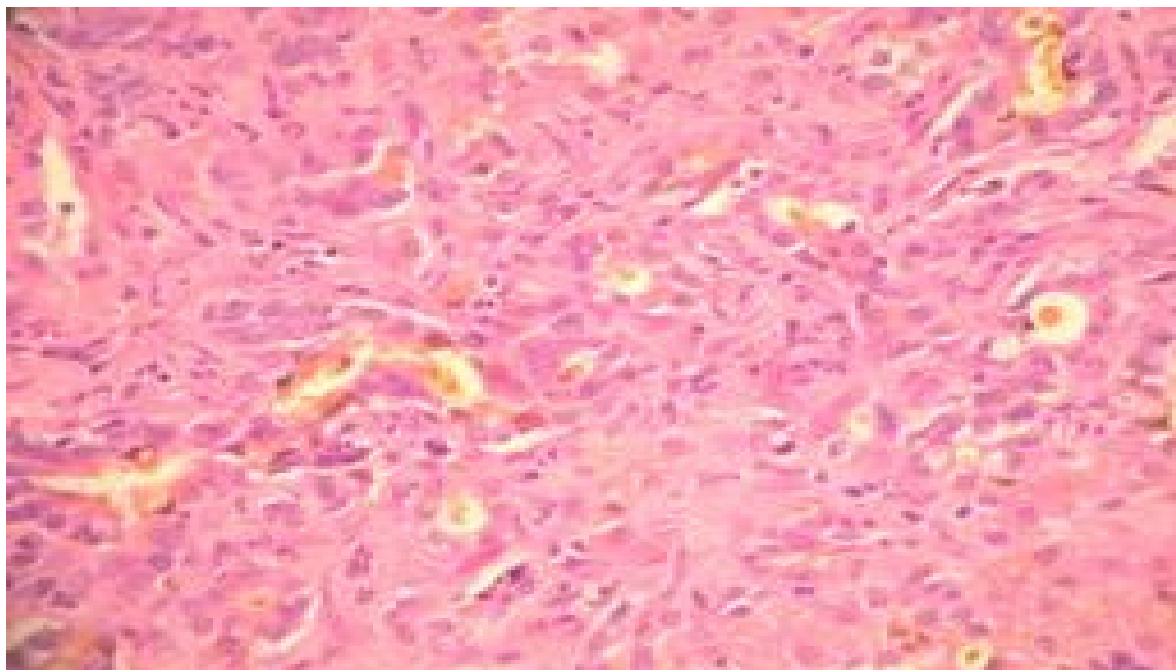
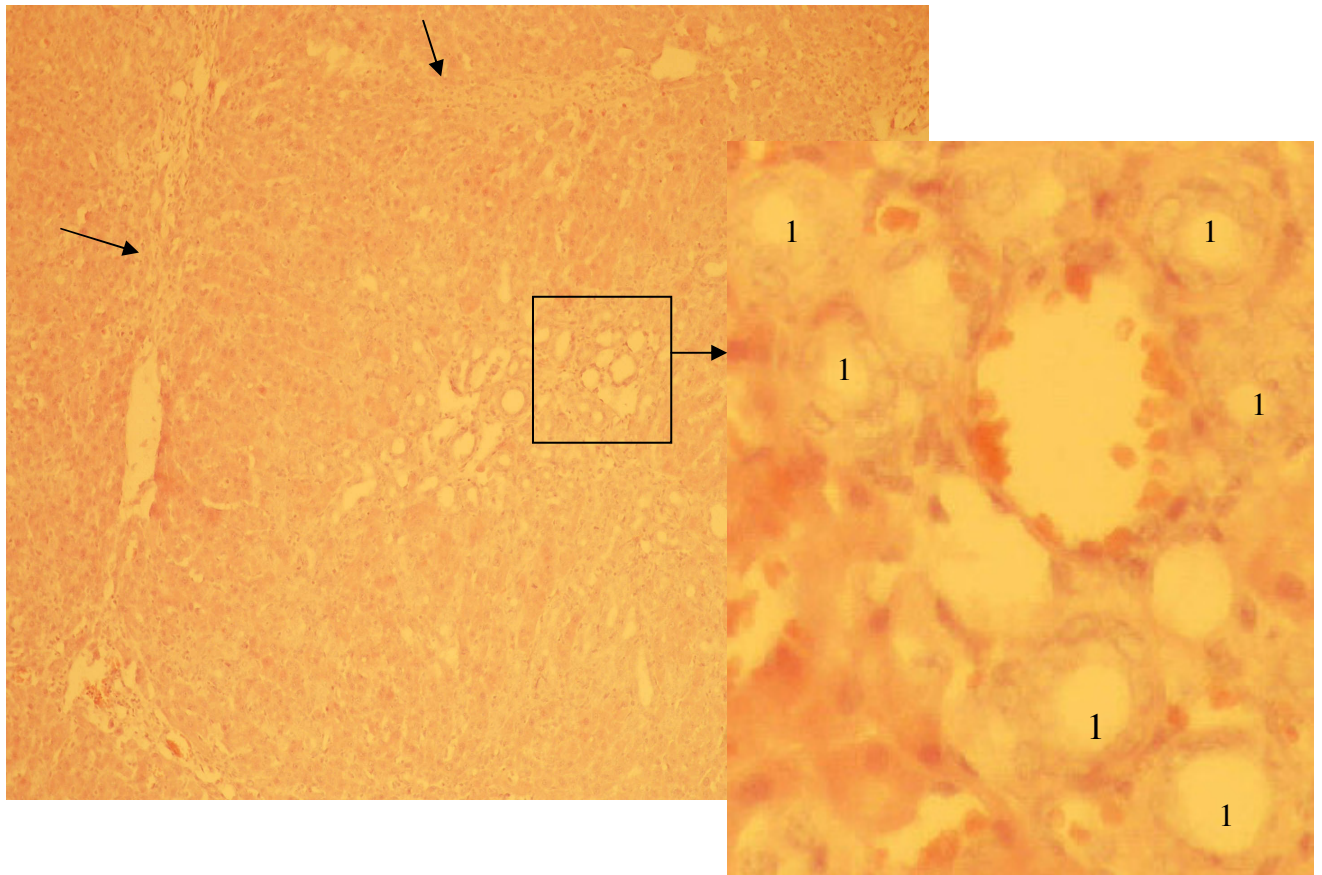
Figuur 6: LM 20X. Sirius red kleuring van de lever in de CBDL groep. In de portale tractus is galwegproliferatie zichtbaar. Tevens ontstaan er fibrose septa rond de portale tractus. (->).



