

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. M.D. Menger)**

**DIE HÄMOXYGENASE-1  
- BEDEUTUNG BEI DER MANIFESTATION DES  
CHOLESTATISCHEN LEBERSCHADENS SOWIE  
VERGLEICH DER FUNKTIONELLEN INHIBITION DURCH  
VERSCHIEDENE METALLOPORPHYRINE**

als Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2011

vorgelegt von:

**Kathrin Abel**

Geboren am 10. Mai 1982 in Augsburg

## **Meiner Familie**

# INHALTSVERZEICHNIS

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Historisches Interesse an der Hämoxygenase</b>	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Zytoprotektion durch HO-1</b>	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Zytoprotektion durch HO-1-Produkte</b>	<b>15</b>
	3.3.1 Biliverdin und Bilirubin	15
	3.3.2 Kohlenmonoxid (CO)	17
	3.3.3 Fe <sup>2+</sup> und Ferritin	18
<b>3.4</b>	<b>Zytotoxizität durch HO-1</b>	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Inhibition der HO-1</b>	<b>20</b>
	3.5.1 Verwendete Substanzen	20
	3.5.2 Klinische Bedeutung	22
<b>3.6</b>	<b>Extrahepatische Cholestase und Verschlussikterus</b>	<b>24</b>
	3.6.1 Pathophysiologie der Hyperbilirubinämie/Ikterus	24
	3.6.2 Formen des Ikterus	25
	3.6.3 Pathophysiologie der Cholestase	27
	3.6.4 Die Cholestase als Risikofaktor in der Chirurgie	29
<b>4</b>	<b>Ziel der Studie</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
<b>5.1</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>34</b>
<b>5.2</b>	<b>Modell</b>	<b>34</b>
	5.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation	34
	5.2.2 Gallengangsligatur	35
	5.2.3 Aufbereitung und Applikation der Metalloporphyrine	36
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungsmethoden</b>	<b>37</b>
	5.3.1 Makrohämodynamik	37

---

5.3.2	Mikrozirkulation der Leber	37
5.3.2.1	<i>Laser-Doppler-Flow</i>	38
5.3.2.2	<i>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</i>	39
5.3.3.3	<i>Mikrozirkulatorische Parameter</i>	41
A)	<i>Sinusoidale Perfusion</i>	43
B)	<i>Sinusoidaler und venulärer Durchmesser</i>	43
C)	<i>Blutzellgeschwindigkeit</i>	43
D)	<i>Sinusoidale und venuläre Leukozytenretention</i>	44
5.3.3	Probenentnahme	44
5.3.3.1	<i>Blutentnahme</i>	44
5.3.3.2	<i>Gewebeasservierung</i>	44
5.3.4	Blutuntersuchungen	45
5.3.5	Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR)	45
5.3.5.1	<i>RNA-Isolation</i>	46
5.3.5.2	<i>cDNA-Einzelstrang-Synthese</i>	46
5.3.5.3	<i>TaqMan-Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Gen-expression</i>	47
5.3.6	Histologische Analysen – Standardfärbungen	49
5.3.7	Immunhistochemie	51
<b>5.4</b>	<b>Experimentelles Protokoll</b>	<b>52</b>
5.4.1	Vergleich dreier Metalloporphyrine	53
5.4.2	HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur	54
<b>5.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
<b>6.1</b>	<b>Vergleich der drei Metalloporphyrine SnMP, SnPP und CrMP</b>	<b>57</b>
6.1.1	Makrohämodynamik nach Metalloporphyringabe	57
6.1.2	Mikrozirkulation der gesunden Leber nach Metalloporphyringabe	59
6.1.2.1	<i>Sinusoidale Perfusion</i>	59
6.1.2.2	<i>Sinusoidaler Durchmesser und Blutzellgeschwindigkeit</i>	60
6.1.2.3	<i>Sinusoidale Leukozytenretention</i>	61
6.1.3	Leberparameter nach Metalloporphyringabe	61
6.1.3.1	<i>Albumin und Plasmacholinesterase</i>	61

---

6.1.3.2	<i>Serumbilirubin und Laktatdehydrogenase</i>	62
6.1.3.3	<i>Transaminasen</i>	64
6.1.4	Funktionelle Blockade und HO-1 Genexpression nach HO-1 Induktion	64
6.1.4.1	<i>Bilirubin im Serum</i>	64
6.1.4.2	<i>HO-1 mRNA Induktion</i>	65
<b>6.2</b>	<b>HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur</b>	<b>66</b>
6.2.1	Überleben und Gewichtsverlauf nach Gallengangsligatur	67
6.2.2	Leberlaborparameter nach HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur	67
6.2.2.1	<i>Bilirubin im Serum</i>	68
6.2.2.2	<i>Serumalbumin und Cholinesterase</i>	68
6.2.2.3	<i>Transaminasen, Laktatdehydrogenase und alkalische Phosphatase-</i>	69
6.2.3	Lebermikrozirkulation nach HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur	71
6.2.4	Histologischer Schaden und Leukozyteninfiltration nach HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur-	72
6.2.4.1	<i>Histomorphologie</i>	72
6.2.4.2	<i>CAE-Färbungen</i>	73
6.2.5	HO-1 Protein-Expression, Leberproliferation und Leberzellapoptose bei Gallengangsligatur	74
6.2.5.1	<i>HO-1</i>	74
6.2.5.2	<i>PCNA</i>	76
6.2.5.3	<i>Caspase-3</i>	78
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>7.1</b>	<b>Diskussion des Modells</b>	<b>79</b>
7.1.1	Narkoseverfahren	79
7.1.2	Gallengangsligatur	80
7.1.3	Auswahl und Applikation der Metalloporphyrine	82
<b>7.2</b>	<b>Diskussion der Untersuchungstechniken</b>	<b>83</b>
7.2.1	Laser-Doppler-Flowmetrie	83
7.2.2	Intravitalmikroskopie	84
<b>7.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>86</b>

---

7.3.1	Vergleich der drei Metalloporphyrine SnMP, SnPP und CrMP	<b>86</b>
7.3.2	Endogene Hochregulation von HO-1 bei Cholestase trägt zur Produktion von Bilirubin und Manifestation des Leberschadens bei	<b>90</b>
<b>7.3</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	<b>113</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>114</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Expression und Wirkung der Hämoxxygenase-1 (HO-1), dem Schrittmacherenzym des Hämabbaus, nehmen derzeit einen wichtigen Platz ein, wobei vor allem ihre protektive Wirkung bei oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen in der Leber von besonderem Interesse ist. Hierbei werden unterschiedliche Metalloporphyrine zur funktionellen Blockade der HO-1 Aktivität eingesetzt, ohne dass deren Begleiteffekte, Spezifität oder Aktivität eigens in-vivo untersucht wurden. Aus in-vitro Untersuchungen ging hervor, dass CrMP das ideale Metalloporphyrin zur HO-1 Inhibition wäre. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es deswegen, unterschiedliche Metalloporphyrine hinsichtlich ihrer hämodynamischen Akuteffekte und der Hepatotoxizität im Lebendmodell zu untersuchen. Außerdem sollte in einem zweiten Schritt die funktionelle Bedeutung der Hämoxxygenase-1 im Modell der extrahepatischen Cholestase genauer analysiert werden.

Hierzu erhielten männliche Sprague Dawley Ratten einen der drei Metalloporphyrine SnMP, SnPP oder CrMP. Anschließend erfolgte eine kontinuierliche Messung des arteriellen Blutdrucks über 15 Minuten sowie eine Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie der Leber und eine Bestimmung verschiedener Laborparameter im Serum.

CrMP führte hierbei im Gegensatz zu den beiden anderen HO-1-Inhibitoren zu einem signifikanten und andauerenden Blutdruckabfall, einem Anstieg der Leberenzyme im Serum sowie zu einer verstärkten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Nach Gabe von SnPP ließ sich ein Anstieg der nicht-perfundierten Sinusoide erkennen, SnMP dagegen führte zu keiner Veränderung des sinusoidalen Blutflusses.

Trotz der Überlegenheit in in-vitro-Untersuchung verbietet sich folglich aufgrund der hohen Toxizität die Anwendung von CrMP in in-vivo-Modellen. Für alle nachfolgenden Untersuchungen wurde nur noch SnMP verwendet.

Im zweiten Teil der Studie zur Untersuchung der Bedeutung der HO-1 bei Cholestase erhielten die Tiere entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine

Sham-Operation mit Laparotomie und Mobilisierung des Gallengangs. Jeweils die Hälfte der Tiere erhielt zusätzlich eine i.v.-Bolusgabe des HO-1-Inhibitors SnMP. Nach 3 Tagen, also nach Entwicklung einer Cholestase und vor Auftreten einer biliären Zirrhose wurden die Tiere relaparotomiert und zunächst die Mikroperfusion der Leber mittels Laser-Doppler-Flow-Metrie gemessen. Anschließend wurde Lebergewebe sowohl für eine quantitative PCR als auch zur immunhistochemischen Analyse entnommen sowie Blut zur Bestimmung verschiedener Laborparametern asserviert.

Die zusätzliche HO-1 Inhibition nach Gallengangsligatur führte zu einem signifikant geringeren postoperativen Gewichtsverlust, zu einem weniger ausgeprägten Transaminasenanstieg und zu einem niedrigeren Gesamtbilirubin. Immunhistochemisch ließen sich weniger proliferierende Hepatozyten und Gallengangsepithelien darstellen sowie eine geringere Anzahl extravasierter Leukozyten im Periportalfeld, wenn die gallengangsligierten Tiere zusätzlich SnMP erhalten hatten.

Zusammenfassend konnte man beobachten, dass die Hämoxygenase bei der extrahepatischen Cholestase im Gegensatz zu vielen anderen Untersuchungen keine zytoprotektive Stellung einnimmt, sondern sogar zur Manifestation des Cholestase-bedingten Leberschadens beiträgt. Dieses Phänomen lässt sich am ehesten durch die modulativen Einflüsse der HO-1 Endprodukte auf den intrahepatischen Gallefluss erklären.



## 2 SUMMARY

There are many studies on the physiological role of hemoxygenase-1 (HO-1) evaluating especially its protective actions in different liver pathologies. These studies require metalloporphyrins as HO-1 inhibitors that will not influence tissue perfusion and cellular integrity. In vitro data support the use of CrMP as an ideal HO-1 inhibitor. However, in vivo side effects of the different metalloporphyrins have not been examined yet. One aim of this study was therefore to investigate the effects of three different metalloporphyrins on macrocirculation, microcirculation and hepatotoxicity. Furthermore, the role of HO-1 during extrahepatic jaundice should be examined in a second step.

Sprague Dawley Rats received an injection of one of the three metalloporphyrins SnMP, SnPP or CrMP. Macrocirculation was analyzed by measurement of mean arterial blood pressure, the hepatic microcirculation was assessed by intravital microscopy and blood samples were taken to study liver injury by determining liver enzymes.

Administration of CrMP led in contrast to the other metalloporphyrins to a significant and persisting decrease of blood pressure, an increase of liver enzymes and a marked inflammatory response, as indicated by increased leukocyte adhesion. SnPP led to an increase of the number on non-perfused sinusoids. After administration of SnMP a stable sinusoidal blood flow could be observed.

Despite its superiority in in-vitro investigations, CrMP should therefore not be used in-vivo due to its hepatotoxicity. Because SnMP did not affect the microcirculation, it was used for inhibition of HO-1 in all further investigations.

In the second part of this study -evaluating the role of HO-1 during cholestasis - rats underwent bile duct ligation (BDL) or sham operation. 50% of the animals of each group received additionally SnMP for functional blockade of HO-1. Three days later the animals underwent re-laparotomy. Liver microcirculation was determined by laser Doppler flowmetry and blood and liver samples were taken for further analysis.

Additional inhibition of HO-1 after BDL led to a significant reduced postoperative weight loss, to a less pronounced increase of liver injury markers and a lower total bilirubin.

Immunohistochemically less proliferating hepatocytes and bile duct epithelial cells as well as less neutrophils in the periportal fields could be seen when BDL animals had received SnMP.

In contrast to a large body of studies showing protective effects of HO-1 induction, our findings suggest some detrimental effects of cholestatic HO-1 expression. This might be explained by distinct modulating effects of HO-1 products on intrahepatic bile flow.

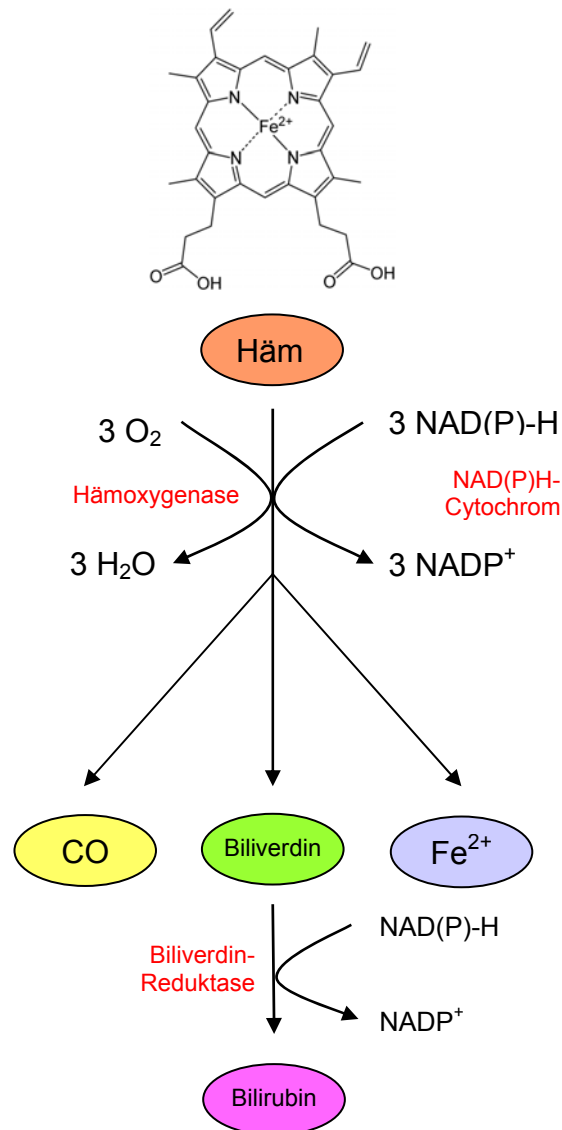
## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Historisches Interesse an der Hämoxxygenase

Historisch gesehen spielten Enzyme, die lediglich Abbauprozesse katalysieren aus wissenschaftlicher Sicht eine eher untergeordnete Rolle und besaßen längst keinen so hohen Stellenwert wie anabole Enzyme. Auch die Hämoxxygenase (HO) stieß, als sie 1968 erstmalig als ein Schrittmacherenzym des Hämabbaus beschrieben wurde [TENHUNEN et al., 1968] auf zunächst eher geringes Interesse. Mittels oxidativer Spaltung katalysiert die Hämoxxygenase die Bildung äquimolarer Anteile an Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und freiem zweiwertigem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) aus Häm (Fe-Protoporphyrin-IX), wobei Biliverdin anschließend mittels Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert wird. Für die Oxidationsreaktion sind die Anwesenheit von Sauerstoff, NAD(P)H sowie NAD(P)H-Cytochrom P-450 Reduktase notwendig, so dass man ursprünglich davon ausging, dass die Hämoxxygenase ein zur cytP450-Familie gehörendes Enzym sei [TENHUNEN et al., 1972]. Später jedoch konnte diese Vorstellung revidiert werden und die HO als ein vollkommen unabhängiges Enzym charakterisiert werden [YOSHIDA et al., 1978].

Erst mit der Entdeckung einer zweiten Isoform der Hämoxxygenase im Jahre 1986 [MAINES et al., 1986] begann sich das Bild der HO als reines Häm-degradierendes Enzym zu wandeln: Obwohl die beiden Enzyme – die ursprünglich beschriebene Hämoxxygenase wurde fortan HO-1 genannt, die neu entdeckte HO-2 – dieselbe Reaktion katalysieren und auch strukturell große Ähnlichkeit aufweisen, zeigten sich im Vergleich so erhebliche Unterschiede, dass man weitere Funktionen der HO vermutete [SUN et al., 1990]. Unter normalen Bedingungen wies die HO-2 eine 2-3fach höhere Aktivität als die HO-1 auf. Interessanterweise konnte nach Exposition mit Kadmium oder Kobalt, d.h. unter Stressbedingungen, die HO-1 Aktivität jedoch um das bis zu 100fache gesteigert werden [TRAKSHEL et al., 1986]. Eine Aktivitätssteigerung der HO-2 wurde jedoch nicht bewirkt, so dass dieses Enzym als die konstitutive, nicht induzierbare Isoform der HO galt, wofür das Fehlen

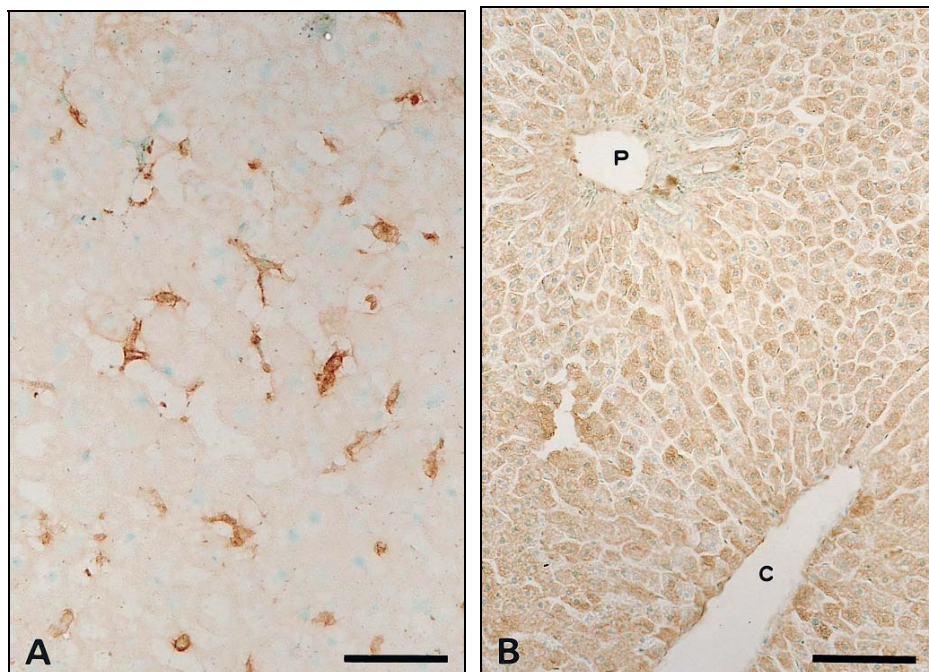
bestimmter Sequenzen im HO-2 Gen verantwortlich gemacht wurde [ALAM et al., 1994]. Inzwischen wurde auch eine weitere nicht induzierbare Isoform der Hämoxygenase, die HO-3, beschrieben, die jedoch nur einen schwachen Katalysator der Hämdegradation darstellt [McCOUBREY et al., 1997].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des enzymatischen Hämabbaus. Die Hämoxygenase spaltet Häm oxidativ zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen. Biliverdin wird anschließend mit Hilfe der Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert.

Durch immunhistochemische Untersuchungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern ist das Muster der Verteilung von HO-1 und HO-2 analysiert worden, insbesondere die Lokalisation der einzelnen Enzyme in der Leber. Hierbei fand sich

ein sehr spezielles Verteilungsmuster (Abbildung 2): In normalem Lebergewebe konnte HO-1 nur in den KUPFFERschen Sternzellen nachgewiesen werden, die für Abbau und Beseitigung zerstörter Erythrozyten verantwortlich sind. HO-2 dagegen fand sich in den Hepatozyten unter Aussparung der KUPFFERschen Sternzellen [GODA et al., 1998]. Die Hepatozyten stellen auf Grund ihrer Ausstattung mit Cytochrom P-450 den Hauptabbauort des Häm dar [BISSELL et al., 1972].

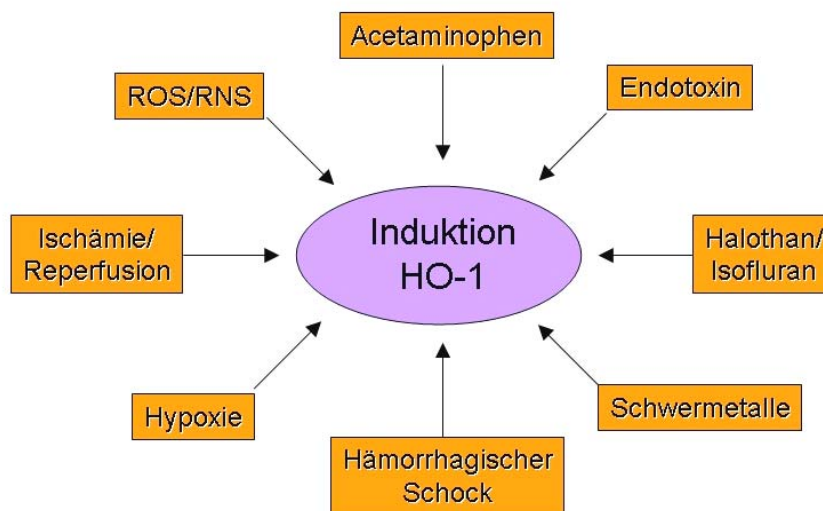


**Abbildung 2:** Expression von HO-1 (A) und HO-2 (B) in Lebergewebe unter Normalbedingungen. Deutlich zu erkennen ist das unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Isoenzyme. Die Balken repräsentieren 50µm in A und 100µm in B. P=Portalvenenast, C=Zentralvene (Abb. aus Goda et al., *J Clin Invest.* 1998 Feb; 101(3), 604-612)

Anders hingegen sah das Verteilungsmuster in Lebergewebe bei oxidativem Stress aus, also beispielsweise nach Verabreichung von Kobaltchlorid, Endotoxin oder nach hämorrhagischem Schock: Im gesamten Lebergewebe, vor allem jedoch in den periportalen und perizentralen Hepatozyten sowie in den sinusoidalen Endothelzellen war eine massive Zunahme der HO-1 Expression im Zytoplasma der Hepatozyten zu erkennen. Demgegenüber zeigte die HO-2 Expression keine Veränderungen gegenüber dem normalen, nicht stimulierten Lebergewebe [BAUER et al., 1998].

## 3.2 Zytoprotektion durch HO-1

Da neben Häm als Substrat der HO auch eine Reihe oxidativer Stressoren wie beispielsweise Wasserstoffperoxid, Natriumarsenit, UVA-Strahlung, Schwermetalle oder Endotoxin als Induktoren der HO-1 identifiziert werden konnten, wurde die HO-1 letztendlich in die Reihe der Stressproteine eingestuft und als Hitzeschockprotein 32 neu definiert [KEYSE et al., 1988]. Man geht sogar davon aus, dass die HO-1 das durch die meisten Stimuli und Konditionen induzierbare Enzym ist [MAINES et al., 1992]



**Abbildung 3:** Eine Vielzahl von hepatotoxischen Noxen und Konditionen führen zur Induktion der HO-1. Einige dieser sind beispielhaft in dieser schematischen Abbildung dargestellt.

Da nicht nur die Induktion der HO-1 nachgewiesen wurde, sondern sich auch Hinweise auf mögliche zytoprotektive Eigenschaften ergaben, rückte die HO-1 in den Folgejahren immer mehr in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Die Anzahl der Publikationen zum Thema Hämoxxygenase stieg somit von lediglich 8 im Jahre 1975 auf 8729 in 2005 [MAINES et al., 2005].

Insbesondere die hepatoprotektive Wirkung der HO-1 konnte in einer Vielzahl von Modellen mit Leberschaden gesichert werden: Die endogene HO-1 verringerte sowohl die mikrozirkulatorische Dysfunktion und den hepatozellulären Schaden als auch die inflammatorische Reaktion nach hämorrhagischem Schock [PANNEN et al., 1998], septischem Schock [KYOKANE et al., 2001], Ischämie/Reperfusion [AMERSI et

al., 1999; WUNDER et al., 2002] und CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberzirrhose [TSUI et al., 2006]. Auch nach Lebertransplantation wiesen Lebern mit initial höherer HO-1 Aktivität einen geringeren Reperfusionsschaden und eine bessere Transplantatfunktion auf als Spenderlebern mit niedriger HO-1-Aktivität [GEUKEN et al., 2005].

Die möglichen zytoprotektiven Effekte der HO-1 resultieren aus den beiden Eigenschaften der HO-1, einerseits Häm abzubauen und andererseits aus den zahlreichen Effekten der HO-1 Stoffwechselprodukte CO, Eisen und Bilirubin (siehe unten). Der Abbau von Häm ist zunächst als protektiv einzustufen, da Häm als solches toxisch ist. Daneben ist Häm aber auch in verschiedensten Enzymen enthalten, die wiederum eine wichtige Rolle im Stoffsstoffwechsel innehaben. Als prominenter Vertreter ist hierbei die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) zu nennen, welche zur Produktion von NO führt, das in eine Vielzahl von inflammatorischen, mitogenen, antiapoptotischen, vasoregulatorischen und neurotransmitter-abhängigen Prozessen eingebunden ist [ABRAMSON et al. 2001, SHARNA et al. 2007, CHUNG et al. 2008]. Die iNOS ist ein Hämprotein mit zwei Hämmolekülen im aktiven Zentrum. Durch die gesteigerte HO-1 Aktivität wird auch iNOS schneller abgebaut [MONCURE et al. 2003].

### **3.3 Zytoprotektion durch HO-1 Produkte**

#### **3.3.1 Biliverdin und Bilirubin**

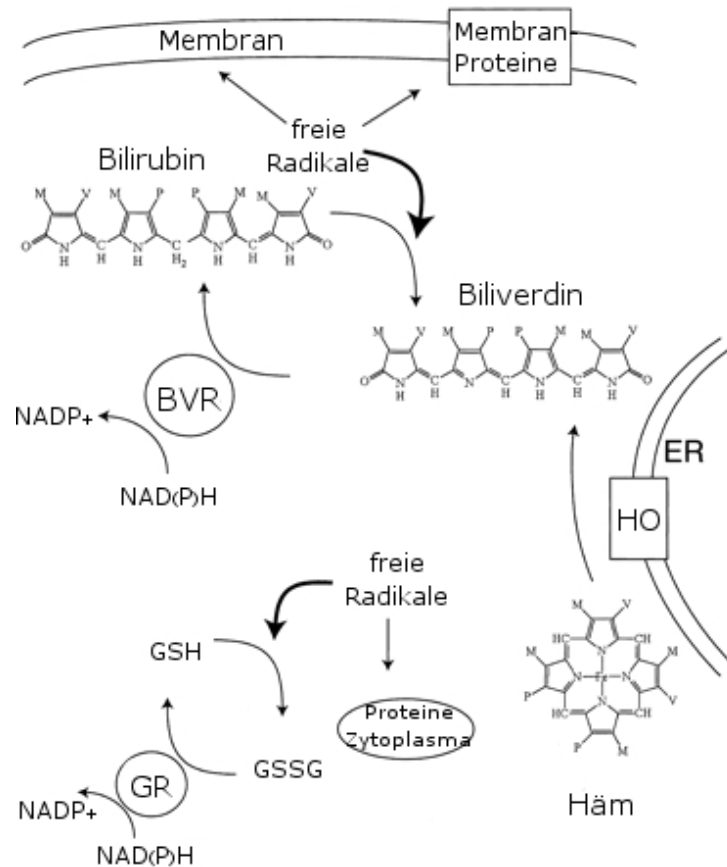
Ähnlich wie die Hämoxygenase war auch deren Stoffwechselprodukt Bilirubin, das mit Hilfe der Biliverdin-Reduktase aus Biliverdin reduziert wird, früher als eher nutzloses bis sogar toxisches Stoffwechselendprodukt angesehen worden. Aufmerksamkeit gewann Bilirubin vor allem durch seine Neurotoxizität bei Neugeborenen, bei denen die Bluthirnschranke noch nicht vollends ausgebildet ist [HSIA et al., 1952]].

Heutzutage dagegen gelten Bilirubin und Biliverdin als potente endogene Antioxidantien: Sowohl in vitro als auch in vivo konnten antioxidative Eigenschaften dieser beiden Moleküle nachgewiesen werden und sie gelten so als physiologische, kettenbrechende Inaktivatoren freier Sauerstoffradikale [STOCKER et al., 1987]. Die

Oxidation ungesättigter Fettsäuren in Liposomen kann durch Bilirubin sogar stärker verhindert werden als mit  $\alpha$ -Tocopherol, welches bis dato als potentestes Antioxidans der Lipidoxidation galt. Diese Entdeckungen konnten in verschiedensten nachfolgenden Versuchsreihen bestätigt werden. So zeigten beispielsweise Baranano et al., dass sogar durch Bilirubin in nanomolarer Dosis Zellen vor einem durch Wasserstoffperoxid induzierten Schaden geschützt werden können. Als zugrunde liegenden Mechanismus der antioxidativen Wirkung geht man von einem Redox-Zyklus im Sinne eines „Self-Recycling“ des Bilirubin aus: Bilirubin wird durch freie Radikale zurück zu Biliverdin oxidiert, um anschließend durch die Biliverdin-Reduktase wieder zu Bilirubin reduziert zu werden und erneut als Antioxidans zur Verfügung zu stehen [BARANANO et al., 2002]. (Abbildung 4)

Außerdem besitzt Bilirubin eine immunsuppressive Wirkung, indem es die Interleukin-1 und -2 Bildung inhibiert und somit die Aktivität natürlicher Killerzellen, die zelluläre antikörperabhängige Zytotoxizität sowie die Lymphokin-aktivierte Immunantwort unterdrückt [HAGA et al., 1996].





**Abbildung 4:** Modell für die Zytoprotektion mittels Biliverdin/Bilirubin: Das von der HO gebildete Biliverdin wird mit Hilfe der Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin reduziert, welches mit freien Radikalen reagiert und somit zu Biliverdin zurückoxidiert wird. Dadurch werden Membranproteine vor Oxidation geschützt. GSH ist das stärkste intrazelluläre Antioxidans, das zytoplasmatische Proteine vor Oxidation schützt. GR=GSH-Reduktase; GSSG=reduziertes GSH. (Abb. modifiziert nach Baranano et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Dec 10;99(25):16093-8)

### 3.3.2 Kohlenmonoxid (CO)

Auch Kohlenmonoxid verlor sein ehemaliges Ansehen als rein toxisches häm-bindendes Gas, als bekannt wurde, dass CO ebenso wie Stickstoffmonoxid (NO) zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) mit gesteigerter cGMP-Bildung (cyclisches Guanosinmonophosphat) führt und somit als second messenger eine weites Spektrum an zellulären Funktionen moduliert [BRÜNE et al., 1987]. Über diesen Mechanismus bewirken beide Gase die Relaxation glatter Muskelzellen, insbesondere der Gefäßwände und gelten somit als potente Vasodilatoren [SAMMUT et al., 1998]. Schon 1995 war gezeigt worden, dass CO – nicht aber NO – für die Regulation der Lebermikrozirkulation eine wichtige Rolle spielt, indem es den

niedrigen vaskulären Tonus der Lebersinusoiden durch Relaxation der Ito-Zellen aufrechterhält. Gezielte Blockade der HO-1 und damit der CO-Produktion bewirkte eine Konstriktion der Ito-Zellen und somit eine Verengung der Sinusoide [SUEMATSU et al., 1995].

Neben diesen cGMP-vermittelten vasoaktiven Eigenschaften verfügt CO, ähnlich wie Bilirubin, auch über eine antiinflammatorische Komponente, die NO-unabhängig über mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) vermittelt wird. Zu diesen Effekten zählen die Inhibition der Plättchenaggregation sowie die Inhibition der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  [OTTERBEIN et al., 2000]. Außerdem wirkt Kohlenmonoxid in verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Hepatozyten und Endothelzellen antiapoptotisch [PETRACHE et al., 2000].

Des Weiteren beeinflusst CO die Gallebildung und den intrahepatischen Gallefluss, da die selektive Inhibition der HO-1 und somit Senkung der CO-Konzentration mittels Zink-Protoporphyrin (ZnPP) zu einer Stimulation der Gallensäureexkretion und des Galleflusses in der Leber führte. Auch diese Prozesse waren cGMP-abhängig [SANO et al., 1997]. CO führte außerdem zu einer Steigerung der Kontraktion und Kontraktionsfrequenz der Canaliculi bilis, was einen weiteren Mechanismus zur Regulation des Gallenflusses darstellt [SHINODA et al., 1998].

### 3.3.3 $\text{Fe}^{2+}$ und Ferritin

Ob auch das beim Hämabbau freiwerdende zweiwertige Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zu den zytoprotektiven Effekten des HO-Systems beiträgt, wird kontrovers diskutiert.  $\text{Fe}^{2+}$  bildet sogar in niedrigen Konzentrationen mittels Fenton-Reaktion Hydroxyl-Radikale [Wunder et al., 2003]. Hydroxyl-Radikale führen zur Lipidperoxidation und greifen so die Seitenketten der zellmembrangebundenen Phospholipide an und zerstören dadurch Zellorganellen und Zellwand.

