

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Therapeutisches Potential von Darbepoetin- α im murinen Modell
des cholestatischen Leberschadens**

Inauguraldissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
2010

Vorgelegt von:

Michael Sigal

Geboren am 02.03.1984

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Mitzner

3. Gutachter: Prof. Dr. Horst Pagel

Eingereicht am 17.12.2010

Öffentliche Verteidigung am 22.02.2012

INHALT

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT..... | 6 |
| 1 ZUSAMMENFASSUNG..... | 7 |
| 2 EINLEITUNG..... | 9 |
| 2.1 Leberfibrose..... | 9 |
| 2.1.1 Definitionen..... | 9 |
| 2.1.2 Ätiologie..... | 9 |
| 2.1.3 Pathogenese | 11 |
| 2.1.4 Klinische Symptome und Komplikationen..... | 16 |
| 2.1.5 Epidemiologie | 20 |
| 2.1.6 Diagnostik | 20 |
| 2.1.7 Therapie | 22 |
| 2.2 Erythropoietin..... | 23 |
| 2.2.1 Das Hormon und seine rekombinanten Analoga | 23 |
| 2.2.2 Hämatopoetisches Potenzial | 24 |
| 2.2.3 Pleiotropes Wirkprofil | 26 |
| 2.3 Ziel der Arbeit und zentrale Fragestellungen..... | 28 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| 3.1 Versuchstiere..... | 29 |
| 3.2 Modell..... | 29 |
| 3.2.1 Anästhesie und chirurgisches Vorgehen | 29 |
| 3.2.2 Experimentelle Gruppen | 30 |
| 3.2.3 Blut- und Gewebeentnahme | 31 |
| 3.3 Untersuchungstechniken..... | 32 |
| 3.3.1 Vollblutuntersuchung..... | 32 |
| 3.3.2 Plasmaanalysen | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.3 | <i>Histologie</i> | 33 |
| 3.3.4 | <i>Immunhistochemie</i> | 37 |
| 3.3.5 | <i>RT-PCR</i> | 38 |
| 3.3.6 | <i>Western Blot</i> | 41 |
| 3.3.7 | <i>Überlebensstudie</i> | 41 |
| 3.4 | Statistik | 42 |
| 3.5 | Zusammenfassung des experimentellen Protokolls | 43 |
| 4 | ERGEBNISSE | 45 |
| 4.1 | Physisches Befinden der Tiere | 45 |
| 4.2 | Rotes Blutbild | 45 |
| 4.3 | HIF-1 α | 46 |
| 4.4 | Nekrose..... | 47 |
| 4.4.1 | <i>Systemische Parameter der hepatozellulären Integrität und Cholestase</i> | 47 |
| 4.4.2 | <i>Galleninfarkte</i> | 49 |
| 4.5 | Inflammation | 51 |
| 4.6 | Apoptose | 52 |
| 4.7 | Fibrose | 53 |
| 4.8 | Profibrotische Gentranskripte | 55 |
| 4.9 | Überlebensstudie | 58 |
| 4.10 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 60 |
| 5 | DISKUSSION | 62 |
| 5.1 | Diskussion der Materialien und Methoden..... | 62 |
| 5.1.1 | <i>Experimentelle Modelle der Leberfibrogenese</i> | 62 |
| 5.1.2 | <i>Charakterisierung der Leberschädigung nach Ligatur des Ductus choledochus</i> | 65 |
| 5.2 | Diskussion der Ergebnisse | 68 |
| 5.2.1 | <i>Anämie bei chronischen Lebererkrankungen und die Rolle von Epo</i> | 68 |
| 5.2.2 | <i>Antinekroinflammatorisches Potential von DPO</i> | 70 |
| 5.2.3 | <i>Die Rolle der Apoptose</i> | 74 |
| 5.2.4 | <i>Antifibrogenetisches Potential von DPO</i> | 77 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.2.5 | <i>Die Beeinflussung des TGF-β Signalwegs durch DPO</i> | 79 |
| 5.3 | Zusammenfassung und Ausblick | 83 |
| 6 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 85 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 87 |
| 8 | DANKSAGUNG | 105 |
| 9 | CURRICULUM VITAE | 106 |
| 10 | SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT. | |

ABSTRACT

Darbepoetin-alpha inhibits the perpetuation of necro-inflammation and attenuates cholestatic fibrosis in mice

Background/Aims: Biliary obstruction and cholestasis result in hepatocellular necro-inflammation and lead to the development of liver fibrosis. In addition to its hematopoietic function erythropoietin and its analogues have been recently reported to ameliorate acute and chronic injury in several organs by means of multiple tissue-protective effects. Therefore we hypothesized that these pleiotropic properties are also salutary in cholestatic liver disease using a well established mouse model of common bile duct ligation (BDL).

Methods: C57BL/6J mice underwent BDL and were treated either with Darbepoetin- α (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) or physiological saline every third day, beginning 24 h after BDL. Mice were sacrificed at 2, 5 and 14 days after BDL. Beside hematological parameters, markers of inflammation and fibrosis were assessed histomorphometrically and immunohistochemically as well as by quantitative real-time PCR and Western Blot analysis. Additionally, a 7-week survival study was performed.

Results: BDL provoked cholestatic hepatitis characterized by biliary infarcts with accumulation of macrophages followed by marked collagen deposition and increased gene expression of profibrotic transcripts. Darbepoetin- α treatment significantly diminished the area of focal necrosis, lowered collagen deposition, decreased levels of profibrotic mediators, and inverted the pattern of Smad mRNA expression. Moreover, Darbepoetin- α prevented systemic anemia caused by BDL and reduced hepatic tissue hypoxia. Finally, Darbepoetin- α treatment significantly prolonged the survival time after BDL.

Conclusions: These findings suggest that Darbepoetin- α , a clinically well established substance, could represent an efficient therapeutic option for patients with cholestatic liver disease.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Die Obstruktion der Gallengänge und Cholestase verursachen eine hepatozelluläre Nekroinflammation und führen zur Entwicklung einer Leberfibrose. Das hämatopoetische Glykoprotein-hormon Erythropoietin wird als multifunktionales Therapeutikum mit einem hohen Potenzial sowohl bei akuten als auch chronischen Krankheiten gesehen. Wir evaluierten das therapeutische Potenzial von Darbepoetin- α (DPO), einem rekombinanten langwirksamen Erythropoietin-Analogon, im murinen Modell der extrahepatischen Cholestase.

Material und Methoden: Männliche C57BL/6J-Mäuse wurden der Ligatur des Ductus choledochus (Bile Duct Ligation, BDL) unterzogen. Beginnend 24 h nach der Operation und nachfolgend jeden dritten Tag erfolgte die intraperitoneale Injektion von DPO (10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) bzw. physiologischer Kochsalzlösung. An den Tagen 2, 5 und 14 nach der BDL wurden den Tieren Blut- und Leberproben für nachfolgende Untersuchungen entnommen. Es erfolgten die Bestimmung des Blutbildes und serologische Untersuchungen. Das Ausmaß der Apoptose, der Nekroinflammation und der Fibrose wurden mittels histologischer, immunhistochemischer sowie molekularbiologischer Methoden, wie der quantitativen real-time-PCR und Western-Blot, analysiert. Darüber hinaus wurde eine Überlebensstudie über einen Zeitraum von 49 Tagen durchgeführt.

Ergebnisse: Die Ligatur des Ductus choledochus führte zu einer akuten cholestatischen Leberschädigung, die durch die Ausbildung von Galleninfarkten mit Akkumulation von Makrophagen gekennzeichnet war. Es kam 14 Tage nach der BDL zu einem deutlichen Anstieg Sirius-red-positiver Kollagenfasern in der Leber. Auch die Expression der Kollagen-(I)- α -mRNA zeigte einen signifikanten Anstieg. Die Applikation von DPO führte zu einer signifikanten Reduktion der Galleninfarkte. Die Verteilung und Anzahl f4/80 positiver Zellen in DPO-behandelten Tieren glichen nahezu derjenigen der Sham-operierten Tiere. DPO inhibierte die Kollagenablagerung sowie die Expression profibrotischer Mediatoren und modulierte das Expressionsmuster der Smad-mRNA. Die chronische Cholestase führte weiterhin zu einem signifikanten Abfall des Hämatokrits, während in DPO-behandelten Mäusen der Hämatokrit auf dem Niveau der Sham-operierten Tiere gehalten wurde.

Zusammenfassung

Letztendlich resultierte durch die Gabe von DPO ein signifikanter Überlebensvorteil für diese Tiere.

Schlussfolgerung: Die hier untersuchte, klinisch etablierte Substanz DPO könnte zukünftig eine interessante Option für Patienten mit cholestatischen Erkrankungen darstellen.

2 EINLEITUNG

2.1 Leberfibrose

2.1.1 Definitionen

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Organismus. Aufgrund ihrer vielseitigen Metabolisierungs- und Entgiftungsfunktionen ist sie zahlreichen Einflüssen ausgesetzt, die sich auf das Organ pathologisch auswirken können. Eine Schädigung der Leber löst eine Entzündungsreaktion aus, die bei Persistenz des toxischen Stimulus zu einer chronischen Entzündung führt und den Prozess der Fibrogenese aktiviert.

Die *Leberfibrose* ist definiert als ein Zustand, der durch eine Zunahme und veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) gekennzeichnet ist. Es handelt sich hierbei um eine dynamische Wundheilungsreaktion mit Umwandlung des hepatischen Parenchyms in Narbengewebe. Prinzipiell gilt die Fibrose als reversibel, wenn das Toxin eliminiert werden kann.

In Abgrenzung zur Fibrose muss für die Diagnose der *Leberzirrhose* neben der Zunahme der EZM auch ein nodulärer Umbau der Leberarchitektur vorliegen. Mit diesem Zustand sind Störungen der metabolischen Funktionen sowie der Perfusion verbunden. Es handelt sich um das Endstadium der Fibrose, welches mit zahlreichen schwerwiegenden Komplikationen verbunden ist. Etymologisch ist das Wort Zirrhose mit dem griechischen *Kirrhos* (orange-gelb) assoziiert, was die typische pathologische Färbung des Organs beschreibt.

2.1.2 Ätiologie

Die hepatische Fibrose wird durch unterschiedliche Erkrankungen verursacht. Dabei sind virale Hepatitiden und durch Alkohol induzierte Leberschäden die beiden wichtigsten Ursachen (Williams, 2006).

Weltweit sind 370 Mio. Menschen an Hepatitis B erkrankt (Roggendorf et al., 2004). Obwohl die akute Hepatitis B in 95 % der Fälle spontan ausheilt, geht man in Deutschland von ca. 600 000 Patienten mit einer chronischen Hepatitis B aus (Roggendorf et al., 2004). Diese Patientengruppe hat ein erhöhtes Risiko, eine Fibrose bzw. Zirrhose sowie ein

hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (Niederrau, 2004). 20 % der Patienten mit einer chronisch aktiven Hepatitis B entwickeln nach 10 Jahren eine Leberzirrhose (Herold, 2010).

Auch die Hepatitis C mit 130 Mio. erkrankten Menschen weltweit (Williams, 2006) ist aufgrund fehlender Impfmöglichkeit eine große medizinische Herausforderung. In Deutschland beobachtet man eine Prävalenz der HCV-Antikörper von 0,4 % - 0,7 % (Dienes, 2004). Ausgehend von einem chronischen Verlauf in 50 % - 80 % der Fälle gibt es in der BRD 400 000 – 500 000 Virusträger. Die Hepatitis C gilt trotz der verbesserten Prävention bei der Übertragung von Blutprodukten als eines der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Fibrose sowie Zirrhose und steht an erster Stelle der Ursachen für eine Lebertransplantation (Dienes, 2004; Villano et al., 1999).

30 % - 50 % aller Lebererkrankungen weltweit sowie über die Hälfte aller Zirrhosen in der westlichen Welt werden durch Alkoholkonsum verursacht (Siegmund et al., 2005). Eine chronische Zufuhr führt zu einem typischen Schädigungsmuster mit perizentraler hepatischer Hypoxie und der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies sowie der Bildung lebertoxischer Metabolite wie Azetaldehyd. Die Leber durchläuft die Stadien der Steatose und Steatohepatitis, bevor es schließlich zur Bildung einer Fibrose sowie einer typischerweise mikronodulären Zirrhose kommt (Siegmund et al., 2005).

Die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) ist eine weitere wichtige Ursache für die Entstehung einer Leberfibrose (Saadeh, 2007). Trotz der Tatsache, dass nur 5 % der Menschen mit einer NASH eine Fibrose entwickeln, ist die Wichtigkeit der Erkrankung nicht zu unterschätzen, da ein hoher Prozentsatz der Bevölkerung an einer nichtalkoholischen Fettleber leidet. Jeder dritte Erwachsene in den USA weist einen erhöhten hepatischen Triglyceridgehalt auf (Williams, 2006). Laut einer Kohortenstudie sind 20 % - 25 % der italienischen Bevölkerung an einer nichtalkoholischen Fettleber erkrankt (Bedogni et al., 2005). Risikofaktoren für eine NASH sind Störungen, die das metabolische Syndrom ausmachen: ein erhöhter *Body Mass Index* (>25) und stammbetonte Adipositas sowie eine Hypertriglyzeridämie, Hypertonie, erhöhte Nüchternglukosespiegel und ein erniedrigtes *High Density Lipoprotein* (HDL) (Bedogni et al., 2005; Williams, 2006).

In 5 % - 15 % ist die Ursache einer chronischen Leberschädigung eine Cholestase (Kuntz & Kuntz, 2008). Hierbei wirkt die aufgestaute Gallenflüssigkeit toxisch auf die Hepatozyten. Die autoimmunologisch bedingte primäre biliäre Zirrhose (PBC) und primäre sklerosierende Cholangitis waren 2003 für über 10 % der Lebertransplantationen in den USA verantwortlich

(Guicciardi & Gores, 2005a). Eine extrahepatische Cholestase kann primär im Rahmen einer sklerosierenden Cholangitis auftreten, aber auch sekundär durch Obstruktion der ableitenden Gallenwege zur Fibrose führen. Mögliche Ursachen sind Gallensteine, Tumore, Spulwürmer, Leberegel, aber auch iatrogene Stenosen des Gallengangs durch laparoskopische Cholezystektomie und endoskopische Eingriffe im Bereich ableitender Gallengänge (Herold, 2010).

Seltenere Ursachen einer Zirrhose sind Stoffwechselerkrankungen, (z.B. α -1-Antitrypsinmangel, Morbus Wilson, Mukoviszidose), Chemikalien (z. B. Tetrachlorkohlenstoff, Arsen) und Medikamente (z.B. Methotrexat). Desweiteren sollten das Budd-Chiari Syndrom, bei dem es zum Verschluss von Lebervenen kommt und die kardial bedingte Stauungsleber als mögliche ätiologische Faktoren bedacht werden (Herold, 2010). Meistens lässt sich aufgrund guter diagnostischer Möglichkeiten die Ursache einer Zirrhose herausfinden, in ca. 5 % der Fälle bleibt die Ätiologie jedoch ungeklärt (Kuntz & Kuntz 2008).

2.1.3 *Pathogenese*

2.1.3.1 *Allgemeine Pathogenese*

Die Fibrose kann als Ergebnis eines extrem komplexen dynamischen Wundheilungsprozesses angesehen werden. Nach einer kurzzeitigen akuten Schädigung kommt es zur Regeneration und Ersatz nekrotischer Areale durch neue Hepatozyten. Dieser Prozess geht mit einer limitierten inflammatorischen Reaktion einher. Bei Persistenz des toxischen Stimulus schlägt jedoch der Regenerationsstimulus fehl und es kommt zu einer Hyperinflammation, zellulären Dysregulation und vermehrten Produktion der EZM (Friedman, 2008; Gressner et al., 2003).

Je nach Ursache beginnt die Fibrosierung in unterschiedlichen Arealen. Bei chronisch viralen Hepatitiden sowie cholestatischen Erkrankungen beobachtet man eine Zunahme der EZM in periportalen Bereichen, während die alkoholinduzierte Fibrose perizentral ihren Ursprung nimmt. Im fortgeschrittenen Stadium entsteht eine Zirrhose mit einem generalisierten knotigen Umbau der Leberarchitektur (Pinzani, 1999).

Durch den Verlust homöostatischer Kontrollmechanismen, die eine Balance zwischen der Synthese und dem Abbau der EZM gewährleisten, werden vermehrt Matrixbestandteile

wie Kollagen (Typen I, III und IV), Fibronectin, Undulin, Elastin, Laminin, Hyaluronan sowie Proteoglykane abgelagert, wodurch eine 3- bis 7-fache Zunahme der EZM resultiert. Neben der Produktion wird auch der Abbau der EZM engmaschig reguliert. Die Fibrose ist mit einer Hemmung des Abbaus assoziiert (Bataller & Brenner, 2005; Gressner et al., 2003). Dabei spielt das Verhältnis von kollagen-abbauenden Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren, *Tissue-Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP)* -1 und -2, eine entscheidende Rolle (Arthur, 2000; Yoshiji et al., 2000).

Die Ablagerungen führen zur Ausbildung einer (unvollständigen) subendothelialen Basalmembran, der sogenannten sinusoidalen Kapillarisation (Schaffer & Popper, 1963) und damit zur Behinderung des Stoffaustausches zwischen Hepatozyten und dem sinusoidalen Blut (Reichen, 1999). Das fibrotische Gewebe ist darüberhinaus für eine Lumeneinengung und Widerstandserhöhung in der Leber verantwortlich. Damit verbunden sind die Reduktion systemischer metabolischer Funktionen und die Ausbildung von Kollateralkreisläufen zwischen Pfortader und Hohlvene. Dies führt zu einer weiteren Verschlechterung der Leberfunktion bis zur Dekompensation und einem erhöhten Risiko für die Ausbildung von Aszites, einer Enzephalopathie sowie lebensgefährlichen Rupturen ösophagealer Kollateralkreisläufe (Gressner et al., 2003).

2.1.3.2 Zelluläres Zusammenspiel während der Fibrose

Die Fibrogenese der Leber ist ein Prozess, bei dem verschiedene zelluläre Subpopulationen engmaschig kooperieren (Abbildung 1). Die hepatozelluläre Nekrose und Apoptose sind mit der Freisetzung diverser Zytokine und einer Aktivierung des Immunsystems assoziiert. Im Zentrum stehen hierbei zunächst die Kupffer-Zellen, die ortsständigen Makrophagen der Leber. In aktivierter Form produzieren sie Sauerstoffradikale, Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Wachstumsfaktoren wie *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) und fördern so die Nekroinflammation. Es kommt zusätzlich zu einer Infiltration weiterer Makrophagen und neutrophiler Granulozyten und zur Aktivierung von Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen, was zu einer Perpetuation der Nekroinflammation mit sekundärer Schädigung des hepatischen Gewebes führt. Diese Vorgänge bedingen das Schlüsselereignis der Fibrogenese, die Aktivierung der leberspezifischen Perizyten, die auch unter dem Namen

Ito-Zellen bekannt sind. Die Ito-Zellen erfüllen in der gesunden Leber die Funktion der Retinoidspeicherung und sind durch eine ausgeprägte Autofluoreszenz gekennzeichnet. Sie haben die einzigartige Fähigkeit im geschädigten Gewebe sowie bei *in vitro*-Kultivierung zu Myofibroblasten zu transdifferenzieren (Friedman et al., 1985; Gressner, 1994). Neben dem Verlust der Fluoreszenz und der Volumendichte der Fettvakuolen ist vor allem die Expression des glatten Muskel- α -Aktin-Zytoskeletts (α -Smooth-Muscle-Actin, α -SMA) ein Zeichen für die Aktivierung der Zellen (Gressner, 1994; Friedman, 2008). Die im Disse-Raum gelegenen Ito-Zellen gelten als die Hauptproduzenten fast aller Komponenten der EZM während der Fibrose. Weiterhin bilden sie verschiedene Wachstumsfaktoren, wodurch es zu einer autokrinen Stimulation und somit zur Perpetuation der Fibrogenese kommt (Kisseleva & Brenner, 2008).

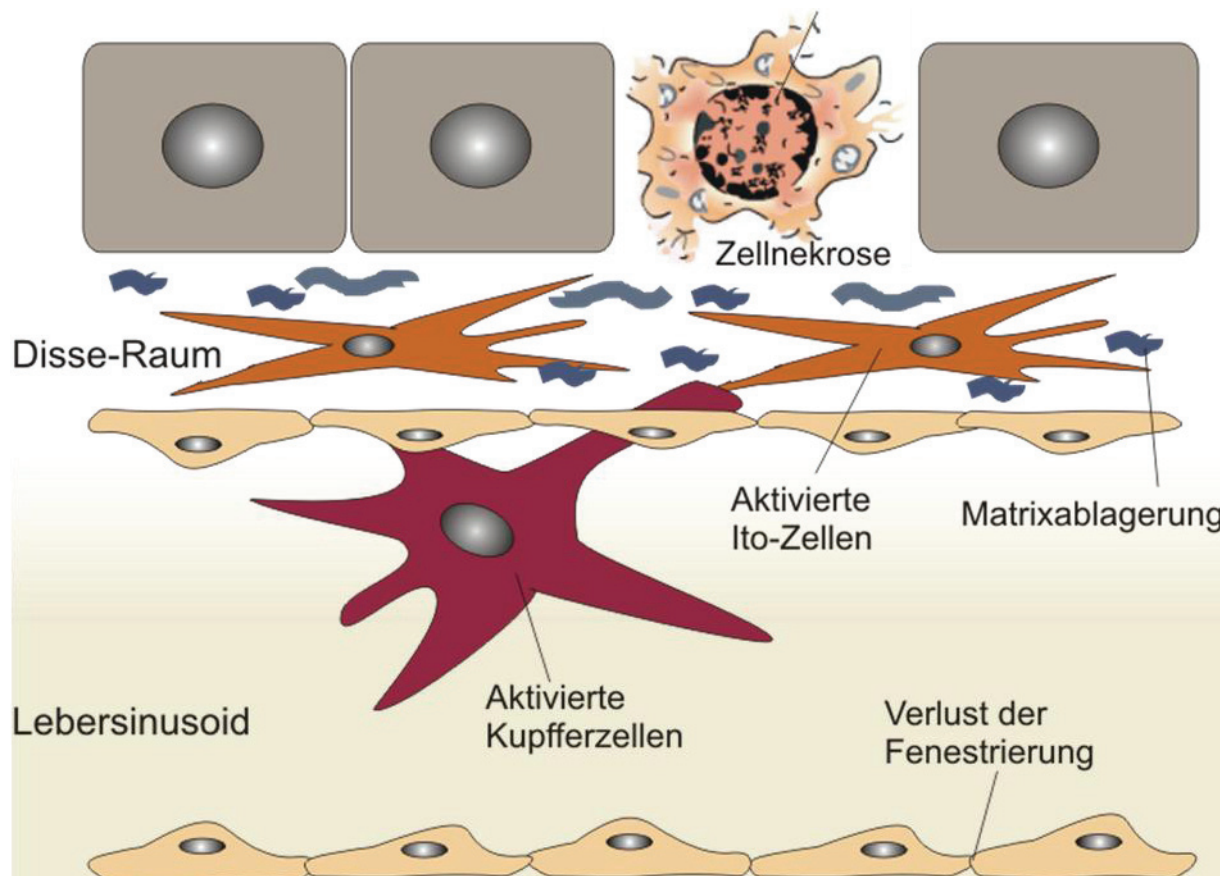


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Fibrogenese der Leber mit den daran beteiligten Zellen. Eine hepatozelluläre Schädigung (Zellnekrose) führt zur Aktivierung des Immunsystems, insbesondere von Kupferzellen, sowie zur Rekrutierung weiterer Makrophagen. Diese Zellen setzen verschiedene Faktoren frei, die zur Aktivierung der Ito-Zellen im Disse-Raum führen. Diese werden stimuliert, Bestandteile der EZM zu produzieren. Die Ablagerung der Bestandteile der EZM führt zur Störung des Stofftransports zwischen dem Sinusoid und den Hepatozyten, was durch den Verlust der Sinusepithelfenestrierung verstärkt wird. Es resultiert eine weitere Schädigung der Hepatozyten bis hin zum Leberversagen.

In den letzten Jahren wurde das beschriebene Konzept durch weitere interessante Forschungsergebnisse erweitert. So konnte gezeigt werden, dass es neben den Ito-Zellen weitere wichtige Zellgruppen gibt, die an der Produktion der extrazellulären Matrix während der Fibrogenese beteiligt sind. Es wurde eine Transdifferenzierung von Hepatozyten (Zeisberg et al., 2007) und Gallengangepithelien (Robertson et al., 2007) zu Fibroblasten demonstriert und im angloamerikanischen Raum als *epithelial-to-mesenchymal-transition* (EMT) bezeichnet. Interessanterweise konnten Scholten et al. (2010) in einer gut gestalteten aktuellen Studie keine EMT von Cholangiozyten, die durch genetisches Labelling spezifisch untersucht werden konnten, detektieren. Trotz des damit geweckten Zweifels an der Rolle der EMT für die Fibrogenese ist diese ein sehr aktueller Forschungsgegenstand. Laut Popov & Schuppan (2010) muss die Relevanz der EMT durch eine Weiterentwicklung der Fibrosemodelle sowie durch Untersuchungen an humanem Gewebe genauer evaluiert werden.

Desweiteren wurde die Aufmerksamkeit auf die Migration und Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Leber während der Schädigung gelenkt. Es wurde beschrieben, dass aus dem Knochenmark stammende Stammzellen die zirrhotische murine Leber infiltrieren und an der Produktion von Kollagen beteiligt sind (Russo et al., 2006). Kisseleva et al. (2007) berichteten über eine Fraktion CD-45-positiver Fibrozyten, die - aus dem Knochenmark stammend - an der Fibrogenese beteiligt sind. Andererseits wurde jedoch berichtet, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen durch Expression von Matrix-Metalloproteinasen an einem Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Higashiyama et al., 2007). Bisher ist die genaue Rolle dieser zellulären Subpopulationen jedoch nicht eindeutig geklärt.

2.1.3.3 Pathophysiologische Rolle von TGF- β und dessen Transduktionsmolekülen

Die zellulären Interaktionen, die die beschriebene Kaskade der Fibrogenese auslösen, werden durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Unter den profibrotischen Faktoren ist dem *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) eine entscheidende Rolle beizumessen. Dieser Wachstumsfaktor führt zur Aktivierung, Migration und Transdifferenzierung der Ito-Zellen (Gressner et al., 2003; Breitkopf et al., 2006). TGF- β

fördert außerdem die Produktion der EZM sowie die Hemmung deren Abbaus (Knittel et al., 1996; Kanzler et al., 1999; Inagaki & Okazaki, 2007). Interessanterweise induziert aktiviertes TGF- β auch seine eigene Expression, wodurch der profibrotische Kreislauf aufrechterhalten wird (Inagaki & Okazaki, 2007).

TGF- β wird in Form eines latenten hochmolekularen Komplexes von Kupffer-Zellen, Ito-Zellen bzw. Myofibroblasten sowie Sinusendothelzellen *aktiv* sezerniert sowie von geschädigten Hepatozyten und Thrombozyten freigesetzt (Bissell et al., 1995; Gressner et al., 2008). Extrazellulär kommt es zur Aktivierung des Komplexes durch spezifische Interaktionen mit Proteasen bzw. durch unspezifische Interaktionen mit Proteinen wie Thrombospondin und $\alpha\beta 1$ -Integrin sowie zu physikochemischen Reaktionen mit Sauerstoffradikalen (Koli et al., 2001). Somit wird die Bioverfügbarkeit von TGF- β durch die Zusammensetzung der EZM reguliert.