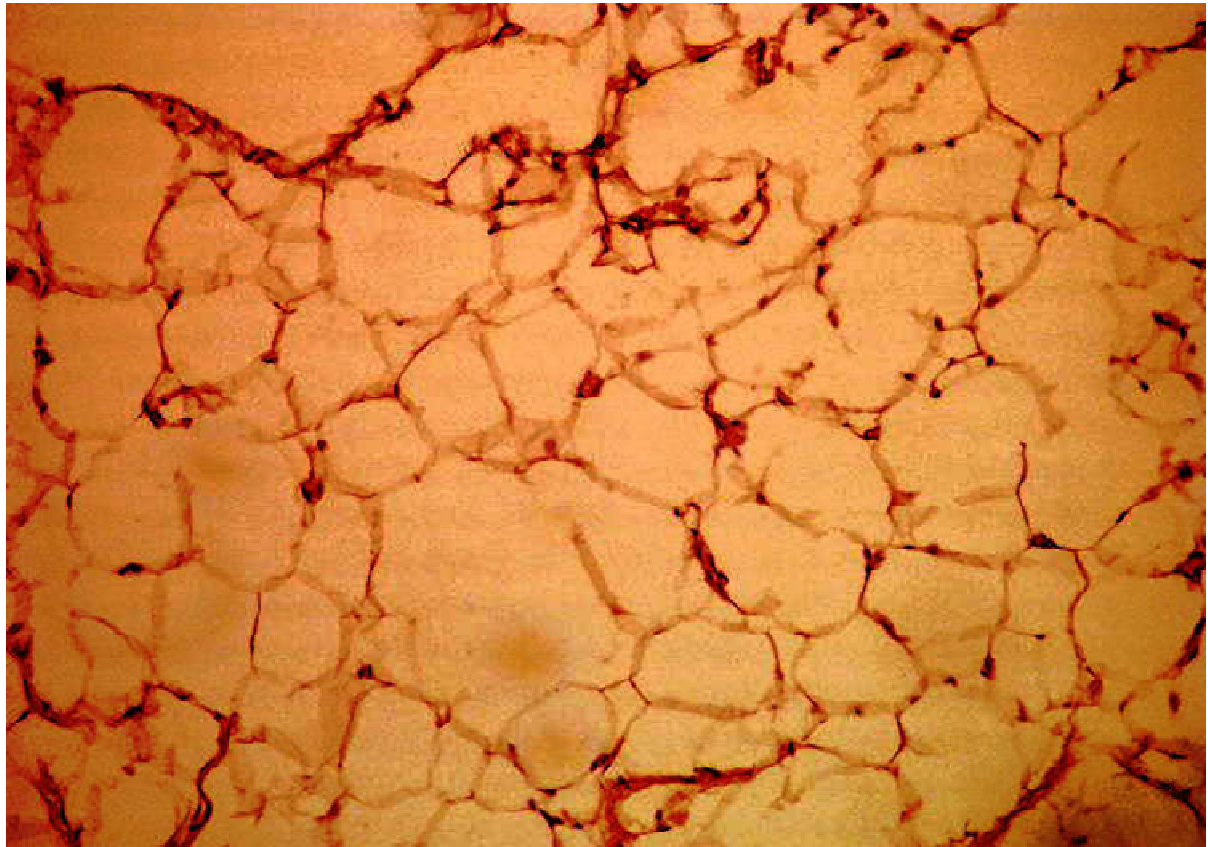
Figuur 7: Boven: LM 4X, beneden LM 10X. Sirius red kleuring van de lever in de CBDL groep. Duidelijke collageenbanden werden zichtbaar (->). Dit kan aanzien worden als een F3 stadium daar er wel veel septa van portaal veld naar portaal veld gaan, maar de septa niet overal aanwezig waren.