Allerdings führt die vermehrte HO-1-Induktion nicht nur zu erhöhten Konzentration an freiem  $\text{Fe}^{2+}$ , sondern auch zu einer vermehrten Bildung des Eisenspeicherproteins Ferritin [EISENSTEIN et al., 1991]. Ferritin wiederum gilt – im Gegensatz zu  $\text{Fe}^{2+}$  - unabhängig von der HO-1-Aktivität als antioxidativ und somit zytoprotektiv [BALLA et al., 1992].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass parallel zum Anstieg der Ferritin-Expression auch eine Aktivitätszunahme der ATPase Pumpe zu verzeichnen ist, welche aktiv intrazelluläres Eisen aus der Zelle entfernt und somit den intrazellulären Eisenpool an  $\text{Fe}^{2+}$  vermindert [FERRIS et al., 1999]. Der relative Anteil von ATPase Pumpe und Ferritin an den zytoprotektiven Effekten der HO-1 konnte bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt werden.

### 3.4 Zytotoxizität der HO-1

Entgegen einer Euphorie, die HO-1 als eine Art Universal-Zytoprotektor zu betrachten und dem Vorschlag, durch gezielte HO-1 Induktion vor allem Leberpathologien therapeutisch zu beeinflussen [FAROMBI et al., 2006], sind auch zytotoxische Effekte einer HO-1 Induktion beschrieben. Bei renalen Epithelzellen, die oxidativem Stress ausgesetzt werden, zeigte sich zum Beispiel eine verbesserte Überlebensrate, wenn die HO-1 zuvor selektiv inhibiert wird [DA SILVA et al., 1996]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Untersuchungen an einem Modell des durch Tetrachlorkohlenwasserstoff ( $\text{CCl}_4$ ) induzierten toxischen Leberschadens: Die Leberzellschädigung führte erwartungsgemäß zur HO-1 Hochregulation. Zusätzliche HO-1-Stimulation durch Hämin-Vorbehandlung vergrößerte aber den Leberschaden, während durch Blockade der HO-1 der Leberschaden reduziert werden konnte [EIPEL et al., 2007].

Besonders deutlich ist die schädigende Wirkung der HO-1 im Modell der biliären Leberzirrhose zu sehen, wo durch HO-1 Überexpression die Leberschädigung verstärkt wird. Sowohl die histologische Schädigung, der Transaminasenanstieg, als auch die Fibrinogenese waren bei Tieren ohne zusätzliche HO-1 Induktion geringer ausgeprägt als bei Tieren mit zusätzlicher HO-1 Induktion [FROH et al., 2007]. Außerdem trägt die HO-1 im Modell der Leberzirrhose wesentlich zur arteriellen Vasodilatation und somit zu massiven hämodynamischen Störungen bei, welche für eine Vielzahl von schweren Komplikationen der Zirrhose wie beispielsweise das hepatorenale Syndrom, Aszites, Verdünnungshyponatriämie und hepatopulmonales Syndrom verantwortlich sind. Durch Blockade der HO-1

können die hämodynamischen Parameter im Wesentlichen normalisiert werden [CHEN et al., 2004]

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese schädlichen Effekte der HO-1 fand sich durch Untersuchungen an transfizierten Fibroblasten mit unterschiedlichem Level an HO-1 Expression, welche oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Hierbei nahm die HO-1 nur innerhalb eines gewissen Bereichs eine protektive Rolle ein. Bei starker Überexpression jedoch ließ sich eine Umkehr der Schutzfunktion der HO-1 erkennen: die HO-1 wirkte in diesem Fall eher zytotoxisch als zytoprotektiv, was zumindest teilweise durch die Akkumulation großer Mengen an freiem reaktiven Eisen bedingt gewesen war [SUTTNER et al., 1999].

Ein ganz ähnliches Verhalten ließ sich auch bei CO nachweisen: Während in niedriger Konzentration die protektiven Eigenschaften dominieren, gilt CO in hoher Dosierung als toxisches Gas. Zum Einen führt die Bindung von CO an Hämproteinen zu einer Unterbrechung des mitochondrialen Sauerstofftransportes und somit zur Freisetzung von Superoxid-Anionen [ZHANG et al., 1992]. Zum Anderen verdrängt exzessives CO kompetitiv auch NO aus den Hämproteinen, welches in sauerstoffreicher Umgebung zur Bildung von Peroxynitrit führt, was als potentes Oxidans bekannt ist [ISCHIROPOULOS et al., 1996].

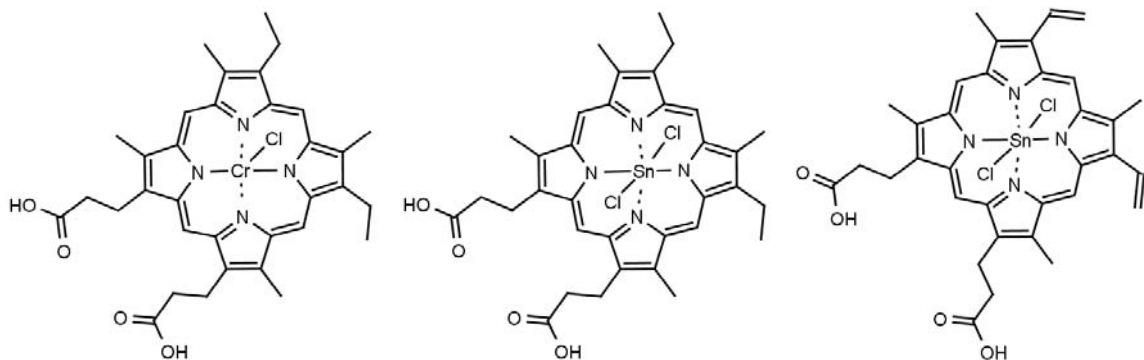
Zusammenfassend muß man also davon ausgehen, dass die HO-1 sowohl protektive als auch schädliche Eigenschaften besitzt und je nach Situation und Expression, d.h. möglicherweise in Abhängigkeit von dem jeweils gewählten Modell die eine oder andere Komponente überwiegt.

## **3.5 Die Inhibition der HO-1**

### **3.5.1 Verwendete Substanzen**

Zur experimentellen Untersuchung der Bedeutung der HO-1 und zur eventuellen späteren klinischen Anwendung, ist es notwendig, die Hämoxigenase selektiv zu inhibieren. Schon mit der Entdeckung und Charakterisierung der HO-1 wurden diverse Metalloporphyrine als potentielle Inhibitoren dieses Enzyms

identifiziert [TENHUNEN et al., 1969]. Für den eventuellen therapeutischen Einsatz einer HO-1 Blockade in vivo wurden dabei folgende Anforderungen an ein Metalloporphyrin gestellt: (1) Das Zentralatom sollte ein biokompatibles Metallion sein, (2) es sollte nicht im Gewebe abgebaut werden und (3) es sollte eine entsprechend hohe Potenz und hohe Spezifität hinsichtlich der HO-1 Inhibition besitzen [VREMAN et al., 1991]. Während zunächst Zinn-Protoporphyrin-IX (SnPP-IX) und als potenterer Blocker Zinn-Mesoporphyrin (SnMP) im Vordergrund standen [DRUMMOND et al., 1981 und 1987], wurden immer mehr Proto- und Mesoporphyrinderivate mit Zinn, Mangan, Chrom, Nickel und Magnesium auf ihre Tauglichkeit als HO-1 Inhibitoren geprüft (Abbildung 5). Hierbei nahm vor allem Chrom-Mesoporphyrin (CrMP) eine herausragende Rolle ein, weil es zumindest in vitro als potentester HO-Inhibitor identifiziert werden konnte [VREMAN et al., 1993].



**Abbildung 5:** Strukturformeln gängiger Metalloporphyrine. Links: CrMP, Mitte: SnMP, Rechts: SnPP-IX

Schon bald nachdem mit dem systematischen Einsatz von Metalloporphyrinen als HO-1-Blocker in der experimentellen Forschung begonnen worden war, zeigte sich, dass die meisten Metalloporphyrine nicht nur spezifisch die HO-1 blockieren, sondern zusätzlich auch die NO-Synthetase (NOS) oder sGC [LUO et al., 1994]. Um trotzdem eine möglichst selektive HO-1 Inhibition zu bewirken, wurde für jeden Blocker eine Dosis bestimmt, in der nur die HO-Aktivität inhibiert wird, ohne die NOS-Aktivität zu beeinflussen. Da auch hier CrMP nicht nur als potentester, sondern auch als selektivster HO-1-Blocker bestimmt wurde, lag nahe, zumindest in vitro CrMP als HO-1 Inhibitor zu bevorzugen [APPLETON et al., 1999]

Inwiefern sich die verschiedenen Metalloporphyrine in vivo unterscheiden, ob es Unterschiede hinsichtlich hämodynamischen Auswirkungen oder Toxizität der einzelnen Substanzen zu beobachten gibt, ist bislang nicht untersucht worden.

### **3.5.2 Klinische Bedeutung**

Klinische Bedeutung erlangte die HO-1 Inhibition mittels Metalloporphyrinen bis heute vor allem bei der Behandlung des Neugeborenenikterus. Dieser stellt ein relativ häufiges und bekanntes Problem in der Neonatologie dar und ist vor allem auf Grund der potentiell schweren Hirnschäden (Kernikterus) gefürchtet, die durch die Neurotoxizität von Bilirubin bei noch nicht vollkommen funktionsfähiger Blut-Hirn-Schranke entstehen [HSIA et al., 1952].

Verursacht wird die Hyperbilirubinämie bei Neugeborenen durch ein Ungleichgewicht zwischen Bilirubinproduktion und hepatischer Bilirubinkonjugation und – exkretion. Verstärkt wird dieses Ungleichgewicht insbesondere bei Kindern, die zusätzlich an einer hämolytischen Krankheit wie beispielsweise Glucose-6-Phosphatasemangel leiden. Die Standardtherapieoptionen des Neugeborenenikterus beinhalten Phototherapie bei milden Formen und zusätzliche Blutaustauschtransfusionen in schweren Fällen [AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2004]. Der Nachteil dieser Behandlungsmethoden ist jedoch, dass nur die Elimination von bereits gebildetem Bilirubin beschleunigt wird, die Bilirubinproduktion selbst jedoch nicht beeinflusst wird. Um eben auch an diesem Punkt anzusetzen, zog man die Verabreichung von Metalloporphyrinen in Erwägung, um die endogene Bildung von unkonjugiertem Bilirubin somit zu unterdrücken.

Tatsächlich erreichte man sogar mit einer 10-50fach niedrigeren Dosis an SnPP als in Tierversuchen eine deutliche Senkung der Serumbilirubinwerte bei sowohl klinisch gesunden Freiwilligen [BERGLUND et al., 1988] als auch bei hyperbilirubinämischen Neugeborenen mit direkter Coombs-positiver ABO-Inkompatibilität [KAPPAS et al., 1988]. Als einzige Nebenwirkung trat bei letzteren in einzelnen Fällen ein flüchtiges Erythem auf. Trotz therapeutischer Erfolge stand man den beiden Metalloporphyrinen SnPP-IX und SnMP dennoch kritisch gegenüber, da sie experimentell eine deutliche photosensitivierende Wirkung zeigten. Im klinischen

Alltag könnte dies für Neugeborene, die zusätzlich eine Phototherapie erhalten oder frühzeitig normalem Sonnenlicht ausgesetzt werden, ein Risiko für erhöhte Sterblichkeit oder Morbidität darstellen [HINTZ et al., 1990]. Als deutlich weniger phototoxische und somit eher für den Einsatz bei Neugeborenen taugliche Metalloporphyrine konnten Zink- und Chromderivate identifiziert werden [VREMAN et al., 1991 und 1993].

Da sich durch die Verabreichung von Metalloporphyrinen schnelle und effektive Bilirubinsenkungen erzielen und sich außerdem zur Entlastung von Eltern und Kind die Zahl an Phototherapie-Behandlungen und Austauschtransfusionen erheblich senken lassen, wurde bald postuliert, doch alle Neugeborenen mit Hyperbilirubinämie oder sogar gänzlich alle Neugeborenen prophylaktisch mit HO-1 Inhibitoren zu behandeln [MARTINEZ et al., 1999].

Demgegenüber steht jedoch die Tatsache, dass die Hämoxxygenase wie oben beschrieben nachgewiesenermaßen sehr viele zytoprotektive Eigenschaften hat, indem sie vor oxidativem Stress schützt und für die Aufrechterhaltung einer konstanten Mikrozirkulation, vor allem der Leber, verantwortlich ist. Ob sich also eine wiederholte systemische HO-Inhibition nicht auch schädlich auf den Organismus auswirken kann, bleibt unklar. Mögliche Folgen wären Akkumulation von intrazellulärem prooxidativem Häm [BALLA et al., 1991] oder Beeinträchtigung der Leberperfusion mit entzündlichen Veränderungen aufgrund verminderter CO-Freisetzung. Interessanterweise waren bisherige klinische Studien zur Behandlung von Neugeborenenikterus mit Metalloporphyrinen lediglich auf die Reduktion des Bilirubinspiegels sowie eventuelle Phototoxizität fokussiert. Inwieweit Leberfunktion und systemische Durchblutung beeinflusst werden, wurde bisher nicht geklärt.

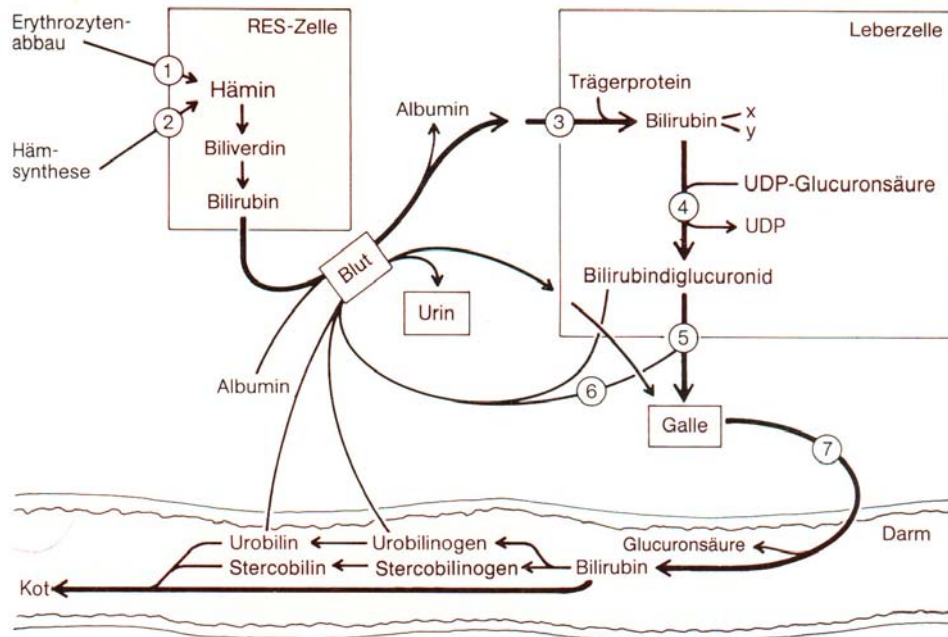
## **3.6 Extrahepatische Cholestase und Verschluss- ikterus**

### **3.6.1 Pathophysiologie der Hyperbilirubinämie/Ikterus**

Neben dem eben beschriebenen Neugeborenenikterus gibt es noch eine Reihe weiterer Zustände mit Hyperbilirubinämie, die sich aufgrund von Bilirubinablagerungen im Gewebe klinisch als Ikterus (Gelbsucht) mit Gelbfärbung von Skleren und Haut äußern. Zu dieser typischen Gelbfärbung kommt es bei Serumbilirubinwerten über 2mg/dl ( $>34\mu\text{mol/l}$ ). Pathophysiologisch lässt sich die Entstehung der Hyperbilirubinämie durch eine Störung an beliebiger Stelle des Bilirubinstoffwechsels mit anschließender Akkumulation der Vorgängerstufen im Blut erklären.

Pro Tag werden durch die Hämoxygenase etwa 300mg Bilirubin aus Häm gebildet und an Albumin gekoppelt zur Leber transportiert. Mit Hilfe der UDP-Glukoronyltransferase werden Bilirubin und Glukuronsäure in den Hepatozyten zur wasserlöslichen Form konjugiert und über die Gallenwege ausgeschieden. Im Darm wird Bilirubin zu Urobilinogen reduziert, was dem Stuhl seine charakteristische Farbe verleiht. 80% davon werden mit dem Stuhl ausgeschieden, etwa 20% gelangen nach Rückresorption über den enterohepatischen Kreislauf zurück zur Leber; ein Teil wird renal ausgeschieden [HEROLD et al., 2005]. (Abbildung 6)





**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Bilirubin-Stoffwechsels mit möglichen Störungen, die zur Entstehung eines Ikterus führen können. 1=Hämolyse, 2=gesteigerter Hämabbau, 3=Mangel an Trägerprotein, 4=Störungen in der Bilirubinkonjugation, 5=Störungen der Sekretion, 6=gesteigerte Durchlässigkeit der Gallenkanalikuli, 7=Verschlussikterus (Abb. aus Pathophysiologie und Pathobiochemie, Florian Lang, 1990)

### 3.6.2 Formen des Ikterus

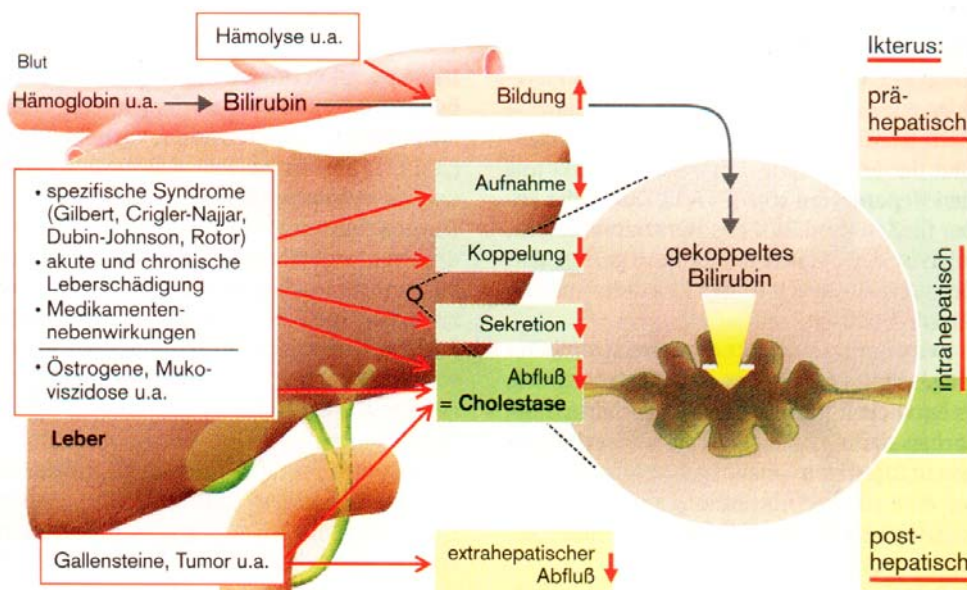
Je nach Ursache der Hyperbilirubinämie können die Ikterusformen in 3 Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 7):

Ein prähepatischer Ikterus entsteht durch eine gesteigerte Produktion von Bilirubin, etwa bei Hämolyse, ineffizienter Erythropoese oder massiven Bluttransfusionen. Dabei ist das unkonjugierte, „indirekte“ Bilirubin im Plasma erhöht.

Ein intrahepatischer Ikterus beruht entweder auf einem spezifischen Defekt der Bilirubinaufnahme in den Hepatozyten, der Konjugierung (z.B. Neugeborenenikterus) oder der Sekretion von Bilirubin in die Gallenkanälchen. Hierbei können sowohl konjugiertes als auch unkonjugiertes Bilirubin im Plasma erhöht sein. Alle drei Schritte können bei diversen Lebererkrankungen und –störungen wie z.B. Virushepatitiden, Alkoholabusus, Medikamentennebenwirkungen, Sepsis, Stauungsleber oder Vergiftungen betroffen sein.

Beim posthepatischen Ikterus liegt die Ursache in einer Obstruktion oder Kompression der intra- und extrahepatischen Gallenwege, wobei vor allem

Gallensteine, Tumoren wie z.B. Pankreaskopf- oder Gallengangskarzinom, Cholangitis oder eine Pankreatitis als Grund der Abflussstörung zu finden sind. Da die Konjugation des Bilirubins – zumindest im Anfangsstadium – ungestört ablaufen kann, kommt es hier zu einem Anstieg des konjugierten, „direkten“ Bilirubins im Serum [SILBERNAGEL et al, 1998]



**Abbildung 7:** Einteilung der verschiedenen Ikterusformen nach Lokalisation der Störung des Bilirubin-Stoffwechsels in prä-, intra-, und posthepatische Form (Abb. aus Taschenatlas für Pathophysiologie, Silbernagel S, 1998)

Differentialdiagnostisch kann bei einem ikterischen Patienten anhand der Beurteilung mehrerer Laborparameter und klinischer Befunde meist auf die Ursache geschlossen werden. Entscheidend dafür sind Stuhl- und Urinfarbe, welche Form des Bilirubins erhöht ist und weitere Labor- bzw. Untersuchungsbefunde, die auf die Grundkrankheit hinweisen, beispielsweise Anstieg der Cholestaseparameter beim posthepatischen Ikterus oder Hämolysezeichen beim prähepatischen. In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten Werte zusammengefasst:

	<b>Prähepatischer Ikterus</b>	<b>Intrahepatischer Ikterus</b>	<b>Posthepatischer Ikterus</b>
<u>Serum</u> - Indirektes Bilirubin - Direktes Bilirubin	++ -	+ +	- ++
<u>Urin</u> - Bilirubin - Urobilinogen	- ++	+ +	++ -
<u>Stuhl</u>	Dunkel	Hell	Hell
Zusätzliche Untersuchungen	LDH/HBDH < 1,3 Haptoglobin ↓ Retikulozytose	GPT ↑ GOT ↑	γ-GT, AP, LAP ↑ Sono: gestaute Gallenwege

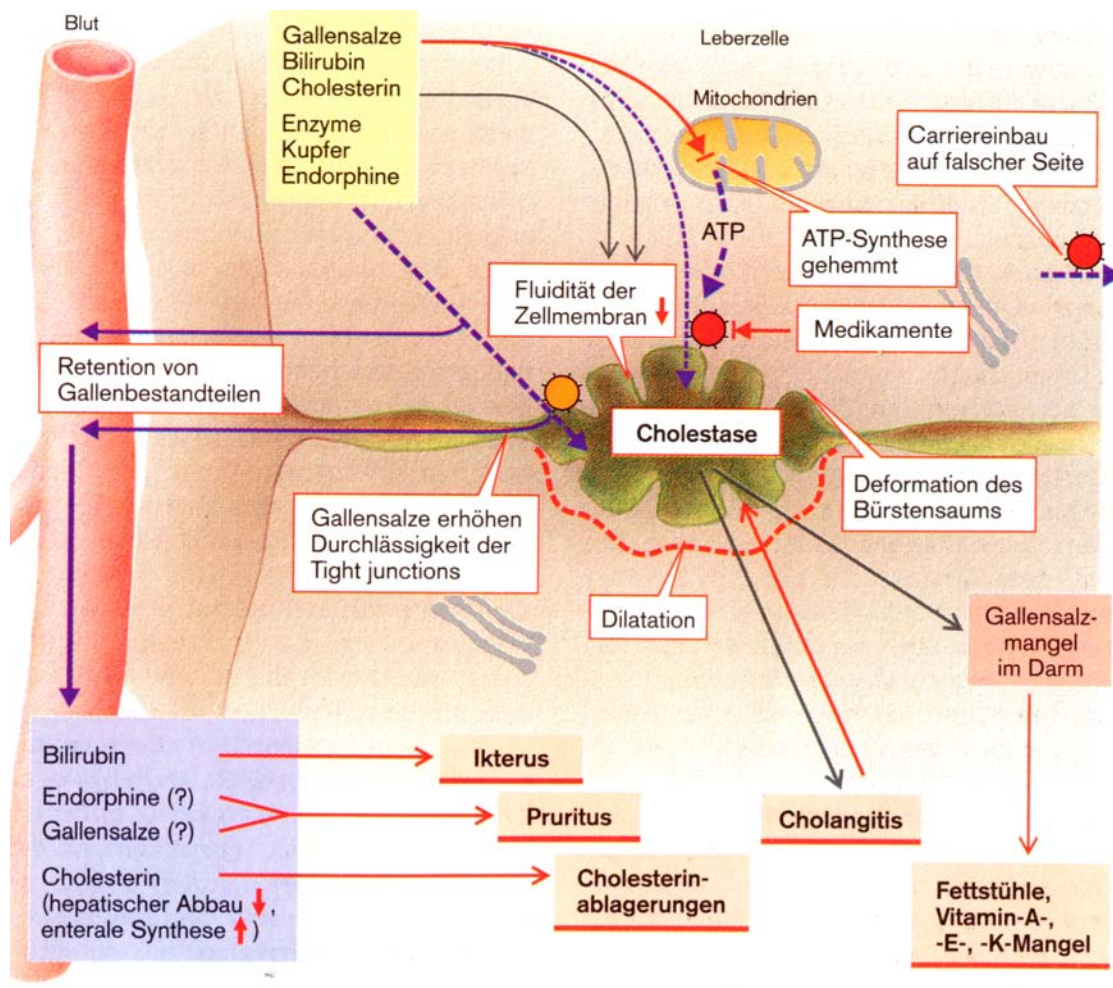
**Table 1:** Zusammenfassung der klinischen Befunde bei der Differentialdiagnose Ikterus [Herold G, 2005]

### 3.6.3 Pathophysiologie der Cholestase

Unter Cholestase versteht man die Retention von gallepflichtigen Substanzen im Plasma durch Stillstand der Galleausscheidung. Ursächlich dafür muss nicht grundsätzlich der „klassische“ Gallestau bei posthepatischem Verschlussikterus durch Obstruktion der extrahepatischen Gallenwege sein, auch intrahepatische Störungen mit Sistieren der Galleproduktion können zur Cholestase führen („Cholestatische Lebererkrankungen“) [POPPER et al., 1981].

Pathophysiologisch liegt der Entstehung der Cholestase bzw. des durch Cholestase verursachten Leberschadens eine Erweiterung der Gallenkanälchen mit Verminderung der Fluidität der kanalikulären Leberzellmembran durch Gallensalzeinwirkung und Cholesterineinlagerung zugrunde [HYOGO et al., 2000]. Dies führt zu Deformationen des Bürstensaums dieser Zellmembran sowie Störungen der kanalikulären Motilität. Um die intrazelluläre Konzentration an toxischen Gallensalzen zu vermindern, kommt es zum Einbau ATP-abhängiger sogenannter MRP (multidrug resistance proteins)-Carrier in die basolaterale

Membran der Leberzelle, um die Gallensalze zurück ins Blut transportieren. Unter physiologischen Bedingungen ist dieser Transportweg quasi vernachlässigbar [ALREFEI et al., 2007]. Die so retinierten Gallensalze wiederum erhöhen zusammen mit dem gesteigerten biliären Druck die Durchlässigkeit der Tight Junctions [TOYOTA et al., 1984] und setzen die mitochondriale ATP-Synthese der Leberzelle herab.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung von Mechanismen und Folgen der Cholestase. Ausführliche Beschreibung siehe Text (Abb. aus Taschenatlas für Pathophysiologie, Silbernagel S, 1998)

Die meisten klinischen Folgen der Cholestase lassen sich aus der Retention von Gallebestandteilen ableiten: Das Bilirubin führt bei Konzentrationen >2mg/dl durch Ablagerung im Gewebe zum Ikterus, d.h. Gelbfärbung von Haut und Skleren, Cholesterin zum Cholesterineinbau in Hautfalten und Sehnen sowie in Zellmembranen von Leber, Niere und Erythrozyten. Durch retinierte Endorphine und

Gallensalze wird vermutlich der quälende Pruritus ausgelöst [SILBERNAGEL et al, 1998].

Nachteilig ist nicht nur der Überschuss der Gallebestandteile im Blut, sondern auch deren Fehlen im Darm: Eine schwerwiegende Cholestase mit Gallensäuremangel im Dünndarm führt zunächst zu Verdauungsstörungen und Malabsorption von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen mit konsekutiven Fettstühlen, da ohne Gallensäuren die für die Fettverdauung essentielle Mizellenbildung nicht möglich ist [HOFMANN et al., 2002]. Der intraluminale Mangel an Gallensalzen führt außerdem sowohl zu Mukosaschäden der Darmwand als auch zu Änderungen der endogenen bakteriellen Flora mit Überwucherung durch Enterobacteriaceae. Dies wiederum fördert die bakterielle Translokation aus dem Darm und resultiert in portaler Bakteriämie und Endotoxämie [DEITCH et al., 1990].

Die Akkumulation von zytotoxischen Gallensalzen, insbesondere in den Hepatozyten [SCHMUCKER et al. 1990], führt zur Schädigung und Proliferation der Hepatozyten, zur Dilatation der Gallengänge, zur Proliferation der Cholangiozyten mit Alterationen der Gallengangsepithelzellen, zur periportalen Neutrophileninfiltration und Aktivierung der Ito-Zellen [GUJRAL et al. 2003]. Genauere Analysen des hepatozellulären Schadens ergaben, dass nicht wie früher angenommen apoptotische, sondern eher onkotisch nekrotische Vorgänge dem hepatozellulären Untergang zu Grunde liegen [GEHRING et al. 2006]. Man spricht auch von sogenannten „bile infarcts“, den Galle-Infarkten, die hauptsächlich periportal zu finden sind [SHIBAYAMA 1990]. In intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Lebermikrozirkulation wurde als Folge einer Cholestase eine erhebliche Durchblutungsstörung mit Expression von Adhäsionsmolekülen in vivo 3-7 Tage nach Gallengangsligatur beschrieben [KÖPPEL et al. 1997].

### **3.6.4 Die Cholestase als Risikofaktor in der Chirurgie**

Die Chirurgie ist hauptsächlich mit der extrahepatischen Cholestase, bedingt durch mechanische Abflussbehinderung in den großen Gallenwegen aufgrund von Tumoren, Gallengangssteinen oder Stenosen des Ductus hepatocholedochus

konfrontiert. Vor allem bei der Resektion stenosierender Gallengangskarzinome, die oftmals auch eine erweiterte Leberresektion erfordern, stellt sich die Frage, welche Bedeutung einer cholestatischen Vorschädigung der Leber für den postoperativen Verlauf zukommt bzw. inwieweit sie das Resektionsausmaß einschränkt.

Obwohl man allgemein von einem cholestasebedingten erhöhten Risiko einer Leberresektion ausgeht, ist die Datenlage klinischer Studien zu dieser Fragestellung nur spärlich. Dies liegt beispielsweise daran, weil fortgeschrittene Gallengangskarzinome eher selten auftreten, in vielen Fällen inoperabel sind und insgesamt eine schlechte Prognose aufweisen. Bisher konnte keine prospektiv randomisierte Studie an einem vergleichbaren Patientenkollektiv (benigne oder maligne Grunderkrankung, gleiche Tumorstadien, keine sonstige Vorschädigung der Leber) zeigen, dass die Cholestase tatsächlich das Ausmaß einer Leberresektion limitiert bzw. mit spezifischen sonstigen postoperativen Komplikationen vergesellschaftet ist. Allerdings wurde in den 80-er Jahren ein hohes Bilirubin vor Lebereingriffen als Risikofaktor gesehen [DIXON et al. 1983] und von einer auffallenden Häufung von septischen Komplikationen und Nierenversagen bei Patienten mit ausgeprägtem Ikterus nach Operationen zur Beseitigung der biliären Obstruktion berichtet [ARMSTRONG et al. 1984]. Als mögliche Ursache einer erhöhten Infektanfälligkeit bei Cholestase wurde eine eingeschränkte Aktivität der neutrophilen Granulozyten [SWAIN et al. 1995], der Lymphozyten [HAGA et al. 1996] sowie der Makrophagen in mesenterialen Lymphknoten [REYNOLDS et al. 1995] und in der Leber [DAGLAR et al. 2001] nachgewiesen. Beim Vergleich von 17 Patienten mit Cholestase, die sich einer Leberresektion unterziehen mussten, mit einem historischen Kollektiv von 13 Patienten ohne Cholestase, wurde eine signifikant erhöhte Morbidität (vor allem bedingt durch postoperative Galleleckagen) gefunden [CHERQUI et al. 2000]. Die Mortalität bzw. die Inzidenz des Leberversagens war in dieser Vergleichsstudie aber in der Cholestasegruppe nicht erhöht.

In einer aktuellen prospektiven Untersuchung zeigte sich hingegen das verbliebene Restlebertvolumen nach Resektion als einziger identifizierbarer Risikofaktor für das Auftreten einer postoperativen Leberdysfunktion [FERRERO et al. 2007]. Interessanterweise war in dieser Studie die Schwelle, bis zu der hin eine Leberresektion ausgedehnt werden kann, in der Gruppe der cholestatisch bzw. chemotherapeutisch vorgeschädigten Lebern gegenüber nicht vorgeschädigten

Lebern um etwa 5% geringer. Im Experiment hatte sich darüber hinaus gezeigt, dass Lebern von Tieren mit Cholestase (7 Tage andauernde Gallengangsligatur) wesentlich empfindlicher auf eine 30-minütige Ischämie reagieren als Lebern nicht cholestastischer Tiere, bzw. von Tieren, bei denen die Cholestase nach Gallengangsligatur wieder durch eine interne Drainage aufgehoben worden war [KLOEK et al. 2008]. Weitere tierexperimentelle Studien haben ergeben, dass eine Leberresektion, verbunden mit vorbestehender Cholestase, zu vermehrten portosystemischen Shunts [BAER et al. 1993], einer höheren DNA-Syntheserate und Leberzellapoptose [BIRD et al. 2002], sowie zu einer geringeren Proliferationsrate von Hepatozyten und einer geringeren postoperativen Körpergewichtszunahme des Tieres [TRACY et al. 1991] führt.