Aktiviertes TGF- β bindet an den TGF- β -Rezeptor Typ II auf der Ito-Zelloberfläche (Abbildung 2). Diese Interaktion führt sofort zur Rekrutierung des Typ I-Rezeptors und es wird ein Tetramer aus den beiden Rezeptortypen gebildet. Daraufhin phosphoryliert der Typ-I-Rezeptor Smad 2 und Smad 3 (Inagaki & Okazaki, 2007). Es handelt sich um intrazelluläre Signaltransduktionsproteine, die aufgrund ihrer Aktivierung durch den Rezeptor auch als R-Smads bezeichnet werden. Die phosphorylierten R-Smads bilden im Zytoplasma einen Komplex mit Smad 4 und der Proteinkomplex transloziert in den Zellkern, wo er die Transkription verschiedener Gene reguliert. Von den R-Smads scheint vor allem Smad 3 für die Regulation der profibrotischen Gene wie Prokollagen (I)- α und TGF- β verantwortlich zu sein, während Smad 2 auch antiproliferative Eigenschaften besitzt (Uemura et al., 2005).

Weiterhin gibt es Proteine, die die TGF/Smad-Signaltransduktion inhibieren. Der wichtigste Vertreter ist dabei Smad 7 (Inagaki & Okazaki, 2007). Interessanterweise führt die Bindung von TGF- β an seinen Rezeptor zu einer schnellen Aktivierung von Smad 7 im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Smad 7 wirkt als kompetitiver Antagonist bei der Bindung der R-Smads an den TGF- β -Rezeptor, wodurch ihre Phosphorylierung gehemmt wird. Desweiteren induziert Smad 7 im Komplex mit den Ubiquitinligasen Smurf 1 und Smurf 2 den Abbau des TGF- β Rezeptors (Moustakas & Heldin, 2008).

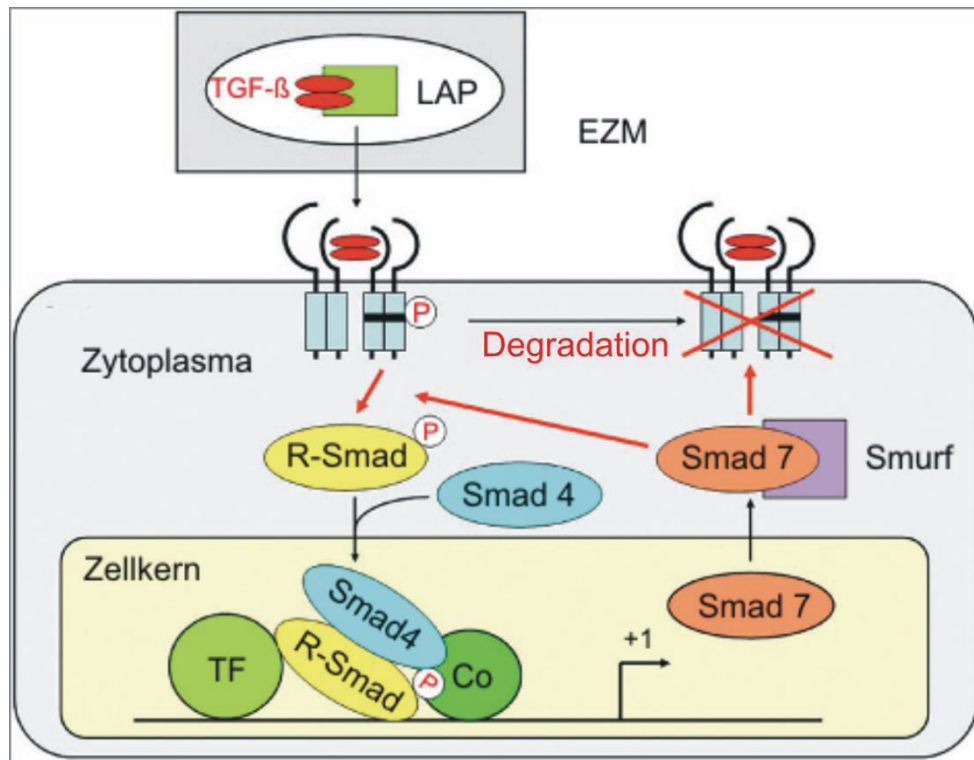


Abbildung 2: Signaltransduktion von TGF- β /Smad. Aktiviertes TGF- β wird aus seiner latenten Form freigesetzt und bindet an seinen Rezeptor. Rezeptor-aktivierte Smads (R-Smad) im Komplex mit Smad 4 führen zur Signaltransduktion vom Zytoplasma in den Zellkern, wo sie in Assoziation mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (TF) sowie Co-Aktivatoren (Co) die Transkription ihrer Ziel-Gene regulieren. Smad 7 wird durch TGF- β selbst induziert und wirkt im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus auf die TGF- β /Smad Signaltransduktion, indem es die R-Smad-Phosphorylierung hemmt und im Komplex mit der Ubiquitinligase Smurf die TGF- β -Rezeptoren abbaut. LAP: Latenzassoziierte Proteine. Modifiziert nach Inagaki et al., 2007.

2.1.4 Klinische Symptome und Komplikationen

Zwischen der Induktion der Fibrogenese und der klinischen Manifestation liegt meist ein langes Zeitintervall. Eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit bzw. verstärkte Müdigkeit sind anfängliche unspezifische Zeichen einer Leberschädigung. Die Symptome, die mit einer Fibrose bzw. Zirrhose assoziiert sein können, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: klinische Symptome, die mit einer Zirrhose assoziiert sind

| Symptom | Kommentar |
|------------------------------------|---|
| Palmarerythem | Differenzialdiagnostisch kommen auch eine rheumatoide Arthritis, Leukämie und Thyreotoxikose in Betracht |
| Leukonychie | Mit einer Hypoalbuminämie assoziiert |
| Dypuytrensche Kontraktur | Häufig Folge von Alkoholabusus |
| Spider-Naevi | Folge einer Dysregulation des Östrogenmetabolismus |
| Foetor hepaticus | Ausgeprägter charakteristischer Geruch |
| Ikterus | Folge der Cholestase, dekompensierten Leberzirrhose, Leberversagen bzw. Hämolyse |
| Kollateralvenen bzw. Caput medusae | Folge der portalen Hypertension mit Ausbildung porto-kavaler Anastomosen |
| Asterixis/ Flattertremor | Zeichen hepatischer Enzephalopathie |
| Hämatome | Sowohl Thrombopenien als auch Fehlen von Gerinnungsfaktoren sind für Leberzirrhose typisch |
| Splenomegalie | Folge portaler Hypertension |
| Aszites | Ab 2 Liter klinisch sichtbar |
| Kachexie | Tritt als Folge einer Malnutrition bei Zirrhose auf, kann aber auch Zeichen eines hepatozellulären Karzinoms sein |
| Gynäkomastie | Ergebnis einer Östrogenimbalance |
| Kratzspuren | Folge eines Pruritus |
| Testikuläre Atrophie | Tritt auf bei Zirrhose, kann aber auch direkt auf einen Alkoholabusus zurückzuführen sein |
| Haarverlust | Im Sinne des Verlusts sekundärer Geschlechtsmerkmale |

Modifiziert nach Guha IN, Iredale JP in Rodes et al., *Textbook of Hepatology*, 2007.

Die Leberzirrhose kann zur Funktionsbeeinträchtigung anderer Organe führen und ist aufgrund der zu erwartenden Komplikationen äußerst gefürchtet. Die wichtigsten sind im Folgenden zusammengestellt:

Die *portale Hypertension* ist definiert als ein portaler Druck oberhalb der Norm von 1 mmHg bis 5 mmHg, klinisch signifikant sind Werte über 12 mmHg. Die portale Hypertension kann zu einer Splenomegalie, Aszites, gastrointestinalen Blutungen sowie einer Nierendysfunktion führen (Guha & Iredale, 2007), wobei die ösophagealen bzw. gastralen Blutungen als die gefährlichsten Komplikationen mit dem höchstem Letalitätsrisiko angesehen werden (Bosch et al., 2008; Guha & Iredale, 2007).

Eine Zirrhose führt aufgrund der gestörten Hämodynamik zur Schädigung der Niere. Es sind veränderte renale Funktionen bezüglich der Salzausscheidung und der Perfusionsparameter beschrieben (Gines et al., 2003). Diese Veränderungen können zum *hepatorenenalen Syndrom* führen. Typischerweise kommt es zur Vasodilatation im Splanchnikusgebiet, erhöhtem kardialen Output, erniedrigtem peripheren Widerstand sowie zu renaler Vasokonstriktion und im Endstadium einem Versagen der Niere (Gines et al., 2003). Die Prognose des hepatorenenalen Syndroms ist als äußerst schlecht anzusehen.

Die Dysfunktion der Leber und die damit verbundene portale Hypertension führen zur intrapulmonalen Vasodilatation und Oxygenierungsstörungen. Das als *hepatopulmonales Syndrom* bezeichnete Krankheitsbild kommt in ca. 15 – 20 % der Patienten mit einer Leberzirrhose vor (Arguedas et al., 2003; Schuppan & Afdhal, 2008) und wurde als unabhängiger Faktor für die Letalität zirrhotischer Patienten ermittelt (Schenk et al., 2003). Zwar ist die Pathogenese nicht vollständig geklärt, aber es gibt Hinweise darauf, dass die Überexpression von NO-Synthasen mit der pulmonalen Dysfunktion zusammenhängt (Schuppan & Afdhal, 2008; Guha & Iredale, 2007).

Auch wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Zirrhose und einer kardialen Funktionsstörung beschrieben und von Lee im Jahre 1989 als *zirrhatische Kardiomyopathie* bezeichnet (Lee, 1989). Diese ist durch eine Myokardhypertrophie in Kombination mit einem reduzierten Ansprechen auf inotrope bzw. chronotrope Stimuli gekennzeichnet (Gaskari et al., 2006). Schwere Formen dieser Erkrankung können die postoperative Mortalität erhöhen und somit die Lebertransplantation unmöglich machen (Schuppan & Afdhal, 2008).

80 % aller *hepatozellulären Karzinome* (HCC) entstehen auf dem Boden einer zirrhotischen Leber (Llovet et al., 2003). Das pathogenetische Konzept geht von Dysplasien der Hepatozyten im Rahmen des ständigen Regenerationsreizes aus, die daraufhin zum invasiven HCC führen. Die Letalitätsrate der Patienten mit einem HCC auf der Grundlage einer Zirrhose ist in den letzten Jahren angestiegen, wohingegen die HCC-Fälle, die nicht auf

eine Zirrhose zurückzuführen sind, eine stabile bzw. fallende Mortalität aufweisen (Fattovich et al., 2004). Während des Stadiums der kompensierten Zirrhose ist das HCC die wichtigste Todesursache (Fattovich et al., 2004).

Aufgrund der Ausbildung porto-kavaler Anastomosen passiert ein Teil des Blutes nicht mehr die Leber. Die fehlende Entgiftung führt zur *hepatischen Enzephalopathie*. Das Krankheitsbild beginnt schleichend mit Veränderungen der Persönlichkeit oder Änderungen der Schlafgewohnheiten, Aufmerksamkeitsdefiziten sowie motorischen Störungen wie dem Flattertremor. Die Enzephalopathie kann bis zum Stadium des Stupors und des Koma fortschreiten (Butterworth et al., 2000). Als Neurotoxine, die bei Zirrhotikern im zentralen Nervensystem akkumulieren, wurden vor allem Ammoniak und Mangan identifiziert, aber auch Phenole sowie kurzkettige Fettsäuren, die mit den beiden erstgenannten Noxen synergistisch neurotoxisch wirken (Butterworth et al; 2000).

Patienten mit einer Zirrhose weisen ein erhöhtes Risiko auf, eine bakterielle Infektion zu entwickeln (Navasa et al., 1999). Es wurde beobachtet, dass das Immunsystem bei den Patienten verändert und vor allem die Funktionalität der Makrophagen gestört ist (Hassner et al., 1981). Weiterhin wurde eine erhöhte bakterielle Translokation im Darm festgestellt (Cicera et al., 2001). Aufgrund der Insuffizienz des Immunsystems ist die Prognose von Infektionen, insbesondere der Sepsis, bei den Patienten besonders schlecht, so dass dies eine sehr gefürchtete Komplikation ist.

Chronische Lebererkrankungen führen regelmäßig zu *Veränderungen im Blutbild*. Eine Thrombozytopenie wird oft beobachtet. Eine mögliche Ursache ist die Splenomegalie. Die Rate an Thrombozyten, die durch die Milz eliminiert werden, steigt bei Patienten mit einer Zirrhose von 30 % auf bis zu 90 % an. Desweiteren ist die Neusynthese vermindert. In Kombination mit einer geminderten Produktion von Gerinnungsfaktoren in der Leber kommt es vermehrt zu Blutungen (Guha & Iredale, 2007).

Auch eine Anämie tritt häufig auf. Diese kann sowohl mikro-, normo- als auch makrozytär sein. Als Ursache kommen ein Folsäuremangel aufgrund einer Malnutrition, ein erhöhter Abbau der Erythrozyten in der Milz sowie eine erhöhte Fragilität der Zellen durch Membrandefekte in Frage (Bruno et al., 2004). Ein Blutverlust durch gastrointestinale Blutungen sowie ein vermindertes Ansprechen auf Erythropoietin sind weitere potentielle Ursachen.

2.1.5 **Epidemiologie**

Die Leberzirrhose ist eine Erkrankung, die weltweit auftritt und beide Geschlechter aller Rassen betrifft. Allerdings gibt es geographische Unterschiede, die vor allem mit dem Alkoholkonsum und der Frequenz der viralen Hepatitiden kausal in Verbindung stehen. Da die Leberzirrhose oft klinisch stumm ist, gibt es keine genauen Zahlen für die weltweite Prävalenz. Es wird eine große Anzahl an unentdeckten Fällen im Zusammenhang mit einer NASH und Hepatitis C angenommen. Die Prävalenz in Europa ist schätzungsweise mit der amerikanischen vergleichbar, während man in Afrika und Asien von höheren Zahlen aufgrund einer erhöhten Rate an Patienten mit viraler Hepatitis ausgeht. Eine Zirrhose wird mit einer Häufigkeit von 4 % - 10 % bei Autopsien gefunden. Diese Zahl hängt sicher damit zusammen, dass die Zirrhose das Letalitätsrisiko erhöht (Leon et al., 2006), so dass diese Daten nicht auf die gesamte Population zu übertragen sind. Es wird davon ausgegangen, dass der tatsächliche Anteil der Patienten mit einer histologisch nachweisbaren Zirrhose bei ca. 1 % der Weltbevölkerung liegt. In Deutschland geht man von 600 000 – 700 000 Menschen aus, die an einer Zirrhose leiden, von denen ungefähr 25 000 Patienten jährlich an der Erkrankung sterben. Die Letalität ist bei Männern doppelt so hoch wie bei Frauen. Bei den 45- bis 65-Jährigen ist es die fünfthäufigste Todesursache (Guha & Iredale, 2007; Schuppan & Afdhal, 2008; Kuntz & Kuntz 2008).

2.1.6 **Diagnostik**

Am Anfang der Diagnostik stehen die Anamnese sowie die klinische Untersuchung. Die typischen Symptome, die auf eine Schädigung der Leber hinweisen können, wurden bereits in der Tabelle 1 zusammengefasst. Bei Verdacht auf eine Fibrose stehen verschiedene bildgebende Verfahren zur Verfügung, deren Aussagekraft jedoch eingeschränkt ist. Sowohl die Computertomographie als auch die Magnetresonanztomographie können Hinweise auf eine Zirrhose wie Splenomegalie, inhomogene Struktur der Leber sowie Kollateralvenen geben. Diese Befunde sind jedoch nicht spezifisch. Außerdem schließen Normbefunde eine kompensierte Zirrhose nicht aus (Kuntz & Kuntz 2008).

Einige Veränderungen im Laborbefund sind typisch für eine Leberschädigung (Tabelle 2) und sind Anlass zu weiterer Diagnostik.

Tabelle 2: Standardlaborparameter einer Leberschädigung

| Laborparameter | Beschreibung | Ätiologie |
|-----------------|--|---|
| ALT, AST, GLDH | Erhöhte Serumaktivität bei akuter Schädigung der Hepatozyten | Parameter der hepatozellulären Integrität |
| AP | Erhöhte Serumaktivität ist ein Hinweis für die Störung der ableitenden Gallenwege | Parameter der Cholestase |
| yGT | Erhöhte Serumaktivität ist Leberspezifisch | Parameter der Cholestase |
| Bilirubin | Abbauprodukt des Häm, wird über die Galle eliminiert | Parameter der Cholestase, hepatischer Eliminationsstörung oder Hämolyse |
| Prothrombinzeit | Erniedrigt bei fortgeschrittener Zirrhose | Synthesestörung der Leber (DD Vitamin K-Mangel) |
| Anämie | Normo-, mikro- und makrozytäre Formen können im Rahmen einer Hepathopathie entstehen | Erhöhter Verlust und erniedrigte Produktion von Erythrozyten |
| Albumin | Erniedrigt bei fortgeschrittener Zirrhose | Erniedrigte Produktion in der geschädigten Leber |

Modifiziert nach Schuppan & Afdhal, 2008.

Der diagnostische Goldstandard für die Leberfibrose bzw. -zirrhose ist die Biopsie, die gleichzeitig eine Aussage über den Grad der Inflammation (Grading) sowie das Ausmaß der Fibrosierung (Staging) erlaubt. Die histologische Begutachtung ermöglicht eine Voraussage über die Progression der Erkrankung und hilft häufig bei der Ursachenfindung. Der Eingriff ist relativ risikoarm, trotzdem geht man von einer Biopsie-assoziierten Letalität von ca. 1:10.000 bis 12.000 aus (Bravo et al., 2001). Die wichtigste Komplikation ist die Nachblutung (Bravo et al., 2001; Schuppan & Afdhal, 2008).

2.1.7 *Therapie*

Je nach Ätiologie der Leberfibrose gibt es unterschiedliche Therapieansätze. Grundsätzlich muss die Exposition mit der Noxe unabhängig vom Stadium der Zirrhose unterbunden werden, was vor allem bei ethyltoxischer Leberschädigung entscheidend ist. Damit kann die Ausbildung einer Zirrhose verhindert, aber auch das Risiko für die Ausbildung eines HCC gesenkt werden.

Die Progression der Erkrankung muss bei Patienten mit einer nachgewiesenen Fibrose gestoppt oder zumindest verlangsamt werden. Das Ziel ist es, klinische Endpunkte wie eine Dekompensation bzw. die Ausbildung eines HCC verhindern. Für die kausale Therapie der Leberfibrose stehen bisher keine zugelassenen Medikamente zur Verfügung. Die Lebertransplantation ist zwar ein kausaler Ansatz, jedoch ist diese aufgrund der begrenzten Organzahl nicht bei allen Patienten durchführbar. Der Wissenszuwachs um die Pathophysiologie der Leberfibrose in den letzten Jahren, insbesondere die Kenntnis über die Dynamik dieses Prozesses, lässt neue Ideen für frühzeitige Therapieansätze zu. Diese greifen entweder in den Prozess der Nekroinflammation ein, um so die profibrotische Kaskade zu unterbinden oder sie modulieren direkt die Fibroblastenaktivierung (Ghiassi-Nejad & Friedman, 2008). Die meisten experimentell erforschten Substanzen können bisher jedoch klinisch nicht angewendet werden. Die Angst vor unvorhersehbaren Nebenwirkungen macht den Zulassungsprozess für neue Medikamente sehr schwierig. Die Ausweitung der Indikationen für bereits klinisch etablierte Arzneistoffe erscheint unter diesem Gesichtspunkt viel sicherer. Nicht zuletzt deswegen sind etablierte Medikamente von hohem Interesse für die moderne Grundlagenforschung und erlauben einen schnellen Übergang vom Labor in die Klinik.

2.2 Erythropoietin

2.2.1 *Das Hormon und seine rekombinanten Analoga*

Das Hormon Erythropoietin (Epo) ist ein Zytokin der Klasse I (Jelkmann, 2004) und wird in der Niere sowie der fetalen Leber mit dem Ziel produziert, die Erythropoese zu stimulieren. Es handelt sich um ein 30,4 kDa großes Glykoprotein aus 165 Aminosäuren. Das Protein hat 4 glykosylierte Ketten: drei N-ständige und eine O-ständige saure Oligosaccharidseitenketten. Diese sind für die Sekretion und die biologische Aktivität des Hormons notwendig und schützen es vor reaktiven Sauerstoffspezies (Chong et al., 2002). Desweiteren sind 2 Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren Zystein für die biologische Aktivität von Bedeutung (Chong et al., 2002). Abbildung 3 zeigt die kompakte globuläre Struktur des Glykoproteins.

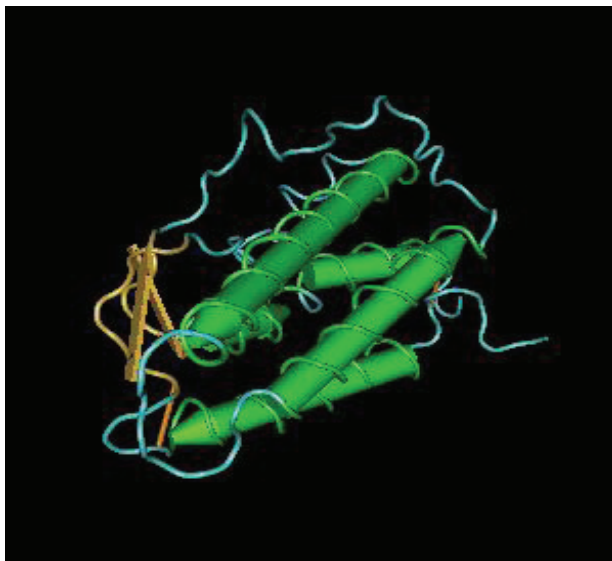


Abbildung 3: 3-D-Strukturdarstellung von Erythropoietin. Aufgrund hydrophober Interaktionen der vier α -Helixbündel (grün), die antiparallel angeordnet sind, handelt es sich um ein kompaktes, globuläres Molekül. Die α -Helices sind mit 2 langen und 2 kurzen Überkreuzungsloops (blau) verbunden. In braun dargestellt sind die zwei β -Stränge in den Überkreuzungsloops (nach Cheetham et al., 1998).

Die Produktion von Erythropoietin wird durch das Sauerstoffangebot reguliert. Bei Mangel an Sauerstoff kommt es zur Aktivierung von *Hypoxia Inducible Factor* (Hif)-1, welcher zur Transkription des Epo-Gens führt (Brines & Cerami, 2008). Zwar ist die Produktion von Epo vor allem für die Zellen der Nierentubuli beschrieben, aber es konnte gezeigt werden, dass auch andere Organe wie Leber, ZNS, Uterus und Plazenta sowie Zellen der glatten Muskulatur zur Produktion fähig sind (Maiese et al., 2005).

Die hämatologische Funktion von Epo wird über eine Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor vermittelt. Dieser Epo-Rezeptor (EpoR) ist ein Glykoprotein aus 484 Aminosäuren

und gehört zur Klasse-I-Zytokinrezeptor-Superfamilie (Jelkmann, 2004). Neben der Erythropoese ist das Vorhandensein des Epo-R auch für eine regelrechte embryonale Entwicklung erforderlich (Yu et al., 2002). Die Untereinheiten des Rezeptors homodimerisieren spontan und ändern ihre Konformation nach Bindung von Epo, wodurch die nachgeschalteten Signalmoleküle, wie die Januskinase 2 (Jak 2), aktiviert werden (Brines & Cerami, 2008).

Im Jahre 1977 war es gelungen, das humane Epo zu isolieren (Miyake et al., 1977). Diese Arbeit war Grundlage für die Erforschung des molekularen Wirkmechanismus von Epo und ermöglichte die rekombinante Produktion der Substanz. Ca. 10 Jahre später wurden erste exogene, rekombinante Epo-Formen entwickelt, um diese therapeutisch zur Behandlung einer Anämie einzusetzen (Lin et al., 1985). Heute sind die chronisch renale sowie die Chemotherapie-induzierte Anämie bei Tumorpatienten die typischen Einsatzgebiete von Epo und seinen Analoga (Angaben laut Fachinformation für Darbepoetin- α , 29.03.2010).

Es sind mehrere rekombinante Epo-Formen verfügbar: Epoetin- α , Epoetin- β , Epoetin- ω , Epoetin- δ sowie Darbepoetin- α (DPO). Diese Substanzen haben alle die gleiche Aminosäuresequenz, unterscheiden sich jedoch im Glykosylierungsmuster, was durch Produktionsprozesse in unterschiedlichen Zelltypen herrührt (Fisher, 2003).

DPO wurde vor ca. 10 Jahren entwickelt und nimmt eine gewisse Sonderstellung ein. Durch zwei zusätzliche Glykosylierungsketten und somit ein größeres Gewicht und eine negativere Ladung weist die Substanz eine etwa drei-fach längere Halbwertszeit (ca. 24 h) sowie eine stärkere biologische Wirksamkeit im Vergleich zu anderen rekombinanten Formen auf (Egrie et al., 2001). Die Substanz wird häufig klinisch eingesetzt, weil die Frequenz der Applikation im Vergleich zu anderen Formen geringer ist.

2.2.2 *Hämatopoetisches Potenzial*

Vor über einem Jahrhundert haben Carnot und De Flandre festgestellt, dass eine Bluttransfusion von einem Tier, welches vorher einen Blutverlust erlitten hat, bei einem gesunden Tier eine Retikulozytose auslöst (Carnot & De Flandre, 1906). Es wurde somit gezeigt, dass es eine Substanz geben muss, die bei Hypoxie vermehrt ausgeschüttet wird und die Erythropoese stimuliert. Dank dieser Pionierarbeit wurde das Interesse an der damals als

Hämopoetin genannten Substanz geweckt und durch intensive Forschungsbemühungen konnte die genaue Regulation der Erythropoese durch Epo aufgedeckt werden.

Heute weiß man, dass Epo seine Wirkung über die Interaktion mit den Blutvorläuferzellen ausübt. Über mehrere Differenzierungsschritte entstehen aus den multipotenten Vorläuferzellen im Knochenmark reife Erythrozyten (Abbildung 4). Besonders sensitiv für Epo scheinen die Proerythroblasten zu sein, da diese Zellen die höchste EpoR-Dichte (1000 pro Zelle) auf ihrer Oberfläche aufweisen (Testa, 2004). Es ist bekannt, dass unter normoxischen Bedingungen ein signifikanter Anteil an Vorläuferzellen im Knochenmark die Reifung nicht überlebt. Diese ineffiziente Erythropoese ist dadurch begründet, dass ein Teil der Erythroblasten durch Apoptose untergeht (Testa, 2004). Bei Hypoxie wird Epo vermehrt ausgeschüttet. Das Andocken an den EpoR führt über verschiedene Signalwege zur Aussendung von Überlebenssignalen, wie der Aktivierung von antiapoptotischen Genen (z.B. Bcl-xL) sowie zur Herunterregulation der Todesrezeptoren wie Fas und *Tumor-Necrosis-Factor-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand* (TRAIL), so dass die Apoptose verhindert wird. Die Erythropoese wird somit effektiver und die Zahl der systemischen Sauerstoffträger kann schnell erhöht werden.

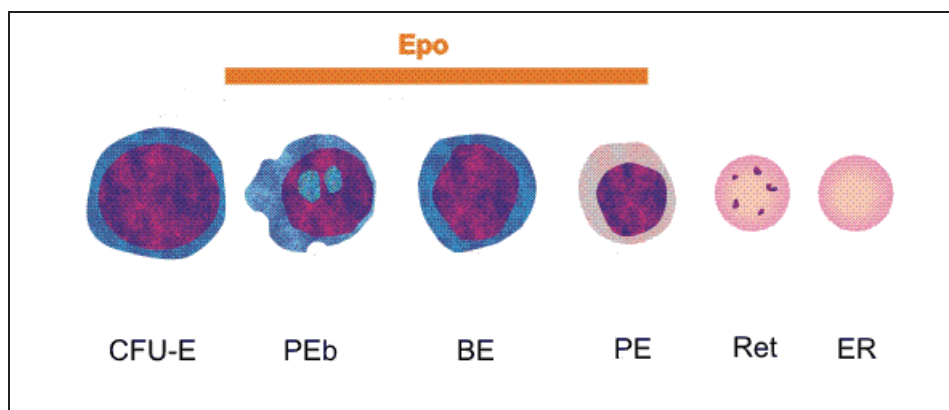


Abbildung 4: Erythropoese. Aus einer multipotenten Stammzelle bildet sich über mehrere Schritte eine erythropoetische Kolonie, die colony forming unit-erythroid (CFU-E). Die Zellen durchlaufen weitere Differenzierungsschritte und ändern dabei ihre Morphologie: PEb: Proerythroblast; BE: Basophiler Erythroblast; PE: Polychromatischer Erythroblast; Ret: Retikulozyt bis dann ein reifer Erythrozyt (ER) entsteht. Erythropoietin greift in die Regulation insbesondere in den Stadien der PEb bis zum PE ein, indem das Hormon die Apoptose in diesen Zellstadien verhindert.