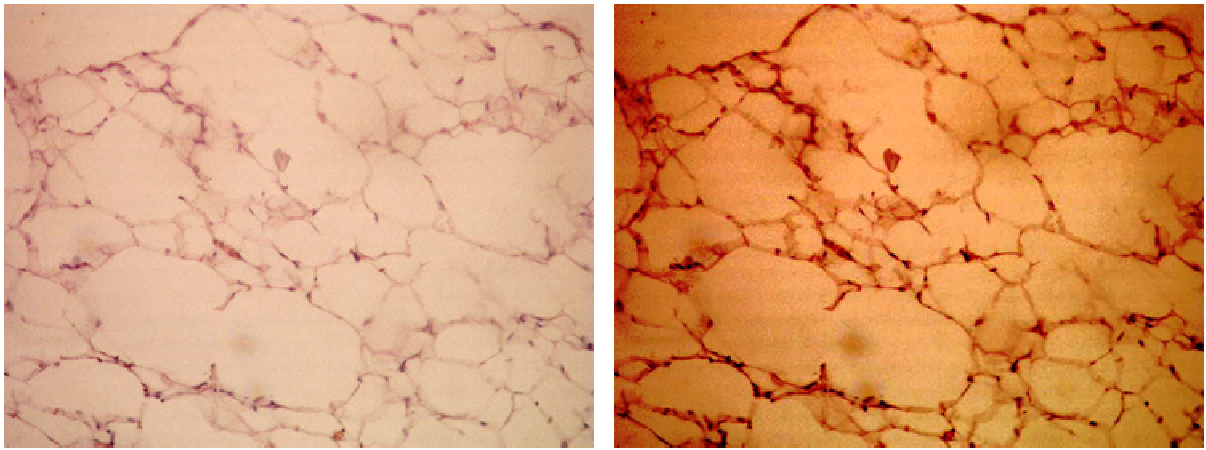
Figuur 8: Boven LM 10X, beneden LM 40X. Haematoxyline-eosine kleuring van de lever in de sham groep. Boven: De klassieke structuur met centrale vene (1) en portale triade (2) is zichtbaar. Beneden: In de portale triade zijn de portale venule (1), het galkanaaltje (2) en de portale arteriole (3) aanwezig.



Figuur 9: Boven: LM 10X en inzet LM 20X. Haematoxyline-eosine kleuring van de lever bij de CBDL groep. Collageen septa (->) en galwegproliferatie (1) zijn frequent zichtbaar. Beneden: LM 20X. Haematoxyline-eosine kleuring van de lever bij de CBDL groep laat ook duidelijk de aanwezigheid van cholestase (bruine vlekken) zien.



Figuur 10: LM 20X. Haematoxyline-eosine kleuring van het visceraal peritoneum. Boven: sham. Beneden: CBDL. Op iedere coupe was er steeds een variatie in de grootte van de vetcellen te bespeuren. Enorme verschillen in de grootte van de vetcellen waren niet meteen op te merken. Een licht kleinere vetcelomtrek bij CBDL kon wel op het zicht vermoed worden.



Figuur 11: LM 20X. Haematoxyline-eosine kleuring van het visceraal peritoneum. Links stelde de originele foto voor. Rechts werd bij dezelfde foto het contrast verbeterd. Door het contrast te verhogen, waren de vetcelaflijningen beter zichtbaar.

4 Bespreking

In deze studie werden CBDL ratten geïnduceerd als model voor biliaire cirrose. De verhoogde serum AST, ALT en bilirubine samen met de gedaalde albumine toonden een goede inductie tot cirrose aan. Via H&E leverhistologie werd een verhoogde collageenvorming, galwegproliferatie en cholestase aangetoond. Via de Metavir methode kon echter geen volledige cirrose (F4 stadium) aangetoond worden. Het was eerder een stadium van septale fibrose (F3 stadium), het stadium net voor cirrose. Alhoewel 4 weken dikwijls als standaard wordt genomen bij CBDL ratten [28], waren de dieren niet bij elk onderzoek volledig cirrotisch.[15]

Er was geen verschil te zien in gewicht, voedselopname en wateropname in vergelijking met controle. Alleen tijdens de eerste week na inductie werd een mindere voedselopname en mindere gewichtstoename in CBDL opgemerkt. Deze verschillen tijdens de eerste week zouden kunnen toegeschreven worden aan de zware operatie die de CBDL dieren ondergingen. Sham dieren ondergingen ook wel een operatie maar hier werd alleen de buikwand geopend. Wellicht zal ook de sham groep minder voedsel dan normaal opgenomen hebben, maar toch nog steeds meer dan de CBDL groep. Aangezien men bij de cirrosegroep malnutritie verwacht, zou dus ook na de eerste week een mindere gewichtstoename zichtbaar moeten zijn. Dit is hier echter niet het geval, ook niet na correctie voor het heptosplenair gewicht. Bij deze correctie werd verondersteld dat het heptosplenair gewicht van sham en CBDL gelijkaardig was in het beginpunt. Deze veronderstelling kan gerechtvaardigd worden daar er een zeer kleine standaarddeviatie op het heptosplenair gewicht bij de sham groep werd gevonden en het begingewicht van sham en CBDL geen grote verschillen toonde. Een kleine foutmarge is echter niet uit te sluiten aangezien bij het begingewicht werd gecorrigeerd voor het heptosplenair gewicht van 4 weken oudere dieren.