## 4 ZIEL DER STUDIE

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, verschiedene HO-1 Inhibitoren hinsichtlich ihrer hämodynamischen Auswirkungen und Hepatotoxizität zu vergleichen. Außerdem sollte in einer zweiten Versuchsreihe die Bedeutung der HO-1 bei der Manifestation des Leberschadens durch extrahepatische Cholestase untersucht werden.

Auf folgende Fragen wurde dabei näher eingegangen:

1. Hat eine HO-1 Blockade bei einem Tier in nicht induziertem Zustand, d.h. bei normalem HO-1 Level überhaupt Auswirkungen auf die Makrohämodynamik bzw. die Mikrohämodynamik insbesondere der Leber? Wenn ja, kann ein Unterschied zwischen den verschiedenen Inhibitoren festgestellt werden?
2. Hat die Applikation von Metalloporphyrinen eine hepatotoxische Wirkung? Gibt es dabei Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen?
3. Wird durch die von uns gewählte Dosierung mit allen Inhibitoren auch eine funktionelle HO-1-Blockade bewirkt? Was passiert auf mRNA-Ebene?
4. Welches der untersuchten Metalloporphyrine ist folglich der für den experimentellen Einsatz geeignetste HO-1-Inhibitor?
5. Welche Entwicklungen sind - die Leber betreffend - drei Tage nach Gallengangsligatur auf histologisch und serologisch zu verzeichnen? Welchen Einfluss hat dabei die Applikation eines HO-1-Inhibitors?
6. Welche Bedeutung hat die HO-1 insgesamt betrachtet im Modell der extrahepatischen Cholestase? Wirkt die schon nachgewiesene



Hochregulation eher protektiv oder verstärkt sie den cholestatischen Leberschaden?

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche waren von der zuständigen Tierschutzbehörde des Saarpfalz Kreises genehmigt und wurden strikt nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Als Versuchstiere dienten 8-12 Wochen alte Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 220–370g. Die Tiere entstammten alle einer Zucht (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und wurden bis zum Versuchsbeginn in einem klimatisierten Raum (Lufttemperatur: 22-24° C, relative Luftfeuchtigkeit: ca. 70%) der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Direktor: Prof. Dr. M.D. Menger; Tierschutzbeauftragte: Frau Dr. med. vet. M. Frings) gehalten. Während ihrer Haltung bekamen die Versuchstiere Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Sowohl Nahrung als auch Trinkwasser blieben bis zu Versuchsbeginn frei zugänglich.

### 5.2 Modell

#### 5.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

Zur Intravitalmikroskopie erfolgte zunächst in Diäthyläther-Kurzarkose (Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland) die intraperitoneale Applikation von Pentobarbital-Natrium (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 50mg/kg KG. In Narkose erfolgte nun die Rasur von Hals- und Bauchregion (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage auf einem Operationstisch mit integrierter Heizplatte (Effenberger, Pfaffing/Attel, Deutschland) fixiert, welche durch Rücksteuerung mit einer rektalen Temperatursonde erlaubte, die Körpertemperatur der Versuchstiere zwischen 36° und 37°C konstant zu halten. Die anschließend durchgeführte

Tracheotomie mit Einführung eines etwa 3cm langen Plastiktubus (Portex Polythene Tubing 800/100/460, Innendurchmesser 1,67mm, Außendurchmesser 2,42mm, Portex Ltd., Hythe, England) diente zur Erleichterung der Spontanatmung. Nach Darstellung der Arteria carotis communis dextra und Anschlingen des Gefäßes mit Fäden der Stärke 6-0 konnte über eine Inzision der Arterienwand ein spitz angeschrägter Polyethylenkatheter (PE-50, 800/110/200, Innendurchmesser 0,58mm, Außendurchmesser 0,96mm, Portex Ltd., England) in das Gefäßlumen eingeführt und mit den vorgelegten Fäden fixiert werden. Der arterielle Katheter wurde über Dreiwegehähne an ein Druckspülsystem (Injectomat S, Fresenius, Schweinfurt, Deutschland) angeschlossen. Die kontinuierliche Spülung mit 0,9% Kochsalzlösung (1ml/h; B.Braun, Melsungen, Deutschland) verhinderte die Okklusion des Katheters durch Thrombenbildung. Der Katheter diente der kontinuierlichen Kontrolle von Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck.

Entsprechend wurde die V. jugularis externa sinistra in der linken Fossa supraclavicularis aufgesucht und nach Technik der Venae sectio katheterisiert. Der venöse Zugang erlaubte die Applikation der Metalloporphyrinlösungen und der zur Intravitalmikroskopie notwendigen Fluoreszenzfarbstoffe.

Zur Intravitalmikroskopie erfolgte die Laparotomie mit Durchtrennen von Omentum minus sowie der Haltebänder der Leber (Ligg. falciforme hepatis, teres hepatis, triangularia dextra und sinistra) zur Mobilisierung der Leber. Das gesamte Intestinum wurde mit einer kleinen angefeuchteten Mullkompressen abgedeckt und regelmäßig mit warmer Kochsalzlösung gespült, um eine Austrocknung und Abkühlung der Baueingeweide zu vermeiden.

## **5.2.2 Gallengangsligatur**

Drei Tage vor dem Untersuchungszeitpunkt erfolgte in den entsprechenden Gruppen in leichter Äthernarkose die Bestimmung des Körpergewichts, Rasur des Bauchbereichs und Fixierung des Tieres in Rückenlage auf einem Operationstisch. Wegen der Kürze des Eingriffs war hierzu keine Temperaturregelung mittels Heizplatte nötig. Unter Fortführung der Äthernarkose mit einem Zentrifugenröhrchen (50ml, Falcontyp, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland), welches unter Gewährleistung

von Sauerstoffzufuhr über der Schnauze des Tieres platziert wurde und mit einer äthergetränkten Kompresse gefüllt war, erfolgt eine mediane Laparotomie. Nach Hochklappen der Leberlappen wurde der extrahepatische Ductus choledochus aufgesucht, mobilisiert und mit einem nicht resorbierbaren Faden (Prolene 4/0, Ethikon, Norderstedt, Deutschland) in der Nähe des Confluens hepaticus doppelt ligiert, um eine Verletzung des Pankreas zu verhindern. Bei Tieren der Sham-OP-Gruppen erfolgte lediglich eine Mobilisierung des Ductus choledochus.

Bei jeweils der Hälfte der Tiere wurden zusätzlich 10µmol SnMP (Aufbereitung der Lösungen siehe 5.2.3) appliziert. Hierzu wurde die linke V. renalis aufgesucht und 1ml der SnMP-Lösung unter Lichtschutz langsam injiziert. Den übrigen Tieren (Kontrollgruppe) wurde auf selbe Weise 1ml NaCl injiziert. Anschließend wurde die Punktionsstelle für eine Minute leicht komprimiert, um eine Blutstillung zu gewährleisten und ein retroperitoneales Hämatom zu verhindern.

Nach Applikation von 10ml gewärmter Kochsalzlösung in die Bauchhöhle wurden die Bauchdecken wieder mittels 2 Schichten nichtresorbierbarer Naht (Prolene 4/0) verschlossen. Zur postoperativen Schmerzkontrolle wurden 0,2-0,3 ml Bupivacain 0,25% in die Bauchdecke injiziert. Zugang zu Nahrung und Trinkwasser wurde sofort wieder gewährt. Der gesamte Eingriff dauerte maximal 15 Minuten und die Tiere zeigten postoperativ eine schnelle, komplikationslose Erholung..

### **5.2.3      Aufbereitung und Applikation der Metalloporphyrine**

Zur Aufbereitung der applizierten Metalloporphyrine wurden 10µmol (7,54mg)/kg KG SnMP, 10µmol (7,50 mg)/kg KG SnPP oder 20µmol (13,04mg)/kg KG CrMP (alle Metalloporphyrine: Frontier Scientific, Lancashire, England) in 200µl Natrium Bicarbonat (8,4%, B.Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst und über 1 Minute mit dem Vortex kräftig gemischt. Anschließend wurden 800µl NaCl (0,9%, B.Braun, Melsungen, Deutschland) zugefügt, um ein konstantes Injektionsvolumen von 1ml mit physiologischem pH Wert zu gewährleisten. Die Lösungen wurden stets direkt vor Versuchsbeginn lichtgeschützt zubereitet. Es wurden Dosierungen gewählt, für die eine jeweils möglichst selektive Inhibition der HO-1 beschrieben ist [APPLETON et al., 1999]

Die Applikation der Metalloporphyrine erfolgte unter Lichtschutz je nach Gruppe entweder im Rahmen der Gallengangsligatur oder Sham-OP wie unter 5.2.2 beschrieben oder am Untersuchungstag über den bereits gelegten venösen Zugang in die V. jugularis externa.

## **5.3 Untersuchungsverfahren**

### **5.3.1 Makrohämodynamik**

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde über den druckstabilen Katheter in der Arteria carotis communis mit Hilfe eines Statham-Druckwandlers (Statham<sup>®</sup> DTX/Plus<sup>®</sup>, Ohmeda, Erlangen, Deutschland) registriert und mit einem Flachbrettschreiber kontinuierlich aufgezeichnet. Die Herzfrequenz (HF) wurde anhand der arteriellen Blutdruckamplituden der fortlaufenden Registrierung bei einer Schreibergeschwindigkeit von 600mm/min durch Auszählen ermittelt. Zu fixen Zeitpunkten, die an die Untersuchung der Mikrozirkulation gekoppelt waren, wurden Messwerte zu MAP und HF erhoben.

### **5.3.2 Mikrozirkulation der Leber**

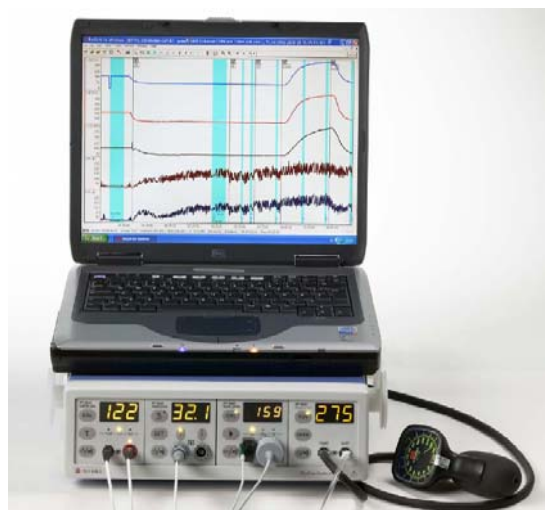
Als direkte Methode der Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) benutzt, mit Hilfe derer unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene Parameter der Mikrozirkulation analysiert werden können. Hiermit wurden die akuten Auswirkungen der verschiedenen HO-1-Inhibitoren auf die Leberperfusion untersucht.

Die Bestimmung der Leberflussrate mittels Laser-Doppler-Flowmetrie diente als technisch weniger aufwendige Methode zur Bestimmung der Mikroperfusion der Leber nach Gallengangsligatur.

### 5.3.2.1 Laser-Doppler-Flowmetrie

Der Laser-Doppler Periflux der Firma Perimed (Periflux 5110, Fa. Perimed, Järfälla, Schweden) dient der nichtinvasiven kontinuierlichen Bestimmung der Mikrozirkulation mittels einer Lasersonde. Dem hier angewandten Messprinzip liegt eine Frequenzänderung zu Grunde, die auftritt, wenn Licht oder andere Strahlungstypen auf sich bewegende Objekte (Blutzellen) treffen. Über eine Lichtleiterfaser wird der monochromatische Laser zum Sondenkopf geführt, der direkt der mit physiologischer Kochsalzlösung benetzten Leberoberfläche aufliegt. Das Licht tritt dadurch in das Gewebe ein und wird mehrfach gestreut. Vor dem Sondenkopf entsteht ein ausgeleuchtetes Messvolumen. Wird dieses von Blutkörperchen durchquert, so entsteht eine Frequenzverschiebung des eintreffenden Lichts, welche über einen gesonderten Kanal aufgenommen und im PC digitalisiert wird. Das Signal entspricht hierbei einer Funktion aus Zahl und Geschwindigkeit der Blutkörperchen, die das Messvolumen passieren, und wird als arbiträre perfusion units (PU) ausgedrückt.

Die Sonde wurde in unserem Versuchsmodell zur Messung der hepatischen Mikrozirkulation auf 10 beliebige Leberabschnitte platziert und ein Messsignal über jeweils 10 Sekunden aufgenommen.



**Abbildung 9:** Periflux 5010 Messeinheit mit 4 Arbeitskanälen zur kontinuierlichen Aufzeichnung des Flux, der Geschwindigkeit zirkulierender Zellen, der Teilchenkonzentration sowie des total backscatter (Reflexionsintensität).

### 5.3.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Eigenschaft fluoreszenzfähiger Stoffe, bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge ( $\lambda$ ), Lichtquanten zu emittieren. Da jedoch nicht der gesamte Anteil der einstrahlenden Lichtenergie als Licht zurückgestrahlt wird, sondern zum Teil in anderer Energieform (z.B. Wärmeenergie) abgegeben wird, werden im Vergleich zu den einfallenden Lichtquanten energieärmere Lichtquanten emittiert. Entsprechend der physikalischen Formel

$$\lambda = (h * c) / E$$

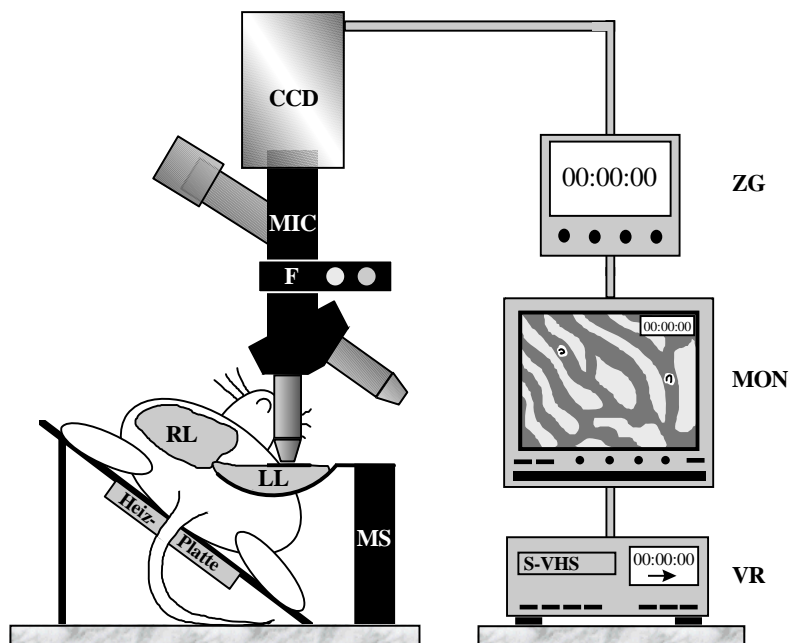
( $\lambda$ : Wellenlänge;  $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum;  $c$ : Lichtgeschwindigkeit;  $E$ : Energie)

ist das emittierte Licht langwelliger als das anregende Licht. Das Spektrum der emittierten Wellenlängen ist hierbei unabhängig von der Anregungswellenlänge, sondern lediglich von den Fluoreszenz-Eigenschaften des angeregten Moleküls. Mit Hilfe verschiedener Filter kann aus dem emittierten Wellenlängenspektrum selektiv das herausgefiltert werden, das für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist.

Bei den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuchen erfolgte die Intravitalmikroskopie der Leber jeweils 15 Minuten vor und nach Verabreichung eines Metalloporphyrins. Hierzu diente ein modifiziertes Zeiss-Axiotech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe (HBO 100 W OFR, Fa. Osram, Augsburg, Deutschland; Gehäuse 100 Z, Fa. Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland), die an ein Ploemo-Pak-System zur Auflichtbeleuchtung angeschlossen war. Unterschiedliche Filterblöcke entsprechend der gewählten Farbstoffe Natrium-Fluoreszein (Filterblock Nr.15, Erregungswellenlänge: 450-490nm, Emissionswellenlänge: >515nm; Leitz, Wetzlar, Deutschland) und Rhodamin-6G (Filterblock Nr.9, Erregungswellenlänge: 530-560nm, Emissionswellenlänge: >580nm; Leitz, Wetzlar, Deutschland) konnten in den Strahlengang eingebracht werden. Die mikroskopischen Bilder wurden von einer hochempfindlichen CCD (charge coupled device)-Videokamera (FK 6990; Lichtempfindlichkeit  $10^{-2}$  lux; Prospective Measurements, San Diego, California, USA) aufgenommen und über einen Bildschirm (33 cm Bildschirmdiagonale; PVM-

1444 QM, Sony, München) an einen S-VHS-Videorecorder mit einer Aufzeichnungsrate von 50 Bildern pro Sekunde (AG-7350, Panasonic, Ratingen, Deutschland) weitergeleitet. Ein zwischen Videokamera und Bildschirm geschalteter Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan) diente zur gleichzeitigen Einblendung und Aufnahme der Zeit in Minuten, Sekunden und Hunderstel-Sekunden. (Abbildung 10)

Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 10fach Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 10x/0.30, Zeiss, Oberkochen), für die quantitativen Analysen der hepatischen Mikrozirkulation ein 20fach Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss Achroplan 20x /0.50, Zeiss, Oberkochen) eingesetzt. Mit den verwendeten Objektiven konnten eine 360fache bzw. 730fache Gesamtvergrößerung auf dem Bildschirm der Aufnahmeinheit erzielt werden.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Das Versuchstier liegt auf dem 30° geneigten Operationstisch, in dem eine Heizplatte integriert ist. Der linke Leberlappen (LL) ist auf eine an einem Magnetstativ (MS) befestigte Metallschale ausgelagert und mit einem Deckgläschen (24x32 mm) versehen. Das verstellbare Stativ erlaubt die plane Oberfläche des linken Leberlappens nahezu frei von Atemexkursionen parallel zur Fokusebene des Mikroskops zu positionieren. RL = rechter Leberlappen, MIC = Mikroskop, CCD = CCD-Videokamera, F = Filterblöcke, ZG = Video-Zeitgenerator; MON = Bildschirm; VR = S-VHS-Videorecorder.



Zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde Natrium-Fluoreszein (2  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht i.v.; MG 376; Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Kontrastverstärkung und Rhodamin-6G (0,1  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht i.v.; MG 302; Merck, Darmstadt) zur *in vivo* Kontrastierung von Leukozyten intravenös appliziert. Es wurden randomisiert insgesamt 10 Gesichtsfelder ausgewählt und für jeweils 20-30 Sekunden in jedem der beiden Filter aufgenommen. Die Gesichtsfelder wurden fokussiert und so eingestellt, daß die den Azinus bildenden Sinusoide auf ihrer gesamten Länge gut visualisierbar waren. Anschließend wurden 5 Gesichtsfelder mit postsinusoidalen Venolen in gleicher Weise eingestellt und ebenfalls für 30s in beiden Filtern aufgenommen.

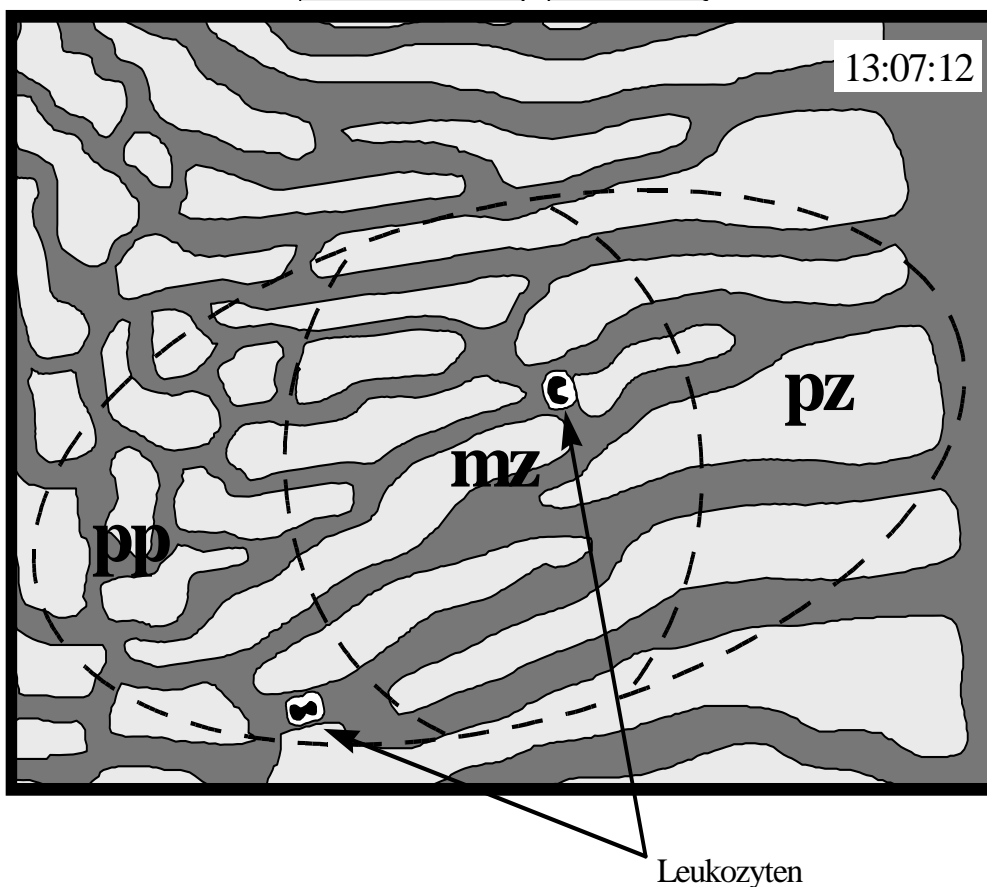
### 5.3.2.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Die Auswertung der während der Versuche aufgezeichneten Videoaufnahmen erfolgte offline, d.h. nach Versuchsende computergestützt mit Hilfe der Software CapImage<sup>®</sup> 5.03 (Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

Um innerhalb der einzelnen Aufnahmen vergleichbare Auswertebedingungen zu schaffen, mussten aus den auf dem Bildschirm sichtbaren Gesichtsfeldern jeweils vergleichbare Regionen der hepatischen Mikrozirkulation ausgewählt werden. Dies erfolgte, indem durch eine auf die Bildschirmoberfläche gelegte Schablone ein Areal auszuwertender Sinusoide festgelegt wurde. Da die Sinusoide innerhalb der verschiedenen Gesichtsfelder verschiedene Längen aufwiesen und eine wichtige Auswertebedingung die Erfassung eines Sinusoids über seine gesamte Länge war, kamen verschieden große Schablonen zur Anwendung. Diese besaßen alle eine elliptische Struktur, da das exakte hexagonale Muster des klassischen Zentralvenenläppchens in Wirklichkeit eher selten anzutreffen ist, und eine ovale Form dem durchschnittlichen architektonischen Aufbau der Azini am nächsten kommt [RAPPAPORT 1958]. Außerdem wurde die Fläche eines jeden untersuchten Azinus bestimmt. Die Erhebung der einzelnen Parameter erfolgte für jeden Sinusoid getrennt, und innerhalb desselben jeweils entsprechend der subazinären Unterteilung in periportale, midzonale und perizentrale Segmente [RAPPAPORT 1973]. Diese topographische Einteilung in drei Zonen gleicher Länge geht auf eine Unterscheidung der Hepatozyten hinsichtlich der unterschiedlichen

Enzymausstattung, Stoffwechselaktivität und Organellenverteilung entlang des Verlaufs der Sinusoide zurück. (Abbildung 11)

Pro Versuchsgruppe kamen jeweils 50 Gesichtsfelder vor und nach Gabe der HO-1-Inhibitoren (5 Versuchstiere, je 10 Gesichtsfelder) zur Auswertung. Jedes der aufgenommenen Gesichtsfelder wurde über eine Zeitspanne von genau 20 Sekunden analysiert. Zur Festlegung dieses Zeitrahmens diente zum einen die eingblendete Zeit des Video-Timers, zum anderen das akustische Signal einer digitalen Stoppuhr mit 20-Sekunden-Countdown. Die ermittelten Werte wurden auf eine Minute umgerechnet.



**Abbildung 11:** Prinzip der off-line-Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Dargestellt ist die Videoaufnahme eines Azinus auf dem Bildschirm, über den eine elliptische Schablone gelegt wurde (gestrichelte Linien, zur Verdeutlichung der zonalen Unterteilung wurden die Bezeichnungen pp = periportal, mz = midzonal und pz = perizentral in dieser Abbildung zusätzlich eingetragen). Oben rechts im Bild das eingblendete Signal des Video-Zeitgebers.

### **A) Sinusoidale Perfusion**

Zur Analyse von Perfusionsausfällen innerhalb der hepatischen Azini dienten die Aufnahmen, die mit dem Blaufiltersystem durchgeführt worden waren. Hierzu wurden jeweils vor und nach Verabreichung des Metalloporphyrins bzw. NaCl zunächst sämtliche Sinusoide gezählt, die innerhalb der Schablone dargestellt waren, wobei wiederum die Unterteilung des azinären Segments in periportale, midzonale und perizentrale Regionen erfolgte. Als perfundiert galten dabei diejenigen Sinusoide, die von Erythrozyten oder Leukozyten durchflossen wurden. Nicht perfundierte Sinusoide wurden gezählt und als prozentuales Verhältnis zur Gesamtzahl der Sinusoide ausgedrückt.

### **B) Sinusoidaler und venulärer Durchmesser**

Weiterhin dienten diese Aufnahmen der Bestimmung der Durchmesser von Sinusoiden und postsinusoidaler Venulen. Hierzu wurden periportal, midzonal und perizentral an je acht verschiedenen Stellen der sinusoidale Durchmesser ausgemessen und daraus je ein Mittelwert berechnet werden. Selbiges Vorgehen wurde auch an den postsinusoidalen Venulen durchgeführt. Analog zu allen anderen Messungen im Rahmen der IVM wurde auch hier das Verhältnis der Durchmesser vor und nach der Metalloporphyringabe bestimmt.

### **C) Blutzellgeschwindigkeit**

Über denselben Gefäßabschnitten bzw. Sinusoiden wurde anschließend mit Hilfe der CapImage®-Software die Erythrozytenfließgeschwindigkeit  $V_{Ery}$  gemessen. Zu diesem Zweck wurde nach der Line-Shift-Methode in die Mitte des betrachteten Gefäß- oder Sinusoidabschnittes eine virtuelle Linie gelegt, entlang derer über einen definierten Zeitraum von 10 Sekunden die Helligkeitswerte aufgezeichnet wurden [HARRIS et al. 2000]. Es ergaben sich – abhängig von der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes – Linien verschiedener Helligkeit. Aus der Steigung dieser Linien errechnet sich die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten bzw. des Blutplasmas.

## **D) Sinusoidale und venuläre Leukozytenretention**

Die mit dem Grünfilter-System erstellten Aufnahmen zeigten die mit Rhodamin 6G *in vivo*-gefärbten Leukozyten. Somit konnten die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen im Sinne adhärenter Leukozyten analysiert werden. In den Sinusoiden wurde die Zahl der Leukozyten, die über einen Zeitraum von mehr als 20 Sekunden stagnierten, nach zonaler Gliederung bestimmt. In den post-sinusoidalen Venulen wurde ebenfalls die Zahl der für 20 Sekunden adhärenten Leukozyten in einem Abschnitt von 100µm analysiert. Zusammen mit der in der Natrium-Fluoreszeinfärbung ermittelten Azinusfläche wurde dann die Zahl adhärenter Leukozyten pro Flächeneinheit errechnet.

### **5.3.3 Probenentnahme**

#### **5.3.3.1 Blutentnahmen**

Am Ende eines jeden Versuches wurde den Versuchstieren über den arteriellen Katheter ca. 2ml Vollblut zur Durchführung einer Serumanalyse entnommen und in Ca<sup>2+</sup>-EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert. Anschließend wurde das Blut in einer Kühlzentrifuge (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 5 Minuten bei 4° C und 3000 U/min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

#### **5.3.3.2 Gewebeasservierung**

Nach der Blutentnahme wurde den Versuchstieren die Leber zu histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen sowie zur quantitativen PCR entnommen und gleichzeitig eine letale Dosis Pentobarbital verabreicht. Die entnommene Leber wurde in kleine Stücke mit glatten Schnitträndern geschnitten und für histologische Analysen in TissueTek (Jung Einbettmedium, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) bzw. zur RNA-Extraktion nativ in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Durchführung der entsprechenden Untersuchungen bei -80°C gelagert. Das verbliebene Lebergewebe wurde in 4%-igem Phosphat-gepuffertem Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für

etwa 3-4 Tage fixiert und anschließend zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung in Paraffinwachs eingebettet.

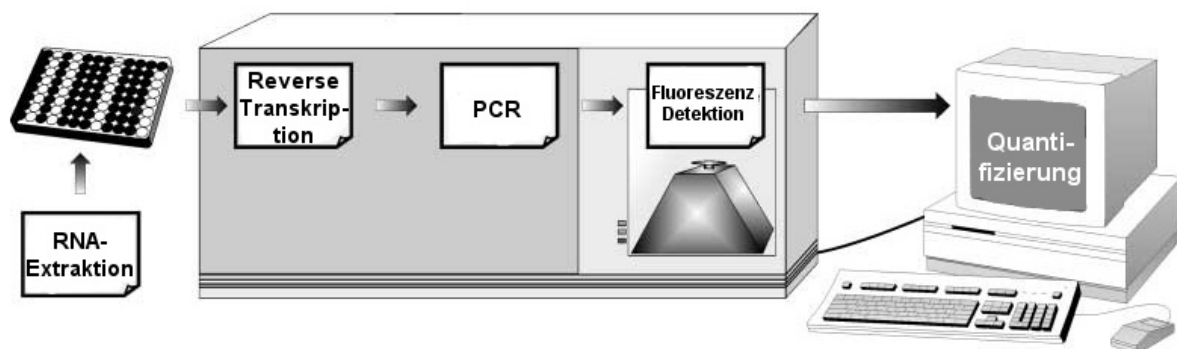
### 5.3.4 Blutuntersuchungen

Das zu Versuchsende asservierte Serum wurde nach Abschluss der Versuchsreihe im Zentrallabor der Universitätsklinik Homburg (Direktor: Prof. Dr. W. Hermann) analysiert. Dabei wurden zur Beurteilung des Ausmaßes des hepatozellulären Schadens die Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase und Lactat-Dehydrogenase (LDH) sowie Cholin-Esterase (CHE) und Albumin als Syntheseparameter bestimmt. Außerdem erfolgte eine Messung der Cholestaseparameter alkalische Phosphatase (AP) und des direkten und indirekten Bilirubins. Die Serumanalyse erfolgte mit einem Automatic Analyzer Hitachi 717 (Boehringer, Ingelheim, Deutschland).

### 5.3.5 Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bei der RNA-Extraktion, wie auch der cDNA-Synthese und PCR wurde RNase-frei gearbeitet, d.h. es wurde jeweils ein eigener Satz Pipetten sowie RNase-freie, sterile Pipettenspitzen und sterilisierte Eppendorf Cups verwendet.

In nachfolgender Abbildung sind die prinzipiellen Arbeitsschritte der Real-Time RT-PCR dargestellt, eine genaue Beschreibung der einzelnen Schritte findet in den folgenden Unterpunkten statt.



**Abbildung 12:** Prinzip der Taqman Reverse Transkriptase-PCR: Zunächst erfolgt die Isolation von RNA aus dem Probengewebe, in unserem Fall der Rattenleber. Nach Synthese von cDNA mittels reverser Transkriptase aus der isolierten RNA werden in der PCR gezielte Genabschnitte amplifiziert und mittels Fluoreszenz-Detektion quantifiziert.

### 5.3.5.1 RNA Isolation

Aus den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Leberstücken wurde mit Hilfe der „Single-Step“ Methode die Gesamt-RNA isoliert. Diese Methode wurde erstmals vor etwa 20 Jahren beschrieben [CHOMCZYNSKI et al., 1987] und beruht auf dem Prinzip, dass extrahierte RNA von DNA mit Hilfe einer Guanidium-Thiocyanat, Natrium-Acetat, Phenol und Chloroform enthaltenden sauren Lösung und nachfolgender Zentrifugation separiert werden kann. In saurem Milieu bleibt RNA in der oberen wässrigen Phase in Lösung, während DNA und Proteine sich in der unteren organischen Phase absetzen. Durch Zugabe von Isopropanol zur oberen Phase präzipitiert reine RNA und kann so für weitere analytische Verfahren asserviert werden.

Alle dafür nötigen Lösungen wurden, wie in dem aktualisierten Protokoll der Single-Step-RNA-Isolation [CHOMCZYNSKI et al., 2006] beschrieben, zubereitet. Pro Probe wurden 50mg Lebergewebe verarbeitet.