2.2.3 *Pleiotropes Wirkprofil*

Neue Untersuchungen belegen ein viel breiteres Wirkpotenzial des Hormons und seiner rekombinanten Formen als zunächst vermutet. Neben der hämatopoetischen Wirkung konnte gezeigt werden, dass Epo in vielen Organen zytoprotektive Effekte auslöst (Joyeux-Fauve, 2007). So konnte ein anti-apoptotisches, anti-nekrotisches sowie anti-inflammatorisches Potenzial der Substanz nachgewiesen werden (Joyeux-Faure, 2007). Die positive Wirkung auf die zelluläre Integrität wurde in vielen Organen demonstriert (Chatterjee, 2005). In experimentellen Ischämie-Modellen des Gehirns und des Rückenmarks, des Herzens, der Retina sowie des Darms konnte die zytoprotektive Wirkung von Epo belegt werden (Brines et al., 2000; Abdelrahman et al., 2004; Junk et al., 2002; Celik et al., 2002; Squadrito et al., 1999). Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten erstmals belegen, dass die Gabe von DPO den akuten Leberschaden reduzieren kann (Le Minh et al., 2007). Diese Untersuchungen wurden kürzlich von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt und der Nachweis eines Überlebensvorteils durch Epo im Modell der Sepsis erweitert (Aoshiba et al., 2009). Diese Arbeiten könnten Wegbereiter für eine neue Therapieoption bei septischen Patienten sein. Weiterhin gibt es Studien, die belegen, dass Epo die Schädigung der Niere im Modell des akuten und chronischen Schadens reduziert (Patel et al., 2004, Park et al., 2007) und somit auch anti-fibrotische Eigenschaften aufweist. Die protektive Wirkung von Epo kann durch eine Vielzahl von Studien mit aktuell schnell steigender Zahl belegt werden.

Die zytoprotektiven Effekte von Epo, welche über die Interaktion mit seinem Rezeptor vermittelt werden, scheinen sehr vielseitig zu sein. Die wichtigsten bisher bekannten intrazellulären Signale, über die Epo seine Wirkung entfaltet, sind in der Abbildung 5 dargestellt.

Neben der Bindung am spezifischen Epo-R konnte kürzlich ein weiterer Rezeptor gefunden werden, über den Epo seine Wirkung ausübt. Es handelt sich um den sogenannten gemeinsamen β -Rezeptor (*engl. common β -receptor; c β -R*). Der Name erklärt sich aus der Tatsache, dass mehrere Zytokine, wie Interleukine 3 und 5, eine Affinität zum Rezeptor aufweisen (Brines et al., 2004). Dieser Rezeptor kann einen heteromeren Komplex mit dem EpoR bilden. Mit c β -R-Knockoutmäusen wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor für die Epo-vermittelte Zytoprotektion notwendig ist (Brines et al., 2004). Andererseits gibt es auch

Studien, die eine Zytoprotektion durch Wirkung von Epo am homodimeren EpoR belegen (Um et al., 2007). Die quantitative Gewichtung des c β -R für die biologische Aktivität des Hormons ist zum heutigen Zeitpunkt noch Gegenstand der Forschung.

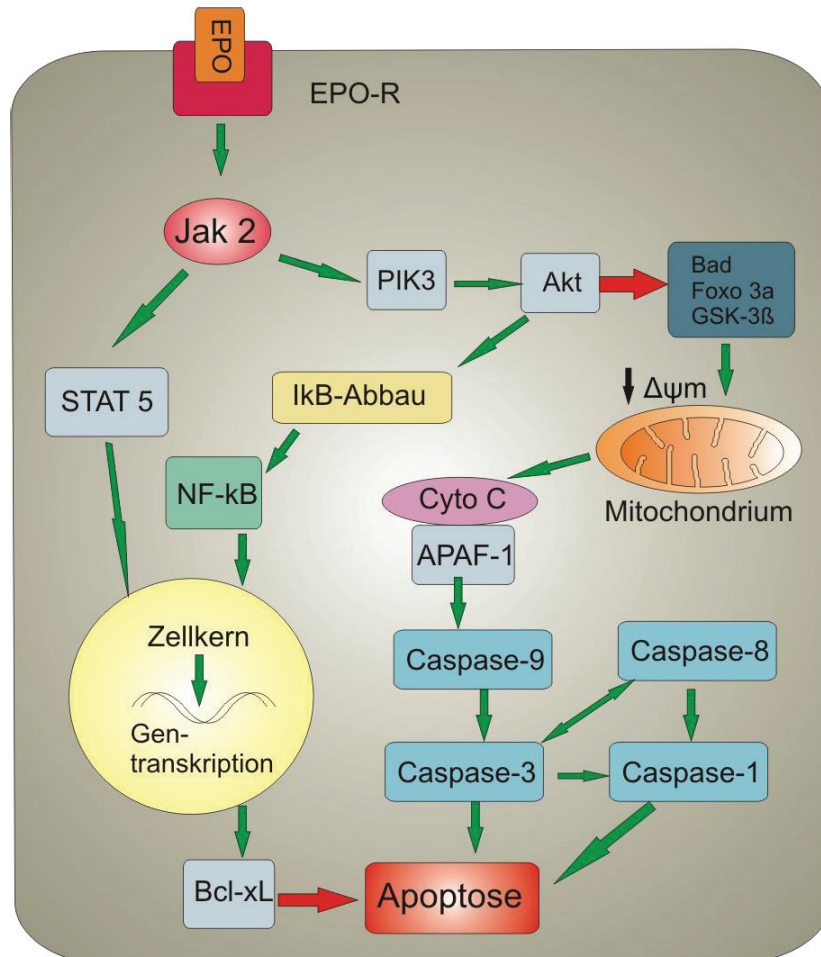


Abbildung 5: Multiple Signalwege führen zur zytoprotektiven sowie anti-inflammatorischen Wirkung von Epo. Nach Bindung am Rezeptor wird die Januskinase-2 (Jak-2) phosphoryliert. Es kommt zur Aktivierung des PIK3-Akt- sowie Stat-5-Signalweges. Nachgeschaltete Proteine wie Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β), Bad, Bcl-xL, I κ B-Kinase (I κ K) und nuclear factor kB (NF-kB) werden so moduliert, dass die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) gewährleistet, der proapoptotische Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1) nicht aktiviert und die Freisetzung von Cytochrom C sowie die Aktivierung der Caspasen-1, -3, -8 und -9 und der Endonukleasen verhindert wird. Weiterhin werden über NF κ B sowie Stat-5 antiapoptotische Gene wie Bcl-xL exprimiert (grüne Pfeile = Aktivierung; rote Pfeile = Inhibition).

2.3 Ziel der Arbeit und zentrale Fragestellungen

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, mit Hilfe eines etablierten *in vivo* Modells des cholestatischen Leberschadens das therapeutische Potential des Epo-Analogons Darbepoetin- α zu evaluieren. Dabei wurden mit Hilfe histologischer, immunhistochemischer, molekularbiologischer und laborchemischer Verfahren Schädigungsparameter in der frühen sowie der fortgeschrittenen Phase der Cholestase evaluiert. Es wurde ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der Fibrose gelegt. Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Applikation von DPO die Letalität der Mäuse reduzieren kann.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen intensiv beleuchtet:

1. Kann die Applikation von DPO der Störung der hepatozellulären Integrität sowie der damit verbundenen Hyperinflammation entgegenwirken?
2. Welche Rolle spielt die Apoptose im vorliegenden Modell und kann die Applikation von DPO diese beeinflussen?
3. Führt DPO zur Reduktion der profibrotischen Kaskade und daraus resultierend geringer ausgeprägten Fibrose?
4. Kann DPO die Expression der TGF- β assoziierten Gentranskripte bzw. Proteine modulieren und somit die Aktivität dieses in der Fibrogenese entscheidenden Wachstumsfaktors inhibieren?
5. Wie wirkt sich die Applikation von DPO auf die Erythropoese aus?
6. Kann die Gabe von DPO das Überleben der Tiere nach der Gallengangsligatur verlängern?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche, 8 bis 10 Wochen alte C57BL/6J Mäuse mit einem Körpergewicht von 22 – 26 g verwendet. Die Tiere (Charles River Labors, Sulzfeld, Deutschland) wurden für einige Tage vor Beginn des Experiments sowie für die Zeit nach dem Primäreingriff in einem klimatisierten Raum (Temperatur 22 - 24 °C; Feuchtigkeit ca. 60 %) der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum gehalten.

Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend den nationalen Tierschutzgesetzen sowie den international geltenden Bestimmungen (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Institutes of Health publication 86-23, Revised 1985*), und der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt.

3.2 Modell

3.2.1 Anästhesie und chirurgisches Vorgehen

Zur Einleitung der Anästhesie wurden die Tiere in einer Narkosekammer aus Plexiglas ca. 30 Sekunden lang einem Gasgemisch aus Sauerstoff und Isofluran (5 % vol.) ausgesetzt, bis eine Bewusstlosigkeit eintrat. Daraufhin wurden die Tiere zur Operation auf einer Präparationsheizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) gelagert, um eine Auskühlung zu verhindern. Zur Fortführung der Narkose unter einer speziell gefertigten Kunststoffmaske mit Absaugvorrichtung wurde die Isofluranmenge auf 1,5 % vol. reduziert und Lachgas (1,5 l/min.) zum Gasgemisch hinzugefügt. Vor dem Eingriff wurde auf die Augen eine Dexpanthenolsalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach Deutschland) aufgetragen, um eine Austrocknung zu vermeiden.

Der Bauch wurde rasiert (Aesculap Favorita II, Aesculap AG & Co. KG, Tuttingen Deutschland) und mittels Povidonjod desinfiziert. Zur Laparotomie wurde ein ca. 1 cm langer medianer Längsschnitt mittels einer Mikropräparationsschere durchgeführt. Durch Lagerung der Brustwirbelsäule auf einem Kunststoffröhrchen wurden die Tiere in eine hyperlordosierte Haltung gebracht, wodurch der Zugang zum Ligamentum hepatoduodenale erleichtert wurde. Unter einem Stereomikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG Heerbrugg, Schweiz) wurde der Ductus choledochus im Ligamentum hepatoduodenale dargestellt. Der Gallengang wurde vorsichtig präpariert, mittels einer dreifachen Ligatur verschlossen und zwischen den beiden distalen Ligaturen durchgetrennt. Die zwei Ligaturen proximal der Transsektion wurden mit dem Ziel gesetzt, den Galleabfluss zu unterbinden. Die Ligatur distal der Transsektion verhindert ein Aufsteigen des Darminhaltes und damit verbundene Infektionen des Bauchraumes.

Danach wurde das Abdomen mit erwärmter physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Bauchdecke sowie die Haut jeweils einzeln mittels fortlaufender Nahttechnik mit Prolene 5.0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und die Wunde nochmals mit Povidoniod desinfiziert. Es erfolgte die Versorgung der Wunde mit einem Pflasterspray. Ein subkutanes Depot auf dem Rücken wurde durch Injektion von 0,9 % NaCl geschaffen, um intraoperative Flüssigkeitsverluste auszugleichen. Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt und zur Erholung für 1 - 2 h einer Rotlichtlampe ausgesetzt, um einen postoperativen Wärmeverlust zu verhindern.

3.2.2 *Experimentelle Gruppen*

Die Behandlung der Tiere erfolgte jeden dritten Tag, beginnend 24 h nach der Gallengangsligatur. Der Zustand der Tiere wurde täglich, das Gewicht jeden dritten Tag kontrolliert. Zur Untersuchung des Lebergewebes sowie des Vollblutes bzw. des Plasma wurden die Tiere am 2., 5. und 14. postoperativen Tag geopfert.

Nach der Operation erfolgte verblindet die Randomisierung der Tiere in die jeweilige Gruppe, wobei jeweils 10 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt untersucht wurden. Desweiteren wurde eine zusätzliche Sham-Gruppe (n = 6) gebildet. Somit ergaben sich folgende Gruppen:

- DPO-Gruppe: Nach der BDL wurde den Mäusen intraperitoneal 10 µg/kg KG DPO (Aranesp®, Amgen, München, Deutschland) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (1 µg DPO in 10 ml NaCl/kg KG) jeden dritten Tag, angefangen 24 h nach der Gallengangsligatur appliziert. Die Gruppe beinhaltete 30 Tiere, wobei jeweils 10 Tiere pro Untersuchungszeitpunkt geopfert wurden.
- Kontrollgruppe: Die Tiere wurden einer identischen Behandlung unterzogen wie die DPO-Gruppe, anstelle von DPO wurde jedoch das identische Volumen physiologischer Kochsalzlösung (10 ml/kg KG) intraperitoneal appliziert. Auch diese Gruppe beinhaltete 10 Tiere pro Untersuchungszeitpunkt.
- Sham-Gruppe: Um die Veränderungen nach der Operation zu untersuchen, die neben der Gallengangsligatur auftraten, wurden 6 Tiere einer Scheinoperation (*Sham*) unterzogen. Nach der Narkose und der Laparotomie wurde der D. Choledochus dargestellt. Dieser wurde jedoch nicht ligiert und es erfolgte keine Transsektion. Nach der Manipulation wurde der Bauchschnitt verschlossen und es erfolgte in der Kontrollgruppe identischen Regime die Applikation physiologischer Kochsalzlösung.

3.2.3 **Blut- und Gewebeentnahme**

An dem nach dem Protokoll vorgesehenen Zeitpunkt wurde die Blut- und Organentnahme der Tiere vorgenommen. Dabei wurden die Mäuse intraperitoneal mit einer Kombinationsnarkose aus 75 mg/kg KG Ketamin und 25 mg/kg KG Xylazin anästhesiert. Es erfolgte eine Elektrorasur des Bauchraums und eine Längslaparotomie. Zur Blutentnahme wurde die V. cava inferior mit einer 22 G-Kanüle punktiert. Durch Aspiration konnten 0,4 bis 0,8 ml Blut gewonnen werden, das sofort in ein Ca²⁺-EDTA-beschichtetes Röhrchen überführt und zur Erstellung des Blutbildes (Sysmex KX 21, Sysmex Norderstedt) verwendet wurde. Anschließend wurde das entnommene Blut für 10 min. bei 4000 U/min zentrifugiert und das Plasma im Überstand bis zur Durchführung laborchemischer Analysen bei -20°C aufbewahrt.

Die Leber wurde von ihren Bändern zum Zwerchfell, Magen sowie Retroperitoneum getrennt und aus dem Situs entnommen. Das Feuchtgewicht der Leber wurde ermittelt und das Organ mittels 2 Skalpelln in mehrere kleine Stücke geteilt. Der linke Leberlappen wurde zur Vorbereitung für histologische Untersuchungen in 4 %-igem phosphatgepuffertem Formalin für 2 - 3 Tage fixiert, um danach in Paraffin eingebettet zu werden. Mehrere Stücke Leberwebe wurden im Flüssigstickstoff gefroren und bei -80°C für molekularbiologische Untersuchungen aufbewahrt. Ein weiteres Stück wurde nach Einbetten im Gewebekleber (TissueTek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) in Flüssigstickstoff eingefroren, in Aluminiumfolie eingewickelt und anschließend bei -80°C für entsprechende immunhistochemische Untersuchungen aufbewahrt. Die Tiere wurden nach Abschluss der Versuche durch eine intrakardiale Injektion einer Ketamin-Überdosis getötet.

3.3 Untersuchungstechniken

3.3.1 *Vollblutuntersuchung*

Unmittelbar nach der Beendigung des jeweiligen Tierexperiments wurde das Blutbild mittels des vollautomatischen Blutzellzähler (Symex KX 21, Sysmex, Norderstedt) ermittelt. Das Gerät ermöglicht eine Differenzierung der Blutzellen aus nur 20-50 µl Vollblut, was für Mausblutuntersuchungen aufgrund geringer Materialmengen von großem Vorteil ist. Bezüglich der Parameter der roten Zellreihe, die für die vorliegende Studie von Relevanz waren, wurden die Erythrozytenzahl, der Hämatokrit und die Hämoglobinkonzentration ermittelt. Nach der Bestimmung des Blutbildes erfolgte die Zentrifugation zur Plasmagewinnung.

3.3.2 *Plasmaanalysen*

Es erfolgte die spektrophotometrische Messung der Enzymaktivitäten von Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Plasma mittels eines

automatisierten Verfahrens mit dem Hitachi 704 Automatic Analyser (Boehringer, Mannheim, Deutschland).

Bei ALT und GLDH handelt es sich um leberspezifische Enzyme, deren Aktivität bei einer Schädigung der hepatozellulären Integrität im Plasma erhöht nachweisbar ist. Der Nachweis der GLDH spricht für eine stärkere Leberschädigung als die Erhöhung der ALT-Aktivität allein, da GLDH zu 100 % in Leberzellmitochondrien lokalisiert ist, während ALT im Zytoplasma vorkommt.

Weiterhin wurde die Konzentration des Bilirubins spektromorphometrisch ermittelt. Gesamtbilirubin reagiert mit diazotierter Sulfanilsäure bei Zugabe eines Akzelerators unter Bildung eines rot gefärbten Azo-Farbstoffs. Die Extinktion dieses Farbstoffs bei 546 nm ist direkt proportional zur Bilirubinkonzentration. Dieses Prinzip wurde bei der automatischen Konzentrationsbestimmung mittels des Hitachi 704 Analysers umgesetzt.

3.3.3 *Histologie*

Das Lebergewebe wurde zur histologischen Untersuchung nach Entnahme für 2-3 Tage in 4 %-iger phosphatgepufferter Formalinlösung fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffinblöcke eingebettet.

3.3.3.1 *Hämatoxylin & Eosin*

Nach Anfertigung von 5 µm dicken Schnitten wurden diese auf Objektträgern fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) angefärbt. Die Schnitte wurden anschließend an einem Lichtmikroskop untersucht, um einen Überblick über das Ausmaß der Leberschädigung zu erhalten. Die H&E-Schnitte wurden weiterhin für die histomorphometrischen Evaluation von Galleninfarkten (Abschnitt 3.3.3.3) verwendet. Bei den Galleninfarkten handelt es sich um cholestasetypische pathognomonische fokale Nekrosen in der Leber (siehe Abbildung 6 B, D).

3.3.3.2 Sirius-Red

Zur quantitativen Bestimmung der Fibrose ist die Sirius-Red-Färbung eine gut etablierte Methode (James, 1986). Das Kollagen wird dabei selektiv mit dem roten Farbstoff angefärbt.

Nachdem die Leberschnitte entparaffiniert wurden, erfolgte eine säurefeste Kernfärbung mit Hämalan. Daraufhin wurden die Schnitte für eine Stunde mit der Pikro-Sirius-Red-Lösung inkubiert. Es handelt sich um eine Lösung aus 0,1 %-igem Direct-Red (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) gelöst in gesättigter Pikrinsäurelösung. Als Ergebnis sind die Zellkerne blau und Kollagen rot angefärbt (Abbildung 7). Die angefärbten Schnitte wurden zur histomorphometrischen Analyse der Fibrose verwendet.

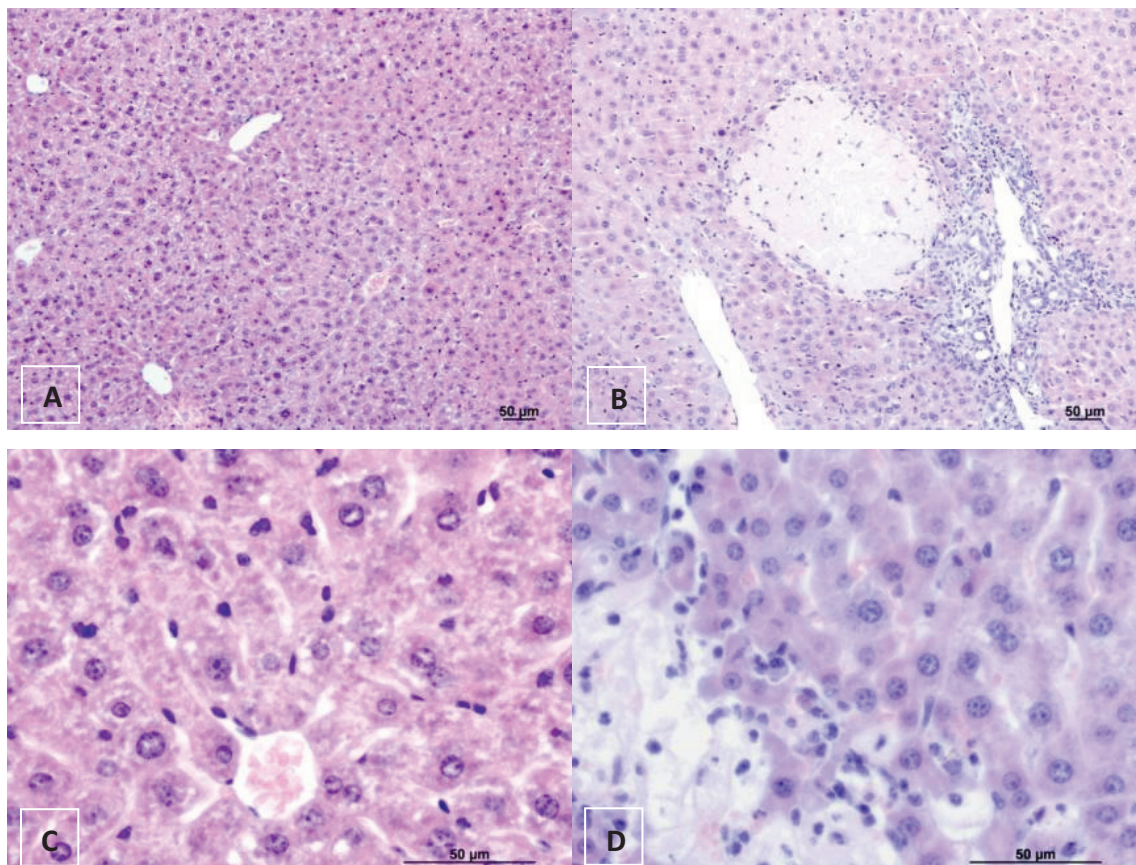


Abbildung 6: Histologische Bilder des Lebergewebes nach Anfärbung mit H&E unter Verwendung eines Objektivs mit 100-facher (A, B) und 400-facher (C, D) Vergrößerung. Abbildung A und C zeigen einen Normalbefund mit intakter Leberarchitektur. In den Abbildungen B und D sind die für die Cholestase typischen Galleninfarkte dargestellt (siehe Text).

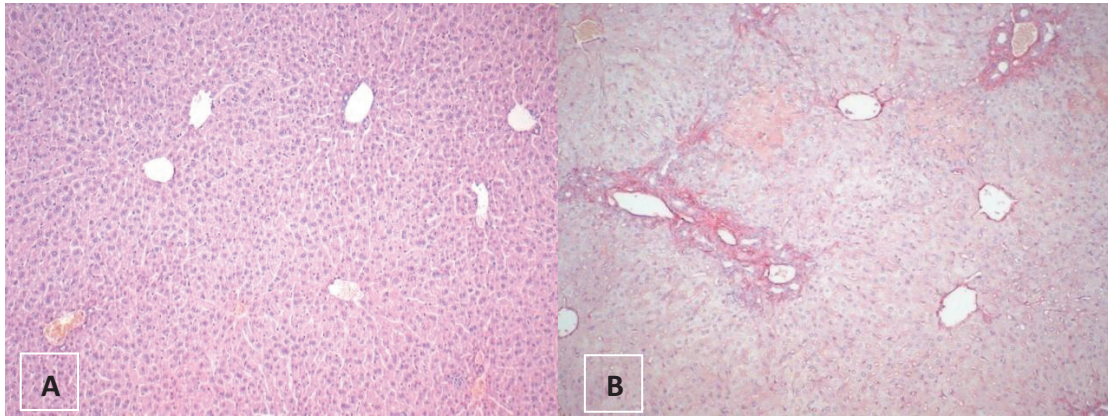


Abbildung 7: Histologische Bilder des Lebergewebes nach Anfärbung mit Sirius-Red (100-fache Vergrößerung). Abb. A zeigt einen Normalbefund einer gesunden Leber. In Abb. B ist eine Leber im Stadium der Fibrose dargestellt. Es ist eine deutliche Zunahme des rot angefärbten Kollagens zu beobachten.

3.3.3.3 Histomorphometrische Auswertung

Zur quantitativen Auswertung der Galleninfarkte in den H&E-gefärbten sowie des Fibroseausmaßes in den Sirius-Red-gefärbten Schnitten wurde eine histomorphometrische Analyse durchgeführt. Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) untersucht. 20 Bilder pro Schnitt wurden unter 100-facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera (Color View II FW camera, Color View, München, Deutschland) fotografiert. Die quantitativen Analysen wurden mittels eines Bildanalyseprogramms (Adobe Photoshop, Adobe Systems Uxbridge, GB) durchgeführt. Die nekrotischen bzw. fibrotischen Areale wurden digital vergrößert und manuell markiert. Es wurde der Anteil positiver Bereiche an der Gesamtfläche ermittelt und in Prozent der Gesamtfläche angegeben. Anschnitte großer Gefäße wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Abbildung 8 zeigt exemplarisch das Vorgehen bei der Fibroseauswertung.

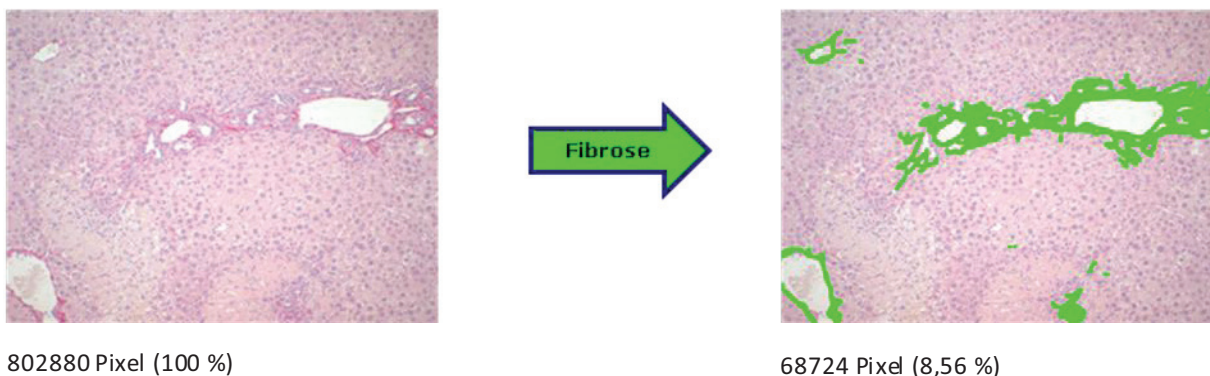


Abbildung 8: Histomorphometrische Auswertung der Fibrose in einem Sirius-Red gefärbten Leberschnitt einer Maus 14 Tage nach der Ligatur des Ductus choledochus. Die rot gefärbten Areale wurden mit dem Pinselwerkzeug der Software grün markiert und die Pixelanzahl grün angefärbter Fläche ermittelt. In diesem Beispiel wurden von insgesamt 802 880 Pixeln 68 724 markiert, was 8,56 % der Gesamtfläche entspricht.

3.3.3.4 TUNEL-Analyse

Die TUNEL (*Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*)-Analyse ist eine Nachweismethode für geschädigte Zellen. Es werden die freien 3'-OH-Gruppen nach Fragmentierung der DNA insbesondere in apoptotischen Zellen angefärbt. Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken wurden 5 µm dicke Schnitte auf poly-L-Lysin-beschichteten Glaträger übertragen und dem Färbungs-Kit (Indirect in situ Nick End Labeling (TUNEL) assay; ApopTag, CHEMICON International, Inc., Temecula, CA, USA) nach Angaben des Herstellers ausgesetzt.