Het uitblijven van verschillen in lichaamsgewicht tussen CBDL en sham kan gelinkt worden met de ongewijzigde voedselopname. Deze voedselopname wordt gereduceerd door o.a. TNF- α stijging, maar kan hier mogelijks in neutrale balans gebracht worden door een verhoogde appetijt als gevolg van leptinedaling. Bij gewichtsbepalingen in cirrose moet wel steeds rekening gehouden worden met de aanwezigheid van ascites en oedeem. Alhoewel bij deze dieren geen of toch nauwelijks geen ascites werd waargenomen, kan eventueel een onopgemerkte oedeem aanwezig zijn. Een analyse van het drooggewicht van proefdieren kan dus nuttig zijn. Tevens is het vooral deze ascites die tot een verminderde voedselopname leidt

door versnelde verzadiging.[3] Ook in sommige andere onderzoeken bij CBDL ratten kon geen significant verschil in lichaamsgewicht gevonden worden en vond geen ascitesvorming plaats.[15]

Om het heptosplenair gewicht te bekomen werden milt en lever bij sacrificatie gewogen. Een vergroting van de lever door cirrose werd vastgesteld. Deze verhoogde massa kan toe te schrijven zijn aan een verhoogde hoeveelheid extracellulaire matrix, een verhoogde infiltratie van afweercellen en bij cholestase vooral door een verhoogde opslag van gal met galwegproliferatie.[2] Tevens was ook het miltgewicht enorm toegenomen. Dit kan hier de aanwezigheid van portale hypertensie aantonen, daar de milt als een bloedopslagplaats functioneert. Verder kan splenomegalie ook veroorzaakt worden door de aanwezige cholangitis. De milt speelt immers een belangrijke rol bij infecties aangezien ze als onderdeel van het lymfesysteem de rijping van lymfocyten voorziet.[2]

Aangezien het gewicht niet meteen een indicatie bracht, werden andere methoden geprobeerd om de malnutritie aan te tonen. Computergestuurde meting van de lichaamssamenstelling was niet beschikbaar. Verder was de huidplooiemeting niet reproduceerbaar en was er onvoldoende expertise om de vetkwabben bij de dieren nauwkeurig te preleveren en te wegen. Hierdoor werd op histologie overgegaan. Bij het histologisch onderzoek van het visceraal peritoneum dient de beperking vermeld te worden dat hierbij op paraffinecoupes werd gewerkt en dat dus bij de alcoholprocedures enige wijzigingen in de vetcellen kon plaatsvinden. In andere onderzoeken werden echter ook reeds succesvolle vetcelmetingen op paraffinecoupes uitgevoerd.[29] Een andere grote beperking in dit project is dat geen vetmetingen in het subcutaan weefsel konden verricht worden en dat dus ook het aantal vetcellen niet werd gemeten.

Malnutritie wijst o.a. op een verminderde vetinhoud van het lichaam. Deze verminderde vetinhoud kan zowel te wijten zijn aan een vermindering in aantal vetcellen als een vermindering in vetcelinhoud. Dit laatste werd onderzocht in deze studie door de omtrek van de vetcel te meten. Een duidelijke daling van de omtrek en dus een verkleining van de vetcel in het visceraal peritoneum was duidelijk in de CBDL groep. Dat er een verminderde vetmassa voorkomt bij cirrose is reeds meerdere keren aangetoond.[3] Het patroon werd echter nog niet onderzocht. Zo dient nog vastgesteld te worden welke vetreserves (visceraal dan wel subcutaan vet) door deze vetdepletie worden aangetast en door welk mechanisme: een verkleining of een vermindering van de vetcellen. Bij malnutritiemetingen in cirrose werd

wel steevast aangetoond dat er een afname was in huidploidikte.[3] De cachexia vindt dus zeker plaats in het subcutaan vet. Uit de literatuur bleek dat computergestuurde analyse van de lichaamssamenstelling bij cirrose voornamelijk een vetdepletie in de romp eerder dan in de ledematen aantoonde.[30] Aangezien in de romp zowel subcutaan als visceraal vet aanwezig is, kon geen vaststaand besluit gesloten worden omtrent het vetpatroon. Deze vaststelling suggereert echter wel dat wellicht ook visceraal vet onder de cachexia lijdt. Verder onderzoek in dit patroon van vetdepletie bij cirrose dient dus zeker nog uitgevoerd te worden en zou eventueel nieuwe perspectieven van de malnutritie kunnen blootleggen.

Naast de voedselopname is een verminderde leversynthesefunctie met een veranderd nutriëntmetabolisme een tweede oorzaak van malnutritie.

Protrombinetijd kon hier niet gemeten worden, maar vorige studies toonden al aan dat de protrombinetijd verlengde bij biliare cirrose.[31] Albumine werd wel als gedaald geconstateerd. Albuminedaling in cirrose is niet alleen te verklaren door een verminderde synthese. De verhoogde circulatiedruk kan meer albumineverlies veroorzaken via verhoogde darmpermeabiliteit. Verder kan albumine ook dalen als gevolg van inflammatie daar het een negatief acutefaseproteïne is. Deze wijst dus vooral op de hypermetabole toestand.