Anschließend erfolgte eine spektrophotometrische Analyse der gewonnenen RNA-Lösung zur Quantifizierung der enthaltenen RNA-Menge sowie Überprüfung auf Reinheit. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA-Lösung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 5.3.5.2 cDNA-Einzelstrang-Synthese

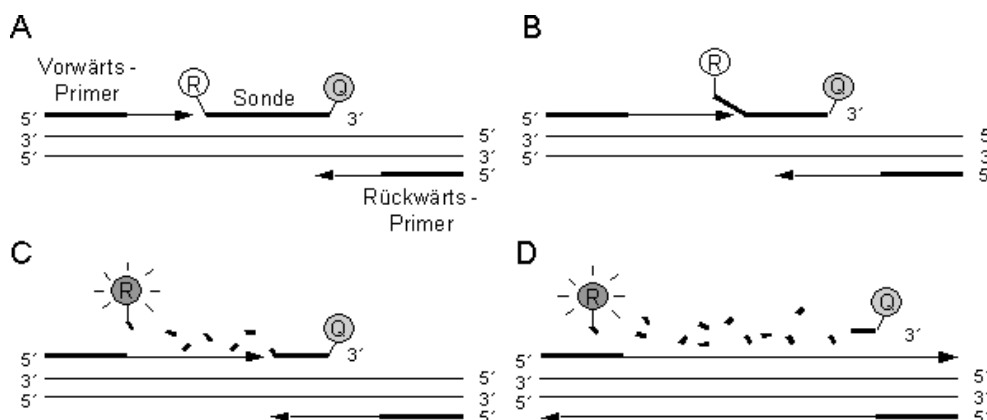
Mit dem nachfolgenden Protokoll wurden jeweils  $2\mu\text{g}$  RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Das Zusammenmischen der einzelnen Komponenten wurde auf Eis durchgeführt.

Durch erneute Spektro-Photometrie wurde die Konzentration der RNA-Lösungen bestimmt und somit die Menge an Lösung berechnet, die genau  $2\mu\text{g}$  RNA enthielt. Für ein Endvolumen von  $20\mu\text{l}$  wurden  $2\mu\text{l}$  RT buffer,  $0,8\mu\text{l}$  5mM dNTP-Mix und  $2\mu\text{l}$   $2,5\mu\text{mol}$  Random Hexamer Primers,  $1\mu\text{l}$  Multiscribe Reverse Transkriptase (RT) mit dem entsprechenden Volumen an RNA-Lösung in ein Reaktionsgefäß

pipettiert und gut gemischt. Die noch auf 20µl fehlende Restmenge wurde mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Alle hierfür benötigten Reagenzien wurden als RT-Kit von Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, USA) erworben. Das Gemisch wurde zunächst für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch eine kurze Erwärmung auf 95°C über 5 Minuten wurde der Synthesevorgang gestoppt. Danach wurden die Reaktionsgefäße umgehend auf Eis genommen und falls die erhaltene cDNA nicht im direkten Anschluss weiterverarbeitet wurde, bei -20°C gelagert.

### 5.3.5.3 TaqMan-Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Genexpression

Diese von Applied Biosystems 1993 entwickelte Technik [LEE et al., 1993] basiert auf der Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und auf dem Einsatz der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase in Verbindung mit einer fluoreszenz-markierten Sonde. Bei der Sonde handelt es sich um ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, das zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz bindet und am 5'-Ende einen fluoreszierenden „Reporter“-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) sowie am 3'-Ende einen „Quencher“-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt. Kommt es nun durch die Taq-Polymerase zur Amplifizierung des entsprechenden mit der Sonde hybridisierten Genabschnittes, wird die Sonde dadurch hydrolysiert und „Reporter“ und „Quencher“ fluoreszieren aufgrund der räumlichen Trennung nun in getrennten Wellenlängenbereichen. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt auch die Fluoreszenz des freigesetzten „Reporters“ mit jedem Amplifikationszyklus an. (Abbildung 13)

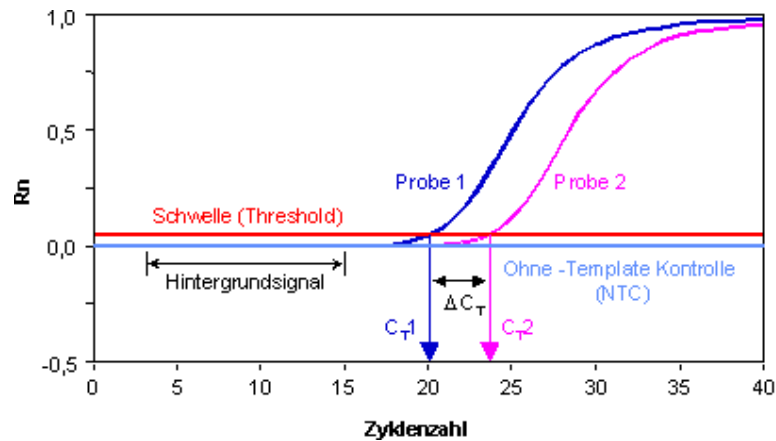


**Abbildung 13:** Prinzip der TaqMan-PCR. A: Primer-Extension (R = Reporter, Q = Quencher), B: Ausbildung der Y-förmigen Sekundärstruktur, C: Sondenhydrolyse, D: Abschluß der Polymerisation.

Mit Hilfe des ABI Prism 7900 Sequence Detection Systems von Applied Biosystems wurde der Anstieg des „Reporter“-Fluoreszenzsignals gemessen. Dadurch war es möglich, den gesamten Verlauf der PCR-Reaktion darzustellen und anhand der erhaltenen Daten die für den entsprechenden Genabschnitt codierende RNA relativ zu quantifizieren.

Für die Durchführung der RT-PCR wurde jeweils 1µl cDNA (enthält 50ng cDNA), 1µl der entsprechenden Gensonde, 8µl RNase freies Wasser sowie 10µl 2xTaqman PCR Universal Master Mix No AmpErase® gut gemischt, in eine 96-well Reaktionsplatte pipettiert und mit einer Schutzfolie bedeckt. Sämtliche Materialien, Sonden und Reagenzien wurden bei Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, USA) erworben. Negativkontrollen ohne RT oder cDNA wurden zum Ausschluss von Verunreinungen mitangesetzt. Die Reaktionsplatten wurden nun in den oben genannten Sequenz Detektor eingesetzt und zunächst in einer 10-minütigen Initiationsphase bei 95° zur Polymerase-Aktivierung inkubiert. Es folgten 40 Zyklen, jeweils bestehend aus zunächst 15 Sekunden mit 95°C zur Denaturierung, gefolgt von einer 10 minütigen Phase bei 60°C zum Primer „Annealing“ und zur Primer Extension. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wurde aufgezeichnet. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte dabei über den C<sub>T</sub>-Wert (*threshold cycle*), der die Zyklenzahl ausdrückt, an dem die „Reporter“-Fluoreszenz erstmals einen definierten Schwellenwert (engl. threshold) oberhalb der Basislinie erreicht. Je höher die Ausgangskonzentration der Zielsequenz zu Beginn der PCR war, desto eher wurde der Schwellenwert erreicht und desto niedriger war der C<sub>T</sub>-Wert. (Abbildung 14)





**Abbildung 14:** Schema eines TaqMan-Amplifikationsplot.

Aufgrund der Variabilität der Menge an genetischem Material ist zur Quantifizierung des Zielgens immer ein Referenzgen, das sogenannte „housekeeper“-Gen, nötig, bei dem man davon ausgeht, dass es in unabhängig von äußerer Beeinflussung in allen Zellen in gleicher Menge vorhanden ist. Mittels Standardkurven wurde für die Quantifizierung des Hämoxxygenase-1-(HMOX)-Gens 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (AgPAT) als Housekeeper-Gen bestimmt. Aus den  $C_T$ -Werten der beiden Gene konnte nun nach folgender Formel die relative Menge an HO-1-codierenden RNA errechnet werden:

$$\text{Relative RNA-Menge} = 2^{-(\text{Mittelwert } C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenz}))} = 2^{-\Delta C_T}$$

### 5.3.6 Histologische Analysen – Standardfärbungen

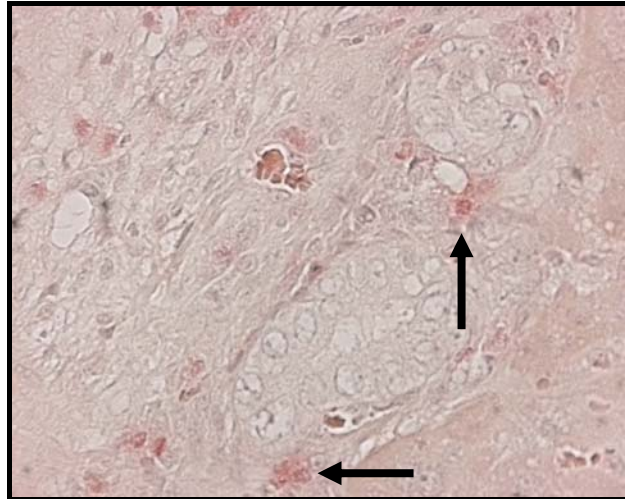
Die in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom in 5µm dicke Präparate geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Die fixierten Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und zum Nachweis infiltrierender Neutrophiler mit AS-D Chlor-Acetatesterase (CAE) (Amersham, Freiburg, Deutschland) gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

Die Auswertung der HE gefärbten Leberhistologien erfolgte an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) computergestützt (Software Axio Vision 3.1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Pro Gewebeschnitt wurden bei 400-facher Vergrößerung verblindet jeweils 25 Gesichtsfelder (high power fields HPF, x40 Objektiv) hinsichtlich hepatischem parenchymatösem und periportalem Schaden beurteilt. Hierzu wurde zunächst das Zytoplasma der Hepatozyten auf Scholligkeit (0=homogen; 1=leicht schollig; 2=mäßig schollig, 3=schwer schollig; 4=sehr schwer schollig) und Vakuolisierung (0=keine; 1=wenige; 2=mehrere; 3=viele, konfluierend; 4=sehr viele, komplett konfluierend) untersucht und anhand des eben genannten Scores qualitativ bewertet [NAYAK et al., 1996; LU et al., 2001].

Des Weiteren wurden die Schnitte auf apoptotische Zellen untersucht und semiquantitativ in Relation zur Gesamtzahl der Hepatozyten pro Schnitt beurteilt (0=0%; 1=<10%; 2=10-30%; 3=30-50%; 4=>50%). Als für apoptotische Vorgänge charakteristische morphologische Veränderungen galten hierbei Veränderungen des Zellkerns wie Kondensierung des Chromatins, Zellschrumpfung sowie Kernfragmentierung und Marginisierung. Mit analogem Bewertung-Score erfolgte außerdem eine Untersuchung auf Nekrosefelder.

Insbesondere bei den Gruppen mit gallengangsligierten Tieren erfolgte eine Untersuchung auf cholestatischen Leberschaden im Bereich der Periportalfelder. Charakteristisch hierfür sind die Proliferation von Gallengangsepithelien mit Kernalterationen, dilatierte Gallengänge, Vergrößerung und Infiltration der Periportalfelder mit Fibroblasten und neutrophilen Zellen, die jedoch in der HE-Färbung nicht eindeutig identifiziert werden können [Gujral et al., 2003].

Anhand der CAE-gefärbten Schnitte wurde die intrahepatische Leukozyteninfiltration bzw. Leukozytenretention untersucht. Hierzu wurde in je 30 Gesichtsfelder im Bereich des Leberparenchyms und in 40 Gesichtsfelder im Bereich der Periportalfelder die Zahl der extravasierten Leukozyten erfasst und zu einer Gesamtsumme aufaddiert. Der Vergleich zwischen den einzelnen Schnitten erfolgte so in absoluten Zahlen. (Abbildung 15)



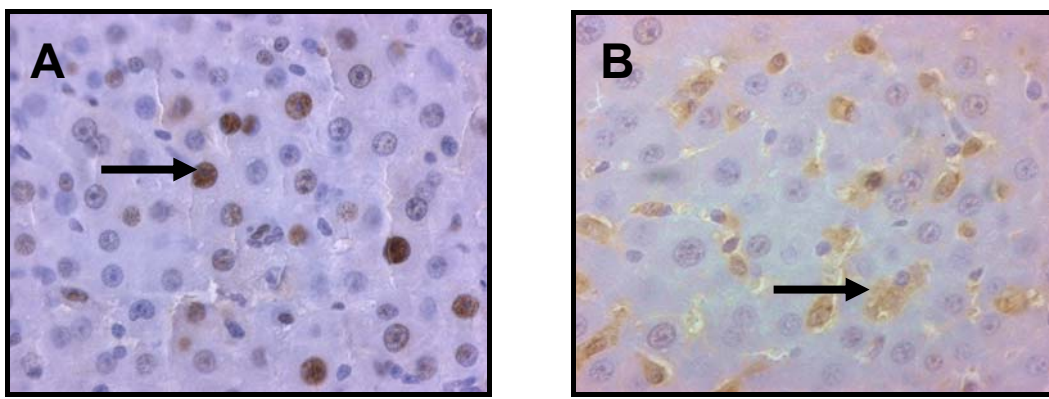
**Abbildung 15:** CAE-Färbung einer Leber 3 Tage nach BDL, ohne Inhibition der HO-1. Zu erkennen sind zahlreiche extravasierende Leukozyten im periportalen Bereich (Beispiele mit Pfeil markiert). Vergrößerung x400.

### 5.3.7 Immunhistochemie

Es erfolgten immunhistologische Färbungen zum Nachweis von HO-1, proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) als Regenerations- und Proliferationsmarker und Caspase-3 als Apoptosemarker. Hierzu wurden die analog zur HE-Färbung gewonnenen Gewebeschnitte zunächst in reinem Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Nach Blockade der endogenen Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden die Schnitte mit den entsprechenden Primärantikörpern über Nacht inkubiert. Hierzu dienten rabbit-anti-rat-HO-1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 (Biomol, Hamburg, Deutschland), mouse-anti-rat-PCNA-Antikörper (1:50; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) und anti-Caspase-3-Antikörper (1:50; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte erst eine weitere Stunde mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (goat-anti-rabbit- bzw. goat-anti-mouse-Antikörper, Verdünnung 1:100) und dann mit aktiviertem Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid inkubiert. Nach Färbung mit Hämalaun nach Meyer wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert, mit Xylol entparaffiniert und eingedeckt.

Die Auswertung der immunhistologischen Schnitte erfolgte, wie auch die Auswertung der HE- und CAE-Färbungen, an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop in 400facher Vergrößerung, wobei je Färbung 25 High Power Fields pro Schnitt

quantitativ ausgewertet wurden. Hierzu wurde die Gesamtzahl der Hepatozyten pro Gesichtsfeld ausgezählt, anschließend die Anzahl der positiv gefärbten Zellen bestimmt und daraus der Anteil der positiven, d.h. das entsprechende Protein exprimierenden Hepatozyten berechnet. Bei den PCNA-Färbungen wurden zusätzlich 20 High Power Fields aus dem Bereich der Periportalfelder ausgewertet, wobei hierzu der Anteil an positiv gefärbten Gallengangsepithelzellen bestimmt wurde, um auch die bei Cholestase charakteristische Gallengangsproliferation zu quantifizieren.



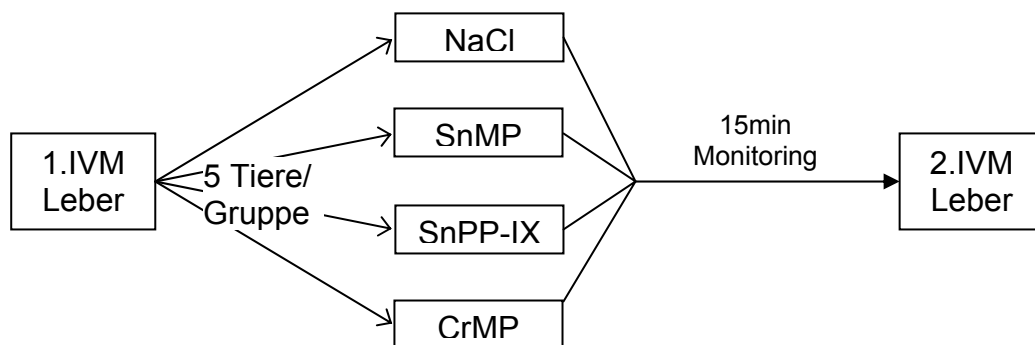
**Abbildung 16A:** PCNA-Färbung einer Leber 3 Tage nach BDL und SnMP-Gabe. Zu erkennen sind einzelne positiv gefärbte Hepatozytenzellkerne. **16B:** HO-1-Färbung einer Leber 3 Tage nach BDL und SnMP-Gabe. Aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation der HO-1 sind hier nicht die Zellkerne sondern das Zytoplasma der Hepatozyten gefärbt. (Beispiele mit Pfeil markiert); Vergrößerung x400.

## 5.4 Experimentelles Protokoll

Es wurden insgesamt zwei unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt, wobei die erste von beiden dazu diente, die Akuteffekte und Toxizität der unterschiedlichen HO-1-Inhibitoren zu vergleichen und anschließend in einer zweiten Versuchsreihe die Bedeutung der HO-1 bei der extrahepatischen Cholestase mit dem zuvor als am unschädlichsten empfundenen HO-1-Inhibitor untersucht wurde.

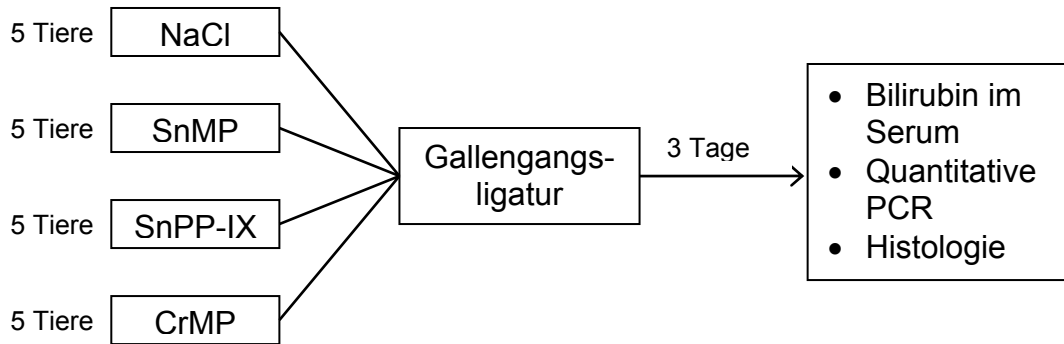
### 5.4.1 Vergleich dreier Metalloporphyrine

In dieser Versuchsreihe wurden jeweils 5 Tiere mit einem der drei funktionellen HO-1-Inhibitoren SnMP, SnPPIX, und CrMP bzw. Kochsalz als Kontrollgruppe behandelt, um Unterschiede in den Auswirkungen einer akuten HO-1 Blockade mit verschiedenen Metalloporphyrinen auf Makrohämodynamik, Mikrozirkulation der Leber sowie Hepatotoxizität zu untersuchen. Dazu wurde jeweils eine Nativ-Intravitalmikroskopie-(IVM) Aufnahme der Leber durchgeführt, nachfolgend der entsprechende HO-1 Blocker bzw. NaCl intravenös injiziert und nach 15 Minuten kontinuierlichem Blutdruckmonitoring eine weitere Leber-IVM-Aufnahme durchgeführt. In den IVM-Aufnahmen wurden alle in 5.3 beschriebenen Parameter der Mikrozirkulation bestimmt. (Abbildung 17)



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Versuchsreihe „Vergleich dreier Metalloporphyrine“. Insgesamt wurden hierzu 20 Tiere untersucht.

Um nachzuweisen, dass sämtliche untersuchte Metalloporphyrine in der entsprechenden Dosierung funktionell auch tatsächlich die HO-1 blockieren, wurde noch eine weitere Versuchsreihe angeschlossen:

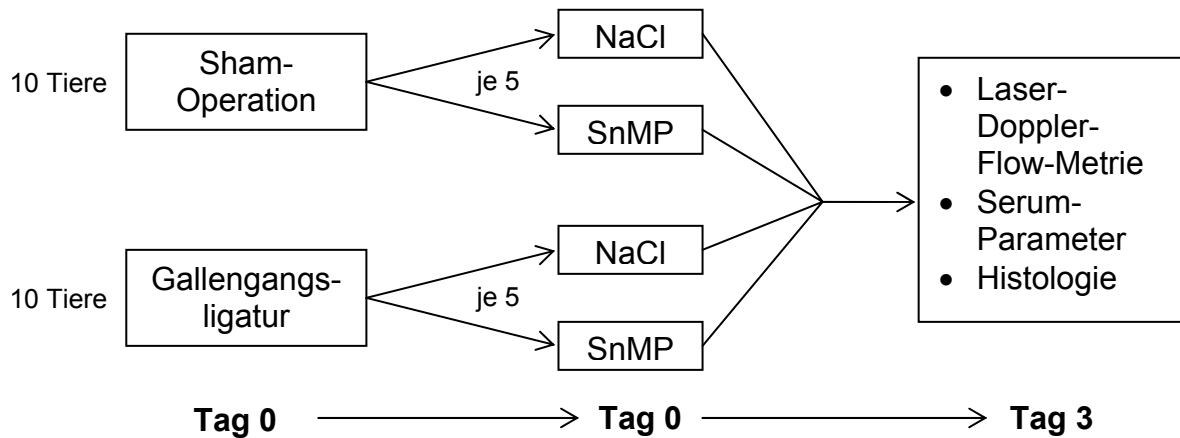


**Abbildung 18:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Versuchsreihe „Vergleich dreier Metalloporphyrine nach Gallengangsligatur“. Insgesamt wurden hierzu 20 Tiere untersucht.

Dazu wurde ein Modell gewählt, durch das nachgewiesenermaßen eine Hochregulation der HO-1 induziert wird, nämlich die Gallengangsligatur (BDL) [GUJRAL et al., 2003]. 20 weitere Tiere wurden somit einer BDL unterzogen, gleichzeitig dabei einer der drei HO-1-Inhibitoren oder Kochsalz verabreicht und nach 3 Tagen Blut und Lebergewebe für histologische Untersuchungen und die quantitative PCR entnommen. Im Serum wurde dann Bilirubin als Endprodukt der HO-1 bestimmt, worauf indirekt auf die funktionelle Blockade des Enzyms geschlossen werden konnte. (Abbildung 18)

#### 5.4.2 HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur

Nach Auswertung der Versuchsergebnisse der ersten Versuchsreihe konnte SnMP als der am wenigsten toxische HO-1-Inhibitor identifiziert werden, so dass alle weiteren Versuche folglich mit SnMP durchgeführt wurden. Um die Bedeutung der HO-1 bei der obstruktiven Cholestase zu untersuchen, wurde bei je 10 Tieren eine Sham-Operation bzw. eine Gallengangsligatur durchgeführt. Jeweils die Hälfte der Tiere erhielt zusätzlich eine i.v. Bolusgabe des funktionellen HO-1 Inhibitors SnMP bzw. NaCl. Nach 3 Tagen, also nach Entwicklung einer Cholestase und vor Auftreten einer biliären Zirrhose, wurden die Tiere relaparotomiert und zunächst die Mikroperfusion der Leber mittels Laser-Doppler-Flow gemessen. Anschließend wurde Lebergewebe für histologische und immunhistochemische Analysen sowie arterielles Blut zur Bestimmung der Leberparameter im Serum entnommen.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Versuchsreihe „HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur“. Insgesamt wurden hierzu 20 Tiere untersucht.

## 5.5 Statistik

Die während der primären Datenerfassung erhobenen Daten wurden bei der Auswertung der Videobänder, der histologischen Schnitte und immunhistochemischen Untersuchungen zunächst auf Erhebungsbögen eingetragen und anschließend zur elektronischen Datenverarbeitung direkt in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) übertragen.

Die so erhobenen Ergebnisse wurden unter Verwendung der Software SigmaPlot 10.0 (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA) in Säulendiagrammen als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) dargestellt.

Nach Prüfen der Daten auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen wurde die statistische Analyse der Daten unter Verwendung der SigmaStat® Statistical Software, Version 2.03 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Es erfolgte eine one-way ANOVA gefolgt von dem Holm-Sidak-Test als post-hoc Test.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurden Unterschiede in den Ergebnissen als signifikant angenommen. Beim Auftreten signifikanter Unterschiede

wurde keine weitere Unterscheidung hinsichtlich bestimmter Signifikanzniveaus getroffen.



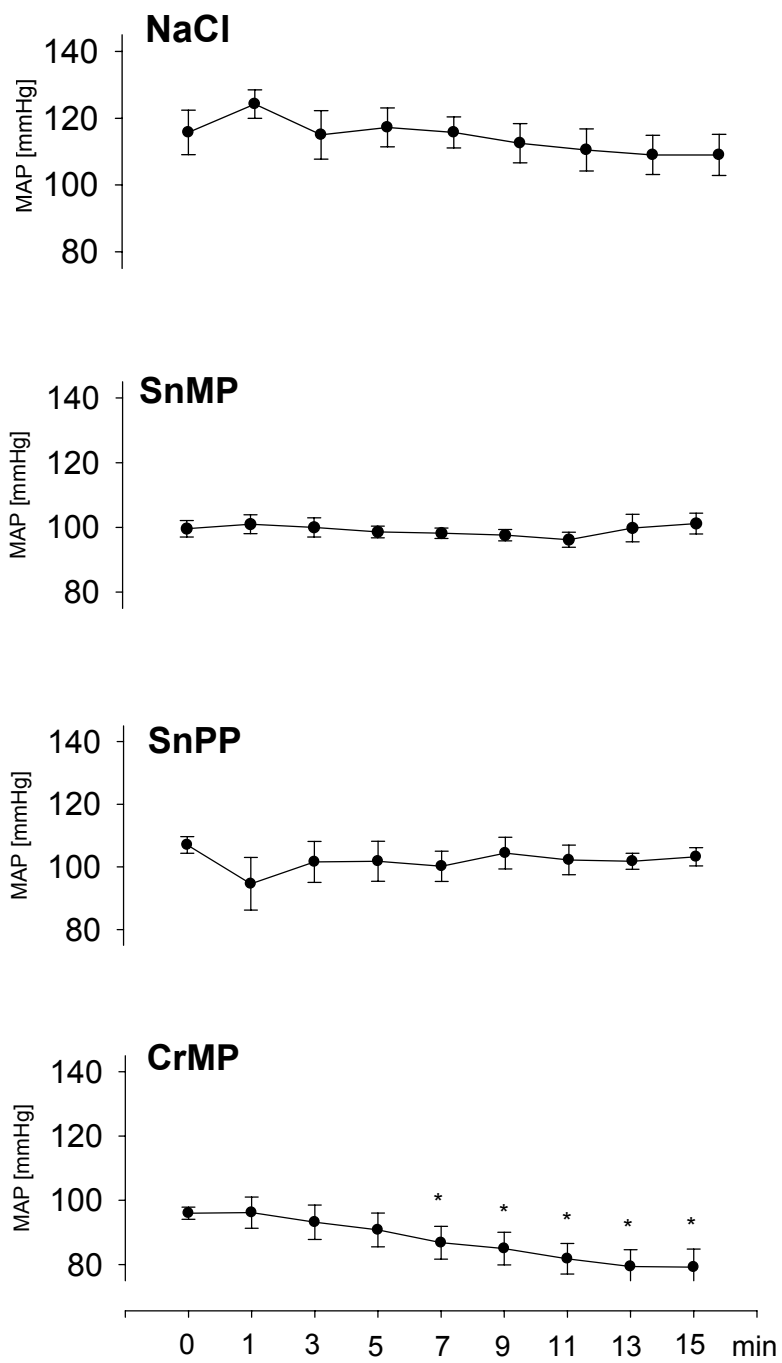
## 6. ERGEBNISSE

### 6.1. Vergleich der drei Metalloporphyrine SnMP, SnPP und CrMP

#### 6.1.1 Makrohämodynamik nach Metalloporphyringabe

Nach Applikation der Kochsalz- bzw. Metalloporphyrinlösung wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten der mittlere arterielle Druck (MAP) gemessen (Abbildung 20). Der Ausgangswert lag bei allen Tieren zwischen 95 und 115mmHg.

Die Verabreichung von 1ml NaCl in der Kontrollgruppe führte zu einem kleinen, jedoch nicht signifikanten transienten Anstieg des MAP, der jedoch nach etwa 3 Minuten nicht mehr nachweisbar war. Die Applikation von SnMP führte zu keiner Veränderungen des Blutdrucks. Nach Gabe von SnPP hingegen kam es zu einem initialen Abfall des Blutdrucks, der sich nach 3 Minuten jedoch wieder auf den Ausgangswert einpendelte. Interessanterweise führte die Verabreichung von CrMP zu einem kontinuierlichen und ab der 7. Minute gegenüber dem Ausgangsblutdruck signifikanten Blutdruckabfall. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 15 Minuten lag in der CrMP Gruppe der durchschnittliche Blutdruck mit  $79,2 \pm 5,6$  mmHg um etwa 20% unter dem Ausgangsniveau.



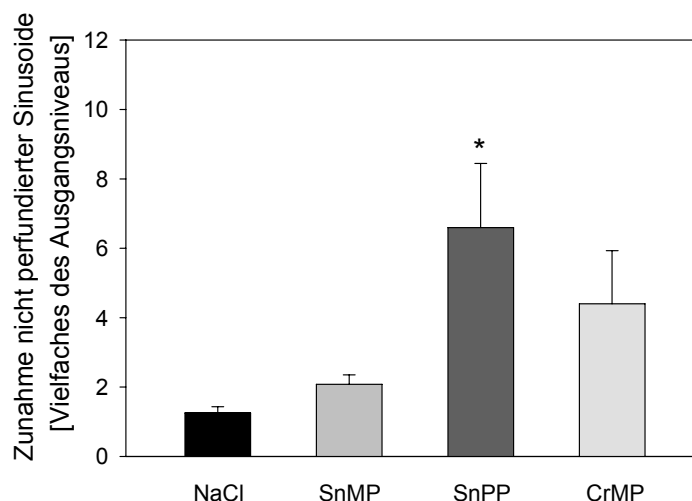
**Abbildung 20:** Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) nach Gabe dreier Metalloporphyrine sowie von NaCl in der Kontrollgruppe. MW  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs MAP<sub>(Zeitpunkt 0)</sub>

## 6.1.2 Mikrozirkulation der gesunden Leber nach Metalloporphyringabe

Es wurden pro Tier 2 Intravitalmikroskopien – je eine vor und nach Applikation des Metalloporphyrins- wie in 5.3.2 beschrieben durchgeführt, die Werte miteinander verglichen und die prozentualen Veränderungen daraus berechnet.

### 6.1.2.1 Sinusoidale Perfusion

Beim Vergleich des prozentualen Anteiles an nicht perfundierten Sinusoiden vor und nach Applikation fiel auf, dass es in den mit NaCl behandelten Kontrolltieren zu einer leichten Zunahme der nicht perfundierten Sinusoide um ca. 20% kam (Abbildung 21). In den mit Metalloporphyrinen behandelten Tieren ließ sich jedoch eine deutlich stärkere Zunahme der Perfusionsausfälle verzeichnen. Besonders ausgeprägt war dies in der Gruppe der SnPP-Tiere: durch die Applikation von SnPP kam es nach 15 Minuten zu einem Anstieg der nicht perfundierten Sinusoide auf das sechsfache des Ausgangswertes. Die Gabe von CrMP führte zu einer Vervielfachung der Perfusionsausfälle, was sich jedoch nicht als signifikant gegenüber der Kontrollgruppe herausstellte. Am wenigsten Perfusionsausfälle traten nach Gabe von SnMP auf.



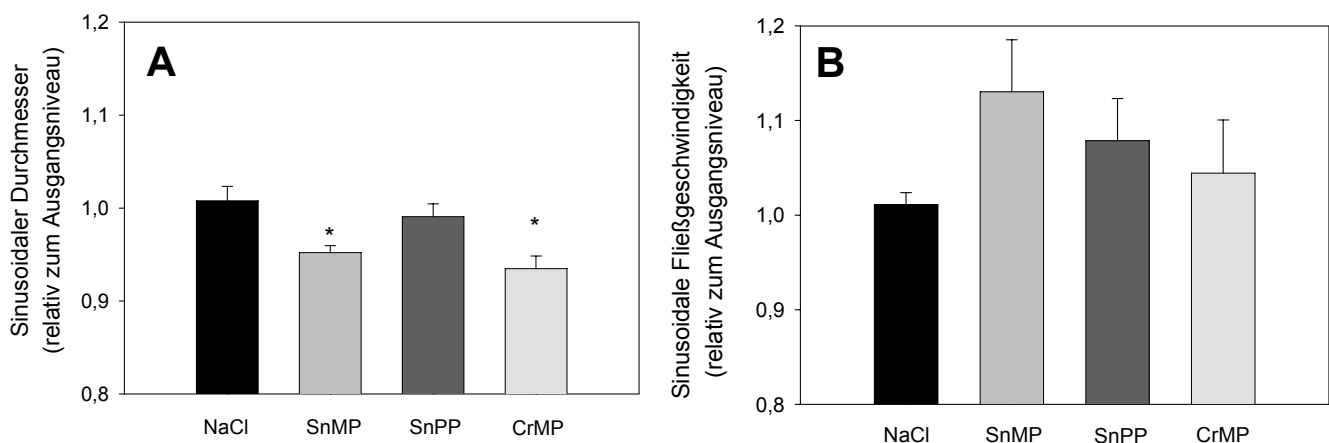
**Abbildung 21:** Zunahme der Perfusionsausfälle durch Applikation der entsprechenden Metalloporphyrine bzw. von NaCl (Kontrollgruppe). Dargestellt ist jeweils die Zunahme der nicht perfundierten Sinusoide als Vielfaches der Werte der Ausgangsaufnahmen vor Gabe des Metalloporphyrins bzw. NaCl. MW  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs NaCl

### 6.1.2.2 Sinusoidaler Durchmesser und Blutzellgeschwindigkeit

Sowohl der sinusoidale Durchmesser als auch die Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurden jeweils für die periportale, midzonale und perizentrale Zone des Azinus getrennt bestimmt. Da sich aber bei der Auswertung keine zonenspezifischen Besonderheiten zeigten, wurden für die weitergehende Analyse Durchschnittswerte aus dem gesamten Azinus gebildet.