Die Glaträger wurden für 15 Minuten bei 37°C mit einer Proteinase vorbehandelt, um die Enzympermeabilität der Proben für eine gleichmäßige Aufnahme von Nukleotiden zu erhöhen. Nach einem Waschschrift erfolgte zur Inaktivierung endogener Peroxidasen die Zugabe von 2 % Wasserstoffperoxid, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer). Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten und einem weiteren Waschungsschritt wurden die Proben für 15 min. in Terminal deoxynucleodityl Transferase (TdT)-Markierungspuffer eingetaucht und danach für 60 min. bei 37°C mit TdT und digoxygenin desoxy-Uridinyltriphosphat inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch den Transfer der Proben in einen „Stopp“-Puffer für 30 min. bei 37°C wurden die Proben gewaschen. Als Chromogen diente 3,3'-Diaminobenzidin, welches zur bräunlichen Anfärbung TUNEL-positiver Zellen führte. Nach Entwicklung der Proben zeigten Zellen, die eine DNA-Fragmentierung aufwiesen, eine dunkelbraune Färbung (Abbildung 9).

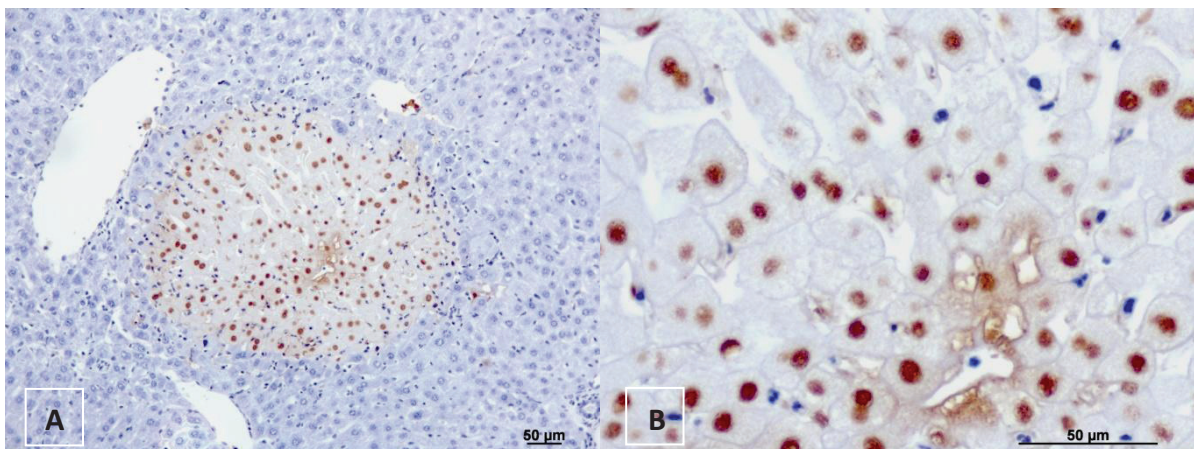


Abbildung 9: Histologische Bilder TUNEL-positiver Zellen (braun) einer durch Cholestase geschädigten Leber (100-fache (A) und 400-fache (B) Vergrößerung)

3.3.4 **Immunhistochemie**

3.3.4.1 *f4/80*

Das f4/80-Antigen wird selektiv von ortsständigen Makrophagen, in der Leber von den Kupffer-Zellen, exprimiert. Austin und Gordon haben erstmals im Jahre 1981 einen monoklonalen Antikörper gegen f4/80 entwickelt (Austyn & Gordon, 1981). Heute gilt der Nachweis des Antigens als etablierte Methode zur Identifizierung von sessilen Makrophagen.

Die Gewebefixierung erfolgte identisch dem beschriebenen Vorgehen für histologische Untersuchungen. 5 µm dicke Gewebeschnitte auf poly-L Lysin-beschichteten Glaträgern wurden mit einem polyklonalen f4/80 Primärantikörper (1:10; polyklonale Ratten-anti-f4/80; Serotec, Oxford, Großbritannien) über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Konjugation mit dem Maus-Anti-Ratten-Immunglobulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in einer Verdünnung von 1:200. Es erfolgte daraufhin die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Fuchsin (Dako Cytomation, Hamburg) diente als Chromogen, so dass f4/80 positive Zellen rot erschienen. Für die Gegenfärbung wurde Hämalaun eingesetzt.

3.3.4.2 *HIF-1α*

Zur Detektion von HIF-1α wurden die 5 µm dicken Leberschnitte auf poly-L Lysin-beschichteten Objektträgern über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen 1:100 verdünnten anti-HIF-1α-Antikörper vom Kaninchen (Santa Cruz) inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte auf Raumtemperatur gebracht und einem mit Meerrettichperoxidase konjugierten (*engl. HRP für horseradish peroxidase*) Sekundärantikörper ausgesetzt (Dako Cytomation). Das 3-Amino-9-Ethylcarbazol Substrat (Dako Cytomation) diente als Chromogen, wodurch HIF-1α-positive Zellen rot angefärbt erschienen.

3.3.4.3 *Cleaved-Caspase-3*

Zur Detektion apoptotischer Zellen ist der Nachweis aktiver Caspasen ein etabliertes Verfahren. Bei den Caspasen handelt es sich um Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum.

Sie spalten C-terminal von Aspartat Peptidbindungen (*engl. cysteinyl-aspartate specific protease*). Zum Auslösen der Apoptose werden Initiator-Caspasen (z. B. Caspase-8 und -9) aktiviert. Diese wiederum spalten die Vorläuferform nachgeschalteter Effektor-Caspasen, zu denen die Caspase-3 gehört. Die Effektor-Caspasen aktivieren Endonukleasen, die entscheidenden Enzyme der Apoptose.

Für die immunhistochemische Analyse der *Cleaved-Caspase-3* wurden die 5 µm dicken im Paraffin eingebetteten Schnitte auf Poly-L Lysin-beschichteten Objektträgern über Nacht bei 4°C mit dem vom Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper gegen *Cleaved-Caspase-3* (1:500; Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.) inkubiert. Der Antikörper detektiert die aktivierte Form der *Cleaved-Caspase-3*. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Als Chromogen diente 3,3'-Diaminobenzidin (Dako Cytomation), so dass eine positive Reaktion durch Braunfärbung des Zellkerns zu detektieren war.

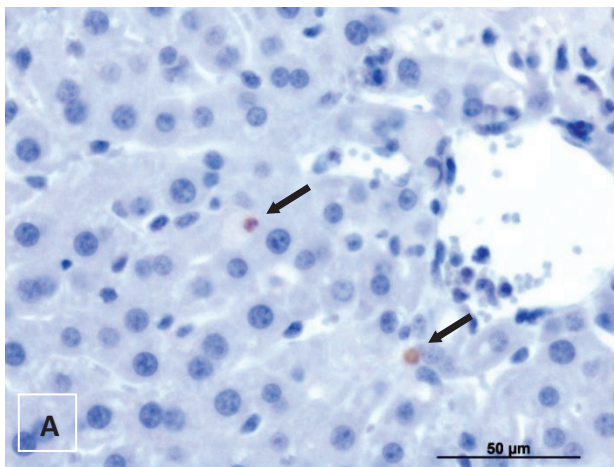


Abbildung 10: Immunhistochemisches Bild *Cleaved-Caspase-3*-positiver Zellen (Pfeile) einer murinen Leber (400-fache Vergrößerung).

3.3.5 RT-PCR

Die Gesamt-RNA wurde aus 30 mg Lebergewebe mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Germany) laut der Herstelleranleitung isoliert. Die Reinheit der gewonnenen RNA wurde evaluiert ($A_{260/280}$ Ratio) und die RNA bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt.

Von jeweils 2 µg RNA wurde die doppelsträngige cDNA durch eine reverse Transkription mit Hilfe von Oligo(dT)18-Primer (Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), Superscript II

RNaseH-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), dNTP's, 5 x first strand Puffer und Dithiothreitol synthetisiert. Die reverse Transkription verlief mit folgendem Programm: 72°C für 10 min und 42°C für 60 min.

Die Expressionsanalyse der mRNA von α -SMA-, collagen-1 α -, TGF- β 1-, Smad 2, 3, 4 und 7 wurde mit dem LightCycler System 1.5 (Roche, Mannheim, Germany) mit Hilfe der Kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierungsmethode durchgeführt. Alle Proben wurden zusätzlich durch die Bestimmung eines Housekeeping-Gens, GAPDH, normalisiert. Als Farbstoff für die Analyse wurde SYBR Green I (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Sequenzen von den genspezifischen Primer-Paaren sind in der Tabelle 1 detailliert aufgelistet. Die Primer wurden Intron-überspannend designt, um das Amplifizieren der genomischen DNA zu vermeiden. Die Annealingtemperatur von beiden Primer-Paaren (Target- und Housekeeping Gen) wurde bei 55°C designt, um beide Reaktionen im selben Lauf zu kombinieren. Das Real-time-PCR-Programm beinhaltete einen zehnmütigen Denaturierungsschritt, worauf 40-50 Amplifikationszyklen folgten. Die Fluoreszenzintensität des Doppelstrang-spezifischen SYBR Green I, welches die Menge des synthetisierten PCR-Produkts reflektiert, wurde am Ende von jedem Elongationsschritt detektiert. Nach jedem PCR-Lauf wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um die Produkte der PCR zu analysieren.

Um die Unterschiede in der PCR-Effizienz zwischen dem Target- und Housekeeping Gen zu berücksichtigen, wurde jeweils eine Standardkurve und eine Koeffizientendatei erstellt. Dafür wurde RNA von fünf gesunden unbehandelten Tieren gepoolt. In jedem PCR Lauf wurde eine Probe ohne cDNA als Negativkontrolle untersucht.

Tabelle 3: Primer für die real-time PCR

| Gen | Primer | Sequenz | Größe |
|----------------------|-----------|----------------------------------|--------|
| α -SMA | vorwärts | 5' - ACTACTGCCGAGCGTGAGAT - 3' | 452 bp |
| | rückwärts | 5' - AAGGTAGACAGCGAAGCCAG - 3' | |
| Collagen-1- α | vorwärts | 5' - GAAACCCGAGGTATGCTTGA - 3' | 276 bp |
| | rückwärts | 5' - GACCAGGAGGACCAGGAAGT - 3' | |
| TGF- β 1 | vorwärts | 5' - CCAGATCCTCTCCAAACTAA - 3' | 344 bp |
| | rückwärts | 5' - GCTCCACAGTTGACTTGAAT - 3' | |
| Smad 2 | vorwärts | 5' - CTGGCTCAGTCTGTCAACCA - 3' | 108 bp |
| | rückwärts | 5' - CTGCCTCCGATATTCTGCTC - 3' | |
| Smad 3 | vorwärts | 5' - TGTGCGGCTCTACTACATCG - 3' | 171 bp |
| | rückwärts | 5' - GCAGCAAATTCCTGGTTGTT - 3' | |
| Smad 4 | vorwärts | 5' - GTGACTGTGGATGGCTATGTGG - 3' | 89 bp |
| | rückwärts | 5' - GCAACCTCGCTCTCTCAATCG - 3' | |
| Smad 7 | vorwärts | 5' - GCATTCCTCGGAAGTCAAGA - 3' | 260 bp |
| | rückwärts | 5' - CAGGCTCCAGAAGAAGTTGG - 3' | |
| GAPDH | vorwärts | 5' - AACGACCCCTTCATTGAC - 3' | 191 bp |
| | rückwärts | 5' - TCCACGACATACTCAGCAC - 3' | |

3.3.6 **Western Blot**

Für die Western-Blot Proteinanalyse von Phospho-Smad 2 und Phospho-Smad 3 wurde das Lebergewebe im Lysepuffer homogenisiert (10 mmol/l Tris, pH = 7,5, 10 mmol/l NaCl, 0,1 mmol/l Ethylendiaminotetraacetylsäure, 0,5 % Triton X-100, 0,02 NaN₃, und 0,2 mmol/l Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid). Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 15 min. bei 10 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamtproteinfraktion aufbewahrt.

Vor der Verwendung wurde ein Proteininhibitorkocktail hinzugefügt (1:100 v/v; Sigma-Aldrich). Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bicinchonininsäure-Proteinassays (Sigma-Aldrich) bestimmt, wobei bovines Serumalbumin als Standard diente. Die Proteine (40 µg Protein/Spalte) wurden diskontinuierlich auf dem SDS Polyacrylamidgel separiert (12 %) und auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran transferiert (Immobilon-P; Millipore, Eschborn, Deutschland). Nach der Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem polyklonalen Kaninchen anti-phospho-Smad 2 (1:1000; Cell Signaling Technology) bzw. mit einem monoklonalen Kaninchen-anti-phospho-Smad 3 (1:1000; Cell Signaling Technology) inkubiert. Es folgte daraufhin der peroxidasegebundene Sekundärantikörper (1:2000, Cell Signaling Technology).

Die Proteinexpression wurde mittels der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz visualisiert (ECL plus, Amersham Pharmacia Biotech) und mit Hilfe des ChemiDoc™ XRS Systems (Quantity One, Bio-Rad Laboratories GmbH, München Deutschland) digitalisiert. Es erfolgte die densitometrische Auswertung (TotalLab, Nonlinear Dynamics, New Castle upon Tyne, Großbritannien), die Normalisierung auf das β-Aktin Signal als Ladungskontrolle (monoklonaler Maus-anti-β-Aktin Antikörper, 1:20,000; Sigma-Aldrich) sowie die Angaben als relative Dichte.

3.3.7 **Überlebensstudie**

Zur Prüfung der Hypothese, dass die DPO-Applikation die Überlebensrate nach der Ligatur des Ductus choledochus erhöhen kann, wurden zusätzlich 20 Tiere für den Überlebensversuch der Ligatur unterzogen. Diese wurden in zwei Gruppen mit je 10 Tieren randomisiert und entweder mit DPO (10 µg/kg KG) oder 0,9 % NaCl verblindet behandelt.

Die erste Applikation erfolgte 24 h nach der Gallengangsligatur und wurde jeden dritten Tag wiederholt. Täglich erfolgte eine Visite, bei der der Zustand der Tiere kontrolliert und notiert wurde. 7 Wochen nach der Operation wurde der Überlebensversuch beendet und die verbliebenen Tiere wurden durch eine intrakardiale Injektion einer Überdosis Ketamin getötet.

3.4 Statistik

Die bei der Datenerfassung erhobenen Primärdaten wurden zur weiteren Verarbeitung direkt in Microsoft-Excel-Tabellen eingegeben.

Mittels dem Softwarepaket SigmaPlot (Jandel Corporations, San Rafael, CA, USA) wurden anhand der Daten Säulendiagramme erstellt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

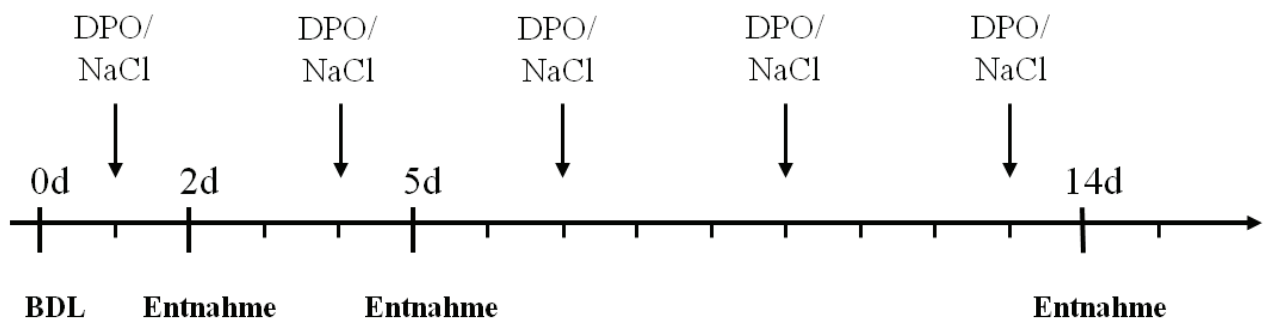
Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software SigmaStat (Jandel Corporations) durchgeführt. Es erfolgte zunächst jeweils die Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests.

Zum Vergleich zwischen der Kontroll- und der DPO-Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt wurde der Student's *t*-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Falls die Voraussetzungen für diesen Test nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test für unverbundene Stichproben (Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Zum multiplen Vergleich wurden die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom entsprechenden *post-hoc* Test, durchgeführt. Zur statistischen Auswertung des Überlebensversuches erfolgte die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse gefolgt vom log-rank-Test.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden Unterschiede in den Ergebnissen als statistisch signifikant angenommen.

3.5 Zusammenfassung des experimentellen Protokolls

Wie unter 3.2.2 beschrieben, beinhaltete das Experiment zwei experimentelle Gruppen, die einer Ligatur des D. choledochus (bile duct ligation; BDL) unterzogen wurden. Die Blut- und Gewebegewinnung dieser Tiere erfolgte an den Tagen 2, 5 und 14 nach der Gallengansligatur. Die Applikation der entsprechenden Substanzen erfolgte jeden dritten Tag, angefangen 24 h nach der Operation.



Zusätzlich wurde eine Gruppe gebildet, bei der die Tiere einer Schein-OP (Sham) unterzogen wurden, so dass sich insgesamt 3 Gruppen ergaben:

1. **DPO** Ligatur des Ductus choledochus, (bile duct ligation; BDL) 10 µg/kg KG, jeden dritten Tag; 10 Tiere je am Tag 2, 5 und 14
2. **Kontrolle** BDL; 0,9 % NaCl, jeden dritten Tag; 10 Tiere je am Tag 2, 5 und 14
3. **Sham** Schein-OP; 0,9 % NaCl, jeden dritten Tag; 6 Tiere, am Tag 14

Die Tiere wurden dem Protokoll entsprechend der Blut- und Organentnahme unterzogen, bevor sie durch eine intrakardiale Überdosis Ketamin getötet wurden. Es wurden Vollblut-, Plasma- sowie histologische, immunhistochemische, RNA- und proteinanalytische Untersuchungen des Lebergewebes durchgeführt.

Desweiteren wurde 20 Tiere für die 7-wöchigen Überlebensstudie der Gallengansligatur unterzogen und mit 10 µg/kg KG DPO bzw. 0,9 % NaCl entsprechend dem

obigen Protokoll therapiert. Der Zustand der Tiere wurde täglich kontrolliert und die Anzahl verstorbener Tiere dokumentiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Physisches Befinden der Tiere

Es wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, um die Kinetik der Gallengangsligatur-induzierten Veränderungen zu evaluieren und optimale Untersuchungszeitpunkte zu ermitteln. Unmittelbar nach der Operation wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Es entsprach jeweils ungefähr dem präoperativen Ausgangsgewicht der Tiere. Nach dem Aufwachen aus der Narkose zeigten die Mäuse keine pathologischen Auffälligkeiten bei einer guten körperlichen Aktivität.

Im Rahmen einer täglichen Visite wurde der Zustand der Tiere überwacht. Die Tiere wiesen eine stetige Gewichtsabnahme auf. Am Tag 4 nach der BDL betrug das Gewicht der Tiere $87,7 \% \pm 1,9 \%$ des Ausgangsgewichts und am Tag 14 $74,7 \% \pm 1,2 \%$. Parallel dazu wurde eine Reduktion der körperlichen Aktivität der Tiere festgestellt. Als Zeichen der Cholestase lagen einige Tage nach der Operation eine gelbliche Verfärbung der Haut, eine Dunkelfärbung des Urins sowie eine hellere Stuhlfarbe im Vergleich zu gesunden Tieren vor. In der 3. und 4. Woche nach der BDL zeigte sich eine massive Zustandsverschlechterung, die mit einer hohen Letalitätsrate (siehe Abschnitt 5.9) assoziiert war.

4.2 Rotes Blutbild

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, sind Veränderungen der roten Blutzellreihe im Sinne einer Anämie typisch für viele Lebererkrankungen. Daher war es von Interesse, ob die Gallengangsligatur eine Reduktion der Parameter des roten Blutbildes mit sich bringt.

Die Ligatur des Ductus choledochus (BDL) führte zu Veränderungen im Blutbild der Tiere (Abbildung 11). 14 Tage nach der Operation lag ein signifikanter Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämatokrits sowie der Hämoglobin-Konzentration verglichen mit Sham-operierten Tieren vor. Die Applikation von DPO konnte diesem Zustand effektiv entgegenwirken. Es ist gelungen, die Erythrozytenzahl sowie den Hämatokrit optimal einzustellen, d.h. den BDL-induzierten Abfall zu verhindern, ohne signifikant vom Niveau der Sham-operierten Tiere nach unten oder oben abzuweichen (Abbildung 11 A, B). Auch dem Hämoglobin-Abfall

Ergebnisse

konnte mit DPO entgegengewirkt werden. Dieser war zwar im Vergleich zum Sham-Niveau erniedrigt, jedoch signifikant höher als in der entsprechenden Kontrollgruppe (Abbildung 11 C).

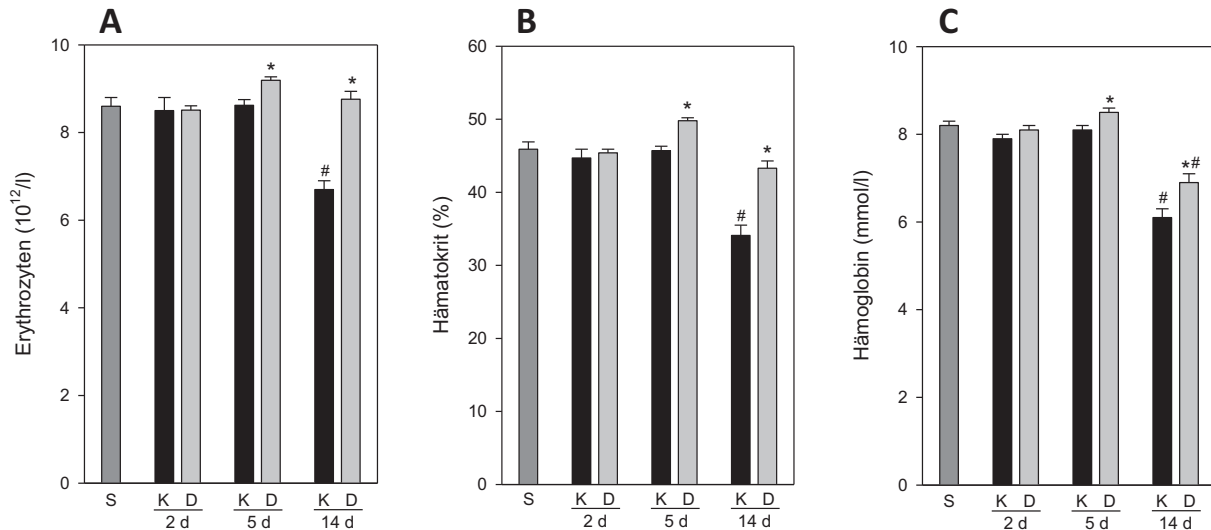


Abbildung 11: Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) sowie die Hämoglobinkonzentration (C) der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; # $p < 0,05$ vs. Sham (S); * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K) zum jeweiligen Zeitpunkt.

4.3 HIF-1 α

Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu Regulationsmechanismen, die die Sauerstoffversorgung der Zelle verbessern sollen. Im Zentrum stehen hierbei die Hypoxie-induzierten Faktoren (Hypoxia inducible factors, HIF). Dabei handelt es sich z. B. um Wachstumsfaktoren wie VEGF sowie Epo selbst (Higgins et al., 2004). Andererseits konnte gezeigt werden, dass auch profibrotische Mediatoren durch die HIFs überexprimiert werden (Higgins et al., 2004; Moon et al., 2009). Somit dient HIF-1 α einerseits als möglicher Marker der Gewebehypoxie und andererseits als wichtiger profibrotischer Faktor.

In der Abbildung 12 sind repräsentative immunhistochemische Bilder von HIF 1 α in den Leberschnitten dargestellt. Es wird deutlich, dass 14 Tage nach BDL die HIF-1 α Expression massiv erhöht ist. Vor allem in den als Galleninfarkte bezeichneten fokalen Nekrosen sowie

im Bereich der fibrotischen Straßen ist eine Überexpression zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist das Ausmaß der Expression in den mit DPO behandelten Tieren deutlich geringer.

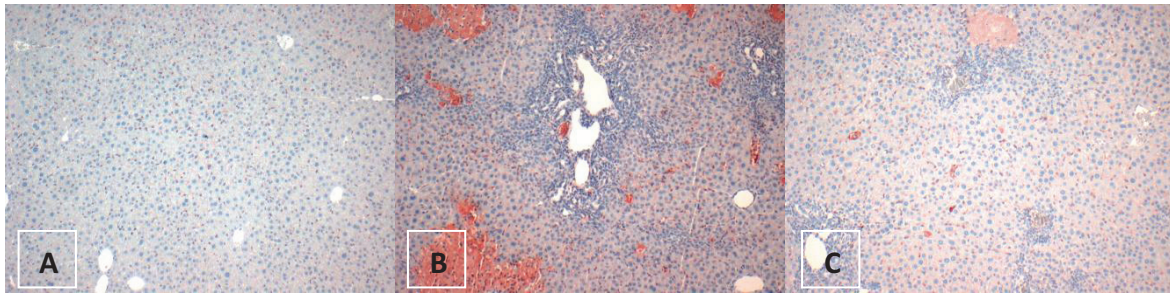


Abbildung 12: Repräsentative Abbildungen der HIF-1 α -Immunhistochemie (fotografiert mit einem 10-er Objektiv) der Mäuselebern 14 Tage nach Sham-Operation (A) sowie 14 Tage nach der Gallengangsligatur und Therapie mit NaCl (B) oder mit DPO (C).

4.4 Nekrose

4.4.1 Systemische Parameter der hepatozellulären Integrität und Cholestase

4.4.1.1 ALT und GLDH

Eine Störung der hepatozellulären Integrität führt zur Freisetzung intrazellulärer Substanzen in den systemischen Kreislauf. Dieser pathophysiologische Vorgang dient als Grundlage dafür, Enzymaktivitäten im Blutplasma mit organspezifischen Schädigungen zu assoziieren.

Für die Leber sind die Transaminasen ALT und AST als klinische Marker etabliert. Vor allem ALT gilt als Leberspezifisch. GLDH ist ein weiteres Enzym, das vor allem bei starker Schädigung der Leber eine erhöhte Aktivität aufweist, was daran liegt, dass dieses mitochondrial lokalisiert ist.

In der Abbildung 13 sind die Aktivitäten von ALT und GLDH im Plasma der Tiere aus den jeweiligen experimentellen Gruppen dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Ligatur des Gallengangs zu einer deutlichen Störung der hepatozellulären Integrität geführt hat. Die Aktivität von ALT war am Tag 2 nach der BDL 25-fach, die von GLDH sogar 70-fach erhöht. Am Tag 5 und 14 nach BDL waren die Werte verglichen mit Sham-Tieren zwar auch erhöht, erreichten jedoch nicht mehr die hohen Aktivitäten von Tag 2. Dies spricht dafür, dass die BDL vor allem zu einer frühen, akuten Schädigung der hepatozellulären Integrität führt.

Ergebnisse

Die Applikation von DPO konnte die hepatozelluläre Integrität am Tag 2 nach der BDL verbessern. Der Anstieg der Aktivität von ALT und GLDH war deutlich, jedoch nicht signifikant geringer als in den Kontrolltieren.