Het veranderd glucosemetabolisme kon niet bevestigd worden daar geen significante verschillen werden ontdekt in het nuchter glucose, nuchter insuline en HOMA-index. Vorige studies confirmeerden reeds het kleiner risico op insulineresistentie bij cholestatische cirrose versus hepatocellulaire cirrose zoals hepatitis en alcoholische cirrose. Tevens ontwikkelt insulineresistentie zich pas na verloop van tijd.[32] Deze afwezigheid van insulineresistentie kan mede één van de factoren zijn die leiden tot een ongewijzigde voedselopname in dit diermodel. Bij insulineresistentie zal de verhoogde insulineconcentratie immers voor een anorexigeeffect zorgen.

Een derde oorzaak wordt gecreëerd door de hypermetabole situatie. Hemodynamische metingen werden hier niet uitgevoerd, maar eerdere bevindingen van dezelfde onderzoeksgroep toonden bij dit CBDL model wel een significant verhoogde portale druk en een niet significant verlaagde arteriële bloeddruk aan.[28] Ook de hierboven vermelde splenomegalie toont de aanwezigheid van portale hypertensie aan.

Eén van de oorzaken van de hypermetabole toestand met name de inflammatie werd wel achterhaald. Hierbij werd een duidelijke inflammatie bevestigd door de significante stijging van TNF- α . Er werd echter geen significant verschil teruggevonden bij IL-6. Bij deze laatste

test dient wel opgemerkt te worden dat een groot aantal stalen van zowel de sham als de CBDL groep onder de detectielimiet lagen. Dit kan dan ook de grote standaarddeviatie bij de CBDL groep verklaren en zo een eventueel verschil verbergen. Bij cholestatische cirrosepatiënten is er immers typisch een inflammatiesituatie met infiltratie van inflammatoire cellen. Deze situatie werd veroorzaakt door de cholestase en de verminderde darmbarrière-functie.[8] Sommige studies bij CBDL dieren toonden echter ook al geen significante stijging aan in IL-6.[15] Deze mogelijke discrepanties kunnen eventueel verklaard worden door de fluctuatie in cytokineniveau tijdens de inductieperiode. Zo werd aangetoond dat cytokines soms een transiënte daling ondergaan tussen de vroege en late fase.[33]

Een andere mogelijke oorzaak van malnutritie is de maldigestie en malabsorptie veroorzaakt door het onderbreken van de hoofdgalweg. Hierbij werd vooral het effect op vetoplosbare vitamines gezien. Een daling in zowel vitamine A, D als E was duidelijk zichtbaar, aangezien de gal essentieel is om vetoplosbare substanties op te nemen. Bijkomende oorzaken zijn mogelijks een verminderde vitamine A opstapeling en een verminderde vitamine D activatie. Vitamine K werd hier niet gemeten. Vorige studies toonden echter al deficiëntie in vitamine K aan in het CBDL model.[31] Deze deficiënties hebben een klinische relevantie, zo zijn vitamine A en E belangrijk als antioxidant. Hun verlaging kan dus een verhoogde lipideperoxidatie en leverschade faciliteren. Een verlaagd vitamine E draagt ook bij aan een verlengde cholestase. Vitamine D deficiëntie leidt dan vooral tot osteopenia en osteoporose terwijl vitamine K deficiëntie de bloedstolling verder beperkt.[2] Het is dus belangrijk dergelijke tekorten te voorkomen of op te vangen. Supplementatie wordt dikwijls aanbevolen, zeker bij cholestase. Naast enterale supplementatie kan parenterale supplementatie nuttig zijn daar juist de gastro-intestinale opname het probleem vormt.[3, 31]

Naast vitamines kunnen ook de concentraties aan oligo-elementen gewijzigd worden door de cirrose. Koper kende een significante stijging in dit CBDL model. De verklaring ligt hem grotendeels in de verminderde excretie via de gal door galwegonderbreking. De voornaamste plaatsen voor koperaccumulatie zijn de lever en de hersenen. De complicatie van deze koperaccumulatie zijn dus vooral neurologische problemen, maar er is nog geen sterk bewijs dat de accumulatie van koper bij cholestase toxisch kan zijn voor de lever. Verder kan het bijdragen tot het nierfalen.[8]

Ook zink kan beïnvloed worden door cirrose. Deficiënties kunnen optreden door verminderde absorptie, een veranderde zinkdistributie, een verhoogde nood door inflammatie, verminderde albuminebinding door leverdysfunctie, verhoogde urinaire zinkexcretie en

verminderde leverextractie en portosystemische shunts. In dit project werd geen significante zinkdeficiëntie ontdekt. Verhoogde zinkverliezen worden voornamelijk waargenomen bij ascites en dit doet zich nu niet voor in deze CBDL dieren. Wel dient opgemerkt te worden dat het serumzink maar een klein percentage van de totale lichaamsreserve representeert. Zo is de lever een sterke zinkuitwisselaar met het serum zodat ook de gehalten in de lever zouden moeten nagegaan worden.[11]

Aangezien ook hormonen de voedingsstatus kunnen beïnvloeden, werden de niveaus van adiponectine, ghreline en leptine nagegaan.