In der Kontrollgruppe blieben die sinusoidalen Durchmesser vor und nach Verabreichung von NaCl konstant (Abbildung 22A). Die Applikation von Metalloporphyrinen führte hingegen zu einer Abnahme des sinusoidalen Durchmessers. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei Gabe von SnMP und CrMP zu beobachten. Nach SnPP Gabe war zwar tendenziell auch eine Abnahme des sinusoidalen Durchmessers zu verzeichnen, diese war jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

Korrespondierend zur Abnahme des sinusoidalen Durchmessers fand sich eine Zunahme der sinusoidalen Blutzellgeschwindigkeit (Abbildung 22B). Diese war mit einem Anstieg von  $13,0 \pm 5,5\%$  am stärksten ausgeprägt nach Applikation von SnMP.

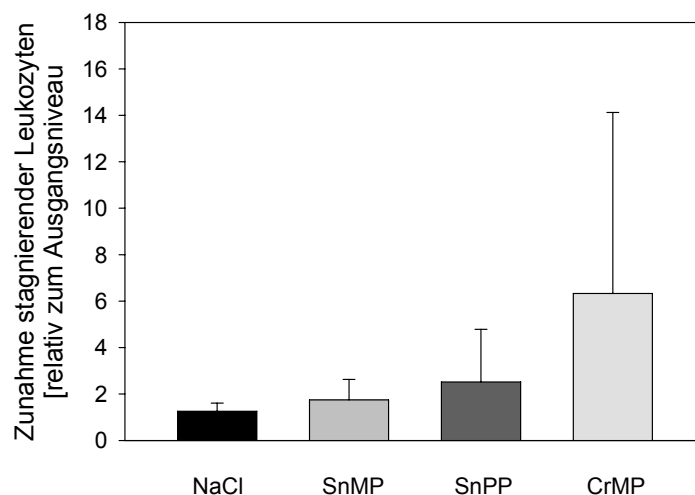


**Abbildung 22A:** Relative Veränderungen des sinusoidalen Durchmessers 15 Minuten nach Gabe eines Metalloporphyrins bzw. NaCl im Vergleich zum Ausgangswert; **22B:** Relative Veränderungen der sinusoidalen Fließgeschwindigkeit im Vergleich zum Ausgangswert. MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs NaCl

### 6.1.2.3 Sinusoidale Leukozytenretention

Zur Auswertung der sinusoidalen Leukostase wurden die in den Sinusoiden stagnierenden Leukozyten vor und nach Metalloporphyringabe ausgezählt.

Im Vergleich zu den NaCl-Kontrolltieren, bei denen die Zahl der adhärenenten Leukozyten über den Beobachtungszeitraum konstant blieb, kam es nach CrMP-Applikation zu einem im Mittel sechsfachen Leukozytenanstieg (Abbildung 23). Aufgrund der hohen Standardabweichung war diese Zunahme jedoch gegenüber den Kontrolltieren nicht signifikant. Durch die Gabe von SnMP oder SnPP kam es zu keinem nennenswerten Anstieg der sinusoidal stagnierenden Leukozyten.



**Abbildung 23:** Relative Veränderungen der in den Lebersinusoiden stagnierenden Leukozyten nach Metalloporphyrin bzw. NaCl Gabe im Vergleich zum Ausgangswert;  $MW \pm SEM$ .

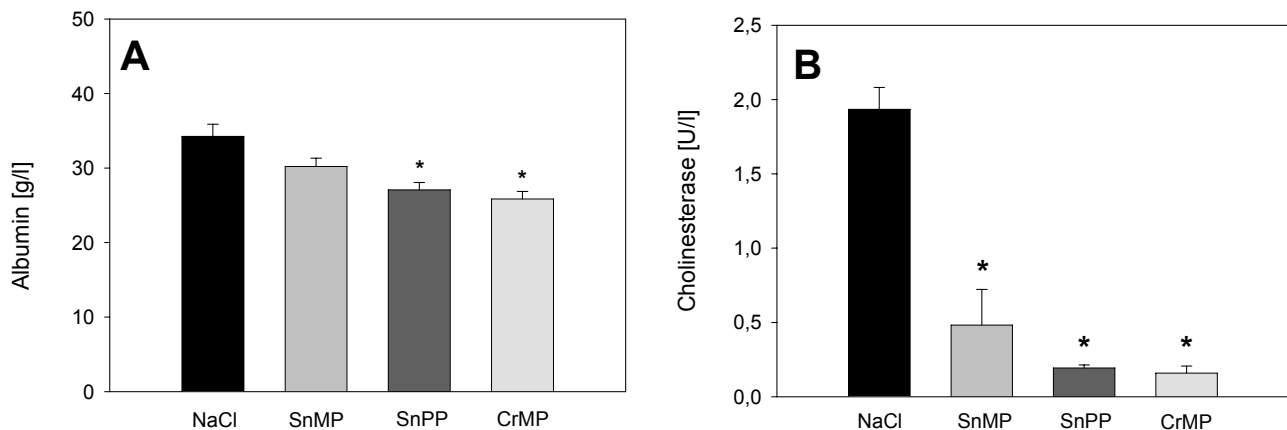
## 6.1.3 Leberlaborparameter nach Metalloporphyringabe

### 6.1.3.1. Albumin und Cholinesterase

Akute Auswirkungen der Metalloporphyrine auf die Leberfunktion wurden mittels Analyse der Syntheseparameter Serumalbumin und Cholinesterase (CHE)

beurteilt. Trotz der nur kurzen Zeitspanne zwischen Applikation und Blutentnahme von etwa einer Stunde ergaben sich bei den mit CrMP und SnPP behandelten Tieren um etwa 15-25% signifikant niedrigere Albuminwerte in der Serumanalyse als bei den Tieren der NaCl-Gruppe (Abbildung 24A). Tiere, die mit SnMP behandelt wurden, zeigten hingegen nur geringfügig verminderte Albuminwerte.

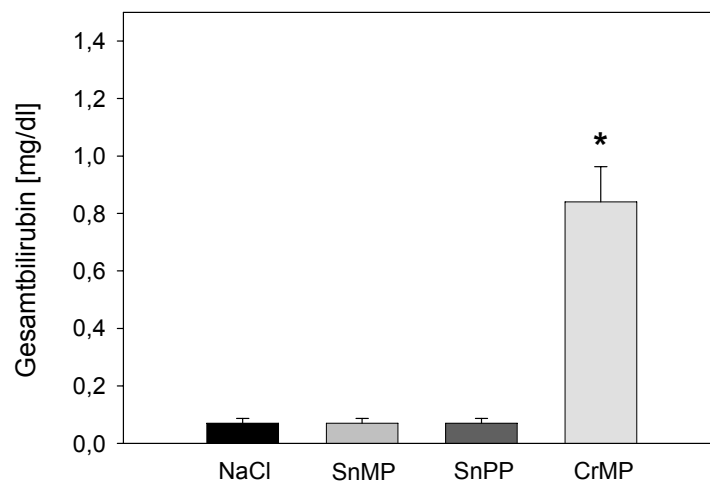
Dagegen war die Serum-Cholinesterase in allen mit Metalloporphyrinen behandelten Tieren drastisch um etwa 80-90% gegenüber den Kontrolltieren vermindert (Abbildung 24B). Die geringste Einschränkung war auch hier bei den SnMP-Tieren zu finden.



**Abbildung 24:** Serumwerte von Albumin (A) und Cholinesterase (B);  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs NaCl

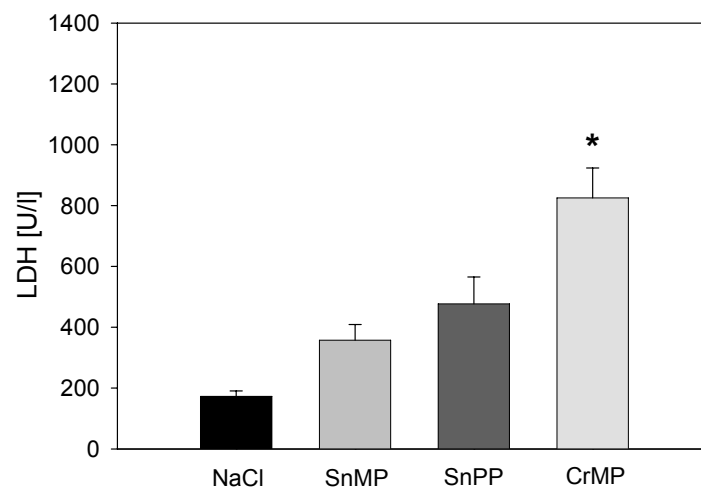
### 6.1.3.2. Serumbilirubin und Laktatdehydrogenase

Im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen fiel auf, dass die mit CrMP behandelten Tiere mit  $0,84 \pm 0,1$  mg/dl bis zu 10fach höhere Bilirubinwerte im Serum aufwiesen, während die Serumbilirubinkonzentrationen in den anderen Gruppen im Normbereich blieben (Abbildung 25).



**Abbildung 25:** Gesamtbilirubin im Serum;  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs NaCl.

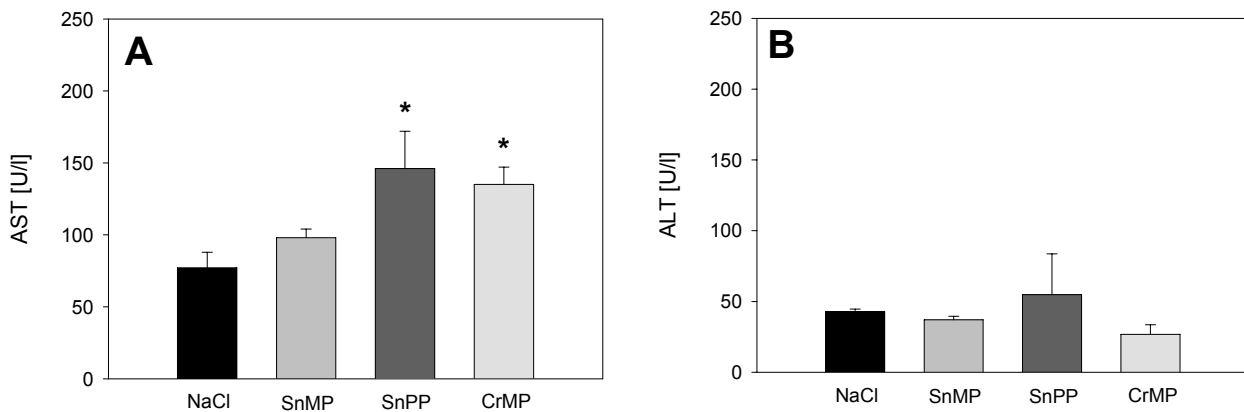
Als Hämolyseparameter wurde außerdem die Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum bestimmt. Nach Gabe von Metalloporphyrinen waren die LDH Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 26). Am meisten ausgeprägt und signifikant sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch der SnMP- und SnPP-Gruppe, war wiederum der etwa 8fache LDH Anstieg auf Werte von  $796 \pm 98 U/l$  in der CrMP Gruppe. Die LDH-Werte der Kontrollgruppe lagen zum Vergleich bei  $173 \pm 17 U/l$ .



**Abbildung 26:** Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum;  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs NaCl

### 6.1.3.3 Transaminasen

Zur Untersuchung des hepatozellulären Schadens wurden im Serum die Transaminasen AST und ALT bestimmt. Während sich die vier Gruppen bei der ALT nicht wesentlich unterschieden, zeigte sich nach Gabe der Metalloporpyhrine, dass SnPP und CrMP zu einem signifikanten Anstieg der AST führten (Abbildung 27). Sie waren bei diesen Tieren mit Werten von  $135 \pm 12 \text{ U/I}$  bei CrMP bzw.  $147 \pm 25 \text{ U/I}$  bei SnPP gegenüber den Kontrolltieren mit  $77 \pm 11 \text{ U/I}$  etwa verdoppelt. SnMP dagegen führte lediglich zu einem tendenziellen Anstieg der Transaminasen (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Aspartat-Aminotransferase AST (A) und Alanin-Aminotransferase ALT (B) im Serum;  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs NaCl

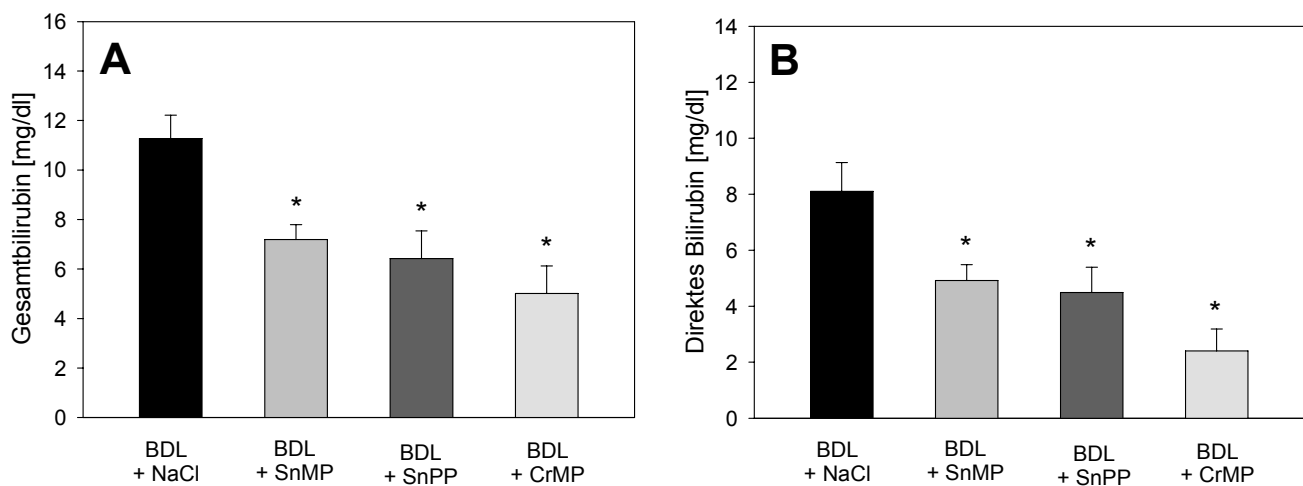
## 6.1.4 Funktionelle Blockade und HO-1 Genexpression nach HO-1 Induktion

### 6.1.4.1 Bilirubin im Serum

Zur Überprüfung, ob alle der untersuchten Metalloporpyhrine in der gewählten Dosis auch tatsächlich funktionell die HO-1 inhibierten, wurde die Bilirubinkonzentration als Stoffwechselprodukt der HO-1 bei Tieren mit BDL untersucht. Nach BDL wurden die verschiedenen HO-1 Inhibitoren bzw. NaCl verabreicht und drei Tage später das Serumbilirubin bestimmt, woraus auf die funktionelle Aktivität des jeweiligen Inhibitors geschlossen werden konnte.



Durch Behandlung mit allen drei untersuchten Metalloporphyrinen wurden signifikant geringere Gesamtbilirubinwerte im Serum gemessen, weswegen man von einer funktionellen Blockade der HO-1 in der verabreichten Dosierung eines jeden Metalloporphyrins ausgehen kann (Abbildung 28). Bei SnMP und SnPP lag die durchschnittliche Gesamtbilirubin-Reduktion bei etwa 40%, CrMP erzielte die größte Bilirubin-Reduktion auf etwa 50% gegenüber Tieren mit BDL, denen nur NaCl als Kontrolle verabreicht worden war. Auch bei der isolierten Betrachtung des direkten Bilirubins, welches bei Cholestase im Serum akkumuliert und hauptverantwortlich für die posthepatische Hyperbilirubinämie ist, zeigte sich eine signifikante Reduktion des direkten Bilirubins durch sämtliche Metalloporphyrine. Wiederum bewirkte CrMP mit einer Senkung des direkten Bilirubinspiegels um etwa 70% die stärkste Blockade.

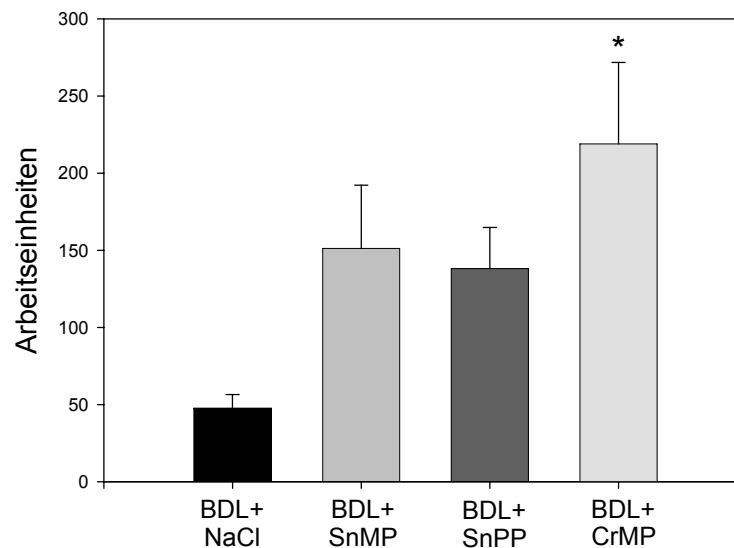


**Abbildung 28:** Gesamtbilirubin (A) und direktes Bilirubin (B) im Serum 3 Tage nach Gallengangsligatur;  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs BDL+NaCl

#### 6.1.4.2 HO-1 mRNA Induktion

Mit den entnommenen Gewebeproben wurde eine quantitative PCR durchgeführt, um die HO-1 Induktion auf mRNA-Ebene durch die verschiedenen Metalloporphyrine zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass alle drei verwendeten Inhibitoren 3 Tage nach Verabreichung zu einer verstärkten Bildung von HO-1 codierender mRNA führten, wenngleich aufgrund einer relativ hohen Standardabweichung dieser Anstieg nur in der CrMP Gruppe signifikant gegenüber

den Kontrolltieren mit BDL und NaCl Gabe war (Abbildung 29). Auffällig war, dass besonders in den mit CrMP behandelten Tieren die HO-1 mRNA zwar am deutlichsten erhöht war, in dieser Gruppe aber die niedrigsten Bilirubinwerte und somit die ausgeprägteste funktionelle HO-1 Blockade verzeichnet werden konnten.



**Abbildung 29:** HO-1 mRNA-Menge, angegeben in Arbeitseinheiten des TaqMan®; MW±SEM. \* $p < 0,05$  vs BDL+NaCl.

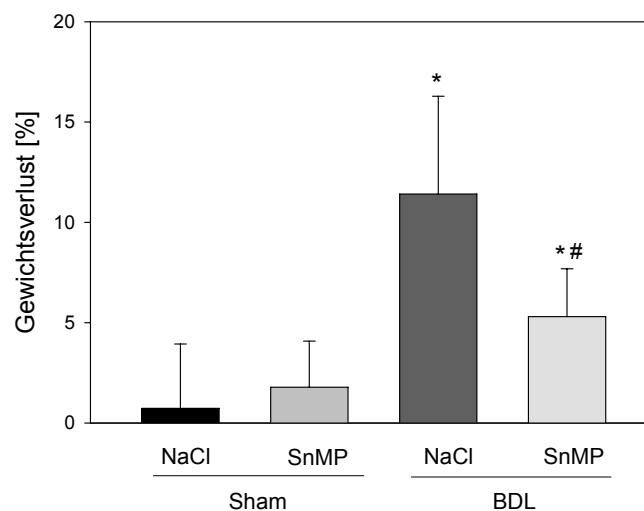
Zusammenfassend fand sich im ersten Untersuchungsabschnitt beim Vergleich der drei Metalloporphyrine ein Vorteil für SnMP bezüglich seiner hämodynamischen Stabilität, nur geringen Beeinflussung der Lebermikrozirkulation, vernachlässigbaren Hepatotoxizität und nachweisbaren HO-1 Inhibition, im Vergleich zu SnPP und vor allem CrMP. Aus diesem Grunde wurde im Weiteren die funktionelle HO-1 Inhibition nur mehr mit SnMP durchgeführt.

## 6.2. HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur

In diesem Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, wie sich die HO-1 Inhibition im Modell der Gallengangsligatur, welche nicht nur zu einer HO-1 Induktion, sondern auch zu einer manifesten Leberschädigung führt, auswirkt.

## 6.2.1 Überleben und Gewichtsverlauf nach Gallengangsligatur

Alle Tiere haben den gesamten Beobachtungszeitraum von 3 Tagen nach Sham-Operation bzw. Gallengangsligatur (BDL) mit oder ohne HO-1 Blockade mit SnMP überlebt. Während die shamoperierten Tiere während der 3 Tage ihr Ausgangsgewicht konstant beibehielten, führte die BDL-Operation jedoch zu einem drastischen Gewichtsverlust von  $11,4 \pm 4,8\%$  bezogen auf das Ausgangsgewicht (Abbildung 30). Dieser Gewichtsverlust konnte durch die zusätzliche Gabe von SnMP bei BDL signifikant auf  $5,3 \pm 2,4\%$  reduziert und somit halbiert werden. Die Gabe von SnMP bei shamoperierten Tieren führte zu keiner Veränderung des Gewichtsverlaufes.



**Abbildung 30:** Postoperativer Gewichtsverlust nach einem Beobachtungszeitraum von 3 Tagen im Vergleich zum Ausgangsgewicht bei Tieren nach Shamoperation oder Gallengangsligatur und HO-1 Blockade.  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham + NaCl; # $p < 0,05$  vs BDL + NaCl.

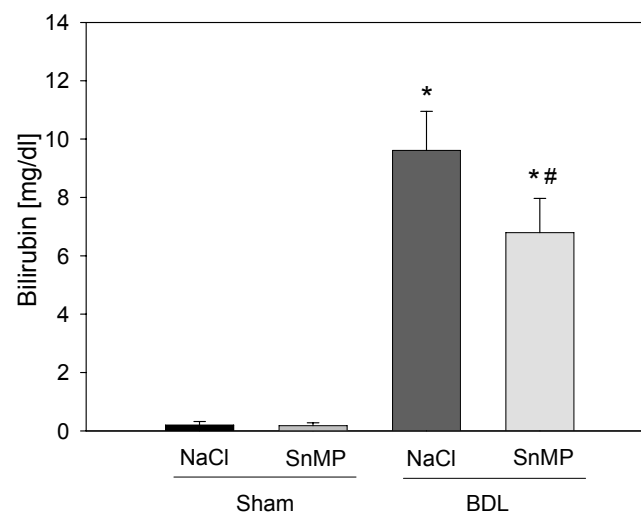
## 6.2.2. Leberlaborparameter nach HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur

Die Beurteilung der Leberfunktion erfolgte im Serum sowohl durch Bestimmung von Bilirubin als Marker für die Leberexkretion als auch durch

Bestimmung der Lebersyntheseparameter Serum-Cholinesterase (CHE) und Albumin.

### 6.2.2.1 Bilirubin im Serum

Erwartungsgemäß führte die Gallengangsligatur nach 3 Tagen zu einem starken Anstieg des Gesamtbilirubins auf Werte von  $9,6 \pm 0,4$  mg/dl (Abbildung 31). Während die HO-1 Blockade bei shamoperierten Tieren keinen Einfluss auf die Bilirubinwerte zeigte, konnte ein signifikanter Rückgang der Bilirubinproduktion auf  $6,7 \pm 0,6$  mg/dl durch funktionelle HO-1 Blockade bei gallengangsligierten Tieren nachgewiesen werden.

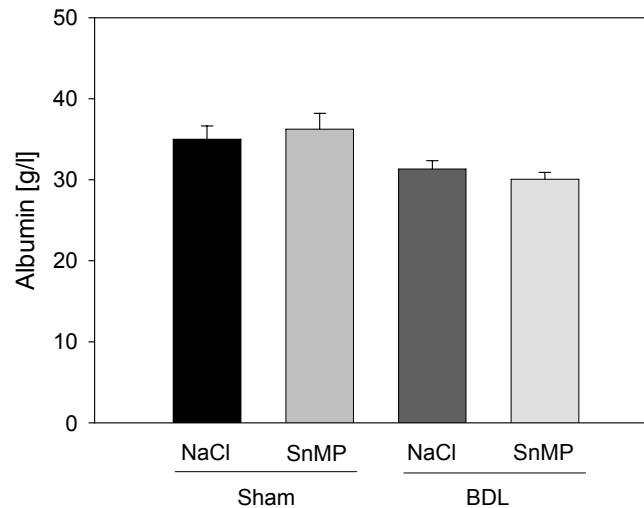


**Abbildung 31:** Gesamtbilirubin im Serum 3 Tage nach Sham-Op bzw. Gallengangsligatur.  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham + NaCl; # $p < 0,05$  vs BDL + NaCl.

### 6.2.2.2 Serumalbumin und Cholinesterase

Die Serum-Albuminwerte waren zwar insgesamt bei den BDL-Tieren tendenziell etwas niedriger als bei den shamoperierten Tieren, es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden (Abbildung 32). Auch SnMP-Gabe hatte keinen Einfluss auf die Albuminproduktion. Interessanterweise war die Serum-CHE-Aktivität in allen 4 Gruppen, also auch bei

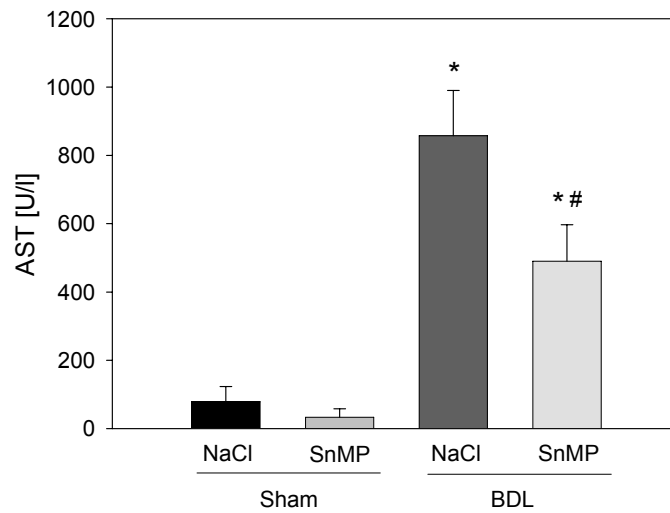
den shamoperierten Tieren im Vergleich zu Normalwerten nicht-operierter Ratten [ $1,9 \pm 1,4$  U/l] um etwa 25% deutlich vermindert.



**Abbildung 32:** Serumalbumin 3 Tage nach Sham-Op bzw. Gallengangsligatur.  $MW \pm SEM$ .

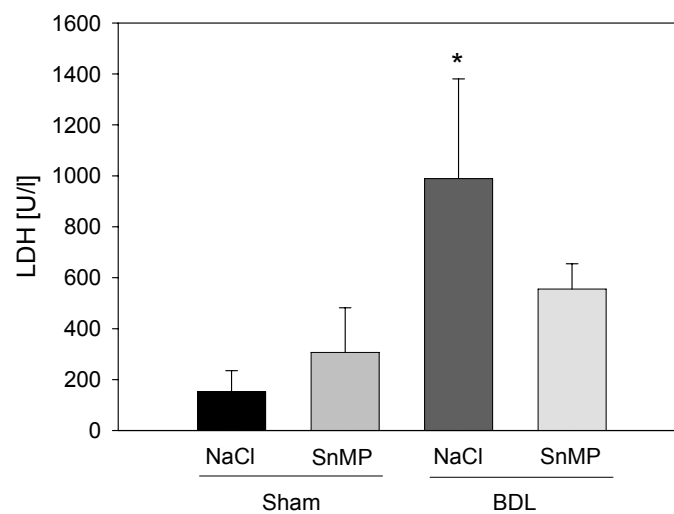
### 6.2.2.3 Transaminasen (ALT/AST), Laktatdehydrogenase (LDH) und alkalische Phosphatase (aP)

Zur Beurteilung des Leberschadens wurden die Transaminasen AST und ALT, alkalische Phosphatase und LDH im Serum bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Gallengangsligatur zu massivem Transaminasenanstieg führt (Abbildung 33). Während bei den Kontrolltieren die AST bei  $78 \pm 22$  U/l lag, wiesen gallengangsligierte Tiere nach 3 Tagen AST-Werte von  $857 \pm 59$  U/l. Durch zusätzliche Verabreichung von SnMP konnten diese Werte um etwa 40% signifikant auf  $490 \pm 48$  U/l reduziert werden. Die alleinige SnMP-Gabe führte zu keiner Veränderung der Transaminasen. Repräsentativ ist hier die AST dargestellt, bei der ALT zeigte sich ein prinzipiell ähnlicher jedoch nicht signifikanter Verlauf.



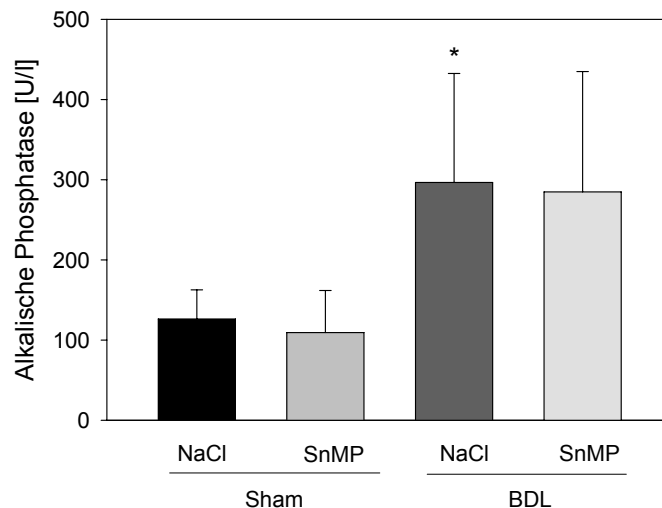
**Abbildung 33:** Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum 3 Tage nach Sham-Op bzw. Gallengangsligatur. MW±SEM. \* <math>p</math><math><0,05</math> vs Sham + NaCl; #<math>p</math><math><0,05</math> vs BDL + NaCl.

Vergleichbare Resultate ergaben sich auch bei der Bestimmung von LDH (Abbildung 34). Wiederum führte die BDL zu einem signifikanten Anstieg der LDH auf 989±147U/l. In der Gruppe der BDL Tiere mit HO-1 Blockade waren dagegen die LDH-Werte, wenngleich wegen der hohen Standardabweichung nicht signifikant, auf 555±47 U/l stark reduziert und auch im Vergleich gegenüber den Kontrolltieren nicht erhöht.



**Abbildung 34:** Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Serum 3 Tage nach Sham-Op bzw. Gallengangsligatur. MW±SEM. \*<math>p</math><math><0,05</math> vs Sham + NaCl.

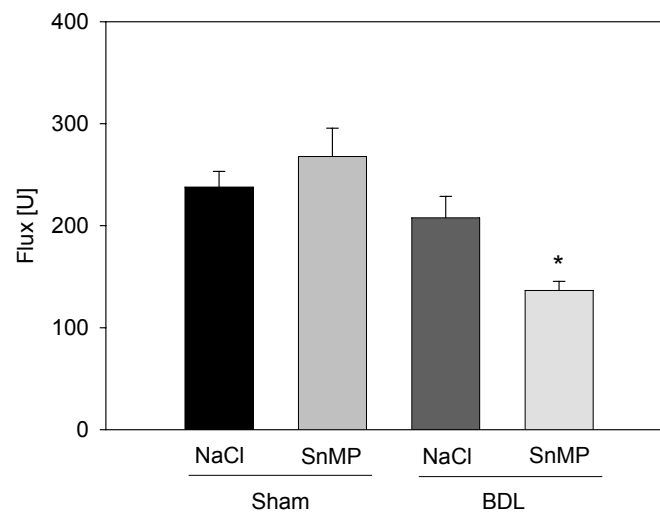
Die Gallengangsligatur führte erwartungsgemäß zu einem starken Anstieg des Cholestase-Parameters aP. Die alleinige Gabe eines HO-1 Inhibitors nach Sham-Operation führte zu keinem Anstieg der aP. Beim Vergleich der BDL Tiere mit und ohne HO-1 Blockade zeigten sich keinerlei Unterschiede hinsichtlich der aP (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Alkalische Phosphatase im Serum 3 Tage nach Sham-Op bzw. Gallengangsligatur.  $MW \pm SEM$ ; \* $p < 0,05$  vs Sham + NaCl.