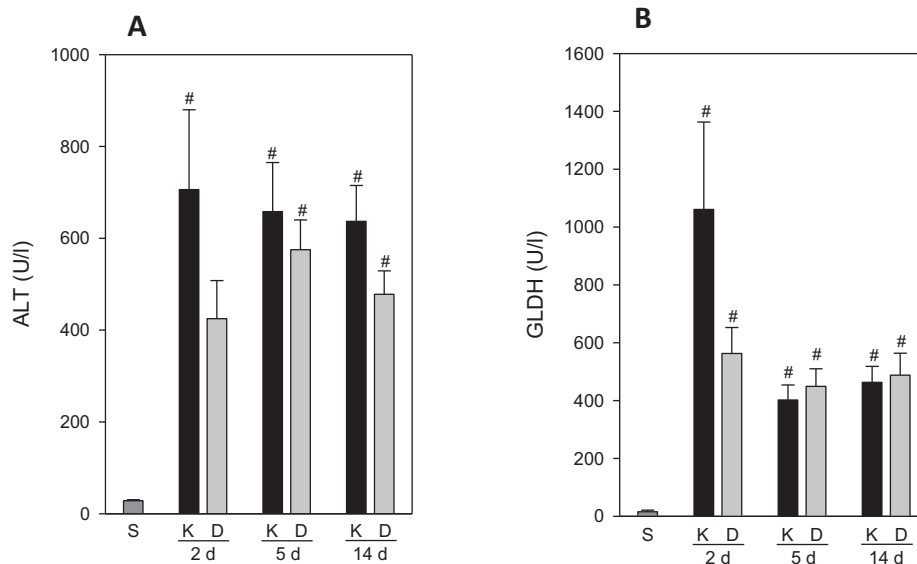


Abbildung 13: Plasmaaktivitäten von ALT (A) und GLDH (B) der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) sowie 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; # $p < 0,05$ vs. Sham.

4.4.1.2 Bilirubin

Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Häm. Das Hämmolekül kann nicht reutilisiert werden und wird in mehreren Schritten zu Bilirubin abgebaut, Richtung Leber transportiert, um dort konjugiert und ausgeschieden zu werden. Einerseits ist Bilirubin selbst toxisch, andererseits dient es auch als Marker der Cholestase.

Erwartungsgemäß stieg die Konzentration des Bilirubins im Plasma nach der Gallengangsligatur stetig an. Interessanterweise war am Tag 2 nach der Gallengangsligatur die Konzentration im Plasma in den DPO-therapierten Tieren signifikant erniedrigt (Abbildung 14). Die Gabe von DPO scheint die Cholestase zu verzögern. Zu späteren Zeitpunkten bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ergebnisse

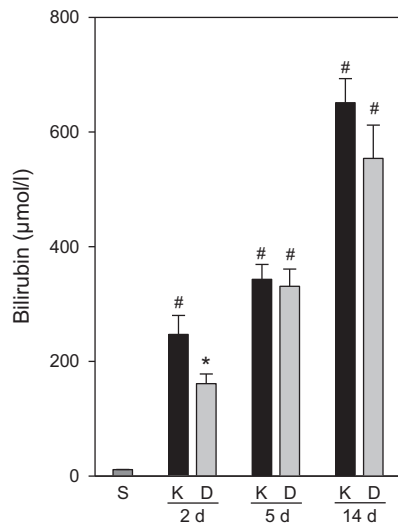


Abbildung 14: Plasmabilirubinkonzentration der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach BDL und Gabe von DPO (**D**; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (**K**; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (**S**; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; # $p < 0,05$ vs. Sham (S); * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K) zu jeweiligen Zeitpunkt.

4.4.2 Galleninfarkte

Bei den Galleninfarkten handelt es sich um fokale Nekrosen in der Leber, die pathognomonisch für die Cholestase sind. Die genaue Pathogenese ist nicht geklärt. Bei Entstehung der Galleninfarkte scheinen mehrere Faktoren relevant zu sein:

-Mechanische Faktoren: Die Ligatur des Gallengangs führt zum Druckanstieg im Gallengangssystem. Letztendlich kommt es dadurch zur Ruptur kleiner Gallengänge und zum Austritt der Galle. Dies führt zum Untergang der Hepatozyten und somit zur Ausbildung der Galleninfarkte. Gegen diese Hypothese spricht die Tatsache, dass die Infarkte schon früh nach der Cholestase entstehen und eine spätere Zunahme des Drucks nicht zur Zunahme des Infarktareals führt (Georgiev et al., 2008).

-Toxische Faktoren: Die Gallensalze sind bekanntermaßen toxisch für die Hepatozyten und führen zu hepatozellulären Nekrosen.

-Perfusionsstörungen: Es ist beschrieben, dass die Cholestase zu Perfusionsstörungen in der Leber führt. Somit kommt es zur Minderversorgung der Hepatozyten und folglich zu einem Infarkt.

Wie in der Abbildung 15 gezeigt, führt die Gallengangsligatur bereits nach 2 Tagen zur Entwicklung von Galleninfarkten. Die vulnerable Phase für die Entwicklung dieser scheint

Ergebnisse

frühzeitig zu sein, da es keine weitere Erhöhung des Infarktumfangs nach dem 2. postoperativen Tag zu verzeichnen gab.

Die therapeutische Applikation von DPO konnte den Flächenanteil der Galleninfarkte an allen untersuchten Zeitpunkten beinahe halbieren. Dieses Ergebnis histologischer Untersuchungen steht im Einklang mit den bereits vorgestellten Daten der laborchemischen Untersuchungen der Aktivitäten von ALT sowie GLDH und belegt das gewebeprotective, antinekrotische Potenzial von DPO.

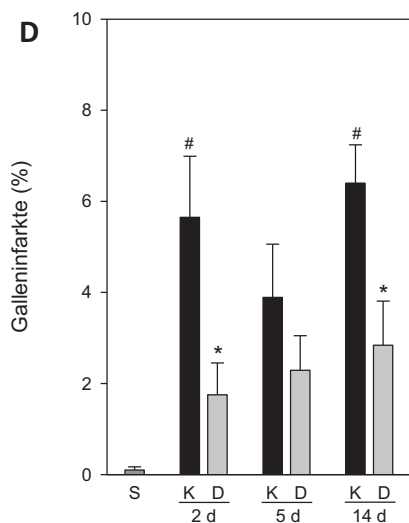
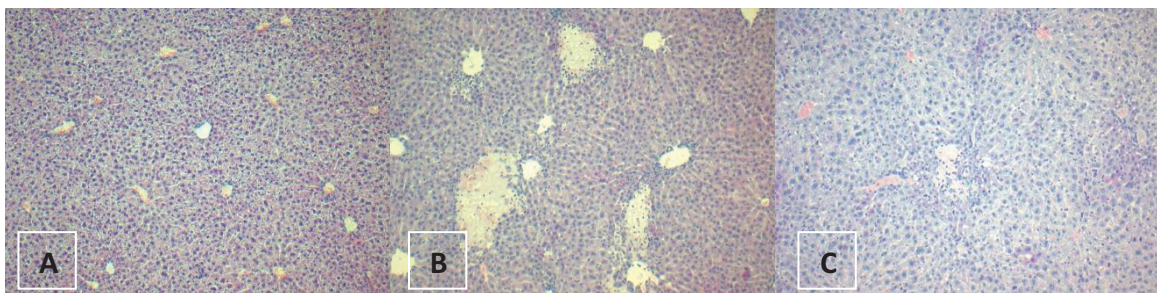


Abbildung 15: Repräsentative H&E-Schnitte der Mäuselebern einer Sham-operierten Maus (A) sowie einer Maus am Tag 2 nach der BDL und Applikation von NaCl (B) bzw. DPO (C) sowie die histomorphometrische Auswertung der Galleninfarkte (D) in Leberschnitten der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; [#] $p < 0,05$ vs. Sham (S); ^{*} $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K) zum jeweiligen Zeitpunkt.

4.5 Inflammation

Es ist bekannt, dass nicht nur Infektionen, sondern auch verschiedene toxische Reize zur Inflammation führen können. Um diese nach der Gallengangsligatur zu analysieren, wurde die f4/80-Immunohistochemie durchgeführt. Diese ist gut geeignet, um die ortständigen Makrophagen (bzw. Kupffer-Zellen in der Leber) zu detektieren.

Interessanterweise konnte schon am Tag 2 nach der BDL eine deutliche Zunahme der Makrophagenzahl festgestellt werden. Vor allem im Bereich der Galleninfarkte war die Infiltration massiv erhöht (Abbildung 16). Dies impliziert, dass die Galleninfarkte eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der Entzündungsreaktion nach der BDL spielen.

Die Applikation von DPO führte dazu, dass sowohl die Zahl als auch die Verteilung der f4/80-positiven Zellen derjenigen der Sham-operierten Mäuse entsprach. Dies spricht dafür, dass die inflammatorische Reaktion mittels DPO reduziert werden konnte.

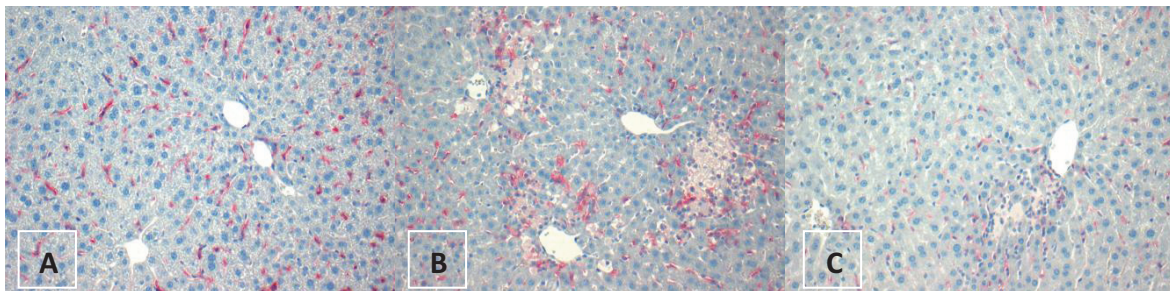


Abbildung 16: Repräsentative Abbildungen der f4/80 Immunhistochemie (20-er Objektiv) 2 Tage nach Sham-Operation (A) sowie 2 Tage nach der Gallengangsligatur und Therapie mit NaCl (B) sowie mit DPO (C).

4.6 Apoptose

Die Apoptose beschreibt einen Vorgang, der als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Im Gegensatz zur Nekrose tritt die Apoptose klassischerweise unter physiologischen Bedingungen auf und führt nicht zwangsläufig zur Initiation einer Entzündungsreaktion. Trotzdem konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Apoptose unter verschiedenen pathologischen Konditionen, so auch bei der Leberfibrose, vermehrt auftritt und sogar die Erkrankungsprogression fördern kann.

Der apoptotische Zelltod nach der BDL wurde mittels der TUNEL-Analyse sowie der Immunohistochemie der Cleaved-Caspase-3 evaluiert (Abbildung 17). Die BDL führte zu einem massiven Anstieg der TUNEL-positiven Zellen. Dieser Anstieg konnte jedoch nicht mittels der Cleaved-Caspase-3-Immunohistochemie untermauert werden. Die Analyse der Schnitte ergab weiterhin, dass die TUNEL positiven Zellen nicht die typischen Merkmale der Apoptose wie die Chromatinkondensation bzw. Bildung von apoptotischen Körperchen aufwiesen. Es liegt daher sehr nahe, dass es sich um nekrotische Zellen im Bereich der Gallensinfarkte handelt.

Die Auswertung der Cleaved-Caspase-3 Immunohistochemie zeigte vereinzelt positive Zellen in Sham-operierten Tieren. Es ergab sich kein signifikanter Anstieg Cleaved-Caspase-3-positiver Hepatozyten zu den untersuchten Zeitpunkten nach der BDL. Ebenso zeigte sich kein Unterschied in der Zahl positiver Zellen zwischen den BDL-Gruppen.

Diese Untersuchungen belegen die untergeordnete Rolle der Apoptose im Modell der BDL. Die Detektion apoptotischer Zellen mittels der TUNEL-Analyse scheint nicht adäquat zu sein. Somit sollte die Interpretation bezüglich der Rolle der Apoptose nach BDL, die sich aus der Auswertung mittels der TUNEL-Schnitte ergab, kritisch überdacht werden (Abbildung 17).

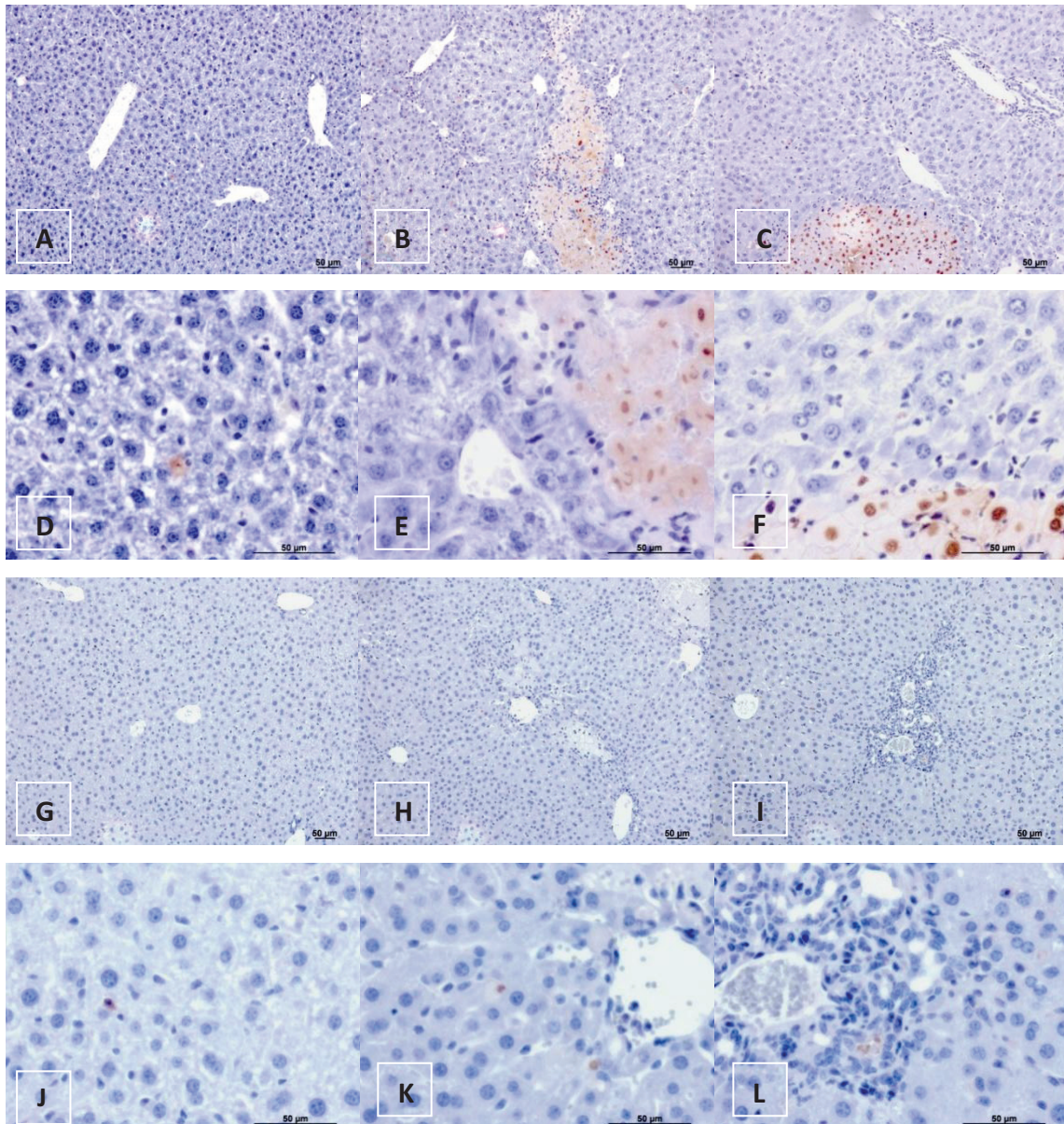


Abbildung 17: Repräsentative Abbildungen muriner Leberschnitte nach Färbung mittels TUNEL (A-F) sowie Immunhistochemien von Cleaved-Caspase-3 (G bis L). Abbildungen A, D, G und J zeigen Leberschnitte der Sham-operierten Mäuse. Abbildungen B, E, H, K zeigen Leberschnitte von Mäusen 2 Tage, Abbildungen C, F, I und L 14 Tage nach BDL. (- 50 µm).

4.7 Fibrose

Zur Evaluation des fibrotischen Leberschadens nach BDL wurden sowohl histologische Untersuchungen als auch Bestimmungen der Fibrose-assoziierten Gentranskripte durchgeführt. Die Färbung der Leberschnitte mit Sirius-red offenbarte einen deutlichen

Ergebnisse

Anstieg von Kollagenfasern 14 Tage nach der BDL (Abbildung 18 C-E). Positive Areale wurden vor allem im Bereich der Periportalfelder gefunden. Die histomorphometrische Untersuchung zeigte, dass die Therapie mit DPO zu einer signifikanten Reduktion Sirius-red positiver Areale geführt hat (Abbildung 18 A).

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde weiterhin die Expression der Kollagen-(I)- α Gentranskripte gemessen. Auch auf der Ebene der mRNA zeigte sich ein deutlicher Anstieg 14 Tage nach der Gallengangligatur. Parallel zur histologischen Untersuchung ergab sich in der DPO-Gruppe eine signifikant niedrigere Expression der Kollagen-(I)- α mRNA verglichen mit den NaCl-behandelten Tieren. Diese Ergebnisse verdeutlichen das antifibrotische Potenzial von DPO.

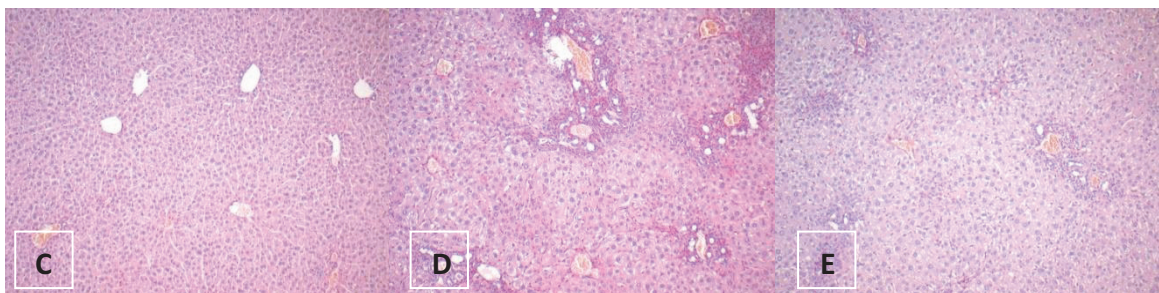
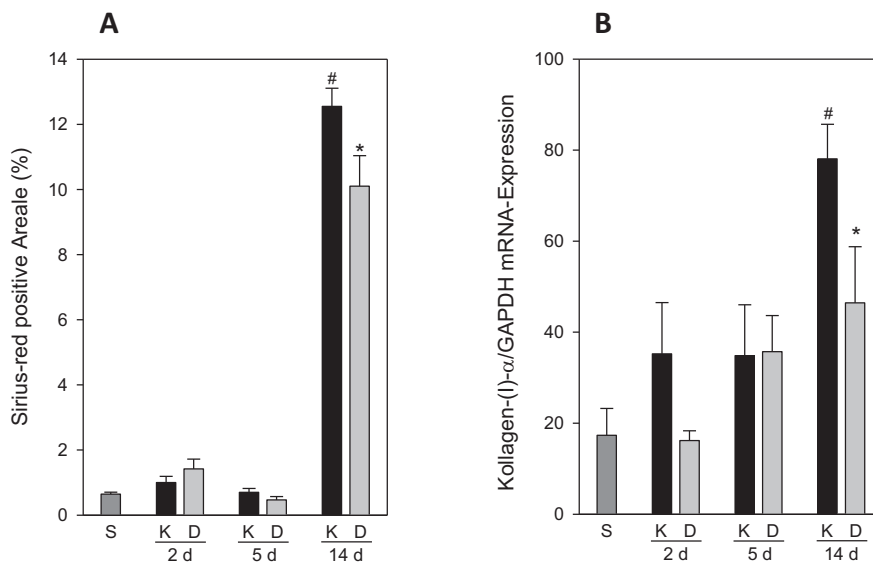


Abbildung 18: Histomorphometrische Auswertung der mit Sirius-red gefärbten Leberschnitte (A) sowie die relative Expression der Kollagen-(I)- α -mRNA im Lebergewebe (B) der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) sowie 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; [#] $p < 0,05$ vs. Sham (S), ^{*} $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

Repräsentative Abbildungen der mit Sirius-red angefärbten Leberschnitten einer Sham-operierten Maus (C), sowie einer Maus 14 Tage nach der BDL und Behandlung mit NaCl (D) oder DPO (E).

Weiterhin wurde die Expression der α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) mRNA gemessen. Nach der Aktivierung und Transdifferenzierung der Ito-Zelle ändert sich deren Expressionsmuster. Die aktivierte, Myofibroblasen-ähnliche Zelle exprimiert im Gegensatz zu ihrer ruhenden Form α -SMA. Somit ist dies ein geeigneter und etablierter Marker der Ito-Zell-Aktivierung und der Fibrogenese.

2 Tage nach der BDL kam es zu einem starken Anstieg der α -SMA-Expression. Zu den späteren Zeitpunkten war das Expressionsniveau im Vergleich zu Sham-Tieren nur leicht erhöht, so dass man von einem frühen Expressionspeak sprechen kann. Interessanterweise konnte dieser Peak in den DPO-behandelten Tieren nicht beobachtet werden. DPO führte zu einer signifikanten Reduktion von α -SMA 2 Tage nach der Operation. Es lässt sich also schlussfolgern, dass DPO die frühe Aktivierung der Ito-Zellen verhindern konnte. Dies könnte ein möglicher Grund für die geringere Kollagenablagerung in den DPO-behandelten Tieren sein.

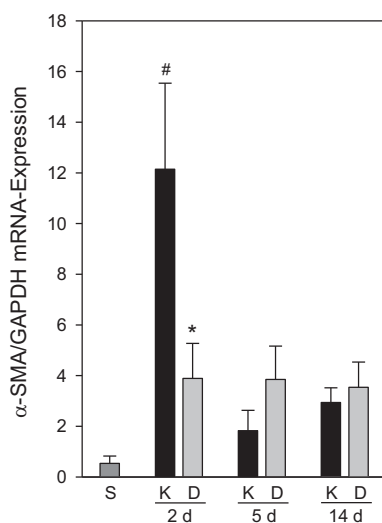


Abbildung 19: Relative Expression der α -SMA-mRNA im Lebergewebe der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; # $p < 0,05$ vs. Sham (S), * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

4.8 Profibrotische Gentranskripte

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, spielt TGF- β eine entscheidende Rolle bei dem fibrogenetischen Prozess. Es sind verschiedene Formen von TGF- β bekannt, wobei speziell für TGF- β 1 ein klarer Zusammenhang mit der Leberfibrose belegt ist (Inagati & Okazaki, 2007). Es ist gesichert, dass TGF- β 1 von verschiedenen Zellen während der Fibrogenese produziert wird und aktivierend auf die Ito-Zellen wirkt. Somit ist der Wachstumsfaktor für

Ergebnisse

die Perpetuation der Fibrogenese verantwortlich. Unsere Messungen ergaben einen stetigen Anstieg der TGF- β 1-mRNA nach der BDL (Abbildung 20). Verglichen mit der Sham-Gruppe wurde ein ca. 8-facher Anstieg der mRNA 14 Tage nach der BDL gemessen. Auch in den DPO behandelten Tieren war ein Anstieg zu verzeichnen. 14 Tage nach der BDL war die Expression jedoch mit einem 6-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht reduziert (Abbildung 20).

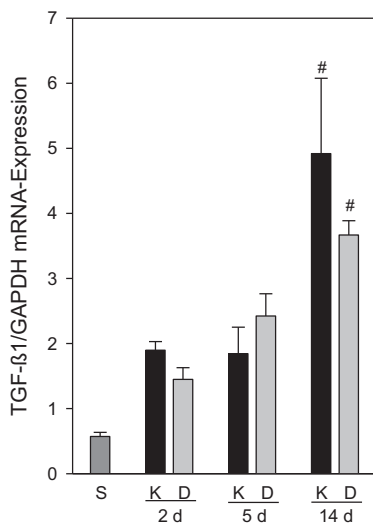


Abbildung 20: Relative Expression der TGF- β 1-mRNA im Lebergewebe der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; # $p < 0,05$ vs. Sham (S).

Desweiteren bestimmten wir die mRNA der intrazellulären TGF- β 1 Signaltransduktionsmoleküle, den sogenannten Smads. Parallel zur Expression von TGF- β 1 kam es zu einem stetigen Anstieg der R-Smads, wobei die Expression von Smad 3, jedoch nicht von Smad 2 zwei Wochen nach der BDL verglichen zur Sham-Gruppe signifikant erhöht war (Abbildung 21 A, B). DPO führte zu einer Veränderung des Expressionsmusters mit einer signifikanten Erhöhung von Smad 2, jedoch nicht von Smad 3.

Auch die Smad 4- und Smad 7-Expression zeigten eine signifikante Erhöhung 14 Tage nach der BDL (Abbildung 21 C, D). Die mit DPO behandelten Tiere zeigten auch hier veränderte Expressionsmuster. Es kam zu keinem signifikanten Anstieg von Smad 4 und 7, wobei sich der Unterschied zwischen der Kontroll- und der DPO-Gruppe am deutlichsten bei der Expression von Smad 7 zeigte.

Zusammenfassend hat DPO zu einer Modulation der TGF- β 1- und Smad-Genexpressionen geführt. Das Expressionsniveau von TGF- β 1 sowie Smad 3, 4 und 7 konnte durch DPO reduziert werden, während Smad 2 in der DPO-Gruppe überexprimiert wurde.

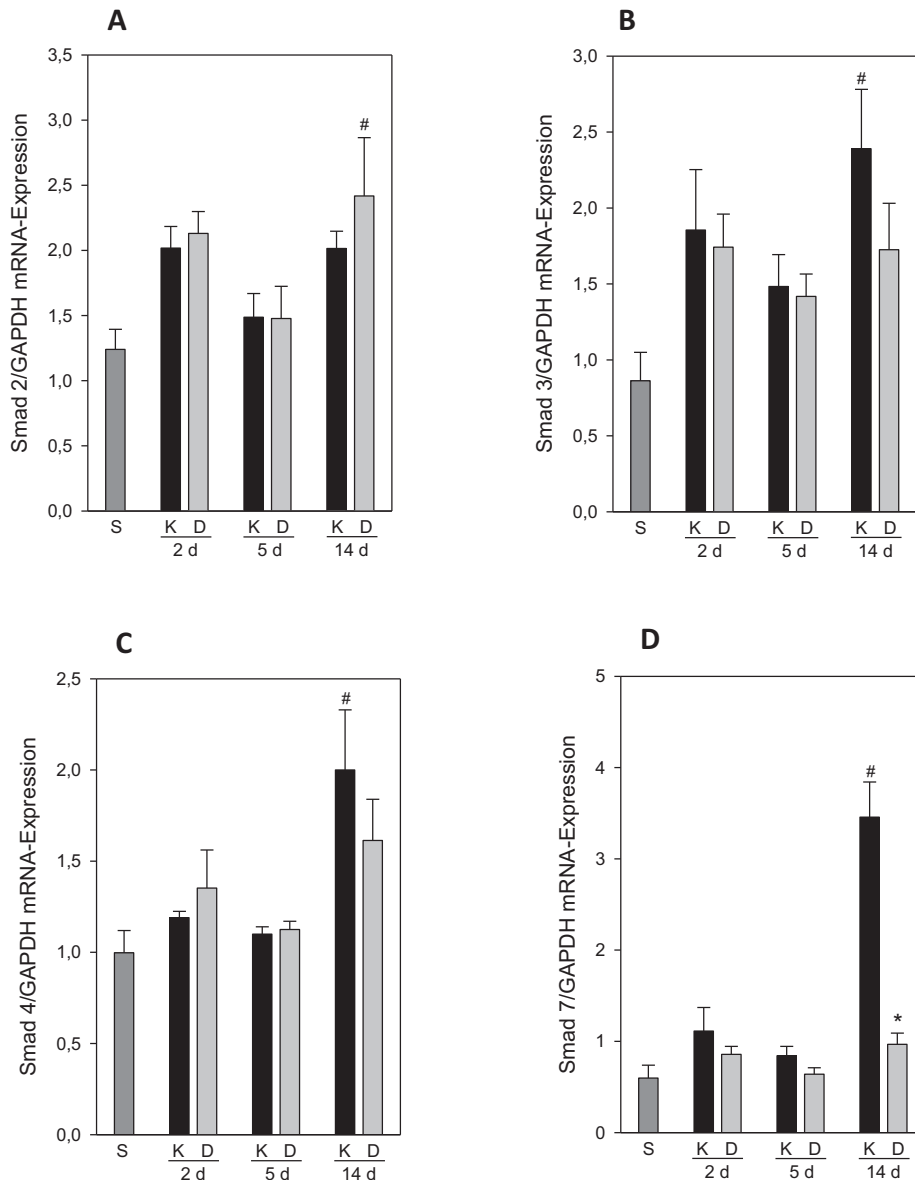


Abbildung 21: Relative mRNA Expression von Smad 2 (A), Smad 3 (B), Smad 4 (C) und Smad 7 (D) mRNA im Lebergewebe der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; [#] $p < 0,05$ vs. Sham (S). ^{*} $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

Auf der Proteinebene wurde zusätzlich die aktivierte, phosphorylierte Form der Rezeptor-aktivierten Smad 2 und Smad 3 bestimmt (Abbildung 22). Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der phospho-Smad 2-Expression nach der BDL. Auch die Applikation von DPO führte zu keinen Änderungen. Überraschenderweise führte die BDL zu

einem stetigen Abfall der phospho-Smad 3-Expression ohne Unterschiede zwischen NaCl und DPO behandelten Tieren.