Het adiponectine gehalte kende geen significante wijziging in het serum en het vetweefsel. Bij biliaire cirrose kan een verhoging optreden door een verminderde excretie via de gal en een verhoogde productie bij vetdepletie.[19] Mogelijks was de vetdepletie hier nog onvoldoende om de verhoging te stimuleren en zou dit wel het geval kunnen zijn bij een langere inductietijd. Verder is er door de afwezigheid van hyperinsulinemie in dit model ook geen extra stimulatie tot adiponectinesynthese.

Het nuchtere ghreline gehalte kende geen wijziging. Dit was enigszins in de lijn met bevindingen in patiënten waar ofwel geen wijziging ofwel een lichte stijging werd opgemerkt. [21-23] Aangezien de voedselopname ongewijzigd bleef, zal de maag nog steeds even goed gevuld worden en zal er hieruit geen extra ghrelinestimulatie volgen. In dit 4 weken model speelde ghreline dus geen rol in de voedingsstatus. Misschien kan in een verder gevorderde status van malnutritie met een hogere vetdepletie ook hier wel een stijging plaatsvinden. Dit zou dan de vetdepletie kunnen weerspiegelen en een positieve impuls geven daar het anti-fibrotisch werkt en de energiebalans wat kan stabiliseren.

Leptine kende een significante daling in het serum van CBDL dieren. De concentratie in het vet was niet significant verschillend maar een gedaald serumgemiddelde was duidelijk. In de literatuur werd reeds opgemerkt dat de leptineconcentratie na biliaire obstructie eerst steeg om dan nadien te dalen. Dit wekte de suggestie op dat leptine anorexia medieert in de vroege periode, maar niet in de latere periodes.[15, 26]. De verklaring voor deze daling bestaat erin dat bij biliaire cirrose er altijd vetmalabsorptie is en leptine dus daalt door verminderde vetstatus. Er kan hierdoor een link gelegd worden met de verminderde vetcelomtrek in het peritoneum en de vetmalabsorptie. Verder zouden galzouten in de darm mede de verhoging van leptine in de hand kunnen werken en kan bij biliaire cirrose het leptine dus gedaald zijn door het onderbreken van de hoofdgalweg.[26] Een daling van het leptine vormt hier een beschermingsmechanisme aangezien hierbij inflammatie, cirrose en

energieverbruik worden afgeremd en appetijt wordt aangewakkerd. Dit eetluststimulerend effect kan hier dan de verlaagde voedselopname door TNF- α stijging bij cirrose ombuigen en zo tot een balans van ongewijzigde opname resulteren.

5 Algemene besluit omtrent het CBDL model

De resultaten toonden aan dat de malnutritietoestand zich niet onmiddellijk in al zijn facetten uit. Voor optimaal malnutritieonderzoek in een diermodel zou men de cirrosetoestand langer moeten aanhouden. Voor ratten wordt dus best een inductietijd van meer dan 4 weken genomen.

De verschillende oorzaken van malnutritie werden onderzocht in dit model. Een wijziging in de voedselopname kon niet aangetoond worden. Mogelijke verklaring hiervan ligt in de afwezigheid van zinkdeficiëntie, ascites en insulineresistentie en vooral in de daling van het leptine. Een veranderd nutriëntmetabolisme met insulineresistentie kon niet aangetoond worden. Een aantasting van de leverfunctie is wel aanwezig bij biliaire cirrose. Verder is er sprake van inflammatie en een heel duidelijke deficiëntie aan vetoplosbare vitamines. Oorzaak van de malnutritie ligt hem hier dus vooral in de vetmalabsorptie en de hypermetabole toestand door inflammatie en portale hypertensie.

Bij de hormonen werd alleen een daling in het leptine aangetoond. Deze daling kan een weerspiegeling zijn van de vetdepletie en kan de appetijt en het energieverbruik positief beïnvloeden bij cirrose. In dit model dragen de drie hormonen dan ook niet bij tot malnutritie, maar kan eventueel aan leptine een beschermende rol toegekend worden.

Bij malnutritie-ondersteuning is het vooral belangrijk rekening te houden met de oorzaak van de levercirrose. Wanneer cholestase-geïnduceerde cirrose vergeleken wordt met een algemeen cirrosebeeld, kunnen toch enigszins andere accenten gelegd worden in de malnutritie-oorzaak. Bij cholestase betreft het vooral een vetmalnutritie, eerder dan een veralgemeende malnutritie. Hierbij is duidelijk dat naast macro-nutriënten ook naar de vitamines en oligo-elementen moet gekeken worden.

Deze studie bracht ook een aantal zaken aan het licht die aandringen op verder onderzoek. Vooreerst blijkt dieper onderzoek naar het patroon van malnutritie nodig. Zo zou meer kennis moeten verkregen worden over de lokalisatie van het vetverlies: Treft de malnutritie hier meer de subcutane, viscerale dan wel beide vetreserves? Deze studie kan verdergezet worden in diermodellen door o.a. vetcelmetingen en ook bij patiënten door computergestuurde analyse van de lichaamssamenstelling.