### 6.2.3 Lebermikrozirkulation nach HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur

Die Mikrozirkulation der Leber wurde mit Hilfe der Laser Doppler-Flowmetrie (LDF) beurteilt. Es zeigte sich, dass alleinige BDL oder SnMP-Gabe den im Lebergewebe ermittelten Flux nicht signifikant beeinflusste (Abbildung 36). Bei den gallengangsligierten Tieren zeigte sich jedoch tendenziell eine leichte Einschränkung der Mikrozirkulation. Bei zusätzlich HO-1 blockierten Tieren war gegenüber den shamoperierten eine signifikante Abnahme des Fluxes zu verzeichnen.



**Abbildung 36:** Hepatischer Flux, gemessen mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) 3 Tage nach Sham-Op bzw. Gallengangsligatur.  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham + NaCl.

## 6.2.4 Histologischer Schaden und Leukozyteninfiltration nach HO-1 Blockade bei Gallengangsligatur

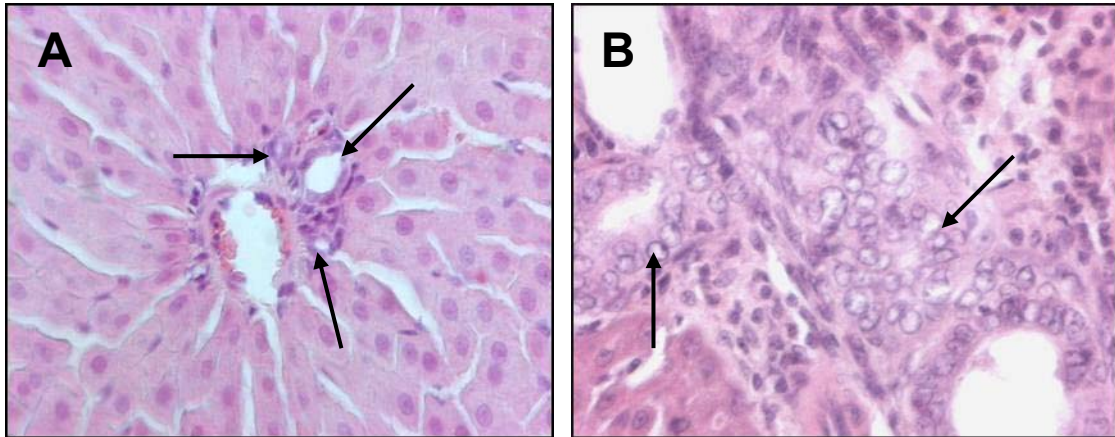
### 6.2.4.1 Histologische Morphologie

Histologisch zeigte sich in den HE-Schnitten eine Veränderung im Lebergewebe nach BDL vor allem im periportalen Feld. Das restliche Leberparenchym zeigte sich in allen 4 Untersuchungsgruppen relativ homogen und ohne Zeichen von Vakuolisierung und Scholligkeit des Zytoplasmas, Karyolysen der Hepatozyten oder anderen Hinweisen auf eine morphologisch fassbare Leberschädigung. Auch Nekrosefelder konnten nach 3-tägiger Cholestase nicht beobachtet werden.

In Bezug auf die Alterationen im periportalen Feld waren bei allen gallengangsligierten Tieren, unabhängig von der SnMP-Gabe, eine massive Proliferation und Dilatation der Gallengänge, Kernalterationen der Gallengangsepithelzellen, Karyolysen der periportalen Hepatozyten sowie eine generelle Infiltration des periportalen Feldes mit verschiedenen Zelltypen auffällig



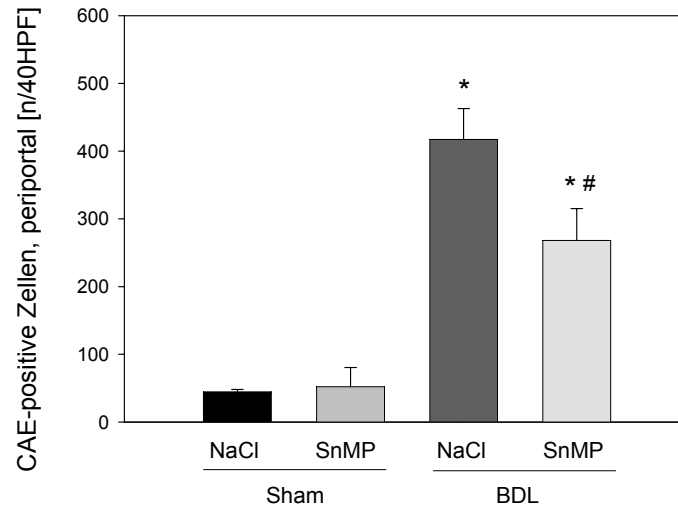
(Abbildung 37). Vergleichbare Veränderungen fanden sich in den sham-operierten Tieren nicht.



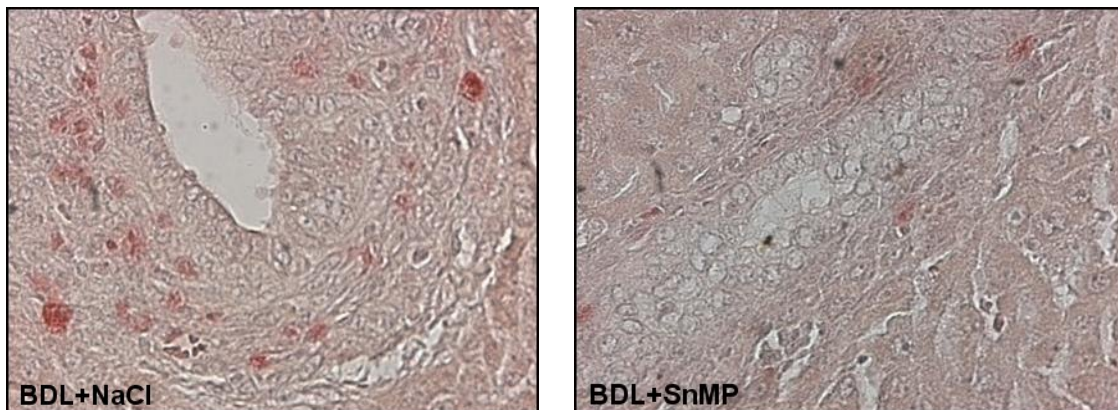
**Abbildung 37:** Repräsentative Beispiele von Periportalfeldern in HE-Färbung; A: Unauffälliges Periportalfeld eines sham-operierten Tieres mit wenigen, kleinen Gallengängen (Pfeile) mit zartem Epithel; B: Massiv vergrößertes Periportalfeld mit zellulärer Infiltration und zahlreichen dilatierten Gallengängen mit stark proliferierendem Epithel (Pfeile); Vergrößerung beider Abbildungen x400

#### 6.2.4.2 CAE-Färbungen

Die Leukozyteninfiltration des hepatischen Gewebes wurde anhand von CAE-gefärbten Schnitten untersucht. Eine verstärkte Infiltration soll hierbei mit einem größeren Leberschaden korrelieren [GUJRAL et al., 2003]. Beim Betrachten der CAE-gefärbten Schnitte konnte bestätigt werden, dass es im periportalen Feld nach Gallengangsligatur zu einer massiven Leukozyteninfiltration kam. Zur genaueren Untersuchung des Effektes einer HO-1 Blockade wurden die immunhistochemisch angefärbten Leukozyten in den jeweiligen Untersuchungsgruppen gezählt und miteinander verglichen (Abbildung 38). Im Gegensatz zu shamoperierten Tieren führte die BDL zu einer deutlichen periportalen Leukozyteninfiltration, je 40 High-Power-Fields konnten  $417 \pm 26$  extravasierte Leukozyten gezählt werden. In den zusätzlich HO-1 geblockten BDL-Tieren war diese periportale Leukozyteninfiltration mit  $268 \pm 21$  Zellen signifikant geringer ausgeprägt (Abbildung 38 und 39).



**Abbildung 38:** Anzahl von extravasierten CAE-positiven Zellen im Periportalfeld [absolute Zahl pro 40 High Power Fields];  $MV \pm SEM$ ; \* $p < 0,05$  vs Sham + NaCl; # $p < 0,05$  vs BDL + NaCl.



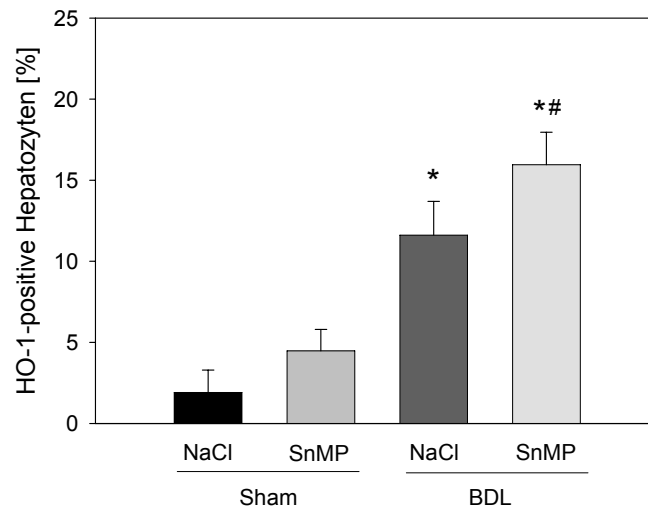
**Abbildung 39:** Repräsentative Beispiele von CAE-Färbungen, periportal. Vergrößerung x400

## 6.2.5 HO-1 Protein-Expression, Leberproliferation und Leberzellapoptose bei Gallengangsligatur

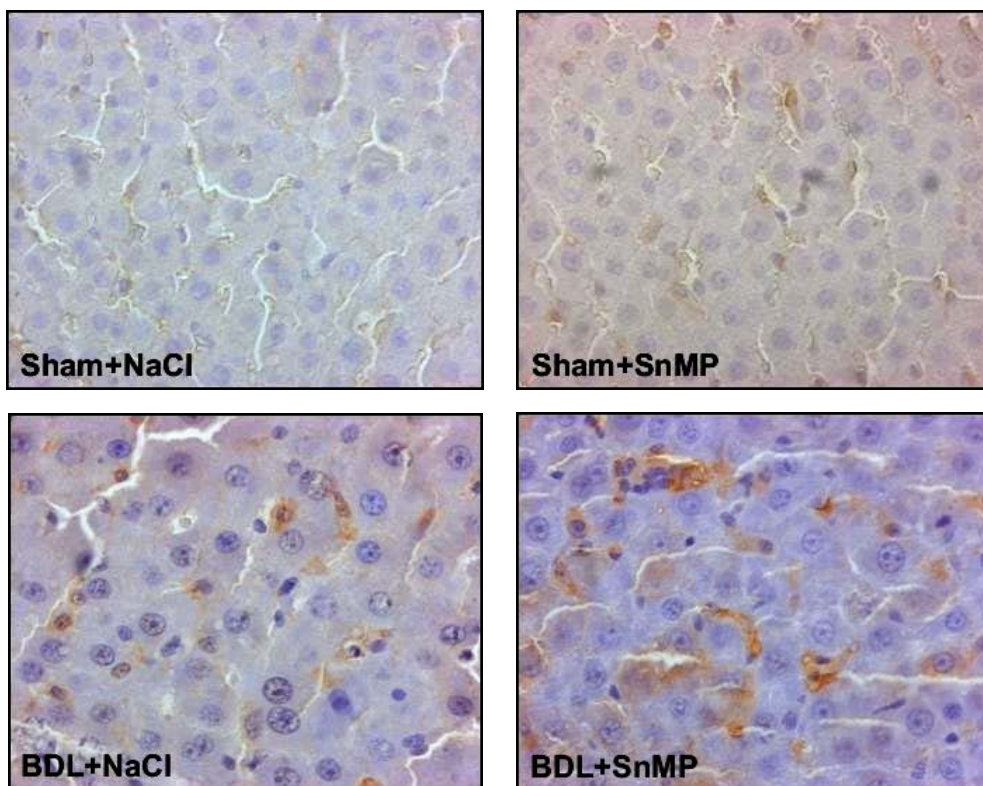
### 6.2.5.1 HO-1 Expression

Zur quantitativen Auswertung der HO-1 gefärbten immunhistologischen Schnitte wurde der prozentuale Anteil an positiven Hepatozyten in je 25 Gesichtsfeldern ausgezählt (Abbildung 40 und 41). Dabei zeigte sich, dass in den Kontrolltieren, also 3 Tage nach Sham-Operation mit  $1 \pm 0\%$  nur sehr wenige HO-1-positive Hepatozyten zu finden waren. Nach Gallengangsligatur kam es zu einem signifikanten Anstieg der HO-1 Expression auf  $11 \pm 1\%$  positive Hepatozyten. Eine

zusätzliche Verabreichung des HO-1 Inhibitors SnMP konnte die HO-1 Expression sogar noch weiter auf  $15\pm 1\%$  steigern. Auch schon die alleinige Verabreichung von SnMP bei Sham-Tieren führte zu einer vermehrten HO-1 Expression in insgesamt  $4\pm 1\%$  der Hepatozyten.



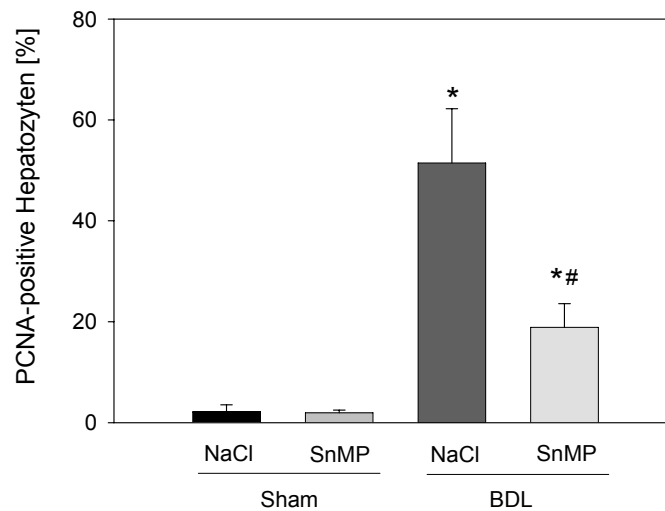
**Abbildung 40:** Prozentualer Anteil der HO-1-positiven Hepatozyten in der Immunhistochemie.  $MW\pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham + NaCl; # $p < 0,05$  vs BDL + NaCl.



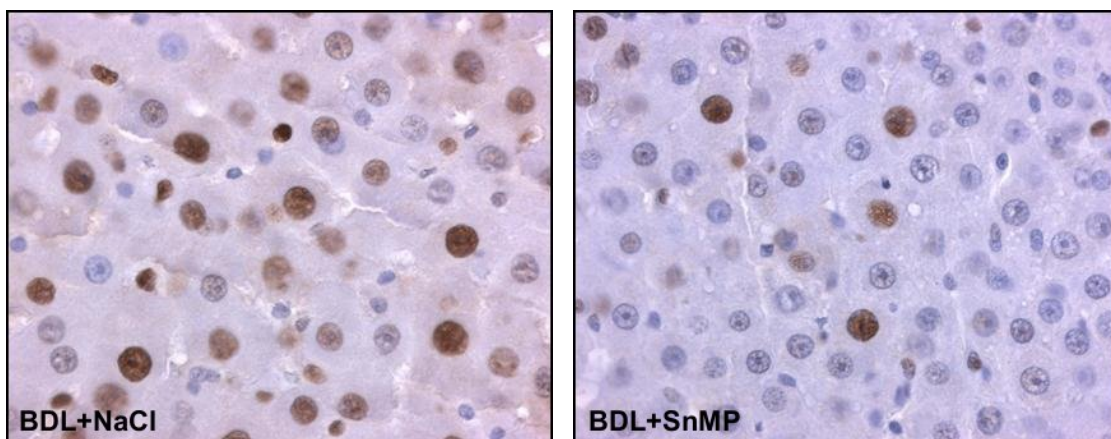
**Abbildung 41:** Repräsentative Beispiele von HO-1 exprimierenden Hepatozyten; Vergrößerung x400

**6.2.5.2. PCNA**

Mittels quantitativer Auswertung immunhistochemischer PCNA-Färbungen wurde die Proliferation/Regeneration von Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen untersucht. Bei shamoperierten Tieren mit oder ohne Verabreichung von SnMP Tieren waren kaum PCNA-positive und somit regenerierende bzw. proliferierende Hepatozyten zu finden (Abbildung 42 und 43). 3 Tage nach Gallengangsligatur zeigte sich hingegen ein massiver Anstieg an proliferierenden Zellen: 51,4±4,8% aller Hepatozyten ließen sich positiv auf PCNA anfärben, bei zusätzlicher Gabe von SnMP war dieser Anteil signifikant auf 18,9±2,1% verringert.

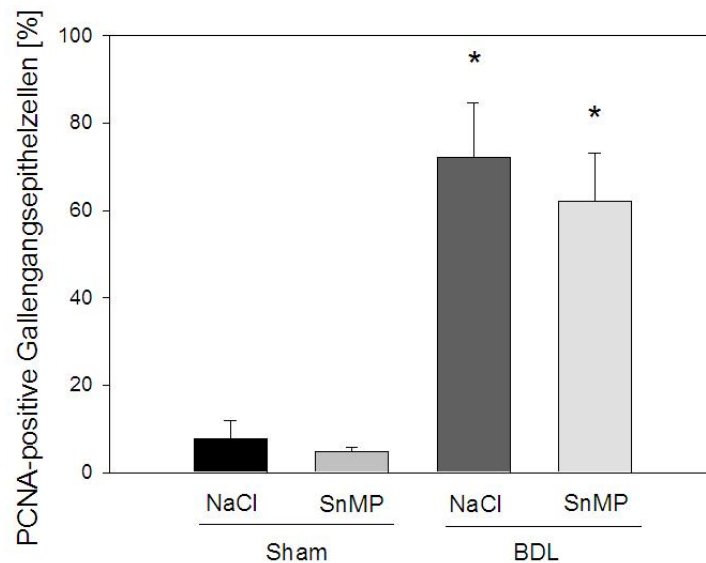


**Abbildung 42:** Prozentualer Anteil der PCNA-positiven Hepatozyten; MW±SEM. \*p<0,05 vs Sham + NaCl; #p<0,05 vs BDL + NaCl.

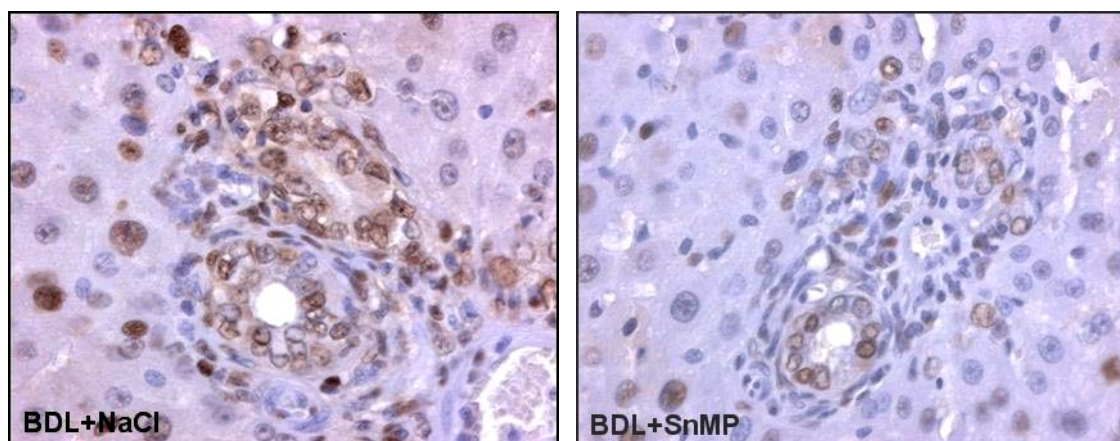


**Abbildung 43:** Repräsentative Beispiele von PCNA-positiven Hepatozyten. Vergrößerung x400

Bei der Untersuchung der Periportalfelder ließ sich mit knapp 80% PCNA-positiver Gallengangsepithelzellen eine starke Proliferation der Gallengänge nach BDL nachweisen (Abbildung 44 und 45). Zusätzliche Verabreichung von SnMP hatte eine leicht, jedoch nicht signifikant geringere Gallengangsproliferation zu Folge. Bei shamoperierten Tieren waren nur sehr wenige PCNA-positive Zellen im Bereich der Periportalfelder zu finden.



**Abbildung 44:** Prozentualer Anteil der PCNA-positiven Gallengangsepithelzellen.  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham + NaCl.



**Abbildung 45:** Repräsentative Beispiele von PCNA-positiven Gallengangsepithelzellen, Periportalfelder, Vergrößerung x400

### **6.2.5.3 Caspase-3**

Bei der Auswertung der Caspase-3 fanden sich weder in den Periportalfeldern noch im Leberparenchym in keiner der 4 Gruppen mehr als vereinzelt positiv gefärbte Zellen. Es bestand kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Somit ergaben sich keine Hinweise auf durch SnMP-Gabe oder Gallengangsligatur induzierte Apoptose.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Diskussion des Modells

#### 7.1.1 Narkoseverfahren

Die chirurgischen Eingriffe der Gallengangsligatur und Präparation zur Intravitalmikroskopie machen eine Narkose erforderlich. Ein Problem hierbei stellt neben den Auswirkungen auf Atmung und Kreislauf, die vorwiegend hepatische Metabolisierung vieler Narkotika dar. Für die Gallengangsligatur musste deshalb auf die Äthernarkose zurückgegriffen werden, da Äther als einziges Narkotikum nicht hepatisch metabolisiert wird. Äther bietet außerdem die Vorteile der analgetischen und muskelrelaxierenden Wirkung. Durch die rasch flüchtige Eigenschaft des Narkotikums ergibt sich zudem die Möglichkeit, die Operation unter Spontanatmung durchzuführen und war ideal für die nur kurzzeitig notwendigen Betäubungen. Andererseits erschwerte das rasche An- und Abfluten die Narkoseführung. Als nachteilig erwies sich der während der Narkoseeinleitung auftretende Stress für die Tiere durch die Schleimhautreizung und das ausgeprägte Exzitationsstadium. Die Reizung der Atemwege bewirkt eine Hypersalivation mit bisweilen auftretender Aspiration bei atemdepressiver Wirkung des Narkotikums. So machten immer wieder auftretende Atemstillstände bei akuter Atemwegsverlegung oder Asphyxie eine künstliche Beatmung notwendig.

Für die sich anschließenden länger dauernden in vivo Untersuchungen mit chirurgischer Manipulation war diese relativ aufwendige Art der Narkoseführung nicht durchführbar. So war eine Narkose mit einem Barbiturat notwendig, da die Tiere ruhig liegen mussten und zeitlich keine Möglichkeit für häufige repetitive Dosen eines Narkotikums bestand. Die Pentobarbitalmonoanästhesie zeichnet sich gerade gegenüber den alternativen Anästhetika Chloralhydrat und Ketamin durch eine bessere Steuerbarkeit und erreichbarer hämodynamischer Stabilität aus [BÜHREN, 1989].

Das verwendete Anästhetikum Pentobarbital (Narcoren) wird nach intraperitonealer Applikation und nachfolgender Resorption über die Leber metabolisiert. Hiermit bieten sich die Vorteile einer schonenden Narkoseeinleitung und eine langanhaltende Wirkung nach nur einmaliger Gabe. Nachteilig muss die durch die negative Inotropie und Sympathikolyse einhergehende Kreislaufdepression in Kauf genommen werden, die eine blutige Blutdrucküberwachung, sowie repetitive Volumengaben mittels Bolusapplikationen von Ringer-Lösung notwendig machte. Die stark atemdepressive Wirkung erforderte eine Tracheotomie, was einen anschließenden Überlebensversuch ausschloss [LONGNECKER et al., 1986]. Theoretisch führt Pentobarbital zu einer Induktion des hepatischen Cytochrom P450-Enzymsystems. Bei - wie in den vorliegenden Untersuchungen - lediglich einmaliger Anwendung dieses Narkoseverfahrens spielt diese Enzyminduktion aber wohl eine eher untergeordnete Rolle. Außerdem wurde postuliert, dass Pentobarbital zu einer Reduktion der portalvenösen Durchblutung führt [SEYDE et al., 1985]. Dies konnte jedoch in neueren Untersuchungen nicht bestätigt werden [RICHTER, 2008].

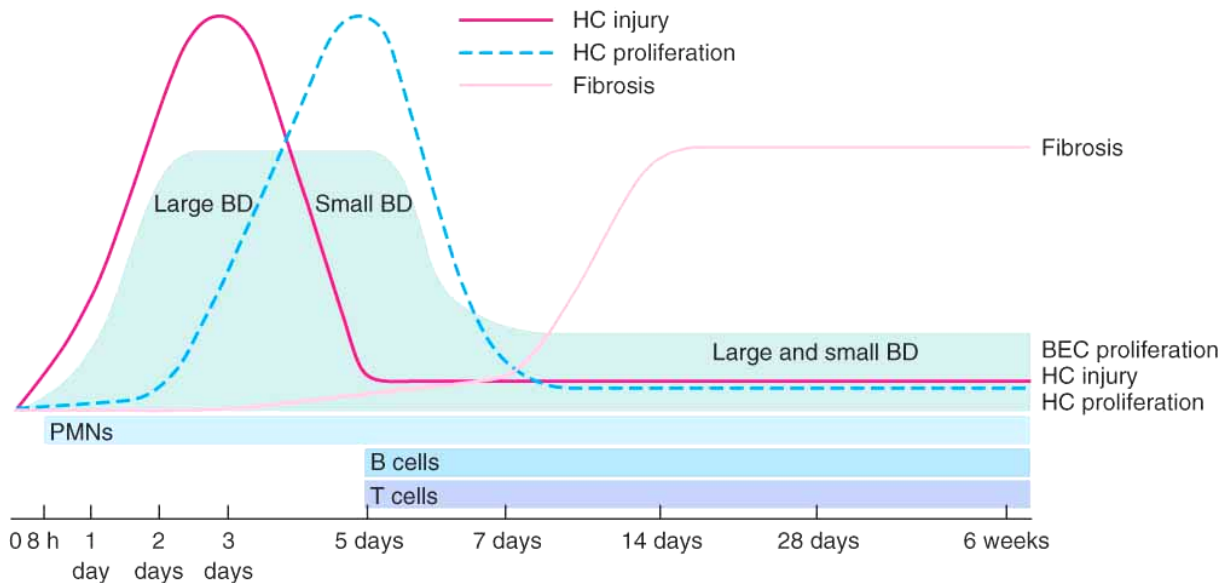
### **7.1.2 Gallengangsligatur**

Als tierexperimentelles Modell für die extrahepatische Cholestase hat sich das Modell der Gallengangsligatur (bile duct ligation, BDL) etabliert. Durch eine chirurgische Intervention mit Ligatur des Ductus communis kann künstlich die Situation der obstruktiven Cholestase induziert werden [JOHNSTONE et al., 1976]. Anhand dieses Modelles können cholestatische Mechanismen und Veränderungen ideal untersucht werden. So konnte die zeitliche Abfolge spezifischer Phasen bei akutem und chronischem Cholestaseschaden analysiert werden [GEORGIEV et al., 2008]

Schon wenige Stunden nach Eintritt der Cholestase finden sich histologisch hepatozelluläre Schädigen und auch im Serum sind erhöhte Transaminasen nachzuweisen. Parallel dazu beginnt die periportale Neutrophileninfiltration. Ihren Höhepunkt erreicht die Leberzellschädigung nach etwa 2-3 Tagen, im Abstand von weiteren 2-3 Tagen folgt dann der Höhepunkt der hepatozellulären Proliferation, was im Sinne von Regenerations- und Reperaturvorgängen zu verstehen ist.



Die Proliferation der Cholangiozyten beginnt in den großen Gallengängen schon nach etwa 2-3 Tagen, in den kleinen Gallengängen jedoch erst um den 5. Tag. Nach etwa einer Woche kommt es zur lymphozytären Infiltration mit B- und T-Zellen und zum allmählichen Beginn der Fibrogenese mit Akkumulation von Kollagen (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Zeitliche Abfolge des cholestatischen Leberschadens bei der Maus. HC injury = hepatozellulärer Schaden; Large/Small BD = große/kleine Gallengänge; PMNs = polymorphonukleäre Leukozyten (Neutrophile); BEC proliferation = Proliferation der Gallengangsepithelzellen (Abb. aus GEORGIEV et al., 2008]

Als tierexperimentelles Modell für die Obstruktion des Gallengangs stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Auswahl, die schon 1957 von Symeonidis et al. miteinander verglichen wurden: der Gallengang kann entweder exzidiert oder ligiert werden, wobei ersteres das chirurgisch aufwendigere Verfahren darstellt. Initial, das heißt während der ersten 14 Tage nach dem Eingriff, erwiesen sich beide Methoden als gleichwertig, d.h. weder klinisch noch histologisch ließ sich ein Unterschied zwischen ihnen erkennen. In der späteren Phase jedoch kam es in vielen Fällen nach Gallengangsligatur zur Rekanalisation des Gallengangs und einer vollständigen Erholung der zuvor cholestatisch geschädigten Leber, nach Gallengangsexzision entwickelten jedoch alle Tiere über einen Zeitraum von 4 Wochen eine stark ausgeprägte Leberfibrose und – zirrrose [SYMEONIDIS et al., 1957].

Da nur der akute cholestatische Leberschaden untersucht werden sollte, wurde in den vorliegenden Untersuchungen das technisch einfachere aber für diese Phase gleichwertige Verfahren der Gallengangsligatur gewählt.

Als Untersuchungstag sollte der Zeitpunkt gewählt werden, bei dem der cholestatische Leberschaden möglichst sein Maximum erreicht hat, fibrotische Veränderungen jedoch noch nicht eingetreten sind. Da ein Beginn der Fibrogenese etwa ab dem 7. Tag nach Eintritt der Cholestase sowie ein Maximum des hepatozellulären Schaden zwischen dem 2. und 4. Tag gezeigt werden konnten [GEORGIEV et al., 2008], wurden in unserer Versuchsreihe sämtliche Untersuchungen 3 Tage nach Gallengangsligatur durchgeführt.

### **7.1.3 Auswahl und Applikation der Metalloporphyrine**

Ausschlaggebend für die Wahl der zu untersuchenden HO-1 Inhibitoren waren die Häufigkeit ihrer Anwendung in experimentellen und klinischen Modellen, sowie die potentielle Bedeutung bei zukünftigen Experimenten aufgrund spezieller chemischer oder physiologischer Eigenschaften. SnMP und SnPP-IX wurden bislang experimentell am häufigsten eingesetzt, SnMP hat eine große klinische Bedeutung bei der Behandlung des Neugeborenenikterus erlangt (siehe 3.5.2). Neben diesen beiden HO-1-Inhibitoren wurde auch CrMP in die Versuchsreihe aufgenommen, da es in vitro als selektivster und außerdem potentester HO-1-Blocker gilt [APPLETON et al., 1999].

Die Applikation von Metalloporphyrin- oder Kochsalzlösung erfolgte parallel zur Gallengangsligatur bzw. Sham-Operation. Diese kann prinzipiell sowohl oral, intraperitoneal als auch intravenös erfolgen. Da die Wirkdauer der Metalloporphyrine bei oraler Zufuhr jedoch nur zwischen 24 und 48 Stunden beträgt, wäre eine wiederholte Zufuhr während der 3 Tage zwischen Operation und Zeitpunkt der Untersuchung nötig gewesen [MORIOKA et al., 2006]. Nach parenteraler Verabreichung eines Metalloporphyrins dagegen lässt sich für einen Zeitraum von mindestens 4 Tagen bis zu einer Woche eine ausgeprägte Inhibition der HO-1-Aktivität nachweisen [RODGERS et al., 1996]. Damit war eine einmalige intravenöse

perioperative Injektion eines Metalloporphyrins für die HO-1-Blockade über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg ausreichend.

## **7.2 Diskussion der Untersuchungstechniken**

### **7.2.1 Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF)**

Abhängig von der benutzten Sondenform kann in der Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) sowohl eine invasive als auch eine nicht-invasive Variante der Flussmessung zur Anwendung kommen. Die in dieser Studie verwendete Methode hat den Vorteil, dass sie nicht-invasiv ist, andererseits aber den Nachteil, dass sie nur eine Eindringtiefe von ca. 1 mm aufweist. Um Daten des gemessenen Blutflusses auswerten zu können, ist es wichtig, die genaue Eindringtiefe der Sonde zu kennen. Die Eindringtiefe des Lasers hängt ab vom Durchmesser der optischen Fasern, der Geometrie der Sonden und der verwendeten Wellenlänge [GUSH et al. 1984, JOHANSSON et al. 1991].

Zu beachten ist, dass die Untersuchungsmethode der LDF keine Absolutwerte liefert, sondern nur relative Veränderungen des Blutflusses erfasst, da sich die Perfusion Units aus der Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen und der intravasalen oder auch interstitiellen Teilchenkonzentration ergeben. Verändert sich einer der beiden letztgenannten Parameter, kann eine unkalkulierbare Fluxänderung hervorgerufen werden [LEHMANN 2001]. Bei Änderungen des Hämatokritwertes (intravasale Konzentration) oder auftretenden Ödemen (interstitielle Konzentration) ändert sich somit zwangsläufig der in der LDF ermittelte Flux, ohne dass es aber tatsächlich zu einer Veränderung der Perfusion gekommen sein muss.