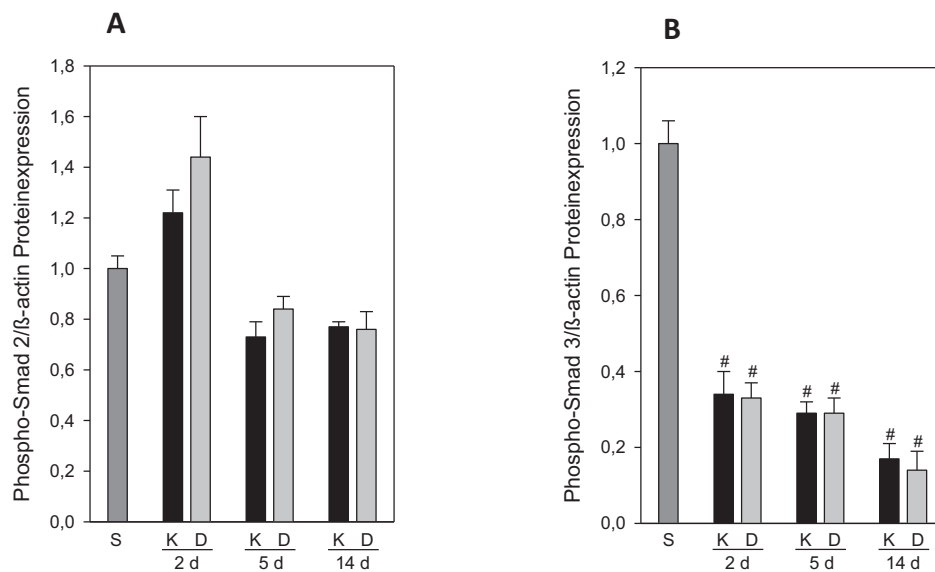


Abbildung 22: Relative Proteinexpressionen von phospho-Smad 2 (A) sowie phospho-Smad 3 (B) der Mäuse 2, 5 und 14 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (K; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; [#] $p < 0,05$ vs. Sham (S).

4.9 Überlebensstudie

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die DPO-Therapie das Überleben der Versuchstiere nach der BDL verlängern könnte, wurden 20 zusätzliche Tiere der Ligatur des D. choledochus unterzogen und in 2 Gruppen randomisiert. Es wurde entweder DPO oder NaCl entsprechend dem experimentellen Protokoll appliziert. Täglich wurde eine Visite durchgeführt, bei der das Befinden der Tiere überprüft wurde. Die Letalität ist in der Abbildung 23 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Applikation von DPO zu einem signifikanten Überlebensvorteil geführt hat. Am Tag 28 nach der Gallengangsligatur lebten 90 % der mit DPO behandelten Tiere, während in der Kontrollgruppe die Überlebensrate nur 30 % betrug. Dieses Ergebnis ist von hohem klinischem Interesse und unterstreicht die günstigen Effekte von DPO im Modell des cholestatischen Leberschadens.

Ergebnisse

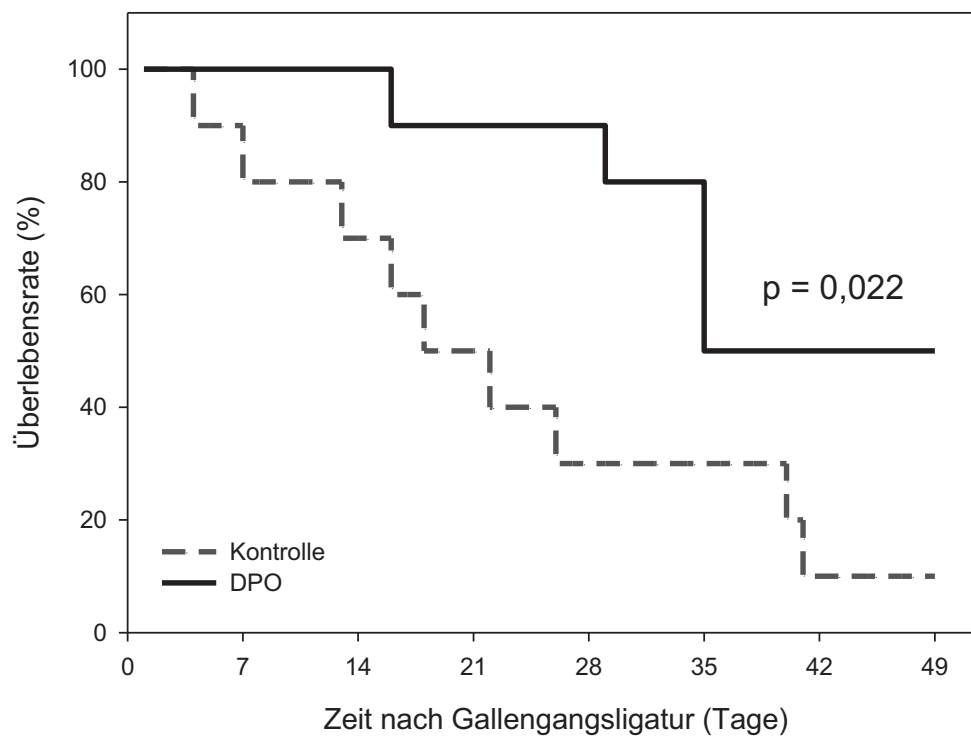


Abbildung 23: Kaplan-Maier-Überlebenskurve der Mäuse nach BDL. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Kontrollgruppe (NaCl), die durchgezogene Linie steht für die DPO-Gruppe. Der Log-rank Test ergab einen signifikanten Unterschied von $p = 0,022$.

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte das therapeutische Potential von DPO im Modell der extrahepatischen Cholestase gezeigt werden. Im Einzelnen wurden folgende Aspekte beobachtet:

- Die Gallengangsligatur führt zu einem signifikanten Abfall des Hämatokrits. Die therapeutische Applikation von DPO konnte dem entgegenwirken. DPO stabilisierte den Hämatokrit auf dem Niveau der Sham-operierten Tiere.
- Die frühzeitige Schädigung des Leberparenchyms nach der Gallengangsligatur, die sich in der Freisetzung der leberspezifischen Enzyme äußert und sich histologisch in Form der Galleninfarkte präsentierte, konnte durch DPO reduziert werden. Die Gabe von DPO führte zu einer deutlichen Gewebeprotektion in der Phase der akuten Cholestase.
- Der durch die Cholestase induzierte Untergang von Gewebe äußert sich als nekrotischer Zelltod, während die Apoptose eine untergeordnete Rolle spielt.
- Schon 2 Tage nach der Gallengangsligatur ist eine starke inflammatorische Antwort zu erkennen. Es kommt zu einer massiven Infiltration von Makrophagen in die Leber. Die Gabe von DPO inhibiert die Cholestase-induzierte Gewebeeinfiltration mit f4/80-positiven Makrophagen.
- Die extrahepatische Cholestase führt langfristig zur Ausbildung einer Leberfibrose. Es kommt zu einer erhöhten Produktion und Ablagerung von Kollagen in der Leber. Die Applikation von DPO reduziert signifikant die Expression von Kollagen-(I)- α -mRNA und die Kollagenablagerung am Tag 14 nach der Gallengangsligatur.

Ergebnisse

- Die frühe Aktivierung der Ito-Zellen, welche entscheidend für die Perpetuation der Fibrogenese sind, wird durch DPO signifikant reduziert.
- Die Gallengangsligatur führt zur veränderten Expression der TGF- β -assoziierten Gene. DPO moduliert das Muster der Genexpression von TGF- β 1 und Smad. Die Ergebnisse sprechen für eine weniger aktive TGF- β -Signaltransduktion in DPO-behandelten Tieren.
- Die Applikation von DPO führt darüber hinaus zu einer Reduktion der HIF-1 α -Expression. Dabei handelt es sich um einen wichtigen profibrotischen Mediator.
- Die vielversprechende therapeutische Wirkung von DPO wird durch die signifikante Verlängerung der Überlebenszeit untermauert.

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Materialien und Methoden

5.1.1 *Experimentelle Modelle der Leberfibrogenese*

Die Leberfibrose bzw. -Zirrhose repräsentieren einen gemeinsamen Endzustand verschiedener chronischer Lebererkrankungen (Friedman, 2003). Eine fortgeschrittene Fibrose zeichnet sich durch die extrazelluläre Akkumulation von fibrillärem Material, insbesondere von Typ-I und Typ-III Kollagen aus (Iredale, 2007). Die vielfältigen Ursachen der Fibrose und Zirrhose sind im Abschnitt 3.1.2 erläutert worden. Die steigende Inzidenz einerseits und der Mangel kausaler Therapiestrategien andererseits erklärt das klinisch-wissenschaftliche Interesse an dieser Erkrankung (Iredale, 2003; Iredale, 2007). Die einzige kausale Therapie der Zirrhose ist die Lebertransplantation, die aufgrund eines Organmangels, einer potentiellen Inoperabilität sowie des Risikos fürs Wiederaufflammen der Grunderkrankung im transplantierten Organ nur für einen Teil der Patienten in Frage kommt (Iredale, 2007). Diese Problematik kann nur durch neue effektive Therapiestrategien gelöst werden. Die intensive Grundlagenforschung der letzten 20 Jahre identifizierte die zellulären und molekularen Schlüsselmechanismen, die das Verständnis der Pathogenese der Leberfibrose deutlich verbessert haben (Bataller & Brenner, 2005). Diese Erkenntnisse (siehe Abschnitt 3.1.3) stellen die Grundlage zur Entwicklung neuer kausaler Therapieoptionen.

Die Entwicklung komplementärer experimenteller Modellsysteme ermöglicht die Aufschlüsselung der Vorgänge der Fibrogenese, die das heutige pathophysiologische Konzept der Erkrankung prägen (Iredale, 2007). Insgesamt können die Modelle der Leberfibrose in drei große Gruppen eingeteilt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, native Zellpopulationen der Leber zu isolieren und ihr Verhalten *in vitro* zu untersuchen. Dabei können Zellen aus gesunden und experimentell verletzten Lebern isoliert werden (Friedman et al., 1985; Pinzani et al., 1992). Zellkulturen eignen sich sehr gut zur Untersuchung des Zellverhaltens sowie der Effekte spezifischer Mediatoren. Es ist aber nicht möglich, die *in vivo*-Vorgänge, die durch ein dynamisches Zusammenspiel verschiedener Zellarten zustande kommen, nachzubilden. Dies ist der entscheidende Nachteil der *in vitro* Modelle. Eine zweite Gruppe beinhaltet die Untersuchung humaner Leberbiopsien bzw. -

Resektaten. Ein großer Vorteil hier ist, dass das Gewebe von tatsächlich klinisch erkrankten Patienten stammt (Wanless et al., 2000). Das humane Gewebe kann vor allem zur Validierung der Untersuchungsergebnisse, die aus Zellkulturen bzw. Tiermodellen stammen, geeignet sein. Allerdings stellen die Gewebeproben nur eine Momentaufnahme dar. Die Indikationsstellung zur Gewebegewinnung ist aufgrund möglicher Komplikationen streng zu stellen, so dass wiederholte Biopsien zu wissenschaftlichen Zwecken aus ethischen Gründen oftmals nicht möglich sind (Iredale, 2007). Die dritte Gruppe sind die tierexperimentellen Modelle (Chang et al., 2005). Im Hinblick auf das komplexe Zusammenspiel zwischen den Zellen der Leber sowie der Bedeutung extrahepatischer Zellen bieten *in vivo* Modelle entscheidende Vorteile. Kausale Ursachen der Leberschädigung wie die Cholestase bzw. die Inflammation können somit nachempfunden werden. Weiterhin können genetische Modifikationen die pathogenetische Relevanz isolierter Prozesse aufdecken. Eine Untersuchung in verschiedenen Stadien der Erkrankung zur Verlaufsbeobachtung ist möglich. Auch experimentelle therapeutische Interventionen können in Tierexperimenten auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden (Iredale, 2007). Als Nachteil muss die Tatsache genannt werden, dass möglicherweise Unterschiede zu humanen Prozessen bestehen.

Die beiden am häufigsten verwendeten und am besten charakterisierten murinen Modelle der Leberfibrose sind das Modell der Ligatur des Ductus choledochus (Georgiev et al., 2008) sowie des Modell der toxischen Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff (CCL₄) (Constandinou et al., 2005).

Beim CCL₄ handelt es sich um eine lebertoxische Substanz. Die wiederholte Applikation führt zur Lipidperoxidation und damit zur chronischen zentrilobulären Hepatozytenschädigung. Die Zeit bis zur Entwicklung der Fibrose ist abhängig von der applizierten Dosis und beträgt 4 bis 20 Wochen (Chang et al., 2005). Der Nachteil dieses Modells ist, dass die Fibrose im Vergleich zur menschlichen Leber relativ gering ausgeprägt ist, während höhere Dosen wiederum zur erhöhten Toxizitäts-bedingten Letalität vor der Entwicklung der Fibrose bzw. Zirrhose führen (Chang et al., 2005). Desweiteren muss streng darauf geachtet werden, dass eine potenzielle antifibrotische Therapie keine Hemmung des im CCL₄-Modell zur Toxizität führenden CYP-2E induziert. Falls dies nicht ausgeschlossen werden kann, ist ein möglicher anti-fibrotischer Effekt nicht zu verallgemeinern, sondern als rein modellspezifisch zu betrachten (Wallace et al., 2008).

Das Modell der Gallengangsligatur ist ein etabliertes Modell der Cholestase. Nach Gallengangsligatur entwickeln Mäuse im Vergleich zur CCL₄-Gabe schneller eine Fibrose (Chang et al., 2005). Die Obstruktion des D. choledochus wird auch im Rahmen humaner Erkrankungen beobachtet, so dass das murine Modell die klinische Situation nachahmt. Die histologischen Veränderungen entsprechen größtenteils der humanen Pathologie, die bei gestörtem Abfluss der Galle entsteht: Die Akkumulation der Gallensäuren führt zur periportalen Hepatozytenschädigung, zur Bildung von pathognomonischen Galleninfarkten sowie zur periportalen Fibrose (Georgiev et al, 2008). Eine Schwäche des Modells ist die hohe Toxizität, die zwar schnell zur Entwicklung der Fibrose führt, jedoch das Risiko einer frühen Letalität der Tiere mit sich bringt (Guicciardi & Gores, 2005a). Laut Chang et al. (2005) entwickeln FVB/N-Mäuse innerhalb von 4-8 Wochen eine Leberfibrose und versterben alle innerhalb von 16 Wochen nach der Ligatur des Ductus choledochus. Im Vergleich dazu legen unsere Untersuchungen an der C56BL/6J-Mäusen nahe, dass bei diesen Tieren die Kinetik noch etwas schneller ist. Alle Tiere wiesen am Tag 14 klare histologische Zeichen der Leberfibrose auf (Abbildung 18). Laut der durchgeführten Überlebensstudie (Abbildung 22) erreichen also 80 % der Tiere das Stadium der Leberfibrose, bevor sie versterben. Somit ist das verwendete Modell gut zur Untersuchung der akuten Cholestase und Fibrose geeignet. Die sorgfältige Auswahl der Untersuchungszeitpunkte ermöglicht es, trotz der schnellen Schädigungskinetik, verschiedene Phasen der cholestatisch bedingten Veränderungen der Leber reproduzierbar zu evaluieren.

5.1.2 **Charakterisierung der Leberschädigung nach Ligatur des Ductus choledochus**

Cholestatische Lebererkrankungen kommen in einer Reihe klinischer Situationen vor. Die Störung des Gallenabflusses führt zur Akkumulation von Substanzen, die unter physiologischen Bedingungen mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden (Trauner et al., 1998). Es handelt sich dabei vor allem um Gallensäuren, die in hohen Konzentrationen zytotoxisch sind (Paumgartner et al., 2006; Trauner et al., 2003). Die Cholestase führt langfristig zur Entwicklung einer Leberfibrose, Zirrhose und letztendlich zum Leberversagen (Zollner & Trauner, 2009).

Die Ligatur des D. choledochus in Mäusen ist ein etabliertes und sehr gut charakterisiertes Modell der Cholestase. Georgiev und Mitarbeiter (2008) beschrieben im Detail die zeitabhängigen Veränderungen nach der Gallengangsligatur in männlichen C57BL/6J Mäusen. Sie konnten zeitlich fest definierte Erkrankungsstadien beobachten. Es wurde eine Phase der akuten Cholestase mit einem Höhepunkt der Freisetzung hepatozellulärer Enzyme 2-3 Tage nach der Gallengangsligatur identifiziert. Laschke et al. (2008) sowie Dold et al. (2009) berichteten, dass intravitalmikroskopisch untersuchte Lebern von Mäusen 12 h nach der Gallengangsligatur als Zeichen der frühen Inflammation einen signifikanten Abfall der sinusoidalen Perfusion sowie einen Anstieg der Leukozytenadhärenz aufweisen.

Auch unsere Daten bestätigen die früh einsetzende Nekroinflammation nach der Gallengangsligatur. Darüberhinaus zeigte sich am Tag 2 post operationem ein 68-facher Anstieg der Aktivität von GLDH im Serum. Da GLDH in Mitochondrien der Hepatozyten lokalisiert ist (Schmidt et al., 1988), spricht die hohe Aktivität für eine besonders starke Störung der hepatozellulären Integrität in der frühen Phase der Cholestase.

Neben den serologischen Veränderungen sind auch histologische Zeichen der Nekroinflammation identifiziert worden. Fokale Nekrosen, sogenannte Galleninfarkte, entwickeln sich ab 8 Stunden nach der Gallengangsligatur und erreichten ihre maximale Ausdehnung am 2. Tag (Georgiev et al., 2008). Galleninfarkte sind pathognomonisch für die Obstruktion großer Gallengänge und können auch beim Menschen beobachtet werden (Guicciardi & Gores, 2005b). Die Mechanismen, die zur Entwicklung dieser fokalen Nekrosen führen, sind

nicht genau geklärt. Eine mögliche Erklärung ist ein druckinduzierter Einriss der Hering-Kanäle (Wagner et al., 2003). Jedoch sprechen die frühe Entwicklung der Infarkte sowie die Tatsache, dass zu späteren Zeitpunkten keine Progredienz der Infarktareale beobachtet werden konnte, gegen diese Hypothese. Eine toxische Wirkung der Gallensäuren auf die Hepatozyten sowie die frühe Störung der Leberperfusion könnten ebenso an der Entwicklung der Galleninfarkte beteiligt sein. Interessant ist die Tatsache, dass die Progredienz der Galleninfarkte nur in den ersten Tagen der Cholestase besteht. Während unsere histomorphometrischen Untersuchungen eine darauffolgende Stagnation der Infarktareale am Tag 5 und 14 zeigten, beschrieben Georgiev et al., (2008) sogar das fast vollständige Verschwinden fokaler Nekrosen zu späteren Untersuchungszeitpunkten. Diese Daten belegen, dass Galleninfarkte als histologisches Korrelat der *akuten* cholestatischen Schädigung der Leber angesehen werden können. Darüberhinaus ist von Interesse, dass es zu einer massiven Akkumulation f4/80-positiver Zellen insbesondere um die Galleninfarkte gekommen ist. Die Erkenntnis, dass Galleninfarkte an der Initiation der inflammatorischen Kaskade beteiligt sind, ist ein Beitrag zur Klärung ihrer bisher unbekannt pathophysiologischen Relevanz.

Nach initialer akuter Schädigung der Leber nehmen die Aktivitäten der Enzyme im Serum wieder ab. Auch kann keine Progression der Nekrose beobachtet werden. Es scheinen Anpassungsvorgänge zu existieren, die das akute Versagen des Organs verhindern. Die hierfür verantwortlichen molekularen Mechanismen sind zum Teil aufgeklärt und zeigen eine hohe Komplexität. Im Zentrum stehen nukleäre Rezeptoren wie der Farnesoid X Rezeptor, der Pregnan X Rezeptor sowie der Vitamin D Rezeptor (Zollner & Trauner, 2009). Diese regulieren z. T. überlappend Gruppen von relevanten Ziel-Genen, wodurch eine Adaptation an die Cholestase ermöglicht wird (Trauner & Boyler 2003; Zollner & Trauner, 2009). Es kommt zur Veränderung im Expressionsmuster der Gallensäuretransporter, sowie zur Modulation von Genen, die für die Gallensäuresynthese und deren Detoxifikation verantwortlich sind. Unsere Beobachtung, dass nach der initialen akuten Leberschädigung die Krankheitsprogression zunächst stagniert, könnte durch diese Adaptationsmechanismen erklärt werden.

Trotz der Schutzmechanismen führt eine länger andauernde Cholestase zur Entwicklung einer Leberfibrose (Zollner & Trauner, 2009). Die vorliegende Studie belegt eine starke Heraufregulation von verschiedenen Fibrosemarker 2 Wochen nach der Gallengangsligatur,

was im Einklang mit anderen Studien steht (Canbay et al., 2004; Georgiev et al., 2008) Unsere Daten belegen, dass es am Tag 14 nach der Ligatur des D. choledochus zu einer signifikant erhöhten Expression Fibrose-assoziiertes Gene wie Kollagen-(I)- α und TGF- β 1 sowie von Smad 3, 4 und 7 kommt, was für eine aktive Fibrogenese spricht. Darüberhinaus konnten wir histologische Zeichen der Fibrose am Tag 14 mittels Sirius-red-Färbung darstellen. Dieser Untersuchungszeitpunkt ist somit gut geeignet, die Leberfibrose zu untersuchen. Die Untersuchung der Tiere zu noch späteren Zeitpunkten erhöht das Risiko einer positiven Selektion, da die Letalität ab der dritten Woche entscheidend zunimmt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 *Anämie bei chronischen Lebererkrankungen und die Rolle von Epo*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gehen chronische Lebererkrankungen häufig mit einer Anämie einher (Abschnitt 3.1.4). Nutritive Störungen, Blutverluste bei verminderter Produktion von Koagulationsfaktoren aber auch die toxische Wirkung auf das Knochenmark sind als mögliche Ursachen zu nennen (Guha & Iredale, 2007). Die vorliegende Studie zeigt, dass auch die experimentell induzierte Cholestase in Mäusen mit einem signifikanten Abfall des Hämatokrits einhergeht. Am Tag 14 nach der Ligatur des Ductus choledochus fiel der Hämatokrit von $0,46 \pm 0,01$ (Sham) auf einen Mittelwert von $0,34 \pm 0,01$ ab (Abbildung 11). Es ist seit langem bekannt, dass ein erniedrigter Hämatokrit bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen ein relevanter prognostischer Faktor ist (Orrego et al., 1983). Auch gilt die Anämie als unabhängiger Faktor, der die Lebensqualität von Zirrhosepatienten negativ beeinflusst (Les et al., 2009). Unabhängig von den gewebeprotektiven Eigenschaften von Epo ist das Hormon daher schon aufgrund seines hämatopoetischen Potentials von Interesse. Unsere Daten belegen, dass die Applikation von DPO zur Stabilisierung des Hämatokrits gut geeignet ist (Hämatokrit von $0,43 \pm 0,01$ am Tag 14 nach der Gallengangsligatur in der DPO-Gruppe). Die Hämoglobinkonzentration konnte im Gegensatz zum Hämatokrit durch Gabe von DPO nicht auf dem Niveau der Sham Gruppe am Tag 14 nach der Gallengangsligatur gehalten werden. Zwar war die Konzentration in der DPO-Gruppe signifikant höher als in der entsprechenden Kontrollgruppe ($8,2 \pm 0,1$ mmol/l (Sham) vs. $6,1 \pm 0,2$ mmol/l (Kon 14 d) vs. $6,9 \pm 0,2$ mmol/l (DPO 14 d)), jedoch war auch ein deutlicher Unterschied zur Sham-Gruppe zu verzeichnen. Das Nicht-Erreichen der Hämoglobinkonzentration der Sham-Tiere durch die Behandlung mit DPO könnte mit dem gesteigerten Bedarf an Eisen zusammenhängen. Es wurde berichtet, dass die Wirkung von DPO auf die Erythropoese bei Patienten mit einer Chemotherapie-induzierten Anämie durch die zusätzliche Gabe von Eisen verbessert wird (Auerbach et al., 2010). Eine zusätzliche Gabe von Eisen wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht in Erwägung gezogen, da die Wirkung von DPO isoliert betrachtet werden sollte. Es ist wahrscheinlich, dass analog zur beschriebenen klinischen Beobachtung eine zusätzliche

Applikation von Eisen zu einer höheren Hämoglobinkonzentration in den DPO behandelten Tieren geführt hätte.

Chronische Lebererkrankungen gehen häufig auch mit einem Anstieg des Serum-Epo-Spiegels einher (Tacke et al., 2004; Bruno et al., 2004; Yang et al., 2003). Tacke et al. (2004) berichteten, dass die Serumkonzentration mit der Schwere der Erkrankung zunimmt. Im Einzelnen wurden verschiedene Faktoren herausgearbeitet, die die Epo-Konzentration beeinflussen. Unter anderem steigt diese als Antwort auf eine Anämie bzw. eine Blutungskomplikation. Aber auch andere Faktoren, wie die Verschlechterung der pulmonalen Funktion und eine Thrombozytopenie sowie eine reduzierte Leberfunktion per se gehen mit einer Erhöhung der Epo-Konzentration einher (Tacke et al., 2004). Auch Bruno et al. (2004) beschäftigten sich mit der Plasmakonzentration von Epo bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. Während Tacke et al. eine Erhöhung der Epo-Konzentration auch in nicht-anämischen Patienten mit chronischer Lebererkrankung beschrieben, konnten Bruno et al. nur einen signifikanten Anstieg bei Patienten mit einem Abfall des Hb unter 12 g/dl beobachten.

Bruno et al. beschrieben weiterhin, dass der Anstieg der Epo-Konzentration bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen nicht adäquat ist. So fällt der Anstieg bei Patienten mit anderen Ursachen der Anämie, wie dem Eisenmangel, deutlich höher aus. Wir konnten zeigen, dass eine externe Gabe von Epo zu einer deutlichen Erhöhung des Hämatokrits führt. Es ist also durchaus plausibel anzunehmen, dass der durch die Anämie provozierte Anstieg der Epo-Konzentration bei chronischen Lebererkrankungen zu gering ist bzw. das Ansprechen auf Epo reduziert ist, was die externe Gabe von Epo sinnvoll erscheinen lässt.

5.2.2 **Antinekroinflammatorisches Potential von DPO**

5.2.2.1 *Protektion des Lebergewebes durch Epo-Analoga*

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Applikation von DPO mit einer Reduktion der Nekrose verbunden ist. Sowohl die systemischen Parameter der hepatozellulären Desintegrität als auch die histologischen Zeichen der Nekrose zeigten eine deutliche Reduktion in Tieren, die mit DPO behandelt wurden.