Bij de hormonen adiponectine, ghreline en leptine werden in de literatuur soms verschillen gerapporteerd tijdens het tijdsverloop van cirrose en tussen de verschillende etiologieën van cirrose onderling. Tevens kunnen uit proteïneconcentraties niet steeds vaste conclusies getrokken worden, daar de wijzingen zich zowel op het vlak van transcriptie, translatie, afbraak als receptorbinding kunnen voordoen. Hierbij wordt dan ook aangeraden verdere analyse door middel van testen op mRNA niveau en op de receptoren te ondernemen.

6 Korte vergelijking met het PPVL model

Zoals reeds gezegd, werd ook een PPVL model onderzocht op malnutritie. Dit is het model voor prehepatische portale hypertensie door ligatie van de portale vene. Hierbij werden de 9 dieren reeds na 2 weken gesacrificeerd daar portale hypertensie zich snel volledig ontwikkeld. Voor uitgebreide data en beschrijvingen wordt verwezen naar de thesis van Elke De Beleyr. In tabel 4 worden de significantieniveaus van de verschillende parameters kort vergeleken met deze van de CBDL groep. Op deze manier kan de rol van portale hypertensie op zich aangetoond worden en kunnen de invloeden van cirrose bovenop de portale hypertensie duidelijk worden.

Tabel 4: Vergelijking CBDL en PPVL op de verschillende parameters.

	P-waarde CBDL versus sham		P-waarde PPVL versus sham	
AST	<0.001	↑	0.001	↑
ALT	<0.001	↑	0.006	↑
Bilirubine	<0.001	↑	0.109	
Albumine	0.002	↓	0.02	↓
Lever	<0.001	↑	0.923	
Milt	<0.001	↑	0.001	↑
Gewicht	0.441		0.001	↓
Vetcelperimeter	0.001	↓	0.248	
Voedselinname	0.149		0.001	↓
Wateropname	0.123		0.001	↓
Vitamine A	0.001	↓	0.306	
Vitamine D	0.001	↓	0.175	
Vitamine E	0.001	↓	0.008	↑
Zink	0.596		0.439	
Koper	0.001	↑	0.796	
Insuline	0.361		1	
Glucose	0.193		1	
IL-6	0.542		0.000	↑
TNF-α	0.002	↑	0.097	
Leptine serum	0.045	↓	0.201	
Leptine vet	0.105		0.234	
Adiponectine serum	0.754		0.251	
Adiponectine vet	0.251		0.251	
Ghreline serum	0.294		0.293	

CBDL: common bile duct ligation, PPVL: partial portal vein ligation, AST (aspartaat aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), IL-6 (interleukine 6), TNF-α (tumor necrosis factor alfa), ↑: stijging, ↓: daling.

Portale hypertensie werd aangetoond door hemodynamische metingen en door toename van het miltgewicht. Het levergewicht nam niet toe daar portale hypertensie geen cirrose en galopstapeling induceert. Er is echter wel een geringe beschadiging van de lever daar AST en

ALT gestegen zijn. Bij albumine werd een daling opgemerkt door inflammatie en doordat portale hypertensie zorgt voor een verhoogd verlies via de darm en varices. Toch bleek de albuminedaling meer expliciet bij het CBDL model aangezien de leversynthesefunctie bij cirrose aangetast is. Bilirubine was niet verhoogd daar de excretie hier niet in de weg wordt gestaan.

Malnutritie was hier wel aanwezig. Een duidelijke verschil in gewicht manifesteerde zich immers door de hypermetabole status. Aangezien de dieren maar 2 weken werden opgevolgd, kon het gewicht eventueel beïnvloed worden door de zware operatie. Echter, ook gedurende de tweede week was er minder gewichtstoename dan in de sham groep, er was soms zelfs gewichtsafname. Een verandering in de vetcelomtrek kon echter niet gevonden worden. Een verklaring hiervoor kan zijn dat malnutritie zich nog niet volledig heeft voltrokken of dat eerder andere vetreserves worden aangetast.

Ook hier werden dan de verschillende oorzaken van malnutritie bestudeerd. Een mindere voedsel- en wateropname werd gezien. Deze kan verklaard worden door inflammatie. Inflammatie was aanwezig bij PPVL door de verhoogde druk op de bloedvatwand, door de lichte leverschade en door mogelijke bacterie-influx via de verminderde darmbarrière. Mede hierdoor, maar ook door de portale hypertensie op zich, is er zeker sprake van een hypermetabole situatie. Vetmalabsorptie was niet aanwezig daar er geen daling in vetoplosbare vitamines was. Een veranderd nutriëntmetabolisme kon niet aangeduid worden door de afwezigheid van insulineresistentie.

Bij de hormonen werden geen significante verschillen gezien, maar toch was er een gedaald gemiddelde bij het leptine. Dit kan niet de verminderde appetijt verklaren, maar kan wel een verminderde vetstatus weergeven.

Malnutritie bij PPVL werd dus vooral door de hypermetabole status veroorzaakt en dit zowel door de portale hypertensie op zich, als door de gerelateerde inflammatie. Tevens was een verminderde voedselopname zichtbaar. Vetmalabsorptie en insulineresistentie spelen hier geen rol in malnutritie aangezien deze niet aanwezig waren.