Des Weiteren ist die Laser-Doppler-Flowmetrie, gerade an ausgelagerten Organen, limitiert durch auftretende Bewegungsartefakte durch Atmung, intestinale Peristaltik oder Manipulation des Operateurs [AHN et al. 1986]. Das Auftreten von plötzlichem außergewöhnlichem Anstieg des Laser-Doppler-Signals, mangelnder Pulssynchronität und Rückgang der Gesamtrückstreuung machen aber die Artefakte vom normalen Blutfluss unterscheidbar. Die Gesamtrückstreuung ist die anteilige Menge des abgestrahlten Laserlichts, das vom Gewebe wieder zurück gestreut und

von den optischen Fasern gemessen wird. Eine hohe Gesamtrückstreuung bedeutet eine passende optische Kopplung und somit ein Dopplersignal von hoher Qualität [RONHOLM et al. 2001]. Die Gesamtrückstreuung wurde in den vorliegenden Untersuchungen kontinuierlich erfasst und diente als Qualitätskontrolle des Messsignals. Es wurden nur Messungen mit ausreichend hoher Gesamtrückstreuung erfasst.

## 7.2.2 Intravitalmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Leber ist eine etablierte Untersuchungsmethode, die an vielerlei Tiermodellen, wie etwa Mäusen [RAPPAPORT, 1977], Hamstern und Ratten [MENGER et al. 1991] durchgeführt worden ist. Erstmals beschrieben wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen der Lebermikrozirkulation im Jahre 1939 [KNISELY et al., 1939], in den Folgejahren wurde diese Methode dann stetig weiterentwickelt und verbessert und gilt somit inzwischen als Standardmethode für mikrozirkulatorische Analysen. Grundsätzlich ist die Analyse der Mikrozirkulation mittels Epi-Illumination (Auflicht) oder Trans-Illumination (Durchlicht) möglich. Frühe intravitalmikroskopische Untersuchungen nutzten dabei vor allem die Trans-Illuminations-Technik [BLOCH 1955]. Um jedoch die Lebermikrozirkulation optimal analysieren zu können eignet sich mehr die Technik der Epi-Illumination: die Trans-Illumination ist auf eine sehr dünne Gewebedicke angewiesen, was die Untersuchung der Leber auf den äußersten Leberrand beschränken und somit zu einer limitierten Anzahl an untersuchbaren Azini führen würde. Außerdem ist die Untersuchung des Leberrandes durch mögliche mechanische Manipulationen im Rahmen der Präparation und der Auslagerung wie durch mögliche Austrocknung während der Mikroskopie in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Demgegenüber bietet die Technik der Epi-Illumination den Vorteil, dass die Mikroskopie unabhängig von der Gewebedicke an jeder beliebigen Stelle der Leberoberfläche durchgeführt werden kann. Da davon ausgegangen werden kann, dass die an der Leberoberfläche stattfindenden Prozesse denen im Organinneren gleichen [RAPPAPORT et al., 1958], wobei man entsprechend der Homogenitätshypothese davon ausgeht, dass die ausgesuchten Areale mit den zu untersuchenden Gefäßen im vorliegenden Beispiel repräsentativ für das gesamte untersuchte Organ sind.

Der Nachteil dieser Methode besteht in der dazu nötigen chirurgischen Manipulation des Versuchstiers, die eine Narkose des Tieres unvermeidbar macht. Schon allein durch die chirurgische Präparation kommt es zu einer Beeinträchtigung der Leberperfusion, verantwortlich dafür ist insbesondere die Laparotomie [GELMAN et al., 1976; BOHRER et al., 1981] und die Präparation und Manipulationen in Hilusnähe [KLAR et al., 1995]. Um die Leber überhaupt mikroskopisch untersuchen zu können, erfolgt eine Auslagerung des linken Leberlappens unter Rotation des Versuchstiers um 45° entlang der Längsachse des in Rückenlage fixierten Tieres. Zur Verminderung der Atemexkursionen wird dieser auf ein Stativ ausgelagert, mit Kochsalzlösung benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Bei diesem Manöver besteht prinzipiell immer die Möglichkeit der Alteration der Leberperfusion. Aus methodologischen und ethischen Gründen sind jedoch vergleichende Messungen an nicht-narkotisierten und nicht-laparotomierten Tieren intravitalmikroskopisch nicht durchführbar. Durch die Rotation des Tieres und die Auslagerung der Leber auf ein Stativ konnte eine Beeinträchtigung der Leberperfusion jedoch weitgehend vermieden werden. Weiterhin wurde bei der Auslagerung der Leber auf das Stativ darauf geachtet, dass sich der linke Leberlappen auf Herzhöhe befand, um hydrostatische Effekte auf die Leberperfusion auszuschließen.

Da bei unserem Versuchsaufbau pro Tier jeweils zwei IVM-Aufnahmen mit dazwischenliegender Wartezeit und Blutdruckmonitoring vorgesehen waren und der Leberlappen so relativ lange dem Druck des Deckglases ausgesetzt war, war durchaus mit einem allein durch den Versuchsaufbau bedingten Abfall der Leberperfusion in den zweiten Aufnahmen zu rechnen. Um nun bestimmen zu können, inwiefern die Veränderungen der Mikrozirkulation tatsächlich der HO-1-Inhibition zuzuschreiben sind, haben wir zusätzlich eine Kontrollgruppe untersucht, der keine Metalloporphyrine appliziert wurden. Zunahmen an Perfusionsausfällen, Leukozytenstagnation oder Änderungen der Blutflussgeschwindigkeit in dieser Gruppe wurden als versuchsbedingt angesehen und galten als Referenzwert für die Berechnungen der Mikrozirkulationsveränderungen durch HO-1-Inhibitor.

Durch die Notwendigkeit der systemischen Applikation von phototoxischen Fluoreszenzfarbstoffen ist die Technik der Epi-Illumination nur beschränkt einsetzbar [SAETZLER et al. 1995]. Da eine längere Lichtexposition während einer Intravitalmikroskopie intrazelluläre photodynamische Prozesse induzieren kann

[STEINBAUER et al. 2000], wurde bei der Auswahl der Gesichtsfelder darauf geachtet, während einer intravitalmikroskopischen Untersuchung nicht in unmittelbarer Nähe eines bereits belichteten Areals wiederholt zu mikroskopieren. Bisher wurde in der Intravitalmikroskopie noch keine Erfahrung mit SnMP gemacht. Die Phototoxizität der Metalloporphyrine im Allgemeinen ist aber bekannt. Daher sollte die Dosis möglichst gering gehalten werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Studie sollten die Auswirkungen einer funktionellen HO-1 Blockade auf die Mikrozirkulation der Leber an der Ratte untersucht werden. Nachdem schon nachgewiesen worden war, dass die Applikation verschiedener Metalloporphyrine sowohl in vitro als auch in vivo zu einer Inhibition der HO-1 Aktivität in Hepatozyten bzw. im Lebergewebe führt [Vreman et al., 1989 und 1991], sollten nun anhand eines in-vivo-Modells die hämodynamischen Veränderungen der Leberzirkulation nach Applikation verschiedener Metalloporphyrine analysiert werden.

## **7.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.3.1 Vergleich der drei Metalloporphyrine SnMP, SnPP und CrMP**

Wie unter 3.2. dargelegt, existiert eine Vielzahl von Befunden in der Literatur, dass die HO-1 protektive Eigenschaften bei verschiedensten Stressmodellen aufweist. Derartige Untersuchungen folgten alle demselben Prinzip, nämlich der Blockade der HO-1 Aktivität mittels eines Metalloporphyrins. Beispielsweise führte die Gabe von CrMP nach Extremitätenischämie und 24-stündiger Reperfusion zu vermehrten Perfusionsdefekten in der Mikrozirkulation und zu einem erhöhten Leberzellschaden [WUNDER et al. 2002, MCCARTER et al. 2004]. Beim hämorrhagischen Schock mit anschließender Volumentherapie (Ischämie/ Reperfusion der Leber) führte die HO-1 Inhibition mittels SnMP zu einer vermehrten perizentralen Nekrose als Ausdruck eines reduzierten nutritiven Blutflusses in der Leber [RENSING et al. 1999]. Bei der Small-for-Size-Lebertransplantation (Reperusions- und Hyperperfusionsschaden) war nach HO-1 Blockade mit ZnMP

das Transplantatüberleben gegenüber einer Kontrollgruppe ohne HO-1 Blockade geringer [YANG et al. 2004]. Von besonderem Interesse ist, dass in den eben zitierten, aber auch anderen ähnlichen Studien mit HO-1 Blockade eine Kontrollgruppe, in der lediglich das eingesetzte Metalloporphyrin dem gesunden Versuchstier gegeben wurde, nicht mituntersucht wurde. Aus diesem Grunde bleibt es letztendlich unklar, ob die beobachteten Schädigungen der Zellintegrität bzw. Störungen der Mikrozirkulation tatsächlich auf die HO-1 Blockade zurückzuführen sind, oder es sich möglicherweise um Nebenwirkungen des verabreichten Metalloporphyrins handelt.

Vor dem Hintergrund der großen Anzahl von Studien zur HO-1 Inhibition bei unterschiedlichsten Modellen ist es erstaunlich, dass bislang in keiner in-vivo Untersuchung unterschiedliche Metalloporphyrine miteinander verglichen wurden und insbesondere der Einfluss der Metalloporphyrine auf die Mikrozirkulation der gesunden Leber thematisiert wurde.

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal in-vivo gezeigt, dass die Gabe von Metalloporphyrinen bestimmte Einflüsse auf den systemischen Blutdruck, die hepatische Mikrozirkulation und sogar auf die Leberlaborparameter hat. Darüber hinaus konnte sogar ein gewisser hepatotoxischer Effekt für CrMP gezeigt werden. CrMP führte zu einem signifikanten Blutdruckabfall und einer entzündlichen Reaktion im Lebersinus. SnPP hingegen hatte nur einen vorübergehenden Blutdruckabfall zur Folge, führte aber zu einer nachweisbaren Beeinträchtigung der sinusoidalen Perfusion, wenngleich nicht in dem Umfang, dass eine ernsthafte Leberzellschädigung hiervon zu erwarten gewesen wäre. Nichtsdestotrotz ließen sich sowohl in der CrMP als auch in der SnPP Gruppe erhöhte ALT-Konzentrationen als Ausdruck einer Leberzellschädigung nachweisen. Die geringsten Auswirkungen auf Blutdruck, Lebermikrozirkulation und Leberlaborparameter waren nach Gabe von SnMP beobachtet worden, weshalb dieses Metalloporphyrin am geeignetsten für Studien zur HO-1 Inhibition schien und deshalb im weiteren Studienverlauf eingesetzt wurde.

Der genaue Mechanismus der beobachteten Beeinträchtigungen der Makrohämodynamik und Mikrozirkulation bleibt auch nach den vorliegenden Untersuchungen ungeklärt. Theoretischen Überlegungen zufolge müsste es

eigentlich nach Gabe eines HO-1 Inhibitors und konsekutivem Abfall des Vasodilatators CO zu einem Anstieg des systemischen Widerstandes und somit zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks kommen. So ließ sich an isolierten Muskelarteriolen eine vaskuläre Widerstandserhöhung durch Applikation von Metalloporphyrinen durchaus nachweisen [KOZMA et al. 1999], bei in-vivo-Versuchen konnten jedoch durch die kurzfristige Gabe von HO-1 Inhibitoren bei Tieren, die bis dato unter normalen Aufzuchtverhältnissen standen, keine Blutdruckveränderungen beobachtet werden [TERAN et al. 2005]. Durch die Applikation von CrMP fand sich jedoch ein Blutdruckabfall statt des erwarteten Anstieges bzw. Erhalt des Ausgangsniveaus. Da durch die beiden anderen HO-1 Inhibitoren bei gleicher funktioneller Blockade kein solcher Effekt zu verzeichnen war, liegt dieser Beobachtung eine eher HO-1-unabhängige und CrMP-spezifische Eigenschaft zu Grunde. Ein denkbarer Erklärungsansatz hierfür wäre -wie bereits schon unter 7.2.2 diskutiert- eine durch den hohen Lichteinfall während der Intravitalmikroskopie induzierte phototoxische Reaktion mit systemischem Blutdruckabfall. Da jedoch nur nach der Applikation von CrMP diese Beobachtung zu verzeichnen war, kann man diese Erklärung weitgehend ausschließen. Nachdem die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Blockern im Zentralatom des Porphyrinkomplexes liegen und man davon ausgehen kann, dass analog zum Abbau des Hämoglobins, bei dem Eisen freigesetzt wird, auch aus den Metalloporphyrinen gewisse Mengen des entsprechenden Metallions freigesetzt werden, könnten die substanzspezifischen Unterschiede eine mögliche allergische Reaktion oder generell toxische Wirkung des Metallions darstellen.

Obwohl in-vitro Untersuchungen die effektive HO-1 Inhibition durch CrMP gezeigt haben, war in der vorliegenden Untersuchung ein Anstieg des Bilirubins bereits schon gut eine Stunde nach Applikation des Metalloporphyrins nachweisbar. Dieser Befund ist umso auffälliger, als dass CrMP durch seine nachgewiesenermaßen hohe Potenz der HO-1 Inhibition eigentlich die endogene Bilirubinproduktion hätte reduzieren müssen. Nachdem nach Gabe von CrMP neben Bilirubin auch LDH erhöht war, liegt der Verdacht nahe, dass CrMP zu einer Hämolyse geführt hatte. Schon vor über 20 Jahren wurde berichtet, dass die Injektion von Chrom in Hühner-Embryos zu hepatozellulären und erythrozytären Schäden durch DNA-Strangbrüche und Cross-Links führt [HAMILTON et al. 1986] und



galt seitdem als mutagen und karzinogen. In den Folgejahren konnten die molekularen Mechanismen der Chrom-Toxizität weitergehend analysiert werden, so dass man heute davon ausgeht, dass durch Chrom mittels Oxidation des Hämoglobins durch hochreaktive intermediäre Chromat-Zwischenstufen eine Hämolyse verursacht wird [MISRA et al. 1994, ALPOIM et al. 1995]. Chrom, das Zentralatom des CrMP, gilt außerdem im Gegensatz zu Zinn, dem Zentralatom von SnMP und SnPP, als Auslöser von allergischen Typ I und Typ IV-Reaktionen: schon in pikomolaren Konzentrationen wurde Chrom sowohl als Verursacher von allergischer Kontaktdermatitis und Hautulzera identifiziert [SHELNUTT et al. 2007] als auch als Auslöser von akutem und verzögertem allergischen Asthma beschrieben [LEROYER et al. 1998]. Bei experimentellen Untersuchungen der Wirkungen von Chrom auf das Immunsystem zeigte sich in niedrigen Konzentrationen eine Stimulation von Immunzellen, sowie die Induktion bestimmter Zytokine [SHRIVASTAVA et al. 2002] durch Chromexposition. Es ist außerdem bekannt, dass Chrom zu einer Schädigung der Lipide der Zellwand führen kann [SCHUSTER et al. 2004] und die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber schädigenden Einflüssen erhöht [O'HARA et al. 2006].

Nach Applikation der Metalloporphyrine wurden in allen 3 Gruppen niedrigere Serumalbuminwerte als bei den Kontrolltieren gemessen, signifikant war der Unterschied jedoch nur bei den SnPP- und CrMP-behandelten Tieren. Bei einer Halbwertszeit des Albumins von 19 Tagen erscheint ein Albuminabfall aufgrund einer verminderten Synthese im Sinne einer Leberfunktionseinschränkung jedoch unwahrscheinlich, sondern ist eher Ausdruck einer akut verminderten Fraktion an freiem Albumin, da die verwendeten Metalloporphyrine im Blut zu nahezu 100% an Serumalbumin gebunden werden [GREENBAUM et al. 1994]. Außerdem wäre ein zusätzlicher akuter Verdünnungseffekt durch die Gabe der Injektionsträgerlösung denkbar, war jedoch als alleinige Ursache für den Albuminabfall auszuschließen, da alle Tiere, auch die Kontrolltiere, im Laufe des Versuches dasselbe Flüssigkeitsvolumen erhielten.

Ein möglicherweise sehr sensitiver, aber nur sehr selten eingesetzter Leberfunktionsparameter ist die Cholinesterase. So beobachtete Anfang der 90-iger Jahre eine Hannoveraner Arbeitsgruppe, dass es bei Ratten in den drei folgenden Tagen nach Gallengangsligatur zu einer signifikant geringeren Aktivität der

Serumcholinesterase kommt [PUTZKI et al. 1991]. Interessanterweise war aber auch in der Sham-Operationsgruppe am ersten postoperativen Tag ein Abfall der Serumcholinesterase zu verzeichnen. Die Autoren führten als mögliche Ursachen Einflüsse der Narkose bzw. des – wenn auch geringen - operativen Traumas an. Nichtsdestotrotz wurde der Cholinesterase trotz dieser Befunde in der Folgezeit wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Auch in den vorliegenden Untersuchungen konnte ein deutlicher Abfall der Cholinesterase nach Gabe der Metalloporphyrine, nicht aber nach Gabe von NaCl gemessen werden. Die Tatsache, dass in der Kontrollgruppe keine Beeinträchtigung der Cholinesterase gefunden wurde, schließt reine Effekte der Narkose bzw. Hämodilution durch Volumengabe, als auch Einflüsse des erheblichen operativen Traumas zur Intra vitam Mikroskopie aus. Ob es sich wiederum um eine Nebenwirkung der Metalloporphyrine oder um einen HO-1-spezifischen Effekt handelt, muss offen bleiben.

Es wurde bereits gezeigt, dass Metalloporphyrine, die eigentlich zur Blockade der HO-1 eingesetzt werden, ihrerseits zu einer vermehrten mRNA HO-1 Genexpression führen [SARDANA et al. 1987, HAJDENA-DAWSON et al. 2003]. Über die Regulationsmechanismen der mRNA-Genexpression durch Metalloporphyrine ist aber nichts bekannt. Mögliche Erklärungsmodelle reichen von der direkten Aktivierung aufgrund der chemischen Ähnlichkeit mit Häm, von der negativen Feedbackhemmung bis hin zur Aktivierung aufgrund des Metalloporphyrin-induzierten Leberschadens. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Induktion der HO-1-mRNA-Genexpression für alle drei untersuchten Metalloporphyrin bestätigt werden. Trotz einer vermehrten Genexpression blieb die Aktivität der HO-1 aber durch Verwendung des Metalloporphyrins als falsches Substrat inhibiert, erkennbar an der verminderten Bilirubinakkumulation nach BDL.

### **7.3.2 Endogene Hochregulation von HO-1 bei Cholestase trägt zur Produktion von Bilirubin und Manifestation des Leberschadens bei**

Einheitlich hatte sich im Versuchsabschnitt 6.2. gezeigt, dass die HO-1 Blockade bei gallengangligierten Tieren zu einem geringeren cholestatischen

Leberschaden mit verminderter Infiltration von neutrophilen Granulozyten und geringeren Reiz zur Leberregeneration führt. Damit reihen sich diese Befunde zu der eher geringeren Zahl von Publikationen, die der endogen induzierten HO-1 eine schädigende Wirkung bzw. der HO-1 Inhibition zellprotektive Fähigkeiten zuschreiben [KADOYA et al. 1995, YET et al. 1997, EIPEL et al. 2007]. Offenbar ist die HO-1 Expression als solche weder günstig noch schädlich, sondern abhängig vom jeweils gewählten Modell. Neben den weithin postulierten zytoprotektiven Effekten für CO [siehe auch Kapitel 3.3.2, sowie SASS et al. 2003, OTT et al. 2005] oder Bilirubin [siehe auch Kapitel 3.3.1, sowie STOCKER et al. 1987, KATO et al. 2003], könnte die Akkumulation von toxischem Eisen, ebenfalls Stoffwechselprodukt der HO-1, die möglichen protektiven Effekte von CO und Bilirubin aufwiegen. Unberücksichtigt des Verständnisses der genauen Einflüsse und Abläufe, korrelierte eine hohe HO-1 Expression in humanen Spenderlebern mit dem Auftreten eines Organschadens [GEUKEN et al. 2005]. Nach BDL ist eine vermehrte HO-1 Expression nicht nur in der Leber [CARTER et al. 2002, CHEN et al. 2004, FLORES et al. 2005], sondern auch in weiteren Organen wie Lunge [CARTER et al. 2002], Milz [CHEN et al. 2004], Aorta [CHEN et al. 2004], und dem Herzen [LIU et al. 2001] beschrieben worden. Während aber in den zitierten Arbeiten meist die 2-5-wöchige BDL als Modell der biliären Zirrhose angewandt wurde, richtete sich die Aufmerksamkeit bei den vorliegenden Untersuchungen auf die akute (dreitägige) Cholestase. Damit wurde die Cholestase als solche untersucht und wurden Einflüsse der biliären Leberzirrhose vermieden (siehe auch Kapitel 7.1.2.). Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt, waren die HO-1 Expression vor allem in den Hepatozyten -sowohl nach BDL, als auch nach vermehrter HO-1-mRNA-Genexpression durch Gabe von SnMP- und die laborchemischen Indikatoren einer Leberschädigung wie beispielsweise AST oder LDH deutlich erhöht. Die Lebersynthese war nicht deutlich eingeschränkt. Im Gegensatz zu den Akutversuchen im vorigen Abschnitt, waren diesmal zwischen den Untersuchungsgruppen keine Unterschiede beim Serumalbumin feststellbar. Dies bestätigt nochmalig, dass die verminderten Albuminkonzentrationen im vorhergehenden Abschnitt nicht als Ausdruck einer verminderten Lebersyntheseleistung verstanden werden dürfen. Der Blick auf die Serumcholinesterase als möglicherweise sehr sensitivem Lebersynthesemarker zeigte aber, dass die Sham-Operation nun zu erniedrigten Serumcholinesterasekonzentrationen geführt hatte

und keine darüber hinausgehende Suppression nach BDL oder HO-1 Blockade stattfand.

Die ersten Tage nach BDL zeigten typischerweise eine hohe Proliferationsrate der Gallengänge, die vom dritten Tag bis zur vierten Woche nach BDL von 87.7 auf 16.5% abnahm [YOSHIOKA et al. 2005]. Außerdem nahmen der Quotient aus Lebergewicht zu Körpergewicht als Ausdruck der Leberregeneration bzw. -proliferation und der Quotient aus Milzgewicht zu Körpergewicht als Ausdruck der Splenomegalie die ersten dreißig Tage nach BDL zu. Die Interpretation der Quotienten von Leber- bzw. Milzgewicht zu Körpergewicht muss aber berücksichtigen, dass, wie in der vorliegenden Untersuchung gezeigt, nach BDL auch eine Abnahme des Körpergewichts regelhaft auftritt, was selbstverständlich Einfluss auf die Berechnung des Quotienten nimmt. Eine Abnahme des Körpergewichts nach Sham-Operation war im Wesentlichen nicht aufgetreten.

Unter den untersuchten Markern der Leberfunktion und Leberregeneration äußerte sich der zytoprotektive Effekt der HO-1 Blockade in Form einer verminderten Abnahme des Körpergewichts, einem verminderten Transaminasenanstieg, einer abgeschwächten periduktulären Infiltration mit Neutrophilen und einer geringeren Zahl PCNA-exprimierender proliferierender Hepatozyten. Die beobachteten Effekte gingen einher mit einer erhöhten HO-1 Gen- und Proteinexpression. Vergleichbare Daten hierzu in der Literatur über die Auswirkungen einer direkten HO-1 Blockade durch Gabe von SnMP auf den cholestatischen Leberschaden gibt es nicht. Allerdings wurde zumindest für das Modell der chronischen BDL schon gezeigt, dass die indirekte Inhibition der HO-1 Expression, ausgelöst durch die Inhibition von Stickstoffmonoxid durch L-NAME, in der Lage ist, die Serumbilirubinkonzentration signifikant zu senken [FLORES et al. 2005]. Darüber hinaus fanden sich nach indirekter HO-1 Inhibition durch L-NAME auch geringere Transaminasen, sowie eine geringere alkalische Phosphatase.

Wie schon in der Einleitung unter Kapitel 3.6.3 dargestellt, geht der cholestaseinduzierte Leberschaden mit erheblichen Störungen der hepatischen Mikrozirkulation einher [KOEPEL et al. 1997]. Es ist aber in den vorliegenden Untersuchungen des Abschnitts 6.2. der protektive Effekt der HO-1 Inhibition wohl weniger auf Veränderungen oder gar Verbesserungen der Mikrozirkulation

zurückzuführen. Die Lebermikrozirkulation wurde mit Hilfe der Laser-Doppler-Flowmetrie erfasst und zeigte paradoxerweise sogar einen leicht erniedrigten Flux nach HO-1 Blockade. Diese leichte Reduktion des Flux scheint auf die im vorigen Abschnitt bereits diskutierten Veränderungen nach Metalloporphyringabe zurückzuführen zu sein. Eine andere theoretische Möglichkeit könnte eine vermehrte Shuntdurchblutung der Leber auf Kosten der Mikrozirkulation sein. Bereits unter physiologischen Bedingungen sind intrahepatische, sowohl arteriolo-portalvenöse als auch portalvenös-systemisch Shunts beschrieben [GEUMEI et al. 1968, MATSUI et al. 1986, ALEXANDER et al. 2001, ALEXANDER et al. 2002]. Bei Leberzirrhose fließt ein erheblicher Anteil unter Umgehung des Leberparenchyms durch diese Shunts [RICHTER 2008]. Bisher ist nur wenig über die Regulation der Shuntdurchblutung bekannt. Es ist aber durchaus denkbar, dass CO nicht nur vasodilatierende Eigenschaft im Sinusoid, sondern auch in den Shunts aufweist.

Trotz messbarer Unterschiede der Perfusion ist es aber unwahrscheinlich, dass diese zu Beeinträchtigungen der Leberfunktion und -integrität geführt haben. In Bezug auf die Pathophysiologie des Cholestaseschadens der Leber werden vielmehr zwei andere Mechanismen diskutiert: 1. die onkotische Nekrose mit Zytolyse in Verbindung mit einer interstitiellen Entzündungsreaktion und 2. die hepatozelluläre Apoptose durch Aktivierung von Todesrezeptoren und/oder mitochondrialem Stress [MIYOSHI et al. 1999, JAESCHKE et al. 2003, GUJRAL et al. 2003, CANBY et al. 2003]. Ausgelöst werden die genannten Mechanismen durch das komplexe Zusammenspiel von Gallensäuren, reaktiven Sauerstoffradikalen und direkter zellvermittelter Schädigung. Die ersten 48 Stunden nach BDL findet sich weniger eine Apoptose als eine Zellnekrose [LI et al. 2007]. Für das Auslösen der Nekrose werden Neutrophilen-abhängige Proteasen wie z.B. die Elastase verantwortlich gemacht [GUJRAL et al. 2004A, GUJRAL et al. 2004B]. Bei intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 defizienten Mäusen konnte die für die BDL pathognomonische periportale Neutrophileninfiltration aufgehoben und damit der hepatozelluläre Schaden deutlich verbessert werden. Eine Inhibierung der Neutrophileninfiltration und Milderung des hepatozellulären Schadens bei BDL fand sich auch nach Gabe von rekombinantem hepatocyte growth factor (HGF) [LI et al. 2007]. Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte -diesmal durch SnMP-Gabe- eine Verminderung der periportalen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten erzielt werden. Es existieren

Daten, dass HO-1 die venuläre Leukozytenadhäsion unterdrückt, ein Effekt der dem durch die HO-1 gebildeten Bilirubin zugeschrieben wird [HAYASHI et al. 1999, FREITAS et al. 2006]. Demzufolge müsste eine HO-1 Inhibition zu einer vermehrten venulären Leukozytenadhäsion führen. Die postkapilläre Leukozytenadhäsion wurde in den vorliegenden Untersuchungen nicht eigens thematisiert. Jedenfalls erscheint es unwahrscheinlich, dass die verminderte periportale Infiltration neutrophiler Granulozyten Ausdruck eines erhöhten oxidativen Stresses ist. Wesentlich wahrscheinlicher für die sich vor allem in der periportalen Region abspielende Entzündungsreaktion erscheinen toxische Effekte durch bestimmte Stoffwechselprodukte.

Bei Persistenz der Gallensäuren kommen zur Nekrose noch apoptotische Vorgänge hinzu [BIRD et al. 2002, GUJRAL et al. 2004A, PATEL et al. 1995]. In Kultur als auch in-vivo führten hydrophobe Gallensäuren zu einer Fragmentierung der DNA [BENZ et al. 1998, TAKIKAWA et al. 2001]. Es ist wenig wahrscheinlich, dass die nach HO-1 Inhibition beobachtete Minimierung des cholestatischen Leberschadens Folge antiapoptotischer Effekte ist. Im Gegenteil, die HO-1 Inhibition müsste sogar zu einer verstärkten Apoptose führen, da weniger CO anfällt, welches seinerseits antiapoptotische Effekte aufweist [ZHANG et al. 2003]. Schließlich waren bei BDL-Ratten die Glutathionkonzentrationen und weitere Antioxidantien in der Leber erniedrigt [SINGH et al. 1992, KRÄHENBÜHL et al. 1995]. Diese Befunde zeigen, dass auch der oxidative Stress den Cholestaseschaden in der Leber vermittelt. Aber auch hier hätte eine HO-1 Inhibition keine Verminderung, sondern eher sogar eine Zunahme des oxidativen Stresses bewirkt, da, wie bereits dargestellt, Biliverdin und Bilirubin starke Radikalfänger sind [siehe 3.3.1.]. An sich finden sich ja per definitionem bei der BDL erhöhte Bilirubinkonzentrationen, sodass letztlich die antioxidative Kapazität von Bilirubin in diesem Modell erschöpft ist. Damit wird indirekt auch deutlich, wie hoch der anfallende oxidative Stress bei BDL sein muss.

Nachdem also der protektive Effekt der HO-1 Inhibition beim Cholestaseschaden der Leber weder durch Modulation der Apoptose noch durch Abnahme des oxidativen Stresses zustande kommt, stellt sich die Frage nach alternativen HO-1-vermittelten Wirkungen. Ein Erklärungsmodell fände sich durch Beobachtungen von SANO und Mitarbeitern [SANO et al. 1997], die gezeigt haben, dass durch HO-1 Inhibition mittels ZnMP der Gallefluss inklusive die Ausscheidung

von toxischen Gallensäuren erhöht werden kann. Auch in eigenen, nicht in dieser Schrift dargestellten Versuchen, zeigte sich eine bis zu vierfach höhere Gallesekretion nach Gabe von SnMP. Es ist zu vermuten, dass durch die Hemmung der HO-1 und der damit verbundenen erhöhten Ausscheidung toxischer Gallensäuren deren Akkumulation nach BDL vermindert werden kann und somit deren Toxizität herabgesetzt wird. Es soll aber an dieser Stelle auch nicht unerwähnt bleiben, dass sich die Galleausscheidung nach Gabe von SnPP in einer anderen Studie nicht verändert hat [SIMIONATTO et al. 1985].

In den vorliegenden Untersuchungen konnte außerdem das typische HO-1 Expressionsmuster in der Leber unter Stressbedingungen bestätigt werden [BAUER et al. 1998]. Demzufolge kommt es unter (oxidativem) Stress in der Leber zu einer Umverteilung der HO-1 Expression von periportalen Kupferzellen zu Hepatozyten. Interessanterweise war die HO-1 Inhibition vergesellschaftet mit einer verminderten hepatozellulären Proliferation. Es mag sein, dass eine erhöhte HO-1 Expression in den Hepatozyten schädlich ist und dass deshalb die HO-1 Inhibition mit einer verminderten Schädigung und damit geringeren Proliferation einhergeht. Ob die Schädigung dabei, wie oben dargestellt, mit einer erhöhten Akkumulation von Gallensäuren oder aber einer eventuellen HO-1 abhängigen Eisenakkumulation einhergeht, kann anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht weiter eingegrenzt werden.

## 7.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lassen sich aus den durchgeführten Untersuchungen verschiedene Erkenntnisse gewinnen: Zum einen unterscheiden sich die verschiedenen Metalloporphyrine, die in der Literatur bisher scheinbar beliebig zur HO-1-Inhibition eingesetzt worden sind, hinsichtlich ihres Nebenwirkungsspektrums deutlich voneinander. Es konnte mit SnMP der für unsere Versuchsreihen geeigneteste HO-1-Inhibitor identifiziert werden, der sich im Vergleich zu den anderen Metalloporphyrinen durch die geringste Hepatotoxizität auszeichnete. CrMP dagegen führte zu deutlicher Leberzellschädigung und inflammatorischer Lokalreaktion.

Allerdings kann durch unsere Untersuchung nicht das komplette Nebenwirkungsspektrum der einzelnen Metalloporphyrine beurteilt werden. Um für Versuchsreihen, die sich mit anderen Organsystemen als der hepatobiliären Einheit befassen, den geeigneten da am wenigstens eigentoxischen HO-1-Inhibitor zu identifizieren, müssen noch weitere Untersuchungen folgen, die andere Schwerpunkte bei der Beurteilung unterschiedlicher Wirkweisen der einzelnen Metalloporphyrine setzen.