Der hepatoprotektive Effekt von DPO bzw. von anderen Epo-Analoga konnte in verschiedenen Leberschädigungsmodellen gezeigt werden (Vollmar & Menger, 2009). So konnte unsere eigene Arbeitsgruppe erstmals im Modell des akuten septischen Leberschadens, bei dem durch Applikation vom Lipopolysaccharid in Kombination mit D-Galaktosamin ein akutes Leberversagen induziert wurde, zeigen, dass DPO einen protektiven Effekt aufweist. Sowohl das Ausmaß der Nekrose als auch der Apoptose waren deutlich reduziert. DPO führte schlussendlich zu einem verlängerten Überleben der Versuchstiere (Le Minh et al., 2007). Auch im Ischämie/Reperusionsmodell der Leber von Ratten (Sepodes et al., 2006; Luo et al., 2009) bzw. Mäusen (Hochhauser et al., 2008) zeigte sich die Gabe von Epo als vorteilhaft. Luo et al. (2009) zeigen eine signifikante Reduktion von ALT und AST nach Gabe von 1000 IE/kg Epoetin-alpha. Histologisch konnten durch Epo die nekrotischen Zeichen, wie die Zellschwellung und vakuoläre Degeneration, reduziert werden. Die Ergebnisse konnten kürzlich auch in einer Studie an Schweinen bestätigt werden (Shimoda et al., 2009). In der hier vorliegenden Studie konnten wir gewebeprotective Eigenschaften von Epo auch im Modell der Cholestase belegen.

5.2.2.2 *Mechanismen der Hepatoprotektion*

In einer kürzlich publizierten Arbeit (Bramey et al., 2009) wurde versucht, die zellulären Mechanismen der Epo-Wirkung an primären Hepatozyten *in vitro* zu evaluieren. Die aus Ratten isolierten Hepatozyten wurden einem hypoxischen Milieu mit folgender Reoxygenierung ausgesetzt. Daneben wurde eine weitere Gruppe auf 4 °C abgekühlt und anschließend wiedererwärmt. Die Behandlung mit Epo zeigte keinen Vorteil bezüglich der

Hepatozytenschädigung. Die typischen Epo-Signalmoleküle, wie Jak-2 sowie STAT-3 und STAT-5, wurden durch Gabe von Epo nicht aktiviert (Bramey et al., 2009). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Epo nicht durch die direkte Wechselwirkung mit den Hepatozyten, sondern eher indirekt die Hepatoprotektion vermittelt.

Eine mögliche Erklärung für den durch Epo gebotenen Schutz vor nekrotischem Zelltod könnte eine Interaktion mit anderen Zelltypen als den Hepatozyten sein. Plausible Kandidaten hierfür sind die Kupffer-Zellen. Die Interaktion von Epo mit Zellen des Immunsystems konnte mehrfach belegt werden (Strunk et al., 2008; Yazihan et al., 2008; Schultz et al., 2008). Man geht davon aus, dass Epo, als Typ-I-Zytokin und Teil des Immunsystems, in der Lage ist, der Produktion und Wirkung anderer pro-inflammatorischer Zytokine entgegenzuwirken. In einer Studie, bei der humanes Blut durch Hinzugabe von LPS bzw. Phorboläther zur Liberation von Inflammationsmarkern stimuliert wurde, konnte durch Applikation von Epo die Konzentrationen von TNF- α , IL-2, -6 und 8 signifikant reduziert werden (Strunk et al., 2008). In der humanen Monozyten-/Makrophagenzelllinie U937 hat EPO die Produktion proinflammatorischer Zytokine in ähnlicher Weise gehemmt (Yazihan et al., 2008). Auch die durch *Neisseria meningitidis* aktivierte Zytokinproduktion von Monozyten konnte *in vitro* durch Epo gehemmt werden (Schultz et al., 2008). Diese Ergebnisse zeigen, dass Epo in der Lage ist, die Immunantwort durch eine direkte Interaktion mit inflammatorischen Zellen zu modulieren.

Auch *in vivo* konnten anti-inflammatorische Effekte von Epo aufgezeigt werden. Eine klassische Erkrankung, bei der die Inflammation als pathogenetisch entscheidender Faktor angesehen werden kann, ist die rheumatoide Arthritis. Im Mausmodell dieser Erkrankung konnte gezeigt werden, dass Epo die Inflammation, den Gewichtsverlust und das Ausmaß der Arthritis deutlich reduzieren konnte (Cuzzocrea et al., 2005). Die Konzentrationen von MIP-I und -II (*macrophage inflammatory proteins*) als Marker der Makrophagen sowie die Myeloperoxidase als Marker der Neutrophileninfiltration konnten durch Epo um 50 % gesenkt werden. Brines und Cerami (2008) gehen davon aus, dass Epo ein natürlicher Antagonist von proinflammatorischen Faktoren, besonders von TNF- α , ist. Interessanterweise wurde auch im oben beschriebenen Modell des akuten septischen

Leberschadens die Konzentration von TNF- α durch die Gabe von DPO deutlich reduziert (Le Minh et al., 2007).

Im Rahmen von Studien zu Hirninfarkten konnte demonstriert werden, dass Epo in der Lage ist, den Sekundärschaden, der sich als Antwort auf die primäre Verletzung ergibt, zu reduzieren (Villa et al., 2003; Brines 2010). Es wurde gezeigt, dass die Applikation von Epo im Modell der zerebralen fokalen Ischämie die Infiltration von inflammatorischen Zellen ins Schädigungsareal deutlich mindert. Dadurch kam es zu einer geringeren Produktion proinflammatorischer Zytokine, wodurch wiederum das Infarktareal vermindert werden konnte. Der Sekundärschaden, der nicht durch die ursächliche Noxe, sondern durch die Antwort auf diese entsteht, wurde also durch Epo aufgrund einer Interaktion mit Zellen des Immunsystems reduziert, während das primäre Nekroseareal nicht beeinflusst wurde. Es ist plausibel, dass ein ähnlicher Effekt auch zur Hepatoprotektion nach der Gallengangsligatur führt. In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass speziell im Bereich fokaler Nekrosen eine Infiltration mit Makrophagen stattfindet. Diese Infiltration ist in den DPO-behandelten Tieren deutlich reduziert. Hier gleichen die Anzahl und die Verteilung der Makrophagen derjenigen von gesunden Tieren. Die Inflammation ist durch DPO sichtbar inhibiert. Somit könnte man schlussfolgern, dass DPO die Antwort auf den primären Schaden verhindert und damit den sekundären Schaden reduziert.

Der sekundäre Schaden kann als Resultat einer Hyperinflammation betrachtet werden. Die Cholestase ist ein äußerst komplexes dynamisches Syndrom, bei dem die Inflammation eine entscheidende Rolle spielt (Gujral et al., 2004). Die Retention von lebertoxischen Gallensalzen führt zu einer raschen inflammatorischen Antwort. Diese ist durch eine Aktivierung von Kupffer-Zellen, die Akkumulation weiterer Makrophagen sowie die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet (Saito et al., 2000; Gujral et al., 2004). In verschiedenen Modellen konnte belegt werden, dass es sich bei dieser Immunantwort um eine pathologische Hyperinflammation handelt. So zeigte die Depletion von Kupffer-Zellen mit Gadoliniumchlorid einen Vorteil bezüglich der Schädigungsparameter nach der Gallengangsligatur (Canbay et al., 2003). Auch in mit Dimethylnitrosamin behandelten Ratten konnte durch eine Suppression der Makrophageninfiltration eine Reduktion des Schadens erreicht werden (Imamura et al., 2005). Es ist von höchster

Wichtigkeit, dass die Reduktion der akuten Nekroinflammation in beiden erwähnten Studien (Canbay et al., 2003; Imamura et al., 2005) auch zu einer Reduktion der Fibrose in der Leber zu späteren Untersuchungszeitpunkten geführt hat. Es lässt sich somit ein Zusammenhang zwischen der Inflammation und der Fibrogenese herstellen.

Die protektive Wirkung von DPO bezüglich der Nekrose, Inflammation und Initiation der Fibrogenese kann aufgrund der vorliegenden Daten zumindest teilweise durch die Interaktion mit inflammatorischen Zellen erklärt werden. Da bisher keine direkte protektive Wirkung auf die Hepatozyten belegt werden konnte, ist der hepatoprotektive Effekt also als indirekt anzusehen. Insbesondere könnte die Wirkung durch die Interaktion mit den Kupffer-Zellen zustande kommen. Diese sollte in Zukunft durch weitere Studien genauer beleuchtet werden.

5.2.3 *Die Rolle der Apoptose*

Die Apoptose ist als programmierter Zelltod definiert. Der von Kerr et al. (1972) eingeführte Begriff beschreibt einen von der Nekrose abzugrenzenden Vorgang, der von der Zelle selbst kontrolliert wird, so dass ein Schutz des Nachbargewebes gewährleistet wird. Im adulten Organismus dient der Vorgang zur Kontrolle der Zellzahl und der Größe eines Gewebes, zur Eliminierung entarteter Zellen sowie zur Selektion und zum Abbau unnötiger bzw. potentiell schädlicher Zellen des Immunsystems (Galluzzi et al., 2007). Auch in der Leber ist sowohl der extrinsische als auch intrinsische Weg der Apoptose für die Homöostase des Organs von entscheidender Bedeutung (Schattenberg et al., 2006).

Die Dysregulation dieser Wege trägt allerdings zu einer Reihe von Erkrankungen der Leber, wie der viralen Hepatitis, dem toxischen Leberschaden und dem akuten Leberversagen bei (Guicciardi & Gores, 2005b; Malhi & Gores, 2008). Im Modell des akuten Leberversagens ist die kritische Rolle der Apoptose unter anderem durch die Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe belegt (Eipel et al., 2007). So konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Apoptose den Leberschaden reduziert (Eipel et al., 2004). Diese experimentelle Beobachtung stimmt mit den klinischen Beobachtungen überein: bei Patienten mit akuter Leberschädigung korrelierte die Immunoreaktivität des M-30-Antigens, eines Markers der hepatozellulären Apoptose, welcher durch die proteolytische Spaltung von Cytokeratin 18 durch die Cleaved-Caspase-3 entsteht, mit dem Schweregrad des Leberschadens (Rutheford et al., 2007). Erhöhtes M-30 geht nicht nur mit einer höheren Freisetzung hepatozellulärer Enzyme, sondern auch mit einer gesteigerten Inflammation bei Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleber einher (Wieckowska et al., 2008). Eine entscheidende Rolle der Apoptose wird somit deutlich und eröffnet neue Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapie verschiedener Lebererkrankungen.

Ein anti-apoptotischer Effekt von Epo konnte in verschiedenen Modellen der akuten Leberschädigung gezeigt werden (Aoshiba et al., 2009; Shimoda et al., 2009; Hochhauser et al., 2008). Die intrazellulären Mechanismen, die zur Reduktion des apoptotischen Zelltodes führen, konnten durch Studien an erythropoetischen Stammzellen genau aufgeklärt werden

(Jelkmann, 2004). Die Steigerung der Erythropoese wird durch die Reduktion der Apoptose vermittelt. Es kommt zur Aktivierung der Janus-Tyrosinkinase 2 (Jak 2) (Kawakami et al., 2001). Das weitere Signal wird durch Transduktionsmoleküle wie dem *Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)*, der *Mitogen Activated Protein-Kinase (MAPK)* sowie der *Protein Kinase B* vermittelt (Ghezzi & Brines 2004). Diese Mechanismen führen zur Heraufregulation der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-Xl (Gregory et al., 1999; Brines & Cerami 2008). Neben dem erythropoetischen System wurde in vielen Organen ein anti-apoptotischer Effekt durch Modulation der o.g. Signalproteine erzielt. Neben der Interaktion mit dem EpoR ist insbesondere die Interaktion von Epo mit dem *common β Rezeptor* von Interesse. Dieser scheint für die zytoprotektive Wirkung von Epo außerhalb des erythropoetischen Systems verantwortlich zu sein (Brines et al., 2001). Es wurde beschrieben, dass Epo außerhalb des Knochenmarks über einen heteromeren Rezeptor, bestehend aus einem Monomer des klassischen EpoR sowie einer Einheit des *common β Receptor*, der nicht nur Epo, sondern auch unter anderem Interleukin-3 und Interleukin-5 bindet, seine Wirkung ausübt. Das Vorhandensein dieses alternativen Wegs, über den Epo seine gewebeprotective Wirkung ausübt, weckte die Idee, rezeptorspezifische Liganden zu entwickeln (Brines, 2010). Das Ziel ist es, eine Reduktion der Apoptose zu erzielen ohne die Hämatopoese zu beeinflussen, um mögliche rheologische Nebenwirkungen durch eine überschießende Hämatopoese nicht zu riskieren. Eine entsprechende Substanz ist das Carbamoyl-Epo (CEPO). Diese Substanz scheint die Hämatopoese nicht zu beeinflussen, jedoch neuroprotective Eigenschaften aufzuweisen (Brines, 2010). CEPO wurde allerdings bisher nur in einigen tierexperimentellen Studien, jedoch nicht klinisch eingesetzt, so dass keine Aussage zur Sicherheit dieser Substanz getroffen werden kann. Eine Wirkung auf die Leber ist bisher nicht beschrieben. Die Evaluation und Weiterentwicklung von Erythropoietinanaloga ist aktuell ein sehr interessanter Gegenstand der Forschung.

Im Gegensatz zum akuten Leberversagen ist die Rolle der Apoptose bei der cholestatischen Schädigung nicht eindeutig geklärt. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass im Modell der Gallengangsligatur die Apoptose eine untergeordnete Rolle spielt. Verschiedene Studien zeigen, dass Gallensäuren, vor allem die Glycin konjugierte Chenodesoxycholsäure, eine Fas-vermittelte Apoptose induzieren können (Myoshi et al., 1999; Faubion et al., 1999; Sodemann et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass *lpr*-Mäuse, welche Fas-Ligand

defizient sind, nach Ligatur des D. choledochus eine geringere Fibrose als Wildtyp-Tiere aufweisen (Canbay et al., 2002). Die Autoren schlussfolgerten, dass eine Reduktion der Apoptose mit einer geringeren Fibrose einhergehen würde. Als Marker der Apoptose wurde dabei jedoch lediglich die TUNEL-Methode angewandt. Eine weitere Arbeitsgruppe (Gujral et al., 2004) wiederholte die Experimente und bestätigte, dass die Leberschädigung in den *lpr*-Mäusen nach der Gallengangligatur weniger stark ausgeprägt war als in den Kontrolltieren. Die Rolle der Apoptose wurde dabei genauer beleuchtet. Überraschenderweise fanden Gujral et al. heraus, dass die Ligatur des D. choledochus zu keiner Erhöhung der Apoptosemarker führt. Die Expression einer Reihe apoptotischer Gene wie Caspase-3, Apo-1, Bcl-2 und FasL waren nicht erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten die Marker der Inflammation, wie TNF- α , TNF-R, IL-6 sowie IL-10, einen signifikanten Anstieg in Wildtyp-, jedoch nicht in *lpr*-Mäusen (Gujral et al., 2004). Daraus folgt, dass das Fehlen des FasL zwar zu einer verminderten Leberschädigung führt, die hepatozelluläre Apoptose jedoch nicht beeinflusst wird. Diese Erkenntnis wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt. Unsere immunhistochemischen Analysen der Cleaved-Caspase-3 bestätigen die zuvor beschriebenen Genexpressionsanalysen. Die TUNEL-Färbung allein scheint nicht adäquat zur Detektion apoptotischer Zellen zu sein. Die Auswertung sollte immer morphologische Kriterien der Apoptose, wie die Zellschrumpfung, die Chromatinkondensation und die Ausbildung apoptotischer Körperchen beinhalten, um nekrotische von apoptotischen Zellen zu differenzieren. Weiterhin sollten die Ergebnisse durch eine zweite Detektionsmethode überprüft werden. Dafür ist die Detektion der Cleaved-Caspase-3 bzw. -7 eine gut geeignete Möglichkeit (Kuribayashi et al., 2006). Weiterhin ist die Verwendung einer Negativ- und Positivkontrolle notwendig.

Eine von der Apoptose unabhängige Zytoprotektion durch DPO ist eine interessante Erkenntnis, da bisher die benefizielle Wirkung von Epo in Schädigungsmodellen der Leber auf die Reduktion der Apoptose zurückgeführt und die Hemmung der Nekrose und Inflammation als sekundäres Ereignis angesehen wurde. Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass Epo-vermittelte Mechanismen existieren, die einen von der Apoptose unabhängigen Schutz vermitteln. Es ist plausibel, dass eine Interaktion mit dem Immunsystem zu einer Reduktion der Zellschädigung geführt hat.

5.2.4 **Antifibrogenetisches Potential von DPO**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass DPO nicht nur den akuten cholestatischen Schaden der Leber reduzieren konnte, sondern auch im chronischen Stadium wirksam war. Sowohl die histomorphometrische Auswertung der Sirius-red-Schnitte als auch die Messung der Expression der Kollagen-(I)- α mRNA zeigten am Tag 14 nach der Gallengangsligatur einen signifikanten Anstieg. Diese fibrotische Antwort wurde durch DPO signifikant reduziert. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten, die die Wirkung von Epo in chronischen Schädigungsmodellen anderer Organe belegen. Im experimentellen Modell des Herzversagens an diabetischen Mäusen wurde vor kurzem eine protektive Wirkung des langwirksamen Erythropoietinanalogs CERA auf die Entwicklung der Kardiomyopathie gezeigt. Die Messung der Expression von Kollagen-Typ-I zeigte eine signifikante Reduktion durch Gabe von CERA (Shushakova et al., 2009). Auch im Modell der Chlorhexidinglukonat-induzierten Peritonealfibrose erwies sich die Gabe von Epo als vorteilhaft. So wurde die Expression von TNF- α und von molekularen Promotoren der Fibrose, wie TGF- β und VEGF, durch Epo reduziert (Mondello et al., 2009). Weiterhin wurde von einer reduzierten Inflammation und Lungenfibrose im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenschädigung durch Epo berichtet (Sigounas et al., 2008). In einem Modell der durch die Obstruktion des Ureters verursachten Nierenschädigung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass Epo die Inflammation und die Expression profibrotischer Marker, wie Kollagen-(I)- α und TGF- β , und damit die Organschädigung inhibiert (Park et al., 2007; Srisawat et al., 2008). Es wird deutlich, dass die Applikation von Epo zu einer Reduktion der fibrotischen Kaskade in einer Vielzahl von Organen führt. Die hier vorgestellten Studien beschreiben eine Reduktion der Inflammation im jeweils betroffenen Organ, die dann in einer geringeren Expression der profibrotischen Mediatoren mündet. Auch unsere Ergebnisse legen nahe, dass insbesondere die frühe Gewebeprotektion durch DPO mit einer Reduktion der Fibrose einhergeht.

Die massive Expression der α -SMA-mRNA schon am Tag 2 nach der BDL spricht dafür, dass die akute cholestatische Schädigung zu einer frühzeitigen Aktivierung der Ito-Zellen führt und unterstreicht den Zusammenhang zwischen der Nekroinflammation und der Aktivierung der profibrotischen Kaskade. Die signifikante Reduktion der Genexpression von

α -SMA durch DPO könnte somit auf die verminderte Nekroinflammation zurückgeführt werden.

Allerdings ist auch eine direkte Interaktion von DPO mit den Ito-Zellen bzw. den Myofibroblasten der Leber denkbar. *In vitro* Studien an Myofibroblasten des Herzens zeigten, dass Epo die Kollagenexpression dieser Zellen nach Aktivierung durch Angiotensin II inhibiert und somit deren Aktivierung verhindert (Zhang et al., 2008). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Epo die *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT) der Epithelzellen der Nieren *in vitro* hemmt (Park et al., 2007). So wurde die Expression von α -SMA und Vimentin als Marker mesenchymaler Zellen sowie die Phosphorylierung von Smad 2 durch Epo inhibiert. Da die EMT auch an der Pathogenese der Leberfibrose beteiligt sein könnte (Choi & Diehl, 2009, Popov & Schuppan, 2010), müssen weitere Studien zeigen, inwieweit DPO diesem Prozess entgegenwirkt und so zur Reduktion der Fibrose führt.

Die Frage, ob DPO direkt über die Interaktion mit den Fibroblasten oder indirekt über die Protektion des Gewebes die Ausbildung der Fibrose hemmt, kann nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden. Zur Beantwortung dieser Frage sind weitere *in vitro* Experimente durch unsere Arbeitsgruppe vorgesehen, die eine direkte Wirkung von Epo auf isolierte primäre Ito-Zellen evaluieren sollen.

5.2.5 *Die Beeinflussung des TGF- β Signalwegs durch DPO*

TGF- β ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der sowohl die Aktivierung als auch die Progression der Fibrose fördert. TGF- β wird bei chronischer Leberschädigung von nicht-parenchymatösen Zellen produziert und fördert die Proliferation der Ito-Zellen. 14 Tage nach Gallengangsligatur stieg die mRNA-Expression von TGF- β 1 signifikant an. Auch in den DPO-behandelten Tieren wurde ein Anstieg beobachtet. Dieser war zwar im Vergleich zu den Kontrolltieren um 25 % erniedrigt, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Da TGF- β über verschiedene engmaschig kontrollierte intrazelluläre Wege unterschiedliche biologische Wirkungen entfalten kann, haben wir das Augenmerk auf die intrazelluläre TGF- β -Signaltransduktion gelegt. Die Gallengangsligatur ging mit einem signifikanten Anstieg von Smad 3 und Smad 4, jedoch nicht von Smad 2 einher. Uemura et al. (2005) haben berichtet, dass Smad 2 und Smad 3 unterschiedliche Rollen in der Transduktion des TGF- β Signals in Ito-Zellen spielt. Es wurde herausgefunden, dass Smad 2 und 3 voneinander unabhängige Signale induzieren können. Smad 3 scheint eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung, Chemoattraktion und Migration der Ito-Zellen zu spielen. Im Gegensatz dazu mediiert Smad 2 vornehmlich inhibitorische Signalwege (Uemura et al., 2005). Weiterhin wurde die entscheidende Rolle von Smad 3 in der TGF- β -vermittelten Repression der Produktion der MMP-1 in dermalen Fibroblasten beschrieben, während Smad 2 hierbei nicht involviert zu sein scheint (Yuan et al., 2001). Auch nach der Gallengangsligatur in Ratten zeigte sich nur eine Aktivierung von Smad 3, während Smad 2 nicht moduliert war (Seyhan et al., 2006). Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle von Smad 3 in der Fibrogenese und gehen mit unseren mRNA-Analysen einher. Interessanterweise führte die Applikation von DPO zu einer Veränderung des Musters der Smad-Expression. In der DPO-Gruppe wurde 14 Tage nach der Gallengangsligatur Smad 2 signifikant hochreguliert, während Smad 3 und Smad 4 im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen nicht signifikant verändert vorlagen. Die Modulation der Smad-mRNA-Expression in Richtung der eher antiproliferativen Smad 2 Expression ist ein möglicher Hinweis dafür, dass DPO die Expression der im TGF- β -Signalweg beteiligten Moleküle in Richtung einer Proliferationshemmung moduliert.

Wir untersuchten weiterhin die Expression der Smad 7-mRNA. Die Ligatur des D. choledochus induzierte eine signifikante Hochregulation der Smad 7-mRNA 14 Tage post operationem. Die Behandlung mit DPO reduzierte diesen Anstieg signifikant. Dooley et al. (2003) beschrieben, dass der adenovirale Gentransfer von Smad 7 zu einer Reduktion der Fibrose nach der Gallengangligatur führt. Allerdings beschrieb dieselbe Arbeitsgruppe auch einen physiologischen Anstieg von Smad 7 nach Gallengangligatur, der die Fibroseprogression nicht inhibiert (Seyhan et al., 2006). Dabei handelt es um einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der in seiner Stärke jedoch zu niedrig ist, um das aktive Signal adäquat zu hemmen. Daher kann die Expression der Smad 7-mRNA in unserer Studie eher als ein Marker der Fibrose bzw. einer aktiven profibrotischen Signaltransduktion angesehen werden. DPO konnte die Überexpression signifikant reduzieren, was als Zeichen einer gehemmten profibrotischen Kaskade interpretiert werden kann.

Um sicherzustellen, dass die Expression von Smad 7 die Phosphorylierung der R-Smads nicht beeinflusst, wurde die phosphorylierte Form der Proteine mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Kochsalz- und DPO-behandelten Tieren festgestellt. Dies bestätigt die Hypothese, dass die reaktive Aktivierung von Smad 7 die Phosphorylierung von Smad 2 und Smad 3 nicht entscheidend beeinflusst. Wir beobachteten eine Herunterregulation von Smad 3 im Verlauf nach der Gallengangligatur. Dies steht im Gegensatz zu einer früheren Studie, die eine Heraufregulation der Phosphorylierung in Ratten nach der Gallengangligatur beschreibt (Seyhan et al., 2006). Dieser Unterschied ist überraschend und bedarf weiterer Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung könnte eine unterschiedlich Signaltransduktion in den beiden Tierspezies sein. Es ist möglich, dass die von Georgiev et al. (2008) beschriebene Stagnation der Fibrogenese in Mäusen ab der 3. Woche nach der Gallengangligatur mit einer geringeren Smad 3-Aktivierung zu erklären ist. Es ist interessant, dass die Aktivierung der Transkription des Smad 3-Gens nicht mit einem Anstieg der Aktivierung auf Protein-Niveau einherging. Möglicherweise ist eine posttranslationale Modifikation hierfür verantwortlich. Es wäre denkbar, dass Mäuse physiologischerweise über effektivere Mechanismen verfügen, den Smad-Signalweg zu inhibieren. Die Reduktion der Phosphorylierung von Smad 3 ist eventuell eine Erklärung für die Stagnation der Fibrogenese in Mäusen, jedoch nicht in Ratten ab der 3. Woche nach Gallengangligatur. Die Tatsache,

dass auch innerhalb der ersten 2 Wochen keine Erhöhung der Phosphorylierung von Smad 2 und Smad 3 vorlag, sich jedoch eine klare Fibrose nach 2 Wochen zeigte, spricht dafür, dass andere profibrotische Signalwege in der Maus von höherer Relevanz zu sein scheinen.

Wir konnten zeigen, dass die Applikation von DPO die Heraufregulation diverser profibrotischer Gene, wie Kollagen-(I)- α , α -SMA, TGF- β Smad 3 und Smad 7, inhibiert. Für Kollagen-(I)- α konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des Gens auch mit einer Reduktion der Kollagenablagerung einhergeht. Für Smad 3 zeigte sich hingegen ein Unterschied zwischen der Expression auf mRNA-Niveau und der Aktivität auf Proteinebene. Die Regulation der Genexpression von Smad 3 ist trotzdem von Interesse, weil diese, neben anderen untersuchten Genen, ein Hinweis dafür ist, dass DPO insgesamt zu einem Fibrose-hemmenden Expressionsmuster geführt hat. Es ist wahrscheinlich, dass die Expression weiterer Signaltransduktionsmoleküle durch DPO beeinflusst wurde. Insbesondere die MAP-Kinase, die auch als Signaltransduktionsmolekül von TGF- β im Verlauf der Fibrogenese der Leber fungiert (Khimji et al., 2008), könnte durch DPO beeinflusst worden sein. Es sind noch weitere mögliche Smad-unabhängige TGF- β Signalwege beschrieben und umfassen die Aktivierung von GTPase Ras, ERK, p38 und c-Jun N-terminalen Kinasen (Moustakas & Heldin 2005).