Parameters die duidelijk veroorzaakt werden door cholestase, met name de verhoogde bilirubineconcentratie, de deficiëntie in vetoplosbare vitamines en het verhoogde koper, werden hier niet gezien. Portale hypertensie droeg wel bij tot de hypermetabole situatie met inflammatie en tot een verminderde voedselopname.

Referenties

1. Fox, S.I., *Human physiology*. Vol. 10th ed. 2008, New York: Mc Graw-hill.
2. Kuntz, E. and H.D. Kuntz, *Hepatology: Principles and practice*. Vol. 2th ed. 2006, Germany: Springer.
3. DeLegge, M.H., *Nutrition and gastrointestinal disease*. Clinical gastroenterology. 2008, Totowa, N.J.: Humana Press. xii, 334 p.
4. Boyer, T.D., et al., *Zakim and Boyer's hepatology : a textbook of liver disease*. 5th ed. 2006, Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
5. Garcia-Compean, D., et al., *Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(3): p. 280-8.
6. Diehl, A.M., *Cytokine regulation of liver injury and repair*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 160-71.
7. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response*. J Pathol, 1997. **181**(3): p. 257-66.
8. Schiff, E.R., M.F. Sorrel, and W.E. Maddrey, *Schiff's diseases of the liver*. Vol. 8nd ed. 1999, Philadelphia, PA: Lippincott-Raven.
9. Geerts, A.M., et al., *Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation*. Int J Exp Pathol, 2008. **89**(4): p. 251-63.
10. Tsiaousi, E.T., et al., *Malnutrition in end stage liver disease: Recommendations and nutritional support*. Journal of Gastroenterology and Hepatology. **23**(4).
11. Stamoulis, I., G. Kouraklis, and S. Theocharis, *Zinc and the liver: an active interaction*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(7): p. 1595-612.
12. Henkel, A.S. and A.L. Buchman, *Nutritional support in patients with chronic liver disease*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(4): p. 202-9.
13. Meier, U. and A.M. Gressner, *Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin*. Clin Chem, 2004. **50**(9): p. 1511-25.
14. Tsochatzis, E., G.V. Papatheodoridis, and A.J. Archimandritis, *The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(11): p. 2629-40.
15. Bahcecioglu, I.H., et al., *TNF-alpha and leptin in experimental liver fibrosis models induced by carbon tetrachloride and by common bile duct ligation*. Cell Biochem Funct, 2004. **22**(6): p. 359-63.
16. Ben-Ari, Z., et al., *Alterations in serum leptin in chronic liver disease*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(1): p. 183-9.
17. Tietge, U.J., et al., *Elevated circulating adiponectin levels in liver cirrhosis are associated with reduced liver function and altered hepatic hemodynamics*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(1): p. E82-9.
18. Neumeier, M., et al., *Adiponectin and its receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(34): p. 5490-4.

19. Tacke, F., et al., *High adiponectin in chronic liver disease and cholestasis suggests biliary route of adiponectin excretion in vivo*. J Hepatol, 2005. **42**(5): p. 666-73.
20. Bertolani, C. and F. Marra, *The role of adipokines in liver fibrosis*. Pathophysiology, 2008. **15**(2): p. 91-101.
21. Tacke, F., et al., *Ghrelin in chronic liver disease*. J Hepatol, 2003. **38**(4): p. 447-54.
22. Takahashi, H., et al., *Fasting plasma ghrelin levels reflect malnutrition state in patients with liver cirrhosis*. Hepatol Res, 2006. **34**(2): p. 117-23.
23. Marchesini, G., et al., *Plasma ghrelin concentrations, food intake, and anorexia in liver failure*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2136-41.
24. Kalaitzakis, E., et al., *Altered postprandial glucose, insulin, leptin, and ghrelin in liver cirrhosis: correlations with energy intake and resting energy expenditure*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(3): p. 808-15.
25. Iseri, S.O., et al., *Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats*. Regul Pept, 2008. **146**(1-3): p. 73-9.
26. Lin, S.Y., et al., *Different tumor necrosis factor-alpha-associated leptin expression in rats with dimethylnitrosamine and bile duct ligation-induced liver cirrhosis*. Metabolism, 2005. **54**(4): p. 445-52.
27. Muniyappa, R., et al., *Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(1): p. E15-26.
28. Colle, I., et al., *Systemic and splanchnic haemodynamic effects of sildenafil in an in vivo animal model of cirrhosis support for a risk in cirrhotic patients*. Liver Int, 2004. **24**(1): p. 63-8.
29. Bing, C., et al., *Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice*. Br J Cancer, 2006. **95**(8): p. 1028-37.
30. Riggio, O., et al., *Whole body and regional body composition analysis by dual-energy X-ray absorptiometry in cirrhotic patients*. Eur J Clin Nutr, 1997. **51**(12): p. 810-4.
31. Akimoto, T., et al., *Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats*. Exp Anim, 2005. **54**(2): p. 155-61.
32. Zein, N.N., et al., *Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 209-17.
33. Dawiskiba, J., et al., *Alterations of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 production and activity of the reticuloendothelial system in experimental obstructive jaundice in rats*. HPB (Oxford), 2002. **4**(1): p. 11-9.