Die zweite wichtige Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die HO-1 zwar in vielen jedoch nicht in allen hepatischen Pathologien eine protektive Rolle einnimmt: In dem hier untersuchten Fall des cholestatischen Leberschadens zeigt sich deutlich, dass die Inhibition der HO-1-Aktivität zu einem signifikant verringerten Leberschaden führt. Dies konnte sowohl histologisch als auch serologisch sowie durch ein insgesamt verbessertes Outcome verifiziert werden. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen hinter der schädlichen Rolle der HO-1 im Modell der akuten Cholestase können durch unsere Untersuchungen nicht eruiert werden, am ehestens kommen jedoch modulative Einflüsse der HO-1-Endprodukte auf den intrahepatischen Gallefluss in Frage. Weitere Versuchsreihen zur Klärung des genauen Mechanismus müssen noch folgen.

Ob diese Erkenntnisse jedoch auch in den klinischen Alltag übertragen werden können, bleibt offen. Zwar ist theoretisch auch die therapeutische Umsetzung des hier dargestellten Sachverhalts möglich – die medikamentöse HO-1-Inhibition in einem Patienten mit schwerem cholestatischen Leberschadens – zuvor müssen jedoch noch zahlreiche Studien und Untersuchungsreihen durchgeführt werden: So ist in unseren Versuchen nur die Akutwirkung einer HO-1-Inhibition bei Cholestase untersucht worden, langfristige Effekte sind auch in der Literatur aktuell noch nicht bekannt. Ebenso müsste bei der klinischen Anwendung beachtet werden, welche Auswirkungen die HO-1-Inhibition auf andere im Körper stattfindenden Prozesse, Mechanismen oder gar parallel dazu bestehenden pathologischen Zuständen hat, da der HO-1 ja in den sehr vielen Konstellationen auch eine protektive Rolle zugeschrieben wird. Nicht zu vernachlässigen ist auch das teilweise toxische Nebenwirkungsprofil der Metalloporphyrine, welche einem klinischen Einsatz ebenfalls im Wege stehen könnten.



Trotz all dieser aktuell noch ungeklärten Punkte konnte die HO-1 in dieser Arbeit als wichtiges Enzym identifiziert werden, welches im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse einer akuten Cholestase endogen hochreguliert wird, damit wesentlich zur Manifestation des cholestatischen Leberschadens beiträgt und so in Zukunft bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte der Cholestase eine wichtige Rolle spielen kann.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15:831-845

Ahn H, Lindhagen J, Nilsson GE, Oberg PA, Lundgren O. Assessment of blood flow in the small intestine with Laser Doppler flowmetry. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21:863-870

Alam J, Caj J, Smith A. Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem.*, 1994 Jan 14;269(2):1001-9

Alexander B, Cottam H, Naftalin R. Hepatic arterial perfusion regulates portal venous flow between hepatic sinusoids and intrahepatic shunts in the normal rat liver in vitro. *Pflugers Arch* 2001; 443:257-264

Alexander B, Rogers C, Naftalin R. Hepatic arterial perfusion decreases intrahepatic shunting and maintains glucose uptake in the rat liver. *Pflugers Arch* 2002; 444: 291-298

Alrefei WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 2007 Oct;24(10):1803-23

Alpoim MC, Geraldés CF, Oliveira CR, Lima MC. Molecular mechanisms of chromium toxicity: oxidation of hemoglobin. *Biochem Soc Trans.* 1995 May;23(2):241S

American Academy of Pediatrics: Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004 Jul;114(1):297-316

Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito A, Shen X, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman C, Kolls J, Alam J, Ritter T, Volk H, Farmer D, Ghobral R, Busuttill R, Kupiec-Weglinski J. Up regulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 1999. 104:1631-39

Appleton SD, Chretien ML, Mclaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Brien JF, Nakatsu K, Maurice DH, Marks GS. Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metab Dispos.* 1999 Oct;27(10):1214-19

Armstrong CP, Dixon JM, Taylor TV, Davies GC. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. *Br J Surg* 1984; 71:234-238

Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol.* 1988 Apr;254(4 Pt 1):G471-6

Baer HU, Guastella T, Wheatley AM, Zimmermann A, Blumgart LH. Acute effects of partial hepatectomy on liver blood flow in the jaundiced rat. *J Hepatol* 1993; 19:377-382

Balla G, Vercellotti GM, Müller-Eberhard U, Eaton J, Jakob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest.* 1991 May;64(5):648-55

Balla G, Jacob H, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton J, Vercellotti G. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 1992 Sep 5;267(25):18148-53

Baranano D, Rao M, Ferris c, Snyder S. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Dec 10;99(25):16093-8

Bauer I, Wanner G, Rensing H, Alte C, Miescher E, Wolf B, Pannen B, Clemens M, Bauer M. Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 1998 Mar;27(3):829-38

Bauer C, Kuntz W, Ohnsmann F, Gasser H, Weber C, Redl H, Marzi I. The attenuation of hepatic microcirculatory alterations by exogenous substitution of nitric oxide by s-nitroso-human albumin after hemorrhagic shock in the rat. *Shock* 2004 Feb;21(2):165-9

Benz C, Angermüller S, Tox U, Kloters-Planchky P, Riedel HD, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodesocycholic acid on bile-acid-induced-apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol* 1998; 28:99-106

Berglund L, Angelin B, Blomstrand R, Drummond G, Kappas A. Sn-protoporphyrin lowers serum bilirubin levels, decreases biliary bilirubin output, enhances biliary heme excretion and potently inhibits hepatic heme oxygenase activity in normal human subjects. *Hepatology* 1988 May-Jun;8(3):625-31

Bird MA, Lange PA, Schrum LW, Grisham JW, Rippe RA, Behrns KE. Cholestasis induces murine hepatocyte apoptosis and DNA synthesis with preservation of the immediate-early gene response. *Surgery* 2002; 131:556-563

Bissell D, Hammaker L, Schmid R. Hemoglobin and erythrocyte catabolism in rat liver: the separate roles of parenchymal and sinusoidal cells. *Blood* 1972 Dec;40(6):812-22

Bloch EC. In vivo microscopic observations of the circulating blood in acute myocardial infarction. *Am J Med Sci.* 1955 Mar;229(3):280-94

Bohrer SL, Rogers EL, Koehler RC, Traystman RJ. Effect of hypovolemic hypotension and laparotomy on splanchnic and hepatic arterial blood flow in dogs. *Curr Surg.* 1981 Sep-Oct;38(5):325-8

Brüne B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 1987 Oct;32(4):497-504

Bühren V. Hohe Aortenblockade nach Trauma. Klinische Bedeutung und experimentelle Studie. Habilitationsschrift, Homburg 1989.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93

Caroli J. Les ictères par rétention: diagnostic medicochirurgical. Paris: Masson 1956.

Carter E, Hartsfield C, Miyazono M, Jakkula M, Morris K, McMurtry I. Regulation of heme oxygenase-1 by nitric oxide during hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:L346-L353

Chen y, Ginès P, Yang J, Summer S, Falk S, Russel N, Schrier R. Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 2004 Apr;39(4):1075-87

Cherqui D, Benoist S, Malassagne B, Humeres R, Rodriguez V, Fagniez PL. Major liver resection for carcinoma in jaundiced patients without preoperative biliary drainage. *Arch Surg* 2000; 135:302-308

Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162(1):156-9

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5

Chung HT, Choi BM, Kwon YG, Kim YM. Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO mediated antiapoptosis and antiinflammation. *Methods Enzymol* 2008; 441:329-338

Clouzeau-Girard H, Guyot C, Combe C, Moronvalle-Halley V, Housset C, Lamireau T, Rosenbaum J, Desmoulière A. Effects of bile acids on biliary epithelial cell proliferation and portal fibroblast activation using rat liver slices. *Lab Invest.* 2006 Mar;86(3):275-85

Daglar GO, Kama NA, Atli M, Yuksek YN, Reis E, Doganay M, Dolapci M, Kologlu M. Effect of 5-lipoxygenase inhibition on Kupffer cell clearance capacity in obstructive jaundiced rats. *J Surg Res* 2001; 96:158-162

Da Silva J, Morishita T, Escalante B, Staudinger R, Drummond G, Golgorsky M, Lutton J, Abraham N. Dual role of heme oxygenase in epithelial cell injury: contrasting effects of short-term and long-term exposure to oxidant stress. *J Lab Clin Med.* 1996 Sep;128(3):290-6

Deitch EA, Sittig K, Li M, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg.* 1990 Jan;159(1):79-84

Diamond T, Dolan S, Thompson RL, Rowlands BJ. Development and reversal of endotoxemia and endotoxin-related death in obstructive jaundice. *Surgery* 1990 Aug;108(2):370-4

Dixon JM, Armstrong CP, Duffy SW, Davies GC. Factors affecting morbidity and mortality after surgery for obstructive jaundice: a review of 373 patients. *Gut* 1983; 24:845-852

Drummond GS, Kappas A. Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 Oct;78(10):6466-70

Drummond GS, Galbraith RA, Sardana MK, Kappas A. Reduction of the C2 and C4 vinyl groups of Sn-protoporphyrin to form Sn-mesoporphyrin markedly enhances the ability of the metalloporphyrin to inhibit in vivo heme catabolism. *Arch Biochem Biophys.* 1987 May 15;255(1):64-74

Eipel C, Eisold M, Schütt H, Vollmar B. Inhibition of heme oxygenase-1 protects against tissue injury in carbon tetrachloride exposed livers. *J Surg Res.* 2007 May 1;139(1):113-20

Eisenstein R, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 Feb 1;88(3):688-92

Farombi EO, Surh Y. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol.* 2006 Sep 30;39(5):479-91

Ferrero A, Viganò L, Polastri R, Muratore A, Eminefendic H, Regge D, Capussotti L. Postoperative liver function and future remnant liver: where is the limit? Results of a prospective study. *World J Surg* 2007; 31:1643-1651

Ferris C, Jaffrey S, Sawa A, Takahashi M, Brady S, Barrow R, Tysoe S, Wolosker H, Baranano D, Dore S, Poss K, Snyder S. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol.* 1999 Jul;1(3):152-7

Flores O, Criado M, Sanchez-Rodriguez A, Hidalgo F, Collia F, Lopez-Novoa J, Esteller A. Relationships between NOS2 and HO-1 in liver of rats with chronic bile duct ligation. *Hepatology Research* 2005; 32:58-65

Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. Heme oxygenase/carbon monoxide biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br J Pharmacol* 2006; 149:345-354

Froh M, Conzelmann L, Walbrun P, Netter S, Wiest R, Wheeler M, Lehnert M, Uesugi T, Scholmerich J, Thurman R. Heme oxygenase-1 overexpression increases

liver injury after bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol.* 2007 Jul 7;13(25):3478-86

Gehring S, Dickson E, San Martin M, Van Rooijen N, Papa E, Harty M, Tracy T, Gregory S. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006 Mar;130(3):810-22

Gelman SI. Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. *Arch Surg* 1976 Aug;111(8):881-3

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 May;95(5):646-56

Geuken E, Buis C, Visser D, Blokzijl H, Moshage H, Nemes B, Leuvenink H, Jong K, Peeters P, Slooff M, Porte R. Expression of Hem-Oxygenase-1 in Human Livers Before Transplantation Correlates with Graft Injury and Function after Transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Aug; 5(8):1875-85

Geumei AM, Mahfouz M, Aboul-Enein A. Intrahepatic vascular pathways: Hepatic arterioportal shunt. *J Surg Res* 1968; 8:463-470

Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998 Feb; 101(3), 604-612

Greenbaum NL, Kappas A. Distribution of metalloporphyrin inhibitors of heme oxygenase among serum transport proteins. *Pharmacology* 1994 Oct;49(4):205-14

Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaescheke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 2003 Aug; 38(2):355-63

Gujral JS, Liu J, Farhood A, Hinson JA, Jaeschke H. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G499-G507

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

Gumucio JJ, Miller DL, Krauss MD, Zanolli CC. Transport of fluorescent compounds into hepatocytes and the resultant zonal labeling of the hepatic acinus in the rat. *Gastroenterology* 1981 Apr;80(4):639-46

Gush RJ, King TA, Jayson MI. Aspects of laser light scattering from skin tissue with application to laser Doppler blood flow measurement. *Phys Med Biol* 1984; 29:1463-1476

Haga Y, Tempero M, Zetterman R. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1996 May 24;1316(1):29-34

Hajdena-Dawson M, Zhang W, Contag P, Wong R, Vreman H, Stevenson D, Contrag C. Effects of metalloporphyrins on heme oxygenase-1 transcription: correlative cell culture assays guide in vivo imaging. *Molecular Imaging* 2003; 2:138-149

Hamilton JW, Wetterhahn KE. Chromium (VI)-induced DNA damage in chick embryo liver and blood cells in vivo. *Carcinogenesis* 1986 Dec;7(12):2085-8

Harris AG, Sinitsina I, and Messmer K. Quantitative analysis of orthogonal polarization spectral images. Validation in the hamster dorsal skinfold chamber. *Prog Appl Microcirc Basel* 2000; 24:21-31

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leucocyte adhesion elicited by oxidative stress: Role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999; 85:663-671

Herold G und Mitarbeiter. *Lehrbuch der Inneren Medizin* 2005; 440-2

Hintz SR, Vreman HJ, Stevenson DK. Mortality of metalloporphyrin-treated neonatal rats after light exposure. *Dev Pharmacol Ther.* 1990;14(3):187-92

Hofmann AF. Cholestatic liver disease: pathophysiology and therapeutic options. *Liver* 2002;22 Suppl 2:14-9

Hsia FY, Allen SH, Gellis SS, Diamond LK. Erythroblastosis fetalis. VIII. Studies of serum bilirubin in relation to Kernicterus. *N Engl J Med* 1952 Oct 30;247(18):668-71

Hyogo H, Tazuma S, Kajiyama G. Biliary excretory function is regulated by canalicular membrane fluidity associated with phospholipid fatty acyl chains in the bilayer: implications for the pathophysiology of cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000 Aug;15(8):887-94

Ischiropoulos H, Beers M, Ohnishi S, Fisher D, Garner S, Thom S. Nitric oxide production and perivascular nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. *J Clin Invest* 1996 May 15;97(10):2260-7

Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003; 125:1246-1257

Johansson K, Jakobsson A, Lindahl K, Lindhagen J, Lundgren O, Nilsson GE. Influence of fibre diameter and probe geometry on the measuring depth of laser Doppler flowmetry in the gastrointestinal application. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991; 10:219-229

Johnstone JM, Lee EG. A quantitative assessment of the structural changes the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *Brit. J Exp Pathol* 1976 Feb;57(1):85-94

Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* 1989 Jul;69(3):708-64

Kappas A, Drummond GS, Manola T, Petmezaki S, Valaes T. Sn-protoporphyrin use in the management of hyperbilirubinemia in term newborns with direct Coombs-positive ABO incompatibility. *Pediatrics* 1988 Apr;81(4):485-97

Kadoya C, Domino EF, Yang GY, Stern JD, Betz AL. Preischemic but not postischemic zinc protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1995; 26:1035-1038

Kato Y, Shimazu M, Kondo M, Uchida K, Kumamoto Y, Wakabayashi G, Kitajima M, Suematsu M. Bilirubin rinse: a simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology* 2003; 38:364-373

Keyse S, Tyrrell R. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci* 1988 Jan; 86:99-103

Klar E, Kraus T, Osswald BR, Bleyl J, Fernandes L, Mehrabi A, Newman W, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G. Induction of impaired microcirculation by in situ hilus preparation in liver explantation. *Zentralbl Chir* 1995;120(6):482-5

Knisely MH: Microscopic observations of the circulatory conditions in living frog liver lobules. *Anat Rec* 1939;73:269-270

Koepfel TA, Trauner M, Baas JC, Thies JC, Schlosser SF, Post S, Gebhard MM, Herfarth C, Boyer JL, Otto G. Extrahepatic biliary obstruction impairs microvascular perfusion and increases leukocyte adhesion in rat liver. *Hepatology* 1997; 26:1085-1091

Kozma F, Johnson RA, Zhang F, Yu C, Tong X, Nasjletti A. Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *Am J Physiol* 1999 Apr;276(4 Pt 2):R1087-94

Krähenbühl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995; 22:607-612

Kubulus D, Mathes A, Pradarutti S, Raddatz A, Heiser J, Pavlidis D, Wolf B, Bauer I, Rensing H. Hemin arginate-induced heme oxygenase 1 expression improves liver microcirculation and mediates an anti-inflammatory cytokine response after hemorrhagic shock. *Shock* 2008 May;29(5):583-90

Kyokane T, Norimizu S, Tani H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M. Carbon monoxide from heme catabolism



protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated liver. *Gastroenterology* 2001; 120:1227-40

Lang F, Pathophysiologie und Pathobiochemie. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1990: 308-13; 340-5

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids. Res.* 1993; 21: 3761-3766.

Lehmann C. Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikroirkulation bei Endotoxinämie. Habilitationsschrift, Heidelberg 2001; Kap.6:24-26

Leroyer C, Dewitte JD, Bassanets A, Boutoux M, Daniel C, Clavier J. Occupational asthma due to chromium. *Respiration* 1998;65(5):403-5

Li Z, Mizuno S, Nakamura T. Antinecrotic and antiapoptotic effects of hepatocyte growth factor on cholestatic hepatitis in a mouse model of bile-obstructive diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:G639-G 646

Liu H, Song D, Lee SS. Role of heme oxygenase-carbon monoxide pathway in pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G68-G74

Longnecker DE, Seyde WC. Anesthetic regimes: Advantages and disadvantages. In *Microcirculatory technology* (Eds. Baker CH, Nastuk WL), Academic Press, Orlando 1986; 343-365

Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 2001 Jan;59(1):185-92

Luo D, Vincent SR. Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation in vivo. *Eur J Pharmacol* 1994 May 17;267(3):263-7

Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem.* 1986 Jan 5;261(1):411-9

Maines MD. Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions. CRC Press, Boca Raton, FL 1992

Maines MD, Gibbs P. 30 some years of heme oxygenase: From a „molecular wrecking ball“ to a „mesmerizing“ trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Dec 9; 338(1):568-77

Martinez JC, Garcia HO; Otheguy LE, Drummond GS, Kappas A. Control of severe hyperbilirubinemia in full-term newborns with the inhibitor of bilirubin production Sn-mesoporphyrin. *Pediatrics* 1999 Jan;103(1):1-5

Matsui O, Kawamura I, Takashima T. Occurance of an intrahepatic porto-arterial shunt after hepatic artery embolization with Gelfoam powder in rats and rabbits. *Acta Radiol Diagn* 1986; 27:119-122

McCarter SD, Akeyea TG, Lu X, Bihari A, Scott JR, Badhwar A, Dungrey AA, Harris K, Feng Q, Potter RF. Endogenous heme oxygenase induction is a critical mechanism attenuating apoptosis and restoring microvascular perfusion following limb ischemia/reperfusion. *Surgery* 2004; 136:67-75

Mc Coubrey W, Huang T, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997 Jul 15;247(2):725-32

Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res.* 1991;23(3-4):158-69

Misra M, Alcedo JH, Wetterhahn KE. Two pathways for chromium(VI)-induced DNA damage in 14 day chick embryos: Cr-DNA binding in liver and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in red blood cells. *Carcinogenesis* 1994 Dec;15(12):2911-7

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

Moncure M, Chen L, Childs EW, Smally D, Udobi KF, Cheung LY. Heme-oxygenase-1 mRNA expression affects hemorrhagic shock-induced leucocyte adherence. *J Trauma* 2003; 55:118-123

Morioka I, Wong RJ, Abate A, Vreman HJ, Contag CH, Stevenson DK. Systemic effects of orally-administered zinc and tin (IV)metalloporphyrins on heme oxygenase expression in mice. *Pediatr Res* 2006 May;59(5):667-72

Nayak NC, Sathar SA, Mughal S, Duttgupta S, Mathur M, Chopra P. The nature and significance of liver cell vacuolation following hepatocellular injury--an analysis based on observations on rats rendered tolerant to hepatotoxic damage. *Virchows Arch* 1996 Aug;428(6):353-65

Ott MC, Scott JR, Bihari A, Badhwar A, Otterbein LE, Gray DK, Harris KA, Potter RF. Inhalation of carbon monoxide prevents liver injury and inflammation following hind limb ischemia. *FASEB J* 2005; 19:106-108

Otterbein L, Bach F, Alam J, Soares M, Tao L, Wysk M, Davis R, Flavell R, Choi A. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):422-8

Pannen B, Kohler N, Hole B, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 1998, 102:1220-1228

Patel T, Gorges GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21:1725-1741

Petrache I, Otterbein L, Alam J, Wiegand G, Choi A. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 Feb;278(2):L312-9

Popper H. Cholestasis: the future of a past and present riddle. *Hepatology* 1981; 1(2):187-91

Putzki H, Reichert B: Die Aktivitaet der Serumcholinesterase nach experimenteller Choledochusligatur an der Ratte. *Z Gesamte Inn Med* 1991; 46: 524-525

Rappaport AM. The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec* 1958 Apr;130(4):673-89

Rappaport AM. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 1973 Sep;6(2):212-28

Rappaport AM. Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat* 1977; 16:116-120

Rensing H, Bauer I, Datene V, Pätou C, Pannen BH, Bauer M. Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med* 1999; 27:2766-2775

Rensing H, Bauer I, Zhang JX, Paxian M, Pannen BH, Yokoyama Y, Clemens MG, Bauer M. Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. *Hepatology* 2002 Dec;36(6):1453-65

Reynolds JV, Murchan P, Redmond HP, Watson RW, Leonhard N, Hill A, Clarke P, Marks P, Keane FB, Tanner WA. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. *Br J Surg* 1995; 82:534-538

Richter S: Die „hepatic arterial buffer response“ (HABR) bei Leberzirrhose, Pneumoperitoneum und Leberresektion. Makrohämodynamische und mikrovaskuläre Untersuchungen der Leberdurchblutung unter physiologischen und patho-physiologischen Bedingungen. Habilitationsschrift, Homburg, 2008.

Rodgers PA, Seidman DS, Wei PL, Dennery PA, Stevenson DK. Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996 Jun;39(6):1041-9

Ronholm E, Bäckman L, Friman S, Karlsten KL, Mjörnstedt L, Olausson M, Aneman A. Endoluminal laser-Doppler measurements of jejunal perfusion in patients undergoing liver transplantation. *Transpl Int* 2001; 14:24-30

Sammur I, Foresti R, Clark J, Exon D, Vesely M, Sarathchandra P, Green C, Motterlini R. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br J Pharmacol* 1998 Dec;125(7):1437-44

Sano T, Shiomi M, Wakabayashi Y, Shinoda Y, Goda N, Yamaguchi T, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M. Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1997 May;272(5 Pt 1):G1268-75

Sardana MK, Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: Tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2464-2468

Sass G, Soares M, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003; 38:909-918

Schmucker DL, Ohta M, Kanai S. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990 Nov;12(5):1216-21

Seyde WC, McGowan L, Lund N, Duling B, Longnecker DE: Effects of anaesthetics on regional hemodynamics in normovolemic and hemorrhaged rats. *Am J Physiol* 1985; 249:H164-H173

Shelnutt SR, Goad P, Belsito DV. Dermatological toxicity of hexavalent chromium. *Crit Rev Toxicol* 2007 Jun;37(5):375-87

Shibayama J. Factors producing bile infarction and bile duct proliferation in biliary obstruction. *J Pathol* 1990 Jan;160(1):57-62

Shinoda Y, Suematsu M, Wakabayashi Y, Suzuki T, Goda N, Yamaguchi T, Saito S, Ishimura Y. Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 1998 Aug;28(2):286-95

Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, Chaturvedi UC. Effects of chromium on the immune system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002 Sep 6;34(1):1-7

Silbernagel S, Lang F. Taschenatlas der Pathophysiologie. Thieme Verlag, 1998; 168-9

Simionatto CR, Anderson KE, Drummond GS, Kappas A. Studies on the mechanism of Sn-Protoporphyrin suppression of hyperbilirubinemia. *J Clin Invest* 1985; 75:513-521

Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. Antioxidant defenses in the bile duct ligated rat. *Gastroenterology* 1992; 103:1625-1629

Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000 Jul;385(4):290-8

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987 Feb; 235(4792):1043-6

Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995 Nov;96(5):2431-7

Sun Y, Rotenberg MO, Maines MD. Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem* 1990 May 15;265(14):8212-7

Suttner D, Dennery P. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 1999 Oct;13(13):1800-9

Swain MG, Tjandra K, Kanwar S, Kubes P. Neutrophil adhesion is impaired in a rat model of cholestasis. *Gastroenterology* 1995; 109:923-932

Symeonidis A, Trams EG. Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct. *Am J Pathol* 1957 Jan-Feb;33(1):13-27

Tenhunen R, Marver H, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968 Oct;61(2):748-55

Tenhunen R, Marver H, Schmid R. Microsomal Heme Oxygenase – Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969 Aug; 244 (23): 6388-6394

Tenhunen R, Marver H, Pimstone N, Trager W, Cooper D, Schmid R . Enzymatic degradation of heme. Oxygenative cleavage requiring cytochrome P-450. *Biochemistry* 1972; 11:1716-1720

Teran FJ, Johnson RA, Stevenson BK, Peyton KJ, Jackson KE, Appleton SD, Durante W, Johnson FK. Heme oxygenase-derived carbon monoxide promotes arteriolar endothelial dysfunction and contributes to salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 Mar;288(3):R615-22

Thomson JG, Kerrigan CL. Hydrogen clearance: assessment of technique for measurement of skin-flap blood flow in pigs. *Plast Reconstr Surg* 1991 Oct;88(4):657-63

Toyota N, Miayi K, Hardison WG. Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular tight junction. *Lab Invest* 1984 May;50(5):536-42

Tracy TF, Bailey PV, Goerke ME, Sotelo-Avila C, Weber TR. Cholestasis without cirrhosis alters regulatory liver gene expression and inhibits hepatic regeneration. *Surgery* 1991; 110:176-183

Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The non inducible isoform. *J Biol Chem* 1986 Aug 25;261(24):11131-7

Tsui T, Lau C, Ma J, Glockzin G, Obend A, Schlitt H, Fan S. Adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer suppresses the progression of micronodular cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol* 2006 April 7; 12(13):2016-23

Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Anal* 1992;75(3):421-30.

Vreman HJ, Gillman MJ, Stevenson DK. In vitro inhibition of adult rat intestinal heme oxygenase by metalloporphyrins. *Pediatr Res* 1989 Oct;26(4):362-5

Vreman HJ, Lee OK, Stevenson DK. In Vitro and In Vivo characteristics of a heme oxygenase inhibitor: ZnBG. *Am J Med Sci* 1991 Dec; 302(6):335-41

Vreman HJ, Ekstrand BC, Stevenson DK. Selection of metalloporphyrin heme oxygenase inhibitors based on potency and photoreactivity. *Pediatr Res* 1993 Feb;33(2):195-200

Wunder C, Brock R, McCarter S, Bihari A, Harris K, Eichelbronner O, Potter RF. Inhibition of haem oxygenase activity increases leukocyte accumulation in the liver following limb ischaemia/reperfusion in mice. *J Physiol* 2002. 540:1013-21

Wunder C, Potter RF. The heme oxygenase system: Its Role in Liver Inflammation. *Curr Drug Targ* 2003 Sep;3(3):199-208

Yang ZF, Tsui TY, HO DW, Tang TC, Fan ST. Heme oxygenase-1 potentiates the survival of small for size liver graft. *Liver Transpl* 2004; 10:784-793

Yet SF, Pellacani A, Patterson C, Tan L, Folta SC, Foster L, Lee WS, Hsieh CM, Perrella MA. Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 7:4295-4301

Yoshida T, Kikuchi G. Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *J Biol Chem* 1978 25; 253(12):4230-6

Yoshioka K, Mori A, Taniguchi K, Mutoh. Cell proliferation activity of proliferating bile duct after bile duct ligation in rats. *Vet Pathol* 2005; 42:382-385

Zhang J, Piantadosi CA. Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J Clin Invest* 1992 Oct;90(4):1193-9

---

Zhang F, Kaide J, Wey J, Yiang H, Yu C, Balazy M, Abraham NG, Wang W, Nasjletti A. Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Jul;281(1):H350-8

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne deren tatkräftige Unterstützung und Hilfe das Entstehen dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre:

Besonderer Dank gebührt *Herrn Prof. Dr. Michael Menger*, Direktor des Institutes für Experimentelle Chirurgie in Homburg, für die stete Förderung unserer gesamten Arbeitsgruppe, für seine kreativen Denkanstöße und weiterführenden Ideen und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für uns hatte.

Außerdem natürlich ein besonderes Danke an *Herrn Dr. med. Stefan Scheingraber*, jetzigen Chefarzt der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Cham, der als Oberarzt der Allgemein Chirurgie in Homburg damals unsere Arbeitsgruppe ins Leben gerufen hat: Auf seine unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie Unterstützung bei der Versuchsplanung, - durchführung sowie der Interpretation der Ergebnisse konnte ich stets zählen. Danke für diese hervorragende und intensive Betreuung während der gesamten Dissertation.

Auch bei den anderen Doktoranden meiner Arbeitsgruppe *Fr. cand. med. Simone Goger*, *Fr. cand. med. Susanne Matt* und *Hr. cand. med. David Bardens* sowie *Hr. Dr. med. Sven Messner* möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, den Teamgeist und die stetige gegenseitige Unterstützung bedanken. Im Labor konnten wir jederzeit auf die Hilfe von *Fr. Dr.rer.med. Claudia Scheurer*, *Fr. J. Becker* und *Fr. E. Gluding* bei der Aufarbeitung der histologischen Proben und allen sonstigen anfallenden Problemen zählen. Danke auch an alle übrigen Mitarbeiter des Institutes, die uns stets hilfsbereit zur Seite waren.

Zu guter Letzt auch ein herzliches Danke an meine Familie, die mich während all dieser Jahre sowohl finanziell als auch moralisch stets unterstützt hat, ohne mich jemals unter Druck zu setzen, sowie an alle Freunde, die mir während der oft sehr freizeitraubenden Versuche doch stets zur Seite standen.



## 10 PUBLIKATIONEN

### ORIGINALPUBLIKATIONEN

---

- 01/2009 *Inhibition of hemoxygenase-1 improves survival after liver resection in jaundiced rats.*  
Scheingraber S, Bauer M, Bauer I, Bardens D, Abel K, Horn AK, Schilling MK, Wolff M  
Eur Surg Res. 2009;42(3):157-67. Epub 2009 Jan 29.
- 05/2009 *Metalloporphyrins, used for HO-1 inhibition, themselves affect hepatic microcirculation, liver function, and hepatocellular integrity.*  
Scheingraber S, Messner S, Matt S, Abel K, Goger S, Kötner K, Schilling MK, Menger MD  
Microcirculation. 2009 May;16(4):355-63. Epub 2009 Mar 18

### KONGRESSBEITRÄGE

---

- 09/2006 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten:  
*„Der Bilirubinanstieg bei Verschlussikterus ist teilweise bedingt durch eine stressinduzierte Induktion der HO-1“*  
Scheingraber S, Menger MD, Messner S, Abel K, Goger S, Schilling MK
- 05/2007 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie:  
*„Hämoxygenase-1 führt zu endogener Bilirubinproduktion und trägt zur Manifestation des Leberschadens bei.“*  
Abel K, Scheingraber S, Matt S, Messer S, Goger S, Schilling MK, Menger MD  
Chirurgisches Forum 2007, Band 36, 213-214
- „Vergleich dreier Metalloporphyrine bezüglich ihrer hämodynamischen Auswirkungen und Inhibition der Hämoxygenase-Aktivität“*  
Messner S, Scheingraber S, Matt S, Abel K, Goger S, Schilling MK, Menger MD  
Chirurgisches Forum 2007, Band 36, 233-234

# 11 LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name	Kathrin Abel
Geburtsdatum	10. Mai 1982
Geburtsort	Augsburg
Eltern	Walburga Abel, geb. Bader Bernhard Abel
Familienstand	Ledig

## SCHULAU SBILDUNG

---

1988 – 1992	Besuch der Luitpold-Grundschule, Mering
1992 – 2001	Besuch des Wernher-von-Braun-Gymnasiums, Friedberg
07/2001	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

## STUDIUM

---

2001-2003	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
09/2003	Physikum
09/2003 - 07/2004	Studium der Humanmedizin an der Universität de Valencia (Spanien) im Rahmen des ERASMUS-Austauschprogrammes
09/2004 – 08/2006:	Fortsetzung des Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,
08/2006 – 08/2007	Praktisches Jahr: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Manchester Royal Infirmary, Manchester (Großbritannien), Department of Surgery</li><li>2. Universitätsklinik Homburg, Klinik für Innere Medizin</li><li>3. Hospital Pirovano, Buenos Aires (Argentinien), Departamente de Ginecología y Obstetricia</li></ol>

05/2008                    2. Ärztliche Prüfung

#### DISSERTATION

---

07/2004                    Beginn der Promotinosarbeit im Institut für Klinisch-  
Experimentelle Chirurgie an der Universität des  
Saarlandes, Leitung: Prof. Dr. med. M. Menger,  
Betreuung: Dr. med. S. Scheingraber

#### WEITERBILDUNG

---

seit 07/2008              Assistenzärztin an der Universitäts-Frauenklinik  
Homburg zur Weiterbildung in der Fachrichtung  
Gynäkologie und Geburtshilfe