Andere Wachstumsfaktoren, wie PDGF und CTGF, sind entscheidend in den Prozess der Fibrose involviert. Es konnte gezeigt werden, dass diese u. a. durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α reguliert werden (Higgins et al., 2004). Kimura et al. (2008) konnten zeigen, dass HIF-1 α entscheidend an der Fibrogenese der Niere beteiligt ist. Die Hemmung von HIF-1 α führte dabei zu einer deutlichen Reduktion der Nierenfibrose, während die stabile Expression von HIF-1 α eine Verstärkung der Fibrogenese zur Folge hatte (Kimura et al., 2008). Weiterhin zeigten Moon et al. (2009), dass HIF-1 α -Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach der Ligatur des Ductus choledochus eine signifikant geringere Kollagenproduktion und Expression von α -SMA aufweisen. Eine Arbeit von Copple et al. (2010) beschäftigte sich mit der Aktivierung von HIF-1 α in den Ito-Zellen. Dabei berichteten die Autoren über HIF-1 α abhängige Mechanismen in den Ito-Zellen, die hypoxie-bedingt zur Kollagenproduktion und Angiogenese führen. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Ligatur des Ductus choledochus zu einer Überexpression von HIF-1 α führt (Abschnitt

5.4). Eine Erklärung für die Überexpression könnte die lokale Hypoxie sein. Es ist bekannt, dass eine Verletzung der Leber mit einer mikrovaskulären Desorganisation und lokaler Gewebhypoxie einhergeht (Rosmorduc & Housset, 2010). Die vielfältigen Effekte der Hypoxie werden u. a. über HIF-1 α mediiert. die hypoxiebedingte Aktivierung von HIF-1 α scheint nicht nur für die akute Zellschädigung sondern auch für die Inflammation sowie die Stimulation der Fibrogenese, Angiogenese und sogar die Karzinogenese ein entscheidender Stimulus zu sein (Rosmorduc & Housset, 2010). Auch die hepatozelluläre EMT wird durch die Hypoxie stimuliert (Copple, 2010). Interessanterweise konnten wir zeigen, dass die mit DPO behandelten Tiere eine - verglichen mit Kontrolltieren - geringere Expression von HIF-1 α aufwiesen. Dies spricht dafür, dass die lokale Hypoxie durch DPO reduziert werden konnte. Diese Tatsache könnte wiederum eine Erklärung für die reduzierte profibrotische Kaskade in DPO behandelten Tieren sein. Eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung der Leber könnte einerseits durch einen Anstieg der Sauerstoffträger und andererseits durch eine bessere Perfusion bedingt sein. Für beides geben unsere Ergebnisse deutliche Hinweise. Wir konnten zeigen, dass DPO signifikant dem Abfall der Parameter der roten Blutzellreihe entgegenwirkt und somit die Sauerstoffversorgung der Leber verbessert. Auf der anderen Seite könnte die Reduktion Gallengangsligatur-induzierter Inflammation zur Perfusionsverbesserung beigetragen haben. Die intravitalmikroskopische Untersuchung von Mäusen 12 h nach Ligatur des D. choledochus offenbarte eine starke Erhöhung nicht-perfundierter Sinusoide von 5 % auf 39 %, was durch eine Zunahme die Leuko- und Trombozytenadhäsion in den Sinusoiden erklärt wurde (Laschke et al., 2008). Weiterhin konnte mittels in vivo-Floureszenzmikroskopie gezeigt werden, dass im Modell der akuten Leberschädigung die Gabe von DPO zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation führte (Le Minh et al., 2008). Es ist denkbar, dass die pleiotropen gewebeprotectiven Effekte von DPO auch im Modell der Ligatur des D. choledochus zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation und dadurch zur Reduktion der Hypoxie-assoziierten Folgen geführt haben.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zeigen erstmals die pleiotropen gewebeprotectiven Effekte von DPO im Modell der Cholestase. Es konnte sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium der cholestatischen Lebeschädigung ein Vorteil durch die Behandlung mit DPO aufgezeigt werden.

Vom klinischen Interesse ist der Effekt von DPO auf den Cholestase-induzierten Abfall der Parameter der roten Blutzellreihe. Die hämatopoetische Wirkung von Epo könnte im Rahmen der Behandlung der chronischen Lebererkrankungen von Interesse sein. Die Anämie ist ein negativer prognostischer Faktor bei Patienten mit Lebererkrankungen (Orrego et al., 1983) Auch auf die Lebensqualität von Patienten mit Leberzirrhose kann sich eine Anämie negativ auswirken (Les et al., 2008). Ein beschriebenes Einsatzfeld für Epo-Analoga ist die therapieinduzierte Anämie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C (Dieterich et al., 2003). Interessanterweise führte in einer Phase II-Studie die Therapie der Anämie bei Patienten, die einer antiretroviralen Therapie einer Hepatitis C mit DPO unterzogen wurden, zu einer signifikanten Verbesserung der Lebensqualität, wobei keine signifikante Erhöhung an Nebenwirkungen beobachtet wurde (Younossi et al., 2008). Sowohl experimentelle Beobachtungen (Lindenblatt et al., 2007) als auch klinische Daten (Gallegos-Orozco et al., 2008) belegen, dass die befürchtete Risikoerhöhung für thrombotische Ereignisse durch Gabe von Epo-Analoga ausgeblieben ist. Die Wirksamkeit und Sicherheit einer Therapie der Anämie mit DPO bei Patienten mit cholestatischen Lebererkrankung erscheint vielversprechend und sollte durch weitere klinische Studien verifiziert werden.

Die Therapie mit DPO führte zu einer Reduktion der Leberschädigung. Die akute Nekrose und Inflammation wurden durch DPO deutlich reduziert. Die Aktivierung der fibrotischen Kaskade wurde durch DPO weiterhin beeinflusst. Diese Ergebnisse könnten von Interesse für die klinische Forschung sein. Sowohl für Patienten mit akuter als auch mit chronischer Schädigung der Leber könnte Epo als innovativer Therapieansatz durch klinische Studien untersucht werden.

Die Komplexität des Zusammenspiels verschiedener Zellfraktionen in der Leber macht es schwierig, den entscheidenden Mechanismus der DPO-Wirkung zu benennen. Es gibt viele Hinweise, dass DPO indirekt durch die Modulation der Inflammation gewebeprotectiv wirkt. Der Reduktion der Gewebhypoxie durch DPO ist eine besondere Relevanz beizumessen, da durch Hypoxie lokale Mechanismen aktiviert werden, die sowohl die Inflammation als auch die Fibrose entscheidend fördern.

Inwieweit eine Interaktion mit verschiedenen Zellarten der Leber besteht, ist ebenso von großem Interesse. Es ist bisher nicht gelungen, eine direkte Wirkung von Epo auf Hepatozyten nachzuweisen (Bramey et al., 2009). Eine Interaktion mit Kupffer-Zellen als entscheidende Fraktion ortständiger Immunzellen der Leber ist zu erwarten und sollte in weiteren Untersuchungen evaluiert werden. Ebenso ist ein direkter Einfluss auf die Ito-Zellen vor allem im Hinblick auf den Prozess der Fibrogenese denkbar. Vorstellbar sind aber auch Modifikationen neuerer in die Fibrogenese involvierter Mechanismen, wie der EMT und der Rekrutierung von Fibroblasten aus dem Stammzellpool.

Die pleiotropen, gewebeprotectiven Mechanismen von DPO zeigten sich nicht nur auf dem molekularen Niveau, sondern führten zu einem verlängerten Überleben der Tiere. Dies ist sicherlich vom höchsten klinischen Interesse. Dieses Ergebnis sollte Anstoß für klinische Studien mit Epo bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen sein. Die Frage, ob die experimentellen Ergebnisse sich auch klinisch bestätigen, kann nur durch randomisierte kontrollierte Studien beantwortet werden.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Schematische Darstellung der Fibrogenese der Leber
- Abb. 2 Schematische Darstellung der Signaltransduktion von TGF- β /Smad (modifiziert nach Inagaki & Okazaki, 2007)
- Abb. 3 3-D Strukturdarstellung von Erythropoietin (Abbildungsquelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=11188>; (22.05 2009))
- Abb. 4 Schematische Darstellung der Erythropoese (modifiziert nach http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/Complements/g09_comp56.htm; (04. 12.2009))
- Abb. 5 Schematische Darstellung zellulärer Signaltransduktion von Epo nach Bindung an den Epo-Rezeptor (modifiziert nach Maiese et al., 2004)
- Abb. 6 Abbildungen H&E-gefärbter Schnitte muriner Lebern
- Abb. 7 Abbildungen Sirius-Red-gefärbter Schnitte muriner Lebern
- Abb. 8 Prinzip histomorphometrischer Auswertung
- Abb. 9 Abbildungen von Schnitten muriner Lebern nach Aufarbeitung mittels TUNEL
- Abb. 10 Abbildung eines Schnittes muriner Leber nach immunhistochemischer Detektion von Cleaved-Caspase-3
- Abb. 11 Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration
- Abb. 12 Repräsentative Abbildungen von Schnitten muriner Lebern nach immunhistochemischer Detektion von HIF-1 α
- Abb. 13 Plasmaaktivitäten von ALT und GLDH
- Abb. 14 Plasmakonzentration von Bilirubin
- Abb. 15 Histomorphometrische Auswertung von Galleninfarkten sowie histologische Darstellung von Galleninfarkten in H&E -gefärbten Schnitten muriner Lebern

- Abb. 16 Repräsentative Abbildungen von Schnitten muriner Lebern nach immunhistochemischer Detektion von f4/80
- Abb. 17 Repräsentative Abbildungen von Schnitten muriner Lebern nach TUNEL sowie immunhistochemischer Detektion von Cleaved-Caspase-3
- Abb. 18 Darstellung histomorphometrischer Auswertung der mit Sirius-red gefärbten Leberschnitte sowie der relativen Expression der Kollagen-(I)- α -mRNA im Lebergewebe. Repräsentative Abbildungen der mit Sirius-red angefärbten murinen Leberschnitte
- Abb. 19 Darstellung der Expression der α -SMA-mRNA
- Abb. 20 Darstellung der Expression der TGF- β 1-mRNA
- Abb. 21 Darstellung der Expression der Smad 2, 3, 4 und 7-mRNA
- Abb. 22 Darstellung der Proteinexpression von phospho-Smad 2 und phospho-Smad 3
- Abb. 23 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Tiere nach Ligatur des Ductus choledochus und Applikation von NaCl bzw. DPO

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, Collin M, Patel NS, Yaqoob MM, Thiemermann C. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock* 2004; 22: 63–69

Aoshiba K, Onizawa S, Tsuji T, Nagai A. Therapeutic effects of erythropoietin in murine models of endotoxin shock. *Crit Care Med.* 2009; 37: 889–898

Arguedas MR, Abrams GA, Krowka MJ, Fallon MB. Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation. *Hepatology.* 2003; 37:192–197

Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 279: G245–G249

Auerbach M, Silberstein PT, Webb RT, Averyanova S, Ciuleanu TE, Shao J, Bridges K. Darbepoetin alfa 300 or 500 µg once every 3 weeks with or without intravenous iron in patients with chemotherapy-induced anemia. *Am J Hematol.* 2010; 85: 655-663

Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage, *Eur. J. Immunol.* 1981; 11: 805–815

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 209–221

Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology.* 2005; 42: 44–52

Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver—Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 447–455

Bosch J, Garcia-Pagan JC. Prevention of variceal rebleeding. *Lancet*. 2003; 361: 952–995

Bramey T, Freitag P, Fandrey J, Rauen U, Pamp K, Erhard J, Frede S, de Groot H, Petrat F. No evidence for protective erythropoietin alpha signalling in rat hepatocytes. *BMC Gastroenterology*. 2009; 9: 26

Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med*. 2001; 344: 495–500

Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol*. 2006; 44: 57–66

Brines M, Cerami A Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med*. 2008; 264: 405–432

Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 14907–14912

Brines M. The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif*. 2010; 29: 86–92

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 10526–10531

Bruno CM, Neri S, Sciacca C, Bertino G, Di Prima P, Cilio D, Pellicano R, Caruso L, Cristaldi R. Plasma erythropoietin levels in anaemic and non-anaemic patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1353–1356

Butterworth RF. Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2000; 32(1 Suppl): 171–180

Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, Bronk SF, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308: 1191–1196.

Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology.* 2003; 38: 1188-1198

Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology.* 2002; 123: 1323–1330

Carnot P, De Flandre C. Sur l'activite hemopoietique de serum au cours de la regeneration du sang. *C R Acad Sci (Paris).* 1906; 143: 384–386

Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagioglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 2258–2263

Chang ML, Yeh CT, Chang PY, Chen JC. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 4167–4172

Chatterjee PK. Pleiotropic renal actions of erythropoietin *Lancet.* 2005; 365: 1890–1892

Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, Egrie J, Harvey TS NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation *Nat. Struct. Biol.* 1998; 5: 861–866

Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*. 2009; 50: 2007-2013

Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22: 503-514

Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taurá P, Fuster J, García-Valdecasas JC, Lacy A, Suárez MJ, Rimola A, Rodés J. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2001; 34: 32-37

Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med*. 2005; 117: 237-250

Copple BL, Bai S, Burgoon LD, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the expression of genes in hypoxic hepatic stellate cells important for collagen deposition and angiogenesis. *Liver Int*. 2010 Sep 29 [Epub ahead of print]

Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int*. 2010; 30: 669-682

Cuzzocrea S, Mazzon E, di Paola R, Genovese T, Patel NS, Britti D, de Majo M, Caputi AP, Thiemermann C. Erythropoietin reduces the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 940–950

Dienes HP. Definition und Diagnostik der akuten und chronischen Hepatitis C. *Z Gastro*. 2004; 42: 705-706

Dieterich DT, Wasserman R, Bräu N, Hassanein TI, Bini EJ, Bowers PJ, Sulkowski MS. Once-weekly epoetin alfa improves anemia and facilitates maintenance of ribavirin dosing in hepatitis C virus-infected patients receiving ribavirin plus interferon alfa. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98: 2491-2499

Dold S, Laschke MW, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *Br J Pharmacol.* 2009; 156: 466-474

Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology.* 2003; 125: 178-191

Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer.* 2001; 84 Suppl 1: 3-10

Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286: G769-G776

Eipel C, Kidess E, Abshagen K, Leminh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol.* 2007; 151: 406-413

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 2004; 127: S35–S50

Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest.* 1999; 103: 137–145

Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update *Exp Biol Med (Maywood).* 2003; 228: 1-14

Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 8681-8615

Friedman SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev.* 2008; 88: 125-172

Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J. Hepatol.* 2003; 38 (Suppl. 1): S38–S53

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008; 134: 1655-1669

Gallegos-Orozco JF, Werner KT, Rosati M, Byrne TJ, Balan V, Vargas HE, Rakela J. Erythropoietin does not increase the frequency of thromboembolic events or hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients treated with combination antiviral therapy. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103: 2161-2162

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007; 14: 1237-1243

Gaskari SA, Honar H, Lee SS. Therapy insight: Cirrhotic cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006; 3: 329–337

Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation *Br J Surg.* 2008; 95: 646-656

Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ.* 2004; 11: S37-44

Ghiassi-Nejad Z, Friedman SL. Advances in antifibrotic therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008; 2: 803-816

Gines P, Guevara M, Arroyo V, Rodes J. Hepatorenal syndrome. *Lancet.* 2003; 362: 1819-1827

Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating Bcl-xL expression. *Blood*. 1999; 94: 87-96

Gressner AM, Yagmur E. Pathogenetic, Therapeutic and Diagnostic aspects of Hepatic Fibrosis. *J Lab Med* 2003; 27: 423-430

Gressner AM. Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. *Gut*. 1994; 35: 1331-1333

Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. J. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jul; 23: 1024-1035

Guha IN, Iredale JP. Clinical and diagnostic aspects of cirrhosis. *Textbook of Hepatology: from science to clinical practice - 3rd edition*. Rodes J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M. (Editors) 2007. Wiley-Blackwell publishing

Guicciardi ME, Gores GJ, (a). Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed? *J Hepatol*. 2005; 42: 297-300

Guicciardi ME, Gores GJ, (b). Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005; 54: 1024-1033

Gujral JS, Liu J, Farhood A, Jaeschke H. Reduced oncotic necrosis in Fas receptor-deficient C57BL/6J-lpr mice after bile duct ligation. *Hepatology*. 2004; 40: 998-1007

Hassner A, Kletter Y, Shlag D, Yedvab M, Aronson M, Shibolet S. Impaired monocyte function in liver cirrhosis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981; 282: 1262-1263

Herold G. *Innere Medizin*. 2010. Gerd Herold Köln

Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I. Bone marrow-derived cells express matrix metallo-

proteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2007; 45: 213–222

Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F1223–F1232

Hochhauser E, Pappo O, Ribakovsky E, Ravid A, Kurtzwald E, Cheporko Y, Lelchuk S, Ben-Ari Z. Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model. *Apoptosis*. 2008; 13: 77-86

Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology*. 2005; 128: 138-146

Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56: 284–292

Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ*. 2003; 327: 143–147

Iredale JP. Models of liver Fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J clin invest*. 2007; 117: 539-548

James J, Bosch KS, Zuyderhoudt FM, Houtkooper JM, van Gool J Histophotometric estimation of volume density of collagen as an indication of fibrosis in rat liver. *Histochemistry*. 1986; 85: 129-133

Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med*. 2004; 43: 649-659

Joyeux-Faure M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 323: 759-762

Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 10659–10664

Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Büschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol*. 1999; 276: G1059-G1068

Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem*. 2001; 276: 39469-39475

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-257

Khimji AK, Shao R, Rockey DC. Divergent transforming growth factor-beta signaling in hepatic stellate cells after liver injury: functional effects on ECE-1 regulation. *Am J Pathol*. 2008; 173: 716-727

Kimura K, Iwano M, Higgins DF, Yamaguchi Y, Nakatani K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Rankin EB, Neilson EG, Haase VH, Saito Y. Stable expression of HIF-1alpha in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295: F1023-F1029

Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22 Suppl 1: S73-S78.

Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006; 45: 429-438

Knittel, T, Janneck T, Muller L, Fellmer P, and Ramadori. G. Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. *Hepatology*. 1996; 24: 352-360

Koli K, Saharinen J, Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech.* 2001; 52: 354-362

Kuntz E, Kuntz HD *Hepatology Textbook and Atlas* 3rd edition; 2008; Springer Berlin

Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biol Ther.* 2006; 5: 763-765

Laschke MW, Dold S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Platelet-dependent accumulation of leukocytes in sinusoids mediates hepatocellular damage in bile duct ligation-induced cholestasis. *Br J Pharmacol.* 2008; 153: 148-156

Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol.* 2007; 170: 1954-1963

Lee SS. Cardiac abnormalities in liver cirrhosis. *West J Med.* 1989; 151: 530-535

Leon DA, McCambridge J. Liver cirrhosis mortality rates in Britain, 1950 to 2002. *Lancet* 2006; 367: 52-56

Les I, Doval E, Flavià M, Jacas C, Cárdenas G, Esteban R, Guardia J, Córdoba J. Quality of life in cirrhosis is related to potentially treatable factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Sep 29 [Epub ahead of print]

Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 7580-7584

Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B. Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through

platelet and endothelial cell deactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1191-1198

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003; 362: 1907–1917

Luo YH, Li ZD, Liu LX, Dong GH. Pretreatment with erythropoietin reduces hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009; 8: 294-299.

Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA.* 2005; 293: 90-95

Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25: 577-583

Malhi H, Gores GJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury *Gastroenterology.* 2008; 134: 1641-1654

Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1977; 252: 5558–5564

Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology.* 1999; 117: 669-677

Mondello S, Mazzon E, Di Paola R, Crisafulli C, Italiano D, Buemi M, Aloisi C, Cuzzocrea S. Erythropoietin suppresses peritoneal fibrosis in rat experimental model. *Eur J Pharmacol.* 2009; 604: 138-149

Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, Copple BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296: G582-G592

Moustakas A, Heldin C-H. Dynamic control of TGF- β signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2008; 582: 2051-2065

Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 2005; 118: 3573-3784

Navasa M, Fernández J, Rodés J. Bacterial infections in liver cirrhosis. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1999; 31: 616-625

Niederau C. Indikationsstellung zur Therapie der chronischen Hepatitis B und D. *Z Gastro.* 2004; 42: 682-686

Orrego H, Israel Y, Blake JE, Medline A. Assessment of prognostic factors in alcoholic liver disease: toward a global quantitative expression of severity. *Hepatology* 1983; 3: 896-905

Park SH, Choi MJ, Song IK, Choi SY, Nam JO, Kim CD, Lee BH, Park RW, Park KM, Kim YJ, Kim IS, Kwon TH, Kim YL. Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 1497-1507

Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiernemann C. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int* 2004; 66: 983–989

Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 4445-4451

Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest.* 1992; 90: 642-646

Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin. Immunopathol.* 1999; 21: 475–490

Popov Y, Schuppan D. Epithelial-to-mesenchymal transition in liver fibrosis: dead or alive? *Gastroenterology.* 2010; 39: 722-725

Reichen J. The Role of the Sinusoidal Endothelium in Liver Function. *News Physiol Sci.* 1999; 14: 117-121

Robertson H, Kirby JA, Yip WW, Jones DEJ, Burt AD. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2007; 45: 977–981

Roggendorf M, Ross S. Definition und Diagnose der akuten und chronischen Hepatitis B. *Z Gastro* 2004; 42: 679-681

Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis.* 2010; 30: 258-270

Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2006; 130: 1807-1821

Rutherford AE, Hynan LS, Borges CB, Forcione DG, Blackard JT, Lin W, Gorman AR, Shaikh OS, Reuben A, Harrison E, Reddy KR, Le WM, Chung RT; ALF Study Group. Serum apoptosis markers in acute liver failure: a pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5: 1477-1483

Saadeh S. Nonalcoholic Fatty liver disease and obesity. *Nutr Clin Pract.* 2007; 22: 1-10

Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology.* 2000; 118: 1157-1168

Schaffner F, Popper H. Capillarisation of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology.* 1963; 44: 239-242

Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int.* 2006; 26: 904-911.

Schenk P, Schoniger-Hekele M, Fuhrmann V, Madl C, Silberhumer G, Müller C. Prognostic significance of the hepatopulmonary syndrome in patient with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003; 125: 1042-1052

Schmidt ES, Schmidt FW. Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme. *Clin Chim Acta*. 1988; 173: 43-55

Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2010; 139: 987-998

Schultz C, Zimmer J, Hartel C, Rupp J, Temming P, Strunk T. Attenuation of monocyte proinflammatory cytokine responses to *Neisseria meningitidis* in children by erythropoietin. *Clin Exp Immunol* 2008; 154: 187-191

Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008; 371: 838-851

Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiemermann C, Mota-Filipe H. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemiareperfusion injury in the rat. *Transpl Int*. 2006; 19: 919–926

Seyhan H, Hamzavi J, Wiercinska E, Gressner AM, Mertens PR, Kopp J, Horch RE, Breitkopf K, Dooley S. Liver fibrogenesis due to cholestasis is associated with increased Smad7 expression and Smad3 signaling. *J Cell Mol Med*. 2006; 10: 922-932

Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, Mori S, Kijima H, Okada T, Kubota K. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model. *Hepatogastroenterology*. 2009; 56: 470-475

Shushakova N, Park JK, Menne J, Fliser D. Chronic erythropoietin treatment affects different molecular pathways of diabetic cardiomyopathy in mouse. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39: 755-760

Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis.* 2005; 23: 264-274

Sigounas G, Salleng KJ, Mehlhop PD, Sigounas DG. Erythropoietin ameliorates chemotherapy-induced fibrosis of the lungs in a preclinical murine model. *Int J Cancer.* 2008; 122: 2851-2857

Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 278: G992–G999

Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, Saitta A, Caputi AP. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 482–488

Srisawat N, Manotham K, Eiam-Ong S, Katavetin P, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S. Erythropoietin and its non-erythropoietic derivative: do they ameliorate renal tubulointerstitial injury in ureteral obstruction? *Int J Urol.* 2008; 15: 1011-1017.

Strunk T, Hartel C, Temming P, Matzke N, Zimmer J, Schultz C. Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatr.* 2008; 97: 16-20

Tacke F, Schöffski P, Luedde T, Meier PN, Ganser A, Manns MP, Trautwein C. Analysis of factors contributing to higher erythropoietin levels in patients with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 2004; 39: 259-266

Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 2004; 18: 1176-1199

Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2003; 83: 633-671

Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1217-1227

Uemura M, Swenson ES, Gaça MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cel.* 2005; 16: 4214-4224

Um M, Gross AW, Lodish HF. A “classical” homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal.* 2007; 19: 634–645

Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.* 2003; 198: 971-975

Villano S, Vlahov D, Nelson K, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology.* 1999; 29: 908-914

Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009; 89: 1269-1339

Wagner M, Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Silbert D, Tsybrovskyy O, et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 825–838

Wallace K, Burt, AD, Wright MC. Liver Fibrosis. *Biochem J.* 2008; 411: 1-18

Wanless, I.R., Nakashima, E., and Sherman, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000.; 124: 1599–1607

Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2006; 44: 27-33

Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology.* 2006; 44: 521-526

Yang YY, Lin HC, Lee WC, Huang YT, Hou MC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Plasma erythropoietin level in patients with cirrhosis and its relationship to the severity of cirrhosis and renal function. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 18: 1156-161

Yazihan N, Karakurt O, Ataoglu H. Erythropoietin reduces lipopolysaccharide-induced cell damage and midkine secretion in U937 human histiocytic lymphoma cells. *Adv Ther* 2008; 25: 502–514

Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology.* 2000; 32: 1248-1254

Younossi ZM, Nader FH, Bai C, Sjogren R, Ong JP, Collantes R, Sjogren M, Farmer D, Ramsey L, Terra K, Gujral H, Gurung C, Srishord M, Fang Y. A phase II dose finding study of darbepoetin alpha and filgrastim for the management of anaemia and neutropenia in chronic hepatitis C treatment. *J Viral Hepat.* 2008; 15: 370-378

Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development.* 2002; 129: 505-516

Yuan W, Varga J Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem.* 2001; 276: 38502-38510

Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 23337–23347

Zhang XJ, Ma YX, Wen Y, Xu XJ. Erythropoietin suppresses the expressions of TGF-beta1 and collagen in rat cardiac fibroblasts induced by angiotensin II. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2008; 36: 636-640

Zollner G., Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol.* 2009; 156: 7–27

8 DANKSAGUNG

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation entstanden am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock. Ich möchte mich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchführen zu können. Die exzellente fachliche Betreuung war eine entscheidende Voraussetzung für den Erfolg dieser Arbeit. Neben dem tiefen Fachwissen wusste sie, die richtigen Worte zu jeder Situation zu finden, um meine Motivation für die vorliegende Arbeit, aber auch Begeisterung für die experimentelle Forschung generell, zu entfachen und auch in schwierigen Situationen nie zu verlieren. Die Zusammenarbeit hat mich fachlich und auch menschlich geprägt. Weiterhin möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an verschiedenen Kongressen bedanken.

Großer Dank gilt Herrn Dr. Christian Eipel für die intensive fachliche und menschliche Betreuung. Die konstruktive Kritik und zahlreiche fachliche Anregungen haben diese Arbeit wesentlich beeinflusst. Ich danke ihm dafür, dass sich er immer Zeit für mich genommen hat und ein zuverlässiger Ansprechpartner war.

Ich möchte mich weiterhin bei Frau Dr. Kerstin Abshagen und Herrn Dr. Nikolai Siebert für ihre fachliche Unterstützung, insbesondere im Hinblick auf die molekularbiologischen Untersuchungen, bedanken.

Für die stets gutgelaunte Hilfsbereitschaft und wertvolle technische Assistenz in allen Belangen des Laboralltags möchte ich mich bei Frau Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz und Maren Nerowski herzlich bedanken. Aber auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie danke ich für die Unterstützung sowie für die Schaffung einer angenehmen, freundlichen Arbeitsatmosphäre.

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Michael Sigal

Geburtsdatum: 02.03.1984

Studium:

10/2004: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock

09/2006: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

11/2010: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Publikationen:

Originalarbeit:

Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- α inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. Lab Invest. 2010; 90: 1447-1456

Zitierfähige Abstracts:

Sigal M, Siebert N, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin-alpha inhibits the perpetuation of necro-inflammation and attenuates the progression of cholestatic fibrosis in mice. Langenbecks Arch Surg. 2009; 394: 943

Sigal M, Siebert N, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin-alpha inhibits the perpetuation of necro-inflammation and attenuates the progression of cholestatic fibrosis in mice. Am J Hematol. 2009; 84: E13

Krimmling T, Sigal M, Zechner D, Vollmar B, Eipel C. Hydrogen sulfide has no effect on cholestasis and fibrogenesis after biliary obstruction in mice. Langenbecks Arch Surg. 2010; 395: 826

Kongressbeitrag:

Sigal M, Siebert N, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- α verringert die Nekroinflammation und mildert die cholestatische Fibrose in Mäusen. Chirurgisches Forum und DGAV-Forum 2010 für Experimentelle und Klinische Forschung. Chir. Forum 39; 2010: 203